



UNIVERZITET U NIŠU
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET
DEPARTMAN ZA HEMIJU



Slavoljub C. Živanović

**Uticaj Mg(II) i Ca(II) jona na autooksidaciju
orto-dihidroksi fenolnih jedinjenja u vodenim
rastvorima**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Niš, 2018.



UNIVERSITY OF NIŠ
FACULTY OF SCIENCES AND MATHEMATICS
DEPARTMENT OF CHEMISTRY



Slavoljub C. Živanović

**The influence of Mg(II) and Ca(II) ions on the
ortho-dihydroxy phenolic compounds
autoxidation in aqueous solutions**

DOCTORAL DISSERTATION

Niš, 2018.

Mentor

dr Goran Nikolić, redovni profesor,
Univerzitet u Nišu, Medicinski fakultet

Članovi komisije

Ime i prezime:

Institucija:

Ime i prezime:

Institucija:

Ime i prezime:

Institucija:

Ime i prezime:

Institucija:

Datum odbrane ____ . ____ . ____ . god.

Eksperimentalni deo ove doktorske disertacije urađen je u laboratorijama Naučnoistraživačkog centra za biomedicinu Medicinskog fakulteta u Nišu, Odeska za farmaciju Medicinskog fakulteta u Nišu i na Prirodno-matematičkom fakultetu u Nišu.

Izrada disertacije je realizovana u okviru projekata III 41018 i OI 172044 Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

Najsrdajnije se zahvaljujem mentoru, dr Goranu Nikoliću, redovnom profesoru Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu, koji je predložio temu disertacije, rukovodio njenom izradom i svojim nesebičnim angažovanjem i savetima značajno doprineo izradi disertacije i njenom konačnom izgledu.

Posebnu zahvalnost dugujem dr Ružici Nikolić, penzionisanom redovnom profesoru Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Nišu, koja je u jednom periodu bila moj mentor i samim time, u velikoj meri uticala na kvalitet disertacije.

Veliku zahvalnost upućujem dr Danijeli Kostić, redovnom profesoru Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Nišu, na korisnim sugestijama i pruženoj pomoći tokom jednog dela eksperimentalnog rada.

Zahvaljujem se dr Žarku Mitiću, vanrednom profesoru Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu na stručnoj pomoći i saradnji pri izradi disertacije.

Na kraju se zahvaljujem kolegama, prijateljima, porodici i svima koji su na bilo koji način doprineli da ova disertacija ugleda svetlost dana.

Подаци о докторској дисертацији

Ментор:	Др Горан М. Николић, редовни професор, Универзитет у Нишу, Медицински факултет
Наслов:	Утицај Mg(II) и Ca(II) јона на аутооксидацију <i>орто</i> -дихидрокси фенолних једињења у воденим растворима
Резиме:	<p>У овој дисертацији је испитиван утицај дијамагнетних металних јона Mg(II) и Ca(II), на аутооксидацију полифенолних једињења, које садрже једну или две <i>орто</i>-дихидроксилне групе, у воденим растворима на различитим рН вредностима. Праћена је аутооксидација полифенола распрострањених у природи, и то: катехола, кафене киселине, рузмаринске киселине, хлорогенске киселине, рутина и хематоксилина. У ту сврху су примењене следеће инструменталне методе: UV/Vis спектрофотометрија са накнадном хеометријском обрадом UV/Vis спектра, ESR спектроскопија, течна хроматографија високих перформанси (HPLC) и масена спектрометрија (MS).</p> <p>Показано је да рН вредност раствора и/или присуство и врста металних јона утичу на брзину и начин одвијања процеса аутооксидације испитиваних једињења. Примењене технике су омогућиле утврђивање броја и структура, како међупроизвода, тако и стабилних производа аутооксидације.</p> <p>Добијени резултати омогућавају стицање детаљнијег увида у механизме антиоксидативних активности проучаваних полифенола и свеобухватније сагледавање њиховог биохемијског деловања са евентуалним последицама у хуманој употреби.</p>
Научна област:	Хемија
Научна дисциплина:	Неорганска хемија
Кључне речи:	аутооксидација, катехол, кафена киселина, рутин, рузмаринска киселина, хематоксин, хлорогенска киселина, магнезијум, калцијум
УДК:	546.4:[542.943:547.565.2(043.3)
CERIF класификација:	P 360
Тип лиценце Креативне заједнице:	CC BY-NC-ND

Data on Doctoral Dissertation

Doctoral Supervisor:	dr Goran M. Nikolić, full professor, University of Niš, Faculty of Medicine
Title:	The influence of Mg(II) and Ca(II) ions on the <i>ortho</i> -dihydroxy phenolic compounds autoxidation in aqueous solutions
Abstract:	<p>In this dissertation, the influence of diamagnetic metal ions Mg (II) and Ca (II) on the autoxidation of polyphenol compounds, containing one or two <i>ortho</i>-dihydroxyl groups, in aqueous solutions at different pH values, was studied. The autoxidation of polyphenols distributed in nature, such as: catechol, caffeic acid, rosmarinic acid, chlorogenic acid, rutin and hematoxylin was investigated. For this purpose, the following instrumental methods were applied: UV/Vis spectrophotometry with subsequent hemometric treatment of UV/Vis spectra, ESR spectroscopy, high performance liquid chromatography (HPLC) and mass spectrometry (MS).</p> <p>It has been shown that the pH value of the solution and/or the presence and type of metal ions affect the speed and manner of the autoxidation processes of the investigated compounds. Applied techniques have enabled the determination of the number and structure of intermediate products as well as stable autoxidation products.</p> <p>The obtained results allow a more detailed insight into mechanisms of antioxidative activities of studied polyphenols and a more comprehensive view of their biochemical behavior with the implications for further human use.</p>
Scientific Field:	Chemistry
Scientific Discipline:	Inorganic chemistry
Key Words:	autooxidation, catechol, caffeic acid, rutin, rosmarinic acid, hematoxylin, chlorogenic acid, magnesium, calcium
UDC:	546.4:[542.943:547.565.2(043.3)
CERIF Classification:	P 360
Creative Commons License Type:	CC BY-NC-ND



**ПРИРОДНО - МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ
НИШ**

КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАЦИЈА

Редни број, РБР:	
Идентификациони број, ИБР:	
Тип документације, ТД:	монографска
Тип записа, ТЗ:	текстуални / графички
Врста рада, ВР:	докторска дисертација
Аутор, АУ:	Славољуб Ц. Живановић
Ментор, МН:	Горан М. Николић
Наслов рада, НР:	Утицај Mg(II) и Ca(II) јона на аутооксидацију орто-дихидрокси фенолних једињења у воденим растворима
Језик публикације, ЈП:	српски
Језик извода, ЈИ:	енглески
Земља публикавања, ЗП:	Србија
Уже географско подручје, УГП:	Србија
Година, ГО:	2018.
Издавач, ИЗ:	ауторски репринт
Место и адреса, МА:	Ниш, Вишеградска 33.
Физички опис рада, ФО: (поглавља/страна/ цитата/табела/слика/графика/прилога)	9 поглавља, 180 страна, 130 цитата, 10 табела, 140 слика
Научна област, НО:	Хемија
Научна дисциплина, НД:	Неорганска хемија
Предметна одредница/Кључне речи, ПО:	аутооксидација, катехол, кафена киселина, рутин, рузмаринска киселина, хематоксилин, хлорогенска
УДК	546.4:[542.943:547.565.2(043.3)]
Чува се, ЧУ:	библиотека
Важна напомена, ВН:	Израда дисертације је реализована у оквиру пројеката ИИИ 41018 и ОИ 172044 Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије.

Извод, ИЗ:	<p>У овој дисертацији је испитиван утицај дијамагнетних металних јона Mg(II) и Ca(II), на аутооксидацију полифенолних једињења, које садрже једну или две орто-дихидроксилне групе, у воденим растворима на различитим рН вредностима. Праћена је аутооксидација полифенола, распрострањених у природи, и то: катехола, кафене киселине, рузмаринске киселине, хлорогенске киселине, рутина и хематоксилина. У ту сврху су примењене следеће инструменталне методе: UV/Vis спектрофотометрија са накнадном хемотриметријском обрадом UV/Vis спектра, ESR спектроскопија, течна хроматографија високих перформанси (HPLC) и масена спектрометрија (MS).</p> <p>Показано је да рН вредност раствора и/или присуство и врста металних јона утичу на брзину и начин одвијања процеса аутооксидације испитиваних једињења. Примењене технике су омогућиле утврђивање броја и структура, како међупроизвода, тако и стабилних производа аутооксидације.</p> <p>Добијени резултати омогућавају стицање детаљнијег увида у механизме антиоксидативних активности проучаваних полифенола и свеобухватније сагледавање њиховог биохемијског деловања са евентуалним последицама у хуманој употреби.</p>
Датум прихватања теме, ДП:	03.12.2014.
Датум одбране, ДО:	
Чланови комисије, КО:	Председник: <hr/> Члан: <hr/> Члан: <hr/> Члан: <hr/> Члан, ментор:

Образац Q4.09.13 - Издање 1



КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАЦИЈА

Document type, DT :	monograph
Type of record, TR :	textual / graphic
Contents code, CC :	doctoral dissertation
Author, AU :	Slavoljub C. Živanović
Mentor, MN :	Goran M. Nikolić
Title, TI :	The influence of Mg(II) and Ca(II) ions on the <i>ortho</i> -dihydroxy phenolic compounds autoxidation in aqueous solutions
Language of text, LT :	Serbian
Language of abstract, LA :	English
Country of publication, CP :	Serbia
Locality of publication, LP :	Serbia
Publication year, PY :	2018
Publisher, PB :	author's reprint
Publication place, PP :	Niš, Višegradska 33.
Physical description, PD : (chapters/pages/ref./tables/pictures/graphs/appendixes)	9 chapters, 180 pages, 130 references, 10 tables, 140 pictures
Scientific field, SF :	Chemistry
Scientific discipline, SD :	Inorganic chemistry
Subject/Key words, S/KW :	autooxidation, catechol, caffeic acid, rutin, rosmarinic acid, hematoxylin, chlorogenic acid, magnesium, calcium
UC	546.4:[542.943:547.565.2(043.3)]
Holding data, HD :	library
Note, N :	This work was performed within the Projects No. III 41018 and OI 172044 of Ministry of Education, Science and Technological Development of the Republic of Serbia

Abstract, AB :	<p>In this dissertation, the influence of diamagnetic metal ions Mg (II) and Ca (II) on the autoxidation of polyphenol compounds, containing one or two <i>ortho</i>-dihydroxyl groups, in aqueous solutions at different pH values, was studied. The autoxidation of polyphenols distributed in nature, such as: catechol, caffeic acid, rosmarinic acid, chlorogenic acid, rutin and hematoxylin was investigated. For this purpose, the following instrumental methods were applied: UV/Vis spectrophotometry with subsequent hemometric treatment of UV/Vis spectra, ESR spectroscopy, high performance liquid chromatography (HPLC) and mass spectrometry (MS).</p> <p>It has been shown that the pH value of the solution and/or the presence and type of metal ions affect the speed and manner of the autoxidation processes of the investigated compounds. Applied techniques have enabled the determination of the number and structure of intermediate products as well as stable autoxidation products.</p> <p>The obtained results allow obtaining a more detailed insight into mechanisms of antioxidative activities of studied polyphenols and a more comprehensive view of their biochemical behavior with the implications for further human use.</p>
Accepted by the Scientific Board on, ASB :	03.12.2014.
Defended on, DE :	
Defended Board, DB :	
Member, Mentor:	

Образац Q4.09.13 - Издање 1

LISTA SIMBOLA, SKRAĆENICA I IZRAZA

Skraćenica	Značenje
ACN	Acetonitril
APX	Askorbat peroksidaza
ATP	Adenozin trifosfat
BDE	Energija disocijacije veze (Bond Dissociation Enthalpy)
CA	Kafena kiselina
CAT	Katalaza
Cat	Katehol
CGA	Hlorogenska kiselina
CI	Hemijska jonizacija
Da	Dalton
DAD	Diode array detector
DNK	Dezoksiribonukleinska kiselina
EFA	Evolving Factor Analysis (kod MCR-ALS analize)
EI	Elektronska jonizacija
EPR	Elektronska paramagnetna rezonanca
ESI-MS	Elektrosprej jonizacija – masena spektrometrija
ESR	Elektronska spinska rezonanca
FAB	Jonizacija brzim atomima

G	Gaus
GPX	Gvajakol peroksidaza
HAT	Transfer atoma vodonika (Hydrogen-atom transfer)
Hm	Hematein
HOMO	Najviša popunjena molekulska orbitala (Highest Occupied Molecular Orbital)
HPLC	Tečna hromatografija visokih performansi
Htx	Hematoksilin
IL	Interleukin
IP	Jonizacioni potencijal (Ionization Potential)
LC/MS	Tečna hromatografija/masena spektrometrija
LOF	Lack-of-fit (kod MCR-ALS analize)
LUMO	Najniža nepopunjena molekulska orbitala (Lowest Unoccupied Molecular Orbital)
m/z	odnos mase i naelektrisanja
MALDI	Desorpcija/ionizacija laserom uz pomoć matrice
MCR-ALS	Multivariate curve resolution-alternating least squares
MeOH	Metanol
MM	Molarna masa
MS	Masena spektrometrija
PCA	Principal Component Analysis (kod MCR-ALS analize)
Ph	Polifenol
Q	Hinon

r ²	Procenat varijanse na optimumu (kod MCR-ALS analize)
RA	Ruzmarinska kiselina
ROS	Reaktivne kiseonične vrsta (Reactive Oxygen Species)
RP HPLC	Reversno-fazna tečna hromatografija visokih performansi
RT	Retenciono vreme
Rut	Rutin
SET	Transfer jednog elektrona (Single-electron transfer)
SET-PT	Transfer elektrona praćenim transferom protona (Single electron transfer followed by proton transfer)
SOD	Superoksid dismutaza
SPLET	Gubitak protona transfer elektrona redom (Sequential proton loss electron transfer)
SQ	Semihinon
SVD	Singular value decomposition (kod MCR-ALS analize)
TIC	Ukupna jonska struja
TOF	Time-of- flight
UV/Vis	Ultraljubičasta-vidljiva spektrofotometrija

S A D R Ž A J

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DEO	5
2.1. Autooksidacija i reaktivne kiseonične vrste	6
2.2. Polifenoli kao antioksidansi	11
2.2.1. Pojam i podela polifenola	11
2.2.2. Antioksidativna svojstva polifenola	14
2.2.3. Prooksidativna svojstva polifenola	17
2.3. Ispitivana polifenolna jedinjenja	19
2.3.1. Katehol	19
2.3.2. Kafena kiselina	20
2.3.3. Hlorogenska kiselina	21
2.3.4. Rutin	21
2.3.5. Ruzmarinska kiselina	22
2.3.6. Hematoksilin	23
2.4. Uloga i značaj metalnih jona u biološkim sistemima	24
2.4.1. Magnezijum	25
2.4.2. Kalcijum	27
2.4.3. Uticaj dvovalentnih dijamagnetnih metalnih jona na autooksidaciju polifenola	27
2.5. Metode i tehnike ispitivanja procesa autooksidacije	29
2.5.1. UV/Vis spektrofotometrija	30
2.5.1.1. MCR-ALS obrada podataka	30
2.5.2. Tečna hromatografija visokih performansi	33
2.5.3. Elektrosprej jonizaciona masena spektrometrija (ESI-MS)	35
2.5.4. Elektron spin rezonantna spektroskopija	38

3. EKSPERIMENTALNI DEO.....	40
3.1. Materijal i metode	41
3.2. UV/Vis spektrofotometrija.....	42
3.2.1. Hemometrijska obrada dobijenih UV/Vis spektara	44
3.3. HPLC-DAD analiza	46
3.4. LC/MS analiza.....	47
3.5. ESR spektroskopija	47
4. REZULTATI I DISKUSIJA.....	49
4.1. Katehol	50
4.1.1. Autooksidacija katehola na pH 8,4	50
4.1.1.1. UV/Vis spektralna analiza.....	50
4.1.1.2. HPLC-DAD analiza	53
4.1.1.3. ESI-MS analiza	58
4.1.1.4. ESR analiza	60
4.1.2. Autooksidacija katehola na pH 7,4	63
4.1.2.1. HPLC-DAD analiza	63
4.2. Kafena kiselina.....	67
4.2.1. Autooksidacija kafene kiseline na pH 8,4.....	67
4.2.1.1. UV/Vis spektralna analiza.....	67
4.2.1.2. HPLC-DAD analiza	71
4.2.1.3. LC/MS analiza.....	76
4.2.1.4. ESR analiza	82
4.2.2. Autooksidacija kafene kiseline na pH 7,4.....	85
4.2.2.1. HPLC-DAD analiza	85
4.3. Hlorogenska kiselina	89
4.3.1. Autooksidacija hlorogenske kiseline na pH 8,4.....	89

4.3.1.1. UV/Vis spektralna analiza.....	89
4.3.1.2. HPLC-DAD analiza	92
4.3.1.3. ESI-MS analiza	96
4.3.1.4. ESR analiza	97
4.3.2. Autooksidacija hlorogenske kiseline na pH 7,4.....	98
4.3.2.1. HPLC-DAD analiza	98
4.4. Rutin.....	103
4.4.1. Autooksidacija rutina na pH 8,4.....	103
4.4.1.1. UV/Vis spektralna analiza.....	103
4.4.1.2. HPLC-DAD analiza	107
4.4.1.3. ESR analiza	112
4.4.2. Autooksidacija rutina na pH 7,4.....	114
4.4.2.1. HPLC-DAD analiza	114
4.5. Ruzmarinska kiselina	117
4.5.1. Autooksidacija ruzmarinske kiseline na pH 8,4.....	117
4.5.1.1. UV/Vis spektralna analiza.....	117
4.5.1.2. HPLC-DAD analiza	121
4.5.1.3. ESI-MS analiza	124
4.5.2. Autooksidacija ruzmarinske kiseline na pH 7,4.....	126
4.5.2.1. HPLC-DAD analiza	126
4.6. Hematoksilin	131
4.6.1. Autooksidacija hematoksilina na pH 8,4.....	131
4.6.1.1. UV/Vis spektralna analiza.....	131
4.6.1.2. HPLC-DAD analiza	137
4.6.1.3. ESI-MS analiza	142
4.6.1.4. ESR analiza	148

4.6.2. Autooksidacija hematoksilina na pH 7,4.....	149
4.6.2.1. HPLC-DAD analiza	149
5. ZAKLJUČAK	153
6. LITERATURA	156
7. BIOGRAFIJA	169
8. BIBLIOGRAFIJA	171
9. IZJAVE AUTORA	177

1. Uvod

Polifenolna jedinjenja obuhvataju široku grupu fitohemikalija, sekundarnih biljnih metabolita, sa potencijalno pozitivnim efektom na ljudsko zdravlje. Zbog ovoga, ali i činjenice da su, usled široke rasprostranjenosti u voću, povrću i drugim biljkama, znatno zastupljena u ljudskoj ishrani, poslednjih godina raste interesovanje za njihovo veoma intenzivno proučavanje. Kao rezultat značajne biološke i farmakološke aktivnosti koje poseduju, polifenolna jedinjenja ispoljavaju zaštitna svojstva kod nekih hroničnih bolesti, a pokazuju i kardioprotektivni i antikancerogeni efekat (Crozier et al. 2009, Knekt et al. 2002).

Navedene protektivne karakteristike polifenola potiču od njihovih antioksidativnih svojstava, tj. relativne lakoće oksidacije, a koja je usko povezana sa molekulskom strukturom polifenola, naročito sa prisustvom i rasporedom hidroksilnih grupa. Posebno značajne antioksidativne osobine ispoljavaju polifenolna jedinjenja koja u svom molekulu sadrže dve, odnosno, tri hidroksilne grupe na susednim atomima ugljenika benzenovog prstena (Heim et al. 2002, Rice-Evans et al. 1996).

Antioksidativna svojstva polifenola proizilaze iz njihovih sposobnosti da stupaju u reakciju i da neutrališu slobodne radikale, molekule koji, zbog svoje velike i neselektivne reaktivnosti mogu da izazovu oštećenja nekih značajnih biomolekula i samim tim dovedu do pojave raznovrsnih oboljenja. Slobodni radikali su reaktivne molekulске vrste koje nastaju u organizmu spontano tokom normalne metaboličke aktivnosti ćelija, ali često i pod uticajem različitih polutanata. Svojom antioksidativnom aktivnošću, polifenoli mogu da spreče štetno delovanje slobodnih radikala, ispoljavajući pozitivan uticaj na ljudsko zdravlje. Na autooksidaciju, kao hemijski proces, značajan uticaj imaju faktori sredine kao što su pH i prisustvo jona metala, a posebno je za delovanje ovih jedinjenja u biološkim sistemima značajno prisustvo jona koji su prirodno zastupljeni u živim ćelijama. Rezultati prethodnih proučavanja pokazuju da sa povećanjem pH sredine i/ili prisustvom jona metala dolazi do ubrzanja procesa autooksidacije (Lebedev et al. 2007, Nikolic et al. 1998).

U većini ovih istraživanja je proučavan uticaj jona bioloških mikroelemenata, kao što su Cu, Fe, Zn (García et al. 1996, Lim et al. 2005, Nkhili et al. 2014), dok je relativno mala pažnja posvećena jonima makroelemenata (Ca i Mg), čiji je sadržaj u ljudskom organizmu višestruko veći u odnosu na mikroelemente. Pored toga, većina publikacija koja se odnosi na ovu temu, bavila se autooksidacijom polifenola koji sadrže jedan par hidroksilnih grupa u *orto* položaju (Albarran et al. 2010, McBride 1989).

U ovoj doktorskoj disertaciji predmet proučavanja je autooksidacija polifenolnih jedinjenja koja sadrže, kako jedan, tako i dva para *orto*-dihidroksilnih grupa u prisustvu jona kalcijuma i magnezijuma na različitim pH vrednostima.

Najpre je ispitivana autooksidacija katehola (1,2-dihidroksibenzena), kao najjednostavnijeg molekula koji sadrži dve susedne hidroksilne grupe vezane za benzenov prsten. Molekul katehola se nalazi u strukturi većih polifenolnih jedinjenja, tako da može služiti kao model za proučavanje različitih vrsta hemijskih reakcija karakterističnih za *orto*-dihidroksilne grupe, kao što su oksidacija, kompleksiranje i kuplovanje (Šmejkalová et al. 2007).

Kafena kiselina (3,4-dihidroksicimetna kiselina) je jedna od najrasprostranjenijih fenolnih kiselina. Nalazi se u hrani (borovnice, kivi, šljive, višnje, jabuke) i piću (kafa, vino, čaj), kako u slobodnom tako i u esterifikovanom obliku (Manach et al. 2004).

Hlorogenska kiselina je po hemijskoj strukturi estar kafene i hinske kiseline. Veoma je rasprostranjena u prirodi, a pogotovo se može naći u kafi, breskvama, šljivama, trešnjama i sl. (Munoz et al. 2007a).

Ruzmarinska kiselina predstavlja estar kafene i 3,4-dihidroksifenilmlečne kiseline. Pored hlorogenske kiseline, jedan od najzastupljenijih estara kafene kiseline, široko rasprostranjena u mnogim biljnim vrstama. Posедуje dve *orto*-dihidroksilne grupe u različitim delovima molekula (Petersen 2013).

Rutin, ili kvercetin-3-O-rutinozid, je glikozid koga čine flavonol kvercetin i disaharid rutinoza. Rutin pripada grupi flavonoida koji se najčešće mogu sresti u prirodi. Veoma je rasprostranjen u biljkama (voću, povrću, crnom čaju...), a naročito je zastupljen u žitarici heljdi (Fabjan et al. 2003).

Hematoksilin (7,11b-dihidroindeno[2,1-c]hromen-3,4,6a,9,10(6H)-pentol) je prirodno polifenolno jedinjenje izolovano iz srži stabla drveta *Haematoxylum campechianum* koje potiče iz Centralne Amerike (Titford 2005). Slično ruzmarinskoj kiselini, sadrži dve *orto*-dihidroksilne grupe, smeštene u različitim delovima molekula.

Autooksidacija navedenih jedinjenja u vodenim rastvorima je proučavana u zavisnosti od spoljašnjih faktora, i to pH rastvora i prisustva jona Mg(II) i Ca(II), koji su sveprisutni u biološkim sistemima i u njima imaju višestruke uloge, počev od građivnih pa do funkcionalnih

(intracelularnih i ekstracelularnih). Često su sastavni delovi metaloenzima, neophodnih za odvijanje normalnih biohemijskih procesa. Sa druge strane, ovi dvovalentni metalni joni mogu ispoljiti i negativan efekat svojim uticajem na autooksidaciju *orto*-dihidroksilnih fenolnih jedinjenja.

Zbog svega navedenog, predmet ove disertacije je ispitivanje uticaja dvovalentnih dijamagnetnih jona Mg(II) i Ca(II) na autooksidaciju navedenih polifenolnih jedinjenja sa jednim, odnosno, dva para *orto*-dihidroksilnih grupa u molekulima, uz pojašnjenje mehanizama njihove autooksidacije.

U tom cilju su korišćene sledeće instrumentalne metode i tehnike hemijske analize:

Ultraljubičasta i vidljiva (UV/Vis) spektrofotometrija, koja je dala osnovne podatke o toku reakcija autooksidacija sa vremenom. Naknadnom obradom dobijenih UV/Vis spektara primenom metode MCR-ALS (Multivariate Curve Resolution – Alternating Least Squares) određen je kinetički profil praćenih reakcija pri čemu su dobijeni i spektri pojedinih komponenti sistema.

Elektron spin rezonantna spektroskopija (ESR) je upotrebljena za detekciju i određivanje molekulske strukture prelaznih, spinski stabilisanih, slobodno-radikalnih vrsta nastalih tokom procesa autooksidacije.

Tečna hromatografija visokih performansi (HPLC) je korišćena za hromatografsko razdvajanje i utvrđivanje broja proizvoda autooksidacije. Upotrebom detektora DAD (Diode Array Detector), kojim su snimljeni UV/Vis spektri razdvojenih jedinjenja, ostvarena je i njihova delimična karakterizacija.

Korišćenjem instrumentalne tehnike masene spektrometrije (MS) utvrdili smo detaljnije strukture pojedinih proizvoda autooksidacije i ostvarili njihovu potpuniju karakterizaciju.

Ovim istraživanjem je određen broj i potencijalna struktura međuproizvoda nastalih tokom reakcija autooksidacija ispitivanih polifenolnih jedinjenja u prisustvu dijamagnetnih jona metala, Mg(II) i Ca(II). Time je omogućeno sticanje detaljnijeg uvida u mehanizme antioksidativne aktivnosti proučavanih polifenola i sveobuhvatnije sagledavanje njihovog biohemijskog delovanja, sa ciljem određivanja uslova za bezbednu upotrebu prehrambenih proizvoda i preparata koji ih sadrže.

2. Teorijski deo

2.1. Autooksidacija i reaktivne kiseonične vrste

Oksidacioni procesi imaju ogroman uticaj na naš svakodnevni život. Okruženi smo nebrojenim i raznovrsnim pojavama oksidacione prirode, a veliki broj reakcija oksidacije se događa unutar bioloških sistema, omogućavajući njihovo funkcionisanje. Oksidacija može biti relativno jednostavan process, ali i izuzetno složen i veoma komplikovan za razumevanje.

Poseban vid oksidacije predstavlja autooksidacija. Ona podrazumeva svaku spontanu oksidaciju koja se dešava u prisustvu kiseonika ili na vazduhu. Autooksidacija može biti inicirana UV zračenjem, toplotom ili katalizatorima, kao što su pojedini metali. Mnoga organska jedinjenja podležu autooksidacionim promenama, tako da je veoma značajan uticaj autooksidacije na različite materijale i industrijske proizvode, kao što su plastika, guma, nafta, benzin. Naročito je važno razumevanje autooksidacije u industriji hrane, posebno one bogate polifenolnim jedinjenjima koja su joj, po svojoj prirodi, sklona.

Po svojoj suštini, autooksidacija se zasniva na lančanoj reakciji slobodnih radikala. Slobodni radikali su po definiciji atomi, joni ili molekuli koji imaju jedan ili više nesparenih elektrona, usled čega pokazuju izraženu i neselektivnu reaktivnost i veoma lako stupaju u hemijske reakcije sa različitim molekulima. U zavisnosti od položaja nesparenog elektrona, postoje slobodni radikali kiseonika, azota, hlora itd. Sa aspekta autooksidacije, posebno su značajne slobodno-radikalske vrste koje potiču od kiseonika, uzimajući, pritom, u obzir i činjenicu da je štetno dejstvo kiseoničnih slobodno-radikalskih vrsta prvi put evidentirano 1954. godine u radovima Rebeke Geršman i njenih saradnika (Gerschman et al. 1954), gde je pokazano da kiseonik može imati i toksičan karakter. Teoriju je proširio dve godine kasnije američki lekar Denham Harman, tvrdeći da slobodni radikali utiču na starenje i pojavu degenerativnih bolesti, predloživši za uzročnike hidroksil i hidroperoksil slobodne radikale, čije je prisustvo utvrdio u ćelijama (Harman 1956).

Danas je poznato da, pored pomenute dve slobodno-radikalske vrste, tokom normalnog aerobnog metabolizma, u ćelijama nastaje niz nusproizvoda u vidu toksičnih reaktivnih kiseoničnih vrsta, ROS (engl. Reactive Oxygen Species), koje u povišenim koncentracijama mogu imati štetan uticaj na organizam. U normalnim fiziološkim uslovima, živi organizmi poseduju odbrambeni sistem koji neutrališe nastale ROS. Međutim, u uslovima pojačanog stresa (aero-zagađivači, teški metali, UV zračenje, pušenje, psihički stres i sl.) moguće je da se proizvodnja ROS uveća do te mere, da ćelijski odbrambeni sistem nije u stanju da ih ukloni u

potpunosti. Tada dolazi do narušavanja pomenute ravnoteže i do pojave stanja poznatog kao oksidativni stres. Ovakvo stanje može da proizvede različita oksidativna oštećenja ćelija, kao što su peroksidacija lipida, oksidacija proteina, oštećenje nukleinskih kiselina i konačno dovede do smrti ćelija, starenja i pojave različitih oboljenja (Sharma et al. 2012).

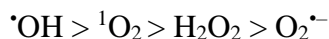
Navedeno destruktivno dejstvo ROS pokazuju u uslovima povećane produkcije. Međutim, pri niskim i umerenim koncentracijama, one mogu, zbog svojih malih dimenzija, da služe kao signalni molekuli koji pozitivno utiču na mnoge biohemijske procese u ćeliji, npr. ekspresiju i broj gena (Pitzschke et al. 2006).

Uopšteno govoreći, ROS možemo podeliti na slobodnoradikalske i neradikalske vrste, od kojih su najvažnije date u tabeli 1.

Tabela 1. Najvažnije reaktivne slobodnoradikalske i neradikalske vrste kiseonika

Slobodnoradikalske vrste	Neradikalske vrste
Superoksid anjon radikal, $O_2^{\bullet-}$	Vodonik peroksid, H_2O_2
Hidroksil radikal, $\bullet OH$	Hipohlorasta kiselina, $HOCl$
Hidroperoksil radikal, $HO_2\bullet$	Ozon, O_3
Peroksil radikal, $RO_2\bullet$	Singletni kiseonik, 1O_2
Alkoksil radikal, $RO\bullet$	Peroksininitrit, $ONOO^-$

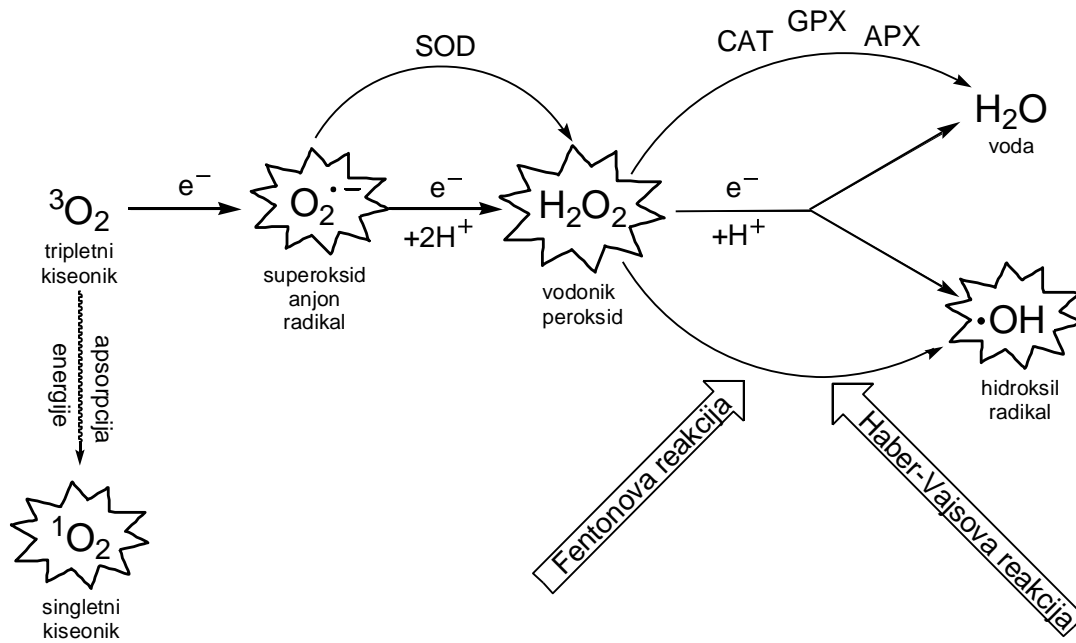
Hemijska aktivnost pomenutih ROS je različita. Neke, kao npr. $\bullet OH$, mogu da oksidišu većinu organskih molekula, dok H_2O_2 spada u srednje jake. Opšta reaktivnost ROS u biološkom medijumu opada sledećim redom:



Osnovna osobina ROS je sposobnost konverzije jedne vrste u drugu. Primera radi, redukcijom H_2O_2 nastaje $\bullet OH$, što znači da manje reaktivan oblik može preći u reaktivniji, što dodatno usložnjava ionako kompleksne biohemijske procese u ćeliji (Mattila et al. 2015).

Sve reaktivne kiseonične vrste su derivati molekulskog kiseonika O_2 (slika 1), koji u svom osnovnom, *tripletnom* (3O_2) stanju ima dva elektrona paralelnih spinova smeštenih u antiveznim π^* orbitalama. U ovakvom stanju kiseonik je slabo reaktivan, jer da bi stupio u

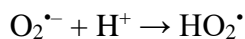
reakciju, potrebno je da primi dva elektrona a da istovremeno dođe do konverzije spina, što je malo verovatno. Za povećanje njegove aktivnosti potrebna je aktivacija energijom, čime prelazi u reaktivniji *singletni* ($^1\text{O}_2$) kiseonik, kod koga je spinska restrikcija eliminisana. Singletni kiseonik reaguje sa mnogim biološkim molekulima: direktno oksiduje proteine, nezasićene masne kiseline i DNK (Sharma et al. 2012).



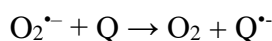
Slika 1. Šematski prikaz formiranja reaktivnih kiseoničnih vrsta

Monoelektronskom redukcijom tripletni kiseonik može preći u *superoksidni anjon radikal* ($\text{O}_2^{\bullet-}$), koji ima kako oksidujuće tako i redukujuće osobine. On podleže reakcijama protonovanja, elektronskog transfera, dismutacije.

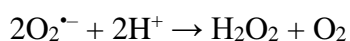
Veoma važna reakcija $\text{O}_2^{\bullet-}$ je protonovanje jer je to glavni izvor HO_2^{\bullet} radikala:



U reakcijama elektronskog transfera, $\text{O}_2^{\bullet-}$ može redukovati hinone (Q):

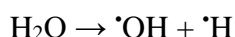


Verovatno najznačajnija je reakcija dismutacije, jer ona određuje životni vek $\text{O}_2^{\bullet-}$. Dešava se između dva molekula $\text{O}_2^{\bullet-}$ koji u prisustvu H^+ jona daju vodonik peroksid. Dismutacija može biti spontana ili enzimski inicirana.

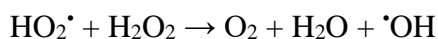
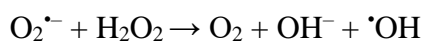


Vodonik peroksid je relativno dugoživeći molekul, sa vremenom poluživota oko 1 ms. Usled toga, kao i činjenice da nema nesparenih elektrona, može prelaziti relativno velika rastojanja, prolaziti kroz biološke membrane i eventualno nanositi štetu daleko od mesta nastanka. Tako može oksidovati ostatke cisteina (-SH) ili metionina (-SCH₃), ili inaktivirati pojedine enzime oksidovanjem njihovih tiolnih grupa (Sharma et al. 2012).

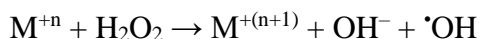
Najreaktivniji od svih ROS je *hidroksil radikal* ([•]OH), koji, zbog činjenice da ima nespareni elektron, može primiti elektron od gotovo svakog molekula u blizini. Može da nastane homolitičkim cepanjem molekula vode:



ali i putem dobro poznate Haber-Vajsove reakcije, koja predstavlja zbir sledeće dve reakcije:

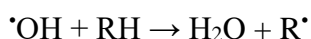


Još efikasnija je Fentonova reakcija koja se odigrava u prisustvu metalnog jona:

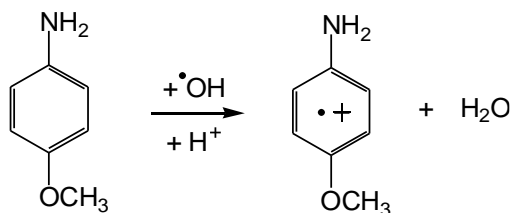
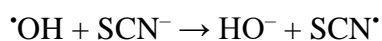


Tipične reakcije u kojima učestvuje [•]OH su sledeće:

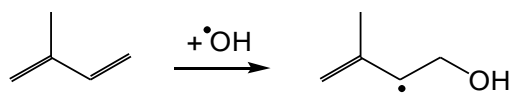
1. oduzimanje atoma vodonika molekulu koji sam postaje radikal



2. reakcije elektronskog transfera pri čemu nastaju ili neutralni ili katjonski radikali

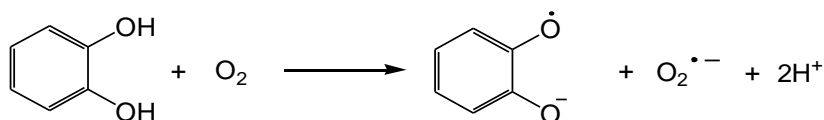


3. adicija na dvostruke veze uz nastajanje hidroksilovanih radikala



Usled izražene hemijske reaktivnosti, hidroksil radikal može reagovati sa svim biološkim molekulima izazivajući oksidativna oštećenja ćelija, kao što su lipidna peroksidacija, oštećenje proteina i razaranje ćelijske membrane. Problem postaje veći ako se ima u vidu da ćelije imaju ograničenu sposobnost neutralisanja delovanja $\cdot\text{OH}$ radikala, tako da njihova uvećana produkcija gotovo sigurno vodi do odumiranja ćelije.

Slobodni radikali u navedenim oksidacionim reakcijama učestvuju kroz proces autooksidacije. Generalno, autooksidacija podrazumeva autokatalitičke procese između kiseonika i organskih jedinjenja uz formiranje slobodnih radikala. Na primeru najprostijeg polifenola koji sadrži vicinalne hidroksilne grupe, katehola, početna faza autooksidacije se može predstaviti sledećom hemijskom reakcijom:



kojom nastaju dva tipa radikalskih vrsta, semihinonski radikal i superoksid anjon radikal.

Obzirom na negativan uticaj slobodnih radikala koji putem (auto)oksidacije mogu imati na žive sisteme, ovi su vremenom razvili odbrambene mehanizme sa ciljem da spreče ili umanje posledice destruktivnog oksidativnog delovanja slobodnih radikala. Glavnu ulogu u takvom odbrambenom sistemu imaju antioksidansi. Prema najprihvaćenijoj definiciji koju je dao Halliwell, to su „supstance koje prisutne u malim koncentracijama u odnosu na supstrat koji se oksiduje, značajno usporavaju ili sprečavaju njegovu oksidaciju“ (Halliwell 1990).

Podela antioksidanasa se može izvršiti prema nekoliko kriterijuma. Prema rastvorljivosti u vodi, dele se na hidrofilne (deluju u krvnoj plazmi i ćelijskoj tečnosti) i lipofilne (sprečavaju lipidnu peroksidaciju ćelijske membrane).

Sa funkcionalnog stanovišta, antioksidansi mogu biti preventivni (sprečavaju formiranje slobodnih radikala tako što helatiziraju jone prelaznih metala), „skevendžer“ antioksidansi („hvataju“ slobodne radikale) i reparacioni (obnavljaju oštećene biomolekule ili regenerišu druge antioksidanse).

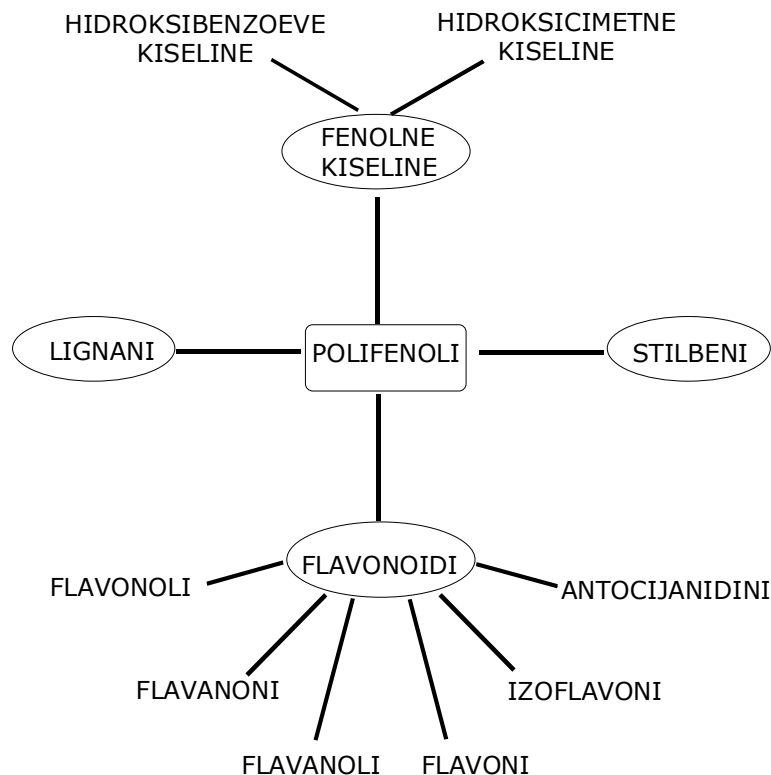
Prema načinu delovanja antioksidansi se dele na enzimske i neenzimske. U enzimske spadaju superoksid dismutaza (SOD), askorbat peroksidaza (APX), gvajakol peroksidaza (GPX) i katalaza (CAT). SOD, vrsta metaloenzima za čije delovanje su potrebni metali (Cu/Zn, Mn ili

Fe), eliminiše superoksid anjon radikal, dismutirajući ga u vodonik peroksid, dok preostali enzimi neutrališu upravo delovanje vodonik peroksida. Neenzimski antioksidansi mogu biti endogeni (glutation, tokoferol, askorbinska kiselina, karotenoidi) i egzogeni (polifenolna jedinjenja).

2.2. Polifenoli kao antioksidansi

2.2.1. Pojam i podela polifenola

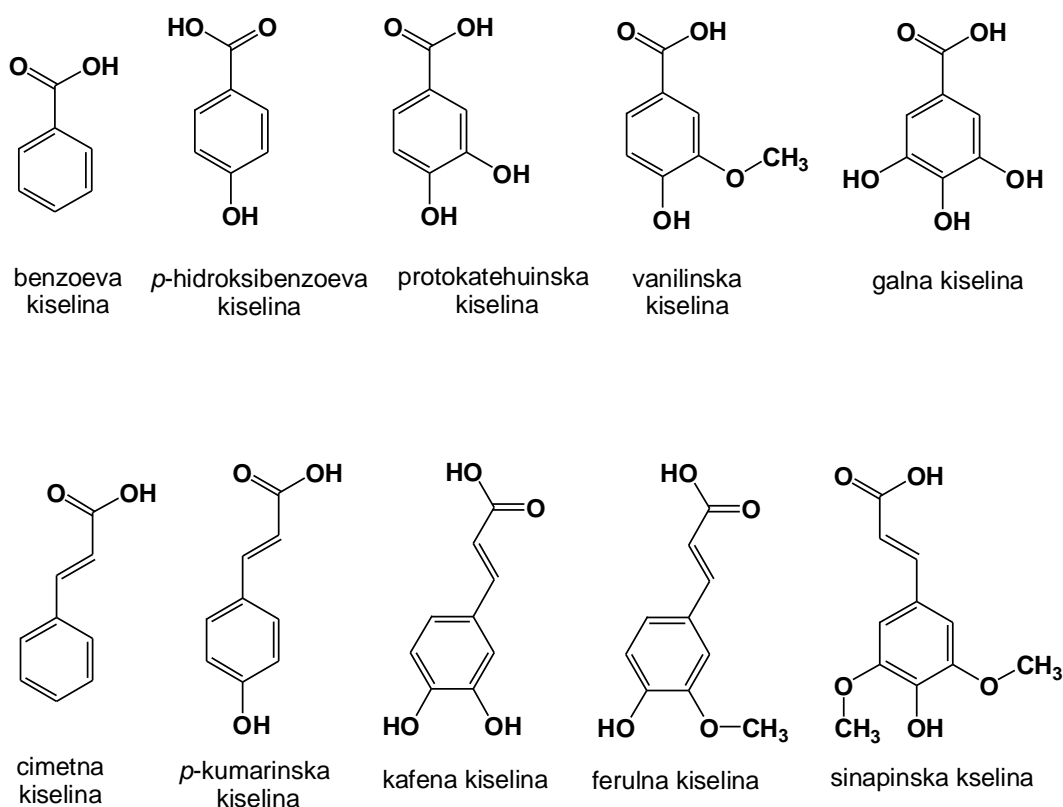
Tokom svog života biljke proizvode različite metabolite, koji se mogu podeliti na primarne i sekundarne. U primarne, koji su esencijalni za rast i život biljaka, spadaju ugljeni hidrati, lipidi, nukleotidi i amino kiseline. Sekundarni metaboliti svakako nisu esencijalni za biljke, ali imaju mnogo drugih bitnih uloga, pre svega zaštitnih. Oni su ključni faktori koji štite biljke od biljojeda, insekata, mikroba, virusa, ultraljubičastog zračenja i sl. Sa druge strane, često biljkama daju boju, utiču na miris i ukus. Najveću grupu sekundarnih metabolita, koji obuhvataju veoma različita i hemijski kompleksna jedinjenja, čine fenolna jedinjenja ili polifenoli (Watson 2014).



Slika 2. Podela polifenola

Polifenoli obuhvataju široku grupu, po hemijskoj strukturi, veoma različitih jedinjenja. Do danas ih je klasifikovano više od 8000 svrstanih u 4 klase i više podklasa (Robbins 2003). Grafički prikazana podela polifenolnih jedinjenja je data na slici 2.

Ne postoji sveobuhvatna i jedinstvena definicija polifenola, mada je bilo različitih predloga (Quideau et al. 2011). Prema pojednostavljenom ali i najšire prihvaćenom stavu, polifenoli su sekundarni metaboliti biljaka koji u svojoj hemijskoj strukturi imaju jednu ili više hidroksilnih grupa vezanih za aromatično jezgro. Interesovanje za proučavanje polifenola je naglo počelo da raste sa saznanjem o njihovom pozitivnom efektu na ljudsko zdravlje, širokoj rasprostranjenosti u biljnom svetu i svešću da kao takvi postaju lako dostupni za ljudsku ishranu. Polifenolna jedinjenja su sveprisutna u voću, povrću, orašastim plodovima, pićima i napicima (vino, kafa, čaj i dr.) i svakodnevna upotreba ovih namirnica, pokazalo se, utiče na poboljšanje ljudskog zdravlja i smanjenje rizika od hroničnih bolesti. Naročitu pažnju privuklo je saznanje o antioksidativnim svojstvima polifenola i u vezi s tim njihovim kardioprotektivnim, antikancerogenim, antimikrobnim i antimutagenim osobinama (Andjelković et al. 2006).

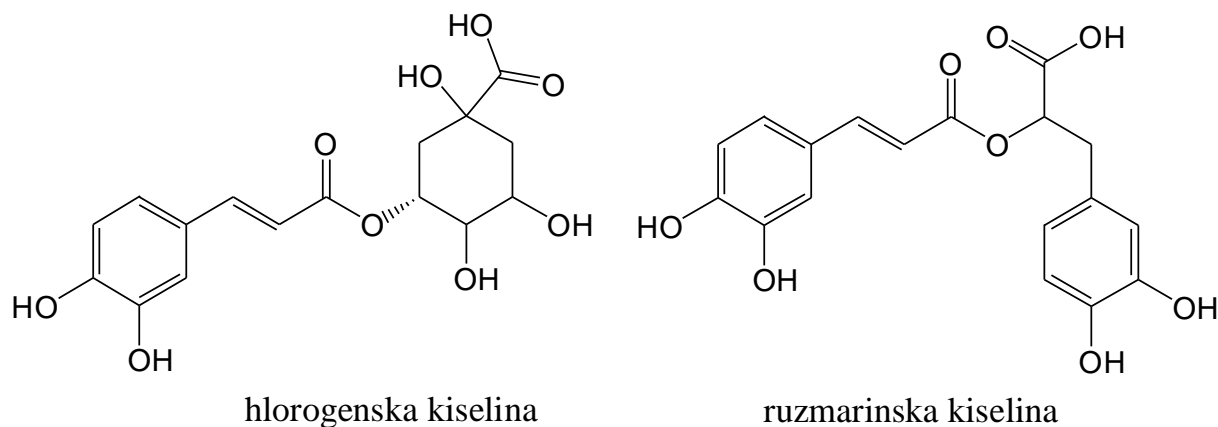


Slika 3. Najvažniji predstavnici hidroksibenzoevih kiselina (gore) i hidroksicimetnih kiselina (dole)

Fenolne kiseline (slika 3) po hemijskoj strukturi pripadaju monofenilnim karboksilnim kiselinama. To su derivati benzojeve (C₆-C₁) i cimetne (C₆-C₃) kiseline koji se međusobno razlikuju po broju i položaju hidroksi i, eventualno, metoksi grupa. Najvažnije hidroksibenzojeve kiseline su *p*-hidroksibenzojeva, protokatehuinska, vanilinska i galna kiselina, dok su glavni predstavnici hidroksicimetnih kiselina *p*-kumarinska, kafena, ferulna i sinapinska kiselina.

Biosinteza fenolnih kiselina počinje od aromatične aminokiseline fenilalanina, koja nastaje kao krajnji proizvod ciklusa šikimske kiseline. Varijacije u strukturi fenolnih kiselina nastaju kao posledica različitih hidroksilacija i metoksilacija aromatičnog prstena.

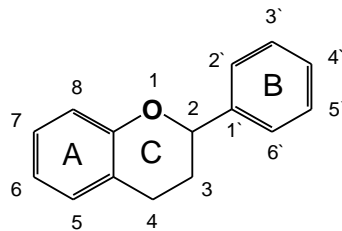
Fenolne kiseline su široko rasprostranjene u biljnom svetu. Mogu se naći u svim delovima biljaka i veoma su zastupljene u biljkama koja se koristi za ljudsku ishranu. U prirodi se u malom procentu mogu naći kao slobodne kiseline, a mnogo češće u vezanom obliku kao estri, etri ili acetali, sjedinjeni sa, najčešće malim molekulima (glukoza, maleinska, vinska ili hinska kiselina), a katkad i sa većim (flavonoidi, terpeni i sl.) (Robbins 2003). Primera radi, kafena kiselina (3,4-dihidroksicimetna kiselina), jedna od najzastupljenijih i najvažnijih prirodnih fenolnih proizvoda, često je estarski vezana sa hinskom kiselinom, čineći hlorogensku kiselinu ili sa 3,4-dihidroksifenilmlečnom kiselinom u obliku ruzmarinske kiseline (slika 4).



Slika 4. Najvažniji estri kafene kiseline

Flavonoidi su velika grupa polifenolnih jedinjenja sa osnovnom difenilpropanskom strukturom, C₆-C₃-C₆, prikazanom na slici 5. Sastoje se od dva aromatična prstena (označenih sa A i B) između kojih se nalazi heterociklični šestočlani prsten koji sadrži atom kiseonika (prsten C) (van Acker et al. 1996). Klasifikovani su u sledećih 6 klasa:

1. flavonoli (kvercetin, kemferol, miricetin ...)
2. flavanoni (naringenin, hesperetin ...)
3. flavanoli (katehin, epikatehin ...)
4. flavoni (luteolin, apigenin ...)
5. izoflavoni (genistein, daidzein ...)
6. antocijanidini (cijanidin, delphinidin, malvidin, peonidin, petunidin ...).



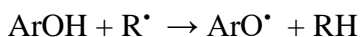
Slika 5. Osnovni skelet flavonoida

Poput fenolnih kiselina, sinteza flavonoida u biljkama počinje od fenilalanina sledeći polipropenoidni put. Do danas je izolovano i identifikovano oko 6000 flavonoida od kojih su mnogi prisutni u višim biljkama (Ghasemzadeh & Ghasemzadeh 2011). Retko se mogu naći u slobodnom stanju (kao aglikoni), već uglavnom konjugovani sa različitim šećerima u obliku O-glikozida. Najčešći šećer je glukoza, a u velikoj meri su prisutni galaktoza, ramnoza i ksiloza. Uobičajena pozicija za glikolizaciju je C atom broj 3, a ređe broj 7 (Rice-Evans et al. 1996). Pored O-glikozida, ređe se mogu naći C-glikozidi u kojima je šećer direktno vezan za atom ugljenika koji pripada skeletu molekula flavonoida.

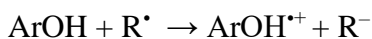
2.2.2. Antioksidativna svojstva polifenola

Za polifenolna jedinjenja viših biljaka se može reći da pripadaju grupi najvažnijih i najjačih prirodnih, neenzimskih, egzogenih antioksidanasa, čija je reaktivnost uslovljena hemijskom strukturom (Rice-Evans et al. 1996). Polazeći od osnovnog skeleta kojeg čini fenil grupa sa hidroksilnom funkcijom, zapaža se da hemijske osobine polifenola zavise od kombinacije hidrofobnog aromatičnog prstena i hidrofilnog karaktera polarne hidroksilne grupe. Kao posledica toga, ovakvi molekuli mogu da se ponašaju i kao donori i kao akceptori atoma vodonika, ali i da učestvuju u reakcijama transfera elektrona (Quideau et al. 2011). Tako u svom antioksidativnom delovanju (poli)fenolna jedinjenja mogu da direktno eliminišu slobodne radikale na sledeća četiri načina (Rajan & Muraleedharan 2017, Wang et al. 2014, Zheng et al. 2018):

1. transferom atoma vodonika, mehanizam HAT (engl. hydrogen-atom transfer)

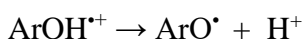
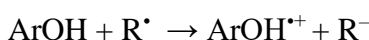


2. transferom jednog elektrona, mehanizam SET (engl. single-electron transfer)

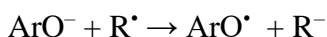


Kao i kombinacijom navedena dva mehanizma u po dva koraka:

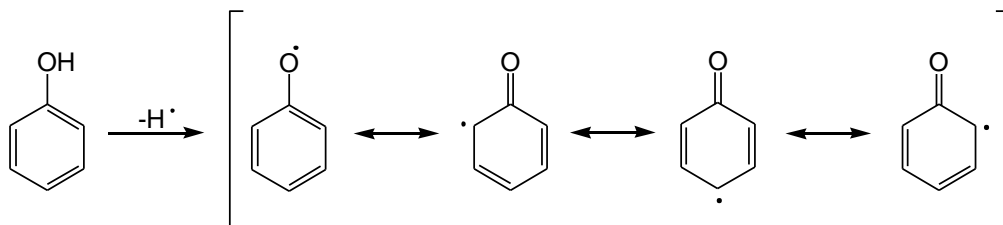
3. transferom elektrona praćenim transferom protona, mehanizam SET-PT (engl. single electron transfer followed by proton transfer)



4. sukcesivnim gubitkom protona i transferom elektrona, mehanizam SPLET (engl. sequential proton loss electron transfer)



U svim slučajevima fenolni antioksidansi i sami postaju slobodni radikali (fenoksi radikali), ali manje reaktivni budući da im je struktura stabilizovana delokalizacijom nesparenog elektrona (slika 6). Njihova efikasnost kao antioksidanasa zavisi od lakoće kojom doniraju atom H, odnosno elektron, tj. od energije disocijacije veze BDE, (engl. bond dissociation enthalpy), odnosno od jonizacionog potencijala, IP (engl. ionization potential). Što su ove dve vrednosti niže, transfer H/e⁻ je lakši i polifenol je jači antioksidans.



Slika 6. Stabilizovane rezonantne strukture fenoksi radikala

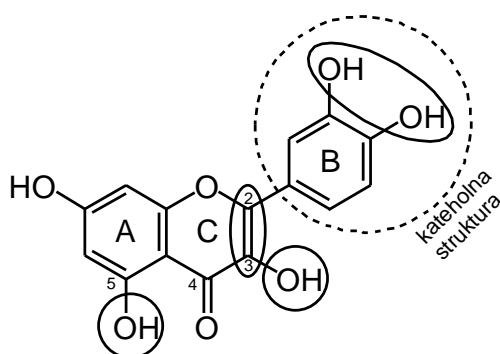
Uvođenje jedne hidroksilne grupe u hemijski inertan aromatični prsten dovodi do značajnih promena njegove hemijske aktivnosti. Međutim, prisustvo dve susedne hidroksilne grupe

(poznate pod nazivom kateholne grupe) otvara nove mogućnosti, prvenstveno omogućavajući helatizaciju metalnih jona, što je još jedan od mehanizama antioksidativnog delovanja polifenola (Andjelković et al. 2006). Na ovaj način metalni joni (naročito) prelaznih metala, gradeći stabilne komplekse sa fenolnim antioksidansima, bivaju sprečeni da učestvuju u reakcijama građenja slobodnih radikala (kao što je Fentonova reakcija kojom nastaju hidroksil radikali).

Veliki broj polifenolnih jedinjenja, naročito flavonoida, u okviru molekula poseduje strukturu katehola (1,2-dihidroksibenzena), a vrlo često i dodatne hidroksilne grupe. Pokazano je da upravo od broja i rasporeda hidroksilnih grupa, kao i od stepena njihove supstitucije zavise antioksidativna svojstva flavonoida (Rice-Evans et al. 1996). Posebno tri kriterijuma utiču na antioksidativnu efikasnost flavonoida:

1. prisustvo *o*-dihidroksi (kateholne) strukture u prstenu B – učešćem u elektronskoj delokalizaciji povećava stabilnost nastalih radikala,
2. konjugacija 2,3-dvostruke veze sa 4-okso funkcijom prstena C – utiče na proširenje elektronske delokalizacije sa prstena B na ostatak molekula,
3. prisustvo 3-OH i 5-OH grupa u prstenu A, zajedno sa 4-okso funkcijom prstena C – pružaju dodatne mogućnosti za helatizaciju metalnih jona.

Tako, od flavonoida, kvercetin (slika 7) ispunjava sve pomenute kriterijume i istovremeno pokazuje jaču antioksidativnost u odnosu na jedinjenja koja ne zadovoljavaju sve uslove (Rice-Evans et al. 1996).

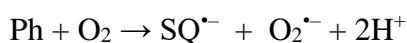


Slika 7. Strukturna formula kvercetina

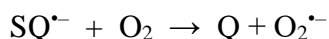
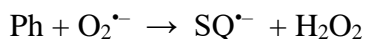
2.2.3. Prooksidativna svojstva polifenola

Pored navedenih pozitivnih antioksidativnih osobina koje imaju, polifenolna jedinjenja mogu pod određenim uslovima, ispoljiti i suprotne, prooksidativne karakteristike (Zheng et al. 2006) kroz proces autooksidacije kojim se formiraju slobodni radikali. Autooksidacija polifenola (Ph) se odigrava u tri, dobro poznata, koraka (inicijacija, propagacija i terminacija) uz nastajanje hinona (Q) i pojedinih slobodno-radikaliskih vrsta, između ostalih semihinona (SQ):

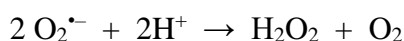
Inicijacija



Propagacija

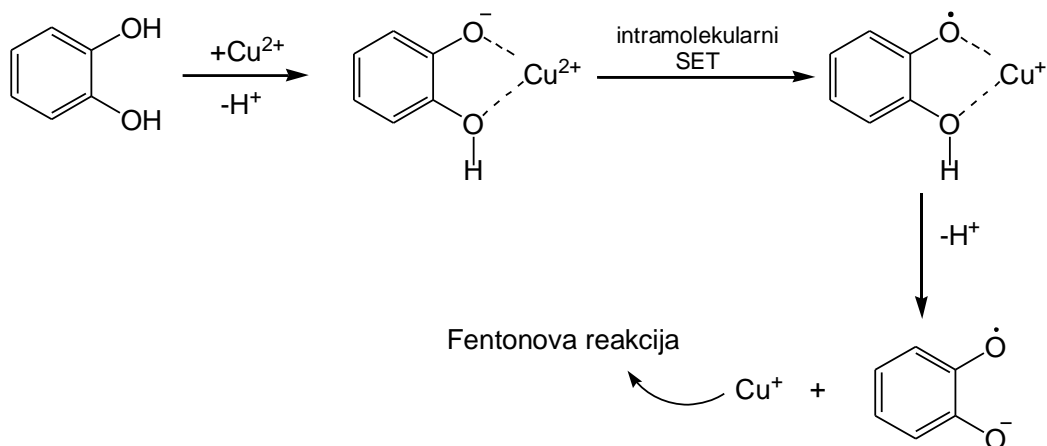


Terminacija



Ključni korak je, svakako, inicijacija tokom koje se formiraju slobodni radikali. Sledi najkompleksnija faza u kojoj oni reaguju sa različitim organskim molekulima stvarajući mnoštvo oksidacionih proizvoda. Autooksidacija se može završiti samo ako slobodni radikali reaguju ili sa drugim slobodnim radikalima ili sa antioksidansima (Karbowski et al. 2010, Lebedev et al. 2007).

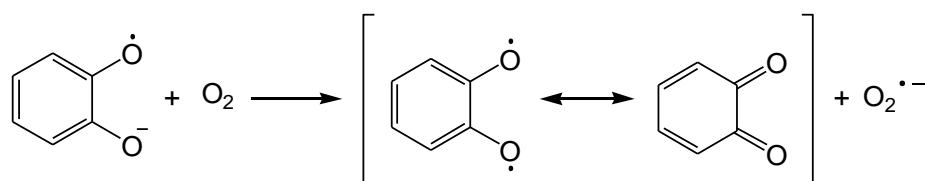
Prooksidativne osobine polifenolnih jedinjenja mogu, naročito, doći do izražaja u dodiru sa jonima metala. Ovo se najčešće odnosi na jedinjenja koja u delu molekula poseduju kateholnu ili pirogalolnu strukturu. Ona mogu helatacionim mehanizmom redukovati jone Cu^{2+} ili Fe^{3+} koji, posredstvom Fentonove reakcije, stvaraju $\cdot\text{OH}$ radikale. Primer prooksidativnog delovanja katehola je dat na slici 8.



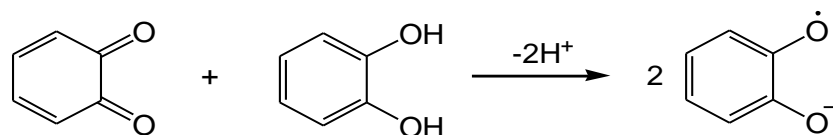
Slika 8. Šematski prikaz ispoljavanja prooksidativnog karaktera katehola

Reakcija počinje formiranjem helatnog kompleksa između polifenola koji sadrži *o*-dihidroksilnu grupu i metalnog jona, npr. Cu^{2+} . Pošto protonovane hidroksilne grupe nisu dobar ligand za metalne jone, najpre se vrši jednostruka deprotonizacija, čime se povećava elektronska gustina na kiseonikovom atomu i favorizuje se kompleksiranje sa pozitivnim metalnim jonom. U normalnim fiziološkim uslovima deprotonizacija je malo verovatna, obzirom da je pK_1 katehola 9,25. Međutim, ona postaje realna obzirom da prisustvo metalnih jona snižava ovu vrednost (Lebedev et al. 2007). Nakon ovoga sledi intramolekulski transfer elektrona kojim nastaju semihinonski anjon radikal i Cu^+ jon.

Nagrađeni semihinonski *o*-hidroksifenoksi radikali mogu, dalje, sa molekulskim kiseonikom proizvesti $\text{O}_2^{\bullet-}$ radikale.



Na ovaj način nastao hinon, u reakciji sa kateholom gradi semihinonske anjon radikale:



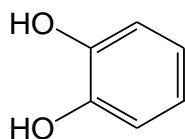
Posle svega ostaje pitanje za čijim se odgovorom još uvek traga: da li su polifenolna jedinjenja antioksidansi ili prooksidansi, odnosno pod kojim uslovima se ponašaju kao antioksidansi, a

kada kao prooksidansi? U svakom slučaju može se reći da ponašanje polifenola zavisi od mnogo faktora, kao što su: hemijska struktura, koncentracija i rastvorljivost, redoks potencijal prema hemijskim vrstama sa kojima mogu biti u kontaktu, energija disocijacije veze, jonizacioni potencijal. Pored toga, u obzir se moraju uzeti i fizičko-hemijske karakteristike medijuma u kome se polifenoli nalaze (Quideau et al. 2011).

2.3. Ispitivana polifenolna jedinjenja

2.3.1. Katehol

Katehol (1,2-dihidroksibenzen), takođe poznat pod imenom pirokatehol, je najjednostavnije od svih polifenolnih jedinjenja, sa hemijskom formulom $C_6H_6O_2$ i molarnom masom 110.1 g/mol (slika 9). To je čvrsta, bela supstanca, rastvorna u vodi, ali i u mnogim organskim rastvaračima (piridin, hloroform, benzen, dietiletar). Male količine katehola se prirodno nalaze u voću i povrću. Katehol ima široku primenu. Koristi se u fotografiji, proizvodnji gume i plastike, farmaceutskoj industriji (Schweigert et al. 2001).



