



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ  
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ

Дејан Миленковић

**МЕХАНИЗМИ АНТИОКСИДАТИВНОГ ДЕЛОВАЊА  
БАЈКАЛЕИНА**

ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

Крагујевац, 2013.

## ИДЕНТИФИКАЦИОНА СТРАНИЦА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

### *I. Аутор*

Име и презиме: Дејан Миленковић

Датум и место рођења: 05.01.1982. Крагујевац, Србија

Садашње запослење: Истраживачко развојни центар за биоинжењеринг "БиоИРЦ"

### *II. Докторска дисертација*

Наслов: Механизми антиоксидативног деловања бајкалеина

Број страница: 104

Број слика: 34, Број табела: 16

Број библиографских јединица: 134

Установа и место где је израђена: Природно-математички факултет, Крагујевац

Научна област (УДК): 547:544, Хемија - Органска хемија: Физичка хемија

Ментор: др Зоран Марковић

### *III. Оцена и одбрана*

Датум пријаве теме: 06.03.2013.

Број одлуке и датум прихватања докторске дисертације: 385/5, 03.07.2013.

Комисија за оцену подобности теме и кандидата: број одлуке 250/10, 08.05.2013.

1. Др Иван Гутман, професор емеритус, Природно-математички факултет у Крагујевцу, ужа научна област: Физичка хемија
2. Др Светлана Марковић, редовни професор, Природно-математички факултет у Крагујевцу, ужа научна област: Физичка хемија
3. Др Зоран Марковић, ванредни професор, Државни универзитет у Новом Пазару, ужа научна област: Хемија (ментор)
4. Др Јасмина Димитрић-Марковић, ванредни професор, Факултет за физичку хемију у Београду, ужа научна област: Физичка хемија – спектрохемија

Комисија за оцену докторске дисертације: број одлуке 790/X-1, 02.10.2013.

1. Др Иван Гутман, професор емеритус, Природно-математички факултет у Крагујевцу, ужа научна област: Физичка хемија
2. Др Драган Амић, редовити професор у трајном знанствено-наставном звању, Пољопривредни факултет, Свеучилиште Josipa Jurja Strossmayera у Осиеку, знанствена грана: Органска хемија
3. Др Светлана Марковић, редовни професор, Природно-математички факултет у Крагујевцу, ужа научна област: Физичка хемија
4. Др Зоран Марковић, ванредни професор, Државни универзитет у Новом Пазару, ужа научна област: Хемија (ментор)
5. Др Јасмина Димитрић-Марковић, ванредни професор, Факултет за физичку хемију у Београду, ужа научна област: Физичка хемија – спектрохемија

Комисија за одбрану докторске дисертације: број одлуке 790/X-1, 02.10.2013.

1. Др Иван Гутман, професор емеритус, Природно-математички факултет у Крагујевцу, ужа научна област: Физичка хемија
2. Др Драган Амић, редовити професор у трајном званствено-наставном звању, Пољопривредни факултет, Свеучилиште Јосипа Јурја Строссмayerа у Осијеку, Знанствена грана: Органска хемија
3. Др Светлана Марковић, редовни професор, Природно-математички факултет у Крагујевцу, ужа научна област: Физичка хемија
4. Др Зоран Марковић, ванредни професор, Државни универзитет у Новом Пазару, ужа научна област: Хемија (ментор)
5. Др Јасмина Димитрић-Марковић, ванредни професор, Факултет за физичку хемију у Београду, ужа научна област: Физичка хемија – спектрохемија

Датум одбране дисертације:

Ова докторска дисертација је урађена у Институту за хемијске науке Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу.

Тему докторске дисертације предложио је др Зоран Марковић, ванредни професор на Хемијско-технолошком департману Државног Универзитета у Новом Пазару. Са великим поштовањем, искрено се захваљујем ментору на пруженој несебичној подршци током израде и писања ове докторске дисертације.

Члановима комисије, проф. др Ивану Гутману, проф. др Светлани Марковић и проф. др Јасмини Димитрић-Марковић дугујем захвалност за све корисне сугестије и савете који су допринели бољем квалитету ове докторске дисертације.

Посебно се захваљујем проф. др Драгану Амићу са Пољопривредног факултета Свеучилишта Josipa Jurja Strossmayera у Осијеку на корисним саветима током израде докторске дисертације.

Такође се захваљујем MSc Јелени Ђоровић и др Светлани Јеремић на великој колегијалности током израде дисертације.

Највећу захвалност дугујем својој мајци Слободанки, оцу Александру, сестри Данијели, сестрићу Матеји и зету Горану на великој подршци током израде и писања дисертације.

# Садржај

Списак слика .....	1
Списак табела .....	3
Извод .....	4
Summary .....	6
<b>1. ОПШТИ ДЕО .....</b>	<b>8</b>
1.1. Флавоноиди, појам и значај .....	9
1.2. Основна структура флавоноида .....	11
1.3. Методе одређивања антиоксидативне активности флавоноида .....	14
1.3.1. ABTS метода .....	15
1.3.2. DPPH метода .....	16
1.3.3. Реакције са $Cl_3COO$ радикалом .....	17
1.3.4. Реакција са галвиноксил радикалом .....	18
1.4. Структурне особине и антиоксидативна активност флавоноида .....	18
1.4.1. Улога 2,3-двоструке везе и 4-кето групе .....	20
1.4.2. Улога хидроксилних група .....	21
1.5. Антиоксидативни механизми флавоноида .....	24
1.5.1. Антиоксидативна активност флавоноида по НАТ механизму .....	25
1.5.2. Антиоксидативна активност флавоноида по SET-PT механизму .....	25

1.5.3.	Антиоксидативна активност флавоноида по SPLET механизму .....	26
1.6.	Бајкалеин .....	27
<b>2.</b>	<b>О РАЧУНАРСКИМ МЕТОДАМА</b> .....	<b>28</b>
2.1.	Увод .....	29
2.2.	Шредингерова једначина .....	29
2.3.	Варијациони принцип за основно стање .....	30
2.4.	Апроксимације за решавање Шредингерове једначине .....	30
2.4.1.	Борн-Опенхајмерова апроксимација .....	31
2.4.2.	Слејгера детерминанта .....	32
2.4.3.	Хартри-Фокова апроксимација .....	33
2.4.4.	Ротхан-Холове једначине .....	34
2.4.5.	Корелациона енергија .....	36
2.5.	Теорија функционала густине .....	36
2.5.1.	Функционали измене/корелације .....	40
2.5.2.	Апроксимација локалне густине и локалне спинске густине .....	40
2.5.3.	Апроксимација генерализованог градијента .....	41
2.5.4.	Хибридни функционали .....	42
<b>3.</b>	<b>НАШИ РАДОВИ</b> .....	<b>45</b>
3.1.	Структура бајкалеина .....	46

3.2.	Спектралне особине бајкалеина .....	53
3.2.1.	IR и Раманска спектрална анализа бајкалеина .....	53
3.2.2.	UV/Vis спектри .....	63
3.3.	Честице које настају у процесу антиоксидативног деловања бајкалеина .....	66
3.3.1.	Радикали бајкалеина .....	66
3.3.2.	Ањони бајкалеина .....	71
3.3.3.	Радикал катјон бајкалеина .....	75
3.3.4.	Радикали изведени из радикал катјона бајкалеина .....	79
3.4.	Антиоксидативни механизми бајкалеина .....	81
3.4.1.	НАТ механизам код бајкалеина .....	85
3.4.2.	SET-PT механизам код бајкалеина .....	89
<b>4.</b>	<b>ЗАКЉУЧАК</b> .....	<b>91</b>
<b>5.</b>	<b>ЛИТЕРАТУРА</b> .....	<b>95</b>
<b>6.</b>	<b>ПРИЛОГ</b> .....	<b>105</b>
6.1.	Биографија .....	106
6.2.	Списак публикованих радова .....	107
6.3.	Публиковани научни радови у којима су презентовани резултати докторске дисертације .....	109

## Списак слика:

Слика 1.1. Структурне формуле једињења из класе флавоноида.

Слика 1.2. Утицај гликозиловања на антиоксидативну активност лутеолина.

Слика 1.3. Најважнији процијанидни тримери који се користе у људској исхрани.

Слика 1.4. Структура АВТS радикал катјона.

Слика 1.5. Тролокс (6-хидрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-карбоксилна киселина).

Слика 1.6. Структура DPPH радикала.

Слика 1.7. Генерисање  $Cl_3COO$  радикала помоћу  $\bullet OH$

Слика 1.8. Константе брзине реакције различитих фенола са  $Cl_3COO$  радикалом.

Слика 1.9. Структура галвиноксил радикала.

Слика 1.10. Структурне групе важне за хватање слободних радикала.

Слика 1.11. 2,3-двострука веза и 4-кето група одговорна за реакцију са слободним радикалима.

Слика 1.12. Утицај броја и распореда хидроксилних група одговорних за антиоксидативну активност.

Слика 1.13. Утицај хидроксилне групе у положају 3- на антиоксидативну активност.

Слика 3.1. Нумерисани атоми бајкалеина и његови диедарски углови ( $\omega_1$ -  $\omega_3$  и  $\tau$ ).

Слика 3.2. Најстабилнија конформација молекула бајкалеина 1. 1a, 1b, и 1c су мање стабилни ротамери.

Слика 3.3. Енергетски профил за ротацију прстена В око везе  $C_2-C_1'$  код бајкалеина.

Слика 3.4. Зависност израчунатих од експериментално одређених дужина веза код бајкалеина.

Слика 3.5. Зависност израчунатих од експериментално одређених углова веза код бајкалеина.

Слика 3.6. IR (a) и Рамански (b) спектри бајкалеина. На обе слике експериментално добијен спектар је приказан горе, а израчунат доле.

Слика 3.7. Експериментални IR (горе) и Рамански (доле) спектар бајкалеина у области од 1800 до 400  $cm^{-1}$ .

Слика 3.8. Експериментални спектар (горе) и симулирани спектри (доле): А - спектар симулиран помоћу В3LYP/6-311+G(2df,p) модела; В - спектар симулиран помоћу PBE/6-311+G(2df,p) модела.

Слика 3.9. Орбитале одговорне за електронске прелазе у UV спектру бајкалеина.



Слика 3.10. Структуре радикала бајкалеина O5R, O6R и O7R. Сваки радикал је приказан са свим својим ротамерима.

Слика 3.11. Енергетски профил за ротацију око C2-C1' везе за O6R1 радикал. Оптимизација је изведена помоћу M05-2X/6-311+G(d,p) модела у гасу и води.

Слика 3.12. Расподела спинске густине код најстабилнијих ротамера радикала бајкалеина у гасовитој и воденој фази.

Слика 3.13. Структуре анјона бајкалеина O5A, O6A и O7A. Сваки анјон је приказан са свим својим ротамерима.

Слика 3.14. Расподела негативног наелектрисања код најстабилнијих ротамера анјона у гасовитој и воденој фази.

Слика 3.15. Резонанционе структуре код анјона O7A.

Слика 3.16. Расподела спинске густине и мапа спинске густине радикал катјона бајкалеина.

Слика 3.17. Расподела наелектрисања код бајкалеина (лево) и његовог радикал катјона (десно).

Слика 3.18. Оптимизоване геометрије радикала C4-O, C6-O и C7-O са значајним вредностима спинске густине.

Слика 3.19. Оптимизоване геометрије прелазних стања у гасовитој фази са назначеним значајним међуатомским растојањима (pm) и одговарајућим резултатима IRC рачуна.

Слика 3.20. Расподела спинске густине у пост-реакционом комплексу у положају 6.

Слика 3.21. Реакциони пут за НАТ механизам бајкалеина у положају 6.

## Списак табела:

Табела 1.1. Антиоксидативне активности флавоноида у зависности од њихових структурних особина.

Табела 3.1. Енергије (kJ/mol) израчунате помоћу M05-2X/6-311+G(d,p) и B3LYP/6-311+G(d,p) модела за изоловане и солватисане ротамере бајкалеина

Табела 3.2. Дужине веза код бајкалеина (pm).

Табела 3.3. Углови веза код бајкалеина (°).

Табела 3.4. Донорско-акцепторске интеракције одговорне за водоничне везе код бајкалеина.

Табела 3.5. Експериментално добијени и израчунати положаји трака у IR и Раманским спектрима бајкалеина, асигнација и интензитети нормалних облика.

Табела 3.6. Експериментални и израчунати електронски прелази код бајкалеина.

Табела 3.7. Релативне енергије (kJ/mol) израчунате помоћу M05-2X/6-311+G(d,p) модела за ротамере радикала бајкалеина у гасовитој и воденој фази.

Табела 3.8. Дужине веза и торзиони угао  $\tau$  за најстабилнији ротамер бајкалеина 1, и најстабилнији ротамер радикала и анјона бајкалеина (O6R1 и O7A2) у гасовитој и воденој фази.

Табела 3.9. Термодинамички параметри (kJ/mol) за ротамере анјона бајкалеина у гасовитој и воденој фази.

Табела 3.10. Дужине веза (pm) и торзиони угао за бајкалеин и његов радикал катјон.

Табела 3.11. Вредности за дужине веза, углове веза и торзиони угао  $\tau$  за оптимизоване структуре радикала.

Табела 3.12. Термодинамички параметри за сва три антиоксидативна механизма бајкалеина и фенол (kJ/mol) израчунати помоћу M05-2X/6-311+G(d,p) модела у гасовитој и воденој фази.

Табела 3.13.  $\Delta BDE$  и  $\Delta IP$  вредности (kJ/mol) OH група бајкалеина у односу на фенол.

Табела 3.14. Спинска густина и парцијално негативно наелектрисање за реактанте, прелазна стања и производе.

Табела 3.15. Израчунате вредности термодинамичких величина за реакцију бајкалеина и хидрокси радикала.  $\Delta G_a^\ddagger$ ,  $k$  и  $\Delta G_r$  означавају слободну енергију активације, константу брзине и слободну енергију реакције.

## ИЗВОД

Иако је антиоксидативна активност флавоноида објекат веома интезивног експерименталног и теоријског истраживања, антиоксидативно деловање бајкалеина се испитује тек однедавно. У оквиру ове дисертације испитивани су механизми антиоксидативног деловања бајкалеина, и то **HAT (Hydrogen Atom Transfer)**, **SET-PT (Sequential Electron Transfer – Proton Transfer)** и **SPLET (Sequential Proton Loss Electron Transfer)**. Испитивање антиоксидативних активности бајкалеина је изведено у корелацији са испитивањем структурних и електронских особина бајкалеина.

Резултати ове докторске дисертације добијени су помоћу метода функционала густине, које су имплементирани у програмски пакет Gaussian: M05-2X, B3LYP и PBE, у комбинацији са базисним скуповима 6-311+G(d,p) и 6-311+G(2df,p). Прорачуни су изведени за гасовиту фазу и водени раствор. За процену ефеката воде као растварача коришћен је солватациони модел заснован на континуму – CPCM. Урађена је NBO (Natural Bond Orbital) анализа свих оптимизованих геометрија ради утврђивања ефеката који проистичу из електронске структуре.

Бајкалеин је непланаран молекул, што показује експериментална ( $9.0^\circ$ ) и израчуната ( $24.5^\circ$ ) вредност за диједарски угао између прстенова В и С. У најстабилнијој конформацији бајкалеин има три водоничне везе које имају стабилизациони ефекат. Водонична веза  $D_H(H5--O4)$  даје највећи допринос стабилизацији молекула бајкалеина, што је потврдила и NBO анализа.

Извршено је симулирање вибрационих и UV/Vis спектра бајкалеина и поређење са одговарајућим експерименталним спектрима. Постигнуто је одлично слагање између експериментално добијених и симулираних IR, Раманских и UV спектра. Уз помоћ симулираних спектра извршена је прецизна асигнација вибрационих модова у IR и Раманском спектру. Одређене су молекулске орбитале бајкалеина између којих се врше електронски прелази одговорни за UV спектар.

Испитани су сви радикали, анјони и радикал катјон бајкалеина, који имају важну улогу у антиоксидативним механизмима бајкалеина. Положај 6 најповољнији је за хомолитичко раскидање O–H везе у гасовитој фази, док је положај 7 најповољнији за хетеролитичко раскидање O–H везе у воденој фази. Расподела спинске густине у најстабилнијем O6R1 радикалу показује да је неспарени електрон веома добро

делокализован, чиме се може објаснити стабилност овог радикала и способност бајкалеина да делује антиоксидативно по НАТ механизму. Расподела наелектрисања у најстабилнијем ањону O7A2, показала је да постоји делокализација негативног наелектрисања у прстену А. Овај ањон се јако стабилизује у воденом раствору, чиме се може објаснити способност бајкалеина да делује антиоксидативно по SPLET механизму.

Наша истраживања предвиђају планарну структуру за радикал катјон бајкалеина. Занимљива особина радикал катјона у односу на молекул бајкалеина је та да је Н атом прешао са O5 на O4, чиме се постиже делокализација неспареног електрона преко прстена А, и тако смањује нестабилност настала губитком електрона. Хетеролитичком дисоцијацијом из радикал катјона настају три радикала. Испитане су структуре сва три радикала. Нађено је да је делокализација спинске густине највише изражена у термодинамички најстабилнијем C6–O радикалу.

BDE, PA и IP вредности послужиле су у одређивању термодинамички најповољнијег реакционог пута. НАТ механизам је најповољнији реакциони пут антиоксидативног деловања бајкалеина у гасовитој фази. Са друге стране, SPLET механизам је термодинамички најповољнији реакциони пут у воденој фази. SET-PT није повољан реакциони пут бајкалеина ни у гасовитој ни у воденој фази.

Започета су механистичка истраживања антиоксидативног деловања бајкалеина. Симулација реакције бајкалеина са хидрокси радикалом потврдила је да је НАТ доминантан реакциони пут у гасовитој фази, и да је положај 6 најреактивнији. Услед више енергије р орбитала хидроксидног и метантиолатног ањона у односу на енергију SOMO орбитале радикал катјона, ни радикал катјон не реагује по SET-PT, него по НАТ механизму у гасовитој фази. Досадашња механистичка истраживања су у потпуној сагласности са резултатима термодинамичких истраживања.

Имајући у виду преглед стања у досадашњем истраживању антиоксидативног деловања флавоноида, добијени резултати, који проистичу из ове дисертације, пружају значајан допринос разумевању сложених механизма преко којих бајкалеин остварује своје антиоксидативно деловање, тим пре што у овој области има веома мало објављених резултата. Очекује се да ће добијени резултати, применом комплементарних приступа, допринети бољем разумевању структурних и електронских особина других полифенола.

## SUMMARY

Antioxidative activity of flavonoids has been a subject of intensive experimental and theoretical investigation. Nevertheless, the research concerning antioxidative action of baicalein has been initiated only recently. Within this doctoral dissertation the mechanisms of antioxidative action of baicalein: **HAT (Hydrogen Atom Transfer)**, **SET-PT (Sequential Electron Transfer – Proton Transfer)**, and **SPLET (Sequential Proton Loss Electron Transfer)** were examined. The investigation of antioxidative activity of baicalein was performed in correlation with the investigation of structural and electronic properties of baicalein.

The results of the present doctoral dissertation were obtained by using the DFT methods, as implemented in the Gaussian program package: M05-2X, B3LYP and PBE, combined with the 6-311+G(d,p) and 6-311+G(2df,p) basis sets. The calculations were performed for the gas phase and aqueous solution. To estimate the effects of water as solvent a continuum-based solvation model, CPCM, was used. The NBO (Natural **Bond Orbital**) analysis of all optimized geometries was performed, to reveal the effects that emanate from the electronic structure.

Baicalein is a non-planar molecule, as documented with the experimental ( $9.0^\circ$ ) and calculated ( $24.5^\circ$ ) value for the dihedral angle between the B and C rings. In its most stable conformation baicalein has three hydrogen bonds with the stabilizing effect. The  $D_H(H5--O4)$  hydrogen bond contributes most to the stabilization of the baicalein molecule. This finding was confirmed with the NBO analysis.

The vibrational and UV/Vis spectra of baicalein were simulated, and compared to the corresponding experimental spectra. Excellent agreement between the experimentally obtained and simulated IR, Raman and UV spectra was achieved. Using the simulated spectra, a precise assignation of the vibrational modes in the IR and Raman spectra was accomplished. Some molecular orbitals of baicalein were distinguished. The electron transitions responsible for the UV spectrum occur among these orbitals.

All radicals, anions, and radical cation of baicalein were examined, because they play a significant role in the antioxidative mechanisms of baicalein. The 6 site is most favorable for homolytic cleavage of the O–H bond in the gas phase, whereas the 7 site is most favorable for heterolytic cleavage of the O–H bond in the aqueous solution. The spin density

distribution in the most stable O6R1 radical reveals that the unpaired electron is delocalized very well. This finding can explain the stability of this radical and antioxidative action of baicalein according to the HAT mechanism. The charge distribution in the most stable anion O7A2 showed that there is delocalization of the negative charge in the A ring. This anion is strongly stabilized in the aqueous solution. Antioxidative action of baicalein according to the SPLET mechanism can be attributed to this fact.

Our investigations predict a planar structure of the baicalein radical cation. An interesting feature of the radical cation in comparison to the baicalein molecule is that the H atom is transferred from O5 to O4. In this way delocalization of the unpaired electron is realized over the A ring, and, thus, the instability induced by the loss of an electron is reduced. Heterolytic dissociation of the radical cation yields three radicals. The structures of all three radicals were examined. It was found that the spin density delocalization is most pronounced in the thermodynamically most stable C6–O radical.

BDE, PA, and IP values served to determine thermodynamically most favorable reaction pathway. The HAT mechanism is most favorable reaction pathway for antioxidative action of baicalein in the gas phase. On the other hand, the SPLET mechanism is most favorable reaction pathway for antioxidative action of baicalein in the aqueous phase. SET-PT is not favorable mechanism of antioxidative action of baicalein in either gas or aqueous phase.

Mechanistic investigations of antioxidative action of baicalein have been commenced. A simulation of the reaction of baicalein with the hydroxyl radical confirmed that HAT is the dominant reaction pathway in the gas phase, and that the 6 position is most reactive. Due to the higher energies of the p orbitals of the hydroxide and methanthiolate anions in comparison to the energy of the SOMO of the radical cation, the radical cation does not conform to the SET-PT, but to the HAT mechanism in the gas phase. So far, our mechanistic investigations are in perfect accord with the results of thermodynamical research.

Bearing in mind the findings of previous research regarding antioxidative activity of flavonoids, the results of this doctoral dissertation provide a significant contribution to understanding the complex mechanisms through which antioxidative action of baicalein is realized. It should be emphasized that there are very few published results in this scientific field. It is expected that these results, by applying complementary approaches, will contribute to a better understanding of the structural and electronic properties of other polyphenols.

## **1. ОПШТИ ДЕО**

### 1.1. Флавоноиди, појам и значај

Флавоноиди (добили су име од латинске речи *flavus*, што значи жут) представљају групу полифенолних једињења која се налазе у многим биљкама, воћу и поврћу. Познати су по карактеристичним црвеним, плавим и пурпурним антоцијанидним пигментима у биљкама. Ова група једињења представља важну компоненту у људској исхрани. Извори флавоноида у храни су чоколада, поврће, воће, орашасто воће, семенке и корење, док су извори флавоноида у пићу вино, чај, итд.



Флавоноиди у последње време привлаче пуно пажње због своје изванредне антиоксидативне активности. Истраживања су показала да флавоноиди добро реагују са слободним радикалима, при чему настају мање реактивни флавоноидни феноксидни радикали, па зато имају важну улогу у фармацеутској и прехранбеној индустрији као лекови и антиоксиданти. Флавоноиди имају и низ других биохемијских функција. Заштитна улога флавоноида у биолошким системима приписује се њиховој способности спаривања електрона слободног радикала, и хелатног везивања јона прелазних метала ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ) [1], активирања антиоксидативних ензима [2] и инхибирања оксидаза [3]. Због своје антиоксидативне активности сматра се да



флавоноиди имају антибактеријско, антиалергијско, антиканцерогено деловање, а такође се зна да имају и велики утицај на укус и боју хране [4].

Биљни производи који су богати флавоноидима играју важну улогу у исхрани људи, јер утичу превентивно на очување њиховог здравља. Паркинсонова болест је прогресивно обољење које подразумева постепени губитак нервних ћелија у одређеним деловима мозга, доводећи до проблема са контролом покрета и другим симптомима који се не односе на кретање [5-7]. Неконтролисана производња реактивних кисеоникових врста (РОС-а) има улогу у патогенези Паркинсонове болести [8], што се огледа у промени активности унутарћелијских ензимских антиоксиданата - супероксид дисмутазе, каталазе или глутатион пероксидазе. Код Паркинсонове болести је повећана липидна пероксидација [9], низак је ниво редукованог глутатиона [10-12], оштећена је функција митохондрија [13-14], услед оксидативног стреса приликом кога се генерише РОС [15].

Редовно конзумирање воћа смањује ризик од појаве Паркинсонове болести. То посебно важи за мушкарце, који могу да смање ризик редовним конзумирањем јабука, поморанци и других извора корисних флавоноида. Испитивања су показала да мушкарци који су чешће конзумирали воће, имали су 40% мањи ризик да оболе од Паркинсонове болести. Редовно конзумирање хране богате антоцијанидинима, подкласе флавоноида, који углавном потичу из јагодичастог воћа, тесно су повезани са мањим ризиком од Паркинсонове болести код мушкараца и жена. Сматра се да антоцијанидини у овом воћу делују заштитнички на нервне ћелије мозга.

### ***Француски парадокс***

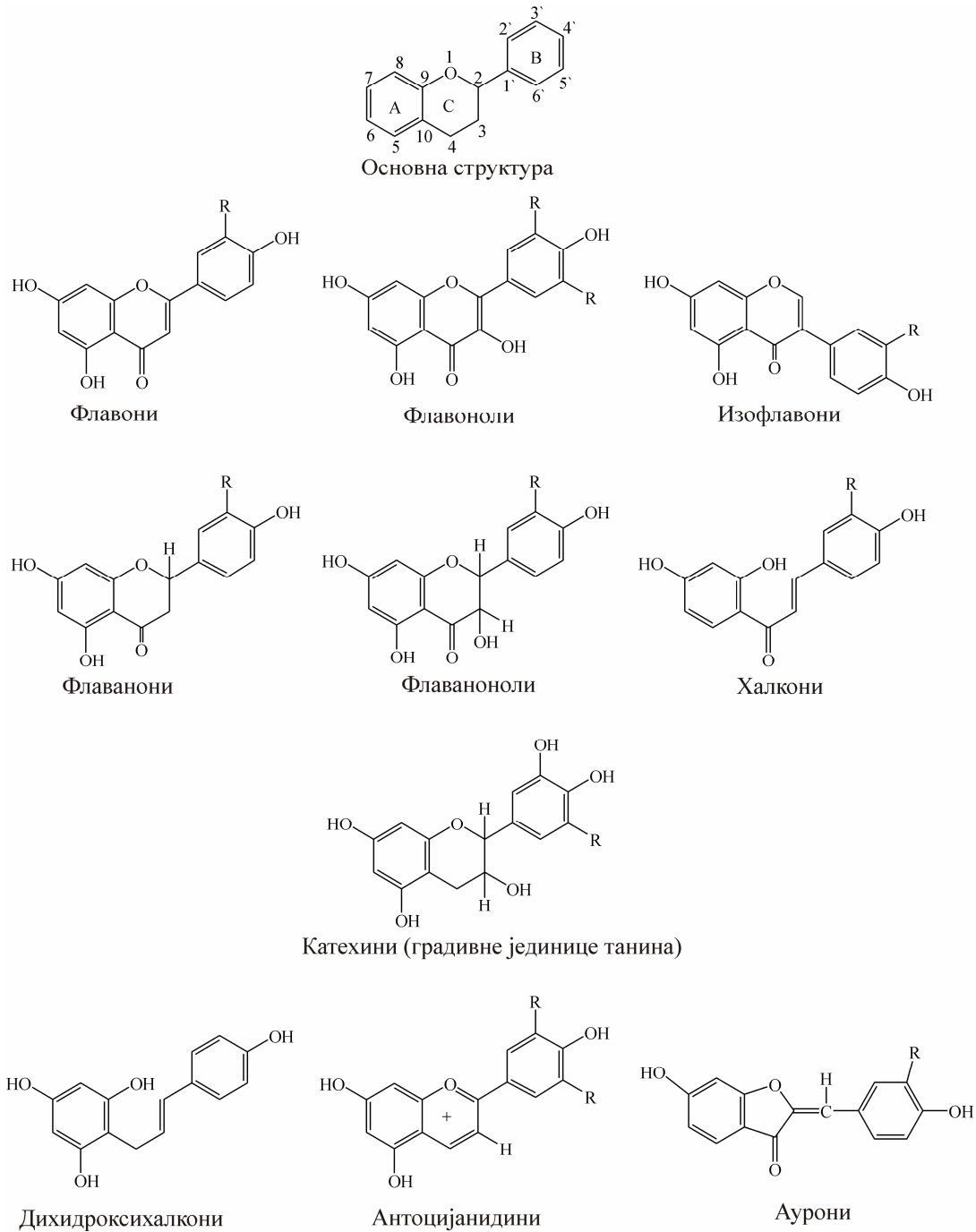
Појам “француски парадокс” односи се на појаву да у становништву јужне Француске налазимо мање кардиоваскуларних болести, премда исхрана, у просеку, садржи већу количину засићених масти него просечна исхрана становништва осталих развијених земаља. Почетна истраживања тог феномена показују да конзумирање умерене количине вина, посебно црног вина, може смањити ризик од болести срца и до 40 % [16]. Нека компонента црног вина одговорна је за заштиту од ове болести. Доказано је да изоловани полифеноли из црног вина спречавају оксидацију LDL-холестерола и на тај начин заустављају настанак атеросклерозе.

## 1.2. Основна структура флавоноида

Основну структуру флавоноида чини дифенилпропан ( $C_6C_3C_6$ ), односно 1-фенил-3-(2-хидроксифенил)пропан-1-ол из којег се губитком воде и затварањем С-прстена добија флаван, од којег се изводи велики број различитих једињења сличне структуре. Основна структура на слици 1.1 нам даје информације о усвојеној номенклатури ових једињења. Прстенови се обележавају са А, В и С, а атоми у прстеновима одговарајућим арапским бројевима. Групи флавоноида припадају следеће подкласе:

- флавони,
- флавоноли,
- изофлаволи,
- флавонони,
- флаваноноли,
- халкони,
- катехини (градивне јединице танина),
- дихидроксиалкони,
- антоцијанидини,
- аурони.

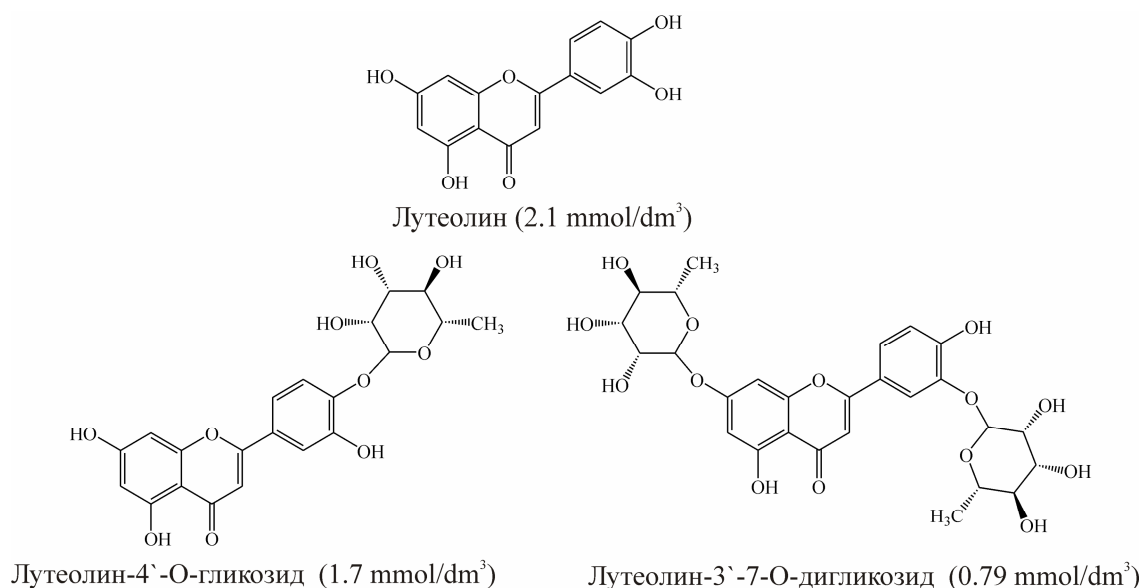
До данас је изоловано преко 9000 флавоноида. На слици 1.1 су приказане структурне формуле једињења из класе флавоноида.



Слика 1.1. Структурне формуле једињења из класе флавоноида

У готово свакој биљци пронађени су флавоноли и у мањој мери флаволи [17]. Интересантно је да поједине биљке могу садржати и до 50 различитих флавоноида. Флаванони и флаволи често се налазе заједно, нпр. у агрумима и повезани су са специфичним ензимима, за разлику од флаволи и флавонола који се међусобно искључују у многим биљкама [18].

Разлике у појединим подкласама флавоноида потичу од различитог степена оксидованости прстена С. Крајње редукована подкласа су катехини а крајње оксидована флавоноли. Најчешће се јављају флавони и флавоноли са хидроксилним групама у положајима 3' и 4' у прстену В, а ређе они с хидроксилном групом само у положају 4'. Гликозиловање код флавоноида догађа се најчешће у положају 3, а ређе у положају 7. Шећер који се веже на агликонски део (део који не садржи шећер) углавном је глукоза, поред глукозе могу се везати галактоза, рамноза и ксилоза. Агликони су снажнији антиоксиданти од одговарајућих гликозида [19, 20].

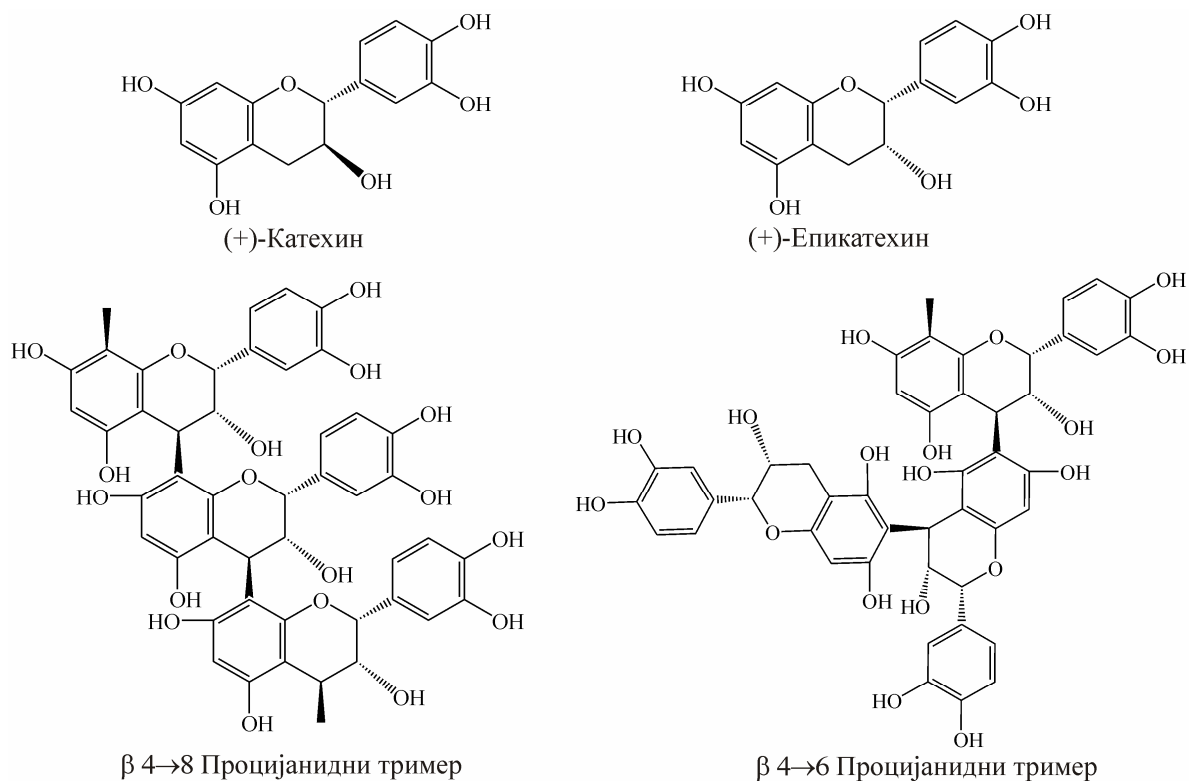


Слика 1.2. Утицај гликозиловања на антиоксидативну активност лутеолина

Да бисмо ово илустровали упоредили смо Тролокс антиоксидативни капацитет (ТЕАС)-вредност лутеолина са његовим 4'-моно и 3',7-дигликозидом. Као што се види са слике 1.2, антиоксидативна активност флавоноидних гликозида се смањује са порастом броја гликозидних група. Поред присуства укупног броја гликозидних група важну улогу има положај у којем се налази поједина група, као и структура шећера.

Флавоноиди који су заступљени у храни разликују се по положају хидроксилних, метокси и гликозидних група, и у конјугацији између прстенова А и В. Флавоноиди у биљкама углавном су у облику 3-О-гликозида или у облику полимера. До полимеризације флаванола у танин и остала сложена једињења долази приликом

ферментације, ензимском оксидацијом лишћа зеленог у црни чај. Танини или галотанини су естри 3,4,5-трихидроксибензојеве киселине. Галатна група тих танина и мономерних катехина у зеленом чају делимично је одговорна за способност хелације и хватања слободних радикала. Кондензовани танини или проантоцијанидини састоје се од флаванолских јединица којих може бити и до 17 у једном молекулу. За људску исхрану најважнија од тих једињења су **процијанидини** који се састоје од мономера (+)-катехина и (-)-епикатехина. (-)-Катехини и (+)-епикатехини су фитотоксични, и неке их биљке синтетизују у корену да би спречиле насељавање других биљака на тој територији [21]. Процијанидни димери, тримери и олигомери који се налазе у црним винима, семенкама грожђа, јабукама и семенкама какаоа везани су  $\beta 4 \rightarrow 6$  (веза између атома С6 крајњег молекула и атома С4 почетног молекула) и  $\beta 4 \rightarrow 8$  (веза између атома С8 крајњег молекула и атома С4 почетног молекула) везама (слика 1.3).



Слика 1.3. Најважнији процијанидни тримери који се користе у људској исхрани

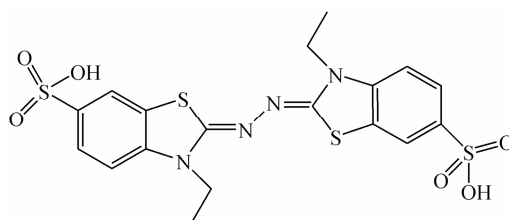
### 1.3. Методе одређивања антиоксидативне активности флавоноида

За одређивање антиоксидативне активности флавоноида до сада су развијене многе методе, као што су одређивање способности реаговања са реактивним

кисеониковим врстама [22,23-26], одређивање способности реаговања са радикалима, нпр. 1,1-дифенил-2-пикрилхидразил радикалом (DPPH) и 2,2'-азинобис-(3-етилбензо-тиазолин-6-сулфонат) (ABTS) радикал катјоном [27], и ензимско и неензимско мерење инхибиције липидне пероксидације. Све ове методе су углавном ограничене на релативно упоређивање са референтним једињењима.

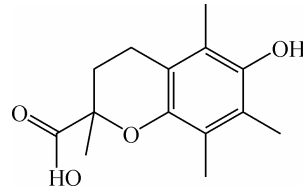
### 1.3.1. ABTS метода

2,2'-азинобис-(3-етилбензо-тиазолин-6-сулфонат) је безбојна натријумова или амонијумова со (ABTS), која може формирати плаво-зелени ABTS радикал катјон (слика 1.4) хемијском или ензимском оксидацијом неколико сати пре анализе. За оксидацију раствора ABTS-а користи се раствор калијум-персулфата  $K_2S_2O_8$ . Мешавина се онда разблажи етанолом, при чему се достиже максимум апсорбанце од  $0.7 \pm 0.02$  на таласној дужини од 734 nm. Ова апсорбанца се дефинише као референтна апсорбанца ( $A_{ref}$ ). Када се ABTS радикал катјон меша са антиоксидантом, долази до редукције генерисаног ABTS радикал катјона, те се апсорбанца смањује до стабилне вредности ( $A_{detect}$ ), због реакције антиоксиданта са ABTS радикал катјоном. Антиоксидативна активност супстанце у процентима се израчунава на основу формуле  $(1-A_{detect}/A_{ref}) \times 100$ . Ово је најједноставнија примена ABTS радикал катјона за испитивање укупне антиоксидативне способности у храни и узорцима крви. Интеракција између антиоксиданта и ABTS радикал катјона показује укупну антиоксидативну способност молекула, дакле, не може дати квантитативну оцену способности појединачних хидроксилних група [28].



Слика 1.4. Структура ABTS радикал катјона

Тролокс (6-хидрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-карбоксилна киселина, слика 1.5) је комерцијални синтетички антиоксидант, који је у води растворан дериват витамина Е.

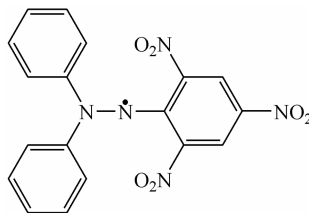


Слика 1.5. Тролокс (6-хидрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-карбоксилна киселина)

Тролокс је референтни антиоксидант који реагује са ABTS радикал катјоном. Потребно је да и други антиоксиданти реагују са ABTS радикал катјоном под истим експерименталним условима. Резултати за друге антиоксиданте у хватању ABTS радикал катјона се пореде са Тролоксом, и добијене вредности се изражавају као Тролокс антиоксидативни капацитет (TEAC) [29].

### 1.3.2. DPPH метода

DPPH радикал (слика 1.6) на собној температури је стабилан радикал са N-центром, и користи се за испитивање способности хватања радикала антиоксидантима. Због свог неспареног електрона, DPPH радикал растворен у етанолу показује апсорпцију у видљивом делу спектра (љубичаста боја) на таласној дужини од 517 nm ( $A_{\text{ref}}$  око 1.0). Додатком антиоксиданта смањује се апсорбанца раствора до стабилне вредности ( $A_{\text{detect}}$ ), што се такође огледа у промени боје из љубичасте у жуту. Способност антиоксиданта да ухвати DPPH радикал (%) израчунава се помоћу формуле  $(1 - A_{\text{detect}}/A_{\text{ref}}) \times 100$ .



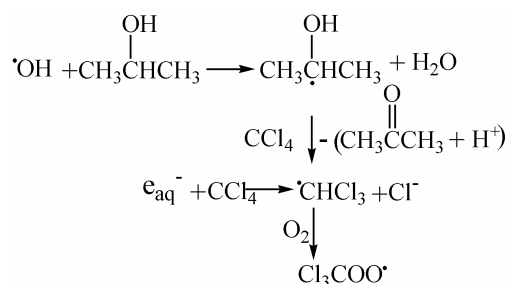
Слика 1.6. Структура DPPH радикала

На основу антиоксидативне способности за различите концентрације узорака изражене у процентима, одређује се  $IC_{50}$ .  $IC_{50}$  представља концентрацију узорка која је потребна за инхибирање 50% DPPH радикала или ABTS радикал катјона. Овај податак се користи да се искаже антиоксидативни капацитет испитиване супстанце. Мале вредности  $IC_{50}$  за неко једињење показују да се оно понаша као јак антиоксидант.

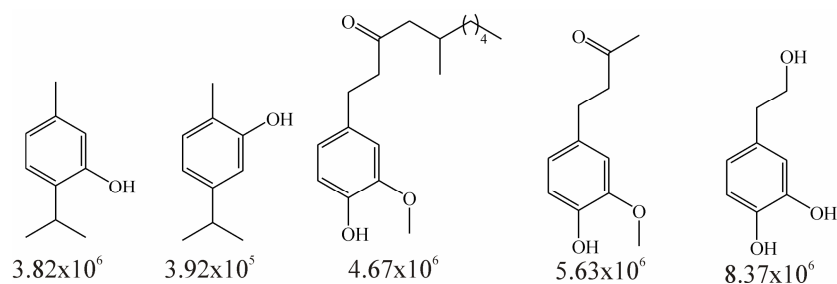
У новије време уместо доста несигурног одређивања концентрације флавоноида при којој се почетна концентрација DPPH смањи на 50 % ( $EC_{50}/IC_{50}$  вредност), уведене су нове методе које се заснивају на одређивању константе брзине и других кинетичких параметара реакције [30].

### 1.3.3. Реакције са $Cl_3COO$ радикалом

Трихлорометил перокси ( $Cl_3COO$ ) радикал се такође користи за испитивање антиоксидативне активности различитих антиоксиданата.  $Cl_3COO$  радикал се генерише у мешавини која садржи 1%  $CCl_4$  (v/v) и 5%  $(CH_3)_2CHOH$  (v/v) у 10 mM  $KH_2PO_4$ - $KOH$  пуферу на  $pH = 7.4$ . Сматра се да се  $Cl_3COO$  радикал формира интеракцијом одговарајућих агенаса са  $\cdot OH$  који је генерисан радиолизом (слика 1.7).  $Cl_3COO$  радикал није довољно стабилан да се очува на собној температури. Константе брзине за реакције  $Cl_3COO$  радикала са неким природним фенолима, приказане су на слици 1.8 [31].



Слика 1.7. Генерисање  $Cl_3COO$  радикала помоћу  $\cdot OH$

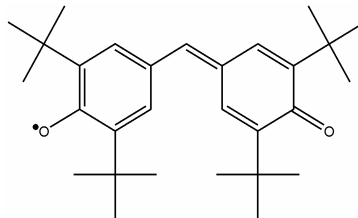


Слика 1.8. Константе брзине реакције различитих фенола са  $Cl_3COO$  радикалом



### 1.3.4. Реакција са галвиноксил радикалом

Галвиноксил радикал (слика 1.9) на собној температури је стабилан радикал са радикалским центром на атому кисеоника. Примена галвиноксил радикала је иста као и DPPH - показује способност антиоксиданата да реагују са слободним радикалима. Антиоксиданти смањују интензитет сигнала галвиноксил радикала у спектрима електрон парамагнетске резонанције, при чему константа брзине реакције између галвиноксил радикала и антиоксиданата може бити прецизно измерена. На пример, константе брзине  $\alpha$ -токоферола и убихинона у реакцији са овим радикалом су  $1.0 \times 10^4$  и  $6.0 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  [32].



Слика 1.9. Структура галвиноксил радикала

На основу слике 1.9 видимо да кисеоник са неспареним електроном у свом окружењу има терц-бутил групе, које стварају стерне сметње за приступ реакционом центру галвиноксил радикала, што има за последицу да овај радикал реагује само са мањим молекулима.

### 1.4. Структурне особине и антиоксидативна активност флавоноида

Флавоноид као антиоксидант мора да задовољи два услова:

1. Када је присутан у малој концентрацији у односу на супстанцу подложну оксидацији, мора битно успорити или спречити реакцију оксидације;

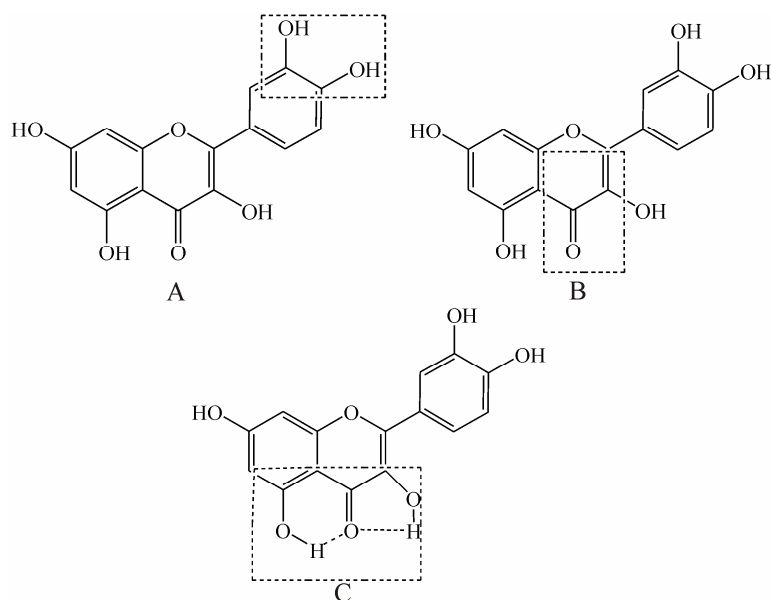
2. Из њега настали радикал мора бити стабилан да не би подстицао ланчану реакцију. Настали радикали се обично стабилизују делокализацијом електрона, стварањем интрамолекулских водоничних веза, или даљом реакцијом са другим радикалом.

Главне структурне особине флавоноида важне за способност реаговања са радикалима су следеће:

1. *o*-дихидроксилна (катехолна) структура у В-прстену која даје стабилност радикалу и омогућује делокализацију електрона (слика 1.10А);

2. Двострука веза између С2 и С3 атома на прстену С је у конјугацији са 4-кето групом на прстену, што омогућује делокализацију електрона из В-прстена (слика 1.10В);

3. Хидроксилне групе на положајима 3 и 5 које обезбеђују водоничну везу са кето групом у положају 4 (слика 1.10С).



Слика 1.10. Структурне групе важне за хватање слободних радикала

Велика пажња се посвећује испитивању антиоксидативне активности флавоноида која произилази из њихове способности да хватају слободне радикале. Познато је да су структурне особине значајан фактор који утиче на антиоксидативне активности флавоноида [33-39]. У табели 1.1 су приказане антиоксидативне активности флавоноида у зависности од њихових структурних особина.

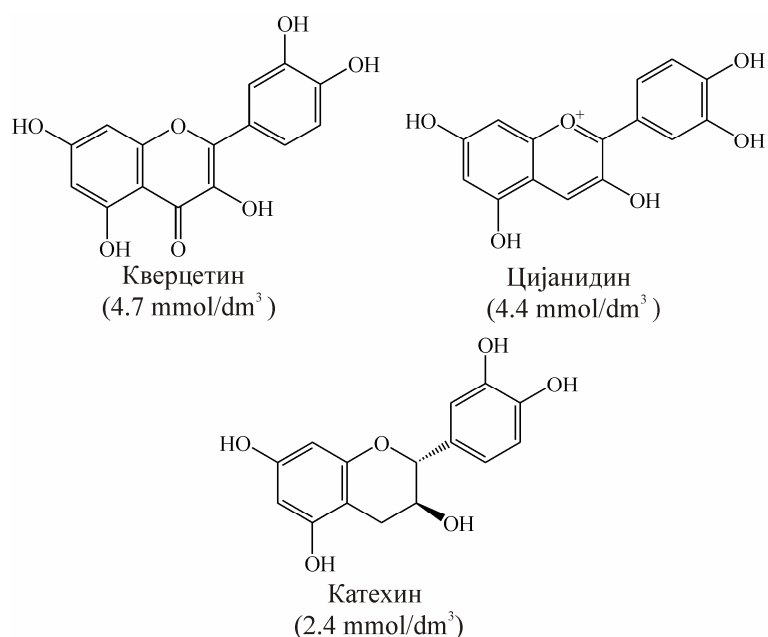
Табела 1.1. Антиоксидативне активности флавоноида у зависности од њихових структурних особина [39,40]

Једињење	Положај слободних ОН група	2,3-двострука веза	Антиоксидативна активност	
			TEAC (mmol/L)	DPPH (%)
<b>Флавоноли</b>				
кверцетин	3,5,7,3', 4'	+	4.7	89.8
епигалокатехин	3,5,7,3', 4', 5'		3.8	
мирицетин	3,5,7,3', 4', 5'	+	3.1	72.8
морин	3,5,7,2', 4'	+	2.5	96.5
епикатехин	3,5,7,3', 4'		2.5	
катехин	3,5,7,3', 4'		2.4	
рутин	5,7,3', 4'	+	2.4	90.9
кемпферол	3,5,7,4'	+	1.3	93.0
галангин	3,5,7		1.2	91.1
фисетин	3,7,3', 4'	+		79.0
<b>Антоцијанидини</b>				
цијанидин	3,5,7,3', 4'		4.4	
пеонидин	3,5,7,4'		2.2	
малвидин	3,5,7,4'		2.1	
пеларгонидин	3,5,7,4'		1.3	
<b>Флавони</b>				
бајкалеин	5,6,7	+	2.6	
лутеолин	5,7,3', 4'	+	2.1	
лутеолин-4'-гликозид	5,7,3'		1.7	
апигенин	5,7,4'	+	1.4	0.7
крисин	5,7	+	1.4	1.1
лутеолин-3',7'-дигликозид	5,4'		0.8	
<b>Флаванони</b>				
таксифолин	3,5,7,3', 4'		1.9	94.8
нарингенин	5,7,4'		1.5	6.3
хеспетин	5,7,3'		1.4	30.0

#### 1.4.1. Улога 2,3-двоструке везе и 4-кето групе

Као што смо рекли, постојање 2,3-двоструке везе заједно са 4-кето групом повећава способност реакције са слободним радикалима. 2,3-двострука веза на прстену је у конјугацији са 4-кето групом, што омогућује делокализацију електрона из В

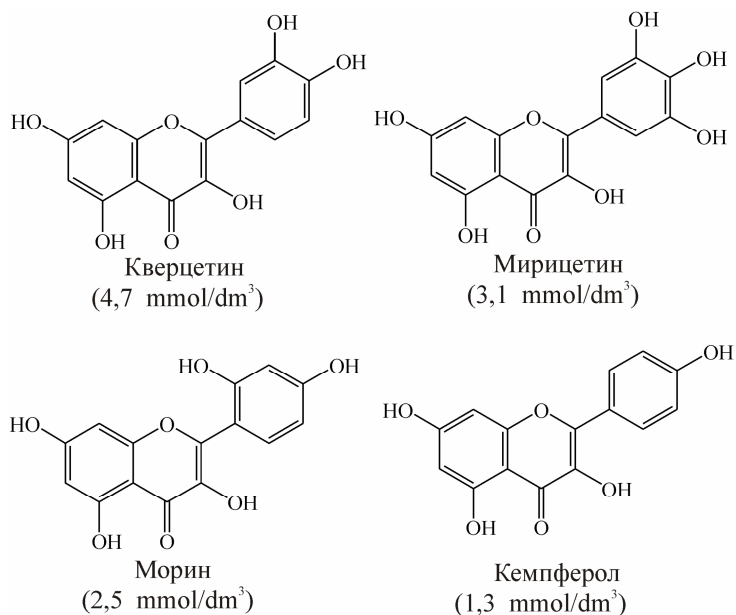
прстена у прстен С, и тиме додатно стабилизује настали радикал. На слици 1.11 су приказане структуре три флавоноида са истим бројем ОН група и њиховим распоредом, али са разликама у прстену С. Кверцетин у прстену С има 2,3-двоструку везу и 4-кето групу и показује највишу ТЕАС вредност [39], цијанидин са својим прстеном С који омогућава конјугацију има скоро једнаку ТЕАС вредност [39]. Ово нам доказује да су постојање незасићења у прстену С и могућност резонанције важни фактори који утичу на стабилност насталог радикала. С друге стране положај двоструке везе у прстену С такође игра важну улогу у стабилизацији насталих радикала. Када се двострука веза налази у положају 2,3 као што је то у случају кверцетина, она доприноси додатној стабилизацији насталог радикала. С друге стране њено непостајање у молекулу потенцијалног антиоксиданта, као у случају катехина (слика 1.11), у знатној мери утиче на мању стабилност насталог радикала.



