

Kinetički izotopni efekti u reakcijama fenolnih kiselina i DPPH• radikala

Lalić, Josipa

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:541408>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-10**



Repository / Repozitorij:

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



Josipa Lalić

**Kinetički izotopni efekti u reakcijama fenolnih
kiselina i DPPH• radikala**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2022.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu i izrađen u Zavodu za fizikalnu kemiju pod stručnim vodstvom doc. dr. sc. Cvijete Jakobušić Brala.

Veliko hvala mentorici doc. dr. sc. Cvijeti Jakobušić Brala na stručnom vodstvu, pomoći i strpljenju tijekom izrade diplomskog rada.

Zahvaljujem svim prijateljima i dečku koji su mi bili podrška tijekom studiranja te su mi pružili mnoge nezaboravne uspomene.

Najveća zahvala ide mojoj obitelji na bezuvjetnoj podršci, razumijevanju i ljubavi.

Sadržaj

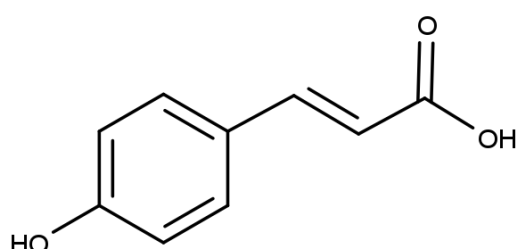
| | |
|---|----|
| 1. UVOD | 1 |
| 1.1. Fenolni spojevi | 1 |
| 1.1.1. <i>p</i>-kumarinska kiselina | 1 |
| 1.1.2. Ferulična kiselina | 3 |
| 1.1.3. Vanilinska kiselina | 5 |
| 1.1.4. Vanilin | 6 |
| 1.1.5. Kvercetin | 7 |
| 1.2. Kemijska kinetika | 9 |
| 1.2.1. Brzina kemijske reakcije | 9 |
| 1.2.2. Zakon za brzinu reakcije | 10 |
| 1.2.3. Kinetički izotopni efekt | 12 |
| 1.3. Reakcija fenolnih spojeva i DPPH radikala | 14 |
| 2. OBRAZLOŽENJE TEME | 16 |
| 3. MATERIJALI I METODE | 17 |
| 3.1. Kemikalije, instrumenti i laboratorijski pribor | 17 |
| 3.2. Mjerenje konstantne brzine reakcije fenolnih spojeva s DPPH• | 18 |
| 3.3. Određivanje kinetičkog izotopnog efekta reakcije fenolnih spojeva i DPPH• | 19 |
| 4. REZULTATI I RASPRAVA | 20 |
| 4.1. Reakcija <i>p</i>-kumarinske kiseline i DPPH• | 22 |
| 4.2. Reakcija ferulične kiseline i DPPH• | 28 |
| 4.3. Reakcija vanilinske kiseline i DPPH• | 32 |
| 4.4. Reakcija vanilina i DPPH• | 36 |
| 4.5. Reakcija kvercetina i DPPH• | 43 |
| 5. ZAKLJUČAK | 49 |
| 6. POPIS KRATICA OZNAKA I SIMBOLA | 51 |
| 7. LITERATURA | 52 |
| 8. SAŽETAK/ SUMMARY | 56 |
| 8.1. Sažetak | 56 |
| 8.2. Summary | 57 |

1. UVOD

1.1. Fenolni spojevi

1.1.1. *p*-kumarinska kiselina

Kumarinska kiselina (4-hidroksi-cimetna kiselina, $M = 164,16$) je hidroksilni derivat cimetne kiseline koji se u prirodi nalazi u obliku tri izomera (orto, meta i para). Najčešće prisutna forma je upravo *p*-kumarinska kiselina koja se može naći u mnogom voću (posebice u kruškama i bobičastom voću), povrću i žitaricama u obliku slobodne kiseline ili estera. U biljkama, *p*-kumarinska kiselina je komponenta lignina i tanina (Boz, 2015).



Slika 1.1.1.1 Struktura *p*-kumarinske kiseline

Kao i drugi mnogi fenolni spojevi, i *p*-kumarinska kiselina pokazuje antioksidativni učinak pri čemu se za učinak smatra odgovornom fenilna skupina (Shen i sur, 2019; Matthew i sur, 2015).

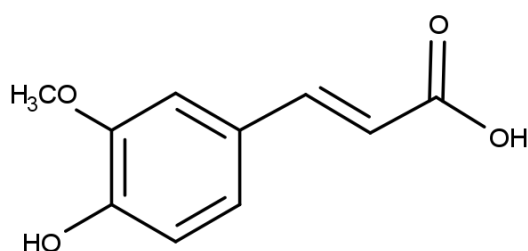
2,2'-azobis-2-metil-propanimidamid (AAPH) je vodotopljivi azo spoj koji inducira stvaranje ROS-a te se često koristi kod karakterizacije antioksidansa. Na PC12 staničnoj liniji tretiranoj s AAPH, *p*-kumarinska kiselina je smanjila nastajanje ROS-a i otpuštanje laktat dehidrogenaze. U *in vivo* pokusima *p*-kumarinska kiselina je potaknula ekspresiju antioksidativnih gena kao GPx, SOD, HO-1 i NQO1. Nadalje, kod miševa na dijeti bogatoj mastima *p*-kumarinska kiselina je smanjila jetrenu steatozu, smanjila lipidnu peroksidaciju i potaknula detoksificirajuće enzime iskazujući učinak protiv hiperlipidemije (Shen i sur, 2019).

p-kumarinska kiselina pokazuje veliki broj bioloških učinaka koji su još izrazitiji kod konjugata s mono- i polisaharidima, aminima i organskim kiselinama kao kininskom kiselinom. *p*-kumarinska kiselina i derivati pokazuje antimikrobnu, antivirusnu, antimutagenu te antitumorsku aktivnost. Pomaže kod dijabetesa smanjenjem intestinalne apsorpcije ugljikohidrata, djelujući na enzime uključene u metabolizam glukoze te stimuliranjem

otpuštanja inzulina. Konjugati pokazuju jaču aktivnost, ali vrlo lošu apsorpciju te je potrebno poboljšati farmakokinetička svojstva konjugata (Pei i sur, 2015).

1.1.2. Ferulična kiselina

Ferulična kiselina (4-hidroksi-3-metoksicimetna kiselina, $M = 194,18$) je fenolni spoj koji se u prirodi može naći u obliku dva izomera, *cis* (žuta uljasta tekućina) i *trans* (bijeli kristal). U prirodi se 90% ferulične kiseline nalazi u *trans* konfiguraciji. U visokim koncentracijama ferulična kiselina se može naći u grahu, patlidžanu, artičokama, cikli, pšeničnim i kukuruznim mekinjama. Može se naći u slobodnom obliku, u obliku dimera ili esterificirana s proteinima i polisaharidima u staničnom zidu. Važna je komponenta staničnog zida jer je odgovorna za umrežavanje polisaharida i drugih polimera staničnog zida (Paiva i sur, 2013).



Slika 1.1.2.1 Struktura ferulične kiseline

Antioksidativni potencijal ferulične kiseline najviše se pripisuje njenoj sposobnosti hvatanja radikala, pri čemu nastaje stabilni fenoksi radikal. Bočni nezasićeni lanac omogućuje proširenu konjugaciju koja dodatno stabilizira radikal. Najvjerojatnija sudbina takvog radikala je kondenzacija s drugim radikalom, uključujući drugim ferulatom pri čemu nastaje dimer kurkumin koji je također antioksidans (Graf, 1992).

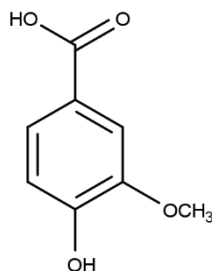
Ferulična kiselina u organizmu regulira razinu ROS-a te aktivnost antioksidativnih enzima. Primjerice, u slučaju komplikacija dijabetesa kao dijabetičke nefropatije, neuropatije te retinopatije se povećava aktivnost enzima aldoza reduktaze koja kao koenzim troši NADPH i posljedično se narušava redoks stanje u organizmu. Ferulična kiselina djeluje kao inhibitor aldoza reduktaze, te time posredno smanjuje nastajanje naprednih krajnjih proizvoda glikacije (*Advanced Glycation End Products* - AGE) koji nepovoljno djeluju u slučaju dijabetičke nefropatije povećavajući količinu izvanstaničnog matriksa u glomerulima (Li i sur, 2021).

Ferulična kiselina, kao i druge prirodno prisutne metoksilirane fenolne kiseline, se istražuje zbog potencijala za tretman nuspojava izazvanih lijekovima i prevenciju toksičnosti uzrokovanih primjerice arsenom, ugljikovim i kadmijevim tetrakloridom (Stompor-Goracy i Machaczka, 2021).

Ferulična kiselina pokazuje učinak u tretmanu neurodegenerativnih bolesti, dijabetesa, kardiovaskularnih bolesti, upale, tumora te bakterijskih i virusnih infekcija (Stompor-Goracy i Machaczka, 2021). Dobro absorbira UV zračenje te uslijed strukturne sličnosti s tirozinom se smatra da kompetitivno inhibira sintezu melanina u koži. Iz ovog razloga, a i zbog antimikrobnih i protupalnih svojstava često se nalazi u dermatološkim pripravcima protiv starenja, hiperpigmentacije i akni (Chaudary i sur, 2019).

1.1.3. Vanilinska kiselina

Vanilinska kiselina (4-hidroksi-3-metoksibenzojeva kiselina, $M = 168,15$), oksidirana je forma vanilina koja se također koristi kao aroma i miris. Može se naći u nekoliko vrsta voća, maslinama, zrnju žitarica, ali i u vinu i pivu. (Kiokias i sur, 2020)



Slika 1.1.3.1. Struktura vanilinske kiseline

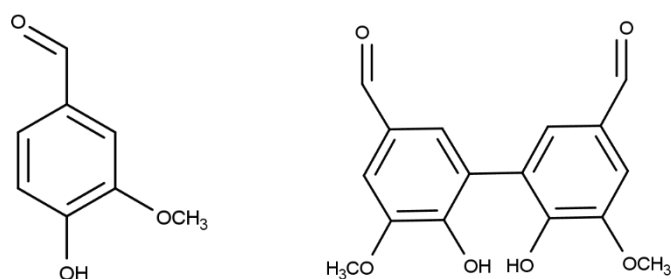
U nekoliko istraživanja utvrđen je snažni antioksidativni učinak vanilinske kiseline (Keller et al, 2016; Vishnu et al, 2017). Chou i sur (2010), su usporedili antioksidativnu aktivnost vanilina i vanilinske kiseline izoliranih iz origana (*Origanum vulgare*). Vanilinska kiselina je pokazala veću efikasnost hvatanja radikala te veći protektivni učinak kod lipidne peroksidacije, što se povezuje za karboksilnu skupinu, koja nije pristuna u strukturi vanilina.

U istraživanju Anbalagan i sur (2017) potvrdila se antioksidativna aktivnost kod lipidne peroksidacije u slučaju DMBA (dimetilben[a]antracen) izazvane oralne karcinogeneze. DMBA inducira tumore promjenom DNA, pokretanjem kronične upale i prevelikim stvaranjem reaktivnih kisikovih spojeva. Vanilinska kiselina (200 mg/kg) značajno je usporila progresiju tumora u DMBA tretiranih hrčaka.

Vanilinska kiselina pokazala je korisne učinke i u drugim studijama gdje su utvrđeni antioksidativni, antimutageni, protupalni i neuroprotektivni učinci. (Kiokias i sur 2020)

1.1.4. Vanilin

Vanilin (4-hidroksi-3-metoksibenzaldehid, $M = 152,15 \text{ g/mol}$) je fenolni aldehid koji pripada skupini jednostavnih fenolnih spojeva. Sastavni je dio vanilije, jedne od najpoznatijih aroma i mirisa. Može biti izoliran iz ekstrakta vanilije, ali je danas najčešće kemijski sintetiziran iz lignina (Converti i sur, 2010). Sintetski vanilin se u velikoj mjeri koristi kao kemijski intermedijer prilikom sinteze lijekova kao što su trimetoprim, *L*-metildopa, *L*-dopa (Hocking, 1997).



Slika 1.1.4.1 Struktura vanilina i divanilina

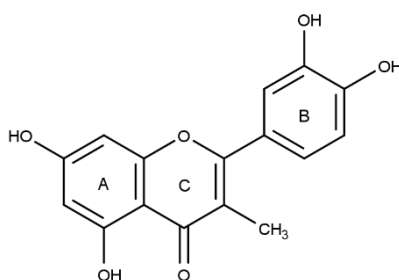
Vanilin prema dosadašnjim istraživanjima pokazuje važna bioaktivna svojstva koja uključuju antitumorska, antimutagena, neuroprotektivna, antimikrobna, antioksidativna i druga svojstva (Arya i sur, 2021).

Vanilin se pokazao kao učinkoviti hvatač reaktivnih kisikovih spojeva (ROS) u različitim antioksidativnim testovima. Pokazuje jaču aktivnost od askorbinske kiseline i Troloxa u gašenju $\text{ABTS}\cdot^+$ organskog radikala i kod ORAC te OxHLIA metode, ali ne pokazuje aktivnost u gašenju DPPH i galvinoxil radikala. Kod gašenja ABTS radikala procijenjeno je da 1 mol vanilina gasi 2,6 mola ABTS radikala u 120 minuta reakcije. Prema tome, pretpostavljeni mehanizam reakcije s radikalima je dimerizacijom vanilina pri čemu nastaje divanilin koji nadalje reagira s još 3 mola ABTS radikala (Tai i sur, 2011).

Za inhibiciju migracije i invazije tumorskih stanica pretpostavlja se da je važna aldehidna skupina na položaju C-1 s obzirom da vanilinska kiselina ne pokazuje taj inhibitorski učinak (Chou i sur, 2010).

1.1.5. Kvercetin

Kvercetin (3,3',4',5,7-pentahidroksiflavon, $M = 302,23$) je biljni flavonol koji se općenito pojavljuje u obliku glikozida s glukozom, ksilozom ili rutinozom koji se vežu na jednu od kvercetinskih hidroksilnih skupina te tvore raznovrsne glikozidne forme (Salehi i sur, 2020). Kvercetin sadrži pet hidroksilnih skupina na položajima 3, 5, 7, 3' flavonoida.



Slika 1.1.5.1 Struktura kvercetina

Jedan je od najzastupljenih prehrambenih flavonoida prisutan u raznom voću (uglavnom citrusno), povrću (luk, brokula), maslinovom ulju, zelenom čaju i crnom vinu (Anand David i sur, 2016). Kvercetin je žute boje te u obliku kvercetin-3-*O*-glikozida služi kao pigment u cvijeću, voću i povrću.

Jedan je od najčešće korištenih flavonoida za tretman upalnih i metaboličkih bolesti. Snažan je antioksidans čija se antioksidativna aktivnost može poboljšati kompleksiranjem s metalnim ionima (Xu i sur, 2019). Antioksidativna aktivnost kvercetina povezuje se za njegovo djelovanje na glutation (GSH), aktivnost enzima, signalne putove, keliranje metalnih iona i hvatanje reaktivnih kisikovih spojeva.

Pokazano je da kvercetin inducira sintezu glutationa koji služi kao donor vodika za enzim superoksid dismutazu koja nadalje gasi slobodne radikale te se time održava antioksidativni kapacitet organizma. Također, kvercetin se preko hidroksilnih skupina na bočnom fenilnom prstenu (prsten B) veže na važne aminokiselinske ostatke aktivnih mjesta acetilkolinesteraze i butirilkolinesteraze čime inhibira njihovo oksidativno djelovanje. S druge strane, značajno potiče ekspresiju endogenih antioksidativnih enzima (Cu/Zn SOD, Mn SOD, katalaza, GSH peroksidaza) (Xu i sur, 2019).

Kvercetin modulira upalu inhibirajući upalne enzime cikloksigenazu (COX) i lipoksigenazu time smanjujući broj upalnih medijatora kao prostaglandine i leukotriene. U prekliničkim *in vitro* studijama kvercetin je značajno smanjio broj upalnih medijatora te u studiji sa štakorima

(doza ekvivalentna 80 mg) inhibirao i akutnu i kroničnu upalu. Inhibira ksantin oksidazu te time sprječava akumulaciju urične kiseline što pomaže kod gihta (Anand David i sur, 2016).

Kvercetin ima nekoliko učinaka na različite signalne puteve kojima pozitivno utječe na antioksidativno stanje organizma i na taj način prevenira razvijanje bolesti. Tako može regulirati signalne puteve NRFB, AMPK i MAPK koji su uzrokovani ROS-om (Xu i sur, 2019).

Oksidansi i slobodni radikali uzrokuju štetu mnogim sustavima te se kriju u pozadini mnogih bolesti te je tako kvercetin u mnogim istraživanjima pokazao protuupalno, kardiovaskularno, antimikrobno, antitumorsko, antiviralno, neuroprotektivno djelovanje (Anand David i sur, 2016).

1.2. Kemijska kinetika

1.2.1. Brzina kemijske reakcije

Kemijska kinetika je područje fizikalne kemije koje proučava brzinu kemijskih reakcija te mehanizme kojima se te reakcije odvijaju. Poznavanjem reakcijskih mehanizama, slijeda reakcija na molekularnoj razini, pomaže nam u razumijevanju različitih kemijskih promjena i predviđanju ponašanja reaktanta u kemijskoj reakciji. Reakcija opisana jednadžbom $A \rightarrow B$ se može sastojati od niza elementarnih procesa koji dovode do produkta te opisuju mehanizam reakcije.

