

Izračun parametara i simulacija EPR spektara dušikovih radikala

Šutalo, Dominik

Master's thesis / Diplomski rad

2024

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:644420>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-13**



Repository / Repozitorij:

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



Dominik Šutalo

**Izračun parametara i simulacija EPR spektara
dušikovih radikala**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2024. godina. .

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Analitička kemija Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za analitičku kemiju pod vodstvom doc. dr. sc. Davora Šakića.

Zahvalio bih se mentoru Davoru Šakiću zbog neiscrpne pomoći i strpljivosti tijekom provođenja ovog diplomskog rada, i svim ljudima koji su mi pomogli tijekom ovog studija i svojim prisustvom učinili studij lakšim.

SADRŽAJ

1. UVOD
 - 1.1. Slobodni radikali u zdravlju i bolesti
 - 1.2. Stabilnost dušikovih radikala
 - 1.3. Elektronska paramagnetska rezonancija
 - 1.3.1. Princip metode
 - 1.3.2. EPR metode u biološkim uzorcima – spinske stupice i spinske probe
2. OBRAZLOŽENJE TEME
3. MATERIJALI I METODE
 - 3.1. Računalni pristup rješavanju kemijskih problema
 - 3.2. Bazni skup
 - 3.3. EPR Računi - kvantno-kemijski programski paket ORCA
 - 3.4. Vizualizacija EPR spektra
4. REZULTATI I RASPRAVA
 - 4.1. Rezultati izračuna EPR parametara
 - 4.2. Simulacija EPR spektara i usporedba s eksperimentalnim EPR spektrima za pojedine radikale
5. ZAKLJUČAK
6. POPIS LITERATURE
7. SAŽETAK/SUMMARY
8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

1. UVOD

1.1. Slobodni radikali u zdravlju i bolesti

Slobodni radikali su molekularne specije koje posjeduju svojstvo nesparenog elektrona u atomskoj orbitali. Zbog prisutnosti nesparenog elektrona u atomskoj orbitali, slobodni radikali dijele neka zajednička svojstva. (Lobo i sur., 2010.) Nesparen elektron u slobodnim radikalima čini ih iznimno reaktivnim, te zbog toga nestabilnima i kratkoživućim specijama. Zbog svoje visoke reaktivnosti, oni mogu uzimati elektrone drugih molekula čime postižu stabilnost. Slobodni radikali, u koje spadaju reaktivne kiskove specije (ROS) i reaktivne dušikove specije (RNS), mogu nastati endogeno (njihov izvor su mitohondriji, peroksisomi, endoplazmatski retikulum i stanice imunskog sustava poput fagocita.) ili iz vanjskih, egzogenih izvora: zagađenje okoliša, alkohola, duhanskog dima, teških metala, industrijskih otapala, pesticida i lijekova. Primjeri ljekovitih djelatnih tvari koje stvaraju slobodne radikale su halotan i paracetamol. (Phaniendra i sur., 2015).

Neki od slobodnih radikala sa značajem za žive organizme su hidroksidni ($\text{OH}\cdot$), superoksidni ($\text{O}_2\cdot^-$), peroksidni radikal ($\text{RO}_2\cdot$) i radikal dušikovog monoksida ($\text{NO}\cdot$) (Aruoma, 1998.) U niskim i umjereno niskim koncentracijama, ROS/RNS imaju pozitivan učinak i uključeni su u različite fiziološke procese. (Phaniendra i sur., 2015).

Jednom kad nastanu, slobodni radikali mogu, kroz različite interakcije, stupiti u reakciju s drugim radikalom ili drugom molekulom. Doseg i selektivnost tih reakcija ovise o koncentraciji radikala, delokalizaciji nesparenog elektrona radikala i odsustvu slabih veza u drugim molekulama u okruženju s kojima bi slobodni radikali mogli reagirati (Aruoma, 1998.). Predloženi su različiti mehanizmi enzimskih reakcija koje su posredovane radikalima. Te reakcije mogu se ugrubo podijeliti u tri tipa; (1.) stvaranje slobodnih radikala nevezanih za supstrat enzimske katalize, (2.) raspad slobodnih radikala stimuliran enzimskom katalizom i (3.) sudjelovanje slobodnih radikala u katalitičkim procesima enzima. (Yamazaki, 1987.).

Superporodica SAM enzima (SAM – S-adenozil-L-metionin) sudjeluje u katalizi različitih reakcija u biokemijskim putevima, poput biosinteze različitih kofaktora enzima, antibiotika i

drugih prirodnih spojeva, sudjeluje i u sintezi i popravku DNA te ima ulogu u bakterijskom metabolizmu. Za tu superporodicu karakterističan je intermedijerni spoj - metabolit kofaktora S-adenozil-L-metionina, iz kojeg reduktivnim cijepanjem nastaje 5'-deoksiadenozil 5'-radikal (5'-dA•), koji je neophodan za funkciju enzima. Taj radikal kasnije inicira uklanjanje vodikovog atoma (H•) iz supstrata enzima. (Booker i sur., 2010.)

Reaktivne dušikove specije (RNS) čine porodicu molekula derivata dušikovog oksida (NO•) proizvedenog putem enzimske aktivnosti inducibilne dušikove oksid sintetaze 2 - NOS2. NOS2 se prvenstveno eksprimira u makrofagima nakon indukcije citokinima i mikrobnim produktima, osobito gama interferonom (IFN- γ) i različitim lipopolisaharidima (LPS).

Dušikovi radikali sudjeluju u raspadu proteina i peptida, u sintezi amina i amida. (Hioe i sur., 2015.) Slobodni radikali nastali u bočnim ograncima aminokiselina nekih enzima relativno su stabilni i imaju važnu ulogu u enzimskoj katalizi. (Yamazaki, 1987.) Radikale stvaraju i nefagocitne izoforme NADPH oksidaze. U toj reakciji slobodni radikali imaju važnu ulogu kao glasnici unutarstanične signalne kaskade. (Pizzino i dr., 2017.)

Dušikov monoksid (NO•) se sintetizira u tkivima pomoću različitih sintetaza dušikovog oksida (NOS, engl. *nitric oxide synthetase*), koje prevode L-citrulin u L-arginin. Dušikov oksid je topljiv u vodi i lipidima, prolazi kroz citoplazmu i plazmatsku membranu. Važan je sekundarni unutarstanični glasnik koji stimulira gvanilat ciklaze, protein kinaze i pomaže u relaksaciji glatkih mišića. Također, ima djelovanje staničnog redoks regulatora. (Phaniendra i sur., 2015.)

Slobodni radikali napadaju strukturno i funkcionalno važne makromolekule i dovode do oštećenja stanica i narušavanja homeostaze. (Lobo i sur., 2010.) Mehanizmi posredovani slobodnim radikalima povezuju se s patologijom nekih bolesti, poput raka, ateroskleroze, malarije, reumatoidnog artritisa i neurodegenerativnih bolesti. (Aruoma, 1998.) Sa starenjem, reakcije posredovane slobodnim radikalima su relativno česte te akumulacija slobodnih radikala dovodi do oksidativnih oštećenja, zbog disbalansa između stvaranja slobodnih radikala i obrambenog učinka antioksidansa (Lobo i sur., 2010.), točnije, između suvišnog stvaranja ROS/RNS specija i deficijencije enzimskih i neenzimskih antioksidansa (Phaniendra i sur., 2015.) Primjerice, suvišak hidroksidnog radikala i peroksinitrita može uzrokovati lipidnu peroksidaciju, čime oštećuje staničnu membranu i lipoproteine. (Pizzino i sur., 2017.)

Među slobodnih radikala su različite makromolekule u tijelu, najčešće lipidi, nukleinske kiseline i proteini. ROS induciraju oštećenje DNA tako što dovode do modifikacije lančane okosnice DNA prilikom loma same lančane okosnice; te zbog unakrsnog povezivanja DNA s proteinima. Radikali sudjeluju u adiciji na dvostruke veze pirimidinskih baza i oduzimanju vodika iz šećerne baze nukleinskih kiselina što rezultira lančanom reakcijom DNA te u konačnici uzrokuje mutagenezu stanice i karcinogenezu. (Lobo i sur., 2010.)

DNA je osjetljiva na lezije nastale oksidacijskim stresom. Najčešća lezija je formiranje 8-okso-2'-deoksigvanozina (8-OHdG), koja uzrokuje mutagenezu i gubitak epigenetske informacije zbog narušavanja procesa metilacije CpG otoka u genima promotorima. Stanice mogu lezije dovesti u red različitim mehanizmima, primjerice, popravkom izrezivanja baza ili antioksidansima. Proteini također mogu biti oštećeni oksidacijskim stresom zbog modifikacija konformacije. Te modifikacije dovode do gubitka ili smanjivanja njihove enzimske aktivnosti. (Pizzino i sur., 2017.)