Слика 1.11. 2,3-двострука веза и 4-кето група одговорна за реакцију са слободним радикалима

#### 1.4.2. Улога хидроксилних група

Антиоксидативна активност већине полифенолних антиоксиданата зависи од распореда и укупног броја хидроксилних група [37,41]. На способност реаговања РОС са флавоноидима највише утичу хидроксилне групе прстена В.

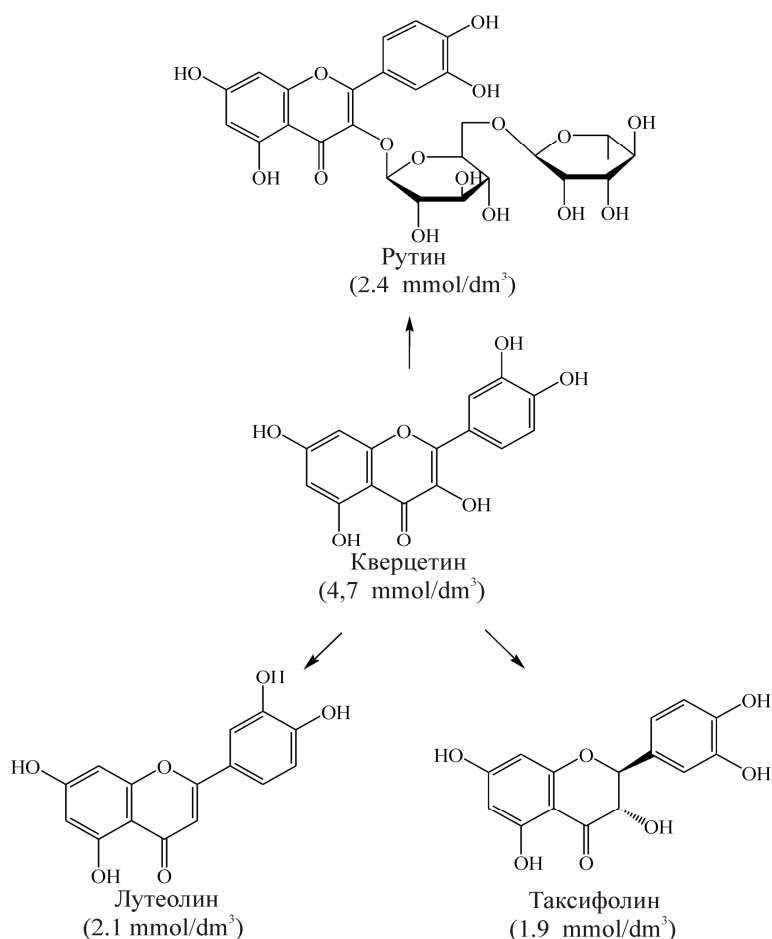


Слика 1.12. Утицај броја и распореда хидроксилних група одговорних за антиоксидативну активност

На слици 1.12 приказана је важност суседства две хидроксилне групе на прстену В за антиоксидативну активност. Кверцетин са *o*-дихидроксилним распоредом има највишу ТЕАС вредност [39], док морин са *m*-дихидроксилним распоредом у прстену В има значајно нижу ТЕАС вредност [39]. Кемпферол има само једну хидроксилну групу у В прстену и има најнижу ТЕАС вредност [39]. То упућује на чињеницу да прстен В са само једном хидроксилном групом није ефикасан донор водоника. Такође, присутност треће хидроксилне групе на прстену В (код мирицетина) не повећава антиоксидативну активност него је чак и смањује у односу на кверцетин. Када је у структури флавоноида присутан катехол, тада се он оксидује на прстену В дајући делокализацијом електрона стабилизован *o*-семихинонски радикал [34,42].

Прстен С доприноси антиоксидативној активности тако што поседује слободну хидроксилну групу на положају 3 [41] и омогућује конјугацију између ароматичних прстенова. Супериорност кверцетина у инхибицији оксидативних оштећења делимично се приписује његовој хидроксилној групи у положају 3 за коју се претпоставља да повећава стабилност флавоноидног радикала [43], као и у планарности молекула, јер је торзиони угао између прстенова В и С, који је одговоран за планарност молекула, близак нули.

Чињеница да је молекул кверцетина скоро планаран, у великој мери доприноси стабилности насталих флавоноидних радикала [44]. Флавоноли и флаваноли који имају хидроксилну групу у положају 3 су планарни, за разлику од флавона и флаванона који је немају [44]. Планарност допушта проширену конјугацију у молекулу, што има за последицу бољу делокализацију електрона, и већу стабилност флавоноидних феноксидних радикала. Губитак хидроксилне групе у положају 3 доводи до девијације овог торзионог угла, односно молекул постаје непланаран, што има за последицу знатно мању могућност делокализације  $\pi$  електрона, а самим тим долази до пада стабилности флавоноидних радикала. Важност улоге хидроксилне групе у положају 3 се може видети на слици 1.13.



Слика 1.13. Утицај хидроксилне групе у положају 3 на антиоксидативну активност приказана је помоћу ТЕАС вредности

Гликозовање флавоноида у односу на одговарајући агликон (кверцетин и рутин) снижава њихову активност. У рутину, гликозовањем 3-ОН групе и задржавањем катехолне структуре ТЕАС вредност се смањује за  $2.3 \text{ mmol/dm}^3$  у односу на кверцетин [39], а у лутеолину који нема 3-ОН групу за  $2.6 \text{ mmol/dm}^3$  у односу на кверцетин. Таксифолин за разлику од кверцетина, рутина и лутеолина нема 2,3-двоструку везу, што спречава делокализацију електрона арилоксилних радикала са прстена С на прстен В, а тиме и на А, што резултује значајним снижавањем ТЕАС вредности (слика 1.13) [39]. Ово поређење кверцетина, лутеолина и рутина показује важност интеракције 3-ОН групе са двоструком везом у прстену С за антиоксидативне активности поменутих једињења.

### 1.5. Антиоксидативни механизми флавоноида

Постоје три основна реакциона пута којим флавоноиди и друга фенолна једињења ( $\text{ArOH}$ ) могу остварити своје антиоксидативно деловање:

1) Трансфер атома водоника (Hydrogen Atom Transfer) – **НАТ механизам**



2) Трансфер једног електрона и трансфер протона (Single Electron Transfer – Proton Transfer) - **SET-PT механизам**



3) Губитак протона праћен преносом електрона (Sequential Proton Loss Electron Transfer) - **SPLET механизам**



На основу једначина 1-3 могу се увести термодинамички параметри који одређују којим ће механизмом флавоноид реаговати са слободним радикалом:

- 1) Енталпија раскидања везе (Bond Dissociation Enthalpy - **BDE**) за ArOH по HAT механизму.
- 2) Јонизациони потенцијал (Ionization Potential - **IP**) за ArOH и енталпија дисоцијације протона (Proton Dissociation Enthalpy - **PDE**) за ArOH<sup>+</sup> по SET-PT механизму
- 3) Афинитет према протону (Proton Affinity - **PA**) за ArOH и енталпија преноса електрона (Electron Transfer Enthalpy - **ETE**) из ArO<sup>-</sup> за SPLET механизам

#### 1.5.1. Антиоксидативна активност флавоноида по HAT механизму

HAT механизам одређен је енталпијом хомолитичког раскидања O–H везе молекула флавоноида, што се може представити следећом реакцијом:



Производ ове реакције је феноксидни радикал флавоноида. BDE се рачуна на основу следеће једначине:

$$\text{BDE} = H(\text{Ar-O}^\bullet) + H(\text{H}^\bullet) - H(\text{Ar-OH}) \quad (1.5)$$

$H(\text{Ar-O}^\bullet)$  је енталпија флавоноидног радикала,  $H(\text{H}^\bullet)$  је енталпија водониковог атома,  $H(\text{Ar-OH})$  је енталпија молекула [45-49].

#### 1.5.2. Антиоксидативна активност флавоноида по SET-PT механизму

Први корак у SET-PT механизму [47, 50-55] одређен је јонизационим потенцијалом отпуштања електрона из молекула, што се може представити следећом реакцијом:



Производ ове реакције је радикал катјон флавоноида. IP се рачуна на основу следеће једначине:



$$IP = H(\text{Ar-OH}^{\bullet+}) + H(e^-) - H(\text{Ar-OH}) \quad (1.7)$$

$H(\text{Ar-OH}^{\bullet+})$  је енталпија радикал катјон флавоноида,  $H(e^-)$  је енталпија електрона.

Други корак у SET-PT механизму одређен је енталпијом дисоцијације протона радикал катјон флавоноида, услед чега долази до депротоновања радикал катјона, што се може представити следећом реакцијом:



Производ ове реакције је феноксидни радикал флавоноида. PDE се рачуна на основу следеће једначине:

$$PDE = H(\text{Ar-O}^{\bullet}) + H(\text{H}^+) - H(\text{Ar-OH}^{\bullet+}) \quad (1.9)$$

$H(\text{H}^+)$  је енталпија протона.

### 1.5.3. Антиоксидативна активност флавоноида по SPLET механизму

Први корак у SPLET механизму [48, 55-60] је хетреолитичко ракидање O-H везе, и одређен је PA вредношћу.



Производ ове реакције је феноксидни анјон флавоноида. PA вредност се рачуна на основу следеће једначине:

$$PA = H(\text{Ar-O}^-) + H(\text{H}^+) - H(\text{Ar-OH}) \quad (1.11)$$

$H(\text{Ar-O}^-)$  је енталпија анјона.

Други корак у SPLET механизму одређен је енталпијом отпуштања електрона из феноксидног анјона флавоноида, што се може представити следећом реакцијом:



Производ ове реакције је феноксидни радикал флавоноида. ETE се рачуна на основу следеће једначине:

$$ETE = H(\text{Ar-O}^\bullet) + H(e^-) - H(\text{ArO}^-) \quad (1.13)$$

## 1.6. Бајкалеин

Хемијско понашање флавоноида као антиоксиданата је област веома интезивног и експерименталног и теоријског истраживања. До сада је на ту тему објављено на стотине радова. Међутим, испитивање антиоксидативног деловања бајкалеина се истражује однедавно. У оквиру ове дисертације, а у циљу одређивања могућих реакционих путева, испитивани су механизми антиоксидативног деловања бајкалеина. Пре свега мисли се на следеће механизме: **HAT**, **SET-PT** и **SPLET**. Испитивање антиоксидативних активности бајкалеина је изведено у корелацији са испитивањем структурних и електронских особина бајкалеина.

Бајкалеин (5,6,7-трихидрокси-2-фенил-4Н-хромен-4-он) је важно биоактивно флавоноско једињење које је пронађено у кинеској биљци *Scutellaria baicalensis*, из чијег корена је првобитно изоловано [61]. Бајкалеин је био предмет неких теоријских [62] и експерименталних испитивања која су имала за циљ да прикажу начин и подручје његовог хемијског деловања, као што је спречавање липидне пероксидације изазаване присуством гвожђа, затим његово антиканцерогено, антиинфламаторно и антиоксидативно деловање [63-65]. Бајкалеин се може користити у медицинске сврхе у лечењу болести са симптомима несанице, повишене температуре и обилних знојења. Његово антиоксидативно деловање се огледа у позитивном ефекту против оксидативног стреса, јер реагује са слободним радикалима штитећи неуроне од оксидативног оштећења. Бајкалеин показује неуропротективни ефекат, апоптотични ефекат, и делује антиинфламаторно стимулишући одбрамбени механизам, чиме побољшава стања настала услед неуродегенративних обољења као што је између осталог Паркинсонова болест [66]. Сматра се да је релативно јак антиоксидант, његова TEAC вредност је 2.56 [40], иако прстен А, на коме се налазе ОН групе, није добар електрон дозор.

## ***2. О РАЧУНАРСКИМ МЕТОДАМА***

## 2.1. Увод

Рачунарске методе могу се сврстати у две категорије: молекулско механичке и квантно механичке.

У *молекулској механици* закони класичне физике примењују се на молекуле, без експлицитног разматрања електрона. Молекул се описује као скуп повезаних атома. Атом се представља као сфера чија маса зависи од врсте елемената. Хемијска веза се посматра као опруга [67]. Еластичност опруге зависи од врсте атома који је граде, и од тога да ли је веза једнострука, двострука или трострука [68-74]. *Квантна механика* посматра интеракције између језгара и електрона у молекулу. Молекулска геометрија разматра се као распоред језгара коме одговара минимална енергија [68-72, 75, 76-83]. Ове методе деле се на три класе: аб иницио (*ab initio*), методе функционала густине (DFT) и семиемпиријске методе. Све квантно механичке методе заснивају се на решавању Шредингерове једначине. Хартри-Фокова аб иницио метода налази се на раскрсници у решавању Шредингерове једначине: уводе се корекције ове методе са циљем да се добију решења која ће тежити егзактним решењима Шредингерове једначине (ово води ка корелисаним аб иницио методама), или се уводе додатне апроксимације које воде ка семиемпиријским методама. Многе DFT методе користе Хартри-Фоков интеграл измене.

## 2.2. Шредингерова једначина

Шредингерова једначина је основна једначина у нерелативистичкој квантној механици, која описује кретање електрона и језгара [84]. Потпуно одбацује покушаје да се кретање електрона одвија по одређеним путањама у атому, и настоји да опише њихово кретање искључиво таласним особинама. У неком тренутку вероватноћа да се електрон нађе у некој тачки простора сразмерна је квадрату апсолутне вредности таласне функције. За молекулски систем који се састоји од  $N_A$  језгара и  $n$  електрона, временски независна и нерелативистичка Шредингерова једначина може се приказати следећом формулом:

$$\hat{H}\Psi(r,R) = E\Psi(r,R) \quad (2.1)$$

где је  $\hat{H}$  Хамилтонов оператор (хамилтонијан), који садржи све операторе који описују кинетичку и потенцијалну енергију одређеног молекула,  $\Psi(r,R)$  таласна функција свих

језгара и електрона ( $r$  и  $R$  су електронске и нуклеарне координате), а  $E$  је енергија стања које је описано таласном функцијом  $\Psi$ . Развијени облик Хамилтоновог оператора у атомским јединицама приказан је следећом формулом:

$$\hat{H} = -\frac{1}{2} \sum_{i=1}^n \nabla_i^2 - \frac{1}{2} \sum_{A=1}^{N_A} \nabla_A^2 - \sum_{i=1}^n \sum_{A=1}^{N_A} \frac{Z_A}{r_{iA}} + \sum_{i=1}^n \sum_{j>1}^n \frac{1}{r_{ij}} + \sum_{A=1}^{N_A} \sum_{B>A}^{N_A} \frac{Z_A Z_B}{R_{AB}} \quad (2.2)$$

Прва два израза повезана су са кинетичком енергијом електрона и језгара ( $T=T_e+T_N$ ). Преостала три израза представљају потенцијалну енергију привлачења између електрона и језгара ( $V_{eN}$ ), и потенцијалну енергију одбијања између електрона ( $V_{ee}$ ) и језгара ( $V_{NN}$ ).  $M_A$  и  $Z_A$  су маса и атомски број атома  $A$ .  $\nabla^2$  је Лапласов оператор који је у картезијанском координативном систему дефинисан као збир других парцијалних извода функције:

$$\nabla^2 = \frac{\partial^2}{\partial x^2} + \frac{\partial^2}{\partial y^2} + \frac{\partial^2}{\partial z^2} \quad (2.3)$$

Треба нагласити да се електрони третирају индивидуално, док се језгра третирају као агрегати сачињени од нуклеона.

### 2.3. Варијациони принцип за основно стање

У случају Шредингерове једначине, по варијационом принципу свака апроксимативна таласна функција  $\Psi(r,R)$  даје вредност за енергију која је већа од егзактне енергије основног стања  $E_0$ . Другим речима, што је нижа енергија која одговара таласној функцији  $\Psi(r,R)$ , то је та функција  $\Psi(r,R)$  приближнија егзактној таласној функцији  $\Psi_0(r,R)$ .

### 2.4. Апроксимације за решавање Шредингерове једначине

Шредингерову једначину могуће је поставити за сваки атом и молекул. Ипак, ту једначину је изразито тешко решити, па егзактно, аналитичко решење, постоји само за атом водоника. Једноставно, постоји сувише променљивих да би се заиста решила

Шредингерова једначина за велике атоме и молекулске системе, па се у тим случајевима врше нумеричке апроксимације.

#### 2.4.1. Борн-Опенхајмерова апроксимација

Током прошлог века предложене су различите апроксимације за решавање Шредингерове једначине. Прва у низу апроксимација која води до упрошћавања вишеелектронске Шредингерове једначине је Борн-Опенхајмерова апроксимација. Ова апроксимација раздваја кретање електрона од кретања језгара [68-72, 75, 76-83]. Борн и Опенхајмер предлажу да се један проблем раздвоји на два проблема [85].

Језгра су много тежа и крећу се спорије него електрони, па се кинетичка енергија језгара може занемарити. То значи да се електрони крећу у пољу фиксираних језгара. Електронска Шредингерова једначина за молекулски систем дата је следећом формулом:

$$\hat{H}_e \Psi_e(\mathbf{r}) = E_e \Psi_e(\mathbf{r}) \quad (2.4)$$

где је  $\Psi_e(\mathbf{r})$  електронска таласна функција,  $E_e$  је електронска енергија и  $\hat{H}_e$  је електронски Хамилтонов оператор дат следећим изразом:

$$\hat{H}_e = -\frac{1}{2} \sum_{i=1}^n \nabla_i^2 - \sum_{i=1}^n \sum_{A=1}^{N_A} \frac{Z_A}{r_{iA}} + \sum_{i=1}^n \sum_{j>1}^n \frac{1}{r_{ij}} \quad (2.5)$$

Укупна енергија молекулског система је сума електронске енергије  $E_e$  и константе која представља потенцијалну енергију фиксираних језгара:

$$E = E_e + \sum_{A=1}^{N_A} \sum_{B>A}^{N_A} \frac{Z_A Z_B}{R_{AB}} \quad (2.6)$$

Ова прва апроксимација представља основу за све методе квантне механике. Различите квантно-механичке методе заснивају се, уствари, на различитим покушајима да се што тачније израчуна електронска енергија. У даљем тексту  $\hat{H}$ ,  $\Psi$  и  $E$  представљаће електронски хамилтонијан, електронску таласну функцију и електронску енергију.

### 2.4.2. Слејтерова детерминанта

Чак и поред Борн-Опенхајмерове апроксимације Шредингерова једначина се не може решити за системе који имају више од једног електрона. Зато морају да се уведу додатне апроксимације [68-72, 75, 76-83].

Вишеелектронска таласна функција  $\Psi(r)$  зависи од координата свих електрона у молекулу. Хартри је предложио да се вишеелектронска таласна функција представи као производ једноелектронских функција (молекулских орбитала):

$$\Psi(r_1, r_2, \dots, r_n) = \varphi_1(r_1)\varphi_2(r_2)\dots\varphi_n(r_n) \quad (2.7)$$

Таласна функција (једн. 2.7) назива се Хартријев производ. Постоји  $n$  оваквих једначина, по једна за сваки електрон. Фок је приметио да Хартријева таласна функција не задовољава Паулијев принцип искључења, јер једначина (2.7) претпоставља да се у свакој молекулској орбитали налази само један електрон [67]. Фок је предложио да се у израз за таласну функцију uvede спинска функција  $\sigma(s)$ ,  $\sigma = \alpha, \beta$ . Спинска функција је дефинисана на следећи начин:

$$\begin{array}{ll} \alpha(\uparrow) = 1 & \alpha(\downarrow) = 0 \\ \beta(\uparrow) = 0 & \beta(\downarrow) = 1 \end{array}$$

где стрелице  $\uparrow$  и  $\downarrow$  означавају електроне са спином  $+1/2$  и  $-1/2$ .

Електрон је описан спин орбиталом  $\chi_i(x_i)$ , која је једнака производу између просторне орбитале  $\varphi_i(r_i)$  и једне од две могуће спинске функције:

$$\chi_i(x_i) = \varphi_i(r_i)\sigma(s), \quad \sigma = \alpha, \beta \quad (2.8)$$

Спин орбитала је функција и положаја електрона и његовог спина. Једначина (2.8) показује да постоје две спин орбитале  $\chi_i(x_i)$ :  $\varphi_i(r_i)\alpha$  и  $\varphi_i(r_i)\beta$ , што значи да се просторној орбитали  $\varphi_i(r_i)$  могу придружити два електрона супротних спинова [67].

За вишеелектронски систем који има  $n$  електрона, укупна таласна функција је приказана Слејтеровом детерминантом [86]:

$$\Psi = \frac{1}{\sqrt{n!}} \begin{vmatrix} \chi_1(x_1) & \chi_2(x_1) & \chi_3(x_1) & \dots & \chi_n(x_1) \\ \chi_1(x_2) & \chi_2(x_2) & \chi_3(x_2) & \dots & \chi_n(x_2) \\ \chi_1(x_3) & \chi_2(x_3) & \chi_3(x_3) & \dots & \chi_n(x_3) \\ \dots & \dots & \dots & \dots & \dots \\ \chi_1(x_n) & \chi_2(x_n) & \chi_3(x_n) & \dots & \chi_n(x_n) \end{vmatrix}$$

где је  $\frac{1}{\sqrt{n!}}$  фактор нормирања.

### 2.4.3. Хартри-Фокова апроксимација

Суштина Хартри-Фокове апроксимације је да компликоване проблеме вишеелектронских система замени проблемима једноелектронских система, и то тако што се одбијање између електрона представља као просечан ефекат [87]. Електрон “не види” све различите електроне одвојено, али “види” потенцијално поље које је настало услед деловања свих других електрона. Хартри-Фокова апроксимација може се представити следећим изразом:

$$\hat{f}\varphi_i(\mathbf{r}_i) = \varepsilon_i \varphi_i(\mathbf{r}_i), \quad i=1, 2, \dots, n \quad (2.9)$$

Ових  $n$  једначина зову се Хартри-Фокове једначине, где  $\hat{f}$  представља Фоков оператор, а  $\varepsilon_i$  енергије молекулских орбитала [67]. Фоков оператор је једноелектронски оператор који је дефинисан изразом:

$$\hat{f}_j = -\frac{1}{2}\nabla_j^2 - \sum_I \frac{Z_I}{\Delta\mathbf{r}_{Ij}} + V_j^{\text{ef}} \quad (2.10)$$

Прва два члана односе се на кинетичку енергију електрона и потенцијалну енергију која је резултат привлачења између електрона и језгара.  $V_j^{\text{ef}}$  је ефективни или Хартри-Фоков потенцијал. Он се састоји од две компоненте, што се може видети на основу следећег израза:

$$V^{\text{ef}} = \sum_{i=1}^{n/2} (2\hat{J}_i - \hat{K}_i) \quad (2.11)$$



$\hat{J}$  је Кулонов оператор који представља просечни одбојни потенцијал који осећа један електрон од преосталих  $n-1$  електрона:

$$\hat{J}_i(r_1)\varphi_k(r_1) = \left[ \int \varphi_i^* \frac{1}{\Delta r_{12}} \varphi_i(r_2) dr_2 \right] \varphi_k(r_1) \quad (2.12)$$

$\hat{K}$  је оператор измене и дефинисан је као:

$$\hat{K}_i(r_1)\varphi_k(r_1) = \left[ \int \varphi_i^* \frac{1}{\Delta r_{12}} \varphi_k(r_2) dr_2 \right] \varphi_i(r_1) \quad (2.13)$$

Он физички одговара кретању електрона са истим спиновима. То је у складу са Паулијевим принципом, који каже да електрони са истим спином не могу (i) имати исту енергију и (ii) бити на истом месту.

#### 2.4.4. Ротхан-Холове једначине

Решавању Хартри-Фокових једначина допринели су Ротхан [88] и Хол [89] тако што су предложили да се молекулска орбитала посматра као линеарна комбинација атомских орбитала  $\eta_\mu$  (LCAO) [68-72, 75, 76-83]:

$$\varphi_i = \sum_{\mu=1}^L c_{\mu i} \eta_\mu \quad (2.14)$$

где  $\varphi_i$  представља збир  $L$  атомских орбитала  $\eta_\mu$  помножених молекулско орбиталним коефицијентима  $c_{\mu i}$ . У данашње време се за конструкцију молекулских орбитала користе математичке функције које се називају базисне функције. Скуп примењених базисних функција назива се базисни скуп.

Када се једначина (2.14) уврсти у Хатри-Фокове једначине, добијају се Ротхан-Холове једначине, које се у матричном облику представљају на следећи начин:

$$FC=SC\varepsilon \quad (2.15)$$

где  $F$ ,  $C$ ,  $S$  и  $\varepsilon$  представљају Фокову матрицу, матрицу молекулско орбиталних коефицијената, матрицу преклапања и матрицу орбиталних енергија.

Елементи Фокове матрице су сложеног облика, и зато се представљају на следећи начин:

$$F_{\mu\nu} = H_{\mu\nu}^u + J_{\mu\nu} - K_{\mu\nu} \quad (2.16)$$

где  $H^u$ ,  $J$  и  $K$  представљају унутрашњи хамилтонијан, Кулонов елемент и елемент измене.  $H^u$  описује кинетичку енергију електрона и потенцијалну енергију која је резултат привлачења између електрона и језгара. Обе енергије зависе од положаја само једног електрона:

$$H_{\mu\nu}^u = \int \eta_{\mu}(r_1) \left[ -\frac{1}{2} \nabla^2 - \sum_I \frac{Z_I}{\Delta r_{I1}} \right] \eta_{\nu}(r_1) d(r_1) \quad (2.17)$$

Преостала два члана описују интеркације између електрона (Кулонову енергију и енергију измене). Кулонов интеграл и интеграл измене дефинисани су изразима у којима фигуришу четвороцентрични-двоелектронски интеграл, и где  $D$  представља матрицу густине:

$$J_{\mu\nu} = \sum_{\lambda}^L \sum_{\sigma}^L D_{\lambda\sigma} \iint \eta_{\mu}(r_1) \eta_{\nu}(r_1) \frac{1}{\Delta r_{12}} \eta_{\lambda}(r_2) \eta_{\sigma}(r_2) dr_1 dr_2 \quad (2.18)$$

$$K_{\mu\nu} = \frac{1}{2} \sum_{\lambda}^L \sum_{\sigma}^L D_{\lambda\sigma} \iint \eta_{\mu}(r_1) \eta_{\lambda}(r_1) \frac{1}{\Delta r_{12}} \eta_{\nu}(r_2) \eta_{\sigma}(r_2) dr_1 dr_2 \quad (2.19)$$

Решавањем Ротхан-Холове једначине помоћу различитих базисних скупова настају различити Хартри-Фокови модели. Применом Хартри-Фокове методе са комплетним базисним скупом добија се енергија која се назива Хатри-Фокова граница ( $E_{HF}$ ). Пошто Хартри-Фокова метода занемарује електрон-електрон интеракције, добијена енергија не одговара стварној енергији молекула.

Решавање Хартри-Фокове једначине мора да се изврши користећи процедуру самогласног поља (SCF). Почетна таласна функција је Слејтерова детерминанта изабрана као пробна таласна функција, са пробним молекулско орбиталним коефицијентима. На овај начин се израчуна Фокова матрица која ће у следећој итерацији дати бољи опис таласне функције. Овај процес траје дотле док се постигне конвергенција система.

За системе са затвореном љуском (паран број електрона) користи се ограничена Хартри-Фокова метода (RHF). За системе са отвореном љуском (непаран број електрона)

могу да се користе или ROHF (ограничена Хартри-Фокова метода за отворену љуску) или UHF (неограничена Хартри-Фокова метода).

#### 2.4.5. Корелациона енергија

Због увођења ефективног потенцијала добијена енергија из Хартри-Фокове апроксимације није егзактна. Разлика између егзактне енергије и енергије Хартри-Фокове границе зове се корелациона енергија  $E_{kor}$  [68-71, 77, 80, 82].

$$E_{kor} = E_{egz} - E_{HF} \quad (2.20)$$

$E_{kor}$  је негативна величина јер је  $E_{HF} > E_{egz}$ . Ова енергија је мера грешке која се уводи у Хартри-Фокову методу. Главни допринос корелационој енергији потиче од динамичке корелације која се односи на кретање електрона, које је у стварности корелисано. Постоји и нединамичка (статичка корелација) која проистиче из чињенице да у неким случајевима Слејтерова детерминанта основног стања није добра апроксимација стварног основног стања, јер постоје и друге Слејтерове детерминанте сличне енергије. Нединамичка корелација је важна код молекула код којих је основно стање описано помоћу већег броја дегенерисаних детерминантни.

Код модела функционала густине уводи се апроксимативни корелациони члан на експлицитан начин. Квалитет модела функционала густине зависи од избора корелационог члана.

#### 2.5. Теорија функционала густине

За разлику од свих других квантно механичких метода, које се заснивају на таласној функцији, методе функционала густине заснивају се на величини која се може експериментално одредити – густини електрона  $\rho(r)$ . Густина електрона је функција само три просторне променљиве, док електронска таласна функција зависи од  $x$ ,  $y$  и  $z$  координата свих електрона. Густину електрона дефинише вишеструки интеграл преко спин координата свих електрона, и преко свих, осим једне, просторне променљиве:

$$\rho(r) = n \int \dots \int |\Psi(x_1, x_2, \dots, x_n)|^2 dx_1 dx_2 \dots dx_n \quad (2.21)$$

Вероватноћу да се један одређени електрон произвољног спина нађе у елементу запремине  $dr_1$ , при чему свих преосталих  $n-1$  електрона имају произвољне положаје и спинове, одређује  $\rho(r)$  стања представљеног таласном функцијом  $\Psi$ . Пошто се електрони не могу разликовати, вероватноћа налажења било ког електрона у овом положају једнака је вероватноћи за тај одређени електрон помноженој бројем електрона  $n$ . Дакле,  $\rho(r)$  је ненегативна функција просторних променљивих, чији интеграл је једнак укупном броју електрона. Када су вредности просторних променљивих бесконачно велике  $\rho(r)$  постаје једнака нули.

Основу теорије функционала густине (**Density Functional Theory-DFT**) чини Хоенберг-Коновна теорема. Ова теорема гласи: Постоји јединствени функционал за који важи [68-72, 79, 80, 82]:

$$E[\rho(r)] = E \quad (2.22)$$

где је  $E$  егзактна електронска енергија. Густина електрона се покорава веријационом принципу, што су доказали Хоенберг и Кон [90]. Енергија која одговара датој густини електрона је већа или једнака егзактној енергији. Недостатак теореме је тај, што не даје облик функционала  $E[\rho(r)]$ . Зато у теорији функционала густине постоје многобројни апроксимативни функционали.

Облик функционала који су предложили Кон и Шам дат је следећим изразом:

$$E[\rho(r)] = T_e(\rho) + V_{Ne}(\rho) + V_{ee}(\rho) + E_{xc}(\rho) \quad (2.23)$$

где је  $T_e(\rho)$  кинетичка енергија која потиче од кретања електрона између којих не постоје интеракције, а чија густина је једнака густини стварних електрона, између којих постоје интеракције:

$$T_e(\rho) = -\frac{1}{2} \sum_i^n \langle \phi_i | \nabla^2 | \phi_i \rangle \quad (2.24)$$

$V_{Ne}(\rho)$  је нуклеарно-електронски члан и представља потенцијалну енергију која потиче из привлачења између језгара и електрона:

$$V_{Ne}(\rho) = \int V_{Ne} \rho(r) dr = - \sum_i^n \int \sum_I^N \frac{Z_I}{\Delta r_{iI}} |\varphi_i(r_1)|^2 dr_1 \quad (2.25)$$

$V_{ee}(\rho)$  представља потенцијалну енергију која потиче од одбијања између електрона:

$$V_{ee}(\rho) = \frac{1}{2} \int \frac{\rho(r_1)\rho(r_2)}{\Delta r_{12}} dr_1 dr_2 = \frac{1}{2} \sum_i^n \sum_j^n \int \int |\varphi_i(r_1)|^2 \frac{1}{\Delta r_{12}} |\varphi_j(r_2)|^2 dr_1 dr_2 \quad (2.26)$$

$E_{xc}(\rho)$  се назива функционал измене/корелације, и обухвата енергију измене која настаје услед антисиметричности таласне функције, као и корелациону енергију услед кретања индивидуалних електрона. Осим доприноса потенцијалној енергији система, функционал измене/корелације садржи и мањи допринос кинетичкој енергији. У овом функционалу садржано је све што не знамо о испитиваном систему. Сви ови чланови из једн. (2.23) су функције густине електрона.

Кон-Шамова једноелектронска једначина приказана је следећим изразом:

$$\left( -\frac{1}{2} \nabla^2 \left[ \sum_j^n \int \frac{|\varphi_j(r_2)|^2}{\Delta r_{12}} dr_{12} + V_{xc}(r_1) - \sum_I^N \frac{Z_I}{\Delta r_{iI}} \right] \right) \varphi_i = \varepsilon_i \varphi_i \quad (2.27)$$

где је  $V_{xc}$  потенцијал који зависи од енергије измене/корелације  $E_{xc}$ . Овај потенцијал дефинише се као извод енергије измене/корелације по густини електрона:

$$V_{xc} = \frac{\partial E_{xc}}{\partial \rho} \quad (2.28)$$

Чланови у загради у једн. (2.27) чине Кон-Шамов једноелектронски оператор. На основу тога, једн. (2.27) добија следећи облик:

$$\hat{f}^{KS} \varphi_i = \varepsilon_i \varphi_i \quad (2.29)$$

Оператор  $\hat{f}^{KS}$  се разликује од Фоковог оператора  $\hat{f}$  (једн. (2.9)) по начину на који се третирају потенцијали измене и корелације. Корелација се потпуно занемарује код Фоковог оператора, а допринос од измене приказан је оператором измене  $\hat{K}$  (једн. (2.13)).

Код Кон-Шамовог оператора ови доприноси изражени су помоћу потенцијала измене/корелације  $V_{XC}$ .

Када се примени LCAO метода, и уведу Кон-Шамова матрица (аналогна Фоковој матрици), матрица преклапања  $S$ , матрица молекулско орбиталних коефицијената  $C$ , и матрица орбиталних енергија  $\epsilon$ , облик једн. (2.29) се мења:

$$F^{KS}C=SC\epsilon \quad (2.30)$$

Пошто између Ротхан-Холове једн. (2.15) и једн. (2.30) постоји аналогија, при решавању једн. (2.30) примењује се поступак сличан Ротхан-Холовој процедури. DFT модели не занемарују корелацију електрона, а захтевни су као и HF модели. На основу овога произилази велика предност метода функционала густине: рачунски су ефикасније у одређивању корелације електрона у односу над аб иницио методама.

Облик Кон-Шамове матрице може се представити на следећи начин:

$$F_{\mu\nu}^{KS} = \int \eta_{\mu}(r_1) \left( -\frac{1}{2} \nabla^2 - \sum_I \frac{Z_I}{\Delta r_{I1}} + \int \frac{\rho(r_2)}{\Delta r_{12}} + V_{XC}(r_1) \right) \eta_{\nu}(r_1) dr_1 \quad (2.31)$$

Кинетичку енергију и интеракције између електрона и језгара описују први и други члан у загради. Пошто ове величине зависе од координата само једног електрона, ова два члана се комбинују у један интеграл:

$$h_{\mu\nu} = \int \eta_{\mu}(r_1) \left[ -\frac{1}{2} \nabla^2 - \sum_I \frac{Z_I}{\Delta r_{I1}} \right] \eta_{\nu}(r_1) dr_1 \quad (2.32)$$

Трећи члан у једн. (2.31) се назива Кулонов допринос. Он се може представити у облику четвороцентрично-двоелектронског интерграла:

$$J_{\mu\nu} = \sum_{\lambda} \sum_{\sigma} D_{\lambda\sigma} \iint \eta_{\mu}(r_1) \eta_{\nu}(r_1) \frac{1}{\Delta r_{12}} \eta_{\lambda}(r_2) \eta_{\sigma}(r_2) dr_1 dr_2 \quad (2.33)$$

До сада се појављују формуле које су веома сличне онима које фигуришу у Хартри-Фоковој методи. Разлика је у делу који се односи на измену/корелацију. Израз за измену/корелацију у Кон-Шамовој матрици приказан је као интеграл:

$$V_{\mu\nu}^{XC} = \int \eta_{\mu}(r_1) V_{XC}(r_1) \eta_{\nu}(r_1) dr_1 \quad (2.34)$$

где мора да се одлучи о експлицитном облику за  $V_{XC}$ , док је у оквиру Хартри-Фокове методе интеграл измене дат једн. (2.19).

### 2.5.1. Функционали измене/корелације

Функционали измене/корелације који се данас користе могу се груписати у три класе: функционали засновани на апроксимацији локалне густине и локалне спинске густине, функционали засновани на апроксимацији генерализованог градијента, и хибридни функционали. Функционали првог типа називају се локалне методе, док се функционали преостала два типа називају нелокалне или градијент-кориговане методе [68, 76, 80, 91-94].

### 2.5.2. Апроксимација локалне густине и локалне спинске густине

Овај приступ (**L**ocal **D**ensity **A**pproximation - LDA) заснован је на појму униформног (или хомогеног) електронског гаса. Овај хипотетички гас се састоји од електрона између којих постоје интеракције и позитивних језгара, а његова густина има исту вредност у свакој тачки. Овај приступ дозвољава да се  $E_{xc}$  представи на следећи начин:

$$E_{XC}^{LDA}(\rho) = \int \rho(r) \epsilon_{XC}(\rho(r)) dr \quad (2.35)$$

где је  $\epsilon_{xc}(\rho)$  енергија измене/корелације по честици униформног електронског гаса густине  $\rho$ .  $\epsilon_{xc}(\rho)$  се даље може поделити на доприносе од измене и корелације:

$$\epsilon_{XC}(\rho(r)) = \epsilon_X(\rho(r)) + \epsilon_C(\rho(r)) \quad (2.36)$$

За функционал измене постоји експлицитни израз, што није случај са функционалом корелације. На основу Монте Карло симулације хомогеног електронског гаса развијени су различити функционали корелације који садрже емпиријске факторе скалирања. Воско, Вилк и Нусаир су предложили функционал корелације VWN [95], Перду и Цунгер развили су PZ81 [96], Кол и Перду развили су CP, Перду и Ванг PW92, итд.

Апроксимација локалне густине може се прилагодити случајевима када густине  $\alpha$  и  $\beta$  нису једнаке, што је довело да развоја апроксимације локалне спинске густине (**Local Spin Density Approximation - LSDA**). У овом случају једн. (2.35) мења облик у:

$$E_{XC}^{LSDA}(\rho_\alpha, \rho_\beta) = \int \rho(r) \epsilon_{XC}(\rho_\alpha(r), \rho_\beta(r)) dr \quad (2.37)$$

где  $\rho_\alpha(r)$  и  $\rho_\beta(r)$  означавају  $\alpha$  и  $\beta$  спинске густине.

Апроксимација локалне густине је осредње тачности, која је недовољна за већину примена у хемији. Зато се LDA дуго примењивала у физици чврстог стања, а у компјутерској хемији скоро да није оставила никакав траг [67].

### 2.5.3. Апроксимација генерализованог градијента

Може се претпоставити да ће се побољшање у односу на LDA постићи ако се претпостави да густина електрона није униформна. То се постиже тако што се поред информација о  $\rho(r)$  у одређеној тачки узимају и информације о градијенту густине  $\nabla\rho(r)$ . На основу оваквог резоновања настала је апроксимација градијента експанзије (**Gradient Expansion Approximation - GEA**). Али ни ова апроксимација није довела до жељеног побољшања у тачности у односу на LDA.

Апроксимација генерализованог градијента (**Generalized Gradient Approximation - GGA**) довела је до жељених побољшања. Општи облик GGA функционала приказан је следећим изразом:

$$E_{XC}^{GGA}(\rho_\alpha, \rho_\beta) = \int f(\rho_\alpha, \rho_\beta, \nabla\rho_\alpha, \nabla\rho_\beta) dr \quad (2.38)$$

при чему постоје различити изрази за зависност функције  $f$  од густина електрона и њихових градијената. Функционали из ове групе су веома сложеног облика и често садрже емпиријске параметре. Најпознатији функционали измене овог типа су B86 и B88 (Бекеови), P86 (Пердуов), PW91 (Пердуа и Ванга) и PBE (Пердуа, Бурка и Ернцерхофа), а функционали корелације PW91 (Пердуа и Ванга) и LYP (Лиа, Јанга и Пара). LYP, који има један емпиријски параметар, за разлику од свих досада споменутих функционала, није заснован на униформом електронском гасу, већ је изведен из израза за корелациону енергију атома хелијума.



#### 2.5.4. Хибридни функционали

Да би се добили значајни резултати помоћу теорије функционала густине, неопходно је да имамо тачан израз за функционал измене, јер је допринос од измене значајно већи од одговарајућег доприноса од корелације.

Члан измене фигурише у оквиру Хартри-Фокове теорије. Беке је формулисао функционале код којих се допринос од измене заснива на мешавини Хартри-Фокове и DFT теорије, а допринос од корелације на DFT теорији, и то се може представити општим изразом:

$$E_{XC}^{\text{hibrid}} = c_{\text{HF}} E_X^{\text{HF}} + c_{\text{DFT}} E_{XC}^{\text{DFT}} \quad (2.39)$$

где су  $c_{\text{HF}}$  и  $c_{\text{DFT}}$  константе. Наравно, овакав приступ уводи делимичан семиемпиријски карактер у DFT шему. Један од примера је тропараметарски функционал B3LYP:

$$E_{XC}^{\text{B3LYP}} = E_{XC}^{\text{LDA}} + a_0 (E_X^{\text{HF}} - E_X^{\text{LDA}}) + a_X (E_X^{\text{B88}} - E_X^{\text{LDA}}) + a_C (E_C^{\text{LYP}} - E_C^{\text{VWN}}) \quad (2.40)$$

у чијем називу В потиче од Бекеовог функционала измене, 3 од три емпиријска параметра ( $a_0$ ,  $a_X$  и  $a_C$ ), а LYP од функционала корелације Лија, Јанга и Пара. Параметар  $a_0$  дозвољава да се помешају Хартри-Фоков члан измене и функционал измене LDA. Бекеова корекција на функционал измене LDA је скалирана параметром  $a_X$ . Функционал корелације VWN коригован је функционалом корелације LYP. Беке је одредио параметре у B3LYP функционалу, тако што их је подешавао у односу на енергије атомизације, јонизационе потенцијале, афинитете према протону и атомске енергије одређеног скупа молекула. Ти параметри имају следеће вредности:  $a_0=0.20$ ,  $a_X=0.72$  и  $a_C=0.81$ . Током протеклих деценија овај функционал се појавио као ефикасна метода за израчунавање електронских особина (електронска енергија, енталпија дисоцијације везе, енергија јонизације, итд.) различитих молекулских система. B3LYP има и неке своје недостатке: понекад даје лоше резултате у опису кинетике хемијске реакције, и није погодна за примену у хемији прелазних метала.

У новије време појавили су се и хибридни мета функционали [97]. Ови функционали, осим од густине електрона и градијента густине, зависе и од густине кинетичке енергије. Побољшање DFT перформанси спроведено параметризацијом функционала измене и функционала корелације, засновано је на чињеници да тачност DFT

прорачуна зависи од квалитета функционала измене/корелације. Трулар и Чао развили су неке врло значајне хибридне мета функционале, од којих ће се овде споменути пар њих: M05-2X, M06, M06-2X и M06-L. Сви ови функционали погодни су за термохемијска и кинетичка израчунавања на молекулима који садрже све елементе, осим прелазних метала. M06 и M06-L су погодни за испитивање термохемије прелазних метала. За истраживање проблема у органометалној хемији, где се врши истовремено раскидање и стварање хемијских веза, препоручује се M06 функционал.

### **M05-2X функционал**

Труларова група [97] развила је нову класу функционала, која се назива M05-класа са циљем да се побољшају перформансе термодинамичких и кинетичких израчунавања, као и опис нековалентних интеракција. Класа M05 функционала измене/корелације, као што је M05-2X, добијена је оптимизацијом параметара функционала измене и функционала корелације, укључујући густину кинетичке енергије. Део Хартри-Фоковог доприноса укључен је у укупну енергију измене. На крају, коначан функционал дефинисан је следећим изразом:

$$E_{XC}^{hibrid} = \frac{X}{100} E_X^{HF} + \left(1 - \frac{X}{100}\right) E_X^{DFT} + E_C^{DFT} \quad (2.41)$$

X је проценат Хартри-Фокове измене у хибридном функционалу,  $E_X^{HF}$  енергија Хартри-Фокове измене,  $E_X^{DFT}$  је DFT енергија измене, и  $E_C^{DFT}$  је DFT енергија корелације.

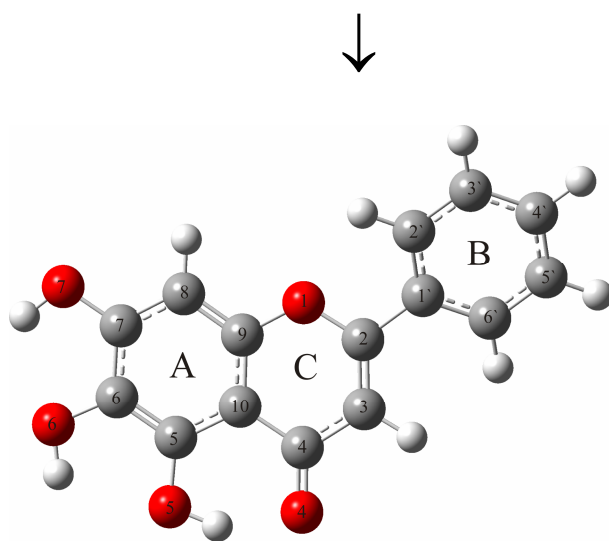
Јед. (2.41) може се написати у следећем облику:

$$E_{XC}^{hibrid} = E_X^{HF} + \left(1 - \frac{X}{100}\right) (E_X^{DFT} - E_X^{HF}) + E_C^{DFT} \quad (2.42)$$

На основу једначине (2.42), можемо видети да се укупна енергија корелације моделира као сума динамичке енергије корелације  $E_C^{DFT}$  и нединамичке енергије корелације  $\left(1 - \frac{X}{100}\right) (E_X^{DFT} - E_X^{HF})$ . Трулар и сарадници извршили су оптимизацију параметара у M05 и M05-2X функционалима користећи различите скупове података.

На основу процена [97] и поређења за још 28 функционала из литературе, Трулар и Чао дошли су до следећег закључка: 1) M05-2X, M05, PW6B95, PWB6K, и MPWB1K функционали дају најбоље резултате за термохемијску кинетику, термохемију и нековалентне интеракције код неметала; 2) M05-2X метода показује најбоље перформансе за израчунавање апсолутних и релативних енталпија дисоцијација веза и за израчунавање нековалентних интеракција између молекула.

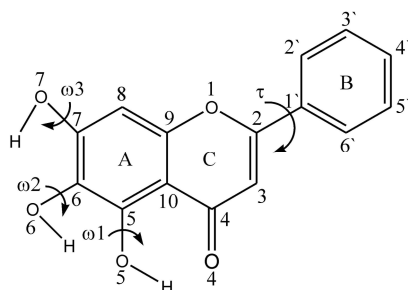
За истраживања спроведена у оквиру ове докторске дисертације коришћени су функционали B3LYP, PBE и M05-2X.



### ***3. НАШИ РАДОВИ***

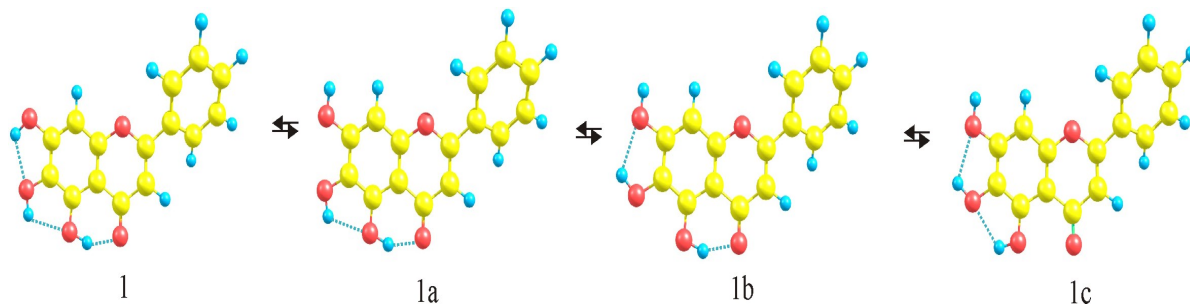
### 3.1. Структура бајкалеина

За разлику од већине флавоноида, код којих се хидроксилне групе налазе у прстену В, код бајкалеина налазе се три хидроксилне групе на прстену А (слика 3.1). Зато је посебна пажња била усмерена на испитивање прстена А код бајкалеина помоћу метода функционала густине. Испитивање антиоксидативне активности бајкалеина изведено је у корелацији са испитивањем структурних и електронских особина бајкалеина. Пошто је понашање различитих ОН група у полифенолним једињењима под великим утицајем електронских ефеката суседних група и конформације молекула, **конформациона анализа** је важан корак у одређивању антиоксидативне активности неког полифенолног молекула, у овом случају бајкалеина [60].



Слика 3.1. Нумерисани атоми бајкалеина и његови диедарски углови ( $\omega_1$ -  $\omega_3$  и  $\tau$ )

У конформационој анализи бајкалеина разматрани су сви могући ротамери добијени комбиновањем антиперипланарних и синперипланарних положаја атома водоника на кисеониковим атомима 5, 6 и 7. На овај начин добијена су четири могућа ротамера (слика 3.2).



Слика 3.2. Најстабилнија конформација молекула бајкалеина 1. 1a, 1b и 1c су мање стабилни ротамери

Применом модела M05-2X/6-311+G(d,p) [60] и B3LYP/6-311+G(d,p) [98] нађено је на основу вредности енталпија да је ротамер 1 најстабилнији како у гасовитој, тако и у воденој фази (табела 3.1). Укупне енергије, енталпије и слободне енергије су израчунате на 298 К. У табели 3.1 приказане су релативне вредности укупних енергија, енталпија, као и слободне енергије солватације за испитиване ротамере бајкалеина.

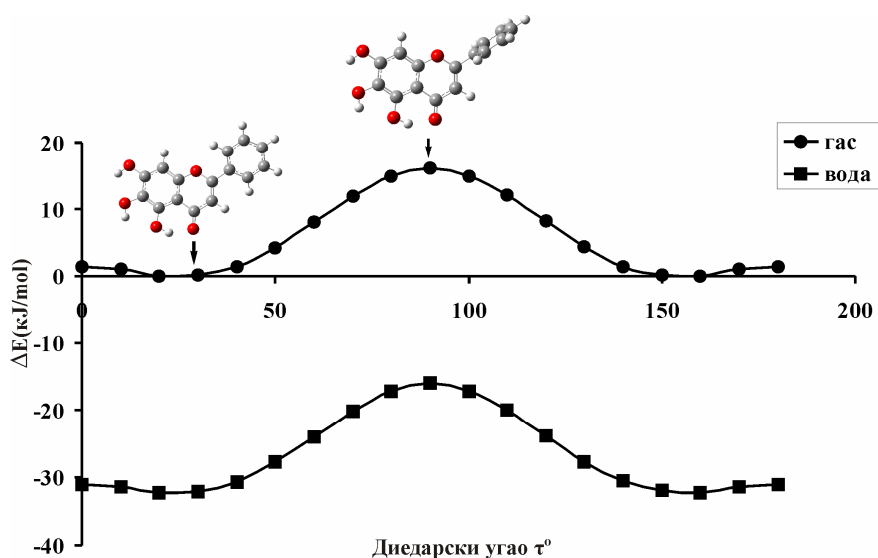
Табела 3.1. Енергије (kJ/mol) израчунате помоћу M05-2X/6-311+G(d,p) и B3LYP/6-311+G(d,p) модела за изоловане и солватисане ротамере бајкалеина

Ротамер	M05-2X/6-311+G(d,p)				B3LYP/6-311+G(d,p)			
	$\Delta E$	$\Delta H$	$\Delta E^{\text{CPCM}}$	$\Delta G_{\text{solv}}$	$\Delta E$	$\Delta H$	$\Delta E^{\text{CPCM}}$	$\Delta G_{\text{solv}}$
<b>1</b>	0.0	0.0	0.0	-35.3	0.0	0.0	0.0	-33.2
<b>1a</b>	22.1	22.3	8.3	-44.1	19.7	20.0	7.4	-44.9
<b>1b</b>	28.9	29.4	9.4	-46.1	25.9	26.6	8.4	-49.7
<b>1c</b>	63.9	65.3	36.9	-58.5	63.5	65.5	37.9	-58.1

$\Delta E$  и  $\Delta H$  означавају разлику у енергији, односно енталпији, у односу на најстабилнији конформер.  $\Delta G_{\text{solv}}$  означава разлику у слободној енергији између молекула у гасу и у води. Све величине су кориговане одговарајућим скалираним величинама [99] (енергија нулте тачке (ZPVE), термална корекција за енталпију и термална корекција за слободну енергију).

Конформациони простор за најстабилнији ротамер 1 (слика 3.2) испитан је у функцији торзионог угла  $\tau$ , да би се одредио најповољнији међусобни положај прстенова В и С. У ову сврху коришћен је теоријски модел M05-2X/6-311+G(d,p). Торзиони угао  $\tau$  (O1–C2–C1'–C2') је скениран у интервалу од 0° до 180° у корацама од 10° без ограничења на свим другим геометријским параметрима. Пронађен је глобални минимум за  $\tau=24.5^\circ$  (ротамер 1), који се јавља и на  $\tau=155.5^\circ$  (слика 3.3). На максимуму потенцијалне енергије за  $\tau=90^\circ$  нађено је прелазно стање за претварање једног конформера у други. Слободна енергија активације за ову ротацију износи 16.2 kJ/mol. Очигледно је да је ова баријера веома ниска, слична оној за бутан (16.7 kJ/mol). То значи да на собној температури прстен В лако ротира око C2–C1' везе. Вода не фаворизује ротацију прстена В око C2–C1'. Наиме, вредност енергетске баријере за ротацију око ове везе у води идентична је са добијеном вредношћу у гасовитом стању (16.2 kJ/mol). Главни узрок томе је одсуство ОН група на В прстену, тако да не постоји значајна интеракција прстена В са водом као растварачем, као што је то у случају кверцетина [49, 100]. Да бисмо проверили добијену вредност за енергетску баријеру, извршен је прорачун у

једној тачки помоћу вишег базисног скупа 6-311++G(3df,2pd). Добијена вредност у гасу није нижа, као што се могло очекивати, него је чак незнатно већа: 17.4 kJ/mol. Израчунате енергије помоћу вишег базисног скупа 6-311++G(3df,2pd) у води дају нешто веће вредности за енергетску баријеру (18.3 kJ/mol) у односу за гас за исти базисни скуп. Важно је напоменути да за вредност  $\tau$  од  $0^\circ$  до  $\pm 40^\circ$  крива потенцијалне енергије је скоро равна, са променом енергије од око 1.4 kJ/mol (слика 3.3), што значи да се планарна конформација лако добија уз незнатан утрошак енергије. Из овога се може претпоставити да у делокализацији  $\pi$  електрона може учествовати и прстен В. И код других ротамера уочен је сличан међусобни положај између прстенова В и С (диедарски углови  $\tau$  леже у интервалу од  $24.3^\circ$  до  $25.1^\circ$ ).



