

# Kinetika reakcija kvercetina i DPPH radikala

---

**Murković, Dorotea**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2022**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:707067>

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

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



*Repository / Repozitorij:*

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



**Dorotea Murković**

# **Kinetika reakcije kvercetina i DPPH radikala**

## **DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2022.

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. Cvijete Jakobušić Brala.

## Zahvala

*Mentorici, docentici Cvijeti Jakobušić Brala na ukazanoj pomoći i strpljenju prilikom izrade ovog diplomskog rada.*

*Mojim roditeljima koji su mi omogućili bezbrižne studentske dane.*

*Zakladi Mikec na ukazanom povjerenju i financijskoj potpori tijekom studiranja.*

***„Kome je god mnogo dano, od njega će se mnogo iskati. Kome je mnogo povjereno, više će se od njega iskati.“***

***Lk 12,48***

## SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Antioksidativna aktivnost.....	1
1.1.1. Mjerenje antioksidativne aktivnosti.....	4
1.1.1.1. DPPH test antioksidativne aktivnosti.....	7
1.2. Flavonoidi.....	9
1.2.1. Kvercetin.....	11
1.2.2. Katehin.....	12
1.2.3. Mehanizam reakcije kvercetina i DPPH•.....	13
1.3. Kemijska kinetika.....	15
1.3.1. Brzina kemijske reakcije.....	15
1.3.2. Zakoni za brzinu kemijske reakcije.....	16
1.3.3. Kinetički izotopni efekt.....	18
1.4. UV-VIS spektrofotometrija.....	19
1.5. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti.....	20
2. OBRAZLOŽENJE TEME.....	22
3. MATERIJALI I METODE.....	23
3.1. Kemikalije, instrumenti i laboratorijski pribor.....	23
3.2. Mjerenje konstante brzine reakcije kvercetina i DPPH• te reakcije katehina i DPPH•.....	24
3.3. HPLC analiza reakcije kvercetina i DPPH• te reakcije katehina i DPPH• u otapalima metanolu i dioksanu.....	26
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	28
4.1. Konstanta brzine reakcije kvercetina i DPPH• u smjesi otapala dioksan-voda (0,99: 0,01 v/v).....	28
4.2. Kinetički izotopni efekt reakcije kvercetina i DPPH• u smjesi otapala dioksan-voda (0,99:0,01 v/v) na 620 nm.....	39
4.3. Konstanta brzine reakcije kvercetina i DPPH• u metanolu.....	43
4.4. Konstanta brzine reakcije katehina i DPPH• u metanolu.....	46
4.5. HPLC analiza reakcije kvercetina i DPPH• te reakcije katehina i DPPH• u otapalu metanolu i dioksanu.....	48
5. ZAKLJUČAK.....	54

6. POPIS KRATICA OZNAKA I SIMBOLA.....	55
7. LITERATURA.....	56
8. SAŽETAK/ SUMMARY .....	61
8.1. Sažetak.....	61
8.2. Summary.....	62
9. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD .....	63

# 1. UVOD

## 1.1. Antioksidativna aktivnost

Antioksidansi su tvari koje mogu inhibirati oksidacijski stres i prevenirati molekularna oštećenja (Galano i sur., 2016). Oksidacijski stres posljedica je neravnoteže u nastajanju i potrošnji oksidiranih specija (Sayre i sur., 2008) i često uključuje reakcije između slobodnih radikala i molekula koje su od iznimne fiziološke važnosti: lipida, proteina, DNA. Antioksidansi su u mogućnosti inhibirati štetno djelovanje oksidacijskog stresa koristeći različite mehanizme, inhibicija može biti enzimska i neenzimska (Galano i sur., 2016).

Slobodni radikali su specije koje sadrže jedan ili više nesparenih elektrona. Zbog nesporenog elektrona radikal je vrlo nestabilan i reaktivan. Radikali mogu reagirati s drugim radikalima ili neradikalnim molekulama pri čemu nastaju novi radikali, koji opet mogu dalje reagirati, što je osnova mnogih kemijskih lančanih reakcija. Najčešći radikali u organizmu su reaktivne kisikove specije (ROS) ili reaktivne dušikove specije (RNS). U ROS ubrajamo superoksidni anionski radikal ( $O_2^{\bullet-}$ ), hidroksi radikal ( $\bullet OH$ ), alkoksi radikal ( $RO\bullet$ ) i hidroperoksi radikal ( $HOO\bullet$ ). U RNS ubrajamo peroksinitratni radikal ( $ONOO^{\bullet-}$ ), dušikov monoksid radikal ( $NO\bullet$ ) i dušikov dioksid radikal ( $NO_2\bullet$ ) (Galano i sur., 2016).

Antioksidansi djeluju protuupalno (Parhiz i sur., 2015), antibakterijski (Widsten i sur., 2014), antivirusno (Panchal i sur., 2012), kardioprotektivno (Tinkel i sur., 2012) i neuroprotektivno (Danta i Piplani, 2014). Upravo ti mehanizmi djelovanja temelj su potencijalnog terapijskog djelovanja antioksidansa na kardiovaskularne bolesti (Tinkel i sur., 2015), karcinom (Roleira i sur., 2015), dijabetes (Marrazo i sur., 2014), osteoporozi (Yan i sur., 2014), artritis (Vyaskh i sur., 2014), kataraktu (Sunkireddy i sur., 2013).

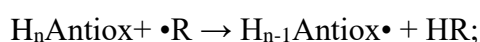
U hrani je prisutno veliko mnoštvo raznih prirodnih antioksidansa. Među njima nalazimo i fenole koji uključuju više od 8000 različitih spojeva, svi oni u svojoj strukturi sadrže fenolnu skupinu. Klasifikacija takvih spojeva ovisi o broju fenolnih podjedinica: jednostavni fenoli sadrže jednu fenolnu podjedinicu (npr. fenolne kiseline), polifenoli sadrže dvije fenolne jedinice (npr. flavonoidi), a svi ostali fenoli se ubrajaju u fenole koji sadrže više flavonoidnih jedinica. Flavonoidi su polifenoli čiju osnovnu strukturu gradi flavonska (2-fenil- benzo- $\gamma$ -

piran) jezgra. Flavonsku jezgru grade dva benzenska prstena (A i B) povezana piranskim prstenom koji sadrži kisik (Galano i sur., 2016).

S obzirom na način djelovanja antioksidansi se mogu podijeliti na primarne i sekundarne (Chaiyasit i sur., 2007). Primarni antioksidansi su one kemijske specije koje sprječavaju oksidaciju tako što uklanjaju slobodne radikale. Primarni antioksidansi izravno reagiraju sa slobodnim radikalima pri čemu se stvara izrazito manje reaktivna specija te se prekida lančana reakcija. Sekundarni antioksidansi usporavaju oksidacijski proces indirektnim putem: keliranjem metala, razgradnjom hidrogen peroksida do neradikalnih specija, redukcijom oksidiranih primarnih antioksidansa (Galano i sur., 2016).

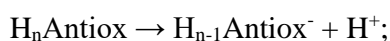
Reakcijski mehanizmi djelovanja primarnih i sekundarnih antioksidansa ovise o strukturi i drugim svojstvima samog antioksidansa. Kada antioksidans (A) reagira s vrlo reaktivnim radikalom (R•) on sam postaje radikal (A•). Struktura prirodnih fenola omogućuje nastajanje stabilnog i manje reaktivnog radikala A• (Leopoldini i sur., 2011).

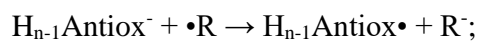
Najčešći mehanizmi antioksidativnih reakcija polifenola su: HAT (reakcija prijelaza atoma vodika, engl. *Hydrogen-Atom Transfer*), PCET (reakcija spregnutog prijelaza elektrona i protona, engl. *Proton-Coupled Electron Transfer*), SPLET (reakcija uzastopnog prijelaza protona i elektrona, engl. *Sequential Proton-Loss Electron-Transfer*) i SEPT (reakcija uzastopnog prijenosa elektrona i protona, engl. *Sequential Electron Proton Transfer*). Važno je napomenuti da HAT, PCET, SPLET i SEPT reakcijski mehanizmi daju isti te da ih je teško razlikovati (Galano i sur., 2016). HAT i PCET su reakcijski mehanizmi u kojima dolazi do prijelaza elektrona i protona u jednom reakcijskom stupnju:



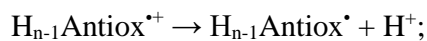
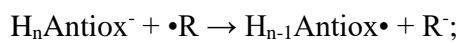
HAT je reakcijski mehanizam u kojem se dolazi do prijelaza elektrona i protona zajedno (prijelaz vodikova atoma), kod PCET-a dolazi do prijelaza elektrona i protona u jednom koraku, ali oni prelaze odvojeno.

SPLET je reakcijski mehanizam u kojem se prijelaz elektrona i protona odvija uzastopno.





SEPT kao i SPLET mehanizam uključuje prijelaz elektrona i prijelaz protona, ali u obrnutom redosljedu u odnosu na SPLET.



SPLET je prepoznat kao ključan mehanizam kojim (poli)fenoli uklanjaju radikal u polarnom mediju u mnogim istraživanjima (Galano i sur., 2016). Cao i sur. (Cao i sur., 2014) predlažu HAT kao ključan reakcijski mehanizam za polifenole, dok Amić i sur. (Amić i sur., 2014) kao glavni reakcijski mehanizam predlažu PCET.



### 1.1.1. Mjerenje antioksidativne aktivnosti

Metode za mjerenje antioksidativne aktivnosti su iznimno napredovale u zadnjih nekoliko desetljeća. Prve korištene metode mjerile su učinkovitost antioksidansa tako što su pratile nastanak oksidacijskih produkata (često se pratila oksidacija lipida). Za procjenu antioksidativne aktivnosti danas se koriste mnoge kemijske metode visoke osjetljivosti i automatizirane metode detekcije. Oksidacijski supstrati su također napredovali od nekadašnjih modela hrane do kemijskih spojeva, bioloških materijala, staničnih linija, tkivnih linija. Metode za mjerenje antioksidativne aktivnosti opisane su u nastavku, a razlikuju se u oksidacijskom supstratu, oksidansima, reakcijskim mehanizmima reakcije na kojoj se zasniva metoda, metodi detekcije i načinu prikazivanja rezultata (Shahdi i Ying, 2015).

Veliki broj metoda dostupan je za izravno mjerenje reakcija prijenosa vodikova atoma ili elektrona s potencijalnog antioksidansa na slobodni radikal u jednostavnom sustavu bez lipida. Ova grupa metoda povezuje antioksidativnu aktivnost s kapacitetom uklanjanja radikala. Nedostatak metode je da su neki od radikala koji se koriste biološki irelevantni te samim time metoda ne prikazuje pravo stanje u *in vivo* situaciji. Međutim, na ovaj način utvrđena antioksidativna aktivnost daje važne informacije o intrinzičnom antioksidativnom potencijalu antioksidansa. Ove metode zahtijevaju ne lipidni supstrat jer radikali mogu reagirati s lipidima i obično sadrže sustav koji uključuje oksidans (slobodni radikal), oksidativnu probu te antioksidans. Ove metode mogu se podijeliti u dvije skupine prema reakcijskom mehanizmu reakcije: metode koje se zasnivaju na prijelazu atoma vodika (HAT) i metode koje se zasnivaju na prijelazu elektrona (ET) (Prior i sur., 2005).

Za detekciju koriste se različite metode: spektrofotometrija, fluorometrija, kemifluoroscencija, EPR (elektromagnetska paramagnetska rezonancija), FT-IR (infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom), NMR (nuklearna magnetska rezonancija), amperometrija. Metode su jednostavne, brze, automatizirane i često korištene (Shahdi i Ying, 2015).

Antioksidativnu aktivnost je moguće procijeniti i na temelju redukcijskog potencijala antioksidansa, koji je moguće odrediti uz primjenu cikličke voltametrije (Shahdi i Ying).

Ove metode ubrajaju se u ET-bazirane metode (Shahdi i Ying, 2015).

**Tablica 1.1.1.1.** Prikaz metoda mjerenja antioksidativne aktivnosti

METODA	OKSIDANS	PROBA	DETEKCIJA
ORAC (engl., <i>Oxygen radical absorbance capacity</i> )	peroksidni radikal dobiven iz AAPH (2,2'-azobis(2- amidinopropan) dihidroklorid)	fluroscein	fluorometrija
Kemilumiscencija	hidrogenperoksid	luminol	fluorometrija
DPPH (2,2-difenil-1- pikrilhidrazil)	DPPH•	DPPH•	spektrofotometrija ili EPR
TEAC (engl., <i>Trolox equivalent antioxidant capacity</i> )	kationski radikal ABTS (2,2'-azino- bis(3- etilbenzotiazoline-6- sufonska kiselina)	kationski radikal ABTS	spektrofotometrija
FRAP ( engl., <i>Ferric reducing antioxidant power</i> )	Fe <sup>3+</sup>	fericijanid	spektrofotometrija
CUPRAC (engl., <i>Cupric reducing antioxidant power</i> )	Cu <sup>2+</sup>	neokuprin	spektrofotometrija
Ag <sup>+</sup> redukcija	Ag <sup>+</sup>	Ag nanočestica	površinska plazmonska rezonanca
Au <sup>3+</sup> redukcija	Au <sup>3+</sup>	Au nanočestica	ciklička voltometrija
CERAC (engl., <i>Cerium reducing antioxidant capacity</i> )	Ce <sup>4+</sup>	indigo karmin boja	spektrofotometrija

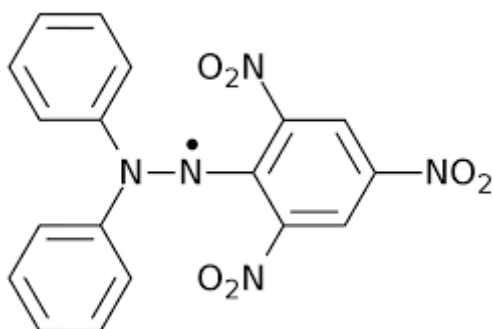
CHROMAC (engl., <i>Chromium reducing antioxidant capacity</i> )	$\text{Cr}^{6+}$	$\text{Cr}^{3+}$ kompleks	spektrofotometrija
--	------------------	---------------------------	--------------------

Tranzicijski metali mogu stimulirati lipidnu oksidaciju putem Fentonove reakcije ili razgrađujući lipidne hidroperokside u reaktivnije peroksil i alkoksil radikale. Flavonoidi su snažni kelatori metala. Antioksidansi keliraju metal, stvaraju kompleks i na taj način metal ne može djelovati kao inicijator lipidne oksidacije. Posljedično, efikasnost keliranja metala se može koristiti kao indikator antioksidativne aktivnosti, najčešće u kombinaciji s drugim metodama. Uobičajeno se efikasnost kelacije metala određuje tako da se mjeri keliranje željezovog iona ( $\text{Fe}^{2+}$ ). Prati se smanjenje apsorbancije na 485 nm (željezov sulfat) ili 562 nm (ferozin) nakon dodatka antioksidansa (Shahdi i Ying, 2015).

### 1.1.1.1. DPPH test antioksidativne aktivnosti

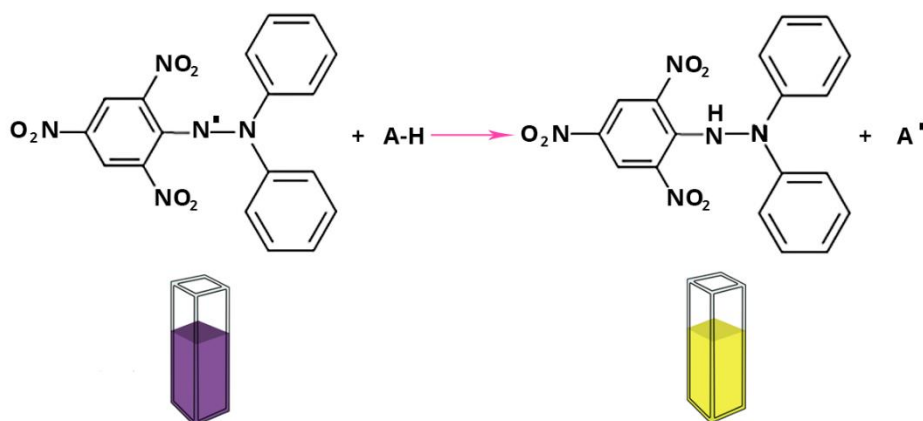
DPPH• metoda je među najčešće korištenim metodama za određivanje antioksidativne aktivnosti (Blois, 1958).

DPPH• (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) je stabilan radikal zbog delokalizacije slobodnog elektrona na aromatskim prstenovima. Delokalizacija elektrona sprječava dimerizaciju molekula radikala koja je česta kod drugih radikala (Shadidi i Ying, 2015).



Slika 1.1.1.1.1 Struktura DPPH•

DPPH• pokazuje snažnu apsorpciju u području oko 520 nm zbog nesparenog elektrona te je ljubičaste boje. Miješanjem otopine DPPH• s antioksidansom koji je donor elektrona dolazi do redukcije DPPH• radikala. Redukcijom radikala dolazi do smanjenja apsorpcije i boja prelazi u žutu. Smanjenje apsorpcije je linearno proporcionalno s koncentracijom antioksidansa (Kedare i Singh, 2011).



Slika 1.1.1.1.2. Prikaz reakcije redukcije DPPH•

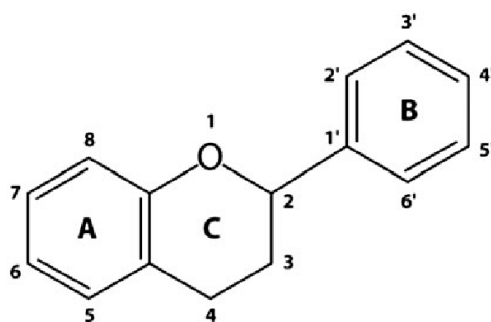
Za interpretaciju rezultata dobivenih DPPH• metodom uvodi se veličina efikasna koncentracija  $EC_{50}$ .  $EC_{50}$  je koncentracija antioksidansa koja dovodi do smanjenja apsorbancije za 50%. Ponekad se određuje i vrijeme potrebno da se apsorbancija smanji za 50%,  $T_{EC50}$  (Shadidi i Ying, 2015).