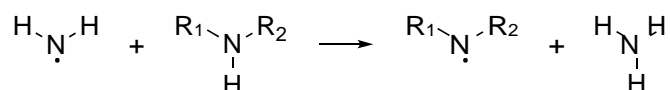
Metabolizam brojnih lijekova dovodi do nastanka intermedijera koji reduciraju molekularni kisik u ROS. Primjeri antineoplastika koji stvaraju slobodne radikale i uzrokuju oksidacijski stres su citotoksični antibiotici (mitomicin C, mitoksantron, aktinomicin), PARP inhibitori (olaparib, rukaparib, veliparib itd.), nitroksidi, kamptotecin i derivati kamptotecina. Reaktivne kisikove specije, transfer elektrona i oksidacijski stres, koji su sastavnice mehanizama brojnih antineoplastika, induciraju apoptozu u stanicama raka. (Fong, 2018.)

1.1. Stabilnost dušikovih radikala

Stabilnost radikala može se opisati koristeći termodinamičke i kinetičke zakonitosti. Termodinamička stabilnost za određeni radikal definirana je entalpijom reakcije izodezmične reakcije prijenosa protona s ispitivanog radikala na referentni radikal koji čini sustav molekula/radikal s istim radikalnim centrom kao i ispitivani radikal. (Zipse, 2007.) Izodezmična reakcija je reakcija, stvarna ili hipotetska, u kojoj su vrste veza koje nastaju stvaranjem produkata iste kao one koje se cijepaju u reaktantima. ("<https://goldbook.iupac.org/>")

Razlikom vrijednosti entalpija za reakcije disocijacije vodikovog atoma s ispitivanog radikala ($R_1R_2NH/R_1R_2N\cdot$) i disocijacije vodikovog atoma s referentnog dušikovog sustava (što je u slučaju dušikovih radikala amonijak/aminil radikal, $NH_3/NH_2\cdot$) dobije se energija stabilizacije veze. Za dušikove radikale, negativna vrijednost disocijacije veze znači da radikal u ispitivanom sustavu postiže veću stabilizaciju u odnosu na aminil radikal. (Zipse, 2006.)

Dušikovi radikali sadrže manjak elektronskog naboja od odgovarajućih ugljikovih analoga. Iz tog razloga, stabilizirajući učinak elektron-donorskih jednostavnih alkilnih grupa je značajniji za dušikove radikale – metilaminil radikal je stabilniji od etil-radikala. Adicija druge alkilne skupine na radikalni centar ima pozitivniji učinak na stabilnost dušikovog radikala nego istovrsnog ugljikovog analoga. (Zipse, 2006.)



Slika 1 - Reakcijska shema u ispitivanju stabilnosti dušikovih radikala- amonijak/aminil radikal su referentni sustavi (Preuzeto i prilagođeno prema Hioe, 2015.)

Osim elektron-donorskih učinaka, na stabilnost radikala ima i hiperkonjugacija. Učinak hiperkonjugacije na stabilizaciju alkilaminil radikala očituje se u interakciji nesporenog spina sa susjednim σ -vezama prisutnih u npr. C-H ili C-C vezama. Taj tip hiperkonjugacije dovodi do srednje jake stabilizacije radikala. U metilaminil radikal, primjerice, do hiperkonjugacije

dolazi zbog interakcije nesporenog elektrona u 2p atomskoj orbitali na dušikovom atomu sa sigma C-H veznim orbitalama na metilnoj skupini. Stabilnost alkilaminil radikala povećava se s brojem alkilnih supstituenata vezanih na atomsko središte radikala. Međutim, doprinos stabilizaciji dodatkom drugog supstituenta je manji u odnosu na doprinos istog supstituenta u monosupstituiranom radikal. Povećavanje duljine supstituenta u adiranoj alkilnoj skupini dovodi do manje učinkovite stabilizacije alkilne skupine. Također, ciklički alkilni supstituenti imaju sličan učinak na stabilizaciju radikala kao i alifatski supstituenti iste veličine. Na primjer, ciklopropilni supstituent ima značajan učinak na stabilizaciju radikala. Međutim, utjecaj veličine cikličkih supstituenata na stabilnost dušikovitih radikala manja je nego njihov utjecaj na stabilnost ugljikovitih radikala. (Hioe i sur., 2015.)

Dodatak karbonilne skupine ima destabilizirajući učinak na radikal, koji se povećava dodatkom druge karbonilne skupine na dušikov radikal. Acilni supstituenti u amidnim sustavima stabiliziraju dušikov radikal hiperkonjugacijom u sustavima s popunjenim orbitalama. Kod sustava s nepopunjenim orbitalama, delokalizacija elektrona dovodi do smanjenja rezonancijskog učinka između karbonilne skupine i dušikovog atoma. Adicija elektron-odvlačećih acilnih skupina na dušikov atom u radikal smanjuje energiju separacije σ i π stanja radikala. Malonimidil, sukcinimidil i glutarilimidil radikali imaju σ temeljno stanje molekulskih orbitala, a za te radikale dušikov nesporeni elektron je lokaliziran u π molekulskoj orbitali. Adicija tiokarbonilnih, etinil, cijano i iminskih supstituenata na dušikov radikal stabilizira radikal. (Hioe i sur., 2015.)

Istovremena adicija elektron-donorskih i elektron-akceptorskih supstituenata uzrokuje jaku stabilizaciju sustava ugljikovitih radikala. Primjerice, stabilizirajući učinak istovremene elektron-donor/elektron-akceptor adicije na dušikov radikal primijećen je kod derivata hidroksamske kiseline, tj. N-hidroksiformamidil radikala. Taj radikal ima dva stanja niske energije – u stanju energetskog minimuma radikal formira π elektronsko stanje s nesporenim elektronom u 2p dušikovoj orbitali okomitoj na molekulsku ravninu. U manje stabilnom stanju N-hidroksiformamidil radikala nesporeni elektron lokaliziran je na karbonilnom kisikovom atomu. (Hioe i sur., 2015.)

Protonirani dušikovi radikali su reaktivniji i selektivniji od svojih neutralnih oblika i zbog toga imaju veću važnost u organskoj sintezi. Zbog veće elektrofilnosti, protonirani radikali adiraju se na alkene i arene te intramolekularnom pregradnjom tvore cikličke amine. Ciklički alkil-

radikali dodatno su stabilizirani u odnosu na neutralne oblike radikala, osim protoniranog aziridin radikala. Protonirani arilaminski radikali značajno su stabilizirani u odnosu na pripadajuće neutralne radikalne oblike. (Hioe i sur., 2015.)

1.2. Elektronska paramagnetska rezonancija

1.2.1. Princip metode

Elektronska paramagnetska rezonancija je spektroskopska tehnika koja opaža i mjeri specije sa nesparenim elektronima. EPR detektira energetske prijelaze nesparenih elektrona u primijenjenom magnetskom polju. Dva energijska stanja elektrona u radikalu, bez primijenjenog vanjskog magnetskog polja su degenerirana, ali primjenom vanjskog magnetskog polja dolazi do raspodjele u stanje više i manje energije, ovisno o orijentaciji spinskog momenta elektrona u odnosu na primijenjeno magnetsko polje. Stanje niže energije odgovara paralelnom usmjerenju spinskog magnetskog momenta u odnosu na smjer vanjskog magnetskog polja. (Carrington, 1963.)

Primjenom mikrovalnog zračenja fiksne frekvencije potrebno je nametnuti i magnetsko polje da bi se ostvario uvjet nužan za rezonantni prijelaz u stanje više energije, kojeg karakterizira antiparalelno usmjerenje spinskog magnetskog momenta i vanjskog magnetskog polja, a taj uvjet je zadan jednadžbom:

$$h\nu = \mu_e g_e B_0$$

gdje je ν rezonantna frekvencija u vanjskom primijenjenom magnetskom polju B_0 , a h je Planckova konstanta. Uvjet je lako postići kontinuiranom promjenom magnetskog polja B_0 . (Pajić, 2002.) Magnetsko polje u okruženju elektrona u radikalu drugačije je od primijenjenog magnetskog polja zbog lokalnog magnetskog polja koje proizlazi iz intrinzičnih strukturnih svojstava molekule. (Atkins i sur., 2014.)

Anizotropija je osobitost nekog sredstva da njegova fizikalna svojstva poprimaju različite vrijednosti za različite smjerove mjerenja. G-faktor je anizotropan čije vrijednosti i magnituda ovise o orijentaciji radikala u odnosu na primijenjeno magnetsko polje. Razlika u Zeemanovim energijama između spinskog stanja niže i više energije nije dovoljno značajna kako bi se uspjela detektirati bez konstruktivne interferencije vanjskog magnetskog polja s drugim, primijenjenim magnetskim poljem, čime je rezultirajuće magnetsko polje promijenjeno.

(Atkins i sur., 2014.)

G-vrijednost je tenzor u interakciji spinskog momenta jezgre (I) i magnetskog momenta nesparenog elektrona. Karakteristične vrijednosti g-tenzora (g_{xx} , g_{yy} , g_{zz}) ovise o orijentaciji osi simetrije paramagnetske molekule ili iona, u odnosu na primijenjeno magnetsko polje. (Che i sur., 1990.)