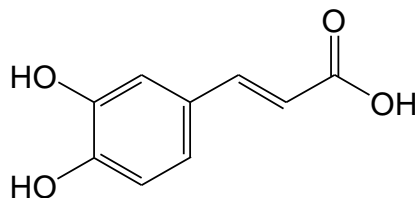
Slika 9. Strukturna formula katehola

Kao najmanji molekul koji sadrži dve *orto*-hidroksilne grupe, katehol je pogodan kao model za proučavanje različitih vrsta hemijskih reakcija, kao što su oksidacija, kompleksiranje i kuplovanje. Naročito je ovakvo hemijsko ponašanje katehola ispitivano u prisustvu različitih, biološki značajnih, metalnih jona. U tom smislu je ispitivan uticaj jona gvožđa, bakra, aluminijuma, mangana, magnezijuma, kalcijuma (Felix & Sealy 1982, Lebedev et al. 2011, McBride 1989, Nikolic et al. 1998, Tofan-lazar et al. 2013). Važnost katehola kao modela proizilazi i iz činjenice da se on može smatrati strukturnom jedinicom većih jedinjenja od biološkog značaja, kao što su neurotransmiteri (kateholamin), hormoni (estrogen), polifenoli (Lebedev et al. 2007). Često se sva ova jedinjenja nazivaju zajedničkim imenom – kateholi.

Kateholi su predmet višegodišnjeg proučavanja i zbog saznanja da njihovi oksidacioni proizvodi mogu biti toksični i izazivati oštećenja ćelija živih organizama (Nikolic et al. 1998, Schweigert et al. 2001).

2.3.2. Kafena kiselina

Kafena kiselina (3,4-dihidroksicimetna kiselina) jedno je od najvažnijih prirodnih fenolnih jedinjenja koje pripada klasi hidroksicimetnih kiselina (Shahidi & Naczk 2006). To je čvrsta supstanca žućkaste boje, molekulske formule $C_9H_8O_4$ i molarne mase 180.16 g/mol (Slika 10).

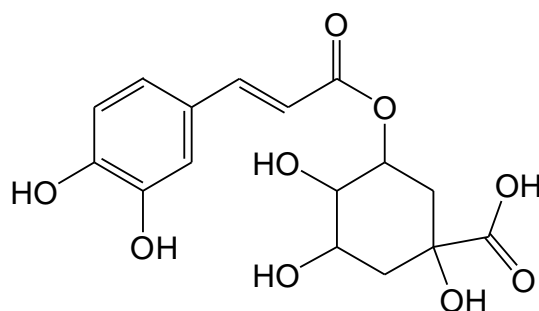


Slika 10. Strukturna formula kafene kiseline

Kafena kiselina je jedna od najrasprostranjenijih fenolnih kiselina. Zastupljena je u hrani (borovnice, kivi, šljive, višnje, jabuke) i pićima (kafa, vino, čaj), kako u slobodnom tako i u esterifikovanom obliku (Manach et al. 2004). Zbog antioksidativnih, antimikrobnih i citotoksičnih svojstava, kafena kiselina je predmet intenzivnog istraživanja u vezi njene upotrebe u farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji (Magnani et al. 2014), i razvoja novih obećavajućih neuroprotektivnih lipofilnih antioksidanasa (Chavarria et al. 2015). Takođe, ispituje se njena potencijalna uloga u lečenju kancera (Anantharaju et al. 2016). U literaturi su već opisani različiti načini transformacije kafene kiseline u različitim sistemima, uključujući autoksidaciju u alkalnim vodenim rastvorima (Cilliers & Singleton 1989, 1991), perjodatnu oksidaciju u kiselim rastvorima (Antolovich et al. 2004, Fulcrand et al. 1994), Fentonovu oksidaciju (Antolovich et al. 2004), elektrohemijsku oksidaciju (Arakawa et al. 2004, Tazaki et al. 2001), enzimske transformacije (Koclar Avci et al. 2013, Moridani et al. 2001, Pati et al. 2006), foto-indukovane transformacije (Le Person et al. 2013, Parrino et al. 2016) i biotransformacije od strane nekih gljiva (Wu et al. 2015). Takođe, postoje literaturni podaci o interakcijama kafene kiseline sa mnogim jonima prelaznih metala (García et al. 1996, Nguyen et al. 2016, Nkhili et al. 2014). Međutim, ne može se pronaći mnogo podataka o međusobnim interakcijama između kafene kiseline i Mg (II) ili Ca (II) jona uprkos njihovom biološkom značaju, iako je značajan uticaj jona zemnoalkalnih metala na autoksidaciju različitih fenolnih supstanci dobro dokumentovan u literaturi (Beneduci et al. 2017, Lebedev et al. 2007, Živanović et al. 2016).

2.3.3. Hlorogenska kiselina

Pod opštim nazivom hlorogenska kiselina podrazumeva se klasa estara kafeine i hinske kiseline, kod kojih je estarska veza ostvarena preko jedne od tri hidroksilne grupe hinske kiseline, koje se nalaze u položajima 3, 4 ili 5. Uže posmatrano, ime hlorogenska kiselina nosi struktura 3-O-kafeoilhinske kiseline (prikazana na slici 11), dok su njeni izomeri 4-O-kafeoilhinska kiselina (kriptohlorogenska kiselina) i 5-O-kafeoilhinska kiselina (neohlorogenska kiselina).



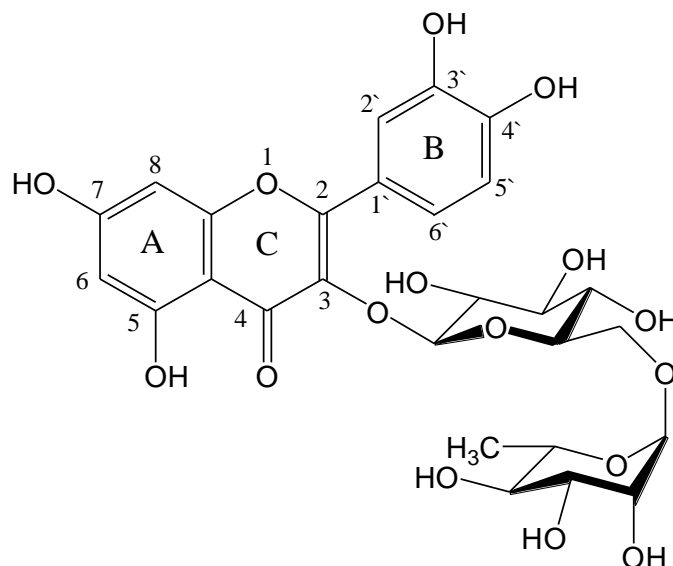
Slika 11. Strukturna formula hlorogenske kiseline

Molekulska formula hlorogenske kiseline je $C_{16}H_{18}O_9$ a molarna masa iznosi 354.31 g/mol. U najvećoj meri, kao glavno polifenolno jedinjenje, može se naći u kafi, pogotovo zelenoj (Seruga & Tomac 2014), tako da se njoj pripisuje potencijalno pozitivan efekat kafe na ljudsko zdravlje. Pored toga, ima je u breskvama, šljivama, krompiru, hibiskusu i dr (Moridani et al. 2001, Munoz et al. 2007b).

Kao i druga polifenolna jedinjenja, hlorogenska kiselina se odlikuje antioksidativnim svojstvima i s tim u vezi, smatra se da pokazuje raznovrstan biološki potencijal, kao npr. antibakterijski (Yadav et al. 2017), antiinflamatorni, antidijabetski (van Dijk et al. 2009), antihipertenzivni (Kozuma et al. 2005), antikancerogeni (Huang et al. 1988), ali i da utiče na smanjenje telesne težine (Cho et al. 2010).

2.3.4. Rutin

Rutin, ili kvercetin-3-O-rutinozid (slika 12), je glikozid koga čine flavonol kvercetin i disaharid rutinoza koji se sastoji od ramnoze i glukoze. Ima molekulsku formulu $C_{27}H_{30}O_{16}$ i molarnu masu 610.52 g/mol.

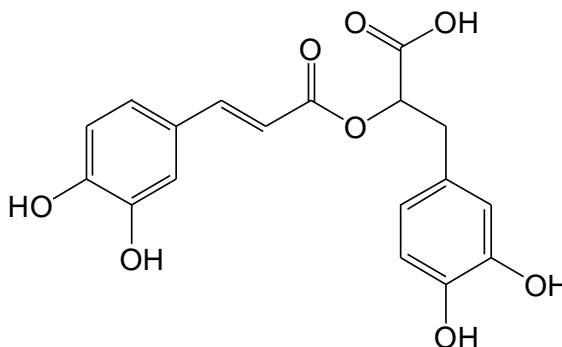


Slika 12. Strukturna formula rutina

Rutin pripada grupi flavonoida koji se najčešće mogu sresti u prirodi. Široko je rasprostranjen u biljnom svetu (voću, povrću, crnom čaju...) ali je mišljenje da je najbolji izvor rutina za ishranu žitarica heljda (Fabjan et al. 2003, Savic et al. 2013). Rutin se zbog izraženih bioaktivnih karakteristika svrstava u grupu vitamina P, a smatra se da je on, zapravo, aktivacioni faktor vitamina C (Levchenko et al. 2000, Sung et al. 2008). Rutin ispoljava širok spektar fizioloških i farmakoloških aktivnosti, uključujući antioksidativne, antimikrobne, antiinflamatorne, antikancerogene, zbog čega se često koristi u farmaceutskim preparatima i u suplementima ljudske ishrane (Paczkowska et al. 2015b).

2.3.5. Ruzmarinska kiselina

Ruzmarinska kiselina je estar kafene (3,4-dihidroksicimne) i 3,4-dihidroksifenilmlečne kiseline (slika 13). Ima molekulsku formulu $C_{18}H_{16}O_8$ i molarnu masu 360.32 g/mol.



Slika 13. Strukturna formula ruzmarinske kiseline

Uz hlorogensku kiselinu, predstavlja jedan od najzastupljenijih estara kafene kiseline. Iako se može naći u mnogim biljnim vrstama najprisutnija je u vrstama porodice Lamiaceae i Boraginaceae (Petersen 2013). Smatra se da je njena uloga u biljkama odbrana od patogenih i herbivora, i zaštita od ultravioletnog zračenja (Petersen & Simmonds 2003).

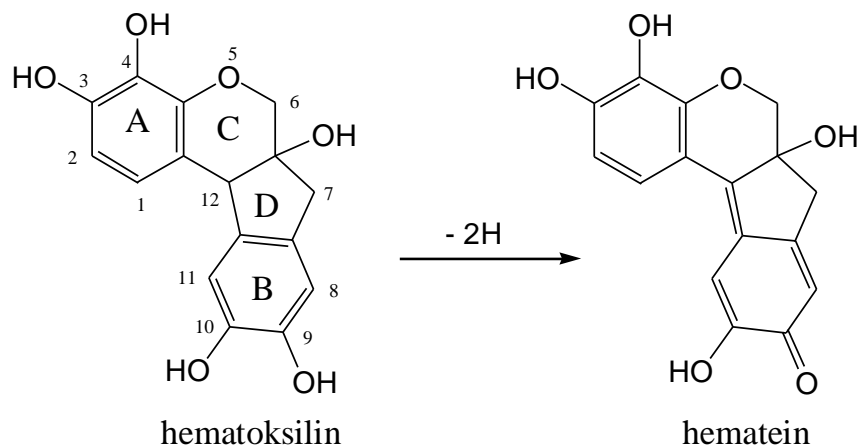
Ruzmarinska kiselina se odlikuje brojnim farmakološkim aktivnostima, potvrđene u *in vitro* i *in vivo* studijama, kao što su antioksidativna, antiinflamatorna, antimutagena, antikancerogena, antibakterijska, antifungalna, antivirusna i hepatoprotektivna (Cheung & Tai 2007, Lima et al. 2006, Petersen & Simmonds 2003). Eksperimentalno je dokazan jak antioksidativni kapacitet ruzmarinske kiseline, naročito u uklanjanju slobodnih radikala, a značajno je i da inhibira aktivnost enzima ksantin-oksidge. Takođe, može da redukuje mangan iz šestovalentnog u petovalentni i na taj način spreči produkciju slobodnih radikala uzrokovanu metalnim jonima (Tepe et al. 2007). Proizvodnja reaktivnih kiseoničnih vrsta i oslobađanje interleukina (IL)-6 značajno su smanjene u prisustvu ruzmarinske kiseline. Antiinflamatorni efekat ruzmarinske kiseline zasniva se i na inhibitornom efektu na aktivnost ciklooksigenaze i lipooksigenaze (Petersen & Simmonds 2003). U istraživanjima je potvrđeno da ova fenolna kiselina može uticati na inhibiciju aktivnosti adenil-ciklaze i da može još delovati i kao antitrombotično, antiagregaciono, renoprotektivno, antidepresivno sredstvo i sredstvo protiv starenja (Domitrović et al. 2014, Lu & Yeap Foo 2002, Takeda et al. 2002).

2.3.6. Hematoksilin

Hematoksilin (7,11b-dihidroindeno[2,1-c]hromen-3,4,6a,9,10(6H)-pentol) je prirodno polifenolno jedinjenje izolovano iz srži stabla drveta *Haematoxylum campechianum* koje potiče iz Južne Amerike. Njegova molekulska formula je $C_{16}H_{14}O_6$ a molarna masa iznosi 302.28 g/mol. Relativno lako prelazi u oksidovani oblik, poznat pod imenom hematein (slika 14).

Hematoksilin se dugo vremena koristi kao osnova za boje u tekstilnoj industriji, kao i u histologiji. I mada je njegova današnja primena kao boje za tekstil znatno manja, još uvek se široko primenjuje u hirurškoj patologiji i histologiji (Titford 2005). Pored toga, u poslednje vreme, hematoksilin nalazi primenu u veoma različitim oblastima, kao što je određivanje superoksid dismutaze (Martin et al. 1987), izrada biosenzora (Nasirizadeh & Zare 2009) ili sinteza nanočestica zlata i srebra korišćenjem sintetičkih humičnih supstanci na bazi hematoksilina (Litvin & Minaev 2013, 2014). Pošto pokazuju bolji efekat kao skevendžeri superoksid anjon radikala u poređenju sa nekim prirodnim dobro poznatim fenolnim

antioksidansima, kao što je kvercetin (Kitagawa et al. 1992), neki derivati hematoksilina se ispituju u svojstvu nove generacije anti-HIV-1 agenasa (Ishii et al. 2012).



Slika 14. Oksidacija hematoksilina do hemateina

Primena hematoksilina kao histohemijskog sredstva za bojenje u velikoj meri zavisi od njegove lakoće oksidacije i sposobnosti da, kako on tako i njegov oksidacioni proizvod hematein, grade komplekse sa različitim metalima (Cooksey 2010). Ranija proučavanja hematoksilina usmerena na optimizaciju histohemijskog bojenja i uglavnom zasnovana na spektrofotometrijskim merenjima, pokazala su da su oksidacija i autooksidacija hematoksilina veoma složeni procesi (Lalor & Martin 1959a,b; Marshall & Horobin 1972), naročito u prisustvu metalnih jona (Roubani-Kalantzopoulou & Katsanos 1986). Zbog činjenice da upotreba hematoksilina u drugim oblastima zahteva dobro poznavanje njegovih osobina i ponašanja u različitim sistemima, poslednjih godina se sve više proučavaju elektrohemijske karakteristike hematoksilina (Beiginejad et al. 2012, Namazian et al. 2012, Sokolová et al. 2010, Zare & Nasirizadeh 2011).

2.4. Uloga i značaj metalnih jona u biološkim sistemima

Metali se nalaze u svim živim organizmima ali je njihova pojedinačna zastupljenost u biološkim sistemima različita. Četiri od njih, natrijum, kalijum, kalcijum i magnezijum su prisutni u relativno velikim količinama u živim organizmima, dok se pojedini metali (kobalt, bakar, gvožđe, mangan, molibden, nikl, vanadijum i cink) nalaze samo u tragovima. Svi navedeni metali su esencijalni za ljude (Crichton 2008).

U biološkim sistemima metali najčešće grade komplekse sa većim organskim molekulima koji sadrže kiseonik, azot ili neki drugi atom koji se ponaša kao Luisova baza, ali se, u niskim koncentracijama, mogu naći i kao slobodni joni. U zavisnosti od toga njihova uloga u biološkim sistemima je različita: učestvuju u fotosintezi, transportu kiseonika, kofaktori su brojnih enzima, sastavni delovi nekih vitamina i dr. Sa druge strane, u nekim situacijama čak i esencijalni metali mogu ispoljiti toksične efekte (House 2013).

Relativno velika zastupljenost magnezijuma i kalcijuma u živim organizmima i njihove raznovrsne funkcije čine ih posebno interesantnim za proučavanje interakcija njihovih jona sa različitim biološki značajnim jedinjenjima.

2.4.1. Magnezijum

Magnezijum je element II grupe periodnog sistema elemenata sa atomskim brojem 12 i atomskom masom $24,31 \text{ g mol}^{-1}$. Spada u grupu lakih metala sa gustinom od samo $1,74 \text{ g cm}^{-3}$. Jedan je od najzastupljenijih elemenata u prirodi; to je 8. najčešći element. Zemljina kora sadrži oko 1,87% magnezijuma, dok se u morskoj vodi, sa prosečnom koncentracijom $1,35 \text{ g dm}^{-3}$ nalazi na trećem mestu (iza hlora i natrijuma), što čini oko 2×10^{15} tona magnezijuma u okeanima (Torshin & Gromova 2009). Sastavni je deo molekula hlorofila gde zauzima centralno mesto u porfirinskom prstenu. Spada u grupu od devet makronutrijenata odgovornih za reprodukciju i rast biljaka (Williams & Salt 2009).

U ljudskom telu, magnezijum je četvrti metal po zastupljenosti (iza natrijuma, kalijuma i kalcijuma), gde se nalazi kako intracelularno tako i ekstracelularno. Od ukupnog sadržaja magnezijuma, oko 50% je smešteno u kostima, a ostatak se nalazi u ćelijama, uglavnom u vezanom obliku. Oko polovine količine ćelijskog magnezijuma je vezano za ATP, a najveći deo ostatka za ribozome. Slobodan magnezijum u obliku Mg(II) jona u ćeliji se nalazi u koncentraciji oko $0,5 \text{ mmol dm}^{-3}$ (Crichton 2008).

Magnezijum je, ne samo jedan od najrasprostranjenijih elemenata u biološkim sistemima, već u njima igra veliki broj različitih esencijalnih uloga. Kao kofaktor učestvuje u preko 300 enzimskih reakcija, među kojima su sinteza nukleinskih kiselina i energetske metabolizam (Fawcett et al. 1999). Pored ovoga, magnezijum je neophodan za metabolizam masnih kiselina i vitamina. Učestvuje u aktivaciji vitamina D, koji reguliše metabolizam kalcijuma i fosfata, i na taj način utiče na formiranje i održavanje kostiju (Uwitonze & Razzaque 2018).

U poređenju sa drugim značajnim biološkim katjonima magnezijum ima jedinstvene karakteristike u pogledu jonskog radijusa, koordinacionog broja i koordinacione geometrije. Jonski radijus Mg(II) jona je manji u odnosu na ostale biološki značajne katjone, ali je radijus hidratisanog jona najveći, što za posledicu ima činjenicu da je zapremina hidratisanog katjona magnezijuma 400 puta veća od zapremine njegovog nehidratisanog jona. Kod ostala tri najzastupljenija katjona taj odnos je znatno manji; 25 kod natrijuma i kalcijuma i 5 kod kalijuma. U tom smislu važna je činjenica da jon Mg(II) ima mnogo manju brzinu izmene vode iz svoje hidratacione sfere u odnosu na ostala tri katjona. Koordinacioni broj magnezijuma je isključivo 6 čineći oktaedarsku strukturu, dok je kod kalijuma i kalcijuma promenljiv i može biti 6, 7 ili 8, što za posledicu ima veće varijacije u dužini i uglovima veza kod katjona sa fleksibilnijom geometrijom (Crichton 2008).

Zbog navedenih fizičkih karakteristika, a naročito velikog jonskog potencijala (odnos između naelektrisanja i jonskog radijusa) jon magnezijuma se ponaša kao „tvrđ“ jon koji se uglavnom veže za „tvrde“ ligande niske polarizabilnosti, kao što je kiseonik, koji je i primarni koordinacioni ligand magnezijuma. Jon Mg(II) pokazuje veći afinitet prema vodi nego prema fosfatnom ili karboksilatnom anjonu. Zbog toga sa nukleinskim kiselinama i proteinima gradi prvenstveno komplekse spoljne sfere, u kojima je direktno za magnezijum vezan kiseonik iz vode (Collins 2006).

Apsolutna potreba za magnezijumom postoji kako kod biljaka tako i kod ljudi. Unos magnezijuma u ljudsko telo je putem hrane. Naročito bogato magnezijumom je zeleno povrće, orašasti plodovi, soja, čokolada i integralne žitarice. Takođe i konzumiranje pijaće vode (naročito „tvrde“) može biti dobar izvor magnezijuma (Elin 1987).

Međutim, procenjeno je da je u prošlom veku unos magnezijuma opao za više od polovine. Tome su doprineli različiti faktori, među kojima prvenstveno, moderno procesiranje hrane, intenzivna (i neodgovarajuća) obrada poljoprivrednog zemljišta, kisele kiše i sl., koje dovode do gubitka magnezijuma iz hrane. Imajući u vidu pomenutu esencijalnu ulogu magnezijuma u ljudskom organizmu, njegov nedostatak se može povezati sa brojnim hroničnim bolestima kardiovaskularnog, nervnog, respiratornog i reproduktivnog sistema (Fawcett et al. 1999).

2.4.2. Kalcijum

Kao magnezijum, i kalcijum se nalazi u II grupi periodnog sistema elemenata, tj. pripada zemnoalkalnim metalima. To je jedan od najrasprostranjenijih elemenata u prirodi. Čini oko 3% zemljine kore, uglavnom u obliku sedimentnih stena. U morskoj vodi je njegova koncentracija 5-50 puta veća nego u slatkoj.

Od svih biometala, kalcijuma ima najviše u ljudskom organizmu. Čini 1,5-2% ukupne telesne mase čoveka, pri čemu je najveći deo skladišten u kostima, dok se u serumu nalazi u koncentraciji oko $2,45 \text{ mmoldm}^{-3}$. Joni kalcijuma (kao i magnezijuma) imaju intracelularne i ekstracelularne uloge u živom svetu. Unutar ćelija, koncentracija Ca(II) jona utiče na različite biološke procese, kao što su kontrakcija mišića, sekrecija, glikoliza, transport jona, deoba i rast ćelija. Ekstracelularni Ca(II) joni, učestvuju u aktivnostima ekstracelularnih enzima, u sistemu zgrušavanja krvi, utiču na termalnu stabilnost proteina, a u biljnom svetu doprinose čvrstini biljaka. U cilju uspostavljanja prave koncentracije Ca(II) jona u intracelularnom i ekstracelularnom prostoru, organizam koristi Ca pumpu, tako da sistem može efikasno da odgovori na iznenadnu promenu koncentracije Ca(II) jona (Dudev & Lim 2003).

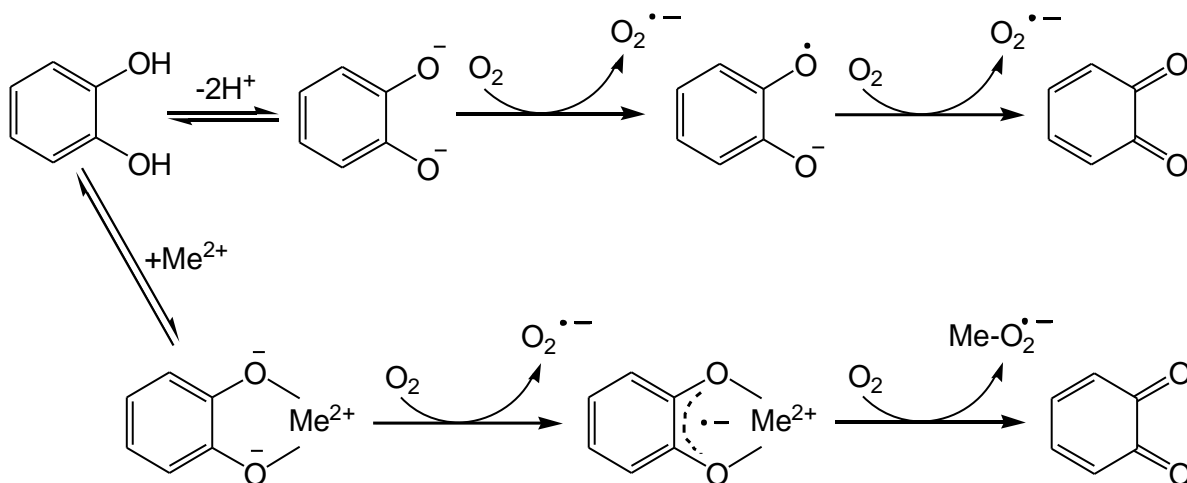
Slično magnezijumu, i kalcijum kao „tvrd“ jon teži da veže ligande koji sadrže kiseonik, međutim, sa većom dužinom veze Ca–O $2,3-2,8 \text{ \AA}$ u odnosu na dužinu veze Mg–O koja iznosi oko $2,05 \text{ \AA}$. Takođe, kalcijum se radije veže za kiseonik iz fosfatnih i karboksilatnih jona, za razliku od magnezijuma koji se jače vezuje za kiseonik iz vode (Collins 2006). Dalje, pokretljivost Ca(II) jona je znatno veća u poređenju sa pokretljivošću Mg(II) jona. Izražene kao brzine izmene one iznose $3 \times 10^8 \text{ sec}^{-1}$ i 10^5 sec^{-1} , respektivno (Crichton 2008).

2.4.3. Uticaj dvovalentnih dijamagnetnih metalnih jona na autooksidaciju polifenola

U proces autooksidacije polifenolnih jedinjenja često su uključeni metalni joni, obzirom da su u većoj ili manjoj meri, normalno prisutni u biološkim sistemima. Tom prilikom, pre svega, nastaju helatni kompleksi u kojima metalni jon modifikuje elektronsku gustinu liganda (polifenolnog jedinjenja) (Eaton 1964) mehanizmom elektronskog transfera (SET). To dovodi do promene hemijske aktivnosti polifenola i brzine autooksidacije.

Proučavajući najprostije od svih polifenolnih jedinjenja, katehol (1,2-dihidroksibenzen), Lebedev ja sa svojim saradnicima (Lebedev et al. 2007) pokazao da tokom njegove autooksidacije dolazi do formiranja semihinonskih radikala (SQ), hinona (Q) i pojedinih

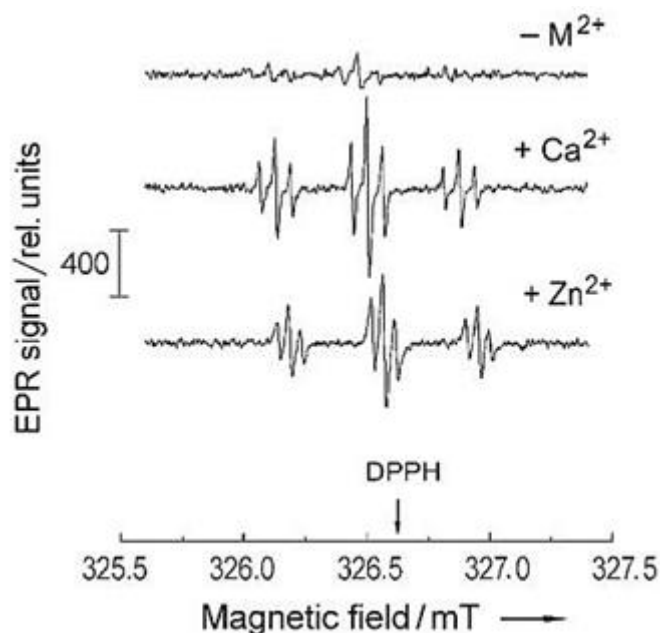
reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS). Zajednička osobina svih katehola je sposobnost specifične interakcije sa metalnim jonima u metastabilnim redoks stanjima (kateholat, SQ i Q). U tom smislu posebnu važnost imaju tranzicioni kompleksi metala i kateholata koje karakteriše intramolekulski transfer elektrona. Na slici 15 su prikazane reakcije autooksidacije katehola bez i u prisustvu dvovalentnog metalnog jona.



Slika 15. Reakcija autooksidacije katehola, bez i u prisustvu dvovalentnog metalnog jona

Može se videti da metalni joni utiču na promenu mehanizma autooksidacije katehola, iako kao krajnji proizvod, u oba slučaja nastaje hinon. Pored toga, merenjem potrošnje kiseonika tokom reakcije utvrđeno je da metalni joni višestruko ubrzavaju reakciju autooksidacije.

Kada postoji hemijska interakcija slobodnih radikala i metalnih jona, često se za proučavanje strukture slobodnih radikala, kao pogodna eksperimentalna tehnika koristi ESR. Pokazalo se da je ESR spektroskopija savršeno primenljiva u ovakvim slučajevima. Naime, usled fenomena spinske stabilizacije, kojim metalni joni povećavaju kinetičku stabilnost kompleksiranog radikala, a time i njegov životni vek i trenutnu koncentraciju, mogu se jasno snimiti njegovi ESR spektri (Eaton 1964). U suprotnom, u nedostatku metalnih jona, intenzitet ESR signala slobodnih radikala je prilično slab, usled vrlo kratkog vremena postojanja, koje je posledica velike hemijske reaktivnosti. To se odlično može videti na slici 16, koja prikazuje ESR spektre autooksidacije katehola snimljene bez prisustva metalnih jona i u prisustvu Ca(II) i Zn(II) jona (Lebedev et al. 2007).



Slika 16. ESR spektri snimljeni u toku autooksidacije katehola, bez metalnog jona M^{2+} , u prisustvu $Ca(II)$ i $Zn(II)$ jona na sobnoj temperaturi (Lebedev et al., 2007)

Intenzitet ESR signala radikala nastalog u toku autooksidacije katehola bez prisustva metalnih jona je veoma slab, dok su u prisustvu metala signali jasno izraženi, pri čemu se vidi da istovremeno dolazi do promene vrednosti g-faktora. Lebedev i saradnici su došli do zaključka da $Ca(II)$ joni (kao i drugi joni zemnoalkalnih metala) kratkotrajno pojačavaju ESR signal, a da je spinska stabilizacija izraženija u prisustvu $Zn(II)$ jona.

Inače, efekat spinske stabilizacije je najviše proučavan kod jedinjenja koja sadrže kateholnu strukturu (dve susedne hidroksilne grupe na aromatičnom prstenu), kao što su: katehol (Eaton 1964), flavonoidi (van Acker et al. 1996), L-dopa (Lebedev et al. 2007) i drugi slični molekuli. Ovaj efekat je uočen i kod nekih polifenolnih jedinjenja sa tri vicinalne hidroksilne grupe u molekulu, ali je mnogo manje ispitivan (Nikolić et al. 2011).

2.5. Metode i tehnike ispitivanja procesa autooksidacije

Pogodne, a verovatno i najčešće korišćene, metode za ispitivanje autooksidacije polifenolnih jedinjenja su UV/Vis spektrofotometrija i ESR spektroskopija, dok poslednjih godina masena spektrometrija dobija sve veći značaj. Pored ovih, u ovom radu je korišćena tečna hromatografija (HPLC). Hemometrijskom metodom MCR-ALS su dodatno analizirani UV/Vis spektri.

2.5.1. UV/Vis spektrofotometrija

Ultraljubičasta-vidljiva spektroskopija ili ultraljubičasta-vidljiva spektrofotometrija (UV/Vis) je spektrometrijska tehnika koja se često koristi za kvalitativnu i kvantitativnu analizu (Owen 1996) u različitim naučnim oblastima (hemija, fizika, biohemija i dr.). Zasniva se na merenju intenziteta apsorbirane svetlosti koja prolazi kroz uzorak (rastvor). Do apsorpcije svetlosti dolazi na elektronskom nivou, kada pobuđeni elektroni prelaze iz osnovnog u više energetsko stanje. Mogući su različiti elektronski prelazi, ali su za ovu tehniku najvažniji samo oni koji se dešavaju u elektromagnetnom delu spektra između 200 i 800 nm. Kod organskih molekula oni uključuju dve vrste prelaza elektrona: $n \rightarrow \pi^*$ i $\pi \rightarrow \pi^*$. To znači da molekul mora da sadrži π elektrone i/ili atome sa slobodnim elektronskim parovima. Često se ovakvi atomi ili atomske grupe definišu kao hromofore. Energetski favorizovani prelazi su sa najviše popunjene molekulske orbitale HOMO (engl. highest occupied molecular orbital) na najnižu nepopunjenu molekulsku orbitalu LUMO (engl. lowest unoccupied molecular orbital).

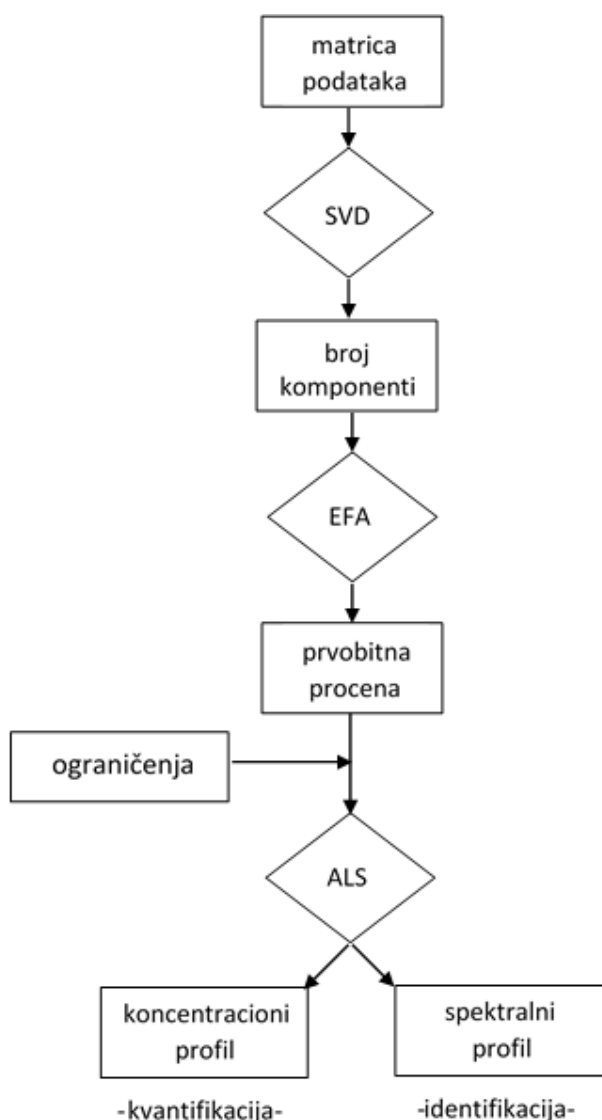
Izlazni signal UV/Vis spektrofotometrijskog merenja je UV/Vis spektar, koji predstavlja zavisnost apsorpcije od talasne dužine svetlosti. Spektar obično sadrži jedan ili više apsorpcionih maksimuma (λ_{\max}) u zavisnosti od vrste i broja hromofora. Izgled spektra je specifičan, a vrlo često jedinstven za različita hemijska jedinjenja, tako da može poslužiti za njihovu karakterizaciju i/ili identifikaciju. Pored toga, na osnovu intenziteta apsorpcije, moguće je vršiti kvantitativna određivanja u proučavanom sistemu.

Kako polifenolna jedinjenja, kao i većina degradacionih proizvoda autooksidacije, usled prisustva aromatičnih prstenova, imaju sposobnost apsorpcije zračenja u UV/Vis oblasti, to su veoma pogodna za ispitivanje upravo tehnikom UV/Vis spektrofotometrije. Ukoliko su aromatični prstenovi supstituisani hidroksilnim, metoksi ili drugim grupama, šećernim jedinicama i sl. dolazi do promene položaja i intenziteta apsorpcionih maksimuma u odnosu na polazno jedinjenje.

2.5.1.1. MCR-ALS obrada podataka

Hemometrijske metode dobijaju na značaju razvojem analitičkih instrumenata i pojavom personalnih kompjutera. Savremeni analitički aparati kao rezultat analiza daju mnoštvo digitalnih podataka, od kojih se, najčešće, koristi manji broj, dok veći deo ostaje neupotrebljen. Hemometrija pokušava da dobijene podatke upotrebi maksimalno, koristeći različite metode. Naročito je korisna za obradu spektralnih podataka kod multikomponentnih sistema. U tom

smislu je veliku primenu našla metoda MCR-ALS (Multivariate curve resolution-alternating least squares) (Tauler 1995), čija je šema data na slici 17.



Slika 17. Šematski prikaz MCR-ALS procesa

U situacijama obrade podataka kod višekomponentnih sistema, obično se primenjuju metode kojima se, iz tako složenog sistema, razdvajaju nezavisne komponente. Istovremeno se određuje realan doprinos svake od njih u takvom sistemu. Da bi se to omogućilo podaci se svrstavaju u matricu u kojoj se jedan smer odnosi na promenu koncentracije komponenti sistema, a drugi na promenu intenziteta signala. Dobijena matrica \mathbf{D} ($m \times n$) sadrži kompletne podatke o svim komponentama sistema. Osnovni cilj MCR metode je razlaganje dobijene matrice tako da se dobiju individualne komponente koje su povezane sa hemijski značajnim

veličinama, kao što su koncentracija i spektri. U tom cilju se inicijalna matrica **D** deli na dve matrice podataka **C** i **S^T**, za koje važi sledeći odnos:

$$\mathbf{D} = \mathbf{CS}^T + \mathbf{E}$$

Ukoliko se ova metoda primeni na spektroskopska merenja, kod kojih je set spektara snimljen u određenom vremenskom intervalu, onda se matrica **C** odnosi na koncentracije čistih komponenti, a matrica **S^T** na njihove spektre. Matrica **E** predstavlja ostatak, odnosno eksperimentalnu grešku merenja.

Početna faza proračuna podrazumeva dobijanje preliminarnih podataka o broju inicijalnih komponenti prisutnih u sistemu primenom procedure razdvajanje po jedinstvenim vrednostima, SVD (engl. Singular Value Decomposition). Na nju se nadovezuje procedura analiza nastajućih faktora, EFA (engl. Evolving Factor Analysis), kako bi se dobio što bolji uvid u početno stanje sistema. EFA se zasniva na proračunu ranga submatrica, tako što počinje sa malom submatricom a zatim u svakom narednom koraku dodaje novu kolonu (ili red) i pri tome prati i proračunava svojstvene vrednosti (eigenvalue). Analiza se obavlja konstruisanjem grafika od početka do kraja procesa (analiza unapred EFA, “forward” EFA) ili u suprotnom pravcu (analiza unazad EFA, “backward” EFA). Grafički prikaz predstavlja zone (vremenske intervale) u kojima se pojedine komponente pojavljuju ili nestaju. Nove komponente se detektuju u EFA analizi unapred pojavom novih značajnih svojstvenih vrednosti. Kod EFA analize unazad koja prati proces od kraja do početka, pojava novih značajnih svojstvenih vrednosti ukazuje da u odgovarajućem redu određena komponenta nestaje. Drugim rečima, EFA unapred daje informacije o novim komponentama koje nastaju tokom procesa, dok EFA unazad obezbeđuje podatke o komponentama koje nestaju iz reakcione smeša. Profili individualnih komponenti se dobijaju kombinacijom analiza unapred i unazad, pri čemu se polazi od pretpostavke da komponenta koja se prva pojavljuje prva i nestaje iz sistema.

MCR-ALS metoda koristi ovako dobijene podatke da bi izvršila svoj iterativni algoritam do finalne konvergencije. U ovoj fazi rada poznavanje hemijskog sistema koji se proučava može doprineti dobijanju kvalitetnijih i realnijih rezultata. Uvode se ograničenja kojima se programu daju instrukcije da u proračun ne uzima nerealne opcije. Najčešća ograničenja su:

- Selektivnost (Selectivity). Označava oblasti u kojima je prisutna samo jedna komponenta. Na ovaj način se eliminiše rotaciona dvosmislenost i osigurava dobijanje realnih profila odziva hemijskog sistema.
- Ne-negativnost (Non-negativity). Određuje da vrednosti profila budu jednake ili veće od nule i primenjuje se kako na koncentracione tako i na spektralne profile.
- Jednoznačnost (Unimodality). Određuje prisustvo samo jednog maksimuma po profilu. Primenjuje se kod koncentracionih profila nekih hemijskih reakcija, a naročito važi za hromatografske pikove.
- Zatvorenost (Closure). Odnosi se na bilans masa. Primenjuje se kod hemijskih reakcija u sistemu kod kojeg je suma koncentracija svih ili pojedinih komponenti konstantna.

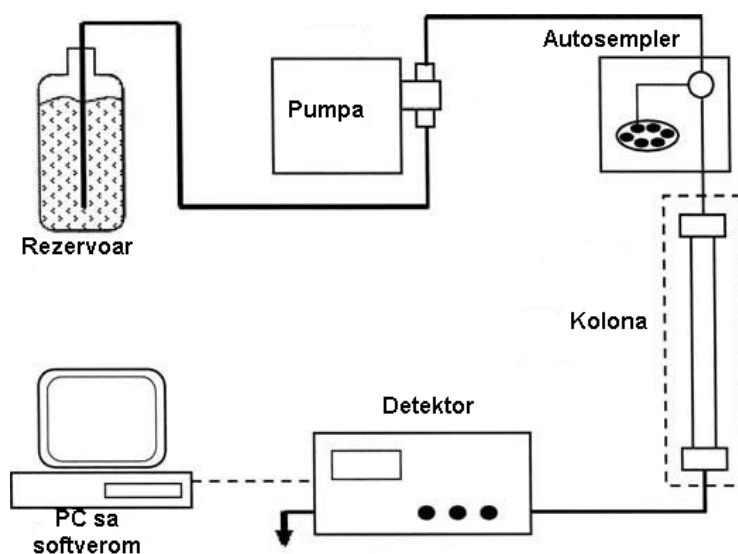
Uzimajući u obzir navedene podatke neophodne za proračun (inicijalna procena stanja, ograničenja), MCR metoda započinje optimizaciju sistema procedurom ALS, koja se zasniva na iterativnom algoritmu. Proces se završava kada se postigne konvergencija, odnosno kada u dva uzastopna iterativna ciklusa relativna razlika u standardnoj devijaciji ostataka između eksperimenta i izračunatih vrednosti bude manja od prethodno definisane vrednosti (najčešće 0,1%). Numerički pokazatelj kvaliteta optimizacije daju sledeće numeričke vrednosti: nedostatak slaganja, LOF (engl. lack of fit), procenat objašnjene varijanse i standardna devijacija ostataka u odnosu na eksperimentalne podatke.

2.5.2. Tečna hromatografija visokih performansi

Tečna hromatografija visokih performansi, HPLC (High Performance Liquid Chromatography; ili ponekad tečna hromatografija pri visokim pritiscima; High Pressure Liquid Chromatography), je specifična vrsta tečne hromatografije na koloni, koja se koristi u preparativne i analitičke svrhe. Preparativna HPLC se bavi razdvajanjem i prečišćavanjem smeša radi dobijanja čistih supstanci. Ipak, uobičajeno je, kada se govori o HPLC, da se prvenstveno misli na analitički tip. U tom smislu, HPLC je separaciona metoda koja se koristi za razdvajanje pojedinačnih komponenti iz složene smeše radi njihove identifikacije i kvantifikacije (Snyder et al. 2010). Šema tipičnog HPLC instrumenta je prikazana na slici 18.

HPLC podrazumeva postojanje dve faze (sredine) od kojih je jedna pokretna, tzv. mobilna, a druga nepokretna ili stacionarna, uobičajeno zvana kolona. Uzorak, koji čini smeša analita (jedinjenja), se unosi u instrument gde biva zahvaćen mobilnom fazom koja ga nosi kroz

kolonu. Kretanje pojedinih analita kroz kolonu zavisi od njihovih specifičnih fizičko-hemijskih interakcija sa stacionarnom fazom. Koliko dugo će pojedinačni analit prolaziti kroz kolonu zavisi od njegove prirode, od stacionarne faze i sastava mobilne faze. Posledica toga je da se analiti kroz kolonu kreću različitom brzinom, zadržavaju se u njoj različito vreme i na taj način se postiže njihovo fizičko razdvajanje. Vreme koje pojedinačni analit provede u koloni sve dok ne dođe do njenog kraja i ne napusti je, karakterističan je parametar pod nazivom retenciono vreme, RT (vreme zadržavanja, engl. Retention Time). Pod određenim hromatografskim uslovima, retenciono vreme je jedinstvena karakteristika analita koja može da posluži za njegovu identifikaciju.



Slika 18. Najvažniji delovi tipičnog HPLC instrumenta

U zavisnosti od načina razdvajanja komponenti postoji nekoliko tipova HPLC, od kojih je najkorišćeniji (u 80% slučajeva, a istovremeno i u ovom radu) reversno-fazni tip, RP HPLC (engl. Reversed-Phase HPLC). Karakterišu ga nepolarna stacionarna faza (modifikovani silika-gel ili polimerni materijali) i polarna mobilna faza (voda, metanol, acetonitril). Analiti koji su najpolarniji prvi napuštaju kolonu, dok se na njoj najduže zadržavaju najnepolarniji. Koristi se za uzorke visoke do srednje polarnosti, koji su rastvorni u polarnim rastvaračima.

Za uspešnu HPLC analizu potrebno je, najpre, izabrati podesan hromatografski tip, zatim odgovarajuću kolonu i mobilnu fazu, koja je često kombinacija dva ili više rastvora. Tokom procesa mobilna faza može imati konstantan sastav (izokratska elucija) ili se njen sastav može menjati u vremenu (gradijentna analiza). Brzina protoka mobilne faze je jedan od važnijih

parametara koji utiče na kvalitet separacije. Takođe, potrebno je temperaturu kolone držati konstantnom. Veoma je važna i prethodna priprema uzoraka za analizu, koja se kreće od relativno jednostavnih do prilično kompleksnih postupaka: filtriranje, centrifugiranje, tečno-tečna ekstrakcija, deproteinizacija, ekstrakcija čvrstom fazom (SPE, engl. Solid Phase Extraction).

Za registrovanje komponenti razdvojenih tokom HPLC postupka koriste se detektori. U upotrebi su različiti tipovi i to: UV/Vis spektrofotometrijski, fluorescentni, elektrohemijski, detektori za merenje indeksa refrakcije, maseni detektori. Najširu primenu imaju UV/Vis spektrofotometrijski, pogotovo specijalna varijanta tzv. Diode Array detektori (DAD), koji pored toga što mogu da registruju promenu apsorbance upadne svetlosti, imaju sposobnost da snimaju UV/Vis spektre detektovanih jedinjenja.

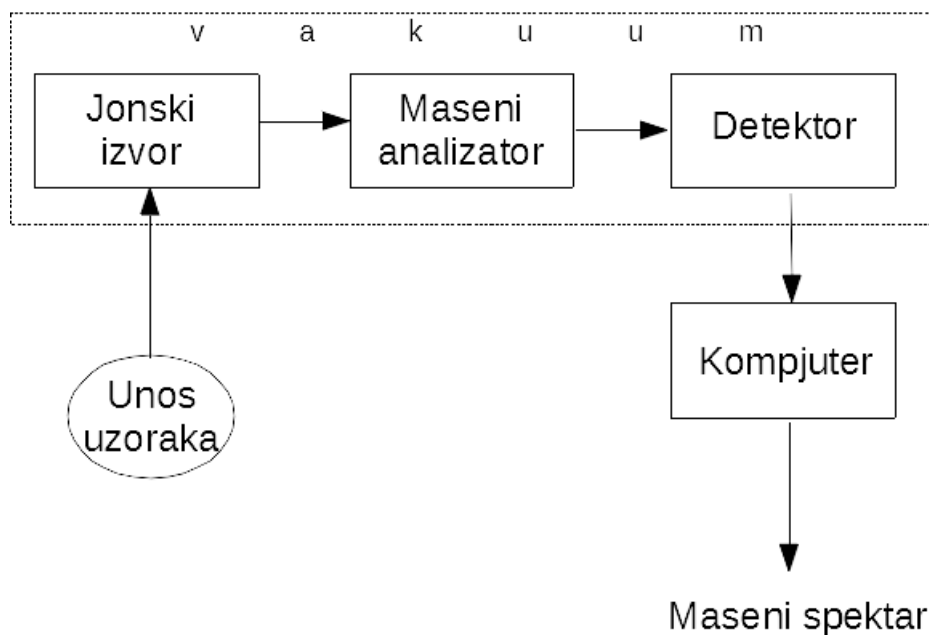
Krajnji zapis hromatografskog razdvajanja se naziva hromatogram. To je dvodimenzionalni grafik sa retencionim vremenom na apscisi i intenzitetom signala na ordinati. Na osnovu retencionog vremena se vrši identifikacija (često se snimljeni UV/Vis spektri koriste kao nedvosmislena potvrda), a na osnovu intenziteta apsorpcije se izračunava koncentracija datog jedinjenja.

HPLC tehnika je, pogotovo u svom reversno-faznom modu, našla široku primenu u razdvajanju i analizi polifenolnih jedinjenja.

2.5.3. Elektrosprej jonizaciona masena spektrometrija (ESI-MS)

ESI-MS je jedan od najpopularnijih i najčešće korišćenih tipova masene spektrometrije (MS) (Hoffmann & Stroobant 2007). Osnovni princip na kome se zasniva MS je formiranje jona (pozitivnih ili negativnih) koji se ubrzano kreću kroz magnetno/električno polje da bi stigli do detektora, koji pristigle jone razdvaja prema odnosu masa/naelektrisanje (m/z). Osnovni delovi masenog spektrometra su (slika 19):

- jonski izvor, u kome se formiraju joni analiziranih molekula
- maseni analizator, koji dobijene jone razvrstava po odnosu m/z
- detektor, evidentira jone pristigle do njega



Slika 19. Uprošćena šema masenog spektrometra

Način jonizacije molekula može biti različit, pa prema tome i jonski izvori mogu biti sledeći:

1. Elektronska jonizacija, EI (engl. Electron Impact)
2. Hemijska jonizacija, CI (engl. Chemical Ionisation)
3. Jonizacija brzim atomima, FAB (engl. Fast Atom Bombardment)
4. Desorpcija/jonizacija laserom uz pomoć matrice, MALDI (engl. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation)
5. Elektrosprej jonizacija, ESI (engl. Electrospray Ionisation)

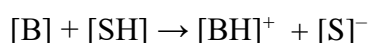
Maseni analizatori su, takođe, zasnovani na različitim principima rada, tako da postoji nekoliko tipova, od kojih su najčešći:

1. Kvadrupolni
2. Time-of-flight (TOF)
3. Jonski trap

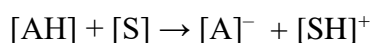
Moguće su različite kombinacije jonskih izvora i masenih analizatora, mada ima i nekih koje su realno neprihvatljive. Jedna od mogućih ali i tipičnih je verzija elektrosprej jonizacije i kvadrupola (često trostrukog), ESI-MS, koja je našla uspešnu primenu kod analize smeše polifenolnih jedinjenja prirodnih proizvoda (Savić et al. 2014) ili proizvoda oksidacije polifenolnih jedinjenja (Antolovich et al. 2004).

Osnovni princip rada ESI-MS je stvaranje finog aerosola ispitivanog rastvora koga čine visoko naelektrisane kapljice u jakom električnom polju. Uzorak (rastvoren u pogodnom rastvaraču) prolazi kroz kapilarnu cev na koju je primenjen visoki napon (do 5 kV), pri čemu se raspršuje u finu maglu površinski naelektrisanih kapljica. Uz pomoć hemijski inertnog gasa (najčešće azota) i povišene temperature stimuliše se isparavanje rastvarača, usled čega raste gustina naelektrisanja. U momentu kada ona dostigne kritičnu vrednost, elektrostatičko odbijanje nadjača površinski napon i kapljice se dele na sitnije. Proces se ponavlja više puta do nastajanja veoma sitnih (visoko naelektrisanih) kapljica, odnosno, na kraju, molekulskih jona uzorka, koji se usmeravaju u maseni analizator.

Nastali joni mogu biti pozitivni ili negativni, tako da u zavisnosti od toga, ESI funkcioniše u dva moda: pozitivnom (ESI+) i negativnom (ESI-). U ESI+ modu, pozitivni joni ispitivanih molekula nastaju vezivanjem protona rastvarača:



dok u modu ESI- molekuli otpuštaju protone formirajući negativne jone:



Pored gore navedenih načina, pozitivni joni mogu da nastanu vezivanjem pojedinih, često prisutnih, metalnih jona najčešće Na^+ i K^+ , dok se negativni mogu formirati vezivanjem anjona halogena, npr. Cl^- . Na ove neželjene događaje potrebno je obratiti posebnu pažnju prilikom interpretacije snimljenih masenih spektara kako se ne bi pogrešno protumačili.

Nastali molekularni joni mogu biti jednostruko naelektrisani (manji organski molekuli), a mogu dobiti višestruko naelektrisanje, pogotovo kad se radi o makromolekulima, koji poseduju više jonizujućih mesta.

ESI-MS instrumentalna tehnika spada u tzv. „meke“ jonizacione metode, tj. koristi relativno blage uslove jonizacije, što ostavlja prisutne molekulske i jonske vrste mahom u nepromenjenim obliku, bez dodatne fragmentacije ili je fragmentacija slabo izražena.

Izlazni signal ESI-MS analize je maseni spektar, kod koga je na apscisi predstavljen odnos m/z dok ordinata predstavlja relativni intenzitet (zastupljenost) pojedinih jonskih vrsta. Za intenzitet važi da je upravo proporcionalan vremenu života jona, odnosno stabilniji joni pokazuju intenzivniji pik.

2.5.4. Elektron spin rezonantna spektroskopija

Ova spektroskopska metoda, koja je poznata i pod nazivom elektron paramagnetna rezonanca (EPR), zasniva se na rezonantnoj apsorpciji elektromagnetnog zračenja od strane nesparenih elektrona u homogenom magnetnom polju. To znači da se pomoću nje mogu ispitivati samo paramagnetne supstance, tj. one koje sadrže molekule, atome ili jone sa nesparenim elektronima, kakvi su npr. slobodni radikali.

Elektroni su, između ostalog, određeni spinskim kvantnim brojem m_s , čije dve moguće vrednosti ($-1/2$ i $+1/2$) opisuju dva spinska stanja, koja poseduju istu energiju u uslovima kada ne postoji spoljašnje magnetno polje. U prisustvu spoljašnjeg magnetnog polja, postojeća energetska degeneracija se uklanja i magnetski moment zauzima jednu od dve orijentacije (dva energetska nivoa): paralelnu (niži energetski nivo, $m_s = -1/2$) i antiparalelnu (viši energetski nivo, $m_s = +1/2$). Prelaz sa nižeg na viši energetski nivo je moguć samo u slučaju kada je energija apsorbovanog elektromagnetnog zračenja jednaka razlici energija dva stanja, odnosno u uslovima rezonancije. Tada važi sledeća jednačina:

$$\Delta E = h\nu = g \mu_B B$$

u kojoj su: ΔE – razlika u energiji između dva stanja, h – Plankova konstanta, ν – frekvencija upadnog zračenja, g – Zemanov faktor cepanja, μ_B – Borov magneton, B – jačina primenjenog magnetnog polja.

Iz navedene jednačine je očigledno da se rezonantni uslov može postići na dva načina: promenom frekvencije upadnog zračenja ili jačine magnetnog polja. U praktičnom radu se ESR spektri skoro isključivo snimaju promenom jačine magnetnog polja pri konstantnoj vrednosti frekvencije upadnog zračenja.

Veličina koja ne zavisi od spoljašnjih uslova, već od samih elektrona i njihovog okruženja je g -faktor. Za slobodne elektrone ova vrednost iznosi približno 2,0023. Međutim, elektroni u realnim uslovima interaguju sa svojom okolinom, uključujući i atomska jezgra koja i sama mogu da poseduju magnetni moment, tako da g -faktor, u zavisnosti od okruženja elektrona, može da ima različite vrednosti.

Od mogućih nekoliko tipova međusobnih interakcija, poseban značaj ima interakcija magnetnog momenta jezgra i spinskog momenta elektrona. Svako jezgro koje ima spin I cepa

elektronske spinske nivoe na $2I+1$ podnivoa, usled čega se u ESR spektru pojavljuje veći broj linija koje se, često, razlikuju po intenzitetu. Ovaj fenomen, veoma značajan u praksi, naziva se hiperfina interakcija. Na osnovu broja i intenziteta ovako dobijenih linija može se, za pojedina atomska jezgra, odrediti konstanta hiperfinog cepanja kao jedan od karakterističnih parametara.

Postoji mogućnost direktnog izračunavanja broja linija nastalih usled hiperfinog cepanja kod izotropnih sistema (npr. slobodni radikali u rastvoru). Slobodni radikali koji imaju M ekvivalentnih jezgara sa spinom I , imaće $2MI + 1$ broj linija u ESR spektru. Za one koji sadrže grupu M_1 ekvivalentnih jezgara sa spinom I_1 i grupu M_2 ekvivalentnih jezgara sa spinom I_2 , broj očekivanih linija u ESR spektru iznosi $(2M_1 I_1 + 1)(2M_2 I_2 + 1)$. Osim toga moguće je na osnovu relativno jednostavnih pravila (Paskalov trougao) izračunati i odnos intenziteta ESR signala koji potiču od određene paramagnetne čestice (Weckhuysen et al. 2004).

Linije ESR signala se mogu razlikovati i po obliku koji može biti dvojak: Lorencov i Gausov. Za slobodne radikale u rastvoru karakterističan je Lorencov, dok je za one u čvrstom stanju tipičan Gausov oblik. ESR spektri sistema u čvrstom stanju se po izgledu znatno razlikuju od ESR spektara sistema u tečnom stanju, obzirom na anizotropni karakter interakcija elektrona i okoline. U ovakvim slučajevima moguće je da g -faktor i konstanta hiperfinog cepanja imaju po dve ili po tri vrednosti zavisno od stepena uređenosti sistema.

Na osnovu broja i odnosa intenziteta signala, kao i vrednosti za g -faktor i konstante hiperfinog cepanja određenih iz ESR spektara, moguće je izvršiti karakterizaciju čestica koja sadrže nesparene elektrone i utvrditi njihovu prirodu i strukturu. ESR spektroskopija se pokazala kao pogodna tehnika za ispitivanje autooksidacije polifenolnih jedinjenja koja je usko povezana sa hemijom slobodnih radikala kao tipičnih paramagnetnih čestica.

3. Eksperimentalni deo

Ispitivan je uticaj jona Mg(II) i Ca(II) na autooksidaciju polifenolnih jedinjenja, koja sadrže jedan ili dva para *orto*-dihidroksilnih grupa, u slabo alkalnim vodenim rastvorima pri pH vrednostima 7,4 i 8,4. Ispitivanja su najpre vršena na pH 8,4 jer je poznato iz literature da je autooksidacija polifenola izraženija u baznoj sredini što je omogućilo poređenje dobijenih rezultata sa onima koji su publikovani za slična jedinjenja. Naknadno su ispitivanja vršena i na pH 7,4 što približno odgovara fiziološkim uslovima.

Polifenolna jedinjenja na kojima je ispitivana autooksidacija jesu katehol (sa najjednostavnijom *orto*-dihidroksi fenolnom strukturom), zatim kafena, hlorogenska i ruzmarinska kiselina (fenolne kiseline), rutin (flavonoid) i hematoksilin (neoflavonoid). Autooksidacija pomenutih polifenola je praćena najpre u alkalnim rastvorima bez prisustva metalnih jona, a zatim u prisustvu Mg(II) i Ca(II) jona.

Karakterizacija procesa autooksidacije polifenolnih jedinjenja pod različitim uslovima vršena je primenom UV/Vis, ESR, HPLC-DAD, ESI-MS tehnika uz primenu MCR-ALS hemometrijske metode za obradu spektrofotometrijskih podataka i kompjuterske simulacije ESR spektara.

3.1. Materijal i metode

Čistoća korišćenih supstanci je analitička (p.a.), osim acetonitrila (ACN) i metanola (MeOH) koji su HPLC kvaliteta. Kafena kiselina, ruzmarinska kiselina, kvercetin i rutin su nabavljeni od firme Sigma (Nemačka); katehol, hematoksilin i trifluorosirćetna kiselina su kupljeni od firme Merk (Nemačka). Metalne soli MgCl₂ i CaCl₂ su dobijene od Centrohema (Srbija), kao i tris(hidroksimetil)aminometan (Tris), koji je upotrebljavan za pravljenje pufera. Hlorovodonična kiselina je proizvod Zorke (Srbija). Metanol (MeOH) i acetonitril (ACN) korišćeni u tečnoj hromatografiji su HPLC čistoće, proizvođača Avantar (Holandija), dok su oni upotrebljeni prilikom tečno-masenih analiza LC/MS kvaliteta (Carlo Erba, Francuska). Mravlja kiselina (Carlo Erba, Francuska) je, takođe, LC/MS kvaliteta. Ultračista dejonizovana voda je pravljena uz pomoć sistema za prečišćavanje vode TKA Smart2Pure (Thermo Scientific, Nemačka).

Rastvori polifenola su pravljeni u dva koraka: najpre su u odgovarajućem rastvaraču pravljeni osnovni rastvori, koji su neposredno pre rada razblaživani dejonizovanom vodom do radne

koncentracije. Osnovni rastvori katehola (10 mM) i hematoksilina (1 mM) su dobijeni rastvaranjem tačno odmerene mase u 0,1 M rastvoru HCl. Razblaživanjem dejonizovanom vodom dobijeni su radni rastvori, koncentracija 0,5 mM za katehol i 0,05 mM za hematoksin. Ostala polifenolna jedinjenja su rastvarana u MeOH u koncentraciji 10 mM (osnovni rastvori), da bi radni rastvori koncentracija 0,5 mM bili dobijeni razblaživanjem osnovnih dejonizovanom vodom.

Rastvori pufera pH vrednosti 7,4 i 8,4 koncentracije 100 mM pravljeni su rastvaranjem tačno odmerene mase TRIS u dejonizovanoj vodi, a zatim tačnim podešavanjem pH dodatkom koncentrovane HCl uz kontrolu pH-metrom (Hanna Instruments, Nemačka). Na ovaj način su dobijeni rastvori pufera bez metalnih jona (označeni kao TRIS). Rastvori TRIS pufera koji sadrže metalne jone napravljeni su rastvaranjem metalnih soli $MgCl_2$ i $CaCl_2$ do finalnih koncentracija metala 0,2 M, uz eventualno naknadno podešavanje pH vrednosti. Ovako dobijeni rastvori su označeni kao Mg-TRIS i Ca-TRIS.

Za potrebe analize uzoraka masenom spektrometrijom, umesto TRIS pufera korišćen je 50 mM amonijum-acetatni pufer, pH 8,4. On je pravljen tako što je tačno odmerena količina amonijum-acetata rastvorena u dejonizovanoj vodi uz podešavanje do potrebne pH vrednosti pomoću amonijaka.

Autooksidacija polifenolnih jedinjenja je inicirana mešanjem jednakih zapremina radnog rastvora polifenola i odgovarajućeg rastvora pufera bez metalnih jona (TRIS) ili pufera koji sadrži odgovarajući metalni jon (Mg-TRIS ili Ca-TRIS). Dobijeni rastvori su podvrgnuti mešanju u otvorenim posudama kako bi se obezbedio nesmetani dotok kiseonika iz vazduha. U određenim vremenskim intervalima rastvori su uzorkovani i analizirani korišćenjem dole opisanih tehnika.

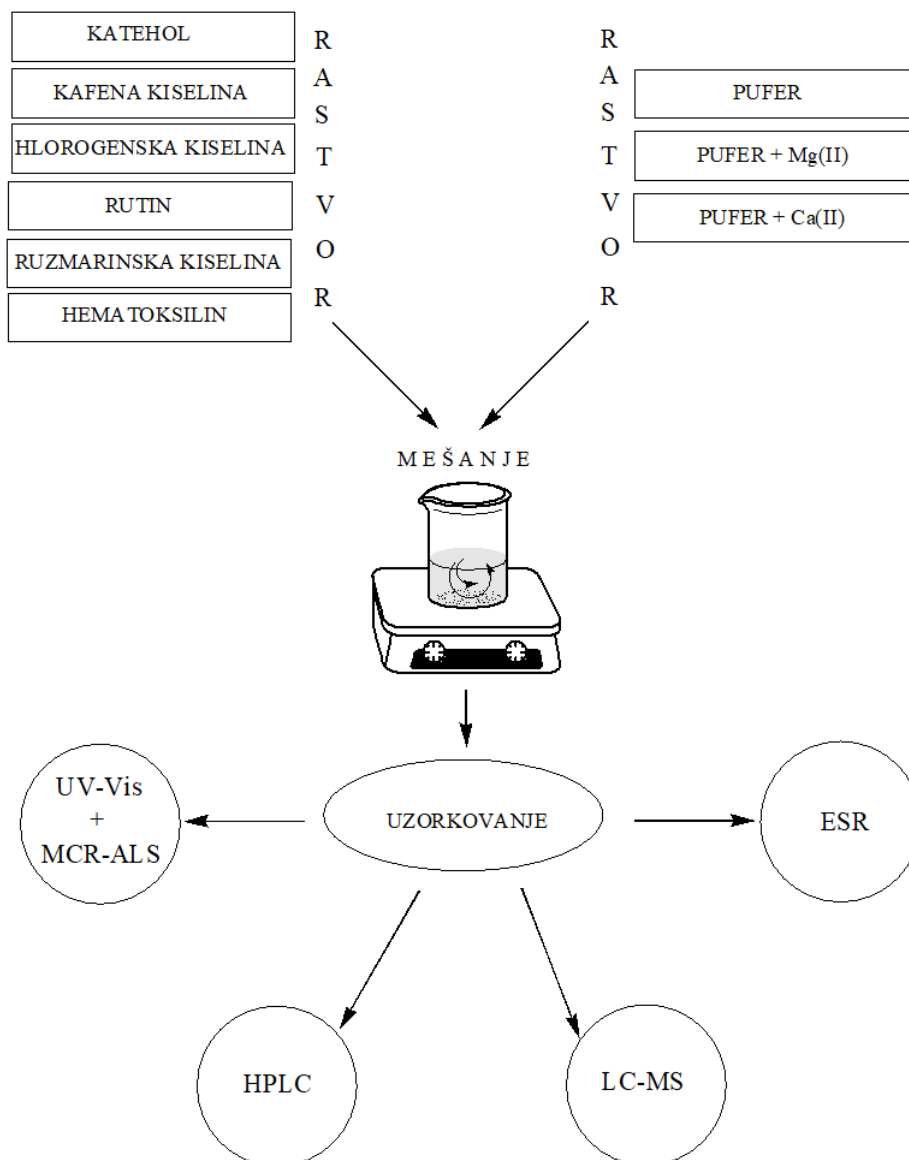
Šematski prikaz eksperimentalnog postupka je prikazan na slici 20.

