



УНИВЕРЗИТЕТ У НИШУ
ТЕХНОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ ЛЕСКОВАЦ



Јелена С. Станојевић

**ФОТОСЕНЗИБИЛИЗОВАНА ОКСИДАЦИЈА
ЛИПИДА У РАСТВОРУ ИНДУКОВАНА
КОНТИНУАЛНИМ UV-СТРЕСОМ У ПРИСУСТВУ
КВЕРЦЕТИНА**

ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

Лесковац, 2017.



UNIVERSITY OF NIŠ
FACULTY OF TECHNOLOGY LESKOVAC



Jelena S. Stanojević

**PHOTOSENSITIZED LIPID OXIDATION IN
SOLUTION INDUCED BY CONTINUOUS UV-STRESS
IN THE PRESENCE OF QUERCETIN**

DOCTORAL DISSERTATION

Leskovac, 2017.

Подаци о докторској дисертацији

Ментор: др Драган Цветковић, доцент
Технолошки факултет у Лесковцу, Универзитет у Нишу

Наслов: Фотосензибилизована оксидација липида у раствору индукована континуалним UV-стресом у присуству кверцетина

Резиме: Циљ ове докторске дисертације је био проучавање UV(-А и -В) индукованог процеса липидне пероксидације сензибилизованог синтетским (бензофенон) и ендогеним фотосензибилизаторима (билирубин, рибофлавин) у присуству кверцетина као антиоксиданса. Смеша фосфолипида је коришћена као „заштитна мета” а процес је праћен у најједноставнијем могућем систему – метанолном раствору. Фотодеградација сензибилизатора и кверцетина уз последични настајак њихових деградационих продуката како када су појединачно тако и у међусобним смешама али и у смешама са фосфолипидима, где поред поменутих процеса долази и до продукције пероксида, је праћена RP-HPLC хроматографијом. Недвосмислену идентификацију продуката деградације је омогућила UHPLC-ESI-MS техника док су слободно-радикалске врсте идентификоване EPR спектроскопијом. Бензофенон се показао фотостабилним, билирубин фотодеградацијом даје биливердин и дипироле док су главни деградациони производи рибофлавина лумихром и лумифлавин. Увид у механизам и контролу процеса липидне пероксидације пружа тест „конјуговани диени”, праћењем сигнала на 234 nm (таласна дужина максимума апсорбације конјугованих диенских структура). Као типичан Тип I сензибилизатор бензофенон генерише супероксид радикал анјон, док рибофлавин мешаним Тип I и II механизмима поред супероксида генерише и синглетни кисеоник. Озрачивањем смеше рибофлавина и билирубина је на индиректан начин доказано да је билирубин типичан Тип II сензибилизатор. Фотосензибилизаторска способност проучаваних сензибилизатора опада у низу: рибофлавин > бензофенон > билирубин. Кверцетин се у проучаваном систему показао ефикасним антиоксидансом који на рачун сопствене деградације испољава своју превентивну активност (преко апсорпције UV зрачења), „хватањем” генерисаних супероксид радикал анјона, синглетног кисеоника и липидних пероксида прекида ланчану реакцију липидне пероксидације а поред свега још и ефикасно „гаси” ексцитована триплетна стања сензибилизатора (пре свега бензофенона и рибофлавина).

Научна област: Технолошко инжењерство
Ужа научна област: Хемија и хемијске технологије

Кључне речи:

Фотохемија, Бензофенон, Рибофлавин, Билирубин, Кверцетин,
UV озрачивање, Липидна пероксидација

УДК:

577.125:577.34

CERIF
класификација:

P 402 Фотохемија

Тип лиценце
Креативне
заједнице:

CC BY-NC-ND

Data on Doctoral Dissertation

Doctoral Supervisor:	dr Dragan Cvetković, assistant professor Faculty of Technology Leskovac, University of Niš
Title:	Photosensitized lipid oxidation in solution induced by continuous UV-stress in the presence of quercetin
Abstract:	<p>The aim of the present PhD thesis was to study UV(-A and -B) induced lipid peroxidation sensitized by synthetic (benzophenone) and endogenous photosensitizers (bilirubin, riboflavin) in the presence of quercetin as antioxidant. Phospholipid mixture was used as a "protective target" and the whole process was followed in the simplest possible system – methanolic solution.</p> <p>Photodegradation of sensitizers and quercetin with the consequent occurrence of their degradation products both individually and in the mutual mixture, as well as in the mixture with phospholipids (where beside the mentioned processes peroxides production occurs), was followed by RP-HPLC chromatography. Unambiguous identification of degradation products was enabled by UHPLC-ESI-MS technique while free radical species were identified by EPR spectroscopy.</p> <p>Benzophenone was photostable, photodegradation of bilirubin gave biliverdin and dipiroles while main degradation products of riboflavin were lumichrome and lumiflavin. Insight into the mechanism and control of lipid peroxidation provided "conjugated diene" assay, by following the signal at 234 nm (the absorption maximum of conjugated diene structures). As typical Type I sensitizer, benzophenone generated superoxide radical anion, while riboflavin generated both superoxide and singlet oxygen by mixed Type I and II mechanisms. Irradiation of bilirubin-riboflavin mixture showed, in the indirect way, that bilirubin is typical Type II sensitizer. Photosensitizing capability of the studied sensitizers decreases in the order: riboflavin > benzophenone > bilirubin. Quercetin exhibited efficient antioxidant activity, mediated by its own degradation, in terms of its preventive (absorbing UV radiation), chain-breaking activities (scavenging of generated superoxide radical anion, singlet oxygen and lipid peroxides) and besides all this effectively quenched triplet excited states of sensitizers (first of all benzophenone and riboflavin).</p>
Scientific Field:	Technological engineering
Scientific Discipline:	Chemistry and chemical technology
Key Words:	Photochemistry, Benzophenone, Riboflavin, Bilirubin, Quercetin, UV irradiation, Lipid peroxidation

UDC: 577.125:577.34

CERIF
Classification: P 402 Photochemistry

Creative
Commons
License Type: **CC BY-NC-ND**

Посвећено проф. Дејану Марковићу[†] и мојим родитељима, Анкици и Слободану, без чије љубави, васпитања и ветра у леђа не бих била оно што данас јесам.

ИЗРАЗИ ЗАХВАЛНОСТИ

Израда ове докторске дисертације је реализована у оквиру пројекта ТР-34012 („Биљни и синтетички биоактивни производи новије генерације”) који финансира Министарство просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије.

Експериментални део, који се тиче хроматографске анализе, је урађен у Лабораторији за физичко-хемијска испитивања и Лабораторији за масену спектрометрију Технолошког факултета у Лесковцу. Велику захвалност дугујем стручном сараднику Ивани Вучковић на несебичној помоћи и указаном поверењу током рада на HPLC хроматографу.

Генерисане слободно-радикалске врсте су идентификоване EPR спектрима снимљеним у Лабораторији за EPR спектроскопију Факултета за физичку хемију, Универзитета у Београду. Посебну захвалност дугујем др Милошу Мојовићу, ванредном професору на пријатној радној атмосфери, издвојеном времену и помоћи око снимања спектра и интерпретације добијених резултата.

Без помоћи др Јелене Звездановић, доцента Технолошког факултета у Лесковцу, дисертација не би била оваква каква јесте. Хвала јој на посвећености и креативности током извођења LC-MS експеримената и интерпретације добијених резултата.

Неизмерну захвалност дугујем доцентима Технолошког факултета у Лесковцу: ментору, др Драгану Цветковићу и др Љиљани Станојевић на доброту, племенитости и безусловној помоћи приликом превазилажења бројних експерименталних потешкоћа. Својом подршком су допринели да стремим напред и истрајем чак и у најтежим тренуцима. Заувек сам ваш дужник.

Посебно сам захвална проф. Милораду Цакићу, редовном професору Технолошког факултета у Лесковцу и др Андрији Шмелцеровићу, ванредном професору Медицинског факултета у Нишу на пажљивом читању дисертације, примедбама и сугестијама које су је додатно обогатиле. Све евентуалне грешке су само моје.

Искрену и најтоплију захвалност дугујем проф. Дејану Марковићу[†], идејном творцу овог рада који ме је увео у „свет хроматографије” и научио свему што знам. Надам се да сам му осветлала образ...

Велико хвала свим блиским, драгим људима који су имали разумевања за моју посвећеност, ентузијазам и перфекционизам.

На крају хвала мом Марјану на разумевању, стрпљењу и непоколебљивој подршци током свих ових година.

Јелена Станојевић

САДРЖАЈ

1 УВОД	1
2 ТЕОРИЈСКИ ДЕО	4
2.1 „Друга страна дуге” – UV зрачење и његови ефекти на кожу.....	4
2.2 Биљке и UV стрес.....	8
2.3 Живот са слободним радикалима.....	11
2.3.1 Кисеоник и реактивне кисеоничне врсте.....	11
2.4 Антиоксиданси.....	15
2.4.1 Флавоноиди.....	16
2.4.1.1 Кверцетин.....	19
2.4.2 Флавоноиди као антиоксиданси.....	21
2.4.2.1 Веза између структуре и активности (SAR) флавоноида.....	21
2.4.2.2 Прооксидативна активност.....	22
2.4.3 Спектралне карактеристике флавоноида.....	24
2.5 Основи фотохемије.....	25
2.5.1 Подсетник из квантне механике.....	26
2.5.2 Селекциона правила.....	28
2.5.2.1 Селекциона правила за електронске прелазе у атомима.....	29
2.5.2.2 Селекциона правила за електронске прелазе у молекулима.....	31
2.5.3 Номенклатура електронских прелаза.....	33
2.5.4 Једномолекулски фотофизички и фотохемијски процеси.....	34
2.7 Механизам фотосензибилизоване реакције.....	37
2.8 Липидна пероксидација.....	40
2.8.1 Липиди – особине, структура, класификација.....	40
2.8.2 Механизам липидне пероксидације.....	42
2.8.3 Инхибиција аутооксидације липида.....	45
2.8.3.1 Флавоноиди као <i>chain-breaking</i> антиоксиданси.....	45
2.8.3.2 Фотосензибилизована липидна пероксидација.....	46
2.8.4 Производи липидне пероксидације.....	47
2.8.5 Мерење интензитета липидне пероксидације.....	48
2.9 Фотосензибилизатори.....	48
2.9.1 Бензофенон.....	49
2.9.1.1 Фотохемија бензофенона.....	51
2.9.2 Билирубин – пријатељ или непријатељ?.....	52
2.9.2.1 Фототерапија.....	55
2.9.2.2 Билирубин као фотосензибилизатор.....	57
2.9.3 Витамини.....	57
2.9.3.1 Рибофлавин.....	58

2.9.3.2 Фотохемија рибофлавина	60
3 КОРИШЋЕНЕ МЕТОДЕ	62
3.1 Основи HPLC хроматографије	62
3.2 Основи UHPLC-ESI-MS технике.....	66
3.2.1 Механизам електроспреј јонизације	68
3.2.2 MS/MS концепт и принцип рада јонског трапа као масеног анализатора.....	71
3.2.3 Предности масеног детектора.....	72
3.3 Теоријске основе EPR спектроскопије.....	72
3.3.1 Zeeman-ов ефекат	74
3.3.2 <i>g</i> -фактор	75
4 ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО	78
4.1 Припрема узорака	78
4.2 UV озрачивање	79
4.3 HPLC хроматографија	81
4.4 Електроспреј јонизација (ESI)-масена спектрометрија (MS).....	84
4.5 UHPLC хроматографија-ESI-MS спектрометрија.....	85
4.6 EPR спектроскопија	87
5 РЕЗУЛТАТИ	89
5.1 UV индуковане промене смеше BZP-QC-PL90.....	89
5.1.1 RP-HPLC анализа смеше BZP-QC-PL90	89
5.1.2 FI-ESI-MS анализа смеше BZP-QC	105
5.1.3 EPR <i>spin trapping</i> анализа смеше BZP-QC.....	108
5.2 UV индуковане промене смеше BRB-QC-PL90.....	109
5.2.1 RP-HPLC анализа смеше BRB-QC-PL90	109
5.2.2 UHPLC-ESI-MS анализа BRB-а.....	122
5.3 UV индуковане промене смеше RFL-QC-PL90.....	128
5.3.1 RP-HPLC анализа смеше RFL-QC-PL90	128
5.3.2 UHPLC-ESI-MS анализа смеше RFL-QC.....	143
5.3.3 EPR <i>spin trapping</i> анализа смеше RFL-QC.....	149
5.4 UV индуковане промене „бинарне” смеше	150
5.4.1 RP-HPLC анализа „бинарне” смеше.....	150
5.5 UV индуковане промене „тернарне” смеше	168
5.5.1 RP-HPLC анализа „тернарне” смеше	168
6 ДИСКУСИЈА	174
6.1 UV индуковане промене смеше BZP-QC-PL90.....	174
6.1.1 UV индуковани <i>bleaching</i> BZP-а у метанолу.....	174
6.1.2 Кверцетин као антиоксиданс	177

6.1.2.1 UV-индуковани <i>bleaching</i> QC-а у метанолу: мера „превентивне” АО активности QC-а.....	178
6.1.2.2 Идентификација деградационих производа QC-а ESI-MS техником	184
6.1.3 UV индуковане промене смеше BZP-PL90 у метанолу.....	190
6.1.4 Антиоксидативна активност QC-а у смеши са липидима: мера АО <i>chain-breaking</i> активности QC-а.....	194
6.1.5 Супресија антиоксидативне активности QC-а бензофеноном.....	196
6.2 Идентификација слободних радикала EPR <i>spin trapping</i> методом.....	200
6.3 Дејство UV зрачења на смешу BRB-QC-PL90	204
6.3.1 Интеракција BRB-а са UV зрачењем – пресек стања	204
6.3.2 (Не)стабилност BRB-а у раствору	206
6.3.3 Фотохемија BRB-а	208
6.3.4 UV индуковани <i>bleaching</i> BRB-а у метанолу	212
6.3.5 UV индуковани <i>bleaching</i> QC-а у смеши BRB-QC-PL90 – <i>blank</i> експеримент	214
6.3.6 Билирубин као фотосензибилизатор у смеши са фосфолипидима	216
6.3.7 UV индуковане промене смеше BRB-QC-PL90.....	218
6.3.8 Идентификација деградационих производа BRB-а UHPLC-ESI-MS техником	219
6.4 Дејство UV зрачења на смешу RFL-QC-PL90.....	224
6.4.1 Ефекат UV зрачења на RFL.....	224
6.4.2 UV индуковани <i>bleaching</i> QC-а у смеши RFL-QC-PL90: <i>blank</i> експеримент	228
6.4.3 UV индуковане промене смеше RFL-QC.....	229
6.4.4 UV индуковани <i>bleaching</i> RFL-а у смеши са фосфолипидима.....	231
6.4.5 UV индуковане промене смеше RFL-QC-PL90.....	233
6.4.6 Идентификација деградационих производа смеше RFL-QC UHPLC-ESI-MS техником	234
6.5 Дејство UV зрачења на „бинарну” и „тернарну” смешу	240
6.5.1 UV индуковане промене смеше BRB-RFL	240
6.5.2 UV индуковани <i>bleaching</i> QC-а у „бинарној” смеши: <i>blank</i> експеримент.....	242
6.5.3 UV индуковане промене смеше BRB-RFL-QC	243
6.5.4 UV индуковане промене смеше BRB-RFL-PL90	244
6.5.5 UV индуковане промене „бинарне” смеше	246
6.5.6 Антиоксидативна активност QC-а у „бинарној” смеши	247
6.5.7 UV индуковане промене „тернарне” смеше	248
7 ЗАКЉУЧЦИ.....	250
ЛИТЕРАТУРА.....	258
БИОГРАФИЈА	276
БИБЛИОГРАФИЈА.....	277

ЛИСТА РЕЛЕВАНТНИХ СКРАЋЕНИЦА И СИМБОЛА

AIBN	2,2'-азобис(2-метилпропионитрил)
ATP	аденозин трифосфат
BRB	билирубин
BVD	биливердин
BZP	бензофенон
BZPH [•]	бензофенон кетил радикал
<i>c</i>	концентрација апсорбујуће врсте
CAT	каталаза
CFCs	<i>Chlorofluorocarbons</i> , хлорофлуороугљеници
CID	<i>Collision Induced Dissociation</i> , сударима индукована фрагментација
Co-Q ₁₀	коензим Q ₁₀
CXL	<i>Corneal Collagen Crosslinking</i> , унакрсно повезивање колагена рожњаче
DABCO	1,4-диазабцикло[2,2,2]октан
DAD	<i>Diode Array Detector</i> , детектор на бази умрежених фотодиода
DEPMPO	5-(диетоксифосфорил)-5-метил-1-пиролин-N-оксид
ДНК	дезоксирибонуклеинска киселина
DPPH	2,2-дифенил-1-пикрилхидразил
EM	електромагнетни спектар зрачења
EPR	<i>Electron Paramagnetic Resonance</i> , електрон-парамагнетна резонанција
ESI-MS	<i>Electrospray Ionization-Mass Spectrometry</i> , електроспреј јонизација-масена спектрометрија
Φ	квантни принос
FAD	флавин аденин динуклеотид
FIO [•]	флавоноидни фенокси радикал
FIOH	флавоноид
FMF	формил-метил-флавин
FMN	флавин мононуклеотид
FR	<i>Far-Red radiation</i> (~700-800 nm), далеко-црвено зрачење
FT-IR	инфрацрвена спектроскопија са <i>Fourier</i> -овом трансформацијом
GC-MS	<i>Gass Chromatography-Mass Spectrometry</i> , гасна хроматографија-масена спектрометрија
GSH	редуковани глутатион
H ₂ O ₂	водоник пероксид

HCFCs	<i>Hydrochlorofluorocarbons</i> , хлорофлуороугљоводоници
4-HNE	4-хидроксиноненал
HO [•]	хидропероксилни радикал
HOCl	хипохлорна киселина
HOMO	<i>Highest Occupied Molecular Orbital</i> , енергетски највиша попуњена орбитала
HPLC	<i>High Pressure Liquid Chromatography</i> , течна хроматографија под високим притиском
IC	<i>Internal Conversion</i> , унутрашња конверзија
IR	<i>InfraRed radiation</i> , инфрацрвено зрачење (780 nm-1 mm)
ISC	<i>Intersystem Crossing</i> , интерсистемски прелаз
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i> , Међународна унија за чисту и примењену хемију
$\lambda_{det.}$	таласна дужина детекције
L [•]	липидни радикал
LC	лумихром
LC-MS	<i>Liquid Chromatography-Mass Spectrometry</i> , течна хроматографија-масена спектрометрија
LF	лумифлавин
LH	липид
ЛП	липидна пероксидација
LUMO	<i>Lowest Unoccupied Molecular Orbital</i> , енергетски најнижа слободна молекулска орбитала
MeOH	метанол
MDA	малондиалдехид
МО	молекулска орбитала
NAD(P)H	никотинамид аденин динуклеотид (фосфат)
Na ₂ CO ₃	натријум карбонат
NaN ₃	натријум азид
NH ₄ OH	амонијум хидроксид
NL	неоксидовани липиди
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy</i> , нуклеарна магнетно-резонантна спектроскопија
NP-HPLC	<i>Normal Phase High Performance Liquid Chromatography</i> , течна хроматографија под високим притиском нормалних фаза
O ₂ ^{•-}	супероксид радикал анјон
¹ O ₂	молекулски кисеоник у синглетном стању
³ O ₂	молекулски кисеоник у триплетном стању
O ₃	озон

$\cdot\text{OH}$	хидрокси радикал
$-\text{OH}$	хидроксилна група
ONOO^-	пероксинитрит
PAR	<i>Photosynthetically Active Radiation</i> , фотосинтетски активно зрачење (400-700 nm)
PDT	<i>Photo Dynamic Therapy</i> , фотодинамичка терапија
PL90	Phospholipon 90 [®] , фосфолипидна смеша
ПНМКе	<i>Polyunsaturated Fatty Acids (PUFAs)</i> , полинезасићене масне киселине
QC	кверцетин
RFL	рибофлавин
$\text{RO}\cdot/\text{LO}\cdot$	алкокси радикал
$\text{ROO}\cdot/\text{LOO}\cdot$	перокси радикал/липидни перокси радикал
ROOH/LOOH	хидропероксид/липидни хидропероксид
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> , реактивне кисеоничне врсте
RP-HPLC	<i>Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography</i> , течна хроматографија под високим притиском обрнутих фаза
S_0	основно синглетно стање
$\text{S}_1, \text{S}_2, \dots$	прво, друго, ... ексцитовано синглетно стање
SAR	<i>Structure Activity Relationship</i> , однос структуре и активности
SOD	супероксид дизмутаза
$\text{T}_1, \text{T}_2, \dots$	прво, друго, ... ексцитовано триплетно стање
TBA	тиобарбитурна киселина
TEMP	2,2,6,6-тетраметилпиперидин
TEMPO	2,2,6,6-тетраметил-пиперидин-1-оксил
$t_{1/2}$	време полу-живота (s)
$t_{\text{irr.}}$	време UV-озрачивања (min)
$t_{\text{ret.}}$	ретенционо време (min)
UHPLC	<i>Ultra High Performance Liquid Chromatography</i> , течна хроматографија изузетних могућности
UV	ултраљубичасто (<i>UltraViolet</i>) зрачење (100-400 nm)
UV-A	ултраљубичасто-A зрачење (320-400 nm)
UVA-1	ултраљубичасто A-1 зрачење (340-400 nm)
UVA-2	ултраљубичасто A-2 зрачење (320-340 nm)
UV-B	ултраљубичасто-B зрачење (280-320 nm)
UV-C	ултраљубичасто-C зрачење (100-280 nm)
UV-VIS	спектроскопија у ултраљубичастој и видљивој области
VIS	видљива светлост (400-800 nm)

1 УВОД

„Ако ћеш да покушаш, иди до краја. Иначе немој ни почињати.”
Charles Bukowski

У последњих неколико декада, учесталост појаве различитих поремећаја повезаних са повећаним (продуженим) излагањем дејству сунчевог зрачења, а посебно његовој најенергетичнијој фракцији, ултраљубичастом (UV) зрачењу је алармантно порасла и наставља даље да расте. Хронично излагање организма, посебно коже, дејству UV зрачења побуђује велики број биолошких одговора, укључујући развој еритема (црвенила), едема (отока), опекотина, хиперплазија (задебљање површинског слоја коже – *epidermis*-а), имуносупресије, оштећења ДНК, фотостарење и меланогенезу. Све ове промене су директно или индиректно укључене у развој канцера коже.

Ултраљубичасто зрачење је врло моћан иницијатор бројних фотохемијских реакција – посебно кад се упореди са мање енергетичним зрачењем из видљивог (VIS) дела сунчевог спектра. Предуслов за овако нешто је најпре ексцитација (побуђивање) датог молекула тако да апсорпцијом зрачења надмаши енергетски ниво тзв. „активираниог комплекса” или прелазног стања, што узрокује деградацију датог једињења и последично формирање примарних и секундарних фотохемијских продуката, неретко уз пратећу продукцију и учешће тзв. слободних радикала. Екситовани молекул се међутим не мора нужно распасти апсорпцијом UV-зрачења, већ се може вратити до основног, непобуђеног стања, кроз серију интрамолекулских конкурентних дезактивационих процеса, а може и предати свој „екситон” суседном молекулу, тј. побудити га или „сензибилизovati”. Ова последња могућност се везује за тзв. фотосензибилизаторе, молекуле који омогућавају одигравање хемијских реакција које су мало вероватне у њиховом одсуству. У том смислу фотосензибилизација представља један посебан вид катализоване (фото)хемијске реакције.

У биолошким системима, апсорбована сунчева светлост, па и њена најреактивнија UV-компонента може интераговати са ендогеним фотосензитивним молекулима и/или са егзогеним фотосензибилизаторима који потичу из лекова или козметичких састојака. Ове интеракције могу за последицу имати директну или индиректну појаву штетних цитотоксичних и генотоксичних ефеката.

Слободни радикали, природно присутни у организму, у његовим ткивима и органима најчешће садрже кисеоник и познати су под називом реактивне кисеоничне врсте или ROS (енг. *Reactive Oxygen Species*). Врло су реактивни, доводе до бројних ефеката, од којих су многи штетни, а неки, нарочито на дужи рок, и фатални. Уколико се у датом временском року не успостави адекватан биланс стварања и уклањања ових реактивних врста, долази до поремећаја у организму. Тако оксидација тиолних група многих протеина (ензима) доводи до промене њихове активности, док је процес оксидације незасићених компоненти мембранских липида, тзв. липидну пероксидацију, као феномен од глобалног значаја (јер се одиграва у свим мембранама и ткивима), немогуће спречити, већ само евентуално контролисати. Липидна пероксидација се одвија управо (и најчешће) уз активно учешће ROS врста, мада су, неретко, иницијатори и ендогени сензибилизатори. Неки од ових сензибилизатора су присутни у поткожним слојевима и могу се активирати апсорпцијом сунчеве светлости.

Штетно дејство слободних радикала могу, међутим, блокирати антиоксидативни агенси који их „хватају” и детоксикују организам. Велики број фенолних једињења присутних у храни поседује добре антиоксидативне особине са флавоноидима као најрепрезентативнијим примером. Ова теза се једним својим делом бави проучавањем антиоксидативних (тзв. превентивних и *chain-breaking*) особина представника флавоноида из групе флавонола – кверцетина, у процесу фотосензибилизације липидне пероксидације индуковане UV зрачењем.

Циљ ове докторске дисертације је заправо проучавање интерактивног понашања ефикасних UV-апсорбера, природно присутних у *stratum*-у коже, у условима континуалног UV-озрачивања у раствору – дакле у једном врло симплификованом систему у односу на реалну ситуацију. Изабрани UV-апсорбери функционишу пре свега као фотосензибилизатори (бензофенон, билирубин, рибофлавин), или као антиоксиданси (кверцетин), док је као „заштитна мета” (у односу на коју се процењује сензибилизација, односно антиоксидативна активност) изабрана смеша фосфолипида, у којој партиципирају и засићени и незасићени липиди.

За разлику од реалне (*in situ*) ситуације, проучаваном систему (фотосензибилизатор + антиоксиданс + липиди) је „одузета” молекуларна организација као и велики део реалног хемијског састава (у *stratum*-у коже су присутни и многи други UV-пигменти, попут меланина, и уопште многи други молекули, попут протеина итд.). То се може третирати као недостатак овог приступа, али је на другој страни

његова предност у томе што се добијају знатно јаснији („чистији”) резултати који се тичу инхерентног понашања сваког од ових UV-апсорбера у односу на продужени UV-стрес – дакле у одсуству бројних осталих учесника *in situ* система (*stratum* коже), који ово понашање чине тежим за детекцију, а још више за интерпретацију. Циљ је проучавање њихове међусобне интеракције у систему (фотосензибилизатор + антиоксиданс + липиди), и то динамички гледано, кроз след догађаја, иницирање (фотосензибилизатор) – контрола (антиоксиданс) – заштита (изабране „мете”, липида, од ефеката индукованог UV-стреса), за сваки од изабраних фотосензибилизатора. За оцену тзв. „комбинованог ефекта” студија је спроведена у истовременом присуству два („бинарна” смеша) и три („тернарна” смеша) фотосензибилизатора.

Праћење фотодградације појединих компонената (фотосензибилизатор, антиоксиданс, фосфолипиди) у метанолу, како самих тако и у одговарајућим смешама (фотосензибилизатор-антиоксиданс, фотосензибилизатор-фосфолипиди, антиоксиданс-фосфолипиди и фотосензибилизатор-антиоксиданс-фосфолипиди) је, у овом раду, засновано на њиховом раздвајању од потенцијалних фотопродуката насталих као последица континуалног UV(-A и -B) озрачивања RP-HPLC хроматографијом, као најпогоднијом аналитичком техником за квалитативну и квантитативну анализу овако комплексних смеша. За недвосмислену идентификацију продуката је коришћена UHPLC-ESI-MS метода. На основу добијених ESI-MSⁿ спектра и литературно доступних фрагментационих шема, предложене су структуре фотопродуката. Присуство и идентификацију одговарајућих ROS врста је омогућила EPR *spin-trapping* метода и спектрална симулација.

Крајњи домет ове докторске дисертације се тиче не само анализе и закључака добијених на основу истраживања проучаваног система (фотосензибилизатор + антиоксиданс + липиди), него и евентуалне интерполације изведених закључака на постојеће *in vivo* студије које се тичу одговора пигмената коже на продужено излагање дејству природне сунчеве светлости, и у оквиру ње присутних UV-A и UV-B фракција.