Слика 3.3. Енергетски профил за ротацију прстена В око везе C2–C1` код бајкалеина

Најстабилнији конформер поново је оптимизован помоћу следећих модела: M05-2X/cc-PVDZ, M05-2X/cc-PVTZ, и PBE/6-311+G(2df,p). Експериментални и израчунати резултати за дужине веза и углове веза приказани су у табелама 3.2 и 3.3.

Табела 3.2. Дужине веза код бајкалеина (pm)

Дужина везе	Експ.	M05-2X		B3LYP		M05-2X		PBE
		А	Б	А	Б	Ц	Д	Б
D(O1-C2)	135.3	135.0	134.7	135.8	135.4	135.1	134.8	136.1
D(C2-C3)	136.0	135.1	134.8	135.9	135.6	135.7	134.8	136.8
D(C3-C4)	143.2	144.4	144.0	144.5	144.2	144.7	144.0	144.1
D(C4-C10)	143.9	145.1	144.6	145.2	144.8	145.0	144.4	144.5
D(C5-C10)	141.4	140.7	140.3	141.2	140.9	141.0	140.3	141.5
D(C5-C6)	138.4	137.9	137.6	138.6	138.3	138.5	137.6	139.2
D(C6-C7)	140.4	139.7	139.3	140.2	139.9	140.1	139.3	140.7
D(C7-C8)	139.2	138.8	138.5	139.4	139.1	139.5	138.6	139.9
D(C8-C9)	138.7	138.3	138.0	138.7	138.4	138.8	138.0	139.0
D(C9-O1)	136.9	136.7	136.4	137.3	136.9	136.8	136.6	137.7
D(C9-C10)	140.0	139.6	139.2	140.3	139.9	139.9	139.1	140.7
D(C2-C1')	146.9	147.3	147.0	147.4	147.2	147.6	147.0	147.2
D(C1'-C2')	139.9	139.6	139.2	140.3	140.0	140.0	139.2	140.7
D(C2'-C3')	139.2	138.7	138.4	139.1	138.8	139.1	138.4	139.4
D(C3'-C4')	139.3	138.9	138.6	139.4	139.0	139.3	138.5	139.7
D(C4'-C5')	139.3	139.0	138.7	139.5	139.1	139.4	138.7	139.8
D(C5'-C6')	138.6	138.6	138.3	139.0	138.6	139.0	138.2	139.2
D(C6'-C1')	140.2	139.6	139.2	140.3	140.0	140.0	139.2	140.7
D(O4-C4)	126.0	123.7	123.8	124.9	124.8	124.3	124.0	126.6
D(O5-C5)	134.8	134.4	134.1	134.9	134.5	134.1	134.2	134.7
D(O6-C6)	136.2	136.5	136.4	137.0	136.9	134.1	136.7	137.3
D(O7-C7)	135.0	134.8	134.7	135.4	135.2	134.1	134.8	135.9
D(H5-O5)	97.0	98.8	99.3	99.6	99.9	100.5	99.6	103.2
D(H6-O6)	97.0	96.4	96.4	96.7	96.7	96.8	96.4	97.7
D(H7-O7)	97.0	96.4	96.5	96.7	96.7	96.9	96.4	97.7
Средња апс. грешка		0.6	0.8	0.5	0.5	0.6	0.8	0.8
Водоничне везе								
D <sub>H</sub> (H5--O4)	174.0	172.5	168.9	171.1	168.8	164.1	166.7	158.4
D <sub>H</sub> (H6--O5)	171.0	223.8	224.0	226.2	226.1	223.8	223.8	226.4
D <sub>H</sub> (H7--O6)	195.0	215.1	215.4	217.2	226.1	213.0	214.7	216.5

A=6-311+G(d,p), B=6-311+G(2df,p), Ц=cc-PVDZ, Д= cc-PVTZ

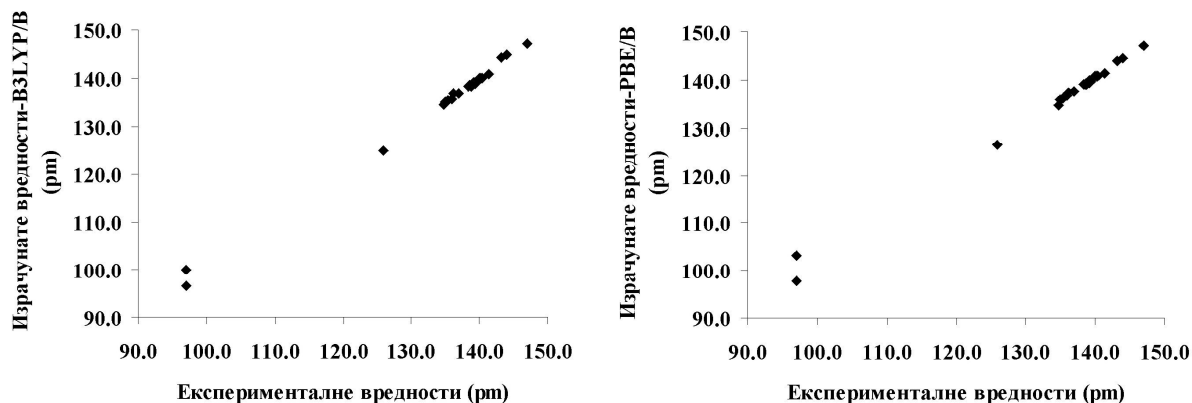


Табела 3.3. Углови веза код бајкалеина (°)

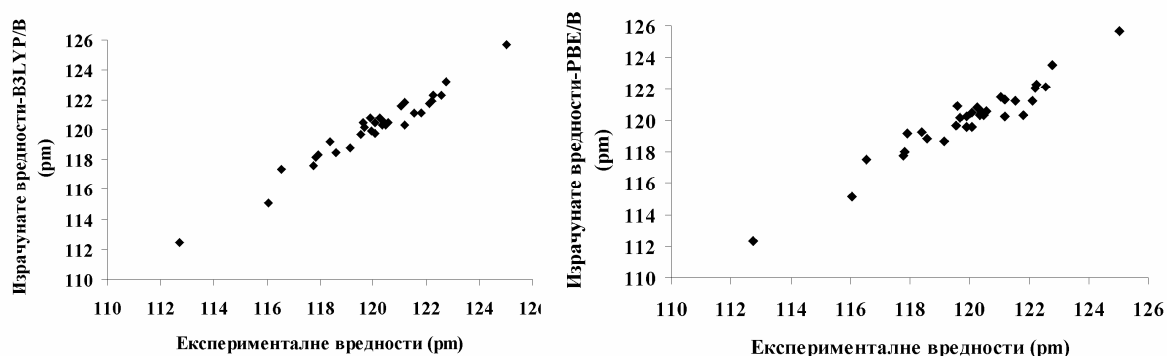
Углови везе	Експ.	M05-2X		B3LYP		M05-2X		PBE
		А	Б	А	Б	Ц	Д	Б
A(C9–O1–C2)	119.9	120.4	120.4	120.7	120.7	120.2	120.3	120.3
A(O1–C2–C1')	112.7	112.4	112.4	112.3	112.4	112.1	112.4	112.3
A(O1–C9–C10)	121.2	120.4	120.4	120.3	120.3	120.3	120.4	120.2
A(O1–C2–C3)	122.2	122.7	122.6	121.9	121.9	122.9	122.6	122.0
A(C2–C3–C4)	121.1	121.1	121.1	121.6	121.6	121.0	121.1	121.4
A(C3–C2–C1')	125.1	125.0	125.0	125.7	125.7	125.1	125.0	125.7
A(C3–C4–C10)	116.1	114.8	114.9	115.0	115.0	114.7	114.9	115.1
A(C4–C10–C5)	121.8	120.9	120.8	121.1	121.1	120.1	120.6	120.3
A(C4–C10–C9)	119.6	120.6	120.6	120.5	120.5	121.0	120.7	120.9
A(C9–C10–C5)	118.6	118.6	118.6	118.4	118.5	118.9	118.7	118.8
A(C10–C5–C6)	119.9	119.8	119.8	119.9	119.9	119.6	119.8	119.6
A(C5–C6–C7)	119.7	120.3	120.1	120.2	120.1	120.2	120.1	120.2
A(C6–C7–C8)	121.6	121.1	121.2	121.0	121.1	121.2	121.2	121.2
A(C7–C8–C9)	117.8	117.9	117.9	118.1	118.2	117.9	117.9	118.0
A(C8–C9–C10)	122.3	122.4	122.3	122.4	122.3	122.2	122.3	122.3
A(C8–C9–O1)	116.6	117.3	117.3	117.3	117.4	117.5	117.4	117.5
A(C1'–C2'–C3')	120.1	120.1	120.2	120.4	120.5	120.2	120.2	120.5
A(C2'–C3'–C4')	120.5	120.2	120.2	120.3	120.3	120.2	120.2	120.3
A(C3'–C4'–C5')	119.5	119.9	119.9	119.7	119.7	119.8	119.8	119.6
A(C4'–C5'–C6')	120.4	120.2	120.2	120.3	120.3	120.2	120.2	120.3
A(C5'–C6'–C1')	120.4	120.2	120.2	120.5	120.6	120.2	120.2	120.6
A(C6'–C1'–C2')	119.1	119.5	119.4	118.9	118.8	119.4	119.4	118.7
A(C6'–C1'–C2)	120.3	120.5	120.5	120.8	120.8	120.6	120.5	120.8
A(C2–C1'–C2')	120.6	120.1	120.1	120.4	120.5	120.0	120.1	120.5
A(C3–C4–O4)	122.8	123.4	123.2	123.3	123.2	123.5	123.2	123.6
A(C10–C4–O4)	121.2	121.9	121.9	121.7	121.8	121.9	121.9	121.3
A(C10–C5–O5)	122.1	122.5	122.0	122.1	121.8	121.8	121.9	121.2
A(C6–C5–O5)	117.9	118.2	118.2	118.0	118.4	118.6	118.4	119.2
A(C5–C6–O6)	122.6	120.3	122.1	122.4	122.3	122.1	122.1	122.1
A(C7–C6–O6)	117.8	117.8	117.8	117.4	117.6	117.6	117.8	117.8
A(C6–C7–O7)	120.1	119.3	119.3	119.7	119.7	119.1	119.2	119.6
A(C8–C7–O7)	118.4	119.5	119.5	119.3	119.2	119.7	119.6	119.2
Средња апс. грешка		0.5	0.4	0.4	0.4	0.5	0.4	0.5
Торзиони угао								
$\tau(O1-C2-C1'-C2')$	9.0	24.5	23.5	21.0	20.2	20.7	22.5	18.5

Као што се види из табеле 3.2, сви модели врло добро репродукују геометријске податке за дужину веза добијене рендгенском структурном анализом (слика 3.4). Средња апсолутна грешка за дужине веза је веома мала (0.5-0.8 pm) и у рангу је грешке кристалографских експеримената. Слична запажања (табела 3.3) важе и за углове веза

(слика 3.5). Постоје мале разлике у перформансама између коришћених модела. Најмања вредност средње апсолутне грешке за дужине веза (0.5  $\mu\text{m}$ ) добијена је помоћу V3LYP/6-311+G(2df,p) модела, што је и за очекивати јер у себи садржи највећи базисни скуп.



Слика 3.4. Зависност израчунатих од експериментално одређених дужина веза код бајкалеина



Слика 3.5. Зависност израчунатих од експериментално одређених углова веза код бајкалеина

На слици 3.4 приказана је корелација између експериментално одређених дужина веза код бајкалеина и дужина веза израчунатих помоћу V3LYP/6-311+G(2df,p) и PBE/6-311+G(2df,p) модела. Коefицијенти корелације за приказане зависности износе 0.999 и 0.997, што говори о одличном слагању између експерименталних и израчунатих вредности. Слична запажања се могу уочити и за углове веза (слика 3.5). Коefицијенти корелације за приказане зависности износе 0.98 и 0.96, што говори о добром слагању између експерименталних и израчунатих вредности за углове веза.

Експериментална вредност диедарског угла  $\tau$  ( $9.0^\circ$ , табела 3.3) је мања од вредности добијених помоћу различитих теоријских модела. Ово се може објаснити чињеницом да се геометрија молекула у кристалу разликује од геометрије изолованог молекула у гасовитој фази. Главни разлог ове појаве је постојање интермолекулских интеракција у кристалу, које не постоје у гасовитој фази.

На основу приказаних резултата може се закључити да је бајкалеин благо непланаран молекул. Један од разлога зашто се јавља непланарност је непостојање ОН групе на угљениковом С3 атому [101]. У случајевима када ОН група постоји у положају 3, кисеоник из ОН групе преко својих слободних електронских парова гради слабу водоничну везу са Н6 из прстена В и на тај начин задржава планарност.

У најстабилнијој структури бајкалеина постоје три водоничне везе које имају стабилизациони ефекат. Конформације 1a, 1b и 1c (слика 3.2) садрже мање водоничних веза и мање су стабилне у односу на глобални минимум за 22.3, 29.4 и 65.3 kJ/mol (табела 3.1). Разлике у енталпијама у односу на глобални минимум јасно указују на чињеницу да је водонична веза  $D_{\text{H}}(\text{H5}--\text{O4})$  јача од друге две водоничне везе, што је у сагласности са израчунатим дужинама веза (табела 3.2). Ови резултати нису у сагласности са експерименталним вредностима. Експериментална вредност за дужину водоничне везе  $D_{\text{H}}(\text{H6}--\text{O5})$  указује да је она краћа у односу на друге две водоничне везе (табела 3.2). Ове разлике између експерименталних и израчунатих вредности могу се приписати интермолекулским везама које постоје у кристалној структури.

Јасно је да је јачина водоничних веза од великог значаја за стабилност ротамера бајкалеина. Зато је изведена NBO (Natural Bond Orbital) анализа за све четири структуре. Према овој методи делокализација електронске густине између попуњених орбитала Луисовог типа (везивних и слободних електронских парова) и орбитала не-Луисовог типа (формално празних и антивезивних) одговара стабилизујућој донорско-акцепторској интеракцији. Јачина ове интеракције може се проценити пертурбационом теоријом другог реда. Као мера јачине водоничне везе може се узети енергија интеракције другог реда  $E(2)$ . Треба истаћи да  $E(2)$  не представља енергију водоничне везе, већ су енергије водоничних веза сразмерне енергијама интеракције другог реда. Код бајкалеина електрони усамљених електронских парова на кисеонику се делокализују у антивезивне орбитале О–Н веза, и на тај начин формирају водоничне

везе (табела 3.4). На пример, нађено је да долази до трансфера електронске густине из 2p орбитале на O4 у антивезивну  $\sigma^*$  O5–H5 орбиталу. Ово је главна доворско-акцепторска стабилизујућа интеракција одговорна за формирање водоничне везе.

Табела 3.4. Дворско-акцепторске интеракције одговорне за водоничне везе код бајкалеина

Дворска NBO	Акцепторска NBO	E(2) kJ/mol
sp <sup>2</sup> O4	$\sigma^*$ O5-H5	13.8
p O4	$\sigma^*$ O5-H5	84.9
sp <sup>2</sup> O5	$\sigma^*$ O6-H6	2.8
sp <sup>2</sup> O6	$\sigma^*$ O7-H7	4.4

### 3.2. Спектралне особине бајкалеина

#### 3.2.1. IR и Раманска спектрална анализа бајкалеина

Полихидрокси флавори садрже више хидроксилих група које имају значајан утицај на изглед вибрационих спектра. Вибрациони спектри ових молекула су уопштено гледано веома сложени са мноштвом спектралних трака које се углавном, у високофреквентној области (4000-2000 cm<sup>-1</sup>), асигнирају различитим облицима O–H и C–H вибрација.

У табели 3.5 приказани су експериментално добијени и израчунати, скалирани положаји трака у IR и Раманском спектру бајкалеина. Асигнирани су првих 69 (од укупно 84) облика који се појављују у опсегу од 4000-400 cm<sup>-1</sup>, и интензитети тих облика. Асигнација нормалних вибрационих облика одрађена је на основу најбољих слагања између експериментално добијених и симулираних спектра. У табели 3.5 такође се наводе IR и Рамански интензитети, вредности расподеле потенцијалне енергије (PED) у процентима [102], као и доприноси различитих облика вибрација у одређеним нормалним облицима. Можемо видети да положаји израчунатих трака показују врло добра слагања са експерименталним резултатима, што указује да је добро одрађена асигнација нормалних облика. Симулације спектра извршене су користећи M052-X/6-311+G(2df, p) модел.

Вибрациони модови асигнирани су на основу PED анализе [102] користећи VEDA 4 програм [103]. Анализа нормалних координата бајкалеина извршена је да би се добио комплетан опис кретања молекула укључујући основне принципе кретања. Израчунати таласни бројеви скалирани су фактором 0.9444 [104-106] да би се добила боља слагања између израчунатих и експерименталних вредности таласних бројева положаја трака.

Како бајкалеин припада групи симетрије (C1) његови (FT)-IR и Рамански спектри су веома слични по изгледу, са мало више трака у IR спектру и неким разликама у релативним интензитетима. Разлика у броју и интензитету трака може се сматрати последицом самог ефекта Раманског расејавања.

Веома карактеристичне и лако препознатљиве широке траке у IR и нормалним Раманским спектрима фенола и полихидроксифенола (такође и алкохола) су траке које се асигнирају различитим облицима О–Н вибрација (табела 3.5). Иако DFT рачун предвиђа у спектру појаву три довољно интензивне траке (облици 84-82, табела 3.5), у експериментално добијеном IR спектру се јављају само две интензивне траке на 3410 и 3065  $\text{cm}^{-1}$ . Прва трака, карактеристична за слабе водоничне везе, асигнирана је О–Н истежућој вибрацији прстена А (O7–H7) (облик 83). Друга трака, по облику и интензитету карактеристична за грађење јаке водоничне везе, асигнирана је О–Н истежућој вибрацији прстена С (O5–H5) (облик 82). Добијени резултати су у сагласности са подацима из табеле 3.2, као и резултатима NBO анализе (табела 3.4).

Табела 3.5. Експериментално добијени и израчунати положаји трака у IR и Раманским спектрима бајкалеина, асигнација и интезитети нормалних облика

		Експерименталне вредности		M05-2X/6-311+G(2df, p)			
Облик	Тип вибрације	$\hat{\nu}_{\text{IR}} / \text{cm}^{-1}$	$\hat{\nu}_{\text{IR}} / \text{cm}^{-1}$	$\hat{\nu}_{\text{скалирано}} / \text{cm}^{-1}$	IR/Рамански интезитет	Раманска активност	PED (%)
84	ОН истежућа (A)(C6-OH)			3629.7	сл/всл	66.2	$\nu_{\text{OH}}$ (99)
83	ОН истежућа (A)(C7-OH)	3410		3616.5	ср/всл	114.6	$\nu_{\text{OH}}$ (99)
82	СН истежућа (C)(C5-OH)	3065		3091.4	всл/всл	76.4	$\nu_{\text{CH}}$ (97)
81	СН истежућа (A)			3079.4	всл/всл	68.3	$\nu_{\text{CH}}$ (99)
80	СН истежућа (B)			3064.6	всл/всл	247.3	$\nu_{\text{CH}}$ (98)
79	СН истежућа (B)			3060.1	всл/всл	22.1	$\nu_{\text{CH}}$ (95)
78	СН истежућа (B)			3053.6	всл/всл	76.2	$\nu_{\text{CH}}$ (83)
77	СН истежућа (B)			3046.3	всл/всл	114.4	$\nu_{\text{CH}}$ (95)
76	СН истежућа (B)			3036.3	всл/всл	40.8	$\nu_{\text{CH}}$ (95)
75	ОН истежућа (A)			3017.7	вј/всл	133.1	$\nu_{\text{CH}}$ (86)
74	C=O истежућа (C) CC истежућа (A-C)	1656	1654	1654.0	вј/ср	206.5	$\nu_{\text{C=O}}$ (47)+ $\delta_{\text{COH}}$ (10)
73	CC истежућа (A, C) C=O истежућа (C)	1615	1612	1619.6	ј/ср	345.1	$\nu_{\text{CC}}$ (64)

72	СС истежућа (В)			1604.3	всл/вј	5312	$v_{CC}(57)+\delta_{CCN}(14)$
71	СС истежућа (А-В-С) ОС истежућа (А)	1587	1589	1593.3	всл/сл	1501	$v_{CC}(44)$
70	СС истежућа (С)(C2=C3)	1560	1566	1596.6	всл/ј	318.0	$v_{CC}(44)+\delta_{CCN}(11)$
69	СС истежућа (А, С) ОС истежућа (А)	1504	1507	1495.1	сл/сл	144.5	$v_{CC}(18)+\delta_{CCN}(34)$
68	СС истежућа (В)	1471	1466	1474.8	всл/всл	92	$v_{CC}(13)+\delta_{CCN}(59)$
67	СС истежућа (А, С) ССС савијајућа (А,В) СОН савијајућа (А-С)	1448	1450	1463.8	вј/всл	11.9	$v_{CC}(56)$
66	СС истежућа (В) ССН савијајућа (В)	1414	1406	1427.5	всл/всл	25.2	$v_{CC}(29)$
65	ОС истежућа (А) СС истежућа (В) СОН савијајућа (А)	1388	1381	1388.3	сл/всл	13.6	$v_{CC}(17)+\delta_{CCN}(30)$
64	СС истежућа (А, С) СОН савијајућа (А)			1365.9	всл/всл	67.0	$v_{CC}(67)+\delta_{CCN}(12)$
63	ОС истежућа (С) СС истежућа (А) СОН савијајућа (А)	1340		1363.1	ј/всл	73.4	$v_{CO}(12)+\delta_{CON}(20)$
62	ОС истежућа (С) СОН савијајућа (А)			1304.0	ј/всл	56.0	$v_{CO}(12)+\delta_{CON}(20)$
61	ОС истежућа (В) ССН савијајућа (В)	1296	1280	1298.8	всл/всл	0.9	$v_{CC}(10)+\delta_{HCC}(65)$
60	СС истежућа (А) СОН савијајућа (А)			1293.3	всл/всл	9.2	$\delta_{CON}(23)$

59	СС истежућа (В) ССН савијајућа (В)			1272.4	всл/всл	23.1	$v_{CC}(35)+\delta_{CCN}(13)$
58	СОН савијајућа (А) ССН савијајућа (С)	1242	1248	1245.2	сл/всл	38.9	$v_{CO}(24)+\delta_{CON}(21)$
57	СС истежућа (С-В) ССН савијајућа (С) ССН савијајућа (В)	1210	1203	1216.1	всл/ј	241.9	$v_{CC}(34) + \delta_{CCN}(33)$
56	СОН савијајућа (А) ССН савијајућа (А)			1178.5	всл/всл	3.7	$v_{CC}(14)+\delta_{CON}(45)$
55	СОН савијајућа (А) ССН савијајућа (С)	1181		1170.3	всл/всл	64.0	$v_{CO}(26)+\delta_{CON}(10) + \delta_{CCN}(20)$
54	ССН савијајућа (В) ССН савијајућа (А)	1161	1160	1155.0	всл/всл	7.9	$v_{CC}(11)+\delta_{CCN}(72)$
53	ССН савијајућа (А, В) СОН савијајућа (А)			1126.6	сл/всл	2.9	$\delta_{CCN}(49)$
52	ССН савијајућа (В)	1103	1110	1125.1	всл/всл	6.3	$\delta_{CCN}(72)$
51	ССН савијајућа (А) ССС савијајућа (А,С) ССО савијајућа (А,С)	1084		1078.3	всл/всл	10.9	$v_{OC}(58)$
50	ССН савијајућа (В)			1067.0	всл/всл	0.1	$v_{CC}(17)+\delta_{CCN}(43)$
49	ССН савијајућа (А, С) СОН савијајућа (А)	1031	1032	1054.1	сп/всл	1.5	$v_{CC}(23)+\delta_{CCO}(20)+ \delta_{CCN}(13)$
48	ССН савијајућа (В)	1019		1019.7	всл/всл	32.6	$v_{CC}(30)+\delta_{CCN}(25)+ \delta_{CCC}(15)$
47	ССН савијајућа (А, С,В)			1003.0	всл/всл	8.1	$v_{CC}(15)+\delta_{CCN}(13)$
46	ССН савијајућа (В)	995	999	984.1	всл/всл	0.3	$\delta_{CON}(49)$
45	ССН савијајућа (В)	963		973.9	всл/всл	50.8	$v_{CC}(14)+\delta_{CCC}(59)$



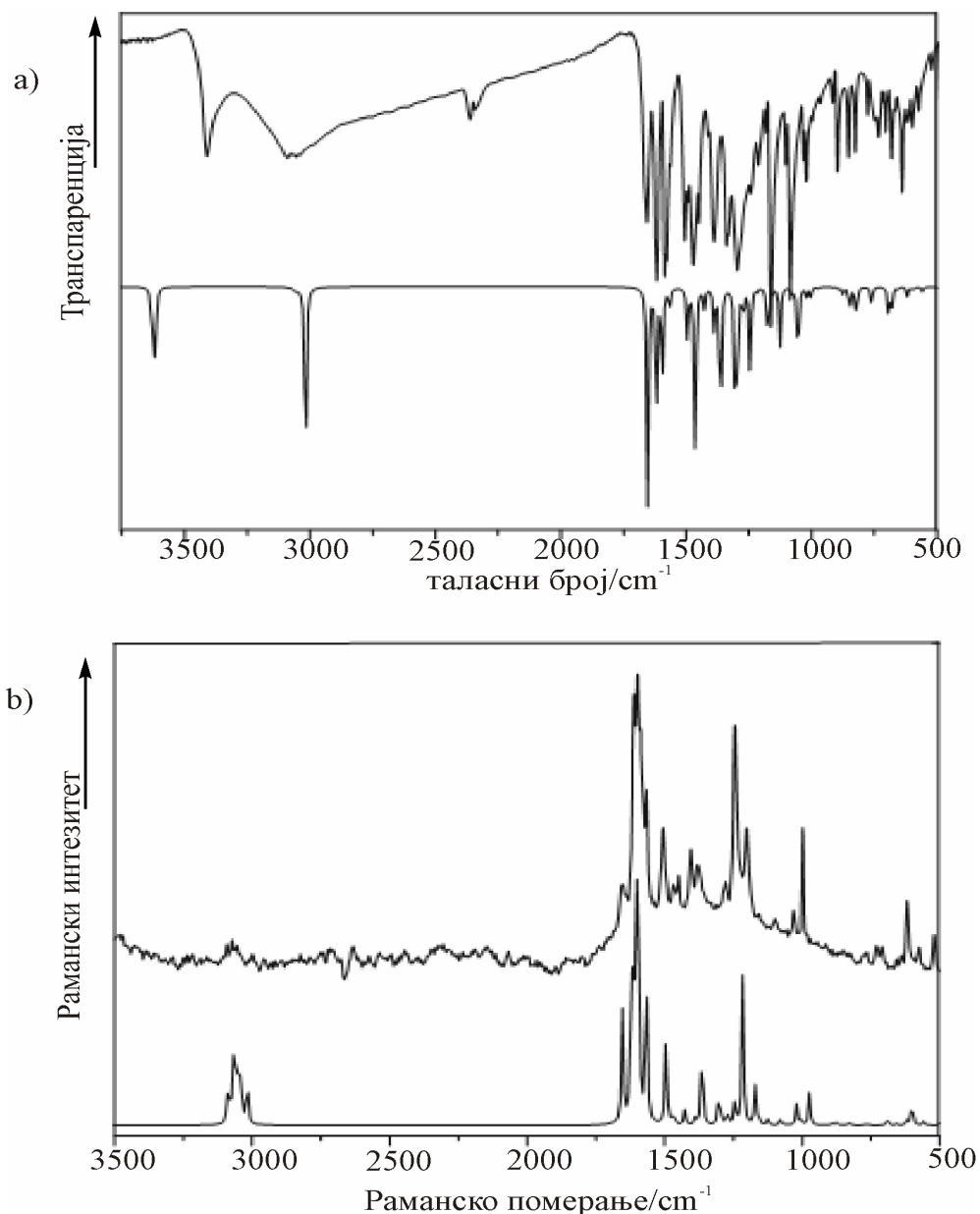
44	ССН савијајућа (В )			964.6	всл/всл	1.4	$v_{OC}(65)+\delta_{CCN}(13)$
43	ССН савијајућа (В) ССС савијајућа (А-С) ССО савијајућа (С-В)	915		918.2	всл/всл	0.1	$\delta_{CCN}(39)$
42	СОС савијајућа (С) ССН савијајућа (С) СОН савијајућа (А)	897		892.2	всл/всл	3.0	$v_{CC}(13)+\delta_{CCC}(11)+\delta_{COS}(13)$
41	ССН савијајућа (А) СОН савијајућа (А) ССС савијајућа (С)			874.5	всл/всл	5.3	$v_{CC}(35)+\delta_{CCN}(15)$
40	ССО савијајућа (А-С ) ССН савијајућа (С )	852		848.7	всл/всл	0.9	$\delta_{CCC}(18)+\delta_{CCO}(23)$
39	ССН савијајућа (В ) ССС савијајућа (А) ССО савијајућа (С )			832.4	всл/всл	3.0	$\delta_{HCC}(54)$
38	ССН савијајућа (А) ССС савијајућа (Б)	824		820.8	всл/всл	1.7	$\delta_{HCC}(74)$
37	ССО савијајућа (А, С) ССС савијајућа (Б)			818.2	всл/всл	0.1	$\delta_{CCO}(35)$
36	ССС савијајућа (А) ССО савијајућа (А-С)	778		772.5	всл/всл	0.7	$v_{CC}(11)+\delta_{CCC}(14)$
35	ССС савијајућа (В) ССН савијајућа (В )	748		760.8	всл/всл	2.4	$v_{CC}(15)+\delta_{CCC}(11)$
34	ССО савијајућа (А, С) ССН савијајућа (С)	734	729	707.9	всл/всл	0.2	$\delta_{CCN}(45)$
33	ССС савијајућа (А, С)	716	712	693.9	всл/всл	3.9	

	ССО савијајућа (А, С) ССН савијајућа (А, С)						$v_{OC} (13) + \delta_{CCO} (12) + \delta_{CCC} (13)$
32	ССС савијајућа (А, В) ССО савијајућа (А, С) ССН савијајућа (В)	682		687.4	всл/всл	4.8	$\delta_{CCO} (12) + \delta_{CCC} (24)$
31	ССС савијајућа (В) ССН савијајућа (В)	668		679.1	всл/всл	0.5	$\delta_{CCC} (22) + \delta_{CCC} (28)$
30	ССС савијајућа (В) СОС савијајућа (А-С)	638	645	655.6	всл/всл	2.51	$\delta_{COC} (12) + \delta_{CCN} (26)$
29	ССС савијајућа (А, В) ССО савијајућа (В)			627.6	всл/всл	0.6	$\delta_{CCO} (15) + \delta_{CCC} (32)$
28	ССОН торзиона (А) СССС торзиона (А, С)	616	621	618.7	всл/всл	7.1	$\delta_{CCO} (30)$
27	СССС торзиона (А, В, С) ССОН торзиона (А)			602.0	всл/всл	23.8	$v_{CC} (28) + \delta_{CCC} (24)$
26	СССН торзиона (В) ССОН торзиона (А)			596.9	всл/всл	9.2	$\delta_{CCC} (73)$
25	СССН торзиона (А-С)	595		590.2	всл/всл	0.5	$\tau_{НССС} (21) + \tau_{в.п. оССС} (60)$
24	СССН торзиона (А) СССО торзиона (А, С)	572	576	557.6	всл/всл	6.2	$\delta_{CCO} (55)$
23	СССН торзиона (А) СССО торзиона (А, С)	519	521	557.6	всл/всл	3.3	$v_{OC} (10) + \delta_{CCC} (45)$
22	СССН торзиона (А, В, С) СССО торзиона (А, С)	487	481	499.5	всл/всл	1.0	$\delta_{CCC} (13) + \tau_{СССС} (14)$
21	СССС торзиона (А, В) СССО торзиона (А, С) СССН торзиона (А, В, С)	459		446.1	всл/всл	1.4	$\delta_{CCC} (14) + \tau_{СССС} (19)$

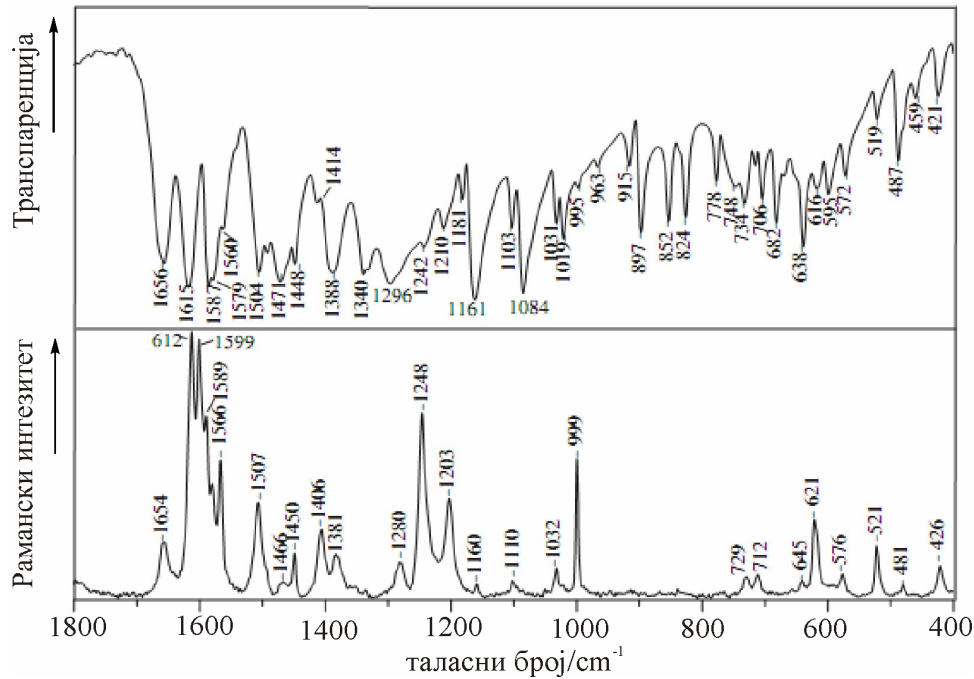
20	HCCC торзиона (A)	421	426	431.3	всл/всл	0.6	$\tau_{\text{HCCC}} (96)$
19	CCOH торзиона (A) CCCH торзиона (A, B) CCCO торзиона (A, C) CCCC торзиона (A, B)			402.1	всл/всл	5.6	$\delta_{\text{CCC}} (19)$
18	CCCC торзиона (B) CCCH торзиона (B)			392.6	всл/всл	1.7	$\tau_{\text{HCCC}} (16) + \tau_{\text{CCCC}} (19)$
17	CCCC вр торзиона (B) CCCO вр торзиона (B)			380.6	всл/всл	2.1	$\tau_{\text{HCCC}} (10) + \tau_{\text{вр. п. CCCO}} (48)$

вр = ван равни, всл = врло слаб, сл = слаб, ср = средњи, ј = јак, вј = врло јак

Иако је област од  $3850$  до  $3200\text{ cm}^{-1}$  карактеристична за C–H истежуће облике вибрација, у експериментално добијеном IR и Раманском спектру бајкалеина нема очекиваних трака (слика 3.6). Недостатак трака може бити последица интеракција између суседних молекула у кристалној фази [107-108].



Слика 3.6. IR (a) и Рамански (b) спектри бајкалеина. На обе слике експериментално добијен спектар је приказан горе, а израчунат доле



Слика 3.7. Експериментални IR (горе) и Рамански (доле) спектар бајкалеина у области од 1800 до 400  $\text{cm}^{-1}$

Област од 1700 до 1400  $\text{cm}^{-1}$  (слика 3.7) карактеристична је за појаву трака које одговарају вибрацијама карбонилне групе, ароматичних прстенова, и пиронског прстена [108-111]. У експерименталном IR спектру бајкалеина најинтезивније траке појављују се у области од 1656 до 1560  $\text{cm}^{-1}$ . Израчунате скалиране вредности износе 1654 до 1567  $\text{cm}^{-1}$ . Ове траке обично представљају комбинације C=O истежућег (1656 и 1615  $\text{cm}^{-1}$ ), C2=C3 истежућег (1560  $\text{cm}^{-1}$ ), и C-C истежућег (1656, 1615, 1587 и 1560  $\text{cm}^{-1}$ ) облика. У Раманском спектру ове траке појављују се у области од 1654 до 1566  $\text{cm}^{-1}$ , скоро на истим положајима као одговарајуће траке у IR спектру (1654 и 1612  $\text{cm}^{-1}$ ; 1566  $\text{cm}^{-1}$ ; 1654, 1612, 1589 и 1566  $\text{cm}^{-1}$ ). Пошто у структури бајкалеин нема OH групу на положају C3, траке које одговарају C=O и C2=C3 истежућим облицима се налазе на незнатно већим фреквенцијама у односу на вредности које одговарају молекулима флавона (флавонола) који имају OH групу у положају 3, као што су кверцетин, фисетин, морин и др. [111-113].

Већина трака у области од 1500 до 1000  $\text{cm}^{-1}$  одговара следећим облицима вибрација: C-C истжућим, O-C истежућим, као и C-C-H, C-O-H, C-C-O, и C-C-C савијајућим вибрацијама прстенова. Мање интезивне траке које се појављују само у IR

спектру испод  $1000\text{ cm}^{-1}$  налазе се на:  $995\text{ cm}^{-1}$  (DFT вредност:  $984\text{ cm}^{-1}$ ),  $963\text{ cm}^{-1}$  (DFT вредност:  $974\text{ cm}^{-1}$ ),  $915\text{ cm}^{-1}$  (DFT вредност:  $918\text{ cm}^{-1}$ ),  $897\text{ cm}^{-1}$  (DFT вредност:  $892\text{ cm}^{-1}$ ),  $824\text{ cm}^{-1}$  (DFT вредност:  $821\text{ cm}^{-1}$ ),  $778\text{ cm}^{-1}$  (DFT вредност:  $772\text{ cm}^{-1}$ ),  $748\text{ cm}^{-1}$  (DFT вредност:  $761\text{ cm}^{-1}$ ),  $734\text{ cm}^{-1}$  (DFT вредност:  $708\text{ cm}^{-1}$ ),  $716\text{ cm}^{-1}$  (DFT вредност:  $694\text{ cm}^{-1}$ ),  $682\text{ cm}^{-1}$  (DFT вредност:  $687\text{ cm}^{-1}$ ),  $668\text{ cm}^{-1}$  (DFT вредност:  $679\text{ cm}^{-1}$ ) и  $638\text{ cm}^{-1}$  (DFT вредност:  $656\text{ cm}^{-1}$ ) претежно су асигниране C–C–C, C–C–H, C–C–O, C–O–C, и C–O–H деформационим облицима сва три прстена. Траке које се појављују испод  $650\text{ cm}^{-1}$  и у IR ( $616, 572, 519, 487, 459$  и  $421\text{ cm}^{-1}$ ) и у Раманском спектру ( $621, 576, 521, 481$  и  $426\text{ cm}^{-1}$ ) асигниране су C–C–C–C, C–C–O–H, C–C–C–H и C–C–C–O торзионим облицима прстенова А, В и С. Израчунате вредности таласних бројева за торзионе и остале облике ( $618, 558, 499, 472, 446$  и  $431\text{ cm}^{-1}$ ) врло добро се слажу са експериментално измереним вредностима. Траке на око  $400\text{ cm}^{-1}$  ( $402, 393$  и  $381\text{ cm}^{-1}$ ) нађене су само помоћу DFT прорачуна, и асигниране су C–C–C–C и C–C–C–O торзионим облицима В прстена.

### 3.2.2. UV/Vis спектри

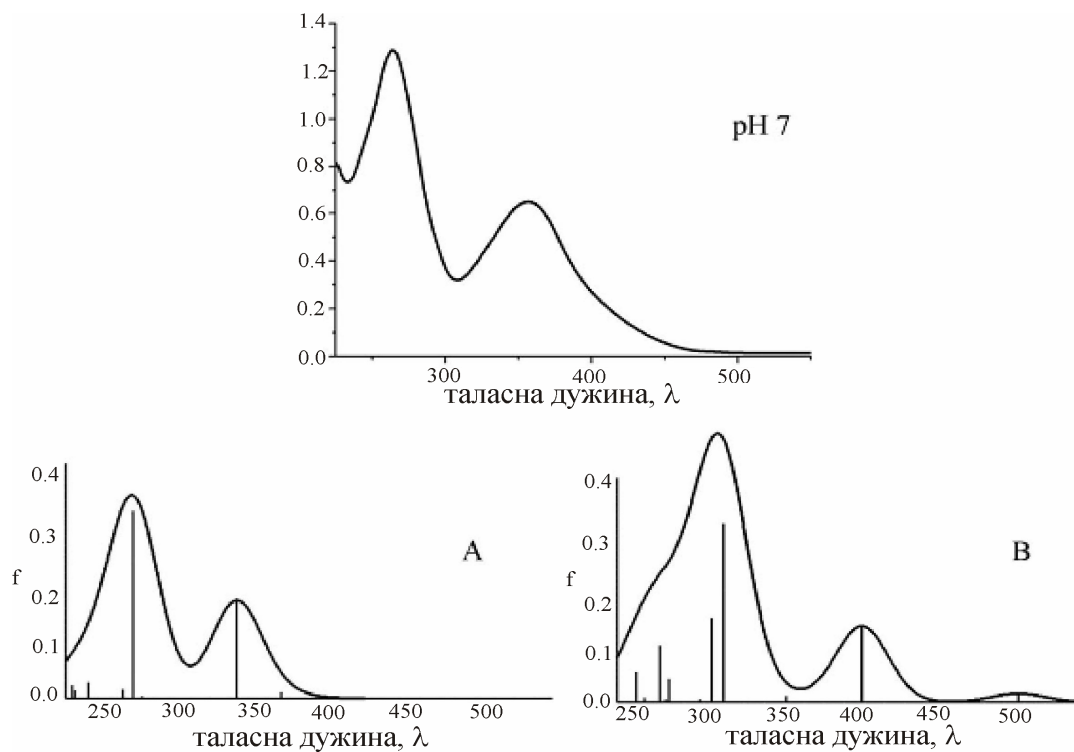
Апсорпција електромагнетног зрачења у видљивој и ултраљубичастој области електромагнетног спектра води до побуђивања електрона из основног у побуђена електронска стања молекула [114].

У спектрохемијским испитивањима електронски апсорпциони спектри кондензованих фаза имају већу важност од електронско-вибрационо-ротационих прелаза гасних система. У том смислу могуће је говорити о њиховој примени у квалитативној, квантитативној и структурној анализи као и примени у неаналитичке сврхе као што је примена у кинетици. Примена електронских апсорпционих спектра у квантитативне сврхе је много важнија него што је то њихова примена у квалитативној анализи. Квалитативна анализа заснива се на карактеристичном положају, интензитету и облику апсорпционих трака одређених хромофора које се могу идентификовати на основу спектра великог броја познатих једињења. Међутим, важно је нагласити да се поузданост методе анализе електронских спектра хромофора повећава само у случају спреге са другим спектроскопским методама и техникама (NMR, MS, IR, ESR) јер те методе показују знатно већу осетљивост на мале структурне промене у молекулима на већим растојањима од самих хромофора што је посебно изражено код великих

молекула. Још један ограничавајући фактор примене ове методе јесте и чињеница да многе хромофоре апсорбују испод доње границе стандардне спектрохемијске области, испод 200 nm, што онемогућава рад са стандардном опремом (у области од 200-800 nm). Много већу примену ова метода има у анализи природних конјугованих једињења као што су биљни пигменти, полиацетилени, порфирина, флавоноиди, антрахинони, биолошки макромолекули као и комплекси прелазних метала који садрже овакве молекуле као лиганде.

UV/Vis спектар бајкалеина симулиран је користећи временски зависну теорију функционала густине (Time Dependent Density Functional Theory = TD-DFT), која подразумева да се израчунају електронски прелази из основног у нижа побуђена стања бајкалеина [115-119]. Симулација је изведена користећи UB3LYP и UPBE функционале и 6-311+G(2df,p) базисни скуп.

На слици 3.8 представљени су експериментални и симулирани UV/Vis спектри бајкалеина, док су у табели 3.6 дати експериментални и израчунати електронски прелази.



Слика 3.8. Експериментални спектар (горе) и симулирани спектри (доле): А - спектар симулиран помоћу B3LYP/6-311+G(2df,p) модела; В - спектар симулиран помоћу PBE/6-311+G(2df,p) модела

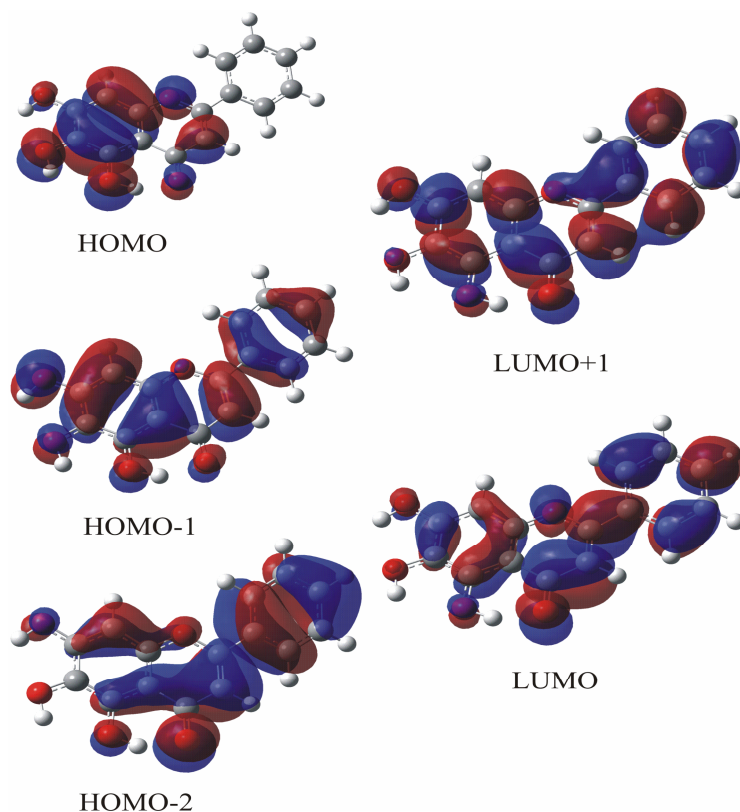
Табела 3.6. Експериментални и израчунати електронски прелази код бајкалеина

Експ.	TD-B3LYP			TD-PBE		
$\lambda(\text{nm})$	$\lambda(\text{nm})$	f	Главни електронски прелази	$\lambda(\text{nm})$	f	Главни електронски прелази
359	342	0.268	НОМО-1→LUMO (94%)	399	0.136	НОМО-1→LUMO (93%)
264	274	0.521	НОМО-2→LUMO (56%) НОМО→LUMO+1 (26%)	312	0.322	НОМО-3→LUMO (44%) НОМО-1→LUMO+1 (33%)
				304	0.150	НОМО-4→LUMO (32%) НОМО-3→LUMO (29%) НОМО-1→LUMO+2 (37%)

$\lambda$  представља таласну дужину, а f осцилаторну јачину

Апсорпциони максимум, чија је експериментална вредност 359 nm, предвиђен је на 342 и 399 nm помоћу B3LYP и PBE метода. У оба случаја, нађено је да овим апорпциним макимумима одговара електронски прелаз из НОМО-1 у LUMO. Максимум који се јавља у експерименталном спектру на 264 nm, предвиђен је B3LYP методом на 274 nm. Овом максимуму одговарају прелази из НОМО-2 у LUMO, и из НОМО у LUMO+1. Истом експерименталном максимуму одговарају два максимума на 313 и 304 nm израчуната помоћу PBE методе. Првом максимуму одговарају прелази из НОМО-3 у LUMO и из НОМО-1 у LUMO+1. Другом максимуму одговарају прелази из НОМО-4 у LUMO, НОМО-3 у LUMO и НОМО-1 у LUMO+2. На основу ове анализе види се да је слагање између експерименталних вредности таласних дужина и интезитета максимума и оних који су израчунати помоћу B3LYP функционала, сасвим задовољавајуће. Са друге стране, PBE метода није погодна за предвиђање UV спектра, бар кад је у питању бајкалеин. Облици одговарајућих орбитала између којих се прелази дешавају, израчунате помоћу B3LYP функционала, приказани су на слици 3.9.





Слика 3.9. Орбитале одговорне за електронске прелазе у UV спектру бајкалеина

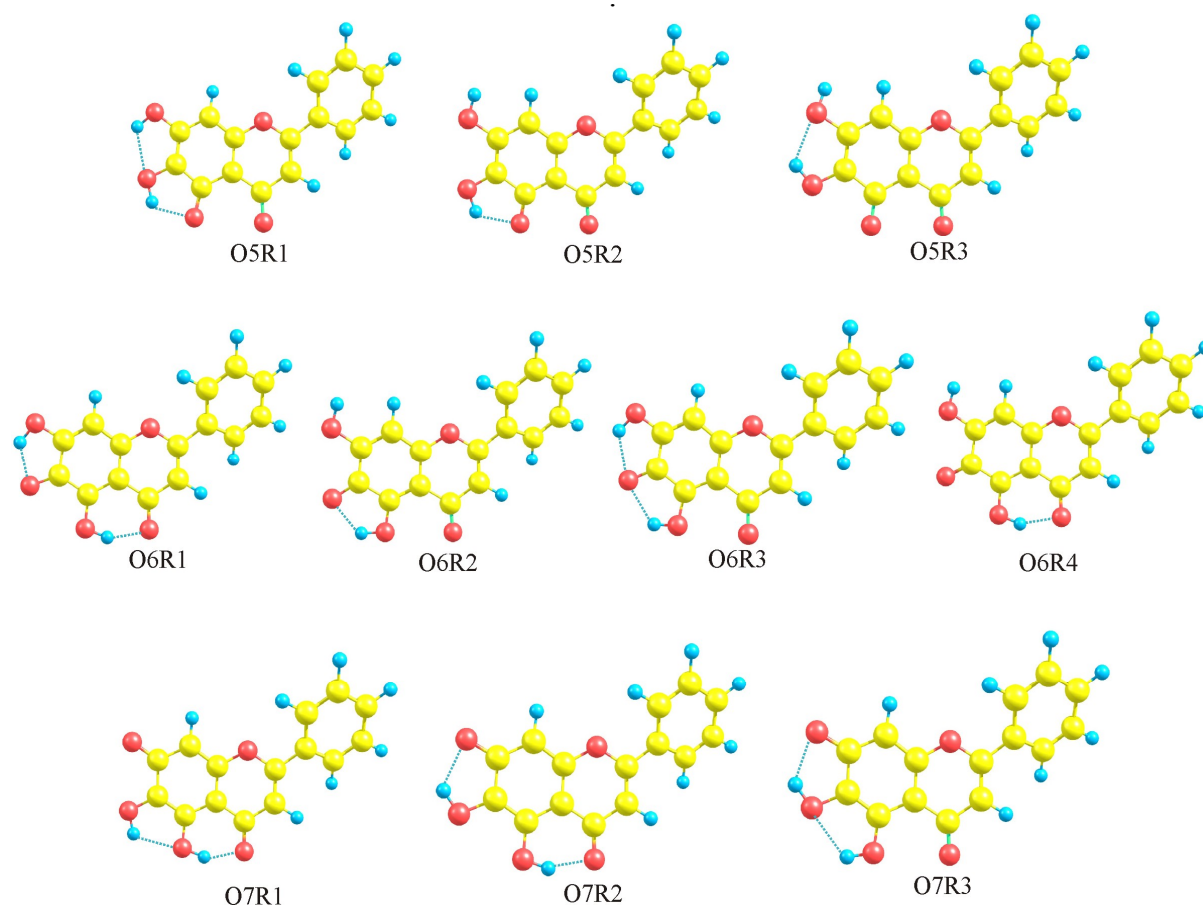
### 3.3. Честице које настају у процесу антиоксидативног деловања бајкалеина

Као што је већ речено у уводу, антиоксидативно дејство полихидрокси фенола може се манифестовати преко најмање три различита механизма: НАТ, SET-PT и SPLET. Да бисмо могли описати ове механизме, неопходно је генерисати молекулске, јонске и радикалске врсте које учествују у горе поменутих механизмима. Оне су дефинисане у једначинама 1.4, 1.6, 1.8, 1.10 и 1.12 и биће подробно описане у овом делу. За све ове механизме заједничко је да се на крају процеса формирају одговарајући радикали бајкалеина.

#### 3.3.1. Радикали бајкалеина

Полазећи од геометрије најстабилнијег конформера бајкалеина (1) симулирано је хомолитичко раскидање О–Н веза на положајима 5, 6 и 7. Радикали образовани на овај начин означени су као O5R, O6R и O7R. Сваки радикал може попримити различите конформације (1, 2, 3 и 4 на слици 3.10). У случају O5R, сви ротамери

означени су O5R1, O5R2 и O5R3. Слична обележавања коришћена су и за друга два радикалска облика. Сви могући радикали и њихови одговарајући ротамери приказани су на слици 3.10. Све оптимизације геометрија извршене су помоћу M05-2X/6-311+G(d,p) модела у гасовитој и воденој фази [60]. Утицај воде као растварача процењен је помоћу солватационог модела CPCM (Polarizable Conductor Calculation Model).



Слика 3.10. Структуре радикала бајкалеина O5R, O6R и O7R. Сваки радикал је приказан са свим својим ротамерима

Из BDE вредности бајкалеина за гасовиту фазу и водени раствор (табела 3.7) произилази следећи редослед лакоће хомолитичког раскидања O–H веза: O6–H6 > O7–H7 > O5–H5. На основу ових резултата потпуно је јасно да је хомолитичко раскидање O–H везе фаворизовано на OH групи везаној за C6 атом. Вредности за  $\Delta H_{\text{solv}}$  и  $\Delta G_{\text{solv}}$  показују да су слободни радикали благо стабилизовани у воденом раствору. У табели 3.7 приказане су и релативне укупне енергије и енталпије за ротамере радикала бајкалеина. На основу вредности енергија утврђено је да је најстабилнији радикал O6R,

односно његов ротамер O6R1 [60]. Сви ротамери друга два радикала су знатно нестабилнији од O6R1 ( $O6R1 > O7R2 > O5R1$ ), и због тога су искључени из даље дискусије.