3.2. UV/Vis spektrofotometrija

Snimanje UV/Vis spektara u toku autooksidacije ispitivanih polifenolnih jedinjenja, osim hematoksilina, izvedeno je korišćenjem UV/Vis spektrofotometra Evolution 60 (Thermo Scientific, USA), sa kvarcnom ćelijom od 1,0 cm. Spektri su snimani odmah po mešanju

odgovarajućih rastvora ($t=0$) i u vremenskim intervalima od 10 min u ukupnom trajanju od 90 min.

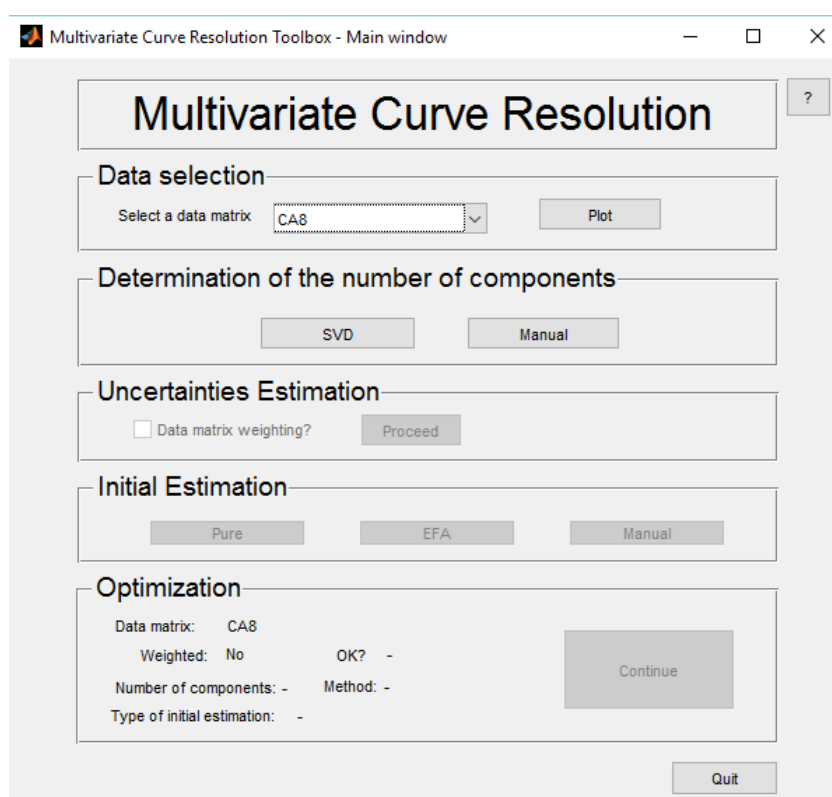
Autooksidacija hematoksilina je, zbog izuzetno brzih reakcija, praćena na, za to pogodnom, UV/Vis spektrofotometru Agilent 8453 Diode Array (Agilent, SAD), takođe korišćenjem kvarcne kivete od 1,0 cm. Proces autooksidacije bez prisustva metalnih jona je praćen 40 min, pri čemu je snimljen 21 spektar, dok je u slučaju prisustva metalnih jona snimljeno po 70 spektara u vremenu od 25 min.



Slika 20. Šematski prikaz eksperimentalnog postupka

3.2.1. Hemometrijska obrada dobijenih UV/Vis spektara

Dobijeni spektrofotometrijski podaci su dodatno hemometrijski obrađivani, upotrebom MCR-ALS multivarijantne analize, sa ciljem dobijanja podataka o broju i vrsti osnovnih komponenti prisutnih tokom autooksidacije polifenola (Tauler 1995). MCR-ALS metoda je izabrana jer se pokazala kao veoma korisna kod obrade multivarijantnih podataka u spektroskopiji, hromatografiji i voltametriji (Ruckebusch & Blanchet 2013). Proračuni su obavljani korišćenjem MATLAB softvera (Mathwork Inc., version R2013a) uz upotrebu grafičkog *user-friendly* interfejsa (verzija 2.0) (Jaumot et al. 2015). Karakteristični koraci interfejsa su prikazani na sledećim slikama.



Slika 21. Polazni prozor za izračunavanje broja komponenti SVD procedurom i postavljanje početnih procena

Constraints: row mode (Concentrations)

Constraints: row mode (concentrations and single experiment)

Constraints

Non-negativity

Apply? Implementation: select... Nr. of species with non-negative profiles?: select...
Enter a vector of positive profiles: []

Unimodality

Apply? Implementation: select... Nr. of species with unimodal profiles?: select...
Constraint tolerance: 1.1 Enter a vector of unimodal profiles: []

Closure

Apply? Nr. of closure constraints to be included?: select... Closure variable?:
First closure constraint equal to: [] Second closure constraint equal to: []
First variable closure: [] Second variable closure: []
Closure condition: select... Closure condition: select...
Which species are in 1st closure? All [] Which species are in 2nd closure? All []

Equality constraints

Apply? Select csel matrix: select a variable from the WS Constraints are: select...

Advanced constraints

Correlation Kinetic HM Reset Continue

Slika 22. Prozor za izbor koncentracionih ograničenja

Constraints: column mode (spectra)

Constraints: column mode (spectra and single technique)

Constraints

Non-negativity

Apply? Implementation: select... Nr. of species with non-negative profiles?: select...
Enter a vector of positive profiles: []

Unimodality

Apply? Implementation: select... Nr. of species with unimodal profiles?: select...
Constraint tolerance: [] Enter a vector of unimodal profiles: []

Closure

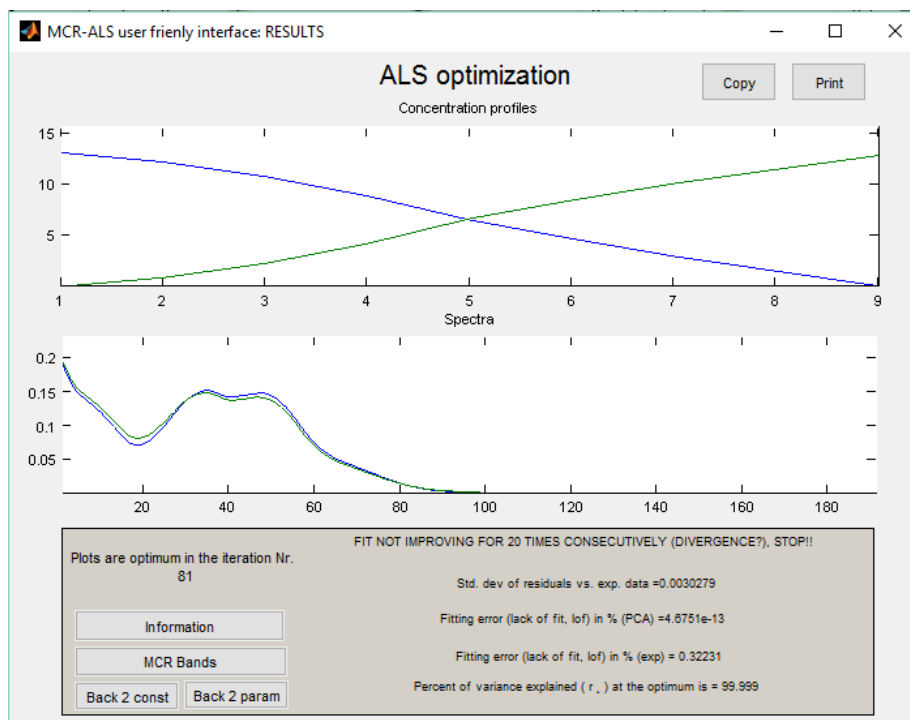
Apply? Nr. of closure constraints to be included?: select... Closure variable?:
First closure constraint equal to: [] Second closure constraint equal to: []
First variable closure: [] Second variable closure: []
Closure condition: select... Closure condition: select...
Which species are in 1st closure? All [] Which species are in 2nd closure? All []

Equality constraints

Apply? Select csel matrix: select a variable from the WS Constraints are: select...

Reset Back Continue

Slika 23. Prozor za izbor spektralnih ograničenja



Slika 24. Finalni prozor sa prikazom rezultata ALS optimizacije

3.3. HPLC-DAD analiza

Za HPLC analize korišćen je sistem Agilent Technologies 1200 (Agilent, SAD) opremljen vakuumskim degazerom, binarnom pumpom, autosemplerom, odeljkom za kolonu sa termoregulacijom i DAD detektorom. Razdvajanja su izvođena na koloni Purospher STAR RP-18e (150 × 4.6 mm, 5 μm, Merk, Nemačka), pri konstantnoj temperaturi od 30°C. Kao mobilna faza korišćeni su 0,1 % vodeni rastvor trifluorosirćetne kiseline (komponenta A) i acetonitril (komponenta B). Primenjivana je gradijentna elucija pri čemu je gradijent komponente B uspostavljen na sledeći način: 0-12 min od 10 do 40%; 12-15 min od 40 do 80%; 15-16 min konstantno 80%, i 16-20 min od 80 do početnih 10%. Protok mobilne faze je bio 0,5 mL/min, a zapremina injektovanih uzoraka je bila 10 μL. Detektor je bio podešen da snima hromatograme na talasnoj dužini 254 nm (koja je tipična za benzoevu kiselinu i njoj slična jedinjenja). Istovremeno su promene apsorbancije praćene na još dve talasne dužine (290 nm i 330 nm) kako bi se uočili mogući proizvodi autooksidacije polifenola koji, eventualno, poseduju dodatne hromofore.

3.4. LC/MS analiza

U ovu svrhu je korišćen LC-MS sistem, kombinacija tečnog hromatografa Dionex Ultimate 3000 UHPLC i masenog spektrometra TSQ Quantum Access MAX sa trostrukim kvadrupolom (Thermo Scientific, Nemačka).

Ispitivana jedinjenja su analizirana direktnim injektovanjem u ESI izvor, tako što je uzorak injektovan u LC-MS mobilnu fazu (MeOH : H₂O = 1 : 1) čiji je protok bio 0,2 mL/min. ESI-MS spektri su snimani u negativnom modu, u dva opsega *m/z* vrednosti: 50–500 i 100–1000. Tokom snimanja ESI-MS spektara korišćeni su sledeći parametri: napon na kapilari 3 kV, temperatura vaporajzera 380°C, pritisak glavnog gasa 40 bar, pritisak pomoćnog gasa 5 bar, temperatura kapilare 360°C, kapilarni otklon -35 V.

U slučaju kafene kiseline, ESI-MS snimanje je vršeno i nakon hromatografskog razdvajanja na koloni Hypersil GOLD, dimenzija 100 x 2,1 mm i veličinom čestica sorbenta 1,9 μm (Thermo Scientific, SAD). Mobilnu fazu su činili 0,1 % vodeni rastvor mravlje kiseline (komponenta A) i acetonitril (komponenta B). Pri protoku mobilne faze 0,25 mL/min primenjen je sledeći gradijent komponente B: 0-12 min od 10 do 40%; 12-15 min od 40 do 80%; 15-16 min konstantno 80%, i 16-19 min od 80 do početnih 10% i 19-20 nepromenjeno 10%. Injektovano je 10 μL uzorka.

Pored ovoga, izvršena je MS/MS analiza karakterističnih pikova od interesa, primenom kolizionih energija 15 i 20 V.

3.5. ESR spektroskopija

Za snimanje ESR spektara korišćen je spektrometar Bruker ESR-300E (Bruker, Nemačka) u X-band modu, primenom tankoslojne kvarcne ćelije ER-160FC. Parametri za snimanje spektara su bili sledeći: mikrotalasna frekvencija 9,64 GHz, mikrotalasna snaga 2,0 mW, centar polja 344,0 mT (3440 G), širina polja 2,0 mT (20 G), modulaciona frekvencija 100 kHz, modulaciona amplituda 0,01 mT (0,1 G), vremenska konstanta 10,24 ms, vreme konverzije 327,68 ms.

Kompjuterskim simulacijama dobijani ESR spektri pojedinih čestica slobodnih radikala su upoređivani sa realno snimljenim spektrima, kako bi se izvršila karakterizacija i identifikacija detektovanih formiranih slobodnoradikalskih vrsta. Kompjuterske simulacije su rađene

korišćenjem softvera SimFonia (verzija 1.25, Bruker, Nemačka), kao i programa EPR-WinSIM:NIEHS (verzija 0.98, Public EPR Software Tool, SAD).

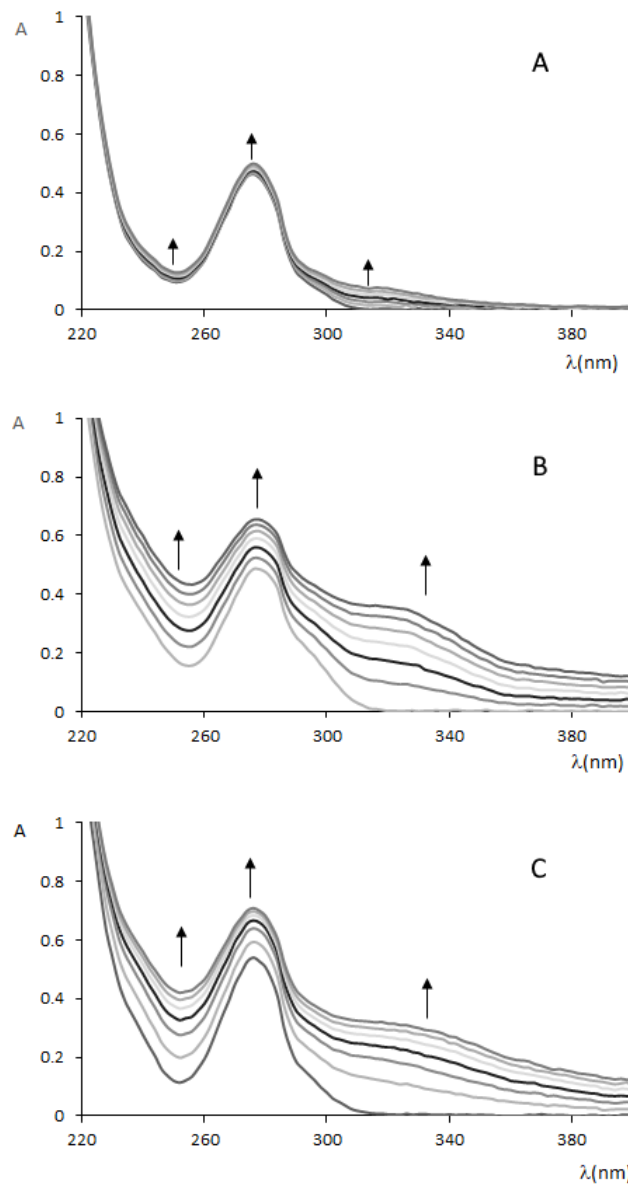
4. Rezultati i diskusija

4.1. Katehol

4.1.1. Autooksidacija katehola na pH 8,4

4.1.1.1. UV/Vis spektralna analiza

Slika 25 prikazuje UV/Vis spektre snimljene u toku autooksidacije katehola na pH 8,4 bez prisustva metalnih jona (A) i u prisustvu jona Mg(II) (B) i Ca(II) (C), snimane na svakih 15 minuta tokom 90 minuta.



Slika 25. UV/Vis spektri snimljeni u toku autooksidacije katehola na pH 8,4 bez prisustva metalnih jona (A), u prisustvu jona Mg(II) (B) i Ca(II) (C)

U blago alkalnoj sredini, na pH 8,4, katehol pokazuje relativno jednostavan UV/Vis spektar sa maksimumom na 276 nm koji odgovara potpuno protonovanom molekulu, što je posledica visokih pKa vrednosti katehola; prva konstanta kiselosti, pK_{a1} , ima vrednost oko 9,5 (Lebedev et al. 2007). U toku reakcije autooksidacije katehola, dolazi do nezatnog rasta intenziteta apsorbanca na svim talasnim dužinama, pri čemu je taj rast nešto intenzivniji na oko 314 nm. Uočene male promene UV/Vis spektra katehola govore o, takođe, maloj brzini njegove autooksidacije na pH 8,4 u odsustvu metalnih jona.

Kada se u reakcionu sistem uvedu joni Mg(II) i Ca(II) promene u spektrima su daleko izraženije. U oba slučaja događa se minimalno batohromno pomeranje maksimuma apsorpcije za oko 2 nm, tj. na 278 nm, ali je hiperhromni efekat mnogo intenzivniji u poređenju sa sistemom bez metalnih jona. Ovo upućuje na zaključak da se autooksidacija katehola ubrzava u prisustvu Mg(II) i Ca(II) jona u reakcionoj smeši.

4.1.1.1.1. MCR-ALS obrada spektralnih podataka

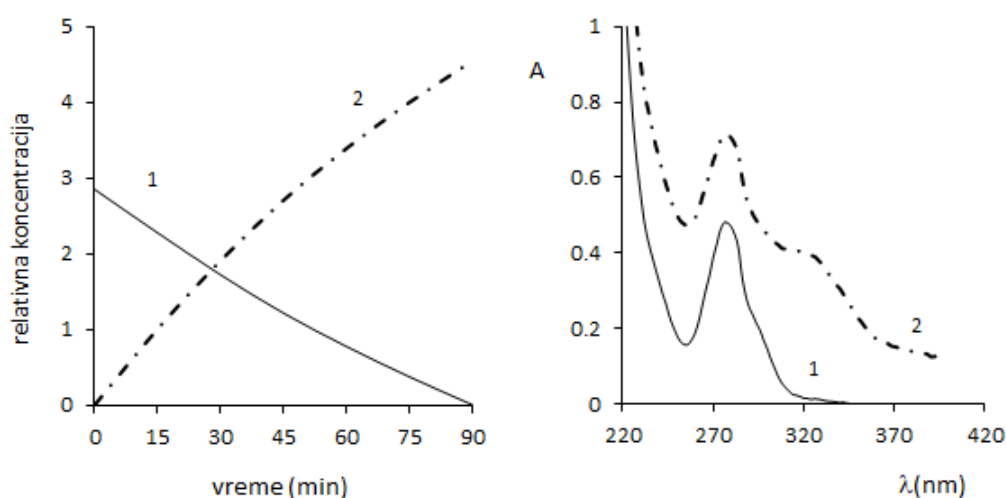
Naknadna analiza dobijenih UV/Vis spektara u prisustvu metalnih jona, sprovedena je MCR-ALS metodom, kako bi se procenili broj i spektri značajnih komponenti prisutnih u reakcionim smešama, tj. kako bi se odredili koncentracioni i spektralni profile učesnika u reakciji. Finalni parametri MCR-ALS optimizacije su dati u sledećoj tabeli:

Tabela 2. Finalni parametri MCR-ALS analize UV/Vis spektara katehola snimljenih na pH 8,4 u prisustvu metalnih jona

	pH 8,4 + Mg(II)	pH 8,4 + Ca(II)
LOF% (PCA)	0,4857	0,2651
LOF% (exp)	1,1985	1,0197
r^2	99,9856	99,9881

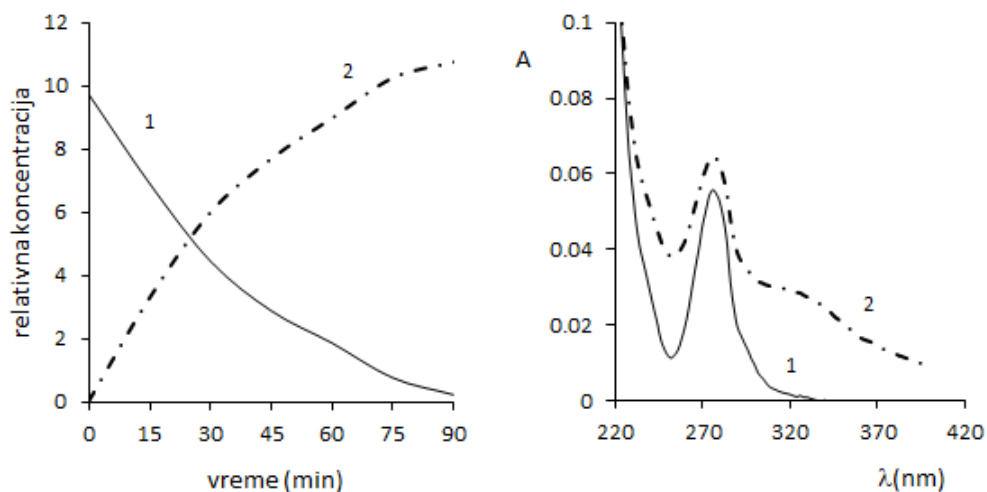
Slika 26 prikazuje koncentracione i spektralne profile sistema Cat-Mg(II) na pH 8,4. U reakcionoj smeši su identifikovane dve glavne komponente. Komponenta 1 je prisutna od početka reakcije i njena koncentracija konstantno, gotovo linearno, opada do 90. minuta, kada potpuno nestaje iz reakcionog sistema. Iz ovoga se jasno može zaključiti da je komponenta 1 katehol. Proizvod autooksidacije katehola, komponenta 2, nastaje na početku reakcije autooksidacije, a njena koncentracija stalno raste do kraja praćenja autooksidacije. Na osnovu

njenog UV/Vis spectra, koji pokazuje značajnu apsorbciju talasnih dužina preko 320 nm, može se pretpostaviti da se radi o jedinjenju sa hinonskom strukturom.



Slika 26. Koncentracijski profili (levo) i spektri čistih komponenti (desno) dobijeni primenom MCR-ALS metode na autooksidaciju katehola u prisustvu jona Mg(II) na pH 8,4

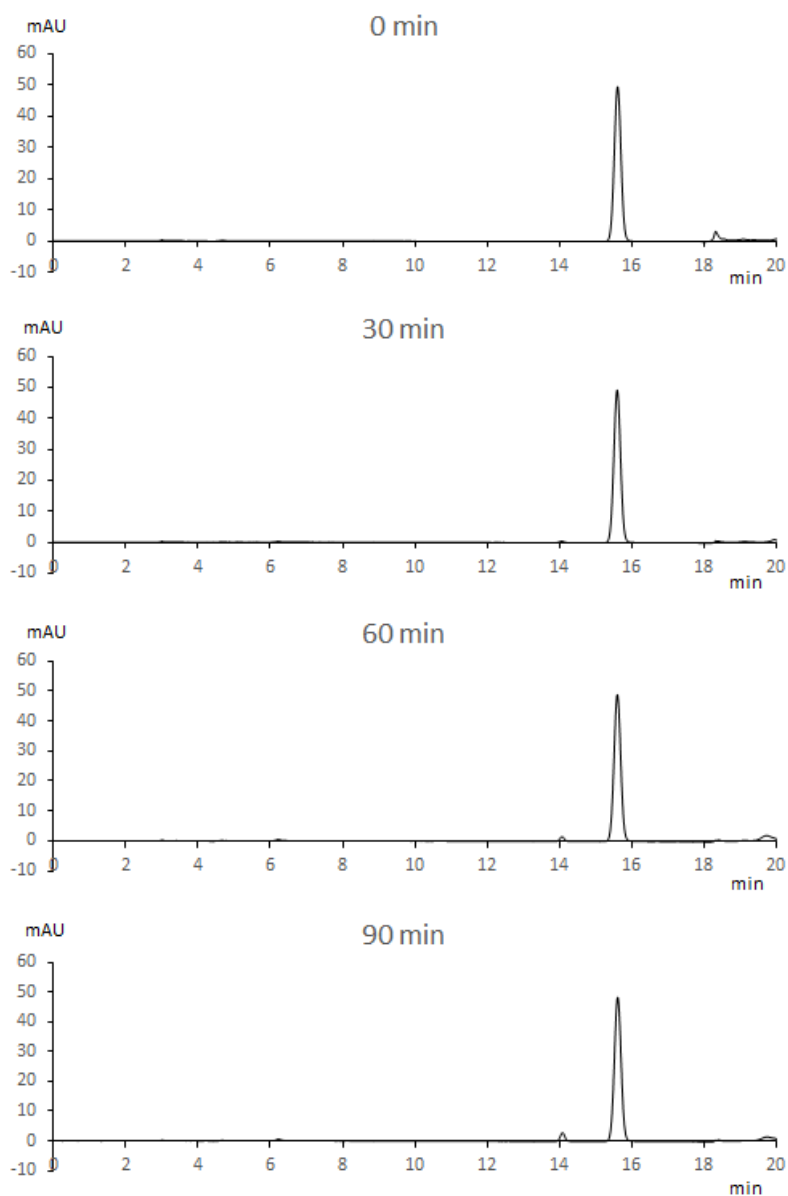
Na slici 27, koja predstavlja rezultat MCR-ALS obrade spektara za sistem Cat-Ca(II), zapaža se veoma sličan model ponašanja kao u prethodnom slučaju. Sudeći po veoma sličnom spektru komponente 2, može se pretpostaviti da se radi o istom proizvodu reakcije čije se spektralne karakteristike malo razlikuju samo zbog razlika u uticaju različitih metalnih jona na raspodelu elektronske gustine u tom molekulu.



Slika 27. Koncentracijski profili (levo) i spektri čistih komponenti (desno) dobijeni primenom MCR-ALS metode na autooksidaciju katehola u prisustvu jona Ca(II) na pH 8,4

4.1.1.2. HPLC-DAD analiza

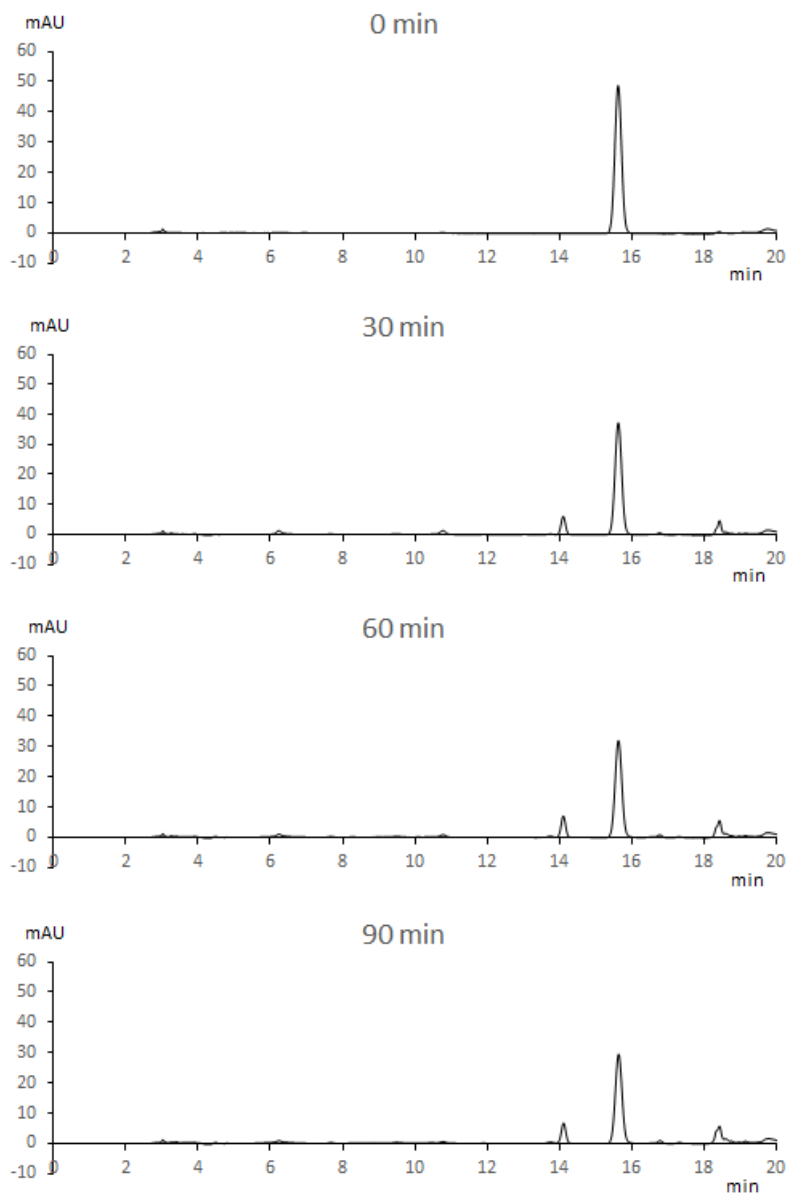
Iduće tri slike predstavljaju hromatograme snimane u toku 90 minuta autooksidacije katehola bez prisustva metalnih jona (slika 28), u prisustvu jona Mg(II) (slika 29) i jona Ca(II) (slika 30).



Slika 28. Hromatogrami snimljeni u toku autooksidacije katehola na pH 8,4 bez prisustva metalnih jona

Retenciono vreme katehola je 15,65 minuta. U sva tri sistema intenzitet ovog pika (tj. koncentracija katehola) je opadao sa vremenom kao posledica trošenja katehola tokom reakcije autooksidacije. I dok je ovo smanjenje intenziteta pika katehola za 90 minuta minimalno u

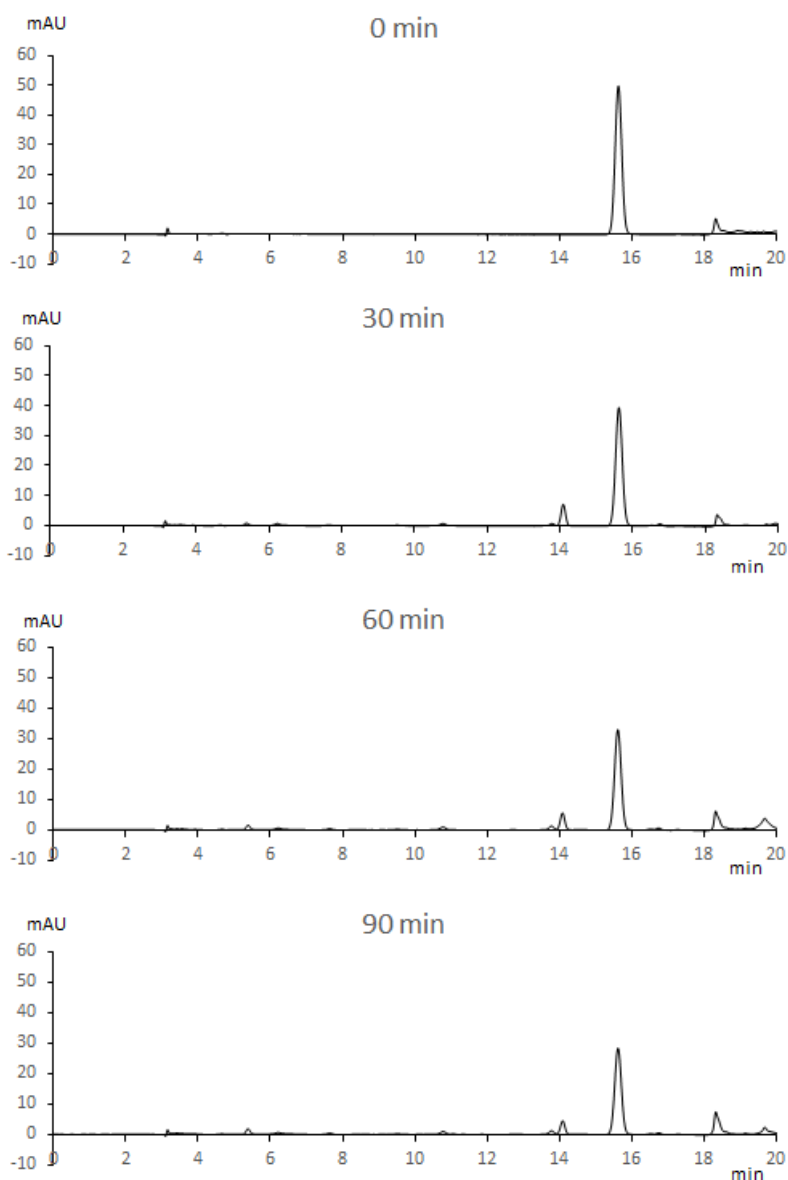
sistemu bez prisustva metalnih jona, znatno je veće u sistemima Cat-Mg(II) i Cat-Ca(II), što je u saglasnosti sa spektrofotometrijskim merenjima.



Slika 29. Hromatogrami snimljeni u toku autooksidacije katehola na pH 8,4 u prisustvu Mg(II) jona

U reakcionoj smeši bez prisustva metalnih jona se pored katehola na samom početku reakcije autooksidacije može detektovati pik na 18,5 min koji u daljem toku reakcije nestaje iz reakcione smeše, tako da se već posle prvih 30 minuta ne vidi na hromatogramu. Istovremeno, posle 30

minuta pojavljuje se pik na 14,1 min koji se do kraja neznatno uvećava. Na osnovu retencionih vremena pikova novonastalih jedinjenja, može se zaključiti da je autooksidacioni proizvod sa RT 18,5 min manje polaran, dok je onaj sa RT 14,1 min polarniji od katehola.

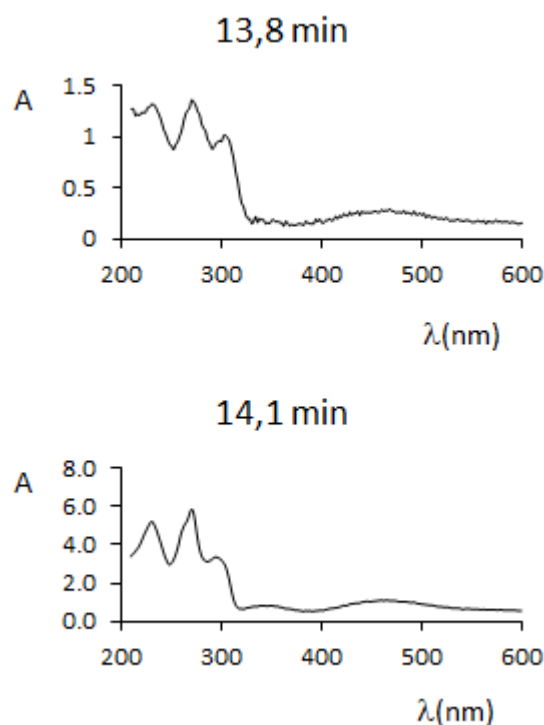


Slika 30. Hromatogrami snimljeni u toku autooksidacije katehola na pH 8,4 u prisustvu Ca(II) jona

Isti pikovi se mogu uočiti na hromatogramima snimanim tokom autooksidacije katehola u prisustvu metalnih jona, uz nekoliko razlika između sistema Cat-Mg(II) i Cat-Ca(II). U Cat-

Mg(II) sistemu, oba navedena pika se javljaju u prvih 30 minuta reakcije i ostaju do kraja snimanja hromatograma u gotovo nepromenjenim intenzitetima. U sistemu Cat-Ca(II), odmah na početku se pojavljuje pik na 18,5 min i lagano raste do 90. minuta. Pik sa RT 14,1 min pojavljuje se do 30. minuta reakcije i lagano opada do kraja.

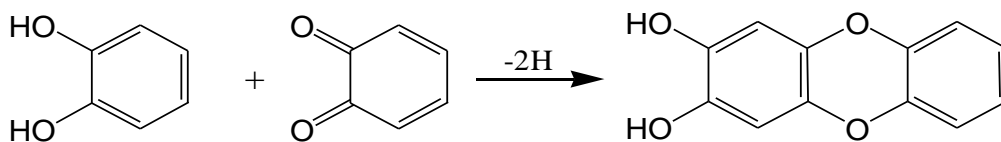
Očigledno je da pik na 14,1 min odgovara glavnom autooksidacionom proizvodu katehola. On je, očekivano, najmanji u sistemu bez metalnih jona zbog najmanje brzine autooksidacije katehola. Najizraženiji je u Cat-Mg(II) sistemu, dok je u Cat-Ca(II) sistemu, nešto slabijeg intenziteta. Istovremeno, neposredno pre njega, na retencionom vremenu 13,8 min, javlja se dodatni pik čiji se intenzitet povećava sa vremenom autooksidacije. Ovo bi moglo da znači da se jedinjenje sa RT 14,1 min vremenom transformiše u jedinjenje sa RT 13,8 min. Štaviše, verovatno se radi o neznatnim transformacijama, pošto oba jedinjenja imaju veoma bliska retencionna vremena i veoma slične UV/Vis spektre, prikazane na slici 31, na kojoj se zapaža povećanje apsorbancije u delu spektra vidljive oblasti, što govori o produženoj delokalizaciji π -elektrona u nastalim proizvodima, karakterističnoj za hinonske strukture.



Slika 31. UV/Vis spektri jedinjenja sa RT 13,8 min i 14,1 min ekstrahovani iz hromatograma

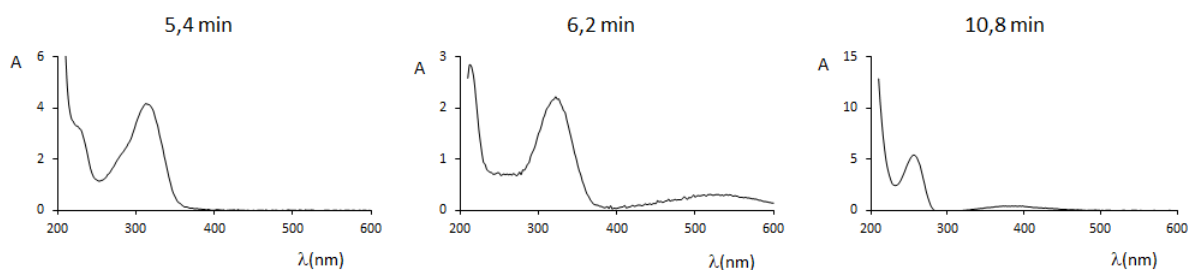
Zbog činjenice da oksidacijom katehola u alkalnim uslovima nastaju hinonski molekuli, a koji imaju smanjena retenciona vremena u reversno-faznoj hromatografiji, za pik sa RT 14,1 min se može pretpostaviti da odgovara *orto*-benzohinonu (hinonska forma katehola). To je u skladu sa literaturnim podacima (Nikolic et al. 1998) i vrednostima za LogP koja za katehol iznosi 0,91, dok je za njegov hinon manja i iznosi -0,06 (LogP vrednosti dobijene su korišćenjem softvera ChemDraw Ultra, verzije 7.0).

Često u kasnijoj fazi autooksidacije polifenolnih jedinjenja, pa tako i katehola, dolazi do dimerizacije (ili čak polimerizacije) polaznih jedinjenja. Mogući dimer koji može nastati iz katehola i njegovog hinona, prikazan na slici 32, ima procenjenu vrednost za LogP 1,27, tako da bi trebalo da ima duže retenciono vreme od katehola, odnosno, jedinjenje sa RT 18,5 min bi moglo biti upravo ovaj dimer.



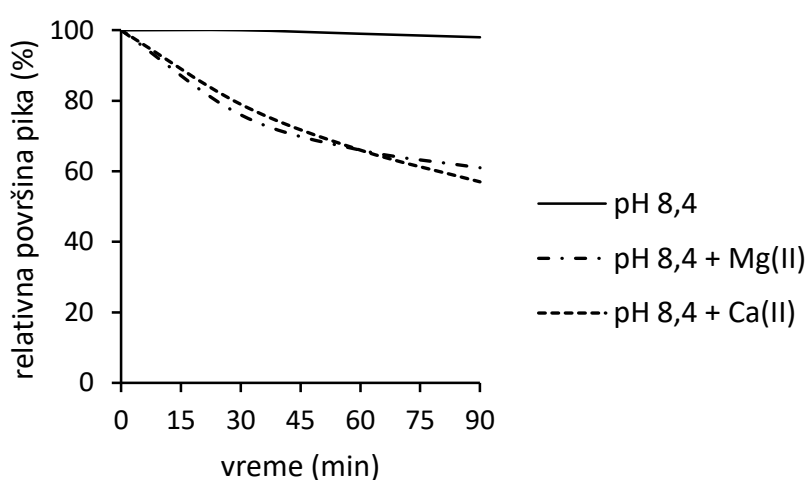
Slika 32. Nastajanje mogućeg dimera katehola

Pažljivo proučavanje prikazanih hromatograma otkriva prisustvo minornih pikova na RT 6,2 min u sva tri sistema, dok se u sistemima sa metalnim jonima pojavljuje dodatni pik na 10,8 minuta. Na kraju, samo u prisustvu jona Ca(II) nastaje jedinjenje sa retencionim vremenom 5,4 min. Na osnovu njihovih retencionih vremena, može se zaključiti da se radi o polarnijim jedinjenjima od katehola, kao i od glavnih proizvoda njegove autooksidacije. Na slici 33 su prikazani njihovi UV/Vis spektri, ekstrahovani iz hromatograma.



Slika 33. UV/Vis spektri jedinjenja sa RT 5,4 min, 6,2 min i 10,8 min ekstrahovani iz hromatograma

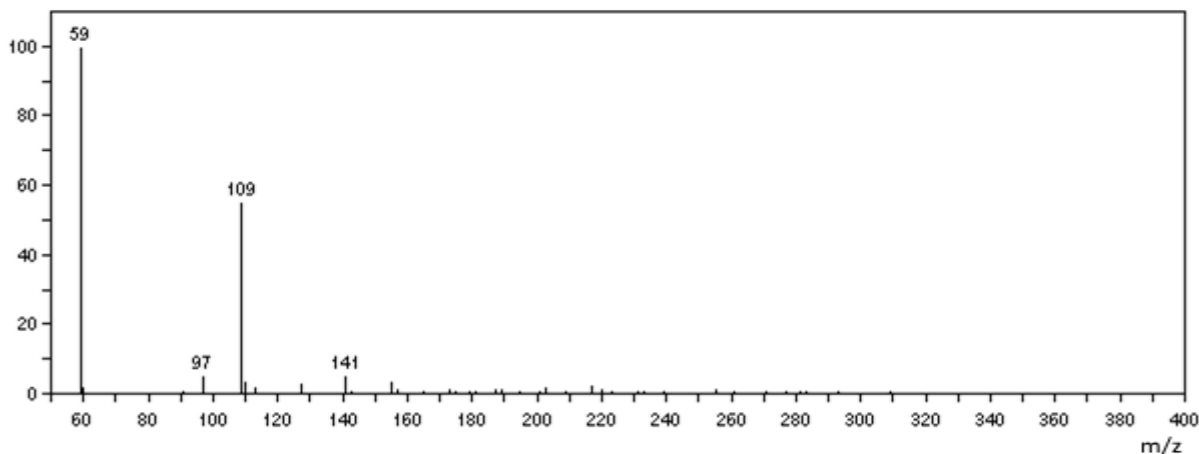
Potrošnju katehola u sva tri ispitivana sistema na pH 8,4 prikazuje slika 34. Tokom 90 minuta praćenja reakcije autooksidacije, količina katehola u sistemu bez metalnih jona je ostala gotovo ista, odnosno, 98% katehola je ostalo nepromenjeno. Kada su, međutim, prisutni metalni joni, potrošnja katehola je mnogo veća, tako da na kraju zaostaje oko 61% i oko 57% neizreagovalog katehola u sistemima Cat-Mg(II) i Cat-Ca(II), respektivno. Očigledno je da joni Mg(II) i Ca(II) znatno ubrzavaju autooksidaciju katehola pri datim eksperimentalnim uslovima, mada uz neznatne razlike reakcionih profila. U početku je uticaj Mg(II) jona na autooksidaciju katehola nešto izraženiji u odnosu na Ca(II) jone, da bi posle 70 minuta reakcije autooksidacije kalcijum pokazao neznatno jače dejstvo u odnosu na magnezijum.



Slika 34. Potrošnja katehola tokom autooksidacije na pH 8,4 bez prisustva metalnih jona i u prisustvu metalnih jona

4.1.1.3. ESI-MS analiza

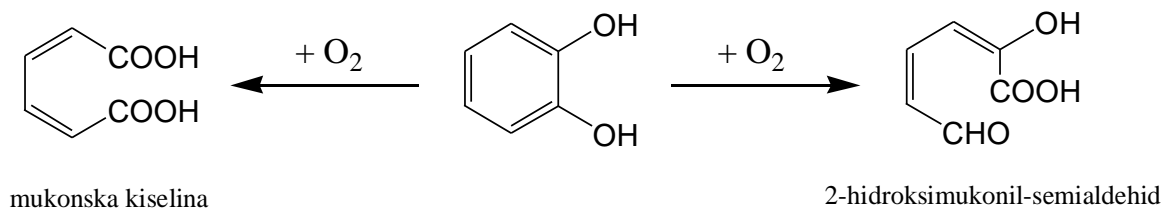
Dalje ispitivanje proizvoda autooksidacije katehola vršeno je masenom spektrometrijom, metodom ESI jonizacije u negativnom modu. Slika 35 prikazuje maseni spektar smeše katehola i pufera na pH 8,4 bez prisustva metalnih jona, snimljen na samom početku reakcije autooksidacije.



Slika 35. ESI-MS spektar vodenog rastvora katehola na pH 8,4.
Vreme autooksidacije 0 min

Najintenzivniji pik sa m/z 59 potiče od acetatnog anjona iz korišćenog pufera. Drugi po intenzitetu je karakterističan pik katehola sa m/z 109 [Cat – H]⁻, a pored njega se uočavaju još dva pika, sa m/z vrednostima 97 i 141.

Poznato je da katehol može reagovati sa molekulskim kiseonikom, nakon čega je moguće otvaranje prstena i formiranje ili mukonske kiseline ili njenog aldehida, 2-hidroksimukonil-semialdehida, kako je prikazano na slici 36 (Bencini et al. 2003, Chuhev & BelBruno 2008, Haribabu 1984):

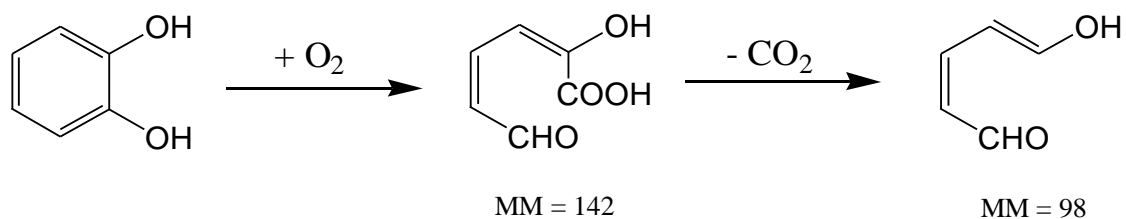


Slika 36. Otvaranje prstena katehola pod dejstvom O₂

Molekulske mase oba proizvoda su identične i iznose 142 Da, što znači da bi njihove m/z vrednosti u negativnom modu snimanja odgovarale piku sa m/z vrednošću 141 u masenom spektru. Dekarboksilacijom nastalih proizvoda, koja je favorizovana u alkalnim uslovima, nastaje novi jon sa m/z 97 (141 – 44), takođe vidljiv u masenom spektru.

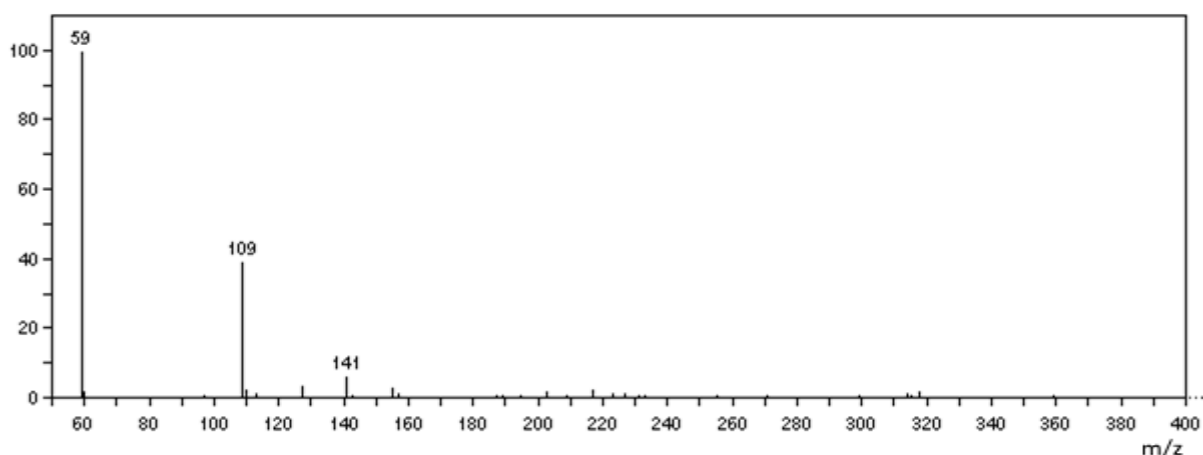
Imajući u vidu da mukonska kiselina sadrži dve ekvivalentne karboksilne funkcije, pretpostavka je da bi tokom ESI jonizacije nastao i dvostruko negativan jon, čija bi m/z vrednost u tom slučaju iznosila (142 – 2) / 2 = 70. Dalje, po istoj logici, dekarboksilacija bi mogla da

bude i dvostruka, odnosno trebalo bi da postoji signal sa m/z $141 - 2 \cdot 44 = 53$. Kako maseni spektri snimljeni u toku autooksidacije katehola ne sadrže pikove sa m/z 53 i 70, zaključak je da tokom oksidacije katehola nastaje samo 2-hidroksimukonil-semialdehid, koji daje jedan proizvod dekarboksilacije (slika 37).



Slika 37. Mogući koraci transformacije katehola

Tokom dalje reakcije autooksidacije, nije bilo značajnih promena u masenim spektrima snimanim nakon više časova, pa čak i nekoliko dana. Uočava se jedino izostanak pika sa m/z 97 posle tri dana (slika 38).

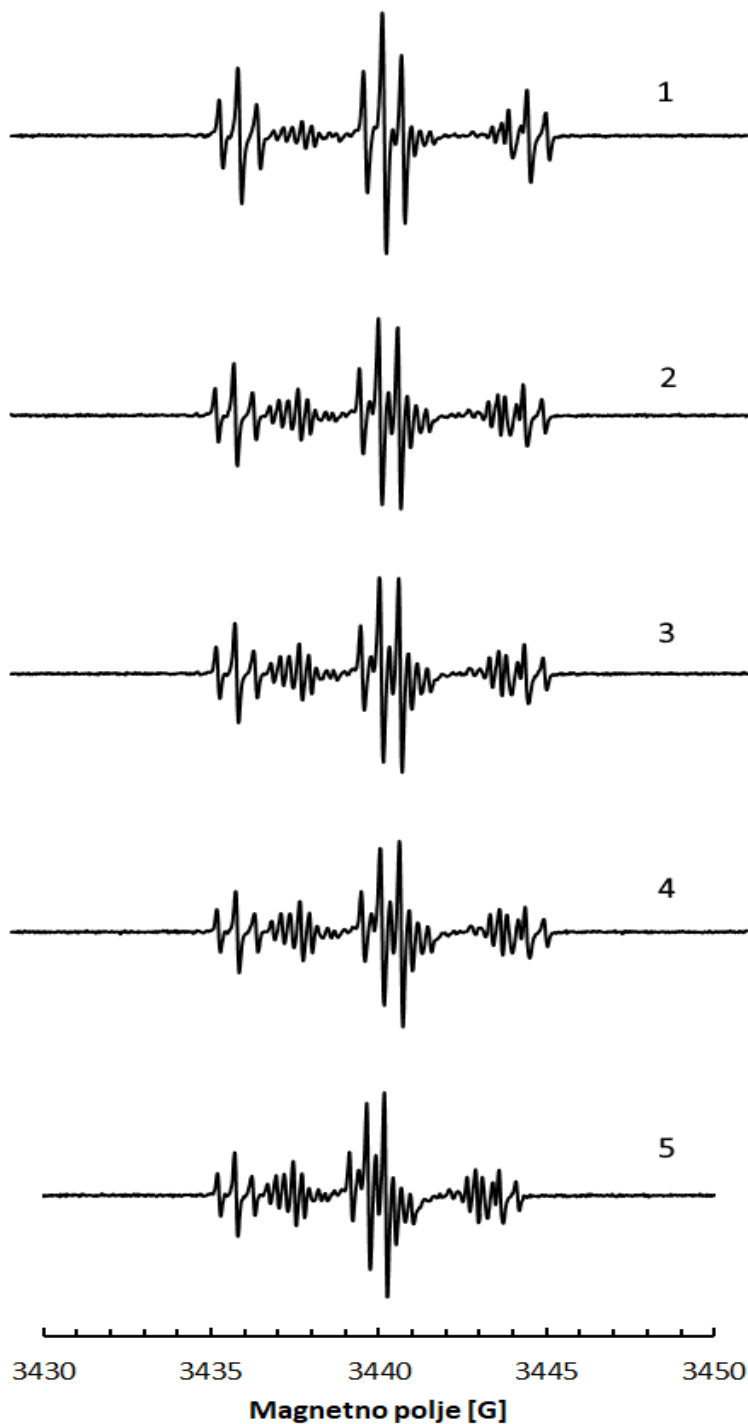


Slika 38. ESI-MS spektar vodenog rastvora katehola na pH 8,4. Vreme autooksidacije 3 dana

4.1.1.4. ESR analiza

Poznato je da tokom reakcija autooksidacije nastaju slobodno-radikalske vrste, tako da je logično očekivati formiranje *orto*-semihinonskih slobodnih radikala u toku autooksidacije katehola (Eaton 1964). Ipak, ESR spektri snimljeni u toku autooksidacije katehola na pH 8,4 bez prisustva metalnih jona imali su veoma loš odnos signal/šum i u njima se nisu mogli uočiti

signali koji bi ukazivali na prisustvo slobodnih radikala. Odsustvo ESR signala najverovatnije je posledica velike reaktivnosti eventualno nastalih slobodnih radikala, tj. usled velikih reakcionih brzina nemoguće je detektovati ih statičkom ESR tehnikom.

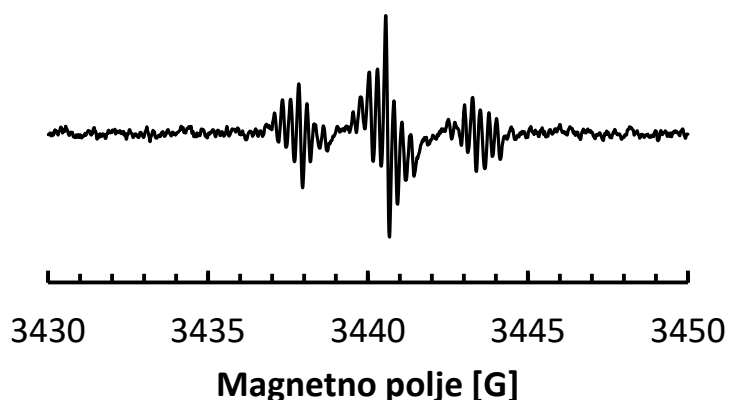


Slika 39. ESR spektri snimljeni u toku autooksidacije katehola na pH 8,4 u prisustvu Mg(II) jona; 1 – 5 min, 2 – 15 min, 3 – 25 min, 4 – 35 min, 5 – 105 min

Sa druge strane, u literaturi se mogu naći ESR spektri i Mg(II) i Ca(II) spinski stabilisani *orto*-semihinonskih radikala različitih kateholnih jedinjenja (Alegría et al. 2004, Eaton 1964, Ferrari et al. 1996, Lebedev et al. 2007), pri čemu se Ca(II) spinski stabilisani radikal kada nisu prisutni oksidirajući agensi (npr. enzimi) mogu detektovati samo na pH vrednostima višim od 9,0 (Eaton 1964, Lebedev et al. 2007). Iz tog razloga, snimani su samo ESR spektri u toku autooksidacije katehola u vodenim rastvorima na pH 8,4 u prisustvu Mg(II) jona, i to u različitim vremenskim intervalima: 5, 15, 25, 35 i 105 min (slika 39).

Već na prvom ESR spektru se uočava da se, osim primarnog *orto*-benzosemihinonskog radikala koji karakteriše triplet tripleta sa odnosom intenziteta 1:2:1, javlja bar još jedan sekundarni radikal. U toku autooksidacije, intenzitet signala primarnog radikala opada a sekundarnog raste.

Oduzimanjem ESR spektara snimljenih posle 25 i 5 min, dobijen je ESR spektar u kome je eliminisan signal primarnog radikala i koji ima približno simetričan raspored signala, što ukazuje na prisustvo jednog dominantnog sekundarnog radikala (slika 40).



Slika 40. ESR spektar sekundarnog radikala dobijen oduzimanjem dva ESR spektra katehola snimljena na pH 8,4 u prisustvu Mg(II) jona posle 25 min i 5 min

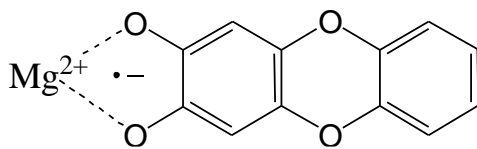
Kompjuterskom simulacijom ESR spektara dobijeni su parametri za konstante hiperfinog kuplovanja primarnog (R1) i sekundarnog (R2) radikala koje su prikazane u tabeli 3.

Tabela 3. Konstante hiperfinog kuplovanja radikalskih vrsta dobijenih kompjuterskom simulacijom ESR spektara snimljenih tokom autooksidacije katehola na pH 8,4 u prisustvu Mg(II) jona

Radikal	a^{H1}	a^{H2}	a^{H3}
R1	3,925	0,511	/
R2	2,706	0,503	0,252

Konstante hiperfinog kuplovanja za primarni radikal u potpunosti odgovaraju literaturnim podacima za *orto*-benzosemihinonski anjon radikal spinski stabilisan Mg(II) jonima (Eaton 1964, Felix & Sealy 1982).

Zadovoljavajuća simulacija ESR spektara sekundarnog radikala dobijena je pod pretpostavkom da u strukturi postoje tri grupe od po dva ekvivalentna protona. Pretpostavljena struktura sekundarnog radikala je data na slici 41.

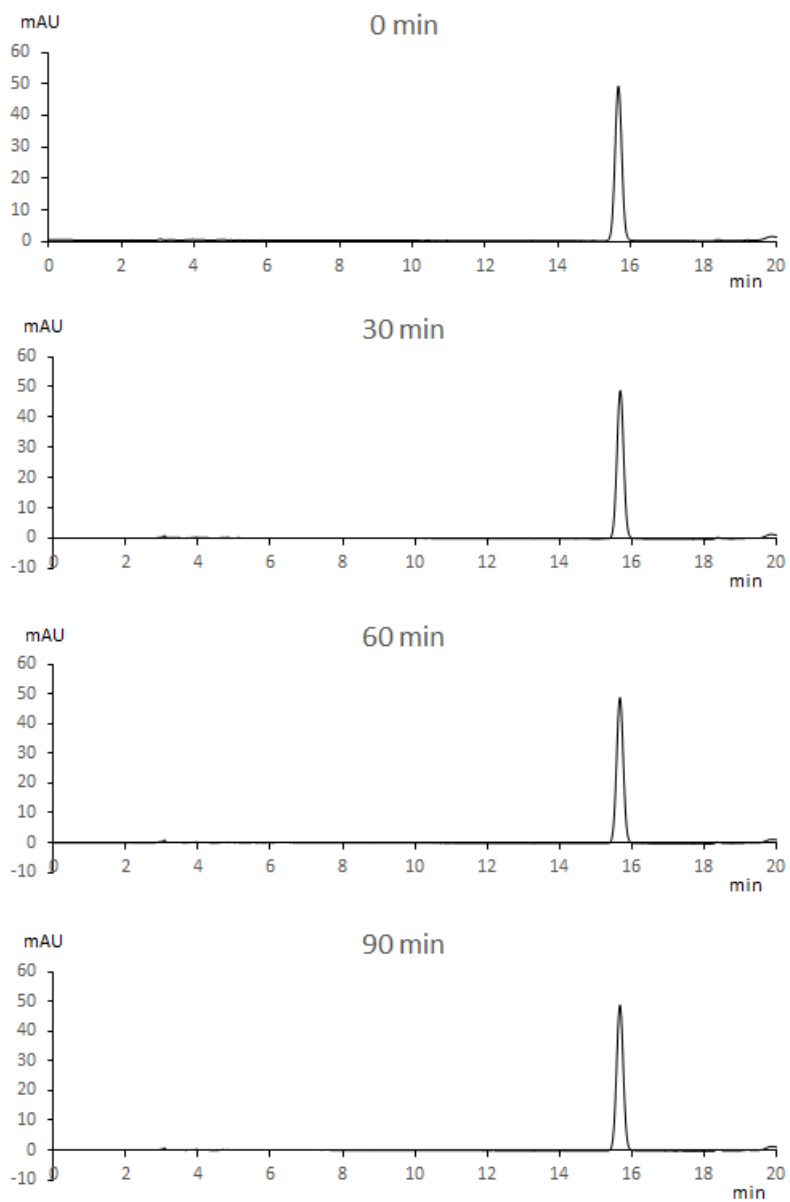


Slika 41. Pretpostavljena struktura sekundarnog radikala nastalog tokom autooksidacije katehola na pH 8,4 u prisustvu Mg(II) jona

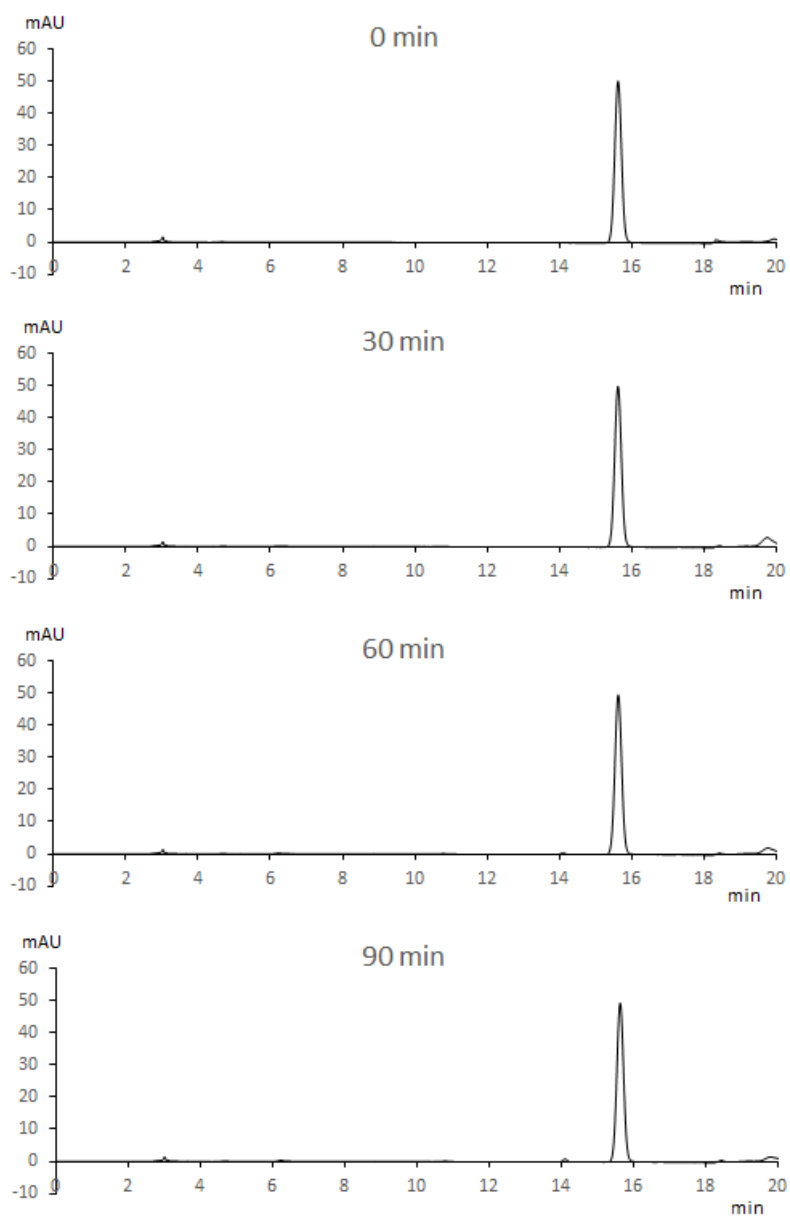
4.1.2. Autooksidacija katehola na pH 7,4

4.1.2.1. HPLC-DAD analiza

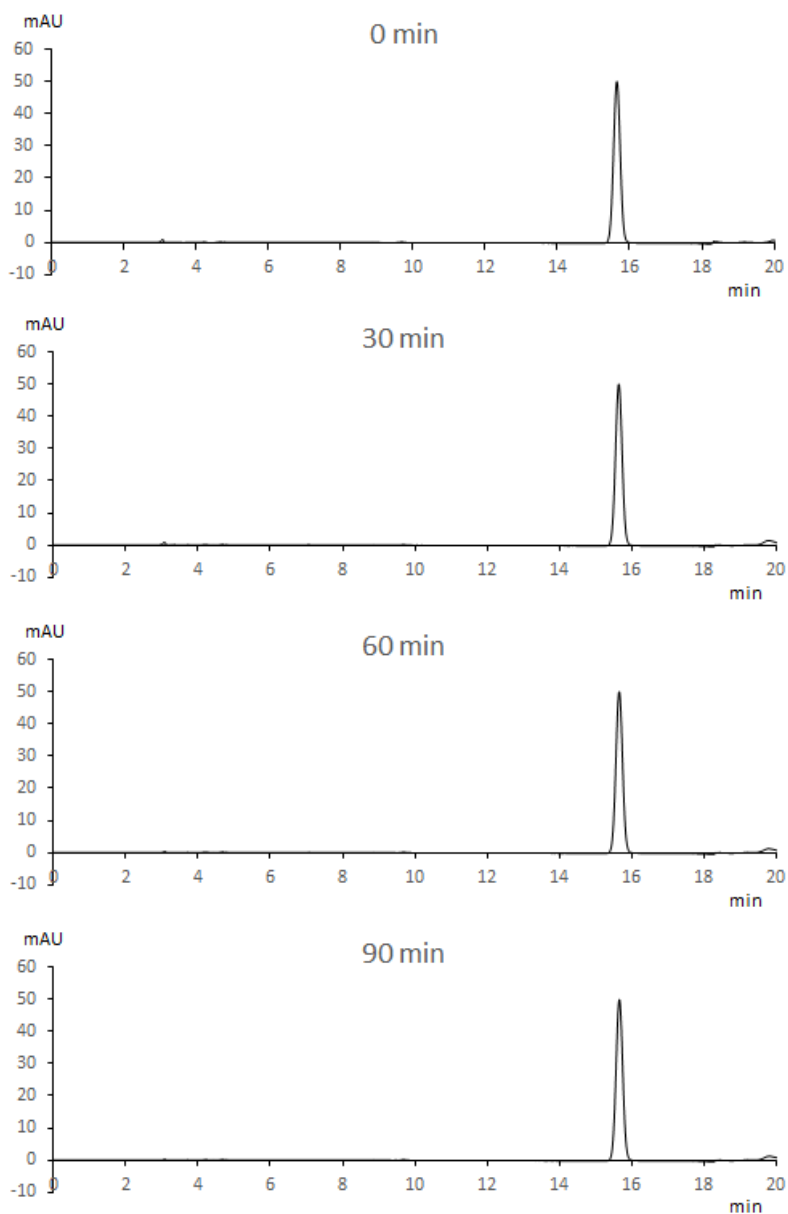
Autooksidacija katehola u TRIS-puferu sa i bez prisustva metalnih jona pri pH 7,4 je praćena HPLC metodom. Na slici 42 su predstavljeni hromatogrami snimani u intervalima od 30 minuta u rastvoru koji ne sadrži jone metala, na slici 43 kada su prisutni Mg(II) joni, a na slici 44 kada se u rastvoru nalaze Ca(II) joni.