2 ТЕОРИЈСКИ ДЕО

„Крађа нечије идеје је плагијат, крађа од многих је истраживање.”
Wilson Mizner

2.1 „Друга страна дуге” – UV зрачење и његови ефекти на кожу

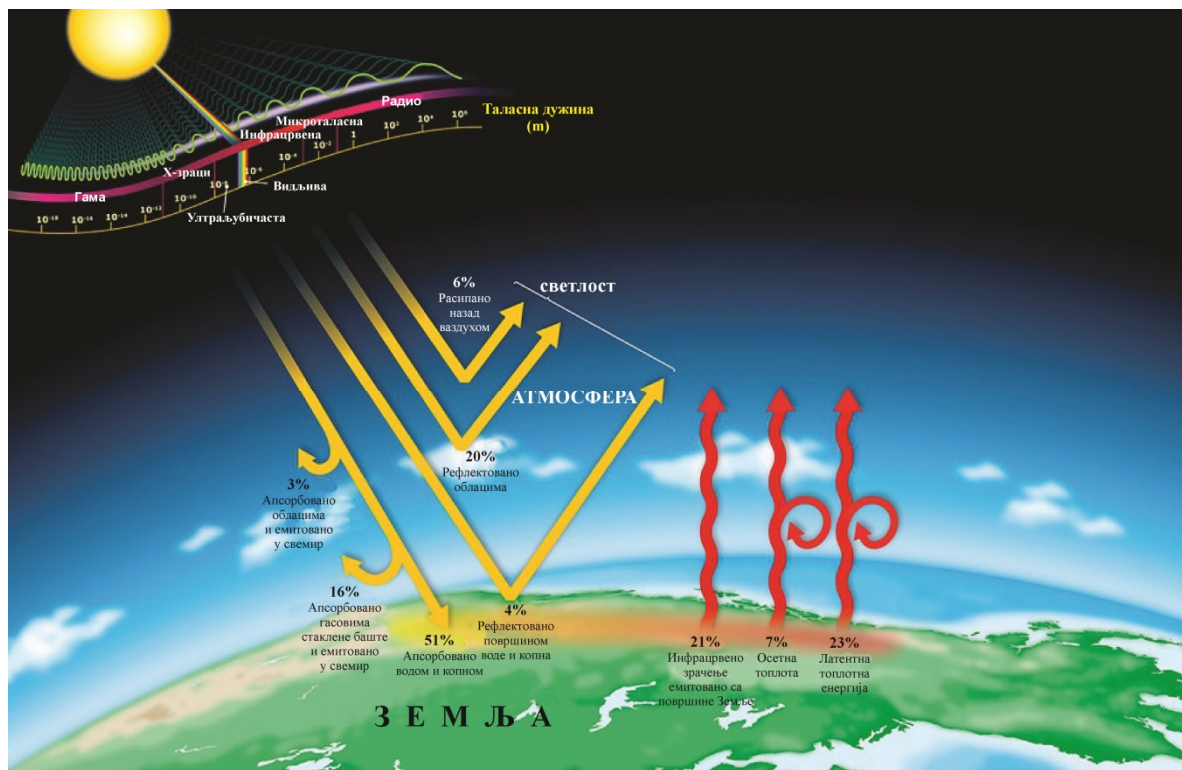
Откад је света и века, човек је у сталној потрази за „еликсиром младости” не би ли коначно открио тајну дуговечности. И заиста, као комплексан, прогресиван и неминован биолошки процес, феномен старења је одувек опчињавао научнике широм света. Постоје два типа старења: „унутрашње” (хронолошко) и „спољашње” (превремено). „Унутрашње” старење се не може контролисати, генетски је предодређено и развија се са годинама. „Спољашње” старење међутим, настаје због различитих фактора (стресора) из спољашње средине у које, између осталог, спадају: екстремне промене температуре, влажност ваздуха, дувански дим и најбитније – излагање Сунцу (Shah and Mahajan, 2013; Mukherjee *et al.*, 2011; Pimple and Badole 2013).

Сунце емитује електромагнетно (EM) зрачење у области таласних дужина од $<0,1 \text{ nm}$ (гама зрачење), преко X-(рентгенских) зрака, ултраљубичастог (*Ultraviolet*, UV), видљивог (*Visible spectrum*, VIS), инфрацрвеног (*Infrared*, IR¹) зрачења и микроталаса, све до $>1 \text{ mm}$ (радио таласи) (Сл.1) (Schade *et al.*, 2005). До површине Земље перманентно допиру фотони сунчеве светлости са уделом инфрацрвене (780 nm-1 mm) од око 56%, видљиве (400-780 nm) око 39% и UV светлости (290-400 nm) од око 5% (González *et al.*, 2008; Afaq, 2011). Људско око детектује светлост из видљивог дела спектра захваљујући конусним неуронима осетљивим и специјализованим за разликовање боје док рецептори у кожи и слузокожи омогућавају детекцију IR зрака као топлоту (Cho *et al.*, 2009). Тело међутим нема специјализоване сензоре за UV зрачење које, иако је у сунчевом спектру зрачења које допире до површине Земље заступљено у најмањем степену, представља његову најенергетичнију компоненту, штетну по читав живи свет на планети.

¹ IR зрачење се дели на: блиску, IR-A (780-1440 nm), средњу, IR-B (1440-3000 nm) и далеку, IR-C (3000 nm-1 mm) област.

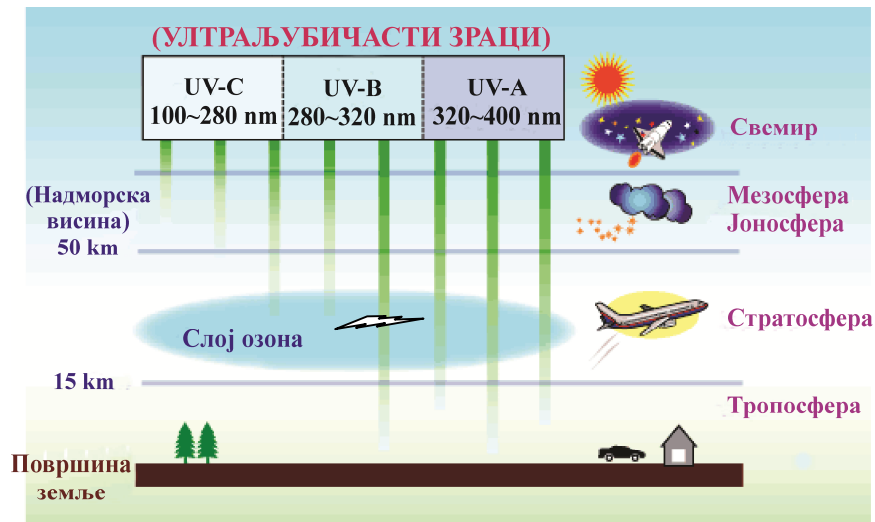
Ултраљубичасто зрачење припада не-јонизујућем делу ЕМ спектра у опсегу таласних дужина од 100 nm до 400 nm (таласна дужина од 100 nm је арбитрарно одабрана као граница између јонизујућег и не-јонизујућег зрачења). Конвенционално се дели на 3 под-области: UV-A (320-400 nm), UV-B (280-320 nm) и UV-C (100-280 nm) (Сл.2). У скорије време је усвојена још и подела UV-A зрачења на UVA-1 (340-400 nm) и UVA-2 (320-340 nm) (Bachelor and Bowden, 2004; IARC, 2006; Radka, 2010).

Средина '70-их година прошлог века је са собом донела поражавајуће откриће да је човек главни кривац за два врло озбиљна проблема са којима се планета Земља суочава – оштећењем озонског омотача и глобалним загревањем.



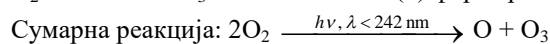
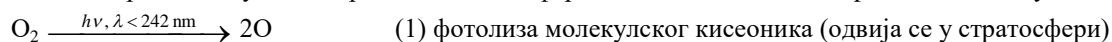
Слика 1 Трансфер енергије између Сунца и Земље. Земљина атмосфера рефлектује око 30% упадног сунчевог зрачења назад у свемир, док остатак пада на тло и загрева га. Тло потом ре-емитује IR зраке назад и природа је у равнотежи. Ако у атмосфери има гасова који апсорбују IR зраке, тзв. „гасови стаклене баште” (хлорофлуороугљеници (CFCs), хлорофлуороугљоводоници (HCFCs), угљен диоксид (CO₂), метан (CH₄), водена пара и азот субоксид (N₂O)), топлотна енергија остаје „заробљена” па се температура на површини Земље повећава (тзв. „ефекат стаклене баште”) узрокујући глобално загревање, што „на дужи стазе” има за последицу промену климе (Bolaji and Huan, 2013; Bruhn *et al.*, 2014).
(<http://content3.jason.org/common/uploads/publiccuploads/cutesoft/transerofenergy.jpg>)

Земља је једина планета сунчевог система на којој је живот могућ захваљујући невидљивом „штиту” смештеном у стратосфери (на висини од 15-50 km) – озонском² омотачу (Сл.2) који „филтрира” UV зрачење у потпуности апсорбујући изузетно штетне UV-C зраке, добар део UV-B (70-90%) и незнатну количину UV-A зрака, чиме штити читав живи свет од мутагених ефеката UV светлости (тзв. „добри озон”³) (Сл.2) (Young, 2006; IARC, 2006).

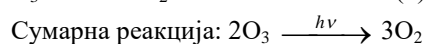
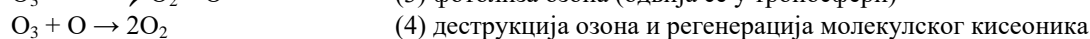
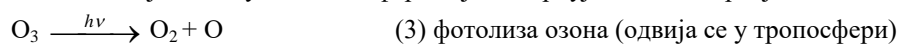


Слика 2 Озонски омотач – чувар живота на Земљи. Халоугљеници, посебно хлорофлуороугљеници (CFCs) интензивно коришћени раних ’70-их година 20. века као расхладни медијум у фрижидерима и клима уређајима, пропеленти у парфемима, дезодорансима, лаковима за косу итд. се, као инертни молекули, не разграђују у тропосфери па постепено дифундују у стратосферу (Kane, 2008). UV-C зрачење у стратосфери их фотолизује што, између осталог, за последицу има стварање атома хлора (радикала) који везује кисеоник из озона, редукујући га до молекулског кисеоника. Само један атом хлора уништава чак 100 000 молекула озона (Bołaji and Huan, 2013; McFarland and Kaye, 1992) а смањење концентрације озона од 1% (и појава тзв. „озонских рупа”) има за последицу повећање флукса UV-B зрачења које допире до површине Земље од 2% (Hui *et al.*, 2015).

² Озон настаје у стратосфери, слоју атмосфере на висини од 17-50 km изнад површине Земље, дејством високоенергетског сунчевог зрачења на атмосферски кисеоник током Чарпан-овог циклуса:



M – било који молекул из атмосфере који апсорбује вишак енергије.

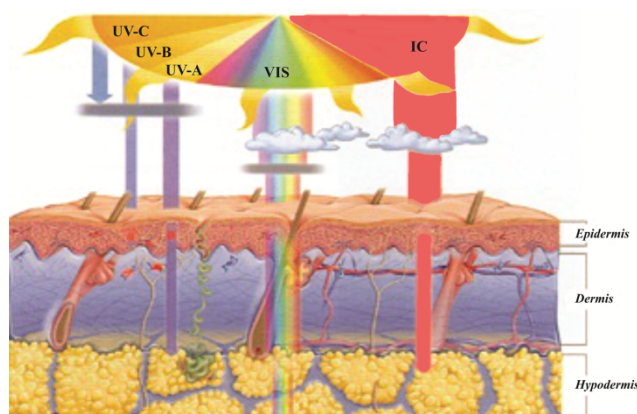


³ Молекул озона награђен у тропосфери представља главни полутант и једну од најважнијих компонената фотохемијског смога („лош озон”). Настаје и у близини електричних уређаја па у слабо проветреним просторијама може узроковати одређене здравствене проблеме (повећати ризик од напада астме и надражаја респираторног система, допринети срчаним нападима и можданим ударима) (Pruog *et al.*, 2006; Li, 2011).

Сазнања о оштећењу озонског омотача и појави „озонских рупа” су покренула лавину истраживања о евентуалним последицама повећане количине UV-B зрачења (van de Staaij *et al.*, 2002).

Ултраљубичасти-В зраци, тзв. „зраци горења” са уделом од око 4-5% у спектру UV зрачења које допире до површине Земље су уједно и његов најактивнији конституент. Једина добра особина ове компоненте зрачења је то што је неопходна за синтезу витамина D₃ у кожи. Са друге стране, UV-B зрачење има већу генотоксичност (способност да оштети ДНК и доведе до мутације), али мању моћ продирања кроз кожу од UV-A па углавном делује на епидермални слој коже индукујући, између осталог, еритем (црвенило коже), тамњење коже, опекотине (1000 пута је ефикасније од UV-A), инфламацију (запаљење), директно оштећење ДНК, локалну и системску имуносупресију (Svobodová *et al.*, 2003; Schade *et al.*, 2005; Afaq, 2011; Deore *et al.*, 2012).

Сунчева светлост садржи око 20 пута више (>95%) UV-A (тзв. „зраци старења”) од UV-B зрачења (Krutmann, 2000; IARC, 2006; Mena *et al.*, 2013; Mahns *et al.*, 2003). Док UV-B иницира настанак тумора (туморогенезу), UV-A првенствено поспешује његово напредовање (пропагацију). UV-A зрачење има већу цитотоксичност од UV-B јер допире до дермалних слојева коже (Сл.3) (Pinnell, 2003). Међутим, многи биолошки ефекти овог (UV-A) зрачења, укључујући и инактивацију хелија, стриктно зависе од присуства молекулског кисеоника (Kvam and Tyrrell, 1997).



Слика 3 Апсорпција UV зрачења у кожи. UV-B зраци краће таласне дужине досежу до површинског слоја коже, покожице (*epidermis*) док UV-A зраци, већих таласних дужина пенетрирају дубље, до крзна (*dermis*). Са „енергетске тачке” ова појава је нелогична, с обзиром на то да UV-B зраци имају већу енергију од UV-A зрака. Разлог лежи у присуству UV-апсорбера у издиференцираним слојевима коже (по дубини: *epidermis*, *dermis*, *hypodermis*). Тако UV-B зрачење на површини коже апсорбују ДНК, тирозин, триптофан, *trans*-урофанска киселина и меланин, док су UV-A апсорбери лоцирани у дубинским слојевима (Pinnell, 2003).

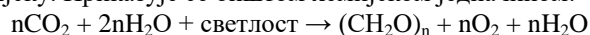
Кожа, као највећи орган човековог тела (површине од 1,5-2 m², са уделом од 18% у укупној телесној маси), и очи су најизложеније штетном дејству UV зрачења (Sekulović, 2009; Herrling *et al.*, 2006; Brohem *et al.*, 2011). Најчешће акутно оштећење очију је фотокератитис (снежно слепило), а од хроничних катаракта (за обе стања је одговорно искључиво UV-B зрачење) (Balasubramanian, 2000), карциноми сквамозних ћелија, меланоми итд. Акутне промене на кожи обухватају опекотине, некрозе и запаљења, а хроничне фотостарење и канцер коже (Longstreth *et al.*, 1998).

У фокусу досадашњег излагања је било штетно дејство UV-зрачења на људе, међутим, треба имати у виду чињеницу да једнако тешку битку под Сунцем води читав живи свет, укључујући биљке, животиње и микроорганизме.

2.2 Биљке и UV стрес

Живот људи и животиња као чланова деликатног светског екосистема је могућ захваљујући најважнијој карици у ланцу са којом живе у симбиози – биљкама (Parisi *et al.* 2010). Наиме, биљке у процесу фотосинтезе⁴ из једноставних, неорганских једињења (CO₂ из атмосфере и H₂O из земљишта) користећи сунчеву енергију, граде органска једињења богата енергијом (угљене хидрате) а ослобађају кисеоник (Raven and Johnson, 1999; Moran *et al.* 2011). Људи их гаје, конзумирају (главни су извор витамина С, есенцијалног нутритијента за људе, чији недостатак омета активност великог броја ензима док авитаминоза доводи до скорбута⁵ (Jansen *et al.*, 2008)) и користе као храну за животиње али и за производњу биогорива (биоетанол, биодизел) као новог обновљивог извора енергије (Parisi *et al.*, 2010).

⁴ Фотосинтеза је процес у коме ауотрофни организми (више биљке, алге и неке бактерије) светлосну енергија претварају у хемијску. Приказује се општом хемијском једначином:



и одиграва у три фазе: **1. светла фаза** – фотолиза (оксидација) воде, редукција коензима NADP и конзервисање енергије у виду АТР-а; **2. дифузија** – отварање стома и улазак CO₂ из ваздуха у лист и **3. тамна фаза** у којој се енергија из светле фазе користи за редукцију CO₂ до угљених хидрата, триозофосфата (код већине биљака). Процес се одвија у хлоропластима листа, и то светла фаза у тилакоидима (спљоштеним мембранским везикулама налик дисковима), а тамна фаза (Calvin-ов циклус) у строми (матриксу који испуњава унутрашњост хлоропласта) (Bonan, 2002).

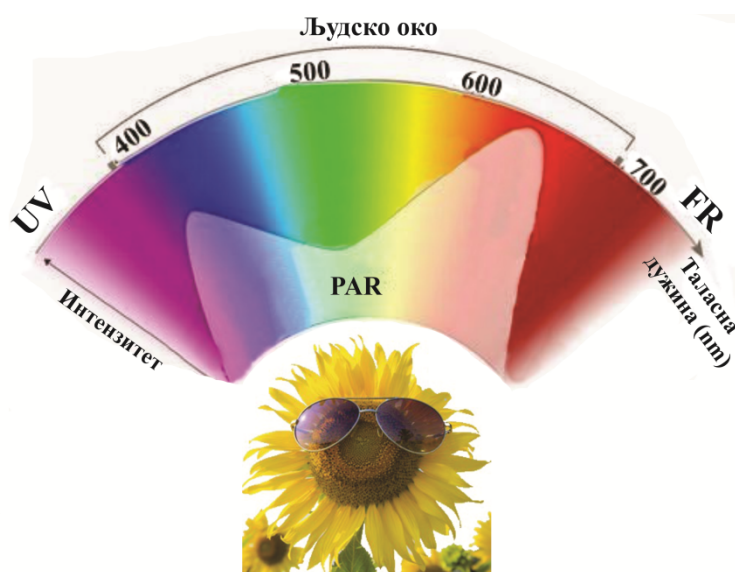
⁵ Симптоми скорбута су веома изражена слабост, крвављење десни и испадање зуба. Крвављење се јавља и у кожи (тамноцрвене пеге), бутинама, потколеницама и другим ткивима. Болесници су бледи, пате од депресије и смањене покретљивости. Ова болест је била честа међу морнарима, гусарима, војницима и др. који су изоловани од копна и дуго нису конзумирали воће и поврће – примарне изворе витамина С (Rathee *et al.*, 2013).

Како је биљкама, као сесилним (причвршћеним за тло) фотоаутотрофима (саме себи производе храну у процесу фотосинтезе) примарни извор енергије Сунце, оне воде већу битку са евентуалним штетним ефектима зрачења јер, за разлику од осталих чланова екосистема, не могу да се од истог склоне (Kataria *et al.*, 2014).

Познаваоци физиологије биљака деле спектар ЕМ зрачења Сунца – релевантног са ботаничке тачке гледишта – на UV (<400 nm); фотосинтетски активно зрачење (PAR) у области 400-700 nm; део видљивог спектра зрачење који неки од аутора (Huché-Théliet *et al.*, 2016) називају далеко-црвено зрачење (FR ~700-800 nm); и IR зрачење (>700 nm) (Сл.4) (Pilarski, 2005). Када је у питању интеракција UV-зрачења (пре свега његове UV-B компоненте) са биљкама, није на одмет вратити се на сам почетак...

Наиме, у раним фазама еволуције копнених биљака (пре неких 470×10^6 година) количина озона у стратосфери је била далеко нижа од данашње, па су се „преци“ данашњих биљака суочавали са повећаном количином UV-B зрачења (van de Staaij *et al.*, 2002; Rozema *et al.*, 2002). У биљкама UV-B генерише реактивне кисеоничне врсте (ROS)⁶ које су у умереним концентрацијама важни сигнални молекули, док појачана продукција доводи до оксидативног стреса и апоптозе (Yokawa and Baluška, 2015). Фотоне из овог дела ЕМ спектра апсорбују и нуклеинске киселине, протеини, липиди, пигменти биљака и фитохормони па су негативни ефекти видљиви током раста, развоја и репродукције манифестујући се смањењем висине биљака и дужине/површине листа, хлорозом (појавом жутила на листовима услед недостатка гвожђа) и некрозом (изумирањем лиснатог ткива), смањеним процентом клијавости семена, променом састава кутикуларног воска, смањеном способношћу конкуренције са коровима итд. Главна мета UV-B зрачења је ипак фотосинтетски апарат, пре свега фотосинтетски пигменти, где ово зрачење директно инхибира њихову синтезу или пак делује на ензиме укључене у пут њихове биосинтезе (Stapleton, 1992; Strid *et al.*, 1994; Dobrikova *et al.*, 2013; Kataria *et al.*, 2014).

⁶ Главни извори ROS врста су транспортни ланац електрона у хлоропластима и митохондрији, пероксидазе и оксидазе (NADPH оксидазе, ксантин оксидазе, липоксигеназе, гликолат оксидазе, аминоксидазе итд.) и фотосензибилизатори, попут хлорофила и пероксизома (Kataria *et al.*, 2014).



Слика 4 Дејство ЕМ зрачења на биљке. Површина листа рефлектује 40-60% IR зрачења док остатак апсорбује вода у истом, спречавајући његово прегревање. У случају PAR зрачења 10% се рефлектује, 85% апсорбују фотосинтетски пигменти – хлорофил и каротеноиди, док преосталих 5% пролази без икаквих ефеката. Од укупне количине апсорбоване PAR енергије 90% се расипа у виду топлоте, 2% емитује флуоресценцијом, 1-5% користи у процесу фотосинтезе а преосталих 3-7% у другим фотобиолошким процесима. Механизам одбране биљака од штетног UV-B зрачења се базира на синтези фенолних једињења (Pilarski, 2005).

У суровој борби за опстанак тадашње биљке су биле приморане да током еволуције развијају механизме којим би се одбраниле од штетног дејства поменутог зрачења и успеле – захваљујући тзв. UV-B *screen*-овима. Наиме, реч је о фенолним једињењима и то углавном фенолним киселинама код алги и лишцајева односно флавоноидима⁷ код виших, тзв. васкуларних биљака (које имају стабло, корен, лист). Уочено је да се одговор биљака на UV-B стрес огледа управо у повећаној синтези и акумулацији UV-B апсорбујућих једињења у *epidermis*-у (van de Staaij *et al.*, 2002; Agati *et al.*, 2013; Kovács and Keresztes, 2002) па је ова компонента UV-зрачења препозната као регулатор боје цвета и плода. Тако је интензивирање боје латица ружа након излагања UV-B светлости приписано акумулацији антоцијанина (Llorens *et al.*, 2015). Поред селективне апсорпције у UV области, флавоноиди су и моћни антиоксиданси што их чини идеалним UV-протекторима (детаљније у даљем тексту) (Jansen *et al.*, 2008).

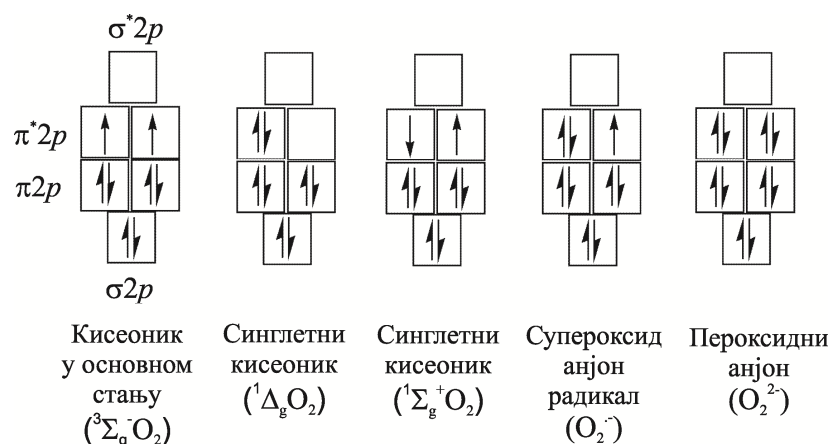
⁷ Акцент је на флавоноидима али треба нагласити да UV-B зрачење поред флавоноида утиче и на велики број метаболита између осталог и на метаболизам алкалоида и терпена (Jansen *et al.*, 2008).

2.3 Живот са слободним радикалима

Земљина атмосфера се од настанка живота на њој, пре више од 3 милијарде година, драстично променила. Захваљујући фотосинтетској активности модрозелених алги (*Cyanobacteria*), тадашња атмосфера богата водоником је постала врло оксигенисана. Највећи удео кисеоника, од чак 35% је достигнут пре 300 милиона година, да би у касном Палеозоику пао на 15% а пре 150 милиона година достигао данашњих 21%. Већи ниво кисеоника је са собом донео и опасност по опстанак тадашњих организама. Шансе за преживљавање су, међутим порасле захваљујући еволутивном развоју аеробних путева метаболизма (Benzie, 2003). Ипак, опасност од токсичности кисеоника је остала до данашњих дана, што је уједно и један од највећих парадокса живота у аеробним условима. Зашто је кисеоник опасан? И како се биолошки системи бране од њега? (Benzie, 2003; Venturi and Venturi, 2007).

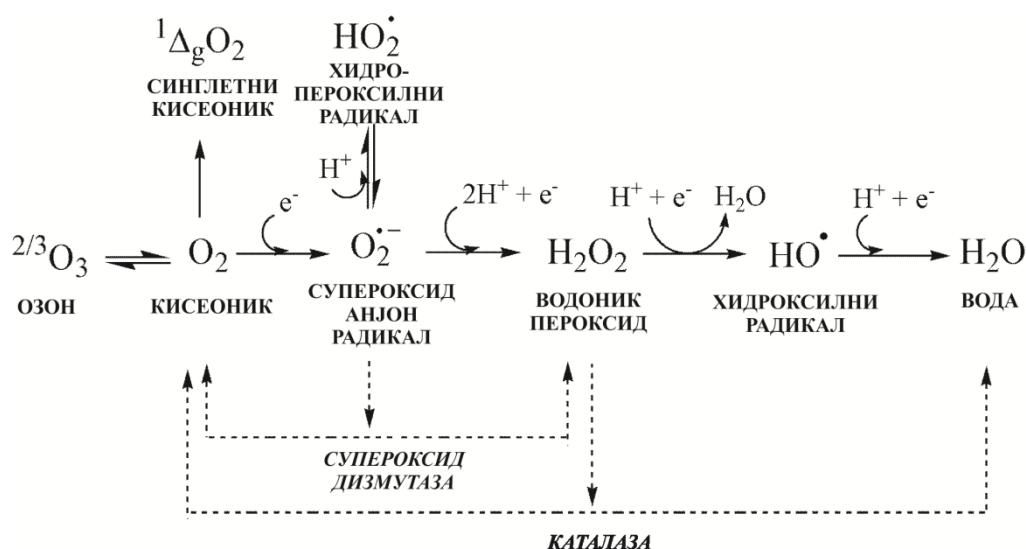
2.3.1 Кисеоник и реактивне кисеоничне врсте

Како је кисеоник други по електронегативности (3,44), после најреактивнијег флуора (3,98), реакције у којима учествује би требало да су брзе, што ипак није случај. Наиме, енергија његове двоструке везе (498 kJmol^{-1}) је релативно висока, па се реакције које захтевају њено раскидање одигравају само на високим температурама. Објашњење тако слабе реактивности лежи у електронској структури његовог молекула. Наиме, кисеоник је у основном, триплетном стању (објашњење у делу 2.5 „Основи фотохемије”) бирадикал са два неспарена електрона смештена у две дегенерисане антивезивне $\pi^* 2p$ молекулске орбитале (Сл.5) (Li, 2011).



Слика 5 Попуњеност виших молекулских орбитала кисеоника и појединих ROS врста (Li, 2011)

Да би кисеоник оксидовао неко једињење у дво-електронској реакцији оно мора да садржи два неспарена (паралелног спина) електрона који би ушли у $\pi^* 2p$ орбитале основног стања молекулског кисеоника. Како због Pauli-јевог принципа искључења електронски пар (спарени електрони, супротних спинова) не испуњава овај критеријум кисеоник тежи да прими електроне појединачно, што ограничава његову реактивност са већином органских молекула. Међутим, током аеробног ћелијског дисања кисеоник се сукцесивним (узастопним) адирањем водоника преводи у воду што за последицу има продукцију редукованих интермедијера из групе слободних радикала (Сл.6), тзв. реактивних кисеоничних врста (ROS) (Apel and Hirt, 2004; Li, 2011).

