

Kinetika i mehanizam reakcije L-askorbinske kiseline i p-benzokinona

Sekelez, Zdeslav

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:163:755232>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-22**



Repository / Repozitorij:

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



Zdeslav Sekelez

**Kinetika i mehanizam reakcije L-askorbinske
kiseline i *p*-benzokinona**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, godina 2024.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Zavodu za fizikalnu kemiju pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Cvijete Jakobušić Brala.

Zahvaljujem se mentorici izv. prof. Cvijeti Jakobušić Brali na strpljenju, pomoći i savjetima prilikom izrade ovog rada.

Hvala Stipi Mustaću, mag. pharm. na pomoći prilikom izrade eksperimentalnog dijela rada.

Posebna zahvala ide mojoj obitelji i prijateljima na bezrezervnoj podršci svih 5 godina mojeg studiranja.

Sadržaj:

1.	UVOD.....	1
1.1.	Kemijska kinetika.....	1
1.1.1.	Brzina kemijske reakcije.....	1
1.1.2.	Određivanje zakona za brzinu reakcije.....	2
1.1.3.	Ovisnost konstante brzine o temperaturi.....	3
1.1.4.	Kinetički izotopni efekt.....	5
1.1.5.	Reakcije spregnutog prijelaza elektrona i protona (PCET).....	7
1.2.	L-askorbinska kiselina.....	9
1.3.	<i>p</i> -Benzokinon.....	12
1.4.	Reakcija <i>p</i> -benzokinona i <i>L</i> -askorbinske kiseline.....	14
2.	OBRAZLOŽENJE TEME.....	15
3.	MATERIJALI I METODE.....	16
3.1.	Kemikalije, instrumenti i laboratorijski pribor.....	16
3.1.1.	Kemikalije.....	16
3.1.2.	Tehnički pribor.....	16
3.2.	Postupak mjerenja konstante brzine reakcije <i>p</i> -benzokinona i <i>L</i> -askorbinske kiseline.....	17
4.	REZULTATI I RASPRAVA.....	21
4.1.	Reakcija <i>L</i> -askorbinske kiseline i <i>p</i> -benzokinona.....	21
4.2.	Konstanta brzine reakcije <i>p</i> -benzokinona i askorbata.....	23
4.3.	Određivanje Arrheniusovih i Eyringovih aktivacijskih parametara.....	28
4.4.	Kinetički izotopni efekt reakcije askorbata i <i>p</i> -benzokinona.....	32
4.5.	Određivanje mehanizma reakcije.....	34
5.	ZAKLJUČAK.....	36
6.	POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA.....	37
7.	LITERATURA.....	38
8.	SAŽETAK / SUMMARY.....	42
8.1.	Sažetak.....	42
8.2.	Summary.....	43

1. UVOD

1.1. Kemijska kinetika

1.1.1. Brzina kemijske reakcije

Kemijska kinetika je područje fizikalne kemije koje proučava brzinu kemijske reakcije te mehanizam kojim se ta reakcija odvija. Brzina kemijske reakcije (v) povezana je s padom koncentracije reaktanata ili porastom koncentracije produkata u vremenu:

$$v = \frac{1}{\nu_R} \frac{d[R]}{dt} = \frac{1}{\nu_P} \frac{d[P]}{dt}$$

Gdje ν_R i ν_P predstavljaju stehiometrijske koeficijente reaktanata i produkata u reakciji. ν_R je negativnog predznaka, a ν_P pozitivnog predznaka. Brzinu reakcije možemo gledati i kao funkciju koncentracija reaktanata:

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

Ova jednadžba zapravo predstavlja osnovni oblik zakona za brzinu reakcije. Većina reakcija prati zakon oblika:

$$v = k_r [A]^a [B]^b \dots$$

Brzina reakcije proporcionalna je koncentraciji reaktanata u reakciji. Koeficijent k_r predstavlja konstantu brzine reakcije, veličinu neovisnu o koncentraciji tvari. Eksponenti predstavljaju red reakcije s obzirom na taj reaktant, a ukupan red reakcije je zbroj svih redova reakcije u odnosu na svaki pojedini reaktant. Red reakcije nije jednak stehiometrijskom koeficijentu, već označava tip ovisnosti koncentracije o vremenu. Svako nepoznatoj reakciji potrebno je odrediti red reakcije i zakon za brzinu reakcije jer nam oni mogu pomoći prilikom otkrivanja mehanizma reakcije. Njih možemo odrediti pomoću metode izolacije i metode početnih brzina (Atkins i de Paula, 2010; Cvitaš, 2011).

1.1.2. Određivanje zakona za brzinu reakcije

Metoda izolacije

Metoda izolacije provodi se tako da se koncentracije svih reaktanata osim jednog drže u velikom suvišku. Zamislimo li reakciju u kojoj su reaktanti A i B, sa zakonom za brzinu reakcije $v = k_r[A]^n[B]^b$, s redom reakcije $n+b$, te je reaktant B u velikom suvišku, koncentracija reaktanta B se neće puno mijenjati tijekom cijele reakcije, odnosno možemo aproksimirati da će biti jednaka njegovoj početnoj koncentraciji $[B]_0$. Stoga se može pojednostaviti izraz za brzinu kemijske reakcije :

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

$$k_{\text{obs}} = k_r[B]_0^b$$

Brzina reakcije tada ovisi samo o koncentraciji reaktanta A. S obzirom da red reakcije s obzirom na reaktant A iznosi n , ukupni red reakcije je isto n . Ovakva reakcija se naziva reakcija pseudo- n -tog reda. Koristeći ovu metodu može se odrediti red reakcije s obzirom na svaki pojedini reaktant te tako zapravo graditi postupno zakon za brzinu određene reakcije (Atkins i de Paula, 2010; Cvitaš 2011).

Metoda početnih brzina

Metoda početnih brzina najčešće se kombinira zajedno s metodom izolacije. Kod ove metode brzina se mjeri na početku reakcije za nekoliko različitih koncentracija izoliranog reaktanta. Zamislimo li reakciju pseudo- n -tog reda, s zakonom za brzinu $v = k_{\text{obs}}[A]^n$, onda je toj reakciji početna brzina v_0 dana izrazom $v_0 = k_{\text{obs}}[A]_0^n$, uzimajući u obzir da je koncentracija reaktanta A na početku reakcije jednaka $[A]_0$. Logaritmiranjem ovog izraza dobiva se izraz:

$$\log v_0 = \log k_{\text{obs}} + n \log [A]_0$$

Dobivena je jednadžba pravca ovisnosti $\log v_0$ o $\log [A]_0$, gdje je nagib pravca red reakcije s obzirom na izolirani reaktant, a odsječak na osi ordinata $\log k_{\text{obs}}$ (Atkins i de Paula, 2010).

1.1.3. Ovisnost konstante brzine o temperaturi

Arrheniusova jednadžba

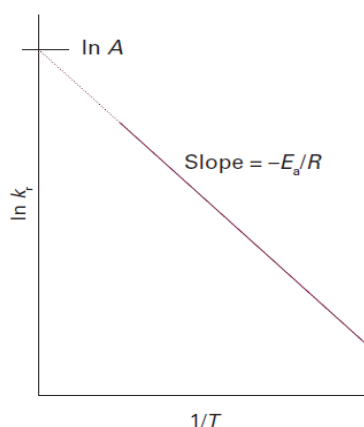
Eksperimentima je pokazano kako se brzina većine reakcija povećava s porastom temperature. Najbolji izraz za ovisnost konstante brzine reakcije o temperaturi postavio je švedski kemičar Svante Arrhenius 1889. godine (Cvitaš, 2011):

$$k_r = Ae^{-E_a/RT}$$

gdje A predstavlja predeksponencijalni faktor koji se može povezati s brojem sudara molekula reaktanata u jedinici vremena. E_a je energija aktivacije, odnosno najmanja kinetička energija koju trebaju imati reaktanti da bi nastalo prijelazno stanje, a posljedično i produkti. Jednadžba sadrži i plinsku konstantu R koja iznosi $8,314 \text{ J K}^{-1}\text{mol}^{-1}$ te temperaturu T . Logaritmirajući po bazi e dobiva se izraz:

$$\ln k_r = \ln A - \frac{E_a}{RT}$$

Prema Arrheniusovoj jednadžbi, može se reći kako su $\ln k_r$ i $\frac{1}{T}$ u linearnom odnosu (slika 1.1.3.1). Iz nagiba pravca može se odrediti energija aktivacije, dok iz osječka na os ordinata predeksponencijalni faktor.



Slika 1.1.3.1 Graf ovisnosti $\ln k_r$ o $1/T$ (u K^{-1}).

Preuzeto iz (Atkins i de Paula, 2010).

Promatrajući graf može se primijetiti kako je ovisnost konstante brzine o temperaturi veća što je strmiji pravac, odnosno što je energija aktivacije veća. Ukoliko energija aktivacije iznosi 0, konstanta brzine je neovisna o temperaturi. U slučajevima reakcija s kompleksnijim mehanizmima može se primijetiti i pad konstante brzine s porastom temperature.

Temperaturna ovisnost konstante brzine nekih reakcija nije linearna te u tim slučajevima energija aktivacije se može definirati pri svakoj temperaturi (Atkins i de Paula, 2010):

$$E_a = RT^2 \left(\frac{d \ln k}{dT} \right)$$

Eyringova jednažba

Ovisnost konstante brzine o temperaturi predstavio je i Henry Eyring, ali preko teorije prijelaznog stanja. Teorija prijelaznog stanja predlaže kako molekule reaktanata prelaze u molekule produkata preko tzv. prijelaznog stanja ili aktiviranog kompleksa te su s njim u ravnoteži. Zamislimo li reakciju s reaktantima A i B, prijelaznim stanjem X te produktom P, mogu se zapisati sljedeće jednažbe:



Sama brzina kemijske reakcije će ovisiti o zadnjem, sporom koraku ove reakcije, ali ovisiti će i o samoj koncentraciji aktiviranog kompleksa X. Koncentracija aktiviranog kompleksa pak će ovisiti o prvom koraku reakcije, odnosno o konstanti ravnoteže K^\ddagger , a konstanta ravnoteže je povezana s Gibbsovom aktivacijskom energijom:

$$K^\ddagger = e^{-\Delta G^\ddagger/RT}$$

Iz ovih jednažbi proizlazi da je konstanta brzine kemijske reakcije zapravo povezana s Gibbsovom aktivacijskom energijom ΔG^\ddagger :

$$k_r = \frac{k_b T}{h} e^{\frac{-\Delta G^\ddagger}{RT}}$$

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

$$k_r = \frac{k_b T}{h} e^{\frac{-\Delta H^\ddagger}{RT}} e^{\frac{\Delta S^\ddagger}{R}}$$

Logaritmirajući potonju jednadžbu po bazi e i dijeleći s temperaturom T dobiva se:

$$\ln\left(\frac{k_r}{T}\right) = \frac{\Delta S^\ddagger}{R} + \ln\left(\frac{k_b}{h}\right) - \frac{\Delta H^\ddagger}{RT},$$

odnosno jednadžba pravca ovisnosti $\ln(k_r/T)$ o $1/T$. Nagib pravca predstavlja $\frac{-\Delta H^\ddagger}{R}$, a odsječak na osi ordinata $\frac{\Delta S^\ddagger}{R} + \ln\left(\frac{k_b}{h}\right)$. k_b predstavlja Boltzmanovu konstantu ($1,38066 \cdot 10^{-23}$ J/K), a h Planckovu konstantu ($6,62608 \cdot 10^{-34}$ J s). Iz Eyringove jednadžbe moguće je odrediti termodinamičke parametre: aktivacijsku entalpiju (ΔH^\ddagger) i aktivacijsku entropiju (ΔS^\ddagger) (Cvitaš, 2011).

1.1.4. Kinetički izotopni efekt

Kinetički izotopni efekt (KIE) jest promjena brzine kemijske reakcije uslijed zamjene jednog atoma u molekuli reaktanta njegovim izotopom. Najčešće je istraživana izotopna zamjena lakog vodika (^1H) s teškim vodikom ili deuterijem (^2D) makar su moguće i druge izotopne zamjene kao npr. $^1\text{H}/^3\text{T}$, $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}/^{14}\text{C}$, $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$...

Prilikom izotopne zamjene ne dolazi do promjene elektronske strukture molekule, već se mijenjaju samo svojstva povezana s masom atoma. Prvenstveno se mijenja frekvencija vibracijskog gibanja (ν):

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

k - konstanta sile veze

μ - reducirana masa ($\mu = \frac{m_1 m_2}{m_1 + m_2}$)

Ako je $m_2 \gg m_1$, jednadžbu možemo pojednostavniti:

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{m_1}}$$

Vibracijska energija je kvantizirana te ovisi o frekvenciji vibracije:

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

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

Gotovo sve molekule se pri sobnoj temperaturi nalaze u osnovnom vibracijskom stanju ($v=0$), tj. imaju nultu vibracijsku energiju E_0 (*eng.* zero point energy – ZPE):

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

E_0 obrnuto je proporcionalna s masom izotopa. Iz toga proizlazi da je ZPE molekule s težim izotopom manja od ZPE molekule s lakšim izotopom. Takva razlika u E_0 može dovesti do pojave kinetičkog izotopnog efekta (Isaacs, 1995).