Slika 42 Hromatogrami snimljeni u toku autooksidacije katehola na pH 7,4 bez prisustva metalnih jona



Slika 43. Hromatogrami snimljeni u toku autooksidacije katehola na pH 7,4 u prisustvu Mg(II) jona



Slika 44. Hromatogrami snimljeni u toku autooksidacije katehola na pH 7,4 u prisustvu Ca(II) jona

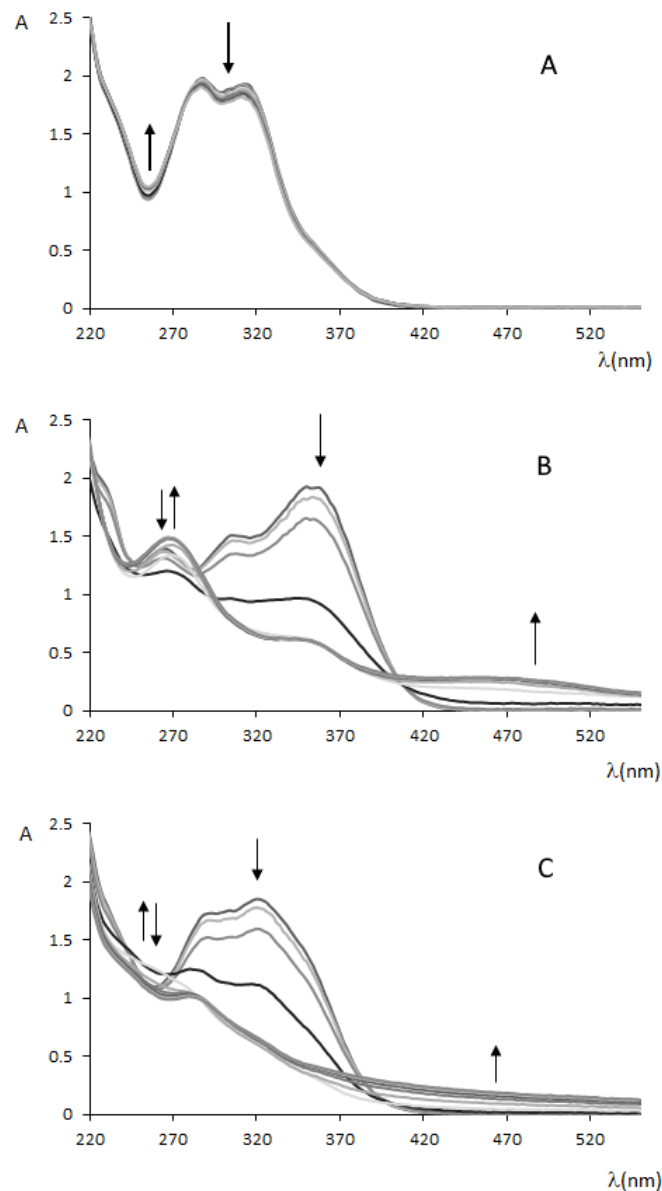
U sva tri slučaja, u hromatogramima je prisutan samo jedan pik, i to onaj koji odgovara kateholu. Površine ovih pikova ostaju gotovo iste sve vreme snimanja hromatograma, tako da se može zaključiti da je brzina autooksidacije na pH 7,4 zanemarljivo mala, kako u odsustvu metalnih jona, tako i u njihovom prisustvu.

4.2. Kafena kiselina

4.2.1. Autooksidacija kafene kiseline na pH 8,4

4.2.1.1. UV/Vis spektralna analiza

Slika 45 prikazuje UV/Vis spektre snimljene u toku autooksidacije kafene kiseline u TRIS puferu bez prisustva metalnih jona i u prisustvu Mg(II) i Ca(II) na pH 8,4 snimane tokom 90 minuta u intervalima od 10 minuta.



Slika 45. UV/Vis spektri snimljeni u toku autooksidacije kafene kiseline na pH 8,4 bez prisustva metalnih jona (A), u prisustvu jona Mg(II) (B) i jona Ca(II) (C)

U slučaju kada metalni joni nisu prisutni, uočava se UV/Vis spektar jednostruko deprotonovane kafene kiseline, tj. kafeatnog anjona, što je u saglasnosti sa činjenicom da je pK_{a1} kafene kiseline oko 4,4 (Cornard & Lapouge 2006). Karakteristični maksimumi apsorpcije se javljaju na 285 nm i 312 nm. Promena spektara tokom vremena je neznatna, iz čega zaključujemo da je brzina autooksidacije kafene kiseline zanemarljivo mala.

Kada su u rastvoru prisutni metalni joni, glavne apsorpcione trake se pomeraju batohromno, ali različito u zavisnosti od vrste metalnog jona.

Magnezijumovi joni trenutno menjaju UV/Vis spektar, tako da se umesto prvobitna dva maksimuma uočavaju nova tri: na 356 nm, 308 nm i 264 nm. Kafena kiselina vremenom nestaje, a istovremeno nastaje(u) novi proizvod(i). Novonastali spektar je sličan spektru dvostruko deprotonovane kafene kiseline (Cornard & Lapouge 2006), što se može objasniti činjenicom da dvovalentni dijamagnetni metalni joni snižavaju pK_a kateholne grupe i time olakšavaju njeno deprotonovanje (Lebedev et al. 2007). Tokom vremena intenziteti maksimuma na 356 nm i 308 nm opadaju veoma brzo, dok apsorpcija na 264 nm najpre neznatno opada do 30. minuta, a zatim lagano raste. Ova pojava, kao i odsustvo jasno izraženih izobestičkih tačaka navode na zaključak da oksidacionu smešu ne čine samo dva jedinjenja u ravnoteži, već je njihov broj, verovatno, veći. Na spektru se zapaža i porast apsorbanace u opsegu između 420 nm i 550 nm, ali bez jasno izraženih pikova.

U slučaju autooksidacije kafene kiseline u prisustvu jona Ca(II) takođe se zapaža trenutna promena UV/Vis spektra kafeatnog anjona, ali ovoga puta uz pojavu dva batohromno pomerena maksimuma: na 322 nm i 292 nm. Ovakav spektar pokazuje izuzetnu sličnost sa spektrom potpuno deprotonivane kafene kiseline (Cornard & Lapouge 2006). Sa vremenom intenzitet maksimuma na 322 nm konstantno opada, dok onaj na 292 nm najpre neznatno raste, a zatim isto tako lagano opada. Porast apsorbanace je vidljiv i na talasnim dužinama preko 400 nm, ali u manjoj meri u odnosu na system koji sadrži Mg(II) jone.

Intenziteti promene početnih spektara upućuju na zaključak da joni Mg(II) i Ca(II) znatno ubrzavaju reakciju autooksidacije kafene kiseline.

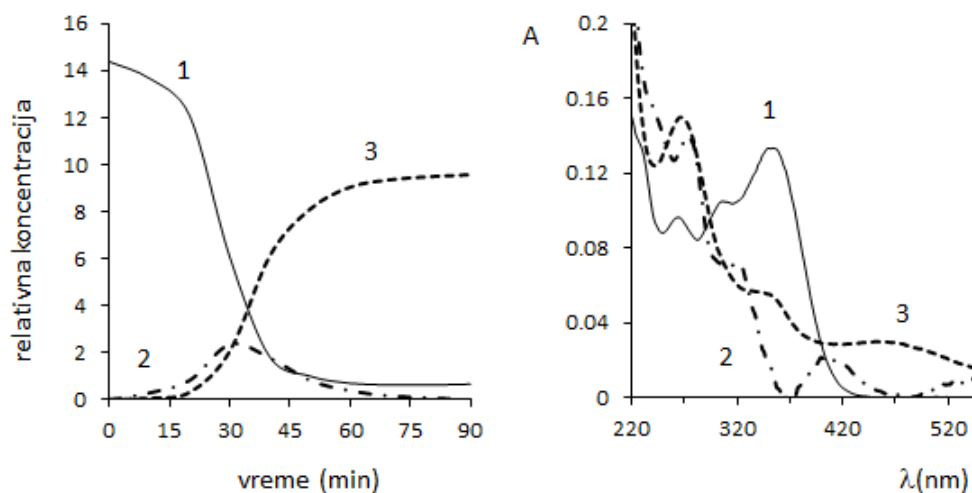
4.2.1.1.1. MCR-ALS obrada spektralnih podataka

UV/Vis spektri snimljeni u toku autooksidacije kafene kiseline u prisustvu metalnih jona su dalje analizirani MCR-ALS metodom u cilju dobijanja broja značajnih apsorpcionih komponenti (koncentracioni profil) u reakcionim smešama, kao i spektara tako određenih pojedinačnih komponenti (spektralni profili). Kvalitet MCR-ALS optimizacije prikazan je u tabeli 4.

Tabela 4. Finalni parametri MCR-ALS optimizacije kod autooksidacije kafene kiseline

	pH 8,4 + Mg(II)	pH 8,4 + Ca(II)
LOF% (PCA)	0,016057	0,0085081
LOF% (exp)	0,90954	1,0255
r^2	99,9917	99,9895

Slika 46 prikazuje rezultat MCR-ALS analize spektara snimljenih u toku autooksidacije kafene kiseline u prisustvu Mg(II) jona.

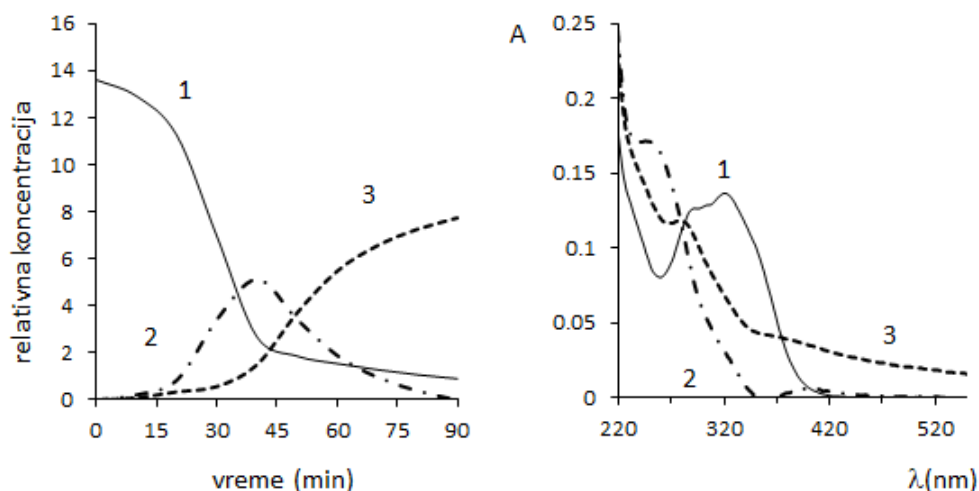


Slika 46. Koncentracioni profili (levo) i spektri čistih komponenti (desno) dobijeni primenom MCR-ALS metode na autooksidaciju kafene kiseline u prisustvu jona Mg(II) na pH 8,4

U reakcionoj smeši su prisutne tri glavne komponente. Komponenta 1 je prisutna od početka reakcije autooksidacije i njena koncentracija konstantno opada sa vremenom. Komponenta 2

nastaje na samom početku reakcije oksidacije, njen sadržaj raste do 30. minuta, posle čega polako nestaje iz reakcione smeše. Treća komponenta se pojavljuje oko 20. minuta, konstantno raste do 60. minuta, a zatim se njena koncentracija neznatno menja do kraja ispitivanja reakcije.

Sličan scenario se može videti na slici 47 koja predstavlja MCR-ALS analizu spektara snimljenih u toku autooksidacije kafene kiseline kada su prisutni Ca(II) joni.

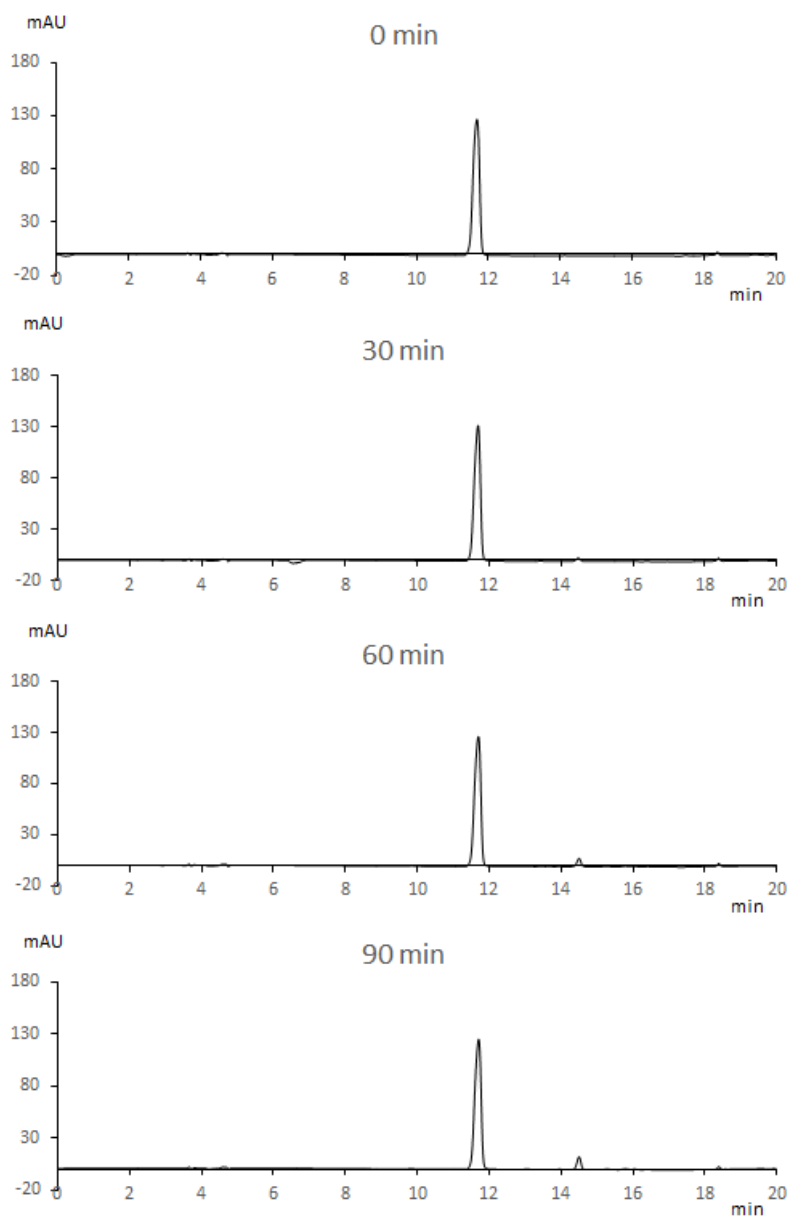


Slika 47. Koncentracioni profili (levo) i spektri čistih komponenti (desno) dobijeni primenom MCR-ALS metode na autooksidaciju kafene kiseline u prisustvu jona Ca(II) na pH 8,4

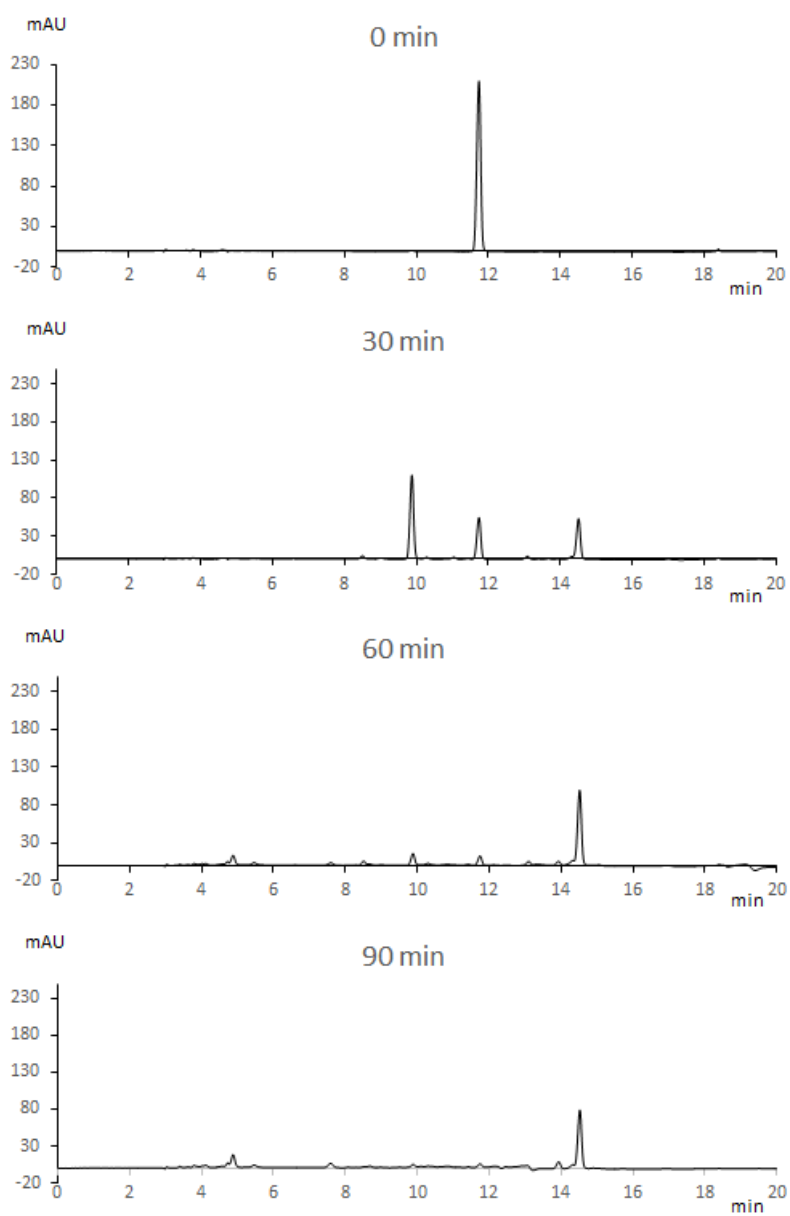
Pod pretpostavkom da tokom autooksidacije kafene kiseline u prisustvu Mg(II) i Ca(II) jona najpre nastaje hinon kafene kiseline, koji veoma brzo podleže reakcijama kuplovanja i gotovo istovremenom nastajanju različitih dimera kafene kiseline, onda UV/Vis spektar komponente 2 može biti shvaćen kao složeni spektar koji potiče kako od hinona anjona kafene kiseline (na šta upućuje apsorpcija na oko 400 nm) tako i od različitih dimera kafene kiseline. U ovom slučaju, različit oblik UV/Vis spektara komponenti 2 za sisteme CA-Mg(II) i CA-Ca(II), može se objasniti većim udelom anjona hinona kafene kiseline u CA-Mg(II) sistemu (što ukazuje na veću stabilnost hinona anjona kafene kiseline u prisustvu jona Mg(II) (zbog njegove mnogo manje pokretljivosti u odnosu na Ca(II) jon), dok kod komponente 2 u sistemu CA-Ca(II) veći doprinos UV/Vis spektru daju dimeri kafene kiseline. Koncentracija komponente 2 postiže maksimalnu vrednost brže u prisustvi Mg(II) jona nego u prisustvu Ca(II) jona. Spektri komponente 3 u oba sistema već pokazuju izvesnu sličnost sa spektrima huminskih kiselina (Veselinović et al. 2010).

4.2.1.2. HPLC-DAD analiza

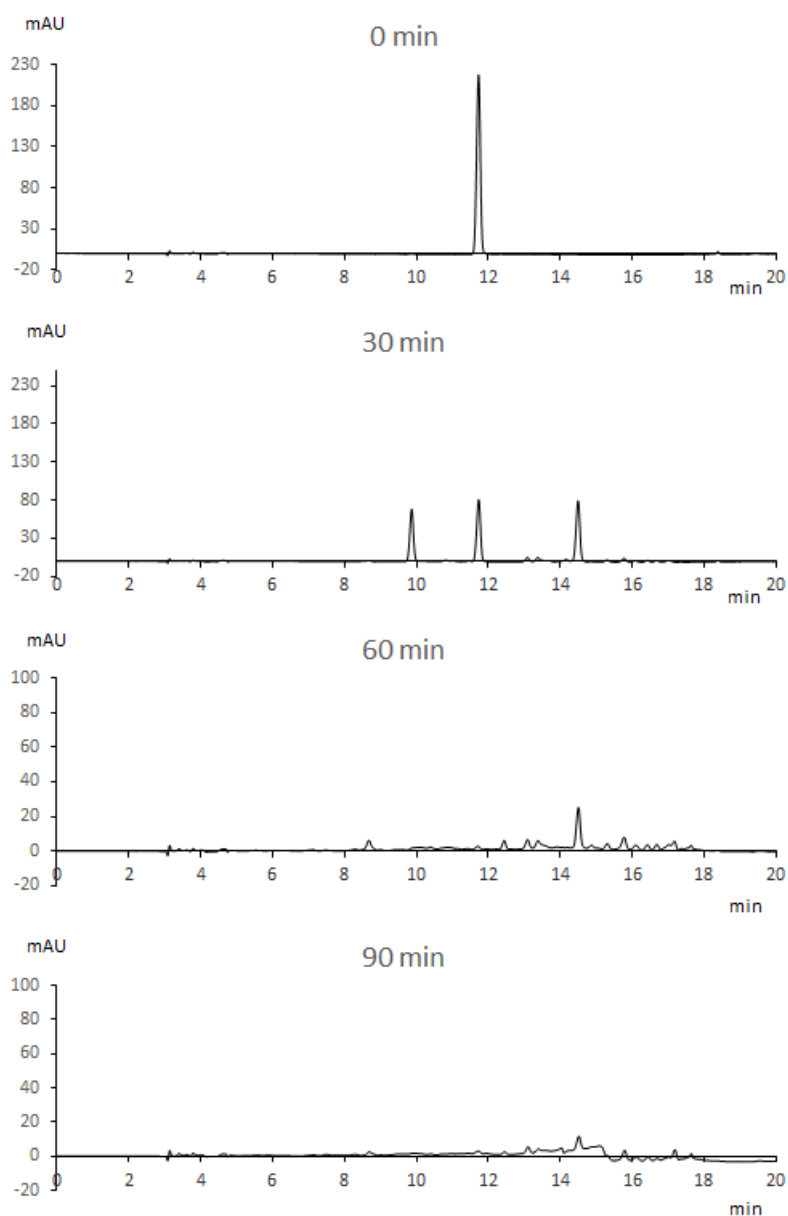
Naredne tri slike predstavljaju hromatograme snimane tokom 90 minuta autooksidacije kafene kiseline bez prisustva metalnih jona (slika 48), u prisustvu jona Mg(II) (slika 49) i jona Ca(II) (slika 50). Hromatogrami su snimani u intervalima od 30 minuta, pri čemu je početni, sniman odmah po mešanju odgovarajućih rastvora, označen sa „0 min“.



Slika 48. Hromatogrami snimljeni u toku autooksidacije kafene kiseline na pH 8,4 bez prisustva metalnih jona



Slika 49. Hromatogrami snimljeni u toku autooksidacije kafene kiseline na pH 8,4 u prisustvu Mg(II) jona



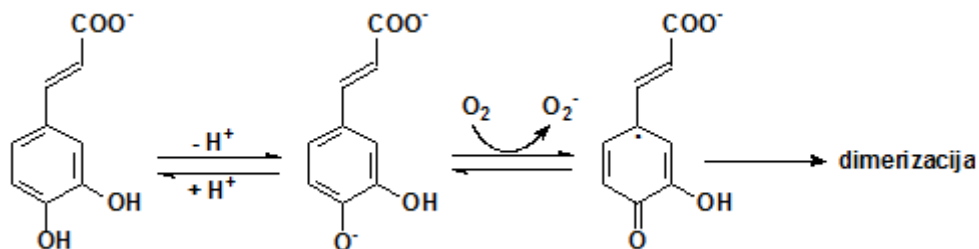
Slika 50. Hromatogrami snimljeni u toku autooksidacije kafeine kiseline na pH 8,4 u prisustvu Ca(II) jona

Karakteristični pikovi koji se uočavaju na datim hromatogramima su oni sa retencionim vremenima 9,9 min, 11,7 min i 14,5 min. Ovo je u saglasnosti sa rezultatima dobijenim MCR-ALS analizom, koja je, takođe, pokazala prisustvo tri glavne komponente tokom autooksidacije kafeine kiseline u prisustvu kako Mg(II) tako i Ca(II) jona. Jedinjenje koje odgovara pik sa retencionim vremenom 11,7 min je kafeina kiselina, što je dokazano standardom kafeine kiseline snimljenim pod istim hromatografskim uslovima (hromatogram nije prikazan). Intenzitet ovog

pika opada sa vremenom u sva tri sistema, ali različitim tempom: dok je u uslovima kada su odsutni metalni joni ovo opadanje veoma sporo, dotle je u prisustvu metalnih jona vrlo brzo, tako da se pik kafene kiseline posle 90 minuta autooksidacije jedva može detektovati.

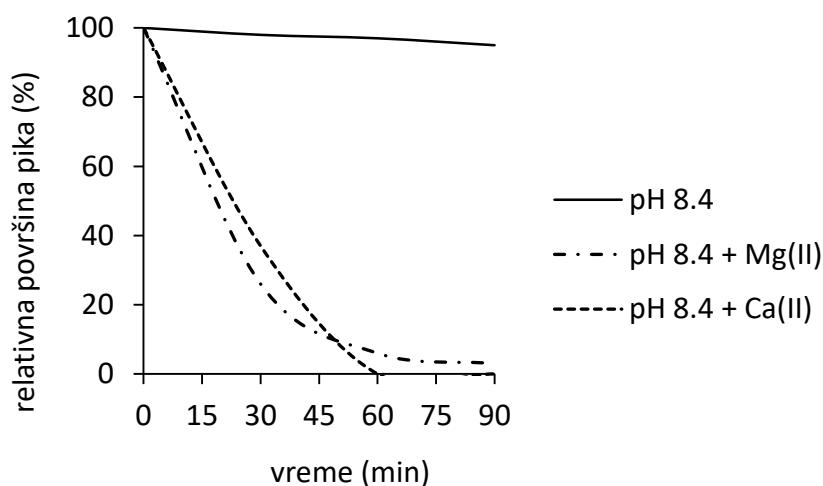
Dalja poređenja hromatograma snimljenih tokom autooksidacije kafene kiseline na pH 8,4 pokazuju da je u odsustvu metalnih jona lagano opadanje intenziteta pika kafene kiseline praćeno pojavom samo jednog, slabo izraženog, pika na retencionom vremenu 14,5 min, dok se u prisustvu metalnih jona pojavljuju dva, jasno vidljiva pika, čija su retencionna vremena 9,9 min i 14,5 min, a koji odgovaraju nastajanju dva glavna proizvoda autooksidacije. Slične rezultate je objavio Antolovich sa svojim saradnicima (Antolovich et al. 2004). Oni su pratili oksidaciju kafene kiseline perjodatima i tom prilikom, takođe, detektovali dva glavna produkta, sa neobično sličnim retencionim vremenima i sličnim DAD UV/Vis spektrima tih jedinjenja kada se uporede sa prikazanim rezultatima. Oni su jedinjenje sa kraćim retencionim vremenom od kafene kiseline identifikovali kao hinon kafene kiseline, a ono sa dužim kao dimer kafene kiseline, predloživši za njegovu strukturu „furofuranski“ tip lignana koji je opisao Tazaki sa saradnicima, na osnovu molekulske mase i UV spektra (Tazaki et al. 2001).

Zato je realna pretpostavka da je jedinjenje detektovano prilikom autooksidacije kafene kiseline u prisustvu Mg(II) i Ca(II) jona, sa retencionim vremenom 9,9 min, takođe hinon kafene kiseline, obzirom na dodatnu činjenicu da su hinonske strukture polarnije u odnosu na svoje fenolne oblike, tako da u uslovima reverzno-fazne HPLC brže napuštaju kolonu i shodno tome, imaju kraća retencionna vremena. Što se tiče jedinjenja sa retencionim vremenom 14,5 min verovatno se radi o dimeru nastalom oksidativnim kuplovanjem molekula kafene kiseline, imajući u vidu činjenicu da dimerizacija (ili polimerizacija) smanjuje polarnost i time produžava retenciono vreme. Štaviše, vrlo je verovatno da se radi o više različitih dimera nastalih od semihinonskih ili hinonskih struktura kafene kiseline koji nastavljaju dimerizaciju (ili čak polimerizaciju) formirajući jedinjenja strukturno veoma slična lignanima i neolignanima (slika 51). Motiv za ovakvu pretpostavku je podatak da je u literaturi predloženo nekoliko mogućih struktura dimera kafene kiseline nastalih njenim oksidativnim kuplovanjem pod različitim uslovima (Arakawa et al. 2004, Cilliers & Singleton 1991, Fulcrand et al. 1994, Pati et al. 2006).



Slika 51. Mogući početni koraci dimerizacije kafene kiseline

Ukoliko se posmatraju promene koncentracija kafene kiseline i dva glavna proizvoda autooksidacije sa vremenom, uočavaju se relativno velike razlike između sistema sa Mg(II) jonima i onog sa Ca(II) jonima (slika 52). U početnoj fazi, u CA-Mg(II) sistemu sadržaj kafene kiseline opada mnogo brže nego u CA-Ca(II) sistemu, mada se tragovi kafene kiseline mogu uočiti i posle 90 minuta autooksidacije. Nasuprot tome, posle sporijeg početnog opadanja koncentracije kafene kiseline u CA-Ca(II) sistemu, njen hromatografski pik se praktično ne može primetiti posle 60 minuta autooksidacije. Sličan model ponašanja se može zapaziti kod hinona kafene kiseline (jedinjenje sa retencionim vremenom 9,9 min), ali potpuno drugačiji u slučaju hinona dimera kafene kiseline (jedinjenje se retencionim vremenom 14,5 min), ali je u oba slučaja njihov nastanak i dalja transformacija sporija u CA-Mg(II) nego u CA-Ca(II) sistemu. Razlog za ovo može biti mnogo izraženiji stabilizirajući efekat Mg(II) jona na hinoidne strukture u poređenju sa Ca(II) jonima.



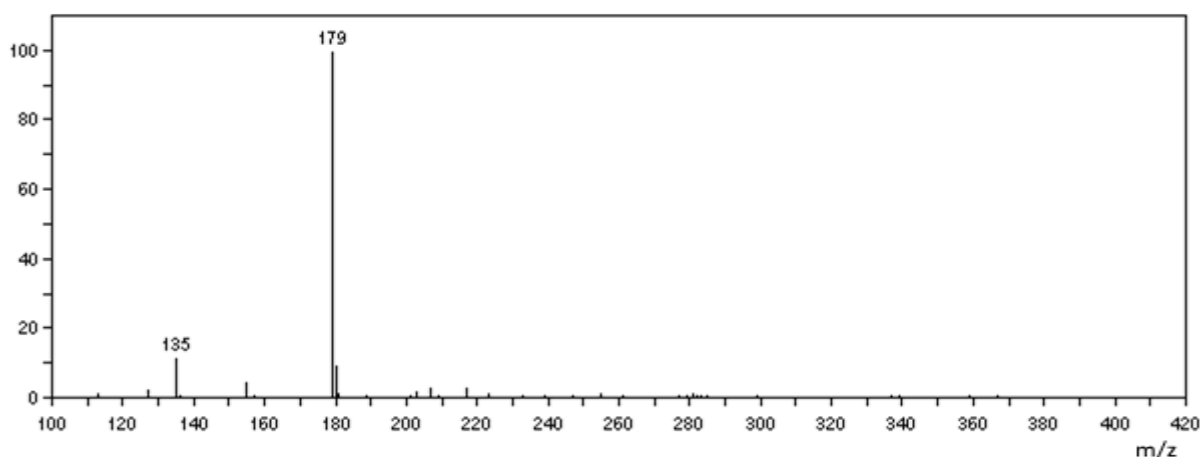
Slika 52. Potrošnja kafene kiseline tokom autooksidacije na pH 8,4 bez prisustva metalnih jona i u prisustvu metalnih jona

Treba primetiti da prilikom autooksidacije kafene kiseline na pH 8,4 bez prisustva metalnih jona nije detektovano prisustvo pika koji odgovara hinonu kafene kiseline. Objašnjenje za to može ležati u upravo pomenutom stabilizirajućem efektu metalnih jona. Naime, hinon kafene kiseline, koji nastaje prilično sporo u ovakvim uslovima, podleže veoma brzom transformaciji usled nedostatka stabilizirajućeg efekta metalnih jona, tako da se veoma brzo gubi iz sistema, i na taj način ostaje nedetektovan.

4.2.1.3. LC/MS analiza

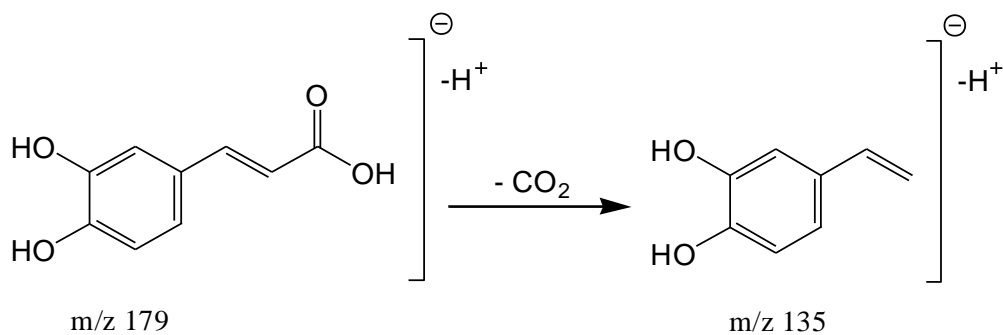
4.2.1.3.1. ESI-MS analiza

U cilju dalje karakterizacije proizvoda autooksidacije kafene kiseline upotrebljena je metoda masene spektrometrije sa ESI jonizacijom u negativnom modu. Na slici 53 prikazan je maseni spektar snimljen na samom početku reakcije na pH 8,4 bez prisustva metalnih jona.



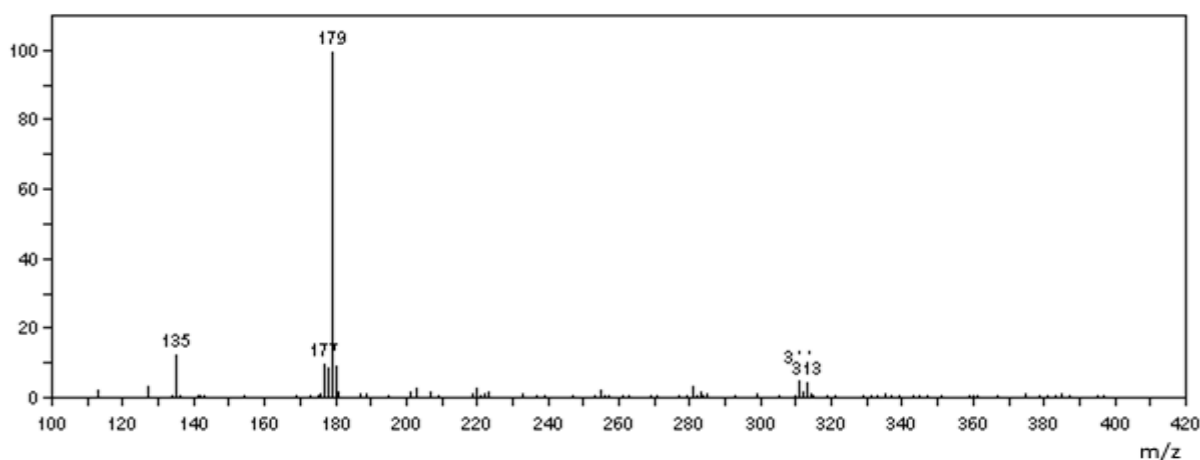
*Slika 53. ESI-MS spektar vodenog rastvora kafene kiseline na pH 8,4.
Vreme autooksidacije 0 min*

Uočavaju se dva dominantna pika. Najintenzivniji ima m/z vrednost 179 i evidentno je, da odgovara kafenoj kiselini $[CA - H]^-$. Jedinjenje sa m/z 135 ima masu za 44 Da manju od m/z kafene kiseline, odnosno nastalo je dekarboksilacijom (gubitkom molekula CO_2) karboksilne funkcije kafene kiseline: $[CA-CO_2-H]^-$ (slika 54), što je ranije već dokumentovano u literaturi (Pati et al. 2006).



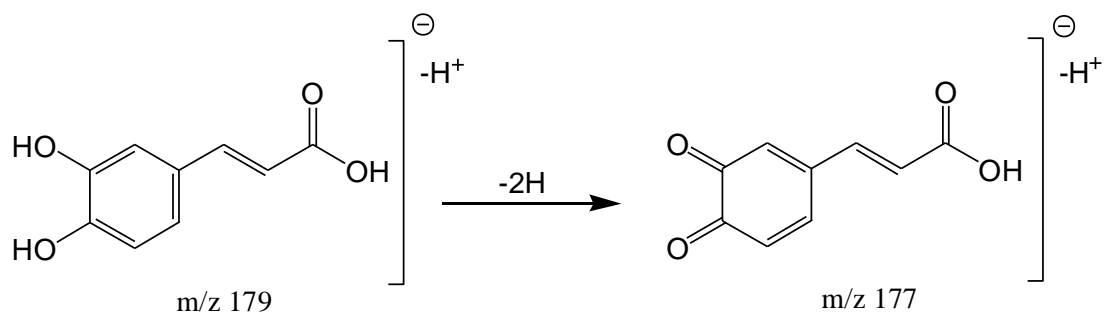
Slika 54. Dekarboksilacija molekula kafene kiseline

Nakon 24 sata od početka reakcije autooksidacije (slika 55), mogu se uočiti novi pikovi.



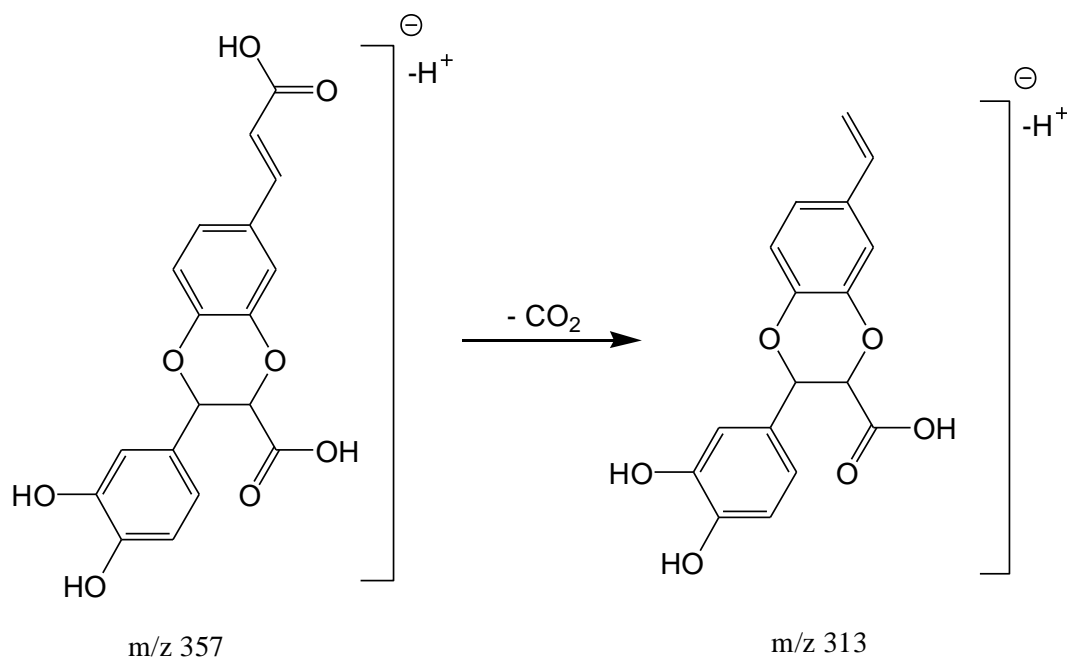
*Slika 55. ESI-MS spektar vodenog rastvora kafene kiseline na pH 8,4.
Vreme autooksidacije 24 časa*

Jedinjenje sa m/z 177, masom manjom za 2 Da od kafene kiseline, predstavlja njen hinon (slika 56), čije nastajanje se može očekivati u alkalnoj sredini.



Slika 56. Nastajanje hinona kafene kiseline

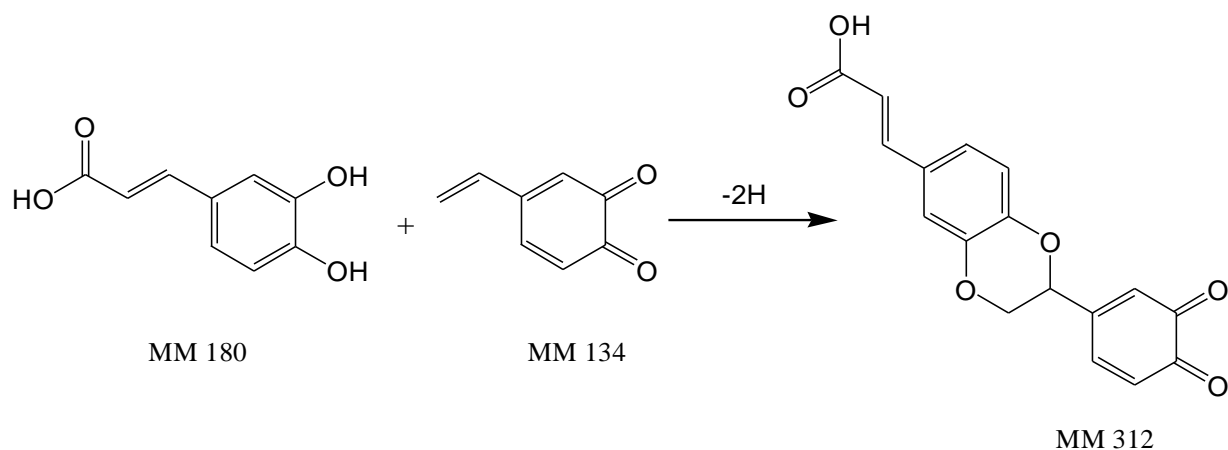
U delu spektra sa višim masama pojavljuje se par sa m/z vrednostima 311 i 313. Oni su povezani sa mogućim, već pomenutim dimerima kafene kiseline čija molekulska masa iznosi 358 Da ($2CA - 2H = 358$). To znači da bi molekulski jon takvog dimera imao m/z 357, što je za 44 Da (masa CO_2) više od 313. Drugim rečima, pik sa m/z 313 bi trebalo da potiče od dekarboksilovanog dimera kafene kiseline (slika 57), analogno gore pomenutoj pretpostavci dekarboksilacije kafene kiseline, dok bi pik sa m/z 311 odgovarao njegovom hinonu, o čemu postoje literaturni podaci (Pati et al. 2014).



Slika 57. Prikaz dekarboksilacije mogućeg dimera kafene kiseline

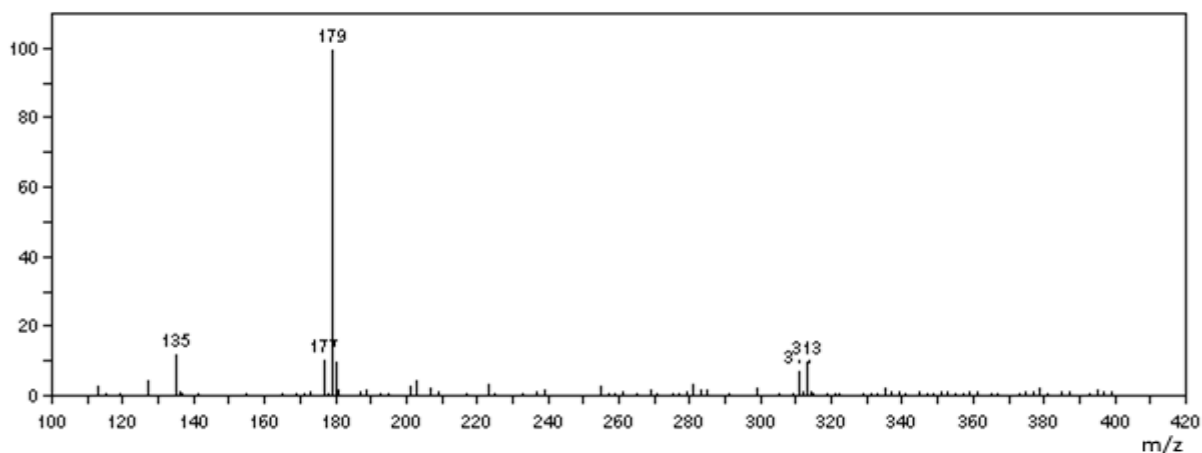
Ovde je neophodno naglasiti da tokom masenih analiza nije detektovan molekulski jon m/z 357, odnosno sam dimer kafene kiseline. Jedno od mogućih objašnjenja leži u načinu jonizacije. Naime, pretpostavka je da se tokom autooksidacije kafene kiseline formira dimer kafene kiseline (ili više njih) ali da se oni dekarboksiluju u jonskom izvoru u uslovima jonizacije, tako da se na kraju detektuju samo joni dekarboksilovanih dimera sa m/z 313.

Druga mogućnost za nastajanje dekarboksilovanih dimera m/z 313 i njegovog hinona m/z 311 je kuplovanje hinona njenog dekarboksilovanog fragmenta (čiji se m/z 133 ne zapaža na masenom spektru, budući da je već izreagovao) sa kafenom kiselinom, odnosno njenim hinonom (slika 58).



Slika 58. Moguće kuplovanje kafene kiseline i hinona njenog dekarboksilovanog fragmenta

Tokom dalje autooksidacije kafene kiseline pri pH 8,4 ne dolazi do značajnih promena u reakcionoj smesi. Posle 6 dana se neznatno uvećao relativni intenzitet pikova sa m/z 311 i 313, pri čemu je 313 sada dominantniji u odnosu na 311, dok je intenzitet signala sa m/z 135 ostao nepromenjen (slika 59).

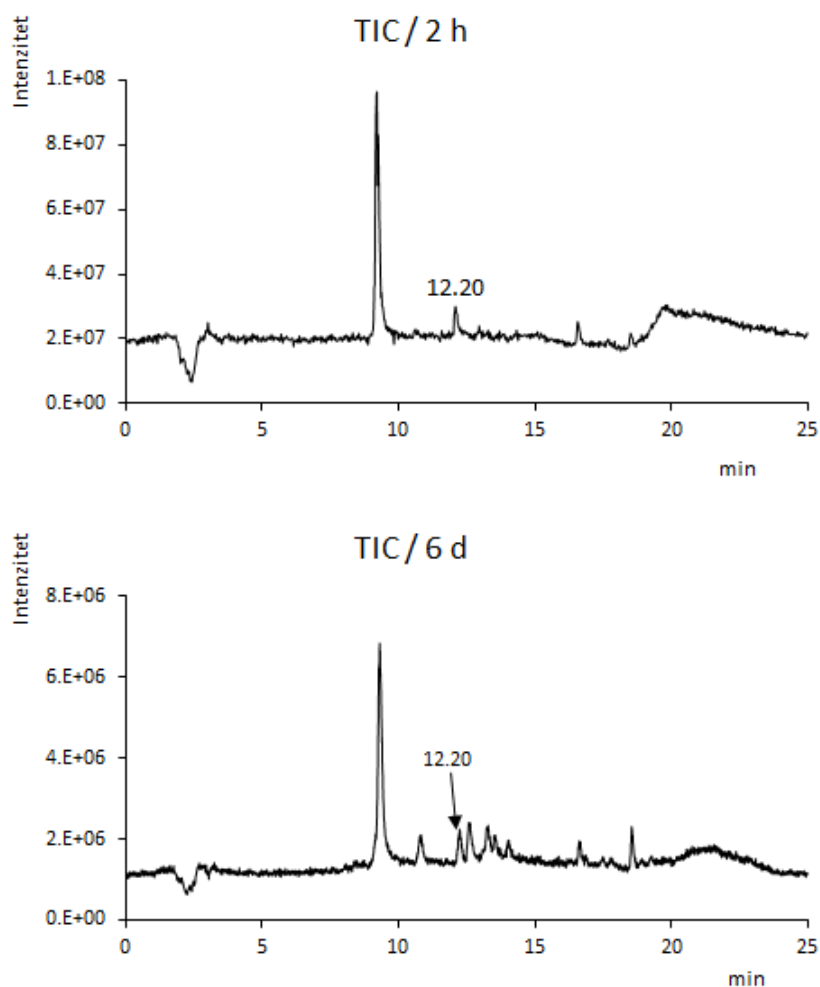


Slika 59. ESI-MS spektar vodenog rastvora kafene kiseline na pH 8,4.
Vreme autooksidacije 6 dana

4.2.1.3.2. HPLC-ESI-MS analiza

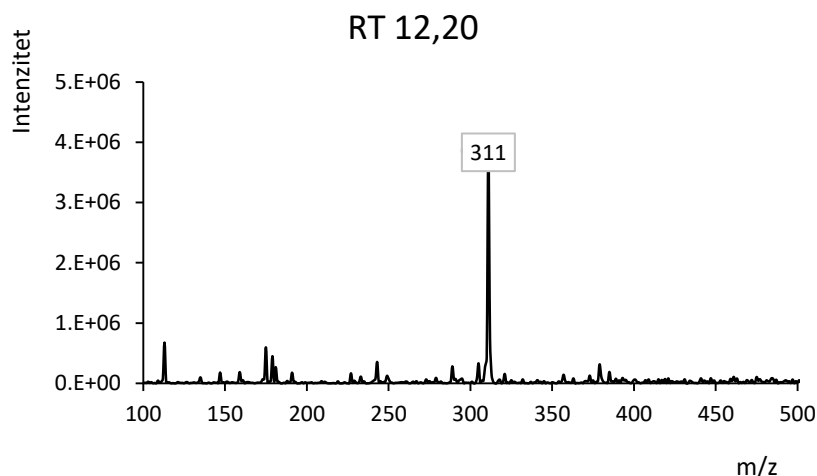
Detaljnije ispitivanje procesa autooksidacije kafene kiseline na pH 8,4 nastavljeno je kuplovanjem ESI-MS metode sa tečnom hromatografijom u cilju razdvajanja proizvoda reakcije na hromatografskoj koloni i njihove dalje analize.

Na slici 60 su prikazani dijagrami ukupne jonske struje snimljeni posle 2 sata i 6 dana nakon početka autooksidacije kafene kiseline na pH 8,4 bez prisustva metalnih jona.



Slika 60. Ukupna jonska struja proizvoda autooksidacije kafene kiseline na pH 8,4 bez prisustva metalnih jona, posle 2 sata (gore) i nakon 6 dana (dole)

Dominantan pik na 9,32 min potiče od kafene kiseline, što je potvrđeno MS spektrom, odnosno m/z vrednošću od 179. Pikovi koji se javljaju posle 15-og minuta ne potiču iz ispitivanog reakcionog sistema, već se konstantno javljaju prilikom različitih analiza, tako da se neće uzeti u dalje razmatranje. Pored kafene kiseline, u početku reakcije autooksidacije, javlja se još samo jedan pik, sa retencionim vremenom 12,20 min. Njegov maseni spektar sadrži signal sa m/z 311 (slika 61).

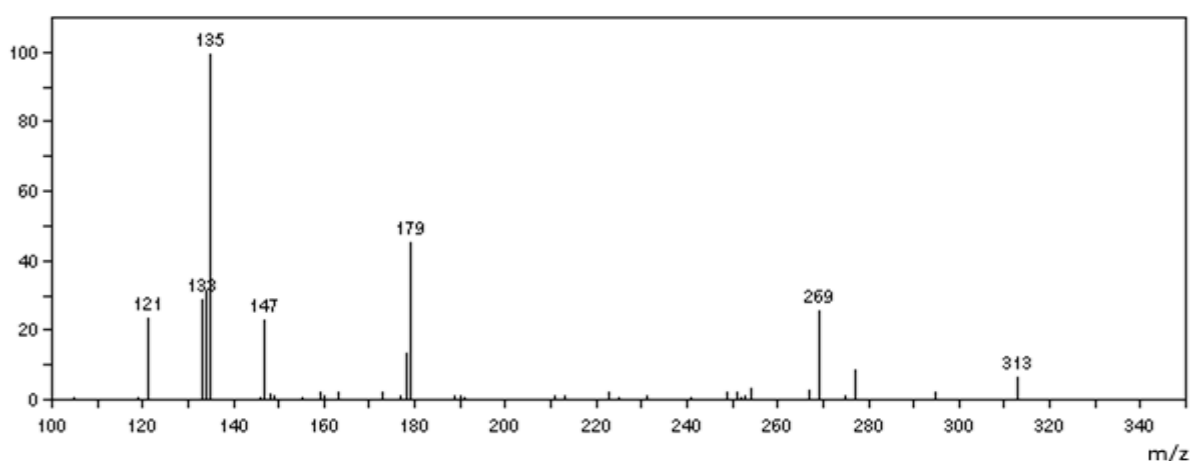


Slika 61. Maseni spektar hromatografskog pika na 12,20 min

Posle 6 dana trajanja reakcije autooksidacije, na hromatogramu se uočava još pet pikova sa sledećim retencionim vremenima: 10,85 min, 12,60 min, 13,25 min, 13,53 min i 14,02 min. Maseni spektri svakog od ovih pikova imaju istu vrednost m/z , i to 313; dakle, pet različitih struktura sa istom masom. Ovo potvrđuje pretpostavku da se kuplovanje kafene kiseline, bilo sa drugim molekulom kafene kiseline bilo sa fragmentom MM 136 dešava na različite načine, pri čemu nastaju različiti dimerni proizvodi.

4.2.1.3.3. ESI-MS/MS analiza

Karakterističan m/z 313 pik je podvrgnut MS/MS analizi, kako bi se njegovom fragmentacijom stekao bolji uvid u strukturu. Maseni spektar dobijen tom prilikom je prikazan na slici 62.

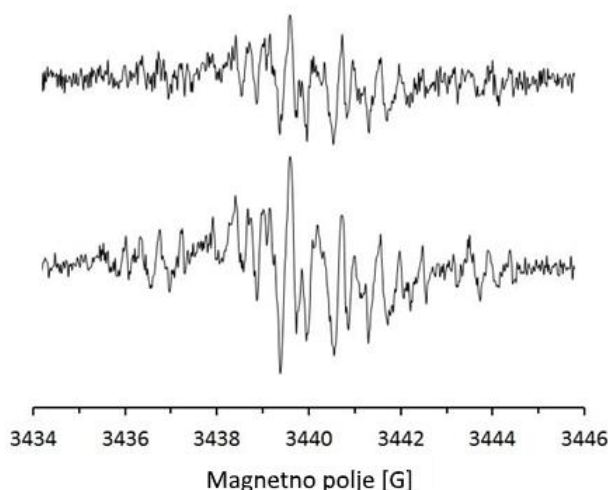


Slika 62. ESI-MS/MS spektar pika sa m/z 313

Pik sa m/z 269 je proizvod nove dekarboksilacije ($313 - 44 = 269$). Pikovi sa m/z 179 i m/z 135 nastaju cepanjem fragmenta m/z 313 na sastavne delove, dok pikovi sa m/z 147 i m/z 121 potiču od fragmenta pika sa m/z 269.

4.2.1.4. ESR analiza

Slika 63 prikazuje ESR spektre kafene kiseline snimljene u toku autooksidacije na pH 8,4 u prisustvu Mg(II) jona u dva vremenska intervala, posle 18 min i 60 min nakon početka reakcije.



Slika 63. ESR spektri vodenih rastvora u kojima je autooksidacija kafene kiseline izvođena na pH 8,4 u prisustvu jona Mg(II) snimljeni 18 minuta (gornji signal) i 60 minuta (donji signal) od početka reakcije

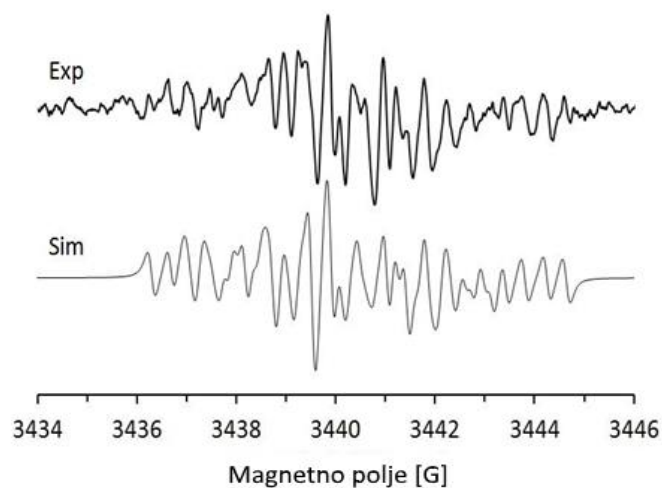
Dobijeni spektri su asimetričnog izgleda, što ukazuje na istovremeno postojanje najmanje dve radikalske vrste u ranoj fazi autooksidacije kafene kiseline

Tabela 5. Konstante hiperfinog kuplovanja radikalskih vrsta dobijenih kompjuterskom simulacijom ESR spektra snimljenog tokom autooksidacije kafene kiseline na pH 8,4 u prisustvu Mg(II) jona i literaturni podaci za CA-Zn(II) sistem

Radikal	a^{H1}	a^{H2}	a^{H3}	a^{H4}	a^{H5}
R1	3,211	2,409	1,500	0,831	0,390
R2	2,486	1,347	1,144	0,593	0,373
CA-Zn(II)	3,023	2,358	1,241	1,027	0,426

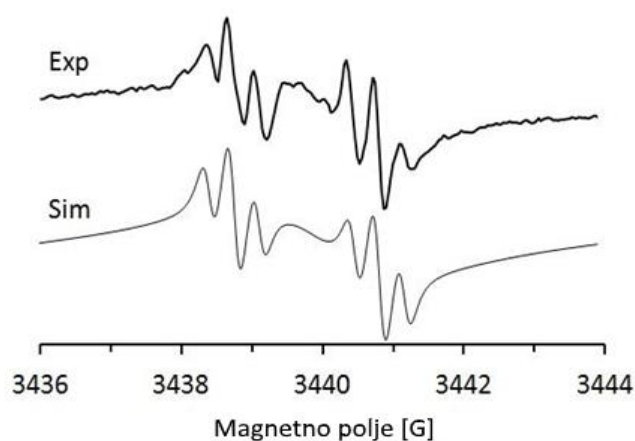
Ovo potvrđuje i kompjuterska simulacija ESR spektra snimljenog 18 minuta posle početka autooksidacije u prisustvu jona Mg(II) (slika 64), pri čemu su vrednosti konstanti hiperfinog kuplovanja (tabela 5) dobijene kompjuterskom simulacijom u saglasnosti sa literaturnim

podacima koji se odnose na radikale spinski stabilisane jonima Zn(II), a koji su dobijeni elektrohemijom oksidacijom kafene kiseline (Mura et al. 2014). Slične vrednosti za konstante hiperfinog kuplovanja javljaju se i kod spinski stabilisanog *orto*-benzosemihinonskog anjon radikala u prisustvu Mg(II) i Zn(II) jona (Eaton 1964). Pod pretpostavkom da istovremeno postoje dve radikalske vrste u sistemu, postignut je zadovoljavajući stepen korelacije (0,748).



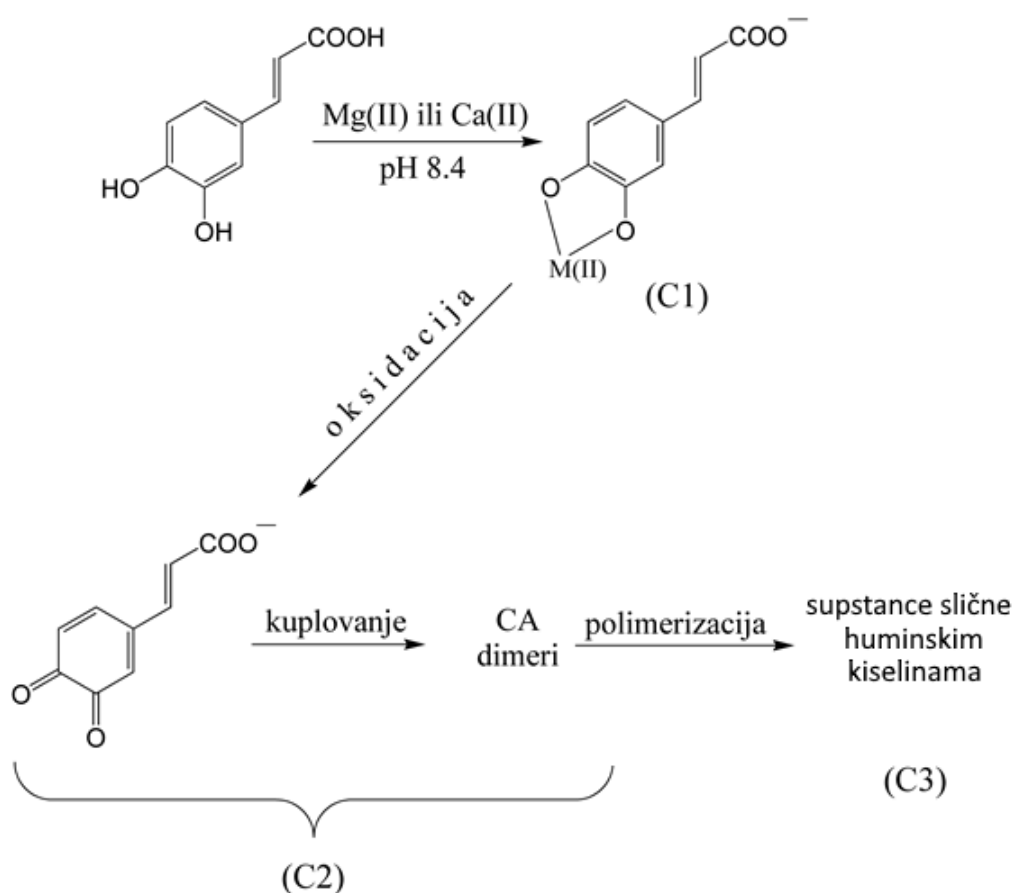
Slika 64. Eksperimentalni ESR spektar nakon autooksidacije kafene kiseline u prisustvu Mg(II) jona, snimljen 18 minuta po početku reakcije (Exp) i njegova kompjuterska simulacija (Sim)

Takođe je snimljen i ESR spektar nakon autooksidacije kafene kiseline u prisustvu Mg(II) jona sedam dana od početka reakcije, prikazan na slici 65



Slika 65. Eksperimentalni ESR spektar nakon autooksidacije kafene kiseline u prisustvu Mg(II) jona, snimljen 7 dana po početku reakcije (Exp) i njegova kompjuterska simulacija (Sim)

Dobijeni spektar ima mnogo sličnosti sa ESR spektrima huminskih kiselina (prirodnih jedinjenja nastalih polimerizacijom različitih prostih fenolnih jedinjenja) (Watanabe et al. 2005). Kompjuterska simulacija potvrđuje prisustvo dve radikalske vrste, jedne koja je tipična za huminske kiseline sa jednom širokom linijom, i druge sa jednostavnim ESR spektrom koga čine dva tripleta uz izuzetno visok stepen korelacije od 0,964. Na osnovu svega prethodno navedenog, može se pretpostaviti da u reakciji autooksidacije kafene kiseline u vodenoj sredini pri pH 8,4 u prisustvu jona Mg(II) i Ca(II) učestvuju kompleks kafene kiseline i metalnog jona (komponenta 1), smeša hinona kafene kiseline i različitih dimera kafene kiseline (komponenta 2) i supstance sa polimernom strukturom slične huminskim kiselinama (komponenta 3), te bi reakciona šema izgledala kao na slici 66:

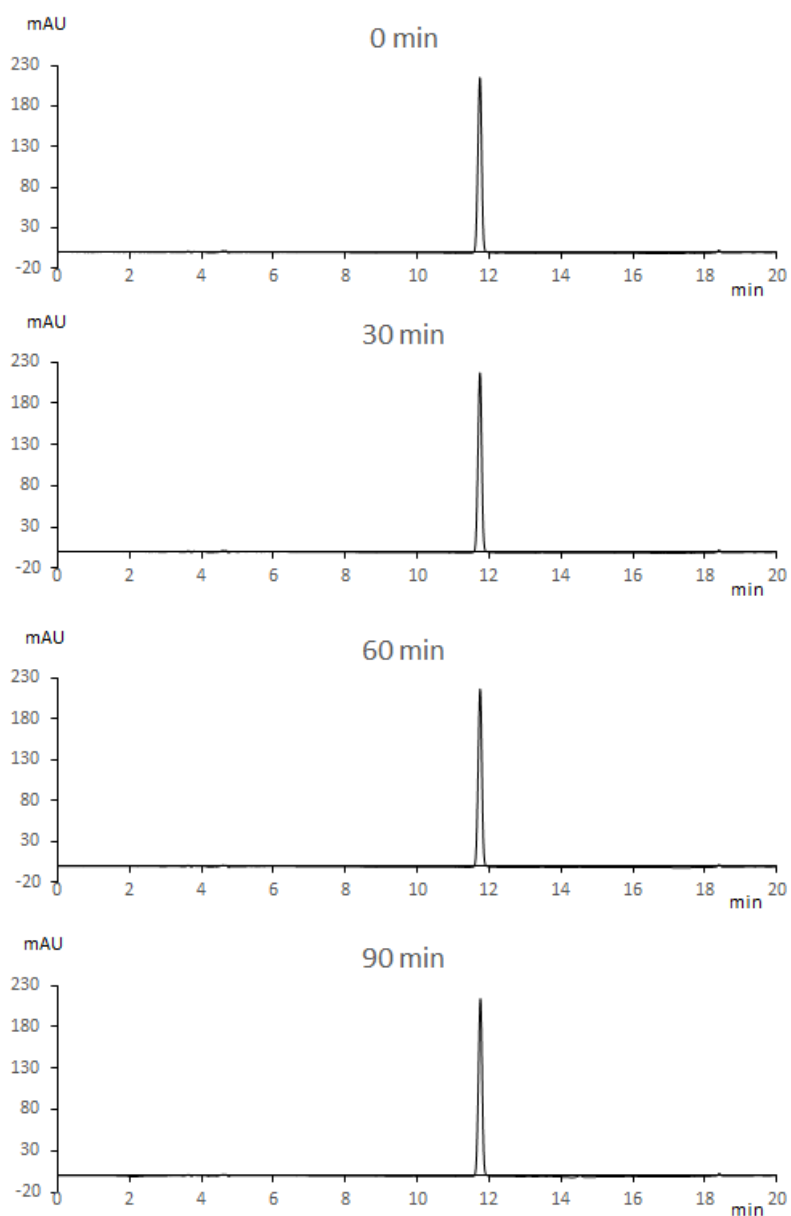


Slika 66. Predložena reakciona šema autooksidacije kafene kiseline na pH 8,4 u prisustvu Mg(II) i Ca(II) jona

4.2.2. Autooksidacija kafene kiseline na pH 7,4

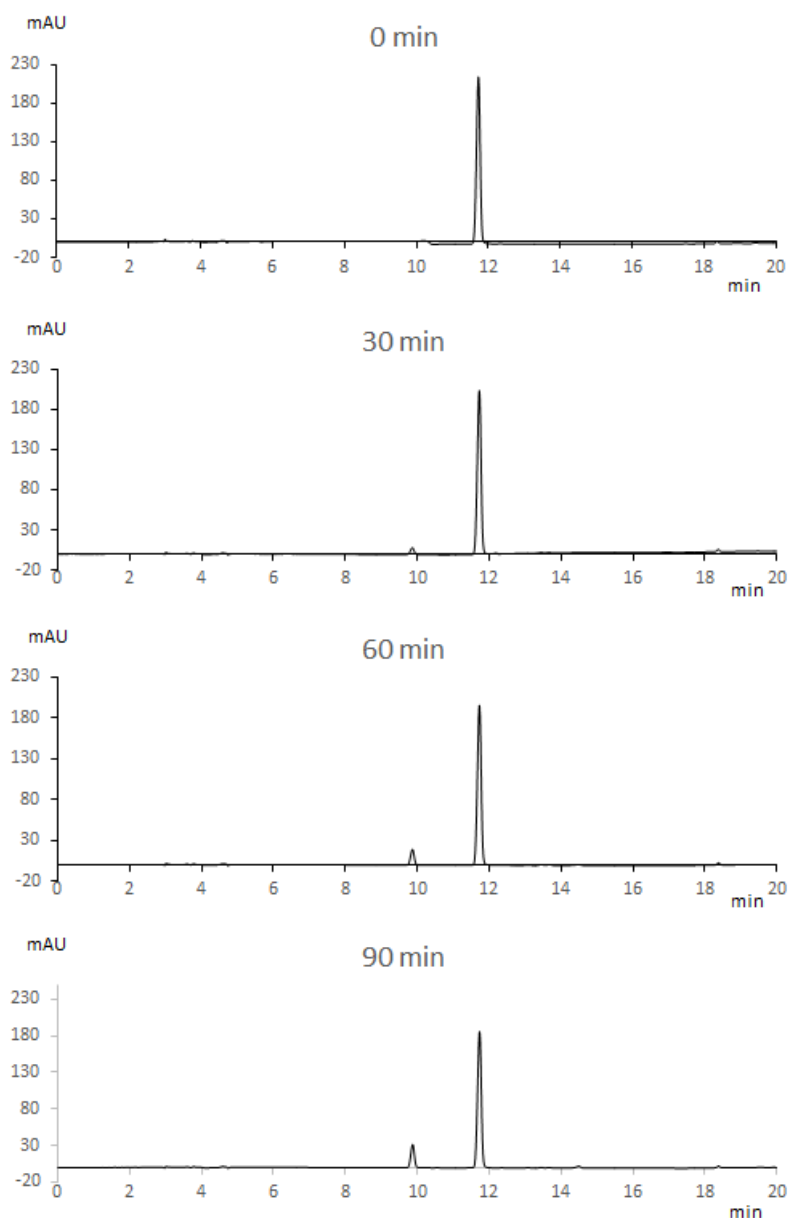
4.2.2.1. HPLC-DAD analiza

Naredne tri slike prikazuju hromatograme snimane u toku 90 minuta autooksidacije kafene kiseline na pH 7,4 bez prisustva metalnih jona (slika 67), u prisustvu jona Mg(II) (slika 68) i u prisustvu jona Ca(II) (slika 69).