Nedostatak metode je što DPPH• reagira i s drugim radikalima, osjetljiv je na Lewisove baze, otapala i kisik, te što analit ili produkti reakcije mogu apsorbirati na istoj valnoj duljini kao i DPPH• radikal. DPPH• u otopini metanola i acetona je osjetljiv na svjetlost, pri čemu dolazi do smanjenja apsorbancije otopine DPPH• u vidljivom području spektra (Kedare i Singh, 2011).

Metoda je brza, jednostavna i široko upotrebljavana za ispitivanje antioksidansa. Može se koristiti za kvantifikaciju antioksidansa u složenim biološkim sustavima, za tekuće i krute uzorke. Metoda je jednostavno primjenjiva za mjerenje ukupnog antioksidativnog kapaciteta u voćnim i povrtnim sokovima. Može se provoditi u otapalu metanol/voda što je pogodno jer se često to otapalo koristi za ekstrakciju antioksidansa iz uzorka, ali i u nepolarnim organskim otapalima za ispitivanje lipofilnih antioksidansa (Kedare i Singh, 2011).

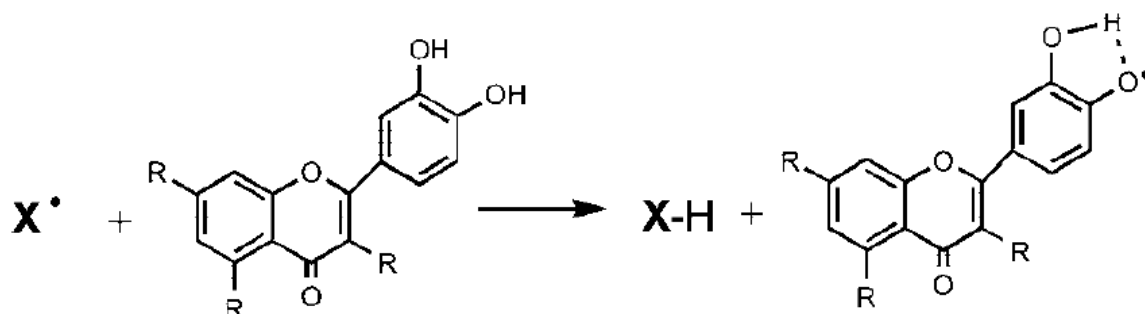
## 1.2. Flavonoidi

Flavonoidi su sveprisutni sekundarni metaboliti biljaka. U biljkama flavonoidi služe kao zaštita od UV zračenja. Normalnom prehranom unosi se 23-34 mg flavonoida dnevno, a od toga većina otpada na kvercetin. Flavonoidi djeluju kao antioksidansi, s čime se povezuje jedan dio pozitivnih učinaka na zdravlje (Foti i sur., 2011).



Slika 1.2.1. Osnovna struktura flavonoida

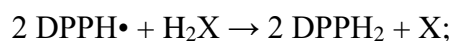
Općenito, antioksidativna aktivnost flavonoida ovisi o: reaktivnosti flavonoida u reakciji sa slobodnim radikalima, što ovisi o supstituentima vezanim na osnovnu strukturu, delokalizaciji slobodnog elektrona u fenoksi radikal, efikasnosti keliranja metala (ovisi o položajima hidroksilne i karboksilne grupe unutar molekule). S obzirom na niski redukcijski potencijal ( $E_{pH7} < 0.75$  V) flavonoidi mogu reducirati slobodne radikale s redukcijskim potencijalom  $E_{pH7} > 0.8$  V kao što su: superoksidni, alkoksidni, peroksidni i hidroksilni radikali. Općenito je prihvaćeno da je za dobra antioksidativna svojstva flavonoida zaslužna kateholna skupina na prstenu B (Musialik i sur., 2008).



Slika 1.2.2. Prikaz reakcije flavonoida i slobodnog radikala

Nastali fenoksi radikal je stabiliziran s intramolekularnom vodikovom vezom između hidroksilne skupine i kisika s nesparenim elektronom. Prisutnost dvostruke veze u prstenu C konjugirane s 4-okso skupinom je također važna za delokalizaciju nesparenog elektrona. Dodatna antioksidativna aktivnost pripisuje se hidroksilnim skupinama na položaju 3 prstena C i položaju 5 prstena A (Musialik i sur., 2008).

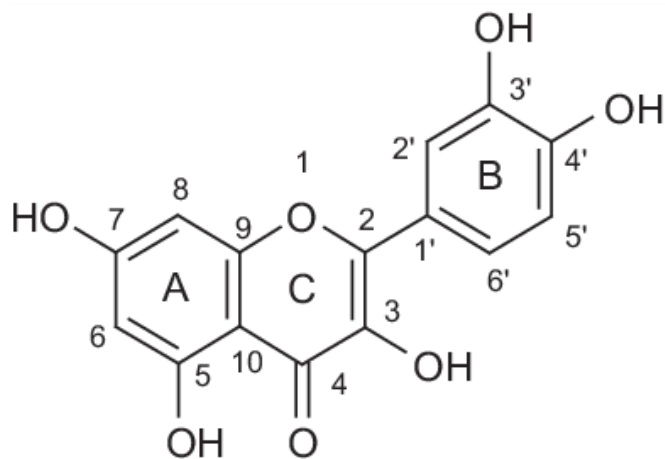
Reakcije flavonoida i DPPH• pokazale su se kao vrlo kompleksne (Osman, 2011). Smatra se da reakcija na kojoj se zasniva antioksidativna aktivnost uključuje oksidaciju kateholnog prstena (prsten B) flavonoida pri čemu nastaje kinonski produkta. Oksidacijom flavonoid otpušta dva elektrona. Reakcija se odvija prema jednadžbi:



pri čemu je H<sub>2</sub>X flavonoid, a X kinonski produkt (Chen i sur., 2010).

### 1.2.1. Kvercetin

Kvercetin spada u podskupinu flavonola. Pripisuju mu se razna djelovanja: antioksidativno, antikarcinogeno, antialergijsko, protuupalno i druga. Kvercetin je prisutan u luku, čajevcu, jabukama, bobicama i crvenom vinu (Kilfoyle i sur., 2011).



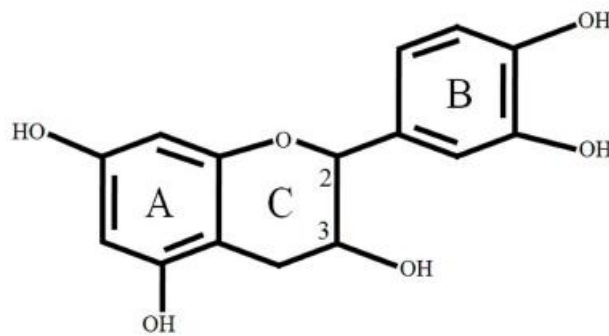
Slika 1.2.1.1. Struktura kvercetina



### 1.2.2. Katehin

Katehin je flavonoid iz grupe flavon-3-on. Glavni izvor katehina je čajevac (lat. *Camellia sinensis*, lat. *Camellia assamica*) (Bae i sur., 2020), a prisutan je i u voću (jabuka, borovnica, kivi, jagoda), crnom vinu, kakaovcu (Grzesik i sur., 2018).

Prsten A ima rezorcinolnu skupinu, a prsten B kateholnu skupinu. Hidroksilna skupina se nalazi na poziciji 3 na prstenu C. Na molekuli postoje dva kiralna centra na 2C i 3C atomu. Katehin postoji u obliku 4 dijastereoizomera, u dvije *cis* (epikatehin) i dvije *trans* (katehin) konfiguracije. Smjesa izomera se označava kao (+)-katehin (Chatterjee i sur., 2018).



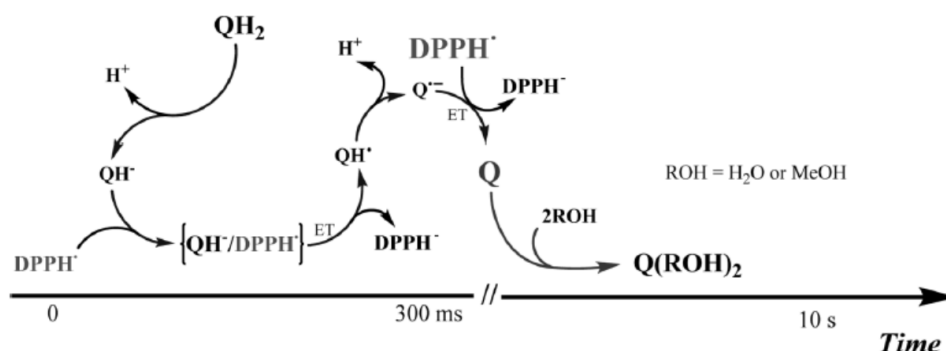
**Slika 1.2.2.1.** Struktura(+)-katehina

Antioksidativna aktivnost katehina povezana je za direktni i indirektni mehanizam djelovanja. Direktni mehanizam uključuje uklanjanje ROS i keliranje metalnih iona, dok se indirektni odnosi na induciranje antioksidativnih enzima, inhibiciju pro-oksidativnih enzima i utjecaj na signalne putove (Bernatoniene i Kopustinskiene, 2018).

Katehin djeluje kao antioksidans, antimikrobno, protuupalno, antiviralno, potiče aktivnost stanica, te zaštitni učinak od UV zračenja (Bae i sur., 2020).

### 1.2.3. Mehanizam reakcije kvercetina i DPPH•

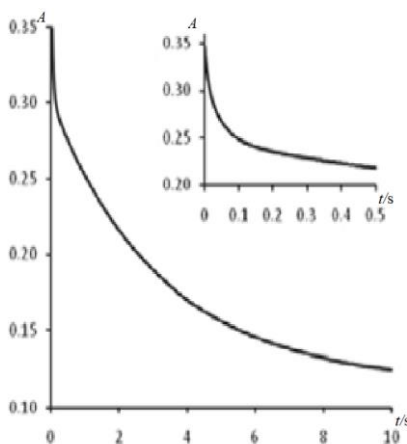
Mehanizam reakcije kvercetina i DPPH• ranije su proučavali Foti i sur., prema kojima se reakcija u otapalu metanol-voda (0,80:0,20 v/v) odvija prema mehanizmu prikazanom na Slici 1.2.3.1.



Slika 1.2.3.1. Predložen mehanizam reakcije kvercetina i DPPH•

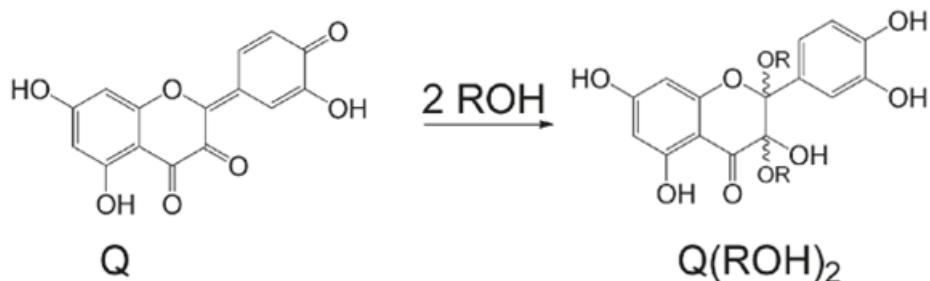
Tijekom reakcije najprije dolazi do prijelaza protona (PT), tj. disocijacije QH<sub>2</sub> pri čemu nastaje QH•, nakon kojega slijedi prijelaz elektrona (ET) što odgovara reakcijskom mehanizmu SPLET (reakcija uzastopnog prijelaza protona i elektrona, engl. *Sequential Proton-Loss Electron-Transfer*).

Tijek reakcije je praćen spektrofotometrijski, praćeno je smanjenje apsorbancije na 519 nm (Slika 1.2.3.2.). Početni brzi pad asorbancije, koji traje oko 100 ms je povezan za prijelaz elektrona s kvercetina na DPPH pri čemu nastaje nastaje kinonmetidni produkt Q koji manje apsorbira nego DPPH• (Foti i sur., 2011).



Slika 1.2.3.2. Ovisnost apsorbancije o vremenu na 519 nm za reakciju kvercetina i DPPH• u otapalu metanol/voda (preuzeto iz Foti i sur., 2011)

Nakon početnog brzog stupnja slijedi sporije smanjenje apsorbancije, koje je povezano za reakciju adicije otapala ROH na položaj 2 i 3 produkta Q, kinonmetida. Smanjenju apsorbancije doprinosi i višak kvercetina koji omogućuje stvaranje kompleksa Q/QH<sub>2</sub> (Foti i sur., 2011).



**Slika 1.2.3.3.** Adicija molekula otapala na produkt Q

Red reakcije s obzirom na kvercetin je manji od jedan, što se objašnjava s reverzibilnim nastajanjem nekovalentnog  $\pi$ -kompleksa između velikog, planarnog i  $\pi$  konjugiranog kvercetinskog aniona i DPPH•.

Reakcije flavonoida u alkoholu znatno su brže od reakcija u zakiseljenom alkoholu ili dioksanu, što se objašnjava SPLET mehanizmom, za razliku od HAT/PCET mehanizma koji je predložen u nepolarnim otapalima (Musialik i sur., 2008). U polarnim otapalima dolazi do prijelaza elektrona i protona s hidroksilne grupe na položaju 7 prstena A, dok u nepolarnim otapalima dolazi do prijelaza elektrona i protona s 3' i 4' OH skupina na prstenu B.

## 1.3. Kemijska kinetika

### 1.3.1. Brzina kemijske reakcije

Brzina reakcije ( $v$ ) označava smanjenje koncentracije reaktanta ili povećanje koncentracije produkta u određenom vremenu  $t$ .

Promatra se reakcija  $A + 2B \rightarrow 3C + D$  u kojoj je molarna koncentracija sudionika reakcije J [J], a volumen sustava je konstantan. Brzina trošenja reaktanata je  $-d[R]/dt$ , gdje je R A ili B, a brzina nastajanja produkata (C ili D, koja se označava s P) je  $d[P]/dt$ .

Brzine trošenja reaktanata i brzine nastajanja produkata se u ovom slučaju razlikuju:

$$d[D]/dt = 1/3(d[C]/dt) = -(d[A]/dt) = -1/2(d[B]/dt);$$

Stoga, kako bi se dobila jedinstvena brzina reakcije, uvodi se veličina doseg reakcije ( $\zeta$ ):

$$\zeta = (n_j - n_{j,0})/v_j;$$

$v_j$  je stehiometrijski koeficijent sudionika reakcije J,  $n_i$  je količina tvari u određenom trenutku,  $n_0$  količina tvari na početku reakcije.

Brzina pretvorbe,  $v$ , odgovara prirastu dosega reakcije u vremenu:

$$v = (d\zeta/dt);$$

Za sustav volumena  $V$  vrijedi:

$$v = (1/v_j) \cdot (1/V \cdot dn_j/dt);$$

$v_j$  je negativan za reaktante i pozitivan za produkte.

Za sustav konstantnog volumena  $V$  može se uzeti da je  $[J] = n_j/V$ , te se dobiva jednadžba za brzinu reakcije:

$$v = (1/v_j) \cdot (d[J]/dt);$$

Molarna koncentracija ( $[J]$ ) izražava u  $\text{mol dm}^{-3}$ , vrijeme ( $t$ ) u sekundama ( $s$ ) te iz toga prolazi da je jedinica za brzinu reakcije ( $v$ )  $\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{s}^{-1}$  (Atkins i de Paula, 2006).

### 1.3.2. Zakoni za brzinu kemijske reakcije

Brzina reakcije često je proporcionalna koncentraciji reaktanata podignutih na određenu potenciju. Na primjer, brzina kemijske reakcije može biti proporcionalna molarnoj koncentraciji dvaju reaktanata A i B.

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

gdje je svaka koncentracija podignuta na prvu potenciju. Koeficijent  $k$  je konstanta brzine reakcije, veličina karakteristična za određenu reakciju, neovisna o koncentraciji reaktanata, ovisna o temperaturi i drugim uvjetima u kojima se reakcija odvija. Zakon za brzinu reakcije je jednadžba koja prikazuje brzinu reakcije kao funkciju koncentracija svih sudionika reakcije u nekom vremenu:

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

Zakon za brzinu reakcije se određuje eksperimentalno i ne može se izvesti iz kemijske jednadžbe reakcije. Mnogim reakcija je utvrđen zakon za brzinu kemijske reakcije koji odgovara:

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

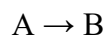
potencija na koju je podignuta koncentracija specije (produkta ili reaktanta) u zakonu za brzinu reakcije je red reakcije u odnosu na tu speciju. Ukupni red reakcije je jednak sumi pojedinih redova reakcija u odnosu na svaku speciju.

#### ZAKON ZA BRZINU REAKCIJE NULTOG REDA

$$v = k;$$

U reakcijama nultog reda brzina reakcije ne ovisi o koncentracijama reaktanata.

#### ZAKON ZA BRZINU REAKCIJE PRVOG REDA



$$d[A]/dt = -k[A];$$

Integriranjem izraza dobiva se ovisnost koncentracije reaktanta A o vremenu:

$$[A] = [A]_0 \cdot e^{-kt};$$

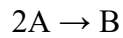
$[A]_0$  je koncentracija reaktanta A pri  $t=0$ .

Vrijeme polureakcije (poluvrijeme reakcije),  $t_{1/2}$ , je vrijeme potrebno da se koncentracija reaktanta smanji za polovicu početne vrijednosti. Za reakcije prvog reda vrijedi:

$$t_{1/2} = (\ln 2)/k;$$

Poluvrijeme reakcije prvog reda je neovisno o početnoj koncentraciji reaktanta.

#### ZAKON ZA BRZINU REAKCIJE DRUGOG REDA



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

Integracijom izraza dobiva se:

$$[A] = [A]_0 / (1 + kt[A]_0);$$

Poluvrijeme reakcije drugog reda dano je izrazom:

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

tj. ovisno je o početnoj koncentraciji reaktanta.