Табела 3.7. Релативне енергије (kJ/mol) израчунате помоћу M05-2X/6-311+G(d,p) модела за ротамере радикала бајкалеина у гасовитој и воденој фази

Ротамер	$\Delta E$	$\Delta H$	$\Delta H^{\text{CPM}}$	$\Delta H_{\text{solv}}$	$\Delta G_{\text{solv}}$	BDE	BDE <sup>CPM</sup>
<b>O5R1</b>	56.7	58.2	43.8	-68.8	-58.5	391.4	363.0
<b>O5R2</b>	73.1	72.2	47.9	-68.8	-69.9	405.5	367.1
<b>O5R3</b>	99.5	101.7	61.0	-68.8	-83.1	435.0	380.2
<b>O6R1</b>	0.0	0.0	0.0	-44.4	-44.1	333.2	319.2
<b>O6R2</b>	57.4	58.3	36.3	-66.4	-66.3	391.5	355.5
<b>O6R3</b>	25.9	26.6	23.3	-47.7	-48.3	359.8	342.5
<b>O6R4</b>	40.4	40.9	17.2	-68.1	-67.1	374.1	336.4
<b>O7R1</b>	46.9	47.5	45.8	-46.1	-46.1	380.7	365.0
<b>O7R2</b>	30.5	30.6	34.4	-40.6	-40.7	363.8	353.6
<b>O7R3</b>	73.6	74.9	69.0	-50.4	-50.4	408.2	388.2

$\Delta E$  означава разлику у укупној енергији у односу на најстабилнији конформер. Укупне енергије за најстабилнији радикал су:  $E(O6R1) = -953.28261552$  а.у. у гасу и  $-953.298919744$  а.у. у води.  $\Delta H$  означава разлику у енталпији у односу на најстабилнији конформер.  $\Delta H_{\text{solv}}$  и  $\Delta G_{\text{solv}}$  означавају разлику у енталпији, односно слободној енергији, између конформера у води и у гасу. BDE представља енталпију раскидања везе. Све величине су кориговане одговарајућим скалираним величинама [99] (ZPVE, термална корекција за енталпију и термална корекција за слободну енергију).

Треба истаћи да радикали задржавају непланарност, која је уочена у основном стању молекула бајкалеина. Вредности за торзиони угао  $\tau$  (табела 3.8) за најстабилнији ротамер радикала бајкалеина у гасовитој и воденој фази су  $27.1^\circ$  и  $22.8^\circ$ . Непланарност насталог радикала смањује конјугацију, што има за последицу слабију делокализацију неспареног електрона, и самим тим и смањење антиоксидативне активности. Тај ефекат се огледа и кроз смањење TEAC вредности бајкалеина (2.56 mM) у поређењу са кверцетином (4.42 – 4.7 mM), цијанидином (4.4 mM), и мирицетином (3.1 mM) [4, 39, 40].

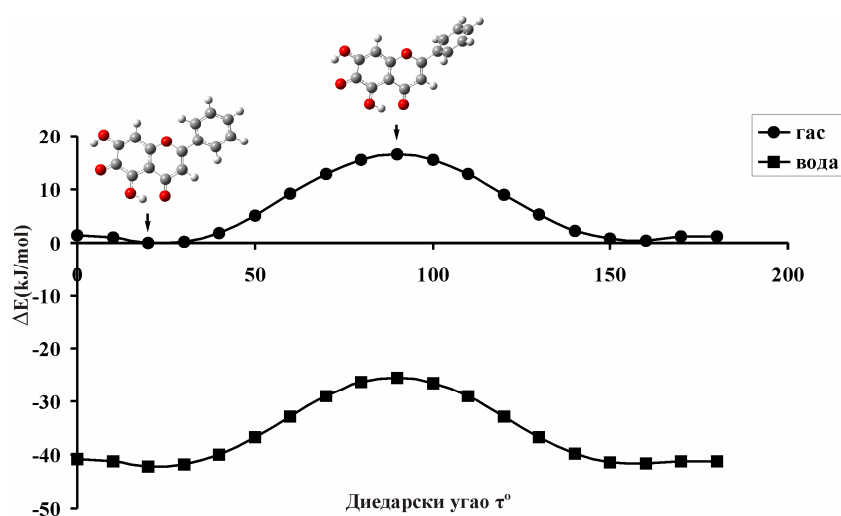
Табела 3.8. Дужине веза и торзиони угао  $\tau$  за најстабилнији ротамер бајкалеина 1, и најстабилнији ротамер радикала и ањона бајкалеина (O6R1 и O7A2) у гасовитој и воденој фази

Дужина везе (pm)	V	BV (вода)	O6R1	O6R1V(вода)	O7A2	O7A2V(вода)
D(O1–C2)	135.0	134.8	135.8	135.7	134.5	134.7
D(C2–C3)	135.1	135.4	134.8	135.2	134.5	135.0
D(C3–C4)	144.4	143.8	144.5	143.7	145.8	144.5
D(C4–C10)	145.1	144.9	145.2	144.9	142.5	143.0
D(C5–C10)	140.7	140.8	140.9	140.5	143.3	142.7
D(C5–C6)	137.9	138.0	144.4	144.2	136.5	136.6
D(C6–C7)	139.7	140.0	146.3	146.2	144.8	144.1
D(C7–C8)	138.8	138.8	136.9	136.8	142.5	141.8
D(C8–C9)	138.3	138.4	139.9	140.1	137.0	137.7
D(C9–O1)	136.7	136.4	135.4	134.7	138.3	137.3
D(C9–C10)	139.6	139.6	139.7	139.6	141.2	140.5
D(C2–C1')	147.3	147.1	147.0	146.8	147.6	147.3
D(C1'–C2')	139.6	139.7	139.6	139.7	139.6	139.7
D(C2'–C3')	138.7	138.8	138.7	138.8	138.8	138.8
D(C3'–C4')	138.9	139.0	138.9	139.0	138.9	139.0
D(C4'–C5')	139.0	139.2	139.1	139.2	139.1	139.2
D(C5'–C6')	138.6	138.7	138.6	138.7	138.7	138.7
D(C6'–C1')	139.6	139.7	139.6	139.7	139.6	139.7
D(O4–C4)	123.7	124.6	123.7	124.5	125.2	125.7
D(O5–C5)	134.4	134.6	131.1	131.5	135.5	135.7
D(O6–C6)	136.5	136.4	124.2	124.7	136.1	136.7
D(O7–C7)	134.8	134.9	132.7	133.0	126.0	127.3
D(H5–O5)	98.8	98.8	99.5	100.1	98.1	98.8
D(H6–O6)	96.4	96.4			97.5	97.4
D(H7–O7)	96.4	96.5	97.4	97.2		
<b>Водоничне везе (pm)</b>						
D <sub>H</sub> (O4--H5)	172.5	172.0	167.4	163.8	173.5	169.6
D <sub>H</sub> (O5--H6)	223.8	226.9			194.6	198.1
D <sub>H</sub> (O6--H7)	215.1	215.9	202.7	207.6		
<b>Торзиони угао</b>						
$\tau$ (O1–C2–C1'–C2') (°)	24.5	23.6	24.1	22.8	21.2	23.5

V=молекул бајкалеина у гасовитој фази, BV= молекул бајкалеина у воденој фази

Најстабилнији радикал O6R1 има две водоничне везе D<sub>H</sub>(O4--H5) и D<sub>H</sub>(O6--H7) које доприносе стабилности овог радикала. Делокализација неспареног електрона у овом радикалу остварује се само преко прстена А, пошто се на прстену С налазе две локализоване двоструке везе: С4–О4 и С2–С3. Делокализација у прстену А доводи до знатних промена у геометрији у односу на бајкалеин. Из табеле 3.8 се види да су дужине веза С6–О6 и С7–С8 код радикала значајно краће од истих веза у молекулу бајкалеина, тј. оне су парцијално локализоване двоструке везе. Дужина везе С2–С1', која

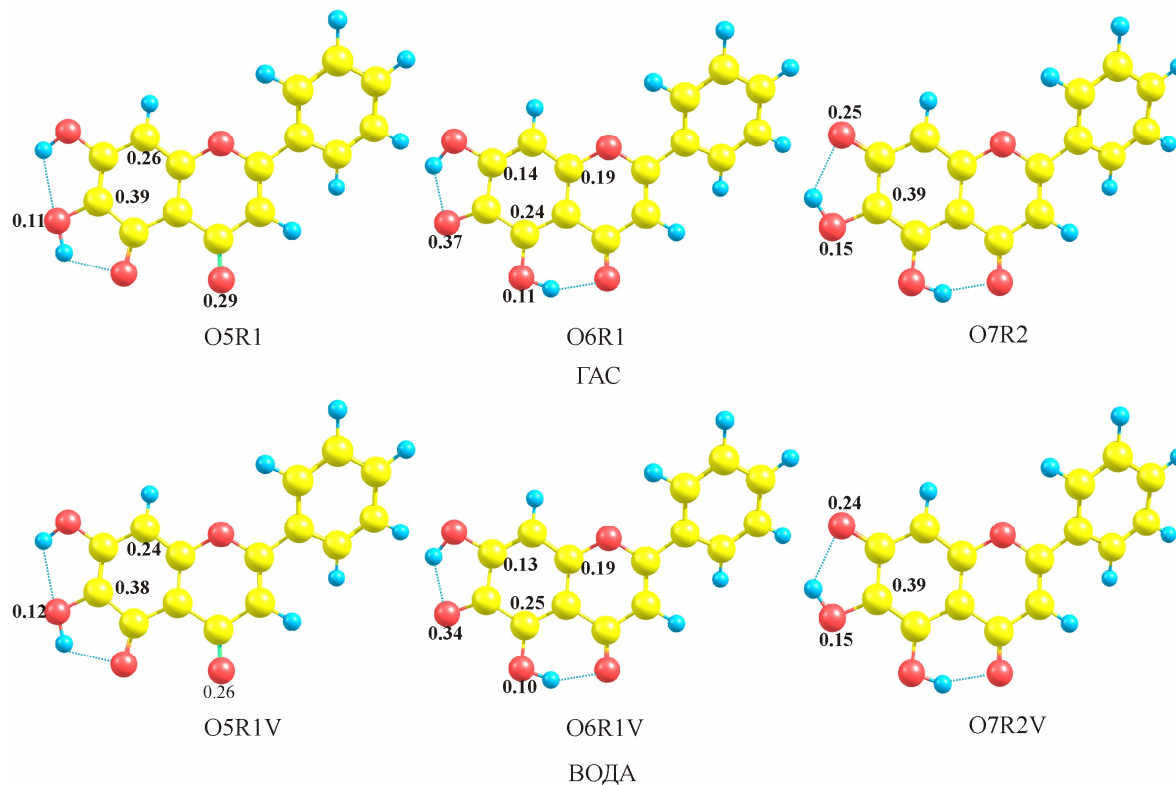
спаја прстенове В и С, у радикалу О6R1 износи 147.0 pm и у гасовитој и у воденој фази. Дужина ове везе показује да она лежи између прсте и ароматичне С–С везе. Наша истраживања су показала да је енергетска баријера за ротацију око С2–С1' везе ниска: 16.4 kJ/mol у гасу и 16.7 kJ/mol у води (слика 3.11). Као и код бајкалеина, ова вредност је врло блиска енергији активације за ротацију око С–С везе код бутана. Све ово указује на чињеницу да ако постоји делокализација неспареног електрона преко прстенова В и С, да ће она бити слаба.



Слика 3.11. Енергетски профил за ротацију око С2–С1' везе за О6R1 радикал. Оптимизација је изведена помоћу M05-2X/6-311+G(d,p) модела у гасу и води

Спинска густина је показатељ реактивности код слободних радикала. Код молекула са спареним електронима спинска густина је свуда једнака нули. Код молекула са неспареним електроном (електронима) спинска густина указује на расподелу неспареног (неспарених) електрона. Значај спинске густине у одређивању могуће делокализације, и самим тим стабилности флавоноидних радикала, приказали су Леополдини [100, 120] и Труилас [121] са својим сарадницима. Расподела спинске густине, добијена NBO анализом, за О6R1 радикал у гасовитој и воденој фази показује да је неспарени електрон делокализован преко О6, С5, О5, С7 и С9 атома (слика 3.12) са вредностима од 0.37/0.34, 0.24/0.25, 0.11/0.10, 0.14/0.13 и 0.19/0.19, респективно (бројеви у италику се односе на вредности за спинску густину у воденој фази). Слика 3.12 показује да је неспарени електрон најбоље делокализован у О6R1, чиме се може објаснити његова стабилност у односу на друге радикале. Такође, расподела спинске

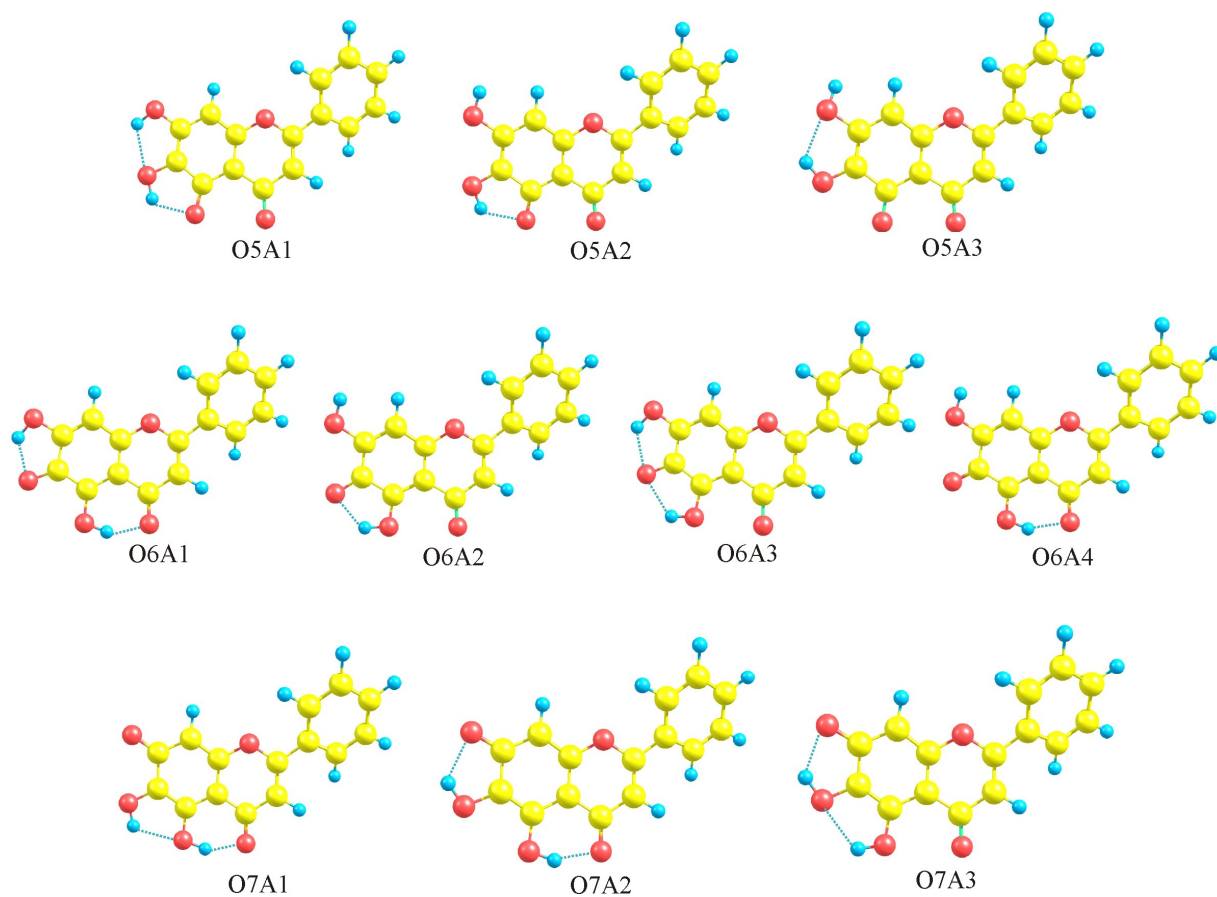
густине потврђује да прстенови В и С не учествују у делокализацији електрона. Пошто је познато да ће се радикалска реакција највероватније одвијати на атому са највећом спинском густином, произилази да је атом О6 највероватнији радикалски центар.



Слика 3.12. Расподела спинске густине код најстабилнијих ротамера радикала бајкалеина у гасовитој и воденој фази

### 3.3.2. Анјони бајкалеина

Полазећи од геометрије најстабилнијег конформера бајкалеина (1) симулирано је хетеролитичко раскидање О–Н веза на положајима 5, 6 и 7. Анјони образовани на овај начин означени су као О5А, О6А и О7А. Сваком анјону одговара више ротамера (1, 2, 3 и 4 на слици 3.13). Ротамери анјона су означени на исти начин као ротамери радикала, осим што је ознака R (за радикал) замењена ознаком А (за анјон). Геометрије свих анјона дате су на слици 3.13, а вредности за одговарајуће термодинамичке параметре у табели 3.9. Као и код радикала бајкалеина, све оптимизације геометрија извршене су помоћу M05-2X/6-311+G(d, p) модела, а утицај воде као растварача процењен је помоћу солватационог модела CPCM.



Слика 3.13. Структуре анјона бајкалеина O5A, O6A и O7A. Сваки анјон је приказан са свим својим ротамерима

У табели 3.9 дате су РА вредности бајкалеина за гасовиту и водену фазу. Из РА вредности произилази следећи редослед лакоће хетеролитичког раскидања O–H веза: O7–H7 > O6–H6 > O5–H5, што значи да је фаворизовано хетеролитичко раскидање O–H везе у положају O7.

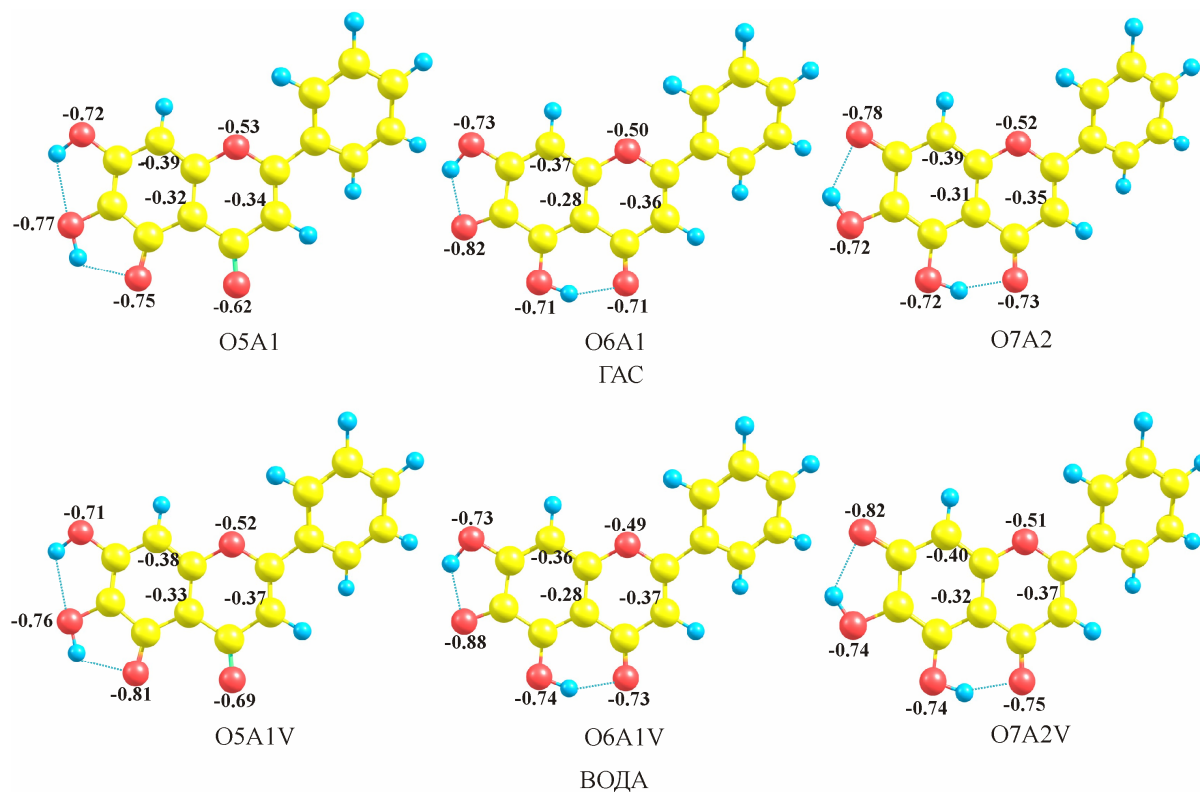
Табела 3.9. Термодинамички параметри (kJ/mol) за ротамере анјона бајкалеина у гасовитој и воденој фази

Ротамер	$\Delta E$	$\Delta H$	$\Delta H^{\text{CPCM}}$	$\Delta H_{\text{solv}}$	$\Delta G_{\text{solv}}$	РА	$\text{РА}^{\text{CPCM}}$
<b>O5A1</b>	49.9	51.0	36.2	-239.6	-238.6	1419.8	124.6
<b>O5A2</b>	75.1	77.0	45.0	-256.7	-253.8	1445.7	133.4
<b>O5A3</b>	115.0	117.3	64.6	-277.4	-275.7	1486.1	153.1
<b>O6A1</b>	33.7	33.7	20.7	-237.7	-236.7	1402.5	109.2
<b>O6A2</b>	90.6	91.9	56.8	-259.8	-258.7	1460.7	145.3
<b>O6A3</b>	39.4	39.7	34.7	-229.7	-229.7	1408.4	123.1
<b>O6A4</b>	101.8	102.8	52.5	-275.0	-272.8	1471.6	141.0
<b>O7A1</b>	23.3	24.0	15.1	-233.7	-233.2	1392.8	103.5
<b>O7A2</b>	0.0	0.0	0.0	-224.7	-224.1	1368.8	88.4
<b>O7A3</b>	34.3	35.2	30.7	-229.2	-229.3	1404.0	119.2

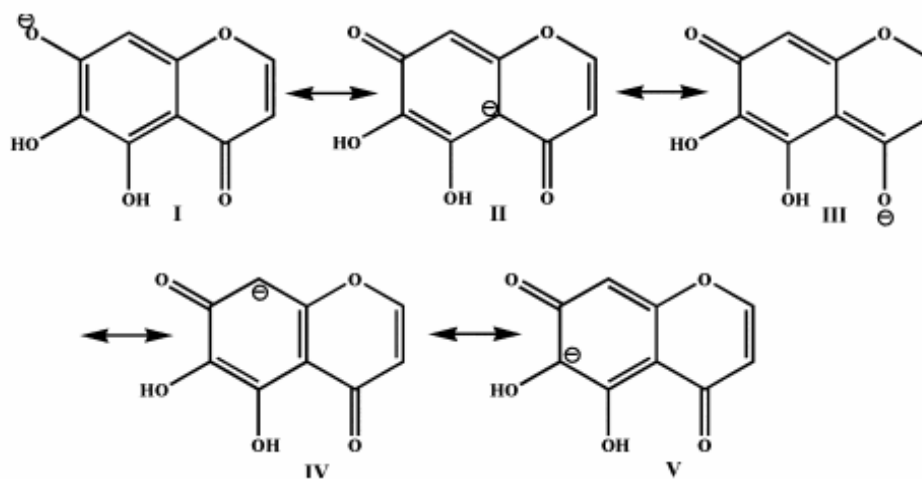
$\Delta E$  означава разлику у укупној енергији у односу на најстабилнији конформер. Укупне енергије за најстабилнији анјон су:  $E(\text{O7A2}) = -953.376421046$  а.у. у гасу и  $E(\text{O7A2}) = -953.463385464$  а.у. у води.  $\Delta H$  означава разлику у енталпији у односу на најстабилнији конформер.  $\Delta G_{\text{solv}}$  означава разлику у слободној енергији између конформера у води и у гасу. РА представља афинитет према протону. Све величине су кориговане одговарајућим скалираним величинама [99] (ZPVE, термална корекција за енталпију и термална корекција за слободну енергију).

Вредности израчунатих енергија у гасу и у води из табеле 3.9 дале су следећи редослед стабилности анјона:  $\text{O7A} > \text{O6A} > \text{O5A}$ . На слици 3.14 приказани су најстабилнији ротамери свих анјона са расподелом негативног наелектрисања добијеном из NBO анализе. Слика показује да је негативно наелектрисање веома добро делокализовано преко прстенова А и С код свих анјона. Због непланарности анјона, као и због могућности лаке ротације око  $\text{C2-C1}'$  везе (табела 3.8), не долази до делокализације негативног наелектрисања преко прстена В. Код O5A1 долази до деформације структуре услед одбијања између депротонивног кисеоника O5 и усамљеног електронског пара на карбонилном кисеонику O4. Са слике 3.15 се види да је анјон O7A стабилизован делокализацијом негативног наелектрисања које се простире од депротонивног кисеоника O7, преко C6, C8, C10 до 4-кето групе у прстену С.





Слика 3.14. Распдела негативног наелектрисања код најстабилнијих ротамера анјона у гасовитој и воденој фази



Слика 3.15. Резонанционе структуре код анјона O7A

Важно је напоменути да су вредности за  $\Delta H_{\text{solv}}$ ,  $\Delta G_{\text{solv}}$  и  $\text{РА}^{\text{CPCM}}$  (табела 3.9) вишеструко ниже од одговарајућих вредности у гасовитој фази. Ова појава је

последича интеракција парцијално негативно наелектрисаних атома код анјона бајкалеина са водом.

Детаљна анализа свих ротамера анјона је показала да је O7A2 најстабилнији анјон, како у гасовитој тако и у воденој фази [60]. Друга два релативно стабилна анјона, O6A1 и O5A1, су за 33.7 и 51.0 kJ/mol у гасу и за 20.7 и 36.2 kJ/mol у води, мање стабилни од O7A2 (табела 3.9), и због тога су искључени из даље дискусије.

Пажљивом анализом геометрије O7A2 анјона уочава се да постоје две локализоване двоструке везе: C4–O и C2–C3 у прстену C, док прстен A карактеришу три локализоване двоструке везе: C7–O, C5–C6 и C8–C9. Само се за прстен B може рећи да има ароматичну структуру. Ако упоредимо дужине веза код анјона и молекула бајкалеина (табела 3.8) видимо да су везе у анјону знатно краће од одговарајућих у молекулу.

### 3.3.3. Радикал катјон бајкалеина

Као што је речено у уводу, у реакцији бајкалеина са електрофилним радикалима може настати бајкалеин радикал катјон (једн. 1.2 и 1.6). Фенолни радикал катјони су потенцијални интермедијери у бројним фотооксидативним процесима, и нађени су у матрицама на ниској температури [122] и кластерима у гасовитој фази [123]. Такође је нађено да феноли фотолизом дају реазличите интермедијере укључујући и радикал катјоне [124]. Шта више, показало се да фенолни радикал катјони могу настати и бити успешно окарактерисани помоћу пулсне радиоллизе, фотојонизације и ласерске флеш фотолизе [124, 125]. Може се претпоставити, да ће и бајкалеин под сличним условима формирати радикал катјон.

Равнотежне геометрије бајкалеина и његовог радикал катјона оптимизоване су у њиховом синглетном и дублетном стању, користећи ограничену и неограничену шему при израчунавањима за затворену и отворену љуску [53]. Примењене су две методе функционала густине: B3LYP и PBE метода.

Основно електронско стање радикал катјона је  $^2B_1$ , па се може очекивати спинска контаминација због примене неограничене таласне функције. Укупан спин  $\langle S^2 \rangle$  је израчунат помоћу UB3LYP и UPBE функционала и великог базисног скупа 6-

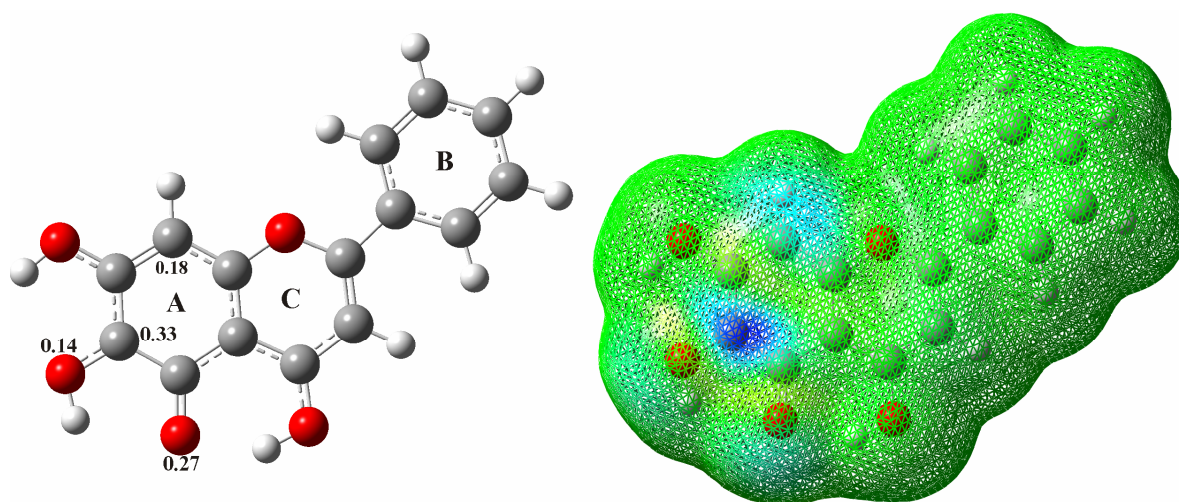
311+G(2df,p), и добијене су вредности 0.764 и 0.755. Ове вредности добро се слажу са очекиваном вредношћу (0.750) за дублетно стање, и показују да је спинска контаминација веома мала, те се може очекивати да ће се добити квалитетни резултати при оптимизацији радикал катјона бајкалеина помоћу оба функционала.

Табела 3.10. Дужине веза (pm) и торзиони угао за бајкалеин и његов радикал катјон

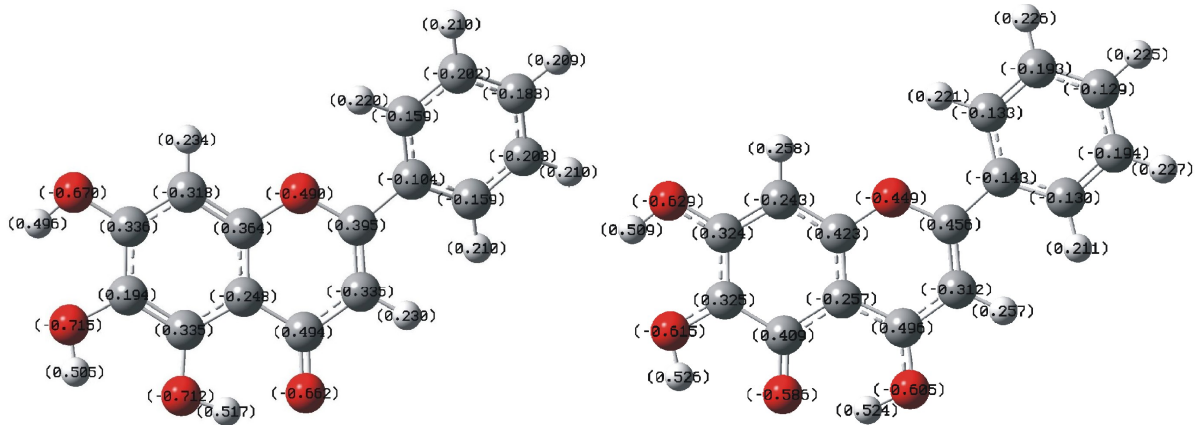
Дужине веза (pm)	Бајкалеин		Радикал катјон	
	PBE	V3LYP	PBE	V3LYP
D(O1–C2)	136.1	135.4	136.8	135.7
D(C2–C3)	136.8	135.6	138.4	137.5
D(C3–C4)	144.1	144.2	140.6	140.0
D(C4–C10)	144.5	144.8	141.9	141.4
D(C5–C10)	141.5	140.9	144.2	144.4
D(C5–C6)	139.2	138.3	145.4	144.9
D(C6–C7)	140.7	139.9	142.2	141.7
D(C7–C8)	139.9	139.1	139.2	138.1
D(C8–C9)	139.0	138.4	141.2	140.9
D(C9–O1)	137.7	136.9	135.4	134.5
D(C9–C10)	140.7	139.9	139.7	138.8
D(C2–C1`)	147.2	147.2	145.4	145.2
D(C1`–C2`)	140.7	140.0	141.3	140.6
D(C2`–C3`)	139.4	138.8	139.0	138.4
D(C3`–C4`)	139.7	139.0	139.8	139.2
D(C4`–C5`)	139.8	139.1	139.9	139.3
D(C5`–C6`)	139.2	138.6	138.9	138.3
D(C6`–C1`)	140.7	140.0	141.3	140.6
D(O4–C4)	126.6	124.8	131.7	130.9
D(O5–C5)	134.7	134.5	126.3	124.8
D(O6–C6)	137.3	136.9	132.6	131.9
D(O7–C7)	135.9	135.2	134.0	133.3
D(H5–O5)	103.2	99.9	100.7	98.9
D(H6–O6)	97.7	96.7	99.1	97.8
D(H7–O7)	97.7	96.7	97.8	96.9
Водоничне везе (pm)				
D <sub>H</sub> (H5--O4)	158.4	168.8	175.0	181.4
D <sub>H</sub> (H6--O5)	226.4	226.1	216.2	220.7
D <sub>H</sub> (H7--O6)	216.5	226.1	229.7	228.6
Торзиони угао (°)				
$\tau$ (O1–C2–C1`–C2`)	18.3	20.2	0.4	2.5

Пошто оба функционала дају веома сличне резултате, сва даља дискусија која се односи на радикал катјон бајкалеина заснива се на резултатима добијеним помоћу V3LYP методе.

Наше истраживање је показало да је радикал катјон бајкалеина скоро планаран. Значајне промене у структури радикал катјона у поређењу са молекулом бајкалеина уочене су у прстену А. Наиме, атом водоника није везан за О5 већ за О4 (табела 3.10). Оптимизација геометрије радикал катјона која је започела од структуре где је атом водоника био везан за О5 резултирала је у спонтаном премештању водоника на О4. NBO анализа [126-129] бајкалеина је помогла у објашњењу овог интересантног резултата. НОМО бајкалеина је усамљени електронски пар на О4. Енергија ове орбитале је  $-0.30469$  au. Разумно је очекивати да ће при формирању радикал катјона молекул бајкалеина напустити електрон из енергетски највише орбитале. Неспарени електрон који остаје на О4 након што је један електрон напустио молекул, не може да се делокализује преко суседног прстена С, јер он није ароматичан, обзиром да има једну двоструку (C2–C3), и две једноструке везе (O1–C2 и O1–C9). Због тога О4 одузима атом водоника који се налази на блиском растојању (са О5). Неспарени електрон на новоформираном радикалском центру О5 може се лако делокализовати преко прстена А, и тако смањити нестабилност која је настала губитком једног електрона. Ова претпоставка је у сагласности са мапом спинске густине и расподелом спинске густине добијеном помоћу NBO анализе за радикал катјон бајкалеина (слика 3.16) које показују да је неспарени електрон делокализован преко О5, С6, О6 и С8 атома [53].



Слика 3.16. Расподела спинске густине и мапа спинске густине радикал катјона бајкалеина

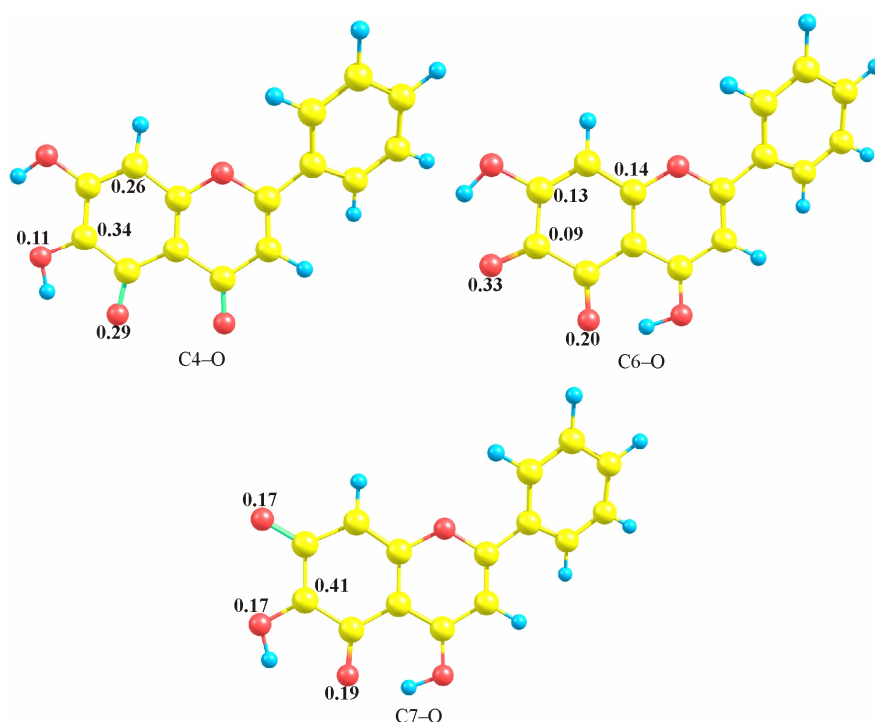


Слика 3.17. Расподела наелектрисања код бајкалеина (лево) и његовог радикал катјона (десно)

Поређење расподеле молекулског наелектрисања између бајкалеина и његовог радикал катјона приказано је на слици 3.17. Као што је и очекивано, кисеоникови атоми бајкалеина парцијално су негативно наелектрисани, док су водоници везани за ове кисеоникове атоме парцијално позитивно наелектрисани. Атоми угљеника су парцијално негативно наелектрисани, осим оних за које су директно везани кисеоникови атоми, због негативног индуктивног ефекта ових кисеоника. Позитивно наелектрисање на радикал катјону је распоређено преко већег броја атома. Пошто је неспарени електрон делокализован преко O5, C6, O6 и O8, ови атоми показују наглашено смањење парцијалног негативног наелектрисања или повећање парцијалног позитивног наелектрисања. Ово се посебно односи на C6, где разлика између његовог парцијалног позитивног наелектрисања у радикал катјону и неутралном молекулу износи 0.131 (слика 3.17). Ова значајна промена у наелектрисању на C6 може се приписати негативном индуктивном ефекту атома O6, због којег  $\pi(C5-O5)$ ,  $\pi(C7-C8)$  и p орбитала на O6 својим позитивним резонанционим ефектом надокнађују недостатак електрона на C6. Заиста, NBO анализа  $\beta$  густине показује да су ове орбитале делокализоване у формално празну p орбиталу на C6 атому. Као последица тога, попуњеност у овој орбитали износи 0.313. Слично се дешава и у случају C5 и O5, где је парцијално позитивно наелектрисање на C5 значајно повећано у односу на родитељски молекул, услед негативног индукованог ефекта електрон дефицитарног O5 атома.

### 3.3.4. Радикали изведени из радикал катјона бајкалеина

Други корак SET-PT механизма (једн. 1.8) симулиран је депротоновањем О–Н веза радикал катјона бајкалеина на положајима 4, 6 и 7. Радикали образовани након хетеролитичког раскидања О–Н веза у радикал катјону означени су као C4–O, C6–O и C7–O. Оптимизације геометрија радикала изведене су помоћу UB3LYP/6-311+G(2df,p) модела, полазећи од оптимизоване геометрије радикал катјона из које је уклоњен одговарајући протон. На слици 3.18 приказане су оптимизоване геометрије и значајне вредности спинске густине код радикала C4–O, C6–O и C7–O. Као што постоји структурна разлика између молекула бајкалеина и његовог радикал катјона (слике 3.2 и 3.16), тако постоји и структурна разлика између радикала изведених из бајкалеина и радикал катјона. Код радикала C6–O, Н атом је везан за О4 атом, док је код O6R радикала везан за О5 атом. C7–O се из истог разлога разликује од радикала O7R.



Слика 3.18. Оптимизоване геометрије радикала C4–O, C6–O и C7–O са значајним вредностима спинске густине

Вредности за дужине веза, углове веза и торзиони угао  $\tau$  за оптимизоване структуре радикала C4–O, C6–O и C7–O приказане су у табели 3.11. Настали радикали

имају непланарну структуру, што се види на основу вредности торзионих углова  $\tau$  између прстенова В и С (табела 3.11). У свим радикалима, водоникови атоми са ОН група оријентисани су тако да се остварује максималан број водоничних веза (две водоничне везе у сваком радикалу). Комплетна делокализација електрона у свим радикалима обухвата само прстен В, док се прстенови А и С одликују локализованим двоструким и једноструким везама. Ово подразумева да је спречен ток електрона између прстенова А и С [53].

Табела 3.11. Вредности за дужине веза, углове веза и торзиони угао  $\tau$  за оптимизоване структуре радикала

Дужине веза (pm)	C4-O	C6-O	C7-O	Углови веза (°)	C4-O	C6-O	C7-O
D(O1-C2)	136.7	135.1	135.2	A(C9-O1-C2)	120.6	122.0	122.3
D(C2-C3)	134.6	136.2	136.0	A(O1-C2-C1')	112.4	113.1	112.8
D(C3-C4)	146.2	141.7	141.9	A(O1-C9-C10)	122.5	119.7	117.8
D(C4-C10)	147.4	140.4	138.7	A(O1-C2-C3)	120.7	120.8	121.4
D(C5-C10)	145.3	144.8	143.2	A(C2-C3-C4)	123.1	119.7	119.4
D(C5-C6)	146.3	146.5	144.1	A(C3-C2-C1')	126.9	126.1	125.8
D(C6-C7)	139.7	146.2	147.7	A(C3-C4-C10)	113.5	119.2	119.5
D(C7-C8)	137.5	138.2	144.8	A(C4-C10-C5)	123.6	119.9	121.3
D(C8-C9)	142.1	138.9	135.8	A(C4-C10-C9)	119.6	118.7	119.7
D(C9-O1)	135.6	136.2	137.6	A(C9-C10-C5)	116.8	121.4	119.0
D(C9-C10)	138.2	140.5	143.1	A(C10-C5-C6)	117.2	116.9	117.3
D(C2-C1')	147.1	146.7	146.7	A(C5-C6-C7)	123.2	117.2	123.3
D(C1'-C2')	139.9	140.1	140.1	A(C6-C7-C8)	118.1	124.3	115.4
D(C2'-C3')	138.8	138.7	138.7	A(C7-C8-C9)	120.1	117.4	121.0
D(C3'-C4')	139.0	139.0	139.0	A(C8-C9-C10)	124.6	122.9	124.2
D(C4'-C5')	139.1	139.1	139.2	A(C8-C9-O1)	112.9	117.4	118.1
D(C5'-C6')	138.6	138.6	138.5	A(C1'-C2'-C3')	120.5	120.4	120.4
D(C6'-C1')	140.0	140.1	140.1	A(C2'-C3'-C4')	120.3	120.3	120.3
D(O4-C4)	122.1	130.4	132.0	A(C3'-C4'-C5')	119.6	119.7	119.7
D(O5-C5)	124.1	126.1	126.6	A(C4'-C5'-C6')	120.3	120.2	120.2
D(O6-C6)	133.0	124.8	131.6	A(C5'-C6'-C1')	120.6	120.5	120.5
D(O7-C7)	135.4	132.9	123.1	A(C6'-C1'-C2')	118.8	118.9	118.8
D(H4-O4)		104.4	100.0	A(C6'-C1'-C2)	120.6	120.7	120.8
D(H6-O6)	98.6		98.0	A(C2-C1'-C2')	120.7	120.5	120.3
D(H7-O7)	96.6	98.4	0.0	A(C3-C4-O4)	121.8	120.3	118.8
D <sub>H</sub> (H4--O5)		149.7	169.6	A(C10-C4-O4)	124.7	120.5	121.7
D <sub>H</sub> (H5--O4)				A(C10-C5-O5)	127.3	119.9	123.4
D <sub>H</sub> (H6--O5)	197.7		208.3	A(C6-C5-O5)	116.5	123.3	119.3
D <sub>H</sub> (H7--O6)	229.5	196.4		A(C5-C6-O6)	120.3	125.2	117.1
				A(C7-C6-O6)	120.3	117.7	119.7
				A(C6-C7-O7)	121.5	114.5	120.4
				A(C8-C7-O7)	120.4	121.2	124.2
Торзиони угао (°)							
$\tau$ (O1-C2-C1'-C2')	20.4	17.7	16.4				

C6–O је најстабилнији радикал, док су C7–O и C4–O за 33.7 и 45.8 kJ/mol мање стабилни. У C6–O радикалу, прстенови А и С су окарактерисани локализованим двоструким везама: C2–C3, C5–O5 и C6–O6. Водоничне везе у овом радикалу врло су јаке, нарочито она између O5 и H4 ( $D_{\text{H}}(\text{H4--O5}) = 149.7 \text{ pm}$ , табела 3.11). У C7–O радикалу налазе се локализоване двоструке везе у прстену А, и то C8–C9, C5–O5 и C7–O7. Такође постоји јака водонична веза између O5 и H4 ( $D_{\text{H}}(\text{H4--O5}) = 169.6 \text{ pm}$ ) и једна врло слаба између O5 и H6 ( $D_{\text{H}}(\text{H6--O5}) = 208.3 \text{ pm}$ , табела 3.11). У C4–O радикалу прстенове А и С карактерише 5 локализованих двоструких веза, и то, C2–C3, C7–C8, и C9–C10, C4–O и C5–O. Водоничне везе  $D_{\text{H}}(\text{H6--O5})$  и  $D_{\text{H}}(\text{H7--O6})$  су врло слабе у односу на C6–O радикал (табела 3.11) [53].

У C6–O радикалу највећа вредност спинске густине налази се на O6 атому, док је остатак спинске густине распоређен између *o*- и *p*-угљеникових атома (слика 3.18). NBO анализа C7–O и C4–O радикала показује веома велике вредности спинске густине на C6 атому (0.41 и 0.34), што указује на слабију делокализацију неспареног електрона код ова два радикала. Познато је да је делокализација спинске густине повезана са лакоћом формирања радикала, па на основу ових података видимо да је настајање C7–O и C4–O радикала из радикал катјона бајкалеина отежано. Пошто је C6–O радикал термодинамички настабилнији, јасно је да он игра значајну улогу у антиоксидативној активности бајкалеина када се антиоксидативни процес одвија по SET-PT механизму [53].

#### 3.4. Антиоксидативни механизми бајкалеина

Постоји неколико предложених начина да се процени који механизам антиоксидативног деловања полифенола у различитим реакционим срединама ће се одиграти: НАТ, SPLET или SET-PT. Први приступ је предложио Рајт [46]. Он је предложио да се на основу  $\Delta\text{BDE}$  и  $\Delta\text{IP}$  вредности може закључити који је доминантан механизам антиоксидативног деловања флавоноида.  $\Delta\text{BDE}$  и  $\Delta\text{IP}$  вредности се добијају као разлика између BDE и IP вредности флавоноида (бајкалеина у овом случају) и фенола као референтног једињења. По Рајту, ако је  $\Delta\text{IP} > -151 \text{ kJ/mol}$  и  $\Delta\text{BDE}$  је око  $-42 \text{ kJ/mol}$ , онда је НАТ доминантан механизам, док, ако је  $\Delta\text{IP} < -188 \text{ kJ/mol}$ , онда је SET-PT доминантан механизам. У својим правилима он ништа не говори о условима у



којима је SPLET главни механизам антиоксидативног дејства. Други приступ [130] се заснива на упоређивању BDE вредности са збировима PA+ETE, и IP+PDE. Ако је најнижа вредност за BDE, PA+ETE, односно IP+PDE, то значи да је доминантан механизам HAT, SPLET, односно SET-PT. Трећи приступ [49-60, 130] заснива се на међусобном поређењу свих горе набројаних термодинамичких величина по следећој шеми:

- Ако је  $BDE < IP$  и  $BDE < PA$  HAT је доминантан механизам.
- Ако је  $BDE < IP$  и  $BDE > PA$ , онда се испита да ли је  $BDE < PDE$ . Ако јесте HAT је доминантан механизам, а ако је  $BDE > PDE$ , SET-PT је доминантан механизам.
- Ако је  $BDE > IP$  и  $BDE < PA$ , онда се испита да ли је  $BDE < ETE$ . Ако јесте HAT је доминантан механизам, а ако је  $BDE > ETE$ , SPLET је доминантан механизам.
- Ако је  $BDE > IP$  и  $BDE > PA$ , значи да HAT није оперативан механизам. Онда се испита да ли је  $IP > PA$ , и ако јесте испита се да ли је  $ETE < PDE$ , и ако јесте онда је SPLET доминантан механизам. Ако је  $ETE > PDE$  не може се дати одговор на питање који механизам је доминантан.
- Ако је  $IP < PA$  испита се да ли је  $PDE < ETE$ , и ако је онда је SET-PT доминантан механизам. Ако је  $PDE > ETE$  не може се дати одговор на питање који механизам је доминантан.

Други и трећи приступ заснивају се на претпоставци да ако су вредности термодинамичких величина од којих одређени механизам зависи најниже онда је вероватно да ће се антиоксидативно дејство одиграти по том механизму. Међутим, често се дешава да су вредности енталпија за дати медијум међусобно веома сличне, што се тумачи као паралелно одвијање два или три антиоксидативна процеса.

BDE, IP, PA, PDE и ETE вредности за бајкалеин у гасовитој и воденој фази израчунате су на основу геометрија радикала, анјона и радикал катјона, оптимизованих помоћу M05-2X/6-311+G(d,p) модела [60]. Иако су неке од ових вредности већ дате у предходном тексту у табелама 3.7 и 3.9, овде ћемо их све сумирати у табели 3.12 да

бисмо лакше објаснили механизме антиоксидативног дејства бајкалеина. У табели 3.13 су дате  $\Delta BDE$  и  $\Delta IP$  вредности бајкалеина.

Табела 3.12. Термодинамички параметри за сва три антиоксидативна механизма бајкалеина и фенол (kJ/mol) израчунати помоћу M05-2X/6-311+G(d,p) модела у гасовитој и воденој фази

положај	Гасовита фаза					Водена фаза				
	HAT BDE	SPLET PA ETE		SET-PT IP PDE		HAT BDE	SPLET PA ETE		SET-PT IP PDE	
				727.2					525.6	
5	391.4	1419.8	270.7		986.0	363.0	124.6	227.0		-162.8
6	333.2	1402.5	224.3		927.8	319.2	109.2	195.3		-206.6
7	363.8	1368.8	309.7		952.2	353.6	88.4	261.3		-172.2
фенол	360.3	1456.0	223.04	822.0	862.0	353.7	139.2	214.3	389.4	-35.9

Табела 3.13.  $\Delta BDE$  и  $\Delta IP$  вредности (kJ/mol) ОН група бајкалеина у односу на фенол

	$\Delta BDE$ 5	$\Delta BDE$ 6	$\Delta BDE$ 7	$\Delta IP$
$B^{gas}$	31.1	-27.1	3.5	-94.8
$B^{CPCM}$	9.3	-34.5	-0.1	136.2

$\Delta BDE$  и  $\Delta IP$  вредности (табела 3.13) омогућавају да се према Рајту одреди који је доминантан механизам антиоксидативног деловања бајкалеина. Тако је HAT механизам одговоран за антиоксидативну активност бајкалеина у гасовитој и воденој фази. Такође, најмања  $\Delta BDE$  вредност указује на то који је положај најповољнији за HAT механизам, а то је положај 6.

На основу другог приступа јасно је да је HAT механизам доминантан у гасовитој фази, јер BDE има значајно ниже вредности од збирова PA+ETE и IP+ PDE. У воденој средини то није случај, зато што су BDE вредности веома сличне са вредностима збирова PA+ETE и IP+ PDE. Другим речима, на основу оваквог приступа, можемо закључити да су сва три механизма међусобно конкурентна у воденој средини.

У трећем приступу анализираћемо сваки механизам посебно. Почећемо од HAT механизма. На основу вредности из табеле 3.12 видимо да су све BDE знатно ниже од

РА и IP вредности, што нам говори да је НАТ механизам најповољнији механизам антиоксидативног деловања бајкалеина у гасу. Такође, када међусобно упоредимо BDE вредности, можемо закључити да је ОН група на угљенику С6 најреактивнија, јер има најнижу BDE вредност. То значи да је ова ОН група најодговорнија за антиоксидативну активност бајкалеина када он реагује по НАТ механизму у гасу.

Ако упоредимо BDE вредности израчунате помоћу M05-2X/6-311+G(d,p) модела у гасовитој фази (табела 3.12), са вредностима које су израчунате помоћу B3LYP/6-311+G(d,p) модела ( $BDE_{O5-H5} = 376.1 \text{ kJ/mol}$ ,  $BDE_{O6-H6} = 317.4 \text{ kJ/mol}$ , и  $BDE_{O7-H7} = 361.7 \text{ kJ/mol}$ ) [98], видимо да су вредности добијене помоћу B3LYP функционала нешто ниже, али је редослед реактивности ОН група исти као и онај са M05-2X функционалом. Односно, и по B3LYP методи је фаворизовано хомолитичко раскидање O6–H6 везе.

Разлике у антиоксидативној активности, које се огледају у BDE вредностима, често се приписују делокализацији  $\pi$ -електрона која доводи до стабилизације радикала насталих након уклањања H атома из молекула бајкалеина. Овај закључак се заснива на претпоставци да ако постоји делокализација  $\pi$ -електрона у молекулу бајкалеина, она такође постоји и у одговарајућим радикалима. Нешто веће BDE вредности (табела 3.12) за O6–H6 бајкалеина, у односу на BDE вредности кверцетина и фисетина ( $297.5 \text{ kJ/mol}$  и  $303.0 \text{ kJ/mol}$ ) [121, 131], нам говоре да је бајкалеин мање ефикасан у антиоксидативном деловању по НАТ механизму у односу на кверцетин и фисетин. То такође значи да је радикал бајкалеина мање делокализован у односу на одговарајуће радикале кверцетина и фисетина. То је показано и на слици 3.12, где се јасно види да је спинска густина у радикалу бајкалеина делокализована само у прстену А, за разлику од радикала кверцетина и фисетина где је неспарени електрон делокализован у прстенима и В и С [49, 131].

Афинитет према протону (РА) је термодинамичка величина која одређује први корак SPLET механизма. Као што је већ речено, у овом кораку долази до депротоновања фенолне О–Н групе (реакција 1.10 и једначина 1.11 - Општи део). Пошто су РА вредности у гасовитој фази знатно више и од BDE и од IP вредности (табела 3.12) јасно је да SPLET није вероватан механизам у гасу. Са друге стране РА и ETE вредности за водени раствор појединачно су мање и од BDE и од IP вредности. То

нас доводи до закључка да је SPLET механизам термодинамички доминантан реакциони пут антиоксидативног деловања бајкалеина у воденом раствору. Међусобним поређењем PA вредности долазимо до закључка да је положај 7 најреактивнији, и самим тим се може рећи и да је најодговорнији за антиоксидативну активност бајкалеина по SPLET механизму. Познато је да је физиолошки рН у организму око 7.4, што очигледно погодује реакцијама које се одвијају по SPLET механизму.