Uzimanjem u obzir da se izvodi zamjena vodika njegovim težim izotopom deuterijem, KIE se izražava kao omjer konstanti brzini reakcija:

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

Ovisno o dobivenim vrijednostima može se govoriti o normalnom ($\text{KIE} > 1$) ili inverznom ($\text{KIE} < 1$) kinetičkom izotopnom efektu. Kinetički izotopni efekti općenito se mogu podijeliti na primarne, sekundarne i KIE otapala. Primarni KIE javlja se kada dolazi do pucanja veze na kojoj je došlo do izotopne zamjene, a sekundarni KIE ukoliko se pucanje dogodilo u blizini mjesta izotopne zamjene. Sekundarni KIE proizlazi iz promjene u hibridizaciji ili hiperkonjugacije te se mogu definirati α - i β - sekundarni KIE ovisno o položaju izotopa naspram atoma na kojem se događa promjena. Do pojave KIE otapala dolazi ukoliko se zamijeni otapalo izotopno izmijenjenim otapalom (npr. zamjena H_2O s D_2O) te je posebno izražen kada je otapalo uključeno u sami mehanizam reakcije (Anslyn i Dougherty, 2006).

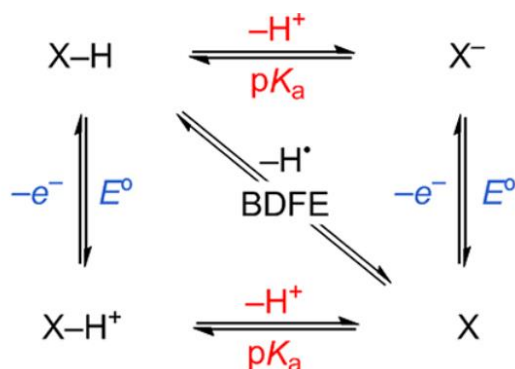
1.1.5. Reakcije spregnutog prijelaza elektrona i protona (PCET)

Reakcije spregnutog prijelaza protona i elektrona (*eng.* Proton-Coupled electron Transfer, PCET) obuhvaćaju širok spektar reakcija koje uključuju transfer protona i elektrona (Darcy i sur., 2018). Dakle, uključuju bilo kakve redoks reakcije gdje dolazi do prijelaza elektrona i protona sa 1 ili više reaktanata, usklađenim ili stupnjevitim mehanizmom. U prijašnjim istraživanjima PCET se okarakterizirao specifično kao prijelaz protona i elektrona u jednom usklađenom koraku, no kako je dobio drugačije mehanističko značenje, formiran je novi termin – usklađeni proton-elektron transfer (*eng.* concerted proton-electron transfer, CPET) (Warren i sur., 2010). Usklađeni mehanizam uključuje i prijelaz atoma vodika (*eng.* Hydrogen Atom Transfer, HAT) u kojem se elektron i proton prenose kao cjelina (vodikov atom), a ne kao dvije odvojene čestice. HAT i CPET se mogu diferencirati metodama računalne kemije (Hammes-Schiffer i Soudackov, 2008).

Proton i elektron transfer može se odviti i stupnjevitim mehanizmom, gdje prvotno dolazi do prijelaza elektrona (ET/PT) ili prvotno dolazi do prijelaza protona (PT/ET) (Warren i sur., 2010). Mehanizam kojim će se odvijati prijelaz protona i elektrona moguće je odrediti uz pomoć termokemijske analize.

Termokemijska analiza PCET reakcija

Za bolje razumijevanje reakcije, potrebno je znati termodinamiku svakog mogućeg reakcijskog mehanizma kojim se taj reakcija može odviti. Kao što je već rečeno, reakcije prijelaza protona i elektrona se mogu dogoditi u jednom ili dva reakcijska koraka.



Slika 1.1.5.1. Kvadratna shema za reakciju homolitičkog cijepanja X-H veze. Preuzeto i prilagođeno iz (Darcy i sur., 2018). BDFE predstavlja slobodnu energiju homolitičkog cijepanja veze (*eng.* Bond Dissociation Free Energy) te se često koristi prilikom opisivanja PCET reakcija.

Standardnu reakcijsku Gibbsovu energiju svakog od koraka prikazanog na kvadratnoj shemi moguće je odrediti uz pomoć dviju fizikalnih veličina: standardnog elektronskog potencijala (E°) i konstante disocijacije kiseline (pK_a):

$$\Delta G^\circ(\text{PT}) = 2,303RTpK_a$$

$$\Delta G^\circ(\text{ET}) = -nFE^\circ$$

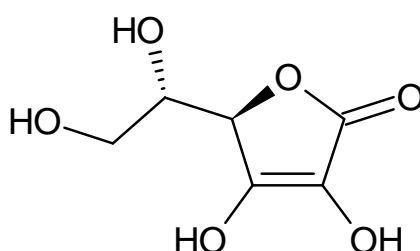
Standardna reakcijska Gibbsova energija za usklađeni prijelaz protona i elektrona (CPET) računa se kao suma standardnih reakcijskih Gibbsovih energija svih koraka na koje se ta reakcija može podijeliti (Mayer, 2004):

$$\begin{aligned} \Delta G^\circ(H^+, e^-) &= 2,303RTpK_a(X-H, X^-) + FE^\circ(X^-, X) \\ &= FE^\circ(X-H, X-H^+) + 2,303pK_a(X-H^+, X) \end{aligned}$$

Da bi se utvrdilo radi li se o usklađenom ili stupnjevitom prijelazu, potrebno je usporediti ΔG° s eksperimentalno određenom ΔG^\ddagger , uz pretpostavku da je uvijek $\Delta G^\ddagger \geq \Delta G^\circ$. Ukoliko je ΔG^\ddagger manja od ΔG° moguće je isključiti određeni prijelaz (Mayer i Rhile, 2004).

1.2. L-askorbinska kiselina

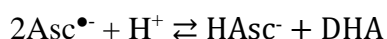
L-askorbinska kiselina, poznatija kao vitamin C, otkrivena je 1920-ih od strane mađarskog znanstvenika A. Szent Györgyia. Molekula je jakih antioksidativnih svojstava zbog svoje specifične strukture (slika 1.2.1). Radi se o planarnom γ – laktonskom prstenu s kiralnim postraničnim lancem vezanim na C4 atomu te endiolnom skupinom u blizini karbonilne skupine. Postoje također i drugi epimeri kao što su D-askorbinska kiselina i D-araboaskorbinska kiselina, međutim L-askorbinska kiselina je komercijalno korištena (Kaur i Nayyar, 2014; Buettner i Jurkiewicz, 1996).



Slika 1.2.1. L-askorbinska kiselina (nacrtano pomoću programa ChemSketch)

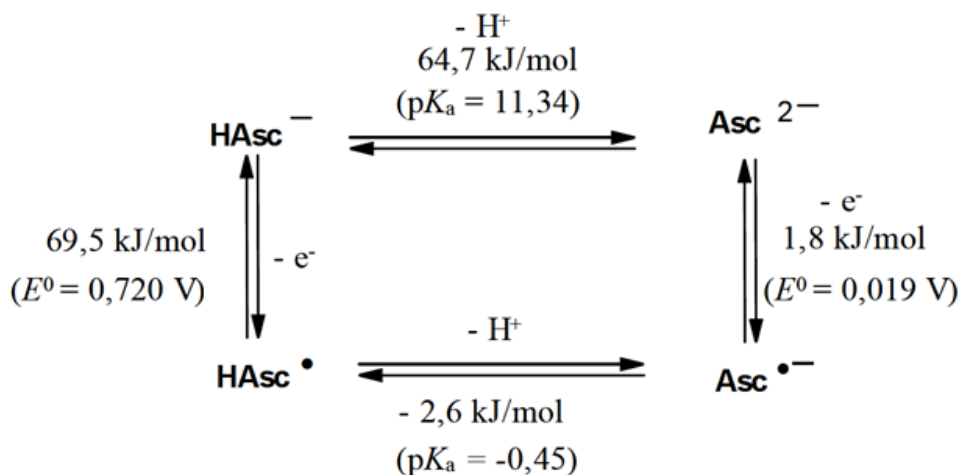
Askorbinska kiselina je dvoprotonska kiselina. Disocijacijom 1 protona s 3-OH hidroksilne ($pK_a = 4,25$) skupine nastaje askorbatni monoanion, askorbat (HAsc^-). Konjugirajuća struktura molekule daje askorbatu specifična kemijska svojstva. U drugom disocijacijskom koraku s 2-OH skupine ($pK_a=11,34$) nastaje askorbatni dianion (Asc^{2-}). L-askorbinska kiselina ima apsorpcijski maksimum na 242 nm ($\epsilon_{\text{max}} \sim 10800 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ cm}^{-1}$), a askorbat na 265 nm ($\epsilon_{\text{max}} \sim 14500 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ cm}^{-1}$) u vodi (Buettner i Jurkiewicz, 1996).

Askorbat je zbog svojih sjajnih reducirajućih svojstava dosta istražen. Pri fiziološkom pH je najzastupljeniji oblik askorbinske kiseline. Oksidacija askorbata odvija se u 2 oksidacijska stupnja:



U prvom oksidacijskom stupnju nastaje askorbil radikal ($\text{Asc}^{\bullet-}$) stabilan π -radikal s delokaliziranim nesparenim elektronom preko visoko konjugiranog trikarbonilnog sustava, dok

u drugom stupnju nastaje dehidroaskorbinska kiselina (DHA) (Buettner i Jurkiewicz, 1996). HAsc⁻ se dugo vremena smatrao jedno-elektronskim reducensom, ali redoks reakcije HAsc⁻ gotovo uvijek uključuju gubitak i elektrona i protona, stoga je zapravo PCET reducens (Warren i Mayer, 2010). Termokemijska analiza HAsc⁻ može se prikazati preko kvadratne sheme:



Slika 1.2.2. Termokemijska analiza L-askorbata u vodi. Preuzeto i prilagođeno iz (Jakobušić Brala, 2011).

Zabilježen je velik broj reakcija askorbata koje se odvijaju PCET mehanizmom: reakcija s TEMPO[•] (2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-oksil) radikalom, citokromom *b*₅₆₁, α-tokoferil radikalom, nizom kinona, glutation peroksidazom i mnogim drugima (Sajenko i sur., 2010; Zhu i sur., 2011).

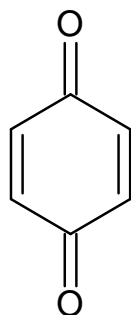
Biološka uloga

Vitamin C je jako zastupljen u voću i povrću te njihovim sokovima. Esencijalni je nutrijent kojeg čovjek mora redovito unositi u organizam zbog nedostatka enzima L-gulonolakton oksidaze koji sudjeluje u završnom stupnju sinteze. Sudjeluje u raznim fiziološkim reakcijama, primjerice nužan je kofaktor enzimima prolil i lizil hidrosilazama prilikom sinteze kolagena. Sudjeluje i u sintezi hormona jer je potreban enzimima dopamin- β -hidrosilazi i peptidil-glicin α -amidirajućoj monooksigenazi (Davies i sur, 1991; Dosedel i sur, 2021). Jedna od njegovih najčešćih terapijskih primjena je kombiniranje s pripravcima željezovih(III) soli u terapiji anemije. Askorbinska kiselina u tom slučaju kao antioksidans reducira Fe^{3+} u Fe^{2+} , oblik željeza koje ima veću bioraspoloživost. Askorbat ne-enzimatskom redukcijom uklanja velik broj slobodnih radikala: superoksid ($O_2^{\bullet-}$), hidroksil (HO^{\bullet}), alkoksil (RO^{\bullet}), peroksil (ROO^{\bullet}) i mnoge druge (Njus i sur., 2020). Vitamin C se koristi i u kozmetici jer ublažava fotostarenje kože smanjenjem oksidativnog stresa uzrokovanog unutarnjim i vanjskim čimbenicima te promicanjem ekspresije gena kolagena (Boo, 2022). Nalazi se u raznim pripravcima za jačanje imuniteta, a još se istražuje i njegova primjena u terapiji tumora i kardiovaskularnih bolesti te u prevenciji prehlade i drugih virusnih bolesti (Dosedel i sur., 2021).