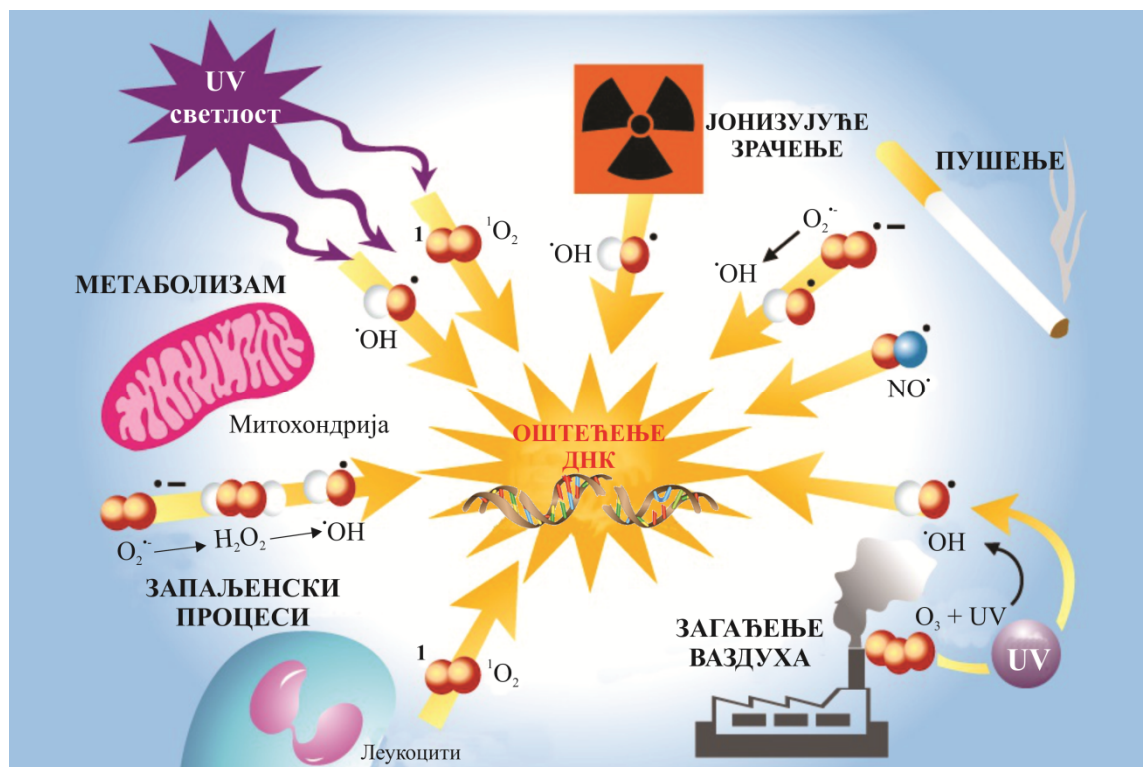


Слика 6 „Радикали рађају радикале”. Веза између кисеоника и ROS врста (Acworth, 2003)

Слободни радикали су нестабилне, врло реактивне хемијске врсте (атом, молекул или јон) са једним или више неспарених електрона у орбитали, способне за независно постојање. Разлог њихове велике реактивности је управо присуство неспареног електрона који тражи „партнера” за стабилизацију, а добија га апстракцијом електрона из ко-реактанта чиме се радикал редукује (има електрон више), док ко-реактант оксидацијом (са електроном мање) постаје нови радикал. Сви радикали који садрже кисеоник чине групу означену термином „реактивне кисеоничне врсте” (ROS)⁸, састављену од: супероксида ($\text{O}_2^{\cdot-}$), водоник пероксида (H_2O_2), хидрокси радикала ($\cdot\text{OH}$), синглетног кисеоника (${}^1\text{O}_2$), перокси радикала ($\text{ROO}\cdot$), алкокси

⁸ Поред ROS, у слободне радикале спадају и реактивне врсте азота (*Reactive Nitrogen Species – RNS*), хлора (*Reactive Chlorine Species – RCS*), брома (*Reactive Bromine Species – RBS*) и сумпора (*Reactive Sulphur Species – RSS*) (Vlaisavljević, 2014).

радикала (RO^\bullet), хидропероксида (ROOH), пероксинитрита (ONOO^\bullet), хипохлорне киселине (HOCl) и озона (O_3) (Palmieri and Sbledorio, 2007). Међу наведеним ROS се разликују радикалске: $\text{O}_2^{\bullet-}$, $^\bullet\text{OH}$, ROO^\bullet и RO^\bullet и не-радикалске врсте: H_2O_2 , $^1\text{O}_2$, ONOO^\bullet , HOCl и O_3 . Извори слободних радикала могу бити ендогени и екзогени (Stevanović i sar., 2011) – Сл.7.

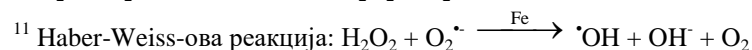
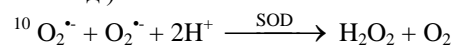


Слика 7 Извори ROS врста. **Ендогени** извори ROS врста су ћелијске мембране (плазме, једра, митохондрија), органеле (митохондрије, пероксизоми, ендоплазматични ретикулум, хлоропласти, ензими (NAD(P)H оксидазе, ксантин оксидазе) и ћелијски процеси, пре свих респираторни ланац преноса електрона у митохондријама и повећана активност фагоцита током инфламаторних процеса. Од **екзогених** извора су најбитнији физички (јонизујуће и UV зрачење, озон, смог, дувански дим...), и биолошки агенси (бактерије и вируси активирају фагоците (неутрофиле) у којима је NAD(P)H оксидаза главни извор продукције супероксида) (Li, 2011; Rittié and Fisher, 2002).

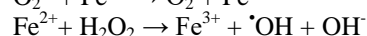
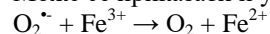
Довођењем одговарајуће енергије молекулу кисеоника долази до екситовања неспарених електрона и генерисања синглетног кисеоника, који се може јавити у два облика: $^1\Delta_g\text{O}_2$ и $^1\Sigma_g^+\text{O}_2$, различитих по структури π^* орбитала (Сл.5). Прво екситовано стање, $^1\Delta_g\text{O}_2$ није слободни радикал већ екстремно реактивни, електрофилни молекул. Други, реактивнији облик, $^1\Sigma_g^+\text{O}_2$ се у биолошким системима обично брзо ($t_{1/2} = 10^{-11}$ s) преводи у $^1\Delta_g\text{O}_2$ па нема биолошки значај. Основни механизам заштите од штетних ефеката $^1\Delta_g\text{O}_2$ је *quenching*⁹ („гашење”) аскорбинском киселином, каротеноидима и токоферолима. Једноелектронском редукцијом кисеоника катализованом NAD(P)H оксидазама и ксантин оксидоредуктазама у митохондријалном респираторном ланцу, додатни електрон улази у једну од кисеоникових (π^*2p) антивезивних орбитала генеришући супероксид (радикал анјон). Као слаба база $\text{O}_2^{\cdot-}$ прима протон и гради дуго-живећи, реактивнији, липофилни хидропероксид (HO_2^{\cdot}), који за разлику од супероксида може иницирати липидну пероксидацију (детаљније на стр. 40). Одговарајући ниво супероксида у ћелијама одржава ензим супероксид дизмутаза (SOD), катализовањем његове дизмутације (диспропорције) до водоник пероксида¹⁰. Ензими каталаза (CAT) и глутатион пероксидаза у сисарима катализују превођење H_2O_2 у молекул воде, контролишући тако ниво овог не-радикала. Дакле, све реакције које продукују супероксид, доводе и до продукције водоник пероксида, који даље у присуству јона прелазних метала (нпр. гвожђа), тзв. Haber-Weiss-овом реакцијом¹¹, даје екстремно реактивни хидрокси радикал ($\cdot\text{OH}$). Хидрокси радикал је најреактивнија ROS врста *in vivo* која реагује са већином (ако не и свим) једињењима у живој ћелији (ДНК, протеини, липиди) у кругу од чак 5 молекулских пречника у односу на место настанка. За разлику од супероксида и водоник пероксида чији се ниво контролише

⁹ До дезактивације (*quenching*-а одн. „гашења”) и враћања синглетног кисеоника у основно, триплетно стање долази интеракцијом са другим једињењима и то на два начина:

- 1) Физички *quenching*: $^1\text{O}_2 + \text{A} \rightarrow ^3\text{O}_2 + \text{A}$, када синглетни кисеоник своју екситациону енергију преноси на други молекул (који сада постаје екситован) и враћа се у своје основно стање, без хемијске промене акцептора енергије (нпр. каротеноида) одн. без настанка нових производа реакције.
- 2) Хемијски *quenching*: када се *quencher* у реакцији са синглетним кисеоником хемијски мења одн. даје нови производ (DeRosa and Crutchley, 2002). Једињења која садрже $>\text{C}=\text{C}<$ двоструке везе (нпр. каротеноиди, полинезасићене масне киселине итд.) често бивају оштећена синглетним кисеоником, па тако каротеноиди граде ендпероксиде (Fiedor *et al.* 2005), масне киселине граде хидропероксиде итд.).



Може се приказати и у облику две под-реакције, при чему се друга назива Fenton-овом реакцијом:



ензимима, хидрокси радикал је далеко више реактиван да би био ограничен на тај начин – јер би напао чак и антиоксидативне ензиме. Уместо тога, биолошке одбране су еволуирале тако да умањују могућност његовог стварања и поправе начињену штету (Li, 2011; Pryor *et al.*, 2006).

Иако су у почетку сматрани врло штетним, последњих година се дошло до сазнања да ROS врсте у умереним и малим концентрацијама – у којим настају под физиолошким условима – „играју” веома битне улоге због којих су неопходне за нормално функционисање организма. Тако учествују у регулацији унутар- и међућелијске сигнализације као секундарни „гласници” (месенцери), експресији гена, адаптацији и опоравку ћелија од оштећења, производњи енергије, васкуларизацији ткива, програмираној ћелијској смрти (апоптози) итд. (Pouillot *et al.*, 2011). Међутим, високе концентрације радикала могу довести до оштећења виталних биомолекула (протеина – деактивација ензима, нуклеинских киселина – мутагенеза и липида – липидна пероксидација), пореметити функцију ћелија, ткива па и читавог организма. „Мајка природа” је, срећом, обдарила жива бића читавим арсеналом одбране од слободних радикала у виду једињења названих антиоксиданси.

2.4 Антиоксиданси

Жива бића одржавају ROS врсте у неопходним количинама софистицираним и сложеним антиоксидативним (АО) системом одбране. Иако ефикасна, АО одбрана није савршена па до оксидације кључних биомолекула ипак долази, годинама се акумулира и поспешује процес старења али и настанак болести које са годинама долазе (Benzie, 2003). Уколико ниво ROS врста (услед повећаног стварања) надвлада капацитет АО одбране (због смањене активности; или и једно и друго) организам доспева у стање оксидативног стреса, укључено у патогенезу кардиваскуларних (атеросклероза, исхемија, хипертензија и др.), неуролошких (Alzheimer-ова, Parkinson-ова болест, мултипла склероза, амиотрофична латерална склероза (ALS), депресија и др.), плућних (астма, хронична опструктивна болест плућа и др.), бубрежних (гломерулонефритис, хронична бубрежна инсуфицијенција, уремија и др.), болести зглобова (реума, артритис и др.), очију (катаракта, макуларна дегенерација) и многих других болести и поремећаја (Li, 2011; Pham-Huy *et al.*, 2008).

Антиоксиданси су по дефиницији „супстанце које у малим концентрацијама спречавају или успоравају оксидацију биомолекула (липида, протеина и ДНК)

неутралишући слободне радикале” (Ndhlala *et al.*, 2010). Своју активност испољавају на различите начине, а детаљан увид ће бити дат у наредном потпоглављу, на примеру флавоноида.

Критеријуми за поделу АО су различити, нпр. порекло (природни – ензимски и не-ензимски – и синтетски), физичко-хемијске особине (хидрофилни и липофилни), механизам деловања (превентивни, *chain-breaking*) итд. (Vertuani *et al.*, 2004). По последњем критеријуму се разликују три главне врсте АО:

- 1) Примарни (превентивни) АО спречавају настанак нових или постојеће ROS врсте преводе у мање штетне облике: ензими SOD, глутатион пероксидаза, каталаза, глутатион редуктаза; протеини који везују (хелирају) јоне метала грађењем комплекса или координационих једињења: феритин, трансферин и лакталбумин (гвожђе); церулоплазмин и албумин (бакар) (Laguette *et al.*, 2007).
- 2) Секундарни (*chain-breaking*) АО „хватају” слободне радикале, спречавајући пропацију ланчане реакције (нпр. липидне пероксидације о којој ће бити речи), попут витамина С, Е, β -каротена, убихинона (Co-Q10), биљних полифенола итд.
- 3) Терцијарни АО поправљају штету на биомолекулима нанету слободним радикалима (нпр. метионин сулфоксид редуктаза) (Smith *et al.*, 2000; Pérez and Aguilar, 2013)

Врста активираниог АО зависи од врсте генерисане ROS врсте, места и времена њеног настанка и њене „мете” (Ndhlala *et al.*, 2010; Pouillot *et al.*, 2011).

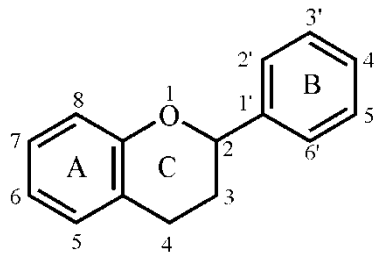
Импозантна цифра од око 10 000 идентификованих структура је флавоноиде довела на водећу позицију међу природним производима, због чега су најважнија и најинтересантнија класа биљних полифенола (Tahara, 2007).

2.4.1 Флавоноиди

Давне 1936. године Szent-Gyorgyi (Albert Szent-Györgyi de Nagyrápolt, мађарски биохемичар) је из наранџе изоловао дотад непознату супстанцу са витаминском активношћу и назвао је витамин Р (Nijveldt *et al.*, 2001). Сазнање да је та супстанца заправо флавоноид рутин је означило почетак ере интензивних истраживања флавоноида са циљем изолације али и проучавања механизма њиховог деловања. Осамдесете године прошлог века су дале нови разлог доспевања флавоноида у жижу

интересовања научне јавности, тзв. „француски парадокс”. Наиме, висок унос засићених масти је на глобалном нивоу доведен у везу са високом смртношћу од коронарних болести. Од овог правила одступа једино Француска, где је број срчаних болесника изузетно низак ако се узме у обзир исхрана богата мастима, недостатак физичке активности и пушачке навике. Очигледан парадокс је пре свега приписан редовном конзумирању црвеног вина¹² али и маслиновог уља, свежег воћа и поврћа, богатих фенолним једињењима¹³ карактеристичних за медитеранску кухињу (Rice-Evans *et al.*, 1996; Harborne and Williams, 2000; Procházková *et al.*, 2011).

Термином „флавоноид” (лат. *flavus* – жут) је означена велика група природних производа (секундарних¹⁴ биљних метаболита) мале молекулске масе који садрже језгро фенилбензопирана одн. флавана ($C_6-C_3-C_6$) – Сл.8. Њихова биосинтеза се одвија комбинацијом два метаболичка пута: шикимске киселине (биосинтеза C_6-C_3 јединице) и поликетидног пута (биосинтеза C_6 јединице) (Vihakas, 2014)



Слика 8 Флавоноидно језгро. Флавоноиди се класификују сходно супституцији на овом основном скелету. Разликују се по положају и броју хидроксилних, метокси, гликозидних група и по степену конјугације између прстенова А и В (Narstein, 2002).

Пуно је неслагања око поделе флавоноида. У овом раду је усвојена она по којој се, у зависности од положаја везе ароматичног (В) прстена и бензопирано (хромано) дела молекула (спојени бензенски – А и хетероциклични пирански прстен – С), флавоноиди деле у три подгрупе са заједничким прекурсором – халконом, због чега су биогенетски и структурно повезане:

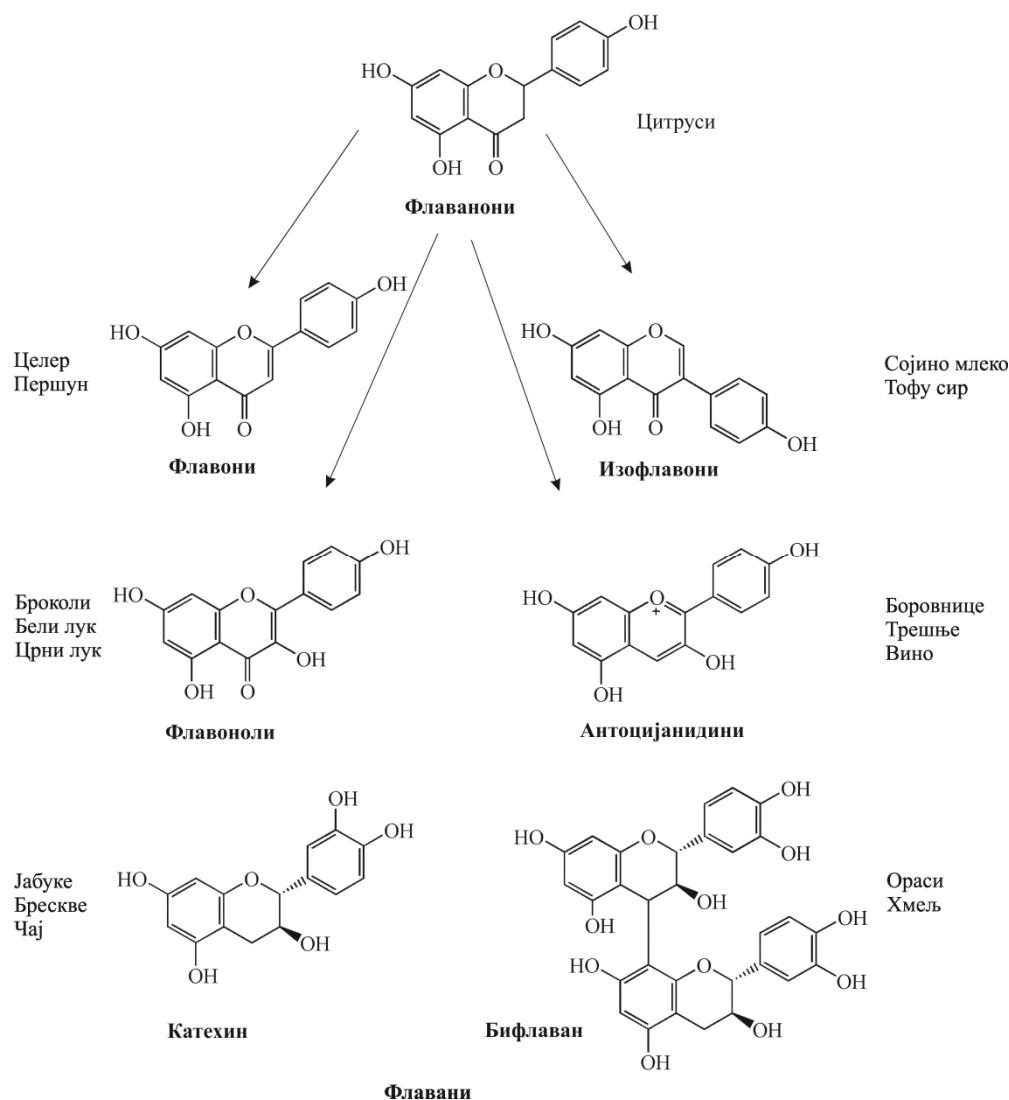
¹² Концентрација фенола је већа у црвеном него у белом вину јер су они присутни углавном у кожици грожђа која се приликом производње белог вина уклања.

¹³ Фенолна једињења садрже једну или више хидроксилних група директно везаних за један или више шесточланих, ароматичних прстенова. Главне класе биљних фенола укључују: C_6 , просте феноле; C_6-C_1 фенолне киселине; C_6-C_2 ацетофеноне и фенилсирћетне киселине; C_6-C_3 хидроксициметне киселине; C_6-C_4 , хидроксиантрахиноне; $C_6-C_2-C_6$ стилбене; $C_6-C_3-C_6$ флавоноиде; $(C_6-C_3)_2$, лигнани; $(C_6-C_3-C_6)_2$ биофлавоноиде; $(C_6-C_3)_n$ лигнине и $(C_6-C_3-C_6)_n$ кондензоване танине (Арак *et al.*, 2007).

¹⁴ За разлику од примарних метаболита (угљени хидрати, нуклеинске киселине, липиди и протеини) који су директно укључени у раст, развој и репродукцију, нису од суштинске важности за преживљавање биљака (Вуег *et al.*, 2010).

- 1) флавоноиди у ужем смислу (2-фенилбензопирани),
- 2) изофлавоноиди (3-бензопирани одн. 3-фенилхромани) и
- 3) неофлавоноиди (4-бензопирани одн. 4-арилкумарини).

Флавоноиди у ужем смислу се даље деле на: флаване, флаваноне, флавоне, флавоноле, дихидрофлавоноле, флаван-3-оле (флаваноле), флаван-4-оле и флаван-3,4-диоле (леукоантоцијанидине) (Marais *et al.*, 2006). Генерално, сви се слажу у једном, да су најважније под-фамилије флавоноида: флавоноли, флавани, флавоноли, флаваноли, антоцијанидини и изофлавоноиди структура приказаних на **Слици 9**.



Слика 9 Структуре и извори најважнијих класа флавоноида. Стрелице указују на пут биосинтезе (Yao *et al.*, 2004).

Акумулирају се у епидермалним ћелијама цветова, листова, стабљика, корења, семења, плодова, најчешће у облику агликона (нпр. флавонол, флаванол), гликозида и

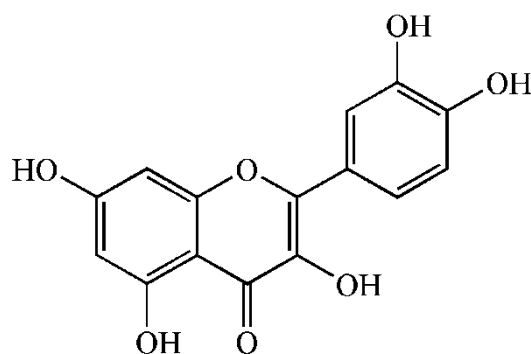
полимера. Гликозиди су састављени из агликона и гликозидно (најчешће у положајима 3 прстена С и 7 прстена А) везаних шећерних компоненти (најчешће глукоза, галактоза и рамноза). Углавном су локализовани у хидрофилним деловима ћелије – вакуолама и апопластима. Структура агликона је значајна за фармаколошко деловање флавоноида, док шећерна компонента (гликон) повећава хидросолубилност (растворљивост у води) молекула (Sakihama *et al.*, 2002; Cushnie and Lamb, 2005; Shafique *et al.*, 2011; Mirković, 2002). Флавоноиди су од посебног значаја за инсекте са способношћу инкорпорације ових једињења у кутикуле јер их штите од патогена и предатора, попут свилене бубе (*Bombyx mori*) која их инкорпорише у своју чауру. Са друге стране, плави лептир (*Polyommatus icarus*) инкорпорацијом флавоноида у крила привлачи парњаке (Simmonds, 2003).

Конечно, флавоноиди су важне компоненте људске исхране иако се генерално не сматрају нутритивентима, а унос варира од земље до земље – најмањи (~2,6 mg на дан) је у Финској а највећи (68,2 mg на дан) у Јапану (Nijveldt *et al.*, 2001). Флавоноли, са кверцетином као представником, су најраспрострањенији од свих флавоноида у храни (детаљније у даљем тексту).

Флавоноидима се приписују антиоксидативна, антиинфламаторна, антимикробна (антибактеријска и антифунгална), антиалергијска, хепатопротективна, антитромботична, антивирусна, антиканцерогена, имуностимулативна и многа друга позитивна биолошка дејства (Bonina *et al.*, 1996; Di Carlo *et al.*, 1999; Ren *et al.*, 2003; Taras *et al.*, 2008; Saija *et al.*, 1995). Разумевање њихове фармакокинетику су омогућила вишегодишња истраживања односа структуре и активности (енг. *Structure Activity Relationship, SAR*) (Heim *et al.*, 2002).

2.4.1.1 Кверцетин

Кверцетин [3,3',4',5,7-пентахидроксифлавоон или по IUPAC-у 2-(3,4-дихидроксифенил)-3,5,7-трихидрокси-4H-хромен-4-он] (Сл.10) је најраспрострањенији од свих флавоноидних молекула. Има га у воћу и поврћу (јабукама – између 21 и 72 mgkg⁻¹; грожђу, лимуну и осталом воћу до 15 mgkg⁻¹; црном луку, кељу, броколију, пасуљу до 486 mgkg⁻¹; зеленој салати, парадајзу и осталом поврћу испод 10 mgkg⁻¹ (Harborne and Williams, 2000; Erlund, 2004), чају, црвеном вину, маслиновом уљу и прополису (Svobodová *et al.*, 2003).



Слика 10 Структурна формула кверцетина

Агликон је многих флавоноида, укључујући рутин, изокверцетин и хиперозид. Упркос присуству пет хидроксилних група липофилног је карактера, док његови деривати могу, зависно од врсте супституената, бити и липо- и хидрофилни. Генерално, О-метил, С-метил и пренил-деривати су липофилни, синтетишу се у жлездама на површини листова, цветова и плодова и карактеристични су за породице *Labiatae* и *Compositae*. Гликозилација бар једне –ОН групе кверцетина повећава хидрофилност молекула, што је од великог значаја за биљке јер се деривати, сада растворни у цитозолу, лакше транспортују у различите делове биљке (Materska, 2008; Murota and Terao, 2003).

Кверцетин испољава антиканцерогено, антивирусно, антитромботично, антиисхемично, антиинфламаторно и антиалергијско дејство, штити од срчаних болести и стимулише имунитет. Ефикасно „хвата” $O_2^{\cdot-}$, 1O_2 и $\cdot OH$ радикале, инхибира циклооксигеназе и липооксигеназе и хелира јоне прелазних метала чиме спречава липидну пероксидацију (Inal and Kahraman, 2000; Schmalhausen *et al.*, 2007; Saija *et al.*, 2003; Joshi *et al.*, 2011).

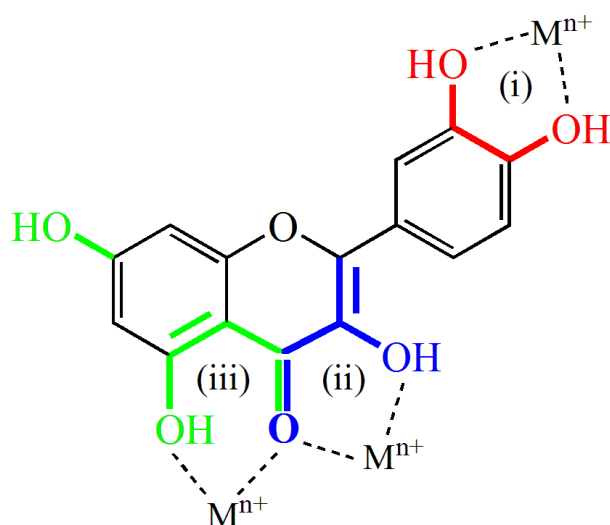
2.4.2 Флавоноиди као антиоксиданси

2.4.2.1 Веза између структуре и активности (SAR) флавоноида

Да би неко фенолно једињење било окарактерисано као антиоксиданс, мора да задовољи два основна услова: (1) да када је присутно у малој концентрацији у односу на супстрат који се оксидује може да одложи, успори или спречи аутооксидацију/слободно-радикалску оксидацију и (2) да новонастали радикал тог једињења буде стабилан према даљој оксидацији. Флавоноиди испуњавају постављене услове а своју АО активност испољавају: (1) директним „хватањем” ROS врста – донирањем водониковог атома или електрона, (2) хелирањем метала, (3) активирањем АО ензима, (4) редукцијом α -токоферил радикала, (5) инхибирањем оксидаза итд. (Rice-Evans *et al.*, 1996). У овом делу ће детаљније бити објашњене само прве две активности.

Најбољи „хватачи” слободних радикала имају следеће структурне карактеристике:

- ❖ *ortho*-3',4'-дихидрокси (катехолну) структуру В-прстена која донирањем водоника радикалима даје најстабилније флавоноидне фенокси радикале (стабилизоване водоничним везивањем или продуженом електронском делокализацијом) (црвено, Сл.11),
- ❖ 2,3-двоструку везу у конјугацији са 4-кето групом прстена С (омогућава делокализацију електрона из В прстена што додатно стабилизује фенокси радикал) и хидроксилну групу у положају 3 прстена С (плаво, Сл.11)
- ❖ *meta*-5,7-дихидрокси групу прстена А у комбинацији са 4-кето групом С прстена која омогућава настанак стабилних хинонских структура делокализацијом неспареног електрона у фенокси радикалу (зелено, Сл.11) (Procházková *et al.*, 2011; Pannala *et al.*, 2001; van der Woude, 2006; Rice-Evans *et al.*, 1996; Medvidović-Kosanović *et al.*, 2010; Trouillas *et al.*, 2006; Halbwirth, 2010).



Слика 11 Најважније структурне карактеристике флавоноида које детерминишу њихову АО активност приказане на примеру кверцетина. Места потенцијалног везивања (хелирања) јона прелазних метала су (i) катехолна структура В прстена; (ii) хидроксилна група у положају 3 у комбинацији са 4-кето групом прстена С и (iii) хидроксилна група у положају 5 прстена А у комбинацији са 4-кето групом прстена С (Sugihara *et al.*, 1999).

Антиоксидативну активност, поред побројаних структурних захтева, одређује број хидроксилних група у молекулу, његова планарност, присуство гликозидних остатака и степен конјугације (Арак *et al.*, 2007). Флавоноли су, због већег броја хидроксилних група, бољи „хватачи” слободних радикала од флавона. Флавоноли и флаваноли са слободном –ОН групом у положају 3 прстена С су, за разлику од флавона и флаванона, планарни што омогућава делокализацију електрона и повећава стабилност флавоноидних фенокси радикала. Супституцијом хидроксилне групе у положају 3 повећава се торзиони угао прстена В у односу на остатак молекула, планарност се губи а АО активност смањује. Тако је кверцетин бољи „хватач” перокси радикала, од својих О-метиллованих и О-гликозилованих деривата (Heim *et al.*, 2002; Kazazić, 2004).