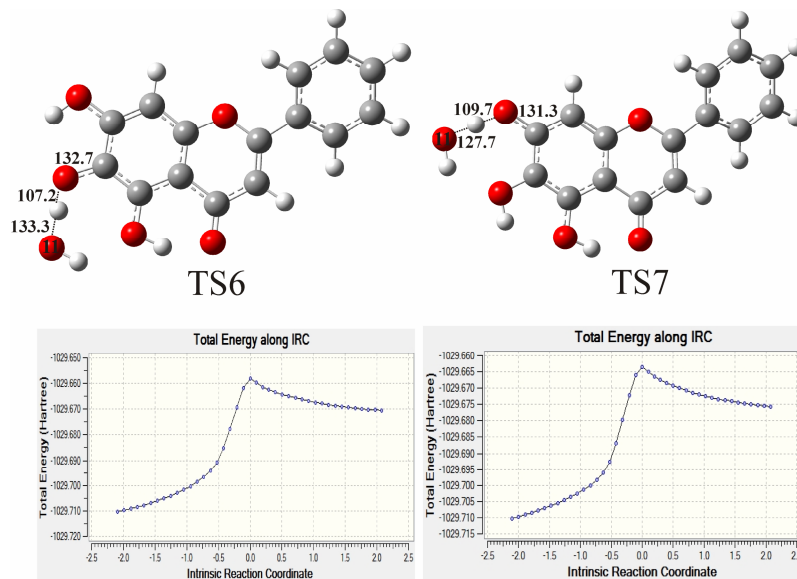
Први корак у SET-PT механизму је отпуштање електрона са молекула бајкалеина и формирање радикал катјона (реакција 1.6 и једначина 1.7 - Општи део). Мера лакоће отпуштања електрона је јонизациони потенцијал IP (табела 3.12). На основу IP вредности јасно је да SET-PT механизам не представља могући реакциони пут антиоксидативног дејства бајкалеина нити у гасовитој фази нити у воденом раствору. По нашем мишљењу, SET-PT механизам може бити оперативан механизам антиоксидативног деловања бајкалеина само ако се оксидациони процеси одвијају преко реакција катализованих помоћу ензима или фотохемијских реакција.

Ова три приступа, заснована на упоређивању одговарајућих термодинамичких величина, слажу се за гасовиту фазу, док за водени раствор постоје несагласности. Да би антиоксидативно деловање бајкалеина у датом медијуму било испитано са већом сигурношћу потребно је да се овом проблему приступи механистички. Овакав приступ подразумева проналажење одговарајућих прелазних стања и равнотежних геометрија, што омогућава израчунавање енергија активације и енергија реакције. На овај начин реакције се могу сагледати и са кинетичке и са термодинамичке тачке гледишта. Оваква истраживања већ су спроведена на неким полифенолима [49, 54, 132-134], а механистичка истраживања антиоксидативног деловања бајкалеина су у току. Овде ће бити приказани резултати испитивања НАТ и SET-PT механизма бајкалеина у гасовитој фази.

#### **3.4.1. НАТ механизам код бајкалеина**

Симулирана је реакција бајкалеина са хидрокси радикалом по једначини 1.1 - Општи део. Имајући у виду реактивност ОН група бајкалеина, на основу добијених BDE вредности (табела 3.12), испитане су реакције у сва 3 положаја. Симулација реакције је изведена помоћу M05-2X/6-311++G(d,p) модела у гасовитој фази. Добијени

резултати показују да се одвајање водоника може вршити са положаја 6 и 7 бајкалеина. Пошто је  $D_{\text{H}}(\text{O4}-\text{H4}-\text{O5})$  веома јака водонична веза у радикал катјону, што се огледа кроз високе BDE, PA и PDE вредности (табела 3.12), реакциони пут у овом положају није пронађен. Обе реакције одигравају се преко једног прелазног стања. Показало се да су TS6 и TS7 рана прелазна стања (сличнија су реагентима него производима), што се види са слике 3.19. Прелазна стања су потврђена одговарајућим IRC (Intrinsic Reaction Coordinate) рачунима.



Слика 3.19. Оптимизоване геометрије прелазних стања у гасовитој фази са назначеним значајним међуатомским растојањима (pm) и одговарајућим резултатима IRC рачуна

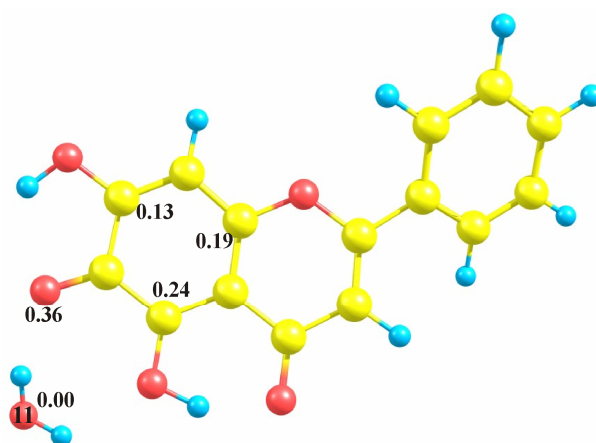
У табели 3.14 су приказане вредности за парцијално негативно наелектрисање и спинску густину на одговарајућим кисеонцима за пре-реакционе комплексе (RC), прелазна стања (TS) и пост-реакционе комплексе (PC). Током реакције парцијално наелектрисање на O11 се повећава и има највишу вредност у PC. Насупрот O11, парцијално негативно наелектрисање на фенолним кисеонцима се смањује, до најниже вредности у PC. Парцијално позитивно наелектрисање на фенолним водонцима износи око 0.5, уз мале варијације током реакција. Са друге стране, спинска густина у оба RC на O11 је врло блиска јединици, док је на фенолним кисеонцима скоро нула. У TS6 и TS7 спинска густина је подељена између O11 и фенолног кисеоника (табела 3.14). Пошто су откривена рана прелазна стања, вредности

спинске густине на O11 су високе. Коначно, у производима (тј. молекулу воде и одговарајућем радикалу бајкалеина) спинска густина је распоређена преко прстена А у радикалу бајкалеина, и њена вредност на O11 је једнака нули. За време реакција спинска густина на фенолним водониковим атомима једнака је нули. Расподела спинске густине у РС6 показује нам да је неспарени електрон делокализован преко O6, C5, C7 и C9 атома (слика 3.20).

Сви ови резултати говоре у прилог томе да долази до преноса H атома на O11, што показује да се бајкалеин покорава НАТ механизму.

Табела 3.14. Спинска густина и парцијално негативно наелектрисање за реактанте, прелазна стања и производе

Положај	Атом	Парцијално наелектрисање			Спинска густина		
		RC	TS	PC	RC	TS	PC
6	O6	-0.744	-0.694	-0.592	0.00	0.14	0.36
	O11	-0.428	-0.583	-0.955	1.02	0.73	0.00
7	O7	-0.692	-0.685	-0.548	0.00	0.21	0.32
	O11	-0.419	-0.613	-0.953	1.02	0.67	0.00



Слика 3.20. Расподела спинске густине у пост-реакционом комплексу у положају 6

Константе брзине за реакцију бајкалеина са хидрокси радикалом рачунате су користећи једначину:

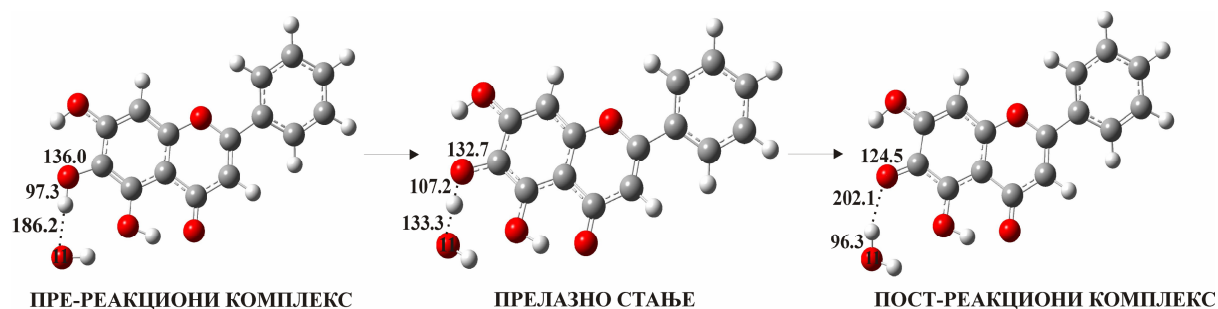
$$k = \frac{k_B T}{h} \exp(-\Delta G_a^\ddagger / RT) \quad (3.1)$$

где су  $\Delta G_a^\ddagger$ ,  $k_B$  и  $h$  слободна енергија активације, Болцманова и Планкова константа. Једн. (3.1) односи се на 1 М раствор. У табели 3.15 приказани су добијени резултати.

Табела 3.15. Израчунате вредности термодинамичких величина за реакцију бајкалеина и хидрокси радикала.  $\Delta G_a^\ddagger$ ,  $k$  и  $\Delta G_r$  означавају слободну енергију активације, константу брзине и слободну енергију реакције

Положај	$\Delta G_a^\ddagger$ (kJ/mol)	$k$ (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	$\Delta G_r$ (kJ/mol)
6	18.76	3.48x10 <sup>9</sup>	-141.37
7	31.09	3.47x10 <sup>8</sup>	-101.88

На основу вредности за константе брзина и слободне енергије реакције закључујемо да је положај 6 и кинетички и термодинамички повољнији за реакцију бајкалеина са хидрокси радикалом. На овај начин потврђена су предвиђања добијена на основу термодинамичких величина у табелама 3.7 и 3.12. Овај реакциони пут приказан је на слици 3.21.



Слика 3.21. Реакциони пут за НАТ механизам бајкалеина у положају 6

### 3.4.2. SET-PT механизам код бајкалеина

Уврежено је становиште да је SET-PT мало вероватан антиоксидативни механизам код флавоноида, углавном због њихових високих IP вредности. Због тога овај механизам није ни испитиван све до недавно [54]. Као што је већ речено у одељку 3.3.1., радикал катјон може настати на различите начине, а не само под дејством електрофилних радикала. Циљ нашег истраживања је да се испита хемијско понашање формираног радикал катјона бајкалеина у присуству различитих база, хидроксидног анјона у овом случају.

Испитане су реакције хидроксидног анјона са свим ОН групама радикал катјона бајкалеина, и откривена су прелазна стања за реакције у положајима 6 и 7. На наше изненађење, вредности парцијалних наелектрисања и спинских густина у оба RC, TS и PC идентичне су вредностима приказаним у табели 3.15, што значи да се сваки RC састоји, уствари, од бајкалеина и хидрокси радикала у различитим положајима, иако смо пошли од радикал катјона бајкалеина и хидроксидног анјона у различитим положајима.

Зашто је дошло до ове трансформације, те је неспарени електрон локализован на O11? Хидроксидни анјон има две р орбитале високе енергије у којима су смештени слободни електронски парови, а чија је енергија (-0.02286 au) виша од енергије SOMO орбитале радикал катјона бајкалеина (-0.4312 au). Зато један електрон спонтано прелази са хидроксидног анјона на радикал катјон градећи бајкалеин и хидрокси радикал. Треба нагласити да је овај спонтани процес екстремно егзотерман ( $\Delta G_r = -562.4 \text{ kJ/mol}$  за положај 6 и  $-555.5 \text{ kJ/mol}$  за положај 7).

Из овога произилази да је равнотежа у првом кораку у реакцији 1.2, барем када је  $R^- = \text{OH}^-$ , потпуно померена улево, што значи да се други корак у реакцији 1.2 уопште не дешава.

Слична ситуација је нађена и код реакције радикал катјона бајкалеина са метантиоенолатним анјоном. Наиме, енергија НОМО орбитале овог анјона (-0.0308) је виша од енергије SOMO орбитале радикал катјона бајкалеина, услед чега долази до спонтаног преласка једног електрона са метантиоенолатног анјона на радикал катјон. На овај начин се формирају бајкалеин и метантиоенолатни радикал који даље реагују



по НАТ механизму. Дакле, и механистички приступ је показао да SET-PT није вероватан механизам антиоксидативног дејства бајкалеина у гасовитој фази, што је у сагласности са резултатима у табели 3.12. Оваква истраживања ће се наставити и са другим базама и у различитим медијумима. На овај начин биће могуће да се упореде бајкалеин и кверцетин, за који је нађено да под одређеним условима реагује по SET-PT механизму [54].

## ***4. ЗАКЉУЧАК***

На основу резултата приказаних у поглављу Наши радови, могу се извести следећи закључци. Ротамер 1 (слика 2) је најстабилнији конформер молекула бајкалеина како у гасовитој, тако и у воденој фази. Бајкалеин је непланаран молекул, што показује експериментална ( $9.0^\circ$ ) и израчуната ( $24.5^\circ$ ) вредност за диедарски угао  $\tau$ . У најстабилнијој конформацији бајкалеин има три водоничне везе које имају стабилизациони ефекат. Водонична веза  $D_H(H5-O4)$  даје највећи допринос стабилизацији молекула бајкалеина. То је потврдила и NBO анализа.

Извршено је симулирање вибрационих и UV/Vis спектра бајкалеина и поређење са одговарајућим експерименталним спектрима. Спектрална анализа је показала одлична слагања између експериментално добијених и симулираних IR и Раманских спектра. Уз помоћ симулираних спектра извршена је прецизна асигнација вибрационих облика у IR и Раманском спектру. Детаљна анализа UV/Vis спектра показала је сасвим задовољавајуће слагање између експерименталних вредности таласних дужина и интензитета, и оних који су израчунати помоћу B3LYP функционала. Одређене су молекулске орбитале бајкалеина између којих се врше електронски прелази одговорни за UV спектар. PBE метода се показала мање ефикасна у предвиђању UV спектра бајкалеина.

Испитани су сви радикали, анјони и радикал катјон бајкалеина, који имају важну улогу у антиоксидативним механизмима бајкалеина. Положај 6 најповољнији је за хомолитичко раскидање O–H везе у гасовитој фази, док је положај 7 најповољнији за хетеролитичко раскидање O–H везе у воденој фази. Расподела спинске густине у најстабилнијем O6R1 радикалу (слика 3.12) показује да је неспарени електрон веома добро делокализован (са највећом вредношћу спинске густине на O6 атому) и у гасовитој и у воденој фази, чиме се може објаснити стабилност овог радикала и способност бајкалеина да делује антиоксидативно по NAT механизму. Расподела наелектрисања у најстабилнијем анјону O7A2, добијена NBO анализом, показала је да постоји делокализација негативног наелектрисања у прстену A, при чему O7 атом носи највеће негативно наелектрисање у гасовитој и воденој фази. Овај анјон се јако стабилизује у воденом раствору, чиме се може објаснити способност бајкалеина да делује антиоксидативно по SPLET механизму.

Наша истраживања предвиђају планарну структуру за радикал катјон бајкалеина. Занимљива особина радикал катјона у односу на молекул бајкалеина је та да је Н атом прешао са О5 на О4. Радикал катјон настаје када електрон напусти НОМО (усамљени електронски пар на О4) бајкалеина. Услед немогућности да се овако настали радикал катјон стабилизује делокализацијом преко прстена С, долази до спонтаног прелаза атома водоника са О5 на О4. Овај радикал катјон се стабилизује делокализацијом неспареног електрона преко прстена А, и тако смањује нестабилност насталу губитком електрона. Хетеролитичком дисоцијацијом из радикал катјона настају три радикала. Структуре сва три радикала су испитане. Нађено је да је делокализација спинске густине највише изражена у термодинамички најстабилнијем С6–О радикалу.

BDE, PA, IP, ETE и PDE вредности послужиле су нам у одређивању термодинамички најповољнијег реакционог пута. Сва три приступа указују да је НАТ механизам најповољнији реакциони пут антиоксидативног деловања бајкалеина у гасовитој фази. По другом приступу сва три механизма су компетитивна у воденој средини. По трећем приступу SPLET механизам је термодинамички доминантан реакциони пут антиоксидативног деловања бајкалеина у воденом раствору, док SET-PT није повољан механизам ни у гасовитој ни у воденој фази.

Да би антиоксидативно деловање бајкалеина било испитано са већом сигурношћу, започета су механистичка истраживања овог проблема. Симулација реакције бајкалеина са хидрокси радикалом потврдила је да је НАТ доминантан реакциони пут у гасовитој фази. Као што се могло и претпоставити на основу термодинамичког испитивања, положај 6 је најреактивнији, односно реакција се скоро десет пута одвија брже него у положају 7. Испитивање реакције радикал катјона бајкалеина са базама (хидроксидним и метантиолатним анјоном) су показала да ни радикал катјон не реагује по SET-PT, него по НАТ механизму у гасовитој фази. То је последица више енергије р орбитала оба анјона у односу на енергију SOMO орбитале радикал катјона, што доводи до спонтаног прелаза електрона са анјона на радикал катјон. На овај начин поново се формира молекул бајкалеина и одговарајући радикал. Механистичка истраживања реакционих путева бајкалеина ће се наставити са различитим радикалима и базама у различитим растварачима у циљу потпунијег објашњења његовог антиоксидативног деловања.

Имајући у виду преглед стања у досадашњем истраживању антиоксидативног деловања флавоноида, добијени резултати, који проистичу из ове дисертације, доприносе разумевању сложених механизма преко којих бајкалеин остварује своје антиоксидативно деловање, тим пре што у овој области има веома мало објављених резултата. Очекује се да ће добијени резултати, применом комплементарних приступа, допринети бољем разумевању структурних и електронских особина других полифенола.

## **5. ЛИТЕРАТУРА**

- [1] M. Ferrali, C. Signorini, B. Caciotti, L. Sugherini, L. Ciccoli, D. Giachetti, M. Comporti, *FEBS Lett.*, 416, 1997, 123.
- [2] A.J. Elliott, S.A. Scheiber, C. Thomas, R.S. Pardini, *Biochem. Pharm.* 44, 1992, 1603.
- [3] P. Cos, L. Ying, M. Calomme, J.P. Hu, K. Cimanga, B. Van Poel, L. Pieters, A.J. Vlietinck, D. Vander-Berghe, *J. Nat. Prod.*, 61, 1998, 71.
- [4] C.A. Rice-Evans, N.J. Miller, P.G. Bolwell, P.M. Bramley, J.B. Pridham, *Free. Radic. Res.*, 22, 1995, 375.
- [5] I. Dalle-Donne, A.S. Giustarini, D. Cavarra, E. Tell, G. Lungarella, *Mass. Spectrom. Rev.*, 24, 2005, 55.
- [6] O. Hornykiewicz, J. Kish, *Adv. Neurol.*, 45, 1986, 19.
- [7] F. Lozoncy, M. Davidson, K. Davis, *Raven. Press.* 715, 1987, 726.
- [8] M. Sayre, A. Smith, G Perry, *Curr. Med. Chem.* 8, 2001, 721.
- [9] K. Barnham, C. Masters, A. Bush. *Nature*, 3, 2004, 205.
- [10] L. Perry, V. Godin, S. Hansen, *Neurosci. Lett.*, 33, 1982, 305.
- [11] L. Perry, W. Young, *Neurosci. Lett.*, 67, 1986, 269.
- [12] E. Sofic, W. Lange, K. Jellinger, P. Riederer, *Neurosci. Lett.*, 142, 1992, 128.
- [13] J. Moore, B. West, L. Dawson, M. Dawson, *Annu. Rev. Neurosci.*, 28, 2005, 57.
- [14] K. Gołmbiowska, A. Dziubina, M. Kowalska, K Kamińska, *Pharmacol. Rep.*, 60, 2008, 319.
- [15] P. Jenner, T. Dexter, J. Sian, H. Schapira, C.D. Marsden, *Ann. Neurol.*, 32. 1992, (Suppl) S82.
- [16] S. Ranaud, M. de Lorgeril, *Lancet*, 339, 1992, 1523.
- [17] J.B. Harborne, H. Baxter, *The Handbook of Natural Flavonoids*, Vol. 2, Wiley & Sons, Chichester (UK), 1999.

- [18] J. Heilmann, I. Merfort, M. Weiss, *Planta. Med.*, 61, 1995, 435.
- [19] A.K. Ratty, N.P. Das, *Biochem. Med. Metab. Biol.*, 39, 1988, 69.
- [20] Z. Gao, K. Huang, X. Yang, H. Xu, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1472, 1999, 643.
- [21] H.P. Bais, T.S. Walker, A.J. Kennan, F.R. Stermitz, J.M. Vivanco, *J. Agric. Food. Chem.*, 51, 2003, 897.
- [22] Y. Hanasaki, S. Ogawa, S. Fukui, *Free. Radic. Biol. Med.*, 16, 1994, 845.
- [23] S.V. Jovanovic, S. Steenken, M. Tosic, B. Marjanovic, M.G. Simic, *J. Am. Chem. Soc.*, 116, 1994, 4846.
- [24] J. Robak, R.J. Gryglewski, *Biochem. Pharmacol.*, 37, 1988, 837.
- [25] A. Arora, M.G. Nair, G.M. Strasburg, *Free. Radic. Biol. Med.*, 24, 1998, 1355.
- [26] W. Bors, C. Michel, *Free. Radic. Biol. Med.*, 27, 1999, 1413.
- [27] M.C. Montensinos, A. Ubeda, M.C. Terencio, M. Payá, M.J. Alcaraz, *Z. Naturforsch.*, 50, 1995, 552.
- [28] H. Shi, N. Noguchi, E. Niki, *Free. Radic. Biol. Med.*, 27, 1999, 334.
- [29] M.J. Arts, G.R. Haenen, H.P. Voss, A. Bast, *Food. Chem. Toxicol.*, 42, 2004, 45.
- [30] W. Brand-Williams, M.E. Cuvelier, C. Berset, *LWT-Food. Sci. Technol.*, 28, 1995, 25.
- [31] L. Zai-Qun, *Chem. Rev.*, 110, 2010, 5675.
- [32] H. Shi, N. Noguchi, E. Niki, *Free. Radic. Biol. Med.*, 27, 1999, 334.
- [33] V. Cody, E. Middleton, J. Harborne, *Plant flavonoids in biology and medicine*, Alan R. Liss, Inc., New York, 1986.
- [34] A.J. Dugas, J. Castaneda, G.C. Bonin, K.L. Price, N.H. Fisher, G.W. Winston, *J. Nat. Prod.*, 63, 2000, 327.



- [35] K. Dekermendjian, P. Kahnberg, M.R. Witt, O. Sterner, M. Nielsen, T. Liljefors, *J. Med. Chem.*, 42, 1999, 4343.
- [36] W.F. Hodnick, F.S. Kung, W.J. Roettger, C.W. Bohmont, R.S. Pardini, *Biochem. Pharmacol.*, 35, 1986, 2345.
- [37] G. Cao, E. Sofic, R.L. Prior, *Free. Radic. Biol. Med.*, 22, 1997, 749.
- [38] H. Wang, J. A. Joseph, *Free. Radic. Biol. Med.*, 27, 1999, 683.
- [39] C.A. Rice-Evans, N.J. Miller, G. Paganga, *Free. Radic. Biol. Med.*, 20, 1996, 933.
- [40] Y.Z. Cai, M. Sun, J. Xing, Q. Luo, H. Corke, *Life Sci.*, 78, 2006, 2872.
- [41] S. Burda, W. Oleszek, *J. Agric. Food. Chem.*, 49, 2001, 2774.
- [42] A. Mora, M. Payá, J.L. Ríos, M.J. Alcaraz, *Biochem. Pharmacol.*, 40, 1990, 793.
- [43] G.R.M.M. Haenen, J.B.G. Paquay, R.E.M. Korthouwer, A. Bast, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 236, 1997, 591.
- [44] S.A.B. E. van Acker, M.J. de Groot, D.-J. van den Berg, M.N.J.L. Tromp, G. Donnè -Op den Kelder, W.J. van der Vijgh, A. Bast, *Chem. Res. Toxicol.*, 9, 1996, 1305.
- [45] A. Vagánek, J. Rimarčík, V. Lukeš, L. Rottmannová, E. Klein, *Acta. Chim. Slov.*, 2, 2011, 55.
- [46] J.S. Wright, E.R. Johnson, G.A. DiLabio, *J. Am. Chem. Soc.*, 123, 2001, 1173.
- [47] A.P. Vafiadis, E.G. Bakalbassis, *Chem. Phys.*, 316, 2005, 195.
- [48] M. Musialik, G. Litwinienko, *Org. Lett.*, 7, 2005, 4951.
- [49] Z.S. Marković, J.M. Dimitrić-Marković, Č.B. Doličanin, *Theor. Chem. Acc.*, 127, 2010, 69.
- [50] H.Y. Zhang, H.F. Ji, *J. Mol. Struct.- THEOCHEM*, 663, 2003, 167.
- [51] H.Y. Zhang, Y.M. Sun, X.L. Wang, *J. Org. Chem.*, 67, 2002, 2709.

- [52] J. Rimarčik, V. Lukeš, E. Klein, M. Ilčin, *J. Mol. Struct.- THEOCHEM*, 952, 2010, 25.
- [53] Z.S. Marković, S. Marković, J.M. Dimitrić-Marković, D. Milenković, *Int. J. Quantum. Chem.*, 112, 2012, 2009.
- [54] Z.S. Marković, D. Amić, D. Milenković, J.M. Dimitrić-Marković, S. Marković, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 15, 2013, 7370.
- [55] E. Klein, V. Lukeš, *J. Phys. Chem.*, 110, 2006, 12312.
- [56] G. Litwinienko, K.U. Ingold, *Acc. Chem. Res.*, 40, 2007, 222.
- [57] G. Litwinienko, K.U. Ingold, *J. Org. Chem.*, 70, 2005, 8982.
- [58] G. Litwinienko, K.U. Ingold, *J. Org. Chem.*, 69, 2004, 5888.
- [59] M.C. Foti, C. Daquino, G.A. DiLabio, K.U. Ingold, *J. Org. Chem.*, 73, 2008, 2408.
- [60] Z.S. Marković, J.M. Dimitrić-Marković, D. Milenković, N. Filipović, *J. Mol. Model.*, 17, 2011, 2575.
- [61] H.B Li, F. Chen, *J. Chromatogr. A.*, 1074, 2005, 107.
- [62] M. Wolniak, J. Oszmianski, I. Wawer, *Magn. Reson. Chem.*, 46, 2008, 215.
- [63] T. Lapidot, S. Harel, B. Akiri, R. Granit, J. Kanner, *J. Agric. Food. Chem.*, 47, 1999, 67.
- [64] B.Q. Li, T. Fu, Y. Dongyan, J.A. Mikovits, F.W. Ruscetti, J.M. Wang, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 276, 2000, 534.
- [65] K. Kitamura, M. Honda, H. Yoshizaki, S. Yamamoto, H. Nakane, M. Fukushima, K. Ono, T. Tokunaga, *Antiviral. Res.*, 37, 1998, 131.
- [66] X. Mu, G. He, Y. Cheng, X. Li, B. Xu, G. Du, *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 92, 2009, 642.
- [67] S. Marković, Z. Marković, Molekulsko modeliranje, Centar za naučno-istraživački rad Srpske akademije nauka i umetnosti i Univerziteta u Kragujevcu, Kragujevac, 2012.

- [68] J.B. Foresman, E. Frisch, Exploring Chemistry with Electronic Structure Methods: A Guide to Using Gaussian, Gaussian Inc., Pittsburg, 1993.
- [69] W.J. Hehre, J. Yu, P.E. Klunzinger, L. Lou, A Brief Guide to Molecular Mechanics and Quantum Chemical Calculations, Wavefunction, Inc., Irvine, 1998.
- [70] E.G. Lewars, Computational Chemistry: Introduction to the Theory and Applications of Molecular and Quantum Mechanics, Kluwer Academic Publishers, New York, 2003.
- [71] W.J. Hehre, A Guide to Molecular Mechanics and Quantum Chemical Calculations, Wavefunction, Inc., Irvine, 2003.
- [72] A. Hinchliffe, Molecular Modelling for Beginners, Wiley & Sons, Inc., Chichester, 2008.
- [73] U. Burkert, N.L. Allinger, Molecular Mechanics, M.C. Cesario Ed., Am. Chem. Soc., Washington, 1982.
- [74] D. Young, Computational Chemistry: A Practical Guide for Applying Techniques to Real World Problems, Wiley-Interscience, 2002.
- [75] S. Marković, Z. Marković, Računari i hemija, Univerzitet u Kragujevcu, Prirodno-matematički fakultet, Kragujevac, 2003.
- [76] F. Jensen, Introduction to Computational Chemistry, Wiley, Chichester, 1999.
- [77] K.B. Lipkowitz, D. B. Boyd. Reviews in Computational Chemistry, VCH, New York, Weinheim, Cambridge, 1990.
- [78] I. Juranić, Hemijska veza, Univerzitetski udzbenik, Hemijski fakultet Univerziteta u Beogradu, Beograd, 1994.
- [79] A. Rauk, Orbital Interaction Theory of Organic Chemistry, John Wiley&Sons Inc., New York, 2001.
- [80] W. Koch, M.C. Holthausen. A Chemist's Guide to Density Functional Theory, Wiley-VCH, Weinheim, 2001.

- [81] M.P. Mueller, *Fundamentals of Quantum Chemistry*, Kluwer Academic Publishers, New York, 2002.
- [82] S.M. Bachrach, *Computational Organic Chemistry*, John Wiley&Sons Inc., Hoboken, New Jersey, 2001.
- [83] M. Perić, *Struktura i spektri molekula*, SANU, Beograd, 2009.
- [84] E. Schrodinger, *Phys. Rev.*, 28, 1926, 1049.
- [85] M. Born, R. Oppenheimer, *Ann. Phys.*, 84, 1927, 457.
- [86] J.C. Slater, *Phys. Review.*, 34, 1929, 1293.
- [87] D.R. Hartree, *Math. Proc. Cambridge.*, 24, 1927, 89.
- [88] C.C.J. Roothaan, *Rev. Mod. Phys.*, 23, 1951, 69.
- [89] G.G. Hall, *P. Roy. Soc. A, Math. Phys.*, 205, 1951, 541.
- [90] P. Hohenberg, W. Kohn, *Phys. Rev.*, 136, 1964, 864.
- [91] L. Hedin, B.I. Lundqvist, *J. Phys. C:*, 4, 1971, 2064.
- [92] K. Burke, J. P. Perdew, M. Ernzerhof, *Int. J. Quant. Chem.*, 61, 1997, 287.
- [93] Y. Zhao, D.G. Truhlar., *J. Phys. Chem. A*, 108, 2004, 6908.
- [94] Y. Zhao, D.G. Truhlar, *Acc. Chem. Res.*, 41, 2008, 157.
- [95] S.H. Vosko, L. Wilk, M. Nusair, *Can. J. Phys.*, 58, 1980, 1200.
- [96] J.P. Perdew, A. Zunger, *Phys.Rev. B*, 23, 1981, 5048.
- [97] Y. Zhao, E.N. Schultz, D.G. Truhlar, *J. Chem. Theory. Comput.*, 2, 2006, 364.
- [98] Z.S. Marković, J.M. Dimitrić-Marković, D. Milenković, N. Filipović, *Monatsh. Chem.*, 142, 2011, 145.

- [99] P.J. Evaluation of Harmonic Vibrational Frequency Scale Factors, *J. Phys. Chem. A*, 111, 2007, 11683.
- [100] M. Leopoldini, T. Marino, N. Russo, M. Toscano, *Theor. Chem. Acc.*, 111, 2004, 210.
- [101] V. Cody, J.R. Luft, *J. Mol. Struct.*, 317, 1994, 89.
- [102] R.A. Munos, Y.N. Panchenko, G. Koptev, N.F. Stepanov, *J. Appl. Spectrosc.*, 12, 1970, 428
- [103] M.H. Jamróz, Vibrational energy distribution analysis, VEDA 4, Warsaw, 2004.
- [104] M.W. Wong, *Chem. Phys. Lett.*, 256, 1996, 391.
- [105] A.P. Scott, L.J. Radom, *J. Phys. Chem.*, 100, 1996, 16502.
- [106] K.J. Jalkanen, P.J. Stephens, *J. Phys. Chem.*, 95, 1991, 5446.
- [107] Z. Jurasekova, J.V. Garcia-Ramos, C. Domingo, S. Sanchez-Cortes, *J. Raman. Spectrosc.*, 37, 2006, 1239.
- [108] T. Teslova, C. Corredor, R. Livingstone, T. Spataru, R.L. Birke, J.R. Lombardi, M.V. Canameres, M. Leona, *J. Raman. Spectrosc.*, 38, 2007, 802.
- [109] G. Varsanayi, A. Hilger, *J. Mol. Struct.*, 2, 1974, 383.
- [110] A. Torreggiani, Z. Jurasekova, S. Sanchez-Cortes, M. Tamba, *J. Raman. Spectrosc.*, 39, 2008, 265.
- [111] Z. Jurasekova, A. Torreggiani, M. Tamba, S. Sanchez-Cortes, J.V. Garcia-Ramos, *J. Mol. Struct.*, 918, 2009, 129.
- [112] A. Torreggiani, A. Trincherro, M. Tamba, P. Taddei, *J. Raman. Spectrosc.*, 36, 2005, 380.
- [113] M. Wang, T. Teslova, F. Xu, T. Spataru, J.R. Lombardi, R.L. Birke, *J. Phys. Chem. C*, 111, 2007, 3038.

- [114] S. M. Milosavljević, *Strukturne instrumentalne metode*, Hemijski fakultet, Beograd, 1994.
- [115] R Bauernschmitt, R. Ahlrichs, *Chem. Phys. Lett.*, 256, 1996, 454.
- [116] M.E. Casida, C. Jamorski, K.C. Casida, D.R. Salahub, *J. Chem. Phys.*, 108, 1998, 4439.
- [117] R.E. Stratmann, G.E. Scuseria, M.J. Frisch, *J. Chem. Phys.*, 109, 1998, 8218.
- [118] J.E. Monat, J.H. Rodriguez, J.K. McCusker, *J. Chem. Phys. A*, 106, 2002, 7399.
- [119] A. Castro, M.A.L. Marques in *Time-dependent density functional theory*, ed. by M.A.L. Marques, C. Ullrich, F. Nogueira, A. Rubio, K. Burke, E.K.U. Gross, *Lecture Notes in Physics*, Vol. 706, Springer, Berlin, 2006, 197-210.
- [120] M. Leopoldini, I.P. Pitarch, N. Russo, M. Toscano, *J. Phys. Chem. A*, 108, 2004, 92.
- [121] P. Trouillas, P. Marsal, D. Siri, R. Lazzaroni, J.L. Duroux, *Food. Chem.*, 97, 2006, 679.
- [122] Q.Sun, G.N.R. Tripathi, R.H. Schuler, *J. Phys. Chem.*, 94, 1990, 6273.
- [123] J. Steadman, J.A. Syage, *J. Am. Chem. Soc.*, 113, 1991, 6786.
- [124] O. Brede, H. Orthner, V. Zubarev, R. Hermann, *J. Phys. Chem.*, 100, 1996, 7097.
- [125] T.A. Gadosy, D. Shukla, L.J. Johnston, *J. Phys. Chem. A*, 103, 1999, 8834.
- [126] A.E Reed, R.B. Weinstock, F.J. Weinhold, *Chem. Phys.*, 83, 1985, 735.
- [127] E.D. Glendening, J.K. Badenhoop, A.E. Reed, J.E. Carpenter, J.A. Bohmann, C.M. Morales, F. Weinhold, *NBO Version 5.9.*, Theoretical Chemistry Institute, University of Wisconsin, Madison, USA, 2009.
- [128] A.E. Reed, L.A. Curtiss, F. Weinhold, *Chem. Rev.*, 88, 1988, 899.
- [129] J.E. Carpenter, F.J. Weinhold, *J. Mol. Struct.-THEOCHEM*, 169, 1988, 41.
- [130] Z.S. Marković, D. Milenković, J. Đorović, J.M. Dimitrić-Marković, V. Stepanić, B. Lučić, D. Amić, *Food. Chem.*, 134, 2012, 1754.

- [131] Z.S Marković, S.V. Mentus, J.M. Dimitrić Marković, *J. Phys. Chem. A*, 113, 2009, 14170.
- [132] S.G. Chiodo, M. Leopoldini, N. Russo, M. Toscano, *Phys. Chem.Chem.Phys.*, 12, 2010, 7662.
- [133] J. R. León-Carmona, J. R. Alvarez-Idaboy, A. Galano, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 14, 2012, 12534.
- [134] F. D. Meo, V. Lemaire, J. Cornil, R. Lazzaroni, J.-L. Duroux, Y. Olivier, P. Trouillas, *J. Phys. Chem. A*, 117, 2013, 2082.

## **6. ПРИЛОГ**



## 6.1. Биографија

Дејан Миленковић је рођен 05.01.1982. године у Крагујевцу. Основну школу завршио је у Крагујевцу, а средњу Пољопривредно-ветеринарску школу у Рековцу. Природно-математички факултет, група хемија, Универзитета у Крагујевцу уписао је школске 2001. године, а дипломирао 2007. године са просечном оценом 8,28. Дипломски рад на тему “Зависност енергије активације нуклеофилне адиције енолатног анјона етил-ацетата на етил-ацетат од НОМО-LUMO гена одговарајућих реактаната” одбранио је 12.03.2007. године са оценом 10. Докторске академске студије, смер Органска хемија, на Природно-математичком факултету у Крагујевцу уписао је школске 2010/2011. године.

Од 01. септембра 2009. године запослен је у Истраживачко-развојном центру за биоинжењеринг БиоИРЦ у Крагујевцу, прво као истраживач-приправник, а сада као истраживач-сарадник.

Од 2011. године је учесник на пројектима Министарства просвете и науке Републике Србије под називима „Динамика нелинеарних физичко-хемијских и биохемијских система са моделирањем и предвиђањем њихових понашања под неравнотежним условима” (бр. ОИ172015) и „Методe моделирања на више скала са применама у биомедицини” (бр. ОИ174028), а учесник је и на билатералном пројекту СРБИЈА ХРВАТСКА бр. N07006 „Истраживање односа, структуре и биолошке активности полифенола“; Министарство просвете и науке Р. Србије, бр. 69-00-74/2010-02/01.

Тренутно се бави истраживачким радом у области органске физичке хемије, прецизније, испитивањем механизма антиоксидативног деловања флавоноида.

Дејан Миленковић до сада има десет објављених научних радова у научним часописима од међународног значаја, и више саопштења на научним скуповима националног и међународног карактера. Стручно веће за природно-математичке науке Универзитета у Крагујевцу је 03.07.2013. године донело одлуку бр. 385/5 о испуњености услова кандидата и научној заснованости теме докторске дисертације под насловом “Механизми антиоксидативног деловања бајкалеина” коју је усвојило

Наставно-научно веће Природно-математичког факултета у Крагујевцу одлуком бр. 370/XII-2 од 29.05.2013. године.

## 6.2. Списак публикованих радова

Дејан Миленковић је до сада објавио десет научних радова:

1. Marković Z., Dimitrić-Marković J., Milenković D., Filipović N.; Mechanistic Study of Structure-Activity Relationship of the Free Radical Scavenging Activity of Baicalein; *J. Mol. Model.*, (2011) 17: 2575–2584,. (**M21**) IF 2.336, ISSN: 1610-2940.
2. Marković Z., Milenković D., Đorović J., Dimitrić Marković J. M., Stepanić V., Lučić B., Amić D.; PM6 and DFT study of free radical scavenging activity of morin; *Food Chem.*, (2012) 134: 1754–1760, (**M21**) IF 3.655, ISSN:0308-8146.
3. Marković Z., Milenković D., Đorović J., Dimitrić Marković J. M., Stepanić V., Lučić B., Amić D.; Free radical scavenging activity of morin 2'-O-phenoxide anion; *Food. Chem.*, (2012) 135: 2070-2077. (**M21**) IF 3.655, ISSN:0308-8146.
4. Marković Z. S., Marković S., Dimitrić Marković J. M., Milenković D.; Structure and reactivity of baicalein radical cation; *Int. J. Quant. Chem.*, (2012) 112: 2009-2017. (**M21**) IF 1.357 ISSN: 0020-7608
5. Marković Z., Amić D., Milenković D., Dimitrić Marković J. M., Marković S.; Examination of the chemical behavior of the quercetin radical cation towards some bases; *Phys. Chem. Chem. Phys.*, (2013) 15: 7370-7378. (**M21**) IF 3.829 ISSN: 1463-9076.
6. Marković Z., Dimitrić Marković J., Milenković D., Filipović N.; Structural and electronic features of baicalein and its radicals; *Monatsh. Chem.*, (2011) 142: 145–152, (**M22**) IF 1.532 ISSN: 0026-9247.
7. Dimitrić Marković J., Marković Z., Milenković D., Jeremić S.; Application of comparative vibrational spectroscopic and mechanistic studies in quantitative analysis

- of fisetin structure; *Spectrochim. Acta. A*, (2011) 83: 120-129. (**M22**) IF 2.098 ISSN: 1386-1425.
8. Brdarić T. P., Marković Z. S., Milenković D., Dimitrić Marković J. M.; A joint application of vibrational spectroscopic and quantum mechanical methods in quantitative analysis of baicalein structure; *Monatsh. Chem.*, (2012) 143: 1369-1378, (**M22**) IF 1.629 ISSN: 0026-9247
  9. Marković Z., Milenković D., Đorović J., Dimitrić Marković J. M., Lučić B., Amić D.; Free Radical Scavenging Activity of Ellagic Acid and Ellagate Anions; *Monatsh. Chem.*, (2013) 114: 803-812, (**M22**) IF 1.629 ISSN: 0026-9247.
  10. Dimitrić Marković J. M., Marković Z. S., Krstić J. B., Milenković D., Lučić B., Amić D.; Interpretation of the IR and Raman spectra of morin by density functional theory and comparative analysis. *Vib. Spectrosc.*, (2013) 64: 1–9, (**M22**) IF 1.747 ISSN :0924-2031.

**6.3. *Публиковани научни радови у којима су презентовани резултати докторске дисертације***

# Mechanistic study of the structure–activity relationship for the free radical scavenging activity of baicalein

Zoran S. Marković · Jasmina M. Dimitrić Marković ·  
Dejan Milenković · Nenad Filipović

Received: 18 August 2010 / Accepted: 20 December 2010  
© Springer-Verlag 2011

**Abstract** Density functional theory calculations were performed to evaluate the antioxidant activity of baicalein. The conformational behaviors of both the isolated and the aqueous-solvated species (simulated with the conductor-like polarizable continuum solvation model) were analyzed at the M052X/6-311+G(d,p) level. The most stable tautomers of various forms of baicalein displayed three IHBs between O4 and OH5, O5 and OH6, and O6 and OH7. The most stable tautomer of the baicalein radical was obtained by dehydrogenating the hydroxyl at C6, while the most stable anion tautomer was obtained by deprotonating the C7 hydroxyl in gaseous and aqueous phases. The expected antioxidant activity of baicalein was explained by its ionization potentials (IPs) and homolytic O–H bond dissociation enthalpies (BDEs), which were obtained via

the UM052X optimization level of the corresponding radical species. Heterolytic O–H bond cleavages (proton dissociation enthalpies, PDEs) were also computed. The calculated IP, BDE, and PDE values suggested that one-step H-atom transfer, rather than sequential proton loss–electron transfer or electron transfer–proton transfer, would be the most favorable mechanism for explaining the antioxidant activity of baicalein in the gas phase and in nonpolar solvents. In aqueous solution, the SPLET mechanism was more important.

**Keywords** Baicalein · DFT calculations · Antioxidant activity · M052X/6-311+G(d,p) level of theory · IP · BDE · PDE

---

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s00894-010-0942-y) contains supplementary material, which is available to authorized users.

Z. S. Marković  
Department of Biochemical and Medical Sciences, State  
University of Novi Pazar,  
Vuka Karadžića bb,  
Novi Pazar 36300, Republic of Serbia

J. M. Dimitrić Marković (✉)  
Faculty of Physical Chemistry, University of Belgrade,  
Studentski trg 12-16,  
11000, Belgrade, Republic of Serbia  
e-mail: markovich@ffh.bg.ac.rs

D. Milenković · N. Filipović  
Bioengineering Research and Development Center,  
34000, Kragujevac, Republic of Serbia

N. Filipović  
Harvard School of Public Health, Harvard University,  
Boston, MA 02115, USA

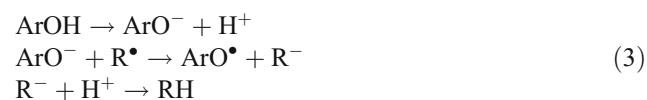
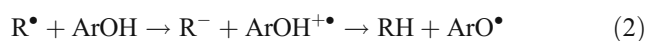
## Introduction

The flavonoid family is a vast and important group among the phenolics, comprising more than several thousand known compounds [1–3]. They play essential roles in plant physiology, as they are involved in the light phase of photosynthesis, the attraction of pollinating insects, growth, reproduction, the regulation of iron channels associated with phosphorylation, resistance to pathogens and predators, and the protection of plants from UV [4]. This variety of beneficial actions is believed to be closely related to their pronounced antioxidant activity, which operates at different levels in the oxidative process, such as when scavenging for free radicals, chelating metal ions, scavenging for lipid peroxy radicals, and removing oxidatively modified and damaged biomolecules [5–11]. Their *in vivo* activity is largely dependent on bioavailability, the heterogeneity of natural media, *in vivo* redox status, and factors related to their basic structure, including structural determinants such

as molecular size, degree of glycosylation, hydroxylation pattern, presence of the C4 carbonyl group, presence of the double bond between C2 and C3 that is conjugated to the 4-oxo group, the C3 hydroxyl group present in flavonols, the degree of conjugation with other polyphenols, and their interactions with surrounding molecules [12–15]. Among the major determinants *in vivo*, the pH of the medium (which varies from pH 1 in the stomach to pH 5.3 in the small intestine, pH 6.8 in mouth saliva, pH 7.4 in blood and tissue fluid, pH 8 in the large intestine, pH 7–8.7 in the pancreas, to pH 8.3–9.3 in the duodenum) [16] influences the basic flavonoid structure [17, 18] as well as the oxidation site and the mechanism through which the oxidation of flavonoids takes place.

Although the mechanism of flavonoid antioxidant activity has been extensively studied over several decades, there are still different perspectives on the molecular mechanisms of radical scavenging by flavonoids and the structural dependency of their antioxidant action. It is known that phenolic antioxidants generally act as very good hydrogen and electron donors. Also, their radical intermediates are relatively stable due to resonance delocalization and a lack of suitable sites for attack by molecular oxygen [19, 20].

There are at least three fundamental and widespread reaction pathways through which flavonoids (ArOH) and other phenolic compounds act as antioxidants [21]. Besides the possibility of direct free radical scavenging through the rapid donation of the hydrogen atom to a radical (the so-called HAT mechanism; see Eq. 1) and the chain-breaking mechanism that leads to indirect H abstraction [the electron transfer–proton transfer (ET-PT) mechanism; see Eq. 2], flavonoids can also undergo a sequential proton loss–electron transfer (SPLET) mechanism, which takes place once the anion (ArO<sup>−</sup>) has formed. All three of these mechanisms may take place in parallel, but at different rates.



The reaction implicated in the HAT mechanism is governed by the bond dissociation enthalpies (BDEs) of ArOH and RH, as the BDE is the molecular property that is used to assess the possible radical scavenging potential of the molecule. To a first approximation, if the BDE of the parent molecule is smaller than the BDE of the protonated

radical form, the reaction is allowed. The first step in the ET-PT mechanism (Eq. 2) is an electron-transfer reaction, where the corresponding controlling parameter is the ionization potentials (IPs) of the ArOH and R<sup>−</sup> species. A prerequisite for this reaction would be that the IP of the parent molecule is lower than the IP of the radical ion, R<sup>−</sup>. Finally, mechanism 3 is mainly governed by the O–H heterolytic bond dissociation enthalpy (the proton dissociation enthalpy, PDE), although the IP of the ArO<sup>−</sup> species is another influential parameter.

This paper considers a possible explanation for the potential antioxidant activity of each reactive site of baicalein, and investigates the correlation between the structure and the scavenging activity of baicalein in a molecular manner. Baicalein and its glycosidized form baicalin are two of the major bioactive flavone compounds found in a traditional Chinese medicinal herb, the Baikal skullcap (*Scutellaria baicalensis* Georgi). Baicalein has been the subject of a number of theoretical [22] and experimental studies that have produced promising results in different areas, such as the inhibition of iron-induced lipid peroxidation and anticancer, antiinflammatory and antioxidant activities [23–25]. Medical interest in it arises from its numerous beneficial effects; among the most striking of these are the treatment of disease-related symptoms such as insomnia, fever, and copious perspiration. It is considered a relatively potent antioxidant, even though the A ring is not considered a good electron donor.

## Computational details

The conformations of different forms of baicalein (neutral, radical, radical cation, and anion) were fully optimized with a new local density functional method (M05-2X) that was recently developed by the Truhlar group [26, 27] using the 6-311+G(d,p) basis set, as implemented in the Gaussian 09 package [28]. This new hybrid meta exchange correlation functional is parameterized so that it includes both nonmetallic and metallic compounds. This functional also yields satisfactory overall performance for main-group thermochemistry and thermochemical kinetics, as well as for organic, organometallic, biological and noncovalent interactions [26, 27, 29, 30]. To calculate the thermodynamic properties in the solvent environment (water), a conductor-like polarizable continuum solvation model (CPCM) [31–35]—as implemented in Gaussian 09—was used in combination with DFT calculations at the M05-2X/6-311+G(d,p) level.

The vibrational frequencies were obtained by diagonalizing the corresponding M05-2X Hessian matrices. The nature of the stationary points was determined by analyzing the number of imaginary frequencies: 0 for a minimum and

1 for a transition state. Relative energies were calculated at 298 K.

Potential energy surfaces were obtained in relation to the torsion angle  $\tau$  between the rings B and C, as defined by C3–C2–C1'–C2' (Fig. 1). The torsion angle  $\tau$  was scanned in steps of  $10^\circ$  without constraining any other geometric parameters. The effects of the following torsion angles rotations were also studied: C4–C5–OH, C5–C6–OH, and C6–C7–OH. Afterwards, the structures were further optimized without any constraint around each potential minimum. Particular attention was devoted to the DFT interpretation of the reactivities of the OH groups in baicalein and the radicals and cations formed after removing H from the molecule.

The bond dissociation enthalpy (BDE) for baicalein was calculated using the following equation:

$$BDE = H_{BOH} - H_{BO\cdot} - H_{H\cdot} \quad (4)$$

where  $H_{BOH}$ ,  $H_{BO\cdot}$ , and  $H_{H\cdot}$  represent the enthalpies of baicalein, the baicalein radical, and the hydrogen atom, respectively. The ionization potential (IP) was obtained as the energy difference between the BOH and  $BOH^{+\cdot}$  species.

The proton dissociation enthalpy (PDE) is defined as  $PDE = H_{BO^-} + H_{H^+} - H_{BOH}$ , where  $H_{BO^-}$  is the enthalpy of the molecule derived from proton dissociation and  $H_{H^+}$  is the enthalpy of the proton ( $-0.00236$  au).

IPs and O–H BDEs were obtained by carrying out unrestricted complete UM05-2X/6-311+G(d,p) optimizations for the radical species formed after the ionization or O–H bond cleavage experienced by the most stable conformer of each of the baicalein forms. In the gas phase, IP, PDE and BDE values were obtained by including ZPVE and other thermal corrections to the enthalpies (TCEs) of the final and initial states. The M05-2X/6-311+G(d,p) values were corrected by using the recommended scaling factor 0.9631 [36].

As previously proposed [36], gas-phase corrections were employed to calculate these parameters in the aqueous phase, because the calculation of vibrational frequencies

with CPCM is not very accurate and thermal corrections are expected to be rather similar in the gas and solvated phases.

In the conformational analysis performed here, all of the conformations obtained by combining antiperiplanar and synperiplanar arrangements of hydrogen atoms for the dihedral angles  $\omega_1$  (C4–C5–O–H),  $\omega_2$  (C5–C6–O–H) and  $\omega_3$  (C6–C7–O–H) were considered, as well as the important dihedral angle O1–C2–C1'–C2' (hereafter denoted  $\tau$ ), which defines the coplanarity of the AC and B systems (Fig. 1).

## Results and discussion

### Conformational analysis

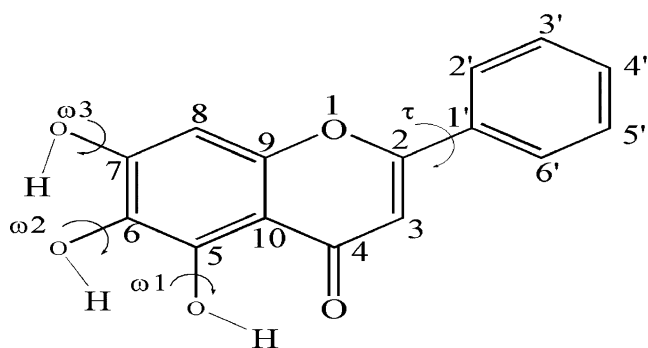
Since the behavior of the different OH groups in polyphenolic compounds is largely influenced by electronic effects of the neighboring groups and the overall geometry of the molecule, the conformation can be regarded as the first parameter of importance when analyzing the antioxidant capacity of any polyphenolic molecule, and baicalein in this case.

A detailed conformational analysis of baicalein in gaseous and aqueous phases (applying the CPCM model) was performed, and the most important results are presented in the sections that follow.

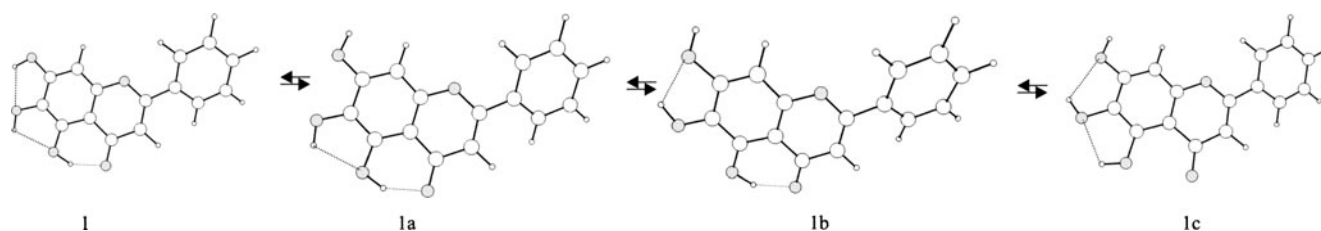
### Neutral form

According to the general rules indicated in the “Computational details” section, four different initial conformations (Fig. 1) were optimized in the gas phase. Analysis of the geometries of baicalein rotamers showed that all of them were nonplanar, implying that the dihedral angle between the bicycle AC and the ring B was nonzero. Rotamer 1 in Fig. 2 (see also Table 1) was found to be the most stable conformer of baicalein.