1.3. *p*-Benzokinon

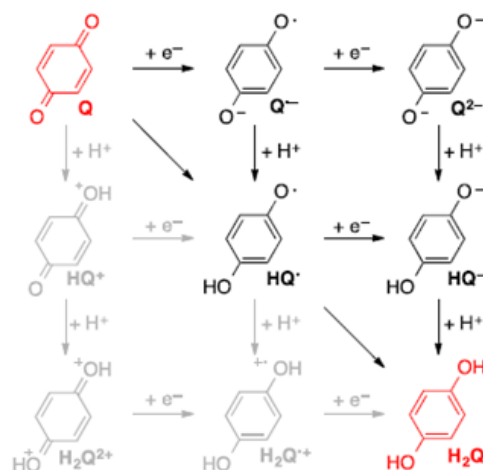
Kinoni su ubikvitarni biološki pigmenti pronađeni u raznim živim organizmima (bakterije, gljive, više biljke te neke životinje). Postoje u prirodi u mnogim oblicima kao što su: benzokinoni, naftokinoni, antrakinoni i policiklički kinoni. Sudjeluju u biološkim procesima kao nosači elektrona u procesima lanca transporta elektrona (koenzim Q10-derivat benzokinona) i fotosinteze. Također, vitamini K su derivati naftokinona (Devi i Mehendale, 2014; El-Najjar i sur., 2011). Nastaju prilikom oksidacije polifenola u voću i povrću, zatim kao jaki elektrofilni stupaju s nukleofilima u reakcije što posljedično dovodi do opadanja kvalitete, gubljenja arome i gnjiljenja namirnice (Geng i sur., 2023). Toksične su molekule te se koriste kao antitumorski lijekovi (npr. derivat benzokinona-mitomycin C; antraciklini), antibiotici, antimalarici i fungicidi (O'Brien, 1991).

1,4-Benzokinon (slika 1.3.1), poznatiji kao *p*-benzokinon, je diketon konjugiran na benzenski prsten. Tvar je žućkaste boje i iritirajućeg mirisa te je teško topljiv u vodi. *p*-Benzokinon, kao i ostali kinoni, može stupati u oksido-redukcijske reakcije te može podvrgnuti nukleofilnom napadu zbog svoje elektrofilne strukture (Devi i Mehendale, 2014; El-Najjar i sur., 2011).



Slika 1.3.1. *p*-Benzokinon (nacrtano pomoću programa ChemSketch)

U oksido-redukcijskim reakcija može doći do $1e^-$ i $2e^-$ redukcije pri čemu nastaju semikinon radikal (*p*-BQ \bullet), odnosno hidrokinon (*p*-H $_2$ Q). Može doći do ET, CPET i HAT prijelaza (shema 1.3.1.). Kemija *p*-benzokinona uvelike je određena njegovim standardnim redukcijskim potencijalom E^0 te dosta pridonosi njegovom toksikološkom i terapijskom značenju.



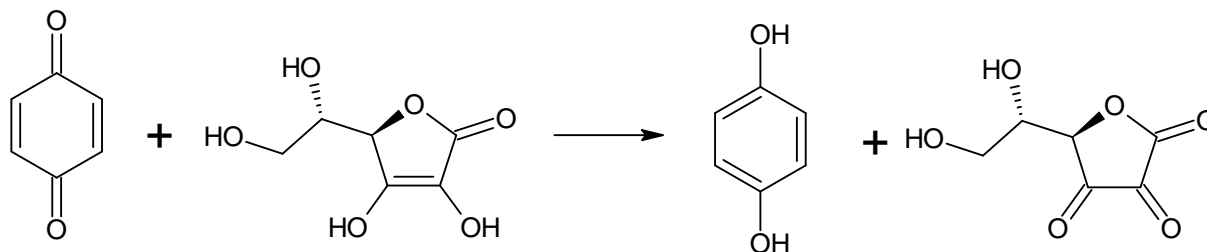
Shema 1.3.1. PCET reakcije *p*-benzokinona. Preuzeto i prilagođeno iz (Huynh i sur., 2016).

Standardni redukcijski potencijali $1e^-$ i $2e^-$ redukcije kinona predmet su velikog broja istraživanja, međutim velik dio vrijednosti E^0 nisu određene pod jedinstvenim skupom uvjeta (Huynh i sur., 2016). Što se tiče *p*-benzokinona određen je E^0 (*p*-BQ/*p*-H₂Q) te iznosi otprilike 0,7V (El-Najjar i sur., 2011), dok E^0 (*p*-BQ/*p*-BQ[•]) još nije jednoznačno određen, premda jedna od predloženih vrijednosti je 0,078 V (Wardman, 1989).

Jedan od glavnih mehanizama citotoksičnosti *p*-benzokinona jest tzv. redoks cikliranje. *p*-BQ[•] može reagirati s molekulskim O₂ te se pritom vraća u oksidirani oblik (*p*-BQ), a posljedično se generiraju i slobodni radikali (O₂[•], HO[•]) (Roginsky i sur., 1999). Redoks cikliranje jedan je od temelja primjene kinona u anti-tumorskoj terapiji, stoga se razmatra dizajniranje bioreduktivnih kemoterapeutika koji sadrže reduktaze / reducense i kinone (El-Najjar i sur., 2011; Li i sur., 2012).

1.4. Reakcija *p*-benzokinona i L-askorbinske kiseline

p-Benzokinon i L-askorbinska kiselina stupaju u redoks reakciju prilikom koje nastaju hidrokinon (*p*-H₂Q) i dehidroaskorbinska kiselina (DHA) (Isaacs i Eldik, 1997). Neki od predloženih mehanizama su ET/PT (Isaacs i Eldik, 1997), ali i HAT mehanizam (Görner, 2004).



Slika 1.4.1. Reakcija *p*-benzokinona i L-askorbinske kiseline. Strukture su nacrtane pomoću programa ChemSketch.

U reakciji kao intermedijer nastaje semikinon radikal (*p*-BQ[•]) koji se može u prisustvu atmosferskog O₂ oksidirati natrag do *p*-benzokinona (tzv. redoks cikliranje) pri čemu se generiraju slobodni radikali (O₂[•], HO[•]), što je jedan od mehanizama citotoksičnosti *p*-benzokinona. Stoga se kombinacija askorbinske kiseline i kinona generalno razmatra kao moguća anti-tumorska terapija, gdje bi askorbinska kiselina reducirala kinon do semikinona, tj. djelovala bi kao promotor redoks cikliranja, a posljedično i stvaranja slobodnih radikala (Li i sur., 2012; Roginsky i sur., 1999).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

L-askorbinska kiselina je široko korišten antioksidans. Često se koristi prilikom liječenja prehlade ili gripe te je poznata njena primjena u anti-age kozmetici. Izuzev svoje terapijske i kozmetičke primjene, moguća je i njena primjena u oksido-redukcijskim organskim reakcijama. Jedna od takvih primjena je redukcija *p*-benzokinona. *p*-Benzokinon je žućkasti pigment čiji derivati sudjeluju u procesima fotosinteze i staničnog disanja. Svoju primjenu su pronašli i u antitumorskoj terapiji – npr. mitomicin C. Kombinacija L-askorbinske kiseline i *p*-benzokinona (kao i drugih kinona) razmatra se kao potencijalna antitumorska terapija, gdje bi L-askorbinska kiselina djelovala kao promotor redoks cikliranja *p*-benzokinona te bi se posljedično generirali slobodni radikali ($O_2^{\bullet-}$, HO^{\bullet}). Slobodni radikali bi zatim djelovali citotoksično na tumorske stanice.

Cilj ovog rada je ispitati kinetiku i mehanizam *L*-askorbinske kiseline i *p*-benzokinona u vodi. Određena je konstanta brzine reakcije pri 25°C. Uz to su određeni i aktivacijski parametri: energija aktivacije (E_a), predeksponencijalni faktor (A), aktivacijska entalpija (ΔH^\ddagger), aktivacijska entropija (ΔS^\ddagger) i Gibbsova aktivacijska energija pri 25°C (ΔG^\ddagger). Određen je i kinetički izotopni efekt (KIE) mjerenjem konstante brzine u H_2O i D_2O . U konačnici je napravljena termokemijska analiza reakcije. Ovakve spoznaje pomažu prilikom razumijevanja mehanizma reakcije *L*-askorbinske kiseline i *p*-benzokinona, ali i dodatno pomažu u budućim istraživanjima koja uključuju ove molekule.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Kemikalije, instrumenti i laboratorijski pribor

3.1.1. Kemikalije

- *p*-benzokinon (Sigma Aldrich)
- L-askorbinska kiselina (Sigma Aldrich)
- Na₂EDTA x 2H₂O (Sigma Aldrich)
- redestilirana voda, H₂O
- teška voda, D₂O (Sigma Aldrich, redestilirana, pH=6,328)

3.1.2. Tehnički pribor

- staklene odmjerne tikvice od 5, 10 i 25 mL
- automatske pipete Eppendorf (10, 100, 200 i 1000 µL), uz odgovarajuće plastične Eppendorf nastavke
- DH-2000 UV-VIS-NIR Lightsource, Ocean Optics
- termostatirani nosač za kivete Q-pod, Quantum Northwest TC 125 Temperature Control ($\pm T < 0,1^{\circ}\text{C}$)
- HP G1103A 8453 UV-VIS spektrofotometar, Agilent Technologies
- kvarcne kivete QS 10,0 mm Helma
- vaga Mettler Toledo ($P_{\text{max}}=220\text{g}$; $d=0,01\text{mg}$)
- Avantes Starline AvaSpec-2048L detektor
- Koolance EXT-440 Liquid Cooling System
- Sustav za pripremu redestilirane vode

3.2. Postupak mjerenja konstante brzine reakcije *p*-benzokinona i L-askorbinske kiseline

Mjerenje konstante brzine reakcije *p*-benzokinona i L-askorbinske kiseline zasniva se na praćenju smanjenja apsorbancije *p*-benzokinona u reakcijskoj otopini tijekom reakcije. Mjerenja su provedena u uvjetima pseudo-prvog reda koji su ostvareni tako što je koncentracija askorbinske kiseline u reakcijskoj otopini bila značajno veća (do 10 puta) od koncentracije *p*-benzokinona. Shodno ovim reakcijskim uvjetima može se pojednostavniti zakon za brzinu reakcije (Isaacs i Eldik, 1997; Seelert i Schenck, 1966):

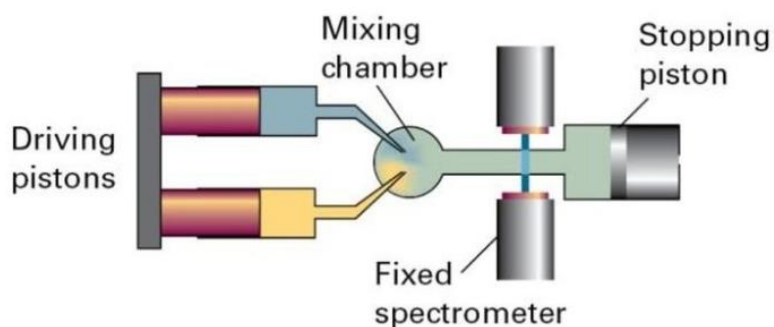
$$-dc(p - BQ)/dt = k_H * c(\text{HAsc}^-) * c(p - BQ)$$

$$k_H * c(\text{HAsc}^-) = k_{\text{obs}}$$

$$-dc(p - BQ)/dt = k_{\text{obs}} * c(p - BQ)$$

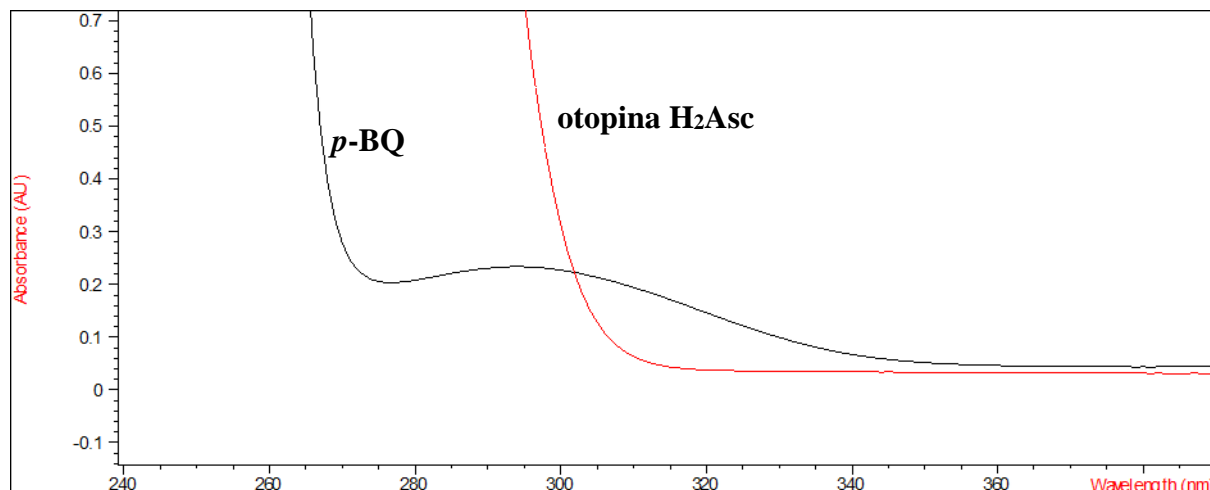
Pomoću ovog zakona, na temelju ovisnosti apsorbancije *p*-benzokinona u vremenu određena je observirana konstanta brzine.