2.4.2.2 Прооксидативна активност

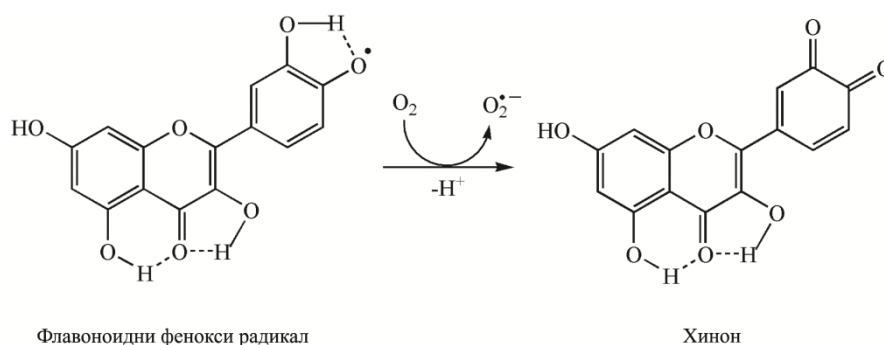
Флавоноиди поред антиоксидативне, под одређеним *in vitro* условима испољавају и штетну, прооксидативну (ПО) активност која је директно пропорционална укупном броју –ОН група, док је гликозиловање и метиловање истих смањују (Kazazić, 2004). Моно- и дихидрокси флавоноиди не показују ПО активност,

док већи број –ОН група, посебно у В прстену (нпр. пирогалолна структура – три хидроксилне групе у мирицетину), појачава генерисање –ОН радикала у Fenton-овој реакцији (Heim, 2002; Procházková *et al.*, 2011). Двострука веза у положају 2,3 у конјугацији са кето групом у положају 4 прстена С такође поспешује настанак ROS врста у присуству кисеоника и Cu^{2+} (Cao *et al.*, 1997). Из напред наведеног се закључује да структурне карактеристике одговорне за АО активност флавоноида под одређеним условима доводе до оксидативног стреса и последичног оштећења ћелија (Сл.12).



Слика 12 Симболично преставаљање антагонистичке природе флавоноида. Јин и Јанг симбол представља равнотежу између АО и ПО својстава биљних фенола. Иако редуковани облици фитофенола делују као АО, оксидовани облици, фенокси радикали, под одређеним условима могу испољити ПО активност (Sakihama *et al.*, 2002).

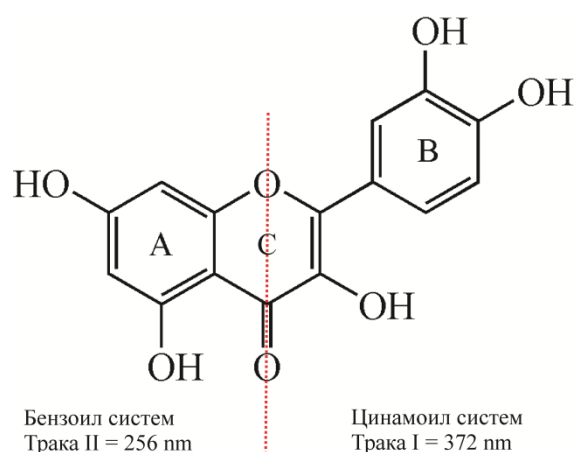
Флавоноиди аутооксидацијом и директним „хватањем” ROS врста дају флавоноидне фенокси радикале који у реакцији са кисеоником и у присуству јона прелазних метала (нарочито гвожђа, Fe^{3+} и бабра, Cu^{2+} , које редукују до Fe^{2+} и Cu^{+}) (Cao *et al.*, 1997; Sugihara *et al.*, 1999; Schmalhausen *et al.*, 2007) генеришу хиноне и супероксид анјон радикале (Сл.13). Поновном оксидацијом метала у Fenton-овој реакцији настају $\cdot\text{OH}$ и друге ROS врсте. Однос АО/ПО деловања флавоноида зависи од концентрације флавоноида (израженија при нижим концентрацијама), односа флавоноид/метал, самог система (врста растварача, рН вредност), присуства других јона метала, кисеоника, антиоксиданаса и хелатора метала (Simić *et al.*, 2007; Kasprzak *et al.*, 2015).



Слика 13 Прооксидативна активност флавоноида приказана на примеру кверцетина (Procházková *et al.*, 2011)

2.4.3 Спектралне карактеристике флавоноида

Флавоноиди имају карактеристичне апсорпционе траке у UV-VIS области ЕМ спектра. Спектар кверцетина, као представника флавонола, у разблаженим воденим или алкохолним растворима карактеришу две главне апсорпционе траке: једна на већим таласним дужинама, означена са „Трака I” и максимумом у опсегу 320-385 nm, као последица апсорпције конјугованог система В-С прстенова (цинамоил систем) одн. $S_0 \rightarrow S_1 (\pi \rightarrow \pi^*)$ прелаза; и друга на мањим таласним дужинама „Трака II”, у области 250-280 nm, као резултат апсорпције А-С (бензоил систем) – Сл.14. Слаба трака са апсорпционим максимумом око 300 nm је приписана апсорпцији С-прстена (Smith *et al.*, 2000; Zvezdanović *et al.*, 2012a; Halbwirth, 2010).



Слика 14 Порекло апсорпционих трака флавоноида приказано на примеру кверцетина (Halbwirth, 2010)

Функционалне групе везане за флавоноидни скелет узрокују померање апсорпционих максимума. Конкретно, повећање броја хидроксилних група доводи до батохромног (црвеног, ка већим таласним дужинама) померања од нпр. 367 nm у кемферолу (четири хидроксилне групе у положајима 3,5,7,4') до 371 nm у кверцетину (пет хидроксилних група у положајима 3,5,7,3',4') одн. 374 nm у мирицетину (шест хидроксилних група у положајима 3,5,7,3',4',5'). Трака I код флавона (немају –ОН групу у положају 3 прстена C) увек апсорбује на таласним дужинама мањим за 20-30 nm од одговарајућих флавонола, нпр. кемферол (367 nm) и апигенин (337 nm). Флаванони са засићеним хетероцикличним C-прстеном и без конјугације између A и B прстена имају врло јаку Траку II са максимумом апсорбације од 270-295 nm, нпр. нарингенин (288 nm) и таксифолин (285 nm) и раме (Трака I) на ~326 nm. Боја антоцијанина варира са бројем и положајем –ОН група. Генерално показују карактеристичне пикове Траке I у области 450-560 nm и Траке II у области 240-280 nm. О-метиловање и гликозиловање доводе до хипсохромног (плавог, ка мањим таласним дужинама) померања, нпр. кверцетин (371 nm) и његов гликозид, рутин (369 nm) (Yao *et al.*, 2004; Ravichandran *et al.*, 2014).

2.5 Основи фотохемије

Фотохемија је, као област хемије која проучава **промене** настале под дејством **светлости**, основа света у коме живимо. Под „светлошћу” се подразумева ЕМ зрачење из UV и VIS области (~700-100 nm), док су „промене” сви процеси који се, након апсорпције фотона, одвијају на молекулском нивоу, чак иако не доводе до „укупне” промене молекула. Тако постоје **фотофизички**, којим се молекулске врсте променом енергије и електронске структуре регенеришу, и **фотохемијски** процеси, којим настају нови молекулски „ентитети”. Најважнији „фотохемијски акт” је апсорпција првих кваната светлости од стране примитивне фотосинтетске јединице и ослобађање молекулског кисеоника, чиме је прокрчен пут настанку и животу комплекснијих јединки. У досадашњем излагању су поменуте и бројне друге фотохемијске реакције од велике важности за живи свет попут активације вида код животиња и синтезе витамина D₂ у кожи. Сем тога индустрија боја, колор штампа и израда фотографија такође почивају на овим реакцијама. Са друге стране, штетно дејство зрачења на ћелијску ДНК и настанак канцера коже се приписују управо фотохемијским реакцијама (Cowan and Drisko, 1976; Coyle, 1986; Rohatgi-Mukherjee, 1986).

Фотохемијске промене су пре 1817. године посматране и проучаване само квалитативно а са интензивним истраживањем се кренуло тек у 19. веку захваљујући развоју спектроскопије и спектроскопских метода, које су обезбедиле „алат” за одређивање структуре и детекцију непостојаних врста али и омогућиле муњевит развој фотохемије до данашњих дана.

Највећи број фотохемијских реакција се састоји из три фазе:

- 1) Апсорпција ЕМ зрачења и настанак ексцитованих стања,
- 2) Примарне фотохемијске реакције у којима учествују ексцитована електронска стања и
- 3) Секундарне или „мрачне” реакције у којим се производи примарних фотохемијских реакција конвертују у стабилне производе.

Зачетници квантитативног прилаза фотохемији су Grotthus и Draper. Они су увидели да хемијску промену не узрокује целокупна упадна светлост, дефинишући **Први закон фотохемије** (њима у част назван Grotthus-Draper-ов закон), који у основи каже да само **апсорбована** светлост доводи до хемијске промене. По **Другом закону фотохемије** (Stark-Einstein-ов закон) један молекул апсорбује један квант светлости (фотон) изузев у случају врло интензивних извора исте, попут ласера, када је могућа апсорпција и два или више фотона од стране једног молекула (Rohatgi-Mukherjee, 1986; Coyle, 1986).

2.5.1 Подсетник из квантне механике

Светлост има дуалну (двојну) природу – понаша се и као талас и као честица. У опису таласне природе (могућност дифракције, интерференције...) се наводи да је састављена од осцилујућег електричног и последично генерисаног магнетног поља, постављених управно једно на друго и на правац простирања. Када је реч о честичној природи (уоченој током фотоефекта, Kompton-овог ефекта...) Einstein 1905. године наводи да се зрачење емитује, пропушта или апсорбује у дискретним јединицама (фотонима) енергије директно пропорционалне фреквенцији електромагнетне осцилације. На основу ових сазнања deBroglie 1923. поставља хипотезу да честично-таласни дуализам важи и за материјалне микрочестице (електроне, језгра, атоме и молекуле), чија је универзалност касније добила и експерименталну потврду радом Davisson-а и Germer-а (1928). Потчињавање микрочестица Heisenberg-овим принципима неодређености (немогућности истовременог одређивања координата и

припадајућим им импулса) и последичног негирања могућности одређивања путање микрочестице те саме чињенице да Bohr-ова теорија, по којој електрони круже око језгра по тачно одређеним путањама губи смисао, ограничиле су примену класичне механике на микрочестице и довеле до настанка квантне механике. Теорију квантне механике су независно један од другог, развили Werner Heisenberg, Erwin Schrödinger и Paul Dirac а њена најбитнија карактеристика је неопходност описивања микрочестица преко вероватноће (Vollhardt and Schore, 1996).

Наиме, с обзиром да је из напред наведеног јасно да је микро(квантну)честицу немогуће посматрати у класичном смислу, јавила се потреба за увођењем функције, која ће садржати таласна својства микрочестица и бити део једначине, чије би решење могло да послужи за процену вероватноће налажења и енергије микрочестица. Решење је пружила Schrödinger-ова једначина која се, као и све основне једначине у физици, не изводи, већ се поставља, а исправност исте потврђује експерименталним резултатима. Schrödinger-ова једначина има више решења, тзв. таласне функције, обележене грчким словом пси, ψ . Њихове вредности за сваку тачку у простору око језгра немају физички смисао али квадрати ових функција (ψ^2) итекако имају. Наиме, они описују вероватноћу налажења електрона у свакој задатој тачки (Vollhardt and Schore, 1996).

Таласна функција електрона у атому се назива атомска орбитала и описује део простора у коме је вероватноћа налажења електрона највећа. Имајући у виду велику брзину електрона и расподелу његове вероватноће налажења, простор у коме се електрон креће више делује као негативно наелектрисани облак, тзв. „облак вероватноће”. С друге стране, енергија честице не може бити произвољна већ има дискретне вредности (квантирана је) а њена квантирана вредност је енергетски ниво.

Стање сваког електрона у атому описују четири различита квантна броја. Прва три (n , l и m) су карактеристика орбитале док четврти (s) одређује број електрона у истој.

n – главни квантни број одређује укупну енергију атома и величину орбитале. Може имати само целобројне вредности (1, 2, 3...) Орбитале са истом вредношћу n су на истом енергетском нивоу.

l – азимутални или орбитални квантни број одређује момент импулса (количину кретања) електрона и облик орбитале. Обележава се симболима s , p , d , f ,... који одговарају вредностима l од 0, 1, 2, 3,... респективно. Вредности l су одређене вредностима главног квантног броја, а максимална је $(n - 1)$ (Табела 1).

m – магнетни квантни број одређује оријентацију орбитале дате енергије (n) и облика (l). Овај квантни број дели подниво на појединачне орбитале у којима су електрони смештени; сваки подниво има $2l + 1$ орбитала па су његове вредности $0, \pm 1, \pm 2, \dots, \pm l$; тако s подниво садржи само једну орбиталу, p три, d пет, итд. (Табела 1).

s – спински квантни број одређује оријентацију спина електрона (ротације око сопствене осе у два међусобно супротна смера). Како спин може имати два смера (означене стрелицама навише и наниже), s има само две вредности: $+1/2$ (\uparrow) или $-1/2$ (\downarrow).

Табела 1 Вредности квантних бројева за различите енергетске нивое атома

n	l	m	Број орбитала	Ознака орбитале	Број електрона
1	0	0	1	2s	2
2	0	0	1	2s	2
	1	-1, 0, 1	3	2p	6
3	0	0	1	3s	2
	1	-1, 0, 1	3	3p	6
	2	-2, -1, 0, 1, 2	5	3d	10
4	0	0	1	4s	2
	1	-1, 0, 1	3	4p	6
	2	-2, -1, 0, 1, 2	5	4d	10
	3	-3, -2, -1, 0, 1, 2, 3	7	4f	14

По Pauli–јевом принципу искључења два електрона у истом атому не могу имати исте вредности за сва четири квантна броја (n , l , m и s). Уколико су вредности n , l и m исте, електрони морају имати супротне спинове (Vollhardt and Schore, 1996).

2.5.2 Селекциона правила

Прелазак електрона између различитих електронских енергетских стања атома има за последицу појаву атомских спектра. Међутим, атом не може емитовати ни апсорбовати зрачење преласком са било ког почетног на било које крајње стање. Правила, добијена кванто-механичким прорачунима, која указују на могућност (вероватноћу) прелаза електрона, се називају „селекциона правила”. Тако су неки прелази окарактерисани као „забрањени” (мала вероватноћа) а неки као „дозвољени” (велика вероватноћа одигравања) (Rohatgi-Mukherjee, 1986; Klessinger and Michl, 1995).

2.5.2.1 Селекциона правила за електронске прелазе у атомима

Селекциона правила за једноелектронске прелазе у атому су добијена емпиријским поређењем теоријски очекиваног и експериментално добијеног броја линија у спектру датог атома. Тако ови прелазни немају ограничења по питању главног квантног броја (n) – могу се вршити између стања са произвољном вредношћу (било који цео број) истог; ограничења су у вредностима орбиталног (l) и магнетног (m) квантног броја.

Дозвољени прелазни су само они који **истовремено** испуњавају следеће услове:

$$\Delta m = 0, \pm 1 \text{ и}$$

$$\Delta l = \pm 1$$

Дакле, примена селекционих правила код предвиђања вероватноће одигравања било ког једноелектронског прелазног је врло једноставна, простим сабирањем вредности магнетног и орбиталног квантног броја датих у **Табели 1**. Тако су забрањени прелазни електрона између $2p$ ($2p_x, 2p_y, 2p_z$) орбитала, нпр. $2p_z \rightarrow 2p_y, 2p_x$ јер је $\Delta l = 0$ али не и $2p_{x,y,z} \rightarrow 2s$ пошто је $\Delta l = -1$ (знак „-“ указује на емисију фотона одн. прелазак електрона са вишег на ниже електронско стање а „+“ на апсорпцију фотона одн. прелазак електрона са нижег на више електронско стање током прелазног).

Енергију атома добрим делом одређује електронска конфигурација (приписивање електрона атомским орбиталама) којом се описује стање и енергија атома племенитих гасова, алкалних и земноалкалних метала и халогена. Међутим, у случају основног стања осталих атома и побуђених стања, једној електронској конфигурацији одговара више електронских стања различитих по енергији па постоји могућност спин-спин, орбитално-орбиталних и спин-орбиталних интеракција. Најчешће коришћени модел којим се описују ове интеракције је Russell-Saunders-ово купловање (L - S купловање) (Rohatgi-Mukherjee, 1986).

2.5.2.1.1 Russell-Saunders-ово купловање

Интеракцијом спинског и орбиталног угаоног момента настаје укупни угаони момент (добија се векторским сабирањем спинског и орбиталног угаоног момента) коме доприносе само валентни електрони (електрони у последњем, непопуњеном енергетском нивоу) па се само они и узимају у разматрање. Тако код атома са само једним електроном у непопуњеном енергетском нивоу, векторски збир орбиталног

$\sqrt{l(l+1)}h/2\pi$ и спинског угаоног момента $\sqrt{s(s+1)}h/2\pi$ даје резултанту $\sqrt{j(j+1)}h/2\pi$, где је j – квантни број, укупни угаони момент. Дакле, за једноелектронске системе, за било које дато l постоје две j вредности: $j = l \pm 1/2$.

Када је број електрона већи од један, више је и могућности за такве интеракције. Рецимо, за два електрона у непопуњеном енергетском нивоу за која су орбитални угаони моменти означени са l_1 и l_2 а спински угаони моменти са s_1 и s_2 , респективно, могуће су следеће интеракције:

1. l_1 и l_2 дајући L ; s_1 и s_2 дајући S ; L и S дајући J .
2. l_1 и s_1 дајући j_1 и l_2 са s_2 дајући j_2 , као и између j_1 и j_2 дајући J .

Прва врста интеракција је L - S купловање (спрезање) или Russell-Saunders купловање.

Из векторског адиционог правила могуће вредности за L и S су:

$$L = (l_1 + l_2), (l_1 + l_2 - 1), \dots, |l_1 - l_2|$$

$$S = (s_1 + s_2), (s_1 + s_2 - 1), \dots, |s_1 - s_2|$$

$$J = L + S, L + S - 1, \dots, |L - S|$$

Дакле, постоје $2S + 1$ вредности J за $L > S$ и $2L + 1$ вредности J за $L < S$.

За атоме са више електрона симболи L вредности су: S ($L=0$), P ($L=1$), D ($L=2$), F ($L=3$), ... попут s, p, d, f, \dots код атома са једним електроном.

Друга врста спин-орбиталне интеракције је j - j купловање које се јавља само у тешким атомима (атомима са великим атомским бројем Z , попут лантаноида и актиноида) па о њему неће бити пуно речи. Једино то да за сваки електрон постоји $(l + s) > j > (l - s)$ вредности j . Ове j вредности даље куплују дајући укупно J .

$$j_i = (l_i + s_i), (l_i + s_i - 1), (l_i + s_i - 2), \dots, |l_i - s_i|$$

$$J = (j_1 + j_2), (j_1 + j_2 - 1), \dots, |j_1 - j_2|$$

где су l_i и s_i орбитални и спински угаони момент, респективно за i -ти електрон.

Дакле, купловањем орбиталних и спинских угаоних момената настају нови квантни бројеви (L – укупни орбитални угаони момент, S – укупни спински угаони момент и J – укупни угаони момент атома) помоћу којих се дефинишу селекциона правила за атоме са већим бројем електрона и то тако да су дозвољени само прелази за које истовремено важи:

- а) Δl може бити било који цео број
- б) $\Delta S = 0$
- в) $\Delta L = 0, \pm 1$

г) $\Delta J = 0, \pm 1$; с тим што је прелаз од $J = 0$ до $J = 0$ забрањен.

Описано спин-орбитално спрезање доводи до цепања енергетског нивоа на $(2S + 1)$ поднивоа, познатих као **мултиплицитет** датог енергетског стања, где је S укупни спински угаони момент – квантни број, који се добија као векторски збир спинова свих валентних електрона у енергетском нивоу.

Комплетан опис енергетског стања атома по овом моделу се представља следећим симболом терма:

$$n^{2S+1}L_j$$

где је n главни квантни број валентног електрона; $2S+1$ мултиплицитет; L укупни угаони момент са вредностима представљеним симболима S ($L = 0$), P ($L = 1$), D ($L = 2$), F ($L = 3$),... и j квантни број укупног угаоног момената атома. Екситовано стање атома живе се, на пример, по овом моделу представља термом 6^3P_1 (Rohatgi-Mukherjee, 1986).

2.5.2.2 Селекциона правила за електронске прелазе у молекулима

Веза између два атома се ствара фазним преклапањем атомских орбитала. Како су атомске орбитале решења таласних једначина уколико, попут таласа, дође до преклапања површина таласних функција истог знака (фазног преклапања) они се могу међусобно појачавати или пак слабити један другога – у случају преклапања површина супротног знака (не-фазно преклапање). Тако фазним преклапањем двеју орбитала настаје нова орбитала ниже енергије – везивна молекулска орбитала (МО) а не-фазним преклапањем антивезивна МО више енергије (Vollhardt and Schore, 1996).

Пандан магнетном квантном броју m у атомима је угаони момент електрона у молекулу ознаке λ и вредности $0, \pm 1, \pm 2, \dots$ које се представљају симболима $\sigma, \pi, \delta, \dots$, респективно (Rohatgi-Mukherjee, 1986).

Симбол терма молекула се, слично оном код атома, добија сабирањем свих λ вредности које дају укупни угаони момент квантни број $\Lambda = \sum \lambda_i$ у правцу осе награђене везе, и укупни спински угаони момент квантни број $S = \sum s_i$. Векторски збир двеју величина даје резултујући угаони момент $\Omega = |\Lambda + S|$. Мултиплицитет је и овде дат у облику $2S+1$. Симболи Λ вредности од $0, \pm 1, \pm 2$, итд. су, респективно, Σ, Π, Δ , итд. па је коначно симбол терма представљен следећим обликом:

$$^{2S+1}\Lambda_\Omega$$

Тако је основно стање молекула кисеоника означено термом ${}^3\Sigma_g^-$, а ексцитована са ${}^1\Delta_g$ и ${}^3\Sigma_g^+$, где знак (+) указује на симетричност МО у односу на раван рефлексије која садржи осу молекула а (-) на антисиметричност исте. Симболи *g* (*gerade*) и *u* (*ungerade*) означавају симетричност и антисиметричност функције у односу на центар инверзије смештен на оси везе (појмови теорије група), респективно. Као најстарија грана алгебре, теорија група је данас толико разноврсна и испреплетена са алгебарским и бројним не-алгебарским дисциплинама (попут кристалографије, спектроскопије, квантне механике, квантне теорије поља) да је немогуће објаснити и продрети у сву њену проблематику. Зато ће о њој и њеним основама овде бити речи таман толико да омогући што боље разумевање спектроскопских термина. Дакле, у погледу критеријума симетричности МО у потпуности симетричне у односу на интернуклеарну осу (попут оних образованих комбинацијом атомских *s* орбитала), се називају σ или σ^* орбитале, зависно од тога да ли су везивне или антивезивне, респективно. Молекулске орбитале антисиметричне у односу на поменуто равн, нпр. оне образоване комбинацијом паралелних атомских *p* орбитала се називају π или π^* . Трећа врста МО је означена као *n*-орбитала – не-везивне орбитале исте енергије као и код одговарајућег изолованог атома, а пар електрона који заузима *n*-орбитале се назива неспареним паром електрона (Rohatgi-Mukherjee, 1986; Coyle, 1986).

Електронско стање молекула се генерално може добити и као производ симетрије¹⁵ попуњених орбитала (Табела 2).

Табела 2 Предвиђање симетричности молекулских орбитала (Rohatgi-Mukherjee, 1986)

Симетрија орбитале	$\lambda_1 + \lambda_2 = \Lambda$	Симетрија молекула
$\sigma \sigma$	$0 + 0 = 0$	Σ^+
$\sigma \pi$	$0 \pm 1 = \pm 1$	Π
$\sigma \delta$	$0 \pm 2 = \pm 2$	Δ
$\pi \pi$	$\pm 1 \pm 1 = 0, \pm 2$	$\Sigma^+, \Sigma^-, \Delta$
$\pi \delta$	$\pm 1 \pm 2 = \pm 1, \pm 3$	Π, Φ
$\delta \delta$	$\pm 2 \pm 2 = 0, \pm 4$	$\Sigma^+, \Sigma^-, \Gamma$

Стога, коначно, селекциона правила за прелазе између два енергетска стања у молекулу гласе:

а) $\Delta\Lambda = 0, \pm 1$

¹⁵ Симетрија молекула дефинисана у реалном 3D простору је одређена скупом елемената симетрије и одговарајућих операција симетрије. Операција симетрије (нпр. рефлексија, инверзија) је покрет молекула у односу на дати елемент симетрије (геометријска величина нпр. равн, центар симетрије, респективно) којим се молекул доводи у првобитан положај. Молекули се према теорији група класификују на основу скупа операција симетрије (тзв. тачкасте групе – Табела 3) које их дефинишу.

б) $\Delta S = 0$

в) Симетрија енергетског стања мора остати иста

Тако је нпр. $n \rightarrow \pi^*$ прелаз у формалдехиду забрањен по критеријуму симетрије (преклапања) јер су n орбитале на атому кисеоника постављене управно на раван π^* орбитала у $>C=O$ групи.

Најстрожији услов који треба испунити током електронског прелаза је задржавање укупног спин угаоног момента ($\Delta S = 0$). Дакле, **дозвољени** су само прелазии између **синглет-синглет** или **триплет-триплет** стања.

Важно је правити разлику између термина „електронско стање” и „електронска орбитала”. Док је „електронска орбитала” део простора у коме је највећа вероватноћа налажења електрона уз претпоставку да не зависи од осталих електрона у молекулу, „електронско стање” означава особине свих електрона у свим орбиталама а како су интеракције између електрона веома значајне, прелаз електрона из једне у другу орбиталу молекула доводи до промене његовог електронског стања (Rohatgi-Mukherjee, 1986).

2.5.3 Номенклатура електронских прелаза

Номенклатура електронских стања и одговарајућих прелаза се разликује зависно од својства које треба истаћи. Неки од система обележавања су приказани у **Табели 3**.

Табела 3 Номенклатура електронских прелаза (Klessinger and Michl, 1995)

Систем	Ознака стања		Пример
Енумеративни (набројиви) систем	S_0	Основно синглетно стање	$S_0 \rightarrow S_1$
	$S_1, S_2, S_3 \dots$	Екситована синглетна стања	$S_0 \rightarrow S_2$
	$T_1, T_2, T_3 \dots$	Триплетна стања	$T_1 \rightarrow T_2$
Теорија група	A, B, E, T (са индексима g, u, 1, 2, ', ")	Иредуцибилне репрезентације тачкасте групе молекула	${}^1A_1 \rightarrow {}^1B_2^*$ ${}^1A_{1g} \rightarrow {}^1B_{2u}$ ${}^1A_{1g} \rightarrow {}^3E_{1u}$
Kasha	σ, π, n σ^*, π^*	Орбитале у основном стању Орбитале у екситованом стању	$\pi \rightarrow \pi^*$ $n \rightarrow \pi^*$
Platt	A B, L (са индексима a, b)	Основно стање Екситована стања	${}^1A \rightarrow {}^1B_a$ ${}^1A \rightarrow {}^1L_b$
Mulliken	N	Основно стање	$V \leftarrow N$
	Q, V, R	Екситована стања	$Q \leftarrow N$
	α, ρ, β	Интензитет и облик траке	

* Горњи леви индекс указује на мултиплицитет

Када је акценат на мултиплицитету, користи се енумеративни систем. Наиме, побуђивањем спољашњих електрона у молекулу, побуђена стања могу бити синглетна (S), када побуђени електрон задржава своју оријентацију или триплетна (T) када долази до промене оријентације. Већина молекула у основном стању има спарене електроне, па је $S = 0$; $2S + 1 = 1$ а молекул у синглетном стању. Основно синглетно стање се обележава са S_0 . Апсорпцијом фотона из UV или VIS области индукује се прелаз електрона у вишу МО. При прелазу, оријентација спина електрона може остати иста, тада је $S = 0$, побуђено стање је синглетно са ознаком S_1 , или може да се промени, када је укупан спин $S = 1$, $2S + 1 = 3$, а стање триплетно (T_1). Молекули са непарним бројем електрона, код којих је $S = 1/2$, а $2S + 1 = 2$, су у основном дублетном стању (Klessinger and Michl, 1995; Klán and Wirz, 2009).

Симболи теорије група се користе онда када се истиче симетрија стања (о чему је већ било речи). Уколико је акценат на врсти молекулских орбитала између којих се врше прелази, користи се Kasha-ина номенклатура ($n \rightarrow \pi^*$, $\pi \rightarrow \pi^*$ итд). Clar-ова номенклатура се заснива на појави апсорпционих трака па се тако нпр. прве три траке фенантрена означавају као α , ρ и β , респективно док Platt-ова номенклатура те исте траке означава са 1L_a , 1L_b и 1B_b . По Mulliken-овој номенклатури основно стање је означено са N а валентна ексцитована стања са V . Посматране траке у спектру фенантрена се називају $V \leftarrow N$ прелази (Klessinger and Michl, 1995).

2.5.4 Једномолекулски фотофизички и фотохемијски процеси

У основном стању молекула сви његови електрони су спарени и смештени у орбитале најниже енергије, па је и укупна енергија молекула најнижа могућа. Када он ступи у интеракцију са ЕМ зрачењем, електрично поље зрачења тежи да наруши облак наелектрисања око молекула. Уколико су фреквенција упадног зрачења и фреквенција молекула, условљена његовим електронским стањем исте, успостављају се резонантни услови и долази до апсорпције фотона од стране молекула/атома, подижући га на виши енергетски ниво (Rohatgi-Mukherjee, 1986). Електронска структура молекула се мења одн. молекул прелази у побуђено (ексцитовано) стање јер један електрон заузима енергетски вишу орбиталу, па је укупна енергија виша од оне у основном стању. Зато је ексцитовано стање посебна врста, са коначним временом живота, физичким и хемијским особинама различитим од оних код основног стања.