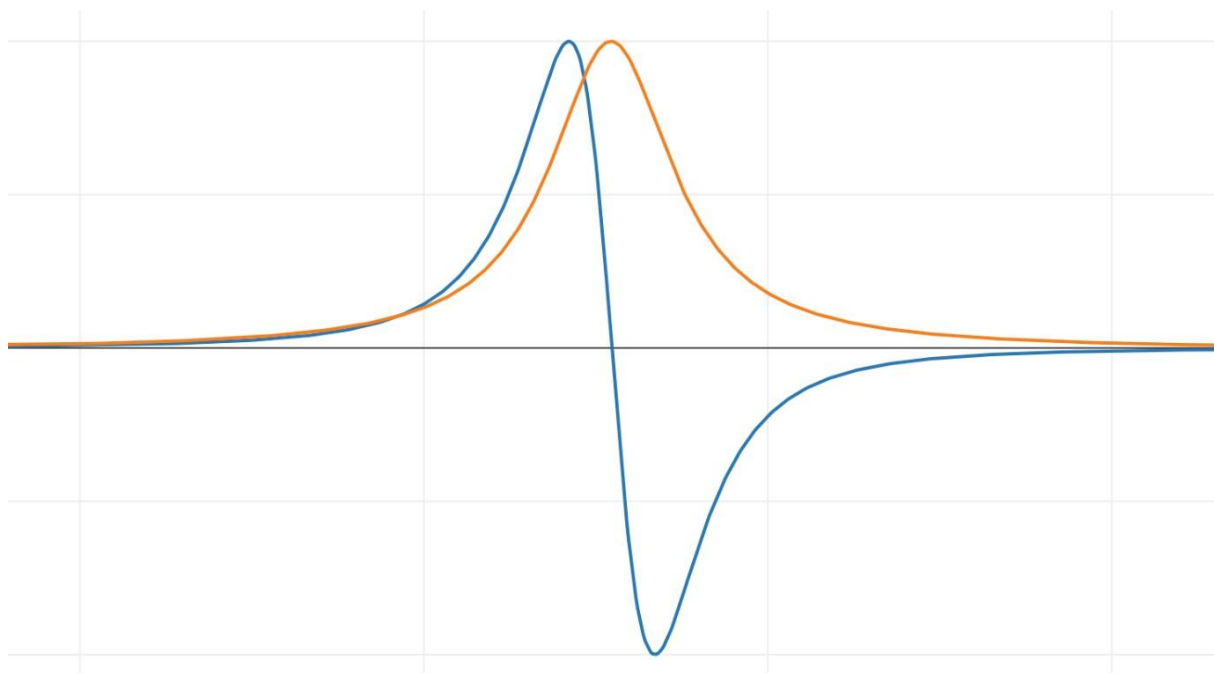
Hiperfina struktura je cijepanje rezonancijskih linija na zasebne dijelove i to za one spektre koji uzimaju u obzir interakcije elektrona s jezgrama u speciji, a koje nisu posljedica točkastog električnog naboja jezgre. Magnetski spinski moment jezgre utječe na nesparene elektrone koji stupaju u interakciju s tom jezgrom, s brojem spektralnih linija koji odgovara formuli $2N(I+1/2)$, pri čemu je N broj jezgri. Za atom vodika, magnetsko polje protona utječe na rezultirajuće magnetsko polje ovisno o orijentaciji protonskog spina. Odnos rezultirajućeg magnetskog polja (B_{loc}) i primijenjenog magnetskog polja (B_0) dan je jednadžbom:

$$B_{loc} = B_0 + am_I$$

Gdje je 'a' hiperfina konstanta sprezanja. Tada spektar daje više linija s pripadnim intenzitetima, čiji je zbroj jednak intenzitetu energije hiperfine interakcije. Razmak takvih spektralnih linija je jednak hiperfinoj konstanti sprezanja sa središtem u vrijednosti g. U slučaju višestrukih jezgara u radikalnoj speciji, svaka pridonosi hiperfinoj strukturi i broj spektralnih linija i njihov intenzitet prate Pascalov trokut. (Atkins i sur., 2014.)

U organskim radikalima, hiperfina struktura nastaje zbog dvije vrste interakcija između nesparenog elektrona i magnetske jezgre: dipol-dipol interakcije i Fermijeve kontaktne interakcije. Dipol-dipol interakcija obrnuto je proporcionalna vrijednosti treće potencije udaljenosti između elektrona i jezgre te ovisi o orijentaciji dvaju spinova. U slučaju kristalnih struktura, ova interakcija se može izravno izmjeriti, ali se ne može izravno izmjeriti u tekućim otopinama zbog brzih promjena orijentacije radikala te se takva dipolna interakcije ne može detektirati. Fermijeva kontaktna interakcija stvara hiperfinu strukturu čija neto vrijednost nije jednaka nuli i do takve interakcije dolazi kad elektronska gustoća nesparenog elektrona u jezgri poprima konačne vrijednosti. Za čiste p , d i f orbitale to nije moguće, zbog čega nespareni elektron mora imati s orbitale. (Carrington, 1963.)

Spektralne EPR linije su krivulje prve derivacije apsorpcije elektromagnetskog zračenja kao funkcije magnetskog polja. (Che i sur., 1990.)



Slika 2 - EPR spektralna linija (žuto) i njena prva derivacija (plavo), simulirano s VisualEPR programom

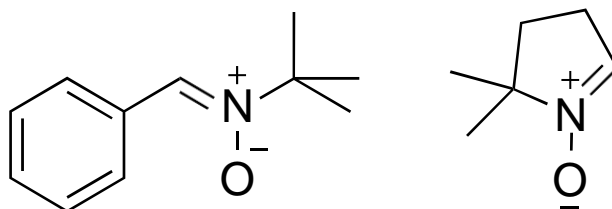
Spektrometar za elektronsku paramagnetsku rezonanciju sastoji se od nekoliko osnovnih komponenti: 1. izvora mikrovalnog EM zračenja, najčešće klistrona, s konstantnom frekvencijom ulaznog elektromagnetskog zračenja, 2. sustava dovoda elektromagnetskog zračenja, koji dovodi mikrovalno zračenje iz izvora do rezonantne šupljine, 3. rezonantne šupljine s reflektirajućim stijenkama, 4. snažnog elektromagneta koji stvara homogeno magnetsko polje vrijednosti 0 - 2 Tesle, 5. detektorske diode koja mjeri energiju apsorpcije, i 5. prikladnog sustava amplificiranja, osciloskopa i detektora (Che i sur., 1990.)

1.3.2. EPR metode u biološkim uzorcima – spinske stupice i spinske probe

U biomedicinskim istaživanjima se istražuju paramagnetski centri prisutni u određenom biološkom sustavu kojeg obično čine ioni prijelaznih elemenata ili slobodni radikali karakteristični za biokemijske reakcije. S obzirom da svakom paramagnetskom centru odgovara specifična vrijednost tenzora g , promjene u apsorpcijskim linijama EPR spektara mogu ukazivati na promjene u aktivnosti biološki značajnih molekula zbog patoloških procesa. (Šentjurc, 1988.)

Na vremenskoj skali EPR eksperimenta nije moguće detektirati kratkoživuće radikale. Zbog toga se koriste spinske stupice. Nestabilni slobodni radikal reagira sa spinskom stupicom pri čemu nastaje stabilni radikal. Uobičajeni način kemijske reakcije spinske stupice s nastalim radikalima u sustavu je putem adicije radikala na spinsku stupicu. (Regović, 2014.) Nastali slobodni radikal je manje reaktivnosti i može postići koncentracije dinamičke ravnoteže koja se lakše detektiraju nego u prvotnom radikal. (Bunce, 1987.)

Postoje dvije glavne skupine spinskih stupica: nitroni i nitrozo spojevi. Prednosti nitrona su stvaranje stabilnih nirtonskih adukata. N-tert-butil- α -fenilnitron (PBN) je prva sintetizirana spinska stupica, ali zbog nedostatka specifičnosti dobivene hiperfine konstante spreznja sintetiziran je i 5,5-dimetil-1-pirolin N-oksid (DMPO), čiji adukti daju specifične vrijednosti za pojedine radikale nastale adicijom na spinsku stupicu. (Regović, 2014.)



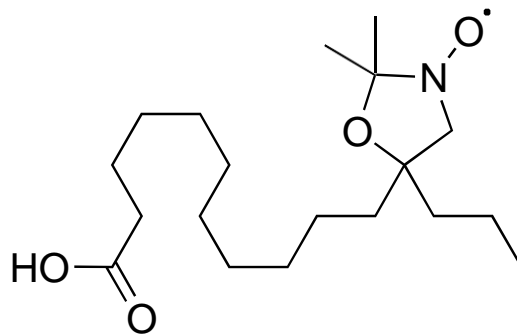
Slika 3 Strukture spinske stupice. Lijevo - struktura N-tert-butil- α -fenilnitrona (PBN), desno – struktura 5,5-dimetil-1-pirolin N-oksid (DMPO)

Dodana radikalna specija udaljena je od nitroksidne skupine što rezultira minimalnim ili zanemarivim dodatnim hiperfinim spreznjem dodane radikalne specije. Stoga, takva identifikacija ovisi isključivo o utjecaju primijenjene spinske stupice na hiperfino spreznje. (Davies, 2016.)