Since the high scavenging activity of the molecule was (due to the increased conjugation) correlated with the planarity (as measured by the torsion angle) of ring B compared with the rest of the molecule (AC bicycle), the conformational space of all the structures in Fig. 2 was analyzed as a function of the torsional angle  $\tau$ . By removing any constraint on the torsional angle, the conformational absolute minimum for structure 1 was found to occur at  $\tau=24.48^\circ$ . The maximum of the potential energy lies at  $\tau=90^\circ$ , and the interconversion barrier between the two minima is about  $3.88 \text{ kcal mol}^{-1}$  (Fig. 3). In order to verify the values obtained for the energy barrier, a single point energy calculation using a larger basis set, 6-311++G(3df,2pd), was performed. The value found in the gas phase was slightly higher:



**Fig. 1** Atomic numbering for baicalein, and its main dihedral angles ( $\omega_1$ – $\omega_3$  and  $\tau$ )



**Fig. 2** The most stable conformation of baicalein molecule is conformer 1. 1a, 1b, and 1c are less stable rotamers

4.17 kcal mol<sup>-1</sup> (Fig. 1). It is worth mentioning that in going from  $\tau=0^\circ$  to  $\pm 40^\circ$ , the potential energy curve is very flat, with an energy variation of about 0.34 kcal mol<sup>-1</sup>, which indicates that the planar conformation is easily obtained and requires a negligible amount of energy. Similar degrees of nonplanarity between the rings B and C (from 24.28° to 25.08°) were found for all of the other baicalein rotamers, which indicates that they cannot use their full delocalization potentials and are less active as scavengers. Nonplanarity can also be caused by the lack of a 3-OH group, which causes slight twisting of the ring [37].

In the most stable structure, labeled 1 in Fig. 2, there are three internal hydrogen bonds (IHB) that all produce a stabilizing effect, especially the bond between the 5-OH and the C4-O carbonyl group. Conformations that lack these bonds (the other rotamers: 1a, 1b and 1c in Fig. 2) are less stable with respect to the absolute minimum by 5.34, 7.02 and 15.61 kcal mol<sup>-1</sup>, respectively. On the basis of these values, it is clear that the hydrogen bond between 5-OH and C4-O has the strongest stabilizing effect, which agrees with the fact that this hydrogen bond is shorter than other two (see Table 1 of the “Electronic supplementary material”). The NBO analysis of baicalein revealed that lone pair–antibonding orbital interactions between the carbonyl oxygen and the adjacent OH bond are responsible for hydrogen bond formation. Since the O4(2p) and O4(1p) orbitals have abundant electrons while the O5–H( $\sigma^*$ ) orbital is electron deficient, it was found that charge transfer from O4(2p) to the O5–H( $\sigma^*$ ) orbital is a favorable donor–acceptor interaction. This is one of the most important influences on the strength of the hydrogen bond delocalization energy. Also, there is significantly weaker charge transfer from O4(1p) to O5–H( $\sigma^*$ ). Both charge transfers contribute to the strength of this IHB. Almost

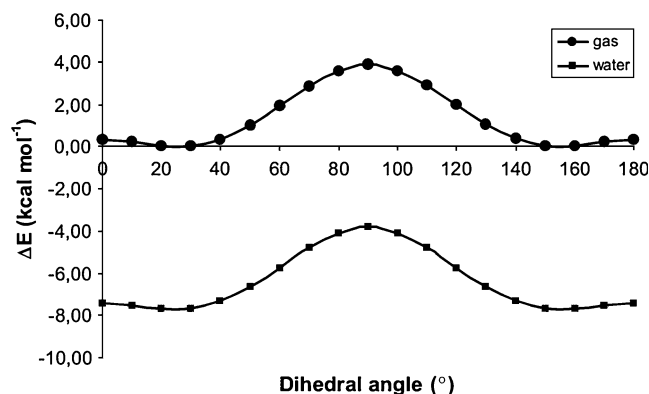
**Table 1** M05-2x/6-311+G(d,p) relative energies (kcal mol<sup>-1</sup>) for isolated and solvated baicalein rotamers

Rotamer	$\Delta E$	$\Delta H$	$\Delta E^{\text{CPCM}}$	$E^{\text{CPCM}} - E$	$\Delta G_{\text{solv}}$
1	0.0	0.0	0.0	8.22	-8.43
1a	5.29	5.34	1.98	14.81	-11.01
1b	6.91	7.02	2.25	13.08	-10.55
1c	15.26	15.61	8.81	11.65	-13.97

negligible charge transfer is observed for O6(1p) and O7–H( $\sigma^*$ ), and for O5(1p) and O6–H( $\sigma^*$ ). This finding is in accord with the IHB lengths (see Table 1 in the “Electronic supplementary material”).

The four stationary points found in the gas phase were also optimized by simulating aqueous solvation with the CPCM method. The lowest energy in CPCM was found for rotamer 1. The energies of the three rotamers 1, 1a, and 1b are very close and vary within an interval of about 2 kcal mol<sup>-1</sup> (Table 1). The relative energies are shrunk by CPCM with regard to the gas phase, which is the usual consequence of the interactions of every OH group with the solvent. Since structure 1 is the most stable conformation of baicalein, all further discussion will focus on this rotamer.

Optimization in water solution leaves the ring structures practically unaltered, as seen from the values reported in Table 1 of the “Electronic supplementary material.” The water does not favor internal rotation about the C2–C1' bond, because the energy barriers obtained in the gas and aqueous phases are nearly identical (3.88 kcal mol<sup>-1</sup>). The main reason for this is that there are no OH groups in the ring B, so there is no significant interaction of ring B with water as a solvent, as in the case of quercetin [38]. This means that there are no differences between the hydration energy values of minima with respect to the transition state. A single point energy calculation with a larger basis set 6-311++G(3df,2pd) gives a somewhat higher value for the energy barrier of 4.38 kcal mol<sup>-1</sup> in water (Fig. 1 of the Electronic supplementary material). The dihedral angle  $\tau$



**Fig. 3** Energy profile for rotation around the C2–C1' bond of baicalein in the gaseous and aqueous phases



assumes a value of  $23.6^\circ$  for the absolute minimum, suggesting a slight deviation from planarity, which is in agreement with the findings for similar compounds [37–39]. Three hydrogen bonds present at the gas-phase minimum, O5–H–O4 (1.725 Å), O6–H–O5 (2.238 Å) and O7–H–O6 (2.151 Å), are also retained in solution. The second of these bonds lengthens by 0.031 Å, while the other two are almost the same length as in the gas phase (see Table 1 in the “Electronic supplementary material”).

#### Homolytic and heterolytic O–H breaking

The energies of homolytic and heterolytic O–H bond cleavage may point to the predominant antioxidative mechanism of baicalein. Those O–H bond-breaking energies are given as BDE and PDE values in Tables 2 and 3.

Homolytic O–H bond breaking in baicalein can give rise to three different radical forms: O5R, O6R and O7R (named after the O–H bond that is broken). Each radical form can adopt several conformations (3, 4, and 3, respectively). In the case of O5R, these rotamers are named O5R1, O5R2 and O5R3, respectively. A similar notation is used for the other two radicals. All possible radical forms and their corresponding rotamers are shown in Fig. 4. The order of stability for the radical species obtained from the most stable rotamer of baicalein in the gas phase is O6R > O7R > O5R, implying that homolytic cleavage of the 6-OH bond is favored. The most stable radical, O6R1, is stabilized by two IHBs (O5–H–O4 and O7–H–O6). For the O7R and O5R radical forms, the most stable rotamers are O7R2 and O5R1, which are 7.3 and 13.6 kcal mol<sup>-1</sup> higher than the O6R1 form (Table 2). The sequence obtained is consistent with the literature data on structure–activity relationships of antioxidant flavonoids [40–42].

The order of stability for the radical forms computed in the aqueous phase is basically the same as that in the gas phase. Again, the O6R1 tautomer is the most stable. Moreover, all of the O6R rotamers are more stable than the other radical rotamers (Table 2). It should be pointed out that this radical retains a nonplanar structure in the gas phase and in water. The nonplanarity could imply decreased conjugation and consequently decreased antioxidant activity (TEAC value  $2.56 \pm 0.03$  mM) in comparison with quercetin (TEAC value  $4.42 \pm 0.08$  mM) [43]. The values of the corresponding dihedral angles are  $24.07^\circ$  and  $22.82^\circ$  in gas and water. Based on PES analysis, it is clear that water does not favor internal rotation about the C2–C1' bond, because the energy barriers obtained in the gas phase and in water are almost identical: 3.93 and 4.00 kcal mol<sup>-1</sup>, respectively Fig. 2 of the Electronic supplementary material.

Complete delocalization in the most stable O6R1 radical rotamer in both the gaseous and aqueous phases involves only ring A, while ring C is characterized by two double bonds that are strongly localized on the carbonyl group and the C2–C3 bond. In this form, partly localized double bonds are located on ring A, on the C–O group at C6, and between the C7 and C8 atoms. The bond lengths of these bonds are significantly different from those of the parent molecule, 1 (see Fig. 2 and Table 1 of the “Electronic supplementary material”). The same bond length of 1.470 Å for the C2–C1' bond in the O6R1 rotamer was found in both the gas and the water phases. The length of this bond lies between the bond lengths characteristic of aromatic and single C–C bonds, indicating weak electron delocalization between rings B and C. This assumption is supported by the NBO analysis. A slightly greater *p*-orbital contribution on C1' in the C2–C1' bond ( $sp^{1.79}$ – $sp^{2.28}$ ) could be the main reason for this bond being slightly longer than a double bond.

**Table 2** M05-2x/6-311+G(d,p) relative energies (kcal mol<sup>-1</sup>) for rotamers of baicalein radicals in the gaseous and aqueous phases

Rotamer	$\Delta E$	$\Delta H$	$\Delta E^{\text{CPCM}}$	$E^{\text{CPCM}} - E$	$\Delta G_{\text{solv}}$	BDE	BDE <sup>CPCM</sup>
O5R1	13.56	13.90	10.14	14.05	9.60	93.53	87.70
O5R3	23.78	24.31	14.22	20.19	13.54	103.94	91.82
O5R2	17.48	17.26	11.19	16.92	10.75	96.89	88.67
O6R1	0.00	0.00	0.00	10.62	0.00	79.63	77.23
O6R2	13.71	13.93	8.49	15.85	8.06	93.56	85.91
O6R3	6.20	6.35	5.36	11.47	4.91	85.98	82.79
O6R4	9.65	9.77	4.06	16.21	4.03	89.40	81.34
O7R1	11.22	11.35	10.80	11.04	10.66	90.98	88.17
O7R2	7.29	7.31	8.16	9.75	8.10	86.94	85.44
O7R3	17.59	17.91	16.19	12.02	15.64	97.54	93.72

$\Delta E$  denotes the difference in energy with respect to the most stable conformer, corrected with ZPVE (including the correction factor) [36]. The electronic energies for the most stable radicals are  $E(\text{O6R1}) = -953.28261552$  a.u. in the gas phase and  $E(\text{O6R1}) = -953.298919744$  a.u. in water.  $\Delta H$  is the difference in enthalpy with respect to the most stable conformer, with thermal correction for enthalpy accounted for.  $\Delta G_{\text{solv}}$  denotes the difference in free energy relative to the most stable conformer, with thermal correction to the Gibbs free energy (including the appropriate correction factor) accounted for [36]

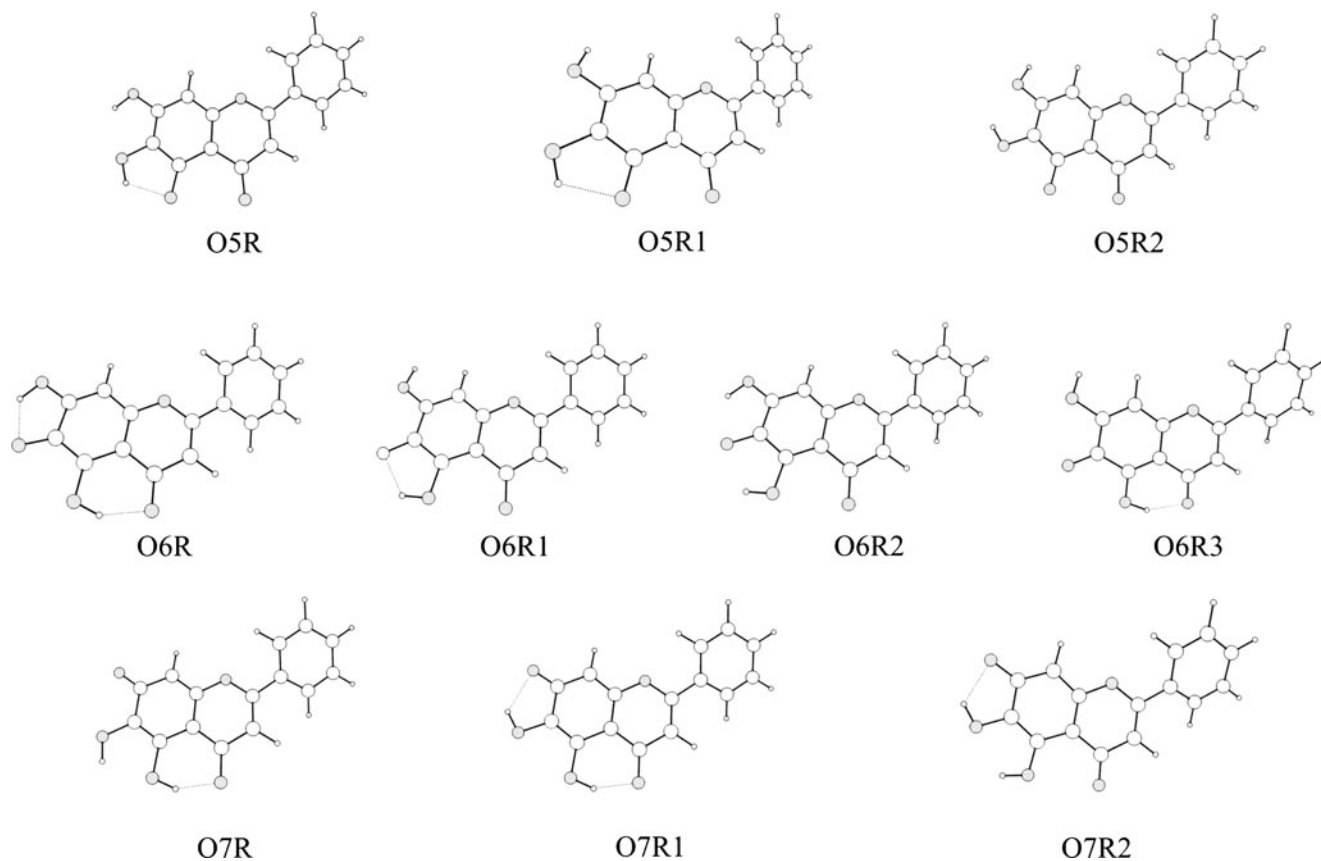
**Table 3** M05-2x/6-311+G(d,p) relative energies (kcal mol<sup>-1</sup>) for isolated and solvated baicalein anion rotamers

Rotamer	$\Delta E$	$\Delta H$	$\Delta E^{\text{CPCM}}$	$E^{\text{CPCM}} - E$	$\Delta G_{\text{solv}}$	PDE	$\text{PDE}^{\text{CPCM}}$
O5A1	11.93	12.19	8.36	57.25	-57.03	339.33	282.07
O5A3	17.95	18.39	10.51	61.12	-60.66	345.54	284.18
O5A2	27.48	28.03	14.98	66.18	-65.90	355.18	288.88
O6A1	8.06	8.05	5.01	56.73	-56.56	335.20	278.39
O6A2	21.66	21.96	13.37	61.97	-61.84	349.11	287.01
O6A3	9.41	9.48	8.15	54.94	-54.90	336.62	281.72
O6A4	24.33	24.57	12.50	65.51	-65.21	351.72	285.99
O7A1	5.58	5.74	3.44	55.81	-55.73	332.88	277.03
O7A2	0.00	0.00	0.00	53.68	-53.55	327.15	273.43
O7A3	8.21	8.42	7.05	54.83	-54.81	335.56	280.78

$\Delta E$  denotes the difference in energy with respect to the most stable conformer, corrected with ZPVE (including the correction factor) [36]. The electronic energy for structure 1 is  $E(1) = -953.921756$  a.u. in the gas phase and  $E(1) = -953.934016$  a.u. in the aqueous phase.  $\Delta H$  is the difference in enthalpy with respect to the most stable conformer, with thermal correction for enthalpy accounted for.  $\Delta G_{\text{solv}}$  denotes the difference in free energy relative to the most stable conformer, with thermal correction to the Gibbs free energy (including the appropriate correction factor) accounted for [36].

The importance of spin density in determining the potential for delocalization and consequently the stability of flavonoids has already been pointed out by Leopoldini et al. [38, 44] and Trouillas et al. [45]. The spin distribution obtained by NBO analysis of the most stable O6R1 rotamer indicates that the oxygen atom bonded to C6 is the most

probable radical center (spin density 0.37 in gas and 0.34 in water). Moreover, the rest of the spin density is delocalized over the C5, O5, C7, and C9 atoms of the A ring Fig. 3 of the Electronic supplementary material these have spin densities of 0.24/0.25, 0.10/0.10, 0.14/0.13, and 0.19/0.19, respectively (numbers in italics are the values in water). In

**Fig. 4** The structures of the baicalein radicals O5R, O6R, and O7R. Each radical is presented with all of its rotamers

gas and water, the most stable radical, O6R1, has the highest spin density on the radical oxygen, in contrast to the other two less stable rotamers Fig. 3 of the Electronic supplementary material. On the basis of the BDE values (Table 2), it is clear that the formation of O5 and O7 radicals is very unlikely in both the gaseous and the aqueous phases. For this reason, they are excluded from the discussion.

Heterolytic cleavage of the O–H bonds leads to the formation of three anions, O5A, O6A, and O7A, each of which is able to adopt several conformations. The ten anionic rotamers are denoted in the same way as the radical rotamers (Fig. 4), except that R (radical) is replaced by A (anion).

The stability sequence for the anion species differs slightly from that calculated for the species formed upon the homolytic breaking of an O–H bond. The order of stability for the anionic species in the gas phase is O7>O6>O5, implying that the heterolytic cleavage of the 7-OH bond is favored. The most stable anion, O7A2, is stabilized by two IHBs (O5–H–O4 and O6–H–O7). The other two relatively stable anions, O6A1 and O5A1, are 5.0 and 8.4 kcal mol<sup>-1</sup> higher than the O7A2 form (Table 3).

In spite of the fact that H-bonding interactions become less important in water, where ion–dipole interactions are predominant, the stability sequence for the anionic species obtained from structure 1 in water is the same as that seen in the gas phase. It is important to note that the values of electron energy are decreased by CPCM by about 55–66 kcal mol<sup>-1</sup> compared to the gas phase (Table 3)—the usual consequence of the interactions of the anion and all OH groups of baicalein with water.

Complete delocalization in the most stable anion form, O7A2, involves only ring B; ring C is characterized by two strongly localized double bonds on the carbonyl group and the C2–C3 bond. The O7A2 anion form has strong localized double bonds in ring A between C7 and O, C5 and C6, and C8 and C9. These bonds are significantly shorter than those in the parent molecule, 1 (Fig. 2 and Table 1 of the “Electronic supplementary material”). It is clear that there is weak electron delocalization over ring B as a result of the nonplanarity of the anion structure, which is also the case with the radical species formed. As can be seen from Scheme 1, the O7A2 anion form is additionally stabilized by the delocalization of the negative charge that spreads from the site of deprotonation to the 4-keto group in ring C. The natural charge (NC) distribution obtained by the NBO analysis indicates that the oxygen atom bonded to C7 is the most probable center of negative charge (NC density is –0.78 in the gas phase and –0.87 in water). The increased negative charge on the O1, C8, C10, and O atoms bonded to C4 (Fig. 2 of the “Electronic supplementary material”), compared to the neutral form, could be a consequence of the possible presence of a resonance effect in the structures of these anion forms (Scheme 1).

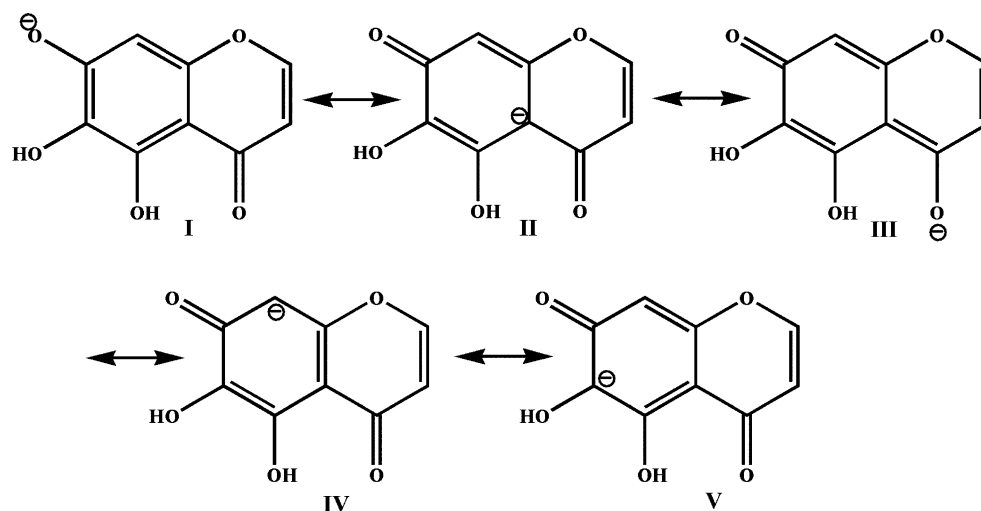
Because the 5-OH group in baicalein is less acidic, the generation of the O5A form leads to the disappearance of very strong H-bonding, and introduces an electronic repulsion between the negative charge of the deprotonated oxygen and the lone pairs on the carbonyl oxygen of ring C.

Ionization potential, bond dissociation enthalpy and proton dissociation enthalpy

The IP values for the most stable structures of baicalein in the gaseous and aqueous phases were calculated as the difference between the electronic energy of the corresponding ionized form of the molecule, B<sup>+</sup>, and that of the parent species, B, corrected with ZPVE (Table 4). The IP values of baicalein are somewhat higher (173.1 kcal mol<sup>-1</sup> in gas and 137.1 kcal mol<sup>-1</sup> in water) than those of widely used synthetic food additives such as butylated hydroxyanisole, propyl gallate and dihydroguaiaric acid (152.7, 167.8 and 160.6 kcal mol<sup>-1</sup>, respectively) [46], or the naturally occurring polyphenolic flavonoid epigallocatechin-3-gallate (147.7 kcal mol<sup>-1</sup>), which is considered one of the most active antioxidants obtained from green tea [47, 48]. Because of the stabilization of charged systems in polar solvents, the IP value obtained from CPCM calculations is significantly different from that calculated in the gas phase.

The BDE values (calculated for the gas phase, with TCE corrections, as the change in enthalpy for reaction 1 at 298 K) of each of the OH groups present in all rotamers of the radical forms of baicalein are similar to, or smaller than, those of hydroxybenzoic acid (61.3–89.6 kcal mol<sup>-1</sup>), cinnamic acid (83.7–105.6 kcal mol<sup>-1</sup>) [48, 49] or phenol (values varying from 82.7 to 87.6 kcal mol<sup>-1</sup>, depending upon the method employed) [50–52]. The lowest BDE value in both gas and water is obtained for the 6-OH group (Table 2). Except in the case of rotamer O7R2, the BDE values calculated in the gas phase are systematically larger, by a few kcal mol<sup>-1</sup>, than those computed with CPCM.

The BDE values (Table 2) for all baicalein radical forms give the following BDE sequence for the present OH groups: O5>O7>O6. This sequence clearly shows that H transfer from the C6–OH group is the easiest. This sequence is also consistent with the literature data concerning structure–activity relationships of antioxidant flavonoids [40, 41]. The order of BDE values calculated for the aqueous phase with CPCM is the same as that for the gas phase. As a consequence of the interactions of the radical forms and all OH groups with the solvent molecules, those BDE values are decreased by about 2 kcal mol<sup>-1</sup> compared to those for the gas phase. The somewhat changed order of stability of the radical rotamers under investigation can be related to the different influences of CPCM on the radical species involved in homolytic breaking.

**Scheme 1** Resonance structures of O7R anion species

The PDE values were calculated for all of the OH groups on the rotamers of baicalein anions in both phases as the enthalpy difference at 298 K for reaction 3. TCE corrections were included in the calculations for both phases. Calculated PDE values in the gas phase are systematically larger, by several tens of kcal mol<sup>-1</sup>, than those computed for water.

The calculated PDE values of all OH groups in all anion rotamers (Table 3) yield the sequence O5>O6>O7, indicating that H transfer from the C7–OH group is easier than that from the other two OH groups. Although they are several kcal mol<sup>-1</sup> smaller than those in the gas phase, PDE values calculated for the aqueous phase follow the same sequence as those calculated for the gas phase. This is a consequence of the interactions of every OH group and O anion with the solvent molecules.

#### Antioxidant mechanisms

According to Wright et al. [53], the main mechanism governing the antioxidant activity of a certain phenolic compound can be inferred from its  $\Delta IP$  and  $\Delta BDE$  values, which are calculated as the difference between the IP and BDE values of the phenolic compound (baicalein in this case) and phenol. For  $\Delta IP \geq -36$  kcal mol<sup>-1</sup> and for a  $\Delta BDE$  value of around  $-10$  kcal mol<sup>-1</sup>, HAT is considered the dominant mechanism, whereas the predominant mechanism is SET for  $\Delta IP \leq -45$  kcal mol<sup>-1</sup>.

The IP and O–H BDE values computed for phenol at the M052X/6-311+G(d,p) level were 141.21 and 85.59 kcal mol<sup>-1</sup>

(for the gas phase) and 146.11 and 84.71 kcal mol<sup>-1</sup> (for the aqueous phase with the CPCM model), respectively.

The results for the gas phase only simulate the behavior in nonpolar solvents, where uncharged forms are preferred. The  $\Delta IP$  value of about  $-32$  kcal mol<sup>-1</sup> and the  $\Delta BDE$  value of about  $-6$  kcal mol<sup>-1</sup> point to HAT as the most favored antioxidant mechanism for baicalein. The SPLET mechanism (Eq. 3), which has been quoted by several authors [20, 52–56], could not be discarded as a possible mechanism for baicalein in water due to the IP values and relatively low O–H PDE values (lower than those of several polyphenols) found for all three species [38, 57].

According to Wright's conditions [52], the HAT mechanism seems to be the only practical one, or at least the preferred one, in the gas phase. However, it should be kept in mind that the relative importance of the HAT, ET-PT and SPLET mechanisms is determined not only by micro-environmental features (lipid phase, aqueous phase) but also the characteristics of the scavenged radical species [54]. It is important to note that, besides structural properties, it is necessary to consider how the electron affinity and H-atom affinity of the radical species that potentially reacts with baicalein affect these three mechanisms. It is also very important to analyze how the electron densities of both compounds change along the reaction coordinates [39, 57].

Besides the possibility of direct free radical scavenging through the mechanism mentioned above, flavonoids can also chelate potentially toxic transition metal ions [Fe(II),

**Table 4**  $\Delta BDE$  and  $\Delta PDE$  values for all baicalein OH groups (with regard to phenol)<sup>a</sup>

	$\Delta BDE$ 5	$\Delta BDE$ 6	$\Delta BDE$ 7	$\Delta PDE$ 5	$\Delta PDE$ 6	$\Delta PDE$ 7	$\Delta IP$
B <sup>gas</sup>	7.94	-5.96	1.35	-6.27	-10.41	-18.46	-31.85
B <sup>CPCM</sup>	4.82	-5.65	2.57	-9.11	-12.79	-17.74	8.98

<sup>a</sup> All theoretical values are given in relation to the values for phenol (calculated with the same method)

Fe(III), Cu(II)], thus preventing metal-catalyzed free radical generating reactions [58–62]. In the metal-assisted decomposition of hydroperoxides, which are the inevitable products of aerobic metabolism, poorly liganded iron species can lead to the catalytic production of the hydroxyl radical  $[\text{Fe(II)} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe(III)} + \text{OH}^- + \text{OH}^*]$ , which is very short-lived and consequently highly reactive [63–65]. In this “metal chelation” mechanism, the loss of a proton by the polyphenol flavonoid molecule is crucial to its antioxidant activity, because the cation’s chelation often involves at least one deprotonated ligand [66]. Therefore, the acidity of these compounds is an important parameter to take into account, as lowering the acidity of the OH group makes deprotonation and metal chelation easier. Thus, the OH proton dissociation enthalpy (Table 3) was calculated. On the basis of the values obtained for PDA and  $\Delta$ PDA, it is clear that the 7OH group should be the most reactive with metal ions in an acidic medium.

## Conclusions

The results obtained using the M052X/6-311+G(d,p) level of theory imply that the baicalein rotamer 1 is the most stable. This form—which is significantly nonplanar in both gaseous and aqueous phases—is additionally stabilized by three IHBs, while the other rotamers are stabilized by two IHBs.

Position C6–OH is the most favored site for homolytic O–H breaking, while the C7–OH site is the most favored for heterolytic O–H breaking in the gaseous and aqueous phases. The spin density of the most stable radical C6 form indicates that the oxygen atom bonded to C6 is the most probable radical center in the gaseous and aqueous phases. The negative charge of the anionic form C7A1 is spread among five areas: the C7–O unit, from which the proton has been removed, and the C4–O, O1, C8, and C10 units. The electron distributions calculated with CPCM differ from those in the gas phase in their increased polarization, which gives rise to increased electron densities on the same units.

The results presented also indicate that the C5–OH site does not figure in the antioxidant mechanism due to its high BDE and PDE values. The main reason for this assumption is that the hydrogen atom of the C5–OH group forms a strong hydrogen bond with the O4 atom in the parent molecule.

It was found that IPs depend significantly on the solvent, because of the stabilization of charged species by polar solvents. Thus, the IPs of baicalein obtained using CPCM calculations were significantly lower (173.1 and 137.1 kcal mol<sup>-1</sup>).

The gaseous and CPCM-computed values for IPs, BDEs and PDEs, which are compatible with a relatively high antioxidant activity, indicate that one-step HAT is the

mechanism that best explains the radical-scavenging activity of baicalein in the gaseous phase, rather than ET-PT or SPLET. On the other hand, the significantly lower IP and PDE values calculated for aqueous solutions suggest that the SPLET mechanism is the most probable under these conditions.

**Acknowledgments** The authors acknowledge financial support from the Ministry of Science of the Republic of Serbia (grant no. 172015).

## References

1. Harborne JB (1976) Chemistry and biochemistry of plant pigments. Academic, London
2. Harborne JB, Grayer R (1988) The flavonoids—advances in research since 1980. Chapman and Hall, London
3. Bravo L (1998) Nutr Rev 56:317–333
4. Santos-Buelga C, Escribano-Bailon TM, Lattanzio V (2010) In: Santos-Buelga C, Escribano-Bailon MT, Lattanzio V (eds) Recent advances in polyphenol research. Wiley–Blackwell, Oxford
5. Haslam E (1996) J Nat Prod 59:205–215
6. Yang CS, Lee M, Chen L, Yang G (1997) Environ Health Perspect 105:971–976
7. Rice-Evans C, Miller N (1996) Biochem Soc Trans 24:790–795
8. Cao G, Sofic E, Prior R (1997) Free Radical Biol Med 22:749–760
9. Wang H, Cao G, Prior RL (1997) J Agric Food Chem 45:304–310
10. Pool-Zobel BL, Bub A, Schroder N, Rechkemmer G (1999) Eur J Nutr 38:227–234
11. Tsuda T, Shiga K, Kawakishi S, Osawa T (1996) Biochem Pharmacol 52:1033–1039
12. Rice-Evans C, Miller N (1996) Biochem Soc Trans 24:790–795
13. Harborne JB, Williams CA (2000) Phytochemistry 55:481–504
14. Shen L, Ji HF, Zhang HY (2007) Biochem Biophys Res Commun 362:543–550
15. Bravo L, Abia R, Eastwood MA, Saura-Calixto F (1994) Br J Nutr 71:933–946
16. Sakakibara H, Ashida H, Kanazawa K (2002) Free Radical Res 36:307–316
17. Grzymislawski M (2000) Human nutrition. Principles of nutritional science. PWN, Warsaw
18. Heredia FJ, Franchia-Aricha EM, Rivas-Gonzalo JC, Vicario IM, Santos-Buelga C (1998) Food Chem 63:491–498
19. Brouillard R (1982) Anthocyanins as food colors. Academic, New York
20. Shahidi F, Janitha PK, Wanasundra PD (1992) Crit Rev Food Sci Nutr 32:67–103
21. Mayer JM, Rhile IJ (2004) Biochem Biophys Acta 1655:51–58
22. Wolniak M, Oszmianski J, Wawer I (2008) Magn Reson Chem 46:215–225
23. Lapidot T, Harel S, Akiri B, Granit R, Kanner J (1999) J Agric Food Chem 47:67–70
24. Li BQ, Fu T, Dongyan Y, Mikovits JA, Ruscetti FW, Wang JM (2000) Biochem Biophys Res Commun 276:534–540
25. Kitamura K, Honda M, Yoshizaki H, Yamamoto S, Nakane H, Fukushima M, Ono K, Tokunaga T (1998) Antiviral Res 37:131–138
26. Zhao Y, Truhlar DG (2008) Theor Chem Acc 120:215–241
27. Zhao Y, Schultz NE, Truhlar DG (2005) J Chem Phys 123:61103(1–5)
28. Frisch MJ, Trucks GW, Schlegel HB, Scuseria GE, Robb MA, Cheeseman JR, Zakrzewski VG, Montgomery JAJr, Stratmann RE, Burant JC, Dapprich S, Millam JM, Daniels AD, Kudin KN, Strain MC, Farkas O, Tomasi J, Barone V, Cossi M, Cammi R, Mennucci B, Pomelli C, Adamo C, Clifford S, Ochterski J, Petersson GA, Ayala PY, Cui Q, Morokuma K, Malick AD, Rabuck KD, Raghavachari K, Foresman JB, Cioslowski J, Ortiz

- JV, Baboul AG, Stefanov BB, Liu G, Liashenko A, Piskorz P, Komaromi I, Gomperts R, Martin RL, Fox DJ, Keith T, Al-Laham MA, Peng CY, Nanayakkara A, Challacombe M, Gill PMW, Johnson B, Chen W, Wong MW, Andres JL, Gonzalez C, Head-Gordon M, Replogle ES, Pople JA (2009) Gaussian 09, revision A.1-SMP. Gaussian Inc., Wallingford
29. Zhao Y, Schultz NE, Truhlar DG (2006) *J Chem Theory Comput* 2:364–382
30. Zhao Y, Truhlar DG (2006) *J Chem Phys* 125:194101(1–18)
31. Cammi R, Mennucci B, Tomasi J (2000) *J Phys Chem A* 104:5631–5637
32. Cammi R, Mennucci B, Tomasi J (1999) *J Phys Chem A* 103:9100–9108
33. Cossi M, Rega N, Scalmani G, Barone V (2001) *J Chem Phys* 114:5691–5701
34. Cossi M, Scalmani G, Rega N, Barone V (2002) *J Chem Phys* 117:43–54
35. Cossi M, Rega N, Scalmani G, Barone V (2003) *J Comput Chem* 24:669–681
36. Merrick JP, Moran D, Radom L (2007) *J Phys Chem* 111:11683–11700
37. Cody V, Luft JR (1994) *J Mol Struct* 317:89–97
38. Leopoldini M, Marino T, Russo N, Toscano M (2004) *Theor Chem Acc* 111:210–216
39. Marković Z, Dimitrić-Marković J, Doličanin Ć (2009) *J Serb Soc Comp Mech* 3:43–55
40. Marković Z, Dimitrić-Marković J, Doličanin Ć (2010) *Theor Chem Acc* 127:69–80
41. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G (1996) *Free Radical Biol Med* 20:933–956
42. Rice-Evans CA, Miller NJ, Bolwell PG, Bramley PM, Pridham JB (1995) *Free Radical Res* 22:375–383
43. Yi-Zhong C, Sun M, Xing J, Luo Q, Corke H (2006) *Life Sci* 78:2872–2888
44. Leopoldini M, Pitarch IP, Russo N, Toscano M (2004) *J Phys Chem A* 108:92–96
45. Trouillas P, Marsal P, Siri D, Lazzaroni R, Duroux JL (2006) *Food Chem* 97:679–688
46. Zhang HY, Sun YM, Wang XL (2003) *Chem Eur J* 9:502–508
47. Lien EJ, Ren S, Bui HH, Wang R (1999) *Free Radical Biol Med* 26:285–294
48. Leopoldini M, Marino T, Russo N, Toscano M (2004) *J Phys Chem A* 108:4916–4922
49. Mandado M, Grana AM, Mosquera RA (2004) *Chem Phys Lett* 400:169–174
50. Gonzalez-Moa MJ, Mandado M, Mosquera RA (2006) *Chem Phys Lett* 424:17–22
51. Wayner DD, Lusztyk E, Ingold KU, Mulder P (1996) *J Org Chem* 61:6430–6433
52. de Heer MI, Korth HG, Mulder P (1999) *J Org Chem* 64:6969–6975
53. Wright J, Johnson ER, DiLabio GA (2001) *J Am Chem Soc* 123:1173–1183
54. Nakanishi I, Kawashima T, Ohkubo K, Kanazawa H, Inami K, Mochizuki M, Fukuzumi S, Ikota N (2005) *Org Biomol Chem* 3:626–629
55. Musialik M, Litwinienko G (2005) *New J Chem* 30:503–504
56. Zhang HY, Ji HF (2006) *New J Chem* 30:503–504
57. Leopoldini M, Russo N, Toscano M (2006) *J Agric Food Chem* 54:3078–3085
58. Singh N, O'Malley PJ, Popelier PL (2005) *Phys Chem Chem Phys* 7:614–619
59. Mayer JM (2004) *Annu Rev Phys Chem* 55:363–390
60. DiLabio GA, Johnson ER (2007) *J Am Chem Soc* 129:6199–6203
61. DiLabio GA, Ingold KU (2005) *J Am Chem Soc* 127:6693–6699
62. Sjodin M, Styring S, Åkermark B, Sun L, Hammarstrom L (2000) *J Am Chem Soc* 122:3932–3936
63. Jovanovic SV, Steenken S, Simic MG, Hara Y (1998) In: Rice-Evans C, Packer L (eds) *Flavonoids in health and disease*. Marcel Dekker, New York
64. Brown JE, Khodr H, Hider RC, Rice-Evans C (1998) *Biochem J* 330:1173–1178
65. van Acker SABE, van den Berg DJ, Tromp MNJL, Griffaen DH, van Bennekom W, van Vijgh WJF, Bast A (1996) *Free Radical Biol Med* 20:331–338
66. Fernandez MT, Mira ML, Florencio MH, Jennings KR (2002) *J Inorg Biochem* 92:105–111



# Structure and Reactivity of Baicalein Radical Cation

ZORAN S. MARKOVIĆ,<sup>1</sup> SVETLANA MARKOVIĆ,<sup>2</sup>  
JASMINA M. DIMITRIĆ MARKOVIĆ,<sup>3</sup> DEJAN MILENKOVIĆ<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Department of Bio-chemical and Medical Sciences, State University of Novi Pazar, Vuka Karadžića bb, 36300 Novi Pazar, Republic of Serbia

<sup>2</sup>Department of Chemistry, University of Kragujevac, Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Republic of Serbia

<sup>3</sup>Faculty of Physical Chemistry, University of Belgrade, Studentski trg 12-16, 11000 Belgrade, Republic of Serbia

<sup>4</sup>Bioengineering Research and Development Center, Prooslava Stojanovića 6, 34000 Kragujevac, Republic of Serbia

Received 28 February 2011; accepted 13 May 2011

Published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

DOI 10.1002/qua.23175

**ABSTRACT:** Neutral baicalein, corresponding radical cation, and three possible radicals obtained by proton removal from the radical cation were investigated using density functional theory. The structure and UV spectrum of baicalein were very well reproduced by the B3LYP/6-311+G(2df,p) level of theory. The results showed that the loss of an electron from baicalein molecule induced the transfer of H4 to O5. The reasons for this rearrangement were pointed out. It was found that delocalization of spin density is most pronounced in the thermodynamically most stable C6–OH radical. It was supposed that this radical plays a significant role in the antioxidant activity of baicalein within the single-electron transfer-proton transfer mechanism. ©2011 Wiley Periodicals, Inc. *Int J Quantum Chem* 000: 000–000, 2011

**Key words:** baicalein; radical cation; SET-PT mechanism; DFT

Correspondence to: J. M. Dimitrić Marković; e-mail: arkovich@ffh.bg.ac.rs (or) Z. S. Marković; e-mail: zmarkovic@np.ac.rs

Contract grant sponsor: Ministry of Science of the Republic of Serbia.

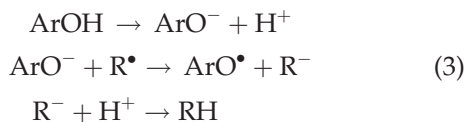
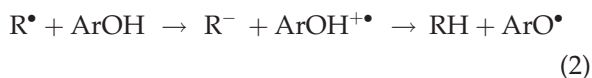
Contract grant numbers: 172015 and 172016.

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

## Introduction

The chemical behavior of flavonoids as antioxidants has become the subject of very intense research, both experimental and theoretical, because the structure–property relations have not been completely elucidated. Flavonoid family is the vast and very important group of low-molecular weight plant phenolics, which together with chlorophyll and carotenoids represent the main pigments in the plant world [1]. Many studies suggested that flavonoids, as an everyday part of human diet, exhibit biological activities including antiallergic, antiviral, anti-inflammatory, and vasodilatory actions [2–6]. However, most interest has been devoted to their antioxidant activity, which arises from their ability to: trap reactive oxygen species (e.g., hydroxyl, alkoxy, and peroxy radicals), chelate transition metal ions able to promote radical formation (so-called Fenton reaction), inhibit enzymes involved in radical production, remove oxidatively changed and damaged biomolecules, or regenerate membrane-bounded antioxidants such as a vitamin E [7–10].

The charge (electron and proton) transfers are fundamental processes in chemistry and biology. The unique electron-rich and highly conjugated chemical structure enable flavonoids (ArOH), especially flavones and flavonols, to act as very good hydrogen and electron donors, which are very important determinants in antioxidant activity. The distinct pathways by which antioxidant molecules transfer their charge distinguish several mechanisms of their antioxidant action. The most common reaction mechanisms are so-called hydrogen atom transfer [HAT, Eq. (1)], single-electron transfer-proton transfer [SET-PT, Eq. (2)], and proton-coupled electron transfer [PCET, Eq. (3)] mechanisms [11–14].



The first one, leading to the direct O–H bond breaking, proceeds by rapid donation of the proton and electron of ArOH (together as a hydrogen

atom) to  $R^{\bullet}$ , forming a new, more stable radical. In HAT mechanism, both the electron and proton are transferred from the same chemical bond. By the second one, which leads to indirect H-abstraction, the primary antioxidant transforms into radical cation by donating an electron to the free radical present in the system. The third mechanism, characteristic of many important biochemical processes [15–21], takes place once the anion ( $\text{ArO}^{-}$ ) is formed, and when a proton and electron are transferred between different sets of molecular orbitals. All the three mechanisms, which could occur in parallel by different rates, have the same net result, inactivation of the radical species by rapid H-atom and electron transfers. The reactions implicated that antioxidant mechanisms are governed by different molecular properties. In HAT mechanism that is the bond dissociation enthalpy (BDE) of both ArOH and RH species and in SET-PT mechanism the main controlling parameter is the ionization potential (IP) of ArOH (the lower the IP value of ArOH, the more efficient the electron abstraction and the reaction with free radicals). For the estimation of phenol PCET reactivity, the O–H heterolytic BDE (proton dissociation enthalpy), together with the IP of  $\text{ArO}^{-}$  specie as another controlling parameter, is of particular importance.

As a part of ongoing investigations of flavonoids' molecular structures [22–24], this article addresses theoretical research in baicalein's (5,6,7-trihydroxy-2-phenyl-4*H*-chromen-4-one) radical cation formation and structure. As a step in operating antioxidant mechanism (SET-PT), formation of radical cation is very important to be considered in detail, because its geometrical and electronic features are of importance in this type of flavonoids' radical inhibition pathway. Biological interest in baicalein arises from its ability to act as inhibitor in iron-induced lipid peroxidation, anti-cancer agent, and agent applied in the treatment of copious and disease-related symptoms such as insomnia, fever, and perspiration [25–27].

## Computational Methods

The equilibrium structures of baicalein and its radical cation were optimized in their singlet and doublet states, respectively, using the restricted and unrestricted schemes for close-shell and open-shell calculations. Two density functional theory (DFT) methods were applied: Becke, three-parameter,



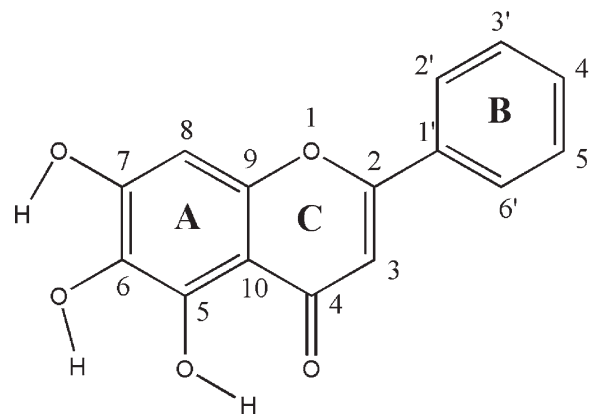
Lee-Yang-Parr (B3LYP) [28, 29] and Perdew, Burke and Ernzerhof (PBE) [30, 31]. The standard split-valence double-zeta Gaussian basis set 6-311G of Pople and coworkers was used [32, 33]. To obtain a better description of the delocalization effects, which are crucial for the geometry and electronic structure of baicalein and its radical cation, diffuse functions were added to the heavy atoms. The 2df,p polarization functions were also added. Full geometry optimizations were undertaken without any symmetry constraints using the Gaussian 09 package [34].

The ground electronic state of the radical cation was  ${}^2B_1$ , and therefore, a spin contamination of the unrestricted wave function might occur in an unrestricted calculation. The expectation value of the total spin,  $S^2$ , was examined. In UB3LYP and UPBE calculations, the values for final  $S^2$  were 0.7638 and 0.7546. These values were in very good agreement with the expectation value of 0.7500 for the doublet ground state. This confirmed the validity of the results of both functionals for the radical cation.

A vibrational frequency calculation at each optimized geometry was performed to confirm that the structure obtained was a stationary point (characterized by no negative frequencies) on the potential energy surface. A natural bond orbital (NBO) [35–38] analysis of baicalein and corresponding radical cation was performed using the B3LYP and PBE density matrices.

The UV spectrum of baicalein was simulated using the time-dependent DFT procedure [39–43], implying that transitions to the lower lying singly excited electronic states of baicalein were computed. The simulation was performed by using both functionals and 6-311+G(2df,p) basis set. All transitions were considered. The output contained information for the excited state energies, oscillator strengths ( $f$ ), and a list of the transitions that gave rise to each excited state. The orbitals involved in transitions, as well as the orbital contribution coefficients, were obtained. GaussSum [44] and ChemCraft 1.6 [45] were used to generate both simulated spectra and orbital information.

The NBO analysis was performed for the closed-shell ground state of baicalein. The NBO procedure for the radical cation was performed separately for the  $\alpha$  and  $\beta$  spin density matrices. In this method, delocalization of electron density between occupied Lewis-type (bonding or lone pair) orbitals and formally unoccupied (antibonding or Rydberg) non-Lewis NBOs corresponded to a stabilizing donor–acceptor interaction. The



**FIGURE 1.** Structure of baicalein. Atoms are labeled in a common way.

strength of this interaction could be estimated by the second-order perturbation theory [37].

## Results and Discussion

### STRUCTURE AND UV SPECTRUM OF BAICALEIN

The structure of baicalein (Fig. 1) is optimized using B3LYP and PBE functionals and compared with the experimental results obtained from the high-resolution X-ray diffraction study [46]. The calculated and experimental bond lengths are listed in Table I. The optimized and experimental bond angles for baicalein are given in Table SI of Supporting Information. In addition, the UV spectrum of baicalein is simulated using both methods and compared with the experimentally obtained UV spectrum (Fig. 2).

The theoretical [23] and experimental [46] data indicate that neutral baicalein in its ground state is nonplanar. It was determined, by the X-ray study, that the dihedral angle between the B and C rings amounts to  $9^\circ$ . The deviation of the ring B from planarity is probably caused by the repulsion of the H3 and H6' hydrogen atoms. The calculations, at both levels of theory (Supporting Information Table SI), show that the ring B is bent in comparison with the chromone plane and makes a dihedral angle  $\tau$  of  $20.2^\circ$  (B3LYP) and  $18.5^\circ$  (PBE), implying that both the functionals overestimate the value for the dihedral angle. If the known differences between the vacuum and condensed phase environments are taken into account, this discrepancy can be ascribed to the

**TABLE I**  
**Atom distances in neutral baicalein and its radical cation, optimized with PBE and B3LYP methods (6-311+G(2df,p) basis set).**

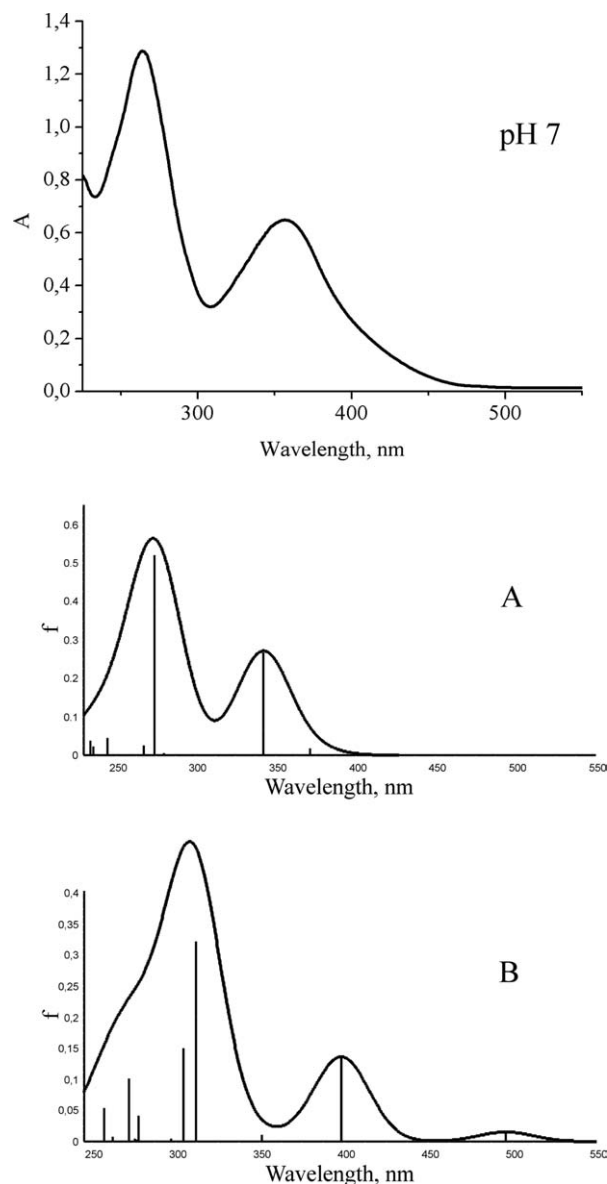
Bond lengths (Å)	EXP	PBE	B3LYP	UPBE	UB3LYP
D(O1—C2)	1.353	1.361	1.354	1.368	1.357
D(C2—C3)	1.360	1.368	1.356	1.384	1.375
D(C3—C4)	1.432	1.441	1.442	1.406	1.400
D(C4—C10)	1.439	1.445	1.448	1.419	1.414
D(C5—C10)	1.414	1.415	1.409	1.442	1.444
D(C5—C6)	1.384	1.392	1.383	1.454	1.449
D(C6—C7)	1.404	1.407	1.399	1.422	1.417
D(C7—C8)	1.392	1.399	1.391	1.392	1.381
D(C8—C9)	1.387	1.390	1.384	1.412	1.409
D(C9—O1)	1.369	1.377	1.369	1.354	1.345
D(C9—C10)	1.400	1.407	1.399	1.397	1.388
D(C2—C1')	1.469	1.472	1.472	1.454	1.452
D(C1'—C2')	1.399	1.407	1.400	1.413	1.406
D(C2'—C3')	1.392	1.394	1.388	1.390	1.384
D(C3'—C4')	1.393	1.397	1.390	1.398	1.392
D(C4'—C5')	1.393	1.398	1.391	1.399	1.393
D(C5'—C6')	1.386	1.392	1.386	1.389	1.383
D(C6'—C1')	1.402	1.407	1.400	1.413	1.406
D(O4—C4)	1.260	1.266	1.248	1.317	1.309
D(O5—C5)	1.348	1.347	1.345	1.263	1.248
D(O6—C6)	1.362	1.373	1.369	1.326	1.319
D(O7—C7)	1.350	1.359	1.352	1.340	1.333
D(H4—O4)				1.007	0.989
D(H5—O5)	0.970	1.032	0.999		
D(H6—O6)	0.970	0.977	0.967	0.991	0.978
D(H7—O7)	0.970	0.977	0.967	0.978	0.969
DH(H5...O4)	1.740	1.584	1.688	1.750	1.814
DH(H6...O5)	1.710	2.264	2.261	2.162	2.207
DH(H7...O6)	1.950	2.165	2.261	2.297	2.286

Experimental values are also included.

packing in the crystal. Table I shows that both methods excellently reproduce the bond lengths of baicalein. The mean absolute errors for bond lengths amount 0.0036 Å (B3LYP) and 0.0058 Å (PBE).

On the other hand, the two methods exhibit different performance in reproducing the UV spectrum of baicalein. Generally, the match between the observed and predicted wavelengths and intensities of the bands is not that good as in the case of the experimental and calculated structural parameters. The maximum of the band, whose experimental value is 359 nm, is predicted at 342.1 and 398.6 nm by B3LYP and PBE methods, respectively. In both cases, this is essentially the HOMO - 1 → LUMO transition (94% for B3LYP and 93% for PBE). The maximum of the band, whose experimental value is 264 nm, is pre-

dicted (using B3LYP method) at 274.4 nm. This peak is attributed to the HOMO - 2 → LUMO transition (56%), followed with HOMO → LUMO + 1 transition (26%). For this absorption, two maxima at 312.9 and 304.4 nm are predicted with PBE method. The first one is mostly ascribed to the HOMO - 3 → LUMO (44%) and HOMO - 1 → LUMO + 1 (33%) transitions, whereas the second one mainly represents HOMO - 4 → LUMO (32%), HOMO - 3 → LUMO (29%), and HOMO - 1 → LUMO + 2 (37%) transitions. Apparently, PBE method fails in predicting wavelengths and intensities in the UV spectrum of baicalein. On the other hand, the agreement between the observed wavelengths and intensities, and those predicted with B3LYP functional, is satisfactory. For this reason, all further discussion will be based on the results obtained with



**FIGURE 2.** Experimental (top) and calculated UV spectrum of baicalein.

B3LYP method. The shapes of the corresponding orbitals for transitions calculated by B3LYP functional are presented in Figure 3. Experimental and calculated electronic transitions for baicalein are given in Supporting Information Table SII.