Prilikom ispitivanja brzine reakcije prati se promjena koncentracije reaktanata ili produkata u vremenu. Brzina trošenja ili nestajanja reaktanta u nekom trenutku reakcije t je $-d[R]/dt$, dok je za produkte brzina nastajanja u nekom trenutku reakcije t $d[P]/dt$. U oba slučaja su brzine reakcije pozitivne vrijednosti.

Zbog razlike u stehiometrijskim koeficijentima promjene u koncentraciji pojedinih sudionika reakcije u jedinici vremena nisu jednake te je više različitih brzina povezano uz samu reakciju. Stoga se uvodi veličina doseg ili napredak reakcije (množina prijetvorbi) ξ :

$$dn_i = \nu_i \cdot d\xi$$

ν_i -stehiometrijski koeficijent reaktanata/produkta reakcije, negativan za reaktante te pozitivan za produkte

n_i – množina tvari i

Brzina kemijske reakcije, ν , u određenom volumenu reakcijskog sustava, V , može se definirati kao prirast dosega reakcije ξ u trenutku t :

$$\nu = \frac{1}{V} \cdot \frac{d\xi}{dt} = \frac{1}{\nu_i} \cdot \frac{dc_i}{dt}$$

Ovaj konačni izraz je vrijedi za homogene otopine određenog volumena kod kojih vrijedi da je $dn_i/V = dc_i$.

U slučaju reakcije $2A + B \rightarrow 3C$; (brzina trošenja i nastajanja su povezane s brzinom reakcije) uzimajući u obzir stehiometrijske koeficijente vrijedi:

$$\frac{1}{3} \cdot \frac{d[C]}{dt} = -\frac{d[B]}{dt} = -\frac{1}{2} \cdot \frac{d[A]}{dt}$$

U slučaju sastava plinskih smjesa često će se brzina definirati na temelju brojnih koncentracija ili parcijalnih tlakova umjesto množinskih koncentracija (Atkins i sur, 2018).

1.2.2 Zakon za brzinu reakcije

Brzina reakcije ovisi o više faktora te proporcionalno raste s povećanjem koncentracije reaktanata. Ovisnost brzine reakcije o koncentraciji reaktanata za reakciju $A + B \rightarrow C$ je iskazana jednadžbom:

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

k - konstanta brzine reakcije; neovisna o koncentraciji reaktanta, ovisna o temperaturi

a, b – parcijalni red reakcije u odnosu na reaktante A i B, zbroj odgovora ukupnom redu reakcije

Ovako utvrđena ovisnost brzine reakcije o koncentraciji reaktanta naziva se zakon za brzinu reakcije te se utvrđuje eksperimentalno i ne mora nužno odražavati stehiometriju same reakcije. Neka naizgled jednostavna kemijska reakcija može imati komplicirani oblik zakona za brzinu reakcije. Općenito, zakon za brzinu reakcije je jednadžba koja opisuje brzinu reakcije kao funkciju koncentracija svih sudionika reakcije u određenom trenutku tijekom reakcije. Poznavajući zakon za brzinu reakcije i konstantu brzine moguće je pretpostaviti brzinu reakciju na temelju sastava reakcijske smjese te predvidjeti sastav reakcijske smjese u određenoj točki reakcije (Atkins i sur, 2018).

Zakon za brzinu reakcija je diferencijalna jednadžba koju je potrebno integrirati čime se dobiva integrirani zakon za brzinu reakcije koji izražava ovisnost koncentracije određenog sudionika reakcije o vremenu.

Za reakcije nultog reda vrijedi da je brzina reakcije konstantna:

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

Integriranjem ovog izraza dobiva se:

$$[A] = [A]_0 - kt$$

Vidljiva je linearna ovisnost koncentracije reaktanta A o vremenu.

Zakon za brzinu reakcije prvog reda je:

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

Integrirani zakon za brzinu reakcije prvog reda je:

$$[A] = [A]_0 \cdot e^{-k \cdot t}$$

Vrijeme polureakcije ($t_{1/2}$) predstavlja vrijeme potrebno da se koncentracija reaktanta smanji na polovicu početne koncentracije. Za reakcije prvog reda ne ovisi o početnoj koncentraciji reaktanta:

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

Za reakciju tipa $A + B \rightarrow P$ zakon za brzinu reakcije drugog reda je:

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

Integriranjem se dobiva:

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

Analiza reakcija drugog i višeg reda se često provodi u uvjetima pseudog-prvog reda. Ti uvjeti se postižu tako da se koncentracije svih reaktanata, osim jednog, drže približno konstantnim. Koncentracija drugih reaktanata je obično u velikom suvišku (20 i više puta) s obzirom na sudionik reakcije koji se prati.

Za reakciju drugog reda $A + B \rightarrow P$ gdje je $[B] \gg [A]$ zakon za brzinu reakcije se svodi na zakon za brzinu reakcije pseudo-prvog reda:

$$v = k_{\text{obs}} \cdot [A]$$

Pri čemu je:

$$k_{\text{obs}} = k \cdot [B]_0$$

Konstanta brzine reakcije (k) se može izračunati iz izmjerene konstante brzine pseudo-prvog reda (k_{obs}) te koncentracije reaktanta u suvišku.

1.2.3 Kinetički izotopni efekt

Kinetički izotopni efekt (KIE) predstavlja promjenu brzine kemijske reakcije uslijed zamjene jednog atoma u molekuli reaktanta njegovim izotopom. Utvrđivanjem kinetičkog izotopnog efekta dobiva se uvid u mehanizam reakcije. Najčešće je istraživana izotopna zamjena lakog vodika (^1H) s teškim vodikom ili deuterijem (^2D) makar su moguće i druge izotopne zamjene.

Kinetički izotopni efekt se izražava kao omjer konstanti brzina:

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

k_{H} , k_{D} – konstanta brzine reakcije s H, D

Ovisno o dobivenim vrijednostima može se govoriti o normalnom ($\text{KIE} > 1$) ili inverznom ($\text{KIE} < 1$) kinetičkom izotopnom efektu. Kinetički izotopni efekti se mogu podijeliti na primarne, sekundarne te KIE otapala. (Isaacs, 1995)

Primarni KIE upućuje na kidanje veze na kojoj je izvršena izotopna zamjena u stupnju koji određuje brzinu reakcije, dok se sekundarni KIE javlja ukoliko je izotopna zamjena izvršena u blizini veze koja puca u stupnju koji određuje brzinu reakcije. Sekundarni KIE upućuje na promjenu u hibridizaciji veze ili sudjelovanje veze u hiperkonjugaciji. Definišu se α i β sekundarni izotopni efekti ovisno o položaju izotopa u odnosu na vezu koja se mijenja. KIE otapala se javlja uslijed zamjene otapala pri čemu kod reaktanta dolazi do zamjene vodikovih atoma s atomima deuterija (npr. kod alkoholnih $-\text{OH}$ skupina, aaminskih $-\text{NH}$). Također, često je samo otapalo uključeno u mehanizam reakcije pri čemu se pojavljuju izotopni efekti. Ovisno o ulozi otapala izotopni efekti mogu biti primarni, sekundarni. (Anslyn i Dougherty, 2006)

Promjena jednog izotopa s drugim ne utječe na promjenu površine potencijalne energije molekule već samo na svojstva koja ovise o atomskoj masi, a to je vibracijska frekvencija. Frekvencija vibracije (ν) je iskazana jednačinom:

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}}$$

k – konstanta sila veze

μ – reducirana masa; $\mu = (m_1 \cdot m_2)/(m_1 + m_2)$

Kao što je vidljivo iz jednadžbe, frekvencija vibracije je direktno proporcionalna korijenu konstante sile veze, a obrnuto proporcionalna reduciranoj masi. Prema tome, frekvencija vibracije veze kod koje je vodik zamijenjen deuterijem je manja. Vibracijska energija je dana izrazom:

$$E_v = \left(v + \frac{1}{2} \right) h\nu$$

$v = 0, 1, 2, \dots$ vibracijski kvantni broj

Na sobnoj temperaturi većina molekula se nalazi u osnovnom vibracijskom stanju ($v=0$) te se energija ovog stanja naziva energijom nulte točke (*ZPE – engl. zero point energy*).

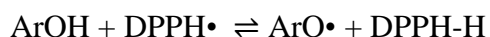
$$E_0 = \frac{1}{2} h\nu$$

Uspoređujući dvije molekule, jednu s lakšim te jednu s težim izotopom (npr. C-H i C-D), molekula s težim izotopom imati će nižu ZPE od molekule s lakšim izotopom. Upravo te razlike u energiji nulte točke dovode do pojave izotopnog efekta.

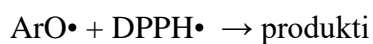
1.3. Reakcija fenolnih spojeva i DPPH• radikala

DPPH• (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) je stabilni radikal ljubičaste boje koji tijekom reakcije s fenolnim spojem uslijed redukcije prelazi u svijetlo žutu boju. DPPH• pokazuje apsorpcijski maksimum na 515-520 nm dok reducirani oblik ne apsorbira na tim valnim duljinama, te se prema tome prati smanjenje apsorbancije (Kedare i Singh, 2011; Brand Williams i sur, 1995).

Reakcija fenolnih spojeva (ArOH) s DPPH• su ranije opisane u literaturi (Foti, 2008), te je predložen reakcijski mehanizam:



Nastali radikal dalje može reagirati s još jednom molekulom DPPH• ili drugim radikalom:



Foti i sur. (2008) su odredili konstante brzine reakcija 27 fenola, uključujući i feruličnu kiselinu koja je ispitana u ovom radu, te 2 nezasićena ugljikovodika s DPPH• u cikloheksanu i *n*-heksanu. Za fenolne spojeve loše topljivosti u cikloheksanu i *n*-heksanu konstanta brzine je određena u čistom diklorometanu. Vrijednosti konstante brzine kretale su se od 0,1 mol⁻¹ dm³ s⁻¹ (fenol) do 9400 mol⁻¹ dm³ s⁻¹ (2,5-dimetoksi-4-hidroksifenol). Mjerenja su provedena u uvjetima pseudo-prvog reda, uz koncentraciju fenola u suvišku u odnosu na DPPH•, pri čemu smanjenje koncentracije DPPH• prati zakon za brzinu reakcije pseudo-prvog reda, te je dobivena linearna ovisnost k_{obs} o koncentraciji fenola, ArOH:

$$k_{\text{obs}} = k_2 [\text{ArOH}] + \text{konst.}$$

Kod određenih fenolnih spojeva smanjenje apsorbancije DPPH• (usprkos koncentracijama fenolnih spojeva 10-50 puta većih od DPPH•) nije slijedilo zakon za brzinu reakcije prvog reda (Foti i sur, 2008).

Ovako utvrđeni zakon za brzinu reakcije su eksperimentalno dobili Musialik i sur. (2008) koji su ispitivali reakcije 10 flavonoida, uključujući i reakciju kvercetina i DPPH• u različitim otapalima.

Predloženi reakcijski mehanizam u nepolarnim otapalima su HAT (reakcija prijelaza atoma vodika, *Hydrogen-Atom Transfer*) ili PCET (reakcija spregnutog prijelaza protona i

elektrona, *Proton-Coupled Electron Transfer*). Kod ovih mehanizama dolazi do prijelaza i elektrona i protona u jednom reakcijskom stupnju. Kod HAT mehanizma elektron i proton prelaze zajedno (vodikov atom), a kod PCET mehanizma elektron i proton prelaze odvojeno. (Foti i sur, 2015).

U polarnim otapalima (metanol, etanol, voda i njihove smjese) je predložen reakcijski mehanizam kod kojega dolazi do uzastopnog prijenosa protona i elektrona (SPLET mehanizam, *engl. Sequential Proton-Loss Electron Transfer*) s fenolantnog aniona na DPPH• (Foti i sur, 2015).

Foti i sur (2008) su za konstante brzine reakcija cimernih kiselina u metanolu i etanolu utvrdili da se smanjuju povećanjem koncentracije cimernih kiselina. Kod cimernih kiselina kiselost medija bitno je određena disocijacijom karboksilne skupine što smanjuje količinu fenolantnog aniona u ravnoteži te uzrokuje smanjenje konstante brzine. Kod metilnih estera cimernih kiselina vrijednosti konstante brzine su bile neovisne o koncentraciji. U dosadašnjim istraživanjima vrlo je malo podataka o kinetičkom izotopnom efektu reakcija fenolnih reakcija s DPPH• i drugim oksidansima. Foti i sur (2008) su odredili kinetički izotopni efekt za reakcije 6 fenolnih spojeva: (fenol, 2-metoksifenol, 2,6-dimetoksifenol, 3,4-dimetoksifenol, sesamol i 2,2,5,7,8-pentametilhidroksilokroman u cikloheksanu. Kinetički izotopni efekt iznosio je 1,3- 3,3.

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Fenolni spojevi su široko zastupljeni u prirodi te se sve više istražuju zbog svojih mnogobrojnih bioloških učinaka među kojima se ističe antioksidativna aktivnost. Naime, u pozadini mnogih bolesti štetu uzrokuju upravo oksidansi i slobodni radikali što nam govori o važnosti antioksidansa kod takvih stanja. Antioksidativna aktivnost fenolnih spojeva općenito povezuje se s različitim mehanizmima, kao hvatanjem slobodnih radikala ili utjecajem na signalne putove. Za fenolne spojeve (*p*-kumarinska kiselina, ferulična kiselina, vanilinska kiselina, vanilin i flavonoid kvercetin) je utvrđen veliki broj pozitivnih učinaka na zdravlje, povezanih za antioksidativnu aktivnost. Za usporedbu antioksidativne aktivnosti različitih spojeva često se koristiti metoda s DPPH radikalom kao brza, jeftina i široko upotrebljiva metoda.

Cilj ovog diplomskog rada je ispitati kinetiku reakcija odabranih jednostavnih fenolnih spojeva, fenolnih kiselina: *p*-kumarinske kiseline, ferulične kiseline, vanilinske kiseline, vanilina i flavonoida kvercetina s DPPH•. Određene su konstante brzine reakcija u otapalu dioksanu i smjesi otapala dioksan-voda (0,99:0,01 v/v i 0,95:0,05 v/v). Određen je kinetički izotopni efekt (KIE) mjerenjem konstante brzine reakcije fenolnih spojeva i DPPH• u smjesi otapala dioksan-voda (0,99:0,01 v/v i 0,95:0,05 v/v) te dioksan-teška voda (0,99:0,01 v/v i 0,95:0,05 v/v). Dobiveni rezultati doprinose razumijevanju reakcije fenolnih spojeva i DPPH•. Također, dobiveni rezultati doprinose razumijevanju antioksidativne aktivnosti fenolnih spojeva mehanizmom hvatanja slobodnih radikala.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Kemikalije, instrumenti i laboratorijski pribor

U eksperimentalnom dijelu korištene su sljedeće kemikalije:

- Redestilirana voda
- Teška voda D₂O (99,9 % D, Sigma Aldrich)
- Dušik 5,0 (99,999% N₂, Messer Croatia plin d.o.o.)
- 1,4-dioksan (99,9%, SeccoSolv)
- 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (95% DPPH, Aldrich)
- Vanilin (>99%, ACROS organics)
- Vanilinska kiselina (>97%, Fluka)
- *p*-kumarinska kiselina (98%, Aldrich)
- Kvercetin (>95%, Sigma)
- Ferulična kiselina (99%, Aldrich)

Također, korišteni su sljedeći instrumenti i pribor:

- vaga Mettler H54AR ($P_{\max}=160\text{g}$, $d=0,01\text{mg}$)
- HP G1103A 8453 UV-VIS spektrofotometar, Agilent Technologies
- termostatirani nosač za kivete Quantum northwest TC 125 Temperature Control ($\pm T < 0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$)
- termostatirani nosač za kivete PolyScience (9120A11B)
- aparatura za redestilaciju vode
- automatske pipete Eppendorf (10, 100, 200 i 1000 μL), uz odgovarajuće plastične Eppendorf nastavke
- plastične tube Eppendorf (1,5 mL)
- staklene odmjerne tikvice (5,0 i 10,0 mL)
- staklene Erlenmayerove tikvice s ubrušenim čepom
- kvarcne kivete QS 10,0 mm Helma

3.2. Mjerenje konstantne brzine reakcije fenolnih spojeva s DPPH•

Ispitivane su reakcije 5 fenolnih spojeva *p*-kumarinske kiseline, ferulične kiseline, vanilinske kiseline, vanilina i flavonoida kvercetina s DPPH• radikalom.

Mjerenje konstante brzine reakcije fenolnih spojeva i DPPH• zasniva se na praćenju smanjenja apsorbancije DPPH• u reakcijskoj otopini tijekom reakcije na valnoj duljini 525 nm koja odgovara maksimumu DPPH•. U slučaju kvercetina se pratilo smanjenje apsorbancije na 620 nm. Mjerenja su provedena u uvjetima pseudo-prvoga reda pri čemu je fenolni spoj bio najmanje u 100 puta većoj koncentraciji od DPPH• u reakcijskoj smjesi.

Za pripremu svih otopina je korišten 1,4-dioksan visoke čistoće iz kojeg je uklonjen kisik propuhivanjem s dušikom u trajanju od 20 minuta. Također, korištena je neposredno pripremljena redestilirana voda. Sve reakcije su provedene na 25 °C uz kontrolu temperature.

Otopine fenolnih spojeva približne koncentracije 0,25-0,01 mol dm⁻³ pripremaju se vaganjem odgovarajuće mase fenolnog spoja te otapanjem u 1,4-dioksanu u staklenoj odmjernoj tikvici od 5 mL. Svi fenolni spojevi osim kvercetina su se dobro otapali u dioksanu. Pripremljena je otopina DPPH• u dioksanu približne koncentracije 0,0014 mol dm⁻³. Sve otopine su se čuvale u zamrzivaču.