Spinske stupice obično daju širi spektar dugoživućih spinskih adukata i stvaraju spektar ovisan o primijenjenom reaktantu što poboljšava specifičnost radikalne specije. Međutim, glavne mane metode su spora kinetika u reakciji sa superoksidima i sklonost biorazgradnji. (Elajaili i sur., 2019.)

Spinske probe su paramagnetske molekule koje ugrađivanjem u željeni sustav služe za dobivanje podataka o okolini tih proba. Po kemijskoj strukturi, to su nitroksidni radikali u heterocikličkim sustavima s dušikom – piperidin, pirolin ili doksil. Koriste se u ispitivanju membrana. Primjeri spinskih proba su derivati masnih kiselina, kolesterola ili fosfolipida s

ugrađenom nitroksidnom skupinom. Nitroksidi se u biološkim sustavima mogu reducirati u dijamagnetske hidroksilamine koji se ne mogu detektirati EPR-om. U takvim sustavima, patološka stanja se mogu detektirati iz kinetika opadanja intenziteta EPR spektra. Za nitroksidne radikale je karakterističan hiperfina rascjep na tri apsorpcijske linije. (Šentjerc, 1988.). Tako dobiveni EPR spektar karakterističan je za molekulu spinske probe zbog čega nije specifičan za pojedine adukte spinskih probi i ispitivanih molekula. (Elajaili i sur., 2019.)



Slika 4 - spinski označivač – oksazolidin-stearinska kiselina

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Eksperimentalno dobiveni podaci metodom elektronske paramagnetske rezonancije od velikog su značaja u istraživanjima stabilnosti radikala i kemijske sudbine slobodnih organskih radikala u *in vivo* sustavima.

S obzirom da je pomoću EPR parametara moguće pretpostaviti neke od karakteristika organskih radikala, metoda je primjenjiva i na dušikove radikale u istraživanjima u polju biomedicinskih znanosti. Međutim, za dobivanje zadovoljavajućih eksperimentalnih rezultata u istraživanjima dušikovih radikala potrebna je specificirana oprema, financijska ulaganja i vrijeme. Kako bi se navedene prepreke prevladale, javlja se potreba za adekvatnim metodama aproksimacije EPR parametara koristeći metode računalne kemije.

Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi odgovaraju li računalno dobiveni EPR parametri za pojedine dušikove radikale eksperimentalno dobivenim vrijednostima, te izračunane vrijednosti i vizualno usporediti s eksperimentalnim podacima.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Računalni pristup rješavanju kemijskih problema

Termodinamički i kinetički parametri su neophodni za poznavanje bilo kakvog kemijskog sustava. Oba parametra ovise o energiji u samom sustavu (atomu, molekuli), ali i o vanjskim faktorima poput temperature okoliša. Svaka molekula, u svakom stanju, posjeduje diskretnu količinu energije. Različita stanja molekula i njihove energije često prikazujemo multidimenzijalnom plohom potencijalne energije. Ovisno o elektronskoj strukturi i razmještanju jezgara atoma u molekuli, različita stanja poprimaju vlastitu energiju.

Elektronsku energiju kao najvažniju informaciju može se izračunati korištenjem kvantno-kemijskih metoda, numeričkim rješavanjem elektronske Schrödingerove jednadžbe, u skladu s odabranom teorijskom metodom. (Tandarić, 2016.).

Jedan od glavnih ciljeva molekularne kvantne mehanike je pronalazak rješenja vremenski neovisne Schrödingerove jednadžbe kako bi se odredile elektronske strukture atoma i molekula. Valna funkcija elektrona opisana tom jednadžbom omogućuje određivanje velikog broja različitih kemijskih i fizikalnih svojstava te je njeno poznavanje od velike važnosti za računalnu kemiju. S obzirom da je Schrödingerovu jednadžbu nemoguće egzaktno riješiti za sustave s više od jednog elektrona, to jest, atom vodika, kation helija i molekulski kation H_2^+ ; razvijeno je više računalnih pristupa u njezinom rješavanju, a koji polaze od Born-Oppenheimerove aproksimacije Schrödingerove jednadžbe. (Atkins i sur., 2008.)

Ti pristupi mogu se podijeliti na *ab initio*, semi-empirijske metode i DFT metodu (eng. density functional theory). *Ab initio* metode razmatraju vrijednosti temeljnih konstanti i atomski broj jezgara te je njihova točnost prvenstveno ograničena primijenjenim modelom valne funkcije. Međutim, račun dobiven *ab initio* metodom je dugotrajan i zahtjeva resurse, zbog čega su razvijene semi-empirijske metode koje koriste pojednostavljenu verziju hamiltonijanskog operatora. (Atkins i sur., 2008.)

Semi-empirijske metode su brze, ali često daju nepouzdan rezultate. Ove metode koriste eksperimentalno dobivene parametre za procjenu geometrije koja minimizira energiju sustava.

One zanemaruju unutarnje (nevalentne) ione, a točnost izračuna varira jer ovisi o sličnosti računalnog modela i sustava za koji su parametri eksperimentalno dobiveni. (Šakić, 2015.)

Ab initio metode temeljene su na Hartree-Fock (HF) teoriji koja opisuje elektron-elektron odbijanja. Rane *ab initio* - Hartree-Fock metode ne uzimaju u obzir elektronsku korelaciju, dok post-Hartree-Fock *ab initio* metode ne zanemaruju elektronsku korelaciju. *Ab initio* metode su iterativne (ponavljajuće) metode koje podrazumijevaju višestruku primjenu modela spinskih orbitala kako bi se konstruirao Fock operator. Višestruki izračuni se ponavljaju sve dok se ne zadovolji kriterij konvergencije i dok rješenja ne zadovolje uvjet samostalnosti (eng. self-consistence) – metoda je zbog toga poznata kao SCF metoda (eng. self-consistent field). (Atkins i sur., 2008.) U SCF metodi, valna funkcija elektrona se perturbira, dok se ostale funkcije drže fiksnima kako bi se izračunala energija sustava. (Šakić, 2015.)

DFT teorija usporediva je s *ab initio* metodama i temelji se na jednadžbama koje su razvili Kohn i Sham. Prema toj teoriji, energija osnovnog stanja kemijskog sustava izravno ovisi o elektronskoj gustoći u molekulskom sustavu. DFT metode, za razliku od Hartree-Fock metoda, uključuju efekt elektronske korelacije. U DFT metodi koristi se slična iterativna metoda za izračun energije kao i kod SCF metode u *ab initio* metodama. Za razliku od SCF metoda, kod DFT iteracija elektronska gustoća ostaje varijabilna. (Šakić, 2015.)

DFT funkcionali razlikuju se prema opisu funkcionala izmjene, korelacija i udjela Hartree-Fock funkcionala. Najčešće korišteni funkcional u računalnim istraživanjima je B3LYP funkcional. On se sastoji od triju funkcionala: funkcionala izmjene (B), korekcijskog funkcionala (LYP) kojeg su razvili Lee, Yang i Parr te Hartree-Fock funkcionala u elektronskoj izmjeni određenog udjela. (Tandarić, 2016.)

3.2. Bazni skup

Bazni skup je skup vektora u vektorskom prostoru koji se koristi za opisivanje molekulskih orbitala. Za potpuni opis valne funkcije potreban je beskonačan skup baznih funkcija, što je računski neizvedivo. Bazni skup omogućuje opis valne funkcije s konačnim brojem baznih funkcija. Precizniji opis molekulskih orbitala postiže se korištenjem većeg broja baznih funkcija koje opisuju valnu funkciju. Kako bi se procijenile pogreške zbog upotrebe premalih

baznih skupova, najprije se provode izračuni s minimalnim baznim skupom, a zatim se ponavljaju s većim baznim skupom. Usporedbom rezultata dobivenih različitim baznim skupovima može se utvrditi utjecaj pojedinog baznog skupa. Pravilan izbor baznog skupa posebno je važan za opisivanje nabijenih sustava, te se pravilnom varijacijom baznog skupa mogu postići točniji rezultati. (Tandarić, 2016.)

Svaka molekulska orbitala u Hartree-Fock teoriji izražena je kao linearna kombinacija osnovnih funkcija, a koje se određuju iz iterativnog rješavanja Hartree-Fock SCF jednadžbi. Potpuna Hartree-Fock valna funkcija izražava se u obliku Slaterove determinante koja nastaje iz pojedinačnih molekulskih orbitala. Hartree-Fock limit se u apstraktnom smislu postiže korištenjem beskonačnog broja osnovnih skupova, što omogućuje optimalan opis elektronske gustoće. Međutim, u praksi nije moguće koristiti beskonačni bazni skup. Kako bi se to prevladalo, potrebno je identificirati matematičke funkcije koje omogućuju maksimalno približavanje Hartree-Fock limitu uz optimalnu efikasnost. (Cramer, 2004.)