Mjerenja su provedena na spektrofotometru (Avantes) koji je opremljen s dodatkom koji omogućuje praćenje brzih reakcija sa zaustavljenim protokom – eng. *stopped flow*. Mjerenje je provedeno tako da su otopine reaktanata stavljene u 2 šprice te je reakcija pokrenuta injektiranjem obe otopine u komoru za miješanje te je protok zaustavljen pokretnim klipom (Atkins i de Paula, 2010). Zatim se pomiješana reakcijska otopina izlaže UV/VIS svjetlu te se prati promjena apsorbancije.



Slika 3.2.1. Shema „stopped-flow“ uređaja, Preuzeto iz (Atkins i de Paula, 2010).

Snimljeni su i spektri otopina reaktanata na HP UV-VIS spektrofotometru. Svi rezultati su obrađeni u programu Microsoft Excel.



Slika 3.2.2. Spektri 0,005M otopine L-askorbinske kiseline i 0,0005M otopine *p*-benzokinona u vodi pri 25°C. Prije mjerenja spektara reaktanta, snimljena je slijepa proba koja je u ovom slučaju bila čista voda.

Kako bi se odredila valna duljina pri kojoj će se mjeriti konstanta brzine reakcije, izmjereni su spektri oba reaktanta. Prema slici 3.2.1. vidi se kako je apsorpcijski maksimum *p*-benzokinona pri valnoj duljini od otprilike 300 nm. L-askorbinska kiselina pri toj valnoj duljini također apsorbira dio zračenja, stoga je odabrana valna duljina od 313 nm gdje je L-askorbinskoj kiselini ϵ približno jednak 0. Mjerenjem reakcije pri toj valnoj duljini omogućeno je praćenje pada koncentracije samog *p*-benzokinona te analogno tome određivanje konstante brzine reakcije.

Prvotno su izvagani *p*-benzokinon i L-askorbinska kiselina potrebni za pripremu matičnih otopina u rasponu od 0,02 do 0,05 mol dm⁻³, odnosno od 0,1 do 0,2 mol dm⁻³. Izvagana je i potrebna masa Na₂EDTA za pripremu 0,05 mol dm⁻³ matične otopine, iz koje se razrjeđivanjem dobila 0,0005 mol dm⁻³ otopina. Matična otopina *p*-benzokinona pripravljena je otapanjem u vodi, dok je matična otopina L-askorbinske kiseline pripravljena otapanjem u 0,0005 mol dm⁻³ otopini Na₂EDTA. EDTA kompleksira ione prijelaznih metala koji kataliziraju autooksidaciju L-askorbinske kiseline (Jakobušić Brala, 2011).

Određivanje konstante brzine reakcije

$c(\text{H}_2\text{Asc}) / \text{M}$	$c(p\text{-BQ})$
0,002	0,00025
0,005	0,0005
0,05	
0,1	
0,0005M Na₂EDTA	H₂O

Tablica 3.2.1. Reakcijski uvjeti prilikom određivanja konstante brzine reakcije. Reakcija je praćena pri temperaturi od 25°C.

Za svaku koncentraciju askorbata određena je observirana konstanta brzine (k_{obs}). U konačnici je prikazana ovisnost izračunate observirane konstante brzine o koncentraciji askorbata te se iz nagiba pravca odredila konstanta brzine reakcije.

Određivanje Arrheniusovih i Eyringovih parametara

$c(\text{H}_2\text{Asc})/\text{M}$	$c(p\text{-BQ})/\text{M}$
0,05	0,0005
0,0005 M Na₂EDTA	H₂O

Tablica 3.2.2. Reakcijski uvjeti za određivanje Arrheniusovih i Eyringovih parametara.

Reakcija se pratila pri različitim temperaturama (15,20,25,30,35,40°C) te su se otopine reaktanata termostatirale na svakoj temperaturi barem 15 minuta. Određena je observirana konstanta brzine reakcije (k_{obs}) pri svakoj temperaturi te je pomoću nje određena konstanta brzine reakcije (k_{H}) prema formuli:

$$k_H = k_{\text{obs}}/c(\text{HAsc}^-)$$

Za određivanje Arrheniusovih i Eyringovih parametara prikazana je ovisnost $\ln(k_H)$ o $1/T$ te ovisnost $\ln(k_H / T)$ o $1/T$. Parametri su određeni iz nagiba pravaca i odsječaka na os ordinata.

Određivanje kinetičkog izotopnog efekta

$c(\text{H}_2\text{Asc})/\text{M}$	$c(p\text{-BQ})/\text{M}$
0,025	0,0005
0,0005 M Na₂EDTA	D₂O

Tablica 3.2.3. Reakcijski uvjeti za praćenje kinetičkog izotopnog efekta reakcije. Reakcija se pratila na temperaturi od 25°C.

Pripremljene su otopine askorbinske kiseline, *p*-benzokinona i Na₂EDTA u teškoj vodi (D₂O). U teškoj vodi dolazi do brze izmjene protona na kisiku te se dobiva deuterirani askorbat (DAsc⁻) kao reaktant. Izračunata je observirana konstanta brzine reakcije ($k_{\text{obs}}(\text{D})$), a iz nje konstanta brzine reakcije k_{D} . Zatim je kinetički izotopni efekt izražen kao kvocijent k_{H} i k_{D} :

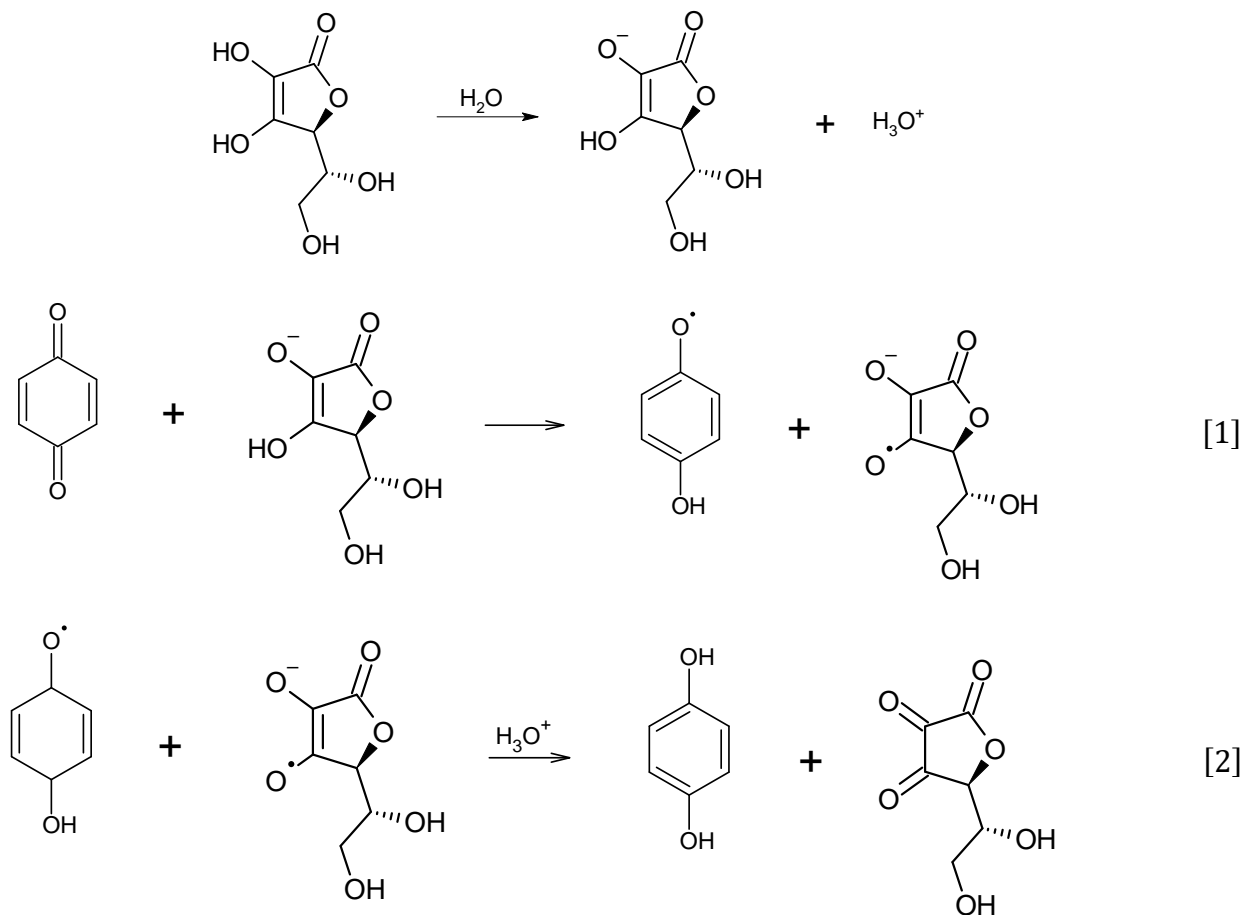
$$k_{\text{D}} = k_{\text{obs}}(\text{D})/c(\text{DAsc}^-)$$

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

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Reakcija L-askorbinske kiseline i *p*-benzokinona

Reakcija L-askorbinske kiseline i *p*-benzokinona odvija se u 2 stupnja:



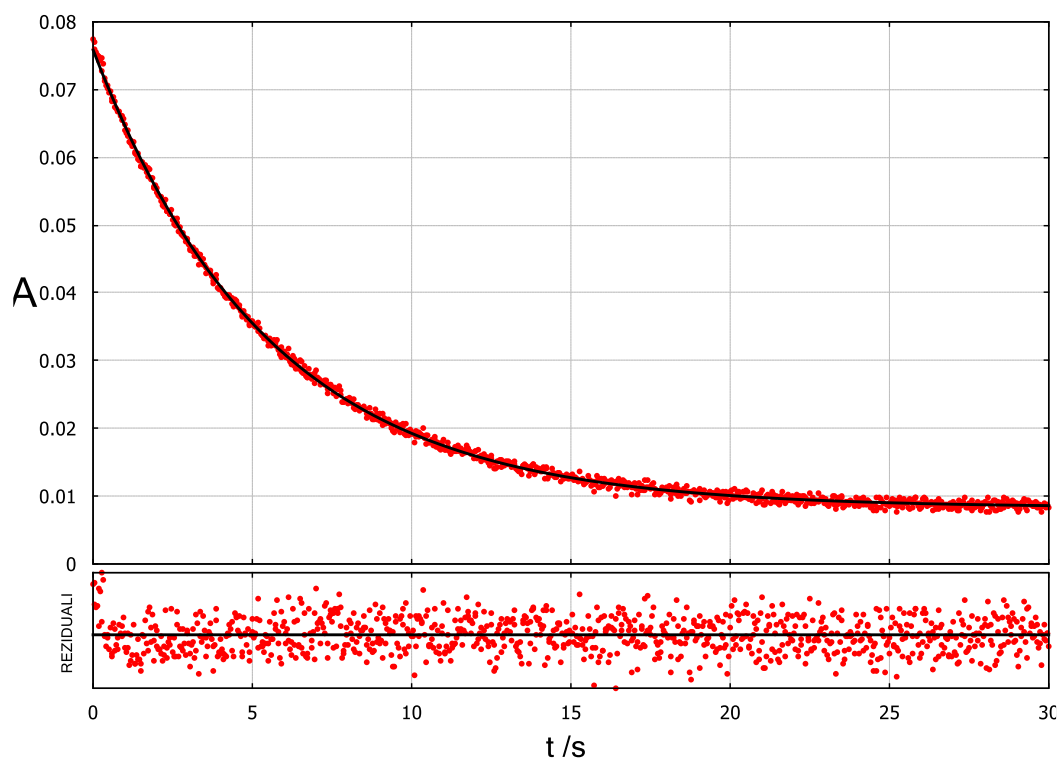
Slika 4.1.1. Reakcija *p*-benzokinona i L-askorbinske kiseline. Strukture su nacrtane u programu ChemSketch. Reakcija je nacrtana po uzoru na (Isaacs, 1997).