#### ZAKON ZA BRZINU REAKCIJE PSEUDO-PRVOG REDA

Određivanje reda reakcije može se pojednostaviti korištenjem izolacijske metode u kojoj su koncentracije svih reaktanata osim jednog u velikom suvišku (barem 10 puta). Na primjer ako je B u suvišku, njegova koncentracija može se smatrati stalnom. Ukoliko je zakon za brzinu reakcije dan izrazom  $v = k[A][B]$ , u ovim uvjetim može se uzeti da je  $[B]$  jednako  $[B]_0$  iz čega proizlazi:

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

Zakon za brzinu reakcije drugog reda sveden je na zakon za brzinu reakciju prvog reda te se naziva zakon za brzinu reakcije pseudo-prvog reda.

### 1.3.3. Kinetički izotopni efekt

Kinetički izotopni efekt (KIE) je promjena brzine kemijske reakcije uslijed izotopne zamjene u molekuli reaktanta. Na temelju kinetičkog izotopnog efekta moguće je dobiti informacije o reakcijskom mehanizmu, prepoznati koje kemijske veze se bitno mijenjaju u koraku koji određuje brzinu reakcije. Primarni kinetički izotopni efekt se pojavljuje kada u koraku koji određuje brzinu reakcije dolazi do pucanja veze koja uključuje izotop, dok se sekundarni kinetički izotopni efekt javlja u slučaju izotopne zamjene na susjednom atomu (Atkins, de Paula, 2006).

Kinetički izotopni efekt izražava se kao količnik dviju konstanti brzine. U brojniku se nalazi konstanta brzine reakcije s reaktantom koji ima najzastupljeniji izotop u prirodi, a u nazivniku konstanta brzine reakcije s izotopno zamijenjenim reaktantom.

Vrlo česta izotopna supstitucija je zamjena vodika s deuterijem kada se kinetički izotopni efekt može izraziti kao:

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

pri čemu je  $k_{\text{H}}$  konstanta brzine za reakciju u kojoj sudjeluje reaktant s prirodnim omjerom izotopa vodika, dok je  $k_{\text{D}}$  konstanta brzine reakcije u kojoj sudjeluje reaktant kojem je vodik zamijenjen deuterijem.

## 1.4. UV-VIS spektrofotometrija

Većina organskih molekula apsorbira elektromagnetsko zračenje u ultraljubičastom (200-350 nm) ili u vidljivom (350-850 nm) području spektra. UV- Vis spektrofotometrija mjeri intenzitet apsorbiranog elektromagnetskog zračenja upravo u tom području (Watson, 1999).

Transmitacija ( $T$ ) je omjer intenziteta transmitiranog zračenja ( $I$ ) i intenziteta ulaznog zračenja ( $I_0$ ) na određenoj valnoj duljini:

$$T = I/I_0;$$

Apsorbancija ( $A$ ) jednaka je logaritmu omjera intenziteta ulaznog zračenja i intenziteta transmitiranog zračenja:

$$A = \log(I_0/I);$$

Apsorbancija ( $A$ ) i transmitacija ( $T$ ) su povezane:

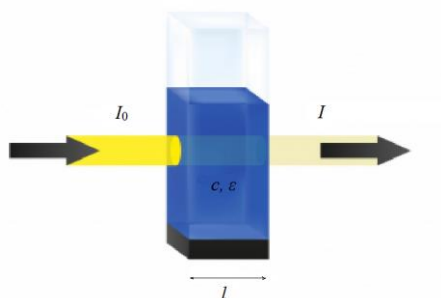
$$A = -\log(T);$$

Prema Beer-Lambertovom zakonu intenzitet transmitiranog zračenja ovisi o debljini uzorka ( $l$ ), molarnoj koncentraciji uzorka ( $c$ ), intenzitetu ulaznog zračenja ( $I_0$ ) te molarnom apsorpcijskom koeficijentu  $\varepsilon$ :

$$I = I_0 \cdot 10^{-\varepsilon c l};$$

Molarni apsorpcijski koeficijent ( $\varepsilon$ ) specifičan je za pojedinu tvar u određenom otapalu. Beer-Lambertov zakon empirijski je izveden, i obično se izražava preko apsorbancije ( $A$ ):

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



**Slika 1.4.1.** Prikaz prolaska svjetlosti kroz otopinu prilikom spektrofometrijskog mjerenja

U kvantitativnoj analizi Beer-Lambertov zakon često se primjenjuje za određivanje nepoznate koncentracije otopine uzorka (Atkins i de Paula, 2014).

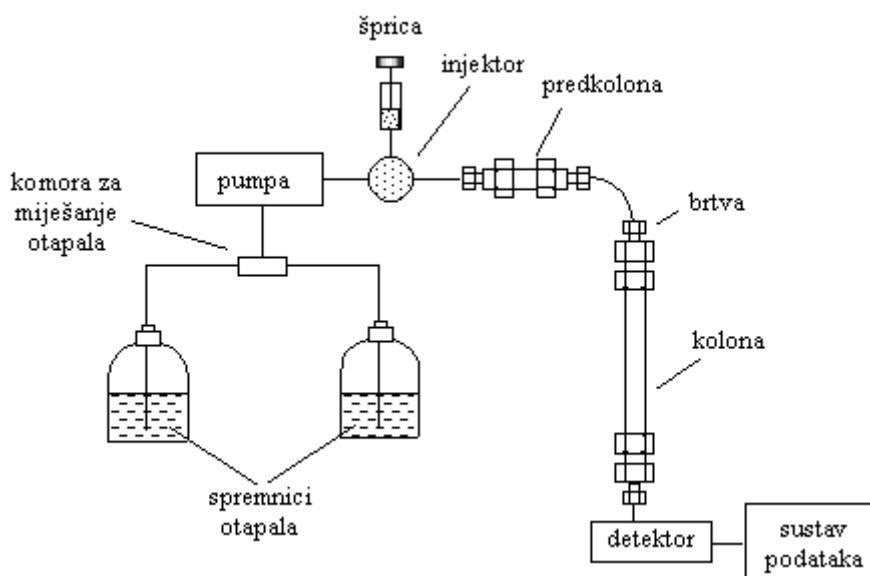


## 1.5. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC, engl. *High Performance Liquid Chromatography*) je tehnika koja se koristi se za separaciju, identifikaciju i kvantifikaciju sastavnica smjese. Tekuća mobilna faza pod tlakom prolazi kroz nehrđajuću čeličnu kolonu koja je napunjena česticama stacionarne faze veličine 3 do 10  $\mu\text{m}$  i nosi sastavnice uzorka. S obzirom na polarnost stacionarne faze, može se podijeliti na kromatografiju normalnih faza i kromatografiju obrnutih faza. Kromatografija normalnih faza sadrži polarnu nepokretnu fazu i nepolarnu pokretnu fazu, dok kromatografija obrnutih faza sadrži pokretnu fazu polarniju od nepokretne (Kaštelan-Macan, 2003). Mehanizam odjeljivanja ovisi o vrsti stacionarne faze. Razlikujemo nekoliko mehanizama odjeljivanja: razdioba, adsorpcija, ionska izmjena, odjeljivanje prema veličini... Odjeljivanje ovisi o svojstvima samih sastavnica (polarnost, veličina, struktura). Sastavnice se razlikuju u svojim svojstvima što utječe na njihovu brzinu kretanja kroz kolonu i vrijeme potrebno da dođu do detektora tj., na odjeljivanje (Watson, 1999).

Osnovni dijelovi HPLC kromatografa su rezervoar za otapala pokretne (mobilne) faze, pumpa, injektor, po mogućnosti predkolona, kolona za odjeljivanje i detektor. Otapala koja se koriste kao pokretna faza trebaju biti visoke čistoće i valja ih osloboditi otopljenih plinova ili suspendiranih čestica, npr. pomoću mikroporoznih filtera pod vakuumom. Pumpa služi ubacivanju pokretne faze pod visokim tlakom stalnom brzinom u kolonu. Razlikuju se dva načina injektiranja: ručno i automatsko. Kod ručnog injektiranja uzorak se unosi mikrolitarskom špricom kroz ventil u sustav za injektiranje tzv. petlju u kojoj se održava tlak. Prebacivanjem ventila otapalo prolazi kroz injektor te sa sobom nosi uzorak na kolonu. ([http://free-zg.htnet.hr/Svjetlana\\_Luterotti/](http://free-zg.htnet.hr/Svjetlana_Luterotti/))

Danas se sve više koristi automatsko injektiranje. Uzorak se unosi pomoću injektora koji se sastoji od ventila, automatskog uzorkivača (engl. *autosampler*) koji može biti termostatiran, injekcijske igle i graduirane injekcije ili crpke, te kapilare određenog volumena. Automatski uzorkivač omogućava automatizirano unošenje uzorka u pokretnu fazu prije ulaska u kolonu. Ventil omogućuje propuštanje uzorka na HPLC kolonu pod uvjetima visokog tlaka (Cindrić M i sur., 2009).



**Slika 1.5.1.** HPLC kromatograf

Najčešće korišteni detektor je UV detektor s nizom dioda (DAD, engl. *Diode-Array Detector*). Manje su zastupljeni: detektor raspršenja svjetla u uparenom uzorku (ELSD, engl. *Evaporative light scattering detector*), detektor zahvata elektrona (ECD, engl. *Electron capture detector*), fluorescencijski detektor. (Watson, 1999)

Vrijeme zadržavanja  $t_R$  je vrijeme potrebno pojedinoj sastavnici da nakon nanošenja uzorka stigne do detektora, to je vrijeme potrebno za ispiranje sastavnice. Kvalitativna analiza uzorka se provodi tako da se uspoređuje vrijeme zadržavanja nepoznatih sastavnica uzorka s vremenom zadržavanja standardne otopine analita.

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Kvercetin je flavonoid široko zastupljen u prirodi, s velikim brojem utvrđenih bioloških učinaka, među kojima se ističe antioksidativna aktivnost (Kilfoyle i sur., 2011). Reakcija redukcije DPPH• u prisutnosti potencijalnih antioksidansa koristi se kao temelj DPPH testa antioksidativne aktivnosti, koji je već dugi niz godina, a i danas česta metoda za procjenu antioksidativne aktivnosti (Blois, 1958). Test se zasniva na praćenju smanjenja apsorbancije DPPH• u vidljivom području spektra, što se povezuje s redukcijom DPPH radikala. Prema novijoj literaturi (Foti i sur., 2011) smanjenje apsorbancije u vidljivom području spektra nije povezano izravno s redukcijom DPPH•, te reakcijska otopina, osim početno, ne sadrži DPPH radikal.

Cilj ovog rada je ispitati kinetiku reakcije kvercetina i DPPH• u dioksanu i metanolu. Određene su konstante brzine reakcije kvercetina i DPPH• u otapalu dioksan-voda (0,99:0,01 v/v) te u metanolu. Sastav reakcijske otopine tijekom reakcije analiziran je uz primjenu HPLC kromatografije, kako bi se utvrdila prisutnost DPPH• u reakcijskoj otopini tijekom vremena u kojemu se prati smanjenje apsorbancije u vidljivom dijelu spektra. Dodatno, određen je kinetički izotopni efekt reakcije kvercetina i DPPH• u smjesi otapala dioksan voda (0,99:0,01 v/v). Za usporedbu su provedena i kinetička i HPLC mjerenja reakcije katehina i DPPH• te je određena konstanta brzine reakcije katehina i DPPH• u metanolu.

Dobiveni rezultati predstavljaju nove uvide koji doprinose razumijevanju reakcije kvercetina i DPPH•, te općenito reakcije na kojoj se zasniva DPPH test antioksidativne aktivnosti.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Kemikalije, instrumenti i laboratorijski pribor

Kemikalije:

- kvercetin ( $\geq 95\%$ , Sigma)
- katehin hidrat ( $\geq 96\%$ , Aldrich)
- DPPH• (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil), (95%, Aldrich)
- teška voda, D<sub>2</sub>O (99,9 % D, Aldrich)
- metanol ( $\geq 99,9\%$  Honeyweii Riedel-de Haen)
- 1,4- dioksan anhidrid (99,8%, Sigma- Aldrich)
- konc. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/ HNO<sub>3</sub> (*p.a.* Kemika)
- redestilirana voda
- dušik 5,0 (99,999% N<sub>2</sub>, Messer Croatia plin d.o.o.)

Instrumenti i laboratorijski pribor:

- vaga Mettler H2OT ( $P_{\max} = 160$  g,  $d = 0,01$  mg)
- HP G1103A 8453 UV-Vis spektrofotometar, Agilent Technologies
- termostatirani nosač za kivete Q-pod, Quantum Northwest TC 125 Temperature Control ( $\pm T < 0,1^{\circ}\text{C}$ )
- HPLC kromatograf, Perkin ELmer Series 200
- aparatura za redestilaciju vode
- Eppendorf automatske pipete od 50, 100, 200 i 1000  $\mu\text{L}$  uz odgovarajuće plastične Eppendorf nastavke, plastične tube Eppendorf (1,5 mL)
- kvarcne kivete QS 10,0 mm Helma
- HPLC vijale
- odmjerene tikvice od 5 mL
- posuđe korišteno za čišćenje kiveta (male čaše, staklena Erlenmeyerova tikvica s ubrušenim čepom od 500 ml, kapaljka)

### 3.2. Mjerenje konstante brzine reakcije kvercetina i DPPH• te reakcije katehina i DPPH•

Mjerenje konstante brzine reakcije ( $k_{\text{obs}}$ ) kvercetina (katehina) i DPPH• zasniva se na praćenju smanjenja apsorbancije DPPH• u reakcijskoj otopini tijekom reakcije. Mjerenja su provedena u uvjetima pseudo-prvog reda koji su ostvareni tako što je koncentracija kvercetina (katehina) u reakcijskoj otopini bila značajno veća (minimalno 20 puta, a iznimno kada to nije bilo moguće 8 puta) od koncentracije DPPH•.

#### **Priprema otopina za određivanje konstante brzine kvercetina i DPPH• u smjesi otapala dioksan-H<sub>2</sub>O i dioksan-D<sub>2</sub>O (0,99:0,01 v/v)**

Matična otopina DPPH• pripremi se u tikvici od 5 mL tako što se izvagani DPPH• (mase oko 0,1 mg) otopi u 5 mL dioksana. DPPH• se dobro otapa u dioksanu.

Matična otopina kvercetina pripremi se u tikvici od 5 mL tako što se izvagani kvercetin (mase oko 30 mg) otopi u 5 mL dioksana. Kvercetin se teško otapa u dioksanu.

Sve matične otopine iznova su pripravljene svaki radni dan te su korištene unutar 3 sata.

Reakcijska otopina u kiveti pripremi se tako što se u smjesu dioksana i vode (0,99:0,01 v/v) doda odgovarajući volumen prethodno pripremljene otopine kvercetina (koncentracije oko  $0,025 \text{ mol dm}^{-3}$ ) u dioksanu. Otopina u kiveti se termostatira 15 minuta na  $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . Reakcija se pokreće dodatkom potrebnog volumena otopine DPPH• (dodaje se oko  $280 \text{ }\mu\text{L}$  otopine približne koncentracije  $0,0003 \text{ mol dm}^{-3}$ ) u dioksanu. Reakcijsku otopinu u kiveti potrebno je dobro promiješati i staviti u spektrofotometar na mjerenje. Mjerenja se provode u rasponu valnih duljina 400-800 nm.  $k_{\text{obs}}$  je određena na dvije valne duljine: 525 i 620 nm.

**Konstanta brzine reakcije u smjesi otapala dioksan-D<sub>2</sub>O,  $k_{\text{D}}$** , određuje se na isti način kao i  $k_{\text{H}}$  s time da je voda zamijenjena teškom vodom. DPPH•. Korištena je teška voda koja je prethodno destilirana dva puta, s time da je prva destilacija provedena u prisutnosti  $\text{KMnO}_4$  i  $\text{KOH}$  (pripremljeno u laboratoriju ranije).

#### **Priprema otopina za određivanje konstante brzine reakcije kvercetina i DPPH• u metanolu**

Matična otopina DPPH• pripremi se u tikvici od 5 mL tako što se izvagani DPPH• (mase oko 1 mg) otopi u 5 mL metanola. DPPH• se dobro otapa u metanolu.

Matična otopina kvercetina pripremi se u tikvici od 5 mL tako što se izvagani kvercetin (mase oko 14 mg) otopi u 5 mL metanola. Kvercetin se dobro otapa u metanolu.

Reakcijska otopina u kiveti pripremi se tako što se u otprilike 1770  $\mu\text{L}$  metanola doda oko 20  $\mu\text{L}$  prethodno pripremljene otopine kvercetina (koncentracije oko  $0,02 \text{ mol dm}^{-3}$ ) u metanolu. Otopina u kiveti se termostatira 15 min na  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ . Reakcija se pokreće dodatkom potrebnog volumena otopine DPPH• (dodaje se oko 10  $\mu\text{L}$  otopine približne koncentracije  $0,005 \text{ mol dm}^{-3}$ ) u metanolu. Reakcijsku otopinu u kiveti je potrebno dobro promiješati i staviti u spektrofotometar na mjerenje. Mjerenja se provode u rasponu valnih duljina 400-800 nm.  $k_{\text{obs}}$  je određena na dvije valne duljine: 525 i 620 nm.

### **Priprema otopina za određivanje konstante brzine reakcije katehina i DPPH• u metanolu**

Matična otopina DPPH• pripremi se u tikvici od 5 mL tako što se izvagani DPPH• (mase oko 2 mg) otopi u 5 mL metanola. DPPH• se dobro otapa u metanolu.

Matična otopina katehina pripremi se u tikvici od 5 mL tako što se izvagani katehin (mase oko 15 mg) otopi u 5 mL metanola. Kvercetin se dobro otapa u metanolu.

Reakcijska otopina u kiveti pripremi se tako što se u otprilike 1280  $\mu\text{L}$  metanola doda oko 480  $\mu\text{L}$  prethodno pripremljene otopine katehina (koncentracije oko  $0,009 \text{ mol dm}^{-3}$ ) u metanolu. Otopina u kiveti se termostatira 15 min na  $25^\circ\text{C}$ . Reakcija se pokreće dodatkom potrebnog volumena otopine DPPH• (dodaje se oko 35  $\mu\text{L}$  otopine približne koncentracije  $0,003 \text{ mol dm}^{-3}$ ) u metanolu. Reakcijsku otopinu u kiveti potrebno je dobro promiješati i staviti u spektrofotometar na mjerenje. Mjerenja se provode u rasponu valnih duljina 400-800 nm.  $k_{\text{obs}}$  je određena na dvije valne duljine: 525 i 620 nm.