Za pripremu reakcijske smjese prvo se u kiveti dodaje određeni volumen 1,4-dioksana i redestilirane vode koji se potom termostatiraju 15 minuta na 25 °C. Nakon termostatiranja, u kivetu se dodaje određeni volumen otopine fenolnog spoja u dioksanu te se otopina promiješa. Reakcija se pokreće dodatkom određenog volumena otopine DPPH• u reakcijsku otopinu, tako da koncentracija u konačnoj reakcijskoj otopini odgovara 0,00005 mol dm⁻³. Otopina se brzo promiješa te stavlja u spektrofotometar na mjerenje.

Mjerenja se provode u rasponu 400-700 nm. U određenim reakcijskim uvjetima provedena su po tri mjerenja, na temelju kojih je određena konstanta brzine reakcije pseudo-prvog reda (k_{obs}).

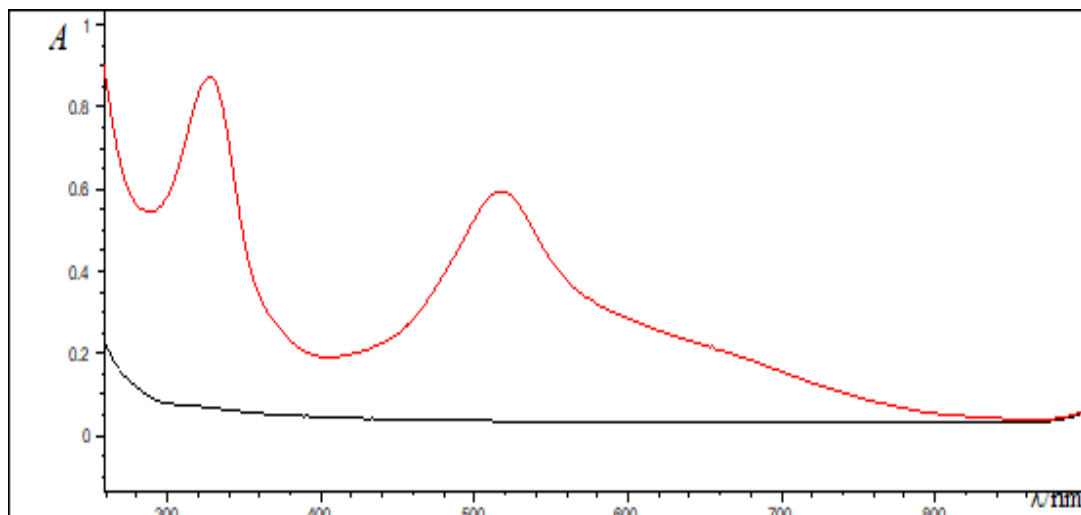
Konstante brzine su određene prema integriranom zakonu za brzinu reakcije prvog reda. korištenjem programa HP G1103A 8453 UV- Vis spektrofotometra. Sve reakcije su praćene najmanje pet poluvremena, tj. dok se apsorbancija na 525 nm smanjila približno na vrijednost 0.

3.3. Određivanje kinetičkog izotopnog efekta reakcije fenolnih spojeva i DPPH•

Za određivanje kinetičkog izotopnog efekta (KIE) provedena su mjerenja konstante brzine reakcije fenolnih spojeva i DPPH• u smjesi otapala dioksan-teška voda (0,99:0,01 v/v i 0,95:0,05 v/v) na isti način kao prilikom određivanja konstante brzine reakcije u smjesi otapala dioksan-voda (0,99:0,01 v/v i 0,95:0,05 v/v). Korištena je teška voda koja je prethodno destilirana dva puta, s time da je prva destilacija provedena u prisutnosti KMnO₄ i KOH (pripremljeno ranije u laboratoriju).

4. REZULTATI I RASPRAVA

Tijek reakcija fenolnih spojeva i DPPH• praćen je mjerenjem smanjenja apsorpcije DPPH• u vidljivom dijelu spektra.



Slika 4.1. Spektar $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ otopine DPPH• u dioksanu

Iz spektra DPPH• u dioksanu određen su maksimumi apsorpcijskih vrpci (λ_{max}) na 328 i 518 nm te procijenjeni ϵ pri 328 i 518 nm iznose $\epsilon_{328} \sim 16100 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ i $\epsilon_{518} \sim 11200 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Mjerenja su provedena tako da je fenolni spoj bio u velikom suvišku tj. u uvjetima pseudo-prvog reda. Smanjenje apsorpcije u svim ispitanim reakcijama slijedi zakon za prvi red što je u skladu s ranije predloženim zakonom za brzinu reakcije (Foti i sur, 2008):

$$v = -\frac{d[\text{DPPH}]}{dt} = k_2 \cdot [\text{ArOH}] \cdot [\text{DPPH}]$$

U uvjetima pseudo-prvog reda, koji su ostvareni tako što je koncentracija fenolnog spoja bila u velikom suvišku vrijedi:

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

$$k_{\text{obs}} = k_2 [\text{ArOH}]$$

Konstanta brzine reakcije (k_2) se dobiva iz izmjerene konstante brzine pseudo-prvog reda (k_{obs}) te koncentracije fenolnog spoja u reakcijskoj smjesi prema jednadžbi:

$$k_2 = \frac{k_{obs}}{[ArOH]}$$

Kinetički izotopni efekt (KIE) reakcije se izračunava iz izmjerenih konstanti brzina reakcije fenolnih spojeva u otapalu s običnom i teškom vodom prema jednadžbi:

$$KIE = \frac{k_H}{k_D}$$

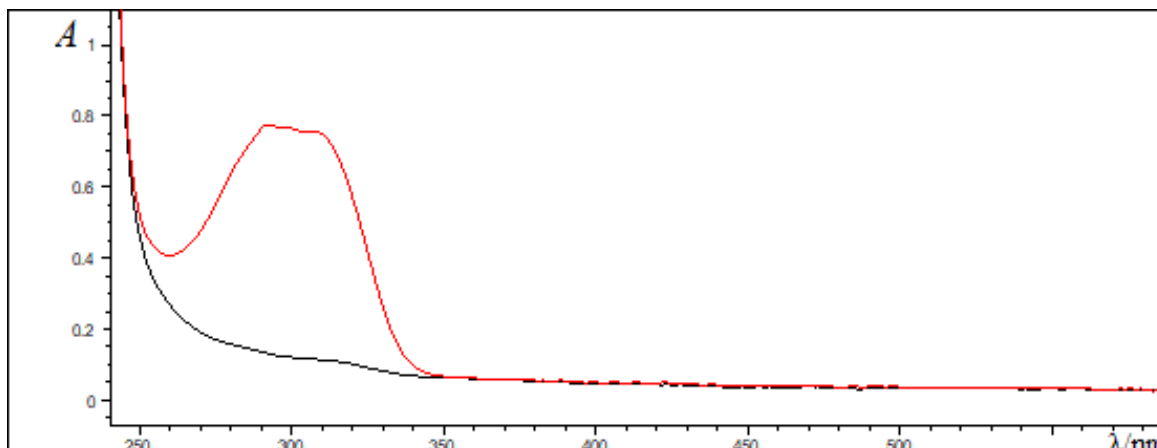
k_H je konstanta brzine reakcije u smjesi otapala dioksan-voda, k_D je konstanta brzine reakcije u smjesi otapala dioksan-teška voda.

U otapalu dioksan-teška voda dolazi do zamjene OH protona s D te se dobije deuterirani fenolni spoj ArOD, što omogućuje određivanje primarnog kinetičkog izotopnog efekta.

4.1. Reakcija *p*-kumarinske kiseline i DPPH•

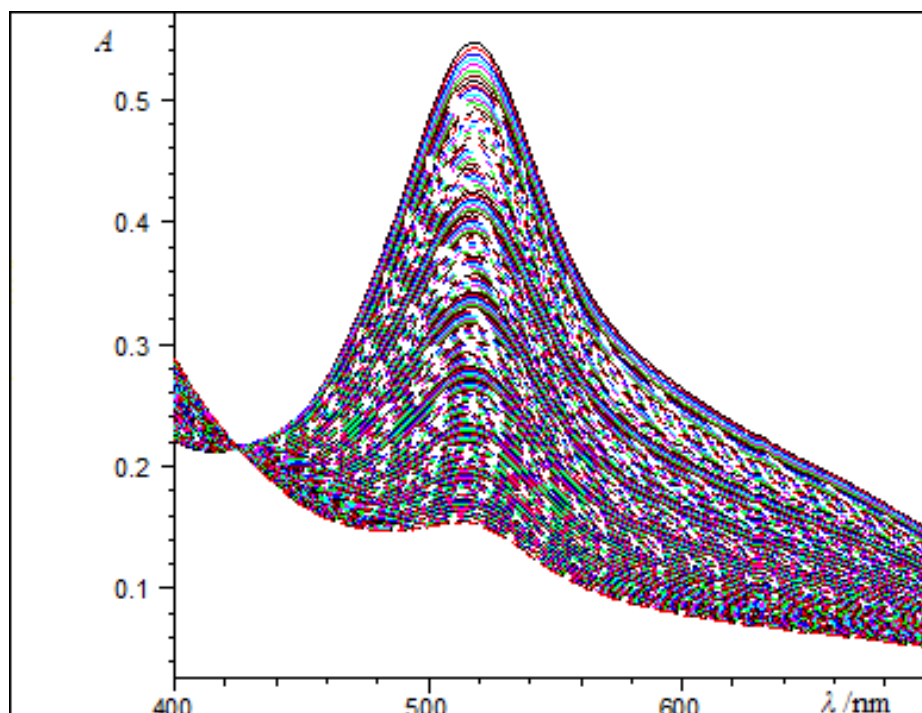
Tijek reakcije *p*-kumarinske kiseline i DPPH• praćen je u rasponu valnih duljina 400-700 nm, te je reakcija praćena tijekom 5 poluvremena reakcije.

U vidljivom dijelu spektra, gdje apsorbira DPPH•, *p*-kumarinska kiselina ne apsorbira zračenje (Slika 4.1.1).

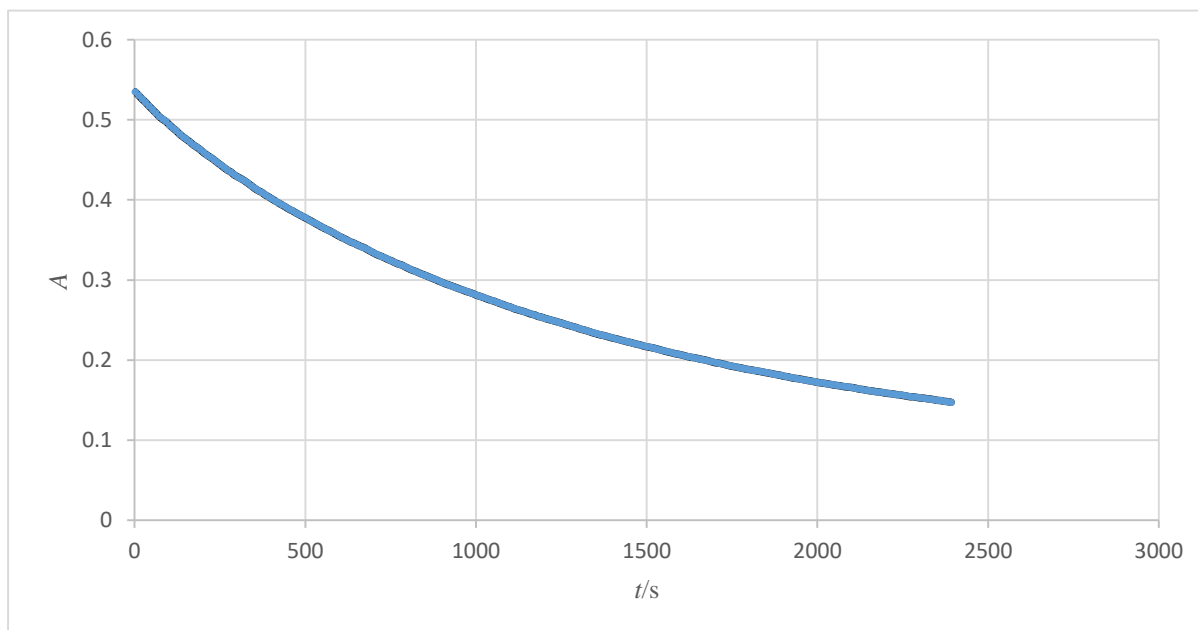


Slika 4.1.1. Spektar 0,0001 mol dm⁻³ otopine *p*-kumarinske kiseline u smjesi otapala dioksan-voda (0,99:0,01, v/v)

Iz spektra *p*-kumarinske kiseline u smjesi otapala dioksan-voda (0,99:0,01, v/v) određen je maksimum apsorpcijske vrpce (λ_{max}) na 292 nm te procijenjeni ϵ pri 292 nm iznosi $\epsilon_{292} = 6200$ dm³ mol⁻¹ cm⁻¹.



Slika 4.1.2. Spektralni profil reakcije *p*-kumarinske kiseline i DPPH• u u smjesi otapala dioksan-voda (0,99:0,01, *v/v*) pri koncentraciji *p*-kumarinske kiseline $0,2 \text{ mol dm}^{-3}$ i koncentraciji DPPH• $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$



Slika 4.1.3. Ovisnost apsorbancije (*A*) DPPH• pri 525 nm o vremenu (*t*) za reakciju *p*-kumarinske kiseline i DPPH• u u smjesi otapala dioksan-voda (0,99:0,01, *v/v*) pri koncentraciji *p*-kumarinske kiseline $0,2 \text{ mol dm}^{-3}$ i koncentraciji DPPH• $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ na temperaturi 25°C .

Smanjenje apsorbancije na 525 nm slijedi integrirani zakon za reakciju prvog reda, temeljem kojega je određena konstanta brzina reakcije pseudo-prvog reda (k_{obs}) kod određenih koncentracija *p*-kumarinske kiseline.

Konstanta brzine reakcije *p*-kumarinske kiseline i DPPH•

U smjesi otapala dioksan-voda (0,99:0,01, v/v i 0,95:0,05, v/v) određene su konstante brzine pseudo-prvog reda (k_{obs}) pri koncentracijama *p*-kumarinske kiseline 0,1 i 0,2 mol dm⁻³.

Tablica 4.1.1. Izmjerene konstante brzine (k_{obs}) i izračunana konstanta brzine (k_2) za reakciju *p*-kumarinske kiseline (PK) i DPPH• u smjesi otapala dioksan-voda (0,99:0,01, v/v)

| $c(\text{PK}) / \text{mol dm}^{-3}$ | $k_{\text{obs}} \cdot 10^4 / \text{s}^{-1}$ | $k_2 \cdot 10^3 / \text{mol}^{-1} \text{dm}^3 \text{s}^{-1}$ | $\overline{k_2} \cdot 10^3 / \text{mol}^{-1} \text{dm}^3 \text{s}^{-1}$ | $\text{SD} \cdot 10^3 / \text{mol}^{-1} \text{dm}^3 \text{s}^{-1}$ | RSD / % |
|-------------------------------------|---|--|---|--|---------|
| 0,1 | 8,90 | 8,90 | 8,62 | 0,36 | 4,2 |
| | 8,75 | 8,75 | | | |
| | 8,21 | 8,21 | | | |
| 0,2 | 16,1 | 8,07 | 7,96 | 0,11 | 1,4 |
| | 15,9 | 7,96 | | | |
| | 15,7 | 7,85 | | | |

* $c(\text{DPPH}) = 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$; valna duljina = 525 nm; $t = 25 \text{ }^\circ\text{C}$

Tablica 4.1.2. Izmjerene konstante brzine (k_{obs}) i izračunana konstanta brzina (k_2) za reakciju *p*-kumarinske kiseline i DPPH• u smjesi otapala dioksan-voda (0,95:0,05, v/v)

| $c(\text{PK}) / \text{mol dm}^{-3}$ | $k_{\text{obs}} \cdot 10^3 / \text{s}^{-1}$ | $k_2 \cdot 10^3 / \text{mol}^{-1} \text{dm}^3 \text{s}^{-1}$ | $\overline{k_2} \cdot 10^3 / \text{mol}^{-1} \text{dm}^3 \text{s}^{-1}$ | $\text{SD} \cdot 10^3 / \text{mol}^{-1} \text{dm}^3 \text{s}^{-1}$ | RSD / % |
|-------------------------------------|---|--|---|--|---------|
| 0,2 | 0,99 | 4,96 | 4,99 | 0,003 | 0,6 |
| | 1,00 | 5,01 | | | |
| | 1,00 | 5,01 | | | |

* $c(\text{DPPH}) = 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$; valna duljina = 525 nm; $t = 25 \text{ }^\circ\text{C}$

Iz vrijednosti izračunatih konstanti brzina reakcije pseudo-prvog reda (k_{obs}) i koncentracije *p*-kumarinske kiseline određena je konstanta brzine reakcije *p*-kumarinske kiseline i DPPH• u smjesi otapala dioksan-voda (0,99:0,01, v/v), pri temperaturi 25°C:

$$k_2 = 0,00829 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$$

Vrijednost konstante brzine reakcije u smjesi otapala dioksan-voda (0,95:0,05, v/v) iznosi:

$$k_2 = 0.00499 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$$

Dobivena konstanta brzine se smanjuje s povećanjem udjela vode, što nije očekivano prema dosadašnjim istraživanjima, gdje je pokazano da se konstanta brzine povećava s povećanjem polarosti kod reakcije fenolnih spojeva i DPPH• (Foti i sur, 2004; Foti, 2015). Ovaj efekt bi trebalo dodatno provjeriti određivanjem konstanti brzine u većem rasponu koncentracija.