Екситација се постиже различитим методама, између осталог електричним пражњењем, јонизујућим зрачењем или хемијском реакцијом. Најчешће коришћен метод за генерисање ексцитованих стања је апсорпцијом UV и VIS фотона. Електромагнетно зрачење из ових области спектра поседује енергију неопходну за конвертовање основног у једно од ниско-лежећих ексцитованих стања, тј. у стање у коме побуђени електрон из енергетски највише попуњене орбитале (HOMO) прелази у енергетски најнижу слободну молекулску орбиталу (LUMO) (Klessinger and Michl, 1995). Ако нема интеракције са другом хемијском врстом, електронско ексцитовано стање може прећи у неко друго електронско стање (ниже ексцитовано или основно стање) истог једињења (фотофизички процес), или у друго једињење (фотохемијски процес).

Интрамолекулски фотофизички процеси се деле у две групе:

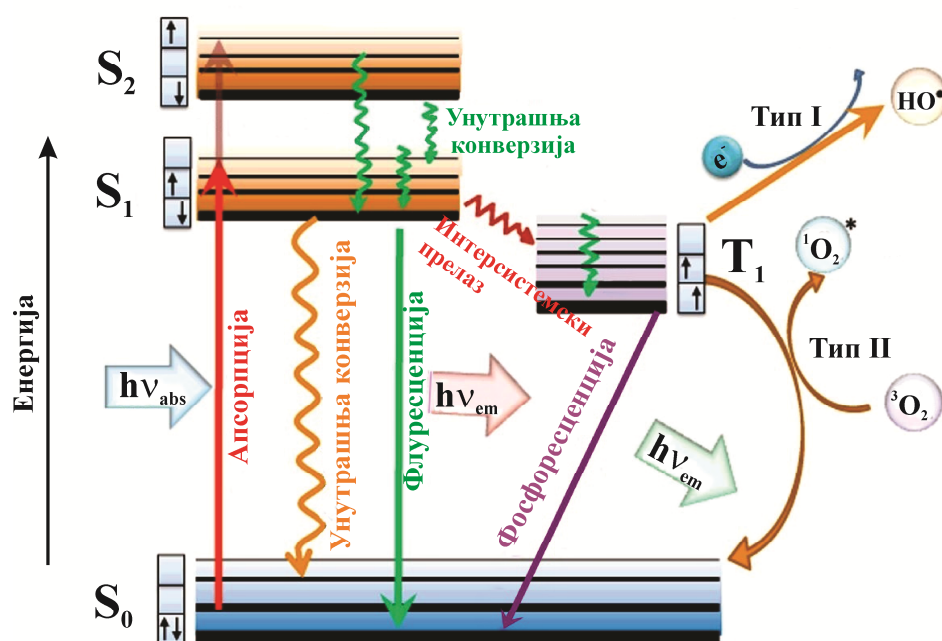
- 1) Радијациони (луминисцентни) процеси код којих долази до емисије фотона: флуоресценција и фосфоресценција. Енергија емитоване светлости молекула у фотолуминисцентним процесима је мања од ексцитационе енергије, јер се део енергије конвертује у вибрационо или ротационо кретање. Стога ексцитацијом молекула UV зрачењем најчешће долази до емисије видљиве светлости.
- 2) Не-радијациони процеси, који се одвијају без емисије светлости а вишак енергије се ослобађа у виду топлоте: унутрашња конверзија (IC), вибрациона релаксација и интерсистемски прелаз (ISC)¹⁶.

На брзину не-радијационих процеса утичу два важна фактора:

- 1) Разлика у енергији: што је већа разлика између најнижих вибрационих нивоа два стања, брзина прелаза је мања: $k(S_2 \rightarrow S_1) > k(S_1 \rightarrow S_0)$.
- 2) Правило задржавања спина (*spin conservation rule*): прелази између стања различитог мултиплицитета су забрањени: $k(S_2 \rightarrow S_1) > k(S_1 \rightarrow T_1)$ (Rohatgi-Mukherjee, 1986).

Побројани интрамолекулски фотофизички процеси до којих долази након ексцитације молекула се могу спојити и представити јединственим дијаграмом, познатим под називом Jablonski дијаграм (Сл.15).

¹⁶ Зависно од тога да ли током процеса долази до промене укупног мултиплицитета не-радијациони прелази се деле у две групе: ако нема промене спина тј. не-радијациони прелаз се одвија између стања истог мултиплицитета (синглет-синглет, триплет-триплет: $S_2 \rightarrow S_1, T_1 \rightarrow T_2$), реч је о IC. Ако до промене мултиплицитета ипак дође одн. не-радијациони прелаз се одвија између стања различитих мултиплицитета (синглет-триплет, триплет-синглет: $S_1 \rightsquigarrow T_1, T_1 \rightsquigarrow S_0$), реч је о ISC (Rohatgi-Mukherjee, 1986).



Слика 15 Упрошћени Jablonski дијаграм. Шематски приказ енергетских нивоа, фотофизичких и фотохемијских процеса који се одигравају у ексцитованом молекулу. Електронска стања су приказана подељаним хоризонталним линијама. S_0 , S_1 и S_2 су, редом, основно синглетно стање, прво и друго ексцитовано синглетно стање (спарени електрони, антипаралелних спинова), док је T_1 триплетно стање (неспарени електрони, паралелног спина). Тањим хоризонталним линијама су приказани вибрациони нивои електронских стања (ротациони нивои нису приказани). Радијациони прелази (апсорпција, флуоресценција и фосфоресценција) су приказани правим, а не-радијациони (IC и ISC) таласастим линијама (Lichtman and Conchello, 2005).

Електрон током ексцитације екстремно брзо (10^{-15} s) апсорбује енергију потребну да пређе из основног (S_0) у неки од виших вибрационих нивоа побуђеног синглетног стања (S_1 , S_2) у складу са Franck-Condon-овим принципом¹⁷. Како је само основно стање стабилно, побуђени молекул се, уколико се не укључи у неку фотохемијску реакцију и изгуби свој идентитет, врло брзо релаксира (ослобађа вишка енергије) IC-ом ($k \approx 10^{-13}$ - 10^{-12} s) до вишег вибрационог нивоа првог ексцитованог синглетног (S_1) стања, а онда вибрационом релаксацијом прелази на најнижи вибрациони ниво овог стања. Доласком на нулти вибрациони ниво S_1 стања постоји, зависно од структуре молекула, неколико могућности за релаксацију до неког од вибрационих нивоа S_0 стања. Први начин је радијациона дисипација (емисија) енергије ($S_1 \rightarrow S_0$) флуоресценцијом ($k \sim 10^{-9}$ s), други: не-радијациони $S_1 \rightarrow S_0$ прелаз IC-ом, а трећи: не-радијациони прелаз из најнижег синглетног у најниже триплетно стање

¹⁷ Franck-Condon-ов принцип гласи: Електронски прелази су толико брзи (10^{-15} s) у поређењу са кретањем језгра (10^{-13} s) да непосредно након прелаза, језгро има скоро исти релативни положај и момент као и непосредно пре прелаза (Klán and Wirz, 2009).

($S_1 \rightsquigarrow T_1$) ISC-ом ($k \approx 10^{-11} - 10^{-7}$ s) (прелаз „забрањен” селекционим правилима, стр. 31). Дакле, иако је прелаз $S_0 \rightarrow T_1$ забрањен селекционим правилима¹⁸, триплетно стање, од посебног значаја за фотохемију, се попуњава индиректно. Релаксација T_1 стања се обично одвија радијационом $T_1 \rightarrow S_0$ емисијом – фосфоресценцијом ($k \approx 10^{-3} - 10$ s). Међутим, уколико се молекул ISC-ом врати из $T_1 \rightsquigarrow S_1$ стање, релаксација до S_0 радијационим прелазом се назива „закасна флуоресценција” (Rohatgi-Mukherjee, 1986; Coyle, 1986)

2.7 Механизам фотосензибилизоване реакције

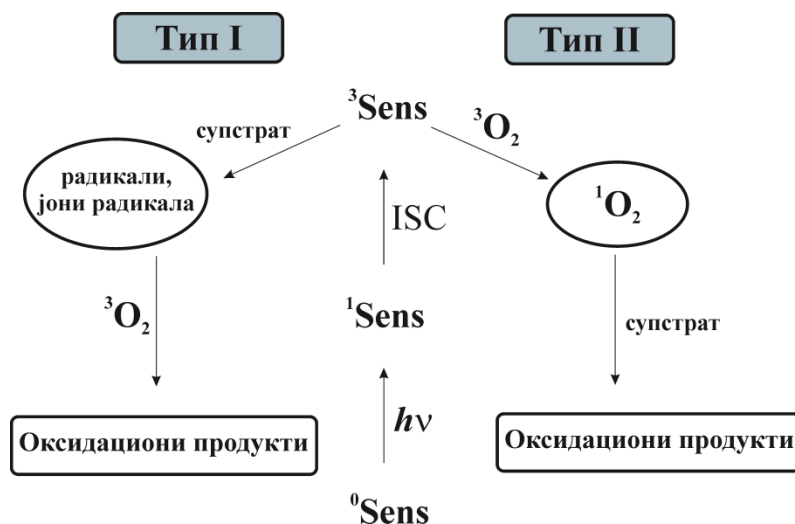
Током фотосензибилизоване реакције молекула који у својој структури садржи хромофору¹⁹ активирану светлошћу (фотосензибилизатор) индукује хемијске промене у молекулима без хромофора (супстрат). До реакције долази уколико се фотоекситована хромофора не врати у основно стање (дисипацијом енергије) већ иницира хемијске реакције којим настају реактивни интермедијери и токсични фотопроизводи. Дакле, предуслов за реакцију са циљаним молекулом је довољно дугачак „живот” екситованог стања (зато се углавном одвијају преко триплета). Ове реакције се у аеробним условима (тзв. фотосензибилизоване оксидације) одвијају преко два компетитивна механизма означених као Тип I и Тип II (Lassalle, 2005) (десна страна дијаграма приказаног на **Сл.15**).

Тип I механизам се, по Foote-у (1968), односи на директну реакцију екситованог триплета сензибилизатора (3Sens) са супстратом (попут масних киселина, фенолних једињења и др.) уз продукцију слободних радикала (**Сл.16**). Реакција се одвија апстракцијом водоника или преносом електрона када настају радикали и јони радикала, респективно (Foote, 1968). Настали радикали даље у реакцији са кисеоником дају оксидационе производе типа хидропероксида док полуредуковани облици преносом електрона на кисеоник дају $O_2^{\cdot-}$, чијом спонтаном дизмутацијом настаје H_2O_2 . Водоник пероксид у присуству јона прелазних метала (Fenton-овом реакцијом) генерише $\cdot OH$ који коначно оксидује супстрате слободно-радикалским механизмом

¹⁸ Селекциона правила за не-радијационе прелазе су супротна од оних која важе за радијационе, па су тако дозвољени прелаз $g \rightsquigarrow g$, $u \rightsquigarrow u$ и $S_1 \rightsquigarrow T_1$ а забрањени $u \rightsquigarrow g$, $S_1 \rightarrow S_0$ и $T_1 \rightsquigarrow S_0$ (Rohatgi-Mukherjee, 1986).

¹⁹ Хромофора (грч. *chromophorus* – носилац боје) је део молекула одговоран за апсорпцију у UV-VIS области (обично групе са незасићеним везама попут $>C=C<$, $>C=O$, NO_2 , итд.).

(DeRosa and Crutchley, 2002; Lassalle, 2005). Брзина Тип I реакције зависи од врсте и концентрације сензибилизатора и супстрата (Foote, 1974).



Слика 16 Механизам фотосензибилизованих реакција (Insińska-Rak and Sikorski, 2014)

Механизам Тип II реакције захтева присуство молекулског кисеоника ($^3\text{O}_2$). Реакција се углавном одвија преносом енергије са $^3\text{Sens}$ на $^3\text{O}_2$ (триплет-триплет анихилација), када настаје врло електрофилни синглетни кисеоник, који врло брзо оксидује биомолекуле. Друга могућност интеракције (<1%) ових двају реактаната је пренос електрона са $^3\text{Sens}$ на $^3\text{O}_2$ уз генерисање супероксида (Lassalle, 2005). Брзину Тип II реакције одређује растворљивост и концентрација кисеоника у систему. Прелаз са Тип I у Тип II и обрнуто зависи од концентрације кисеоника, врсте и концентрације супстрата (Foote, 1974).

Крај фотосензибилизоване реакције означава спонтано или *quencher*-ом индуковано враћање фотоекситоване хромофоре сензибилизатора у основно стање уз могућност иницирања другог циклуса фотоекситације. До неповратне терминације долази након деструкције сензибилизатора (нпр. *bleaching*-а боје услед напада синглетним кисеоником) (Wondrak *et al.*, 2006; Quintero and Miranda, 2000).

Удео Тип I и/или Тип II механизма се одређује помоћу два различита прилаза. Први се заснива на проучавању ефеката одговарајућих „додатака” (*quencher*-а) који инхибирају феномене до којих доводе одговарајуће радикалске (нпр. SOD за $\text{O}_2^{\cdot-}$; манитол, изопропанол, тиоуреа, диметилсулфоксид (DMSO) за $\cdot\text{OH}$) и не-радикалске врсте (нпр. CAT и GSH за H_2O_2 ; натријум азид (NaN_3) и DABCO као физички, а

хистидин као хемијски *quencher* $^1\text{O}_2$). Други прилаз је детекција, на директан или индиректан начин, примарних реакционих производа фотохемијске реакције EPR спектрометријом (Lassalle, 2005).

Фотосензибилизована оксидација је привукла пажњу хемичара и биолога откад је Oscar Raab 1900. године приметио да до смрти парамецијума (*Paramecium caudatum*) долази у присуству сунчеве светлости (или извора вештачке светлости који емитују фотоне из VIS области спектра), кисеоника и боја које апсорбују у тој области (фотосензибилизатори), акридин-оранжа и еозина (Foote, 1968). Када сунчева светлост доспе до површине коже, са исте се рефлектује, расејава или апсорбује. Већ је наглашено да атоми/молекули морају апсорбовати светлост како би иста испољила биолошке ефекте (Први закон фотохемије). До којих ће и каквих ефеката доћи зависи од енергије упадног сунчевог зрачења и врсте хромофоре која апсорбује у кожи.

Ендогени фотосензибилизатори припадају групи тетрапирила (протопорфирин IX, уропорфирин III), флавина (FMN, FAD) и редукованих пиридинских нуклеотида (NADH, NADPH) док егзогени потичу из козметичких средстава, адитива у храни и лекова попут фенотиазина и нестероидних антиинфламаторних лекова. Већина ових агенаса доводи до фотооштећења коже (Wondrak *et al.*, 2006).

Фотосензибилизована продукција синглетног кисеоника је омогућила развој фасцинантног поља медицине – фотодинамичке (PDT) терапије (Andrasik, 2007). PDT терапија се заснива на индуковању смрти малигнух ћелија комбинованим ефектом видљиве светлости, фотосензибилизатора и кисеоника. Третман се састоји из топикалне или интравенске апликације сензибилизатора (најчешће из групе порфирина) – зависно од врсте и/или локализације тумора; његове селективне акумулације у малигнуом ткиву и излагања светлости одговарајуће таласне дужине (обично из црвеног дела спектра, $\lambda \geq 600 \text{ nm}$, јер пенетрира дубље у ткива). Енергија ексцитованог сензибилизатора се преноси на кисеоник уз генерисање синглетног кисеоника и других ROS врста. Ови цитотоксични фотопроизводи иницирају каскаду биохемијских догађаја који оштећују и коначно доводе до смрти неопластичних ћелија. Фотосензибилизатор се на крају из тела уклања преко јетре и бубрега (Andrasik, 2007; Juarranz *et al.*, 2008).

2.8 Липидна пероксидација

2.8.1 Липиди – особине, структура, класификација

Због све већег броја гојазних људи у свету, липиде данас прати лоша репутација иако су апсолутно неопходни за добро здравље. Са структурне и функционалне тачке гледишта представљају врло хетерогену групу једињења са веома битним улогама у телу. Конституенти су ћелијских мембрана и нервног ткива, представљају унутарћелијске депое енергије (највећа количина енергије, у виду АТФ-а, се добија управо из липида процесом β -оксидације масних киселина) а поједини липиди поседују високу биолошку активност попут хормонске (тестостерон, кортизол, естрадиол и др.), провитаминске (каротени) и витаминске (А и D). Неполарну природу липида диктира присуство угљеника и водоника у већем делу молекула па се као такви не растварају (или слабо растварају) у води али се растварају у неполарним растварачима, тзв. растварачима за масти (хлороформ, етар, бензен, ацетон и др.) (Moore and Langley, 2008).

Према једној од многобројних подела – на основу хемијске структуре – липиди се деле на „просте” и „сложене”. „Прости” липиди (воскови и триацилглицероли одн. масти и уља) садрже само атоме С, Н и О а хидролизом дају два производа (алкохол и вишемасне киселине, нпр. триацилглицероли: глицерол и масне киселине). „Сложени” липиди (фосфолипиди, гликолипиди и стероиди), поред наведених садрже и додатне атоме: Р, N или S а хидролизом дају три или више производа (алкохол, вишемасне киселине и угљене хидрате односно фосфорну киселину нпр. глицерофосфолипиди: глицерол, масне киселине и фосфорну киселину) (Fahy *et al.*, 2011). Неки од аутора наводе и трећу групу, тзв. „изведене” липиде који се добијају хидролизом простих и сложених липида. У ову групу спадају масне киселине, глицерол, стероиди, масни алкохоли, кетонска тела, угљоводоници, витамини растворни у мастима (А, D, Е и K), хормони итд. (Akoh and Min, 2002).

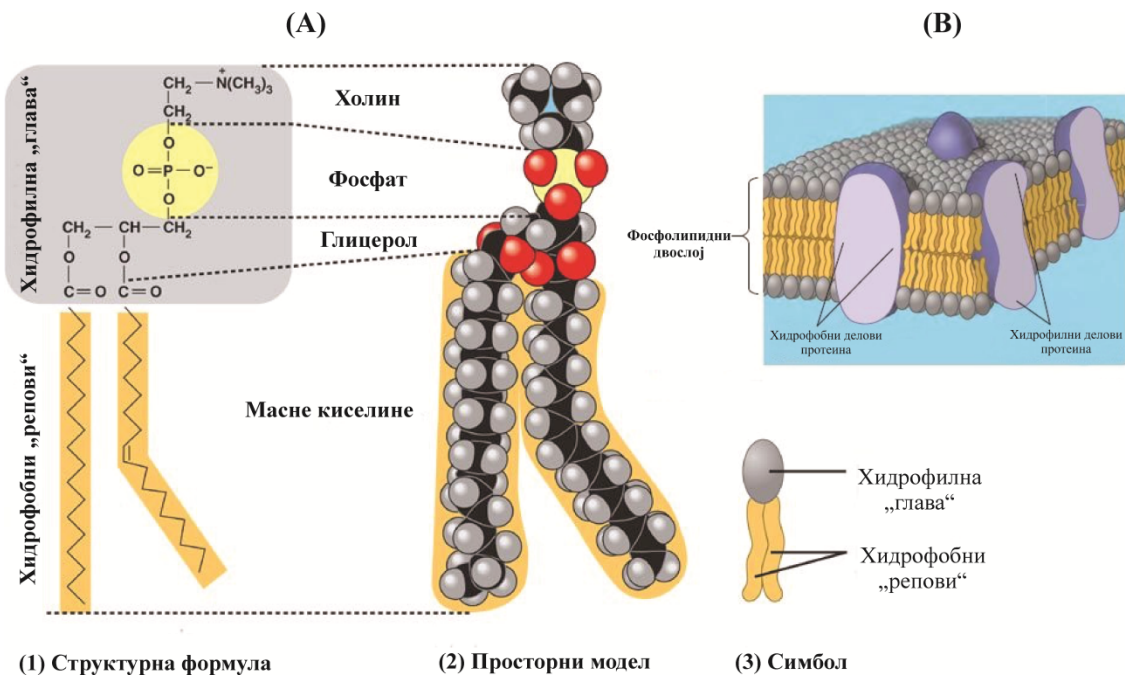
Фосфолипиди су сложени липиди са једном или више фосфатних група у својој структури. Амфипатични су по природи што значи да се сваки молекул састоји из хидрофилног („главе”) и хидрофобног („репа”) дела који у воденој средини формирају липидни двослој, са „главама” оријентисаним ка води на обе стране и „реповима” ка унутрашњости двослоја (Сл.17). Главни су конституент (заједно са протеинима)

ћелијских мембрана²⁰ прокариота (бактерија) и еукариота (биљака и животиња) а учествују и у сигналној трансдукцији. Физичке и хемијске особине фосфолипида диктирају врста „главе” као и дужина и незасићеност „репа”. Добијају се као нус производи у производњи биљних уља, у виду смеше различитих фосфолипидних врста (лецитина), која се користи као емулгатор у прехранбеној индустрији (Yoon and Kim, 2002). Своје место у козметичкој и фармацеутској индустрији дугују употреби као носача (козметички) активних супстанци, у виду емулзија и липозома. Неке од формулација су доступне на тржишту као Intralipid[®] (липидна емулзија (U/V) нутритивних суплемената за интравенозну апликацију), Diprivan[®] (липидна емулзија пропофола), Daunoxome[®] и Ambisome[®] (липозоми са даунорубицином и амфотерицином В, респективно) (Li *et al.*, 2015).

У зависности од алкохолне компоненте фосфолипида се деле на глицерофосфолипиде (са глицеролом) и сфингофосфолипиде (са сфингозином). Како су глицерофосфолипиди најбројнија класа у природи, њима ће бити посвећено више пажње.

Структура глицерофосфолипида је изведена из фосфатидне киселине (1,2-диацил-глицерол-3-фосфата) (Baynes and Dominiczak, 2014). Скелет чини трохидроксилни алкохол глицерол, за који су естарски везана два ланца масних киселина (у положајима *sn*-1 и *sn*-2) и фосфорна киселина (у положају *sn*-3), за коју се даље вежу мали, поларни молекули (пре свих алкохоли) (Сл.17) па отуда и представници попут фосфатидил-холина, фосфатидил-етаноламина, фосфатидил-серина, фосфатидил-инозитола, фосфатидил-глицерола и кардиолипина (Jain *et al.*, 2005; Moore and Langley, 2008).

²⁰ Ћелијске мембране се претежно састоје из глицерофосфолипида (фосфатидилхолин, фосфатидилетаноламин, фосфатидилсерин и фосфатидилинозитол), сфинголипида (сфингомијелина, церамида и ганглиозида), холестерола и естара холестерола, ацилглицерола и масних киселина. Фосфолипидни двослој служи не само као пермеабилна баријера већ обезбеђује средину неопходну за правилно функционисање интегралних (трансмембранских) протеина мембране (Adibhatla and Hatcher, 2010).



Слика 17 Структура фосфолипида приказана на примеру фосфатидил-холина (A): структурна формула (1) просторни модел (2) и симболично представљање молекула фосфолипида (3). (B) Оријентација фосфолипида у мембрани приказаној течни-мозаичним моделом код кога су протеини „уроњени“ у течни фосфолипидни двослој.

Процес оксидације липида без ослобађања енергије се назива липидна пероксидација. Од давнина је препозната као проблем складиштења масти, уља, маргарина али и уљаних боја, мастила, смола и лакова. Зато је и најистраживанији слободно-радикалски процес у прехранбеној и полимерној индустрији, али и од стране кустоса у музејима (Södergren, 2000).

2.8.2 Механизам липидне пероксидације

Липидна пероксидација (ЛП) се дефинише као оксидација липида (пре свега масних киселина, холестерола и фосфолипида) са великим бројем незасићених, двоструких ($>C=C<$) веза (Devasagayam *et al.*, 2003). Процес се одвија преко три различита механизма па тако постоје ензимска, не-ензимска слободно-радикалска и не-ензимска не-радикалска оксидација липида (Niki *et al.*, 2005). У овом делу ће бити разматран механизам не-ензимске слободно-радикалске липидне пероксидације (аутооксидације липида).

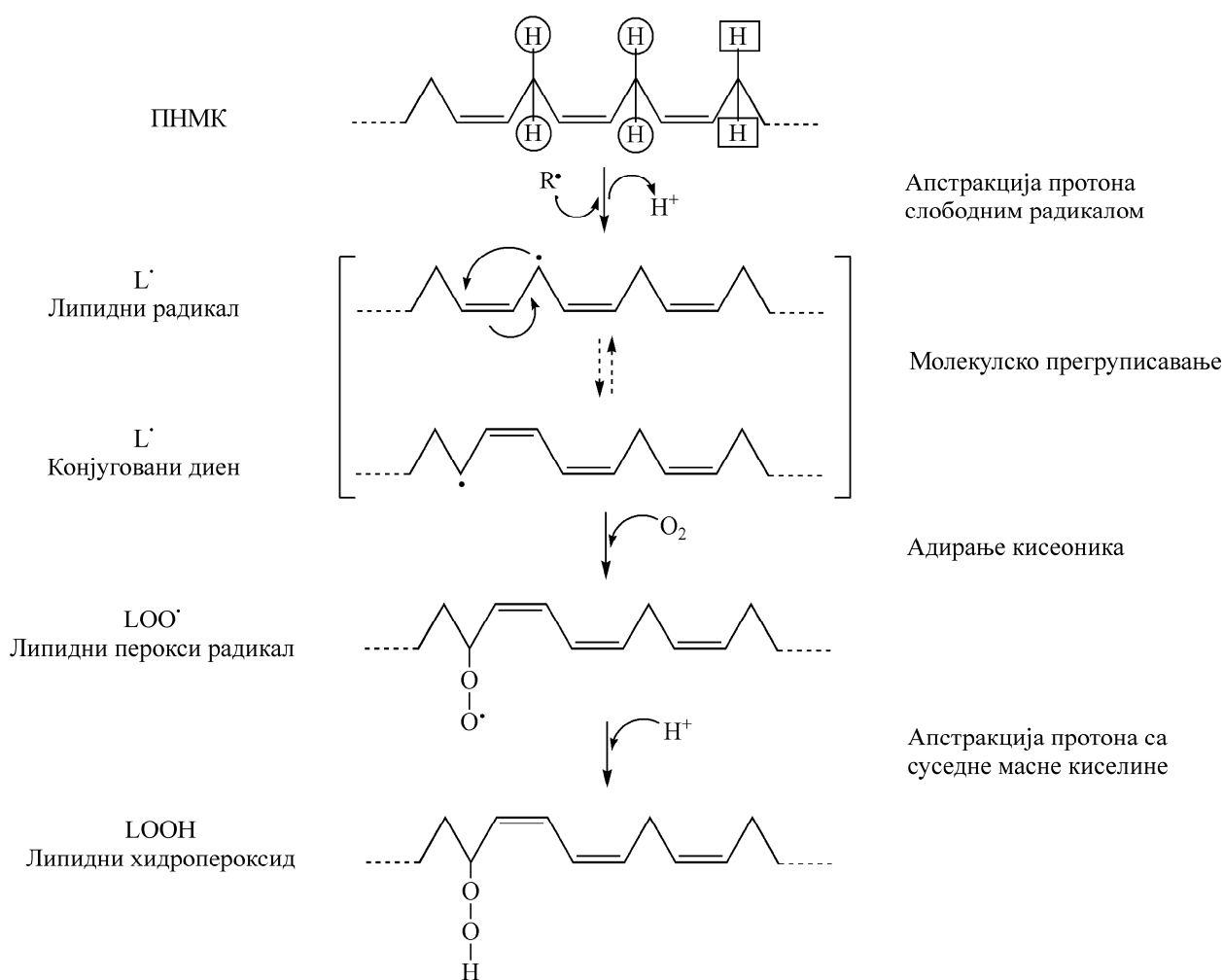
Липиди су конституенти готово свих намирница, углавном (>90%) у облику триацилглицерола (естара масних киселина и трохидроксилног алкохола глицерола) чија оксидација, у виду ужеглости и последичне појаве непријатних мириса, знатно скраћује време складиштења и нутритивну вредност хране (Yanishlieva-Maslarova, 2001). Липидна пероксидација се одвија *in vivo* у биљкама и животињама. До ЛП у биљкама долази активацијом одговарајућих ензима услед механичких повреда или инфекција изазваних бактеријама, гљивама или вирусима док у организмима животиња најчешће долази до оксидативног оштећења липида ћелијске мембране (фосфолипида и холестерола) (Repetto *et al.*, 2012).

Присуство полинезасићених (са бар две и/или више двоструких веза) масних киселина (ПНМКа) у фосфолипидима двослоја биолошких мембрана је основа њихове флуидности. Како су ПНМКе главне мете напада, ЛП смањује флуидност мембране, ограничава мобилност мембранских протеина, повећава не-специфичну пермеабилност мембране за јоне Ca^{2+} и доводи до руптуре мембране што нарушава једну од њених најважнијих улога – способност да делује као баријера. Имајући у виду чињеницу да мембране чине базу многих ћелијских органела (митохондрије, ендоплазматичног ретикулума, лизозома, пероксизома итд.) опстанак читаве ћелије се доводи у питање (Devasagayam *et al.*, 2003). Зато ЛП „игра главну улогу” у патогенези великог броја болести и клиничких стања: дијабетеса, различитих хроничних упалних стања, артеросклерозе, канцера итд.; у неуролошким дегенеративним болестима попут можданог удара, амиотрофичне латералне склерозе (ALS), Parkinson-ове и Alzheimer-ове болести (Lovell and Markesbery, 2003; Negre-Salvayre *et al.*, 2010).