Sva mjerenja su izvedena u triplicatu. Prije korištenja kivete su temeljito očišćene tako što su bile napunjene konc.  $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HNO}_3$  kiselinom 15 minuta. Nakon toga su ostavljenje u deioniziranoj vodi 15 min te temeljito isprane deioniziranom vodom.

### **3.3. HPLC analiza reakcije kvercetina i DPPH• te reakcije katehina i DPPH• u otapalima metanolu i dioksanu**

HPLC analiza je provedena nakon UV-VIS kinetičke analize reakcije. Snimljeni su spektri otopina reaktanata te spektri reakcijske otopine tijekom reakcije, te je određeno trajanje pojedine reakcije u određenim reakcijskim uvjetima. Na temelju dobivenih spektara određena je valna duljina na kojoj će se provesti HPLC analiza. Analiza je provedena na valnoj duljini od 281 nm, na kojoj svi reaktanti apsorbiraju. Zbog ograničenja korištenog HPLC uređaja analiza se nije mogla provesti u vidljivom dijelu spektra. Na temelju utvrđenog trajanja reakcije (konstante brzine reakcije) određeni su vremenski intervali nakon početka reakcije u kojima će se uzeti uzorci reakcijske otopine za HPLC analizu.

#### **Priprema otopina za HPLC analizu**

Matična otopina kvercetina približne koncentracije  $5 \cdot 10^{-3}$  mol  $\text{dm}^{-3}$  pripremi se tako da se u tikvicu od 5 mL odvaži približno 8 mg kvercetina te se tikvica nadopuni metanolom ili dioksanom do 5 mL.

Matična otopina katehina približne koncentracije  $8 \cdot 10^{-3}$  mol  $\text{dm}^{-3}$  pripremi se tako da se u tikvicu od 5 mL odvaži približno 12 mg katehina te se tikvica nadopuni metanolom ili dioksanom do 5 mL.

Matična otopina DPPH• približne koncentracije  $5 \cdot 10^{-4}$  mol  $\text{dm}^{-3}$  pripremi se tako da se u tikvicu od 5 mL odvaži približno 1 mg DPPH• te se tikvica nadopuni dioksanom do 5 mL.

Otopina DPPH• za HPLC analizu koncentracije  $3 \cdot 10^{-5}$  mol  $\text{dm}^{-3}$  dobiva se pipetiranjem otprilike 60  $\mu\text{L}$  matične otopine DPPH• te 940  $\mu\text{L}$  dioksana u bočicu za HPLC.

Otopina kvercetina za HPLC analizu koncentracije  $2,5 \cdot 10^{-4}$  mol  $\text{dm}^{-3}$  dobiva se pipetiranjem otprilike 35  $\mu\text{L}$  matične otopine kvercetina te 965  $\mu\text{L}$  dioksana u vijalu.

Otopina katehina za HPLC analizu koncentracije  $3 \cdot 10^{-3}$  dobiva se pipetiranjem otprilike 40  $\mu\text{L}$  matične otopine katehina te 960  $\mu\text{L}$  dioksana u vijalu.

Reakcijska otopina reakcije kvercetina i DPPH• pripremi se pipetiranjem otprilike 895  $\mu\text{L}$  metanola ili dioksana, 45  $\mu\text{L}$  matične otopine kvercetina i 60  $\mu\text{L}$  matične otopine DPPH• u bočicu za HPLC .

Reakcijska otopina reakcije katehina i DPPH• pripremi se pipetiranjem otprilike 905  $\mu\text{L}$  metanola ili dioksana, 30  $\mu\text{L}$  matične otopine katehina i 65  $\mu\text{L}$  matične otopine DPPH• u vijalu.

**Tablica 3.3.1.** Koncentracije reaktanata u reakcijskoj otopini

Reaktant	$c/\text{mol dm}^{-3}$
Katehin	$3 \cdot 10^{-3}$
Kvercetin	$2,5 \cdot 10^{-4}$
DPPH•	$3 \cdot 10^{-5}$

HPLC analiza provodi se tako što smo se prvo injektiraju čista otapala dioksan i metanol te standardne otopine DPPH•, kvercetina i katehina kako bi se dobili kromatogrami otopina reaktanata koji se mogu usporediti s kromatogramima reakcijske otopine.

Reakcijske otopine u kojima je otapalo metanol razrjeđuju se 10 puta u dioksanu neposredno prije injektiranja (100  $\mu\text{L}$  reakcijske smjese razrijedi se do 1000  $\mu\text{L}$  dioksanom).

**Tablica 3.3.2** Kromatografski uvjeti

Instrument	HPLC kromatograf, Perkin ELmer Series 200
Detektor	DAD
Kolona	C18 Ultra Aqueous, Restek column (5 $\mu\text{m}$ , 250 $\times$ 4.0 mm)
Temperatura kolone	25°C
Pokretna faza	metanol-voda (0,8: 0,2 v/v)
Protok	1 ml/ min
Volumen injektiranja	20 $\mu\text{L}$
Valna duljina detekcije	281 nm
Ukupno vrijeme analize	20 min

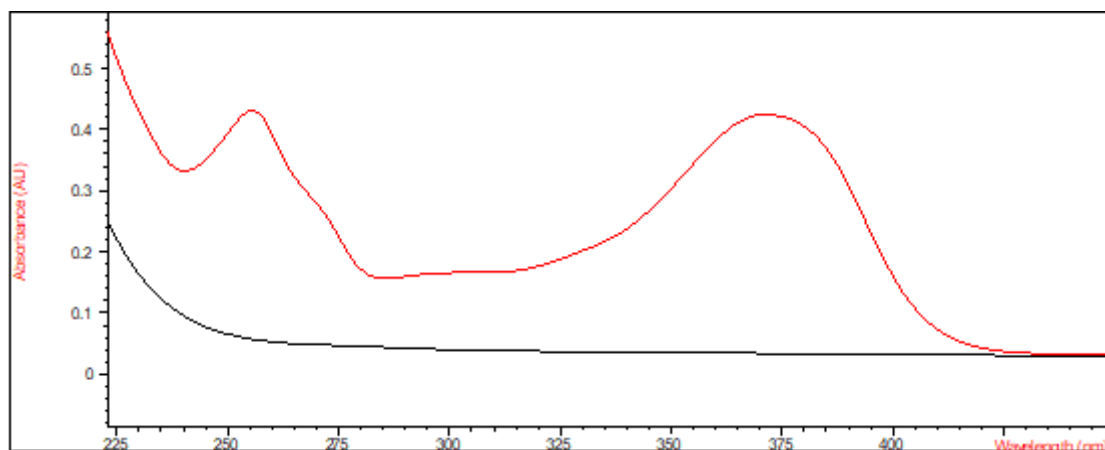


## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Konstanta brzine reakcije kvercetina i DPPH• u smjesi otapala dioksan-voda (0,99: 0,01 v/v)

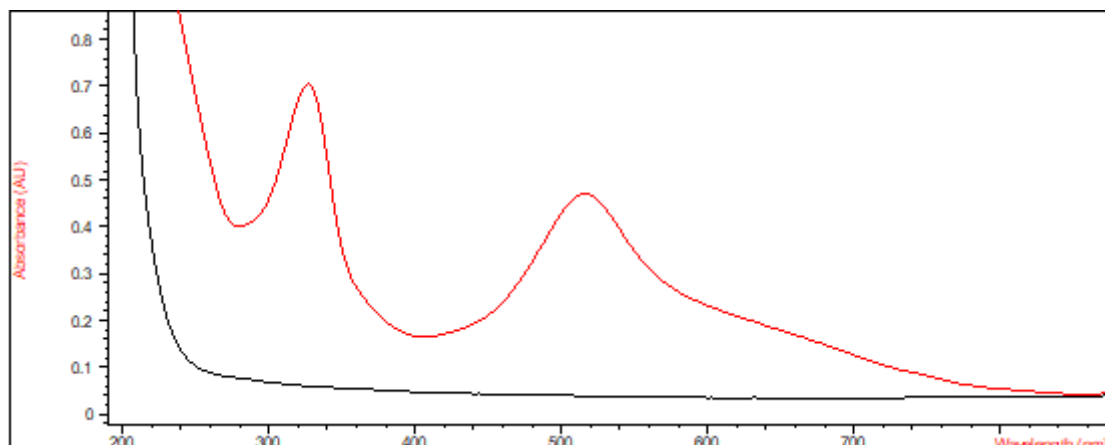
Mjerenje konstante brzine reakcije kvercetina i DPPH• se zasniva na praćenju smanjenja apsorbancije DPPH• u reakcijskoj otopini tijekom reakcije. Određene su konstante brzine reakcije kvercetina i DPPH• pri valnoj duljini od 620 nm u uvjetima pseudo-prvog reda, tako što je koncentracija kvercetina bila u velikom suvišku, najmanje 20 puta veća od koncentracije DPPH•.

Snimljeni spektri otopina kvercetina i DPPH• prikazani su na slikama 4.1.1. i 4.1.2.



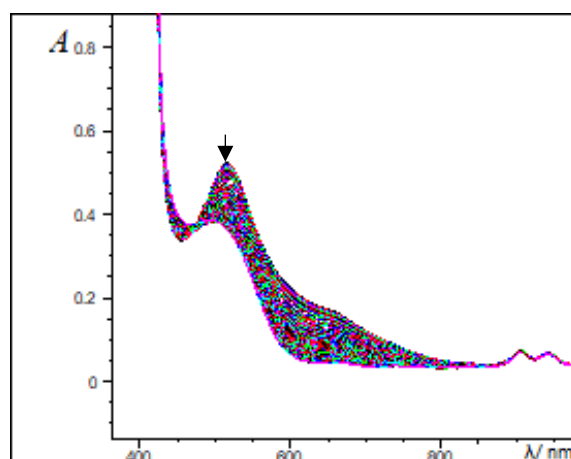
Slika 4.1.1. Spektar  $2 \cdot 10^{-5}$  mol  $\text{dm}^{-3}$  otopine kvercetina u metanolu

Iz spektra kvercetina određena su dva maksimuma apsorpcijske vrpce ( $\lambda_{\text{max}}$ ) pri 255 nm i 372 nm. Procijenjeni  $\epsilon$  pri 255 nm, 372 nm i 281 nm iznose  $\epsilon_{255} \sim 21550 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ,  $\epsilon_{372} \sim 21200 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , te  $\epsilon_{281} \sim 8500 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .



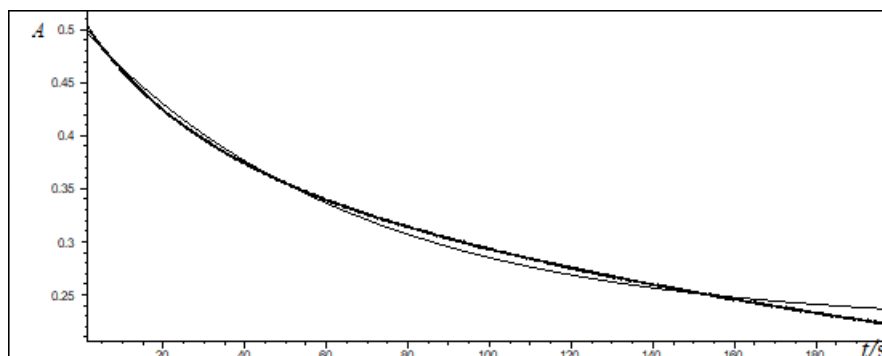
**Slika 4.1.2.** Spektar  $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$  DPPH• u metanolu

Iz spektra DPPH• određena su dva maksimuma apsorpcijske vrpce ( $\lambda_{\text{max}}$ ) pri 327 nm i 517 nm. Procijenjeni  $\epsilon$  pri 327 nm, 517 nm i 281 nm iznose iznosi  $\epsilon_{327} \sim 14100 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ,  $\epsilon_{517} \sim 9420 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  te  $\epsilon_{281} \sim 8000 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .



**Slika 4.1.3.** Spektralni profil reakcije kvercetina i DPPH• u smjesi otapala dioksan-voda (0,99: 0,01 v/v) pri koncentraciji kvercetina  $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$  te koncentraciji DPPH•  $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$

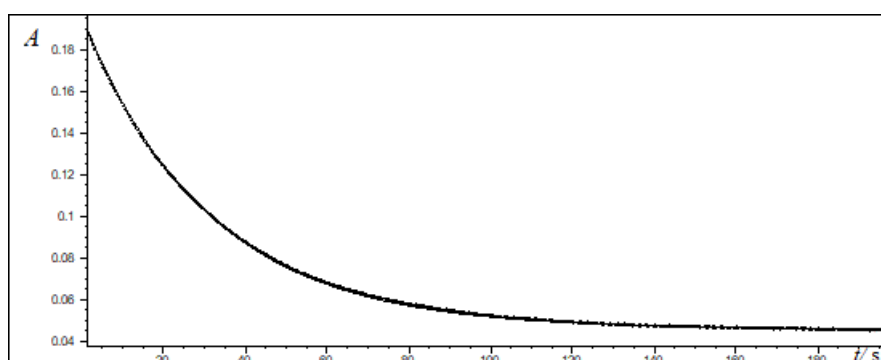
Iz spektralnog profila (Slika 4.1.3.) reakcije kvercetina i DPPH• u smjesi otapala dioksan- voda (0,99: 0,01 v/v) vidljivo je da na 517 nm (valna duljina maksimuma DPPH•) apsorbira i produkt koji nastaje u reakciji. Valna duljina maksimuma apsorpcijske vrpce produkta iznosi 501 nm.



**Slika 4.1.4.** Ovisnost apsorbancije ( $A$ ) DPPH• na 525 nm o vremenu ( $t$ ) za reakciju kvercetina i DPPH• u smjesi otapala dioksan-voda (0,99: 0,01 v/v) pri koncentraciji kvercetina  $7,5 \cdot 10^{-3}$  mol dm<sup>-3</sup> te koncentraciji DPPH•  $5 \cdot 10^{-5}$  mol dm<sup>-3</sup> na temperaturi 25°C

Dobivena ovisnost apsorbancije o vremenu za reakciju kvercetina i DPPH• u smjesi otapala dioksan-voda (0,99: 0,01 v/v) na 525 nm odstupa od zakona za brzinu reakcije prvog reda, kao što je vidljivo na Slici 4.1.4. Odstupanje od zakona za brzinu reakcije prvog reda povezano je s nastankom produkta koji apsorbira na 517 nm.

Zbog odstupanja konstante brzine od zakona na 525 nm određena je konstanta brzine pri 620 nm, valna duljina pri kojoj ne apsorbira produkt. Dobivena ovisnost apsorbancije o vremenu za reakciju kvercetina i DPPH• u smjesi otapala dioksan-voda (0,99: 0,01 v/v) na 620 nm slijedi zakon za brzinu reakcije prvog reda (Slika 4.1.5.).



**Slika 4.1.5.** Ovisnost apsorbancije ( $A$ ) DPPH• o vremenu ( $t$ ) za reakciju kvercetina i DPPH• u smjesi otapala dioksan-voda (0,99: 0,01 v/v) pri koncentraciji kvercetina  $7,5 \cdot 10^{-3}$  mol dm<sup>-3</sup> te koncentraciji DPPH•  $5 \cdot 10^{-5}$  mol dm<sup>-3</sup> na 620 nm na temperaturi 25°C

U smjesi otapala dioksan-voda (0,99: 0,01 v/v) određene su konstante brzine pseudo-prvog reda ( $k_{obs}$ ) u rasponu koncentracija kvercetina od (0,001 do 0,01) mol dm<sup>-3</sup> na 520 nm i 620 nm, pri temperaturi 25 °C. Intervali koji su se koristili za određivanje konstante brzine iznosili su otprilike jedno te pet poluvremena. Poluvrijeme reakcije se odredilo tako što se pratilo vrijeme potrebno da se apsorbancija smanji na 50% početne vrijednosti. Izmjerene konstante brzine reakcije prikazane su u Tablicama 4.1.1.-4.1.4.

**Tablica 4.1.1.** Izmjerene konstante brzine ( $k_{obs}$ ) reakcije kvercetina i DPPH• u smjesi otapala dioksan-voda (0,99: 0,01 v/v) pri različitim koncentracijama kvercetina na 525 nm, pri temperaturi 25 °C. Interval korišten za određivanje konstante iznosio je otprilike jedno poluvrijeme reakcije.

$c(\text{kvercetin})/$ mol dm <sup>-3</sup>	$k_{obs} \cdot 10^2/s^{-1}$	$\overline{k_{obs}}$ $\cdot 10^2/s^{-1}$	SD $\cdot 10^2/s^{-1}$	RSD/%
0,001	0,245	0,248	0,065	26
	0,185			
	0,314			
0,0025	0,666	0,530	0,355	67
	0,128			
	0,797			
0,005	2,89	2,74	0,18	6,6
	2,79			
	2,54			
0,0075	3,11	3,10	0,53	17
	2,57			
	3,62			
0,01	4,32	4,97	0,57	12
	5,42			
	5,16			

\* $c(\text{DPPH}\cdot) = 5 \cdot 10^{-5}$  mol dm<sup>-3</sup>

**Tablica 4.1.2.** Izmjerene konstante brzine ( $k_{obs}$ ) reakcije kvercetina i DPPH• u smjesi otapala dioksan-voda (0,99: 0,01 v/v) pri različitim koncentracijama kvercetina na 525 nm, pri temperaturi 25°C. Interval korišten za određivanje konstante iznosio je približno 5 poluvremena reakcije.