Uz navedene Slaterove orbitale, kao osnovne funkcije za opis atomskih orbitala koriste se i Gaussove orbitale. Zbog zahtjevnosti Slaterovih orbitala, u komputacijama koriste se linearne kombinacije većeg broja pojedinih Gaussovih orbitala koje daju složene osnovne funkcije. Te linearne kombinacije imaju veće slaganje sa Slaterovim orbitalama. Također, prisutne su i polarizacijske i difuzne funkcije. Kao česta kombinacija koriste se skupina Popleovih baznih skupova notirana s 6-31(G) uz koji se koriste dodatne difuzne i/ili polarizacijske funkcije. Primjerice, kod 6-31+G(d) baznog skupa, unutarne orbitale opisane su s jednom osnovnom funkcijom sastavljenom od šest primitivnih Gaussiana, a valentne orbitale opisane su s dvije složene osnovne funkcije. Prva složena osnovna funkcija dobivena je kombinacijom tri primitivna Gaussiana, dok je druga dobivena kombinacijom jednog Gaussiana. Znak „+“ označava primjenu d polarizacijskih funkcija (d primitivnog gaussiana) na sve teške atome. Najfrekventnije korišteni Popleov bazni skup je 6-31G(d). Drugi česti bazni skupovi su 6-311G(d), 6-31G(d,p), 6-31+G(d). (Tandarić, 2016.)

Dunningovi bazni skupovi razvijeni su kako bi se prevladali troškovi i smanjena valentna fleksibilnost baznih skupova atomskih orbitala. (Hashimoto, 1995.). Ti bazni skupovi koriste se za sistemsko poboljšanje izračuna elektronske korelacije unutar metoda valne funkcije uvođenjem i kombiniranjem baznih skupova koji su konzistentni sa samom elektronskom

korelacijom. Primjer takvog baznog skupa je Dunningov Aug-cc-PVTZ-J: to je prošireni, s energijskom korelacijom konzistentan trostruki-zeta bazni skup. To podrazumijeva da sadrži trostruki broj funkcija u odnosu na jednostruk-zeta bazni skup, skup s najmanjim potrebnim brojem funkcija za opis popunjenih atomskih orbitala samostalnog atoma. (Nagy, 2017.)

3.3. EPR Računi - kvantno-kemijski programski paket ORCA

ORCA je kvantno-kemijski programski paket namijenjen za općenitu uporabu s gotovo svim suvremenim metodama opisivanja elektronske strukture u područjima funkcionala gustoće, semi-empirijskim metodama. Program je primjenjiv na veće molekule, komplekse prijelaznih metala i za predviđanje njihovih spektroskopskih svojstava. ORCA koristi sažete bazne funkcije i ima najveću učinkovitost sa segmentiranim i sažetim baznim skupovima u čijim izračunima postiže bolju učinkovitost od drugih komercijalno dostupnih računalnih programa u području kvantne kemije. (Neese i sur., 2012.)

Uz velik broj dostupnih računalnih metoda za izračun spektroskopskih svojstava različitih metoda fizikalne i analitičke kemije, ORCA paket sadrži veliki raspon mogućnosti primjenjivih u Hartree-Fock, DFT metodama; metodama korelacije s jednom referencom i u metodama korelacije s multiplim referencama. ORCA sadrži i semi-empirijske kvantno-kemijske metode i proračun polja sila. (Neese i sur., 2012.)

3.4. – Vizualizacija EPR spektra

Za vizualizaciju spektara iz računski dobivenih podataka korišten je VisualEPR program koji omogućuje interaktivnu vizualizaciju EPR spektara iz ulaznih varijabli korisnika, naknadnu obradu spektra; što uključuje korekciju bazne EPR linije, simulaciju višestrukih radikala u različitim omjerima, zaglađivanje/filtriranje spektralnih linija te mogućnost prikaza integriranih i deriviranih funkcija početnog EPR spektra. (Šakić i sur., 2023.)

4. REZULTATI I RASPRAVA

Procedura provođenja EPR računa pratila je sljedeći protokol:

- 1.) Vizualizacija kemijske strukture radikala iz kartezijevih koordinata pojedinog atoma u radikalu pomoću IQmol softvera za vizualizaciju.
- 2.) Karakterizacija struktura radikala i pripadajućih molekula pomoću ORCA kvantno-kemijskog programskog paketa koristeći funkcionalne B3LYP i BLYP s EPR-III metodom.
- 3.) Ekstrakcija eksperimentalno dobivenih i dostupnih EPR spektara iz *Spectral Database for Organic Compounds, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), Japan*.
- 4.) Interpretacija dobivenih vrijednosti g -faktora i hiperfinih konstanti sprezanja za pojedini radikal.
- 5.) Vizualizacija eksperimentalnih spektara pomoću vrijednosti g -faktora i hiperfinih konstanti sprezanja za pojedini radikal, u VisualEPR programu.
- 6.) Simulacija EPR spektara eksperimentalno dobivenih vrijednosti g -faktora i hiperfinih konstanti sprezanja (iz trećeg koraka) i njihova vizualizacija.

EPR izračun proveden je na radikalnim specijama podijeljenim u šest kategorija ovisno o strukturnim svojstvima supstituenata:

- 1.) Alkilni i cikloalkilni aminil radikali
- 2.) Ciklički i biciklički aminil radikali
- 3.) Dušikovi radikali (de)stabilizirani rezonancijskim učinkom
- 4.) Arilni aminil radikali
- 5.) Dušikovi radikali sa supstituentima koji imaju slobodni elektronski par
- 6.) Dušikovi radikali stabilizirani kaptodativnim učinkom

4.1. Rezultati izračuna EPR parametara

Rezultati izračuna EPR parametara sistematizirani su u sljedećim tablicama za sve kategorije radikala:

Tablica 1. Izračunati EPR parametri i energije disocijacije N-H veze za alkilne i cikloalkilne dušikove radikale (preuzete iz Luo, 2007.)

Radikal	vrijednost g -faktora/ [G]	izotropna hiperfina konstanta cijepanja/ [G]	BDE (kJ/mol)
metilamin	2.0044772	11.38 (N), 33.70 (3H, -CH ₃)	425.1 ± 8.4
etilamin	2.0044232	11.24 (N), 31.5 (2H, -CH ₂ -)	352.3±6.3
dietilamin	2.0043993	12.25 (N), 40.72 (4H, -CH ₂ -)	370.7±8.4
izopropilamin	2.0043675	10.99(N), 47.95 (H, -CH-)	
tert-butil amin	2.0042823	11.08(N)	
ciklopropilamin	2.0043582	10.26(N)	388.3±2.5
ciklobutilamin	2.004025	10.88(N), 20.58(-CH ₂ -)	359.8±5.0
ciklopentilamin	2.004114	17.89 (N)	346.9±5.0
cikloheksilamin	2.0039419	15.94 (N)	366.5±6.3

U radikalu etilamina, značajnije sprezanje EPR signala na vodikovim atomima na sp³ hibridiziranom -CH₃ dijelu radikala računom nije dobiveno, kao ni u sp³ hibridiziranim -CH₃ centrima na oba supstituenta u radikalu dietilamina i u sličnim centrima u molekulama izopropilamina i tert-butil amina. U cikličkim alkilnim dušikovim radikalima, vrijednost hiperfine konstante spreznja dušikove jezgre veća je u odnosu na alifatske radikale i pozitivan rast vrijednosti zabilježen je za radikale s većim brojem ugljikovih atoma, osim u radikalu cikloheksilamina.

Tablica 2. Izračunati EPR parametri i energije disocijacije N-H veze, za cikličke i bicikličke aminil radikale (preuzete iz Luo, 2007.).

Radikal	vrijednost g-faktora/ [G]	izotropna hiperfina konstanta cijepanja/ [G]	BDE (kJ/mol)
aziridin	2.0041898	10.76 (N), 31.40 (4H -C1, C3)	368.2±16.7
azetidin	2.0042139	19.46 (N), 38.48 (4H -C1, C3)	
pirolidin	2.004084	19.76 (N), 41.94 (4H, -C1, C4)	
piperidin	2.0041834	19.39 (N), 16.13 (4H - C1, C5), 2.10 (2H - C3)	
azepan	2.0041898	19.67 (N), 12.48 (2H - C1), 1.66 (2H, - C2), 36.05 (2H, C6),	
9-aza-biciklo[3.3.1]- nonan	2.0044243	19.65 (N)	
6-aza-biciklo[3.1.1]- heptan	2.003999	19.06 (N), 13.20 (2H)	
5-aza- biciklo[2.1.1]heksan	2.0038358	11.70 (N)	
2-aza-biciklo[1.1.1]- pentan	2.0033275	19.14 (N), 6.67 (2H, -CH2-)	
4,4,5,5-tetrametil-2-aza- biciklo[1.1.1]pentan	2.0034566	19.35 (N)	
morfolin	2.0043021	18.93 (N), 16.11 (4H, - C2, C4)	
piperazin	2.0041654	3.08 (N), 14.08 (4H - C1, C4), 3.08 (4H, - C2, C3)	
oksazolidin	2.0039637	19.6 (N)	
haloperidol	2.003946	19.49 (N), 16.11 (4H, -C1, C5), 0.78 (4H, -C2, C3)	
paroksetin	2.004437	19.34 (N), 15.98 (4H, - C1, C5)	

Vrijednosti hiperfine konstante spreznja spreznja dušikovih jezgri, za cikličke i bicikličke radikale, uglavnom poprimaju slične vrijednosti, osim za radikal aziridina, piperazina i bicikličkog sustava 5-aza-biciklo[2.1.1]heksan.