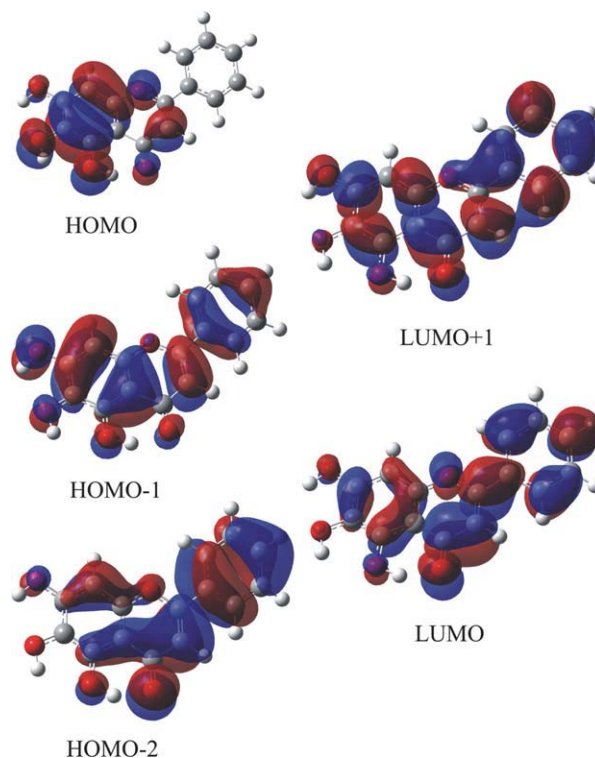
The results for the NBO analysis of baicalein indicate that the electronic interactions in the molecule are dominated by strong conjugation in the rings A and B, allowing each  $\pi$  NBO to delocalize into the adjacent  $\pi^*$  antibonding NBOs. Low occupancy (around 1.8 e) in the lone pairs (pure p orbitals) on all oxygens is observed. This finding

is in agreement with strong donation of density from these lone pairs to the adjacent  $\pi^*$  antibonding C—C bonds. The lone pair on O<sub>4</sub> also delocalizes into the  $\sigma^*$  antibonding O<sub>5</sub>—H<sub>5</sub> bond, indicating a strong hydrogen bonding between O<sub>4</sub> and H<sub>5</sub>.

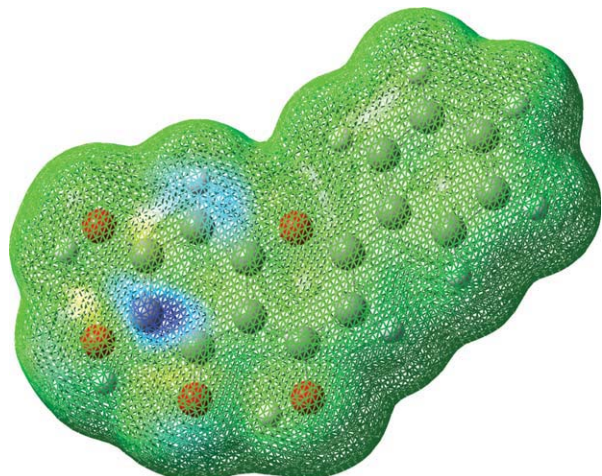
### RADICAL CATION OF BAICALEIN

The IP value of 164.91 kcal/mol for baicalein, calculated in this work, is in good agreement with that calculated using the B3LYP/6-311G(d,p) method [23] (166.31 kcal/mol). In addition, this value is in accord with the theoretical IP values for fisetin [22], quercetin [47], kaempferol [48], and epicatechin [48] (166.55, 166.08, 167.99, and 170.85 kcal/mol, respectively).

Our calculations show that the radical cation of baicalein is almost planar in its ground state (Supporting Information Table SI). The most striking structural difference between baicalein and radical cation appears in the ring A. Namely, the hydrogen is transferred from O<sub>5</sub> to O<sub>4</sub>. As a consequence, the bond C<sub>5</sub>—O<sub>5</sub> is significantly shorter,



**FIGURE 3.** The occupied and virtual orbitals responsible for the UV spectrum of baicalein. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com).]

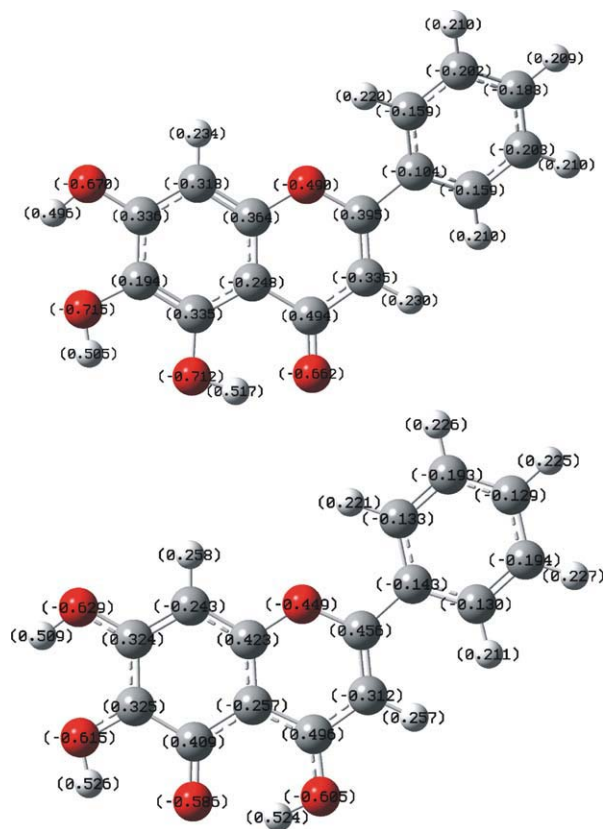


**FIGURE 4.** Spin density map of the radical cation of baicalein. The blue regions indicate the highest spin density values. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com).]

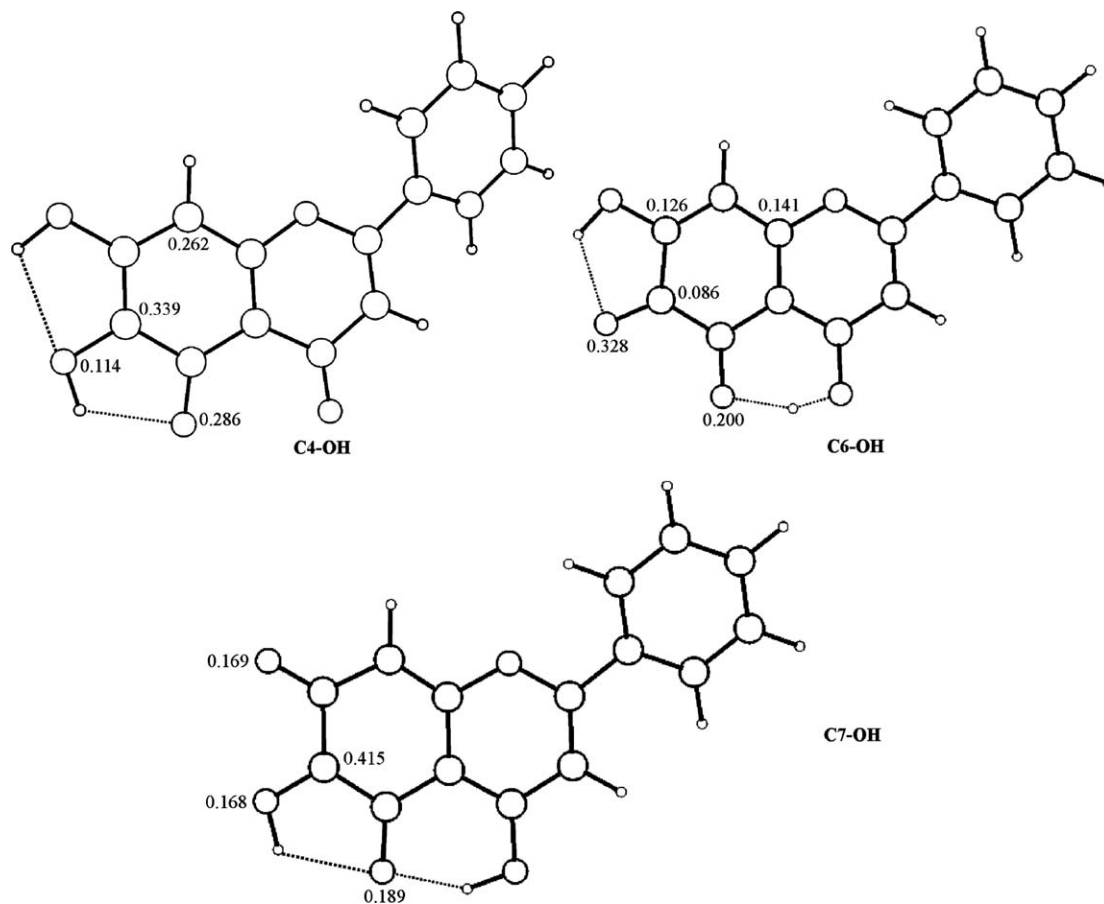
whereas C4—O4 is significantly stretched (Table I). The optimization of the radical cation, which starts from the structure where the hydrogen is bonded to O5, points to its spontaneous rearrangement to O4. The explanation for this very intriguing result is based on the NBO analysis of baicalein. The lone pair on O4 in baicalein is the highest lying occupied molecular orbital, whose energy is  $-0.30469$  au. It is reasonable to expect that an electron from this orbital will leave baicalein, yielding the radical cation. The radical formed on O4 cannot delocalize over the adjacent C ring, as it is not aromatic with the fixed C2—C3 double bond, and single O1—C2 and O1—C9 bonds. Instead, O4 abstracts the proximate hydrogen atom from O5. The radical cation formed in this way can delocalize its unpaired electron over the aromatic ring A, thus, reducing the instability induced by the loss of an electron. This assumption is confirmed with the spin density map of the radical cation, which clearly reveals that the unpaired electron is delocalized over the O5, C6, O6, and C8 atoms (Fig. 4). The spin density map is in agreement with spin densities obtained from the NBO analysis of the radical cation. Namely, the spin density values on the O5, C6, O6, and C8 atoms amount 0.275, 0.331, 0.139, and 0.183, respectively.

The comparison of the charge distribution between baicalein and its radical cation is presented in Figure 5. As expected, the oxygens of baicalein are particularly negatively charged, whereas hydrogens bonded to these oxygens are

positively charged. The carbon atoms are partially negatively charged, except for those bonded to oxygens, due to negative inductive effect of these oxygens. The positive charge of the radical cation is not localized but distributed among all atoms. As the unpaired electron is delocalized over O5, C6, O6, and C8, these atoms show particular reduction of partial negative charge or increase of partial positive charge. This particularly refers to C6, where the difference between its partial positive charge in the radical cation and neutral baicalein amounts 0.131 e. This significant change in charge on C6 can be attributed to additional effect, that is, negative inductive effect of O6, for which  $\pi(C5-O5)$ ,  $\pi(C7-C8)$ , and p orbital on O6 compensate for electron deficiency on C6 with their positive resonance effects. Namely, the NBO analysis of  $\beta$  density shows that these orbitals delocalize into the formally empty p orbital on C6. As a consequence, the occupancy in this orbital amounts 0.313 e. Similar situation is found



**FIGURE 5.** NBO charges of baicalein (top) and its radical cation (bottom). [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com).]



**FIGURE 6.** Optimized geometries and significant spin density values of baicaleine radicals.

in the case of C5 and O5, where the partial positive charge on C5 is significantly increased in comparison with the parent molecule, due to the negative inductive effect of electron deficient O5. Otherwise, as in the case of baicalein, each  $\pi$  NBO delocalizes into the adjacent  $\pi^*$  antibonding NBOs of the A and B rings.

#### **RADICALS ISSUED FROM THE RADICAL CATION OF BAICALEIN**

The next step in the SET-PT mechanism is proton abstraction from the radical cation of baicalein. Figures 4 and 5 show that proton removal is possible from the positions O4, O6, and O7. Thus, geometry optimization of the radicals was performed by starting from the structures obtained by abstraction of H4, H6, or H7 protons from the radical cation of baicalein. A radical formed by proton removal from the C4—OH group of baicalein radical cation is called the C4—OH radical, and the same notation is used for the other two

radicals (Fig. 6). Bond lengths for the optimized structures of the radicals are given in Table II, whereas bond angles are presented in Supporting Information Table SIII.

The C6—OH is the most stable radical, whereas the energies of C7—OH and C4—OH are higher than that for C6—OH by 8.05 and 10.95 kcal/mol, respectively. Like baicalein, all radicals are non-planar, with the torsional angle between rings B and C of  $17.7^\circ$  (C6—OH),  $16.4^\circ$  (C7—OH), and  $20.4^\circ$  (C5—OH; Supporting Information Table SIII). In all radicals, hydrogen atoms of OH groups are oriented in such a way that they form maximal number of hydrogen bonds (two hydrogen bonds in each radical). In all radicals, the complete delocalization involves only ring B, whereas rings A and C are characterized by localized double and single bonds. This implies that the electronic flow between rings A and C is prevented.

In the C6—OH, radical rings C and A are characterized by strongly localized double C2—C3 bond, and carbonyl groups at C5 and C6. Hydrogen

**TABLE II**  
**Bond distances in radicals issued from radical cation of baicalein, optimized at the B3LYP/6-311+G(2df,p) level of theory.**

Bond lengths (Å)	C4—OH	C6—OH	C7—OH
D(O1—C2)	1.367	1.351	1.352
D(C2—C3)	1.346	1.362	1.360
D(C3—C4)	1.462	1.417	1.419
D(C4—C10)	1.474	1.404	1.387
D(C5—C10)	1.453	1.448	1.432
D(C5—C6)	1.463	1.465	1.441
D(C6—C7)	1.397	1.462	1.477
D(C7—C8)	1.375	1.382	1.448
D(C8—C9)	1.421	1.389	1.358
D(C9—O1)	1.356	1.362	1.376
D(C9—C10)	1.382	1.405	1.431
D(C2—C1')	1.471	1.467	1.467
D(C1'—C2')	1.399	1.401	1.401
D(C2'—C3')	1.388	1.387	1.387
D(C3'—C4')	1.390	1.390	1.390
D(C4'—C5')	1.391	1.391	1.392
D(C5'—C6')	1.386	1.386	1.385
D(C6'—C1')	1.400	1.401	1.401
D(O4—C4)	1.221	1.304	1.320
D(O5—C5)	1.241	1.261	1.266
D(O6—C6)	1.330	1.248	1.316
D(O7—C7)	1.354	1.329	1.231
D(H4—O4)		1.044	1.000
D(H6—O6)	0.986		0.980
D(H7—O7)	0.966	0.984	
DH(H4...O5)		1.497	1.696
DH(H5...O4)			
DH(H6...O5)	1.977		2.083
DH(H7...O6)	2.295	1.964	

bonds in this radical are very strong, especially the one between O5 and H4 (Table II). These hydrogen bonds contribute significantly to the stability of the radical. In the C7—OH radical, there are strong localized double bonds in ring A, that is, the C8—C9 bond, and carbonyl groups on C5 and C7. There is also a strong hydrogen bond between O5 and H4, and one much weaker between O5 and H6 (Table II). In the C4—OH radical, the rings A and C are characterized by five strongly localized double bonds, that is, the C2—C3, C7—C8, and C9—C10 bonds and carbonyl groups C4—O and C5—O. The hydrogen bonds in C4—OH are much weaker in comparison with those in C6—OH (Table II).

Spin density is often considered as a parameter, which provides realistic representation of the reactivity [49]. The importance of spin density for

the description of flavonoids has been pointed out in the recent literature data [47]. In the C6—OH radical, the highest spin density is located on the O6 atom, while the rest of spin density is distributed between the ortho- and para-carbon atoms (Fig. 6). A scheme based on classical resonance effects occurring in the phenoxo radical can explain the presence of high-spin density on the O5, C7, and C9 atoms. Somewhat lower spin delocalization is found in other two radicals (Fig. 6). The NBO analysis of the C7—OH and C4—OH radicals shows that spin density is very high on the C6 atom (0.415 and 0.339), indicating the weak delocalization of the unpaired electron. It is known that spin density delocalization is related to the ease of radical formation, which implies that proton removal from the O4 and O7 sites of the radical cation of baicalein is not favored. Taking into account that C6—OH is thermodynamically most stable radical, it is clear that this radical plays a significant role in the antioxidant activity of baicalein within the SET-PT mechanism.

## Conclusions

The structures of neutral baicalein and corresponding radical cation are investigated by using B3LYP and PBE methods with 6-311+G(2df,p) basis set. Both methods reproduce the geometry of baicalein molecule very well, but only B3LYP method successfully describes the UV spectrum of baicalein.

A very interesting feature of the baicalein radical cation is that the hydrogen atom is transferred from O5 to O4. The radical cation is formed by the loss of an electron from the highest lying occupied molecular orbital of baicalein, that is, the lone pair on O4. As the unpaired electron on O4 cannot delocalize over the adjacent nonaromatic C ring, O4 abstracts the proximate hydrogen atom from O5. The radical cation formed in this way delocalizes its unpaired electron over the aromatic ring A, thus reducing the instability induced by the loss of an electron.

The structures and properties of three possible radicals formed after proton removal from the radical cation were also investigated. It was found that spin density delocalization is most pronounced in the thermodynamically most stable C6—OH radical, indicating that this radical plays a significant role in the antioxidant activity of baicalein within the SET-PT mechanism.

---

**References**

- Harborne, J. B.; Williams, C. A. *Phytochemistry* 2000, 55, 481.
- Cody, V.; Middleton, E.; Harborne, J. B. *Plant Flavonoids in Biology and Medicine: Biochemical, Pharmacological, and Structure-Activity Relationships*; Liss AR Inc.: New York, 1986.
- Cody, V.; Middleton, E.; Harborne, J. B.; Beretz, A. *Plant Flavonoids in Biology and Medicine II: Biochemical, Cellular, and Medicinal Properties*; Liss AR Inc.: New York, 1988.
- Rechner, A. R.; Kuhnle, G.; Bremner, P.; Hubbard, G. P.; Moore, K. P.; Rice-Evans, C. A. *Free Radic Biol Med* 2002, 33, 220.
- Lambert, J. D.; Sang, S. M.; Yang, C. S. *Chem Res Toxicol* 2007, 20, 583.
- Pietta, P. G. In *Flavonoids in Health and Disease*; Rice-Evans, C. A.; Packer, L., Eds.; Marcel Dekker: New York, 1997.
- Rice-Evans, C.; Miller, N. *Biochem Soc Trans* 1996, 24, 790.
- Pietta, P. G. *J Nat Prod* 2000, 63, 1035.
- Cao, G.; Sofic, E.; Prior, R. *Free Radic Biol Med* 1997, 22, 749.
- Larson, R. A. *Naturally Occurring Antioxidants*; Lewis Publishers, CRC Press LLC: Boca Raton, 1997.
- Mayer, J. M. *Annu Rev Phys Chem* 2004, 55, 363.
- DiLabio, G. A.; Johnson, E. R. *J Am Chem Soc* 2007, 129, 6199.
- Di Labio, G. A.; Ingold, K. U. *J Am Chem Soc* 2005, 127, 6693.
- Sjodin, M.; Styring, S.; Åkermark, B.; Sun, L.; Hammarstrom, L. *J Am Chem Soc* 2000, 122, 3932.
- Campbell, K. A.; Peloquin, J. M.; Diner, B. A.; Tang, X. S.; Chisolm, D. A.; Britt, D. A. *J Am Chem Soc* 1997, 119, 4787.
- Proshlyakov, D. A.; Pressler, M. A.; DeMaso, C.; Leykam, J. F.; DeWitt, D. L.; Babcock, G. T. *Science* 2000, 290, 1588.
- Tommos, C.; Babcock, G. T. *Acc Chem Res* 1998, 31, 18.
- O'Malley, P. J. *J Am Chem Soc* 1998, 120, 11732.
- Burton, G. W.; Ingold, K. U. *Acc Chem Res* 1986, 19, 194.
- McEvoy, J. P.; Brudvig, G. W. *Phys Chem Chem Phys* 2004, 6, 4754.
- Rhile, I. J.; Mayer, J. M. *J Am Chem Soc* 2004, 126, 12718.
- Marković, Z. S.; Mentus, S. V.; Dimitrić-Marković, J. M. *J Phys Chem A* 2009, 113, 14170.
- Marković, Z. S.; Dimitrić-Marković, J. M.; Milenković, D.; Filipović, N. *Monatsh Chem* 2011, 142, 145.
- Marković, Z. S.; Dimitrić-Marković, J. M.; Doličanin, Č. B. *Theor Chem Acc* 2010, 127, 69.
- Lapidot, T.; Harel, S.; Akiri, B.; Granit, R.; Kanner, J. *J Agric Food Chem* 1999, 47, 67.
- Li, B. Q.; Fu, T.; Dongyan, Y.; Mikovits, J. A.; Ruscetti, F. W.; Wang, J. M. *Biochem Biophys Res Commun* 2000, 276, 534.
- Kitamura, K.; Honda, M.; Yoshizaki, H.; Yamamoto, S.; Nakane, H.; Fukushima, M.; Ono, K.; Tokunaga, T. *Antiviral Res* 1998, 37, 131.
- Lee, C.; Yang, W.; Parr, R. G. *Phys Rev B* 1988, 37, 785.
- Becke, A. D. *J Chem Phys* 1993, 98, 5648.
- Perdew, J. P.; Burke, K.; Ernzerhof, M. *Phys Rev Lett* 77, 1996, 3865.
- Perdew, J. P.; Burke, K.; Ernzerhof, M. *Phys Rev Lett* 78, 1997, 1396.
- Ditchfield, R.; Hehre, W. J.; Pople, J. A. *J Chem Phys* 54, 1971, 724.
- Hehre, W. J.; Ditchfield, R.; Pople, J. A. *J Chem Phys* 56, 1972, 2257.
- Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Zakrzewski, V. G.; Montgomery, J. A., Jr.; Stratmann, R. E.; Burant, J. C.; Dapprich, S.; Millam, J. M.; Daniels, A. D.; Kudin, K. N.; Strain, M. C.; Farkas, O.; Tomasi, J.; Barone, V.; Cossi, M.; Cammi, R.; Mennucci, B.; Pomelli, C.; Adamo, C.; Clifford, S.; Ochterski, J.; Petersson, G. A.; Ayala, P. Y.; Cui, Q.; Morokuma, K.; Malick, A. D.; Rabuck, K. D.; Raghavachari, K.; Foresman, J. B.; Cioslowski, J.; Ortiz, J. V.; Baboul, A. G.; Stefanov, B. B.; Liu, G.; Liashenko, A.; Piskorz, P.; Komaromi, I.; Gomperts, R.; Martin, R. L.; Fox, D. J.; Keith, T.; Al-Laham, M. A.; Peng, C. Y.; Nanayakkara, A.; Challacombe, M.; Gill, P. M. W.; Johnson, B.; Chen, W.; Wong, M. W.; Andres, J. L.; Gonzalez, C.; Head-Gordon, M.; Replogle, E. S.; Pople, J. A. *Gaussian 09, Revision A.1-SMP*; Gaussian Inc.: Wallingford, CT, 2009.
- Reed, A. E.; Weinstock, R. B.; Weinhold, F. *J Chem Phys* 1985, 83, 735.
- Glendening, E. D.; Badenhop, J. K.; Reed, A. E.; Carpenter, J. E.; Bohmann, J. A.; Morales, C. M. Weinhold, F. *NBO Version 5.9*. Theoretical Chemistry Institute, University of Wisconsin, Madison, USA, 2009.
- Reed, A. E.; Curtiss, L. A.; Weinhold, F. *Chem Rev* 1988, 88, 899.
- Carpenter, J. E.; Weinhold, F. *J Mol Struct (THEOCHEM)* 1988, 169, 41.
- Bauernschmitt, R.; Ahlrichs, R. *Chem Phys Lett* 1996, 256, 454.
- Casida, M. E.; Jamorski, C.; Casida, K. C.; Salahub, D. R. *J Chem Phys* 1998, 108, 4439.
- Stratmann, R. E.; Scuseria, G. E.; Frisch, M. J. *J Chem Phys* 1998, 109, 8218.
- Monat, J. E.; Rodriguez, J. H.; McCusker, J. K. *J Chem Phys A* 2002, 106, 7399.
- Marques, M. A. L.; Ullrich, C. A.; Nogueira, F.; Rubio A.; Burke, K. In *Time-Dependent Density Functional Theory, Lecture Notes in Physics*; Gross, E. K. U., Eds.; Springer: Berlin, Heidelberg, New York, 2006; Vol. 706.
- O'Boyle, N. M.; Tenderholt, A. L.; Langner, K. M. *J Comp Chem* 2008, 29, 839.
- Zhurko, G. A.; Zhurko, D. A. *Chemcraft Graphical Program for Working with Quantum Chemistry Results, Chemcraft 1.6*, 2008; Available at: <http://www.chemcraftprog.com>.
- Hibbs, D. E.; Overgaard, G. C.; Hambley, T. W. *New J Chem* 2003, 27, 1392.
- Leopoldini, M.; Marino, T.; Russo, N.; Toscano, M. *Theor Chem Acc* 2004, 111, 210.
- Leopoldini, M.; Marino, T.; Russo, N.; Toscano, M. *J Phys Chem A* 2004, 108, 4916.
- Szabo, A.; Ostlund, N. S. *Modern Quantum Chemistry: Introduction to Advanced Electronic Structure Theory*; Dover: New York, 1982.

# Structural and electronic features of baicalein and its radicals

Zoran S. Marković · Jasmina M. Dimitrić-Marković ·  
Dejan Milenković · Nenad Filipović

Received: 21 May 2010 / Accepted: 15 November 2010  
© Springer-Verlag 2011

**Abstract** Baicalein (5,6,7-trihydroxy-2-phenyl-4*H*-chromen-4-one) was investigated by using the B3LYP/6-311+G\*\* level of theory in the gas phase. The results for bond order, bond dissociation enthalpy, highest occupied molecular orbital (HOMO), and Mulliken spin density for baicalein are presented. The structure–activity relationship was examined in the light of these results. Particular attention was devoted to the density functional theory (DFT) interpretation of the reactivity of the OH groups in baicalein, and the radicals formed after hydrogen removal from this molecule. A detailed analysis of the obtained results revealed that the 6-OH group is responsible for the significant antioxidant activity of this molecule.

**Keywords** Baicalein · Antioxidant activity · BDE · HOMO · DFT

## Introduction

Reactive oxygen and nitrogen radical species can potentially damage almost all types of biologically important molecules like lipids (causing lipid peroxidation), amino acids, carbohydrates, and nucleic acids (causing mutations). An imbalance between antioxidants and reactive oxygen species results in oxidative stress, which is implicated in many diseases, suggesting that free radicals participate as fundamental components in a large majority of, if not all, human diseases [1–3]. A variety of naturally occurring and synthetic antioxidant molecules have been shown to quench free radicals, reduce lipid peroxidation, and detoxify hydrogen peroxide through non-enzymatic defense mechanisms. The flavonoid family is a vast and major group among the phenolics with more than several thousand known compounds. Numerous investigations provided some circumstantial evidence that flavonoids exhibit a variety of beneficial actions generally related to their pronounced antioxidant activity, which operates at different levels in the oxidative process including scavenging free radicals, scavenging lipid peroxy radicals, or removing oxidatively changed and damaged biomolecules [4–9]. The chemical behavior of flavonoids as antioxidants has therefore become the subject of intense experimental and theoretical research.

There are generally two fundamental and widespread mechanisms through which flavonoids (ArOH) and other phenolic compounds can play a preventive role: (1) HAT (hydrogen atom transfer) mechanism leading to the direct O–H bond breaking by rapid donation of a hydrogen atom to a radical to form a new radical, more stable than the initial one ( $\text{ArOH} + \text{HO}\cdot \rightarrow \text{ArO}\cdot + \text{HOH}$ ) and (2) the chain-breaking mechanism leading to indirect hydrogen abstraction, by which the primary antioxidant transforms

---

Z. S. Marković  
Department of Biochemical and Medical Sciences,  
State University of Novi Pazar, Vuka Karadžića bb,  
36300 Novi Pazar, Republic of Serbia

J. M. Dimitrić-Marković (✉)  
Faculty of Chemistry, University of Belgrade,  
Studentski trg 12-16, 11000 Belgrade, Republic of Serbia  
e-mail: markovich@ffh.bg.ac.rs

D. Milenković · N. Filipović  
Bioengineering Research and Development Center,  
34000 Kragujevac, Republic of Serbia

N. Filipović  
Harvard School of Public Health,  
Harvard University, Boston MA 02115, USA



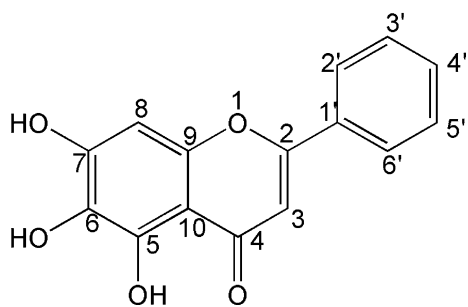
into a radical cation by donating an electron to the free radical present in the system ( $\text{ArOH} + \text{HO}\cdot \rightarrow \text{ArOH}^+ + \text{OH}^- \rightarrow \text{ArO}\cdot + \text{HOH}$ ). The net result of reactions (1) and (2) is the same and both hydrogen atom transfer and electron transfer occur in parallel at different rates. Besides the hydrogen atom transfer (HAT) mechanism, where the proton and the electron are transferred together, many important biochemical processes proceed via proton-coupled electron transfer (PCET) mechanism, which occurs when a proton and electron are transferred between different sets of molecular orbitals [10–13]. Both HAT and PCET mechanisms depend upon the medium investigated. In general they are governed by the strength of the phenolic O–H bond, i.e., by the O–H bond dissociation enthalpy (BDE), the molecular property used in the assessment of possible radical scavenging potential of the molecule. BDE is calculated as the difference in enthalpy between the molecule (baicalein in this case) and its radicals, implicating its correspondence to the OH bond breaking energy (the weaker the OH bond is, the smaller BDE is and the faster HAT mechanism will be leading to the faster reaction with free radicals). The electron-transfer mechanism (2) is governed by a one-electron transfer process with both the ionization potential and reactivity of the radical cation  $\text{ArOH}^+$  playing important roles. Whatever mechanism is involved, the formed radical species  $\text{ArO}\cdot$  needs to be relatively stable, so that reactions (1) and (2) could be thermodynamically favorable in the sense that

it is easier to remove a hydrogen atom from  $\text{ArOH}$  than from  $\text{HOH}$ . In this way an antioxidant molecule will react slowly with the substrate and faster with the radical form preventing or postponing toxic effects (such is the oxidative stress) of its reaction with the substrate molecules, thereby justifying the term “chain-breaking antioxidant”. The antioxidant molecule and the final product obtained from it should be nontoxic and should not exert a pro-oxidant effect [10, 14].

Baicalein (5,6,7-trihydroxy-2-phenyl-4*H*-chromen-4-one) and its glucuronide baicalin are two of the major bioactive compounds found in the traditional Chinese medicinal herb Baikal skullcap (*Scutellaria baicalensis* Georgi). They are widely used in the treatment of copious and disease-related symptoms such as insomnia, fever, and perspiration. Baicalein was also the subject of numerous studies which gave promising results in different areas, such as inhibition of iron-induced lipid peroxidation, anticancer, anti-inflammatory, and antioxidant activities [15–17]. This paper addresses the potential reactivity of each of the baicalein reactive sites and stability of the corresponding radicals formed after hydrogen abstraction from its various OH groups. The structure–activity relationship is examined in the light of the results obtained by applying B3LYP/6-311+G\*\* level of theory in the gas phase.

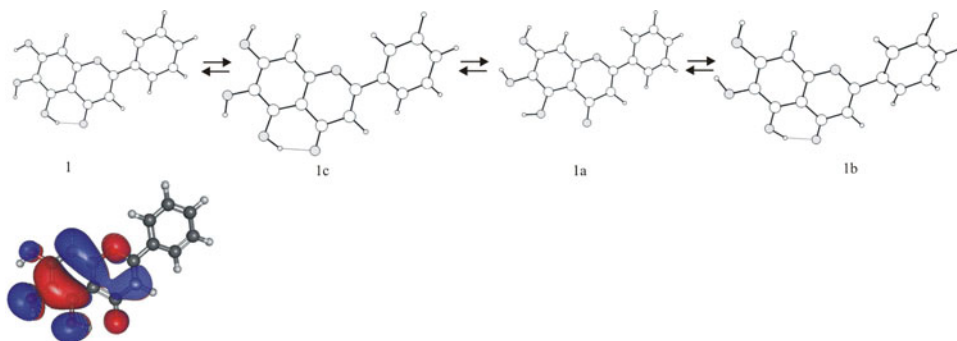
## Results and discussion

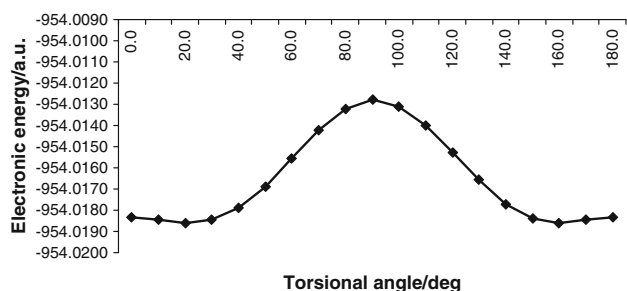
The majority of theoretical investigations of flavonoids concerning BDE are focused only on the B ring, particularly the catechol moiety [18–30]. The present study is focused on ring A because baicalein has OH groups only in this ring (Fig. 1). In order to find the most stable conformation of baicalein and to determine the preferred relative positions between rings B and C the conformational space of structure **1** (Fig. 2) was analyzed as a function of torsional angle  $\tau$  ( $\text{C3–C2–C1'–C2'}$ ) between these rings. By removing constraint for the torsional angle the conformational absolute minima are found at  $\tau = 21.00^\circ$  and at



**Fig. 1** Atomic numbering of baicalein

**Fig. 2** Most stable conformation of the baicalein molecule (**1**). The structures of baicalein in the absence of the C7–OH–C6–O (**1c**), C5O–H–C4O (**1a**), and C6O–H–C5O (**1b**) hydrogen bonds. Calculated HOMO orbital of structure **1**





**Fig. 3** Energy profile for rotation barrier around the inner bond C2–C1' for structure **1**

$\tau = 158.95^\circ$ . The maximum of the potential energy lies at  $\tau = 90^\circ$  and the interconversion barrier between the two minima is about  $15.1 \text{ kJ mol}^{-1}$  (Fig. 3).

The torsional angle values (C3–C2–C1'–C2') of  $20^\circ$  and  $159^\circ$  were found for structurally very similar molecules: quercetin (using AM1) and fisetin (using PM6 methods) [18, 19]. Similarly, the minimization procedure for baicalein finds a nonplanar minimum. It is worth mentioning that in going from  $\tau = 0^\circ$  to  $\pm 40^\circ$ , the potential energy curve is very flat with an energy variation of about  $0.59 \text{ kJ mol}^{-1}$ ; this indicates that the planar conformation is easily obtained, requiring a negligible amount of energy.

Density functional theory (DFT) calculations imply that baicalein is as polar as quercetin [18] and fisetin [19] with a dipole moment of 3.26 D. Results of the bond order calculations (Table 1) indicate that the double bonds are strongly localized in the C2–C3 and C4–O positions of ring C. The bond order values also suggest a highly independent electronic delocalization only in rings B and A. The small deviation from planarity, as well as the low energy value necessary for interconversion from structure **1** to the planar structure (Fig. 2), do not prevent the electronic delocalization in the molecule of baicalein. The C2–C1' bond is in the chromone plane because the C4–C3–C2–C1' torsional angle is close to  $180^\circ$ . This bond has a length of  $1.473 \text{ \AA}$  (Table 2) and the bond order is close to 1 (Table 1). The single character of the C2–C1' bond shows that the conjugation of the  $\pi$  system across all the rings is very small. The double bonds around the carbonyl group in ring C indicate a cross-conjugated system [31] in which the delocalization is allowed only between C and A or C and B rings, but not for rings A and B. This finding is indirectly confirmed by the investigation in which biphenyl molecules were found to be not completely planar [31].

There are three hydrogen bonds present in structure **1** (Fig. 2). The formation of the hydrogen bond between the C5–OH and C4–O carbonyl group has a stabilizing effect. This OH group is additionally stabilized by the formation of another hydrogen bond between the oxygen of the C6–OH group and the C5 oxygen. The conformations lacking these

**Table 1** Bond order values of baicalein (**1**) and its radical species (C5, C6, and C7)

Wiberg bond order	Baicalein	C5–OH	C6–OH	C7–OH
O1–C2	1.014	0.972	0.991	1.013
C2–C3	1.609	1.658	1.620	1.594
C3–C4	1.139	1.089	1.135	1.147
C4–C10	1.107	1.053	1.103	1.093
C5–C10	1.250	1.111	1.266	1.327
C5–C6	1.358	1.083	1.117	1.281
C6–C7	1.293	1.268	1.082	1.069
C7–C8	1.363	1.421	1.453	1.144
C8–C9	1.394	1.219	1.308	1.554
C9–O1	0.971	1.004	1.003	0.960
C9–C10	1.292	1.442	1.283	1.173
C2–C1'	1.067	1.065	1.073	1.074
C1'–C2'	1.366	1.368	1.363	1.361
C2'–C3'	1.447	1.445	1.448	1.448
C3'–C4'	1.430	1.431	1.430	1.429
C4'–C5'	1.422	1.422	1.421	1.420
C5'–C6'	1.455	1.456	1.457	1.458
C6'–C1'	1.362	1.362	1.358	1.357
O4–C4	1.532	1.690	1.539	1.536
O5–C5	1.071	1.568	1.180	1.077
O6–C6	1.000	1.105	1.516	1.123
O7–C7	1.052	1.042	1.112	1.582
H5–C5	0.637		0.632	0.630
H6–C6	0.729	0.681		0.728
H7–C7	0.737	0.741	0.701	
DH(O4–H5)	0.084		0.003	0.088
DH(O5–H6)	0.006	0.040		0.008
DH(O6–H7)	0.006	0.004	0.033	

DH hydrogen bond

bonds (Fig. 2, **1a–1c**) are less stable with respect to the absolute minimum by 65.57, 26.61, and  $19.99 \text{ kJ mol}^{-1}$ , respectively. The lack of hydrogen bond between C5–OH and C4–O carbonyl group has the strongest destabilizing effect, which is in agreement with the fact that this hydrogen bond is shorter than other two (Table 2). The natural bond orbital (NBO) analysis of baicalein revealed that lone pair–antibond and bond–antibond interactions are responsible for hydrogen bond formation. Because O4(2p) and O5–H( $\sigma^*$ ) orbitals are the electron-abundant and electron-deficient components, respectively, the charge transfer from O4(2p) to O5–H( $\sigma^*$ ) orbital is a favorable donor–acceptor interaction, and is a relatively dominant term in determining the strength of hydrogen bond delocalization energy. Almost negligible charge transfer is observed for O6(1p) and O7–H( $\sigma^*$ ), whereas for O5(1p) and O6–H( $\sigma^*$ ) and for O5(2p) and O6–H( $\sigma^*$ ) charge transfer is not observed at all. This finding is in accordance with these hydrogen bonds lengths (Table 2).

**Table 2** Bond lengths (nm) calculated using B3LYP/6-311+G\*\* for baicalein and the corresponding radicals

	Baicalein	C5–OH	C6–OH	C7–OH
D(O1–C2)	0.1358	0.1370	0.1366	0.1358
D(C2–C3)	0.1359	0.1349	0.1356	0.1360
D(C3–C4)	0.1445	0.1466	0.1445	0.1441
D(C4–C10)	0.1452	0.1478	0.1455	0.1458
D(C5–C10)	0.1412	0.1456	0.1414	0.1396
D(C5–C6)	0.1386	0.1466	0.1450	0.1404
D(C6–C7)	0.1402	0.1400	0.1468	0.1473
D(C7–C8)	0.1394	0.1379	0.1375	0.1450
D(C8–C9)	0.1387	0.1424	0.1402	0.1361
D(C9–O1)	0.1373	0.1360	0.1360	0.1377
D(C9–C10)	0.1403	0.1385	0.1405	0.1430
D(C2–C1')	0.1474	0.1473	0.1472	0.1472
D(C1'–C2')	0.1403	0.1403	0.1403	0.1404
D(C2'–C3')	0.1391	0.1392	0.1391	0.1391
D(C3'–C4')	0.1394	0.1393	0.1393	0.1394
D(C4'–C5')	0.1395	0.1395	0.1395	0.1395
D(C5'–C6')	0.1390	0.1390	0.1390	0.1389
D(C6'–C1')	0.1403	0.1403	0.1404	0.1404
D(C2–C1')	0.1474	0.1473	0.1472	0.1472
D(O4–C4)	0.1249	0.1222	0.1247	0.1248
D(O5–C5)	0.1349	0.1466	0.1318	0.1346
D(O6–C6)	0.1370	0.1333	0.1249	0.1330
D(O7–C7)	0.1354	0.1355	0.1333	0.1240
D(H5–C5)	0.0996		0.1001	0.0997
D(H6–C6)	0.0967	0.0984		0.0971
D(H7–C7)	0.0967	0.0966	0.0980	

The torsional angle values ( $\tau$ ) between rings C and B in structures **1a–1c** are similar to the corresponding value for structure **1** (Fig. 2) implicating the importance of the conjugation stabilization between rings B and C in the structures lacking the hydrogen bonds.

#### Baicalein radicals

Geometry optimizations of the radicals are performed by starting from the optimized structure of the parent molecule, after hydrogen atom abstraction from the C5, C6, or C7 position. The radical formed by hydrogen removal from the C5–OH group of baicalein is called the C5–OH baicalein radical, and the same notation is used for the other two radicals (Fig. 4). No geometrical parameter constraint is imposed during the optimization. The OH group neighboring the primary radical site in the A ring is oriented in such way that hydrogen bonding is preserved.

The C6–OH radical, like parent molecule **1**, retains nonplanarity with a torsional angle of approximately 20.3° (Table 3). Energy minima for two other isomers generated

by the loss of the hydrogen from the C7–OH and C5–OH groups are higher than that for C6–OH form by 44.37 and 58.79 kJ mol<sup>-1</sup>, respectively. These two forms are also nonplanar, because torsional angle values between rings B and C are approximately 19.3° (C7–OH) and 20.4° (C5–OH) (Table 3).

Careful inspection of Table 1 allows further comments on the electronic structure of three possible radical isomers of baicalein. The C5–OH, C6–OH, and C7–OH radicals are characterized by two hydrogen bonds (Fig. 4) that contribute to their stabilities. In the C6–OH radical the complete delocalization involves only ring B, whereas ring C is characterized by two double bonds strongly localized on the carbonyl group and C2–C3 bond. The C6–OH radical also has strong localized double bonds in ring A, on the carbonyl group at C6, and between C7 and C8 atoms, which is the significant difference in comparison to the parent molecule **1** (Fig. 2). The same bond order value for the C2–C1' bond in the parent molecule and in the C6–OH radical indicates a weak electron delocalization over ring B.

In the C5–OH radical the complete delocalization involves only ring B, whereas rings A and C are characterized by five double bonds strongly localized on the carbonyl groups C3–O and C5–O, as well as on the C2–C3, C6–C7, and C9–C10 bonds. Moreover, as a result of the nonplanarity of this radical the electronic flow between rings A and C is prevented, a conclusion also supported by the C2–C1' bond order value (Table 1).

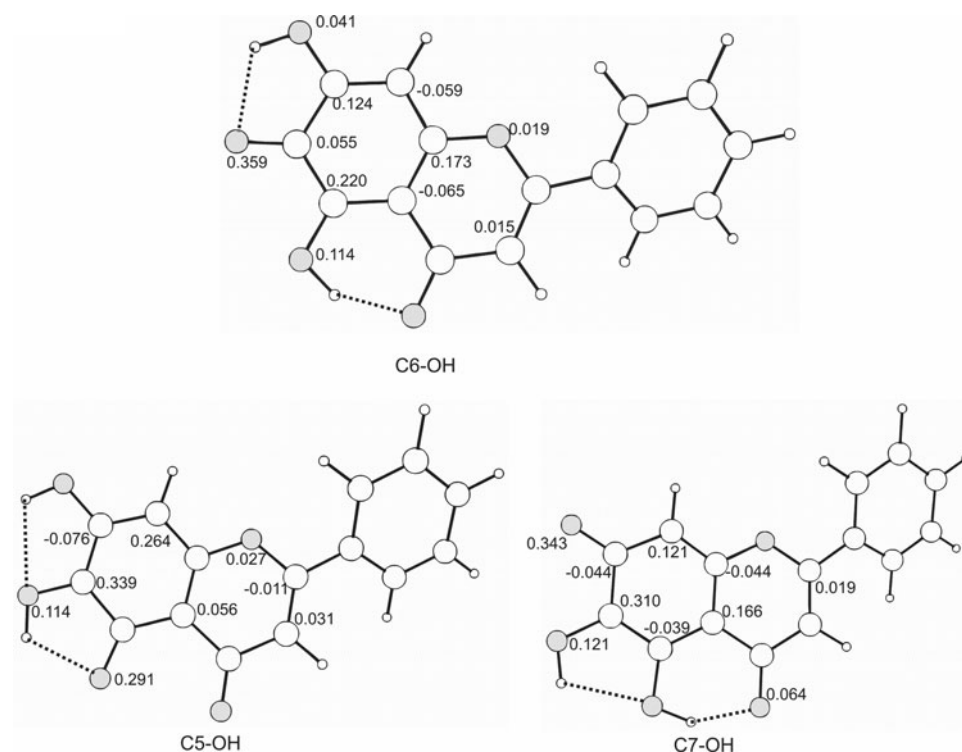
Significant geometrical changes in ring A are also present in the structure of the C7–OH radical. In the C7–OH radical, like in the C6–OH radical, the C6–C7 bond becomes significantly longer (Table 2), whereas the bond order values (Table 1) show that the C7–O and C8–C9 double bonds in ring A are almost localized. The bond order between C2 and C1' is close to 1, implying that conjugation between rings C and B is hindered.

#### BDE values

The DFT calculated BDE values (Table 4) for the three radical forms give the following BDE sequence for the present OH groups: C5–OH > C7–OH > C6–OH. This sequence clearly confirms that hydrogen transfer from C6–OH is easier than that from the other two OH groups. The obtained results are consistent with the literature data concerning structure–activity relationships of antioxidant flavonoids [32].

According to the performed calculations, the BDE values for the C5–OH and C7–OH sites on the A ring are higher than those for the C6–OH form by 44.4 and 58.8 kJ mol<sup>-1</sup>. Whatever the kind of oxidative system is involved, these results clearly implicate the higher reactivity of the C6–OH group compared with the other two

**Fig. 4** Optimized structures of baicalein radicals. Values of corresponding spin densities are presented as *numbers*. Hydrogen bonds are presented as *dashed lines*



**Table 3** Bond angle and dihedral angle values ( $^{\circ}$ ) for baicalein and the corresponding radicals

Angle	Baicalein	C5-OH	C6-OH	C7-OH
A(O1-C2-C3)	121.9	120.8	121.4	122.2
A(C2-C3-C4)	121.6	123.1	121.5	121.5
A(C3-C4-C10)	115.0	113.4	115.4	115.4
A(C4-C10-C5)	121.0	123.5	120.8	120.6
A(C10-C5-C6)	119.9	117.1	120.0	120.2
A(C5-C6-C7)	120.2	123.2	116.6	121.1
A(C6-C7-C8)	121.0	118.1	123.0	116.6
A(C7-C8-C9)	118.1	120.0	117.7	120.2
A(C8-C9-C10)	122.4	124.6	123.5	122.9
A(C9-O1-C2)	120.7	120.5	121.3	121.4
A(C1'-C2'-C3')	120.4	120.4	120.4	120.4
A(C2'-C3'-C4')	120.3	120.3	120.3	120.3
A(C3'-C4'-C5')	119.7	119.6	119.7	119.7
A(C4'-C5'-C6')	120.3	120.3	120.2	120.2
A(C5'-C6'-C1')	120.5	120.5	120.4	120.5
A(C6'-C1'-C2')	118.9	118.8	118.9	118.9
A(C6'-C1'-C2)	120.8	120.6	120.6	120.8
A(C3-C4-O4)	123.3	121.8	123.0	123.5
A(C10-C5-O5)	122.1	127.4	121.4	122.9
A(C5-C6-O6)	122.4	116.7	125.0	120.3
A(C6-C7-O7)	119.7	121.5	115.0	120.6
$\tau$ (O1-C2-C1'-C2')	20.96	21.36	20.34	19.29

**Table 4** Some of the calculated energies of the baicalein molecule (**1**) and its radical isomers (C5-OH, C6-OH, and C7-OH) in their ground state

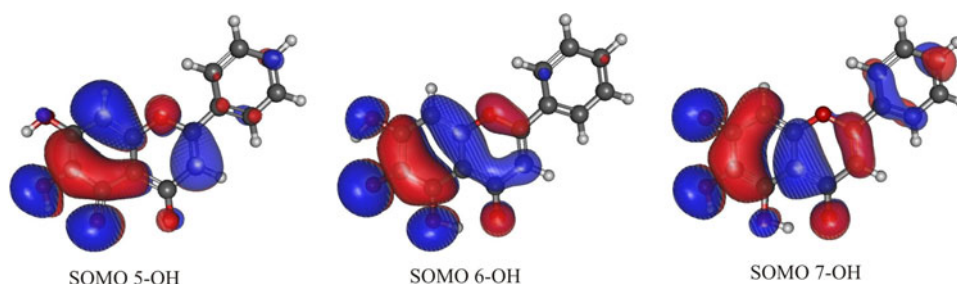
	C5-OH	C6-OH	C7-OH	<b>1</b>
$E + ZPE$ (a.u.)	-953.1631	-953.1849	-953.1683	-953.8061
BDE (kJ mol $^{-1}$ )	89.89	75.85	86.44	
$E_{HOMO}$ (eV)	-0.2460	-0.2570	-0.2605	-0.228
$E_{LUMO}$ (eV)	-0.080	-0.092	-0.094	-0.085
$E_{SOMO}$ (eV)	-0.197	-0.182	-0.200	
IP (kJ mol $^{-1}$ )				166.30

$ZPE$  zero point energy,  $BDE$  bond dissociation enthalpy,  $E_{HOMO}$  energy of the highest occupied molecular orbital,  $E_{LUMO}$  energy of the lowest unoccupied molecular orbital,  $E_{SOMO}$  energy of the singly occupied molecular orbital,  $IP$  ionization potential

hydroxyl groups of ring A. This hierarchy may only be overcome if the oxidation of the molecules takes place via an enzymatic action for which the binding configuration with the protein receptor governs the location of the redox reactions.

The BDE values for C5-OH and C7-OH groups of baicalein are very similar to the corresponding values obtained for quercetin at the same level of theory [21]. Also, a similar value for BDE is obtained for the C7-OH group of fisetin [33]. On the other hand, the BDE value for the C6-OH group is significantly lower, and can be

**Fig. 5** SOMO of radicals formed by hydrogen removal from baicalein



compared with the values of catechol OH groups of quercetin and fisetin [21, 33]. The calculated BDE value for the C6–OH form is in agreement with the experimental TEAC (Trolox equivalent antioxidant activity) value of baicalein [34].

On the basis of the ionization potential value for structure **1** ( $696.82 \text{ kJ mol}^{-1}$ ), which is slightly higher than the corresponding value for quercetin [20], one can expect a lower antioxidant activity for baicalein in comparison to quercetin. This means that baicalein, undergoing whatever mechanism of action, hydrogen atom or electron transfer, would be less effective in terms of antioxidant activity compared with quercetin. The experimental value of TEAC confirms this assumption [32, 34].

The difference in antioxidant activity, which is reflected in the BDE values, is often attributed to the  $\pi$ -electron delocalization leading to the stabilization of the radical forms obtained after hydrogen abstraction. This conclusion is made on the basis of an assumption that if  $\pi$ -electron delocalization exists in the parent molecule it also exists in the corresponding radical forms. The somewhat higher BDE value for the C6–OH group of baicalein, compared with the BDE values of quercetin and fisetin catechol hydroxyl groups [21, 33], could be explained by the lower delocalization of this radical form in comparison to the corresponding radicals of quercetin and fisetin.

The HOMO of baicalein is presented in the lower part of Fig. 2. As expected, the greatest contribution to the HOMO comes from ring A and oxygen atoms O6, O5, and O7. The shape of the HOMO undoubtedly reveals that O6, O5, and O7 atoms are suitable for the formation of stable radical forms (corresponding to hydrogen removal from one of the three OH groups). This assumption is in agreement with the calculated BDE values, especially with the lowest one, obtained for the formation of the C6–OH radical, because the greatest contribution to the HOMO comes from this oxygen atom. The shapes of the SOMO of the radical forms are presented in Fig. 5.

Within an unrestricted scheme, the spin density is often considered to be a more realistic parameter which provides a better representation of the reactivity [35]. The importance of the spin density for the description of flavonoids has been pointed out by recent literature data [20, 21].

Therefore, the spin density on the various baicalein radical forms is also analyzed to help understand the differences in reactivity of the various OH groups, and consequently the differences in BDE values. It should be pointed out that the more delocalized the spin density in the radical form is, the easier the radical is formed, and thus the lower the BDE value is [20, 21].

In the case of the C6–OH radical, the highest spin density is located on the O6 atom while the rest of it is disposed over *ortho* and *para* carbon atoms (Fig. 4). This effect can be explained by using the classical resonance effects occurring in the phenoxy radical. Such a scheme explains the presence of the radical (high spin density) on the C5, C7, and C9 atoms.

In the case of the C5–OH radical the spin density is very high on the C6 atom (0.339) and concomitantly the delocalization is weak (Fig. 4). A somewhat better spin delocalization is found in the case of the C7–OH radical where the spin density is delocalized among the C6, C8, and C10 atoms. Because spin density delocalization is related to the ease of radical formation, it is clear that hydrogen removal from the C5–OH and C7–OH sites is not favored. Figure 4 shows that O7 and O6 atoms have higher spin density values than O5, implying that higher capacity for hydrogen removal from O7 and O6 can be expected.

## Conclusions

On the basis of the results presented baicalein appears to be a nonplanar molecule exerting a cross-conjugation effect. The antioxidant action is generated by three radicals showing nonplanar conformations. The very flat potential energy curve, with an energy variation of about  $0.59 \text{ kJ mol}^{-1}$ , indicates that the planar conformation is easily obtained, requiring a negligible amount of energy. This fact means that radical structures allow extended electronic delocalization between adjacent rings.

The applied theoretical approach confirms the importance of the A ring and sheds light on the role of the C6–OH group, whose reactivity, influencing antioxidant properties of the molecule, is dependent upon the good electron delocalization.

Our results also point to the C5–OH radical, which lies at higher energetic values with the respect to the absolute minimum, indicating its presence in the antioxidant mechanism is rather improbable. The main reason justifying this assumption lies in the fact that the hydrogen atom of the C5–OH group forms a hydrogen bond with the O4 atom.