U literaturi nisu pronađeni podaci o konstanti brzine reakcije u dioksanu, već u metanolu i etanolu. Foti i sur (2004) odredili su konstantu brzine reakcije *p*-kumarinske kiseline i DPPH• u metanolu $k = 0,9-0,22 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$ te u etanolu $k = 1-0,30 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$.

Smanjenje brzine u dioksanu u odnosu na metanol je u skladu s dosadašnjim istraživanjima, gdje je pokazano da se konstanta brzine povećava s povećanjem polarosti što je povezano s promjenom mehanizma iz SPLET mehanizma u metanolu/etanolu u HAT mehanizam u dioksanu, prema kojima u stupnju koji određuje brzinu reakcije dolazi do prijelaza elektrona i protona (Foti i sur, 2008; Foti, 2015).

Kinetički izotopni efekt reakcije *p*-kumarinske kiseline i DPPH•

Tablica 4.1.3. Izmjerene konstante brzine (k_{obs}) i izračunana konstanta brzine (k_{D}) reakcije *p*-kumarinske kiseline i DPPH• u smjesi otapala dioksan-teška voda (0,99:0,01, v/v),

| $c(\text{PK}) / \text{mol dm}^{-3}$ | $k_{\text{obs(D)}} \cdot 10^4 / \text{s}^{-1}$ | $k_{\text{D}} \cdot 10^3 / \text{mol}^{-1} \text{dm}^3 \text{s}^{-1}$ | $\overline{k_{\text{D}}} \cdot 10^3 / \text{mol}^{-1} \text{dm}^3 \text{s}^{-1}$ | $\text{SD} \cdot 10^3 / \text{mol}^{-1} \text{dm}^3 \text{s}^{-1}$ | RSD / % |
|-------------------------------------|--|---|--|--|---------|
| 0,2 | 6,22 | 3,11 | 3,04 | 0,07 | 2,3 |
| | 5,96 | 2,98 | | | |
| | 6,03 | 3,02 | | | |

* $c(\text{DPPH}) = 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$; $\lambda = 525 \text{ nm}$; $t = 25 \text{ }^\circ\text{C}$

Korištenjem podataka iz Tablice 4.1.1. i Tablice 4.1.3. gdje su određene konstante brzine $k_{\text{H}} = k_2$ i k_{D} za reakciju *p*-kumarinske kiseline i DPPH• u smjesi otapala dioksan-voda/teška voda (0,99:0,01, v/v) prema jednadžbi $\text{KIE} = k_{\text{H}}/k_{\text{D}}$ dobiveni kinetički izotopni efekt je:

KIE =2,62

Tablica 4.1.4. Izmjerene konstante brzine (k_{obs}) i izračunana konstanta brzine (k_{D}) reakcije *p*-kumarinske kiseline i DPPH• u smjesi otapala dioksan-teška voda (0,95:0,05, v/v)

| $c(\text{PK}) / \text{mol dm}^{-3}$ | $k_{\text{obs(D)}} \cdot 10^4 / \text{s}^{-1}$ | $k_{\text{(D)}} \cdot 10^3 / \text{mol}^{-1} \text{dm}^3 \text{s}^{-1}$ | $\overline{k_{\text{D}}} \cdot 10^3 / \text{mol}^{-1} \text{dm}^3 \text{s}^{-1}$ | $\text{SD} \cdot 10^3 / \text{mol}^{-1} \text{dm}^3 \text{s}^{-1}$ | RSD / % |
|-------------------------------------|--|---|--|--|---------|
| 0,2 | 3,41 | 1,71 | 1,70 | 0,01 | 0,6 |
| | 3,38 | 1,69 | | | |
| | 3,39 | 1,69 | | | |

* $c(\text{DPPH}) = 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$; $\lambda = 525 \text{ nm}$; $t = 25 \text{ }^\circ\text{C}$

Korištenjem podataka iz Tablice 4.2.2. i Tablice 4.2.4. gdje su određene konstante brzine $k_{\text{H}} = k_2$ i k_{D} za reakciju *p*-kumarinske kiseline i DPPH• u smjesi otapala dioksan-voda/teška voda (0,95:0,05, v/v) prema jednadžbi $\text{KIE} = k_{\text{H}}/k_{\text{D}}$ dobiveni kinetički izotopni efekt je:

KIE =2,95

U literaturi nema podataka o vrijednostima kinetičkog izotopnog efekta za reakciju *p*-kumarinske kiseline i DPPH radikala. Dobiveni KIE je po iznosu u skladu s vrijednostima,

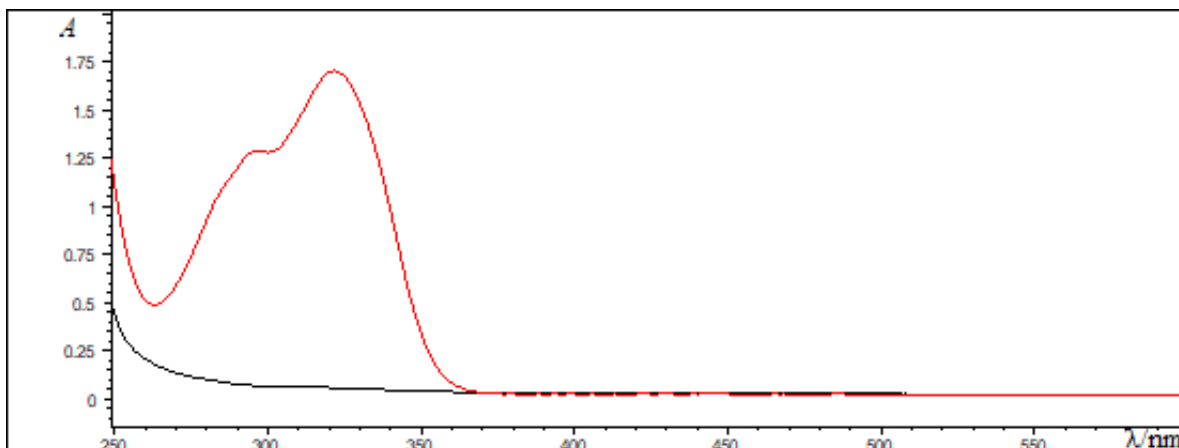
KIE za 6 fenola s različitim supstituentima u cikloheksanu u iznosu od 1,3-3,3 (Foti i sur, 2008).

S obzirom da se u otapalu dioksan-teška voda dobiva deuterirani fenolni spoj ArOD umjesto ArOH, izmjereni KIE upućuje na to da u koraku koji određuje brzinu reakcije dolazi do prijenosa protona. Prema tome, ova vrijednost KIE upućuje na HAT ili PCET reakcijski mehanizam gdje dolazi do prijelaza i protona i elektrona u jednom koraku.

4.2. Reakcija ferulične kiseline i DPPH•

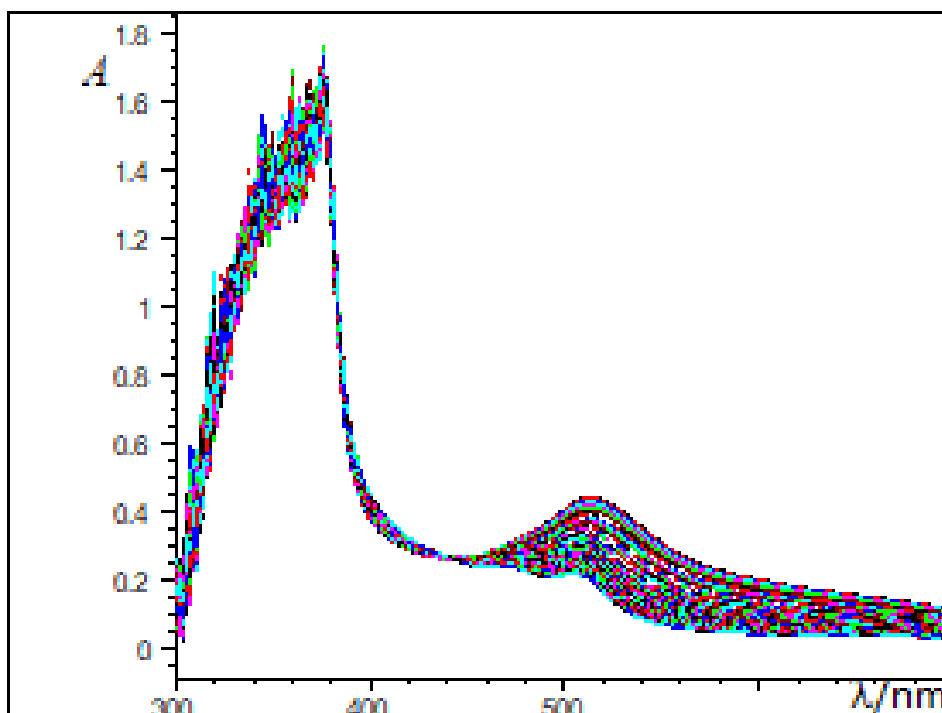
Tijek reakcije ferulične kiseline i DPPH• praćen je u rasponu valnih duljina 400-700 nm te je reakcija praćena tijekom 5 poluvremena reakcije.

U vidljivom dijelu spektra, gdje apsorbira DPPH•, ferulična kiselina i produkti ne apsorbiraju zračenje (Slika 4.3.1)

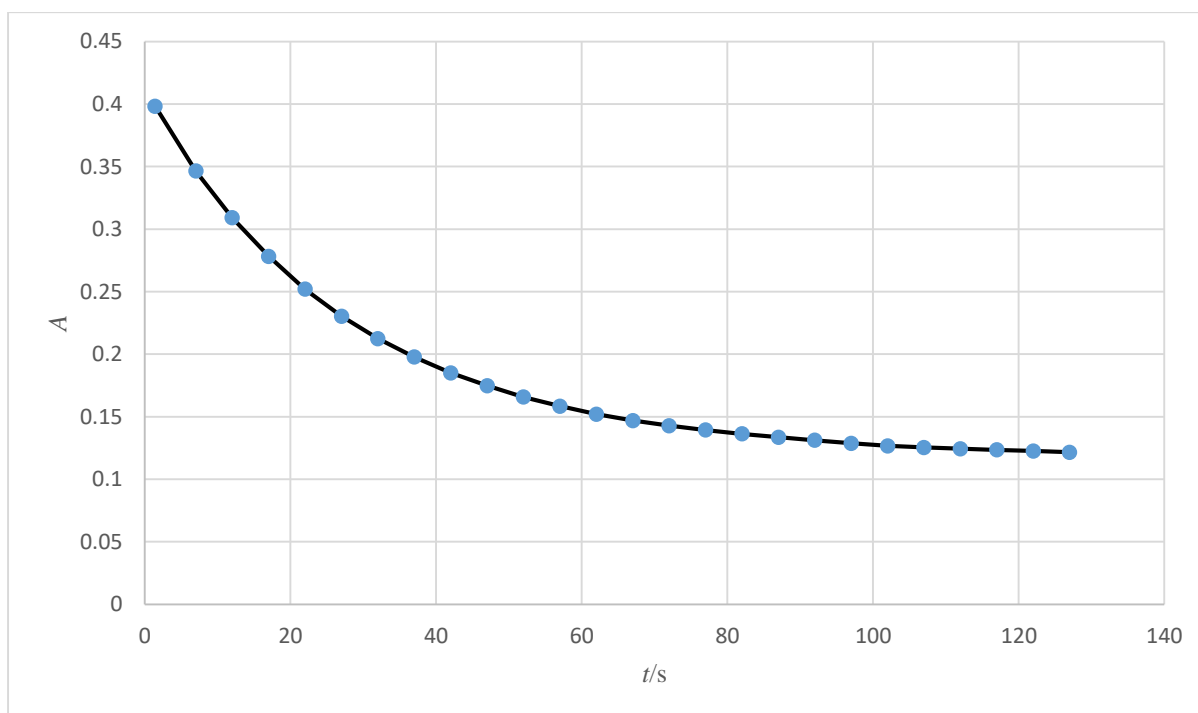


Slika 4.2.1. Spektar 0,0001 mol dm⁻³ otopine ferulične kiseline u smjesi otapala dioksan-voda (0,95:0,05, v/v)

Iz spektra ferulične kiseline u smjesi otapala dioksan-voda (0,95:0,05, v/v) određeni su maksimumi apsorpcijske vrpce (λ_{\max}) na 295 i 321 nm te procijenjeni ϵ iznose $\epsilon_{295} = 12250$ dm³ mol⁻¹ cm⁻¹ i $\epsilon_{321} = 16500$ dm³ mol⁻¹ cm⁻¹.



Slika 4.2.2. Spektralni profil reakcije ferulične kiseline i DPPH• u u smjesi otapala dioksan-voda (0,95:0,05, v/v) pri koncentraciji ferulične kiseline $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ i koncentraciji DPPH• $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ na temperaturi 25°C



Slika 4.2.3. Ovisnost apsorbancije (A) DPPH• pri 525 nm o vremenu (t) za reakciju ferulične kiseline i DPPH• u u smjesi otapala dioksan-voda (0,95:0,05, v/v) pri koncentraciji ferulične kiseline $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ i koncentraciji DPPH• $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ na temperaturi 25°C

Smanjenje apsorbancije na 525 nm slijedi integrirani zakon za reakciju prvog reda, temeljem kojega je određena konstanta brzina reakcije pseudo-prvog reda (k_{obs}) kod koncentracije 0,1 mol dm⁻³ ferulične kiseline. Spektralni profil ferulične kiseline (Slika 4.2.2.) je usporediv s ostalima.

Konstanta brzine reakcije ferulične kiseline i DPPH•

U smjesi otapala dioksan- voda (0,95:0,05, v/v) određena je konstanta brzine pseudo-prvog reda (k_{obs}) pri koncentraciji ferulične kiseline 0,1 mol dm⁻³.

Tablica 4.2.1. Izmjerene konstante brzine (k_{obs}) i izračunana konstanta brzine (k_2) reakcije ferulične kiseline (FK) i DPPH• u smjesi otapala dioksan-voda (0,95:0,05, v/v)

| c (FK) / mol dm ⁻³ | $k_{\text{obs}} \cdot 10^2 /$ s ⁻¹ | $k_2 /$ mol ⁻¹ dm ³ s ⁻¹ | $\bar{k}_2 /$ mol ⁻¹ dm ³ s ⁻¹ | SD / mol ⁻¹ dm ³ s ⁻¹ | RSD / % |
|------------------------------------|--|--|--|---|------------|
| 0,1 | 3,41 | 0,341 | 0,321 | 0,029 | 9,1 |
| | 3,00 | 0,300 | | | |

* $c(\text{DPPH}) = 5 \cdot 10^{-5}$ mol dm⁻³; $\lambda = 525$ nm; $t = 25$ °C

Iz srednje vrijednosti izračunatih konstanti brzina reakcije pseudo-prvog reda (k_{obs}) i koncentracije ferulične kiseline određena je konstanta brzine reakcije ferulične kiseline i DPPH• u smjesi otapala dioksan-voda (0,95:0,05, v/v), pri temperaturi 25°C:

$$k_2 = 0,321 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$$

Prema Foti i sur (2008) dobivena konstanta brzine za reakciju ferulične kiseline i DPPH radikala u alkanskom otapalu (cikloheksan ili *n*-heksan) iznosi $k = 10 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$. Dobivena vrijednosti konstante brzine u smjesi otapala dioksan-voda (0,95:0,05, v/v) puno je niža od konstante brzine dobivene u alkanskom otapalu (Foti i sur, 2008).

Kinetički izotopni efekt reakcije ferulične kiseline i DPPH•

Tablica 4.2.2. Izmjerene konstante brzine (k_{obs}) i izračunana konstanta brzine (k_{D}) reakcije ferulične kiseline i DPPH• u smjesi otapala dioksan-voda (0,95:0,05, v/v)

| $c(\text{FK}) / \text{mol dm}^{-3}$ | $k_{\text{obs(D)}} \cdot 10^3 / \text{s}^{-1}$ | $k_{\text{D}} \cdot 10^2 / \text{mol}^{-1} \text{dm}^3 \text{s}^{-1}$ | $\overline{k_{\text{D}}} \cdot 10^2 / \text{mol}^{-1} \text{dm}^3 \text{s}^{-1}$ | $\text{SD} \cdot 10^2 / \text{mol}^{-1} \text{dm}^3 \text{s}^{-1}$ | RSD / % |
|-------------------------------------|--|---|--|--|---------|
| 0,1 | 2,58 | 2,58 | 2,63 | 0,05 | 1,8 |
| | 2,65 | 2,65 | | | |
| | 2,67 | 2,67 | | | |

* $c(\text{DPPH}) = 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$; $\lambda = 525 \text{ nm}$; $t = 25 \text{ }^\circ\text{C}$

Korištenjem podataka iz Tablice 4.2.1. i Tablice 4.2.2. gdje su određene konstante brzine $k_{\text{H}} = k_2$ i k_{D} za reakciju ferulične kiseline i DPPH• u smjesi otapala dioksan-voda/teška voda (0,95:0,05, v/v) prema jednadžbi $\text{KIE} = k_{\text{H}}/k_{\text{D}}$ dobiveni kinetički izotopni efekt je:

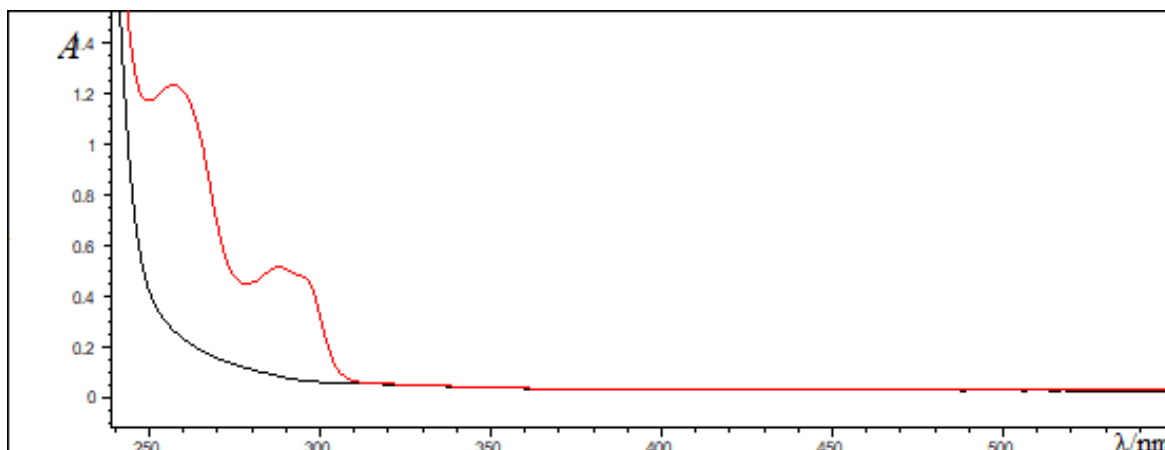
KIE =12,17

U literaturi nema podataka o vrijednostima kinetičkog izotopnog efekta za feruličnu kiselinu. Kod prethodnih istraživanja na fenolima (6 fenola s različitim supstituentima) u cikloheksanu dobivene vrijednosti su bile 1,3-3,3 (Foti i sur, 2008) i ferulična kiselina pokazuje puno veće vrijednosti. Utvrđeni KIE je u skladu s HAT/PCET mehanizmom.