Попут свих ланчаних реакција и ЛП се састоји из три фаза: иницијације, пропације и терминације (Deng *et al.*, 1997).

Иницијација процеса ЛП подразумева напад било које врсте (углавном ROS врсте или фотосензибилизатор у метастабилном, триплетном стању) довољне реактивности да апстрахује (откине) алилне (везане за први С-атом до двогубе везе) и/или двоструко алилне (везане за С-атом између две незасићене везе) протоне из метиленске групе ($-\text{CH}_2-$) ПНМКе (Сл.18). Осетљивост масних киселина на оксидацију одређује број двоструких веза – што их је више, оне су осетљивије. Зато су засићене и масне киселине са једном двоструком везом много отпорније од ПНМКе. Разлог лежи у чињеници да двострука веза слаби С-Н везу суседне метиленске групе што алилне и двоструко алилне протоне, за разлику од винилних (везаних за С-атоме

који граде двоструку везу) чини осетљивијим и подложнијим апстракцији. Како водоников атом садржи један протон и један електрон, његовом апстракцијом остаје неспарени електрон на С-атому за који је првобитно био везан. Образовани угљенично-центрирани (алкил) радикал (липидни радикал, L^{\bullet} – **Сл.18**) се у аеробним ћелијама стабилизује молекулским прегруписавањем (резонантном стабилизацијом) двоструких веза (1,4-пентадиен прелази у 1,3-пентадиен – конјуговани систем) дајући конјуговани диен (L^{\bullet}), који у фази **пропагације** реагује са кисеоником дајући липидни перокси радикал (LOO^{\bullet}). Разградњом липидних пероксида настају алкокси (LO^{\bullet}) или хидрокси ($^{\bullet}OH$) радикали који могу иницирати нови процес ЛП. Образовани перокси радикал апстракцијом водоника са суседне масне киселине даје липидни хидропероксид ($LOOH$) док са друге стране, новонастали угљенично-центрирани радикал (онај на суседној МК) у реакцији са кисеоником даје нови перокси радикал пропагирајући даље реакцију. Пропагација ланца траје све док не дође до реакције два радикала и последичног стварања не-радикалских производа. Тако, уколико у систему нема *chain-breaking* антиоксиданаса (о чему је већ било речи у делу **2.4** на стр. 15), новонастали перокси радикал у реакцији са другим перокси радикалом доводи процес липидне пероксидације у фазу **терминације** (видети шему на стр. 45) (Paillous and Fery-Forgues, 1994; Wheatley, 2000;).



Слика 18 Настанак примарних производа ЛП не-ензимским слободно-радикалским механизмом приказан на примеру масне киселине са три двоструке везе. Због изузетног значаја за иницијацију процеса ЛП у антиконјугованој структури угљоводоничног ланца масне киселине истакнути су алилни (уоквирени квадратом) и двоструко алилни (уоквирени кругом) протони.

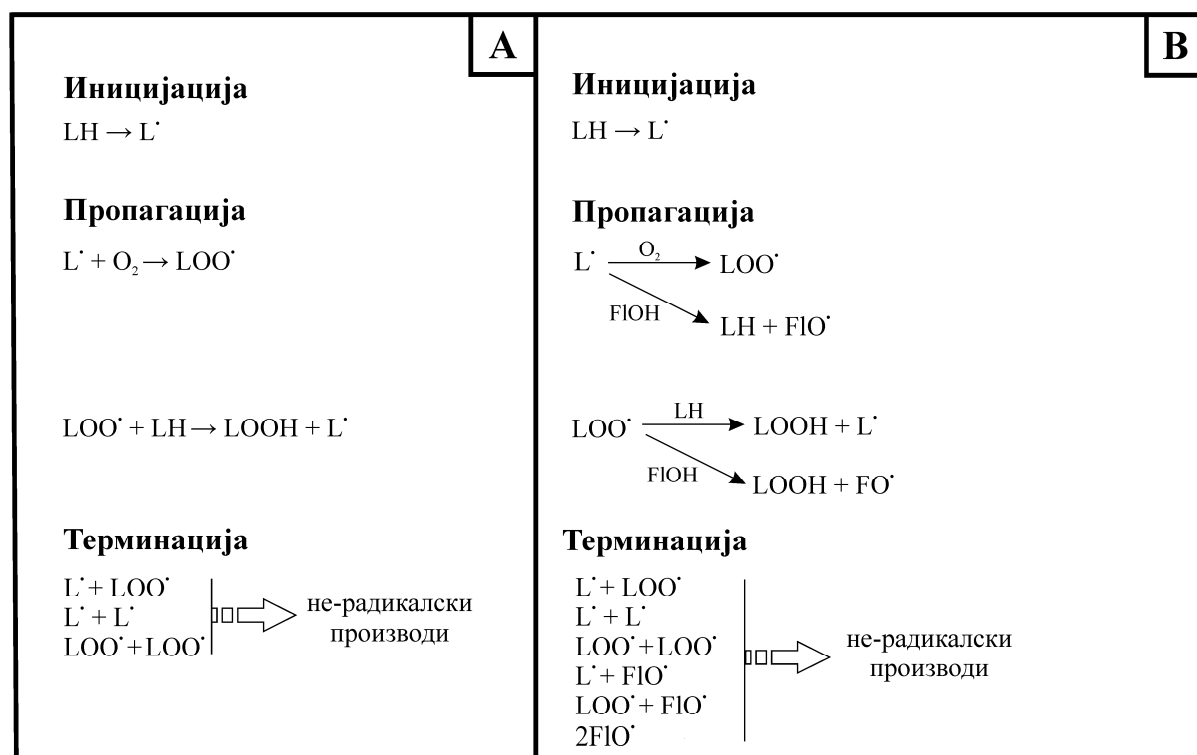
Процес ЛП се може приказати и упрошћенијом шемом, датом на **Слици 19А**.

2.8.3 Инхибиција аутооксидације липида

2.8.3.1 Флавоноиди као *chain-breaking* антиоксиданси

Инхибиција аутокаталитичке, не-ензимске слободно-радикалске ЛП се сматра једним од најважнијих аспеката антиоксидативног деловања флавоноида. Као *chain-breaking* антиоксиданси, флавоноиди (FIOH) инхибирају или успоравају оксидацију липида укључујући се у фазу пропације ланца. Наиме, FIOH донирају водоникове атоме липидним радикалима (L^{\bullet}) или липидним перокси радикалима (LOO^{\bullet}) ометајући

даљу пропацију ланца (Сл.19В). Производи ових реакција су стабилне не-радикалске врсте, липид (LH), одговарајући липидни хидропероксид (LOOH) и флавоноидни фенокси радикал (FIO[•]). Радикали флавоноида испољавају врло слабу реактивност према молекулском кисеонику и/или липидима, што знатно смањује брзину пропације. Флавоноидни радикали учествују и у фази терминације ланца ступајући у реакцију са липидним, перокси или самим флавоноидним радикалима дајући не-радикалске производе (Akoh and Min, 2002; Deng *et al.*, 1997).

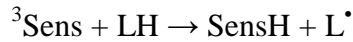


Слика 19 Механизам деловања *chain-breaking* АО. (А) Општи механизам ЛП, (В) Инхибиција аутооксидације липида флавоноидима (Galleano *et al.*, 2010).

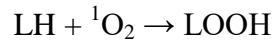
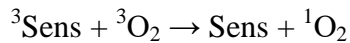
2.8.3.2 Фотосензибилизована липидна пероксидација

Липиди не апсорбују фотоне из UV-VIS области ЕМ спектра па до њихове екситације долази увођењем одговарајућег фотосензибилизатора у систем. Процес фотосензибилизоване ЛП се одвија по већ објашњеним Тип I и Тип II механизмима фотосензибилизованих реакција. По првом (Тип I), радикалском механизму, у директној реакцији између побуђеног фотосензибилизатора (³Sens) и липида (LH),

долази до генерисања липидних радикала, L^{\bullet} и иницирања ЛП, која се даље одвија као и аутооксидација липида:



По другом (Тип II) механизму ексцитовани фотосензибилизатор преноси своју енергију на основно, триплетно стање кисеоника када настаје синглетни кисеоник који у реакцији са липидима (не-радикалским путем) даје хидропероксиде:



Фотосензибилизована ЛП се, у биолошким системима, одвија истовремено радикалским и не-радикалским путем, а који ће бити доминантнији зависи од врсте сензибилизатора (различити сензибилизатори присутни у мембранама и ткивима фаворизују један од механизма) и супстрата (липида), концентрације супстрата и кисеоника (Marković, 1990; Girotti, 2001).

2.8.4 Производи липидне пероксидације

Аутооксидацијом липида настаје велики број оксидационих производа. Примарни производи ЛП су, као што је већ објашњено, нестабилни липидни пероксиди и стабилни хидропероксиди. Спонтаном деградацијом пероксида настају секундарни производи из групе алдехида, кетона, алкохола, угљоводоника итд., зависно од масно-киселинског састава липида и присуства јона метала. Са токсиколошког аспекта су најважнија карбонилна једињења и то: α,β -незасићени алдехиди (4-хидроксиноненал, 4-HNE и акролеин), диалдехиди (малондиалдехид, MDA и глиоксал) и кетоалдехиди од којих потиче непријатан мирис и укус оксидоване (ужегле) хране. Сва ова једињења се стварају и у биолошким системима. С обзиром на то да релативно лако мигрирају кроз хидрофобне мембране, своје дејство испољавају далеко од места настанка, па су означени као „секундарни месенцери” оксидативног стреса. Штетнија су од ROS врста јер доводе до ковалентних модификација нуклеинских киселина, протеина и липида (Guéraud *et al.*, 2010; Negre-Salvayre *et al.*, 2010). Од свих набројаних производа MDA је доказано најмутагенији а 4-HNE најтоксичнији (Lovell and Markesbery, 2003; Ayala *et al.*, 2014).

2.8.5 Мерење интензитета липидне пероксидације

Интензитет оксидације липида се може мерити у различитим фазама процеса и то:

- (1) Мерењем губитка незасићених масних киселина
- (2) Мерењем количине примарних продуката ЛП и
- (3) Мерењем количине секундарних продуката ЛП

Од инструменталних техника се највише користе UV-VIS и FT-IR спектроскопија, спектрофлуориметрија, HPLC хроматографија, LC-MS и GC-MS спектрометрија. Детекцију угљенично- и кисеонично-центрираних радикала омогућава EPR спектроскопија (Halliwell and Chirico, 1993; Devasagayam *et al.*, 2003).

Најстарији и најчешће коришћени прилази за одређивање нивоа ЛП, засновани на UV-VIS спектрофотометрији, су TBA-MDA тест и тест „конјуговани диени”. TBA-MDA тест се базира на реакцији два молекула TBA са једним молекулом MDA. Узорак се загрева са TBA у киселој средини а количина награђеног ружичастог (TBA)₂-MDA хромогена се мери читавањем вредности апсорбанције на 532 nm (апсорпциони максимум адукта) (Lovell and Markesbery, 2003; Palmieri and Sblendorio, 2007)

Тест „конјуговани диени” почива на чињеници да све структуре са распоредом двострука-једнострука-двострука веза ($-C=C-C=C-$) апсорбују UV светлост у области 230-235 nm. Као такве се детектују UV-VIS спектрофотометријом а значајне су за проверу стања чистих липида као показатељ ране фазе ЛП. Повећање осетљивости метода се постиже HPLC хроматографијом са UV детекцијом (Sochor *et al.*, 2012; Halliwell and Chirico, 1993).

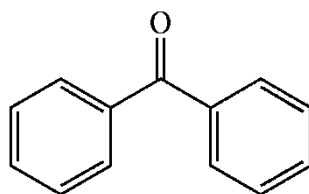
2.9 Фотосензибилизатори

Фотосензибилизатори су посебна врста молекула са способношћу апсорпције енергије зрачења и последичног доспевања у ексцитовано стање преко кога омогућавају одвијање хемијских реакција, до којих, у њиховом одсуству, не би дошло. Фотосензибилизатор из реакције може али не мора изаћи хемијски промењен (Marković, 1990). Како се већина фотосензибилизационих реакција одвија преко

триплетног стања, најефикаснији сензибилизатори су они који дају дугоживеће триплетно стање са високим квантним приносом²¹ (Foote, 1974).

2.9.1 Бензофенон

Бензофенон (дифенил кетон, BZP, Сл.20) је липофилни фотосензибилизатор из групе ароматичних кетона. Синтезише се Fridel-Crafts-овом ацилацијом (електрофилна ароматична супституција) бензоил хлорида у присуству анхидрованог алуминијум хлорида и бензена у вишку и добија у облику белих кристала, мириса на геранијум или ружу, нерастворних у води а растворних у органским растварачима (алкохол, ацетон, етар, сирћетна киселина, хлороформ и бензен) (IARC, 2013). Од изузетног је биохемијског, медицинског, индустријског и физичкохемијског значаја (Castro *et al.*, 2000).



Слика 20 Структура бензофенона

Употреба BZP-а је данас сведена на индустрију где се пре свега користи као фотоиницијатор у изради пластичних маса, премаза, адхезива (лепила) и мастила, у производњи инсектицида и лекова (хипнотика, антихистаминика); али и као појачивач ароме хране и пића. Безалкохолним пићима се (у САД-у) додаје у концентрацијама 0,57-1,28 ppm, сладоледима до 3,27 ppm, а има га и у желе бомбонама, желатинима и пудинзима. Захваљујући способности апсорпције UV зрачења, честа је компонента формулација за израду спрејева за косу, шампона, лакова за нокте, кармина, парфема и сапуна (Jeon *et al.*, 2008; Pestotnik *et al.*, 2012). Међутим, не тако ретко, јавља се као контаминант у пијаћој води и намирницама попут брашна, тестенина, пица, млека, желеа, сланих грицкалица итд. у које доспева услед „миграције” из картонских паковања хране. Зато се за штампање налепница на картонским паковањима не препоручује употреба мастила која садрже BZP и 4-метил-BZP осим ако нема неке

²¹ Квантни принос, Φ , је мера ефикасности фотохемијског процеса тј. ефикасност образовања триплетног стања, и дефинише се као број одиграних фотохемијских процеса по апсорбованом фотону.

функционалне баријере у виду слоја састављеног од алумијума (алуминијумска фолија) или поли(етилентетрафталат)/силикон оксида (IARC, 2013).

Бензофенон је раније био незаобилазна компонента средстава за заштиту од Сунца²², међутим од како је окарактерисан као „најмоћнији генератор слободних радикала познат човечанству” његова употреба у Европи је забрањена. Бензофенон се у овим производима показао као алерген док се његови деривати (обично обележени бројевима од 1-10), нарочито 2-хидрокси-4-метокси-BZP (Benzophenone-3) и 2-хидрокси-4-метокси-BZP-5-сулфонска киселина (Benzophenone-4) повезују са алергијским контактним дерматитисом (NTP, 2006). Ипак, неки од деривата BZP-а се и дан-данас користе у исте сврхе због широког UV апсорпционог спектра (200-350 nm) (Beckett *et al.*, 2004). Имајући у виду чињеницу да филтри на бази BZP-а много лакше пролазе кроз кожу и да директном дермалном употребом услед апсорпције може доћи до њихове значајне акумулације у ткивима, као и то да су у крви, урину, јетри и тестисима људи детектовани: 2,4-дихидрокси-BZP (BZP-1), 2,2',4,4'-тетрахидрокси-BZP (BZP-2), 2-хидрокси-4-метокси-BZP (BZP-3) и 2,2'-дихидрокси-4-метокси-BZP (BZP-8), потенцијална токсичност BZP-а по људе и екосистем привлачи велику пажњу (Zhang *et al.*, 2013).

Са друге стране, деривати BZP-а се у природи јављају као секундарни биљни метаболити и броје више од 300 структурно и функционално различитих чланова. Испољавају антифунгалне, анти-HIV, антимикробне, антиоксидативне, антивирусне и цитотоксичне активности. Половина садржи основно језгро бензофенона (за фенолне прстенове бензофенона је повезан различит број хидрокси-, метокси-, пренил- или геранил група). Друга половина су полипренилни бензофенони код којих је фенолна структура другог прстена бензофенона нарушена везивањем пренил или геранил групе и грађењем би-, три-, тетрацикличних прстенова, епоксида или пероксида. Карактеристични су за више биљке и то посебно за фамилију *Clusiaceae* (раније *Guttiferae*) којој, између осталог, припада кантарион, а из које је изоловано чак 77% природних бензофенона. Око 50 их потиче из фамилија *Gentianaceae*, *Moraceae*,

²² Комерцијални препарати за заштиту од Сунца, у циљу обезбеђивања што бољег нивоа SPF заштите, најчешће садрже комбинацију једињења, тзв. UV-филтре, која апсорбују и/или одбијају (расејавају) UV-A и/или UV-B зрачење. Први су хемијски (према хемијској структури се деле на седам главних група: деривате циметне киселине (цинамате), деривате салицилне киселине (салицилате), деривате *p*-аминобензојеве киселине (РАВА), деривате камфора и бензофенона, дибензоилметани, антранилати), а други физички (титанијум диоксид, TiO₂ и цинк оксид, ZnO) (Ramos *et al.*, 2015).

Polygalaceae, *Rosaceae* и *Thymelaeaceae*; 15 из гљива и 4 из кубанског прополиса (Klundt *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2014).

Бензофенон доспева у тело инхалацијом (удисањем), преко коже или ингестијом (уношењем путем хране). Посебно ризична група су људи који раде у индустрији боја, лакова и лепкова и производњи пластике. Бензофенон, поред средстава за негу тела, садрже и средства за чишћење и прање, тако да перкутана апсорпција може бити знатна. Сем тога, већина зубних протеза се производи полимеризацијом уз бензоил пероксид као иницијатор, чији је деградациони производ управо ВЗР. У екосистем доспева отпадним водама из домаћинства и депонија па се неретко јавља у рекама, а због високог коефицијента расподеле октанол:вода и нерастворљивости у води адсорбује се у седиментима и земљишту. Веома је штетан за водене организме посебно за репродуктивне и хормоналне функције риба (IARC, 2013).

Иако токсикокинетичких података о ефектима ВЗР-а на људе засад нема, доказани негативни ефекти на експерименталне животиње (између осталог је канцероген за мишеве и пацове) оправдавају његово сврставање у потенцијалне канцерогене за људе (NTP, 2006; IARC, 2013).

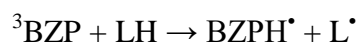
2.9.1.1 Фотохемија бензофенона

Бензофенон ексцитацијом даје синглетно, а ISC-ом и триплетно стање (^3BZP):



Интерсистемски прелаз је нарочито брз и ефикасан када је π, π^* триплетно стање [$T_1(\pi, \pi^*)$] енергетски близу најнижег ексцитованог синглетног стања n, π^* карактера [$S_1(n, \pi^*)$], као што је случај са ВЗР-ом, код кога се ISC одвија брзином од $\sim 10^{11} \text{ s}^{-1}$ са квантним приносом (Φ_{ISC}) од ~ 1 . То значи да са сваком апсорпцијом фотона ВЗР достиже своје триплетно (T_1) стање (Klán and Wirz, 2009).

До релаксације ^3BZP долази физичким *quenching*-ом органским молекулима или апстракцијом водоника када настаје ВЗР кетил радикал (BZPH^\bullet) (Marković, 2001) (детаљније у **Дискусији**):



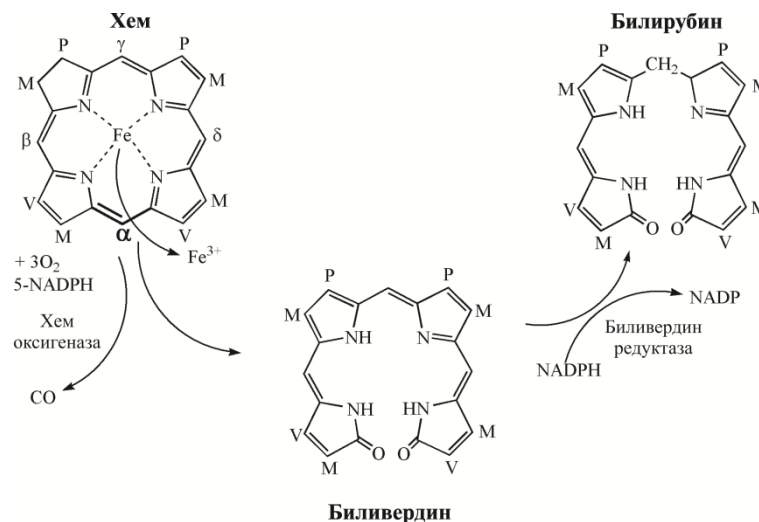
Степен физичког *quenching*-а се креће у опсегу од 0-100% зависно од врсте растварача и структуре *quencher*-а док су константе брзине апстракције водоника ^3BZP -ом у опсегу од око $10^7 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (за алилне водоникове атоме) до $2,7 \times 10^8 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (за двоструко алилне водонике). У биолошким системима су донори

водоника обично двоструко-алилни атоми водоника у масним киселинама. Као врло ефикасан триплетни фотосензибилизатор BZP омогућава контролисану иницијацију ЛП (Kraiev *et al.*, 1997).

2.9.2 Билирубин – пријатељ или непријатељ?

Већина људи се са билирубином среће када на кожи, услед повреде, примете модрицу док га неонатолози и породиље виђају много чешће.

Билирубин (4Z,15Z-билирубин-IX α , BRB) је у води нерастворан жуто-наранџасти пигмент који се перманентно ствара у здравим, одраслим људима, као крајњи производ катаболизма хема брзином од око 300 mg на дан (Dey and Lightner, 2010). Највећи део (80%) BRB-а потиче из катаболизма хемоглобина ослобођеног распадом еритроцита, а преосталих 20% из катаболизма цитохрома, миоглобина, пероксидаза и каталаза (тзв. хемпротеини). Како је хем у слободном стању отрован детоксикација је могућа дејством микрозомалних хем оксигеназа, када настају у води растворан тетрапирол, биливердин (BVD) и угљен моноксид (CO), уз ослобађање гвожђа (Chowdhury *et al.*, 2001) (Сл.21).



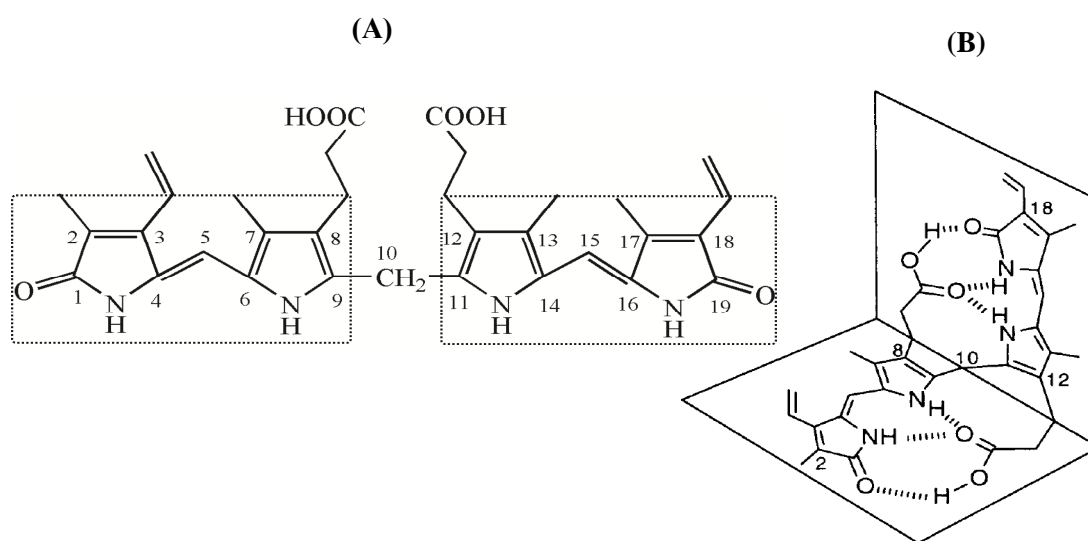
Слика 21 Механизам настајања билирубина. Отварањем хема на α -метинском мосту под дејством микрозомалне хем оксигеназе настаје зелени пигмент BVD који се даље у реакцији катализованој биливердин редуктазом редукује до наранџасто-жутог BRB-а, што је могуће пратити „уживо” посматрањем промене боје задобијене модрице (од тамне, преко зелене, до жуте) током пар дана. Ради поједностављења слике, бочни ланци порфирина прстена су приказани симболима: М (метил, $-\text{CH}_3$), V (винил, $-\text{CH}=\text{CH}_2$) и P (пропионил група, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$) (Wang *et al.*, 2006).

Биливердин²³ би био идеалан крајњи производ јер се лако излучује у жуч, а преко танког доспева у дебело црево одакле се избацује фецесом, што је и случај код птица, рептила и водоземаца (McDonagh, 2001). У сисарима се међутим, из досад необјашњених разлога под дејством ензима биливердин редуктаза, уз учешће NADPH, редукује до хидрофобнијег BRB-а, чија се елиминација из организма олакшава конјугацијом. Питање које се намеће је зашто је еволуцијом развијен енергетски скуп и наизглед беспотребан процес којим се релативно нешкодљив BVD преводи у токсичан BRB?

Иако делује чудно, природа никада не поступа непромишљено. Наиме, доказано је да неконјуговани BRB *in vitro* поседује АО активност према перокси радикалима, чак бољу од α -токоферола (витамина Е) који је сматран најбољим, тако да блага хипербилирубинемија може имати позитивне ефекте по здравље (Sedlak and Snyder, 2004; Fevery, 2008; Higgins, 2010). Штавише, активност „хватања” перокси радикала је доказана у случају BRB-а везаног за албумин како у раствору тако и у плазми здравих одраслих људи. У *in vivo* студијама је показано да BRB штити неонаталне еритроците од оксидативног стреса док су високе концентрације BRB-а у серуму ($0,6 \text{ mgdm}^{-3}$) доведене у везу са мањом смртношћу од канцера, посебно код мушкараца, али и смањеног ризика од артеросклерозе (Arthur, 2010). Такође је доказано да је BRB цитотоксичан у концентрацијама изнад $20 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$ и ефикасан АО у опсегу концентрација од $\sim 0,01$ до $10 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$ (Abu-Bakar *et al.*, 2012).

Клиничка важност BRB-а се огледа у чињеници да је његова акумулација у крви и екстраваскуларном ткиву врло често знак болести (обично болести јетре и жучних путева); узрочник је трајних неуролошких оштећења, а доводи се у везу и са процесом формирања камена у жучи (Cheng and Lightner, 1999).

²³ У биљкама, цијанобактеријама и алгама је биосинтетички прекурсор есенцијалних билина, док инсектима и птицама служи за камуфлажу – пример су зелена јаја код емуа и плава код дроздова.



Слика 22 Структура BRB-а. **(А)** Конфигурација – тетрапирол састављен из два дипиринона (уоквирено) повезана метиленим мостом на C_{10} и **(В)** конформација молекула BRB-а (Brower and Lightner, 2001).

Упркос присуству поларних, бочних ланаца пропионске киселине, неконјуговани BRB (објашњење следи у даљем тексту) је апсолутно нерастворан у крвној плазми и поларним растварачима (нпр. води и метанолу). Објашњење очигледног парадокса лежи у чињеници да молекул BRB-а нема фиксни облик већ као врло флексибилан заузима просторне распореде (конформације) различите стабилности. Конформација која преовладава у кристалима и растворима је приказана на **Слици 22(В)** и може се визуелизовати као „напола отворена књига”. Стабилизована је грађењем 6 интрамолекулских водоничних веза између два дипиринона („корица књиге”) тачније између карбоксилне групе пропионске киселине са једне и амино одн. лактамских група са друге стране (NH/O и OH/O везе). Самим тим су поларне, хидрофилне $-COOH$ и $-NH$ групе „сакривене” па не могу интераговати са поларним групама растварача. Околини молекула су зато приступачне једино угљоводоничне групе на периферији истог, одговорне за изненађујућу липофилност и растворљивост BRB-а у неполарним ратварачима какав је хлороформ, али и способност проласка кроз биолошке мембране (плаценте, крвно-мождане баријере, мембране хепатоцита) због чега га је практично немогуће излучити преко жучи (McDonagh and Lightner, 1985; Wang *et al.*, 2006).

Продукција BRB-а се одвија у макрофагама ретикулоендотелијалног система смештених у слезини, лимфним чворовима и коштаног сржи. Неконјуговани BRB се до

јетре транспортује везан за албумин, где дисоцира и спонтано дифундује кроз фосфолипидни двослој у хепатоците. У микрозомима хепатоцита долази до кидања водоничних веза због конјугације са глукуронском киселином (шећерном киселином са великим бројем –ОН и –COOH група) која се естарски везује за ланце пропионске киселине дајући у води растворан, поларни молекул, BRB диглукуронид (конјуговани BRB) (Kirkby and Adin, 2006). Конјуговани BRB се из јетре лако излучује у жуч а онда у танко па дебело црево и напушта тело преко фецеса (Sedlak and Snyder, 2004).