Slika 67. Hromatogrami snimljeni u toku autooksidacije kafene kiseline na pH 7,4 bez prisustva metalnih jona

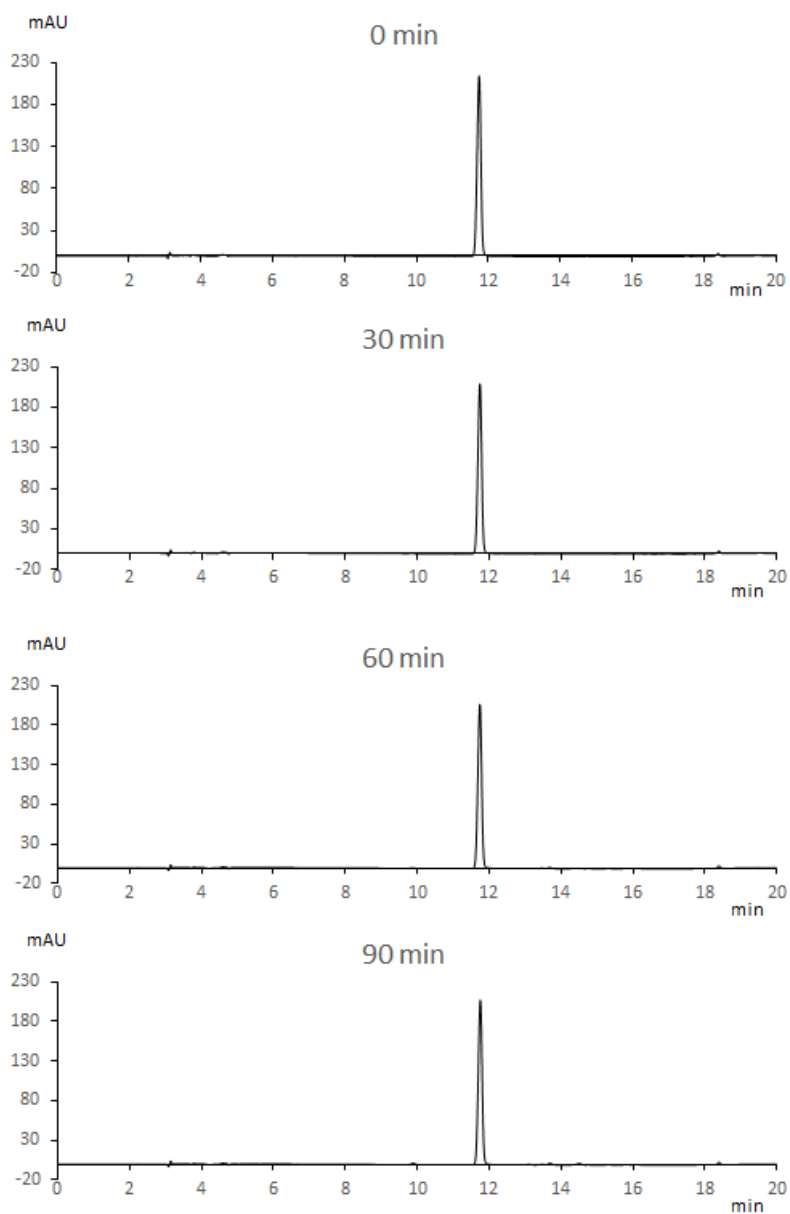
Na hromatogramima koji prikazuju autooksidaciju kafene kiseline bez prisustva metalnih jona može se uočiti samo jedan pik, na RT 11,7 min, koji odgovara kafenoj kiselini. Njegova površina neznatno opada tokom 90 minuta (za oko 2%), ukazujući na zanemarljivu brzinu autooksidacije kafene kiseline pod opisanim uslovima (slika 70).



Slika 68 Hromatogrami snimljeni u toku autooksidacije kafene kiseline na pH 7,4 u prisustvu Mg(II) jona

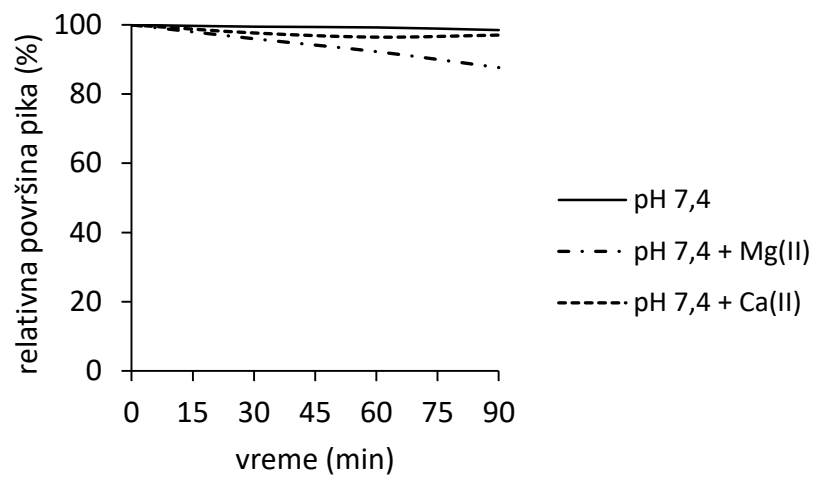
U prisustvu Mg(II) jona, pored glavne komponente se zapaža i pik sa RT 9,9 min. UV/Vis spektar odgovarajućeg jedinjenja je identičan UV/Vis spektru jedinjenja sa istim retencionim vremenom koje se uočava na hromatogramima snimanim na pH 8,4. Na osnovu ovoga

zaključujemo da se radi o identičnim jedinjenjima, odnosno da je u pitanju hinon kafene kiseline. On nastaje već u prvih 30 minuta reakcije i njegov pik se polako uvećava do 90. minuta, dok istovremeno pik kafene kiseline konstantno opada, što upućuje na zaključak da kafena kiselina vremenom prelazi u svoj hinonski oblik. Posle 90 min u reakcionoj smesi zaostaje oko 88% prvobitne količine kafene kiseline.



Slika 69 Hromatogrami snimljeni u toku autooksidacije kafene kiseline na pH 7,4 u prisustvu Ca(II) jona

U sistemu CA-Ca(II) vidljiv je samo pik kafene kiseline, čija se površina sporo smanjuje vremenom, uz potrošnju od oko 4% za 90 minuta praćenja reakcije autooksidacije.



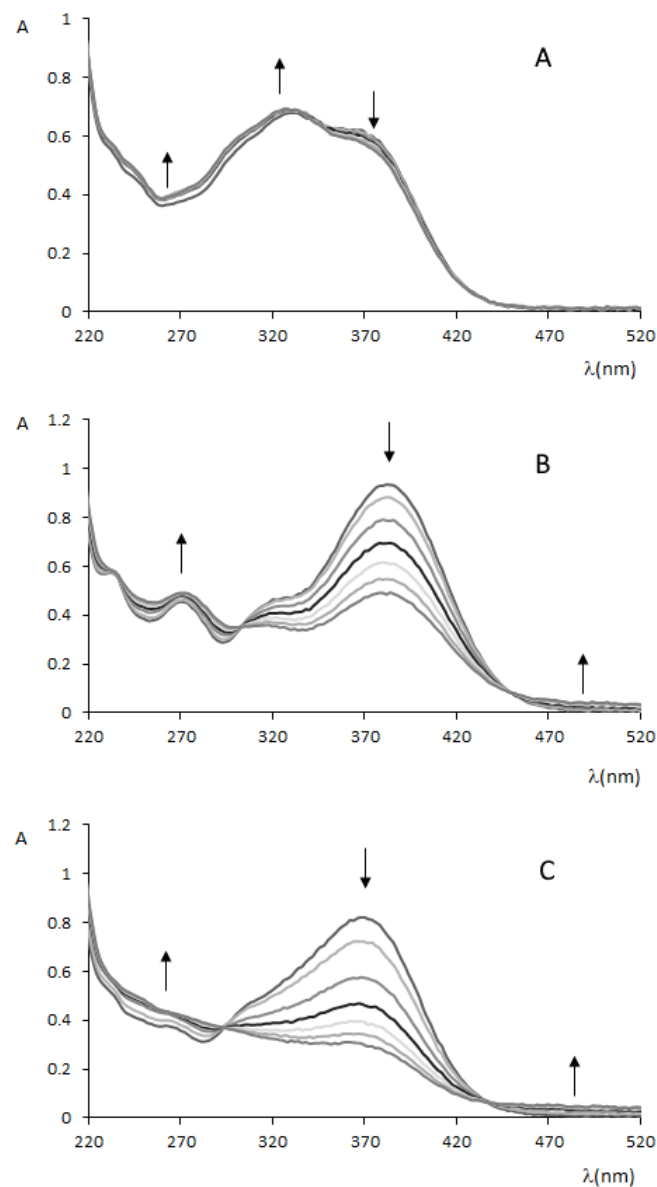
Slika 70. Potrošnja kafene kiseline tokom autooksidacije na pH 7,4 bez prisustva metalnih jona i u prisustvu metalnih jona

4.3. Hlorogenska kiselina

4.3.1. Autooksidacija hlorogenske kiseline na pH 8,4

4.3.1.1. UV/Vis spektralna analiza

Slika 71 prikazuje UV/Vis spektre snimljene u toku autooksidacije hlorogenske kiseline u TRIS puferu bez prisustva metalnih jona i u prisustvu Mg(II) i Ca(II) jona na pH 8,4 snimane tokom 90 minuta u intervalima od 10 minuta.



Slika 71. UV/Vis spektri snimljeni u toku autooksidacije hlorogenske kiseline na pH 8,4 bez prisustva metalnih jona (A), u prisustvu jona Mg(II) (B) i jona Ca(II) (C)

U sistemu bez prisustva metalnih jona dobija se spektar sa maksimumom na 330 nm i prevojem na oko 372 nm karakterističan za monoanjon hlorogenske kiseline, što se može zaključiti na osnovu vrednosti prve dve konstante kiselosti hlorogenske kiseline $pK_{a1} = 3,50$ i $pK_{a2} = 8,42$ (Maegawa et al. 2007). Tokom autooksidacije se zapažaju tek neznatne promene UV/Vis spektara, odnosno blagi porast apsorbanca na nižim talasnim dužinama, do 330 nm i blagi pad iznad ove vrednosti. Pri ovim uslovima je evidentna stabilnost posmatranog sistema.

Međutim, uvođenje metalnih jona u rekcionu smešu trenutno menja izgled UV/Vis spektara. U CGA-Mg(II) sistemu, od prvog minuta postaju vidljiva dva maksimuma: dominantniji na 384 nm i tek naznačen na 268 nm. Vremenom, intenzitet maksimuma na 384 nm značajno opada, dok istovremeno, u manjem obimu, dolazi do porasta apsorbanca na nižim talasnim dužinama, uvećava se maksimum na 268 nm, kao i na višim talasnim dužinama, preko 450 nm, ali bez pojave izraženog maksimuma. Ovakve promene UV/Vis spektara dovode do pojave dve izobestičke tačke: na 304 nm i na 450 nm.

U reakcionom sistemu koji sadrži Ca(II) jone na početku snimanja se zapaža maksimum apsorpcije na 370 nm, koji tokom vremena znatno opada. Intenziteti apsorpcije na nižim i višim talasnim dužinama blago rastu, ne dajući vidljive maksimume. Kao i u prethodnom slučaju, primećuju se dve izobestičke tačke: na 294 nm i na 436 nm.

Pojava izobestičkih tačaka u reakcionim sistemima sa metalnim jonima ukazuje da u svakom trenutku u rastvorima postoje dva jedinjenja u ravnoteži, dok iz intenziteta promena početnih spektara zaključujemo da joni Mg(II) i Ca(II) znatno ubrzavaju autooksidaciju hlorogenske kiseline.

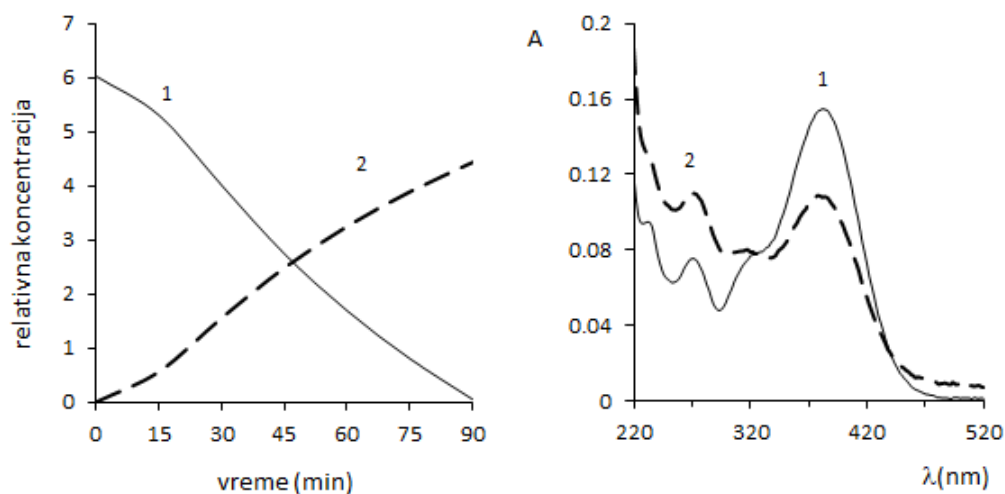
4.3.1.1.1. MCR-ALS obrada spektralnih podataka

UV/Vis spektri snimljeni u toku autooksidacije hlorogenske kiseline u prisustvu metalnih jona su dalje analizirani MCR-ALS metodom sa ciljem dobijanja broja značajnih apsorpcionih komponenti (koncentracioni profil) u reakcionim smešama, kao i spektara tako određenih pojedinačnih komponenti (spektralni profili). Kvalitet MCR-ALS optimizacije prikazan je u tabeli 6.

Tabela 6. Finalni parametri MCR-ALS optimizacije kod hlorogenske kiseline

	pH 8,4 + Mg(II)	pH 8,4 + Ca(II)
LOF% (PCA)	9.4904e-14	6.6586e-14
LOF% (exp)	0.37047	0.58459
r^2	99,9986	99.9966

Slika 72 prikazuje rezultat MCR-ALS analize spektara snimljenih u toku autooksidacije hlorogenske kiseline u prisustvu Mg(II) jona.

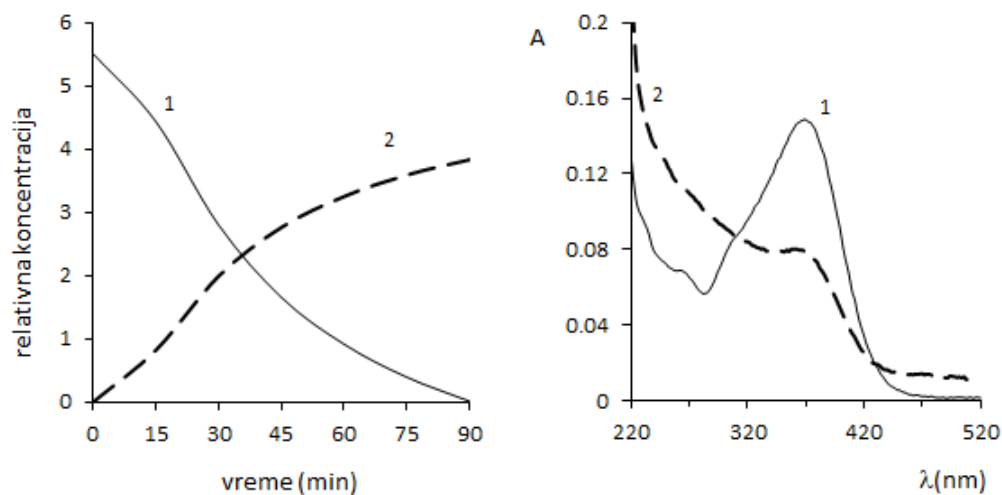


Slika 72. Koncentracijski profili (levo) i spektri čistih komponenti (desno) dobijeni primenom MCR-ALS metode na autooksidaciju hlorogenske kiseline u prisustvu jona Mg(II) na pH 8,4

U reakcionoj smeši su prisutne dve glavne komponente. Komponenta 1 je prisutna od početka reakcije autooksidacije i njena koncentracija konstantno opada sa vremenom. Komponenta 2 nastaje na samom početku reakcije autooksidacije a njena koncentracija stalno raste do kraja ispitivanja reakcije.

Situacija je slična kada su u reakcionoj smeši prisutni joni Ca(II) (slika 73). Utvrđeno je postojanje dve komponente, sa sličnim modelom ponašanja.

Međutim, poređenjem UV/Vis spektara novonastalih komponenti (komponente 2), može se zaključiti da se radi o različitim jedinjenjima, što govori o tome da vrsta metalnog jona kvalitativno utiče na tok autooksidacije hlorogenske kiseline.

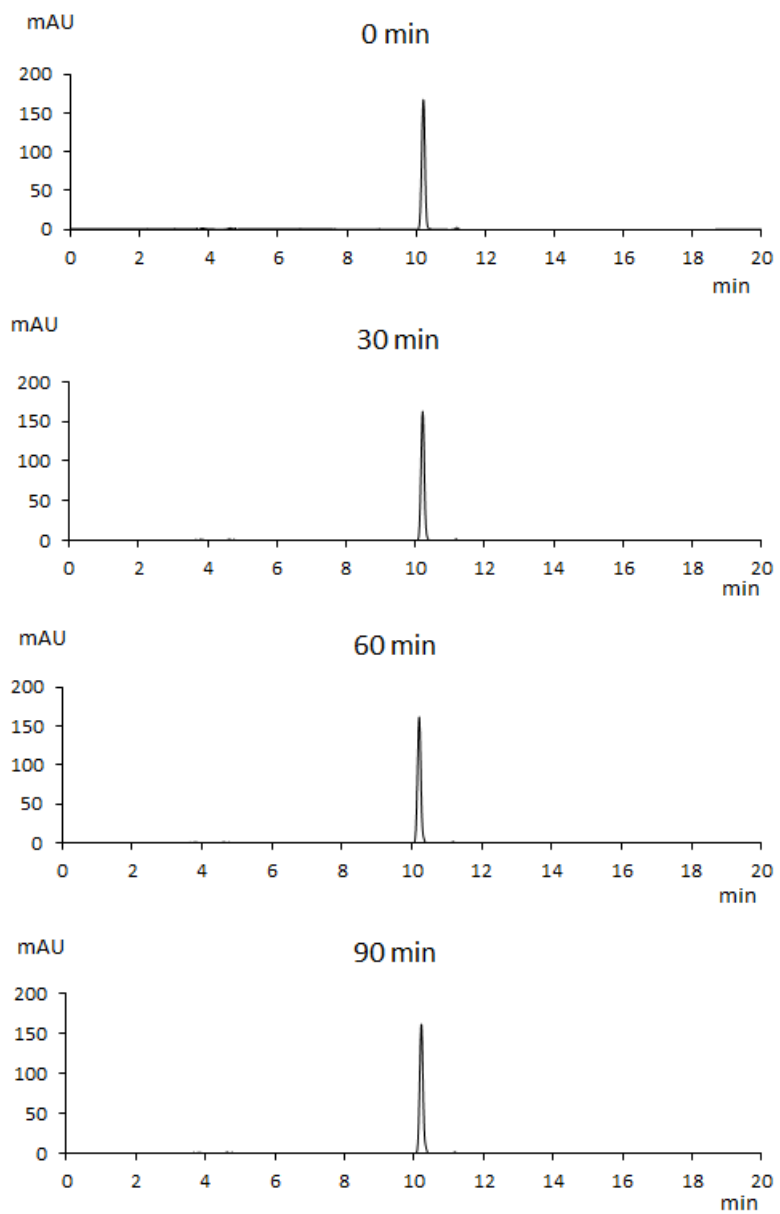


Slika 73. Koncentracioni profili (levo) i spektri čistih komponenti (desno) dobijeni primenom MCR-ALS metode na autooksidaciju hlorogenske kiseline u prisustvu jona Ca(II) na pH 8,4

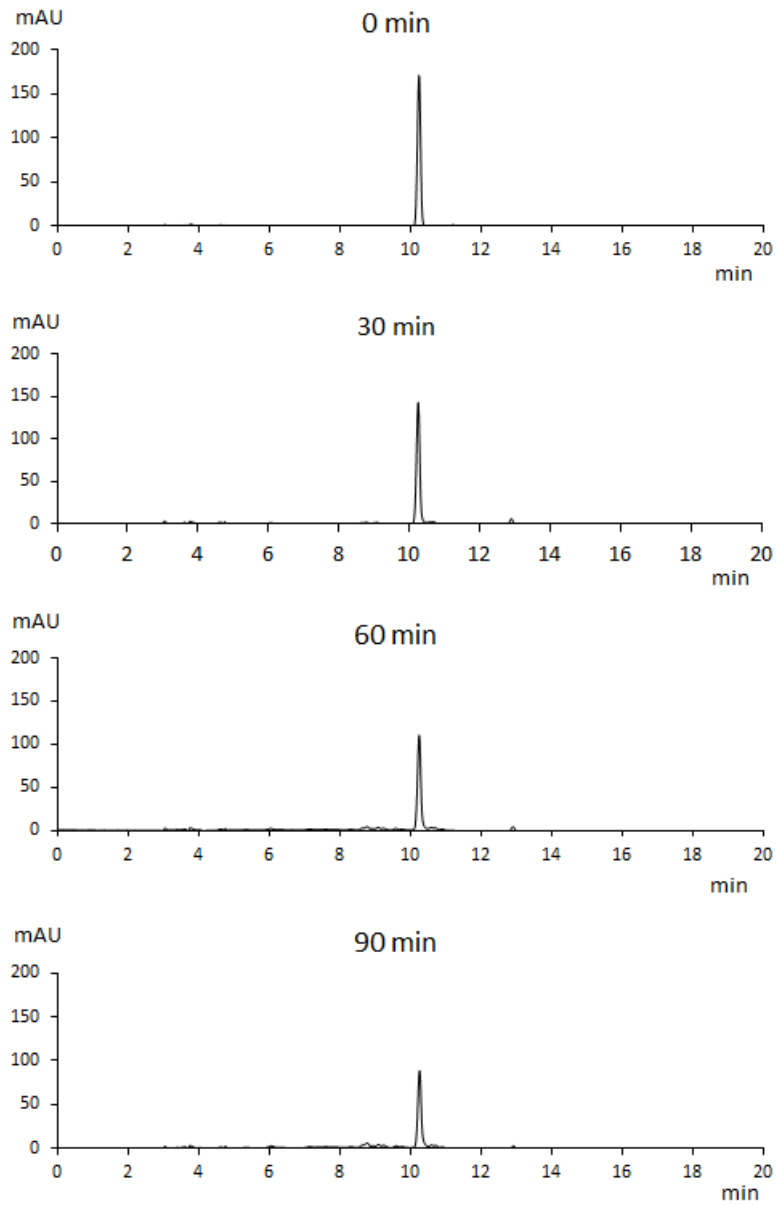
4.3.1.2. HPLC-DAD analiza

Naredne tri slike predstavljaju hromatograme snimane tokom 90 minuta autooksidacije hlorogenske kiseline bez prisustva metalnih jona (slika 74), u prisustvu jona Mg(II) (slika 75) i jona Ca(II) (slika 76). Hromatogrami su snimani u intervalima od 30 minuta. Na svim hromatogramima je dominantan pik sa RT 10,2 min koji potiče od hlorogenske kiseline. Površina pika u sistemu bez prisustva metalnih jona ostaje gotovo nepromenjena tokom čitavog vremena snimanja hromatograma, ukazujući na zanemarljivu brzinu autooksidacije hlorogenske kiseline (slika 77).

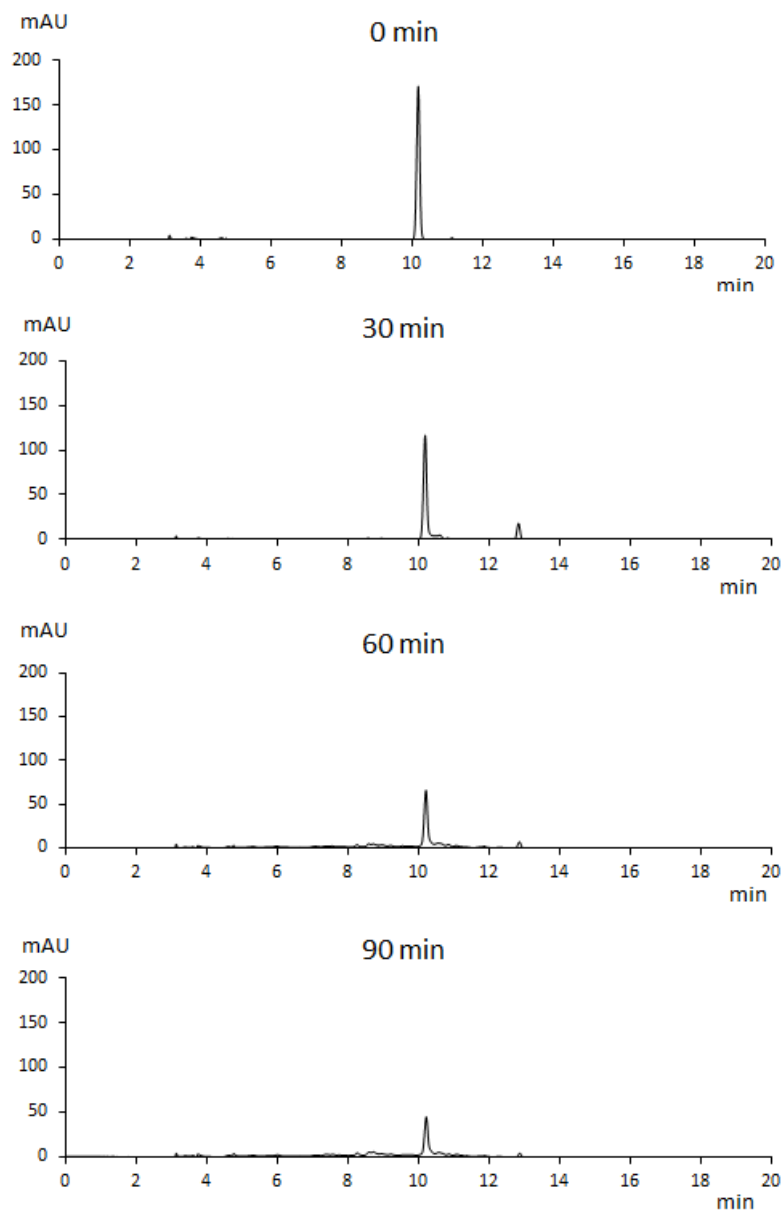
Međutim, u prisustvu metalnih jona, zapaža se naglo smanjenje intenziteta pika hlorogenske kiseline, tako da u CGA-Mg(II) sistemu zaostaje oko polovine, a u CGA-Ca(II) sistemu još i manje, tek nešto oko četvrtine od početne količine hlorogenske kiseline u reakcionoj smeši. Dakle, pored pokazanog kvalitativnog efekta, različiti metalni joni ispoljavaju i drugačije delovanje na brzinu autooksidacije hlorogenske kiseline.



Slika 74. Hromatogrami snimljeni u toku autooksidacije hlorogenske kiseline na pH 8,4 bez prisustva metalnih jona

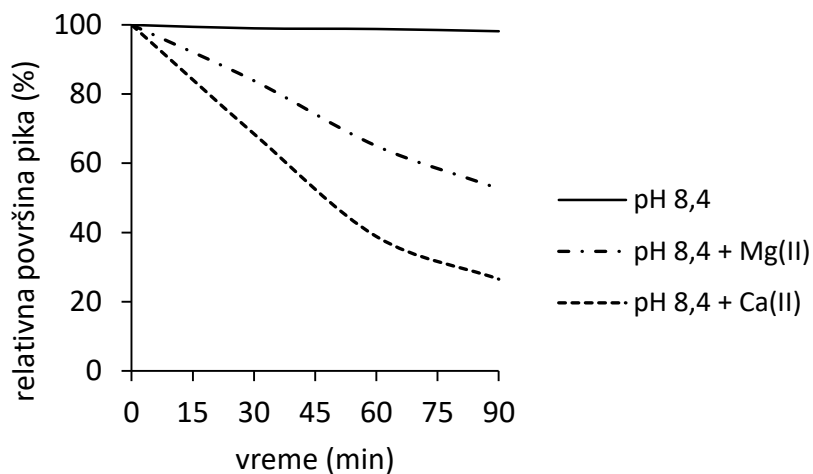


Slika 75. Hromatogrami snimljeni u toku autooksidacije hlorogenske kiseline na pH 8,4 u prisustvu Mg(II) jona



Slika 76. Hromatogrami snimljeni u toku autooksidacije hlorogenske kiseline na pH 8,4 u prisustvu Ca(II) jona

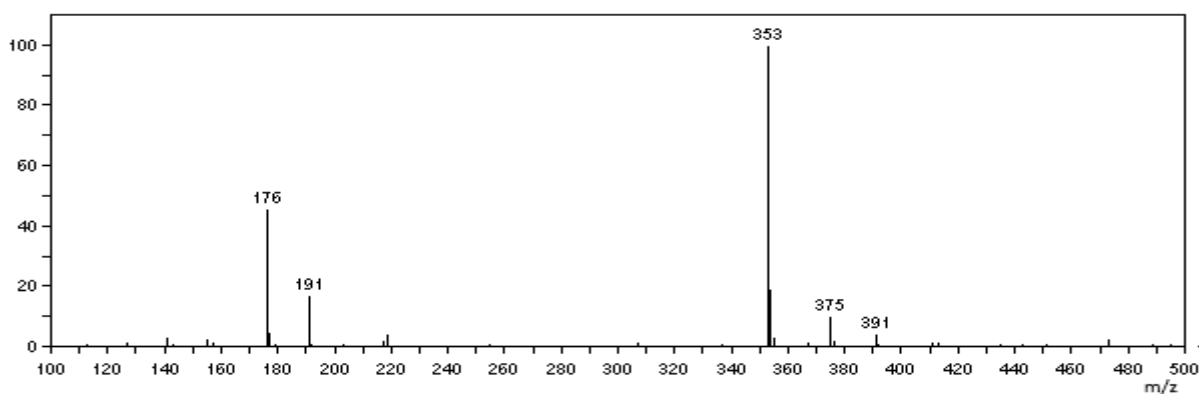
Interesntno je primetiti da, uprkos nestajanju hlorogenske kiseline iz reakcione smeše, mogu se uočiti tek naznake nastajanja novog jedinjenja sa RT 12,9 min, koje je nešto izraženije u CGA-Ca(II) sistemu, saglasno većoj brzini autooksidacije hlorogenske kiseline u prisustvu Ca(II) jona nego kada su prisutni Mg(II) joni (slika 77).



Slika 77. Potrošnja hlorogenske kiseline tokom autooksidacije na pH 8,4 bez prisustva metalnih jona i u prisustvu metalnih jona

4.3.1.3. ESI-MS analiza

U cilju dalje karakterizacije proizvoda autooksidacije hlorogenske kiseline upotrebljena je metoda masene spektrometrije sa ESI jonizacijom u negativnom modu. Slika 78 prikazuje maseni spektar snimljen na samom početku reakcije na pH 8,4 bez prisustva metalnih jona.



Slika 78. ESI-MS spektar vodenog rastvora hlorogenske kiseline na pH 8,4. Vreme autooksidacije 0 min

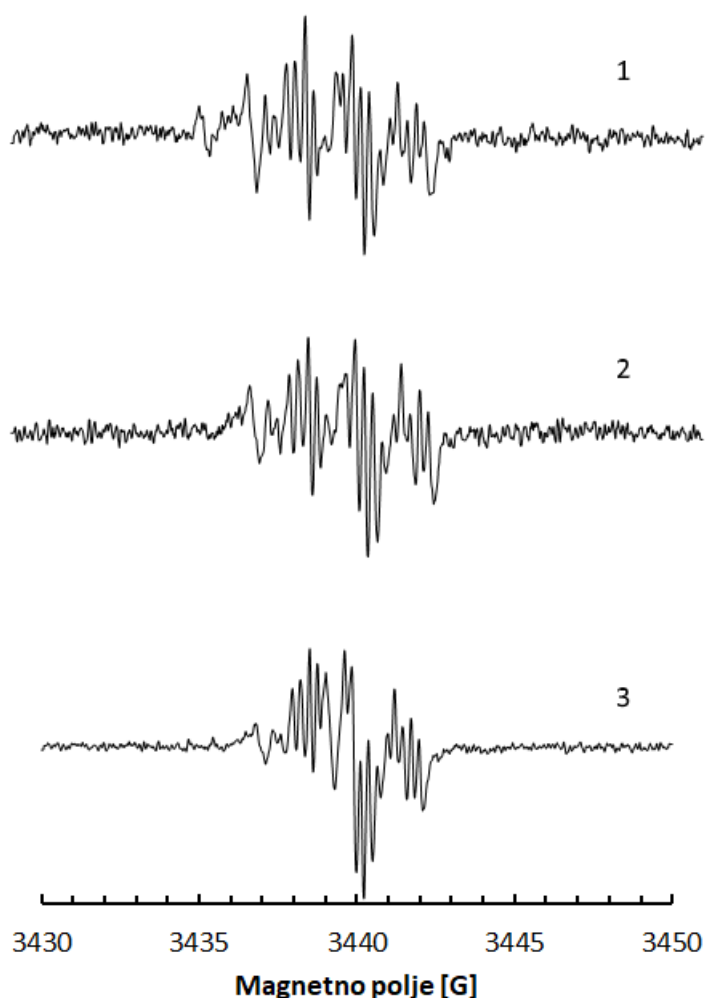
Očigledno je da dominantan pik sa m/z 353 potiče od hlorogenske kiseline $[CGA - H]^-$. Pik sa m/z 191 daje hinska kiselina (koja ulazi u sastav hlorogenske kiseline) sa masom 192 Da, dok onaj sa m/z 176 predstavlja fragment kafene kiseline. Pikovi sa masama većim od hlorogenske,

tj. m/z 375 i 391, su najverovatnije posledica opšteg prisustva jona alkalnih metala Na^+ i K^+ , odnosno odgovaraju njihovim aduktima sa hlorogenskom kiselinom.

U daljem toku autooksidacije hlorogenske kiseline na pH 8,4 bez prisustva metalnih jona nisu primećene značajne promene MS spektra, čime je potvrđena stabilnost ovakvog sistema, koja je već ustanovljena UV/Vis spektrofotometrijom.

4.3.1.4. ESR analiza

Na slici 79 su dati ESR spektri snimljeni u toku autooksidacije hlorogenske kiseline na pH 8,4 u prisustvu Mg(II) jona posle 10 min, 25 min i 45 min od početka reakcije.



Slika 79. ESR spektri snimljeni tokom autooksidacije hlorogenske kiseline na pH 8,4 u prisustvu Mg(II) jona; 1 - 10 mn, 2 - 25 min, 3 - 45 min

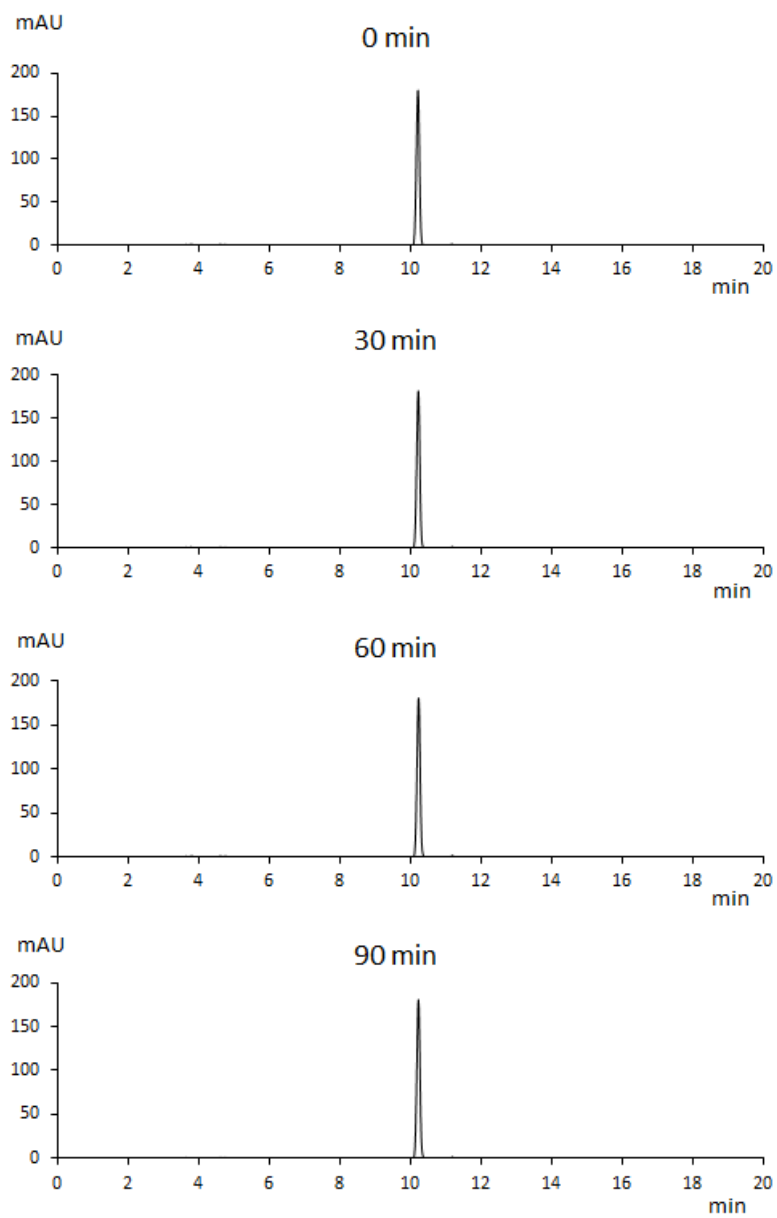
Asimetričan raspored linija u prikazanim ESR spektrima ukazuje na prisustvo bar dve različite slobodnoradikalske vrste. Spektri snimljeni u toku 45 minuta od početka autooksidacije se međusobno ne razlikuju previše, što ukazuje na relativno veliku stabilnost formiranih slobodnih radikala u prisustvu Mg(II) jona. Kompjuterska simulacija ovih ESR spektara bi bila značajno manje pouzdana nego u slučaju kafene kiseline zbog složenije strukture hlorogenske kiseline u odnosu na kafenu.

4.3.2. Autooksidacija hlorogenske kiseline na pH 7,4

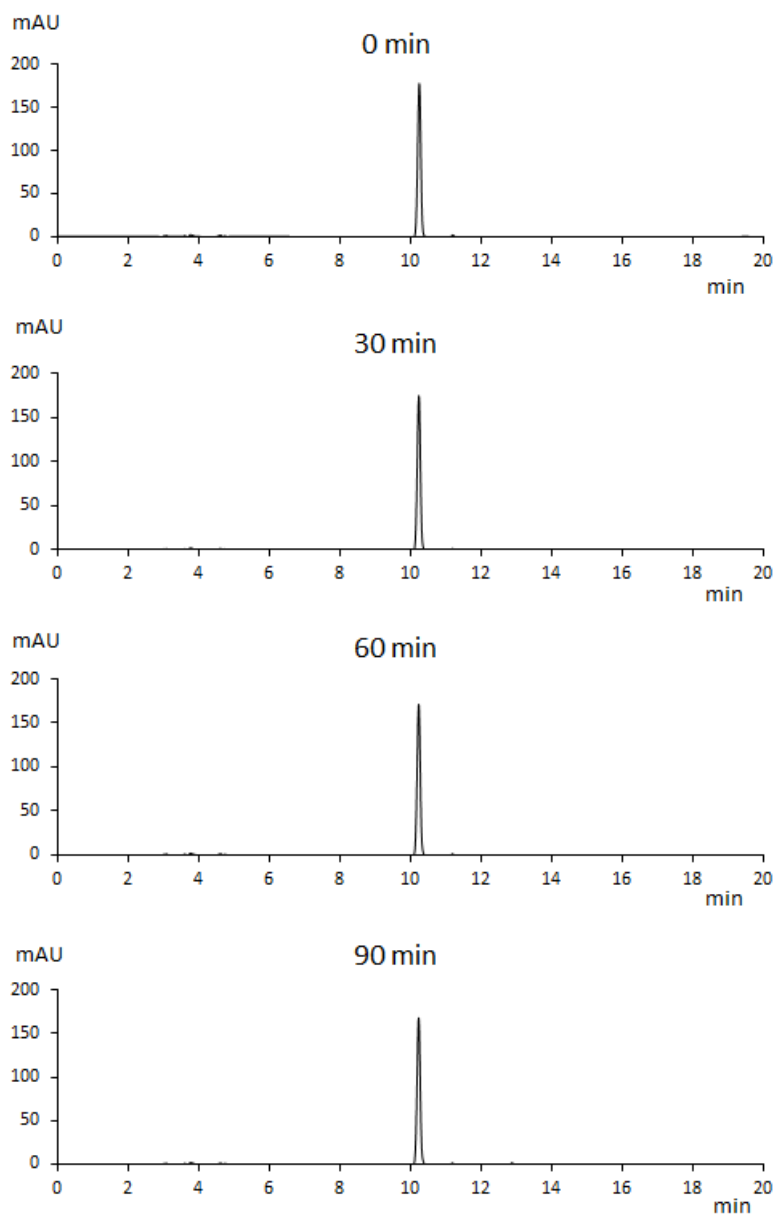
4.3.2.1. HPLC-DAD analiza

Naredne tri slike prikazuju hromatograme snimane u toku 90 minuta autooksidacije hlorogenske kiseline na pH 7,4 bez prisustva metalnih jona (slika 80), u prisustvu jona Mg(II) (slika 81) i jonima Ca(II) (slika 82).

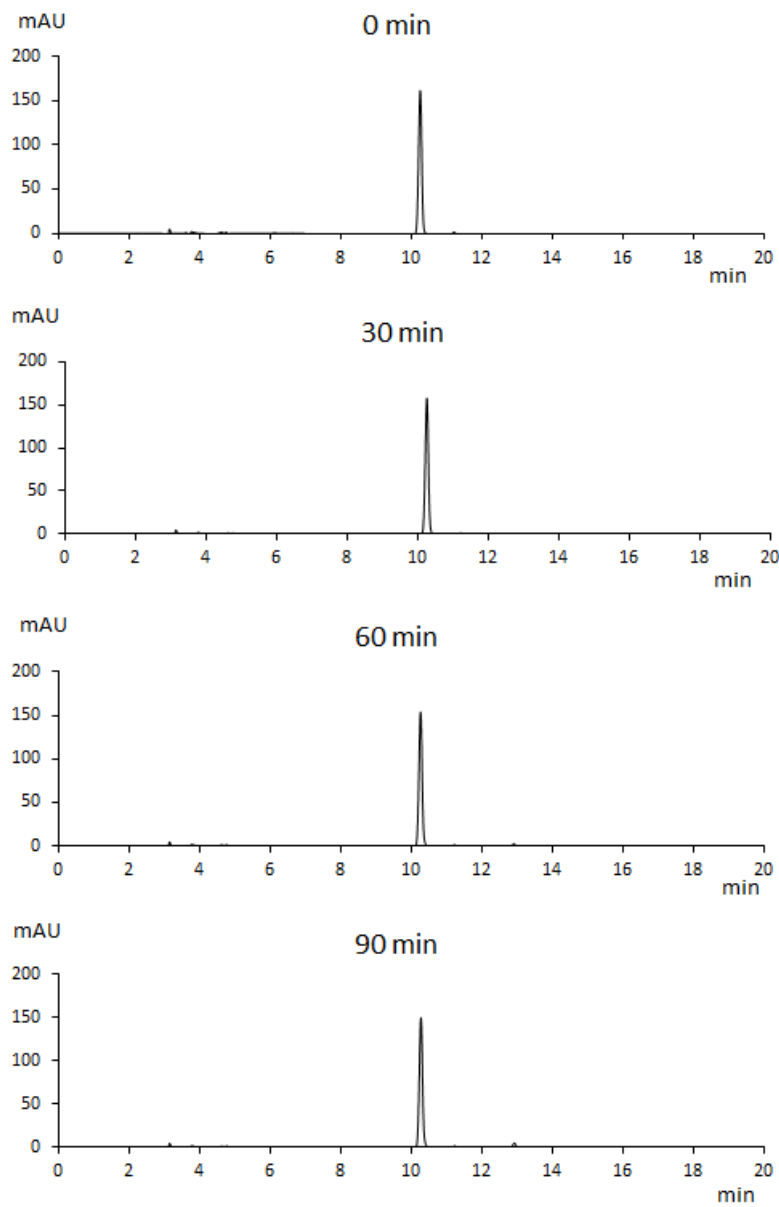
Na svim hromatogramima se uočava samo jedan pik, onaj koji potiče od hlorogenske kiseline. Do kraja praćenja reakcije autooksidacije površina pikova ostaje gotovo nepromenjena. U sistemu bez prisustva metalnih jona potrošnja hlorogenske kiseline je oko 1%, dok je u rastvorima sa metalnim jonima nešto veća i iznosi oko 5% (slika 83)



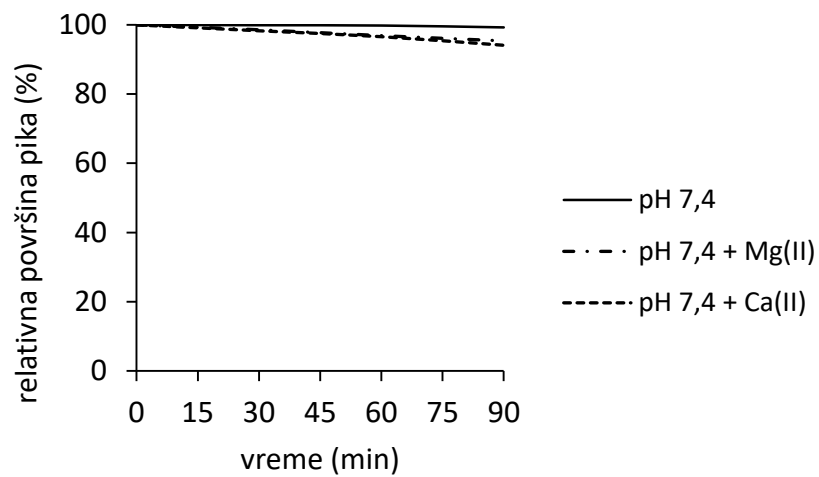
Slika 80. Hromatogrami snimljeni u toku autooksidacije hlorogenske kiseline na pH 7,4 bez prisustva metalnih jona



Slika 81. Hromatogrami snimljeni u toku autooksidacije hlorogenske kiseline na pH 7,4 u prisustvu Mg(II) jona



Slika 82. Hromatogrami snimljeni u toku autooksidacije hlorogenske kiseline na pH 7,4 u prisustvu Ca(II) jona



Slika 83. *Potrošnja hlorogenske kiseline tokom autooksidacije na pH 7,4 bez prisustva metalnih jona i u prisustvu metalnih jona*

4.4. Rutin

4.4.1. Autooksidacija rutina na pH 8,4

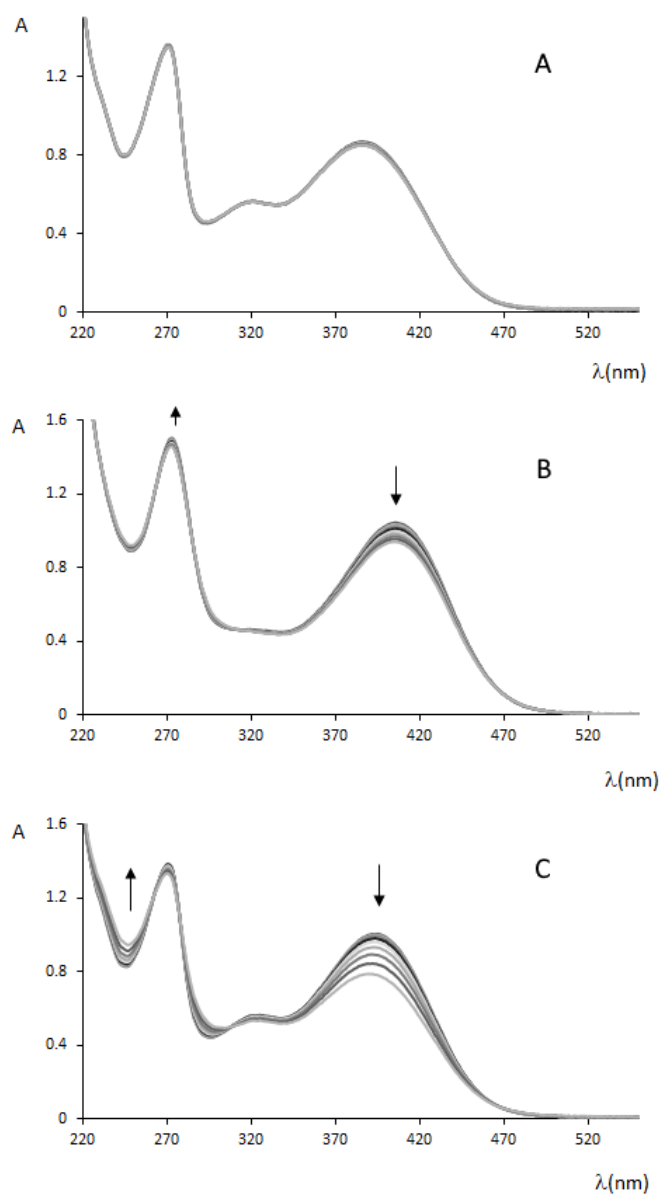
4.4.1.1. UV/Vis spektralna analiza

Opšta karakteristika flavonoida, pa tako i rutina, je prisustvo dve karakteristične apsorpcione trake u UV/Vis spektrima; jedne koja potiče od benzenovog prstena u opsegu 240-280 nm i druge na 320-385 nm karakteristične za cimetnu kiselinu (Kasprzak et al. 2015). Tako su maksimumi apsorpcije svojstveni rutinu (u kiseloj sredini na pH 3) 256 i 356 nm. Međutim, u odnosu na ove vrednosti, na pH 8,4 bez prisustva metalnih jona (slika 84, A), apsorpcioni maksimumi se pomeraju ka višim talasnim dužinama (271 i 385 nm). Ovakvo batohromno pomeranje apsorpcionih traka je prouzrokovano delimičnom deprotonacijom molekula rutina povećanjem pH vrednosti rastvora, što je slučaj i sa sličnim molekulima flavonoida (Jurasekova et al. 2014).

Kompleksiranje flavonoida sa metalnim jonima dovodi do daljeg batohromnog pomeranja karakterističnih traka (Kasprzak et al. 2015). Prisustvo Mg(II) jona pri autooksidaciji rutina na pH 8,4 (slika 84, B) pomera maksimum apsorpcije cimetne trake na 406 nm, dok prisustvo Ca(II) jona (slika 84, C) pomera ovu traku na 395 nm, pri čemu u oba slučaja skoro da nema promene položaja benzoeve apsorpcione trake. Kao i u slučaju kompleksiranja kvercetina jonima Mg(II) i Ca(II) (Erdogan & Karadag 2005), veći batohromni pomak uzrokuju Mg(II) joni, što se može objasniti njegovim većim jonskim potencijalom (odnos naelektrisanja i jonskog radijusa) u odnosu na jone Ca(II).

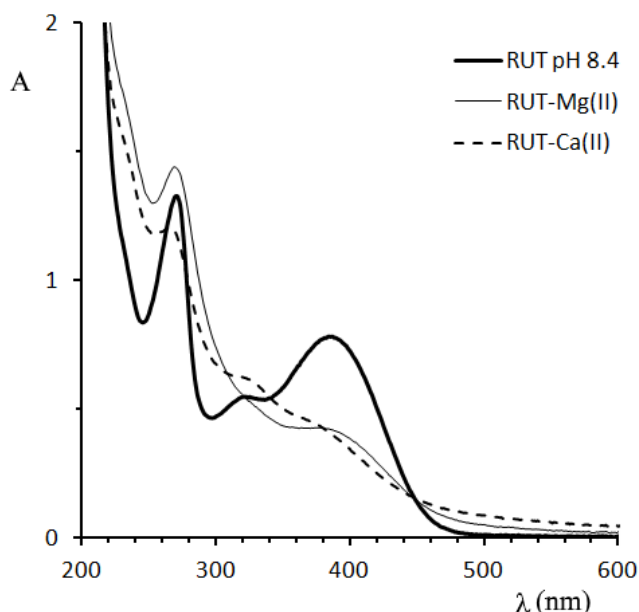
Tokom 90 min autooksidacije rutina u vodenom rastvoru na pH 8,4 bez prisustva metalnih jona dešavaju se vrlo male, gotovo zanemarljive promene UV/Vis spektra. Sa druge strane, prisustvo Mg(II), a naročito Ca(II) jona, utiče na njegovu značajnu promenu. Intenziteti maksimuma dve glavne apsorpcione trake opadaju, ali se uočava i blagi porast apsorbanca na nekim talasnim dužinama. U sistemu rutin-Ca(II) postoje tri jasno definisane izobestičke tačke na 262, 278 i 306 nm što ukazuje na postojanje dve apsorbujuće vrste u ravnoteži pod datim uslovima. Poređenja radi, promene UV/Vis spektra tokom autooksidacije rutina u prisustvu jona Mg(II) i Ca(II) su potpuno drugačijeg tipa u odnosu na one koje se dešavaju nakon dejstva zračenja ili termolize rutina, gde je opadanje apsorbanca vidljivo na svim talasnim dužinama, što govori da

u tim procesima nastaju proizvodi koji ne poseduju hromoforne strukture (Paczkowska et al. 2015a).



Slika 84. UV/Vis spektri snimljeni u toku autooksidacije rutina na pH 8,4 bez prisustva metalnih jona (A), u prisustvu jona Mg(II) (B) i jona Ca(II) (C)

Posle produžene autooksidacije rutina (oko 20 sati), snimljeni su UV/Vis spektri prikazani na slici 85.



Slika 85. UV/Vis spektri snimljeni posle 20 sati autooksidacije rutina na pH 8,4 bez i u prisustvu jona Mg(II) i Ca(II)

UV/Vis spektar snimljen nakon 20 sati autooksidacije rutina na pH 8,4 bez prisustva metalnih jona je gotovo istovetan početnom spektru. Minimalnu razliku čini blagi pad apsorbance dveju glavnih apsorpcionih traka. Međutim, u slučaju autooksidacije rutina u prisustvu Mg(II) i Ca(II) jona, razlike UV/Vis spektara u odnosu na početne su vrlo velike. Štaviše, spektri snimljeni posle 20 sati autooksidacije rutina u prisustvu jona metala imaju sličnosti sa spektrima huminskih kiselina (Veselinović et al. 2010), što ukazuje na verovatnu polimerizaciju rutina tokom njegove produžene autooksidacije pod opisanim uslovima.

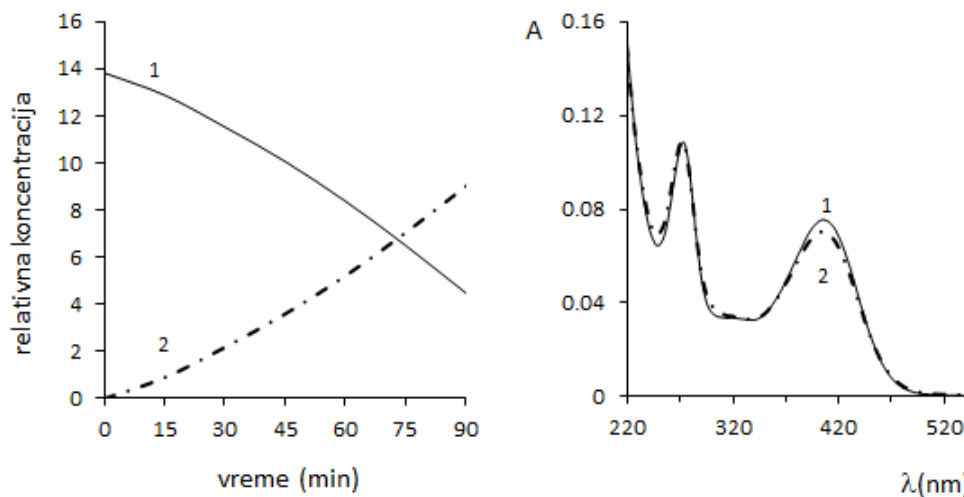
4.4.1.1.1. MCR-ALS obrada spektralnih podataka

Snimljeni UV/Vis spektri autooksidacije rutina u prisustvu metalnih jona su obrađeni MCR-ALS metodom kako bi se stekao uvid o broju i spektrima značajnih apsorpcionih komponenti u reakcionim smešama. U tabeli 7 su prikazani pokazatelji uspešnosti MCR-ALS proračuna.

Tabela 7. Finalni parametri MCR-ALS optimizacije kod rutina

	pH 8,4 + Mg(II)	pH 8,4 + Ca(II)
LOF% (PCA)	$6,664 \times 10^{-13}$	$4,4486 \times 10^{-13}$
LOF% (exp)	0,12779	0,14198
r^2	99,9998	99,9998

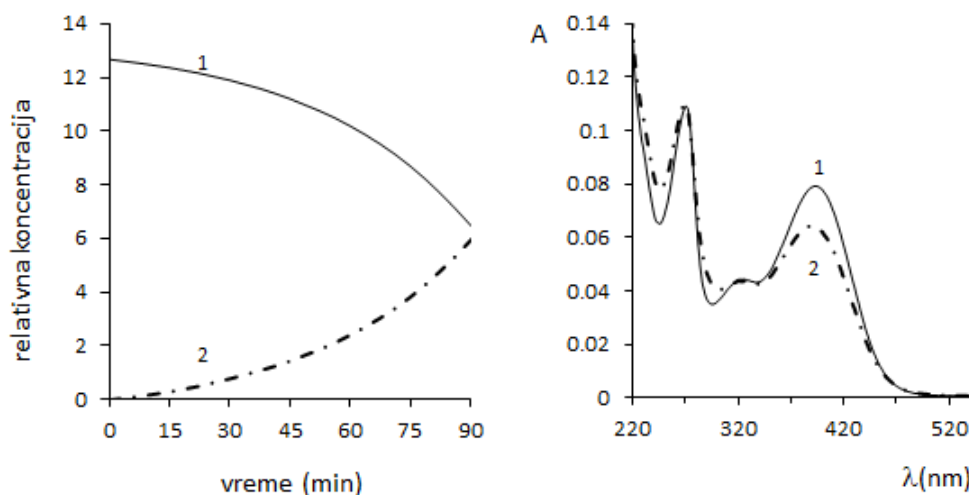
Slika 86 prikazuje rezultate MCR-ALS analize spektara snimljenih u toku autooksidacije rutina u prisustvu Mg(II) jona. U reakcionoj smeši su prisutne dve značajne komponente, od kojih je komponenta 1 rutin, koji je prisutan od početka reakcije autooksidacije. Njegova koncentracija opada konstantno sa vremenom. Suprotno ovome, sadržaj komponente 2 koja predstavlja proizvod autooksidacije rutina raste neprekidno, tako da su obe komponente u 75. minutu podjednako zastupljene u reakcionoj smeši. Interesantna je izrazita sličnost UV/Vis spektara koji su dobijeni MCR-ALS analizom za ove dve komponente.



Slika 86. Koncentracioni profili (levo) i spektri čistih komponenti (desno) dobijeni primenom MCR-ALS metode na autooksidaciju rutina u prisustvu jona Mg(II) na pH 8,4

Sličan je i rezultat MCR-ALS analize spektara autooksidacije rutina u prisustvu Ca(II) jona (slika 87). Reakcionu smešu čine dve glavne komponente. Komponenta 1 je svakako rutin, i njegova koncentracija kontinuirano opada sa vremenom. Suprotno ovome, koncentracija oksidacionog proizvoda rutina, komponenta 2, raste od početka do kraja vremena snimanja.

Sadržaj obe komponente je identičan u 90. minutu reakcije. Takođe, postoji velika sličnost njihovih UV/Vis spektara, ali nešto manje izražena nego u sistemu Rut-Mg(II).