U [1] redoks reakciji askorbat (HAsc^-) predaje elektron i proton *p*-benzokinonu (*p*-BQ) uz nastanak semikinon radikala (*p*-BQ \cdot) i askorbil radikala ($\text{Asc}\cdot$). Prema ranije predloženom mehanizmu, prvotno dolazi do prijelaza elektrona, a zatim prijelaza protona (ET/PT). Prijelaz protona je predstavljen kao spori korak reakcije – korak koji određuje brzinu kemijske reakcije (Isaacs i Eldik, 1997). Jedan od predloženih mehanizama je i HAT prijelaz (Görner, 2004).

[2] redoks reakcija predstavlja prijelaz elektrona s $\text{Asc}^{\bullet-}$ na $p\text{-BQ}^{\bullet}$ uz nastanak krajnjih produkata: hidrokinon ($p\text{-H}_2\text{Q}$) i dehidroaskorbinska kiselina (DHA). Detaljniji mehanizam ovog koraka nije utvrđen. Moguća je i reakcija molekuskog kisika i semikinon radikala u kojoj se semikinon radikal oksidira u p -benzokinon (Roginsky i sur., 1999).

4.2. Konstanta brzine reakcije *p*-benzokinona i askorbata

Izmjerene su konstante brzine *p*-BQ i H₂Asc u uvjetima pseudo-prvog reda, tako što je koncentracija askorbinske kiseline bila do 10 puta veća od koncentracije *p*-benzokinona. Tako se može pretpostaviti kako je koncentracija askorbinske kiseline bila približno konstantna tijekom cijele reakcije.



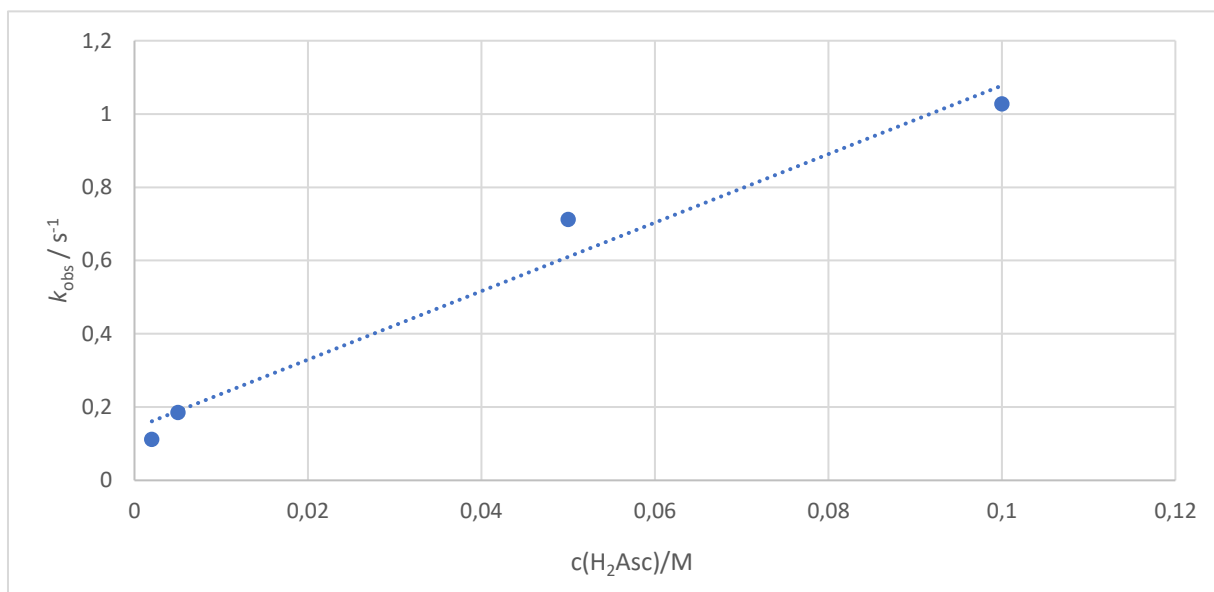
Slika 4.2.1. Ovisnost apsorbancije (A) o vremenu (t) tijekom reakcije 0,0005M *p*-benzokinona i 0,005M askorbinske kiseline u vodi pri temperaturi 25°C. Reakcija se pratila na valnoj duljini od 313 nm.

Promatrajući ovisnost observirane konstante brzine (k_{obs}) o različitim koncentracijama askorbinske kiseline (pri $t=25^{\circ}\text{C}$) dobivena je konstanta brzine reakcije *p*-benzokinona i askorbata:

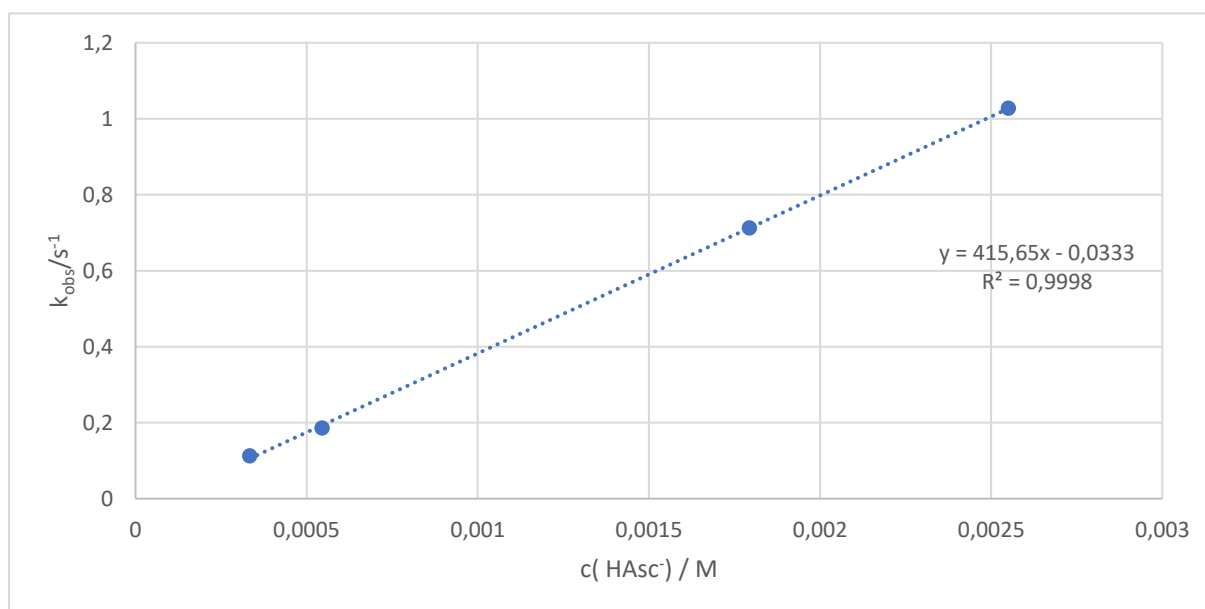
Tablica 4.2.1. Izmjerene konstante brzine za reakciju askorbata i *p*-benzokinona u vodi. Uz izmjerene konstante brzine za reakciju pseudo-prvog reda. Koncentraciju askorbata izračunata je preko poznate konstante disocijacije K_a (pri $T=298,15\text{K}$, $K_a= 6,675 \cdot 10^{-5}\text{M}$).

$c(\text{H}_2\text{Asc}) / \text{mol dm}^{-3}$	$c(\text{HAsc}^-) \cdot 10^3 / \text{mol dm}^{-3}$	k_{obs} / s^{-1}	$\overline{k_{obs}} / \text{s}^{-1}$	$\text{SD} / \text{s}^{-1}$	$r / \%$
0,002	0,334	0,1087	0,1123	0,0051	4,58
		0,1138			
		0,1084			
		0,1116			
		0,1159			
0,005	0,545	0,1872	0,1855	0,0024	1,28
		0,1801			
		0,1819			
		0,1807			
		0,1838			
0,05	1,794	0,6928	0,7126	0,0280	3,94
		0,7382			
		0,7134			
		0,7236			
		0,7325			
0,1	2,550	1,029	1,027	0,0030	0,29
		1,038			
		1,016			
		1,065			
		1,025			

* $c(p\text{-BQ}) = 0,0005 \text{ mol dm}^{-3}$ (iznimno u reakciji s $0,002 \text{ mol dm}^{-3}$ askorbinskom kiselinom je upotrijebljena koncentracija *p*-BQ od $0,00025 \text{ mol dm}^{-3}$ da bi se očuvali uvjeti pseudo-prvog reda. U reakcijskoj smjesi se nalazi i $0,0005 \text{ mol dm}^{-3} \text{ Na}_2\text{EDTA}$).



Graf 4.2.1. Ovisnost observirane konstante brzine (k_{obs}) o koncentraciji askorbinske kiseline ($c(\text{H}_2\text{Asc})$) u vodi pri $t=25^\circ\text{C}$.



Graf 4.2.2. Ovisnost observirane konstante brzine (k_{obs}) o koncentraciji askorbata ($c(\text{HAsc}^-)$) u vodi pri $t=25^\circ\text{C}$.

Prema slici 4.2.1. može se vidjeti kako ovisnost A o t slijedi zakon za pseudo-prvi red. Promatrajući graf 4.2.1. utvrđeno je kako ovisnost k_{obs} o $c(\text{H}_2\text{Asc})$ nije linearna, dok je prema grafu 4.2.2. dobivena linearna ovisnost k_{obs} o $c(\text{HAsc}^-)$ na temelju čega je moguće zaključiti da je reakcija prvoga reda s obzirom na HAsc^- i $p\text{-BQ}$. Ovo je u skladu i s mehanizmom koji je predložen u literaturi (Isaacs i Eldik, 1997; Seelert i Schenck, 1966).

Reakcija se odvija u uvjetima pseudo-prvog reda, gdje je koncentracija p -benzokinona do 10x manja od koncentracije askorbinske kiseline. Stoga je moguće pojednostavniti zakon brzine reakcije:

$$v = k_{\text{H}} * c(\text{HAsc}^-) * c(\text{BQ})$$

$$c(\text{HAsc}^-) \gg c(\text{BQ}) \longrightarrow k_{\text{obs}} = k_{\text{H}} * c(\text{HAsc}^-) \quad (1)$$

Jednadžba prikazanog pravca je :

$$y = 415,65x - 0,0333 ; R^2 = 0,9998.$$

Ta se jednadžba može preoblikovati u :

$$k_{\text{obs}} = 415,65 * c(\text{HAsc}^-) - 0,0333 \quad (2)$$

Kombinirajući izraze (1) i (2) proizlazi da je konstanta brzine k_{H} reakcije jednaka nagibu pravca te iznosi:

$$k_{\text{H}} = (415,7 \pm 4,1) \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

Iz jednadžbe (2) se može izvući i odsječak na os ordinata, $b = -0,0333$. Taj odsječak je u ovom slučaju rezultat pogreške mjerenja.

Jedan od potencijalnih problema koji se mogao javiti prilikom mjerenja konstante brzine ove reakcije jest zapravo redoks cikliranje *p*-benzokinona. Naime u reakciji nastaje međuprodukt benzokinona i askorbata, semikinon (*p*-BQ[•]), te može u prisutnosti kisika reagirati s atmosferskim kisikom koji bi ga oksidacijom mogao vratiti u prvotni nereducirani oblik. U ovom radu reakcija nije provedena u odsutnosti kisika pa bi ovaj proces mogao utjecati na iznos izmjerene konstante brzine reakcije askorbata i *p*-benzokinona. Prema dostupnoj literaturi, povratna reakcija nije zabilježena kada se reakcija odvijala u acetonitrilu (Görner, 2004), stoga je pretpostavljeno da ovaj proces nije utjecao na kinetiku reakcije. U daljnjem istraživanju navedeno je potrebno provjeriti na način da se reakcija ispita u uvjetima bez kisika, odnosno da se sve otopine propušu dušikom.

4.3. Određivanje Arrheniusovih i Eyringovih aktivacijskih parametara

Ispitana je ovisnost konstante brzine reakcije askorbata i *p*-benzokinona o temperaturi u vodi. Mjerenja konstanti brzine reakcije (k_{obs}) provedena su u rasponu temperatura od 15 do 40 °C (15, 20, 25, 30, 35 i 40 °C) pri koncentraciji L-askorbinske kiseline 0,05 mol dm⁻³, koncentraciji *p*-benzokinona 0,0005 mol dm⁻³ te koncentraciji Na₂EDTA 0,0005 mol dm⁻³. Konstante brzine reakcije (k_{H}) pri određenoj temperaturi određene su prema jednadžbi: $k_{\text{H}} = k_{\text{obs}} / c(\text{HAsc}^-)$. Koristeći izmjerene konstante brzine (k_{H}) prikazane su Arrheniusove i Eyringove ovisnosti konstante brzine o temperaturi. Iz nagiba i odsječka pravca određeni su aktivacijski parametri za reakciju askorbata i *p*-benzokinona u vodi.