4.3. Reakcija vanilinske kiseline i DPPH•

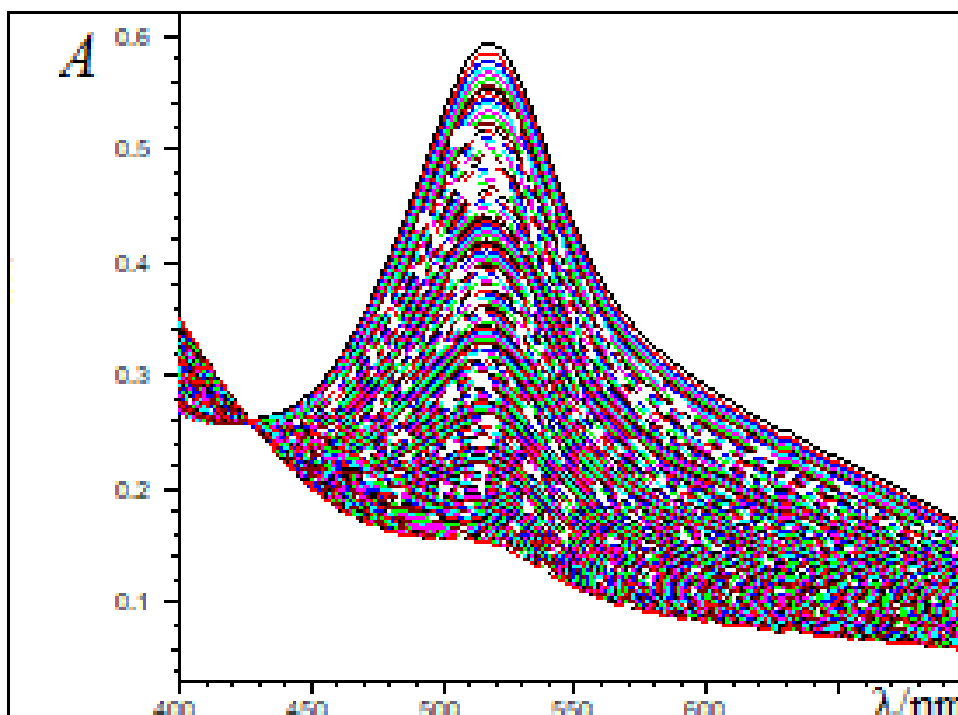
Tijek reakcije vanilinske kiseline i DPPH• praćen je u rasponu valnih duljina 400-700 nm te je reakcija praćena tijekom 5 poluvremena reakcije.

U vidljivom dijelu spektra, gdje apsorbira DPPH•, vanilinska kiselina i produkti ne apsorbiraju zračenje (Slika 4.3.1).

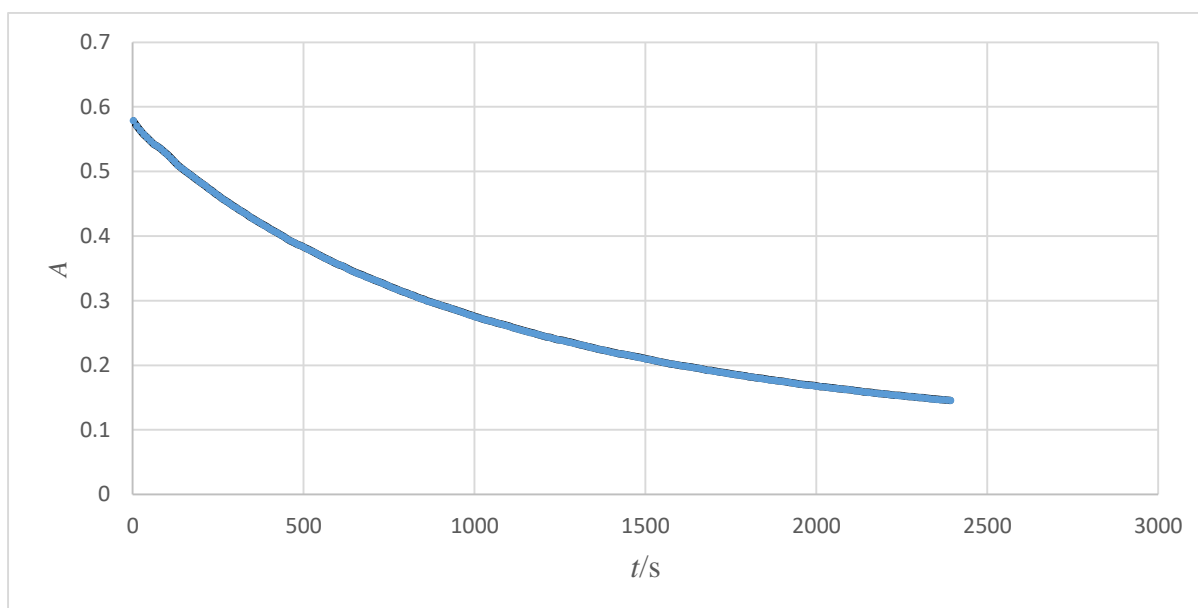


Slika 4.3.1. Spektar 0,0001 mol dm⁻³ otopine vanilinske kiseline u dioksanu

Iz spektra vanilinske kiseline u dioksanu određeni su maksimumi apsorpcijske vrpce (λ_{\max}) na 260 i 290 nm te procijenjeni ϵ pri 260 i 290 nm iznose $\epsilon_{260} = 9800 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ i $\epsilon_{290} = 4400 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.



Slika 4.3.2. Spektralni profil reakcije vanilinske kiseline i DPPH• u dioksanu pri koncentraciji vanilinske kiseline $0,01 \text{ mol dm}^{-3}$ i koncentraciji DPPH• $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$



Slika 4.3.3. Ovisnost apsorbancije (A) DPPH• pri 525 nm o vremenu (t) za reakciju vanilinske kiseline i DPPH• u dioksanu pri koncentraciji vanilinske kiseline $0,01 \text{ mol dm}^{-3}$ i koncentraciji DPPH• $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ na temperaturi 25°C .

Smanjenje apsorbancije na 525 nm slijedi integrirani zakon za reakciju prvog reda, temeljem kojega je određena konstanta brzina reakcije pseudo-prvog reda (k_{obs}) kod koncentracije $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ vanilinske kiseline.

Konstanta brzina reakcije vanilinske kiseline i DPPH•

U čistom dioksanu i smjesi otapala dioksan-voda (0,95:0,05, v/v) određena je konstanta brzine pseudo-prvog reda (k_{obs}) pri koncentraciji vanilinske kiseline 0,1 mol dm⁻³.

Tablica 4.3.1. Izmjerene konstante brzine (k_{obs}) i izračunana konstanta brzine (k_2) reakcije vanilinske kiseline (VK) i DPPH• u dioksanu

| c (VK) / mol dm ⁻³ | $k_{\text{obs}} \cdot 10^3 / \text{s}^{-1}$ | $k_2 \cdot 10^2 / \text{mol}^{-1} \text{dm}^3 \text{s}^{-1}$ | $\overline{k_2} \cdot 10^2 / \text{mol}^{-1} \text{dm}^3 \text{s}^{-1}$ | SD · 10 ² / mol ⁻¹ dm ³ s ⁻¹ | RSD / % |
|---------------------------------|---|--|---|--|---------|
| 0,1 | 2,60 | 1,26 | 1,14 | 0,11 | 10,0 |
| | 1,11 | 1,11 | | | |
| | 1,04 | 1,04 | | | |

* $c(\text{DPPH}) = 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$; $\lambda = 525 \text{ nm}$; $t = 25 \text{ }^\circ\text{C}$

Iz vrijednosti izmjerene konstante brzine reakcije pseudo-prvog reda (k_{obs}) i koncentracije vanilinske kiseline određena je konstanta brzine reakcije vanilinske kiseline i DPPH• u dioksanu, pri temperaturi 25 °C:

$$k_2 = 0,0114 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$$

Tablica 4.3.2. Izmjerene konstante brzine (k_{obs}) i izračunana konstante brzina (k_2) reakcije vanilinske kiseline i DPPH• u smjesi otapala dioksan-voda (0,95:0,05, v/v)

| c (VK) / mol dm ⁻³ | $k_{\text{obs}} \cdot 10^3 / \text{s}^{-1}$ | $k_2 \cdot 10^2 / \text{mol}^{-1} \text{dm}^3 \text{s}^{-1}$ | $\overline{k_2} \cdot 10^2 / \text{mol}^{-1} \text{dm}^3 \text{s}^{-1}$ | SD · 10 ² / mol ⁻¹ dm ³ s ⁻¹ | RSD / % |
|---------------------------------|---|--|---|--|---------|
| 0,1 | 1,15 | 1,15 | 1,15 | 0,00 | 0,1 |
| | 1,15 | 1,15 | | | |
| | 1,14 | 1,14 | | | |

* $c(\text{DPPH}) = 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$; $\lambda = 525 \text{ nm}$; $t = 25 \text{ }^\circ\text{C}$

Iz vrijednosti izmjerene konstante brzine reakcije pseudo-prvog reda ($\overline{k_{\text{obs}}}$) i koncentracije vanilinske kiseline određena je konstanta brzine reakcije vanilinske kiseline i DPPH• u smjesi otapala dioksan-voda (0,95:0,05, v/v), pri temperaturi 25°C:

$$k_2 = 0,0115 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$$

Nisu pronađeni podatci u literaturi za konstantu brzine reakcije vanilinske kiseline i DPPH•. Vrijednosti konstante brzine (k_2) reakcije vanilinske kiseline i DPPH• u čistom dioksanu i smjesi otapala dioksan-voda (0,95:0,05, v/v) su približno jednake.

Kinetički izotopni efekt reakcije vanilinske kiseline i DPPH•

U smjesi otapala dioksan-teška voda (0,95:0,05, v/v) određena je konstanta brzine pseudo-prvog reda ($k_{obs(D)}$) pri koncentraciji vanilinske kiseline 0,1 mol dm⁻³.

Tablica 4.3.3. Izmjerene konstante brzine (k_{obs}) i izračunana konstanta brzina (k_D) reakcije vanilinske kiseline i DPPH• u smjesi otapala dioksan-teška voda (0,95:0,05, v/v),

| $c(VK)/$ mol dm ⁻³ | $k_{obs(D)} \cdot 10^4 /$ s ⁻¹ | $k_D \cdot 10^3 /$ mol ⁻¹ dm ³ s ⁻¹ | $\overline{k_D} \cdot 10^3 /$ mol ⁻¹ dm ³ s ⁻¹ | $SD \cdot 10^3 /$ mol ⁻¹ dm ³ s ⁻¹ | RSD / % |
|----------------------------------|--|---|--|--|---------|
| 0,1 | 3,08 | 3,08 | 3,10 | 0,01 | 2,2 |
| | 3,05 | 3,05 | | | |
| | 3,18 | 3,18 | | | |

* $c(DPPH) = 5 \cdot 10^{-5}$ mol dm⁻³; $\lambda = 525$ nm; $t = 25$ °C

Korištenjem podataka iz Tablice 4.3.2. i Tablice 4.3.3. gdje su određene konstante brzine $k_H = k_2$ i k_D za reakciju vanilinske kiseline i DPPH• u smjesi otapala dioksan-voda/teška voda (0,95:0,05, v/v) prema jednadžbi $KIE = k_H/k_D$ dobiveni kinetički izotopni efekt je:

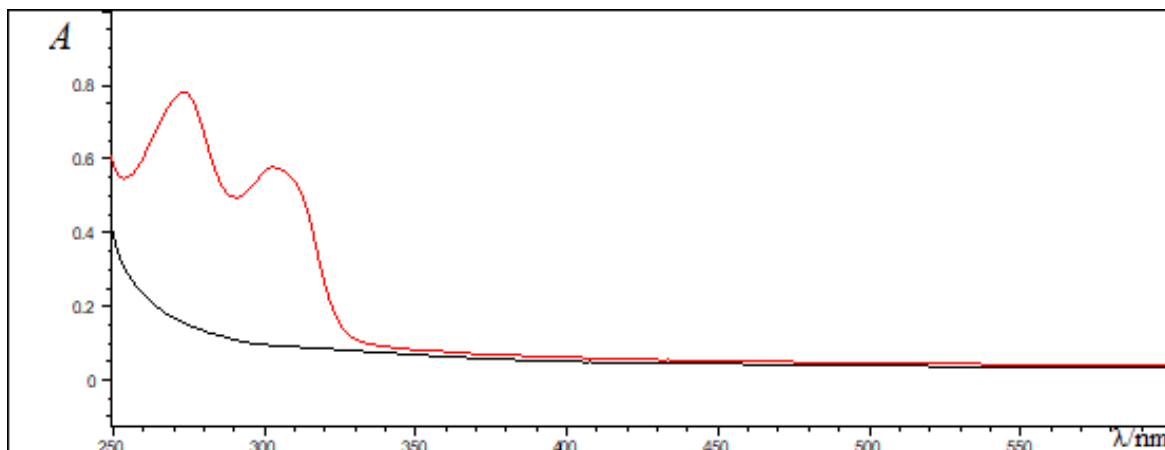
KIE = 3,69

U literaturi nema podataka o vrijednostima kinetičkog izotopnog efekta za reakciju vanilinske kiseline i oksidansa. Kod prethodnih istraživanja na fenolima (6 fenola s različitim supstituentima) u cikloheksanu dobivene vrijednosti su bile 1,3-3,3 (Foti i sur, 2008) i vanilinska kiselina ne odstupa puno od tih vrijednosti. Utvrđeni KIE je u skladu s HAT/PCET mehanizmom.

4.4. Reakcija vanilina i DPPH•

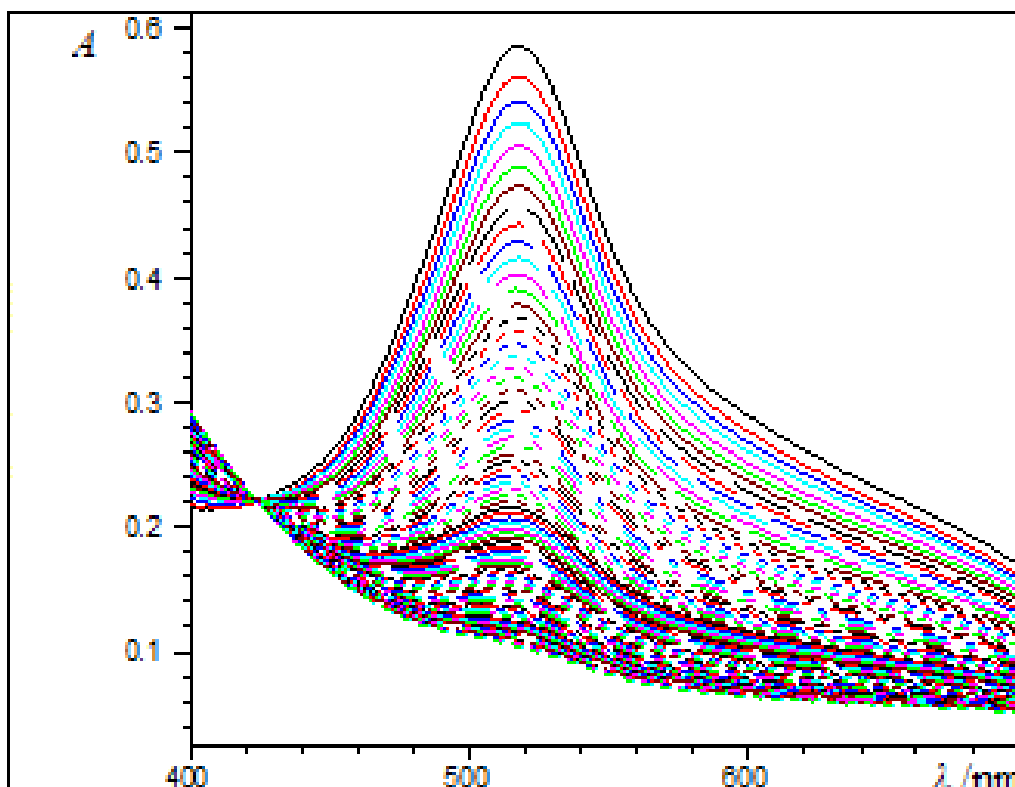
Tijek reakcije vanilina i DPPH• praćen je u rasponu valnih duljina 400-700 nm te je reakcija praćena tijekom 5 poluvremena reakcije.