## Methods

All calculations were performed by using the Becke's three-parameter (B3) exchange functional [36] associated with the Lee–Yang–Parr (LYP) gradient corrected correlation functional [37] denoted B3LYP with the standard split valence double zeta Gaussian basis set 6-31G of Peterson et al. [38, 39]. Furthermore, in order to obtain a better description of the delocalization effects that are crucial for the geometry and the electronic structure of baicalein, diffuse functions were added to the heavy atoms. The *p*, *d* polarization functions (\*\*\*) were also added. Full geometry optimizations were undertaken without any symmetry constraints. A vibrational frequency calculation at the optimized geometry was performed to confirm that the structure obtained was a stationary point (characterized by no negative frequencies) on the potential energy surface. The natural bond orbital (NBO) [40–43] analysis of charges and spin densities of baicalein and corresponding radicals was performed. The Wiberg bond orders [44] were calculated by using the GenNBO program [45]. It should be noted that the Wiberg bond order (sometimes referred to as the Wiberg bond index) is equal to 1 and 2 for pure single and double bonds, respectively. In the case when a bond participates in some  $\pi$ -electron conjugation, its Wiberg bond order will assume a value between 1 and 2; the closer to 2, the stronger the character of a double bond. The bond dissociation enthalpy (BDE) for baicalein was calculated by using the following equation:

$$\text{BDE} = H_{\text{BOH}} - H_{\text{BO}\cdot} - H_{\text{H}\cdot},$$

where  $H_{\text{BOH}}$ ,  $H_{\text{BO}\cdot}$ , and  $H_{\text{H}\cdot}$  are the enthalpies of baicalein, baicalein radical, and hydrogen atom respectively. The ionization potential (IP) was obtained as the energy difference between the BOH and  $\text{BOH}^+$  species. The NBO orbital occupancies associated with the distribution of the singly occupied molecular orbitals (SOMOs) were also used to identify the scavenging mechanism in both cases. All calculations were carried out using the Gaussian 09 computational package [46].

Potential energy surfaces were obtained in relation with the torsion angle  $\tau$  between rings B and C, defined by the C3–C2–C1'–C2' atoms (Fig. 1). The torsion angle  $\tau$  was scanned in steps of 15° without constraints on all other

geometrical parameters. The effects of the following torsion angles rotations were also studied: C4–C5–OH, C5–C6–OH, and C6–C7–OH. Afterwards, the structures were further optimized without any constraint around each potential minimum. Particular attention was paid to the DFT interpretation of the reactivity of OH groups in baicalein and the radicals formed after hydrogen removal from the molecule.

**Acknowledgments** The authors acknowledge financial support by the Ministry of Science and Environmental of Republic of Serbia (Grant No. 142025).

## References

1. Pryor WA (1976) In: Pryor WA (ed) Free radicals in biology, vol I. Academic, New York
2. Pryor WA (1986) *Ann Rev Physiol* 48:657
3. Fridovich I (1978) *Science* 20:875
4. Cody V, Middleton E, Harborne JB (1986) *Plant flavonoids in biology and medicine: biochemical pharmacological and structure-activity relationships*. Alan R Liss, New York
5. Cody V, Middleton EJR, Harborne JB, Beretz A (1988) *Plant flavonoids in biology and medicine II: biochemical cellular and medicinal properties*. Alan R Liss, New York
6. Rice-Evans C, Miller N (1996) *Biochem Soc Trans* 24:790–795
7. Harborne JB, Williams CA (2000) *Phytochemistry* 55:481
8. Cao G, Sofic E, Prior R (1997) *Free Radic Biol Med* 22:749
9. Bravo L, Abia R, Eastwood MA, Saura-Calixto F (1994) *Br J Nutr* 71:933
10. Mayer JM (2004) *Annu Rev Phys Chem* 55:363
11. Di Labio GA, Johnson ER (2007) *J Am Chem Soc* 129:6199
12. Di Labio GA, Ingold KU (2005) *J Am Chem Soc* 127:6693
13. Sjodin M, Styring S, Åkermarck B, Sun L, Hammarstrom L (2000) *J Am Chem Soc* 122:3932
14. Mulder P, Korth HG, Ingold KU (2005) *Helv Chim Acta* 88:370
15. Wang Q, Wang YT, Pub SP, Zheng YT (2004) *Biochem Biophys Res Commun* 324:605
16. Li BQ, Fu T, Dongyan Y, Mikovits JA, Ruscetti FW, Wang JM (2000) *Biochem Biophys Res Commun* 276:534
17. Kitamura K, Honda M, Yoshizaki H, Yamamoto S, Nakane H, Fukushima M, Ono K, Tokunaga T (1998) *Antiviral Res* 37:131
18. Russo N, Toscano M, Uccella N (2000) *J Agric Food Chem* 48:3232
19. Marković Z, Dimitrić-Marković J, Dolićanin Ć (2009) *J Serb Soc Comp Mech* 3:43
20. Leopoldini M, Marino T, Russo N, Toscano M (2004) *J Phys Chem A* 108:4916
21. Leopoldini M, Pitarch IP, Russo N, Toscano M (2004) *J Phys Chem A* 108:92
22. Trouillas P, Marsal P, Siri D, Lazzaroni R, Duroux JL (2006) *Food Chem* 97:679
23. Lemaska K, Szymusiak H, Tyrakowska B, Zieliski R, Soffers AEMF, Rietjens IMCM (2001) *Free Radic Biol Med* 31:869
24. Lucarini M, Pedulli GF, Guerra M (2004) *Chem Eur J* 10:933
25. Priyadarsini KI, Maity DK, Naik GH, Kumar MS, Unnikrishnan MK, Satav JG (2003) *Free Radic Biol Med* 35:475
26. Trouillas P, Fagnere C, Lazzaroni R, Calliste CA, Marfak A, Duroux JL (2004) *Food Chem* 88:571
27. Wright JS, Johnson ER, Di Labio GA (2001) *J Am Chem Soc* 123:1173
28. Zhang HY, Sun YM, Chen DZ (2001) *QSAR* 20:148
29. Zhang HY, Sun YM, Wang XL (2003) *Chem Eur J* 9:502

30. Zhang HY (2004) *New J Chem* 28:1284
31. Hutter W, Bodenseh HK (1993) *J Mol Struct* 291:151
32. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G (1996) *Free Radic Biol Med* 20:933
33. Marković Z, Mentus S, Dimitrić-Marković J, Doličanin Ć (2009) *J Phys Chem* 113:14170
34. Cai YZ, Sun M, Xing J, Luo Q, Corke H (2006) *Life Sci* 78:2872
35. Szabo A, Ostlund NS (1982) *Modern quantum chemistry: introduction to advanced electronic structure theory*. Dover, New York
36. Becke AD (1998) *Phys Rev A* 38:3098
37. Lee C, Yang W, Parr RG (1988) *Phys Rev B* 37:785
38. Peterson GA, Al-Laham MA (1991) *J Chem Phys* 94:6081
39. Peterson GA, Bennett A, Tensfeldt TG, Shirley WA, Mantzaris J (1988) *J Chem Phys* 89:2193
40. Reed AE, Weinstock RB, Weinhold F (1985) *J Chem Phys* 83:735
41. Glendening ED, Reed AE, Carpenter JE, Weinhold F (1995) NBO Version 3.1 Program as part of Gaussian, Theoretical Chemistry Institute, University of Wisconsin, Madison
42. Reed AE, Curtiss LA, Weinhold F (1988) *Chem Rev* 88:899
43. Carpenter JE, Weinhold F (1988) *J Mol Struct (Theochem)* 169:41
44. Wiberg KB (1968) *Tetrahedron* 24:1083
45. Glendening ED, Badenhoop JK, Reed AE, Carpenter JE, Bohmann JA, Morales CM, Weinhold F (2001) GenNBO Version 5.0 Program, Theoretical Chemistry Institute, University of Wisconsin, Madison
46. Frisch MJ, Trucks GW, Schlegel HB, Scuseria GE, Robb MA, Cheeseman JR, Montgomery JA Jr, Vreven T, Kudin KN, Burant J, Millam J, Iyengar S, Tomasi J, Barone V, Mennucci B, Cossi M, Scalmani G, Rega N, Petersson G, Nakatsuji H, Hada M, Ehara M, Toyota K, Fukuda R, Hasegawa J, Ishida M, Nakajima T, Honda Y, Kitao O, Nakai H, Klene M, Knox JE, Hratchian HP, Cross JB, Bakken V, Adamo C, Jaramillo J, Gomperts R, Stratmann RE, Yazyev O, Austin AJ, Cammi R, Pomelli C, Ochterski JW, Ayala PY, Morokuma K, Voth GA, Salvador P, Dannenberg JJ, Zakrzewski VG, Dapprich S, Daniels AD, Strain MC, Farkas O, Malick DK, Rabuck AD, Raghavachari K, Foresman JB, Ortiz JV, Cui Q, Baboul AG, Clifford S, Cioslowski J, Stefanov BB, Liu G, Liashenko A, Piskorz P, Komaromi I, Martin RL, Fox DJ, Keith T, Al-Laham MA, Peng CY, Nanayakkara A, Challacombe M, Gill PMW, Johnson B, Chen W, Wong MW, Gonzalez C, Pople JA (2004) *Gaussian 03, Revision C.02*. Gaussian, Wallingford

# A joint application of vibrational spectroscopic and quantum mechanical methods in quantitative analysis of baicalein structure

Tanja P. Brdarić · Zoran S. Marković ·  
Dejan Milenković · Jasmina M. Dimitrić Marković

Received: 28 December 2011 / Accepted: 4 June 2012  
© Springer-Verlag 2012

**Abstract** Theoretically predicted vibrational wavenumbers of baicalein were compared with available infrared (IR) and Raman experimental data. Assignments of the experimentally obtained normal vibrational modes were done using density functional theory calculations with M05-2X functional and the 6-311+G(2df,p) basis set implemented in the Gaussian 09 package. According to the results, the 1,700 to 1,400  $\text{cm}^{-1}$  Raman and IR regions are associated with the double-bond character of the carbonyl group, aromatic in-plane skeletal vibrations, and aromatic character of the pyrone ring. In particular, the bands in the 1,650 to 1,550  $\text{cm}^{-1}$  region represent the C=O and C2=C3 characteristic stretching modes. Most of the bands in the 1,500 to 650  $\text{cm}^{-1}$  range involve C–C stretch, O–C stretch, and in-plane C–C–H, C–O–H, C–C–O, C–O–C, and C–C–C bending vibrations of the rings. Bands below 650  $\text{cm}^{-1}$  are mostly assigned to different torsional modes of the rings. The applied method reproduced the experimental results with a high degree of accuracy.

**Keywords** Baicalein · IR spectra · Raman spectra · M05-2X/6-311+G(2df,p) level of theory

## Introduction

Besides the variety of internally developed defense mechanisms against reactive oxygen species, organisms rely also on some external factors including dietary substances, such as flavonoids, vitamins C and E, hydroquinones, and various sulfhydryl compounds. The flavonoid family is a vast and very important group of low-molecular-weight plant phenolics. Circumstantial evidence, provided by numerous investigations, points to their essential role in plant physiology, as they are involved in the light phase of photosynthesis, pigmentation, growth and reproduction, nitrogen fixation, regulation of iron channels associated with phosphorylation, resistance to pathogens and predators, ultraviolet (UV) protection of plants, and chemical defense [1–7].

By virtue of their unique electron-rich and highly conjugated chemical structure, flavonoids generally act as very good hydrogen and electron donors, which are very important determinants in antioxidant activity. Moreover, their radical intermediates are relatively stable due to delocalization effect and the lack of suitable sites for attack by molecular oxygen. Their pronounced antioxidant activity, closely related to a variety of their beneficial actions in vivo and in vitro, operates at different levels in the oxidative process, including scavenging lipid peroxyl radicals, chelation of metal ions able to promote radical formation through Fenton reactions, scavenging free radicals, removing oxidatively changed and damaged biomolecules, or regeneration of membrane-bounded antioxidants such as vitamin E [8–18].

---

Z. S. Marković  
Department of Biochemical and Medical Sciences,  
State University of Novi Pazar, Vuka Karadžića bb,  
36300 Novi Pazar, Republic of Serbia

T. P. Brdarić  
Kirilo Savić Institute, Vojvode Stepe 51,  
11000 Belgrade, Republic of Serbia

D. Milenković  
Bioengineering Research and Development Center,  
34000 Kragujevac, Republic of Serbia

J. M. Dimitrić Marković (✉)  
Faculty of Physical Chemistry University of Belgrade,  
Studentski trg 12-16, 11000 Belgrade, Republic of Serbia  
e-mail: markovich@ffh.bg.ac.rs

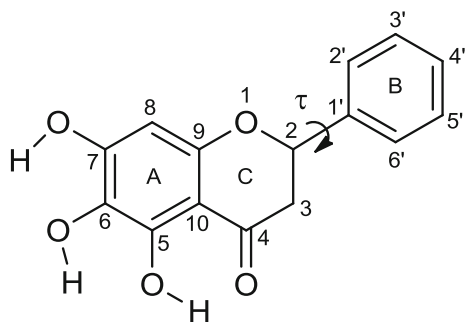


In recent years, the chemical behavior of flavonoids as antioxidants has become the subject of very intense experimental and theoretical research, since the structure–properties relation has not yet been settled. In combination with experimental measurements, the various tools of computational chemistry have provided ways to disclose the relationship between the structure, properties, and performance of these very important molecules. This paper, as part of our ongoing investigations of flavonoid molecular structures [19–22], reports experimental and theoretical research into the baicalein (5,6,7-trihydroxy-2-phenyl-4*H*-chromen-4-one) structure by means of experimental IR and Raman spectroscopies and mechanistic calculations. In this way, by detailed vibrational band assignments, it is possible to provide good insight into the structural changes which appear upon all relevant flavonoid interactions. Found in the traditional Chinese medicinal herb Baikal skullcap (*Scutellaria baicalensis* Georgi), baicalein and its glycosidized form baicalin are two of its major bioactive flavone compounds. They are widely used in treatment of widespread and disease-related symptoms such as insomnia, fever, and perspiration. Baicalein has also been the subject of numerous studies which have given promising results in different areas, such as inhibition of iron-induced lipid peroxidation and anticancer, anti-inflammatory, and antioxidant activities [23–26].

## Results and discussion

### Geometry of baicalein

Different conformations of baicalein (Fig. 1) are implied by the possibility of rotation around the C2–C1' single bond connecting the B and C rings and by the disposition that each –OH group can undergo in the molecule. Optimization at the M05-2X level of theory with the 6-311+G(2df,p) basis set yields as preferred structure a nonplanar conformation ( $\tau = 23.4^\circ$ ) in which the hydroxyl groups are oriented in such a way as to form the maximum



**Fig. 1** Structural formula of baicalein

number (three) of hydrogen bonds. This value for  $\tau$  indicates that baicalein cannot use its full delocalization potential and is less active as scavenger. Nonplanarity can also be caused by the lack of 3-OH group, which causes a slight twist of the ring [27]. The energetic value for the rotation barrier around the torsional angle  $\tau$  (16.2 kJ/mol), which leads to the B ring being perpendicular to the plane of the A and C rings, is much lower in comparison with the values of 24.7 kJ/mol for quercetin [21] and 23.0 kJ/mol for fisetin [20]. Obviously, the rotation around  $\tau$  angle proceeds easily, and there is a very small energy gap between the two most stable conformations. This result suggests their probable coexistence.

Equilibrium geometrical parameters of the absolute minimum are reported in Table 1, together with bond order values and data coming from crystallographic measurements [28]. If the known differences between the vacuum and condensed-phase environments are taken into account, the geometry appears to be quite well reproduced, and the small discrepancies are easily ascribable to the packing in the crystal. Significant geometrical differences were found only in the case of three hydrogen bonds. The O5–H5–O4 (1.689 Å), O6–H6–O5 (2.240 Å), and O7–H7–O6 (2.154 Å) hydrogen bonds present in the gas-phase minimum are significantly different from experimental values. The first one is shorter by 0.051 Å, and the other two are longer by 0.530 and 0.204 Å, respectively, in comparison with the experimental values. Also, it should be emphasized that this density functional theory (DFT) method overestimates the value of the dihedral angle between rings B and C by about  $15^\circ$ .

The Wiberg bond order analysis (Table 1), as well as small nonplanarity of the molecule, preclude a possible extended delocalization with a consequent good stabilization of the radical species, eventually originating from the hydrogen abstraction from the –OH groups of all the rings. As indicated by Rice-Evans et al. [29] and by van Acker et al. [18], the antioxidant properties of flavonoids can be derived just from their good delocalization possibilities.

### IR and Raman spectra analysis

The vibrational spectra of polyhydroxylated flavones are generally very complex with the plurality of spectral bands mostly assigned to different modes of O–H vibrations, due to the fact that these molecules usually have several hydroxyl groups which are expected to have significant impact on the spectra appearance.

The experimentally obtained, theoretically calculated, and scaled band positions, wavenumbers, along with the corresponding assignments for the first 69 vibrational modes (of total 84) appearing in the 4,000 to  $400\text{ cm}^{-1}$  region are listed in Table 2. Vibrational normal mode

**Table 1** M05-2X/6-311+G(2df,p) geometrical parameters of the absolute minimum of baicalein in the gas phase

Bond lengths	Exp.	Gas phase	Wiberg bond order	Angles	Exp.	Gas phase
D(O1–C2)	1.353	1.347	1.011	A(C9–O1–C2)	119.88	120.39
D(C2–C3)	1.360	1.348	1.631	A(O1–C2–C1')	112.73	112.37
D(C3–C4)	1.432	1.440	1.122	A(O1–C9–C10)	121.17	120.38
D(C4–C10)	1.439	1.446	1.093	A(O1–C2–C3)	122.19	122.61
D(C5–C10)	1.414	1.403	1.246	A(C2–C3–C4)	121.05	121.06
D(C5–C6)	1.384	1.376	1.365	A(C3–C2–C1')	125.07	125.02
D(C6–C7)	1.404	1.393	1.293	A(C3–C4–C10)	116.07	114.93
D(C7–C8)	1.392	1.385	1.364	A(C4–C10–C5)	121.79	120.81
D(C8–C9)	1.387	1.380	1.386	A(C4–C10–C9)	119.61	120.61
D(C9–O1)	1.369	1.364	0.964	A(C9–C10–C5)	118.58	118.58
D(C9–C10)	1.400	1.392	1.301	A(C10–C5–C6)	119.92	119.81
D(C2–C1')	1.469	1.470	1.048	A(C5–C6–C7)	119.67	120.14
D(C1'–C2')	1.399	1.392	1.371	A(C6–C7–C8)	121.55	121.21
D(C2'–C3')	1.392	1.384	1.441	A(C7–C8–C9)	117.84	117.92
D(C3'–C4')	1.393	1.386	1.430	A(C8–C9–C10)	122.26	122.34
D(C4'–C5')	1.393	1.387	1.423	A(C8–C9–O1)	116.56	117.28
D(C5'–C6')	1.386	1.383	1.449	A(C1'–C2'–C3')	120.08	120.15
D(C6'–C1')	1.402	1.392	1.367	A(C2'–C3'–C4')	120.47	120.20
D(O4–C4)	1.260	1.238	1.541	A(C3'–C4'–C5')	119.53	119.85
D(O5–C5)	1.348	1.341	1.064	A(C4'–C5'–C6')	120.36	120.15
D(O6–C6)	1.362	1.364	0.993	A(C5'–C6'–C1')	120.39	120.23
D(O7–C7)	1.350	1.347	1.045	A(C6'–C1'–C2')	119.14	119.41
D(H5–O5)	0.970	0.993	0.623	A(C6'–C1'–C2)	120.27	120.52
D(H6–O6)	0.970	0.964	0.720	A(C2–C1'–C2')	120.58	120.07
D(H7–O7)	0.970	0.965	0.728	A(C3–C4–O4)	122.76	123.18
DH(H5–O4)	1.740	1.689		A(C10–C4–O4)	121.17	121.88
DH(H6–O5)	1.710	2.240		A(C10–C5–O5)	122.13	122.00
DH(H7–O6)	1.950	2.154		A(C6–C5–O5)	117.93	118.18
				A(C5–C6–O6)	122.56	122.11
				A(C7–C6–O6)	117.76	117.75
				A(C6–C7–O7)	120.07	119.28
				A(C8–C7–O7)	118.39	119.51
				$\tau$ (O1–C2–C1'–C2')	9.000	23.463

Distances in Å and valence angles in degrees. Experimental data are crystallographic measurements [40]

assignments were done on the basis of a best-fit comparison between the experimentally obtained and theoretically calculated spectra (Figs. 2, 3). Table 2 also lists relative descriptions of IR and Raman intensities, potential energy distribution (PED) values [30], and the description of the largest vibrational contributions to the normal modes. It can be seen that the calculated band positions provide a very good fit to the observed results, indicating correct mode assignments.

As baicalein possesses very low symmetry, belonging to the C1 symmetry group, its Fourier-transform (FT)-IR and Raman spectra are quite similar in appearance with slightly more bands present in the IR spectrum and some differences in relative intensities. The difference in number and intensity of the bands is the consequence of the Raman

scattering effect itself. As implied by the low symmetry, the Raman and IR active vibrational modes also have rather similar assignments.

The most distinct and easily recognizable broad bands in IR and normal Raman (NR) spectra of phenols and polyphenols (also alcohols) are the bands assigned to different modes of O–H vibrations (Table 2). Although being predicted by DFT as three sufficiently intense (especially DFT-calculated IR intensities) bands (modes 84–82, Table 2), only two intense IR bands at 3,410 and 3,065  $\text{cm}^{-1}$  are present. The first band, characteristic of weak hydrogen-bonding interaction, is assigned to mode 83 belonging to O–H stretching vibration of ring A (C7–OH). The second one is assigned to mode 82 (C5–OH), which is characteristic of OH groups involved in

**Table 2** Experimental and calculated positions of the bands in the IR and Raman spectra of baicalein, assignments and intensities of the normal modes

Mode	Assignment	Exp. values		M05-2X/6-311+g(2df,p)			
		$\bar{\nu}_{\text{IR}}/\text{cm}^{-1}$	$\bar{\nu}_{\text{R}}/\text{cm}^{-1}$	$\bar{\nu}_{\text{scaled}}/\text{cm}^{-1}$	IR/Raman intensity	Raman activity	PED (%)
84	OH stretching (A) (C6–OH)			3,629.7	w/vw	66.2	$\nu_{\text{OH}}$ (99)
83	OH stretching (A) (C7–OH)	3,410		3,616.5	m/vw	114.6	$\nu_{\text{OH}}$ (99)
82	OH stretching (A) (C5–OH)	3,065		3,091.4	vw/vw	76.4	$\nu_{\text{OH}}$ (97)
81	CH stretching (A)			3,079.4	vw/v	68.3	$\nu_{\text{CH}}$ (99)
80	CH stretching (B)			3,064.6	vw/vw	247.3	$\nu_{\text{CH}}$ (98)
79	CH stretching (B)			3,060.1	vw/vw	22.1	$\nu_{\text{CH}}$ (95)
78	CH stretching (B)			3,053.5	vw/vw	76.2	$\nu_{\text{CH}}$ (83)
77	CH stretching (B)			3,046.3	vw/vw	114.4	$\nu_{\text{CH}}$ (95)
76	CH stretching (B)			3,036.3	vw/vw	40.8	$\nu_{\text{CH}}$ (95)
75	OH stretching (A)			3,017.7	vs/vw	133.1	$\nu_{\text{CH}}$ (86)
74	C=O stretching (C) CC stretching (A–C)	1,656	1,654	1,654.0	vs/m	206.5	$\nu_{\text{C=O}}$ (47) + $\delta_{\text{COH}}$ (10)
73	CC stretching (A, C) C=O stretching (C)	1,615	1,612	1,619.6	s/m	345.1	$\nu_{\text{CC}}$ (64)
72	CC stretching (B)			1,604.3	vw/vs	531.2	$\nu_{\text{CC}}$ (57) + $\delta_{\text{CCH}}$ (14)
71	CC stretching (A–B–C) OC stretching (A)	1,587	1,589	1,593.3	vw/w	150.1	$\nu_{\text{CC}}$ (44)
70	CC stretching (C) (C2=C3)	1,560	1,566	1,566.6	vw/s	318.0	$\nu_{\text{CC}}$ (44) + $\delta_{\text{CCH}}$ (11)
69	CC stretching (A, C) OC stretching (A)	1,504	1,507	1,495.1	w/w	144.5	$\nu_{\text{CC}}$ (18) + $\delta_{\text{CCH}}$ (34)
68	CC stretching (B)	1,471	1,466	1,474.8	vw/vw	9.2	$\nu_{\text{CC}}$ (13) + $\delta_{\text{CCH}}$ (59)
67	CC stretching (A, C) CCC bending (A, B) COH bending (A–C)	1,448	1,450	1,463.8	vs/vw	11.9	$\nu_{\text{CC}}$ (56)
66	CC stretching (B) CCH bending (B)	1,414	1,406	1,427.5	vw/vw	25.2	$\nu_{\text{CC}}$ (29)
65	OC stretching (A) CC stretching (B) COH bending (A)	1,388	1,381	1,388.3	w/vw	13.6	$\nu_{\text{CC}}$ (17) + $\delta_{\text{CCH}}$ (30)
64	CC stretching (A, C) COH bending (A)			1,365.9	vw/vw	67.0	$\nu_{\text{CC}}$ (67) + $\delta_{\text{CCH}}$ (12)
63	OC stretching (C) CC stretching (A) COH bending (A)	1,340		1,363.1	s/vw	73.4	$\nu_{\text{CO}}$ (12) + $\delta_{\text{COH}}$ (20)
62	OC stretching (C) COH bending (A)			1,304.0	s/vw	56.0	$\nu_{\text{CO}}$ (12) + $\delta_{\text{COH}}$ (20)
61	CC stretching (B) CCH bending (B)	1,296	1,280	1,298.8	vw/vw	0.9	$\nu_{\text{CC}}$ (10) + $\delta_{\text{CCH}}$ (65)
60	CC stretching (A) COH bending (A)			1,293.3	vw/vw	9.2	$\delta_{\text{COH}}$ (23)
59	CC stretching (B) CCH bending (B)			1,272.4	vw/vw	23.1	$\nu_{\text{CC}}$ (35) + $\delta_{\text{CCH}}$ (13)
58	COH bending (A) CCH bending (C)	1,242	1,248	1,245.2	w/vw	38.9	$\nu_{\text{CO}}$ (24) + $\delta_{\text{COH}}$ (21)

**Table 2** continued

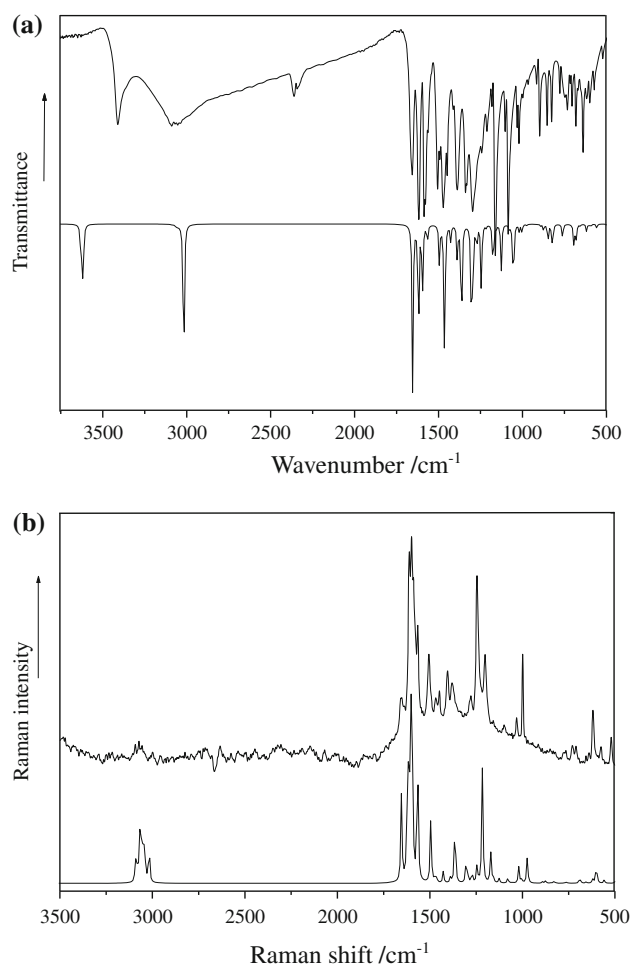
Mode	Assignment	Exp. values		M05-2X/6-311+g(2df,p)			
		$\bar{\nu}_{\text{IR}}/\text{cm}^{-1}$	$\bar{\nu}_{\text{R}}/\text{cm}^{-1}$	$\bar{\nu}_{\text{scaled}}/\text{cm}^{-1}$	IR/Raman intensity	Raman activity	PED (%)
57	CC stretching (C–B) CCH bending (C) CCH bending (B)	1,210	1,203	1,216.1	vw/s	241.9	$\nu_{\text{CC}}$ (34) + $\delta_{\text{CCH}}$ (33)
56	COH bending (A) CCH bending (A)			1,178.5	vw/vw	3.7	$\nu_{\text{CC}}$ (14) + $\delta_{\text{COH}}$ (45)
55	COH bending (A) CCH bending (C)	1,181		1,170.3	vw/vw	64.0	$\nu_{\text{CO}}$ (26) + $\delta_{\text{COH}}$ (10) + $\delta_{\text{CCH}}$ (20)
54	CCH bending (B) CCH bending (A)	1,161	1,160	1,155.0	vw/vw	7.9	$\nu_{\text{CC}}$ (11) + $\delta_{\text{CCH}}$ (72)
53	CCH bending (A, B) COH bending (A)			1,126.6	w/vw	2.9	$\delta_{\text{CCH}}$ (49)
52	CCH bending (B)	1,103	1,110	1,125.1	vw/vw	6.3	$\delta_{\text{CCH}}$ (72)
51	CCH bending (A) CCC bending (A, C) CCO bending (A, C)	1,084		1,078.3	vw/vw	10.9	$\nu_{\text{OC}}$ (58)
50	CCH bending (B)			1,067.0	vw/vw	0.1	$\nu_{\text{CC}}$ (17) + $\delta_{\text{CCH}}$ (43)
49	CCH bending (A, C) COH bending (A)	1,031	1,032	1,054.1	m/vw	1.5	$\nu_{\text{CC}}$ (23) + $\delta_{\text{CCO}}$ (20) + $\delta_{\text{CCH}}$ (13)
48	CCH bending (B)	1,019		1,019.7	vw/vw	32.6	$\nu_{\text{CC}}$ (30) + $\delta_{\text{CCH}}$ (25) + $\delta_{\text{CCC}}$ (15)
47	CCH bending (A, B, C)			1,003.0	vw/vw	8.1	$\nu_{\text{CC}}$ (15) + $\delta_{\text{CCH}}$ (13)
46	CCH bending (B)	995	999	984.1	vw/vw	0.3	$\delta_{\text{COH}}$ (49)
45	CCH bending (B)	963		973.9	vw/vw	50.8	$\nu_{\text{CC}}$ (14) + $\delta_{\text{CCC}}$ (59)
44	CCH bending (B)			964.6	vw/vw	1.4	$\nu_{\text{OC}}$ (65) + $\delta_{\text{CCH}}$ (13)
43	CCH bending (B) CCC bending (A–C) CCO bending (C–B)	915		918.2	vw/vw	0.1	$\delta_{\text{CCH}}$ (39)
42	COC bending (C) CCH bending (C) COH bending (A)	897		892.2	vw/vw	3.0	$\nu_{\text{CC}}$ (13) + $\delta_{\text{CCC}}$ (11) + $\delta_{\text{COC}}$ (13)
41	CCH bending (A) COH bending (A) CCC bending (A)			874.5	vw/vw	5.3	$\nu_{\text{CC}}$ (35) + $\delta_{\text{CCH}}$ (15)
40	CCO bending (A–C) CCH bending (C)	852		848.7	vw/vw	0.9	$\delta_{\text{CCC}}$ (18) + $\delta_{\text{CCO}}$ (23)
39	CCH bending (B) CCC bending (A) CCO bending (C)			832.4	vw/vw	3.0	$\delta_{\text{HCC}}$ (54)
38	CCH bending (A) CCC bending (B)	824		820.8	vw/vw	1.7	$\delta_{\text{HCC}}$ (74)
37	CCO bending (A, C) CCC bending (B)			818.2	vw/vw	0.1	$\delta_{\text{CCO}}$ (35)
36	CCC bending (A) CCO bending (A–C)	778		772.5	vw/vw	0.7	$\nu_{\text{CC}}$ (11) + $\delta_{\text{CCC}}$ (14)
35	CCC bending (B) CCH bending (B)	748		760.8	vw/vw	2.4	$\nu_{\text{CC}}$ (15) + $\delta_{\text{CCC}}$ (11)

**Table 2** continued

Mode	Assignment	Exp. values		M05-2X/6-311+g(2df,p)			
		$\bar{\nu}_{\text{IR}}/\text{cm}^{-1}$	$\bar{\nu}_{\text{R}}/\text{cm}^{-1}$	$\bar{\nu}_{\text{scaled}}/\text{cm}^{-1}$	IR/Raman intensity	Raman activity	PED (%)
34	CCO bending (A, C) CCH bending (C)	734	729	707.9	vw/vw	0.2	$\delta_{\text{CCH}}$ (45)
33	CCC bending (A, C) CCO bending (A, C) CCH bending (A, C)	706	712	693.9	vw/vw	3.9	$\nu_{\text{OC}}$ (13) + $\delta_{\text{CCO}}$ (12) + $\delta_{\text{CCC}}$ (13)
32	CCC bending (A, B) CCO bending (A, C) CCH bending (B)	682		687.4	vw/vw	4.8	$\delta_{\text{CCO}}$ (12) + $\delta_{\text{CCC}}$ (24)
31	CCC bending (B) CCH bending (B)	668		679.1	vw/vw	0.5	$\delta_{\text{CCH}}$ (22) + $\delta_{\text{CCC}}$ (28)
30	CCH bending (B) COC bending (A–C)	638	645	655.6	vw/vw	2.51	$\delta_{\text{COC}}$ (12) + $\delta_{\text{CCH}}$ (26)
29	CCC bending (A, B) CCO bending (B)			627.6	vw/vw	0.6	$\delta_{\text{CCO}}$ (15) + $\delta_{\text{CCC}}$ (32)
28	CCOH torsion (A) CCCC torsion (A, C)	616	621	618.7	vw/vw	7.1	$\delta_{\text{CCO}}$ (30)
27	CCCC torsion (A, B, C) CCOH torsion (A)			602.0	vw/vw	23.8	$\nu_{\text{CC}}$ (28) + $\delta_{\text{CCC}}$ (24)
26	CCCH torsion (B) CCOH torsion (A)			596.9	vw/vw	9.2	$\delta_{\text{CCC}}$ (73)
25	CCCH torsion (A–C)	595		590.2	vw/vw	0.5	$\tau_{\text{HCCC}}$ (21) + $\tau_{\text{o.p. CCCO}}$ (60)
24	CCCH torsion (A) CCCO torsion (A, C)	572	576	557.6	vw/vw	6.2	$\delta_{\text{CCO}}$ (55)
23	CCCH torsion (A) CCCO torsion (A, C)	519	521	499.5	vw/vw	3.3	$\nu_{\text{OC}}$ (10) + $\delta_{\text{CCC}}$ (45)
22	CCCH torsion (A, B, C) CCCO torsion (A, C)	487	481	472.7	vw/vw	1.0	$\delta_{\text{CCC}}$ (13) + $\tau_{\text{CCCC}}$ (14)
21	CCCC torsion (A, B) CCCO torsion (A, C) CCCH torsion (A, B, C)	459		446.1	vw/vw	1.4	$\delta_{\text{CCC}}$ (14) + $\tau_{\text{CCCC}}$ (19)
20	HCCC torsion (A)	421	426	431.3	vw/vw	0.6	$\tau_{\text{HOCC}}$ (96)
19	CCOH torsion (A) CCCH torsion (A, B) CCCO torsion (A, C) CCCC torsion (A, B)			402.1	vw/vw	5.6	$\delta_{\text{CCC}}$ (19)
18	CCCC torsion (B) CCCH torsion (B)			392.6	vw/vw	1.7	$\tau_{\text{HCCC}}$ (16) + $\tau_{\text{CCCC}}$ (19)
17	CCCC o.p. torsion (B) CCCO o.p. torsion (B) CCCC torsion (A, B) CCCOC torsion (A–C)			380.6	vw/vw	2.1	$\tau_{\text{HOCC}}$ (10) + $\tau_{\text{o.p. CCCO}}$ (48)

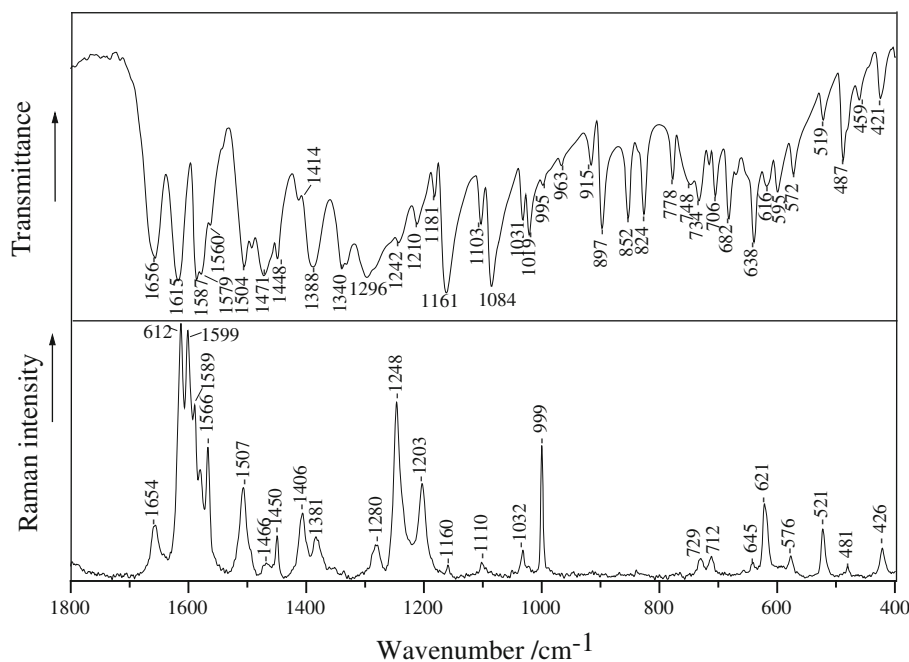
IR intensities are normalized with highest peak equal to 100. Raman intensities are calculated using the formulae for Raman intensity and then normalized to 100. Raman activity = Si of the normal mode

*o.p.* out-of-plane mode, *vw* very weak, *w* weak, *m* medium, *s* strong, *vs* very strong



**Fig. 2** Experimentally obtained (*top*) and theoretically calculated (*bottom*) IR (a) and Raman (b) spectra of baicalein

**Fig. 3** Region from 1,800 to 400  $\text{cm}^{-1}$  of the IR (*top*) and Raman (*bottom*) spectra of baicalein (potassium bromide matrix)



strong hydrogen bonding. These results are also confirmed by theoretical calculations (Table 1). The 3,850 to 3,200  $\text{cm}^{-1}$  region is also very characteristic of various C–H stretching modes, but in the experimentally obtained IR and Raman spectra no bands are observed (Fig. 2). The lack of bands readily assignable to the various C–H stretching modes could arise from the possible interactions of adjacent molecules in the crystal phase [31, 32]. As obvious from Table 2, the largest vibrational contributions to the normal stretching modes of rings A, B, and C in the 3,850 to 3,200  $\text{cm}^{-1}$  region are assigned solely to the stretching modes themselves. The rest of the vibrational modes are presented as the sum of various contributions.

The 1,700 to 1,400  $\text{cm}^{-1}$  IR and Raman regions (Fig. 3) are generally associated with the double-bond character of the carbonyl group, aromatic in-plane skeletal vibrations, and aromatic character of the pyrone ring [32–35]. In the IR spectrum of baicalein, the most intense bands appear in the 1,656 to 1,560  $\text{cm}^{-1}$  region (1,654 to 1,567  $\text{cm}^{-1}$  scaled DFT values), usually involving a combination of the C=O stretching (1,656 and 1,615  $\text{cm}^{-1}$ ), C2=C3 stretching (1,560  $\text{cm}^{-1}$ ), and C–C stretching (1,656, 1,615, 1,587, and 1,560  $\text{cm}^{-1}$ ) vibrations. In the Raman spectrum these bands appear in the 1,654–1,566  $\text{cm}^{-1}$  region, almost at the same positions as corresponding bands in the IR spectrum (1,654 and 1,612  $\text{cm}^{-1}$ ; 1,566  $\text{cm}^{-1}$ ; 1,654, 1,612, 1,589, and 1,566  $\text{cm}^{-1}$ ). As baicalein lacks a hydroxyl group at the C3-position the frequencies of both the C=O and C2=C3 stretching modes are slightly increased and positioned at higher values compared with 3-OH substituted flavones such as quercetin and some other flavonols

[35–37]. Most of the bands between 1,500 and 1,000  $\text{cm}^{-1}$  involve C–C stretching, O–C stretching, and in-plane C–C–H, C–O–H, C–C–O, and C–C–C bending vibrations of the rings. The plurality of less intense bands which appear only in the IR spectrum below 1,000, 1,019  $\text{cm}^{-1}$  (1,020  $\text{cm}^{-1}$  by DFT), 995 (984  $\text{cm}^{-1}$  by DFT), 963  $\text{cm}^{-1}$  (974  $\text{cm}^{-1}$  by DFT), 915  $\text{cm}^{-1}$  (918  $\text{cm}^{-1}$  by DFT), 897  $\text{cm}^{-1}$  (892  $\text{cm}^{-1}$  by DFT), 852  $\text{cm}^{-1}$  (849  $\text{cm}^{-1}$  by DFT), 824  $\text{cm}^{-1}$  (821  $\text{cm}^{-1}$  by DFT), 778  $\text{cm}^{-1}$  (772  $\text{cm}^{-1}$  by DFT), 748  $\text{cm}^{-1}$  (761  $\text{cm}^{-1}$  by DFT), 734  $\text{cm}^{-1}$  (708  $\text{cm}^{-1}$  by DFT), 716  $\text{cm}^{-1}$  (694  $\text{cm}^{-1}$  by DFT), 682  $\text{cm}^{-1}$  (687  $\text{cm}^{-1}$  by DFT), 668  $\text{cm}^{-1}$  (679  $\text{cm}^{-1}$  by DFT), and 638  $\text{cm}^{-1}$  (679  $\text{cm}^{-1}$  by DFT), is predominantly assigned to the C–C–C, C–C–H, C–C–O, C–O–C, and C–O–H deformation modes of all three rings. Bands that appear below 650  $\text{cm}^{-1}$  in both IR (616, 572, 519, 487, 459, and 421  $\text{cm}^{-1}$ ) and Raman spectra (621, 576, 521, 481, –, and 426  $\text{cm}^{-1}$ ) are assigned to in-plane C–C–C–C, C–C–O–H, C–C–C–H, and C–C–C–O torsional modes of the rings. DFT-predicted wavenumber values for the various torsional modes are, as all the rest of calculated modes, in very good agreement with experimentally measured values (618, 558, 499, 472, 446, and 431  $\text{cm}^{-1}$ ). Band around 400  $\text{cm}^{-1}$ , predicted only by DFT calculations, is assigned to out-of-plane C–C–C–C and C–C–C–O torsional modes of the B ring.

## Conclusions

The results of the applied M05-2X/6-311+G(2df,p) density functional method in determination of the spectroscopic and electronic features of baicalein point to a nonplanar molecule, characterized by an extended delocalization and conjugation of the  $p$  electrons, which exists in one stable form containing three hydrogen bonds. Spectral assignments, done on the basis of a best-fit comparison between the experimentally obtained and theoretically calculated IR and Raman spectra, match quite well, indicating DFT calculations as a very accurate source of normal mode assignments.

## Experimental

### Computational methods

The conformations of different baicalein forms were fully optimized with the new local density functional method (M05-2X), developed by the Truhlar group [38, 39], by using the 6-311+G(2df,p) basis set as implemented in the Gaussian 09 package [40]. This new hybrid meta exchange–correlation functional is parameterized for nonmetallic

compounds, yielding satisfactory overall performance for main-group thermochemistry and thermochemical kinetics, as well as organic, biological, and noncovalent interactions [38, 41, 42]. Moreover, this functional has been proven to give much better correlation between experimental and calculated band wavenumbers compared with DFT/B3LYP functional with 6-31G(d,p) basis set.

The vibrational frequencies were obtained from diagonalization of the corresponding M05-2X Hessian matrices. The nature of the stationary points was determined by analyzing the number of imaginary frequencies: 0 for minimum and 1 for transition state. Relative energies were calculated at 298 K.

The vibrational modes were assigned on the basis of PED analysis [30] using VEDA 4 program with its visualization interface [43]. Normal coordinate analysis of baicalein was carried out to obtain a more complete description of the molecular motions involved in the fundamentals. The calculated vibrational wavenumbers were scaled with the uniform scaling factor of 0.9444 [44–46] to obtain better match between calculated and experimental wavenumber values.

Potential energy surfaces were obtained in relation to the torsion angle  $\tau$  defined by the C3–C2–C1'–C2' atoms (Fig. 1) between rings B and C. The torsion angle  $\tau$  was scanned in steps of 10° without constraints on all other geometrical parameters. The effects of the following torsion angle rotations were also studied: C4–C5–OH, C5–C6–OH, and C6–C7–OH. Afterwards, the structures were further optimized without any constraint around each potential minimum. Particular attention was devoted to the DFT interpretation of the reactivity of OH groups in the parent molecule, and the radicals and cations formed after H-removal from the molecule.

Natural bond orbital (NBO) analysis [47–50] of baicalein was also performed. The Wiberg bond orders [51] were calculated using the GenNBO program. It should be noted that the Wiberg bond order (sometimes referred to as the Wiberg bond index) is equal to 1 and 2 for pure single and double bonds, respectively. In the case when a bond participates in some  $\pi$ -electron conjugation, its Wiberg bond order will assume a value between 1 and 2, with values closer to 2 indicating stronger double-bond character.

### IR spectra

IR spectra were recorded on a Thermo Nicolet 6700 FT-IR spectrometer with attenuated total reflectance (ATR). The spectra were recorded in the middle IR region from 4,000 to 400  $\text{cm}^{-1}$ , which is important for monitoring the structural changes of molecules. The spectral resolution was 2  $\text{cm}^{-1}$ . Baicalein (Merck, USA) was studied in potassium bromide matrix with sample:KBr ratio of 1 mg:150 mg.

## Raman spectra

Raman spectra were recorded on a Thermo Scientific Nicolet Almega XR Raman spectrometer. The spectra were obtained in the region from 3,500 to 500  $\text{cm}^{-1}$  directly from the pure powder sample. A 532-nm laser was used for sample illumination, enabling spectral resolution of 2  $\text{cm}^{-1}$ . The laser output was kept at 10 mW. Each spectrum was collected after 1 s of exposure. The number of exposures was ten. Fluorescence correction was applied.

The theoretical Raman intensities ( $I_i^R$ ) were derived from the computed Raman scattering activities using the following equations [52]:

$$I_i^R = C(v_0 - v_i)^4 v_i^{-1} B_i^{-1} S_i, \quad (1)$$

where  $B_i$  is a temperature factor which accounts for the intensity contribution of excited vibrational states, and is represented by the Boltzmann distribution:

$$B_i = 1 - \exp\left(-\frac{hv_i c}{kT}\right). \quad (2)$$

In Eq. (1),  $v_0$  is the wavenumber of the laser excitation line ( $v_0 = 18,797 \text{ cm}^{-1}$ , corresponding to wavelength of 532 nm),  $v_i$  is the normal mode wavenumber ( $\text{cm}^{-1}$ ), while  $S_i$  is the Raman scattering activity of normal mode  $Q_i$ . The theoretical Raman intensity,  $I_i^R$ , is given in arbitrary units ( $C$  is a constant equal to  $10^{-12}$ ). In Eq. (2)  $h$ ,  $k$ ,  $c$ , and  $T$  are the Planck and Boltzmann constants, speed of light, and temperature in Kelvin, respectively. The factor  $B_i$  was assumed to be 1; otherwise, the calculated Raman intensities for the bands below 300  $\text{cm}^{-1}$  were extremely overestimated in comparison with experiment [53].

**Acknowledgments** The authors acknowledge financial support by the Ministry of Science of Republic of Serbia (grant no. 172015).

## References

- Harborne JB, Williams CA (2000) *Phytochemistry* 55:481
- Cody V, Middleton E, Harborne JB (1986) *Plant flavonoids in biology and medicine: biochemical, pharmacological, and structure-activity relationships*. Alan R Liss, New York
- Cody V, Middleton EJ, Harborne JB, Beretz A (1988) *Plant flavonoids in biology and medicine II: biochemical, cellular, and medicinal properties*. Alan R Liss, New York
- Lambert JD, Sang SM, Yang CS (2007) *Chem Res Toxicol* 20:583
- Rechner AR, Kuhnle G, Bremner P, Hubbard GP, Moore KP, Rice-Evans CA (2002) *Free Radical Biol Med* 33:220
- Lee KW, Lee HJ (2006) *BioFactors* 26:105
- Cook NC, Samman S (1996) *Nutr Biochem* 7:66
- Rice-Evans C, Miller N (1996) *Biochem Soc Trans* 24:790
- Pietta PG (2000) *J Nat Prod* 63:1035
- Cao G, Sofic E, Prior R (1997) *Free Radical Biol Med* 22:749
- Haslam E (1996) *J Nat Prod* 59:205
- Larson RA (1997) *Naturally occurring antioxidants*. Lewis Publishers, CRC Press LLC, Boca Raton
- Pietta PG (1997) In: Rice-Evans CA, Packer L, Dekker M (eds) *Flavonoids in health and disease*. Marcel Dekker, New York
- Sies H (1986) *Angew Chem Int Edit* 25:1058
- Diplock AT (1994) In: Rice-Evans CA, Burdon RH (eds) *Free radical damage and its control*. New comprehensive biochemistry, vol 28. Elsevier, Amsterdam
- Husain SR, Cillard J, Cillard P (1987) *Phytochemistry* 26:2489
- Rice-Evans C, Miller NJ, Bolwell PG, Bramley PM, Pridham JB (1995) *Free Radic Res* 22:375
- van Acker SABE, van de Berg DJ, Tromp MNJL, Griffioen DH, van Bennekom WP, van der Vijgh WJF, Bast A (1996) *Free Radical Biol Med* 20:331
- Marković ZS, Mentus SV, Dimitrić Marković JM (2009) *J Phys Chem A* 113:14170
- Marković ZS, Dimitrić Marković JM, Milenković D, Filipović N (2011) *J Mol Model* 17:2575
- Marković ZS, Dimitrić Marković JM, Dolićanin ĆB (2010) *Theor Chem Acc* 127:69
- Wolniak M, Oszmianski J, Wawer I (2008) *Magn Reson Chem* 46:215
- Perez CA, Wei Y, Guo M (2009) *J Inorg Biochem* 103:326
- Li BQ, Fu T, Dongyan Y, Mikovits JA, Ruscetti FW, Wang JM (2000) *Biochem Biophys Res Commun* 276:534
- Duen-Suey C, Jie-Jen L, George H, Cheng-Ying H, Yan-Jyu T, Tzeng-Fu C, Joen-Rong SJ (2007) *J Agric Food Chem* 55:649
- Kitamura K, Honda M, Yoshizaki H, Yamamoto S, Nakane H, Fukushima M, Ono K, Tokunaga T (1998) *Antiviral Res* 37:131
- Rezabal E, Mercero JM, Lopez X, Ugalde JM (2007) *J Inorg Biochem* 101:1192
- Hibbs DE, Overgaard C, Gatti T, Hambley W (2003) *New J Chem* 27:1392
- Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G (1996) *Free Radical Biol Med* 20:933
- Munos RA, Panchenko YN, Koptev G, Stepanov NF (1970) *J Appl Spectrosc* 12:428
- Jurasekova Z, Garcia-Ramos JV, Domingo C, Sanchez-Cortes S (2006) *J Raman Spectrosc* 37:1239
- Teslova T, Corredor C, Livingstone R, Spataru T, Birke RL, Lombardi JR, Canameres MV, Leona M (2007) *J Raman Spectrosc* 38:802
- Varsanayi G (1974) *Assignments for vibrational spectra of 700 benzene derivatives*. Adam Hilger, London
- Torreggiani A, Jurasekova Z, Sanchez-Cortes S, Tamba M (2008) *J Raman Spectrosc* 39:265
- Jurasekova Z, Torreggiani A, Tamba M, Sanchez-Cortes S, Garcia-Ramos JV (2009) *J Mol Struct* 918:129
- Torreggiani A, Trincherio A, Tamba M, Taddei P (2005) *J Raman Spectrosc* 36:380
- Wang M, Teslova T, Xu F, Spataru T, Lombardi JR, Birke RL (2007) *J Phys Chem C* 111:3038
- Zhao Y, Schultz NE, Truhlar DG (2008) *Theor Chem Acc* 120:215
- North MA, Bhattacharyya S, Truhlar DG (2010) *J Phys Chem B* 114:14907
- Frisch MJ, Trucks GW, Schlegel HB, Scuseria GE, Robb MA, Cheeseman JR, Zakrzewski VG, Montgomery Jr JA, Stratmann RE, Burant JC, Dapprich S, Millam JM, Daniels AD, Kudin KN, Strain MC, Farkas O, Tomasi J, Barone V, Cossi M, Cammi R, Mennucci B, Pomelli C, Adamo C, Clifford S, Ochterski J, Petersson GA, Ayala PY, Cui Q, Morokuma K, Malick AD, Rabuck KD, Raghavachari K, Foresman JB, Cioslowski J, Ortiz JV, Babou AG, Stefanov BB, Liu G, Liashenko A, Piskorz P, Komaromi I, Gomperts R, Martin RL, Fox DJ, Keith T, Al-Laham MA, Peng CY, Nanayakkara A, Challacombe M, Gill PMW,



- Johnson B, Chen W, Wong MW, Andres JL, Gonzalez C, Head-Gordon M, Replogle ES, Pople JA (2009) Gaussian 09, Revision A.1-SMP, Gaussian Inc, Wallingford, CT
41. Zhao Y, Schultz NE, Truhlar DG (2005) *J Chem Phys* 123:161103
  42. Zhao Y, Schultz NE, Truhlar DG (2006) *J Chem Theory Comput* 2:364
  43. Jamróz MH (2004) *Vibrational energy distribution analysis. VEDA 4*, Warsaw
  44. Wong MW (1996) *Chem Phys Lett* 256:391
  45. Scott AP, Radom LJ (1996) *J Phys Chem* 100:16502
  46. Jalkanen KJ, Stephens PJ (1991) *J Phys Chem* 95:5446
  47. Reed AE, Weinstock RB, Weinhold F (1985) *J Chem Phys* 83:735
  48. Glendening E, Reed AE, Carpenter JE, Weinhold F (2012) *NBO Version 3.1*
  49. Reed AE, Curtiss LA, Weinhold F (1988) *Chem Rev* 88:899
  50. Carpenter JE, Weinhold F (1988) *J Mol Struct* 169:41
  51. Wiberg KB (1968) *Tetrahedron* 24:1083
  52. Unsalan O, Erdogdub Y (2009) *J Raman Spectrosc* 40:562
  53. Wysokinsk R, Hernik K, Szostak R, Michalska D (2007) *Chem Phys* 333:37