Tablica 4.3.2. Izmjerene konstante brzine pseudo-prvog reda pri različitim temperaturama. Uz izračunate konstante pseudo-prvog reda, u tablici je izračunata i konstanta brzina k_{H} .

$t / ^\circ\text{C}$	T / K	$k_{\text{obs}} / \text{s}^{-1}$	(a)		(b)		SD / s ⁻¹	$r / \%$
			$K_{\text{a}} * 10^5 / \text{M}$	$c(\text{HAsc}^-) * 10^3 / \text{M}$	$k_{\text{H}} / \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$	$\overline{k_{\text{H}}} / \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$		
15	288,15	0,4605	6,140	1,722	267,5	253,5	15,5	6,11
		0,4078			236,9			
		0,4411			256,2			
20	293,15	0,5388	6,406	1,758	306,5	302,5	3,4	1,14
		0,5288			300,8			
		0,5279			300,3			
25	298,15	0,7382	6,675	1,794	411,5	413,2	3,0	0,74
		0,7379			411,4			
		0,7475			416,7			
30	303,15	0,8700	6,945	1,829	475,7	471,8	17,5	3,71
		0,8908			487,0			
		0,8280			452,7			
35	308,15	0,9946	7,217	1,864	533,6	552,4	16,3	2,95
		1,044			560,6			
		1,049			563,0			
40	313,15	1,440	7,490	1,898	758,5	747,9	27,2	3,64
		1,361			717,0			
		1,459			768,3			

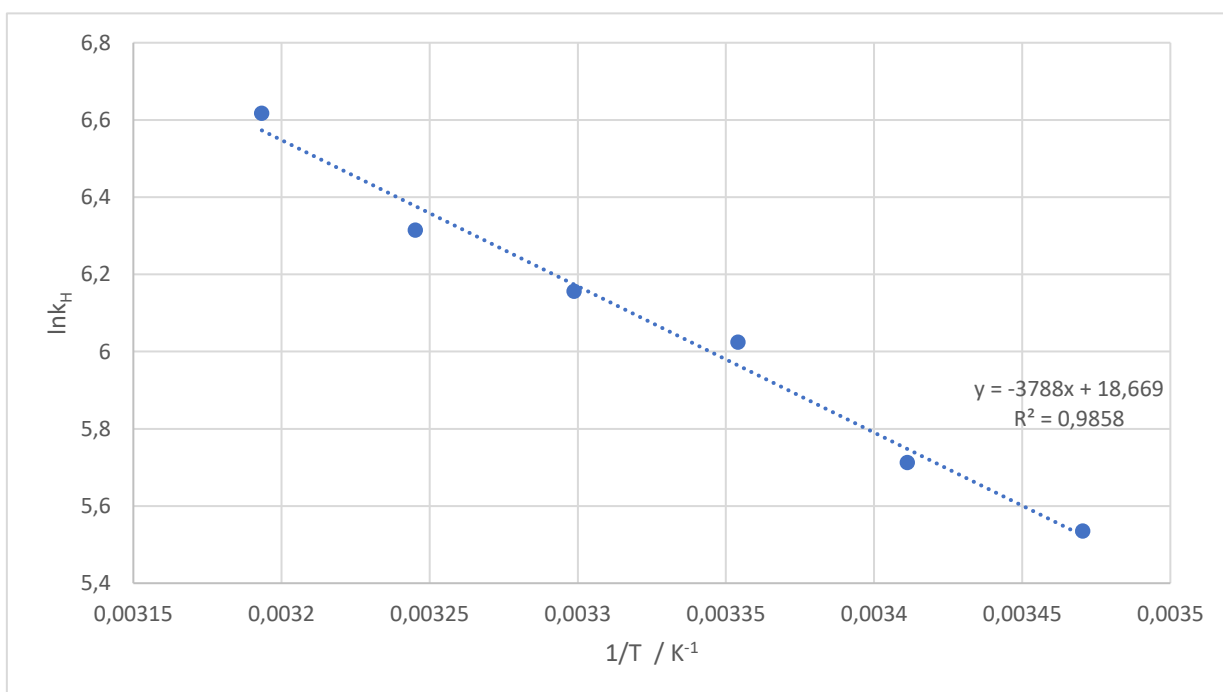
** Reakcijska smjesa se sastoji od 0,0005 M *p*-benzokinona i 0,05 M askorbinske kiseline otopljene u 0,0005 M Na₂EDTA.

^(a) Konstanta disocijacije askorbinske kiseline (K_{a}) pri različitim temperaturama dobivena je iz formule: $\ln K_{\text{a}} = -\Delta H / (RT) + \Delta S / R$; $\Delta H = 5,967 \text{ kJ/mol}$; $\Delta S = -59,9224 \text{ J/K mol}$ za disocijaciju u H₂O. Vrijednosti ΔH i ΔS uzete su iz laboratorijskih podataka.

^(b) $k_{\text{H}} = k_{\text{obs}} / c(\text{HAsc}^-)$

Tablica 4.3.2. Parametri potrebni za prikazivanje Arrheniusovih i Eyringovih ovisnosti.

T/K	$1/T / K^{-1}$	$k_H/M^{-1}s^{-1}$	$\ln k_H$	$\ln(k_H/T)$
288,15	0,00347	253,5	5,535	-0,1281
293,15	0,00341	302,5	5,712	0,0315
298,15	0,00335	413,2	6,024	0,3264
303,15	0,00330	471,8	6,157	0,4423
308,15	0,00324	552,4	6,314	0,5837
313,15	0,00319	747,9	6,617	0,8706



Graf 4.3.1. Ovisnost $\ln k_H$ o $1/T$. Podaci iz tablice 4.3.2.

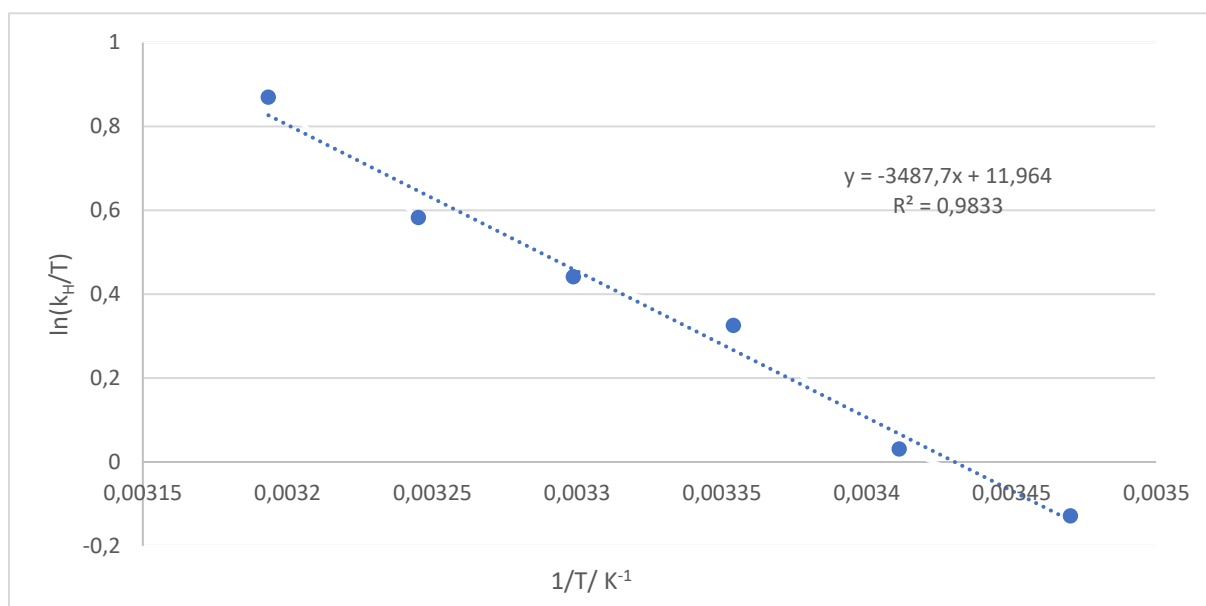
Dobivena je linearna ovisnost iz koje su određeni Arrheniusovi aktivacijski parametri:

$$y = -3788x + 18,669; R^2 = 0,9858$$

$$a = -Ea/R; b = \ln A$$

Tablica 4.3.3. Izračunati Arrheniusovi aktivacijski parametri za reakciju. Podaci s grafa 4.3.1.

a/ M ⁻¹ s ⁻¹ K	b/ M ⁻¹ s ⁻¹	Ea (SD) / kJ mol ⁻¹	ln A (SD)	A * 10 ⁻⁸ / M ⁻¹ s ⁻¹
-3788	18,67	31,49 (1,89)	18,67 (0,76)	1,368



Graf 4.3.2. Ovisnost $\ln(k_H/T)$ o $1/T$. Podaci iz tablice 4.3.2.

Dobivena je jednadžba pravca iz koje su određeni Eyringovi aktivacijski parametri ΔG^\ddagger , ΔH^\ddagger i ΔS^\ddagger :

$$y = -3487,7x + 11,964; R^2 = 0,9833$$

$$a = \frac{-\Delta H^\ddagger}{R}; b = \frac{\Delta S^\ddagger}{R} + \ln\left(\frac{k_b}{h}\right)$$

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

Tablica 4.3.4. Izračunati Eyringovi aktivacijski parametri za reakciju. Podaci s grafa 4.3.2.

a / M⁻¹ s⁻¹	b/ M⁻¹ s⁻¹ K⁻¹	ΔH^\ddagger (SD)/ kJ mol⁻¹	ΔS^\ddagger (SD)/ J mol⁻¹ K⁻¹	ΔG^\ddagger (SD) / kJ mol⁻¹
-3487,7	11,964	29,00 (1,89)	-97,53 (6,27)	58,08 (2,66)

Na temelju Arrheniusove jednadžbe: $\ln k = \ln A - E_a / (R \cdot T)$ određeni su Arrheniusovi aktivacijski parametri. Energija aktivacije (E_a) određena je iz nagiba pravca prema jednadžbi: $E_a = -a \cdot R$ (iz $a = -E_a / R$), a predeksponencijalni faktor (A) iz odsjeka $b = \ln A$ te iznose redom $E_a = 31,49 \pm 1,89$ kJ/mol i $A = 1,368 \cdot 10^8$ M⁻¹ s⁻¹.

S druge strane, na temelju Eyringove jednadžbe $\ln\left(\frac{k}{T}\right) = -\frac{\Delta H^\ddagger}{RT} + \frac{\Delta S^\ddagger}{R} + \ln\left(\frac{k_b}{h}\right)$ određeni su Eyringovi aktivacijski parametri. Aktivacijska entalpija (ΔH^\ddagger) određena je iz nagiba pravca prema jednadžbi: $\Delta H^\ddagger = -a \cdot R$ (iz $a = -\Delta H^\ddagger / R$), a aktivacijska entropija (ΔS^\ddagger) iz odsjeka $b = \frac{\Delta S^\ddagger}{R} + \ln\left(\frac{k_b}{h}\right)$ te iznose redom $\Delta H^\ddagger = 29,00 \pm 1,89$ kJ/mol i $\Delta S^\ddagger = -97,53 \pm 6,27$ J mol⁻¹ K⁻¹. Iz te 2 vrijednosti može se izvući aktivacijska Gibbsova energija iz jednadžbe: $\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T\Delta S^\ddagger$ te iznosi $58,08 \pm 2,66$ kJ/mol (pri 25°C).

4.4. Kinetički izotopni efekt reakcije askorbata i *p*-benzokinona

Tablica 4.4.1. Izmjerene konstante brzine ($k_{\text{obs}}(\text{D})$) i izračunate konstante brzine (k_{D}) za reakciju *p*-benzokinona i askorbata u teškoj vodi (D_2O) pri temperaturi 25°C.

$k_{\text{obs}}(\text{D}) / \text{s}^{-1}$	$K_{\text{a}} \cdot 10^5 / \text{M}$	$c(\text{HAsc}) \cdot 10^3 / \text{M}$	$k_{\text{D}} / \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$	$\bar{k}_{\text{D}} / \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$	$\text{SD} / \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$	$r / \%$
0,1130	2,31	0,748	151,1	156,8	5,5	3,52
0,1213			162,1			
0,1176			157,2			

*Reakcijska smjesa se sastoji od 0,025 M askorbinske kiseline otopljene u 0,0005 M Na_2EDTA i 0,0005 M *p*-benzokinona

** K_{a} askorbinske kiseline u D_2O izračunata je iz formule: $\ln K_{\text{a}} = -\Delta H/(1/T)/R + \Delta S/R$; $\Delta H = 6,6716$ kJ/mol; $\Delta S = -66,3911$ J/K mol. Vrijednosti ΔH i ΔS uzete su iz laboratorijskih podataka

*** $k_{\text{D}} = k_{\text{obs}} / c(\text{HAsc}^-)$

Tablica 4.4.2. Konstante brzine (k_{H} i k_{D}) i kinetički izotopni efekt reakcije *p*-benzokinona i askorbata pri 25°C.