U vidljivom dijelu spektra, gdje apsorbira DPPH•, vanilin i produkti reakcije ne apsorbiraju zračenje (Slika 4.4.1)

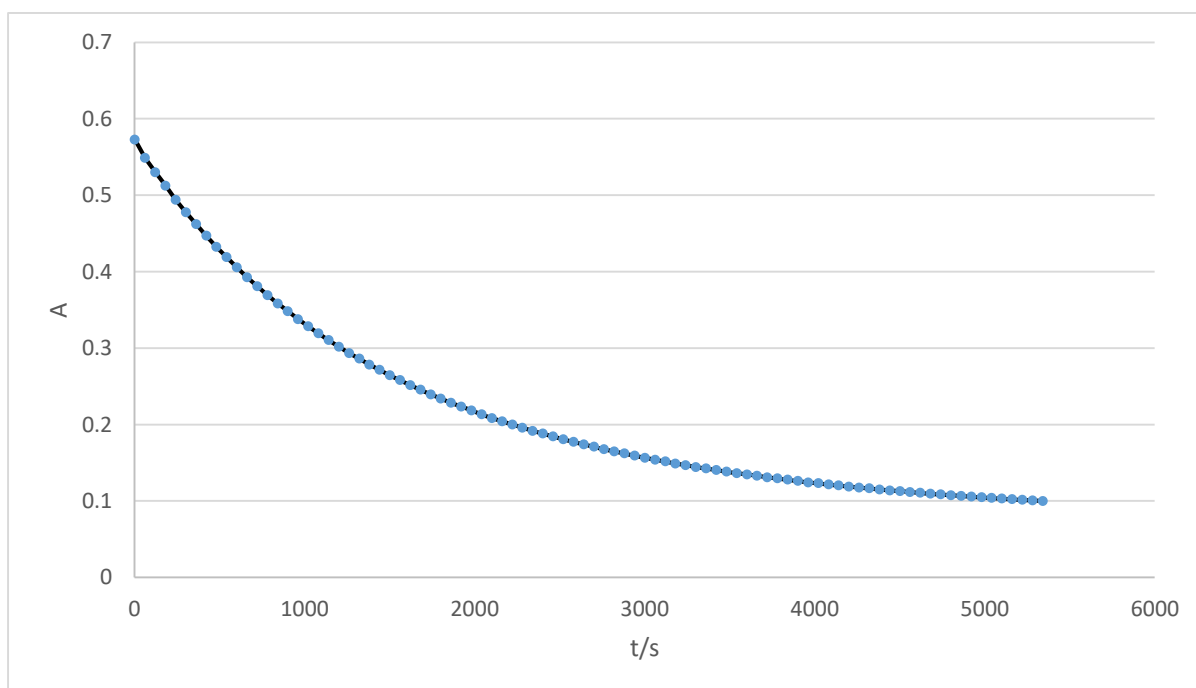


Slika 4.4.1. Spektar 0,0001 mol dm⁻³ otopine vanilina u dioksanu

Iz spektra vanilina u dioksanu određeni su maksimumi apsorpcijske vrpce (λ_{\max}) na 274 i 303 nm te procijenjeni ϵ pri 274 i 303 nm iznose $\epsilon_{274} = 6300 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ i $\epsilon_{303} = 4800 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.



Slika 4.4.2. Spektralni profil reakcije vanilina i DPPH• u dioksanu pri koncentraciji vanilina $0,15 \text{ mol dm}^{-3}$ i koncentraciji DPPH• $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$



Slika 4.4.3. Ovisnost apsorbancije (A) DPPH• pri 525 nm o vremenu (t) za reakciju vanilina i DPPH• u dioksanu pri koncentraciji vanilina $0,15 \text{ mol dm}^{-3}$ i koncentraciji DPPH• $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ na temperaturi 25°C .

Smanjenje apsorbancije na 525 nm slijedi integrirani zakon za reakciju prvog reda, temeljem kojega su određene konstante brzine reakcije pseudo-prvog reda (k_{obs}) kod određenih koncentracija vanilina.

Konstanta brzine reakcije vanilina i DPPH•

U čistom dioksanu određena je konstanta brzine pseudo-prvog reda (k_{obs}) pri koncentraciji vanilina $0,15 \text{ mol dm}^{-3}$.

Tablica 4.4.1. Izmjerene konstante brzine (k_{obs}) reakcije vanilina i DPPH• u dioksanu.

| $c(\text{vanilin}) / \text{mol dm}^{-3}$ | $k_{obs} \cdot 10^4 / \text{s}^{-1}$ | $k_2 \cdot 10^3 / \text{mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$ | $\overline{k_2} \cdot 10^3 / \text{mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$ | $SD \cdot 10^3 / \text{mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$ | RSD / % |
|--|--------------------------------------|--|---|---|---------|
| 0,15 | 6,98 | 4,65 | 4,74 | 0,01 | 2,0 |
| | 7,09 | 4,73 | | | |
| | 7,26 | 4,84 | | | |

* $c(\text{DPPH}) = 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$; $\lambda = 525 \text{ nm}$; $t = 25 \text{ }^\circ\text{C}$

Iz izmjerene konstante brzine reakcije pseudo-prvog reda (k_{obs}) pri koncentraciji vanilina $0,15 \text{ mol dm}^{-3}$ određena je konstanta brzine reakcije vanilina i DPPH• u otapalu dioksanu,

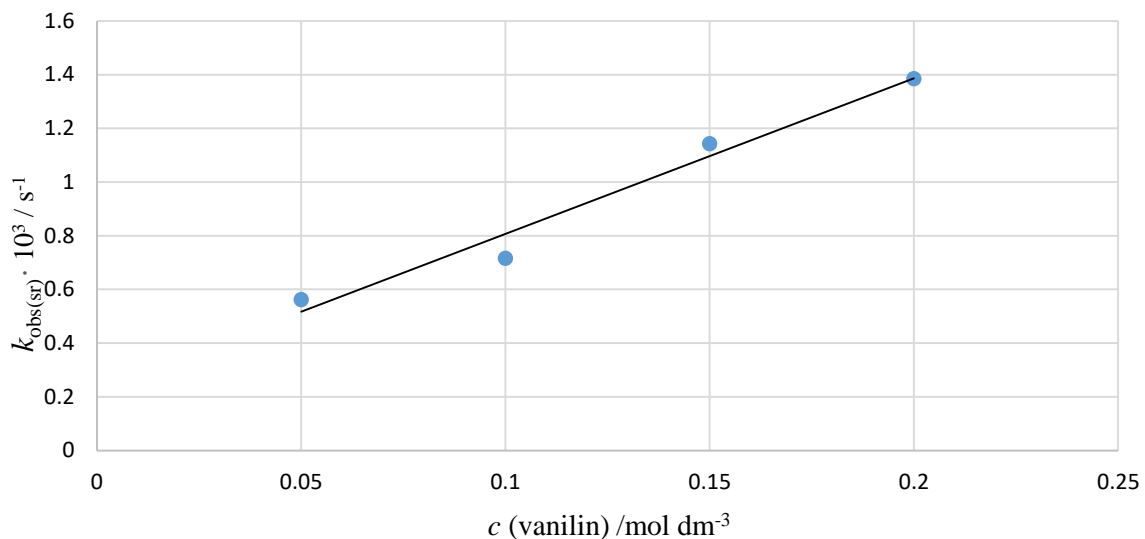
$$k_2 = 0.00474 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$$

U smjesi otapala dioksan-voda (0,95:0,05 v/v) određene su konstante brzine pseudo-prvog reda (k_{obs}) pri koncentracijama vanilina $0,05\text{-}0,2 \text{ mol dm}^{-3}$.

Tablica 4.4.2. Izmjerene konstante brzine (k_{obs}) reakcije vanilina i DPPH• u smjesi otapala dioksan-voda (0,95:0,05, v/v), pri različitim koncentracijama vanilina.

| $c(\text{vanilin}) / \text{mol dm}^{-3}$ | $k_{obs} \cdot 10^3 / \text{s}^{-1}$ | $\overline{k_{obs}} \cdot 10^3 / \text{s}^{-1}$ | $SD \cdot 10^3 / \text{s}^{-1}$ | RSD / % |
|--|--------------------------------------|---|---------------------------------|---------|
| 0,05 | 0,53 | 0,56 | 0,03 | 4,8 |
| | 0,56 | | | |
| | 0,59 | | | |
| 0,1 | 1,03 | 1,10 | 0,01 | 0,7 |
| | 1,10 | | | |
| | 1,17 | | | |
| 0,15 | 1,12 | 1,14 | 0,03 | 2,9 |
| | 1,12 | | | |
| | 1,18 | | | |
| 0,2 | 1,45 | 1,38 | 0,06 | 4,5 |
| | 1,34 | | | |
| | 1,37 | | | |

* $c(\text{DPPH}) = 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$; $\lambda = 525 \text{ nm}$; $t = 25 \text{ }^\circ\text{C}$



Slika 4.4.4. Ovisnost izmjerene konstante brzine ($\overline{k_{\text{obs}}}$) reakcije vanilina i DPPH• u smjesi otapala dioksan-voda (0,95:0,05, v/v) o koncentraciji vanilina. Koncentracija DPPH $5 \cdot 10^{-5}$ M, pri temperaturi 25 °C. Podatci iz Tablice 4.4.2

Prikazana je ovisnost srednje vrijednosti izmjerene konstante brzine ($\overline{k_{\text{obs}}}$) i koncentracije vanilina u smjesi otapala dioksan-voda (0,95:0,05 v/v) za reakciju vanilina i DPPH•. Dobivena je linearna ovisnost ($R^2 = 0.971$), s jednadžbom pravca $y = 0.00581x + 0.0002$ ($y - \overline{k_{\text{obs}}}$; $x - c$ (vanilin)).

Dobivena linearna ovisnost konstante brzine ($\overline{k_{\text{obs}}}$) o koncentraciji vanilina u skladu je sa predloženim zakonom za brzinu prema kojemu je $k_{\text{obs}} = k_2 \cdot c(\text{ArOH})$. Nagib pravca odgovora konstanti brzine (k_2) reakcije vanilina i DPPH•:

$$k_2 = 0,00581 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$$

Povećanje konstante brzine s dodatkom vode u dioksan je u skladu s ranijim istraživanjima, u kojima je utvrđeno povećanje konstante brzine s povećanjem polarosti otapala (Foti i sur, 2004; Foti, 2015).

Kumar i sur (2002) su u svojem istraživanju antioksidativne aktivnosti vanilina i *o*-vanilina za reakciju vanilina i DPPH• u metanolu odredili konstantu brzine $k = 1,7 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$. Određene konstante brzine u dioksanu ($k_2 = 0,00474 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$) i smjesi otapala dioksan-voda (0,95:0,05, v/v; $k_2 = 0,00581 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$) su ~340 puta manje od onih u metanolu.

Prema Foti i sur (2004) i Foti (2015) povećanje konstante brzine s polarnosti otapala se općenito objašnjava promjenom mehanizma iz HAT u SPLET mehanizam.

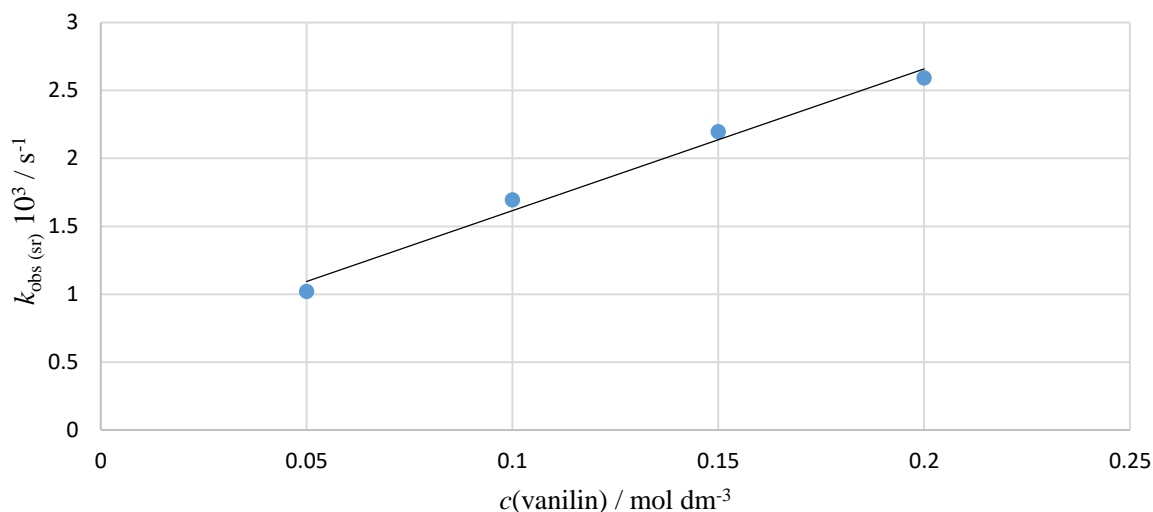
Vrijednost konstante brzine vanilinske kiseline ($k_2 = 0,0115 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$) u čistom dioksanu je približno 2x veća od vrijednosti konstante brzine vanilina ($k_2 = 0,00581 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$) u istoj smjesi otapala dioksan-voda (0,95:0,05, v/v). Veća vrijednost konstante brzine vanilinske kiseline moguće je povezana s prisutnošću karboksilne skupine umjesto aldehidne skupine vanilina. Chou i sur (2010) su u svom istraživanju antioksidativne aktivnosti vanilina i vanilinske kiseline povezali veću efikasnost vanilinske kiseline u hvatanju radikala s prisutnošću karboksilne skupine.

Kinetički izotopni efekt reakcije vanilina i DPPH•

Tablica 4.4.3. Izmjerene konstante brzine ($k_{\text{obs(D)}}$) reakcije vanilina i DPPH• u smjesi otapala dioksan-teška voda (0,95:0,05, v/v)

| $c(\text{vanilin}) / \text{mol dm}^{-3}$ | $k_{\text{obs(D)}} \cdot 10^3 / \text{s}^{-1}$ | $\overline{k_{\text{obs(D)}}} \cdot 10^3 / \text{s}^{-1}$ | $SD \cdot 10^3 / \text{s}^{-1}$ | RSD / % |
|--|--|---|---------------------------------|---------|
| 0,05 | 0,98 | 1,02 | 0,06 | 6,0 |
| | 1,09 | | | |
| | 0,99 | | | |
| 0,1 | 1,64 | 1,69 | 0,06 | 3,5 |
| | 1,76 | | | |
| | 1,69 | | | |
| 0,15 | 2,07 | 2,20 | 0,12 | 5,3 |
| | 2,30 | | | |
| | 2,21 | | | |
| 0,2 | 2,51 | 2,59 | 0,10 | 4,0 |
| | 2,71 | | | |
| | 2,55 | | | |

* $c(\text{DPPH}) = 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$; $\lambda = 525 \text{ nm}$; $t = 25 \text{ }^\circ\text{C}$



Slika 4.5.5. Ovisnost izmjerene konstante brzine ($\overline{k_{\text{obs}}}$) reakcije vanilina i DPPH• u smjesi otapala dioksan-teška voda (0,95:0,05, v/v) o koncentraciji vanilina. Koncentracija DPPH• $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, pri temperaturi $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Podatci iz Tablice 4.4.3.

Prikazana je ovisnost srednje vrijednosti izmjerene konstante brzine ($\overline{k_{\text{obs}}}$) i koncentracije vanilina u smjesi otapala dioksan-teška voda (0,95:0,05, v/v) za reakciju vanilina i DPPH•. Dobivena je linearna ovisnost ($R^2 = 0.861$), s jednadžbom pravca $y = 0.0104x + 0.0006$ ($y - \overline{k_{\text{obs}}}$; $x - c$ (vanilin)).