Tablica 3. Izračunati EPR parametri i energije disocijacije N-H veze, 1. za dušikove radikale (de)stabilizirane rezonancijskim učinkom (preuzete iz Luo, 2007.).

Radikal	vrijednost g-faktora/ [G]	izotropna hiperfina konstanta cijepanja/ [G]	BDE (kJ/mol)
formamid	2.0077398	12.61 (N)	+454.0 ± 12.6
acetamid	2.0057972	7.29 (N), 16.45 (3H, - CH3)	+449.8 ± 12.6
urea	2.0049085	15.53 (N)	+464.4 ± 12.6
benzamid	2.003287	13.67 (N)	+452.5 ± 12.6
karbaminska kis	2.0047526	17.20 (N)	
etinamin	2.0049854	11.01 (N)	
etenimin	2.0032929	10.03 (N)	
feniletlenamin	2.0029636	7.42 (N)	
dietenimin	2.0030423	8.35 (N)	
N-formilformidin	2.0032676	21.79 (N)	+383.7 ± 12.6
malonimid	2.0020449	12.85 (N), 13.51 (2H)	
sukcinimid	2.0038942	21.62 (N)	+493.7 ± 12.6
tercbutilamid	2.0030593	14.75 (N), 12.28 (H, - NH)	
cijanamid	2.0059188	9.11 (N), 12.42 (N, - CN)	+404.2 ± 10.9
metilenimin	2.0027003	14.98 (N)	+364 ± 25.0

Tablica 4. Izračunati EPR parametri i energije disocijacije N-H veze, za arilne aminil radikale (preuzete iz Luo, 2007.). (o, m, p označavaju *orto*, *meta* i *para* položaj supstituenata).

Radikal	vrijednost g faktora/ [G]	izotropna hiperfina konstanta cijepanja/ [G]	BDE (kJ/mol)
anilin	2.0034192	12.05 (N), 2.71 (2H, m), 6.47 (2H, o)	385.8
paratoluidin	2.0033916	11.76 (N), 6.24 (2H, o), 2.59 (2H, m), 9.01 (3H, p-CH ₃)	384.9
p-aminobenzonitril	2.0048215	13.50(N), 2.77 (2H, o), 6.13 (2H, m)	398.3
p-(triflorometil)-anilin	2.0034082	12.01 (N), 2.82 (2H, o), 6.46 (2H, m)	403.8
p-fenilendiamin	2.0033468	10.89 (N), 5.70 (2H, o), 1.76 (2H, m)	362.3
dimetil-p-fenildiamin	2.0033506	10.78 (N), 5.55(2H, o), 1.66 (2H, m) 2.12,2.04 (3H, p-N(CH ₃) ₂)	
p-nitroanilin	2.0040153	11.55 (N), 6.33 (2H, o), 2.91 (2H, m)	404.6
difenilamin	2.003291	11.53 (N), 4.07 (4H, o), 2.014 (4H, m), 4.65 (2H, p)	364.8
sulfanilamid	2.0035146	11.90 (N), 6.44 (2H, o), 2.89 (2H, m)	
2,4,6-trinitroanilin	2.0050368	10.94 (N), 2.79 (2H, m)	

Vrijednosti hiperfine konstante sprezanja za vodikove jezgre u *orto*-položaju poprimaju veću vrijednost u odnosu na vodikove jezgre u *meta*-položaju, osim za neke od radikalnih specija-primjeri su cijanidna funkcionalna skupina u radikalu *para*-aminobenzonitrila i trifluorometilna funkcionalna skupina u radikalu *para*-(trifluorometil)-anilina.

U radikalu difenilamina, vodikove jezgre u *orto*- i *para*- položaju imaju veću hiperfinu konstantu sprezanja nego vodikove jezgre u *meta*- položaju.

Tablica 5. Izračunati EPR parametri i energije disocijacije veze za dušikove radikale sa supstituentima sa slobodnim elektronskim parom (preuzete iz Luo, 2007.).

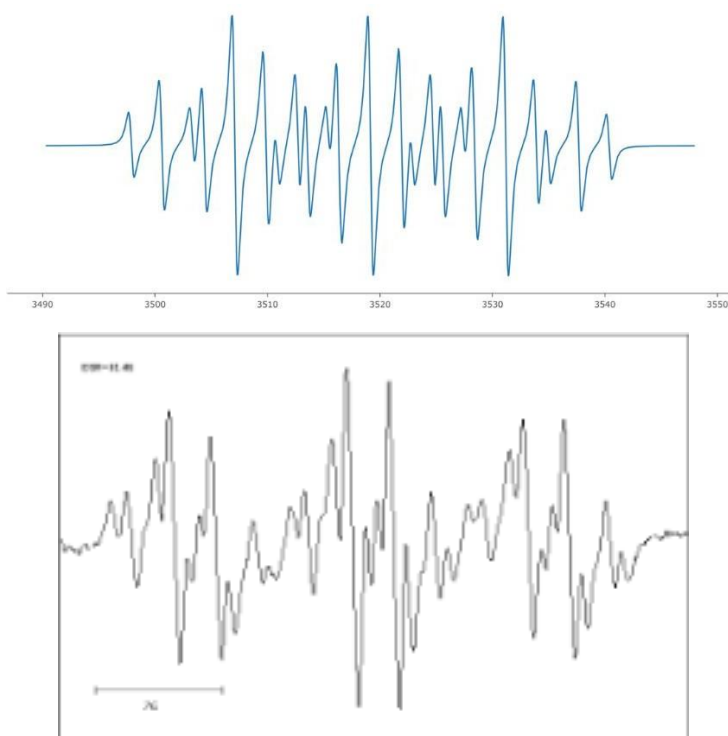
Radikal	vrijednost g faktora/ [G]	izotropna hiperfina konstanta cijepanja/ [G]	BDE (kJ/mol)
fluoramonijak	2.0101649	18.03 (N)	286.6
difluoroamonijak	2.0088509	19.70 (N)	294.6
kloroamid	2.0216585	15.04 (N)	253.1
dikloroaminil	2.0291278	13.46 (N)	
hidroksilamin	2.0076972	16.98 (N)	263.6±8.4
dihidroksilaminil	2.0071923	13.58 (N)	
metoksiaminil	2.0078768	16.34 (N). 4.023 (3H, -CH ₃)	228.4
N,N-dimetoksiaminil	2.007137	17.47 (N), 1.71 (3H, -CH ₃)	
tioaminil	2.0145181	14.10 (N)	
ditioamin	2.0138296	14.20 (N)	
hidrazinil	2.0050093	15.35 (N)	
triazanil	2.0088354	19.45 (N), 4.25 (2N, non.rad.), 34.66 (4H, -NH ₂)	
1,1-dimetilhidrazinil	2.0049716	12.62 (N), 13.82(N. non. rad.), 6.21 (6H, -N(CH ₃) ₂)	410
1,1,3,3-tetrametiltriazanil	2.0097912	13.08 (N, non. rad.), 13.90 (12H, - N(CH ₃) ₂)	

Dušikove jezgre u radikalnim sustavima s više dušikovih atoma, a koje nisu radikalne (notirane s *N.non.rad.*) i jezgre koje tvore radikal, za radikale 1,1-dimetilhidrazinila i 1,1,3,3,-tetrametiltriazanila, imaju slične vrijednosti konstante spreznja

Tablica 6. Izračunati EPR parametri i energije disocijacije N-H veze za dušikove radikale stabilizirane kaptodativnim (push-pull) učinkom (preuzete iz Luo, 2007.).