$k_{\text{H}} / \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ (a)	$\bar{k}_{\text{H}} (\text{SD}) / \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$	$k_{\text{D}} / \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$	$\bar{k}_{\text{D}} (\text{SD}) / \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$	KIE (b) (SD)
411,5	413,2 (3,0)	151,1	56,8 (5,5)	2,65 (0,10)
411,3		162,1		
416,7		157,2		

(a) Podaci uzeti iz tablice 4.3.2.

(b) $\text{KIE} = \bar{k}_{\text{H}} / \bar{k}_{\text{D}}$

Izmjerene su konstante brzine reakcije $k_{\text{obs}}(\text{H})$ i $k_{\text{obs}}(\text{D})$ za reakciju askorbata i *p*-benzokinona u vodi i teškoj vodi pri koncentraciji askorbinske kiseline od 0,025 M i koncentraciji *p*-benzokinona 0,0005 M u prisutnosti 0,0005 M Na₂EDTA pri temperaturi 25°C. Izračunate su konstante brzine reakcije k_{H} i k_{D} prema jednadžbi: $k = k_{\text{obs}} / c(\text{HAsc}^-)$. Na temelju dobivenih rezultata izračunat je kinetički izotopni efekt (KIE) prema jednadžbi $\text{KIE} = k_{\text{H}} / k_{\text{D}}$, koji iznosi $2,65 \pm 0,10$. U literaturi su nađene vrijednosti kinetičkog izotopnog efekta od 7,8 (Isaacs i Eldik, 1997), međutim valja naglasiti kako je u tom radu KIE dan kao omjer observiranih konstanti brzine. Odnosno, nije se uzimala u obzir različita konstanta disocijacije askorbata u H₂O i D₂O.

Ovakva vrijednost kinetičkog izotopnog efekta možda nije velika, no upućuje na reakcijski mehanizam u kojemu u sporomu reakcijskom stupnju, koji određuje brzinu reakcije, dolazi do prijelaza protona što nam pobliže opisuje mehanizam reakcije.

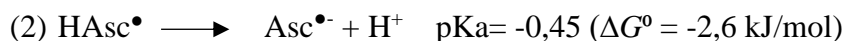
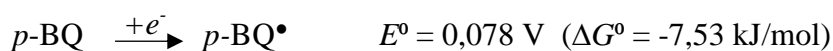
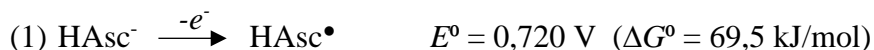
4.5. Određivanje mehanizma reakcije

Cilj ovog rada je bio ispitati reakcijski mehanizam HAsc⁻ i *p*-BQ, tj. pobliže opisati mehanizam prijelaza protona i elektrona. Htjelo se utvrditi je li reakcija prati CPET mehanizam (prijelaz H⁺ i e⁻ s askorbata se događa usklađeno u jednom reakcijskom koraku) ili stupnjeviti mehanizam. Stupnjeviti mehanizam može značiti da prvo dolazi do prijelaza elektrona s askorbata, a zatim protona (ET/PT) ili prvo dolazi do prijelaza protona nakon kojeg slijedi prijelaz elektrona (PT/ET).

Da bi se odredio mehanizam reakcije potrebno je provesti termokemijsku analizu reakcije. Termokemijska analiza podrazumijeva uspoređivanje standardne reakcijske Gibbsove energije (ΔG°) odgovarajućih reakcijskih koraka s eksperimentalno određenom aktivacijskom Gibbsovom energijom (ΔG^\ddagger), uz pretpostavku da je uvijek $\Delta G^\ddagger \geq \Delta G^\circ$. ΔG° PT procesa moguće je odrediti iz pKa odgovarajuće kiseline ($\Delta G^\circ = 2,3 RT \text{ pKa}$), a ΔG° ET procesa iz redoks potencijala E° ($\Delta G^\circ = -nFE^\circ$).

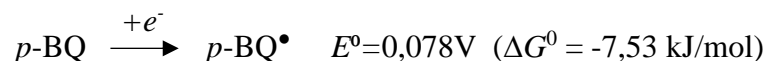
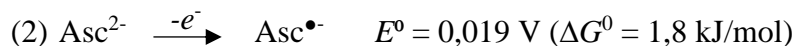
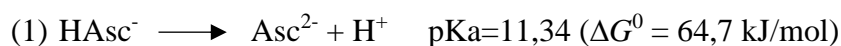
Termokemijska analiza je provedena samo za prvu redoks reakciju s obzirom da se po literaturi u toj reakciji odvija korak koji određuje brzinu reakcije (Isaacs i Eldik, 1997).

ET/PT



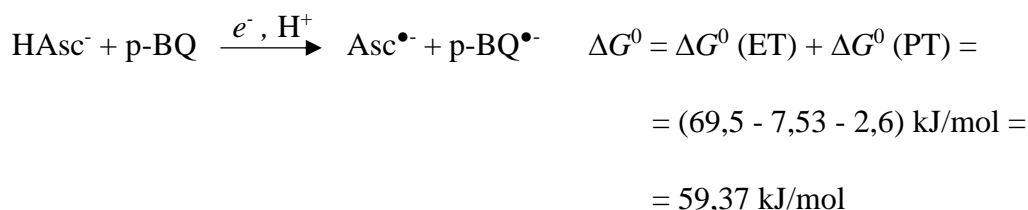
Izmjereni kinetički izotopni efekt potvrđuje kako u koraku koji određuje brzinu reakcije (spori korak reakcije) dolazi do prijelaza protona. Po ET/PT mehanizmu za ovu reakciju se proton transfer odvija u (2) koraku kada dolazi do deprotonacije HAsc[•] radikala. Međutim HAsc[•] ima jako niski pKa= -0,45, što bi značilo da se deprotonacija odvija brzo te u tom slučaju ne bi došlo do pojave primarnog kinetičkog izotopnog efekta. S ovim se može isključiti ET/PT mehanizam kao mogući mehanizam ove reakcije, mehanizam koji je predložen u literaturi (Isaacs i Eldik, 1997).

PT/ET



ΔG^0 sporog koraka reakcije, odnosno koraka u kojem dolazi do cijepanja O-H veze (1) iznosi 64,7 kJ/mol. Eksperimentalno određena ΔG^\ddagger iznosi $58,08 \pm 2,66$ kJ/mol. S obzirom na pretpostavku da uvijek vrijedi $\Delta G^\ddagger \geq \Delta G^0$, može se odbaciti i PT/ET mehanizam jer je ΔG^0 veća od eksperimentalno određene Gibbsove aktivacijske energije.

CPET



Izračunata ΔG^0 CPET mehanizma je veća od eksperimentalno određene $\Delta G^\ddagger = 58,08 \pm 2,66$ kJ/mol, ali je unutar vrijednosti standardne devijacije te se ovaj mehanizam ne treba isključivati. Ovaj mehanizam i je predložen prema (Görner, 2004). U daljnjim bi istraživanjima bilo dobro ponovo eksperimentalno odrediti Eyringove aktivacijske parametre.

5. ZAKLJUČAK

U ovom diplomskom radu je prikazano istraživanje kinetike i mehanizma reakcije *p*-benzokinona i askorbinske kiseline u vodi. Osim izmjerene konstante brzine reakcije pri 25°C, određeni su i Arrheniusovi parametri (energija aktivacije E_a i predeksponencijalni faktor A) te Eyringovi aktivacijski parametri (aktivacijska entalpija ΔH^\ddagger , aktivacijska entropija ΔS^\ddagger i Gibbsova aktivacijska energija ΔG^\ddagger). Uz to je i izmjeren kinetički izotopni efekt (KIE) pri 25°C. Na kraju je provedena termokemijska analiza reakcije.

- Određena je konstanta brzine reakcije askorbata i *p*-benzokinona pri 25°C u vodi te iznosi $415,7 \pm 4,1 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$.
- Izmjerene su konstante brzine reakcije askorbata i *p*-benzokinona pri različitim temperaturama u rasponu 15-40°C. Na temelju dobivenih rezultata prikazane su Arrheniusove i Eyringove ovisnosti konstante brzine o temperaturi te su iz njih dobiveni aktivacijski parametri. Određeni Arrheniusovi parametri iznose: $E_a = 31,49 \pm 1,89 \text{ kJ mol}^{-1}$ i $A = 1,368 \cdot 10^8$. Eyringovi parametri iznose: $\Delta H^\ddagger = 29,00 \pm 1,89 \text{ kJ mol}^{-1}$, $\Delta S^\ddagger = -97,53 \pm 6,27 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ i $\Delta G^\ddagger = 58,08 \pm 2,66 \text{ kJ mol}^{-1}$ pri 25°C.
- Izmjerena je konstanta brzine reakcije *p*-benzokinona i askorbata u teškoj vodi (D_2O) pri 25°C te je određen kinetički izotopni efekt (KIE) kao omjer konstante brzine reakcije u H_2O i D_2O . KIE za ovu reakciju pri 25°C iznosi $2,65 \pm 0,10$ te potvrđuje da u stupnju koji određuje brzinu reakcije dolazi do prijelaza protona.
- Provedena je termokemijska analiza u kojoj su se isključili stupnjeviti ET/PT i PT/ET kao potencijalni mehanizmi prijelaza protona i elektrona te je kao mehanizam predložen CPET, mehanizam koji predlaže prijelaz protona i elektrona usklađeno u 1 reakcijskom koraku, s obzirom da su ΔG° i eksperimentalno određena ΔG^\ddagger približno jednake.

6. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA

p -BQ – p -benzokinon

p -BQ[•] – semikinon radikal

p -H₂Q – hidrokinon

H₂Asc – askorbinska kiselina

HAsc⁻ – askorbat

Asc^{•-} – askorbil radikal

DHA – dehidroaskorbinska kiselina

KIE – kinetički izotopni efekt

PT – proton transfer

ET – elektron transfer

PCET – reakcije spregnutog prijelaza protona i elektrona (*eng.* Proton-Coupled Electron Transfer)

HAT – reakcije prijelaza atoma vodika (*eng.* Hydrogen Atom Transfer)

CPET – usklađeni prijelaz protona i elektrona (*eng.* Concerted Proton-Electron Transfer)

7. LITERATURA

Anslyn EV i Dougherty DA. *Modern Physical Organic Chemistry*. Sausalito California, University Science Books, 2006, str. 421-425

Atkins P i de Paula J. *Atkins' Physical Chemistry*. 9. izdanje. Oxford, Oxford University Press, 2010, str. 784-789

Boo YC. Ascorbic Acid (Vitamin C) as a Cosmeceutical to Increase Dermal Collagen for Skin Antiaging Purposes: Emerging Combination Therapies. U *Antioxidant*. MDPI, 2022, 11(9)

Buettner GR i Jurkiewicz BA. Chemistry and Biochemistry of Ascorbic Acid. U *Handbook of antioxidants*, Marcel Dekker, Inc., New York, 1996, 91–115

Cvitaš T, Fizikalna kemija, rukopis u pripremi (može se dobiti u Središnjoj kemijskoj knjižnici, PMF, Zagreb), 2011

Darcy JW, Koronkiewicz B, Parada GA i Mayer JM. A Continuum of Proton-Coupled Electron Transfer Reactivity. *Acc. Chem. Res.*, 2018, 51(10), 2391–2399

Davies MB, Austin J, Partridge DA. *Vitamin C: Its Chemistry and Biochemistry*. Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1991

Devi SS i Mehendale HM. Quinone. U *Encyclopedia of Toxicology: Third Edition*, Elsevier, 2014, 26-28

Doseděl M. i sur. Vitamin C—sources, physiological role, kinetics, deficiency, use, toxicity, and determination. *Nutrients*, 2021, MDPI AG, 1–36

El-Najjar N, Gali-Muhtasib H, Ketola RA, Vuorela P, Urtti A I Vuorela H. The chemical and biological activities of quinones: Overview and implications in analytical detection. *Phytochemistry Reviews*, 2011, 10(3), 353–370

Geng Y i sur. From polyphenol to o-quinone: Occurrence, significance, and intervention strategies in foods and health implications. *Compr Rev Food Sci Food Saf*, 2023, 22(4), 3254–3291.