$c(\text{kvercetin})/\text{mol dm}^{-3}$	$k_{obs} \cdot 10^3/\text{s}^{-1}$	$\overline{k_{obs}} \cdot 10^3/\text{s}^{-1}$	$SD \cdot 10^3/\text{s}^{-1}$	RSD/%
0,001	2,13	2,21	0,08	3,5
	2,22			
	2,28			
0,0025	5,00	5,78	5,00	86
	11,1			
	1,22			
0,005	22,6	22,2	0,4	1,7
	21,9			
	22,2			
0,0075	17,4	22,1	10,3	47
	15,0			
	34,0			
0,01	48,0	45,0	6,0	13
	49,0			
	38,1			

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

**Tablica 4.1.3.** Izmjerene konstante brzine ( $k_{obs}$ ) reakcije kvercetina i DPPH• u smjesi otapala dioksan-voda (0,99: 0,01 v/v) pri različitim koncentracijama kvercetina na 620 nm, pri temperaturi 25°C. Interval korišten za određivanje konstante iznosio je otprilike jedno poluvrijeme reakcije.

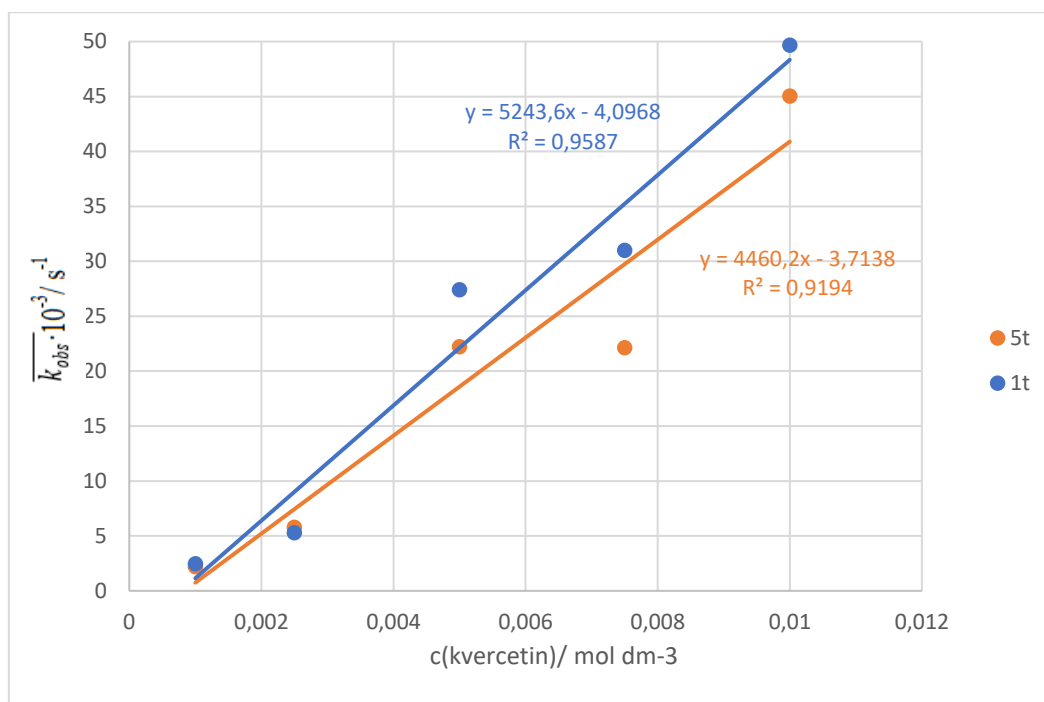
$c(\text{kvercetin})/$ $\text{mol dm}^{-3}$	$k_{obs} \cdot 10^2/\text{s}^{-1}$	$\overline{k_{obs}}$ $\cdot 10^2/\text{s}^{-1}$	$\text{SD} \cdot 10^2/\text{s}^{-1}$	RSD/%
0,001	0,527	0,526	0,004	0,7
	0,529			
	0,522			
0,0025	1,11	1,22	0,12	9,5
	1,20			
	1,34			
0,005	2,80	2,63	0,25	9,6
	2,75			
	2,34			
0,0075	3,63	3,44	0,17	5,1
	3,29			
	3,39			
0,01	4,32	4,97	0,57	12
	5,42			
	5,16			

**Tablica 4.1.4.** Izmjerene konstante brzine ( $k_{obs}$ ) reakcije kvercetina i DPPH• u smjesi otapala dioksan-voda (0,99: 0,01 v/v) pri različitim koncentracijama kvercetina na 620 nm, pri temperaturi 25°C. Interval korišten za određivanje konstante iznosio je otprilike 5 poluvremena reakcije.

$c(\text{kvercetin}) / \text{mol dm}^{-3}$	$k_{obs} \cdot 10^3 / \text{s}^{-1}$	$\overline{k_{obs}} / \cdot 10^3 / \text{s}^{-1}$	$SD \cdot 10^{-3} / \text{s}^{-1}$	RSD/ %
0,001	4,92	4,81	0,13	2,6
	4,67			
	4,84			
0,0025	11,0	11,3	0,2	2,2
	11,2			
	11,5			
0,005	22,5	22,2	0,2	1,0
	22,0			
	22,1			
0,0075	32,7	32,3	0,5	1,7
	31,7			
	32,6			
0,01	44,3	44,6	0,4	0,8
	45,0			
	44,7			

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

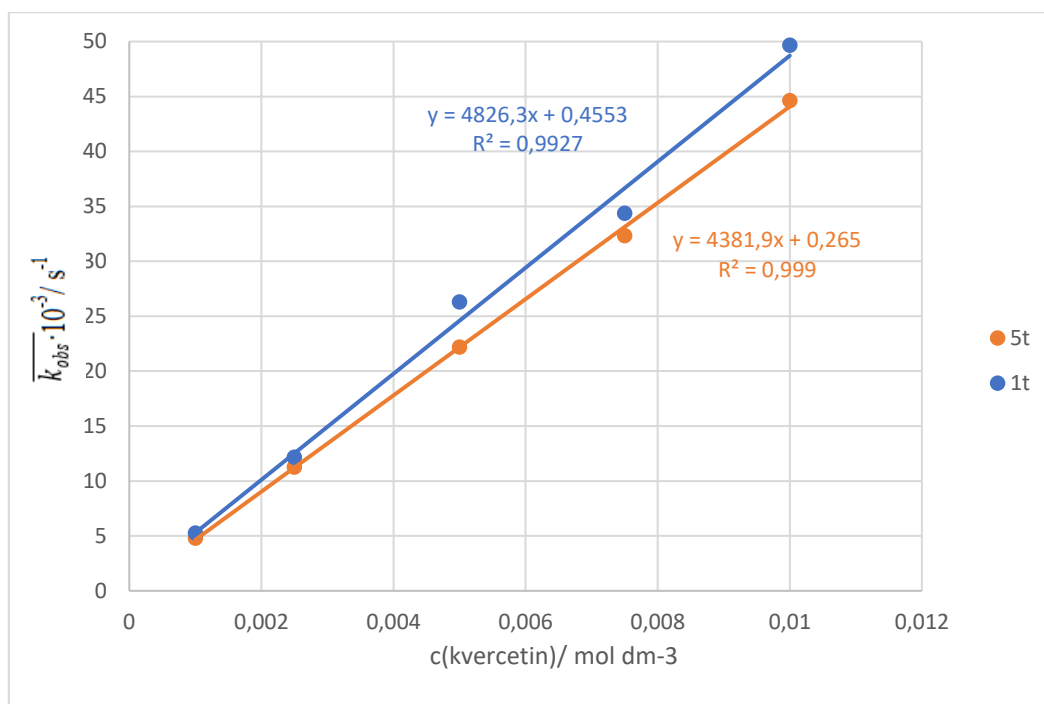
Prikazana je ovisnost izmjerene konstante brzine pseudo-prvog reda ( $k_{obs}$ ) za reakciju kvercetina i DPPH• u smjesi otapala dioksan-voda (0,99: 0,01 v/v) o koncentraciji kvercetina na 525 nm tijekom dva različita intervala: jedno poluvrijeme reakcije te pet poluvremena reakcije. (Slika 4.1.6.)



**Slika 4.1.6.** Prikaz ovisnosti konstante brzine ( $\bar{k}_{obs}$ ) reakcije kvercetina i DPPH• u smjesi otapala dioksan-voda (0,99: 0,01 v/v) o koncentraciji kvercetina na 525 nm, izračunane iz intervala  $\sim 1 t_{1/2}$  (•) i  $\sim 5 t_{1/2}$ , (•). Koncentracija DPPH• iznosi  $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ , pri temperaturi  $25^\circ\text{C}$ . Podatci iz Tablice 4.1.1. te Tablice 4.1.2.



Prikazana je ovisnost izmjerene konstante brzine pseudo-prvog reda ( $k_{obs}$ ) za reakciju kvercetina i DPPH• u smjesi otapala dioksan-voda (0,99: 0,01 v/v) o koncentraciji kvercetina na 620 nm. Konstante brzine su izračunane uzimajući dva različita intervala: jedno poluvrijeme reakcije te pet poluvremena reakcije. (Slika 4.1.7.)



**Slika 4.1.7.** Prikaz ovisnosti konstante brzine ( $\bar{k}_{obs}$ ) reakcije kvercetina i DPPH• u smjesi otapala dioksan-voda (0,99: 0,01 v/v) o koncentraciji kvercetina na 620 nm, izračunane iz intervala  $\sim 1 t_{1/2}$  (●) i  $\sim 5 t_{1/2}$ , (●). Koncentracija DPPH• iznosi  $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ , pri temperaturi  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ . Podaci iz Tablice 4.1.3. te Tablice 4.1.4.

**Tablica 4.1.5.** Usporedni prikaz relativnih standardnih devijacija, koeficijenta determinacije te nagiba pravaca za konstante brzine određene pri različitim parametrima

	525			620		
	RSD (%)	R <sup>2</sup>	a	RSD (%)	R <sup>2</sup>	a
1 t <sub>1/2</sub>	7-67	0,9587	5243	1-12	0,9927	4826
5 t <sub>1/2</sub>	2-87	0,9194	4460	1-3	0,9999	4381

Konstante brzine reakcije određene na 525 nm izračunate iz intervala  $t_{1/2}$  i  $5 t_{1/2}$  imaju visoku relativnu standardnu devijaciju, do 90%. Konstante brzine reakcije određene na 620 nm imaju znatno manju relativnu standardnu devijaciju (1-3 %), posebno u slučaju kad su konstante brzine računane iz  $5 t_{1/2}$ .

Ovisnost konstante brzine ( $k_{obs}$ ) reakcije kvercetina i DPPH• u smjesi otapala dioksan-voda (0,99: 0,01 v/v) o koncentraciji kvercetina na 525 nm je linearna. Odstupanje od linearnosti, izraženo preko koeficijenta determinacije  $R^2$  je značajno veće u slučaju kad su konstante brzine reakcije računane iz pet poluvremena reakcije (0,9194) nego iz jednog poluvremena reakcije (0,9587).

Ovisnosti konstante brzine ( $k_{obs}$ ) reakcije kvercetina i DPPH• u smjesi otapala dioksan-voda (0,99: 0,01 v/v) o koncentraciji kvercetina na 620 nm je linearna s koeficijentom determinacije od 0,9927 (određena iz  $t_{1/2}$ ) te 0,9999 (određena iz  $5 t_{1/2}$ ).

Nagibi pravaca određeni kada je konstanta izračunata iz jednog poluvremena reakcije na 525 nm i 620 nm se razlikuju, dok su njihove vrijednosti približno iste kada je konstanta brzine izračunata iz pet poluvremena.

Kod eksperimentalnih mjerenja konstanti brzina reakcije fenola i DPPH• i u dioksanu i metanolu često se javljaju eksperimentalni problemi koji se manifestiraju kao velika odstupanja u dobivenim rezultatima (Musialik i sur., 2009). U takvim slučajevima često se primjećuju i odstupanja od očekivane kinetike prvog reda. Iz ovih mjerenja je vidljivo da se na 525 nm prati dodatan proces koji utječe na izmjerene konstante brzina reakcija koji na 620 nm nije vidljiv. Ovo opažanje bi moglo biti korisno za razumijevanje eksperimentalnih problema kod određivanja konstante brzine reakcije drugih fenolnih spojeva i DPPH•.

Dobivena linearna ovisnost konstante brzine reakcije pseudo-prvog reda ( $k_{obs}$ ) mjerene na 620 nm o koncentraciji kvercetina u skladu je sa zakonom za brzinu reakcije:

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

U uvjetima pseudo-prvog reda:

$$[\text{kvercetin}] \gg [\text{DPPH}];$$

slijedi:

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

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

Utvrđeni zakon za brzinu reakcije je u skladu s zakonom koji su eksperimentalno utvrdili Musialik i sur. (2008.) za reakcije 10 flavonoida (uključujući kvercetin) i DPPH• radikal u različitim otapalima:

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

Iz nagiba pravca dobivene jednadžbe pravca ovisnosti konstante brzine reakcije pseudo prvog reda ( $k_{\text{obs}}$ ) i koncentracije kvercetina na 620 nm određena je konstanta brzine reakcije ( $k_2$ ) za reakciju kvercetina i DPPH• u smjesi otapala dioksan-voda (0,99: 0,01 v/v), pri temperaturi 25 °C:  **$k_2=4,38 \text{ mol}^{-1}\text{dm}^3\text{s}^{-1}$** . Konstanta izračunata iz nagiba pravca na 525 nm je približno ista i iznosi  **$k_2=4,46 \text{ mol}^{-1}\text{dm}^3\text{s}^{-1}$**

Musialik i sur., 2008. odredili su konstantu brzine reakcije kvercetina i DPPH• u čistom dioksanu  $k_2 = 3,0 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$ . Smjesa otapala dioksan-voda malo je polarnija od samog dioksana. Musialik i sur. navodi kako se s porastom polarnosti otapala povećava i brzina reakcije. Utvrdili su ubrzanje od oko 1000 puta u metanolu u odnosu na dioksan. što objašnjava zašto je određena konstanta brzine reakcije kvercetina i DPPH• u smjesi otapala dioksan-voda (0,99: 0,01 v/v) nešto veća od konstante koju su odredili Musialik i sur. u čistom dioksanu.

#### 4.2. Kinetički izotopni efekt reakcije kvercetina i DPPH• u smjesi otapala dioksan-voda (0,99:0,01 v/v) na 620 nm

Kinetički izotopni efekt (KIE) reakcije kvercetina i DPPH• izračunava se prema jednadžbi:

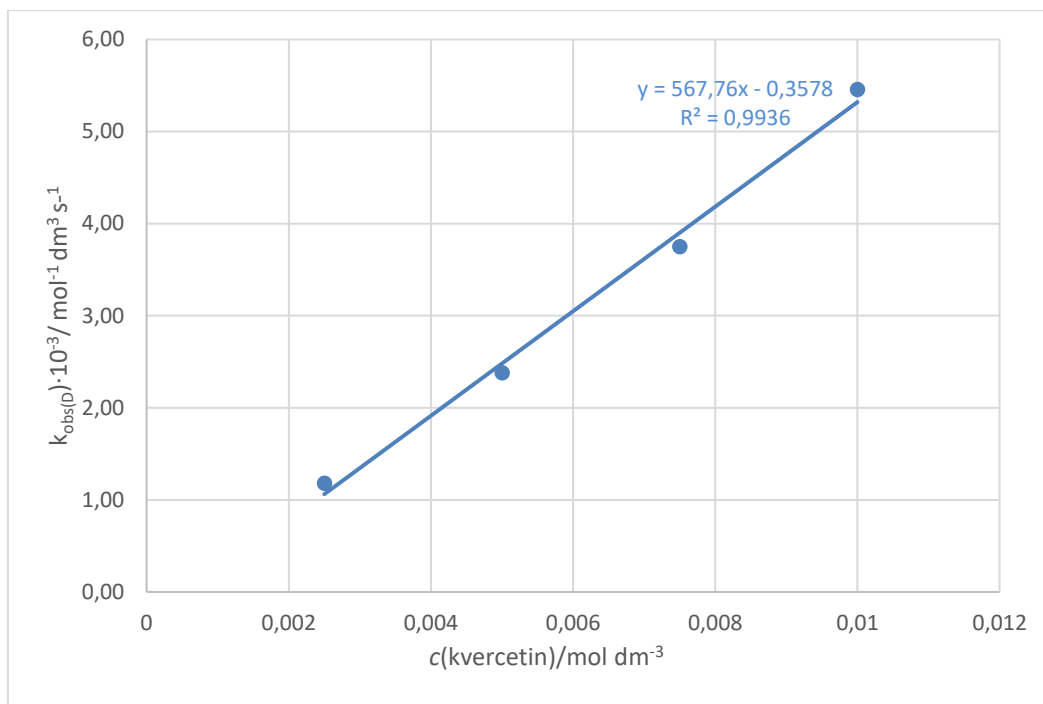
$$\text{KIE} = k_{\text{H}}/k_{\text{D}};$$

pri čemu je  $k_{\text{H}}$  konstanta brzine reakcije u otapalu dioksan-voda (0,99:0,01 v/v), a  $k_{\text{D}}$  konstanta brzine reakcije u otapalu dioksan-teška voda (0,99: 0,01 v/v). Upravo kako bi se mogao odrediti KIE otapalo je sadržavalo 1% vode. U otapalu dioksan-teška voda dolazi do zamjene OH protona s deuterijem te se dobije deuterirani supstrat što omogućuje određivanje primarnog kinetičkog izotopnog efekta. Izmjerene su konstante brzine reakcije  $k_{\text{obs(H)}}$  i  $k_{\text{obs(D)}}$  za reakciju kvercetina i DPPH• u smjesi otapala dioksan-voda (0,99: 0,01 v/v) i smjesi otapala dioksan-teška voda (0,99: 0,01 v/v) na 620 nm. Reakcijska smjesa je sadržavala kvercetin u suvišku te DPPH• koncentracije  $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ , mjerenje je provedeno pri 25 °C. Konstante brzine reakcije  $k_{\text{H}}$  i  $k_{\text{D}}$  izračunate su iz nagiba pravca ovisnosti  $\bar{k}_{\text{obs}}$  o koncentraciji kvercetina.

**Tablica 4.2.1.** Izmjerene konstante brzine ( $k_{\text{obs(D)}}$ ) reakcije kvercetina i DPPH• u smjesi otapala dioksan-teška voda (0,99:0,01 v/v) na 620 nm, pri temperaturi 25°C.