Dobivena linearna ovisnost konstante brzine ($\overline{k_{\text{obs}}}$) o koncentraciji vanilina u skladu je s predloženim zakonom za brzinu prema kojemu je $k_{\text{obs}} = k_2 \cdot c(\text{ArOH})$. Nagib pravca odgovora konstanti brzine (k_2) reakcije vanilina i DPPH•:

Dobivena linearna ovisnost konstante brzine ($\overline{k_{\text{obs}}}$) o koncentraciji vanilina u skladu je sa zakonom za brzinu te nagib odgovora konstanti brzine (k_D) za reakciju vanilina i DPPH•:

$$k_D = 0,0104 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$$

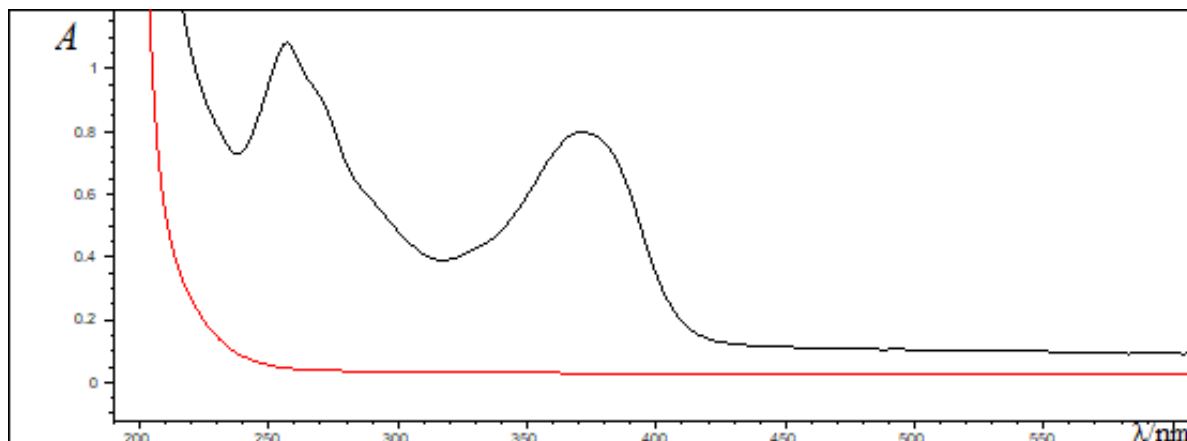
Izmjerene su konstante brzina reakcija k_{obs} i $k_{\text{obs(D)}}$ za reakciju vanilina i DPPH• u smjesi otapala dioksan-voda (0,95:0,05 v/v) i dioksan-teška voda (0,95:0,05 v/v), pri koncentraciji DPPH• $0,00005 \text{ mol dm}^{-3}$ i pri temperaturi $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Iz konstanti brzina $k_H = k_2$ i k_D te prema jednaždbi $\text{KIE} = k_H/k_D$ izračunat je kinetički izotopni efekt (KIE):

$$\text{KIE} = 0,56$$

U literaturi nema podataka o KIE reakcije vanilina i DPPH•. Za razliku od ostalih ispitanih fenolnih spojeva kod kojih je određen normalni KIE, u slučaju vanilina je dobiven inverzni efekt. Na temelju dobivenog KIE je moguće zaključiti da se ova reakcija razlikuje od prethodno opisanih reakcija *p*-kumarinske kiseline, ferulične kiseline, vanilinske kiseline i kvercetina. Inverzni efekt bi se mogao objasniti s brzom predravnotežom u kojoj bi nastajao divanilin, nakon kojega bi slijedio ET/PT na DPPH•. U tom slučaju potrebno bi bilo provesti i korekciju konstante brzine reakcije. Za potvrdu ovog mehanizma su potrebna dodatna istraživanja. Tai i sur (2011) su utvrdili da prilikom reakcije s ABTS radikalom dolazi do dimerizacije vanilina pri čemu nastaje divanilin koji nadalje reagira s još 3 mola ABTS radikala.

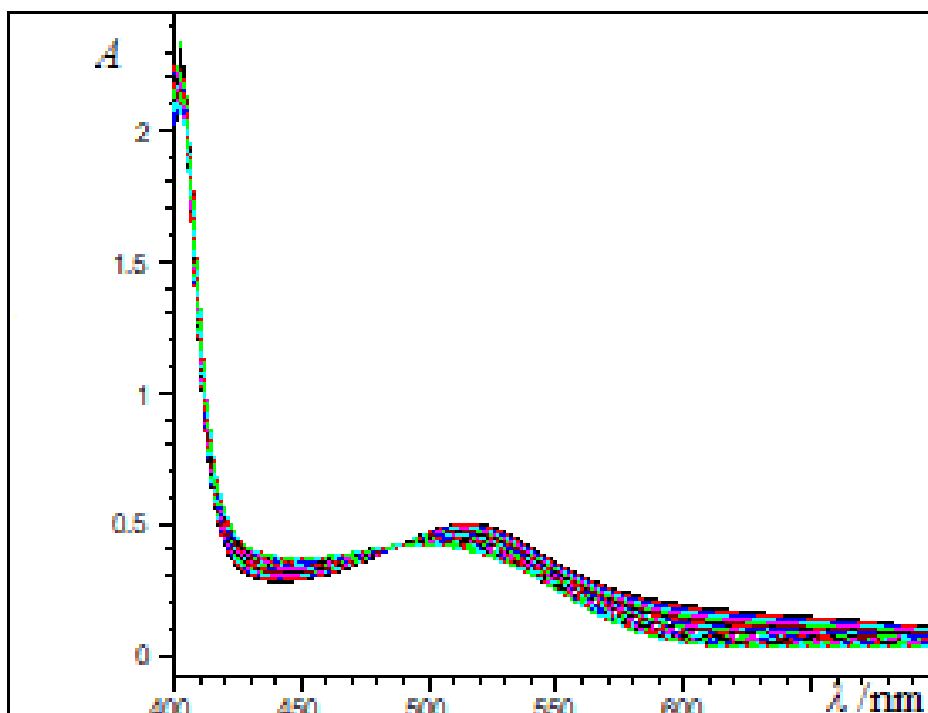
4.5. Reakcija kvercetina i DPPH•

Tijek reakcije kvercetina i DPPH• praćen je u rasponu valnih duljina 400-700 nm, u vremenu koje je bilo potrebno da se apsorbanacija smanji približno na 0.

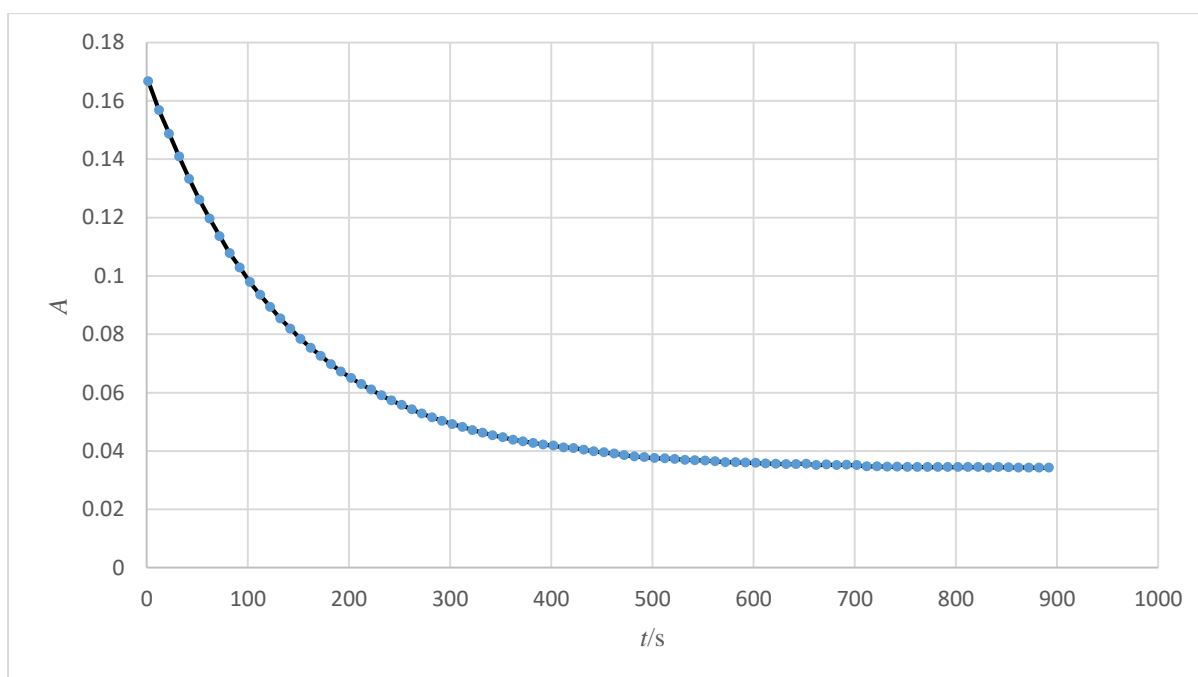


Slika 4.5.1. Spektar $2 \cdot 10^{-5}$ mol dm⁻³ otopine kvercetina u metanolu

Iz spektra kvercetina u metanolu određeni su maksimumi apsorpcijske vrpce (λ_{\max}) na 255 i 372 nm te procijenjeni ϵ pri 255 i 372 nm iznose $\epsilon_{255} = 21550$ dm³ mol⁻¹ cm⁻¹ i $\epsilon_{372} = 21200$ dm³ mol⁻¹ cm⁻¹



Slika 4.5.2. Spektralni profil reakcije kvercetina i DPPH• u u smjesi otapala dioksan-voda (0,99:0,01, v/v) pri koncentraciji kvercetina $0,001 \text{ mol dm}^{-3}$ i koncentraciji DPPH• $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ pri temperaturi $25 \text{ }^\circ\text{C}$



Slika 4.5.3. Ovisnost apsorbancije (A) DPPH• pri 620 nm o vremenu (t) za reakciju kvercetina i DPPH• u smjesi otapala dioksan-voda (0,99:0,01, v/v) pri koncentraciji kvercetina $0,001 \text{ mol dm}^{-3}$ i koncentraciji DPPH• $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ na temperaturi $25 \text{ }^\circ\text{C}$

Mjerenje konstante brzine reakcije kvercetina i DPPH• zasniva se na praćenju smanjenja apsorbancije DPPH• u reakcijskoj smjesi tijekom reakcije. Za kvercetin su određene konstante brzine pri valnoj duljini od 620 nm zbog odstupanja od zakona za brzinu reakcije pseudo-prvog reda što je povezano s nastankom produkta koji apsorbira u blizini maksimuma valne duljine DPPH•.

Konstanta brzine reakcije kvercetina i DPPH•

U smjesi otapala dioksan- voda (0,99:0,01, v/v i 0,95:0,05, v/v) određene se konstante brzine pseudo-prvog reda (k_{obs}) pri koncentracijama kvercetina 0,001 – 0,005 mol dm⁻³.

Tablica 4.5.1. Izmjerene konstante brzine (k_{obs}) i izračunana konstanta brzine (k_2) reakcije kvercetina i DPPH• u smjesi otapala dioksan-voda (0,99:0,01, v/v),

| c (kvercetin) / mol dm ⁻³ | $k_{\text{obs}} \cdot 10^2 / \text{s}^{-1}$ | $k_2 / \text{mol}^{-1} \text{dm}^3 \text{s}^{-1}$ | $\overline{k_2} / \text{mol}^{-1} \text{dm}^3 \text{s}^{-1}$ | SD / mol ⁻¹ dm ³ s ⁻¹ | RSD / % |
|--|---|---|--|--|---------|
| 0,001 | 7,22 | 7,22 | 6,66 | 1,14 | 17,1 |
| | 7,41 | 7,41 | | | |
| | 5,35 | 5,35 | | | |

* $c(\text{DPPH}) = 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$; $\lambda = 620 \text{ nm}$; $t = 25 \text{ }^\circ\text{C}$

Iz srednje vrijednosti izračunatih konstanti brzina reakcije pseudo-prvog reda (k_2) i koncentracije kvercetina određena je konstanta brzine reakcije kvercetina i DPPH• u smjesi otapala dioksan-voda (0,99:0,01, v/v), pri temperaturi 25 °C:

$$k_2 = 6,66 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$$

Tablica 4.5.2. Izmjerene konstante brzine (k_{obs}) i izračunana konstanta brzine (k_2) reakcije kvercetina i DPPH• u smjesi otapala dioksan-voda (0,95:0,05, v/v)

| c (kvercetin) / mol dm^{-3} | $k_{\text{obs}} \cdot 10^2 / \text{s}^{-1}$ | $k_2 / \text{mol}^{-1} \text{dm}^3 \text{s}^{-1}$ | $\overline{k_2} / \text{mol}^{-1} \text{dm}^3 \text{s}^{-1}$ | SD / $\text{mol}^{-1} \text{dm}^3 \text{s}^{-1}$ | RSD / % |
|--|---|---|--|--|---------|
| 0,002 | 1,02 | 5,12 | 5,48 | 0,44 | 8,1 |
| | 1,07 | 5,35 | | | |
| | 1,20 | 5,98 | | | |
| 0,005 | 2,49 | 4,97 | 4,90 | 0,06 | 1,3 |
| | 2,43 | 4,86 | | | |
| | 2,43 | 4,86 | | | |

* $c(\text{DPPH}) = 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$; $\lambda = 620 \text{ nm}$; $t = 25 \text{ }^\circ\text{C}$

Iz srednje vrijednosti izračunatih konstanti brzina reakcije pseudo-prvog reda (k_{obs}) i koncentracije kvercetina određena je konstanta brzine reakcije kvercetina i DPPH• u smjesi otapala dioksan-voda (0,95:0,05, v/v), pri temperaturi 25°C:

$$k_2 = 5,19 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$$

Prema Musialik i sur. (2009) dobivena konstanta brzine reakcije u čistom dioksanu iznosi $k = 3,0 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$. U istom radu Musialik i sur. su proučavali utjecaj različitih otapala na brzinu reakcije flavonoida s DPPH• te je tako konstanta brzina reakcije u metanolu 1000 puta veća nego u čistom dioksanu. Prema tome, brzina reakcije je veća u polarnom otapalu. Dobivene konstante brzine su nešto veće od konstante dobivene u čistom dioksanu. Rezultati dobiveni od Musialik i sur., te s obzirom da su konstante brzine određene u smjesi otapala dioksan-voda koje je polarnije od čistog dioksana, daje objašnjenje zašto su dobivene vrijednosti konstante brzine nešto više.

Kinetički izotopni efekt reakcije kvercetina i DPPH•

Tablica 4.5.3. Izmjerene konstante brzine (k_{obs}) i izračunana konstanta brzine (k_2) reakcije kvercetina i DPPH• u smjesi otapala dioksan-voda (0,99:0,01, v/v)

| $c(\text{kvercetin}) / \text{mol dm}^{-3}$ | $k_{\text{obs(D)}} \cdot 10^3 / \text{s}^{-1}$ | $k_{\text{D}} / \text{mol}^{-1} \text{dm}^3 \text{s}^{-1}$ | $\overline{k_{\text{D}}} / \text{mol}^{-1} \text{dm}^3 \text{s}^{-1}$ | SD / $\text{mol}^{-1} \text{dm}^3 \text{s}^{-1}$ | RSD / % |
|--|--|--|---|--|---------|
| 0,001 | 1,67 | 1,67 | 1,62 | 0,31 | 18,9 |
| | 1,90 | 1,90 | | | |
| | 1,29 | 1,29 | | | |

* $c(\text{DPPH}) = 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$; $\lambda = 620 \text{ nm}$; $t = 25 \text{ }^\circ\text{C}$

Korištenjem podataka iz Tablice 4.5.1. i Tablice 4.5.3. gdje su određene konstante brzine $k_{\text{H}} = k_2$ i k_{D} za reakciju kvercetina i DPPH• u smjesi otapala dioksan-voda/teška voda (0,99:0,01, v/v) prema jednadžbi $\text{KIE} = k_{\text{H}}/k_{\text{D}}$ dobiveni kinetički izotopni efekt je:

KIE =4,11

Tablica 4.5.4. Izmjerene konstante brzine (k_{obs}) i izračunana konstanta brzine (k_2) reakcije kvercetin i DPPH• u smjesi otapala dioksan-voda (0,95:0,05, v/v)

| $c(\text{kvercetin})$ / mol dm^{-3} | $k_{\text{obs(D)}} \cdot 10^2 /$ s^{-1} | $k_{\text{D}} /$ $\text{mol}^{-1} \text{dm}^3 \text{s}^{-1}$ | $\overline{k_{\text{D}}} /$ $\text{mol}^{-1} \text{dm}^3 \text{s}^{-1}$ | SD / $\text{mol}^{-1} \text{dm}^3 \text{s}^{-1}$ | RSD / % |
|--|---|---|--|---|------------|
| 0,005 | 5,35 | 1,07 | 0,994 | 0,064 | 8,95 |
| | 5,08 | 1,02 | | | |
| | 4,48 | 0,90 | | | |

* $c(\text{DPPH}) = 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$; $\lambda = 620 \text{ nm}$; $t = 25 \text{ }^\circ\text{C}$

Korištenjem podataka iz Tablice 4.6.2. i Tablice 4.6.4. gdje su određene konstante brzine $k_{\text{H}} = k_2$ i k_{D} za reakciju kvercetin i DPPH• u smjesi otapala dioksan-voda/teška voda (0,95:0,05, v/v) prema jednadžbi $\text{KIE} = k_{\text{H}}/k_{\text{D}}$ dobiveni kinetički izotopni efekt je:

$$\text{KIE} = 5,23$$

U literaturi nema podataka o vrijednostima kinetičkog izotopnog efekta za kvercetin. Kod prethodnih istraživanja na fenolima (6 fenola s različitim supstituentima) u cikloheksanu dobivene vrijednosti su bile 1,3-3,3 (Foti i sur, 2008) i kvercetin ne odstupaju puno od dobivenih vrijednosti. Dobivena vrijednost u skladu je s HAT mehanizmom koju je predložio Musialik i sur (2009) na temelju znatno manje konstante brzine u dioksanu u odnosu na metanol. Ovo je dodatna potvrda HAT mehanizma.

5. ZAKLJUČAK

U ovom diplomskom radu provedeno je istraživanje kinetike reakcija fenolnih kiselina: *p*-kumarinske kiseline, ferulične kiseline, vanilinske kiseline; vanilina i flavonoida kvercetina u dioksanu te smjesi otapala dioksan-voda (0,99:0,01 v/v i 0,95:0,05 v/v).

Određeni su kinetički izotopni efekti reakcija navedenih fenolnih spojeva i DPPH• u smjesi otapala dioksan-voda (0,99:0,01 v/v i 0,95:0,05 v/v).