Код здравих, одраслих људи концентрација билирубина у серуму/плазми је између $3\text{--}20\ \mu\text{mol dm}^{-3}$, што указује на равнотежу између брзине ослобађања (неконјугованог) BRB-а из слезине у крв и брзине његовог уклањања из крви. Уколико је равнотежа поремећена, као што је случај са новорођенчадима, људи који болују од хемолитичке анемије или људи са Gilbert-овим и Crigler-Najjar-овим синдромом (McDonagh, 2010) долази до акумулације неконјугованог BRB-а у циркулацији и екстраваскуларном ткиву (тзв. неконјугована хипербилирубинемиа) (Stevenson *et al.*, 2011). Различите концентрације BRB-а доводе до различитих поремећаја, па се при концентрацији BRB-а у серуму/плазми изнад $50\ \mu\text{mol dm}^{-3}$ манифестује жутица (иктерус) у виду жуте обојености коже, беоњача и других видљивих слузокожа; док при концентрацијама BRB-а $>350\ \mu\text{mol dm}^{-3}$ долази до таложења неконјугованог BRB-а у ћелијама мозга, и жуте обојености базалних ганглија, хипокампуса, možданог стабла и малог мозга, појаве керниктеруса и последичног оштећења мозга (Higgins, 2010).

Иако се токсичност BRB-а генерално манифестује као енцефалопатија, његова токсичност није ограничена само на ћелије централног нервног система, већ и на остале ћелије и ткива. До енцефалопатија долази скоро увек током неонаталног периода јер је тада ниво одбране врло низак, па се детоксификација постиже физички, трансфузијом крви и фотохемијски – озрачивањем бебе плавом светлошћу (McDonagh and Lightner, 1985).

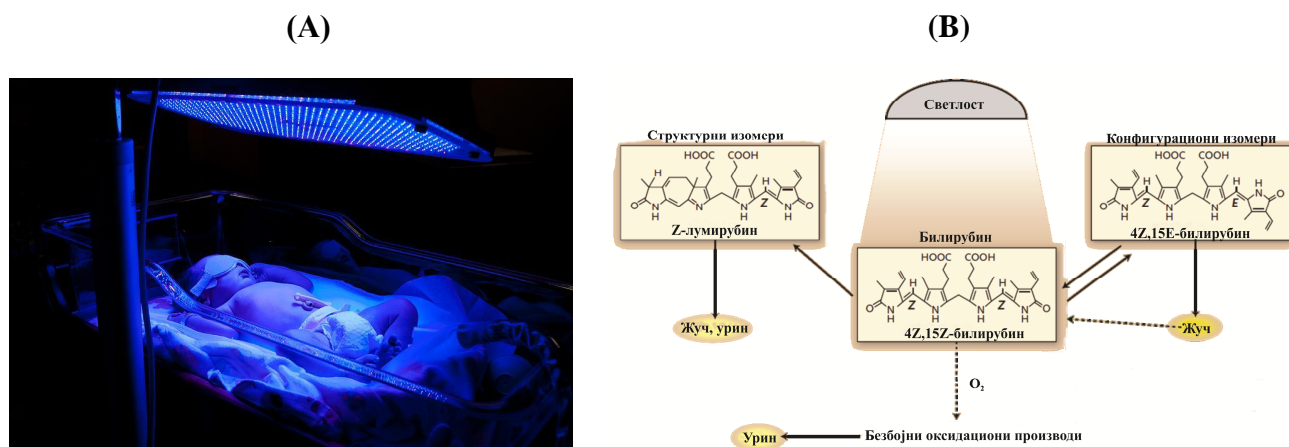
2.9.2.1 Фототерапија

До неонаталне хипербилирубинемиие (физиолошке жутице) долази код 60% термински и 80% превремено рођених беба услед прилагођавања на ванматеричне услове. Фетус пре рођења добија кисеоник из мајчине крви, преко постелице и пупчане врпце. Како је та количина мања од оне у ваздуху, фетус мора (као током боравка на високој планини) да створи већи број еритроцита, који кисеоник везан за

хемоглобин преносе до ћелија. По рођењу и првом удисају, плућа се шире, узимају кисеоник из ваздуха а вишак еритроцита се распада (као када се сиђе у долину). Живот еритроцита код беба је краћи (90 дана у поређењу са 120 код одраслих), јетра је још увек неразвијена (па је конјугација успорена), као и цревна флора па вишак (неконјугованог) BRB-а преплави крв, а кожу и беоњаче обоји жуто. Активност јетре за релативно кратко време достиже задовољавајући ниво али је понекад ниво BRB-а неопходно смањити фототерапијом (Zietz, 2006; Hansen, 2010).

У фототерапији се користи енергија светлости која доводи до промене облика и структуре BRB-а, чиме омогућава његово излучивање преко жучи без конјугације. Билирубин најјаче апсорбује светлост таласне дужине 460 nm па се плава светлост уског спектра (460-490 nm) сматра најефикаснијом у третману физиолошке жутице. Апсорпцијом поменуте светлости мења се конфигурација поткожног неконјугованог BRB-а преко два типа фотохемијских реакција: фотооксидације, током које долази до уништавања молекула BRB-а и фотоизомеризације (конфигурационе и структурне), када молекул остаје интактан али деформисан. У свим реакцијама настају производи који се могу директно излучити (McDonagh and Lightner, 1985).

Фотооксидација је једна од првих истражених фотохемијских реакција BRB-а, којом се молекул хидролизује до моно- и дипирола. Главни фотооксидациони производи су циклични имиди – монопироли (и њихови производи хидролизе) и дипироли, детектовани у урину беба подвргнутих фототерапији белом или плавом светлошћу (Cheng and Lightner, 1999). **Конфигурационом фотоизомеризацијом** се једна од егзоцикличних двоструких веза ($>C_4=C_5<$ или $>C_{15}=C_{16}<$) понаша као једнострука дозвољавајући слободну ротацију око $>C=C<$ осе чиме се кидају интрамолекулске Н-везе. Молекул се увија а конфигурација мења из нативне, 4Z,15Z (ZZ-BRB) у 4E,15Z (EZ-BRB) и 4Z,15E (ZE-BRB). **Структурном фотоизомеризацијом** (интрамолекулском фотоциклизацијом) настаје лумирубин, у коме се винил страна ланца на C_3 циклизује са C_7 на суседном пиролном прстену. Овој реакцији подлеже само лева страна молекула јер садржи винил групу у одговарајућем положају (Сл.23) (McDonagh and Lightner, 1985; Agati and Fusi, 1990).



Слика 23 Механизам фототерапије. (А) Беба под фототерапијом. (В) Апсорпцијом светлости 4Z,15Z-BRB се ексцитује, и тако побуђен може реаговати са кисеоником дајући безбојне оксидационе производе или подлећи преуређивању када настају структурни изомери (лумирубини) или конфигурациони изомери. Приказана су само два главна фотоизомера у људима. Конфигурациона изомерија је повратна и много бржа од неповратне, структурне изомеризације. Када се конфигурациони изомери нађу у жучи, спонтано прелазе у природни билирубин (Maisels and McDonagh, 2008).

2.9.2.2 Билирубин као фотосензибилизатор

Ексцитовани BRB подлеже дезактивационим процесима различитим брзинама прелаза зависно од природе средине. Брзе вибрационе релаксације (0,1-1 ps) превode молекул у најниже ексцитовано синглетно стање. Даља релаксација се одвија на радијациони или не-радијациони начин. Радијациона релаксација се на собној температури, у хлороформу (CHCl₃) одвија флуоресценцијом, у виду слабе емисије на око 525 nm, која драматично расте повезивањем са албумином или снижавањем температуре. Не-радијационом дезактивацијом ексцитовани ¹BRB ISC-ом прелази у ³BRB, са квантним приносом <0,005 у води (pH 9-11) и метанолним растворима. Како је квантни принос триплетног стања врло мали (због чега је слаб фотосензибилизатор), флуоресценције још мањи, не-радијациона релаксација ексцитованог BRB-а се претежно одвија интерсистемским прелазом и/или фотохемијским реакцијама (Agati and Fusi, 1990).

2.9.3 Витамини

Одређени нутритијенти (хранљиви састојци), неопходни за нормално функционисање (раст, развој и/или размножавање) су есенцијални за људе јер је људски организам током еволуције изгубио способност да их синтетише па се као

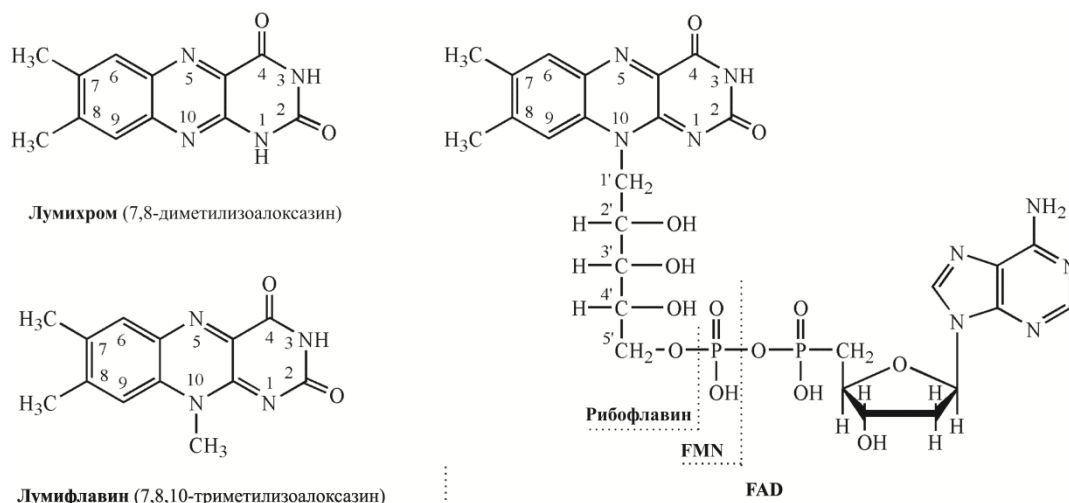
такви морају уносити храном. У ову групу поред одређених аминокиселина и минерала спадају и витамини. По дефиницији Franz Holfmeister-а витамини представљају „супстанце неопходне за раст и одржавање животињског организма, синтетишу их животиње и биљке док су у храни присутни у малим количинама” (Jain *et al.*, 2005). За разлику од осталих нутритијената (угљених хидрата, протеина и липида) немају структурну улогу нити се њиховим катаболизмом добија довољно енергије. Ипак, улоге које имају у организму су високо специфичне због чега су људском организму потребни у малим количинама а недостатак изазива специфичне болести дефицијенције. До данас је као витамин препознато 14 једињења (група једињења). Обележавају се великим словима латинице и обухватају: витамин А (аксерофтол, ретинол), D (калциферол), Е (токоферол), К (филохинон), В₁ (анеурин, тиамин), В₂ (лактофлавин, рибофлавин, овофлавин), В₃ (нијацин, нијацинамид), В₅ (пантотенска киселина), В₆ (пиридоксин, адермин), В₉ (фолна киселина), В₁₂ (цијанокобаламин, антипернициозин), С (аскорбинска киселина), F (линолна, линолеинска и арахидонска киселина) и Н (биотин). Прве четири групе витамина су липосолубилне, а осталих 10 је хидросолубилно, што је и основна подела ове врло хетерогене групе једињења. Имају функцију кофактора ензима (витамин А, К, С, В₁, В₂, В₃, В₅, В₆, В₉, В₁₂ и Н); биолошких АО (Е и С); хормона (витамини А и D), док витамин А има веома важну улогу у нормалном функционисању чула вида (фоторецепцији) (Combs, 2012).

Биљке синтетишу скоро све витамине, животиње једино С (рибе, водоземци, гмизавци), А и D; док људско тело из прекурсора (провитамина) каротена синтетише витамин А, а озрачивањем ергостерола и 7-дехидрохолестерола (као провитамина) UV светлошћу у људском телу настаје витамин D₃. Микрофлора гастроинтестиналног тракта синтетише витамине К, Н, В₁, В₉ и В₁₂ (Combs, 2012).

2.9.3.1 Рибофлавин

Термин „флавин” се, у свету протеина, односи на жуту хромофорну редокс активну простетичну групу класе респираторних ензима, широко распрострањених у биљакама и животињама – флавопротеина, у чијој основи је азотни хетероциклус 7,8-диметилизоалоксазин односно 7,8-диметилбензо[*g*]птеридин-2,4(3*H*,10*H*)-дион (Heelis, 1982).

Рибофлавин је по номенклатури 7,8-диметил-10-(1'-D-рибитил) изоалоксазин – шећерни алкохол D-рибитол је у положају 9 везан за диметил изоалоксазински прстен (Сл.23). Садржи велики број конјугованих двоструких веза и протетична је група флавинских коензима флавин мононуклеотида (FMN) и флавин аденин динуклеотида (FAD), који као преносиоци електрона имају виталне улоге у појединим дехидрогеназама и оксидазама, ензимима који катализују оксидо-редукционе реакције у метаболизму угљених хидрата, протеина и липида (Combs, 2012).



Слика 23 Структуре лумихрома, лумифлавина, рибофлавина, FMN и FAD (Cardoso *et al.*, 2012)

Рибофлавин је широко распрострањен у храни углавном у облику FAD. Зелено, лиснато поврће (нарочито шпаргла, броколи, спанаћ) је богато овим витамином, као и месо (посебно говеђа јетра), масне рибе (лосос, пастрмка, туна, харинга, скуша), млечни производи (млеко, сир – посебно чедар), пивски квасац и јаја. У млеку и јајима се једино налазе знатне количине слободног рибофлавина најчешће везаног са албумином. Рибофлавин је термостабилан, па различите технике стерилизације топлотом, конзервирање и кување хране не утичу на његов садржај због чега печено или кувано месо задржава око 75% витамина. Међутим, излагање светлости на коју је веома осетљив доводи до знатних губитака рибофлавина у храни. Млеко, на пример, губи 30% овог витамина када се изложи светлости, а свега 12% кључањем у току 30 min.

Рибофлавин из животињских производа генерално има већу биорасположивост од оног у биљкама а предуслов за апсорпцију RFL-а из хране је хидролиза FAD и FMN, коју катализују фосфатазе: FAD-пирофосфатаза (конвертује FAD у FMN) и FMN-

фосфатаза (конвертује FMN у слободан RFL) у мембранама ентероцита. Апсорпција RFL-а се претежно одвија у танком цреву одакле као слободан или као FMN може прећи у плазму да би се коначно избацио урином (Combs, 2012).

Неопходан је за формирање еритроцита и дисање, продукцију антитела, регулисање раста и репродукције људи. До дефицијенције рибофлавина, видљиве након само 3-4 месеца не-уношења витамина, између осталог доводе: 1) неправилна исхрана – најчешће због смањеног уноса млека и најчешће се јавља код алкохоличара, 2) појачан катаболизам услед болести или интензивног вежбања и 3) фототерапија код беба са хипербилирубинемијом уколико се не додаје RFL. У ризичну групу спадају труднице, дојиле и новорођенчад, школарци, људи старији од 65 година и спортисти (Powers, 2003).

Недостатак рибофлавина узрокује поремећај мембрана коже и мукозе и манифестује се у виду ангуларног стоматитиса – инфекције угла усана (пуцање и појава рана на угловима усана у народу познат као „жвале”), себореје (хронично инфламаторно обољење коже, најчешће главе и лица), глоситиса (запаљење језика), себороичног дерматитиса (хроничног запаљенског обољења коже) око носа, устију и скротума/вулве, неуропатије (болест периферног нервног система) и анемије са ретикулоцитопенијом, леукопенијом и тромбоцитопенијом (низак ниво ретикулоцита, леукоцита и тромбоцита, респективно) (Anonymous, 2008). Минималне дневне потребе RFL за децу и одрасле варирају од 0,6-1,7 mg дневно. Током трудноће и лактације, женама је потребно до 2 mg дневно (Jain *et al.*, 2005).

2.9.3.2 Фотохемија рибофлавина

Фотореактивност RFL-а потиче од изоалоксазинског прстена, који апсорбује око 365 nm и 445 nm, због чега има карактеристичну жуту боју. Озрачивањем плавом (450-495 nm) или UV-A светлошћу RFL даје кратко-живеће синглетно стање (око 5 ns у води на собној температури), одакле ISC-ом, квантног приноса $\Phi_{ISC} = 0,67$, даје дуго-живеће триплетно стање (око 15 μ s у води, на собној температури) (Cardoso *et al.*, 2012). Управо ове карактеристике га сврставају у ред моћних фотосензибилизатора (стр. 49). Врло комплексна фотохемија RFL-а почива на његовој способности да прими или отпусти пар водоникових атома. Подлеже интрамолекуларној (када настаје формилметилфлавин) и интермолекуларној фоторедукцији, интрамолекуларној (као

производ настаје циклодехидрорибофлавин) и интермолекулској фотоадицији и интрамолекулској фотодеалкилацији (као производ даје лумихром). До које ће фотохемијске реакције доћи зависи од поларности растварача, рН средине, концентрације, врсте и јонске снаге пуфера (уколико се ради у пуферском систему), садржаја кисеоника, интензитета и таласне дужине светлосног извора. Своје фотосензибилизаторске особине RFL испољава мешаним Тип I и Тип II механизмима. Наиме, под дејством светлости RFL генерише супероксид анјон и синглетни кисеоник (Cardoso *et al.*, 2012). Природу настале ROS врсте одређују количина присутног кисеоника, концентрација RFL-а и присуство одговарајућих *quencher*-а (Huang *et al.*, 2004).

Фотосензибилизаторске способности RFL-а имају веома битну и корисну примену у терапији кератоконуса (дегенеративне болести ока узроковане урођеном слабошћу рожњаче), коришћењем „унакрсног повезивања колагена рожњаче” (енг. *Corneal Collagen Crosslinking* скраћенице CXL). Први клинички резултати су објављени 2003. године. Циљ третмана је повећање биомеханичке снаге корнеалне строме фотоактивацијом RFL-а UV-A светлошћу, када настају ROS врсте које посредују у биолошкој полимеризацији стварањем нових ковалентних веза између молекула колагена у корнеалној строми, чиме јој се повећава крутост и отпорност на колагеназе²⁴ (у *in vitro* условима је већа чак 330%). Поступак се одвија под локалном анестезијом. Након абразије рожњаче се врши укапавање 0,1% изотоничног раствора RFL-а (10 mg RFL-5-фосфата раствореног у 10 cm³ 20% раствора декстрана) у току 30 min, на сваких 5 min, до појаве незнатне жуте пребојености рожњаче (у циљу смањења продирања светлости испод 300 μm строме) и коначно озрачивање UV-A светлошћу дозе 5,4 Jcm⁻² у трајању од 30 min (Makdoui, 2011).

²⁴ Ензими који разлажу пептидне везе колагена.

3 КОРИШЋЕНЕ МЕТОДЕ

„Ако вам иде сувише лако, погледајте боље – можда вам иде низбрдо.”
(Непознати аутор)

3.1 Основи HPLC хроматографије

Откад је Цвета²⁵ и века, хроматографија је једна од најважнијих сепарационих техника (техника раздвајања) како у академским тако и у индустријским лабораторијама широм света (Fornstedt *et al.*, 2015). Омогућава квалитативну (идентификацију једињења на основу поређења ретенционог времена са стандардом добијеног под идентичним хроматографским условима) и квантитативну (одређивање концентрације појединих компонената – на основу висине/површине пика) анализу испарљивих (гасна хроматографија – *Gas Chromatography*, GC) и неиспарљивих једињења, чак и оних врло великих молекулских маса (биополимера) (течна хроматографија – *Liquid Chromatography*, LC) – тзв. аналитичка хроматографија али и пречишћавање појединачних компоненти – тзв. препаративна хроматографија (Scott, 2012).

Према једној од најновијих дефиниција „хроматографија је научна дисциплина која се бави проучавањем настанка, промене, кретања и раздвајања концентрационих подручја (зона) компонената (аналита, честица) проучаваног узорка у струји мобилне фазе под утицајем чврсте/течне стационарне фазе или сорбента” (Wixom *et al.*, 2010). Појашњење терминологије следи у даљем тексту.

У течној хроматографији покретна (мобилна) фаза носи компоненте смеше преко површине непокретне (стационарне) фазе која их различитим интеракцијама успорава. Зато се компоненте које „преферирају” стационарну фазу задржавају дуже у

²⁵ Руски ботаничар Михаил Семёнович Цвет (1872-1919) се сматра „оцем хроматографије” јер је 1900. године развио методу за раздвајање биљних пигмената (хлорофила, каротеноида и ксантофила) испирањем екстракта зеленог биља органским растварачима (смеше етанола и петролетра-мобилна фаза) у стакленој цеви (колони) испуњеној уситњеном кредом одн. калцијум карбонатом (CaCO₃ – стационарна фаза) – данас је то тзв. адсорпциона (чврсто/течно) хроматографија на колони – назвавши је „хроматографија” – од грчког „χρῶμα” („chroma” – боја) и „γράφειν” („graphein” – „писати”). Називу технике су „кумовале” различите боје изолованих компонената (зелена, наранџаста и жута, респективно), међутим како презиме Цвет на руском значи „боја”, претпоставља се да је технику заправо назвао по свом презимену. Било како било, назив је задржан до данашњих дана иако не осликава њену савремену примену јер већина компонената које се овом техником раздвајају нису обојене па се ни детекција истих не заснива на посматрању боје (Fornstedt *et al.*, 2015; McPolin, 2009).

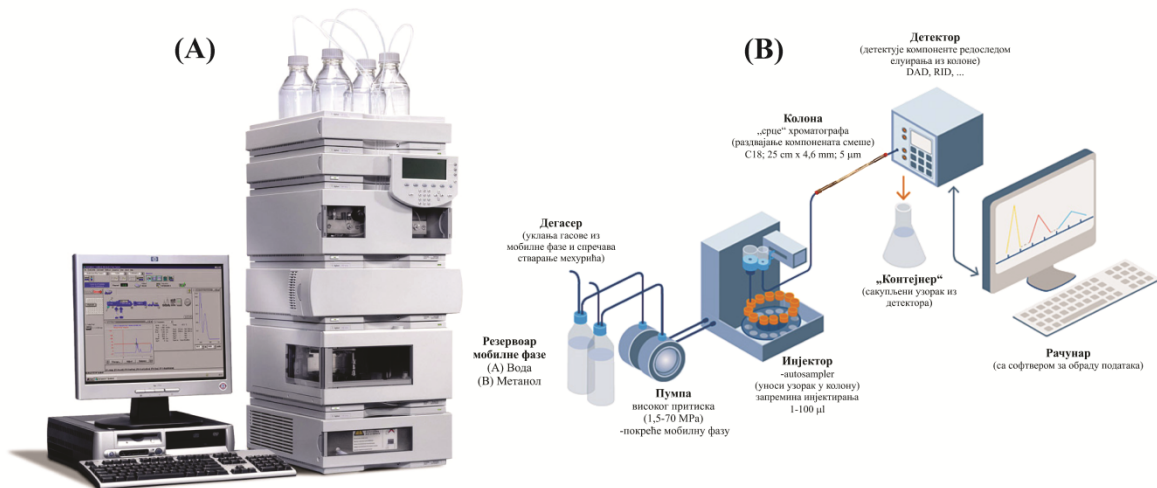
систему од оних којима је „дража” мобилна фаза, па се подела хроматографских метода, између осталог, базира на феноменима „задржавања” компонената у стационарној фази и то: сорпцији (која обухвата адсорпцију и расподелу компонената – тзв. адсорпциона и подеона хроматографија, респективно), ексклузији, односно раздвајању на основу величине честица (тзв. гел хроматографија) и размени јона (тзв. јоно-измењивачка хроматографија) (Li *et al.*, 2013).

Течна хроматографија под високим притиском одн. течна хроматографија високих перформанси (енг. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) спада у групу подеоних хроматографија (пored хроматографије на папиру и танкослојне хроматографије) у којој се компоненте смеше расподељују између две немешљиве (стационарне и мобилне) течне фазе. Наиме, стационарна фаза у HPLC колонама је танак слој (молекулских димензија) течности нанесен (хемијски везан) на грануле чврстог носача²⁶, нерастворне у мобилној фази. Као таква, (HPLC) почива на законитостима екстракције течностечно, што значи да расподелу узорка између две фазе регулише константа равнотеже, тзв. коефицијент расподеле или подеони коефицијент, K . Поменута равнотежа је динамичан процес – компонента прелази из једне у другу фазу, а подеони коефицијент исте се дефинише као: $K = c_s/c_m$, где су c_s и c_m концентрације компоненте у стационарној и мобилној фази, респективно (Аћуја, 2003).

Процес раздвајања HPLC хроматографијом се одвија уношењем (инјектирањем) мале количине течног узорка у струју мобилне фазе (елуента) обезбеђене пумпама које раде под високим притисцима како би омогућиле константан проток кроз колону паковану честицама пречника 3-10 μm . Елуирање се постиже изократским (константан састав мобилне фазе) или градијентним (састав мобилне фазе се током анализе мења) режимом рада, а раздвојене компоненте долазе до детектора по редоследу елуирања из колоне (Sadek, 2004). Детектори су осетљиви на присуство компонената различитих од мобилне фазе па на сваку промену концентрације фазе одговарају сразмерним електричним сигналом (Сл.24).

²⁶ Најчешће силика честице чија је површина покривена поларним силанолним групама – за NP-HPLC. Уколико се силанолне групе хемијски третирају угљоводоничима (n -алкил групама, најчешће октадецил – C18 ланцима, тзв. C18 колоне), покривено је 70-80% силанолних група па се карактер колоне мења у неполярни чиме постају погодне за употребу у RP-HPLC хроматографији (Marković i Zvezdanović, 2010).

У зависности од поларности стационарне и мобилне фазе, HPLC хроматографија може бити нормалних – NP-HPLC (енг. *Normal Phase*-HPLC: поларна стационарна и неполарна мобилна) и реверзних (обрнутих) фаза – RP-HPLC²⁷ (енг. *Reverse Phase*-HPLC: неполарна стационарна и поларна мобилна фаза) (Wixom *et al.*, 2010).



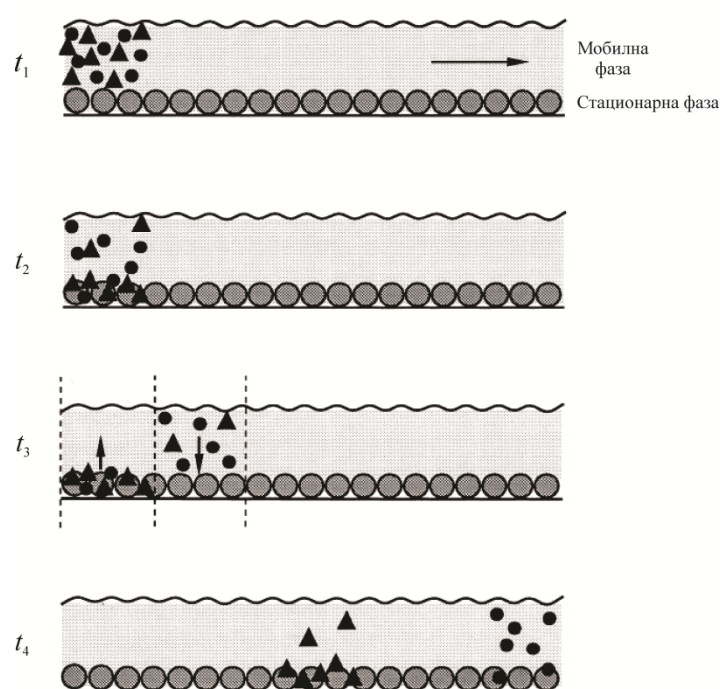
Слика 24 (A) HPLC хроматограф Agilent 1200 Series system (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). (B) Сликосит приказ основних делова уређаја са комбинацијом мобилне и стационарне фазе карактеристичне за RP-HPLC хроматографију. По конвенцији се „јачи“ (неполарнији) растварач обележава са „В“ а „слабији“ (поларнији) са А. Резервоар (један или више, најчешће бинарни или кватернерни систем) је извор мобилне фазе. Пумпа високог притиска, од 1,5-70 МПа покреће мобилну фазу и обезбеђује континуирани проток, без пулсирања. Инјектор (*autosampler*) прецизно одмерава (1-100 µl) и уноси узорак у колону, у којој се врши раздвајање. Температура колоне се одржава константном термостатом. Раздвојене компоненте из колоне (зависно од врсте узорка) детектује одговарајући детектор (DAD (енг. *Diode array detector*), RID (енг. *Refractive index detector*), итд.), његов садржај одлази у „контејнер“ (енг. *Waste*) док се сигнал из детектора региструје рачунаром са одговарајућим софтвером за обраду података (McPolin, 2009).

Као „срце“ хроматографа, колона завређује највише пажње па ће објашњење феномена раздвајања у даљем тексту бити фокусирано на дешавања у њој.