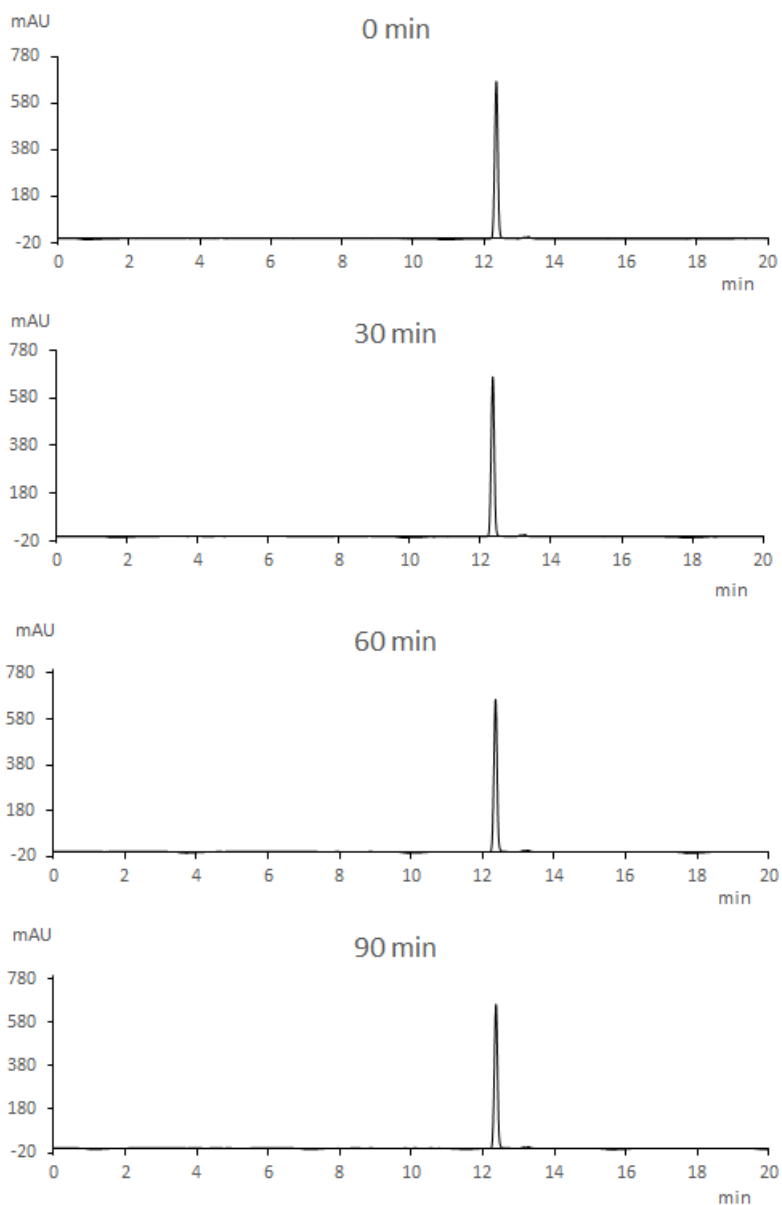
Slika 87. Koncentracioni profili (levo) i spektri čistih komponenti (desno) dobijeni primenom MCR-ALS metode na autooksidaciju rutina u prisustvu jona Ca(II) na pH 8,4

4.4.1.2. HPLC-DAD analiza

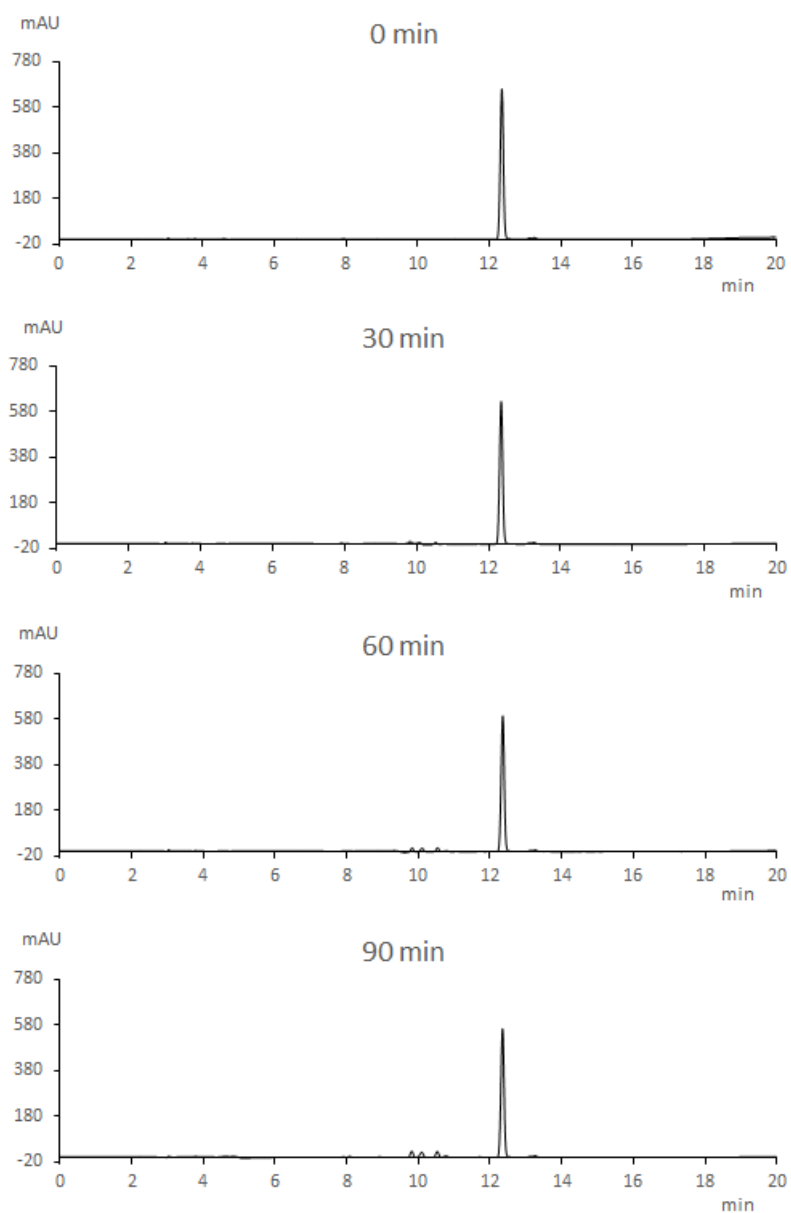
Na sledećim slikama su predstavljene hromatogrami snimani tokom 90 minuta autooksidacije rutina na pH 8,4 bez prisustva metalnih jona (slika 88), u prisustvu jona Mg(II) (slika 89) i jona Ca(II) (slika 90).

Na hromatogramima koji prikazuju autooksidaciju rutina u odsustvu metalnih jona može se uočiti samo jedan pik koji potiče od rutina, sa retencionim vremenom 12,3 min. Isti takav pik preovladava i na hromatogramima snimanim u toku autooksidacije rutina u prisustvu Mg(II) i Ca(II) jona, s tim što se sada mogu uočiti veoma mali pikovi na RT 9,8, 10,1, 10,5 i 10,8 min, koji pripadaju proizvodima transformacije rutina. Njihova niža retencionna vremena ukazuju da su ova jedinjenja polarnija od rutina, imajući u vidu da je za hromatografsko razdvajanje korišćena nepolarna C₁₈ kolona. UV/Vis spektri ovih jedinjenja ekstrahovani iz njihovih hromatografskih pikova su identični za oba sistema, Rut-Mg(II) i Rut-Ca(II), a uz to i veoma slični spektru samog rutina. Pored ovoga, spektri jedinjenja sa RT 9,8 i 10,5 min su praktično identični, pošto im je odnos apsorbanci skoro konstantan u oblasti 210 do 400 nm. Moguće objašnjenje za identične spektre dva jedinjenja sa različitim retencionim vremenima, jeste da se radi o diastereoizomerima nastalim adicijom vode na dvostruku vezu između ugljenika C₂ i C₃

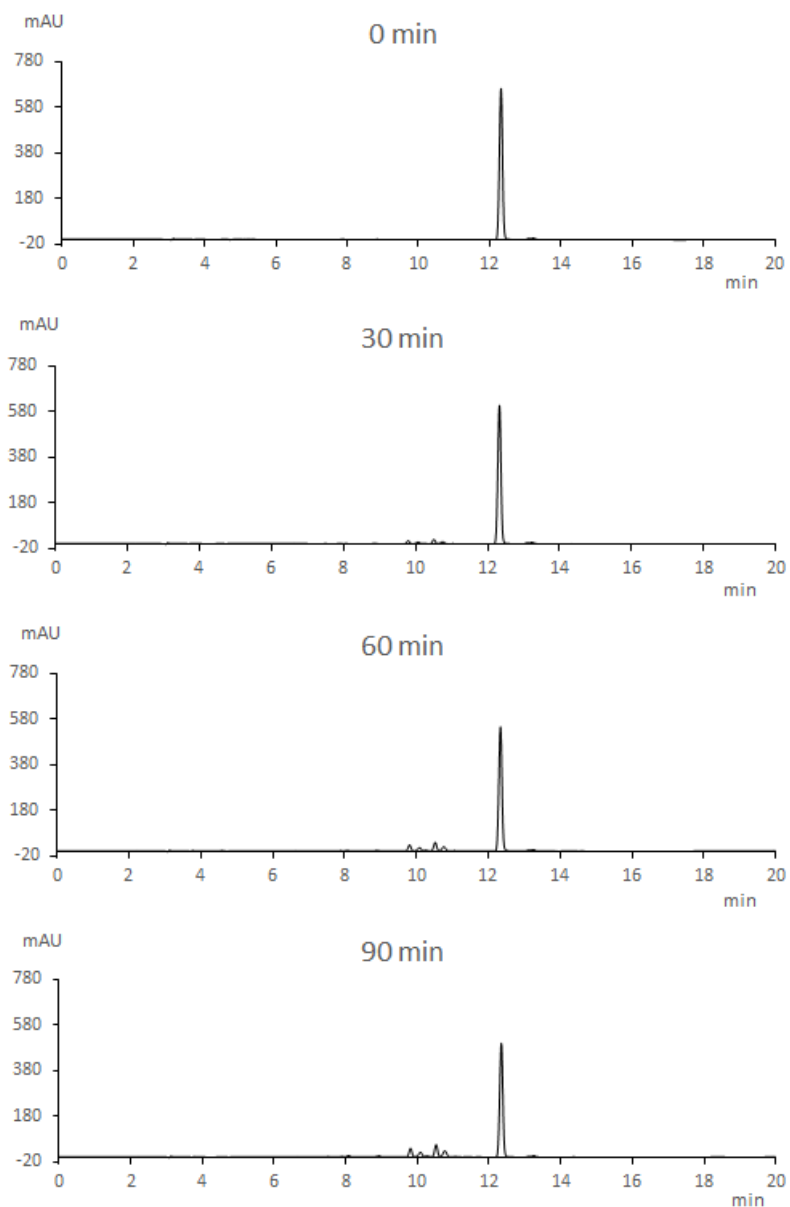
u prstenu C rutina. O takvoj mogućnosti, adiciji rastvarača na dvostruku vezu tokom oksidacije pomoću DPPH ili autooksidacije kvercetina i njegovih derivata (uključujući rutin), postoje literaturni podaci (Dangles et al. 1999).



Slika 88. Hromatogrami snimljeni u toku autooksidacije rutina na pH 8,4 bez prisustva metalnih jona



Slika 89. Hromatogrami snimljeni u toku autooksidacije rutina na pH 8,4 u prisustvu Mg(II) jona

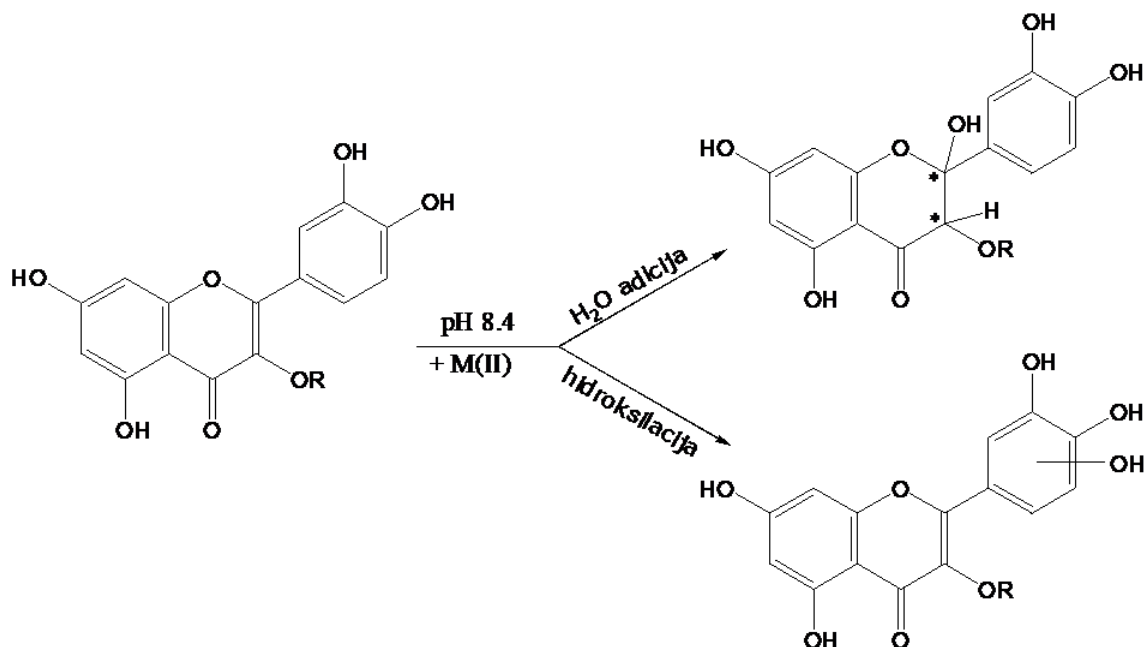


Slika 90. Hromatogrami snimljeni u toku autooksidacije rutina na pH 8,4 u prisustvu Ca(II) jona

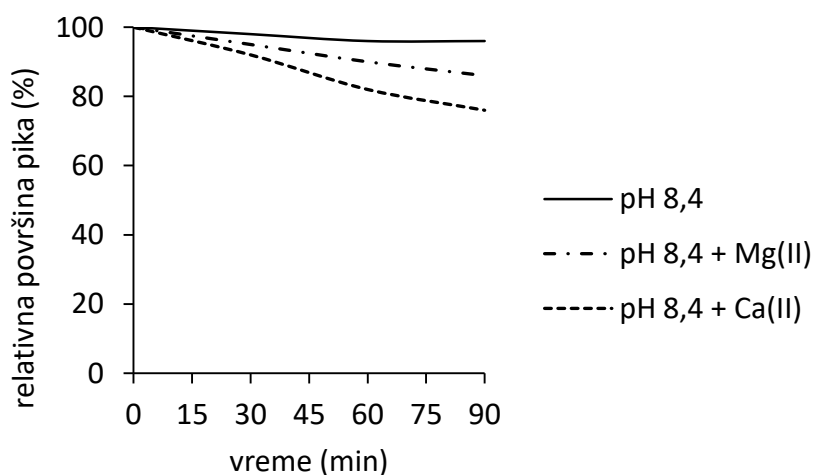
Preostala dva jedinjenja nastala u toku autooksidacije rutina u prisustvu metalnih jona, a čija su retenciona vremena 10,1 i 10,8 min, verovatno nastaju hidroksilacijom B prstena rutina. Ova pretpostavka se zasniva na činjenici da je mogućnost hidroksilacije C prstena u alkalnim uslovima veoma dobro dokumentovana za neke flavonole sa *orto*-dihidroksi grupama na ovom prstenu (Cotelle et al. 1996). Eventualnom hidroksilacijom rutina bi ova jedinjenja postala polarnija od njega, što je u saglasnosti sa njihovim nižim retencionim vremenima. Na kraju, razlike u retencionim vremenima između rutina i pomenutih jedinjenja nisu prevelike da bi

mogle ukazivati na velike strukturne promene, kao što je npr. otvaranje prstena uz formiranje veoma polarnih karboksilnih grupa.

Na slici 91 su šematski prikazane moguće transformacije rutina u početnoj fazi autooksidacije u slabo alkalnom rastvoru u prisustvu jona Mg(II) i Ca(II).



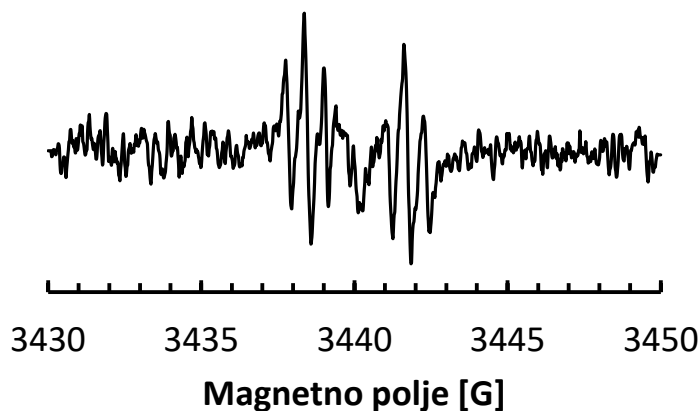
Slika 91. Šematski prikaz početnih transformacija rutina tokom autooksidacije na pH 8,4 u prisustvu jona Mg(II) i Ca(II) (R = rutinozid)



Slika 92. Potrošnja rutina tokom autooksidacije na pH 8,4 bez prisustva metalnih jona i u prisustvu metalnih jona

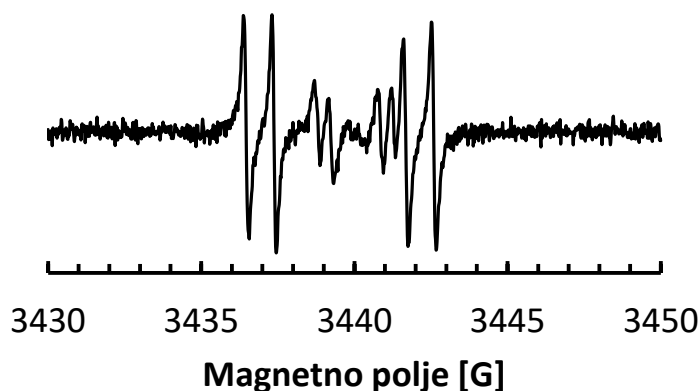
4.4.1.3. ESR analiza

Na slici 93 je prikazan ESR spektar snimljen nakon 15 min autooksidacije rutina na pH 8,4 u prisustvu Mg(II) jona.



Slika 93. ESR spektar autooksidacije rutina na pH 8,4 u prisustvu Mg(II) jona, snimljen 15 min od početka reakcije

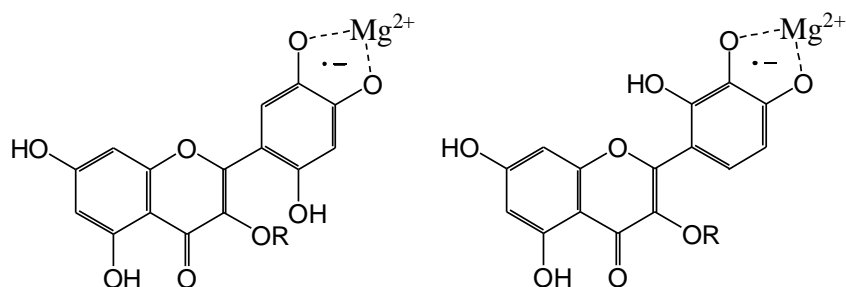
I pored lošeg odnos signal/šum, koji značajno otežava kompjutersku simulaciju ovog spektra, uočljivo je prisustvo signala koji ukazuju na formiranje spinski stabilisanih slobodnih radikala. U cilju dobijanja ESR spektra pogodnijeg za analizu, snimanje je ponovljeno pod istim uslovima za rastvor u kome je koncentracija rutina povećana pet puta. Dobijeni ESR spektar ima mnogo bolji odnos signal/šum i prikazan je na slici 94.



Slika 94. ESR spektar autooksidacije rutina na pH 8,4 u prisustvu Mg(II) jona, snimljen 15 min od početka reakcije; koncentracija rutina je povećana pet puta

U prikazanom ESR sektu se jasno uočavaju dva para od po dva dubleta linija koji potiču od dva različita slobodna radikala koji se istovremeno formiraju u toku autooksidacije rutina pod ovim uslovima na šta ukazuje asimetričan izgled spektra. Imajuću u vidu da ESR spektar koji

sadrži dva dubleta potiče od dva neekvivalentna protona može se pretpostaviti da radikali odgovarajuće strukture nastaju hidroksilacijom rutina u različitim položajima prstena B (što je u skladu sa rezultatima HPLC analize) i njihove strukture su prikazane na slici 95:



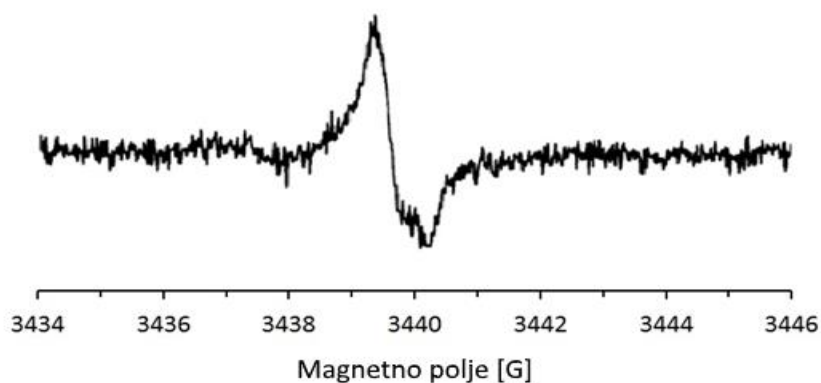
Slika 95. Strukture spinski stabilisanih radikala proizvoda nastalih hidroksilacijom rutina na prstenu B

Vrednosti konstanti hiperfinog kuplovanja dobijene kompjuterskom simulacijom prikazanog ESR spektra (stepen korelacije 0,969) za ova dva radikala prikazane su u tabeli 8:

Tabela 8. Konstante hiperfinog kuplovanja radikalskih vrsta dobijenih kompjuterskom simulacijom ESR spektra snimljenog tokom autooksidacije rutina na pH 8,4 u prisustvu Mg(II) jona

Radikal	a^{H1}	a^{H2}	Relativne površine pikova (%)
R1	5,2	0,92	63
R2	2,06	0,44	37

ESR spektar snimljen nakon 7 dana od početka autooksidacije rutina prikazan je na slici 96 i odgovara ESR spektrima koji su karakteristični za huminske kiseline (Watanabe et al. 2005).

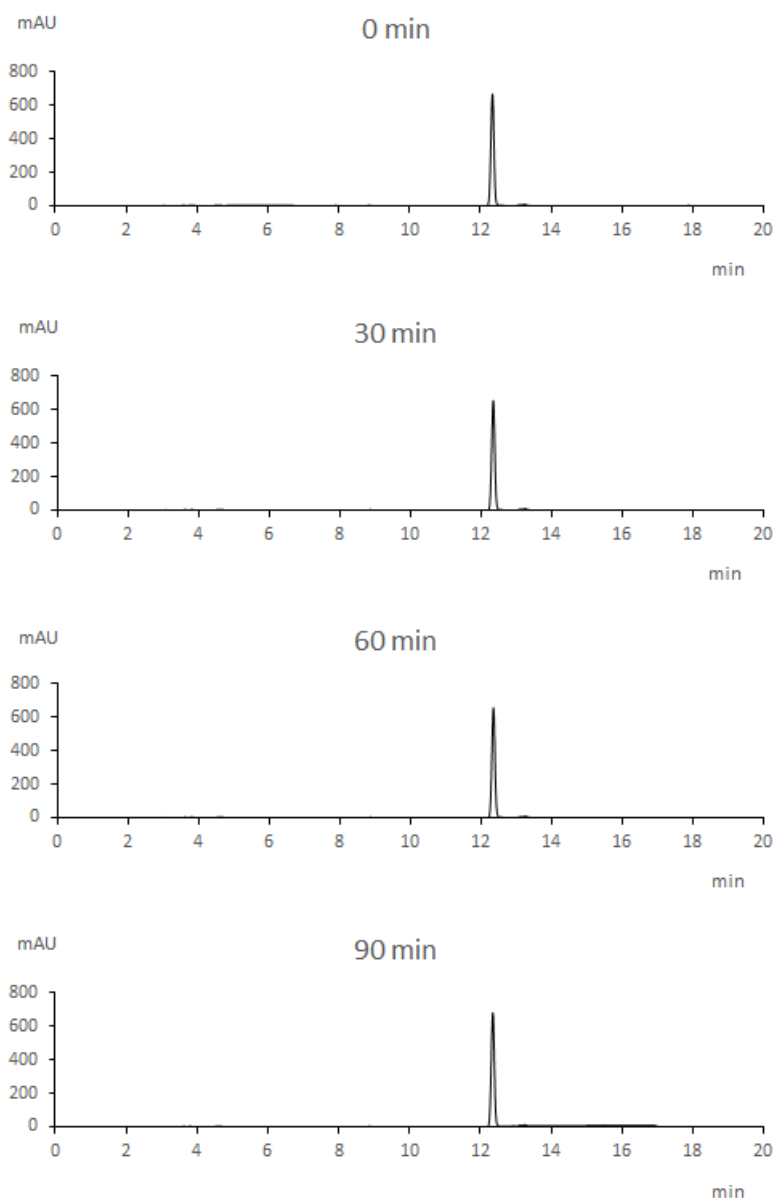


Slika 96. ESR spektar snimljen 7 dana od početka reakcije autooksidacije rutina na pH 8,4 u prisustvu Mg(II) jona

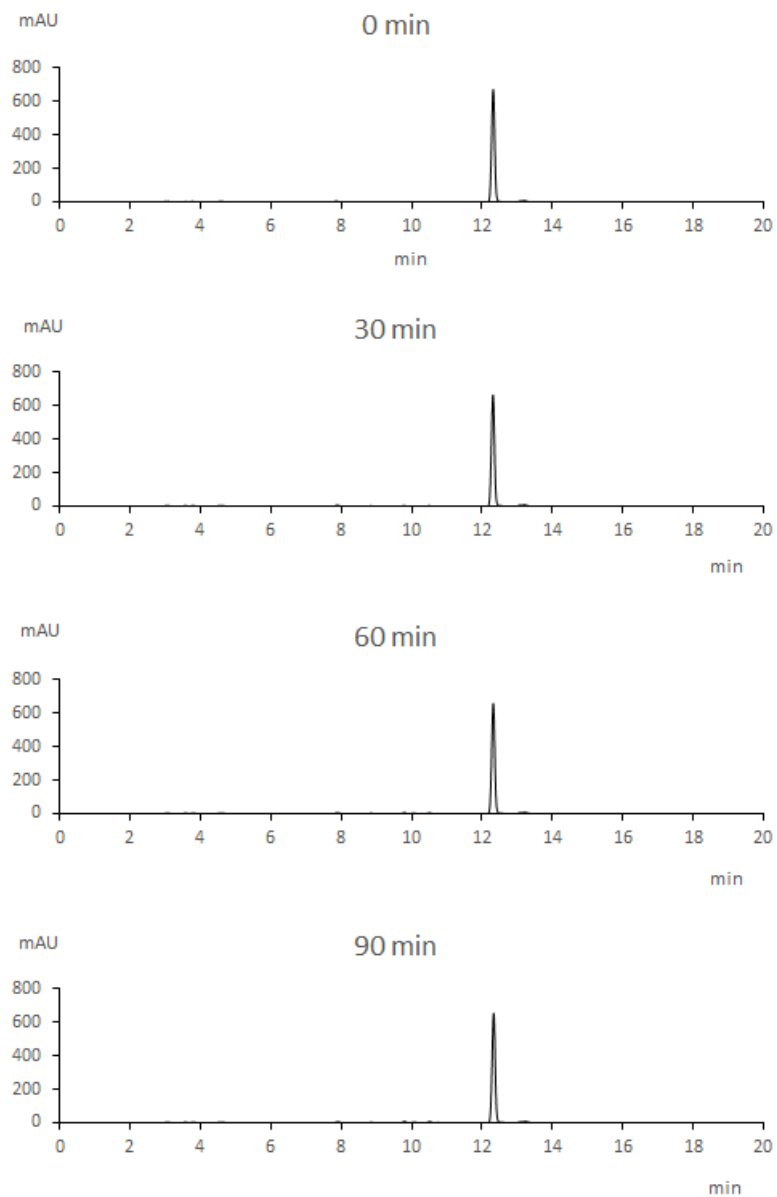
4.4.2. Autooksidacija rutina na pH 7,4

4.4.2.1. HPLC-DAD analiza

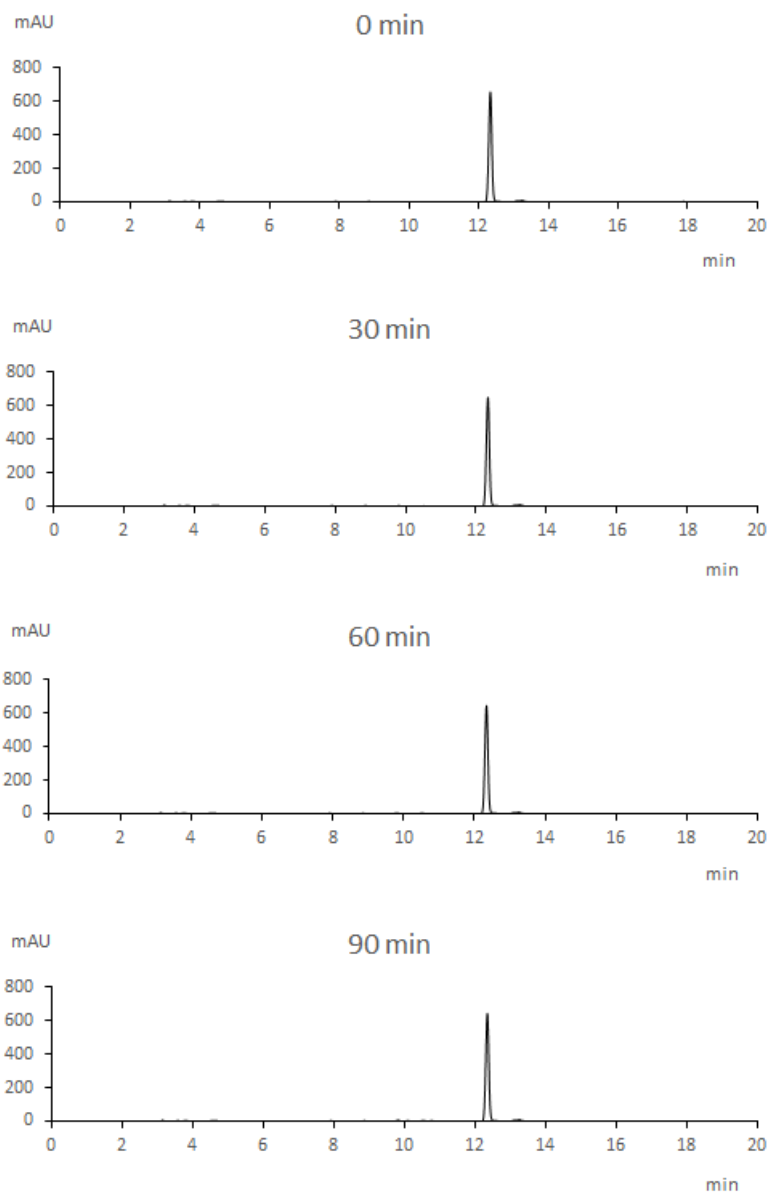
Rezultati HPLC snimanja autooksidacije rutina u TRIS-puferu sa i bez prisustva metalnih jona pri pH 7,4 su prikazani na sledeće tri slike. Slika 97 predstavlja hromatograme snimane u rastvoru koji ne sadrži jone metala, slika 98 kada su prisutni joni Mg(II) a slika 99 kada se u rastvoru nalaze joni Ca(II).



Slika 97. Hromatogrami snimljeni u toku autooksidacije rutina na pH 7,4 bez prisustva metalnih jona



Slika 98. Hromatogrami snimljeni u toku autooksidacije rutina na pH 7,4 u prisustvu Mg(II) jona



Slika 99. Hromatogrami snimljeni u toku autooksidacije rutina na pH 7,4 u prisustvu Ca(II) jona

U sva tri sistema, na hromatogramima je vidljiv samo jedan pik čije je retenciono vreme 12,3 min i potiče od rutina. Površina ovog pika se ne menja u toku praćenja reakcije autooksidacije, što govori o zanemarljivo maloj brzini autooksidacije rutina na pH 7,4, čak i kada su metalni joni prisutni u rastvoru.

4.5. Ruzmarinska kiselina

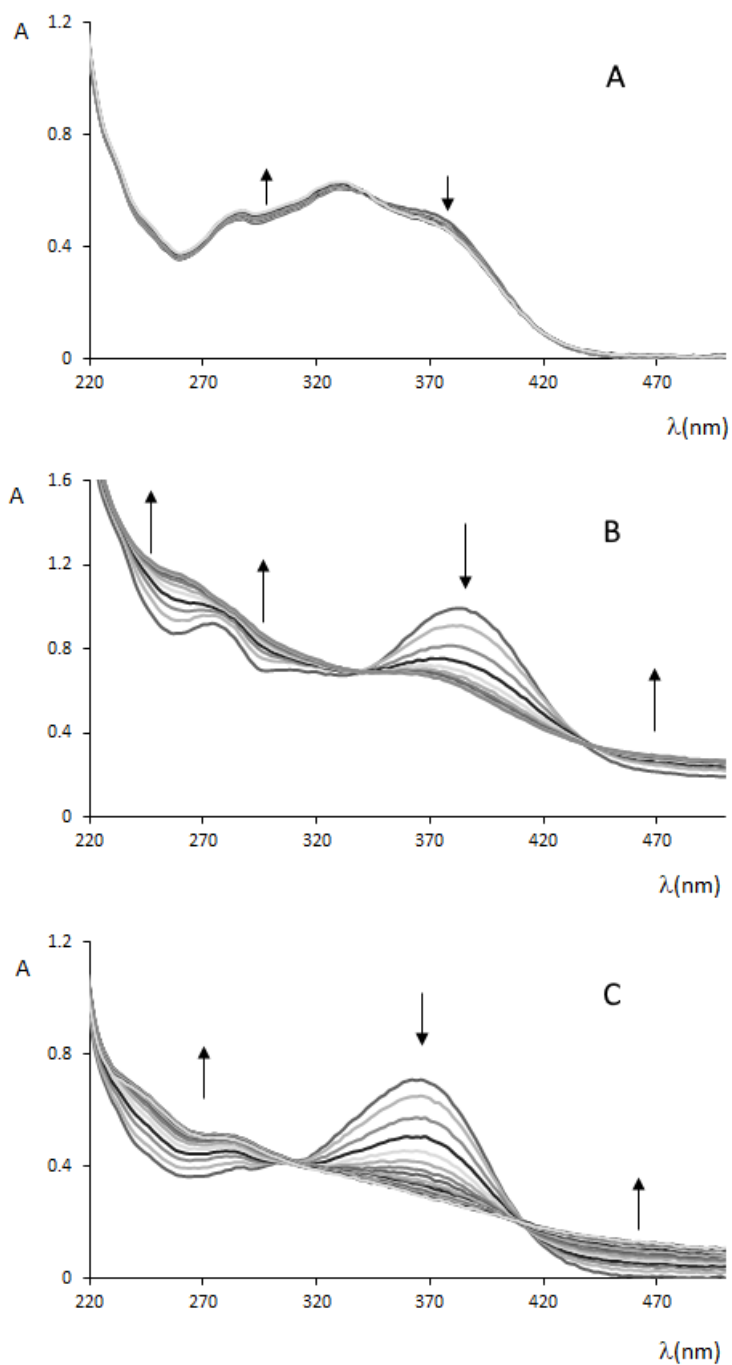
4.5.1. Autooksidacija ruzmarinske kiseline na pH 8,4

4.5.1.1. UV/Vis spektralna analiza

Na slici 100 su predstavljeni UV/Vis spektri snimljeni u toku autooksidacije ruzmarinske kiseline na pH 8,4 bez prisustva metalnih jona (A) i u prisustvu Mg(II) (B) i Ca(II) (C) tokom 90 minuta praćenja reakcija.

Kada u rastvoru nisu prisutni metalni joni, UV/Vis spektar odgovara anjonu ruzmarinske kiseline ako se ima u vidu da pK_{a1} ruzmarinske kiseline ima vrednost oko 3 (Maegawa et al. 2007). Na spektru se mogu uočiti tri slabo izražena maksimuma: na 288 nm, 330 nm i 370 nm. Vremenom, tokom autooksidacije, zapažaju se tek neznatne promene u spektrima, blag porast apsorbanace u opsegu do oko 344 nm i slabo izražen pad apsorbanace iznad te tačke, što ukazuje na veliku stabilnost ovakvog sistema.

Međutim, uvođenje metalnih jona u sistem, dovodi do jasno vidljivih promena UV/Vis spektara u toku narednih 90 minuta, koliko je praćena autooksidacija ruzmarinske kiseline. Već se početni spektri znatno razlikuju od onih bez prisustva metalnih jona, ali postoje razlike i između početnih spektara u sistemima RA-Mg(II) i RA-Ca(II). Ruzmarinska kiselina u prisustvu jona Mg(II) pokazuje dva jasna maksimuma, jedan na 276 nm i drugi, izraženiji, na 384 nm koji se mogu pripisati RA-Mg(II) kompleksu, dok se u prisustvu Ca(II) jona zapaža samo jedan jasno definisan maksimum na 364 nm (RA-Ca(II) kompleks). U toku autooksidacije u prisustvu metalnih jona UV/Vis spektri se značajno menjaju. Kod sistema RA-Mg(II) opada maksimum na 384 nm, dok rastu apsorbanace, kako na nižim talasnim dužinama do 340 nm, tako i na višim talasnim dužinama iznad 440 nm, tako da se na ove dve talasne dužine javljaju izobestičke tačke. Kod RA-Ca(II) sistema se takođe zapažaju dve izobestičke tačke, ali na kraćim talasnim dužinama; na 308 nm i 412 nm. Relativno brzo opadanje maksimuma apsorpcije ukazuje da dolazi do značajnih hemijskih promena početnog jedinjenja u toku autooksidacije. Porast apsorbanacije u nižem opsegu talasnih dužina ukazuje na smanjenje delokalizacije elektrona i/ili gubitak hromofora sa slobodnim elektronskim parovima, dok rast apsorbanacije u višem opsegu talasnih dužina može značiti pojavu hinonskih struktura, što je karakteristično za autooksidaciju polifenolnih jedinjenja.



Slika 100. UV/Vis spektri snimljeni u toku autooksidacije ruzmarinske kiseline na pH 8,4 bez prisustva metalnih jona (A), u prisustvu jona Mg(II) (B) i jona Ca(II) (C)

4.5.1.1.1. MCR-ALS obrada spektralnih podataka

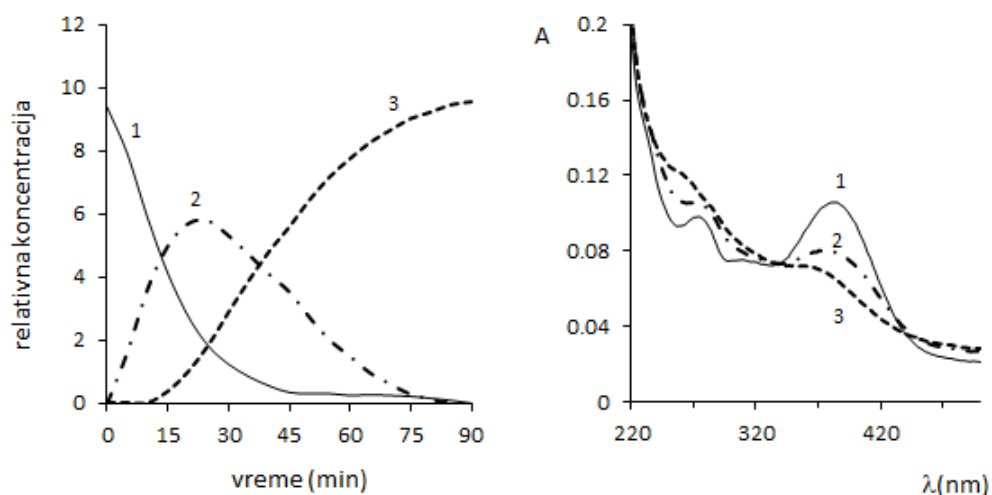
Dalja analiza snimljenih UV/Vis spektara autooksidacije ruzmarinske kiseline na pH 8,4 u prisustvu jona Mg(II) i Ca(II) urađena je MCR-ALS metodom, sa ciljem dobijanja kako

koncentracioni tako i spektralnih profila. Tabela 9 sadrži numeričke podatke koji potvrđuju kvalitet MCR-ALS proračuna.

Tabela 9. Finalni parametri MCR-ALS optimizacije kod ruzmarinske kiseline

	pH 8,4 + Mg(II)	pH 8,4 + Ca(II)
LOF% (PCA)	0,0059246	0,068439
LOF% (exp)	0,29152	1,4366
r^2	99,9992	99,9794

Slika 101 prikazuje rezultat MCR-ALS analize spektara autooksidacije ruzmarinske kiseline u prisustvu Mg(II) jona.

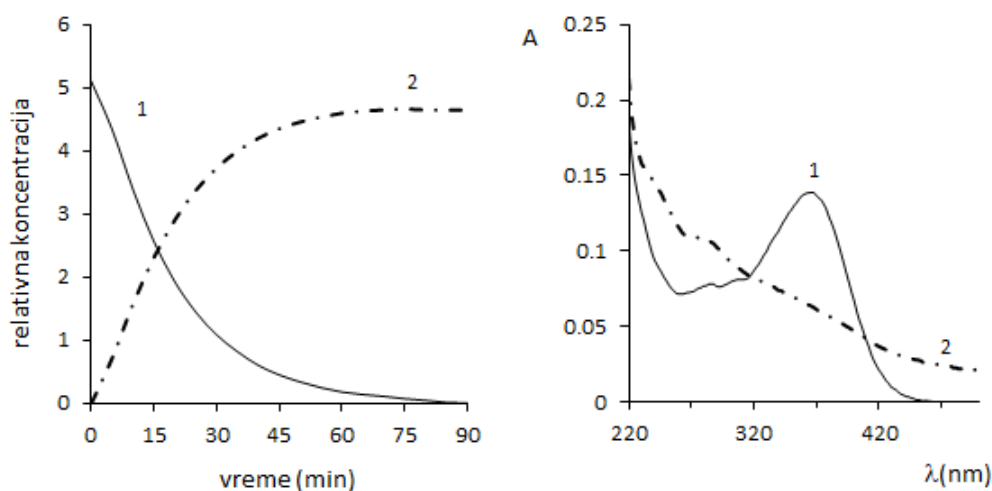


Slika 101. Koncentracijski profili (levo) i spektri čistih komponenti (desno) dobijeni primenom MCR-ALS metode na autooksidaciju ruzmarinske kiseline u prisustvu jona Mg(II) pri pH 8,4

U ovoj reakcionoj smeši su prisutne tri glavne komponente. Komponenta 1, koja je prisutna od samog početka autooksidacije i čija koncentracija konstantno opada sa vremenom, očigledno potiče od RA-Mg(II) kompleksa. Komponenta 2 nastaje na početku reakcije autooksidacije, njen sadržaj raste do 25. minuta, posle čega se smanjuje, ali je i dalje prisutna u sistemu gotovo do kraja posmatranja reakcije. UV/Vis spektar ove komponente ima sličnosti sa UV/Vis spektrom RA-Mg(II) kompleksa (komponenta 1), što ukazuje na njegovo prisustvo u reakcionoj

smeši, ali u nešto izmenjenom obliku. Treća komponenta se pojavljuje oko 10. minuta i njena koncentracija konstantno raste do kraja snimanja, a UV/Vis spektar ove komponente u velikoj meri podseća na huminske kiseline što ukazuje da se najverovatnije radi o polimerizacionom proizvodu.

Na slici 102 predstavljeni su rezultati MCR-ALS analize spektara autooksidacije ruzmarinske kiseline u prisustvu Ca(II) jona.

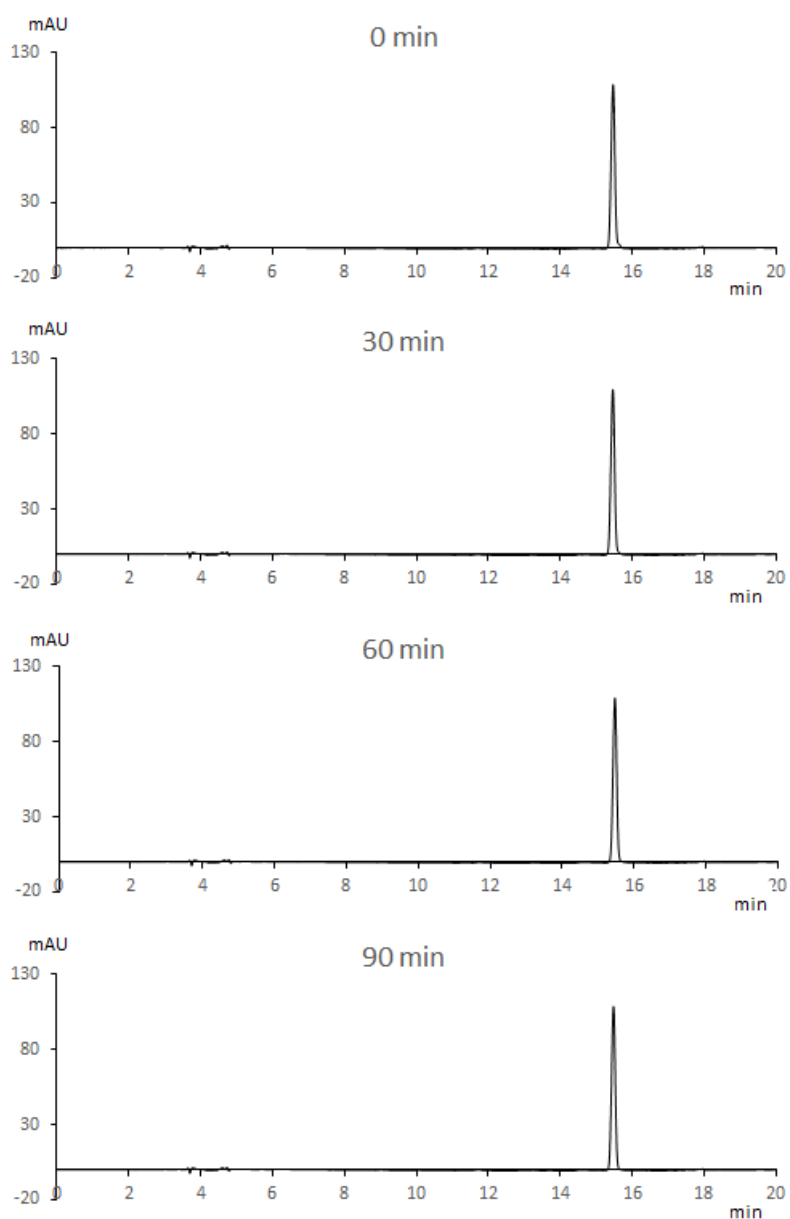


Slika 102. Koncentracioni profili (levo) i spektri čistih komponenti (desno) dobijeni primenom MCR-ALS metode na autooksidaciju ruzmarinske kiseline u prisustvu jona Ca(II) pri pH 8,4

Za razliku od RA-Mg(II) sistema, u RA-Ca(II) sistemu se uočavaju u dve glavne komponente reakcionoj smeši. Komponenta 1 je očigledno, slično prethodnom slučaju, kompleks RA-Ca(II) koji se može zapaziti već od prvog minuta reakcije autooksidacije ruzmarinske kiseline u prisustvu jona Ca(II) i čija koncentracija konstantno opada do kraja reakcije autooksidacije. Druga komponenta, sa UV/Vis spektrom koji podseća na spektar huminskih kiselina, se pojavljuje na startu reakcije autooksidacije, raste naglo do 50. minuta, a zatim neznatno do kraja praćenja reakcije. U poređenju sa RA-Mg(II) sistemom, u ovom slučaju izostaje dodatna (srednja) komponenta koja bi imala sličnost sa RA-Ca(II) kompleksom. Objašnjenje za ovo, najverovatnije, leži u većoj stabilnosti RA-Mg(II) kompleksa u odnosu na RA-Ca(II) kompleks, usled jačeg stabilizirajućeg efekta i slabije pokretljivosti jona Mg(II) u odnosu na Ca(II) jone.

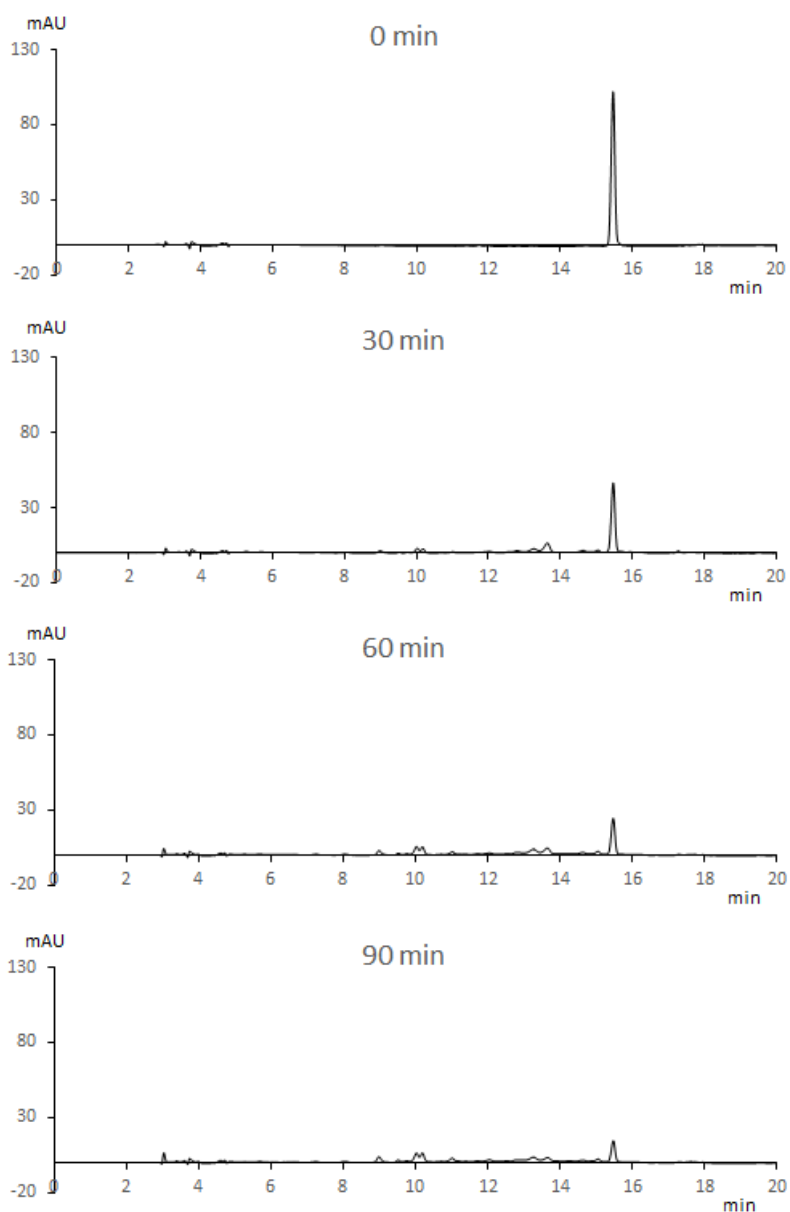
4.5.1.2. HPLC-DAD analiza

Na sledećim slikama predstavljeni su hromatogrami snimani tokom 90 minuta autooksidacije ruzmarinske kiseline na pH 8,4 bez prisustva metalnih jona (slika 103), u prisustvu jona Mg(II) (slika 104) i jona Ca(II) (slika 105). Snimanja su obavljena u intervalima od 30 minuta, pri čemu je prvi hromatogram, sniman neposredno po mešanju odgovarajućih rastvora, označen sa „0 min“.



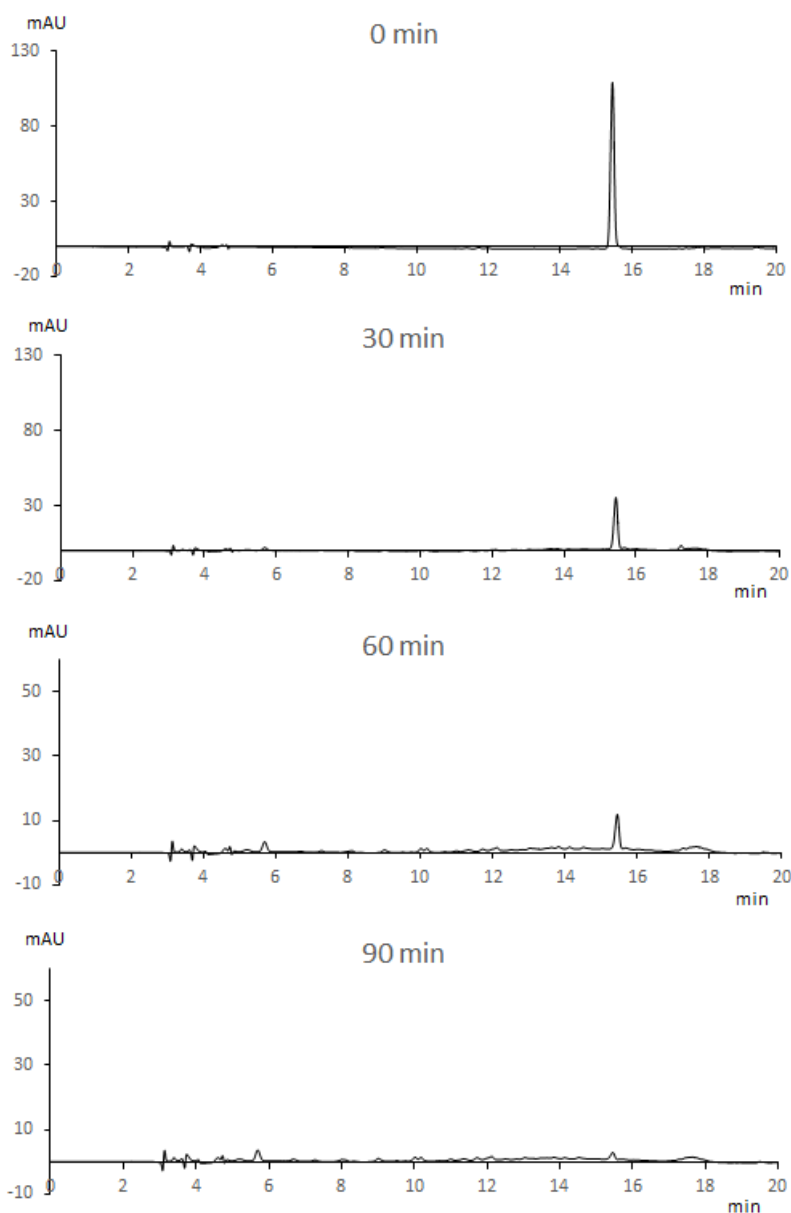
Slika 103. Hromatogrami snimljeni u toku autooksidacije ruzmarinske kiseline na pH 8,4 bez prisustva metalnih jona

Na svim hromatogramima je dominantan jedan pik koji ima retenciono vreme 15,5 min, i koji potiče od ruzmarinske kiseline. Štaviše, na hromatogramima koji predstavljaju autooksidaciju ruzmarinske kiseline na pH 8,4 bez prisustva metalnih jona, to je i jedini pik koji se može uočiti, a njegova površina u narednih 90 minuta neznatno opada (tek za 1%), čime je stabilnost sistema, uočena metodom UV/Vis spektrofotometrije, potvrđena.

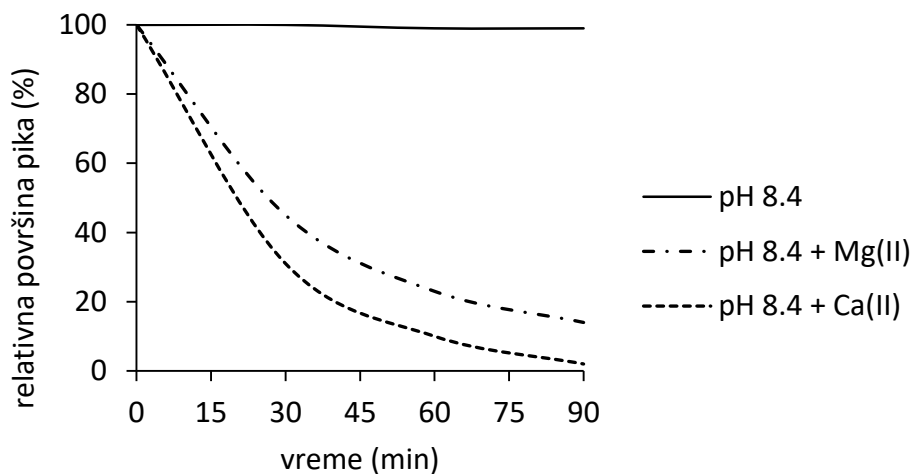


Slika 104. Hromatogrami snimljeni u toku autooksidacije ruzmarinske kiseline na pH 8,4 u prisustvu Mg(II) jona

U prisustvu metalnih jona, pik ruzmarinske kiseline je sve manji sa svakim narednim merenjem, što upućuje na zaključak da joni Mg(II) i Ca(II) znatno ubrzavaju reakciju autooksidacije ruzmarinske kiseline. Dalje, u oba sistema sa metalnim jonima, mogu se na hromatogramima zapaziti i minorni pikovi, od kojih su pojedini karakteristični za svaki sistem posebno.



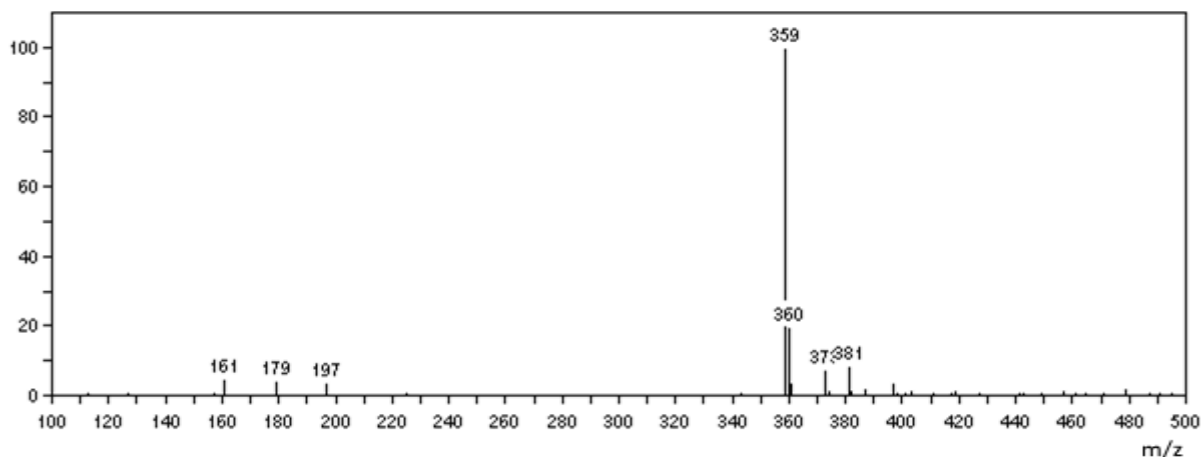
Slika 105. Hromatogrami snimljeni u toku autooksidacije ruzmarinske kiseline na pH 8,4 u prisustvu Ca(II) jona



Slika 106. Potrošnja ruzmarinske kiseline tokom autooksidacije na pH 8,4 bez prisustva metalnih jona i u prisustvu metalnih jona

4.5.1.3. ESI-MS analiza

Autooksidacija ruzmarinske kiseline na pH 8,4 bez prisustva metalnih jona je dalje proučavana tehnikom ESI-MS radi potpunije analize nastalih proizvoda.

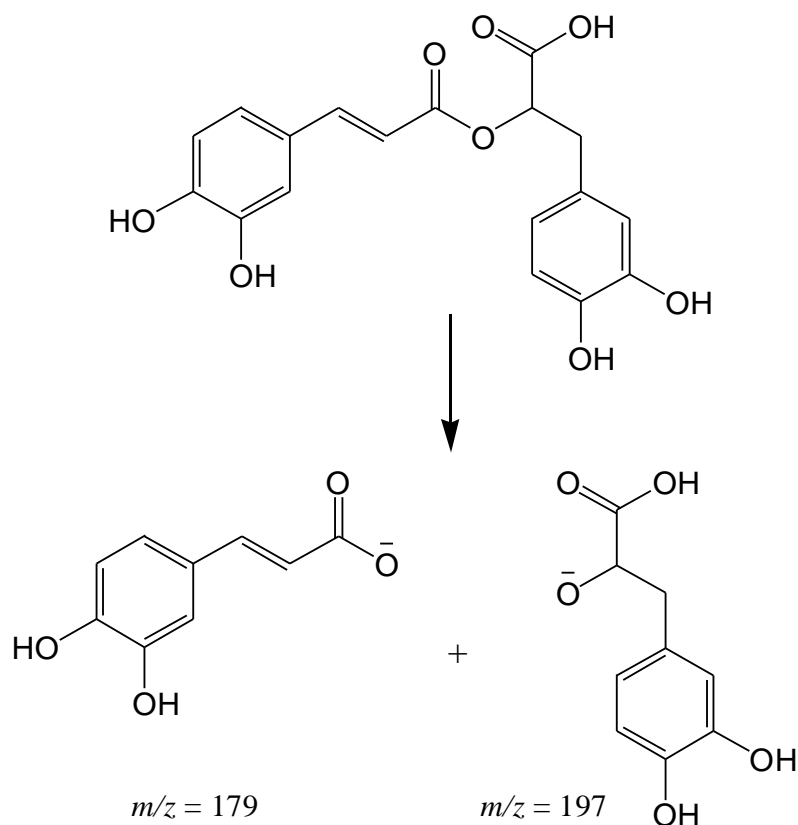


Slika 107. ESI-MS spektar vodenog rastvora ruzmarinske kiseline na pH 8,4. Vreme autooksidacije: 0 minuta

Na samom početku reakcije (slika 107) dominira pik sa m/z 359 koji odgovara ruzmarinskoj kiselini $[RA - H]^-$. Pored njega se, sa manje od 10% zastupljenosti, vide pikovi sa m/z vrednostima 161, 179 i 197 u nižem masenom opsegu, kao i 373 i 381 sa većim masama od

ruzmarinske kiseline. U narednom periodu reakcije autooksidacije u trajanju od 4 dana nije bilo značajnijih promena u snimljenim masenim spektrima.

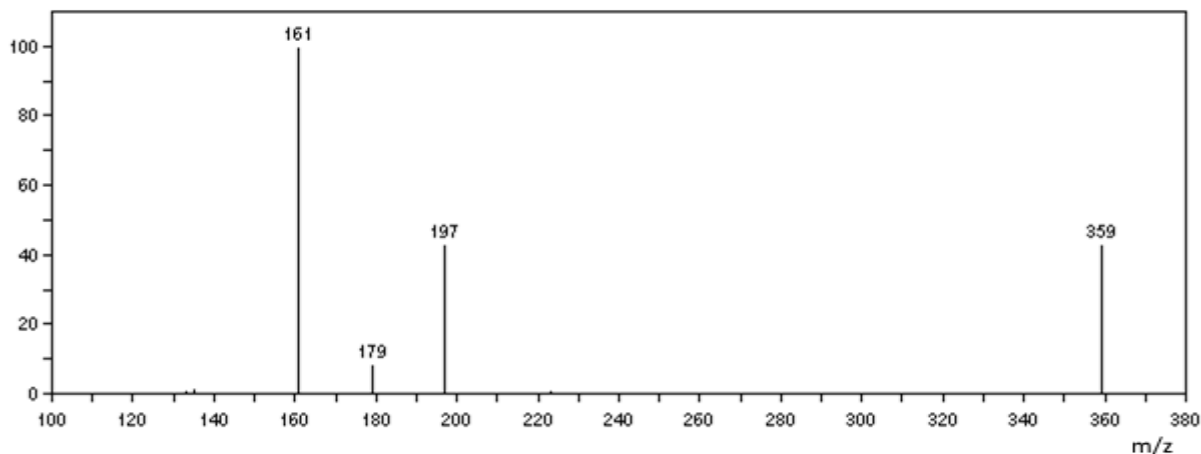
Pikovi sa m/z 179 i 197 nastaju cepanjem molekula ruzmarinske kiseline na sastavna jedinjenja, tj. na kafenu kiselinu i 3,4-dihidroksifenilmlečnu kiselinu (slika 108):



Slika 108. Cepanje molekula ruzmarinske kiseline

Logično objašnjenje za pik sa m/z 161 je da nastaje gubitkom vode kafene kiseline ($179 - \text{H}_2\text{O} = 161$).

Tokom dalje analize snimljen je MS/MS spektar ruzmarinske kiseline radi određivanja proizvoda fragmentacije (slika 109).



Slika 109. ESI-MS/MS spektar pika sa m/z 359

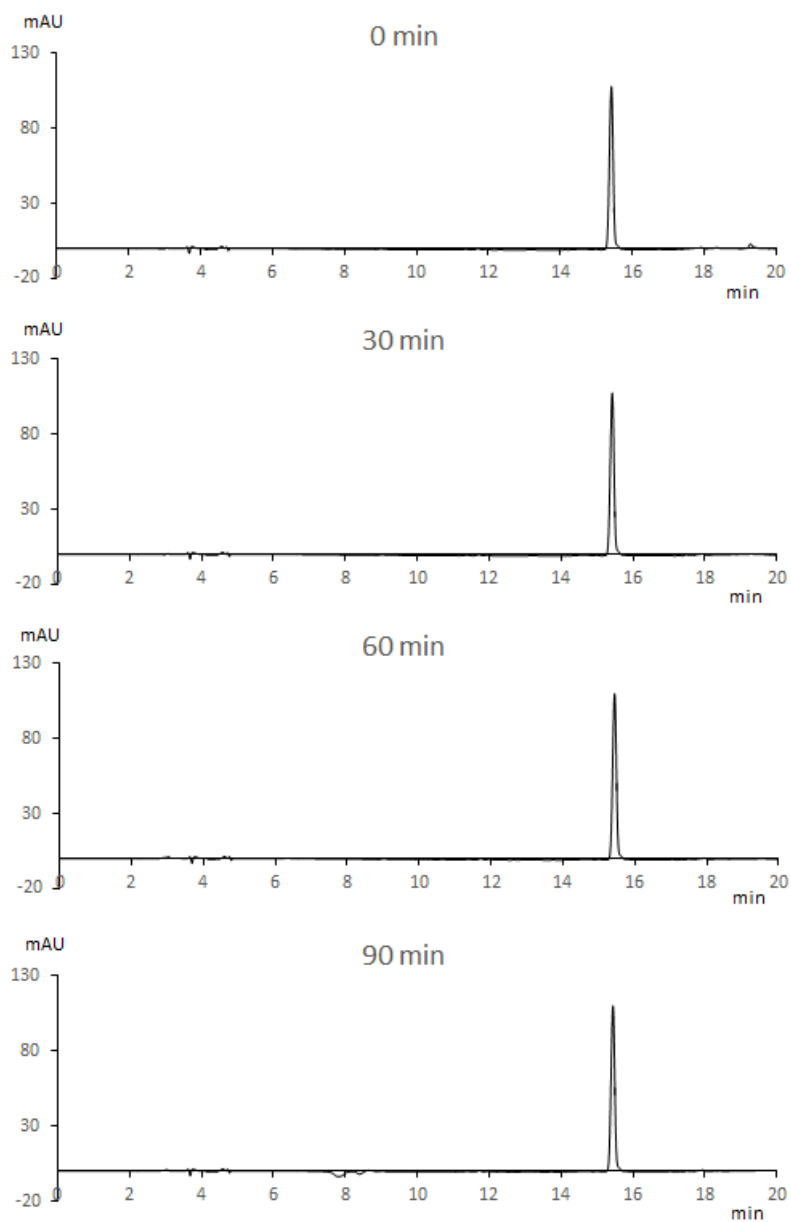
Ovom prilikom su, takođe, dobijeni pikovi sa m/z vrednostima 161, 179 i 197.