$c(\text{kvercetin})/$ $\text{mol dm}^{-3}$	$k_{\text{obs(D)}} \cdot 10^3$ $/\text{mol}^{-1}\text{dm}^3\text{s}^{-1}$	$\overline{k_{\text{obsD}}}$ $\cdot 10^3/$ $\text{mol}^{-1}\text{dm}^3\text{s}^{-1}$	SD $/\text{mol}^{-1}\text{dm}^3\text{s}^{-1}$	RSD/ %
0,0025	1,15	1,18	0,03	2,4
	1,18			
	1,20			
0,005	2,34	2,38	0,05	2,1
	2,43			
	2,37			
0,0075	3,73	3,75	0,04	1,2
	3,80			
	3,72			
0,01	5,33	5,45	0,16	3,0
	5,64			
	5,40			

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



**Slika 4.2.1.** Prikaz ovisnosti konstante brzine ( $\bar{k}_{\text{obs(D)}}$ ) reakcije kvercetina i DPPH• u smjesi otapala dioksan-teška voda (0,99: 0,01 v/v) o koncentraciji kvercetina na 620 nm. Koncentracija DPPH• iznosi  $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ , pri temperaturi 25°C. Podatci iz Tablice 4.2.1.

Iz nagiba pravca (Slika 4.2.1.) određena je konstanta brzine reakcije kvercetina i DPPH• u smjesi otapala dioksan-teška voda (0,99: 0,01 v/v)  $k_D = 0,568 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$ .

Konstanta brzine reakcije kvercetina i DPPH• u smjesi otapala dioksan-voda (0,99: 0,01 v/v) iznosi  $k_H = 4,38 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$  (poglavlje 4.1.).

**Tablica 4.2.2.** Konstante brzine ( $k_H$  i  $k_D$ ) i kinetički izotopni efekt reakcije kvercetina i DPPH• u smjesi otapala dioksan-voda (0,99: 0,01 v/v) na 620 nm, pri temperaturi 25°C.

dioksan-H <sub>2</sub> O	dioksan-D <sub>2</sub> O	KIE
$k_H / \text{mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$	$k_D / \text{mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$	
4,38	0,568	7,71

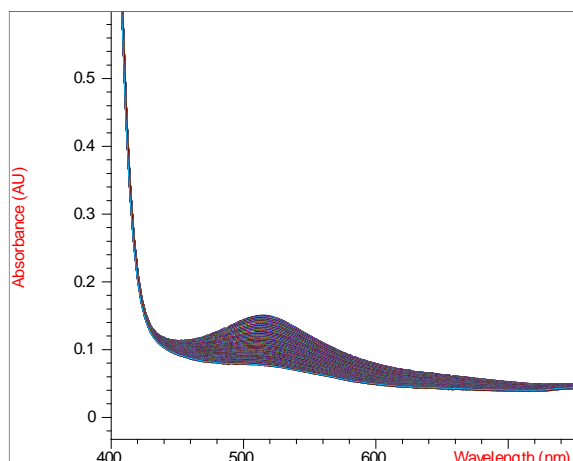
Iz dobivenih rezultata izračunat je kinetički izotopni efekt (KIE) prema jedndžbi  $\text{KIE} = k_H / k_D$ . Kinetički izotopni efekt na 620 nm iznosi 7,71.

Iznos kinetičkog izotopnog efekta upućuje na to da u stupnju koji određuje brzinu reakcije dolazi do prijelaza protona. Na temelju utvrđenog KIE može se isključiti ET reakcijski mehanizam, prema kojemu u stupnju koji određuje brzinu reakcije dolazi do prijelaza elektrona, nakon kojega slijedi brzi prijelaz protona. Dobiveni rezultat bi mogao odgovarati reakcijskom mehanizmu u kojemu dolazi do spregnutog prijelaza elektrona i protona (HAT ili PCET).

Foti i sur. (2015.) su kao reakcijski mehanizam brzog stupnja reakcije kvercetina i DPPH• u smjesi otapala metanol-voda (0,80:0,20 v/v) predložili SPLET (reakcija uzastopnog prijelaza protona i elektrona, engl. *Sequential Proton-Loss Electron-Transfer*). Najprije dolazi do prijelaza protona (PT), tj. disocijacije kvercetina pri čemu nastaje kvercetinjski anion nakon kojega slijedi prijelaz elektrona (ET) na DPPH•.

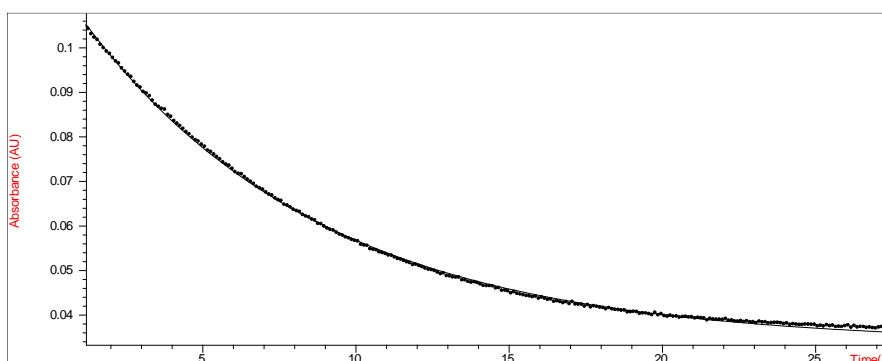
### 4.3. Konstanta brzine reakcije kvercetina i DPPH• u metanolu

Mjerenje konstante brzine reakcije kvercetina i DPPH• zasniva se na praćenju smanjenja apsorpcije DPPH• u reakcijskoj smjesi tijekom reakcije. Određene su konstante brzine reakcije kvercetina i DPPH• pri valnoj duljini od 525 nm u uvjetima pseudo-prvog reda, tako što je koncentracija kvercetina bila u suvišku, 8 puta veća od koncentracije DPPH•.



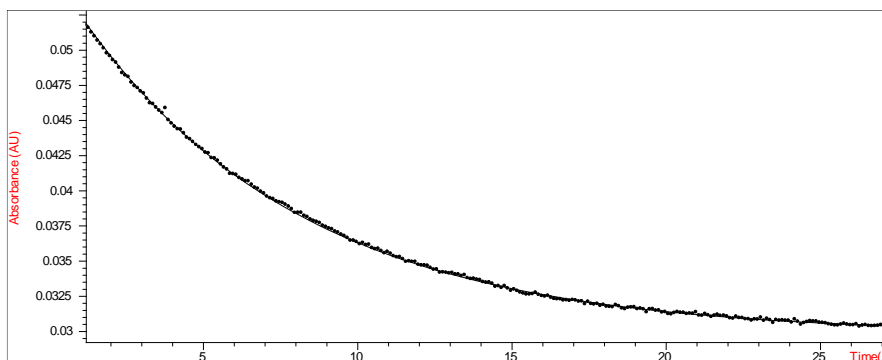
**Slika 4.3.1.** Spektralni profil reakcije kvercetina i DPPH• u metanolu pri koncentraciji kvercetina  $2,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$  te koncentraciji DPPH•  $3 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$

U spektralnom profilu (Slika 4.3.1.) reakcije kvercetina i DPPH• u metanolu nije vidljiva apsorpcija nastalog produkta na 501 nm kao što je vidljiva u spektralnom profilu reakcije kvercetina i DPPH• u smjesi otapala dioksan-voda (0,99: 0,01 v/v).



**Slika 4.3.2.** Ovisnost apsorpcije ( $A$ ) DPPH• na 525 nm o vremenu ( $t$ ) za reakciju kvercetina i DPPH• u metanolu pri koncentraciji kvercetina  $2,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$  te koncentraciji DPPH•  $3 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ , pri temperaturi  $25^\circ\text{C}$





**Slika 4.3.3.** Ovisnost apsorbancije ( $A$ ) DPPH• na 620 nm o vremenu ( $t$ ) za reakciju kvercetina i DPPH• u metanolu pri (%) pri koncentraciji kvercetina  $2,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$  te koncentraciji DPPH•  $3 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$  na temperaturi  $25^\circ\text{C}$

Dobivena ovisnost apsorbancije ( $A$ ) o vremenu za reakciju kvercetina i DPPH• u metanolu se ne razlikuje na 525 nm i 620 nm (Slika 4.3.2. i Slika 4.3.3.) te slijedi zakon za brzinu reakcije prvog reda.

Na temelju izmjerene ovisnosti određene su konstante brzine reakcije pseudo-prvog reda ( $k_{obs}$ ) kod koncentracije kvercetina  $c = 2,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ . Vremenski interval korišten za određivanje konstante brzine reakcije pseudo-prvog reda iznosio je otprilike pet poluvremena reakcije. Izmjerene konstante brzine reakcije prikazane su Tablici 4.3.1.

**Tablice 4.3.1.** Izmjerene konstante brzine ( $k_{obs}$ ) te izračunane konstante brzine ( $k_2$ ) reakcije kvercetina i DPPH• u metanolu pri temperaturi  $25^\circ\text{C}$ . Interval korišten za određivanje konstante iznosio je otprilike pet poluvremena reakcije.

$c(\text{kvercetin})/$ $\text{mol dm}^{-3}$	$k_{obs}/\text{s}^{-1}$	$k_2/\text{mol}^{-1}\text{dm}^3\text{s}^{-1}$	$\bar{k}_2 / \text{mol}^{-1}\text{dm}^3\text{s}^{-1}$	SD/ $\text{mol}^{-1}\text{dm}^3\text{s}^{-1}$	RSD/%
0,00025	$5 t_{1/2}$				
	0,104	415	469	50	11
	0,128	513			
0,120	480				

\* $k_2 = k_{obs}/c(\text{kvercetin})$ ,  $c(\text{DPPH}\bullet) = 3 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$

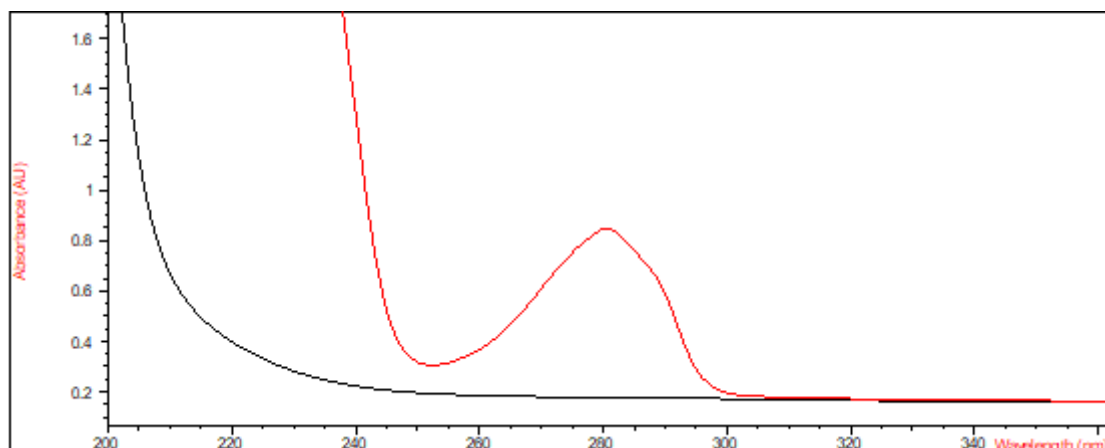
Određena je konstanta brzine reakcije kvercetina i DPPH• u metanolu iznosi  $k_2 = 469 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$ .

Konstanta brzine reakcije izračunana uzimajući interval od pet poluvremena reakcije je u skladu s prethodnim istraživanjem (Butković i sur., 2004) gdje je određena konstanta brzine reakcije kvercetina i DPPH• u metanolu  $k_2 = 476 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$ .

Vrijednost konstante brzine reakcije kvercetina i DPPH• na sobnoj temperaturi u metanolu u različitim studijama jako je varirala. Najznačajnija od tih studija je Litwinienka i sur.  $k_2 = 3000 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$  gdje je konstanta brzine reakcije određena uzimajući u obzir samo početni brzi stupanj reakcije. U ovom radu konstanta brzine reakcije određena je na temelju praćenja ukupne promjene apsorbancije do ~ vrijednosti 0. Početna vrijednost apsorbancije je nešto manja jer je dio reakcije protekao prije početka mjerenja ( $t_{1/2} = 6 \text{ s}$ ) prilikom miješanja otopine u kiveti.

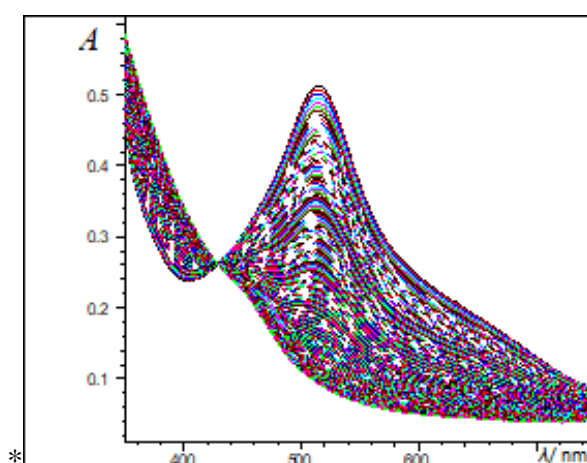
#### 4.4. Konstanta brzine reakcije katehina i DPPH• u metanolu

Mjerenje konstante brzine reakcije katehina i DPPH• se zasniva na praćenju smanjenja apsorbancije DPPH• u reakcijskoj smjesi tijekom reakcije. Određene su konstante brzine reakcije katehina i DPPH• pri valnoj duljini od 525 nm u uvjetima pseudo-prvog reda, tako što je koncentracija katehina bila u suvišku, 50 puta veća od koncentracije DPPH•.



Slika 4.4.1. Spektar  $2 \cdot 10^{-4}$  mol dm<sup>-3</sup> katehina u metanolu

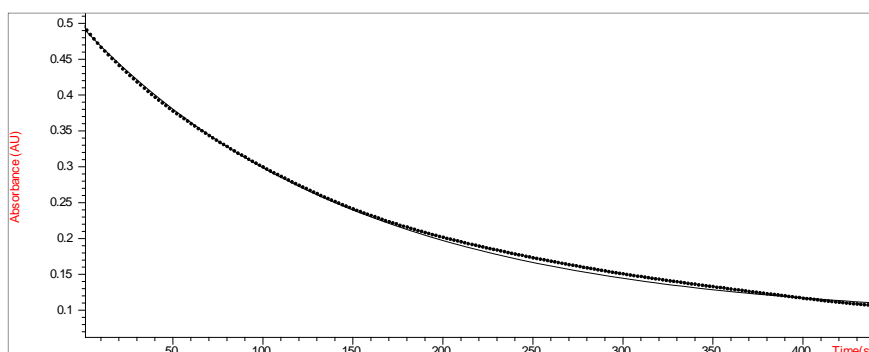
Iz spektra katehina određen je maksimum apsorpcijske vrpce ( $\lambda_{\max}$ ) pri 281 nm. Procijenjen  $\epsilon$  pri 281 nm iznosi  $\epsilon_{281} \sim 4200$  dm<sup>3</sup> mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>.



Slika 4.4.2. Spektralni profil reakcije katehina i DPPH• u otapalu metanolu pri koncentraciji katehina  $2,5 \cdot 10^{-3}$  mol dm<sup>-3</sup> te koncentraciji DPPH•  $5 \cdot 10^{-5}$  mol dm<sup>-3</sup>

Slika 4.4.2. prikazuje spektralni profil reakcije katehina i DPPH• u metanolu. Usporedbom sa Slikom 4.1.1. koja prikazuje spektralni profil reakcije kvercetina i DPPH• u smjesi otapala

dioksan-voda (0,99: 0,01 v/v) gdje je vidljiv produkt koji apsorbira na 517 nm uočava se da u reakciji katehina i DPPH• u metanolu ne nastaje produkt koji apsorbira na 517 nm.



**Slika 4.4.2.** Ovisnost apsorbancije DPPH• na 525 nm o vremenu za reakciju katehina i DPPH• u metanolu (100%) pri koncentraciji DPPH•  $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ , pri temperaturi 25°C

Dobivena ovisnost apsorbancije ( $A$ ) o vremenu za reakciju katehina i DPPH• u metanolu na 525 nm i 620 nm (Slika 4.4.2. i Slika 4.4.3.) slijedi zakon za brzinu reakcije prvog reda. Na temelju izmjerene ovisnosti određene su konstante brzine reakcije pseudo-prvog reda ( $k_{\text{obs}}$ ) kod koncentracije katehina  $c = 2,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ . Vremenski interval korišten za određivanje opservirane konstante brzine reakcije iznosio je otprilike pet poluvremena reakcije. Izmjerene konstante brzine reakcije prikazane su u Tablici 4.4.1.

**Tablica 4.4.1.** Izmjerene konstante brzine ( $k_{\text{obs}}$ ) reakcije katehina i DPPH• u metanolu pri temperaturi 25°C

$c(\text{katehin}) / \text{mol dm}^{-3}$	$k_{\text{obs}} \cdot 10^3 / \text{s}^{-1}$	$k_2 / \text{mol}^{-1} \text{dm}^3 \text{s}^{-1}$	$\overline{k_2} / \text{mol}^{-1} \text{dm}^3 \text{s}^{-1}$	SD / $\text{mol}^{-1} \text{dm}^3 \text{s}^{-1}$	RSD/%
0,0025	7,08	2,83	2,70	0,12	4,34
	6,62	2,65			
	6,54	2,62			

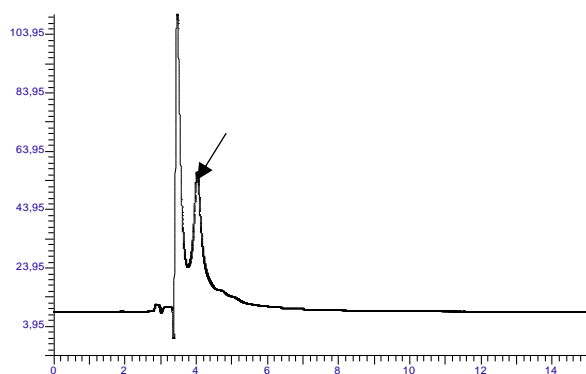
\* $k_2 = k_{\text{obs}} / c(\text{katehin})$

Određena je konstanta brzine reakcije katehina i DPPH• u metanolu  **$k_2 = 2,70 \text{ mol}^{-1} \text{dm}^3 \text{s}^{-1}$** . Konstanta nije u skladu s prethodnim istraživanjem Butković i sur. gdje je određena  $k_2 = 530 \text{ mol}^{-1} \text{dm}^3 \text{s}^{-1}$ . Kako bi se ispitala točnost dobivenih vrijednosti potrebno je ponoviti mjerenja.