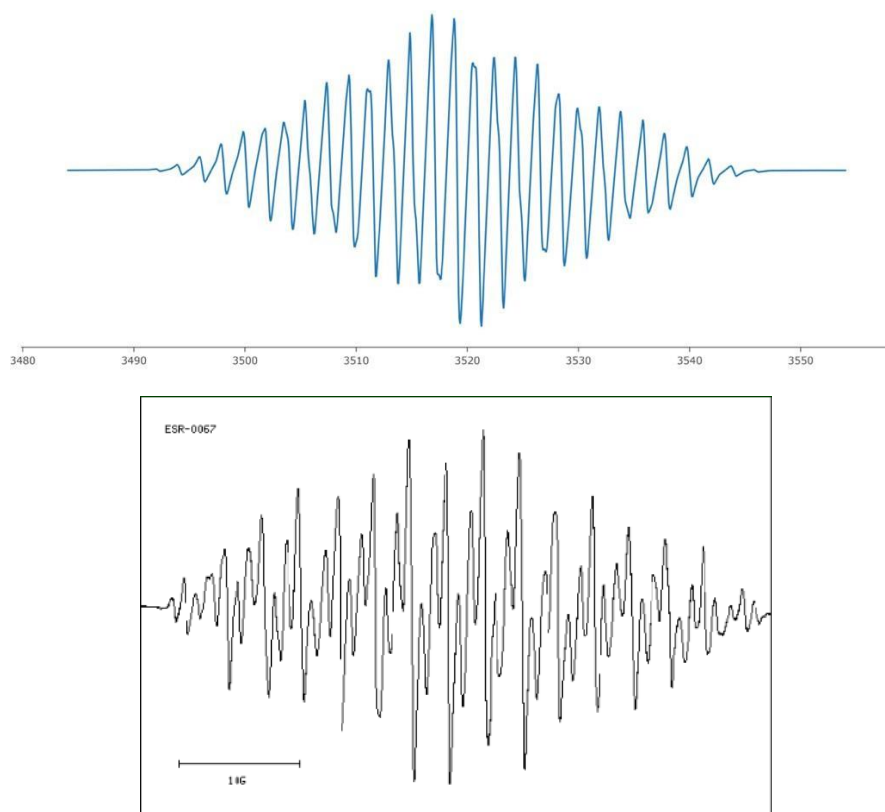
Radikal	vrijednost g/ [G]	izotropna hiperfina konstanta cijepanja/ [G]	BDE (kJ/mol)
N-metilformamid	2.0069009	14.62 (N), 30.53 (3H, -CH ₃)	
N-kloroformamid	2.0144919	12.80 (N)	
N-hidroksiformamid	2.0054696	11.84 (N)	
N-hidroxiacetamid	2.0057124	13.87 (N)	+368.2 ± 12.6
N-hidroksiurea	2.004655	14.26 (N)	340.1 ± 10.0
N-metoksiurea	2.0052756	14.90 (N), 4.35 (3H, -CH ₃)	
N-(trifluorometil)-nitroksid	2.0047077	16.66 (N)	
acetohirazid	2.0039019	8.81 (N), 8.34 (<i>non.rad.</i> N), 2.99 (3H. -CH ₃)	+343.1 ± 12.6
2-piridon	2.0064558	3.57 (N)	410.0 ± 12.6
delta-laktam	2.0042167	20.854 (N), 17.31 (2H. δC), 1.30 (2H, γC)	458.1 ± 12.6
piridin-4-karboksilni hidrazid	2.003925	8.09 (N), 8.42 (N), 8.06 (<i>non.rad.</i> N)	
paracetamol	2.0051347	9.04 (N), 1.43 (2H, m)	
pikrilhidrazin	2.0037229	17.90 (N), 6.38 (N, <i>non. rad.</i>)	334.7 ± 12.6

4.2. Simulacija EPR spektara i usporedba s eksperimentalnim EPR spektrima za pojedine radikale



Slika 5. Simulirani EPR spektar (gore) i eksperimentalni EPR spektar za radikal anilina (dolje) dobiven oksidacijskom katalizom anilina u benzenu kao mediju (preuzeto s sdfs.db.aist.go.jp)

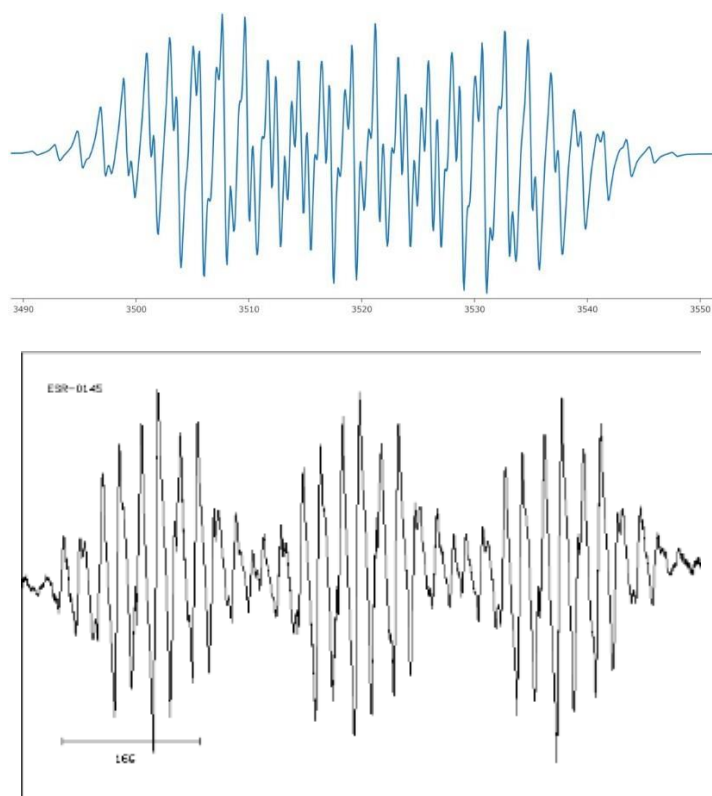
Usporedbom eksperimentalnog spektra anilina u odnosu na simulirani spektar, vidimo vrlo jasno poklapanje glavnih linija. U eksperimentalnom spektru jasno je vidljiva anizotropija, koju simulacija, u sadašnjem trenutku, ne može adekvatno procijeniti. Detaljnom usporedbom, u koju ne ulazimo u ovom radu, točno se može vidjeti za koju jezgru nije dobro pogodena hiperfina konstanta cijepanja, te koji je efekt anizotropije na sam spektar.



Slika 6. Simulirani EPR spektar (gore) i eksperimentalni EPR spektar (dolje) za radikal paratoluidina dobiven oksidacijskom katalizom u dioksanu kao mediju (preuzeto s sdfs.db.aist.go.jp)

U primjeru paratoluidina primjećuje se odstupanje od eksperimentalnog spektra, pri čemu se događa previše poklapanja linija. Vrijednosti hiperfinih cijepanja ovise i o mediju, te bi se trebalo EPR parametre izračunavati korištenjem dodatne simulacije učinka dipolnog momenta otapala na samu molekulu.

U zadnjem primjeru, kod radikala difenilanilina događa se obrnuti slučaj od paratoluidina. Naime, u simuliranom spektru se pojavljuje puno više razlučenih linija, nego u eksperimentalnom spektru. Dok se na eksperimentalnom spektru jasno vide tri distinkte grupacije signala (od dušikove jezgre), u simuliranom spektru po izračunatim konstantama hiperfinog cijepanja, središnji dio nije posebno izražen zbog poklapanja linija.



Slika 7. Simulirani EPR spektar (gore) i eksperimentalni EPR spektar (dolje) za radikal difenilanilina dobiven oksidacijskom katalizom anilina u benzenu kao mediju (preuzeto s sdfs.db.aist.go.jp)

5. ZAKLJUČAK

Za svrhu ovog rada, korištene su metode računalne kemije – ORCA kvantno-kemijski programski paket, zajedno s B3YLP AUG-cc-pvtz-J funkcionalom – kako bi se mogućnosti i specifikacije tog programa iskoristile za dobivanje karakteristični parametri za elektronsku paramagnetsku rezonanciju – vrijednost g -faktora i izotropne hiperfine konstante cijepanja, na velikom broju monosupstituiranih i disupstituiranih dušikovih radikala. Na kraju, za pojedine radikalne specije, dobiveni parametri uspješno su vizualizirani VisualEPR programom za vizualizaciju i dobiveni EPR spektri odgovaraju eksperimentalno dobivenim EPR spektrima. Mogućnosti do sad razvijenih metoda računalne kemije impliciraju upotrebljivost i komplementarnost u drugim poljima kemije, farmacije i znanostima o životu.

6. POPIS LITERATURE

Aruoma OI. Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. *J Am Oil Chem Soc.* 1998, str. 199-212.

Atkins, P., De Paula, J., & Keeler, J. (2017). *Atkins' physical chemistry* (11th ed.). Oxford University Press., str. 487 – 531.

Atkins, P.W. and Friedman, R.S. *Molecular Quantum Mechanics*. OUP Oxford., poglavlje 9 The Calculations of Electronic Structure, 2011., 287. – 380.

Booker SJ, Grove TL. Mechanistic and functional versatility of radical SAM enzymes. *Biol Rep.* 2010.

Bunce, N.J. Introduction to the interpretation of electron spin resonance spectra of organic radicals', *Journal of Chemical Education*, 1987., str. 907.