4.5.2. Autooksidacija ruzmarinske kiseline na pH 7,4

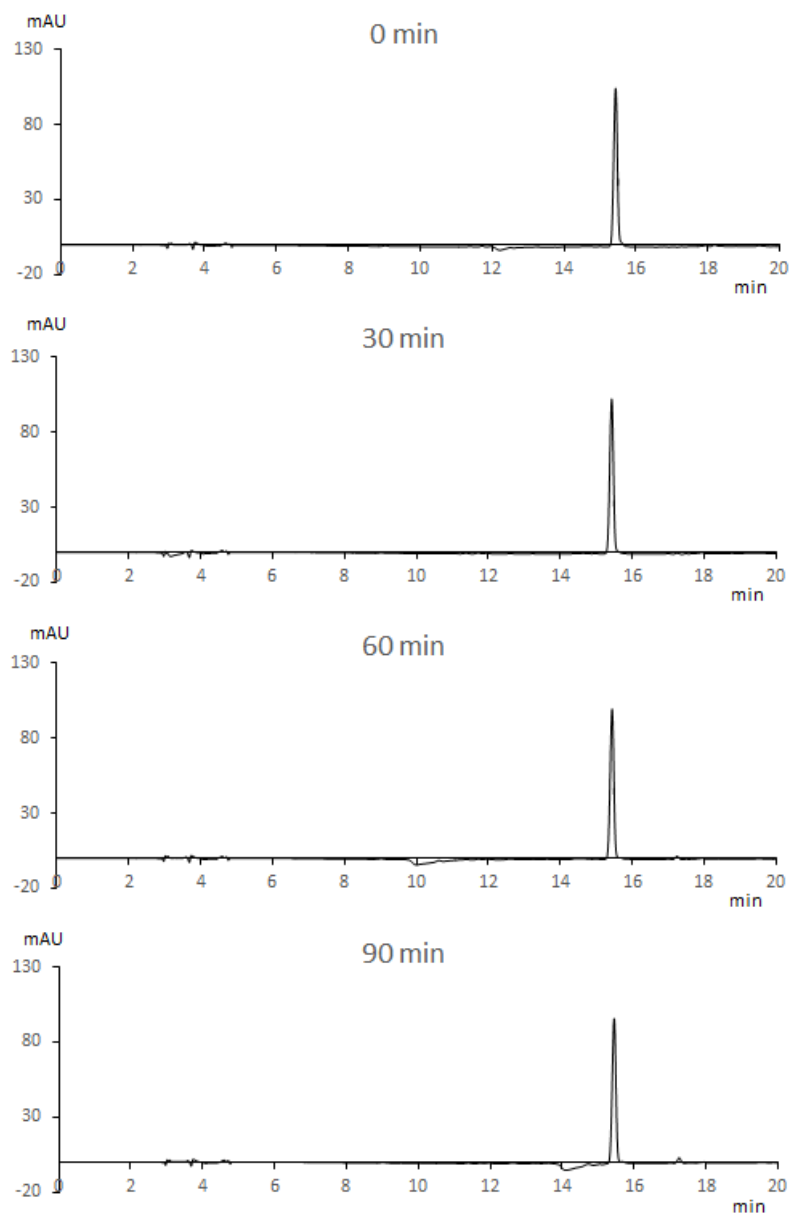
4.5.2.1. HPLC-DAD analiza

Na narednim slikama su prikazani hromatogrami snimani tokom 90 minuta autooksidacije ruzmarinske kiseline na pH 7,4 bez prisustva metalnih jona (slika 110), u prisustvu jona Mg(II) (slika 111) i jona Ca(II) (slika 112).

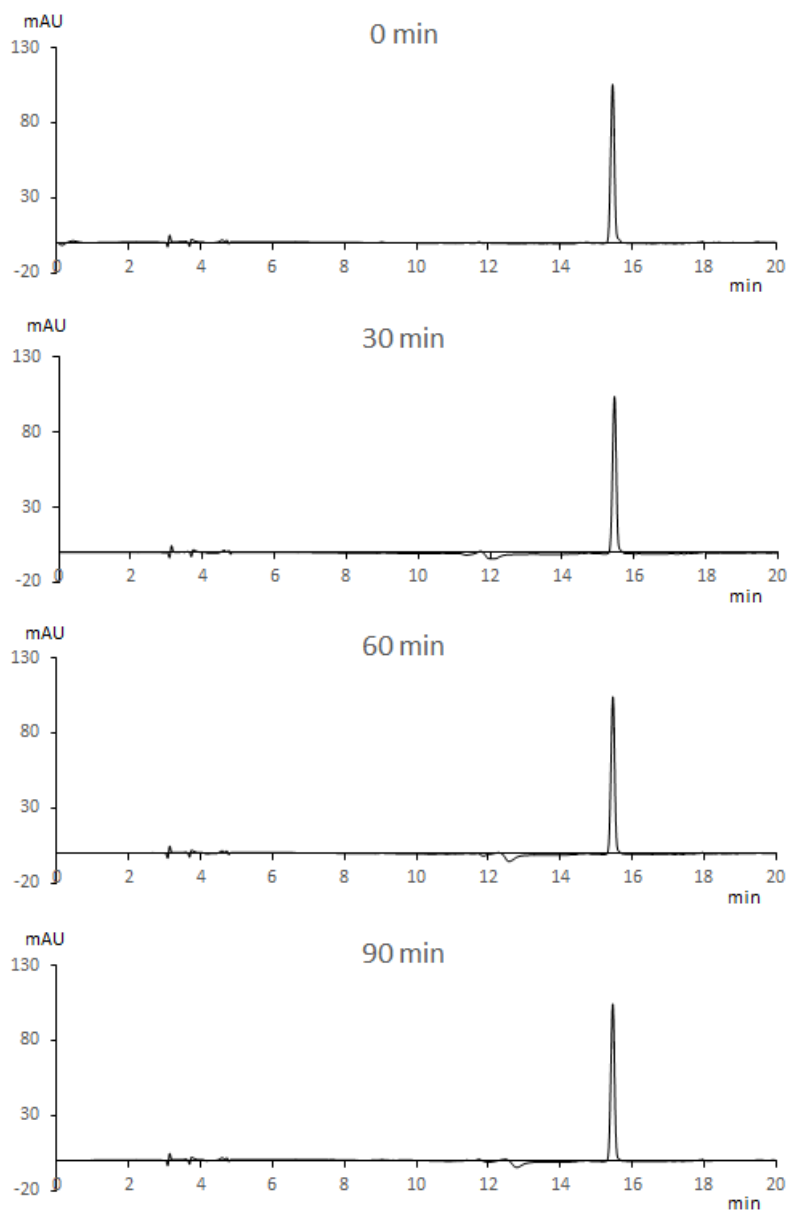
U sva tri sistema, hromatogrami koji prikazuju autooksidaciju ruzmarinske kiseline, otkrivaju prisustvo samo jednog pika, na retencionom vremenu 15,5 min, koji potiče od same ruzmarinske kiseline. Površina ovog pika neznatno opada tokom 90 minuta u rastvoru bez prisustva metalnih jona kao i u prisustvu Ca(II) jona (za oko 2%), dok je potrošnja ruzmarinske kiseline kada su prisutni Mg(II) joni nešto veća (oko 7%) (slika 113).



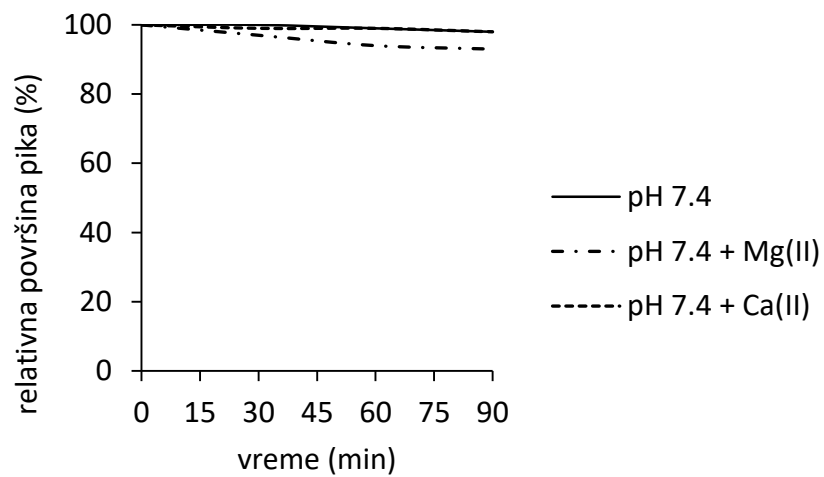
Slika 110. Hromatogrami snimljeni u toku autooksidacije ruzmarinske kiseline na pH 7,4 bez prisustva metalnih jona



Slika 111. Hromatogrami snimljeni u toku autooksidacije ruzmarinske kiseline na pH 7,4 u prisustvu Mg(II) jona



Slika 112. Hromatogrami snimljeni u toku autooksidacije ruzmarinske kiseline na pH 7,4 u prisustvu Ca(II) jona



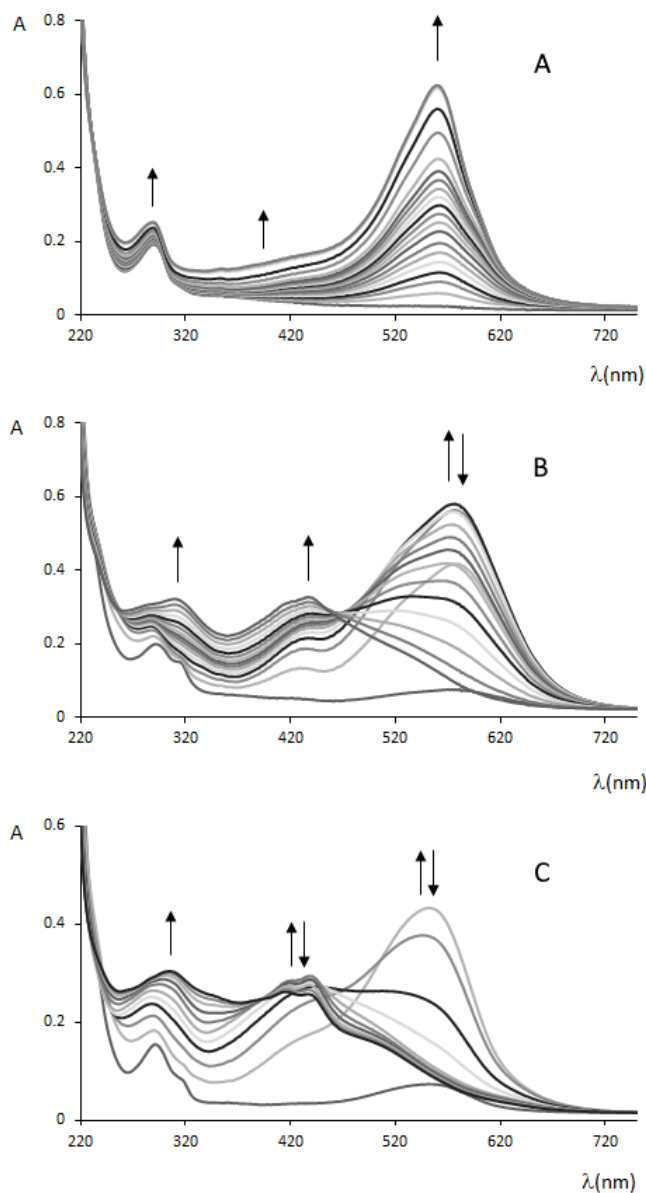
Slika 113. Potrošnja ruzmarinske kiseline tokom autooksidacije na pH 7,4 bez prisustva metalnih jona i u prisustvu metalnih jona

4.6. Hematoksilin

4.6.1. Autooksidacija hematoksilina na pH 8,4

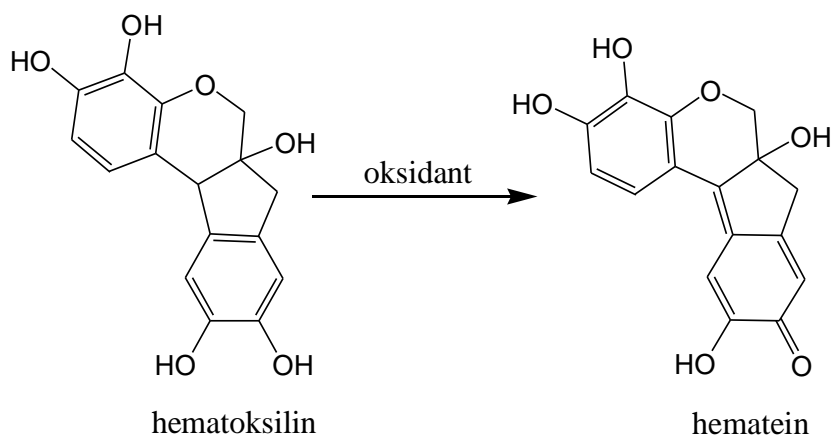
4.6.1.1. UV/Vis spektralna analiza

Na slici 114 su prikazani UV/Vis spektri snimljeni tokom autooksidacije hematoksilina u vodenom rastvoru na pH 8,4 u odsustvu metalnih jona, kao i u prisustvu Mg(II) i Ca(II) jona.



Slika 114. UV/Vis spektri snimljeni u toku autooksidacije hematoksilina na pH 8,4 bez prisustva metalnih jona (A), u prisustvu jona Mg(II) (B) i jona Ca(II) (C)

Sveže pripremljen vodeni rastvor hematoksilina pokazuje maksimum apsorpcije na 292 nm. Početak autooksidacije je jasno vidljiv u sva tri sistema, čak i kod prvog snimljenog spektra samo 10 sekundi nakon mešanja rastvora. Kada u reakcionoj smeši nisu prisutni metalni joni dolazi do konstantnog porasta apsorbanca u čitavom opsegu posmatranih talasnih dužina, uz pojavu intenzivnog apsorpcionog maksimuma na 560 nm, karakterističnog za monoanjon hemateina (Bettinger & Zimmermann 1991a), koji je, prema tome, prvi autooksidacioni proizvod hematoksilina (slika 115).



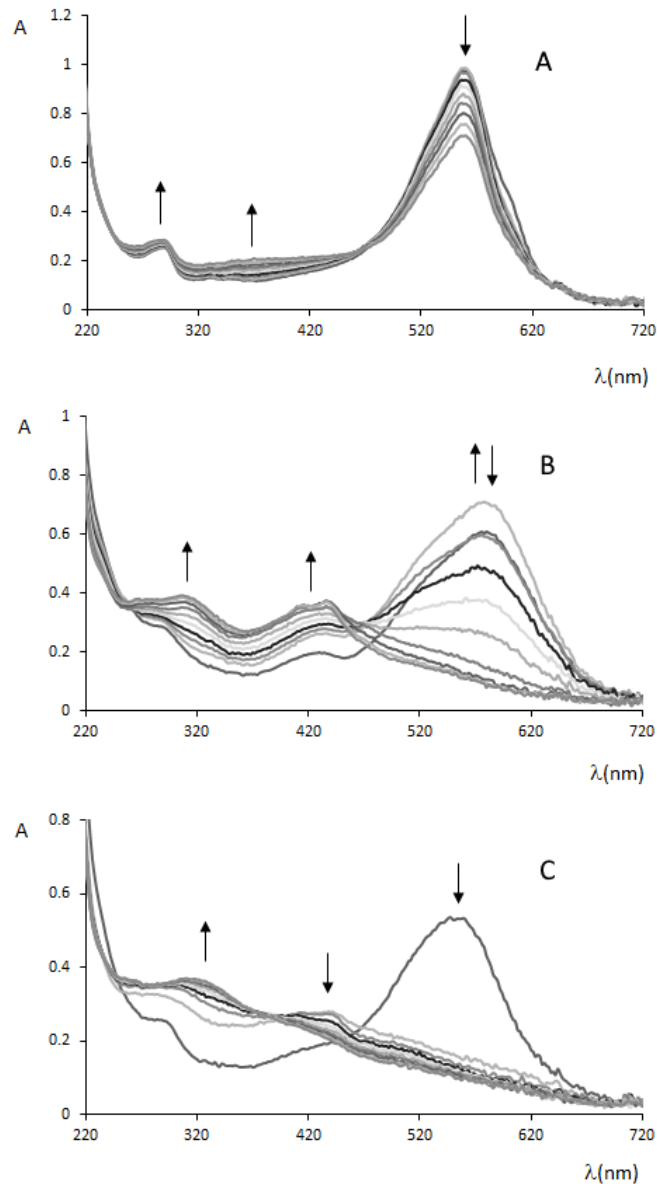
Slika 115. Oksidacija hematoksilina do hemateina

Očigledno da prisustvo metalnih jona, osim toga što dodatno ubrzava autooksidaciju hematoksilina, čini čitav proces kompleksnijim. Kada se u reakcionom sistemu uključe Mg(II) joni, glavna apsorpciona traka se pomera batohromno (u odnosu na sistem bez jona) pokazujući maksimum apsorpcije na 578 nm. Maksimalni intenzitet ovog pika se postiže za oko 2,5 min, posle čega dolazi do njegovog opadanja do kraja snimanja. Pored ovoga se uočavaju još dva maksimuma koja konstantno rastu. Prvi na 312 nm koji, najverovatnije, potiče od anjona hematoksilina, imajući u vidu njegove konstante kiselosti: $pK_{a1} = 4,7$ i $pK_{a2} = 9,6$ (Sokolová et al. 2010). Drugi maksimum na 440 nm se poklapa sa maksimumom apsorpcije hemateina (Bettinger & Zimmermann 1991a) koji se nalazi u ravnoteži sa svojim anjonom. Na osnovu prethodnog se može pretpostaviti da se u reakcionoj smesi nalaze najmanje tri jedinjenja.

U slučaju autooksidacije hematoksilina u prisustvu Ca(II) jona, situacija je još komplikovanija jer intenzitet srednje apsorpcione trake na 440 nm najpre raste a potom opada, uz naznake za pojavu novog maksimuma na 420 nm. Glavni apsorpcioni maksimum je pomeren na 550 nm i svoju maksimalnu vrednost dostiže veoma brzo, već za 1 minut, posle čega isto tako naglo i opada, dok se nova apsorpciona traka, koja konstantno raste, javlja na 305 nm. Takođe, ne

postoji jasno definisana izobestička tačka, tako da i ovu reakcionu smešu čini više od dva jedinjenja, a sudeći prema broju maksimuma od kojih svaki odgovara određenoj komponenti, može se pretpostaviti da ih ima tri ili četiri.

Radi potpunijeg razumevanja prethodnih relacija, pod istim uslovima kao što su praćene reakcije autooksidacije hematoksilina, urađena je autooksidacija hemateina (Hm) i snimljeni su odgovarajući UV/Vis spektri (slika 116).



Slika 116. UV/Vis spektri snimljeni u toku autooksidacije hemateina na pH 8,4 bez prisustva metalnih jona (A), u prisustvu jona Mg(II) (B) i jona Ca(II) (C)

Poređenjem dve slike (114 i 116) odmah se uočava izvanredna sličnost odgovarajućih spektara i poklapanje maksimuma apsorpcije glavnih apsorpcionih traka. Izvesne razlike postoje u smeru promene intenziteta apsorpcije, ali su one i očekivane. Tako, kod autooksidacije hematoksilina bez prisustva metalnih jona intenzitet glavne apsorpcione trake stalno raste, dok kod hemateina pod istim uslovima kontinuirano opada. Ovo je razumljivo pošto se autooksidacija hematoksilina odvija preko hemateina kao međuproizvoda, koji dalje podleže daljim oksidacionim promenama. Kako u prvom slučaju, zbog relativno male brzine reakcije autooksidacije hematoksilina, njegova oksidacija do hemateina (tj. njegovog anjona zbog alkalne sredine) još uvek traje, to je apsorpcioni maksimum na 560 nm (tipičan za anjon hemateina) u porastu. U drugom slučaju, autooksidacije hemateina, ova faza (očigledno) ne postoji, već hematein odmah podleže daljoj oksidaciji, smanjuje mu se koncentracija, odnosno opada intenzitet maksimuma na 560 nm od samog početka reakcije.

Iz sličnog razloga se razlikuje promena intenziteta apsorpcije kada se autooksidacija vrši u prisustvu Ca(II) jona, samo što se ovde promene odigravaju znatno brže. Zbog toga se kod hematoksilina samo u početku zapaža rast intenziteta druge i treće apsorpcione trake (kod kojih se i vidi razlika) dok se ne oksiduje do anjona hemateina, koji se potom dalje transformiše i intenzitet apsorpcije opada. Nasuprot tome, kod autooksidacije hemateina, opet nema početne faze oksidacije hematoksilina, već hematein od samog početka podleže oksidaciji, što se manifestuje kao pad intenziteta pomenutih apsorpcionih traka od starta autooksidacije. Kada je prisutan jon Mg(II), spektri snimljeni u toku autooksidacije hematoksilina i hemateina su najbliži zbog umerene brzine autooksidacije

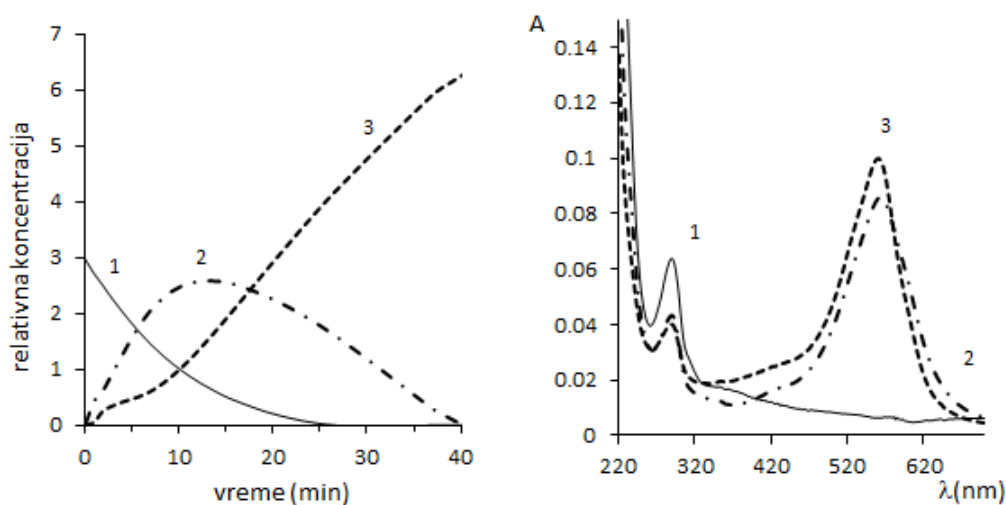
4.6.1.1.1. MCR-ALS obrada spektralnih podataka

U cilju provere prethodnih pretpostavki o broju prisutnih jedinjenja u reakcionim smešama, kao i dobijanja njihovih spektara, primenjena je MCR-ALS metoda, a rezultati kvaliteta takvog proračuna dati su u Tabeli 10.

Tabela 10. Finalni parametri MCR-ALS optimizacije kod hematoksilina

	pH 8,4	pH 8,4 + Mg(II)	pH 8,4 + Ca(II)
LOF% (PCA)	0,098282	0,66765	0,46096
LOF% (exp)	2,1908	4,2774	1,0776
r^2	99,952	99,817	99,9884

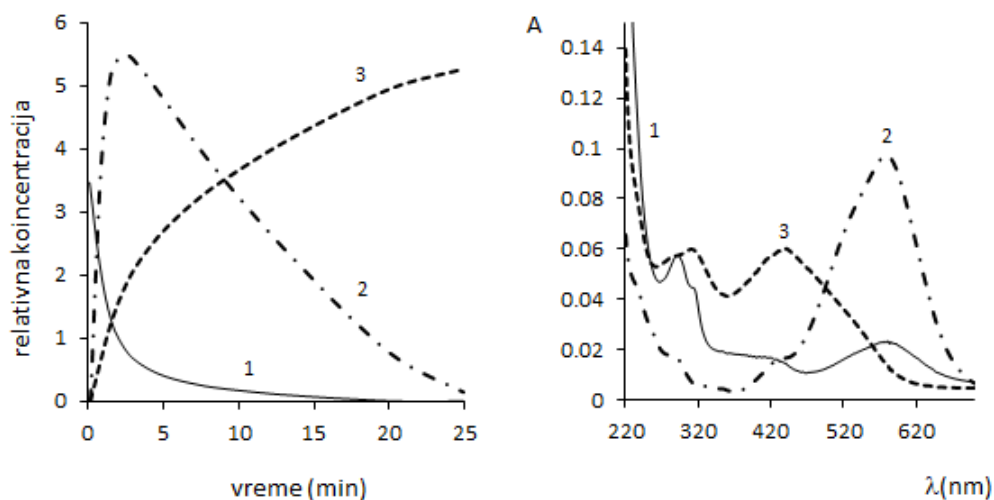
Slika 117 prikazuje rezultat MCR-ALS analize spektara autooksidacije hematoksilina u vodenom rastvoru na pH 8,4 kada nisu prisutni metalni joni.



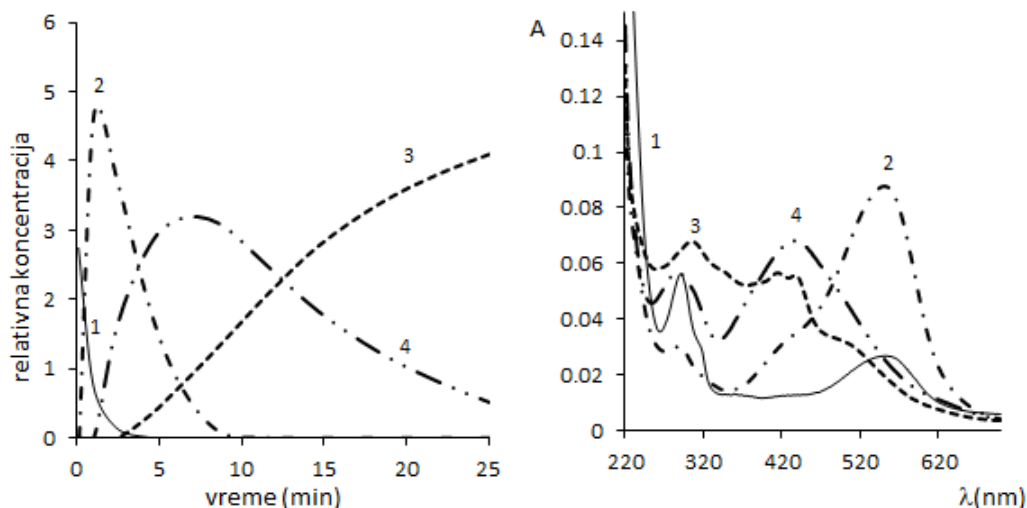
Slika 117. Koncentracijski profili (levo) i spektri čistih komponenti (desno) dobijeni primenom MCR-ALS metode na autooksidaciju hematoksilina na pH 8,4

Metoda MCR-ALS otkriva prisustvo tri apsorbujuće komponente. Koncentracija komponente 1 konstantno opada od početka reakcije i praktično nestaje iz sistema posle oko 25 minuta; očigledno to mora biti hematoksin. Koncentracija komponente 2 dostiže svoj maksimum posle 12,5 min, dok koncentracija komponente 3 stalno raste sve do 40 min reakcije. Poslednje dve komponente imaju slične UV/Vis spektre i mogu biti različiti oblici hemateina. U svakom slučaju su monoanijoni hemateina imajući u vidu njegovu konstantu kiselosti $pK_{a1} = 6,7$ tako da deprotonacija na pH 8,4 dovodi do batohromnog pomeranja glavne apsorpcione trake od 440 nm na 560 nm (Bettinger & Zimmermann 1991a). Jedan od monoanijona hemateina bi mogao biti oblik sa oksidovanim prstenom A, a drugi sa oksidovanim prstenom B, sudeći prema kompjuterskim proračunima molekularnog modelovanja korišćenjem teorije funkcionalne gustine (engl. Density Functional Theory, DFT) (Litvin et al. 2015).

U prisustvu kako Mg(II) (slika 118) tako i Ca(II) jona (slika 119) autooksidacija hematoksilina se odvija mnogo brže nego u odsustvu metalnih jona, što se može objasniti povećanjem disocijacije fenolnih hidroksilnih grupa u prisustvu dijamagnetnih metalnih jona (Lebedev et al. 2007).



Slika 118 Koncentracijski profili (levo) i spektri čistih komponenti (desno) dobijeni primenom MCR-ALS metode na autooksidaciju hematoksilina u prisustvu jona Mg(II) na pH 8,4



Slika 119 Koncentracijski profili (levo) i spektri čistih komponenti (desno) dobijeni primenom MCR-ALS metode na autooksidaciju hematoksilina u prisustvu jona Ca(II) na pH 8,4

U sistemu Htx-Mg(II) postoje tri, a u sistemu Htx-Ca(II) četiri apsorbujuće vrste prema rezultatima MCR-ALS analize. UV-Vis spektri prve dve komponente 1 i 2 u oba sistema su slični i verovatno potiču od metalnih kompleksa sa hematoksilinom i hemateinom. Zaista, UV/Vis spektar komponente 2 u oba sistema ima mnogo sličnosti sa kompleksom hematein-Al(III) (Bettinger & Zimmermann 1991b). U oba sistema koncentracija komponente 1 neprekidno opada od početka reakcije i dostiže nultu vrednost posle 20 min u sistemu Htx-Mg(II), odnosno posle 4,5 min u sistemu Htx-Ca(II). Koncentracija komponente 2 u početku raste dostižući svoj maksimum posle 2,5 min u sistemu Htx-Mg(II), i posle svega 1 min u

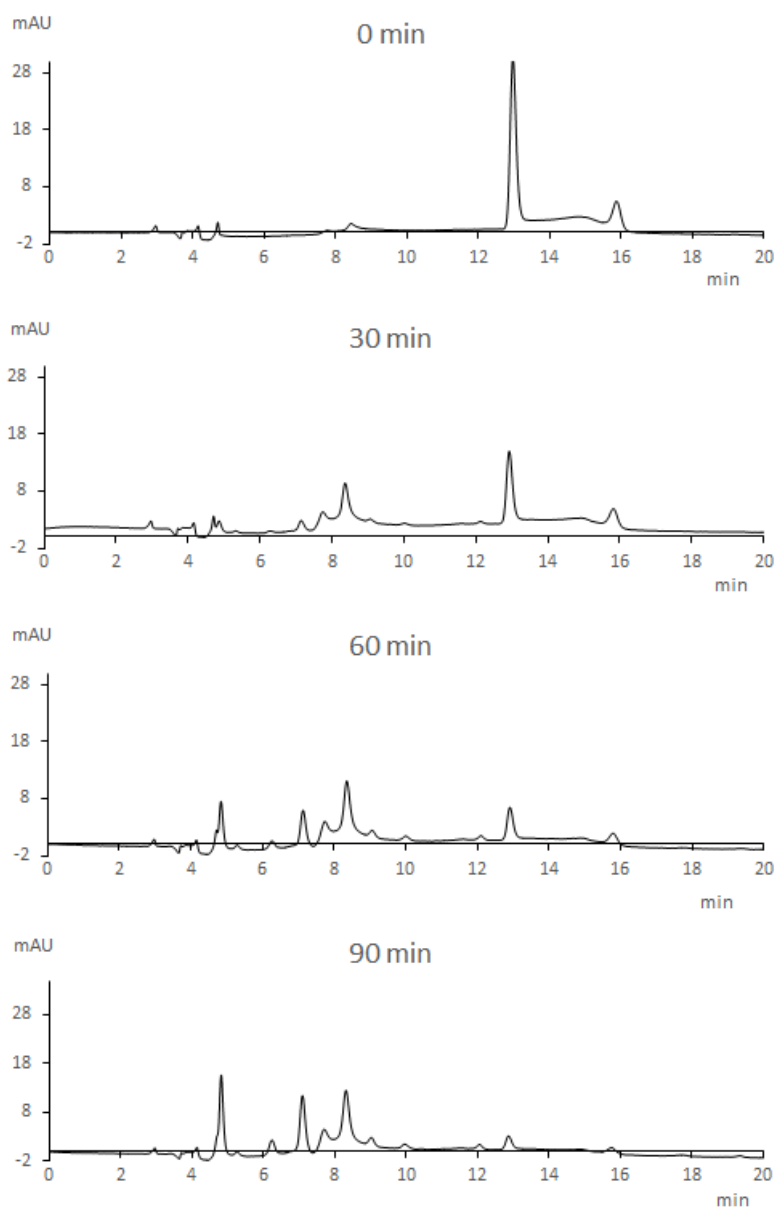
sistemu Htx-Ca(II). Takođe, ova komponenta nestaje iz sistema Htx-Ca(II) posle 11,5 min dok u sistemu Htx-Mg(II) postoji neznatna količina čak i posle 25 min autooksidacije. Komponenta 3 ima slične UV/Vis spektre u oba sistema i može ukazivati na formiranje dimera hematoksilina kao sledećeg koraka u procesu autooksidacije (Samide et al. 2013, Zare & Nasirizadeh 2011). Njena koncentracija stalno raste u sistemu Htx-Mg(II), dok u sistemu Htx-Ca(II) dostiže svoj maksimum posle 6,5 min posle čega počinje da opada. MCR-ALS metoda otkriva postojanje i komponente 4, ali samo u sistemu Htx-Ca(II), sa koncentracijom u stalnom porastu. Ona bi mogla biti pokazatelj dalje oligomerizacije i polimerizacije hematoksilina u ovom sistemu.

Rezultati MCR-ALS analize jasno pokazuju da autooksidacija hematoksilina teče mnogo brže u Htx-Ca(II) nego u Htx-Mg(II) sistemu, mada su početni autooksidacioni proizvodi, verovatno, isti u oba sistema. Ovakva razlika u brzini autooksidacije se može objasniti različitom jačinom interakcije hematoksilin-metal. Jon Mg(II) ima viši jonski potencijal (odnos: naelektrisanje/jonski prečnik) u poređenju sa jonom Ca(II) što prouzrokuje veću energiju veze kompleksa metal-ligand. Primera radi, energija veze kompleksa horminona je za 50% veća za Mg(II) nego za Ca(II) jon (Nicolás & Castro 2006). Posledica ovoga je da Mg(II) jon pokazuje mnogo izraženiji stabilizirajući efekat na hematoksilin i početne proizvode autooksidacije i time usporava njihove dalje transformacije.

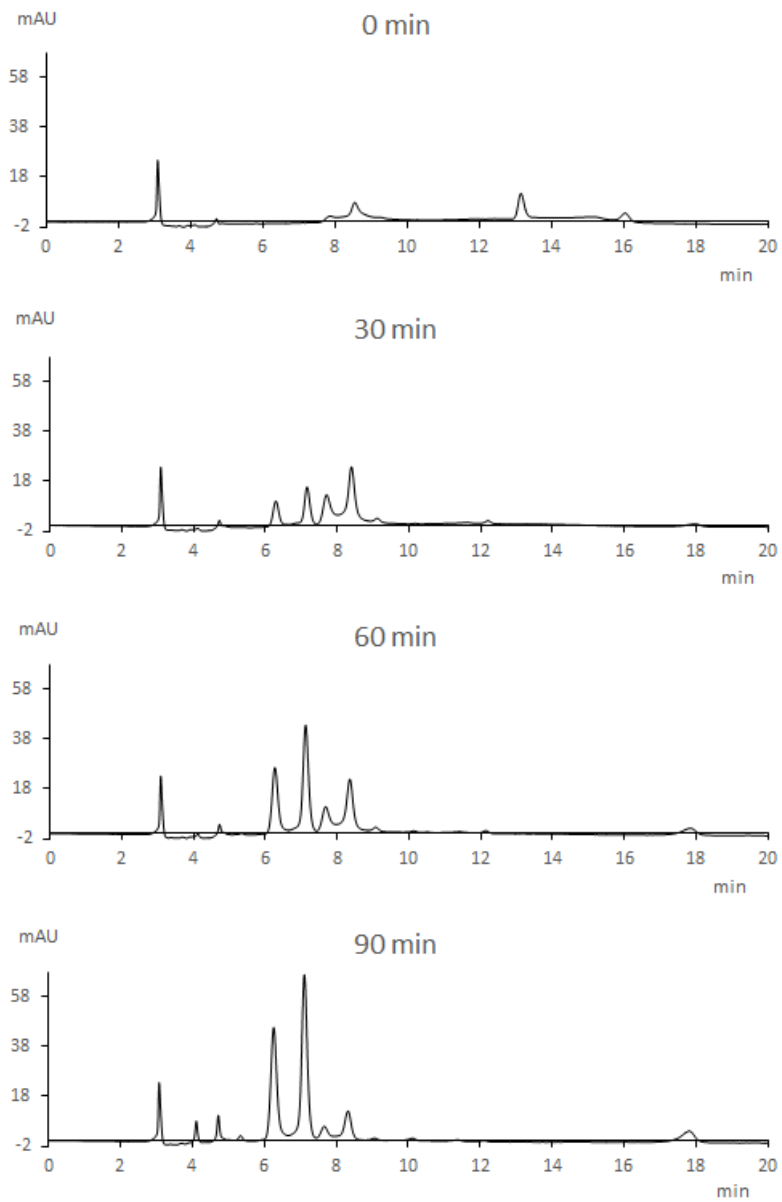
4.6.1.2. HPLC-DAD analiza

Na narednim slikama su predstavljeni hromatogrami snimani tokom 90 minuta autooksidacije hematoksilina na pH 8,4 bez prisustva metalnih jona (slika 120), u prisustvu jona Mg(II) (slika 121) i jona Ca(II) (slika 122).

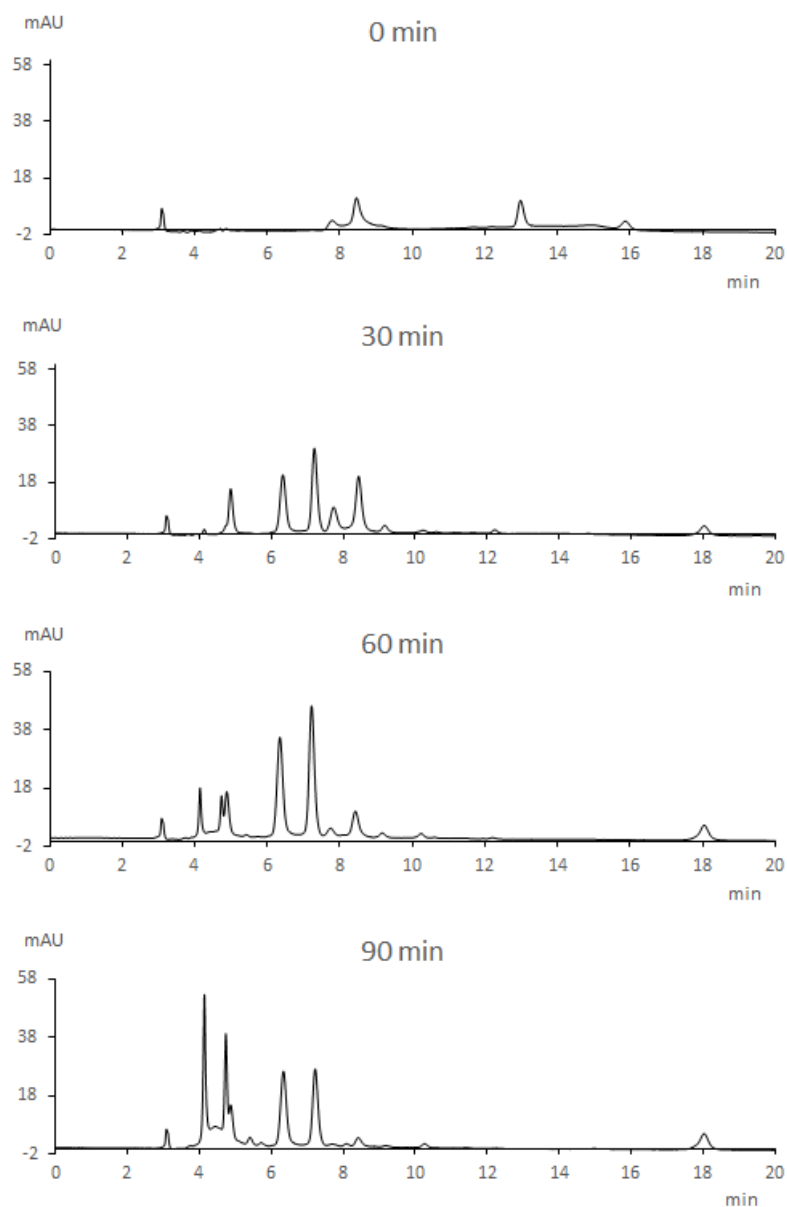
Retenciono vreme hematoksilina od 13,0 min je utvrđeno snimanjem rastvora standarda (hromatogram nije prikazan). Kao posledica trošenja hematoksilina tokom reakcije autooksidacije, intenzitet ovog pika opada sa vremenom u sva tri sistema. Dok je ova potrošnja u sistemu bez metalnih jona relativno spora tako da se pik hematoksilina uočava i na poslednjem hromatogramu (90 min autooksidacije), dotle u sistemima sa metalnim jonima hematoksilin nestaje iz reakcione smeše već u prvih 30 min.



Slika 120. Hromatogrami snimljeni u toku autooksidacije hematoksilina na pH 8,4 bez prisustva metalnih jona



Slika 121. Hromatogrami snimljeni u toku autooksidacije hematoksilina na pH 8,4 u prisustvu Mg(II) jona

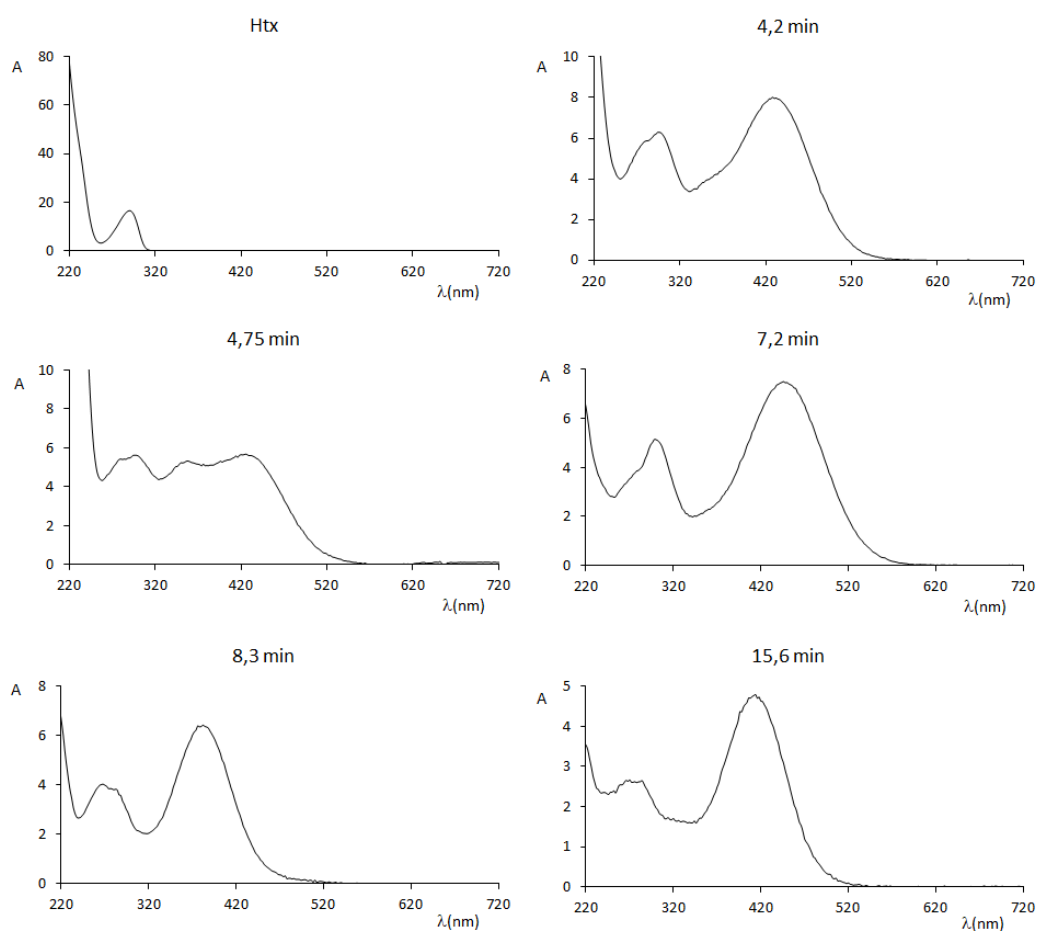


Slika 122. Hromatogrami snimljeni u toku autooksidacije hematoksilina na pH 8,4 u prisustvu Ca(II) jona

Pored hematoksilina, u sva tri sistema se pojavljuju još četiri značajna pika sa retencionim vremenima 6,3 min, 7,2 min, 7,7 min i 8,3 min. U sistemu bez prisustva metalnih jona njihove naznake se uočavaju posle prvih 30 min reakcije autooksidacije, a njihov intenzitet neprekidno raste sa vremenom. Kada se u reakciju uključe metalni joni situacija postaje nešto drugačija. Već na samom početku reakcije autooksidacije, pored hematoksilina uočava se pik sa RT 8,3 min, čiji intenzitet, najpre nezatno raste, da bi posle 60 min nestao sa hromatograma (odnosno iz reakcione smeše). U prvih 30 min reakcije pojavljuje se i pik sa RT 7,2 min koji vremenom

gubi na intenzitetu, ali ne u istoj meri; u sistemu Htx-Mg(II) njegovo smanjivanje je sporije nego u sistemu Htx-Ca(II). Pored navedena tri pika, karakteristična za sva tri sistema, samo u prisustvu metalnih jona vidljivi su i pikovi sa retencionim vremenima 4,2 min, 4,75 min i 15,6 min. Intenzitet prva dva stalno raste sa vremenom, dok ponašanje trećeg zavisi od vrste metalnog jona prisutnog u reakcionoj smeši; u sistemu Htx-Mg(II) njegov intenzitet je, gotovo, nepromenljiv sa vremenom, dok u sistemu Htx-Ca(II) konstantno opada.

Potpunije informacije o proizvodima reakcije autooksidacije hematoksilina daju i njihovi UV/Vis spektri snimani tokom hromatografske analize (slika 123).



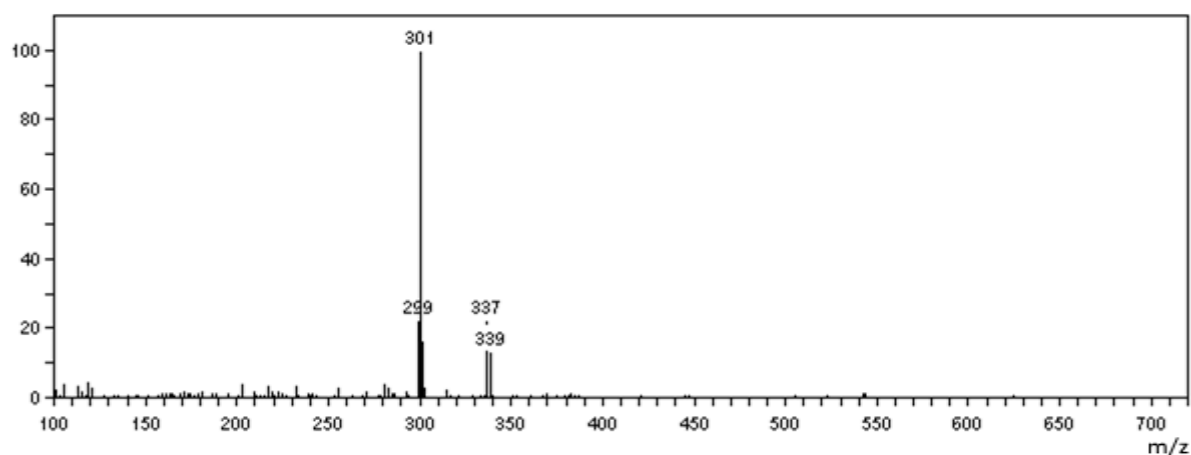
Slika 123. DAD UV/Vis spektri jedinjenja ekstrahovani iz hromatograma

Prema prethodno navedenim informacijama pokušana je identifikacija jedinjenja sa hromatograma. Najpre, pošto se jedinjenja sa RT 4,2 min i 4,75 min pojavljuju samo u slučaju

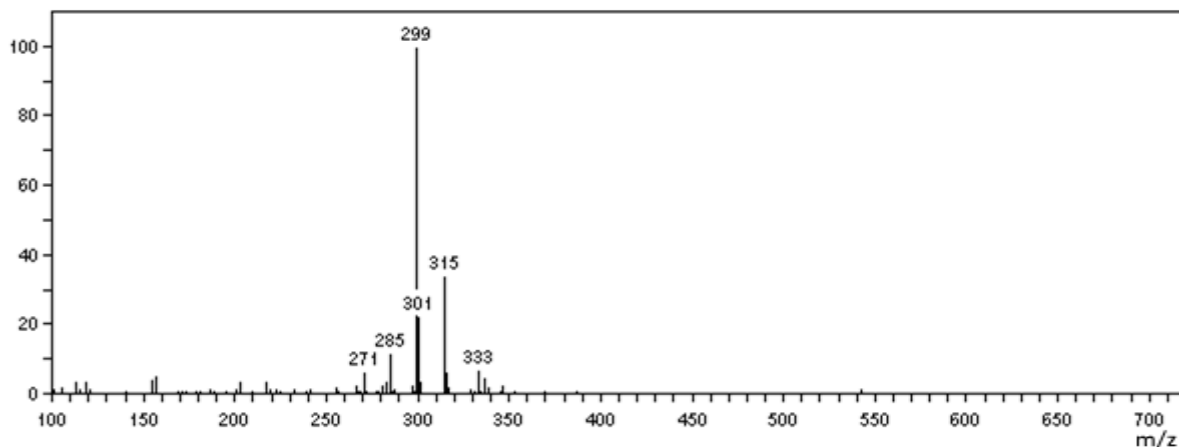
autooksidacije u prisustvu metalnih jona i to ne na samom početku reakcije, ona su, po svemu sudeći, metalni kompleksi hemateina. Jedinjenje sa RT 15,6 min je jedino koje ima veće RT od hematoksilina, što znači da je najmanje polarno. Imajući u vidu podatak da polimerizacija smanjuje polarnost i uzimajući u obzir njegov UV/Vis spektar sa slike 123, može se pretpostaviti da se radi o dimeru hematoksilina ili, verovatnije, hemateina. Jedinjenje sa RT 8,3 min je prvi proizvod autooksidacije hematoksilina u sva tri sistema, tako da mora biti hematein. Preostalo jedinjenje sa RT 7,2 min ima UV/Vis spektar sa batohromno pomerenim maksimumom apsorpcije u odnosu na hematein (slika 123). Ovo navodi na zaključak da je kod tog jedinjenja došlo do produžene delokalizacije elektrona, ili uvođenja nove hromofore, kao što je atom kiseonika sa slobodnim elektronskim parovima.

4.6.1.3. ESI-MS analiza

Autooksidacija hematoksilina je, dalje, proučavana tehnikom masene spektrometrije radi dobijanja potpunijih informacija o nastalim proizvodima. Na samom početku reakcije (slika 124) dominira pik sa m/z 301 koji odgovara hematoksilinu $[\text{Htx} - \text{H}]^-$, a pored njega je vidljiv i dvostruko hidratizirani hematoksilin sa m/z 337 $[\text{Htx} - \text{H} + 2\text{H}_2\text{O}]^-$.

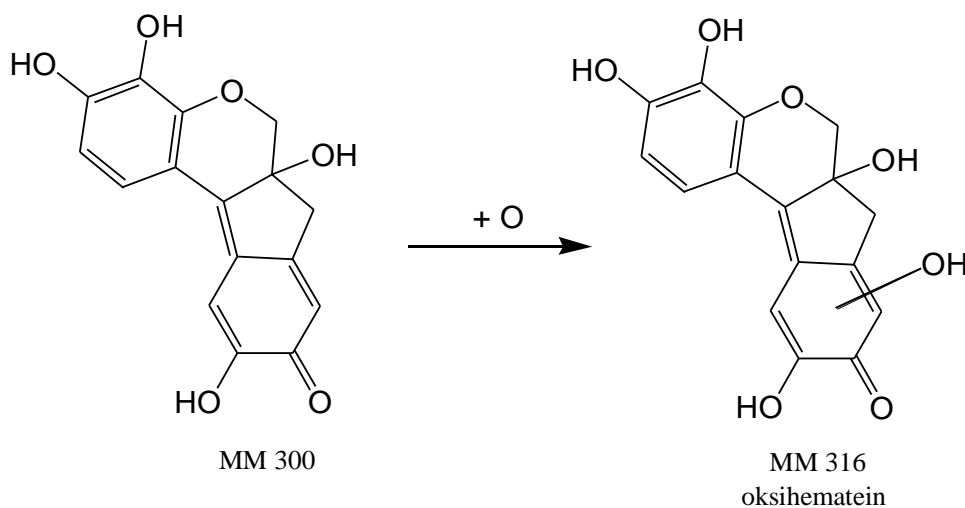


Slika 124. ESI-MS spektar vodenog rastvora hematoksilina na pH 8,4.
Vreme autooksidacije 0 min



Slika 125. ESI-MS spektar vodenog rastvora hematoksilina na pH 8,4.
Vreme autooksidacije 1 sat

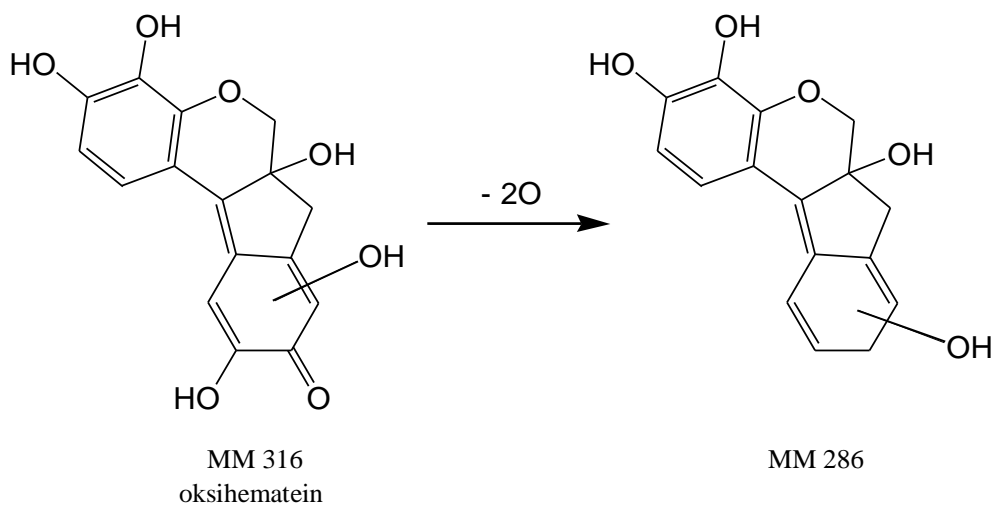
Tokom prvog sata reakcije autooksidacije (slika 125) umesto hematoksilina najzastupljeniji postaje hematein sa m/z 299, $[\text{Hm} - \text{H}]^-$, što je u skladu sa svim dosadašnjim pretpostavkama. Drugi po intenzitetu je pik sa m/z 315 (sa preko 30% relativne zastupljenosti), za koji se osnovano može pretpostaviti da potiče od oksihemateina (Marshall & Horobin 1972, Sokolová et al. 2010), koji nastaje oksigenacijom hemateina. Korišćeni eksperimentalni uslovi ne dozvoljavaju da se odredi tačan položaj oksigenacije, ali je pretpostavka da se kiseonik veže za jedan od dva atoma ugljenika koji pripadaju prstenu A hemateina (slika 126).



Slika 126. Predložena oksigenacija hemateina

Istovremeno postaju vidljivi i pikovi sa m/z 285 i 333. Tokom reakcije autooksidacije hematoksilina, verovatno dolazi i do suprotnog procesa u odnosu na prethodno opisano

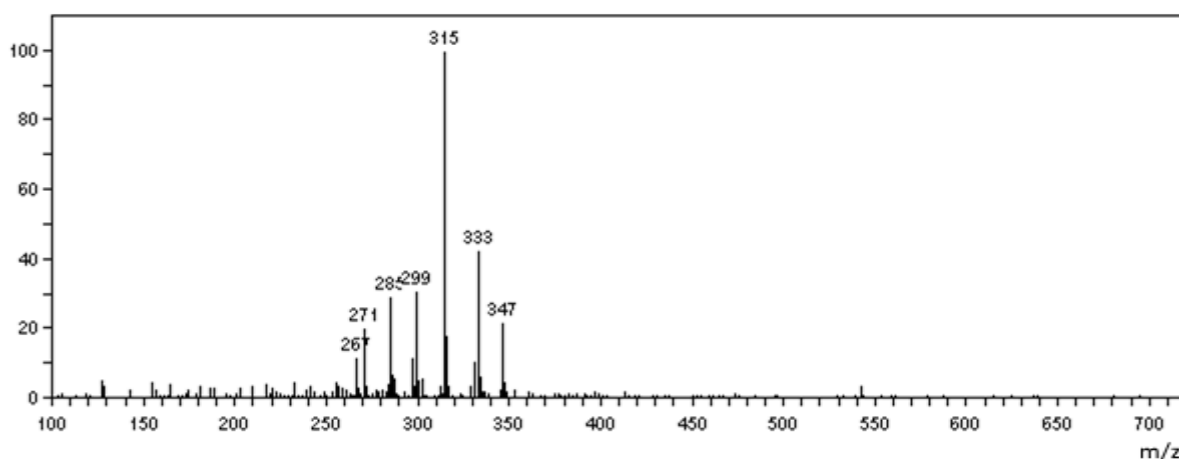
oksisigenaciju, tj. do deoksisigenacije (Ishii et al. 2012), pri čemu nagrađeni oksihematein ostaje bez dva atoma kiseonika, dajući jedinjenje molekulske mase 286 Da, od koga potiče pik sa m/z 285 (slika 127).



Slika 127. Predložena deoksisigenacija oksihemateina

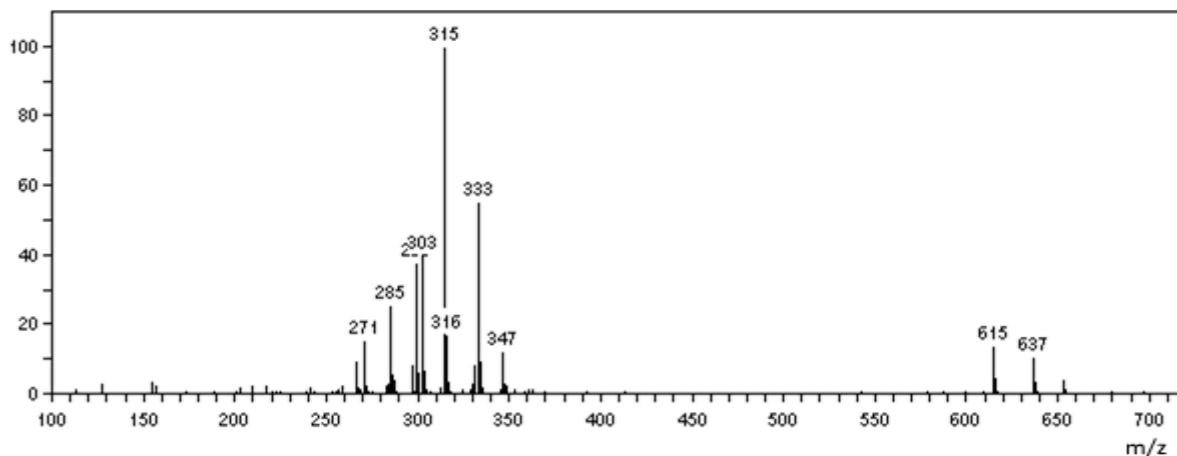
Što se pika sa m/z 333 tiče, logična pretpostavka je da najverovatnije potiče od hidratisanog oksihemateina $[316 + \text{H}_2\text{O} - \text{H}]^-$.

U narednom periodu nakon jednog dana (slika 128), pik sa m/z 315 postaje dominantan u masenom spektru, dok će sadržaj hemateina, usled daljih transformacija, opasti. Na intenzitetu dobijaju već pomenuti pikovi sa m/z 285 (29%) i 333 (43%), a uočavaju se i novi pikovi sa m/z 271 (20%) i 347 (21,5%).



Slika 128. ESI-MS spektar vodenog rastvora hematoksilina na pH 8,4.
Vreme autooksidacije 1 dan

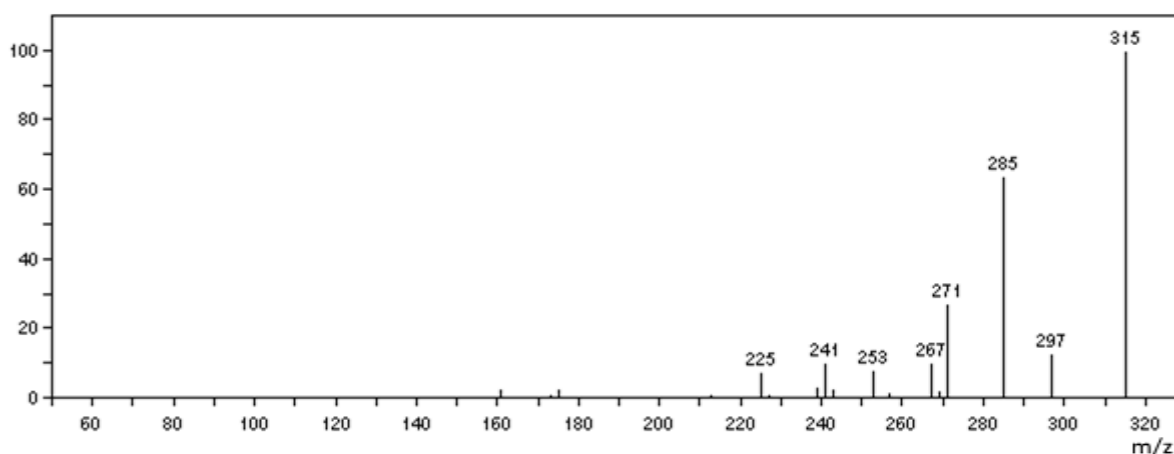
Nakon drugog dana od početka reakcije autooksidacije hematoksilina (slika 129), pored već pomenutih, vidljiv je i pik sa m/z vrednošću 303 (40%), te u delu viših masa onaj sa m/z 615 (14%).



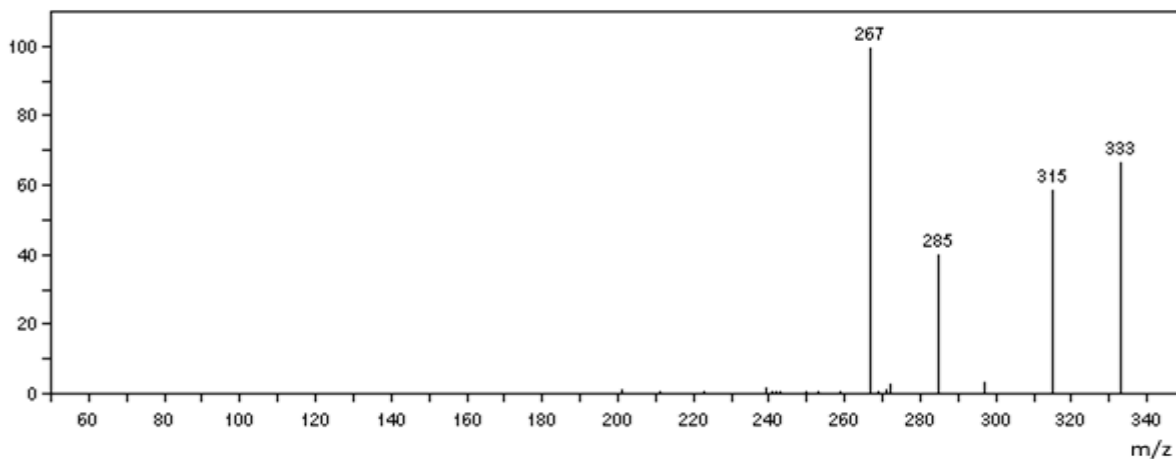
*Slika 129. ESI-MS spektar vodenog rastvora hematoksilina na pH 8,4.
Vreme autooksidacije 2 dana*

U nastavku je primenjena MS/MS fragmentacija karakterističnih pikova radi njihove potpunije analize.

Na slici 130 je prikazan MS/MS spektar jona sa m/z 315 koji fragmentacijom daje glavni proizvod sa m/z 285, što potvrđuje navedenu pretpostavku o deoksigenaciji oksihemateina koja je prikazana na slici 127.