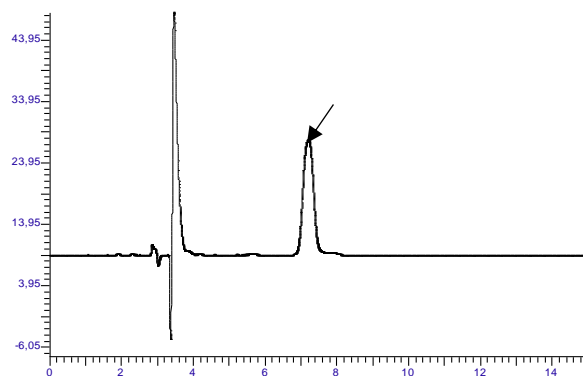
#### 4.5. HPLC analiza reakcije kvercetina i DPPH• te reakcije katehina i DPPH• u otapalu metanolu i dioksanu

HPLC analiza reakcije kvercetina i DPPH• te katehina i DPPH• provedena je uz primjenu metode koja je ranije je opisana u literaturi (Chandrasekar i sur., 2005). Korištena je mobilna faza metanol-voda (0,80:0,20 v/v). Mjerenje je provedeno na valnoj duljini 281 nm. Iz spektara reaktanta Slika 4.1.1, 4.1.2. te 4.4.1. vidljivo je da sva tri reaktanta apsorbiraju na navedenoj valnoj duljini. Najprije su izmjereni HPLC kromatogrami otopine DPPH•, otopine kvercetina i otopine katehina te samih otapala metanola i dioksana. Iz kromatograma su određena vremena zadržavanja kvercetina, katehina i DPPH•.

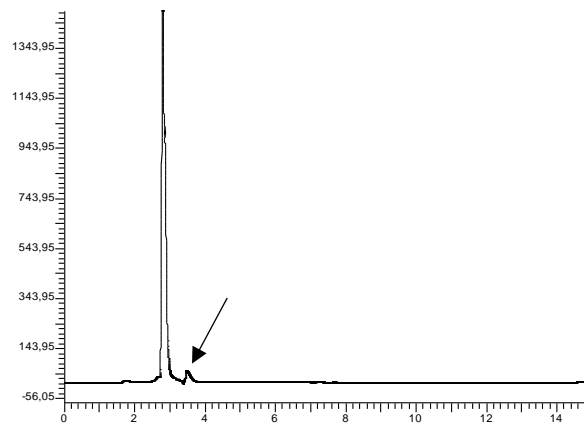
Kromatogrami otopina reaktanata prikazani su na slikama 4.5.1.- 4.5.3., a vremena zadržavanja u tablici 4.5.1. Vrijeme zadržavanja ne ovisi o otapalu koje je korišteno za otapanje reaktanta.



Slika 4.5.1. Kromatogram otopine kvercetina u dioksanu



Slika 4.5.2. Kromatogram otopine DPPH• u dioksanu



**4.5.3.** Kromatogram otopine katehina u dioksanu

**Tablica 4.5.1.** Vrijeme zadržavanja (min) reaktanata u metanolu i dioksanu

reaktant	$t_R$ /min metanol	$t_R$ /min dioksan
katehin	4,1	3,8
kvercetin	4,21	4,15
DPPH•	7,27	7,31

Reakcija kvercetina i DPPH• u metanolu ranije je ispitivana (Foti i sur., 2011, Musialik i sur., 2009, Butković i sur., 2004). Foti navodi da je reakcija bifazna te da se sav DPPH• potroši unutar prvih 100 ms, što odgovara smanjenju apsorbancije s 0,35 na 0,25, tj. za 30%. Nakon toga izmjerena apsorbancija u vidljivom (525 nm) odgovara kinoidnom produktu početne reakcije, a ne DPPH•. HPLC analiza reakcijske otopine provedena je tako što su na HPLC-u analizirani alikvoti reakcijske otopine u vremenu. Na temelju spektrofotometrijskog praćenja reakcije (Tablica 4.3.2. i 4.3.3.) određen je interval vremena u kojemu se apsorbancija reakcijske otopine na 525 nm smanjuje od početne vrijednosti od ~ 0,3 do ~ 0. Početna apsorbancija od 0,5 odgovara DPPH radikalumu. HPLC analiza je provedena kako bi se utvrdilo je li tijekom cijelog navedenog perioda u reakcijskoj otopini prisutan DPPH•. Reakcijska otopina je neposredno prije injektiranja na HPLC razrijeđena 10 puta u dioksanu kako bi se reakcija zaustavila. Analiziran je sastav reakcijske otopine reakcije kvercetina i DPPH• neposredno nakon miješanja reaktanata (što odgovara reakcijskoj otopini staroj nekoliko sekundi) te otopine stare 10 i 20 min.

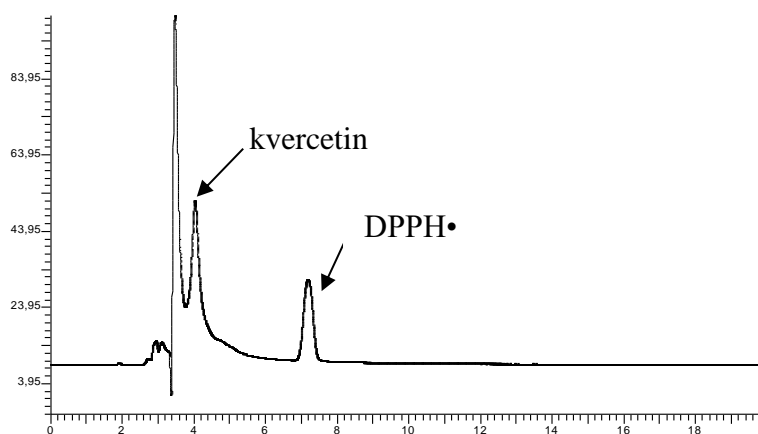
U reakcijskoj otopini u metanolu koncentracija kvercetina je bila  $c = 2,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$  te DPPH•  $c = 3 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ . U ovim reakcijskim uvjetima smanjenje apsorbancije na 525 nm na polovicu

početne vrijednosti traje 6 sekundi. Reakcijska otopina u metanolu je analizirana u trenutku neposredno nakon miješanja otopina reaktanata ( $t=0$ ) te  $t=10$  min i  $t=30$  min.

U reakcijskoj otopini u dioksanu koncentracija kvercetina bila je  $c=2,5 \cdot 10^{-4}$  mol  $\text{dm}^{-3}$  te  $c(\text{DPPH}\cdot)=3 \cdot 10^{-5}$  mol  $\text{dm}^{-3}$ . U ovim reakcijskim uvjetima smanjenje apsorbancije na 525 nm na polovicu početne vrijednosti iznosi 6 min. Stoga je reakcijska otopina u metanolu analizirana u trenutku  $t=0$  min,  $t=3$  min,  $t=6$  min,  $t=10$  min.

U reakcijskoj otopini u metanolu koncentracija katehina bila je  $c=3 \cdot 10^{-3}$  mol  $\text{dm}^{-3}$  te  $\text{DPPH}\cdot$   $c=3 \cdot 10^{-5}$  mol  $\text{dm}^{-3}$ . U ovim reakcijskim uvjetima smanjenje apsorbancije na 525 nm od početne vrijednosti do 0 traje 10 min. Reakcijska otopina u metanolu je analizirana u trenutku  $t=0$ .

Sastav reakcijske otopine praćen je tako što su se uspoređivala vremena zadržavanja pikova u kromatogramu reakcijske otopine s unaprijed određenim vremenima zadržavanja reaktanata.



**Slika 4.5.4.** Kromatogram reakcijske otopine kvercetina i  $\text{DPPH}\cdot$  u dioksanu u trenutku  $t=6$  min nakon početka reakcije

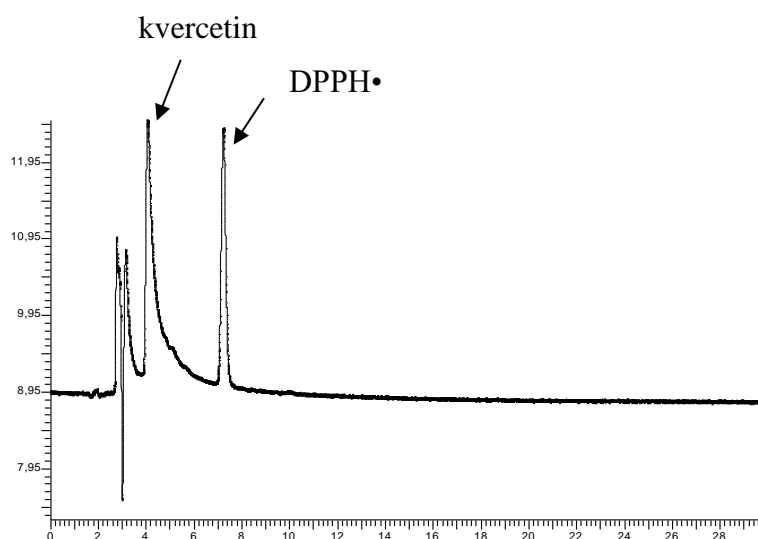
Na Slici 4.5.4. prikazan je kromatogram reakcijske otopine kvercetin i  $\text{DPPH}\cdot$  u dioksanu. U tablici 4.4.2. prikazana su vremena zadržavanja pikova određena iz Slike 4.5.4. Usporedbom vremena zadržavanja pikova kromatograma reakcijske otopine i vremenom zadržavanja reaktanta i otapala iz Tablice 4.5.1 određen je sastav reakcijske otopine.

**Tablica 4.4.3.** Prikaz vremena zadržavanja pikova kromatograma reakcijske otopine  
(Slika 4.5.4)

pik	$t_R$ /min	
1	3,8	dioksan
2	4,2	kvercetin
3	7,3	DPPH•

Pik 1 odgovara dioksanu, pik 2 kvercetinu te pik 3 DPPH•.

Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti da je tijekom 6 minuta reakcije, što odgovara smanjanju od ~50 % od početne vrijednosti apsorbancije, u reakcijskoj otopini u dioksanu prisutan DPPH radikal, te da smanjenje apsorbancije tijekom reakcije odgovara antioksidativnoj, redoks reakciji DPPH radikala i kvercetina.



**Slika 4.5.5.** Kromatogram reakcijske otopine kvercetina i DPPH• u metanolu u trenutku  $t=10$  min nakon početka reakcije

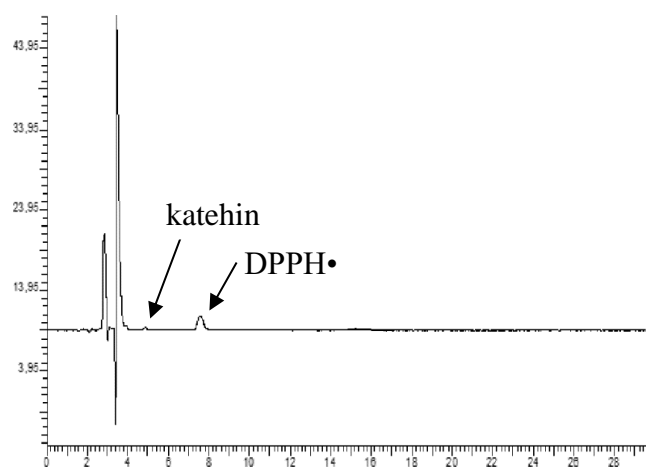
Na Slici 4.5.5. prikazan je kromatogram reakcijske otopine kvercetin i DPPH• u metanolu. U tablici 4.5.3. prikazana su vremena zadržavanja pikova određena iz Slike 4.5.5. Usporedbom vremena zadržavanja pikova kromatograma reakcijske otopine i vremenom zadržavanja reaktanta i otapala iz Tablice 4.5.1 određen je sastav reakcijske otopine.



**Tablica 4.5.3.** Prikaz vremena zadržavanja pikova kromatograma reakcijske otopine  
(Slika 4.5.5.)

pik	$t_R$ /min	
1	2,5	metanol
2	4,2	kvercetin
3	7,2	DPPH•

Pik 1 odgovara metanolu, pik 2 kvercetinu te pik 3 DPPH•.



**Slika 4.5.6.** Kromatogram reakcijske otopine katehina i DPPH• u metanolu u trenutku  $t=0$  min neposredno nakon početka reakcije

Na Slici 4.5.6. prikazan je kromatogram reakcijske otopine katehina i DPPH• u metanolu. U tablici 4.5.4. prikazana su vremena zadržavanja pikova određena iz Slike 4.5.6. Usporedbom vremena zadržavanja pikova kromatograma reakcijske otopine i vremenom zadržavanja reaktanta i otapala iz Tablice 4.5.1 određen je sastav reakcijske otopine.

**Tablica 4.5.4.** Prikaz vremena zadržavanja pikova kromatograma reakcijske otopine  
( Slika 4.5.6.)

pik	$t_R$ /min	
1	3,8	dioksan
2	4,1	katehin
3	7,3	DPPH•

Pik 1 odgovara dioksanu, pik 2 katehinu te pik 3 DPPH•.

Zbog instrumentalnih poteškoća predviđeni nastavak analize nije bilo moguće provesti.

Dobiveni rezultati nisu u skladu s mehanizmom kojega je predložio Foti i sur. koji navode da se DPPH• u cijelosti potroši u prvom koraku reakcije u 300 ms.

Potrebno je provesti dodatna mjerenja kako bi se mogli izvesti pouzdani zaključci o prisutnosti DPPH u reakcijskoj otopini tijekom reakcije. Trebalo bi odrediti vremena zadržavanja produkata, reduciranog DPPH i spoja/spojeva koji nastaju iz kvercetina te katehina.

Moguće je da se vrijeme zadržavanja reduciranog DPPH ne razlikuje od DPPH•. DPPH i DPPH• je moguće razlikovati ako bi se mjerenje provelo u vidljivom dijelu spektra ~ 520 nm, gdje DPPH ne apsorbira.

## 5. ZAKLJUČAK

U ovom diplomskom radu provedeno je istraživanje kinetike reakcije kvercetina i DPPH• u smjesi otapala dioksan-voda (0,99: 0,01 v/v) te metanolu. Sastav reakcijske otopine tijekom reakcije analiziran je uz primjenu HPLC kromatografije. Dodatno, određen je kinetički izotopni efekt reakcije kvercetina i DPPH• u smjesi otapala dioksan-voda (0,99:0,01 v/v). Za usporedbu su provedena i kinetička i HPLC mjerenja reakcije katehina i DPPH• te je određena konstanta brzine reakcije katehina i DPPH• u metanolu.

- Na temelju izmjerene ovisnosti konstante brzine reakcije pseudo-prvog reda o koncentraciji kvercetina određena je konstanta brzine reakcije kvercetina i DPPH• u dioksanu, koja iznosi  $4,38 \text{ mol}^{-1}\text{dm}^3\text{s}^{-1}$ .

Konstante brzine određene na 525 nm i 620 nm su približno iste, iako su odstupanja u izmjerenim vrijednostima na 525 nm znatno veća u odnosu na 620 nm.

Dobiveni rezultat je u skladu s vrijednostima u literaturi (Musialik i sur., 2008).

- Određena je konstanta brzine reakcije kvercetina i DPPH• u metanolu čija vrijednost iznosi  $469 \text{ mol}^{-1}\text{dm}^3\text{s}^{-1}$ .

U metanolu nisu utvrđena odstupanja u izmjerenim vrijednostima kao u dioksanu.

Dobiveni rezultat je u skladu s vrijednostima u literaturi (Butković i sur., 2004).

- Na temelju izmjerene ovisnosti konstante brzine reakcije pseudo-prvog reda o koncentraciji kvercetina u otapalu dioksan-D<sub>2</sub>O određena je konstanta brzine reakcije  $k_D$  ( $k_D = 0,568 \text{ mol}^{-1}\text{dm}^3\text{s}^{-1}$ ) te kinetički izotopni efekt koji iznosi 7,71.

U literaturi nisu pronađeni podatci.

- Određena je konstanta brzine reakcije katehina i DPPH• u metanolu koja iznosi  $2,70 \text{ mol}^{-1}\text{dm}^3\text{s}^{-1}$  pri temperaturi 25°C. Određena konstanta je znatno manja od vrijednosti u literaturi (Butković i sur., 2004).

- HPLC analizom je potvrđeno da je tijekom cijelog perioda u kojemu se prati smanjenje apsorbancije u vidljivom dijelu spektra u reakcijskoj otopini prisutan DPPH• (u reakciji kvercetina i DPPH• te u reakciji katehina i DPPH•). Ovo su preliminarni rezultati koje je potrebno dodatno potvrditi.

## 6. POPIS KRATICA OZNAKA I SIMBOLA

AAPH - 2,2'-azobis(2-amidinopropan) dihidroklorid

ABTS - 2,2'-azino-bis(3- etilbenzotiazoline-6-sufonska kiselina)

CERAC - antioksidativni kapacitet redukcije cerija, engl. *Cerium reducing antioxidant capacity*

CHROMAC - antioksidativni kapacitet redukcije kroma, engl. *Chromium reducing antioxidant capacity*

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

DAD - detektor s nizom dioda, engl. *Diode-Array Detection*

DPPH - 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil

ECD - detektor hvatanja elektrona, engl. *Electron capture detector*

ELSD - detektor za raspršivanje svjetlosti, engl. *Evaporative light scattering detector*

EPR - elektronska paramagnetna rezonancija, engl. *Electron paramagnetic resonance*

ET - prijenos elektrona, engl. *Single electron transfer*

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

FT- IR - Fourierova transformirana infracrvena spektroskopija, engl. *Fourier-transform infrared spectroscopy*

HAT - reakcija prijelaza atoma vodika, engl. *Hydrogen-Atom Transfer*

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

NMR - nuklearna magnetska rezonancija, engl. *Nuclear magnetic resonance*

ORAC - sposobnost hvatanja radikala kisika, engl. *Oxygen radical absorbance capacity*

PCET - reakcija spregnutog prijelaza elektrona i protona, engl. *Proton-Coupled Electron Transfer*

RNS - reaktivna dušikova specija, engl. *Reactive nitrogen substances*

ROS - reaktivna kisikova specija, engl. *Reactive oxygen species*

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

TEAC - Troloks ekvivalentni antioksidativni kapacitet, engl. *Trolox equivalent antioxidant capacity*

## 7. LITERATURA

Amić A, Marković Z, Dimitrić Marković JM, Stepanić V, Lučić B, Amić D. Towards an improved prediction of the free radical scavenging potency of flavonoids: the significance of double PCET mechanisms. *Food Chem*, 2014, 152, 578–585.