Görner H. Photoreactions of p-benzo-, p-naphtho- and p-anthraquinones with ascorbic acid. *Photochemical and Photobiological Sciences*, 2004, 3(10), 933–938

Huynh MT, Anson CW, Cavell AC, Stahl SS i Hammes-Schiffer S. Quinone 1 e⁻ and 2 e⁻/2 H⁺ Reduction Potentials: Identification and Analysis of Deviations from Systematic Scaling Relationships. *Journal of the American Chemical Society*, 2016, 138(49), 15903–15910

Isaacs N. Physical Organic Chemistry. 2. izdanje, Longman Group UK Limited, London, 1995, str. 287-289

Isaacs NS i Van Eldik R (1997). A mechanistic study of the reduction of quinones by ascorbic acid. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, 1997, 8, 1465–1467

Jakobušić Brala C. Kationima pospješeni spregnuti prijelaz elektrona i protona. *Disertacija*, Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, 2011

Kaur R i Nayyar H . Ascorbic Acid: A Potent Defender Against Environmental Stresses. U *Oxidative Damage to Plants: Antioxidant Networks and Signaling*, Elsevier Inc, 2014, 235–287

Li Y, Zhu T, Zhao J i Xu B. Interactive enhancements of ascorbic acid and iron in hydroxyl radical generation in quinone redox cycling. *Environmental Science and Technology*, 2012, 46(18), 10302–10309

Mayer JM. Proton-coupled electron transfer: A reaction chemist's view. *Annual Review of Physical Chemistry*, 2004, 55, 363–390.

Mayer JM i Rhile IJ. Thermodynamics and kinetics of proton-coupled electron transfer: Stepwise vs. concerted pathways. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 2004, 51–58

Njus D, Kelley PM, Tu YJ, Schlegel HB. Ascorbic acid: The chemistry underlying its antioxidant properties. *Free Radic Biol Med*, 2020, 159:37-43

O'brien PJ. Molecular Mechanisms of quinone cytotoxicity. U *Chem.-Biol. Interactions*, 1991, Vol. 80

Roginsky VA, Barsukova TK, Stegmann B HB i Semenov NN . Kinetics of redox interaction between substituted quinones and ascorbate under aerobic conditions. U *Chemico-Biological Interactions*, 1999, Vol. 121

Sajenko I, Pilepić V, Jakobušić Brala C i Uršić S. Solvent dependence of the kinetic isotope effect in the reaction of ascorbate with the 2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl radical: Tunnelling in a small molecule reaction. *Journal of Physical Chemistry A*, 2010, 114(10), 3423–3430

Seelert K i Schenck G. Polarographische Untersuchungen der Ascorbinsäure-Oxydation durch Chinone 2. Mitt.: Reaktionsgeschwindigkeiten. *Archiv Der Pharmazie*, 1966, 299(9), 757–762

Wardman P. Reduction Potentials of One-Electron Couples Involving Free Radicals in Aqueous Solution. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, 1989, 18(4), 1637–1755

Warren JJ i Mayer JM. Tuning of the thermochemical and kinetic properties of ascorbate by its local environment: Solution chemistry and biochemical implications. *Journal of the American Chemical Society*, 2010, 132(22), 7784–7793

Warren JJ, Tronic TA i Mayer JM. Thermochemistry of proton-coupled electron transfer reagents and its implications. *Chem. Rev.*, 2010, 110(12), 6961–7001

Zhu XQ, Mu YY, i Li XT. What are the differences between ascorbic acid and NADH as hydride and electron sources *in vivo on thermodynamics, kinetics, and mechanism?* *Journal of Physical Chemistry B*, 2011, 115(49), 14794–14811

8. SAŽETAK / SUMMARY

8.1. Sažetak

L-askorbinska kiselina (vitamin C) je poznati antioksidans prisutan u voću i povrću. Svoj terapijski potencijal ostvaruje ne-enzimskom redukcijom slobodnih radikala. Moguća je njena primjena u organskim redoks reakcijama, npr. redukcija *p*-benzokinona. *p*-Benzokinon pripada skupini kinona, koji su poznati zbog svog antitumorskog, antibiotskog i fungicidnog djelovanja. Kombinacija askorbinske kiseline i kinona se razmatra zbog svoje potencijalne primjene u antitumorskoj terapiji. U ovom je diplomskom radu ispitana kinetika i mehanizam reakcije L-askorbinske kiseline i *p*-benzokinona radi boljeg razumijevanja reakcijskog mehanizma, ali i dodatnog opisivanja ova 2 reaktanta. Istraživanje kinetike i mehanizma ove reakcije provedeno je u čistoj vodi. Konstanta brzine reakcije L-askorbinske kiseline i *p*-benzokinona u vodi pri 25°C iznosi $415,7 \pm 4,1 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Isto tako su izmjerene konstante brzine za ovu reakciju pri različitim temperaturama, u rasponu 15-40°C. Na temelju dobivenih rezultata prikazane su Arrheniusove i Eyringove ovisnosti konstante brzine o temperaturi iz kojih su određeni aktivacijski parametri. Arrheniusovi aktivacijski parametri iznose: $E_a = 31,49 \pm 1,89 \text{ kJ mol}^{-1}$ i $A = 1,368 \cdot 10^8$. Eyringovi aktivacijski parametri iznose: $\Delta H^\ddagger = 29,00 \pm 1,89 \text{ kJ mol}^{-1}$, $\Delta S^\ddagger = -97,53 \pm 6,27 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ i $\Delta G^\ddagger = 58,08 \pm 2,66 \text{ kJ mol}^{-1}$ pri 25°C. Određen je i kinetički izotopni efekt (KIE) za reakciju pri 25°C te iznosi $2,65 \pm 0,10$ i potvrđuje da u stupnju koji određuje brzinu reakcije dolazi do prijelaza protona. U konačnici je provedena termokemijska analiza reakcije te su stupnjeviti reakcijski mehanizmi (PT/ET i ET/PT) odbačeni kao mogući mehanizmi prijelaza protona i elektrona. Predloženi mehanizam je CPET.

8.2. Summary

L-ascorbic acid (vitamin C) is a well-known antioxidant present in fruits and vegetables. It achieves its therapeutic potential by non-enzymatic reduction of free radicals. It can be used in organic redox reactions, e.g. reduction of the *p*-benzoquinone. *p*-Benzoquinone is a part of the group quinones, which are known for their antitumor, antibiotic and fungicidal activity. Combination of ascorbic acid and quinones is considered for its potential use in antitumor therapy. In this thesis, the kinetics and mechanism of the reaction of L-ascorbic acid and *p*-benzoquinone were examined for a better understanding of the reaction mechanism, but also for an additional description of these 2 reactants. Research of the kinetics and mechanism of this reaction was performed in pure water. The reaction rate constant of L-ascorbic acid and *p*-benzoquinone in water at 25°C is $415.7 \pm 4.1 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$. The rate constants for this reaction were also measured at different temperatures, in the range 15-40°C. Based on the obtained results, the Arrhenius and Eyring plots of the rate constants against temperatures are presented, from which the activation parameters were determined. Arrhenius activation parameters are: $E_a = 31.49 \pm 1.89 \text{ kJ mol}^{-1}$ and $A = 1.368 \cdot 10^8$. Eyring's activation parameters are: $\Delta H^\ddagger = 29.00 \pm 1.89 \text{ kJ mol}^{-1}$, $\Delta S^\ddagger = -97.53 \pm 6.27 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ and $\Delta G^\ddagger = 58.08 \pm 2.66 \text{ kJ mol}^{-1}$ at 25°C. The kinetic isotope effect (KIE) for the reaction at 25°C was also determined: 2.65 ± 0.10 , confirming that the proton transition occurs in the step that determines the rate of the reaction. In the end, a thermochemical analysis of the reaction was performed and stepwise reaction mechanisms (PT/ET and ET/PT) were rejected as possible mechanisms of proton and electron transition. The proposed mechanism is CPET.

**TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA / BASIC
DOCUMENTATION CARD**

Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

Kinetika i mehanizam reakcije L-askorbinske kiseline i p-benzokinona

Zdeslav Sekelez

SAŽETAK

L-askorbinska kiselina (vitamin C) je poznati antioksidans prisutan u voću i povrću. Svoj terapijski potencijal ostvaruje ne-enzimskom redukcijom slobodnih radikala. Moguća je njena primjena u organskim redoks reakcijama, npr. redukcija p-benzokinona. p-Benzokinon pripada skupini kinona, koji su poznati zbog svog antitumorskog, antibiotskog i fungicidnog djelovanja. Kombinacija askorbinske kiseline i kinona se razmatra zbog svoje potencijalne primjene u antitumorskoj terapiji. U ovom je diplomskom radu ispitana kinetika i mehanizam reakcije L-askorbinske kiseline i p-benzokinona radi boljeg razumijevanja reakcijskog mehanizma, ali i dodatnog opisivanja ova 2 reaktanta. Istraživanje kinetike i mehanizma ove reakcije provedeno je u čistoj vodi. Konstanta brzine reakcije L-askorbinske kiseline i p-benzokinona u vodi pri 25°C iznosi $415,7 \pm 4,1 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Isto tako su izmjerene konstante brzine za ovu reakciju pri različitim temperaturama, u rasponu 15-40°C. Na temelju dobivenih rezultata prikazane su Arrheniusove i Eyringove ovisnosti konstante brzine o temperaturi iz kojih su određeni aktivacijski parametri. Arrheniusovi aktivacijski parametri iznose: $E_a = 31,49 \pm 1,89 \text{ kJ mol}^{-1}$ i $A = 1,368 \cdot 10^8$. Eyringovi aktivacijski parametri iznose: $\Delta H^\ddagger = 29,00 \pm 1,89 \text{ kJ mol}^{-1}$, $\Delta S^\ddagger = -97,53 \pm 6,27 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ i $\Delta G^\ddagger = 58,08 \pm 2,66 \text{ kJ mol}^{-1}$ pri 25°C. Određen je i kinetički izotopni efekt (KIE) za reakciju pri 25°C te iznosi $2,65 \pm 0,10$ i potvrđuje da u stupnju koji određuje brzinu reakcije dolazi do prijelaza protona. U konačnici je provedena termokemijska analiza reakcije te su stupnjeviti reakcijski mehanizmi (PT/ET i ET/PT) odbačeni kao mogući mehanizmi prijelaza protona i elektrona. Predloženi mehanizam je CPET.

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

Rad sadrži: 43 stranice, 15 grafičkih prikaza, 10 tablica i 29 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: L-askorbinska kiselina, p-benzokinon, KIE, PCET

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

Ocjenjivači: **Dr. sc. Cvijeta Jakobušić Brala**, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.
Dr. sc. Maja Šegvić Klarić, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.
Dr. sc. Viktor Pilepić, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: Kolovoz 2024.

Basic documentation card

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

Diploma thesis

Kinetics and mechanism of the reaction of L-ascorbic acid and *p*-benzoquinone

Zdeslav Sekelez

SUMMARY

L-ascorbic acid (vitamin C) is a well-known antioxidant present in fruits and vegetables. It achieves its therapeutic potential by non-enzymatic reduction of free radicals. It can be used in organic redox reactions, e.g. reduction of *p*-benzoquinone. *p*-Benzoquinone is a part of the group quinones, which are known for their antitumor, antibiotic and fungicidal activity. Combination of ascorbic acid and quinones is considered for its potential use in antitumor therapy. In this thesis, the kinetics and mechanism of the reaction of L-ascorbic acid and *p*-benzoquinone were examined for a better understanding of the reaction mechanism, but also for an additional description of these 2 reactants. Research of the kinetics and mechanism of this reaction was performed in pure water. The reaction rate constant of L-ascorbic acid and *p*-benzoquinone in water at 25°C is $415.7 \pm 4.1 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$. The rate constants for this reaction were also measured at different temperatures, in the range 15-40°C. Based on the obtained results, the Arrhenius and Eyring plots of the rate constants against temperatures are presented, from which the activation parameters were determined. Arrhenius activation parameters are: $E_a = 31.49 \pm 1.89 \text{ kJ mol}^{-1}$ and $A = 1.368 \cdot 10^8$. Eyring's activation parameters are: $\Delta H^\ddagger = 29.00 \pm 1.89 \text{ kJ mol}^{-1}$, $\Delta S^\ddagger = -97.53 \pm 6.27 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ and $\Delta G^\ddagger = 58.08 \pm 2.66 \text{ kJ mol}^{-1}$ at 25°C. The kinetic isotope effect (KIE) for the reaction at 25°C was also determined: 2.65 ± 0.10 , confirming that the proton transition occurs in the step that determines the rate of the reaction. In the end, a thermochemical analysis of the reaction was performed and stepwise reaction mechanisms (PT/ET and ET/PT) were rejected as possible mechanisms of proton and electron transition. The proposed mechanism is CPET.

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

Thesis includes: 43 pages, 15 figures, 10 tables and 29 references. Original is in Croatian language.

Keywords: L-ascorbic acid, *p*-benzoquinone, KIE, PCET

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

Reviewers: **Cvijeta Jakobušić Brala, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Maja Šegvić Klarić, Ph.D. Full 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: August 2024.