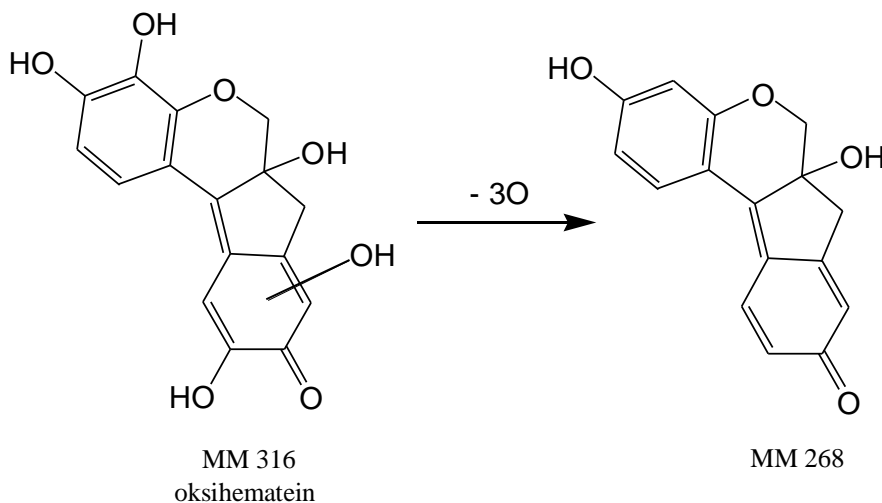


Slika 130. ESI-MS/MS spektar jona sa m/z 315



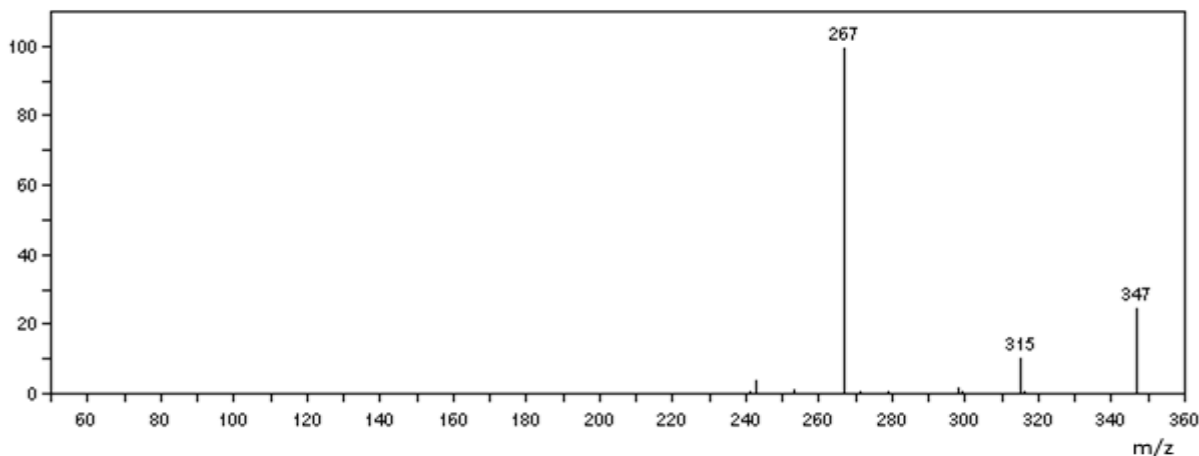
Slika 131. ESI-MS/MS spektar jona sa m/z 333

Na MS/MS spektru jona sa m/z 333, koji je prikazan na slici 131, vide se tri proizvoda njegove fragmentacije sa m/z vrednostima 315, 285, 267. Može se zaključiti da dehidracijom jona kome odgovara pik sa m/z 333 nastaje oksihematein sa m/z 315 ($333 - \text{H}_2\text{O} = 315$), koji, na već opisani način, gubitkom dva atoma kiseonika, daje m/z 285. Ucelini gledano, uklanjanjem tri atoma kiseonika iz oksihemateina dobija se jedinjenje molekulske mase 268 sa m/z vrednošću 267 za odgovarajući jon (slika 132):



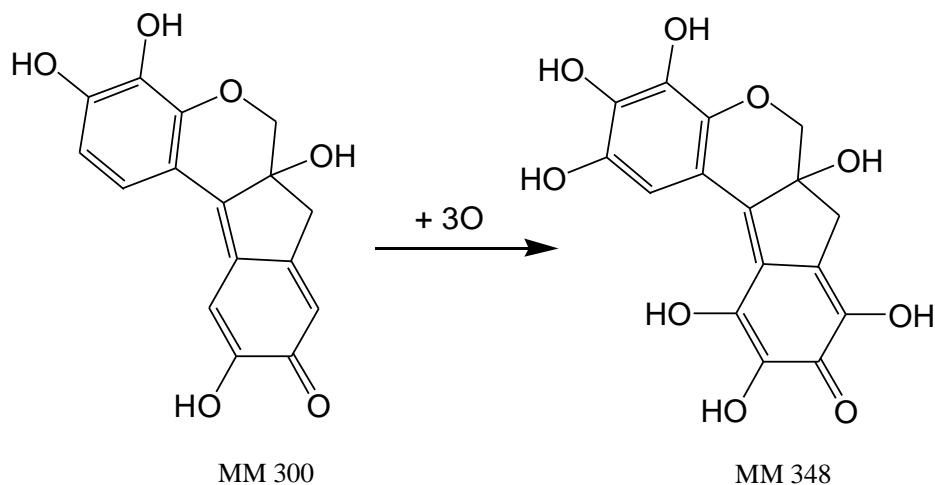
Slika 132. Moguće nastajanje jedinjenja kome odgovara pik sa m/z 267

Na slici 133, koja predstavlja MS/MS spektar jona sa m/z vrednošću 347, zapažaju se fragmenti koji su karakteristični za čitav tok autooksidacije hematoksilina, kao i za prethodno opisane fragmentacije.



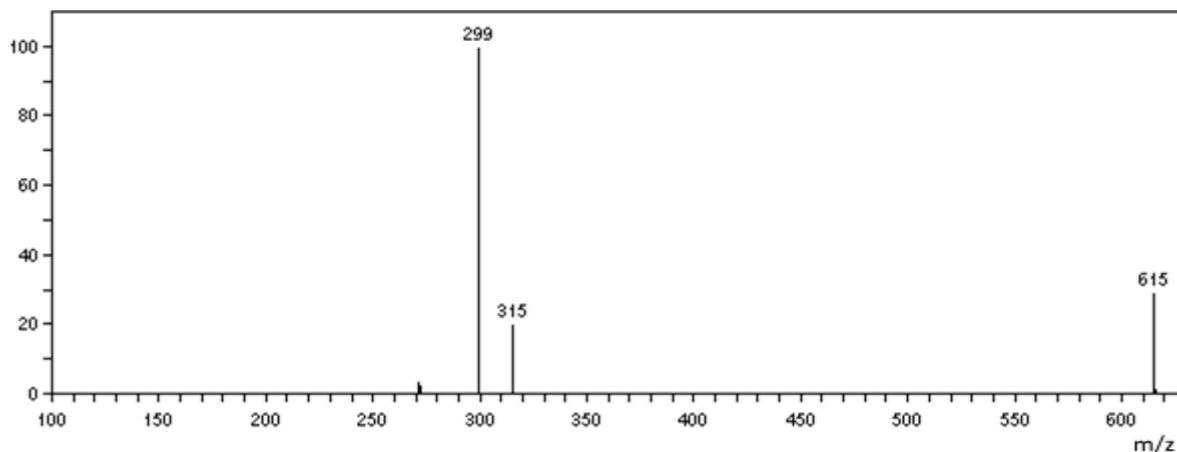
Slika 133 ESI-MS/MS spektar jona sa m/z 347

Pored već prikazane povezanosti jedinjenja sa MM 268 i 316 Da, može se zaključiti da su jedinjenja sa MM 316 i 348 Da takođe strukturno povezana, a iz razlike njihovih masa, $348 - 316 = 32$, pretpostaviti da tu razliku čine dva atoma kiseonika. Zaključak bi bio da jedinjenje sa MM 348 nastaje kada se za molekul hemateina tokom autooksidacije vežu tri atoma kiseonika (slika 134):



Slika 134. Moguće nastajanje jedinjenja kome odgovara pik sa m/z 347

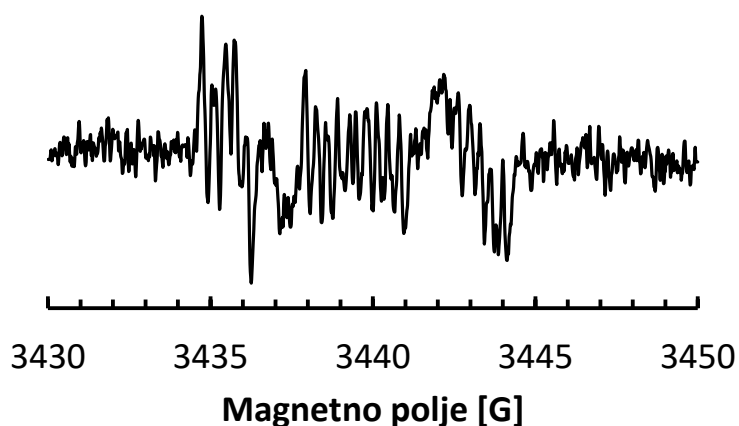
Na kraju, fragmentacijom jona sa m/z 615 dobijaju se dva jedinjenja, oksihematein (m/z 315) i hematein (m/z 299) (slika 135). Na osnovu ovoga, logično je pretpostaviti da jedinjenje čija je MM 616 Da predstavlja hidratizani dimer hemateina, $300 \times 2 - 2 + 18 = 616$.



Slika 135. ESI-MS/MS spektar jona sa m/z 615

4.6.1.4. ESR analiza

Na slici 136 je prikazan ESR spektar snimljen nakon 15 minuta autooksidacije hematoksilina na pH 8,4 u prisustvu Mg(II) jona.



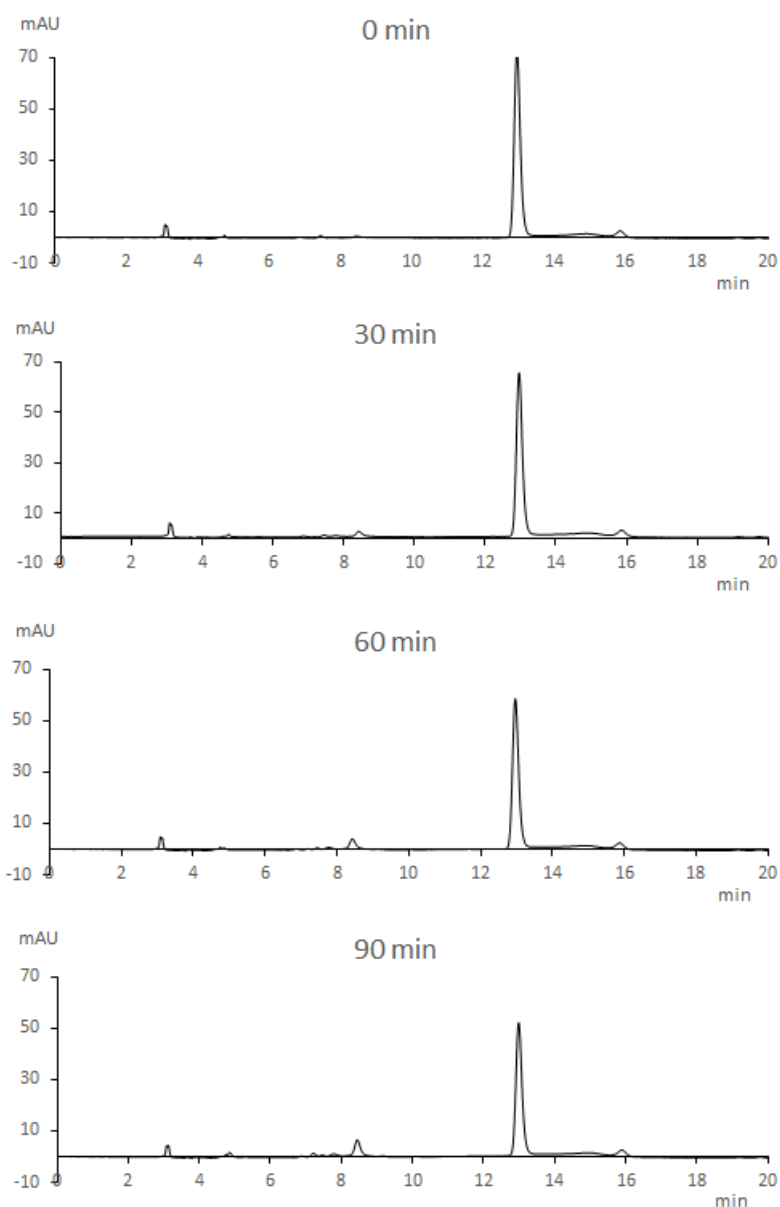
Slika 136. ESR spektar hematoksilina posle 15 min autooksidacije na pH 8,4 u prisustvu Mg(II) jona

Asimetričan raspored linija u prikazanom ESR spektru ukazuje na prisustvo većeg broja različitih slobodnoradikalskih vrsta. Loš odnos signal/šum i veliki broj signala koji se međusobno preklapaju onemogućava pouzdanu kompjuterska simulaciju ovog ESR spektara, ali je očigledno da su interakcije u ovom sistemu mnogo kompleksnije nego kod prethodnih jedinjenja. To proizilazi iz strukture samog hematoksilina koji poseduje dve kateholne grupe, a u skladu je sa rezultatima koji su dobijeni drugim metodama korišćenim u ovom radu.

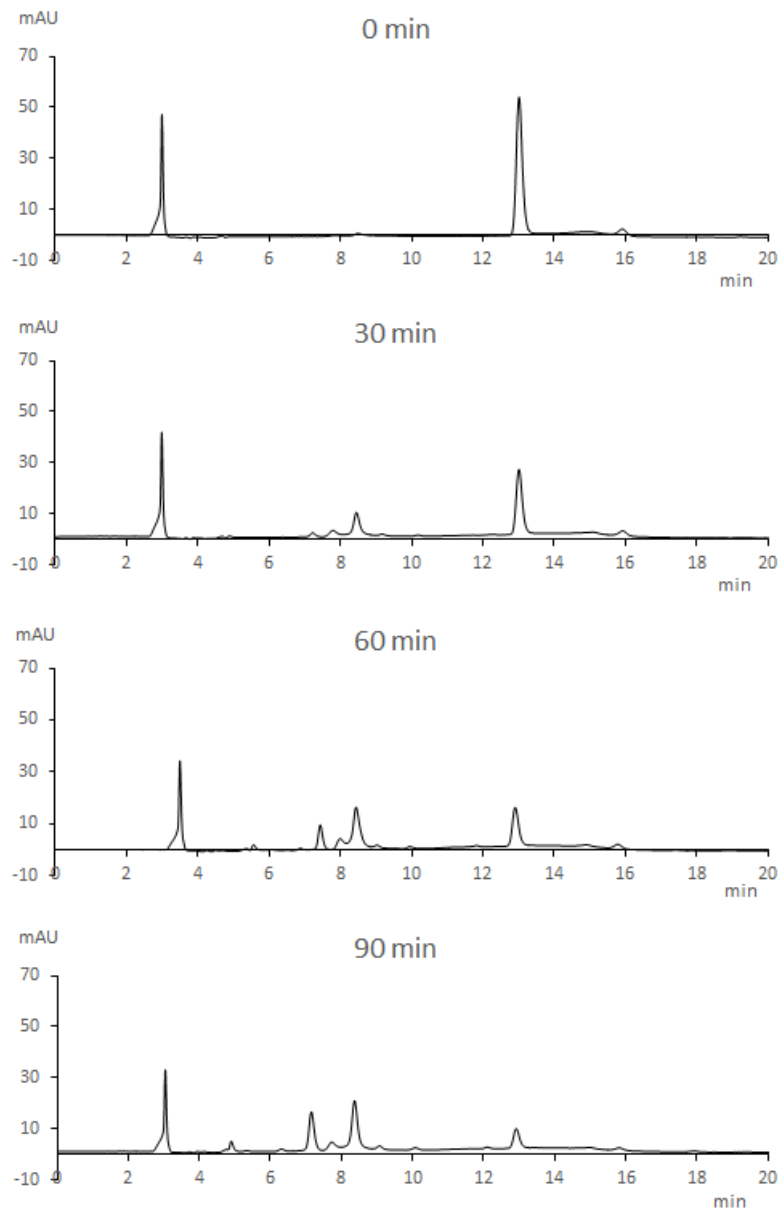
4.6.2. Autooksidacija hematoksilina na pH 7,4

4.6.2.1. HPLC-DAD analiza

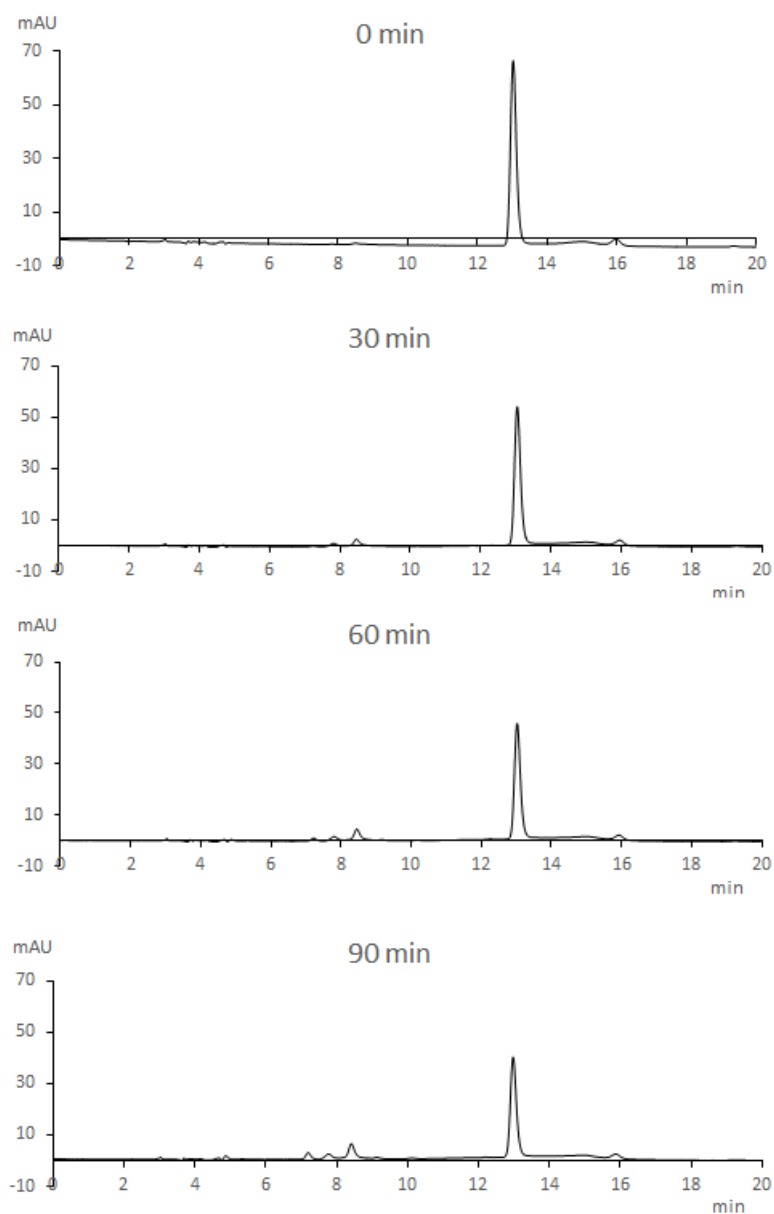
Sledeće tri slike predstavljaju hromatograme snimane tokom 90 minuta autooksidacije hematoksilina na pH 7,4 bez prisustva metalnih jona (slika 137), u prisustvu jona Mg(II) (slika 138) i jona Ca(II) (slika 139).



Slika 137. Hromatogrami snimljeni u toku autooksidacije hematoksilina na pH 7,4 bez prisustva metalnih jona

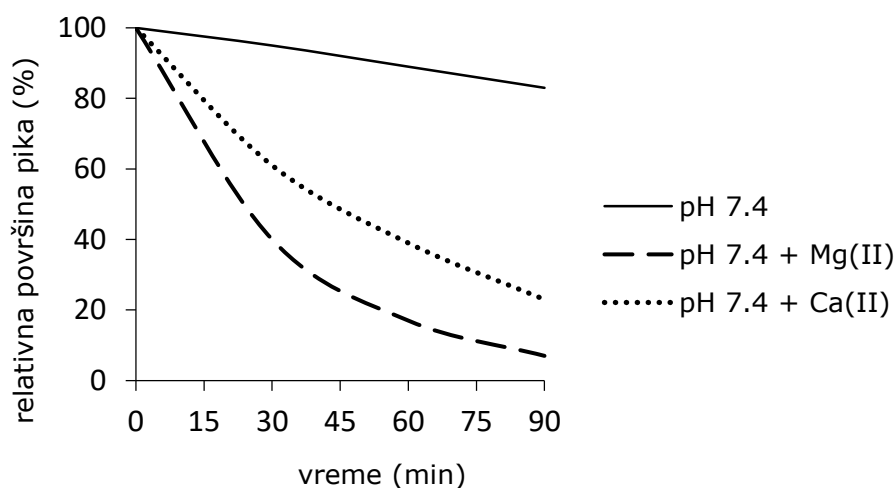


Slika 138. Hromatogrami snimljeni u toku autooksidacije hematoksilina na pH 7,4 u prisustvu Mg(II) jona



Slika 139. Hromatogrami snimljeni u toku autooksidacije hematoksilina na pH 7,4 u prisustvu Ca(II) jona

Dominantan pik na svim hromatogramima je sa RT 13 min koji, evidentno, potiče od hematoksilina. Njegov intenzitet konstantno opada u sva tri sistema u toku reakcije autooksidacije. Do kraja 90. minuta, on ne nestaje u potpunosti, već zaostaje u određenom procentu koji zavisi od posmatranog sistema. Tako je u reakcionoj smeši bez prisustva metalnih jona na kraju prisutno više od 80% neizreagovalog hematoksilina, u sistemu Htx-Ca(II) nešto više od 20%, dok je u sistemu Htx-Mg(II) taj procenat niži od 10 (slika 140).



Slika 140. Potrošnja hematoksilina tokom autooksidacije na pH 7,4 bez prisustva metalnih jona i u prisustvu metalnih jona

Takođe je karakteristično da se u hromatogramima snimljenim u toku autooksidacije hematoksilina na pH 7,4 u prisustvu Mg(II) jona pojavljuje veći broj pikova koji prema RT vrednostima odgovaraju jedinjenjima čije je nastajanje uočeno i pri autooksidaciji hematoksilina na pH 8,4, ali se ne javljaju ili se veoma slabo uočavaju u hromatogramima kod ostala dva sistema (bez prisustva metalnih jona i u prisustvu Ca(II) jona). Ovo je posledica znatno manje brzine autooksidacije u odsustvu metalnih jona, odnosno znatno izraženijeg stabilizujućeg efekta Mg(II) jona prema kateholnim strukturama u odnosu na Ca(II) jon, što je već pokazano u slučaju nekih prethodno ispitivanih jedinjenja.

5. Zaključak

Na osnovu rezultata dobijenih ispitivanjem uticaja jona biometala Mg(II) i Ca(II) na autooksidaciju polifenolnih jedinjenja sa kateholnim strukturama u molekulu (katehol, kafena kiselina, hlorogenska kiselina, rutin, ruzmarinska kiselina i hematoksilin) u slabo baznim vodenim rastvorima (pH 7,4 i 8,4) različitim tehnikama i metodama analize (UV/Vis, HPLC-DAD, ESI-MS, ESR) mogu se izvesti sledeći zaključci:

- Snimanje UV/Vis spektara u toku autooksidacije ispitivanih jedinjenja pod različitim uslovima omogućilo je najpre donošenje preliminarnih zaključaka o veličini i brzini promena u ispitivanim sistemima. Na osnovu promenene intenziteta i položaja karakterističnih apsorpcionih maksimuma u UV/Vis spektrima koji su snimani u pravilnim vremenskim intervalima moglo se delimično zaključivati i o vrsti hemijskih promena koje nastaju kod ispitivanih jedinjenja u toku autooksidacije.
- Precizniji podaci o broju glavnih komponenti koje učestvuju u procesu autooksidacije, kao i o koncentracionim i spektralnim profilima uočenih komponenti dobijeni su hemometrijskom MCR-ALS analizom spektrofotometrijskih podataka.
- Snimanje hromatograma HPLC-DAD tehnikom omogućilo je uočavanje pojave i minornih proizvoda autooksidacije i precizno praćenje promene koncentracije polaznih jedinjenja na osnovu relativne površine njihovih hromatografskih pikova.
- Dodatna karakterizacija hromatografski razdvojenih proizvoda autooksidacije vršena je na osnovu DAD UV/Vis spektara ekstrahovanih iz hromatografskih pikova razdvojenih jedinjenja.
- ESI-MS analiza rastvora u toku autooksidacije fenolnih jedinjenja bez prisustva metalnih jona omogućila je određivanje ili potvrđivanje strukture određenih proizvoda autooksidacije. Posebno je, u tom smislu, kod složenijih sistema bila korisna MS/MS analiza pojedinih karakterističnih jona prisutnih u ESI-MS spektrima.
- Snimljeni ESR spektri nedvosmisleno su pokazali da se ispitivani procesi autooksidacije odvijaju uz učešće različitih slobodnih radikala. U slučajevima kada je odnos signal/šum kod snimljenih spektara bio zadovoljavajući kompjuterskom simulacijom ESR spektara utvrđena je struktura Mg(II) jonom spinski stabilisanih primarnih i/ili sekundarnih radikala i određene su vrednosti za konstante hiperfinog cepanja.
- Sklonost ispitivanih jedinjenja za autooksidaciju opada u nizu hematoksilin > kafena kiselina > ruzmarinska kiselina > hlorogenska kiselina > katehol > rutin. Poređenje jedinjenja sa jednom i sa dve kateholne grupe pokazuje da su, u principu, jedinjenja sa

dve kateholne grupe (hematoksilin i ruzmarinska kiselina) podložnija autooksidaciji, mada to ipak, pre svega zavisi od konkretne strukture molekula (npr. kafena kiselina je reaktivnija od ruzmarinske).

- Kao primarni proizvodi autooksidacije uglavnom su identifikovane hinonske strukture, osim kod hlorogenske i ruzmarinske kiseline gde je najpre došlo do raskidanja estarske veze. U daljem toku autooksidacije potvrđeno je nastajanje dimernih i hidroksilovanih proizvoda, a nakon dužeg vremena (1 do 7 dana) i polimernih proizvoda koji po karakteristikama nalikuju huminskim supstancama.
- Povećanje pH vrednosti rastvora od 7,4 na 8,4 kod autooksidacije u odsustvu metalnih jona nije imalo značajan uticaj na brzinu procesa osim kod hematoksilina gde ovakva promena dovodi do značajnog ubrzavanja autooksidacije.
- Prisustvo Mg(II) i Ca(II) jona povećava brzinu autooksidacije ispitivanih jedinjenja, kako na pH 7,4, tako u još većoj meri i na pH 8,4. Ovakav uticaj metalnih jona je posledica njihove interakcije sa kateholnim strukturama, pri čemu oni pre svega pojačavaju disocijaciju fenolnih hidroksilnih grupa i na taj način olakšavaju formiranje primarnih proizvoda koji podležu daljim transformacijama.
- Razlike u uticaju Mg(II) i Ca(II) jona manifestuju se kroz veću potrošnju polaznih supstanci pri autooksidaciji u prisustvu Ca(II) jona što je naročito izraženo na pH 8,4. Ovo pokazuje da Mg(II) jon ima izraženiji stabilizujući efekat na početne proizvode autooksidacije jer gradi jače veze sa O-donor ligandima zbog većeg jonskog potencijala (odnos naelektrisanje/radijus jona) čime smanjuje brzinu njihove dalje transformacije.
- I pored toga što su redoks neaktivni Mg(II) i Ca(II) joni mogu pod određenim uslovima značajno da utiču na stabilnost i antioksidativna svojstva polifenolnih jedinjenja sa kateholnim grupama u molekulu.
- Dobijeni rezultati su značajni zato što su Mg(II) i Ca(II) joni prisutni u značajnim koncentracijama u svim biološkim sistemima i svakodnevno se u organizam unose putem ishrane, dok su polifenolna jedinjenja značajni antioksidanti koji su zastupljeni u hrani a nalaze se i u mnogim potrošačkim proizvodima (npr. kao aditivi u prehrambenim proizvodima i kozmetičkim preparatima).

6. Literatura

- Albarran G, Boggess W, Rassolov V, Schuler RH. 2010. Absorption Spectrum, Mass Spectrometric Properties, and Electronic Structure of 1,2-Benzoquinone. *J. Phys. Chem. A.* 114:7470–78
- Alegría AE, Sanchez-Cruz P, Rivas L. 2004. Alkaline-earth cations enhance ortho-quinone-catalyzed ascorbate oxidation. *Free Radic. Biol. Med.* 37(10):1631–39
- Anantharaju PG, Gowda PC, Vimalambike MG, Madhunapantula S V. 2016. An overview on the role of dietary phenolics for the treatment of cancers. *Nutr. J.* 15(1):1–16
- Andjelković M, Van Camp J, De Meulenaer B, Depaemelaere G, Socaciu C, et al. 2006. Iron-chelation properties of phenolic acids bearing catechol and galloyl groups. *Food Chem.* /98(1):23–31
- Antolovich M, Bedgood DR, Bishop AG, Jardine D, Prenzler PD, Robards K. 2004. LC-MS Investigation of Oxidation Products of Phenolic Antioxidants. *J. Agric. Food Chem.* 52(4):962–71
- Arakawa R, Yamaguchi M, Hotta H, Osakai T, Kimoto T. 2004. Product analysis of caffeic acid oxidation by on-line electrochemistry/electrospray ionization mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 15(8):1228–36
- Beiginejad H, Nematollahi D, Bayat M. 2012. Electrochemical oxidation of hematoxylin - Part 1: Experimental and theoretical studies in an aqueous acidic medium. *J. Electroanal. Chem.* 681:76–83
- Bencini A, Bill E, Scozzafava A, Totti F. 2003. Density Functional Characterization of the Chemoselective Oxidation of Catechol by using Molecular Oxygen: Thermodynamics of the Reaction between [(triphos)Ir(dtbc)]⁺ and O₂. *Chem. Eur. J.* 9(13):3015–23
- Beneduci A, Furia E, Russo N, Marino T. 2017. Complexation behaviour of caffeic, ferulic and p-coumaric acids towards aluminium cations: A combined experimental and theoretical approach. *New J. Chem.* 41(12):5182–90
- Bettinger, Zimmermann. 1991a. New investigations on hematoxylin, hematein and hematein-aluminium complexes I. *Histochemistry.* 95:279–88
- Bettinger, Zimmermann. 1991b. New investigations on hematoxylin, hematein and hematein-

aluminium complexes II. *Histochemistry*. 96:215–28

Chavarria D, Silva T, Martins D, Bravo J, Summavielle T, et al. 2015. Exploring cinnamic acid scaffold: development of promising neuroprotective lipophilic antioxidants. *Medchemcomm*. 6(6):1043–53

Cheung S, Tai J. 2007. Anti-proliferative and antioxidant properties of rosemary *Rosmarinus officinalis*. *Oncol. Rep.* 17(6):1525–31

Cho AS, Jeon SM, Kim MJ, Yeo J, Seo K II, et al. 2010. Chlorogenic acid exhibits anti-obesity property and improves lipid metabolism in high-fat diet-induced-obese mice. *Food Chem. Toxicol.* 48(3):937–43

Chuchev K, BelBruno JJ. 2008. Oxidation of catechol to 2-hydroxymuconic semialdehyde. *J. Mol. Struct. THEOCHEM*. 856:71–78

Cilliers JLL, Singleton VL. 1989. Nonenzymatic autooxidative phenolic browning reactions in a caffeic acid model system. *J. Agric. Food Chem.* 37:890–96

Cilliers JLL, Singleton VL. 1991. Characterization of the Products of Nonenzymic Autoxidative Phenolic Reactions in a Caffeic Acid Model System. *J. Agric. Food. Chem.* 39:1298–1303

Collins KD. 2006. Ion hydration: Implications for cellular function, polyelectrolytes, and protein crystallization. *Biophys. Chem.* 119(3):271–81

Cooksey C. 2010. Hematoxylin and related compounds – an annotated bibliography concerning their origin, properties, chemistry, and certain applications. *Biotech. Histochem.* 85(1):65–82

Cornard J-P, Lapouge C. 2006. Absorption spectra of caffeic acid, caffeate and their 1:1 complex with Al(III): density functional theory and time-dependent density functional theory investigations. *J. Phys. Chem. A*. 110:7159–66

Cotelle N, Bernier JL, Catteau JP, Pommery J, Wallet JC, Gaydou EM. 1996. Antioxidant properties of hydroxy-flavones. *Free Radic. Biol. Med.* 20(1):35–43

Crichton R. 2008. in *Biological Inorganic Chemistry An Introduction*. ed Crichton R, Elsevier, Amsterdam

- Crozier A, Jaganath IB, Clifford MN. 2009. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Nat. Prod. Rep.* 26(8):1001–43
- Dangles O, Fargeix G, Dufour C. 1999. One-electron oxidation of quercetin and quercetin derivatives in protic and non protic media. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2.* (7):1387–96
- de Hoffmann E, Stroobant V. 2007. in *Mass Spectrometry - Principles and Applications*. John Wiley & Sons Ltd, England
- Domitrović R, Potočnjak I, Crnčević-Orlić Ž, Škoda M. 2014. Nephroprotective activities of rosmarinic acid against cisplatin-induced kidney injury in mice. *Food Chem. Toxicol.* 66:321–28
- Dudev T, Lim C. 2003. Principles Governing Mg, Ca, and Zn Binding and Selectivity in Proteins. *Chem. Rev.* 103:773–88
- Eaton DR. 1964. Complexing of Metal Ions with Semiquinones. An Electron Spin Resonance Study. *Inorg. Chem.* 3:1268–71
- Elin RJ. 1987. Assessment of magnesium status. *Clin. Chem.* 33(11):1965–70
- Erdogan G, Karadag R. 2005. Quercetin (3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone) Complexes With Calcium(II) and Magnesium(II), Its Potentiometric And Spectrophotometric Studies. . 24(1):9–24
- Fabjan N, Rode J, Košir IJ, Wang Z, Zhang Z, Kreft I. 2003. Tartary Buckwheat (*Fagopyrum tataricum* Gaertn.) as a Source of Dietary Rutin and Quercitrin. *J. Agric. Food Chem.* 51(22):6452–55
- Fawcett WJ, Haxby EJ, Male DA. 1999. Magnesium: Physiology and pharmacology
- Felix CC, Sealy RC. 1982. o-Benzosemiquinone and Its Metal Chelates. Electron Spin Resonance Investigation of Radicals from the Photolysis of Catechol in the Presence of Complexing Metal Ions. *J. Am. Chem. Soc.* 104(6):1555–60
- Ferrari, Laurenti, Ghibaudi, Gambino. 1996. ESR characterization and kinetics of the enzymatically obtained M(II)-dopamine-o-semiquinone system. *Res. Chem. Intermed.* 22(5):459–68

- Fulcrand H, Cheminat A, Brouillard R, Cheynier V. 1994. Characterization of compounds obtained by chemical oxidation of caffeic acid in acidic conditions. *Phytochemistry*. 35(2):499–505
- García P, Romero C, Brenes M, Garrido A, García P. 1996. Effect of Metal Cations on the Chemical Oxidation of Olive *o*-Diphenols in Model Systems. *J. Agric. Food Chem.* 44(8):2101–5
- Gerschman R, Gilbert D, Nye S, Dwyer P, Fenn W. 1954. Oxygen Poisoning and X-irradiation: A Mechanism in Common. *Science*. 119:623–26
- Ghasemzadeh A, Ghasemzadeh N. 2011. Flavonoids and phenolic acids: Role and biochemical activity in plants and human. *J. Med. Plants Res.* 5(31):6697–6703
- Halliwell B. 1990. How To Characterize a Biological Antioxidant. *Free Radic. Res. Commun.* 9(I):1–32
- Haribabu B. 1984. Microbial degradation of substituted benzoic acids. *J. Indian Inst. Sci.* 65(C):69–107
- Harman D. 1956. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.* 11(3):298–300
- Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. 2002. Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J. Nutr. Biochem.* 13(10):572–84
- House J. 2013. in *Inorganic Chemistry*, 2nd ed. House J. Elsevier, USA
- Huang M, Smart RC, Wong C, Conney AH. 1988. Inhibitory Effect of Curcumin, Chlorogenic Acid, Caffeic Acid, and Ferulic Acid on Tumor Promotion in Mouse Skin by 12-*O*-Tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Cancer Research* 48:5941-5946
- Ishii H, Koyama H, Hagiwara K, Miura T, Xue G, et al. 2012. Synthesis and biological evaluation of deoxy-hematoxylin derivatives as a novel class of anti-HIV-1 agents. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 22(3):1469–74
- Jaumot J, de Juan A, Tauler R. 2015. MCR-ALS GUI 2.0: New features and applications. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 140:1–12

- Jurasekova Z, Domingo C, Garcia-Ramos J V., Sanchez-Cortes S. 2014. Effect of pH on the chemical modification of quercetin and structurally related flavonoids characterized by optical (UV-visible and Raman) spectroscopy. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 16(25):12802–11
- Karbowiak T, Gougeon RD, Alinc J-B, Brachais L, Debeaufort F, et al. 2010. Wine Oxidation and the Role of Cork. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 50(1):20–52
- Kasprzak MM, Erxleben A, Ochocki J. 2015. Properties and applications of flavonoid metal complexes. *RSC Adv.* 5(57):45853–77
- Kitagawa S, Fujisawa H, Sakurai H. 1992. Scavenging effects of Dihydric and Polyhydric Phenols on Superoxide Anion Radicals, Studied by Electron Spin Resonance Spectrometry. *Chem. Pharm. Bull.* 40(2):304–7
- Knekt P, Kumpulainen J, Jarvinen R, Rissanen H, Heliovaara M, et al. 2002. Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *Am. J. Clin. Nutr.* 76(3):560–68
- Koclar Avci G, Coruh N, Bolukbasi U, Ogel ZB. 2013. Oxidation of phenolic compounds by the bifunctional catalase-phenol oxidase (CATPO) from *Scytalidium thermophilum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97(2):661–72
- Kozuma K, Tsuchiya S, Kohori J, Hase T, Tokimitsu I. 2005. Antihypertensive effect of green coffee bean extract on mildly hypertensive subjects. *Hypertens. Res.* 28(9):711–18
- Lalor GC, Martin SL. 1959a. Studies on Haematoxylin and Haematein, the Colouring Principles of Logwood_I. *J. Soc. Dye. Colour.* 75:513–17
- Lalor GC, Martin SL. 1959b. Studies on Haematoxylin and Haematein, the Colouring Principles of Logwood_II. *J. Soc. Dye. Colour.* 75:517–21
- Le Person A, Lacoste AS, Cornard JP. 2013. Photo-degradation of trans-caffeic acid in aqueous solution and influence of complexation by metal ions. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* 265:10–19
- Lebedev A V., Ivanova M V., Ruuge EK. 2011. Calcium-dioxolene complexes: Rate constants of pyrocatechol oxidation in the presence of Ca^{2+} . *Biophysics (Oxf).* 56(2):188–93
- Lebedev A V., Ivanova M V., Timoshin AA, Ruuge EK. 2007. Effect of group II metal cations on catecholate oxidation. *ChemPhysChem.* 8(12):1863–69

- Levchenko L, Kulakovskaya S, Kulikov A, Sadkov A, Shilov A. 2000. Electrochemical and ESR Studies of Au-Protein from *Micrococcus luteus*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 88(3):201–10
- Lim YY, Ginny Lim TT, Liew LP. 2005. Autooxidation of Some Polyphenols in Various Copper (II) Solutions. *Malaysian J. Chem.* 7(1):032–037
- Lima CF, Fernandes-Ferreira M, Pereira-Wilson C. 2006. Phenolic compounds protect HepG2 cells from oxidative damage: Relevance of glutathione levels. *Life Sci.* 79(21):2056–68
- Litvin VA, Minaev BF. 2013. Spectroscopy study of silver nanoparticles fabrication using synthetic humic substances and their antimicrobial activity. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 108:115–22
- Litvin VA, Minaev BF. 2014. The size-controllable, one-step synthesis and characterization of gold nanoparticles protected by synthetic humic substances. *Mater. Chem. Phys.* 144(1–2):168–78
- Litvin VA, Minaev BF, Baryshnikov G V. 2015. Synthesis and properties of synthetic fulvic acid derived from hematoxylin. *J. Mol. Struct.* 1086:25–33
- Lu Y, Yeap Foo L. 2002. Polyphenolics of *Salvia*—a review. *Phytochemistry.* 59(2):117–40
- Maegawa Y, Sugino K, Sakurai H. 2007. Identification of free radical species derived from caffeic acid and related polyphenols. *Free Radic. Res.* 41(1):110–19
- Magnani C, Isaac VLB, Correa MA, Salgado HRN. 2014. Caffeic acid: a review of its potential use in medications and cosmetics. *Anal. Methods.* 6(10):3203–10
- Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez L. 2004. Polyphenols - Food Sources and Bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* 79(5):727–747
- Marshall PN, Horobin RW. 1972. The oxidation products of Haematoxylin and their role in biological staining. *Histochem. J.* 4(6):493–503
- Martin J, Dailey M, Sugarman E. 1987. Negative and Positive Assays of Superoxide Dismutase Based on Hematoxylin Autoxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* 255(2):329–36

- Mattila H, Khorobrykh S, Havurinne V, Tyystjärvi E. 2015. Reactive oxygen species: Reactions and detection from photosynthetic tissues. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 152:176–214
- Mcbride MB. 1989. Oxidation of dihydroxybenzenes in aerated aqueous suspensions of birnessite. *Clays Clay Miner.* 37(4):341–47
- Moridani MY, Scobie H, Jamshidzadeh A, Salehi PAR, Brien PJO. 2001. Caffeic Acid, Chlorogenic Acid, and Dihydrocaffeic Acid Metabolism : Glutathione Conjugate Formation:29(11):1432–39
- Munoz JL, Garcia-Molina F, Varon R, Rodriguez-Lopez JN, Garcia-Ruiz PA, et al. 2007a. Kinetic Characterization of the Oxidation of Chlorogenic Acid by Polyphenol Oxidase and Peroxidase. Characteristics of the o-Quinone. *J. Agric. Food Chem.* 55:920–28
- Mura F, Silva T, Castro C, Borges F, Zuñiga MC, et al. 2014. New insights into the antioxidant activity of hydroxycinnamic and hydroxybenzoic systems: spectroscopic, electrochemistry, and cellular studies. *Free Radic. Res.* 48(12):1473–84
- Namazian M, Zare HR, Coote ML. 2012. Theoretical Study of the Oxidation Mechanism of Hematoxylin in Aqueous Solution. *Aust. J. Chem.* 65(5):486
- Nasirizadeh N, Zare HR. 2009. Differential pulse voltammetric simultaneous determination of noradrenalin and acetaminophen using a hematoxylin biosensor. *Talanta.* 80(2):656–63
- Nguyen TTD, Santoso SP, Nguyen TTB, Angkawijaya AE, Tran-Nguyen PL, Ju YH. 2016. Solution Equilibrium Study of Divalent Metal Ions with Phenylpropanoid Derivatives and Acetylcysteine Ligands. *Chem. Pharm. Bull.* 64(11):1560–69
- Nicolás I, Castro M. 2006. Theoretical study of the complexes of horminone with Mg^{2+} and Ca^{2+} ions and their relation with the bacteriostatic activity. *J. Phys. Chem. A.* 110(13):4564–73
- Nikolić GM, Premović PI, Nikolić RS. 1998. Spectrophotometric Study of Catechol Oxidation by Aerial O_2 in Alkaline Aqueous Solutions Containing $Mg(II)$ Ions. *Spectrosc. Lett.* 31(2):327–33
- Nikolić GM, Veselinović AM, Nikolić RS, Mitić SS. 2011. Spectroscopic study of $Mg(II)$ ion

- influence on the autoxidation of gallic acid in weakly alkaline aqueous solutions. *Russ. J. Phys. Chem. A.* 85(13):2270–73
- Nkhili E, Loonis M, Mihai S, El Hajji H, Dangles O. 2014. Reactivity of food phenols with iron and copper ions: binding, dioxygen activation and oxidation mechanisms. *Food Funct.* 5(6):1186–1202
- Owen T. 1996. Fundamentals of UV-visible spectroscopy. Hewlett-Packard Company, Germany
- Paczkowska M, Lewandowska K, Bednarski W, Mizera M, Podborska A, et al. 2015a. Application of spectroscopic methods for identification (FT-IR, Raman spectroscopy) and determination (UV, EPR) of quercetin-3-O-rutinoside. Experimental and DFT based approach. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 140:132–39
- Paczkowska M, Mizera M, Piotrowska H, Szymanowska-Powałowska D, Lewandowska K, et al. 2015b. Complex of rutin with β -cyclodextrin as potential delivery system. *PLoS One.* 10(3):1–16
- Parrino F, Di Paola A, Loddo V, Pibiri I, Bellardita M, Palmisano L. 2016. Photochemical and photocatalytic isomerization of trans-caffeic acid and cyclization of cis-caffeic acid to esculetin. *Appl. Catal. B Environ.* 182:347–55
- Pati S, Crupi P, Benucci I, Antonacci D, Di Luccia A, Esti M. 2014. HPLC-DAD–MS/MS characterization of phenolic compounds in white wine stored without added sulfite. *Food Res. Int.* 66:207–15
- Pati S, Losito I, Palmisano F, Zambonin PG. 2006. Characterization of caffeic acid enzymatic oxidation by-products by liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* 1102:184–92
- Petersen M. 2013. Rosmarinic acid: New aspects. *Phytochem. Rev.* 12(1):207–27
- Petersen M, Simmonds MS. 2003. Rosmarinic acid. *Phytochemistry.* 62(2):121–25
- Pitzschke A, Forzani C, Hirt H. 2006. Reactive oxygen species signaling in plants. *Antioxid Redox Signal.* 8(9–10):1757–64
- Quideau S, Deffieux D, Douat-Casassus C, Pouységu L. 2011. Plant polyphenols: Chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angew. Chemie - Int. Ed.* 50(3):586–621

- Rajan VK, Muraleedharan K. 2017. A computational investigation on the structure, global parameters and antioxidant capacity of a polyphenol, Gallic acid. *Food Chem.* 220:93–99
- Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med.* 20(7):933–56
- Robbins RJ. 2003. Phenolic acids in foods: An overview of analytical methodology. *J. Agric. Food Chem.* 51(10):2866–87
- Roubani-Kalantzopoulou F, Katsanos NA. 1986. The Reaction of Hematoxylin with Zirconyl Chloride Studied Spectrophotometrically. *Zeitschrift fur Phys. Chemie.* 149(2):165–81
- Ruckebusch C, Blanchet L. 2013. Multivariate curve resolution: A review of advanced and tailored applications and challenges. *Anal. Chim. Acta.* 765:28–36
- Samide A, Tutunaru B, Bratulescu G, Ionescu C. 2013. Electrochemical synthesis and characterization of new electrodes based on poly-hematoxylin films. *J. Appl. Polym. Sci.* 130(1):687–97
- Savić IM, Nikolić VD, Savić IM, Nikolić LB, Jović MD, Jović MD. 2014. The Qualitative Analysis of the Green Tea Extract Using ESI-MS Method. *Adv. Technol.* 3(1):30–37
- Savic S, Vojinovic K, Milenkovic S, Smelcerovic A, Lamshoeft M, Petronijevic Z. 2013. Enzymatic oxidation of rutin by horseradish peroxidase: Kinetic mechanism and identification of a dimeric product by LC-Orbitrap mass spectrometry. *Food Chem.* 141(4):4194–99
- Schweigert N, Zehnder AJB, Eggen RIL. 2001. Chemical properties of catechols and their molecular modes of toxic action in cells, from microorganisms to mammals. *Environ. Microbiol.* 3(2):81–91
- Šeruga M, Tomac I. 2014. Electrochemical behaviour of some chlorogenic acids and their characterization in coffee by square-wave voltammetry. *Int. J. Electrochem. Sci.* 9:6134–54
- Shahidi F, Naczki M. 2006. *Phenolics in Food and Nutraceuticals*. CRC Press, Boca Raton, USA
- Sharma P, Jha AB, Dubey RS, Pessarakli M. 2012. Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions.

J. Bot. 2012:1–26

Šmejkalová D, Conte P, Piccolo A. 2007. Structural characterization of isomeric dimers from the oxidative oligomerization of catechol with a biomimetic catalyst.

Biomacromolecules. 8(2):737–43

Snyder LR, Kirkland JJ, Dolan JW. 2010. in *Introduction to Modern Liquid Chromatography*. John Wiley & Sons, New Jersey

Sokolová R, Degano I, Hromadová M, Bulíčková J, Gál M, Valášek M. 2010. Oxidation pathways of natural dye hematoxylin in aqueous solution. *Collect. Czechoslov. Chem. Commun.* 75(11):1097–1114

Sung J, Huang KS, Lai TJ, Chen YY, Lin CY, et al. 2008. Oxidation of catechin and rutin by pentaammineruthenium(III) complexes. *Inorg. Chem.* 47(23):11361–66

Takeda H, Tsuji M, Inazu M, Egashira T, Matsumiya T. 2002. Rosmarinic acid and caffeic acid produce antidepressive-like effect in the forced swimming test in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 449(3):261–67

Tauler R. 1995. Multivariate curve resolution applied to second order data. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 30(1):133–46

Tazaki H, Taguchi D, Hayashida T, Nabeta K. 2001. Stable Isotope-labeling Studies on the Oxidative Coupling of Caffeic Acid via *o*-Quinone. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65(12):2613–21

Tepe B, Eminagaoglu O, Akpulat HA, Aydin E. 2007. Antioxidant potentials and rosmarinic acid levels of the methanolic extracts of *Salvia verticillata* (L.) subsp. *verticillata* and *S. verticillata* (L.) subsp. *amasiaca* (Freyn & Bornm.) Bornm. *Food Chem.* 100(3):985–89

Titford M. 2005. The long history of hematoxylin. *Biotech. Histochem.* 80(2):73–78

Tofan-lazar J, Situm A, Al-abadleh HA. 2013. DRIFTS Studies on the Role of Surface Water in Stabilizing Catechol–Iron(III) Complexes at the Gas/Solid Interface. *J. Phys. Chem. A.* 117:10368–10380

Torshin I, Gromova O. 2009. *Magnesium and Pyridoxine: Fundamental Studies and Clinical Practice*. New York: Nova Science Publisher, Inc.

- Uwitonze AM, Razzaque MS. 2018. Role of Magnesium in Vitamin D Activation and Function. *J. Am. Osteopath. Assoc.* 118(3):181
- van Acker SABE, de Groot MJ, van den Berg D-J, Tromp MNJL, Donné-Op den Kelder G, et al. 1996. A Quantum Chemical Explanation of the Antioxidant Activity of Flavonoids. *Chem. Res. Toxicol.* 9(8):1305–12
- van Dijk AE, Olthof MR, Meeuse JC, Seebus E, Heine RJ, Van Dam RM. 2009. Acute effects of decaffeinated coffee and the major coffee components chlorogenic acid and trigonelline on glucose tolerance. *Diabetes Care.* 32(6):1023–25
- Veselinović, A. M., Bojić, A. Lj., Purenović, M. M., Nikolić, G. M., Anđelković, T. D., Dačić, S. D., Bojić D V. 2010. Investigation of the parametar influences of UV/H₂O₂ process on humic acid degradation. *Hem. Ind.* 64(4):265–73
- Wang G, Xue Y, An L, Zheng Y, Dou Y, et al. 2014. Theoretical study on the structural and antioxidant properties of some recently synthesised 2,4,5-trimethoxy chalcones. *Food Chem.* 171:89–97
- Watanabe A, McPhail DB, Maie N, Kawasaki S, Anderson HA, Cheshire M V. 2005. Electron spin resonance characteristics of humic acids from a wide range of soil types. *Org. Geochem.* 36(7):981–90
- Watson RR. 2014. in *Polyphenols in Plants: Isolation, Purification and Extract Preparation.* Elsevier, Amsterdam
- Weckhuysen BM, Heidler R, Schoonheydt R a. 2004. Electron Spin Resonance Spectroscopy. *Mol. Sieves.* 4(1):295–335
- Williams L, Salt DE. 2009. The plant ionome coming into focus. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12(3):247–49
- Wu C, Zacchetti B, Ram AFJ, van Wezel GP, Claessen D, Hae Choi Y. 2015. Expanding the chemical space for natural products by *Aspergillus-Streptomyces* co-cultivation and biotransformation. *Sci. Rep.* 5:10868
- Yadav M, Kaushik M, Roshni R, Reddy P, Mehra N, et al. 2017. Effect of Green Coffee Bean Extract on *Streptococcus mutans* Count: A Randomised Control Trial. *J. Clin. Diag. Res.*

- Zare HR, Nasirizadeh N. 2011. A study of the electrochemical behavior of hematoxylin as an important bioactive flavonoid. *Electrochim. Acta.* 56(11):3920–25
- Zheng LF, Wei QY, Cai YJ, Fang JG, Zhou B, et al. 2006. DNA damage induced by resveratrol and its synthetic analogues in the presence of Cu(II) ions: Mechanism and structure-activity relationship. *Free Radic. Biol. Med.* 41(12):1807–16
- Zheng YZ, Deng G, Chen DF, Liang Q, Guo R, Fu ZM. 2018. Theoretical studies on the antioxidant activity of pinobanksin and its ester derivatives: Effects of the chain length and solvent. *Food Chem.* 240:323–29
- Živanović SC, Nikolić RS, Nikolić GM. 2016. The Influence of Mg(II) and Ca(II) Ions on Rutin Autoxidation in Weakly Alkaline Aqueous Solutions. *Acta Fac. Medicae Naissensis.* 33(3):163–71

7. Biografija

LIČNI PODACI

Ime i prezime Slavoljub Živanović
Datum rođenja 28.11.1963, Niš
Adresa Branka Krsmanovića 13/4, 18000 Niš, Srbija
e-mail zivanovicyu@yahoo.com; slavoljub.zivanovic@medfak.ni.ac.rs

OBRAZOVANJE Diplomirani hemičar, Univerzitet u Nišu, Prirodno-matematički fakultet, Odsek za hemiju, 1983-1988

RADNO ISKUSTVO

1988-1994 Fabrika „Ei Poluprovodnici“, Niš; tehnolog na sledećim poslovima: epitaksijalni rast monokristala silicijuma, hemijsko naparavanje iz gasne faze, hemijsko rezanje, hemijsko pranje.

1995-2001 Fabrika za namensku proizvodnju „Ei Sova“, Niš; vodeći tehnolog supervajzor na poslovima izrade ekrana za pasivne pojačivače slike, kao i tehnolog za vakuumsko naparavanje.

2006-danas Medicinski fakultet u Nišu, najpre kao laborant na studijskoj grupi Farmacija, a od 2008 operater na HPLC uređaju u Naučnoistraživačkom centru za biomedicinu u okviru fakulteta.

NAUČNOISTRAŽIVAČKI RAD Učešće na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije broj III 41018 pod nazivom „Preventivni, terapijski i etički pristup prekliničkim i kliničkim istraživanjima gena i modulatora redoks ćelijske signalizacije u imunskom, inflamatornom i proliferativnom odgovoru ćelije“.

8. Bibliografija

Rad u vrhunskom naučnom časopisu (M21)

1. M. Kostić, D. Kitić, M. Petrović, T. Jevtović-Stoimenov, M. Jović, A. Petrović, S. Živanović. Anti-inflammatory effect of the *Salvia sclarea* L. ethanolic extract on lipopolysaccharide-induced periodontitis in rats, *Journal of Ethnopharmacology* 2017;199:52-59
2. B. Miladinović, M. Kostić, K. Savikin, B. Đorđević, T. Mihajilov-Krstev, S. Živanović, D. Kitić. Chemical Profile and Antioxidative and Antimicrobial Activity of Juices and Extracts of 4 Black Currants Varieties (*Ribes nigrum* L.), *Journal of Food Science* 2014;79(3):C301-C309
3. V. Nikolić, S. Janković, R. Veličković-Radovanović, S. Apostolović, D. Stanojević, S. Živanović, N. Stefanović, S. Pešić, T. Jevtović-Stoimenov, J. Đurić, V. Marković, J. Milovanović. Population Pharmacokinetics of Carvedilol in Patients with Congestive Heart Failure, *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2013;102(8):2851-2858
4. G. Kocić, R. Pavlović, G. Nikolić, D. Stojanović, T. Jevtović, D. Sokolović, A. Cenčić, S. Stojanović, M. Jelić, S. Živanović. The effect of depurinated milk draught diet on rat serum uric acid, lipid status and haematological parameters, *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 2012;96(4):640-647

Rad u istaknutom naučnom časopisu (M22)

1. S. Živanović, A. Veselinović, Ž. Mitić, G. Nikolić. **The study of the influence of Mg(II) and Ca(II) ions on caffeic acid autoxidation in weakly alkaline aqueous solution using MCR-ALS analysis of spectrophotometric data**, *New Journal of Chemistry* 2018;42:6256-6263
2. V. Nikolić, T. Jevtović-Stoimenov, R. Veličković-Radovanović, S. Ilić, M. Deljanin-Ilić, D. Marinković, S. Apostolović, D. Stanojević, S. Živanović, N. Stefanović, S. Pešić, D. Ružić-Zečević, J. Milovanović, S. Janković. Population pharmacokinetics of bisoprolol in patients with chronic heart failure, *European Journal of Clinical Pharmacology* 2013;69(4):859-865

3. D. Bigović, S. Branković, D. Kitić, M. Radenković, T. Janković, K. Savikin, S. Živanović. Relaxant Effect of the Ethanol Extract of *Helichrysum plicatum* (Asteraceae) on Isolated Rat Ileum Contractions, *Molecules* 2010;15(5):3391-3401

Rad u naučnom časopisu (M23)

1. V. Nikolić, S. Janković, M. Deljanin-Ilić, S. Stojanović, M. Nikolić, S. Živanović, D. Stokanović, T. Jevtović-Stoimenov, J. Milovanović. Population Pharmacokinetic Analysis of Bisoprolol in Patients with Stable Coronary Artery Disease, *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics* 2018;43(1):35-44
2. S. Živanović, R. Nikolić, D. Kostić, G. Nikolić. Application of Multivariate Curve Resolution-Alternating Least Square Method for the Spectrophotometric Study of Magnesium(II) and Calcium(II) Ions Influence on the Autoxidation of Hematoxylin, *Oxidation Communications* 2017;40(2):581-591
3. M. Ilić-Deljanin, R. Pavlović, G. Lazarević, S. Živanović, T. Cvetković, G. Kocić, S. Ilić, G. Ambrosio. Detrimental effects of a bout of physical exercise on circulating endogenous inhibitors of endothelial function in patients with coronary artery disease, *Journal of Cardiovascular Medicine* 2017;18(8):610-616
4. V. Nikolić, S. Janković, Z. Dimitrijević, M. Sokolović, B. Andrić, D. Petrović, T. Jevtović-Stoimenov, S. Živanović, J. Milovanović. Population Pharmacokinetics of Bisoprolol in Hemodialysis Patients with Hypertension, *Pharmacology* 2016;97:134-137
4. M. Kostić, B. Zlatković, B. Miladinović, S. Živanović, T. Mihajilov-Krstev, D. Pavlović, D. Kitić. Rosmarinic Acid Levels, Phenolic Contents, Antioxidant and Antimicrobial Activities of the Extracts from *Salvia Verbenaca* L. Obtained with Different Solvents and Procedures, *Journal of Food Biochemistry* 2015;39(2):199-208
5. M. Kostić, T. Džopalić, S. Živanović, N. Živković, A. Cvetanović, I. Stojanović, S. Vojinović, G. Marjanović, V. Savić, M. Čolić. IL-17 and Glutamate Excitotoxicity in the Pathogenesis of Multiple Sclerosis, *Scandinavian Journal of Immunology* 2014;79(3):181-186
6. A. Ignjatović, T. Cvetković, R. Pavlović, V. Đorđević, Z. Milošević, V. Đorđević, D. Pavlović, I. Stojanović, S. Živanović. ADMA and C-reactive protein as mortality

predictors in dialysis patients, *Central European Journal of Medicine* 2013;8(3):346-353

7. P. Džodić, Lj. Živanović, A. Protić, I. Ivanović, R. Veličković-Radovanović, M. Spasić, S. Lukić, S. Živanović. Development and validation of a solid phase extraction-HPLC method for the determination of carbamazepine and its metabolites, carbamazepine epoxide and carbamazepine trans-diol, in plasma, *Journal of the Serbian Chemical Society* 2012;77(10):1423-1436
8. S. Sunarić, J. Živković, R. Pavlović, G. Kocić, N. Trutić, S. Živanović. Assessment of alpha-tocopherol content in cow and goat milk from the Serbian market, *Hemijska Industrija* 2012;66(4):557-564
9. T. Cvetković, R. Pavlović, V. Đorđević, I. Stojanović, R. Veličković-Radovanović, A. Ignjatović, N. Stefanović, S. Živanović, V. Đorđević. Dimethylarginine - Biomarkers in Progression of Kidney Disease, *Journal of Medical Biochemistry* 2012;31(4):301-308

Rad u vodećem časopisu nacionalnog značaja (M51):

1. M. Kostić, B. Miladinović, M. Milutinović, S. Branković, S. Živanović, B. Zlatković, D. Kitić. Rosmarinic and caffeic acid content and antioxidant potential of the *Salvia aethiopis* L., *Acta Medica Medianae* 2017;56(3):121-128

Rad u časopisu nacionalnog značaja (M52):

1. P. Džodić, R. Veličković-Radovanović, A. Šmelcerović, A. Catić-Đorđević, N. Stefanović, A. Spasić, D. Ilić, S. Živanović, I. Ilijev. Validation of HPLC Method for the Determination of Mycophenolic Acid in Human Plasma Obtained From Renal Transplant Recipients, *Acta Medica Medianae* 2016;55(4):28-36
2. S. Živanović, R. Nikolić, G. Nikolić. **The Influence of Mg(II) and Ca(II) Ions on Rutin Autoxidation in Weakly Alkaline Aqueous Solutions**, *Acta Facultatis Medicae Naissensis* 2016;33(3):163-171
3. J. Tomović, A. Rančić, P. Vasiljević, P. Mašković, S. Živanović, N. Manojlović, M. Sovrlić. Antioxidant Activity of Lichen *Cetraria Aculeata*, *Praxis Medica* 2015;44(1):107-113

4. A. Catić-Đorđević, V. Nikolić, S. Živanović, N. Stefanović, R. Veličković-Radovanović. Carvedilol population pharmacokinetic analysis applied validation procedure, *Acta Medica Medianae* 2013;52(3):18-24
5. G. Nikolić, A. Veselinović, Ž. Mitić, S. Živanović. HPLC-DAD Study of Gallic Acid Autoxidation in Alkaline Aqueous Solutions and the Influence of Mg(II) Ion, *Acta Facultatis Medicae Naissensis* 2011;28(4):219-224

Saopštenja sa međunarodnog skupa štampana u celini (M33)

1. B. Miladinović, M. Kostić, M. Milutinović, D. Pavlović, S. Živanović, S. Branković, D. Stojanović, D. Kitić. Flavonoid content of black currant (*Ribes nigrum* L.) juices, *49th International congress, Days of preventive medicine*, Niš, Srbija, 2015; pp. 61-63

Saopštenja sa međunarodnog skupa štampana u izvodu (M34)

1. M. Kostić, M. Milutinović, S. Branković, B. Miladinović, N. Kitić, S. Živanović, D. Kitić. The content of total hydroxycinnamic acid derivatives and flavonoids in *Salvia nemorosa* L. extracts, *51. Internacionalni kongres, Dani preventivne medicine*, Niš, Srbija, 2017; p. 159
2. B. Miladinović, D. Stojanović, M. Kostić, S. Živanović, M. Milutinović, S. Branković, D. Kitić. Antioxidative activity and vitamin C content of red currant (*Ribes rubrum* L.) juices, *51. Internacionalni kongres, Dani preventivne medicine*, Niš, Srbija, 2017; p. 157
3. B. Miladinović, D. Stojanović, M. Kostić, S. Živanović, M. Milutinović, S. Branković, D. Kitić. Vitamin C content of white currant (*Ribes album* L.) juices and extracts, *50th Internacionalni kongres, Dani preventivne medicine*, Niš, Srbija, 2016; p. 85
4. B. Miladinović, M. Kostić, M. Milutinović, S. Branković, D. Pavlović, S. Živanović, D. Kitić. Antioxidative activity, total anthocyanins, polyphenols and tannins content of black currant (*Ribes nigrum* L.) variety Ben Sarek, *3rd Congress „Redox Medicine“: Reactive species signaling*, Niš, Srbija, 2015; p. 36
5. N. Trutić, R. Pavlović, S. Sunarić, J. Živković, S. Živanović, T. Jovanović, G. Kocić, Determination of betaine in commercial cow milk available on the Serbian market,

Proceedings of the 4th Workshop of Specific Methods for Food Safety and Quality, Beograd, Srbija, 2014; pp. 39-40

6. B. Miladinović, M. Kostić, S. Živanović, D. Stojanović, M. Milutinović, S. Branković, D. Kitić. Antioxidative potential and anthocyanin content of Black currant (*Ribes nigrum* L.) variety Ometa, *7th European Congress for Integrative Medicine*, Belgrade, Serbia, 2014; p. 418
7. S. Sunarić, M. Denić, G. Kocić, S. Živanović. Determination of riboflavin in pasteurized and UHT cow milk by HPLC with fluorescence detection, *16th European Conference on Analytical Chemistry-EUROanalysis*, Niš, Srbija, 2011; p. FA16
8. N. Stefanović, T. Cvetković, R. Veličković-Radovanović, V. Đorđević, N. Sladojević, A. Iganjatović, S. Živanović, R. Pavlović. Determination of C-reactive protein. Serum amyloid A and asymmetric dimethylarginine levels in patients on hemodialysis, *10th Congress BANTAO, Balkan Cities Association of Nephrology*, Грчка, 2011; p. 122

9. Izjave autora



ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Изјављујем да је докторска дисертација, под насловом

УТИКАЈ Mg(II) I Ca(II) JONA NA AUTOOKSIDACIJU *ORTO*-DIHIDROKSI FENOLNIH JEDINJENJA U VODENIM RASTVORIMA

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да ову дисертацију, ни у целини, нити у деловима, нисам пријављивао на другим факултетима, нити универзитетима;
- да нисам повредио ауторска права, нити злоупотребио интелектуалну својину других лица.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци, који су у вези са ауторством и добијањем академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада, и то у каталогу Библиотеке, Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Нишу, као и у публикацијама Универзитета у Нишу.

У Нишу, 02.07.2018.

Потпис аутора дисертације:

Славољуб Ц. Живановић



**ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНОГ И ЕЛЕКТРОНСКОГ ОБЛИКА
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Наслов дисертације:

**УТИКАЈ Mg(II) I Ca(II) JONA NA AUTOOKSIDACIJU *ORTO*-DIHIDROKSI
FENOLNIH JEDINJENJA U VODENIM RASTVORIMA**

Изјављујем да је електронски облик моје докторске дисертације, коју сам предао за уношење у **Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу**, истоветан штампаном облику.

У Нишу, 02.07.2018.

Потпис аутора дисертације:

Славољуб Ц. Живановић



ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Никола Тесла“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу унесе моју докторску дисертацију, под насловом:

UTICAJ Mg(II) I Ca(II) JONA NA AUTOOKSIDACIJU ORTO-DIHIDROKSI FENOLNIH JEDINJENJA U VODENIM RASTVORIMA

Дисертацију са свим прилозима предао сам у електронском облику, погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију, унету у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, могу користити сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons), за коју сам се одлучио.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прераде (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

У Нишу, 02.07.2018.

Потпис аутора дисертације:

Славољуб Ц. Живановић