Atkins P, de Paula J. *Physical Chemistry*. 8<sup>th</sup> edition, Oxford, WH Freeman and Company, 2006, str. 794-804, 816.

Atkins P, de Paula J. *Physical Chemistry: Thermodynamics, Structure, and Change*. 10<sup>th</sup> edition, New York, WH Freeman and Company, 2014, str. 479- 480.

Bae J, Kim N, Shin Y, Kim S, Kim Y. Activity of catechins and their applications. *Biomed Dermatol*, 2020, 4, 8.

Bernatoniene J, Kopustinskiene DM. The Role of Catechins in Cellular Responses to Oxidative Stress. *Molecules*, 2018, 23(4), 965, 1-11.

Blois M, Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. *Nature*, 1958, 181, 1199–1200.

Butković V, Klasinc L, Bors W. Kinetic Study of Flavonoid Reactions with Stable Radicals. *J Agric Food Chem*, 2004, 52, 2816–2820.

Cao L, Yu H, Shao S, Wang S, Guo Y. Evaluating the antioxidant capacity of polyphenols with an off-on fluorescence probe and the mechanism study. *Anal Methods*, 2014, 6(18),7151.

Chaiyasit W, Elias RJ, McClements DJ, Decker EA. Role of physical structures in bulk oils on lipid oxidation. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2007, 47(3), 302.

Chandrasekar D, Madhusudhana K, Ramakrishna S, Diwan PV. Determination of DPPH free radical scavenging activity by reversed-phase HPLC: a sensitive screening method for polyherbal formulations. *J Pharm Biomed Anal*, 2006, 13, 40(2), 460-464.

Chatterjee T, Das D, Roy R, Tudu B, Sabhapondit S, Tamuly P, Pramanik P, Bandyopadhyay R. Molecular Imprinted Polymer Based Electrode for Sensing Catechin (+C) in Green Tea. *IEEE Sens J*, 2018, 18, 2236–2244.

Chen WL, Li WS, Fu PJ, Yeh A. Reactivity of dpph in the oxidation of catechol and catechin. *Int J Chem Kinet*, 2011, 43, 147–153.

Cindrić M, Marković A, Horvatić A. Spregnute tehnike tekućinski kromatograf – spektrometar masa: osnove metodologije i primjene. Zagreb, Medicina, 2009, str. 218-232.

Danta CC, Piplani P. The discovery and development of new potential antioxidant agents for the treatment of neurodegenerative diseases. *Expert Opin Drug Discov*, 2014, 9(10), 1205–1222.

Foti MC, Daquino C, Di Labio GA, Ingold KU. Kinetics of the oxidation of quercetin by 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (dpph •). *Org Lett*, 2011, 13, 4826–4829.

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

Galano A, Mazzone G, Alvarez-Diduk R, Marino T, Alvarez-Idaboy R, Russo N. Food Antioxidants: Chemical Insights at the Molecular Level. *Annu Rev Food Sc Technol*, 2016, 7, 335-52.

Grzesik M, Naparło K, Bartosz G, Sadowska-Bartosz I. Antioxidant properties of catechins: Comparison with other antioxidants. *Food Chem*, 2018, 241, 480–492.

HPLC Autosamplers: Perspectives, Principles, and Practices, 2019, <https://www.chromatographyonline.com/view/hplc-autosamplers-perspectives-principles-and-practices>, pristupljeno 24.1. 2022.

Kaštelan-Macan M. Kemijska analiza u sustavu kvalitete. Zagreb, Školska knjiga, 2003, str. 217–235.

Kedare SB, Singh RP. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *J Food Sci Technol*, 2011, 48(4), 412-413.

Kilfoyle BE, Kaushik D, Terebetski J, Bose S, Michniak-Kohn B. Formulating, Packaging, and Marketing of Natural Cosmetic Products: The Use of Quercetin and Curcumin in Skin Care Consumer Products. New York, John Wiley and Sons, 2011, 259–286.

Leopoldini M, Russo N, Toscano M. The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chem*, 2011, 125, 292.

Marrazzo G, Barbagallo I, Galvano F, Malaguarnera M, Gazzolo D. Role of dietary and endogenous antioxidants in diabetes. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2014, 54(12), 1599–1616.

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.

Osman AM. Multiple pathways of the reaction of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH·) with (+)-catechin: evidence for the formation of a covalent adduct between DPPH· and the oxidized form of the polyphenol. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 412(3), 473-478.

Panchal RG, Reid SP, Tran JP, Bergeron AA, Wells J. Identification of an antioxidant smallmolecule with broad-spectrum antiviral activity. *Antivir Res*, 2012, 93(1), 23–29.

Parhiz H, Roohbakhsh A, Soltani F, Rezaee R, Iranshahi M. Antioxidant and anti-inflammatory properties of the citrus flavonoids hesperidin and hesperetin: an updated review of their molecular mechanisms and experimental models. *Phytother Res*, 2015, 29(3), 323–331.

Prior RL, Wu X, Schaich K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J Agric Food Chem*, 2005, 53(10), 4290-4302.

Roleira FMF, Tavares-Da-Silva EJ, Varela CL, Costa SC, Silva T. Plant derived and dietary phenolic antioxidants: anticancer properties. *Food Chem*, 2015, 183, 235–258.

Sayre LM, Perry G, Smith MA. Oxidative stress and neurotoxicity. *Chem Res Toxicol*, 2008, 21, 172.

Shahidi F, Ying Z. Measurement of antioxidant activity. *J Funct Foods*, 2015, 18, 759- 767.



Sunkireddy P, Jha SN, Kanwar JR, Yadav SC. Natural antioxidant biomolecules promises future nanomedicine based therapy for cataract. *Colloids Surf B*, 2013, 112, 554–562.

Tinkel J, Hassanain H, Khouri SJ. Cardiovascular antioxidant therapy: a review of supplements, pharmacotherapies and mechanisms. *Cardiol Rev*, 2012, 20(2), 77–83.

Uvod u kemijsku analizu, 2002, [http://free-zg.htnet.hr/Svjetlana Luterotti/](http://free-zg.htnet.hr/Svjetlana_Luterotti/), pristupljeno 24.1. 2022.

Vysakh A, Ratheesh M, Rajmohanan TP, Pramod C, Premlal S. Polyphenolics isolated from virgin coconut oil inhibits adjuvant induced arthritis in rats through antioxidant and anti-inflammatory action. *Int Immunopharmacol*, 2014, 20(1), 124–130.

Watson D Pharmaceutical Analysis. Glasgow, Churchill Livingstone, 1999, str. 87, 238, 248–250.

Widsten P, Cruz CD, Fletcher GC, Pajak MA, McGhie TK. Tannins and extracts of fruit byproducts: antibacterial activity against foodborne bacteria and antioxidant capacity. *J Agric Food Chem*, 2014, 62(46), 11146– 11156.

Yan XT, Lee SH, Li W, Sun YN, Yang SY. Evaluation of the antioxidant and anti-osteoporosis activities of chemical constituents of the fruits of *Prunus mume*. *Food Chem*, 2014, 156, 408– 415.

## 8. SAŽETAK/ SUMMARY

### 8.1. Sažetak

Kvercetin spada u podskupinu flavonola te mu se pripisuje niz bioloških učinaka: antioksidativni, antikarcinogeni, antialergijski, protuupalni i drugi. Reakcije flavonoida i DPPH• uobičajeno se prate tako što se mjeri smanjenje apsorbancije na valnoj duljini koja odgovara maksimumu DPPH•. Prema novijoj literaturi (Foti i sur., 2011) smanjenje apsorbancije u vidljivom području spektra nije povezano izravno s redukcijom DPPH•, te reakcijska otopina, osim početno, ne sadrži DPPH•. U ovom je diplomskom radu ispitana kinetika reakcije kvercetina i DPPH• radikala u smjesi otapala dioksan-voda (0,99:0,01 v/v) te u metanolu. Na temelju izmjerene ovisnosti konstante brzine reakcije pseudo-prvog reda o koncentraciji kvercetina određena je konstanta brzine reakcije kvercetina i DPPH• u dioksanu, koja iznosi  $4,38 \text{ mol}^{-1}\text{dm}^3\text{s}^{-1}$ . Konstante brzine određene na 525 nm i 620 nm su približno iste, iako su odstupanja u izmjerenim vrijednostima na 525 nm znatno veća u odnosu na 620 nm. Određena je konstanta brzine reakcije kvercetina i DPPH• u metanolu čija vrijednost iznosi  $469 \text{ mol}^{-1}\text{dm}^3\text{s}^{-1}$ . U metanolu nisu utvrđena odstupanja u izmjerenim vrijednostima kao u dioksanu. Na temelju izmjerene ovisnosti konstante brzine reakcije pseudo-prvog reda o koncentraciji kvercetina u otapalu dioksan-D<sub>2</sub>O određena je konstanta brzine reakcije  $k_D$  koja iznosi  $0,568 \text{ mol}^{-1}\text{dm}^3\text{s}^{-1}$  te kinetički izotopni efekt koji iznosi 7,71. Ovi podaci su po prvi puta određeni u ovom diplomskom radu. Za usporedbu su provedena i kinetička i HPLC mjerenja reakcije katehina i DPPH•. Određena je konstanta brzine reakcije katehina i DPPH• u metanolu koja iznosi  $2,70 \text{ mol}^{-1}\text{dm}^3\text{s}^{-1}$ . HPLC analizom je potvrđeno da je tijekom cijelog perioda u kojemu se prati smanjenje apsorbancije u vidljivom dijelu spektra u reakcijskoj otopini prisutan DPPH• (u reakciji kvercetina i DPPH• te u reakciji katehina i DPPH•).

## 8.2. Summary

Quercetin is a flavonol, a subclass of flavonoids that has numerous pharmacological uses due to its antioxidant, anticarcinogenic, antiallergic and anti-inflammatory properties. The reaction of flavonoids and DPPH• are commonly monitored by measuring the decrease in absorption at the wavelength corresponding to the maximum DPPH•. According to new literature (Foti et al., 2011), the decrease in absorption in the visible region of the spectrum is not directly related to the reduction of DPPH• and the reaction solution, except initially, does not contain the DPPH radical. In this thesis, the reaction kinetics of quercetin and DPPH• in a solvent mixture of dioxane-water (0,99:0,01 v/v) and methanol were investigated. Based on the measured dependence of the pseudo-first order reaction rate constant on the quercetin concentration, the reaction rate constant of quercetin and DPPH• in dioxane was determined to be  $4,38 \text{ mol}^{-1}\text{dm}^3\text{s}^{-1}$ . The rate constants determined at 525 nm and 620 nm are approximately the same, although the deviations in the measured values at 525 nm are significantly larger compared to 620 nm. The rate constant of the reaction of quercetin and DPPH• in methanol with a value of  $469 \text{ mol}^{-1}\text{dm}^3\text{s}^{-1}$  was determined. No deviations in the measured values were found in methanol as in dioxane. Based on the measured dependence of the pseudo-first order reaction rate constant on the quercetin concentration in the solvent dioxane-D<sub>2</sub>O, a reaction rate constant  $k_D$  of  $0,568 \text{ mol}^{-1}\text{dm}^3\text{s}^{-1}$  and a kinetic isotopic effect of 7,71 were determined. These data were determined for the first time in this thesis. Both kinetic and HPLC measurements of catechin and DPPH• reactions were performed for comparison. The rate constant of the reaction of catechins and DPPH• in methanol was determined to be  $2,70 \text{ mol}^{-1}\text{dm}^3\text{s}^{-1}$ . HPLC analysis confirmed that DPPH• (in the reaction of quercetin and DPPH• and the reaction catechin and DPPH•) was present in the reaction solution during the whole period in which the decrease in absorption was monitored in the visible part of the spectrum.

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

# Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

## Kinetika reakcije kvercetina i DPPH radikala

Dorotea Murković

### SAŽETAK

Kvercetin spada u podskupinu flavonola te mu se pripisuje niz bioloških učinaka: antioksidativni, antikarcinogeni, antialergijski, protuupalni i drugi. Reakcije flavonoida i DPPH• uobičajeno se prate tako što se mjeri smanjenje apsorbancije na valnoj duljini koja odgovara maksimumu DPPH•. Prema novijoj literaturi (Foti i sur., 2011) smanjenje apsorbancije u vidljivom području spektra nije povezano izravno s redukcijom DPPH•, te reakcijska otopina, osim početno, ne sadrži DPPH•. U ovom je diplomskom radu ispitana kinetika reakcije kvercetina i DPPH• radikala u smjesi otapala dioksan-voda (0,99:0,01 v/v) te u metanolu. Na temelju izmjerene ovisnosti konstante brzine reakcije pseudo-prvog reda o koncentraciji kvercetina određena je konstanta brzine reakcije kvercetina i DPPH• u dioksanu, koja iznosi  $4,38 \text{ mol}^{-1}\text{dm}^3\text{s}^{-1}$ . Konstante brzine određene na 525 nm i 620 nm su približno iste, iako su odstupanja u izmjerenim vrijednostima na 525 nm znatno veća u odnosu na 620 nm. Određena je konstanta brzine reakcije kvercetina i DPPH• u metanolu čija vrijednost iznosi  $469 \text{ mol}^{-1}\text{dm}^3\text{s}^{-1}$ . U metanolu nisu utvrđena odstupanja u izmjerenim vrijednostima kao u dioksanu. Na temelju izmjerene ovisnosti konstante brzine reakcije pseudo-prvog reda o koncentraciji kvercetina u otapalu dioksan-D<sub>2</sub>O određena je konstanta brzine reakcije  $k_D$  koja iznosi  $0,568 \text{ mol}^{-1}\text{dm}^3\text{s}^{-1}$  te kinetički izotopni efekt koji iznosi 7,71. Ovi podaci nisu prethodno pronađeni u literaturi te su po prvi puta određeni u ovom diplomskom radu. Za usporedbu su provedena i kinetička i HPLC mjerenja reakcije katehina i DPPH•. Određena je konstanta brzine reakcije katehina i DPPH• u metanolu koja iznosi  $2,70 \text{ mol}^{-1}\text{dm}^3\text{s}^{-1}$ . HPLC analizom je potvrđeno da je tijekom cijelog perioda u kojemu se prati smanjenje apsorbancije u vidljivom dijelu spektra u reakcijskoj otopini prisutan DPPH• (u reakciji kvercetina i DPPH• te u reakciji katehina i DPPH•).

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

Rad sadrži: 62 stranica, 31 grafičkih prikaza, 16 tablica i 40 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Antioksidans, antioksidativna aktivnost, DPPH, kvercetin, konstanta brzine reakcije, kinetički izotopni efekt, HPLC, UV-VIS

Mentor: **Dr. sc. Cvijeta Jakobušić Brala**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Cvijeta Jakobušić Brala**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*  
**Dr. sc. Monika Barbarić**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*  
**Dr. sc. Viktor Pilepić**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: svibanj 2022.

## Basic documentation card

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

Diploma thesis

### Kinetics of quercetin and DPPH radical reaction

Dorotea Murković

#### SUMMARY

Quercetin is a flavonol, a subclass of flavonoids that has numerous pharmacological uses due to its antioxidant, anticarcinogenic, antiallergic and anti-inflammatory properties. The reaction of flavonoids and DPPH• are commonly monitored by measuring the decrease in absorption at the wavelength corresponding to the maximum DPPH•. According to new literature (Foti et al., 2011), the decrease in absorption in the visible region of the spectrum is not directly related to the reduction of DPPH• and the reaction solution, except initially, does not contain the DPPH radical. In this thesis, the reaction kinetics of quercetin and DPPH• in a solvent mixture of dioxane-water (0,99:0,01 v/v) and methanol were investigated. Based on the measured dependence of the pseudo-first order reaction rate constant on the quercetin concentration, the reaction rate constant of quercetin and DPPH• in dioxane was determined to be 4,38 mol<sup>-1</sup>dm<sup>3</sup>s<sup>-1</sup>. The rate constants determined at 525 nm and 620 nm are approximately the same, although the deviations in the measured values at 525 nm are significantly larger compared to 620 nm. The reaction rate constant of quercetin and DPPH• in methanol with a value of 469 mol<sup>-1</sup>dm<sup>3</sup>s<sup>-1</sup> was determined. No deviations in the measured values were found in methanol as in dioxane. Based on the measured dependence of the pseudo-first order reaction rate constant on the quercetin concentration in the solvent dioxane-D<sub>2</sub>O, a reaction rate constant  $k_D$  of 0,568 mol<sup>-1</sup>dm<sup>3</sup>s<sup>-1</sup> and a kinetic isotopic effect of 7,71 were determined. These data were not previously found in the literature and were determined for the first time in this thesis. Both kinetic and HPLC measurements of catechin and DPPH• reactions were performed for comparison. The rate constant of the reaction of catechins and DPPH• in methanol was determined to be 2,70 mol<sup>-1</sup>dm<sup>3</sup>s<sup>-1</sup>. HPLC analysis confirmed that DPPH• (in the reaction of quercetin and DPPH• and the reaction catechin and DPPH•) was present in the reaction solution during the whole period in which the decrease in absorption was monitored in the visible part of the spectrum.

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

Thesis includes: 62 pages, 31 figures, 16 tables and 40 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Antioxidant, antioxidant activity, DPPH, quercetin, rate constant, kinetic isotope effect, HPLC, UV-VIS

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

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

The thesis was accepted: May 2022.