- Određena je konstanta brzine reakcije *p*-kumarinske kiseline i DPPH• u smjesi otapala dioksan-voda (0,99:0,01, v/v) koja iznosi $0,00829 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$ te u smjesi otapala dioksan-voda (0,95:0,05, v/v) koja iznosi $0,00499 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$. Dobivena konstanta brzine se smanjuje s povećanjem udjela vode, što nije u skladu s dosadašnjim istraživanjima. Određen je i KIE u smjesi otapala dioksan-voda (0,99:0,01, v/v) koji iznosi 2,62 te u smjesi otapala dioksan-voda (0,95:0,05, v/v) koji iznosi 2,95. U literaturi nisu pronađeni podatci. Utvrđeni KIE je u skladu s HAT/PCET mehanizmom.
- Određena je konstanta brzine reakcije ferulične kiseline i DPPH• u smjesi otapala dioksan-voda (0,95:0,05, v/v) koja iznosi $0,321 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$. Dobivena konstanta brzine je puno niža od konstante brzine dobivene u alkanskom otapalu (Foti i sur, 2008). Određen je i KIE u smjesi otapala dioksan-voda (0,95:0,05, v/v) koji iznosi 12,17. U literaturi nisu pronađeni podatci. Utvrđeni KIE je u skladu s HAT/PCET mehanizmom.
- Određena je konstanta brzine reakcije vanilinske kiseline i DPPH• u dioksanu koja iznosi $0,0114 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$ te u smjesi otapala dioksan-voda (0,95:0,05, v/v) koja iznosi $0,0115 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$. Određen je i KIE u smjesi otapala dioksan-voda (0,95:0,05, v/v) koji iznosi 3,69. U literaturi nisu pronađeni podatci. Utvrđeni KIE je u skladu s HAT/PCET mehanizmom.
- Određena je konstanta brzine reakcije vanilina i DPPH• u dioksanu koja iznosi $0,00474 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$ te u smjesi otapala dioksan-voda (0,95:0,05, v/v) koja iznosi $0,00581 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$. Određen je i KIE u smjesi otapala dioksan-voda u smjesi otapala dioksan-voda (0,95:0,05, v/v) koji iznosi 0,56. U literaturi nisu pronađeni podatci. Dobiveni KIE upućuje na složeni reakcijski mehanizam.

- Određena je konstanta brzine reakcije kvercetina i DPPH• u smjesi otapala dioksan-voda (0,99:0,01, v/v) koja iznosi $6,66 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$ te u smjesi otapala dioksan-voda (0,95:0,05, v/v) koja iznosi $5,19 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$. Određen je i KIE u smjesi otapala dioksan-voda (0,99:0,01, v/v) koji iznosi 4,11 te u smjesi otapala dioksan-voda (0,95:0,05, v/v) koji iznosi 5,23. U literaturi nisu pronađeni podatci. Utvrđeni KIE je u skladu s HAT/PCET mehanizmom.

6. POPIS KRATICA OZNAKA I SIMBOLA

- AAPH - 2,2'-azobis(2-amidinopropan) dihidroklorid
- ABTS - 2,2'-azino-bis(3- etilbenzotiazoline-6-sufonska kiselina)
- AGE – napredni krajnji proizvodi glikacije, engl. *Advanced Glycation End Products*
- AMPK – AMP- aktivirana protein kinaza, engl. *AMP-activated protein kinase*
- DMBA - dimetilben[a]antracen
- DPPH - 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
- ET - prijenos elektrona, engl. *Single electron transfer*
- FK – ferulična kiselina engl. *Ferulic acid*
- GSH – glutation, engl. *Glutathione*
- GPx – glutation peroksidaza, engl. *Glutathione peroxidase*
- HAT - reakcija prijelaza atoma vodika, engl. *Hydrogen-Atom Transfer*
- HO-1 – hem oksigenaza, engl. *Heme oxygenase*
- KIE – kinetički izotopni efekt, engl. *Kinetic Isotope Effect*
- MAPK – MAP kinaza, engl. *MAP-kinase*
- NADPH – nikotinamid adenin dinukleotid-fosfat, engl. *Nicotinamide adenine dinucleotide phosphat*
- NQO1 – NAD(P)H kinon dehidrogenaza 1, engl. *NAD(P)H quionone dehydrogenase 1*
- ORAC - sposobnost hvatanja radikala kisika, engl. *Oxygen radical absorbance capacity*
- OxHLIA – test inhibicije oksidativne hemolize, engl. *Oxidative hemolysis inhibition assay*
- PCET - reakcija spregnutog prijelaza elektrona i protona, engl. *Proton-Coupled Electron Transfer*
- PK – *p*-kumarinska kiselina engl. *p-coumaric acid*
- ROS - reaktivna kisikova vrsta, engl. *Reactive oxygen species*
- RSD - relativna standardna devijacija engl. *Relative standard deviation*
- SD – standardna devijacija engl. *Standard deviation*
- SOD – superoksid dismutaza, engl. *Superoxide dismutaze*
- SPLET - uzastopni prijenos protona i elektrona, engl. *Sequential Proton-Loss Electron-Transfer*
- VK – vanilinska kiselina engl. *Vanillic acid*

7. LITERATURA

Anand David AV, Arulmoli R, Parasuraman S. Overviews of Biological Importance of Quercetin: A Bioactive Flavonoid. *Pharmacogn Rev*, 2016, 10(20), 84-89.

Anbalagan V, Raju, K, Shanmugam M Assessment of Lipid Peroxidation and Antioxidant Status in Vanillic Acid Treated 7,12-Dimethylbenz[a]anthracene Induced Hamster Buccal Pouch Carcinogenesis. *J Clin Diagn Res*, 2017, 11(3), BF01–BF04.

Anslyn EV, Dougherty DA. Experiments Related to Thermodynamics and Kinetics. U: Modern Physical Organic Chemistry. Anslyn EV, Dougherty DA, urednici, Sausalito, California, University Science Books, 2006, str. 421-437.

Arya S, Rookes J, Cahill D, Lenka S Vanillin: a review on the therapeutic prospects of a popular flavouring molecule. *Adv Tradit Med*, 2021, 21(3), 1-17.

Atkins P, de Paula J, Keeler J Atkins' Physical Chemistry, 11. izdanje, Oxford University Press, Oxford, 2018, str. 725-734

Bondet V, Brand-Williams W, Berset C, Kinetics and Mechanisms of Antioxidant Activity using the DPPH Free Radical Method. *LWT - Food Sci Technol*, 1997, 30, 609-615.

Boz, H. (2015), *p*-Coumaric acid in cereals: presence, antioxidant and antimicrobial effects. *Int J Food Sci Technol*, 2015, 50: 2323-2328.

Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *LWT – Food Sci Technol*, 1995, 28, 25-30.

Chaudhary A, Jaswal VS, Choudhary S, Sonika, Sharma A, Beniwal V, Tuli HS, Sharma S Ferulic Acid: A Promising Therapeutic Phytochemical and Recent Patents Advances. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov*, 2019, 13(2), 115–123.

Chou T H, Ding, H Y, Hung H J, Liang C. H. Antioxidative characteristics and inhibition of alpha-melanocyte-stimulating hormone-stimulated melanogenesis of vanillin and vanillic acid from *Origanum vulgare*. *Exp Dermatol*, 2010, 19(8), 742–750.

Converti A, Aliakbarian B, Domínguez J. M, Bustos Vázquez G, Perego, P. Microbial production of biovanillin. *Braz J Microbiol*, 2010, 41(3), 519–530.

De Paiva LB, Goldbeck R, dos Santos WD, Squina MF Ferulic acid and derivatives: molecules with potential application in the pharmaceutical field. *Braz J Pharm Sci*, 2013, 49(3), 395-411.

Foti MC, Daquino C, Geraci C (2004). Electron-transfer reaction of cinnamic acids and their methyl esters with the DPPH(*) radical in alcoholic solutions. *J Org Chem*, 2004, 69(7), 2309–2314.

Foti MC, Daquino C, Mackie ID, DiLabio GA, Ingold KU. Reaction of Phenols with the 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl Radical. Kinetics and DFT Calculations Applied To Determine ArO-H Bond Dissociation Enthalpies and Reaction Mechanism. *J Org Chem*, 2008, 73(23), 9270-9282.

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

Graf E Antioxidant potential of ferulic acid. *Free Radic Biol Med*, 1992, 13(4), 435–448

Hocking M, Vanillin: Synthetic Flavoring from Spent Sulfite Liquor. *J Chem Educ*, 1997, 74(9), 1055.

Isaacs N, Physical Organic Chemistry, 2. izdanje, London, Longman Group UK Limited, 1995, str. 288-290

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

Keller S, Locquet N, Cuvelier ME Partitioning of vanillic acid in oil-in-water emulsions: Impact of the Tween[®]40 emulsifier. *Food Res. Int.* 2016, 88, 61–69

Kiokias S, Proestos C, Oreopoulou, V Phenolic Acids of Plant Origin-A Review on Their Antioxidant Activity In Vitro (O/W Emulsion Systems) Along with Their in Vivo Health Biochemical Properties. *Foods*, 2020, 9(4), 534.

Li D, Rui YX, Guo SD, Luan F, Liu R, Zeng N Ferulic acid: A review of its pharmacology, pharmacokinetics and derivatives. *Life Sci*, 2021, 284, 119921.

Mathew S, Abraham TE, Zakaria ZA Reactivity of phenolic compounds towards free radicals under in vitro conditions. *J Food Sci Technol*, 2015, 52(9), 5790–5798.

Musialik M, Kuzmicz R, Pawłowski TS, Litwinienko G. Acidity of hydroxyl groups: an overlooked influence on antiradical properties of flavonoids. *J Org Chem*, 2009, 74(7), 2699–2709.

Pei K, Ou J, Huang J, Ou S p-Coumaric acid and its conjugates: dietary sources, pharmacokinetic properties and biological activities. *J Sci Food Agric*, 2016 96(9), 2952–2962.

Salehi B, Machin L, Monzote L, Sharifi-Rad J, Ezzat S M, Salem M A, Merghany R M, El Mahdy N M, Kılıç C S, Sytar O, Sharifi-Rad M, Sharopov F, Martins N, Martorell M, Cho W C Therapeutic Potential of Quercetin: New Insights and Perspectives for Human Health. *ACS omega*, 2020, 5(20), 11849–11872.

Santosh Kumar S, Priyadarsini KI, Sainis KB Free radical scavenging activity of vanillin and o-vanillin using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical. *Redox Rep*, 2002, 7(1), 35–40.

Shen Y, Song X, Li L, Sun J, Jaiswal Y, Huang J, Liu C, Yang W, Williams L, Zhang H, Guan Y Protective effects of p-coumaric acid against oxidant and hyperlipidemia-an in vitro and in vivo evaluation. *Biomed Pharmacothe.*, 2019, 111, 579–587.

Stompor-Goraćy M, Machaczka M Recent Advances in Biological Activity, New Formulations and Prodrugs of Ferulic Acid. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(23),12889.

Tai A, Sawano, T Yazama F, Ito H Evaluation of antioxidant activity of vanillin by using multiple antioxidant assays. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1810(2), 170–177.

Vishnu K V, Chatterjee N S, Ajeeshkumar K K, Lekshmi R K, Tejpal C S, Mathew S, Ravishankar C N Microencapsulation of sardine oil: Application of vanillic acid grafted chitosan as a bio-functional wall material. *Carbohydr. Polym*, 2017, 174, 540–548.

Xu D, Hu M J, Wang Y Q, Cui Y L Antioxidant Activities of Quercetin and Its Complexes for Medicinal Application. *Molecules*, 2019,24(6), 1123.

8. SAŽETAK/ SUMMARY

8.1. Sažetak

Fenolni spojevi se sve više istražuju radi mnogobrojnih bioloških učinaka među kojima se ističe antioksidativni učinak. Za praćenje antioksidativnog učinka često se koristi metoda s DPPH• radikalom. U ovom diplomskom radu određene su konstante brzine reakcija fenolnih kiselina: *p*-kumarinske kiseline, ferulične kiseline, vanilinske kiseline, vanilina i flavonoida kvercetina s DPPH• u dioksanu te smjesi otapala dioksan-voda (0,99:0,01 v/v i 0,95:0,05 v/v). Određeni su kinetički izotopni efekti reakcija navedenih fenolnih spojeva i DPPH• u smjesi otapala dioksan-voda (0,99:0,01 v/v i 0,95:0,05 v/v). Dobiveni kinetički izotopni efekti, za sve spojeve osim vanilina, upućuje na reakcijski mehanizam HAT (*hydrogen atom transfer*) ili PCET (*proton-coupled electron transfer*), što podrazumijeva da u stupnju koji određuje brzinu reakcije dolazi i do prijelaza protona i do prijelaza elektrona. U slučaju vanilina dobiven je inverzni KIE koji upućuje na drugačiji i složeniji mehanizam reakcije. U literaturi nisu pronađeni podatci o kinetičkim izotopnim efektima navedenih reakcija. Dobiveni rezultati doprinose razumijevanju kinetike i mehanizma reakcija fenolnih spojeva i radikala, s čime je povezan jedan dio antioksidativne aktivnosti ovih spojeva.

8.2. Summary

Phenolic compounds are increasingly being researched for their numerous biological effects, among which the antioxidant effect stands out. To monitor the antioxidant potential, the DPPH• free radical scavenging method is often used. In this thesis, the reaction rate constants of phenolic acids: *p*-coumaric acid, ferulic acid, vanillic acid, vanillin and the flavonoid quercetin with DPPH• in dioxane and solvent mixture dioxane-water (0,99:0,01 *v/v* and 0,95:0,05 *v/v*) were examined. The kinetic isotopic effects for the mentioned phenolic compounds and DPPH• reaction in the solvent mixture dioxane-water (0,99:0,01 *v/v* and 0,95:0,05 *v/v*) were determined. The obtained kinetic isotope effects, for all compounds except vanillin, refer to the reaction mechanism HAT (hydrogen atom transfer) or PCET (proton-coupled electron transfer), which implies that in the rate-determining step of the reaction, both proton and electron transitions occur. In the case of vanillin, an inverse KIE was obtained, which points to a different and more complex reaction mechanism. No data on the kinetic isotope effects for the mentioned reactions were found in the literature. The obtained results contribute to the understanding of the kinetics and mechanism of reactions of phenolic compounds with radicals, with which a part of the antioxidant activity of these compounds is associated.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/ BASIC DOCUMENTATION CARD

Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

Kinetički izotopni efekti u reakcijama fenolnih kiselina i DPPH• radikala

Josipa Lalić

SAŽETAK

Fenolni spojevi se sve više istražuju radi mnogobrojnih bioloških učinaka među kojima se ističe antioksidativni učinak. Za praćenje antioksidativnog učinka često se koristi metoda s DPPH• radikalom. U ovom diplomskom radu određene su konstante brzine reakcija fenolnih kiselina: *p*-kumarinske kiseline, ferulične kiseline, vanilinske kiseline, vanilina i flavonoida kvercetina s DPPH• u dioksanu te smjesi otapala dioksan-voda (0,99:0,01 v/v i 0,95:0,05 v/v). Određeni su kinetički izotopni efekti reakcija navedenih fenolnih spojeva i DPPH• u smjesi otapala dioksan-voda (0,99:0,01 v/v i 0,95:0,05 v/v). Dobiveni kinetički izotopni efekti, za sve spojeve osim vanilina, upućuje na reakcijski mehanizam HAT (*hydrogen atom transfer*) ili PCET (*proton-coupled electron transfer*), što podrazumijeva da u stupnju koji određuje brzinu reakcije dolazi i do prijelaza protona i do prijelaza elektrona. U slučaju vanilina dobiven je inverzni KIE koji upućuje na drugačiji i složeniji mehanizam reakcije. U literaturi nisu pronađeni podatci o kinetičkim izotopnim efektima navedenih reakcija. Dobiveni rezultati doprinose razumijevanju kinetike i mehanizma reakcija fenolnih spojeva i radikala, s čime je povezan jedan dio antioksidativne aktivnosti ovih spojeva.

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

Rad sadrži: 57 stranica, 23 grafičkih prikaza, 16 tablica i 33 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Fenolni spojevi, kvercetin, antioksidans, DPPH, konstanta brzine reakcije, kinetički izotopni efekt, UV-VIS

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

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

Dr. sc. Mirela Matić, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Dr. sc. Viktor Pilepić, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: srpanj 2022.

Basic documentation card

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

Diploma thesis

Kinetic isotope effects in reactions of phenolic acids and DPPH• radicals

Josipa Lalić

SUMMARY

Phenolic compounds are increasingly being researched for their numerous biological effects, among which the antioxidant effect stands out. To monitor the antioxidant potential, the DPPH• free radical scavenging method is often used. In this thesis, the reaction rate constants of phenolic acids: *p*-coumaric acid, ferulic acid, vanillic acid, vanillin and the flavonoid quercetin with DPPH• in dioxane and solvent mixture dioxane-water (0,99:0,01 v/v and 0,95:0,05 v/v) were examined. The kinetic isotopic effects for the mentioned phenolic compounds and DPPH• reaction in the solvent mixture dioxane-water (0,99:0,01 v/v and 0,95:0,05 v/v) were determined. The obtained kinetic isotope effects, for all compounds except vanillin, refer to the reaction mechanism HAT (hydrogen atom transfer) or PCET (proton-coupled electron transfer), which implies that in the rate-determining step of the reaction, both proton and electron transitions occur. In the case of vanillin, an inverse KIE was obtained, which points to a different and more complex reaction mechanism. No data on the kinetic isotope effects for the mentioned reactions were found in the literature. The obtained results contribute to the understanding of the kinetics and mechanism of reactions of phenolic compounds with radicals, with which a part of the antioxidant activity of these compounds is associated.

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

Thesis includes: 57 pages, 23 figures, 16 tables and 33 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Phenolic compounds, quercetin, antioxidant, DPPH, rate constant, kinetic isotope effect, 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
Mirela Matić, Ph.D. Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Viktor Pilepić, Ph.D. Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: July 2022