Carrington, A. Electron-spin resonance spectra of aromatic radicals and radical ions, 1963.

Cramer, C.J. *Essentials of Computational Chemistry: Theories and Models.*, poglavlje 4 Foundations of Molecular Orbital Theory, 2005, str. 105 – 131.

Davies MJ. Detection and characterisation of radicals using electron paramagnetic resonance (EPR) spin trapping and related methods. *Methods.* 2016.

Elajaili HB, Hernandez-Lagunas L, Rangelova K, Dikalov S, Nozik-Grayck E. Use of Electron Paramagnetic Resonance in Biological Samples at Ambient Temperature and 77 K. *J Vis Exp.* 2019

Fong, CW. Free radical anticancer drugs and oxidative stress: ORAC and CellROX-colorectal cancer cells by quantum chemical determinations., 2018.

Hioe, J. *et al.* The stability of nitrogen-centered radicals, *Organic & Biomolecular Chemistry*, str. 157–169., 2015.

Iovine, N.M. *et al.* ‘Reactive Nitrogen Species Contribute to Innate Host Defense against *Campylobacter jejuni*’, *Infection and Immunity*, 2008, 76(3), str. 986–993.

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

Luo, Yu-Ran, *Comprehensive Handbook of Chemical Bond Energies*, 2007.

M. Che, E. Giamello, *Electron Paramagnetic Resonance*, *Studies in Surface Science and Catalysis*, Elsevier, Vol. 57, 1990.

M. Šentjurs, *Magnetske rezonancije u biomedicinskim istraživanjima*, 1988.

Nagy, B. and Jensen, F. *Basis Sets in Quantum Chemistry*. *In Reviews in Computational Chemistry*. 2017.

Neese, F. The ORCA program system. *WIREs Comput Mol Sci*, 2012., str. 73-78.

Pajić, D., *Istraživanje lokalnog magnetskog polja uz površinu kristala jednomolekulskih magneta pomoću elektronske paramagnetske rezonancije*, 2002.

Phaniendra A, Jestadi DB, Periyasamy L. Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian J Clin Biochem.* 2015.

Pizzino G, Irrera N, Cucinotta M, Pallio G, Mannino F, Arcoraci V, Squadrito F, Altavilla D, Bitto A. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxid Med Cell Longev.* 2017.

Regović, M. Mehanizam aromatizacije 4-supstituiranih-1,4-dihidropiridina, 2014.

Šakić, D. Kvantno-kemijsko istraživanje reakcija pregrađivanja odabranih psihofarmaka, doktorska disertacija, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, 2015.

Šakić, D., Zubčić, G., Weitner, T., You, Jiangyang., Chechik, V., Bešić, E., visualEPR: free, online and open-source visualisation and simulation software for fast processing of EPR spectra. *28th Croatian Meeting of Chemists and Chemical Engineers and 6th Symposium Vladimir Prelog*, 2023. str. 123-123.

T. Hashimoto, K. Hirao, H. Tatewaki, Comment on Dunning's correlation-consistent basis sets, *Chemical Physics Letters*, 1995., str. 190-192.

Tandarić T. Mehanizam reakcije kloriranja 5-fluorouracila, doktorska disertacija, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, 2016.

Yamazaki I. Free radical mechanisms in enzyme reactions. *Free Radic Biol Med.* 1987, str. 397-404

Zipse, H. Radical Stability—A Theoretical Perspective. In: Gansäuer, A. (eds) *Radicals in Synthesis I. Topics in Current Chemistry*, vol 263. *Springer, Berlin, Heidelberg.*, 2006.

7. SAŽETAK/SUMMARY

Dušikovi slobodni radikali i reaktivne dušikove specije posjeduju različite funkcije u živim organizmima. Radikalne specije su zbog svojih svojstava kratkoživuće i niske stabilnosti, što zahtjeva primjenu različitih kemijskih metoda u istraživanju i opisivanju funkcije radikala.

U ovom radu, opisana su fundamentalna načela elektronske paramagnetske rezonancije, njene primjene u biološkim ispitivanjima. Također, opisane i primijenjene su metode računalne kemije u svrhu dobivanja parametara karakterističnih za elektronsku paramagnetsku rezonanciju, jednu od esencijalnih metoda u analizi anorganskih i organskih slobodnih radikala.

Dušikovi radikali analizirani u ovom radu podijeljeni su u šest skupina ovisno o prirodi supstituenata na dušikovom radikalnom središtu, s tablično prikazanim EPR vrijednostima za pojedini radikal te vrijednostima energije disocijacije veze.

Odabrani spektri za pojedine radikale vizualizirani su u VisualEPR programu i uspoređeni s eksperimentalno dostupnim EPR spektrima, te se pokazalo znatno slaganje eksperimentalnih spektara sa simuliranim spektrima baziranih na izračunatim parametrima.

Summary:

Nitrogen-centered radicals, as well as reactive nitrogen species play a variety of important roles in living organisms. A short longevity and a low stability, as common features of free radicals prompt the implementation of different methods in chemistry as tools in the research of free radicals.

This paper describes the fundamentals of electron paramagnetic resonance and its application in biological research. Furthermore, the methods of computational chemistry are described and utilized in order to yield the characteristic parameters of electron paramagnetic resonance – one of the essential methods in the analysis of inorganic and organic free radicals.

Nitrogen-centered radicals analyzed in this paper are divided in six groups according to the characteristics of the substituents. The results are presented in six tables with EPR parameters and bond dissociation energies given for each radical.

The calculated spectra were visualized with VisualEPR programme and supplemented with a database comparison to their experimental counterparts for a number of nitrogen-centered free radicals. A good matching between experimental and simulated spectra based on calculated parameters was observed.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu

Diplomski rad

Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Studij: Farmacija

Zavod za analitičku kemiju

A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Izračun parametara i simulacija EPR spektara dušikovih radikala

Dominik Šutalo

SAŽETAK

Dušikovi slobodni radikali i reaktivne dušikove specije posjeduju različite funkcije u živim organizmima. Radikalne specije su zbog svojih svojstava kratkoživuće i niske stabilnosti, što zahtjeva primjenu različitih kemijskih metoda u istraživanju i opisivanju funkcije radikala.

U ovom radu, opisana su fundamentalna načela elektronske paramagnetske rezonancije, njene primjene u biološkim ispitivanjima. Također, opisane i primijenjene su metode računalne kemije u svrhu dobivanja parametara karakterističnih za elektronsku paramagnetsku rezonanciju, jednu od esencijalnih metoda u analizi anorganskih i organskih slobodnih radikala.

Dušikovi radikali analizirani u ovom radu podijeljeni su u šest skupina ovisno o prirodi supstituenata na dušikovom radikalnom središtu, s tablično prikazanim EPR vrijednostima za pojedini radikal te vrijednostima energije disocijacije veze.

Odabrani spektri za pojedine radikale vizualizirani su u VisualEPR programu i uspoređeni s eksperimentalno dostupnim EPR spektrima, te se pokazalo značajno poklapanje između spektara.

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

Rad sadrži: 36 stranica, 7 grafičkih prikaza, 6 tablica i 28 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Slobodni radikali, elektronska paramagnetska rezonancija, kvantna kemija, računalna kemija

Mentor: **doc. dr. sc. Davor Šakić**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **doc. dr. sc. Davor Šakić**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

doc. dr. sc. Erim Bešić, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

prof. dr. sc. Valerije Vrček, *redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: lipanj 2024.

Basic documentation card

University of Zagreb

Diploma thesis

Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Study: Pharmacy

Department of Analytical Chemistry

A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

The calculation and the simulation of EPR parameters for the nitrogen-centered radicals

Dominik Šutalo

SUMMARY

Nitrogen-centered radicals, as well as reactive nitrogen species possess a variety of important roles in living organisms. A short longevity and a low stability, as key features of free radicals prompt the implementation of different methods in chemistry as tools in the research of free radicals.

This paper describes the fundamentals of electron paramagnetic resonance and its application in biological research. Furthermore, the methods of computational chemistry are described and utilized in order to yield the characteristic parameters of electron paramagnetic resonance – one of the essential methods in the analysis of inorganic and organic free radicals.

Nitrogen-centered radicals analyzed in this paper are divided in six groups according to the characteristics of the substituents. The results are presented in six tables with EPR parameters and bond dissociation energies given for each radical.

The calculated spectra were visualized with VisualEPR programme and supplemented with a database comparison to their experimental counterparts for a number of nitrogen-centered free radicals. A good agreement between experimental and simulated spectra were observed.

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

Thesis includes: 36 pages, 7 figures, 6 tables and 28 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Free radicals, electron paramagnetic resonance, quantum chemistry, computational chemistry.

Mentor: **assis. prof. Davor Šakić**, *Ph.D. Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry*

Reviewers: **assis. prof. Davor Šakić**, *Ph.D. Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry*
assis. prof. Erim Bešić, *Ph.D. Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry*
full prof. Valerije Vrčec, *Ph.D. Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry*

The thesis was accepted: June 2024.