Компоненте смеше се расподељују (тј. растварају и делимично адсорбују) између фаза и по неколико хиљада пута због чега хроматографија има енормну моћ

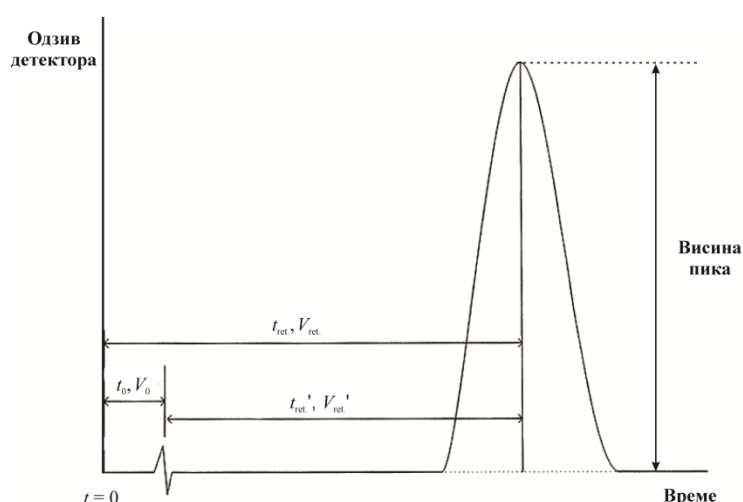
²⁷ Раздвајање смеше RP-HPLC хроматографијом се заснива на хидрофобним интеракцијама компонента смеше из мобилне фазе са имобилисаним хидрофобним лигандима везаним за стационарну фазу. Дакле, поларне компоненте се елуирају прве док мање поларне задржава неполарна стационарна фаза. Као мобилна фаза у RP-HPLC хроматографији се користи вода (или водени раствор пуфера) у комбинацији са органским растварачем који се са истом меша у свим односима (најчешће ацетонитрил и метанол) (Aguilar, 2004).

резолюције и омогућава раздвајање смеше компонената врло сличних физичких особина. Смеша кроз колону путује ношена мобилном фазом и из ње излази (елуира се) у виду раздвојених „зона” (Сл.25). Пут компонената се може описати добро познатом једначином по којој је брзина = пређени пут/време потребно да се тај пут пређе. Иако се зоне компонената крећу константном брзином, кретање индивидуалних молекула је насумично. Тако се један молекул, ношен мобилном фазом, на путу кроз колону у једном тренутку екстрахује а већ следећег де-екстрахује, онда поново екстрахује и тако на хиљаде пута (Fornstedt *et al.*, 2015).



Слика 25 Раздвајање двокомпонентне смеше (▲ и ●) у хроматографској колони. Смеша компонената (▲ и ●) ношена мобилном фазом у тренутку t_1 улази у колону, а обе компоненте, ▲ и ● путују брзином кретања мобилне фазе. У тренутку t_2 наилазе на стационарну фазу која их екстрахује и успорава. Свежа мобилна фаза ре-екстрахује компоненте у тренутку t_3 . Компонента ▲ има нешто већи афинитет према стационарној фази због чега у њој борави дуже и креће се спорије од ●. У тренутку t_4 (ретенционо време компоненте ●) компоненте су потпуно раздвојене (Meuer, 2004).

Резултат хроматографског раздвајања представља зависност одзива детектора од ретенционог времена компонената у колони – тзв. хроматограм (Сл.26).



Слика 26 Хроматограм – визуелни приказ резултата хроматографског поступка. Свакој компоненти смеше одговара одређени пик на хроматограму. „Задржавање” компоненте се изражава или као „ретенционо време” или као „ретенциона запремина”. t_0 је тзв. „мртво време” – време од тренутка уношења узорка до појаве пика мобилне фазе (ретенционо време мобилне фазе одн. ретенционо време компоненте која не интерагује са стационарном фазом). t_{ret} је тзв. „ретенционо време”, укупно време задржавања компоненте у колони одн. време потребно за елуирање компоненте из колоне. t'_{ret} је тзв. „кориговано ретенционо време” одн. време задржавања компоненте у стационарној фази. Аналогно ретенционом времену, V_0 , V_{ret} и V'_{ret} су, редом, „мртва запремина”, „ретенциона запремина” ($V_{ret.} = t_{ret.} \cdot u$; где је u брзина протока мобилне фазе) и „коригована ретенциона запремина”. „Ретенциона запремина” је количина мобилне фазе потребна за елуирање компоненте из колоне. Висина пика представља растојање између основне (базне) линије и врха пика (Курјес, 2004).

Смањење величине честица пуњења колоне испод $2 \mu\text{m}$ повећава резолуцију, омогућава веће протоке мобилне фазе и последично веће притиске што је омогућило развој течне хроматографије изузетних могућности (енг. *Ultra High Pressure Liquid Chromatography*, UHPLC), о којој ће бити речи.

3.2 Основи UHPLC-ESI-MS технике

У претходном поглављу је било речи о принципима течне хроматографије, зато ће у овом делу више пажње бити посвећено масеној спектрометрији. Свакако је важно још једном нагласити да технологија „малих честица” заузима лидерску позицију у „свету течних хроматографија” захваљујући бржим анализама (мање димензије честица паковања колоне и повећан проток елуента кроз колону), изванредној резолуцији и осетљивости (Marković i Zvezdanović, 2010).

Масена спектрометрија је, по најопштијој дефиницији, метода за идентификацију једињења на основу масених спектра који представљају својеврстан „отисак прста” једињења јер су карактеристични и специфични за свако једињење понаособ. Основне функције масеног спектрометра су образовање јона из узорка, њихово раздвајање по маси, тачније односу масе и наелектрисања (m/z ²⁸) и регистровање врсте и количине присутних јона. Успешно извршење поменутих задатака пружају систем за уношење узорка (директним инјектирањем узорка или инјектирањем помоћу сепарационих система – када је масени спектрометар директно повезан са HPLC-ом), јонски извор (где долази до продукције јона), масени анализатор (омогућава раздвајање насталих јона), детектор (детектује исте) и систем за обраду података (генерише масени спектар²⁹ једињења).

Наиме, молекули узорка се испаравањем преводе у гас у систему за уношење узорка да би се потом јонизовали³⁰ у јонском извору што за резултат има настанак једноструко или вишеструко наелектрисаних јона. Тако генерисани јони се у анализатору³¹ разврставају према m/z -вредностима а раздвојене јонске врсте даље, једна по једна, стижу до детектора који их региструје у облику масеног спектра. Дакле, масени спектар даје информацију о томе који су јони образовани из датог једињења и у којој релативној заступљености (Mišović i Ast, 1989; Act, 2007; Niessen and Falck, 2015).

Узорци који се анализирају масеном спектрометријом су углавном раствори у неком органском растварачу (обично метанол или ацетонитрил), водени раствори (телесни флуиди) или елуент из колоне течног хроматографа. Анализирани узорак долази до масеног спектрометра, уз неопходан услов да пре добијања спектра највећи део растварача мора бити уклоњен из узорка без губитка растворене супстанце. У супротном би његово испаравање доспевањем у вакуум масеног спектрометра довело

²⁸ Маса електрона ($9,11 \times 10^{-31}$ kg) је врло мала у поређењу са укупном масом молекула, па је релативна молекулска маса молекула (M_r) заправо једнака маси једноструко ($z = 1$) наелектрисаног молекулског јона (M_r^{+}). Из практичних разлога у масеној спектрометрији се $M_r = M_r^{+}$ обележава са M^{+} (Herbert and Johnstone, 2003).

²⁹ Масени спектар је график зависности релативне количине јона од m/z вредности.

³⁰ Јонизационе методе које се најчешће користе у LC-MS анализи су електронска јонизација (*Electron ionization*, EI), хемијска јонизација (*Chemical Ionization*, CI), бомбардовање брзим електронима (*Fast-atom bombardment*, FAB), термоспреј (*Thermospray*, TSP), електроспреј (*Electrospray*, ESI) и хемијска јонизација под атмосферским притиском (*Atmospheric-pressure chemical ionization*, APCI) (Ardrey, 2003).

³¹ Најчешће коришћени масени анализатори су: квадруполни анализатор (*Quadrupole Mass Analyser*), време лета јона (*Time-of-Flight Mass Analyser*) и јонски трап (јонска замка – *Ion-Trap Mass Analyser*) (Ardrey, 2003).

до наглог пораста притиска и последичног заустављања рада уређаја, што је заправо једна од инкомпатибилности (неспојивости, несагласности) између течне хроматографије и масене спектрометрије. Наиме, мобилна фаза у HPLC хроматографији је течност која често садржи знатну количину воде, а која се пумпа преко стационарне фазе у колони (уобичајеним) протоком од $1 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$, док масени спектрометар ради на притиску од око $1,3 \times 10^{-4} \text{ Pa}$ (високи вакуум³²). Дакле, немогуће је једноставно упумпати елуат из HPLC колоне директно у извор масеног спектрометра, што намеће потребу за одређеним „интерфејсом”³³ чија је функција уклањање целокупне или бар значајне количине мобилне фазе. Друга инкомпатибилност је та што је већина анализата који се раздвајају HPLC хроматографијом неиспарљива и/или термолабилна па као такви нису подложни електронској или хемијској јонизацији. Интефејс којим се успешно превазилазе поменути проблеми је електроспреј јонизација (Ardrey, 2003).

3.2.1 Механизам електроспреј јонизације

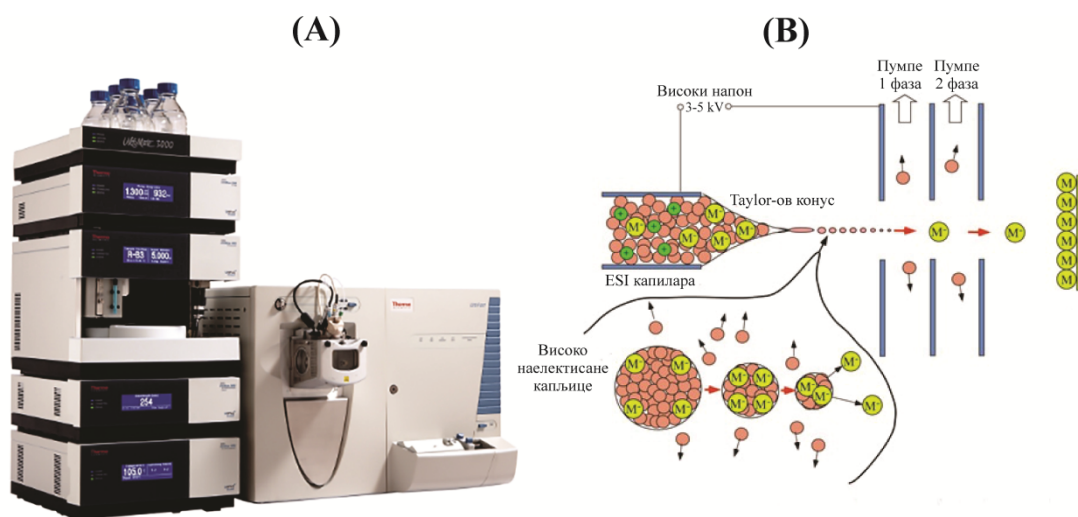
Рад електроспреј јонског извора се заснива на чињеници да јако електрично поље распршује површину течности на ситне (фине) капљице (Сл.27). Састоји се из два одвојена али међусобно зависна дела: области атмосферског притиска коју чине електроспреј игла (капилара) високог електричног потенцијала са помоћним хардвером и вакуумског интерфејса који омогућава пренос јона у масени спектрометар високог вакуума. Електроспреј јонизација је „најмекша”³⁴ јонизација масене спектрометрије због чега се ESI спектар углавном састоји из молекулских јона. Процес је по природи сличан електрофорези јер примењено електрично поље доводи до раздвајања позитивних (зелени кружићи на Сл.27) и негативних наелектрисања (жути кружићи на Сл.27) из раствора (молекули растварача су приказани ружичастим кружићима на Сл.27). Наиме, у позитивном модалитету, електроспреј капилара има релативно висок

³² Јони генерисани у јонском извору морају стићи до детектора. Међутим, средња дужина коју јон „пропућује” између судара (колизија) – тзв. средњи слободни пут – под атмосферским притиском (760 torr, одн. 101 325 Pa) је око 10^{-8} m , због чега је долазак до детектора мало вероватан. Како је међутим средњи слободни пут обрнуто пропорционалан притиску, његовим смањењем на 10^{-6} torr ($1,33322 \times 10^{-4} \text{ Pa}$) пут се повећава на око 10 m, што јонима омогућава „безбедан долазак” до детектора масеног спектрометра (Ardrey, 2003).

³³ „Хардвер” који повезује два уређаја.

³⁴ Карактеристика „мекх” метода јонизације је да се молекулима узорка предаје минимални вишак енергије тако да се формирају одговарајући молекулски јони $[M+H]^+/[M-H]^-$, масе $M+1/M-1$ који се не фрагментушу (или је фрагментација минимална) (Ardrey, 2003).

позитиван потенцијал у односу на контра електроду на улазу у вакуумску област због чега ањоне привлачи врх исте, док су катјони претежно на површини менискуса (закривљености површине) течности. Како се позитивна наелектрисања међусобно одбијају, површина течности се шири даље од врха игле у виду Taylor-овог конуса (Сл.27).



Слика 27 (A) Dionex Ultimate 3000 UHPLC+ систем са LCQ Fleet Ion Trap Mass Spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). (B) Механизам електроспреј јонизације. Аналит растворен у поларном, испарљивом растварачу се упумпава у јонски извор на атмосферском притиску кроз уску челичну капилару под високим напоном (3-5 kV, позитивног или негативног, зависно од примењеног модалитета за дату врсту узорка) малим брзинама протока ($0,1-10 \mu\text{min}^{-1}$). Примењени напон омогућава градијент електричног поља потребан да раздвоји наелектрисања на површини течности, што за резултат има излазак течности у облику тзв. Taylor-овог конуса. Када такав раствор достигне Rayleigh-еву границу (тачку у којој Coulomb-ове силе одбијања површинског наелектрисања постану једнаке површинском напону течности), капљице које садрже вишак позитивног или негативног наелектрисања се откидају са врха капиларе. Оне се затим крећу кроз топлу струју гаса за сушење (азота) ка улазу у масени спектрометар генеришући јоне једним од предложених механизма. По првом, „механизму Coulomb-ове фисије”, повећана густина наелектрисања услед испаравања растварача узрокује деобу великих капљица на све мање и мање, све до капљица које садрже само појединачне јоне. Други, „механизам евапорације јона” претпоставља да повећана густина наелектрисања до које долази након испаравања растварача коначно доводи до тога да Coulomb-ово одбијање надјача површински напон течности што за последицу има ослобађање јона са површине капљице. Без обзира на механизам продукције, ESI процесом се стварају јони у парној фази чији се m/z однос даље анализира (Cech and Enke, 2001).

Електроспреј јонизација се одвија на атмосферском притиску. С обзиром на то да масени анализатор и детектор раде у условима високог вакуума (који обезбеђује

минималну интеракцију јона, одн. спречавање судара, неутрализације, расејања и фрагментације истих), неопходно је јоне пренети из једне у другу област. Процес омогућавају механичке (обарају притисак до 0,1 Pa) и диференцијалне (турбомолекуларне) пумпе (за високи вакуум). Масени спектрометар се састоји из одвојених комора са све мањим и мањим притисцима, одвојених отворима кроз које јони пролазе пре уласка у масени анализатор. Како електроспреј јонизацијом настају неутралне врсте, јони и кластери јона са неутралним врстама, први изазов код увођење јона у област вакуума је њихово раздвајање од неутралних једињења и потпуна десолватација³⁵. Уклањање последњих молекула растварача се постиже проласком капљица кроз област загрејаног инертног гаса (N₂) – *sheath* гас (који поред тога ефикасно уклања неутралне честице са отвора масеног спектрометра), или кроз загрејану капилару (температуре од 170°C до 300°C), када јони из раствора прелазе у гасовиту фазу и формирају константну јонску струју. „Скимери” даље пропуштају само јоне из средишта јонске струје, са праволинијском путањом, чиме се омогућава њихов пут кроз октаполе и јонску оптику до масеног анализатора (Cech and Enke, 2001).

Растварачи који се обично користе за RP-HPLC, попут воде³⁶, метанола и ацетонитрила, дихлорметана и њихових смеша, диметил сулфооксида, изопропанола, бутанола, тетраhydroфурана, ацетона и диметил формамида су компатибилни са ESI. Употреба алифатичних (хексан) и ароматичних угљоводоника (бензен) као и неполарних растварача (нпр. угљентетрахлорид) није пожељна. Пуфере који се уобичајено користе у HPLC попут Tris, фосфатног или сулфатног треба избегавати јер могу контаминирати извор. Ипак, испарљиви пуфери и адитиви као што су сирћетна и мравља киселина, амонијум ацетат, амонијум хидроксид и трифлуоросирћетна киселина се често користе за контролу рН и образовање јона у LC/MS анализи, у концентрацији 0,1-1% (Pramanik *et al.*, 2002).

На процес јонизације поред температуре и протока утиче и хемија анализата. Тако је ESI јонизација метод избора у анализи базних или поларних врста које се лако наелектришу у раствору – базна једињења лако везују протоне док их кисела лако губе (Cody, 2002).

³⁵ Уклањање или дисоцијација растварача са честице у циљу сушења узорка.

³⁶ Чиста вода није пожељна као мобилна фаза због великог површинског напона и велике вискозности.

3.2.2 MS/MS концепт и принцип рада јонског трапа као масеног анализатора

„Јонски трап” тј. „јонску замку” чине три хиперболичне електроде на које се примењује комбинација радиофреквентног напона и напона наизменичне струје. Након јонизације, сви јони су ускладиштени у трапу, а применом одређеног напона, једна по једна јонска врста се избацује из трапа и региструје на детектору, што представља масени спектар узорка. Одређени јон се може изоловати и задржати у трапу избацивањем свих осталих јона. Како је јонски трап увек напуњен неутралним гасом – хелијумом ($\sim 1 \text{ torr}$ одн. $133,3 \text{ Pa}$) применом одговарајућег радиофреквентног поља селектовани јон („*parent ion*”, „родитељски” или „матични” јон) се убрзава па услед јонско-молекулских судара долази до његовог побуђивања и последичне фрагментације, тзв. сударима индукована фрагментација (*Collision Induced Dissociation* – CID). Регистровањем продуката фрагментације („*daughter ion*”, фрагментних јона или „потوماка”) се добија MS/MS спектар или MS^2 спектар селектованог јона. На исти начин се може изоловати неки од јона из MS^2 спектра и индуковати његова фрагментација, чиме се добија MS/MS/MS или MS^3 спектар. Овим поступком је могуће извести n узастопних фрагментација и добијање MS^n спектра почетног јона. Добијени спектар је резултат фрагментације искључиво одабраног јона, без сметњи од стране других јона, па се као такав може користити за одређивање или верификацију његове структуре. Дакле, кључна информација коју масени спектар садржи је шема фрагментације узорка, одн. одговор шта је из чега настало (Аст, 2007).

Битна разлика између других анализатора и јонског трапа је у томе што су код осталих анализатора ступњеви фрагментације раздвојени у простору, док су код јонског трапа раздвојени у времену. Стога је предност јонског трапа очигледна: у случају класичних анализатора за 5, 6 или више узастопних фрагментација неког јона, био би потребан инструментални систем са исто толиким бројем анализатора, дакле захтевао би велики простор и велике трошкове, што је нереално. Са друге стране, све фрагментације код јонског трапа се одигравају у истом простору, једна за другом, без икаквих додатних трошкова, једноставном манипулацијом електронике (Аст, 2007).

3.2.3 Предности масеног детектора

Најчешће коришћени детектор у течној хроматографији је UV детектор који омогућава идентификацију класе једињења, што заједно са његовим ретенционим карактеристикама даје увид у идентитет анализата, али врло ретко омогућава недвосмислену идентификацију. Предност масеног спектрометра, са друге стране, је да углавном омогућава „апсолутну” идентификацију тиме што даје не само структурне информације о датом молекулу већ и његову молекулску масу што је обично најважнија информација којом се број могућих структура драматично смањује. Наиме, масени спектри многих једињења су довољно специфични да омогуће идентификацију са великом поузданошћу и тачношћу, јер многа једињења сличних или идентичних ретенционих карактеристика имају доста другачије масене спектре, чиме је омогућено разликовање и квантитативна анализа. Друга предност масеног спектрометра је висока осетљивост – добијање *full scan* спектра и идентификација су могући коришћењем пикограмских (pg) количина узорка. Комбинација HPLC-а са масеном спектрометријом према томе омогућава дефинисанију идентификацију и квантитативно одређивање једињења која нису у потпуности хроматографски раздвојена (Аст, 2007).

3.3 Теоријске основе EPR спектроскопије

Описивањем атома и молекула принципима квантне механике, закључено је да они имају дискретна (одвојена) стања, свако одговарајуће енергије, чија је разлика (ΔE) мерљива захваљујући вези између ΔE и апсорпције EM зрачења. Према Планк-овом закону, до апсорпције EM зрачење долази ако и само ако је

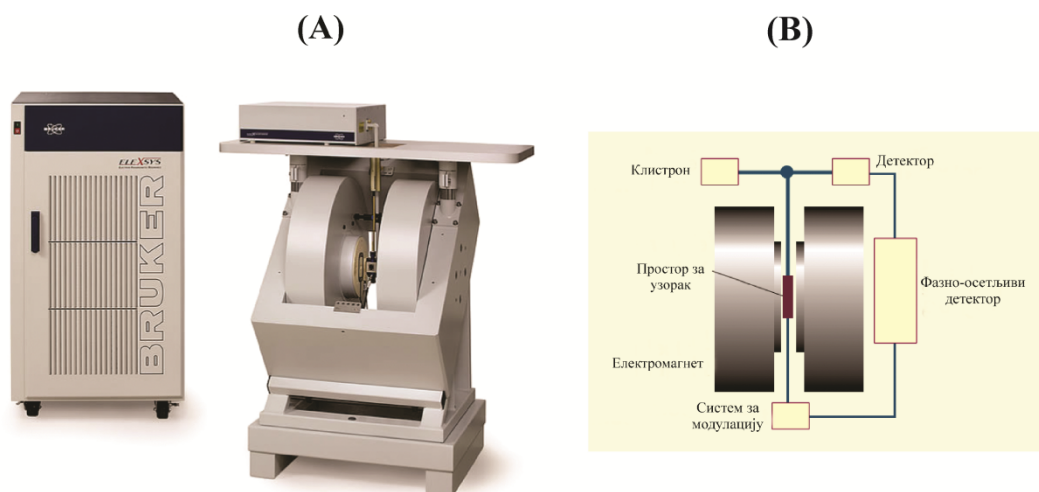
$$\Delta E = h\nu$$

где је h Планк-ова константа ($6,626 \times 10^{-34}$ Js) а ν фреквенција EM зрачења (Duin, 2013).

У делу 2.6 је објашњено да апсорпцијом енергије атом/молекул прелази са нижег на више енергетско стање. Фреквенције зрачења при којима долази до апсорпције (након успостављања резонантних услова тј. изједначавања фреквенције упадног зрачења и фреквенције атома/молекула) заправо одговарају енергетским разликама двају стања. Најчешће се користе фреквенције реда величине мегахерца³⁷ (MHz) – за NMR (зрачење ових фреквенција користе AM, FM и ТВ пријемници);

³⁷ MHz – 10^6 Hz; GHz – 10^9 Hz; THz – 10^{12} Hz; PHz – 10^{15} Hz

гигагерца (GHz) – за EPR – које се користи у радарима и микроталасним пећницама; терагерца и петагерца за UV (750 THz - 30 PHz)/VIS (430-770 THz) спектроскопију. Енергетске разлике које се испитују у EPR спектроскопији су у суштини резултат интеракције неспареног електрона из узорка са магнетним пољем који генерише магнет EPR спектрометра (Сл.28) – тзв. Zeeman-ов ефекат (детаљније у наставку). Магнетно поље јачине $\sim 0,3 \text{ T}^{38}$, које се углавном користи у EPR спектрометрима, одговара резонанцији са електромагнетним пољем фреквенције 10 GHz (10^{10} Hz) и таласне дужине 3 cm (област микроталаса). Дакле, електронска парамагнетна резонанција (EPR) или електронска спинска резонанција (*Electron Spin Resonance*, ESR) је спектроскопска метода којом се, у парамагнетцима (супстанцама које садрже молекуле/јоне/радикале са бар једним неспареним електроном) детектује резонантна апсорпција микроталасног зрачења у хомогеном магнетном пољу (Duin, 2013).



Слика 28 EPR спектрометар (А) Bruker Elexsys-II E500 CW-EPR spectrometer; (В) Шематски приказ основних делова EPR спектрометра. Уређај као извор зрачења користи клистрон, који у зависности од напона који се на њега доводи емитује монохроматско микроталасно зрачење одређене фреквенције. Узорак се смешта у резонаторски простор (cavity) који је „срце” уређаја и у коме се вредност магнетног поља линеарно мења. Обично је у облику паралелопипеда, а како интензитет линија у спектру зависи од положаја узорка у њему, за мерење се најчешће користе цилиндричне (стаклене или кварчне) кивете чија оријентација у магнетном пољу нема утицај на интензитет спектра. Када се успоставе резонантни услови, долази до апсорпције микроталаса што за последицу има промену детекторске струје (детектор је уређај на бази полупроводника који микроталасе конвертује у једносмерну струју). Присуство система за модулацију има за циљ повећање односа сигнал/шум тј. повећање осетљивости. Као детектор се најчешће користи силицијумски кристал (Atkins *et al.*, 2009).

³⁸ 1 T = 10^4 G

3.3.1 Zeeman-ов ефекат

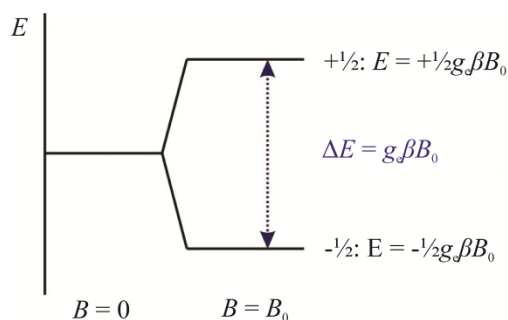
Када би било могуће изоловати неспарени електрон, тако да је потпуно независан од свог окружења, он би и даље имао унутрашњи угаони момент назван „спин”, \bar{S} . Имајући у виду чињеницу да је реч о наелектрисаној честици, понашао би се као мали магнет одн. магнетни дипол магнетног момента $\bar{\mu}$. У интеракцији посматраног електрона са магнетним пољем B_0 би настала два електронска енергетска нивоа (одн. створила би се енергетска разлика) – стање ниже енергије када је $\bar{\mu}$ електрона у смеру магнетног поља, окарактерисано спинским квантним бројем $s = -1/2$, и стање више енергије када је $\bar{\mu}$ супротног смера, окарактерисано са $s = +1/2$ (Zeeman-ов ефекат) – Сл.29. Енергија ових стања је производ вредности μ и B_0 . Тако је за електрон $\mu = sg_e\beta$, где је g_e тзв. g -фактор – константа пропорционалности са вредношћу 2,0023192778 ($\approx 2,00$), док је β – Bohr-ов магнетон ($9,27 \times 10^{-24} \text{ JT}^{-1}$), изведена јединица за мерење магнетног момента електрона/атома/молекула. Према томе, енергије електрона са $s = +1/2$ и $s = -1/2$ су, редом:

$$E_{+1/2} = +1/2 g_e \beta B_0$$

и

$$E_{-1/2} = -1/2 g_e \beta B_0$$

што за резултат има појаву два електронска енергетска нивоа у магнетном пољу (Сл.29).



Слика 29 Цепанье енергетских нивоа под дејством магнетног поља B_0 (Duin, 2013)

Када би даље постојала могућност постављања досад посматраног електрона на молекулу, дошло би до промене његовог укупног угаоног момента јер би онда поред унутрашњег спинског угаоног момента (\bar{S}) имао и орбитални угаони момент (\bar{L}). Како такав електрон у ствари представља својеврсну „циркулишућу струју”, јавља се магнетни момент који потиче од орбиталног угаоног момента. Ова два магнетна

момента интерагују а енергија интеракције зависи од њихових релативних оријентација. Тако је за:

Електрон у простору: $\bar{\mu} \propto g_e \bar{S}$ односно

Електрон у молекулу: $\bar{\mu} \propto g_e \bar{S} + \bar{L}$

Генерално, орбитални угаони момент је приближно 0 за електрон у основном стању (s електрон). Интеракцијом основних и ексцитованих стања долази до спин-орбиталног купловања, па је:

$\bar{\mu} \propto g_e \bar{S} + \text{допринос спин-орбиталног купловања}$

Често се, међутим претпоставља да је спин-орбитално купловање пропорционално \bar{S} :

$\bar{\mu} \propto g \bar{S}$

тј.

$$\Delta E = g\beta B_0$$

Допринос спин-орбиталног купловања зависи од величине језгра које садржи неспарени електрон. Према томе, органски слободни радикали, који садрже само H, O, C и N атоме ће имати мали допринос спин-орбиталног купловања, што ће дати g факторе вредности врло блиске g_e за разлику од метала, код којих је ова разлика знатна (Duin, 2013).

У новонасталој ситуацији посматрани електрон ће осећати језгро као позитивно наелектрисање које кружењем ствара секундарно магнетно поље, δB па је:

$$h\nu = g_e\beta(B_e + \delta B)$$

Како је практично позната само вредност B спектрометра, претходна једначина се може написати као:

$$h\nu = (g_e + \delta g)\beta B = g\beta B$$

„ $g_e + \delta g$ ” одн. g садржи информацију о хемијској природи везе између електрона и молекула односно о „електронској структури молекула” и представља својеврсни „отисак прста” молекула (Duin, 2013).

3.3.2 g -фактор

Када се парамагнетни узорак постави у униформно магнетно поље EPR спектрометра оно, као што је напред показано, цепа енергетске нивое основног стања и

ствара енергетску разлику ΔE . До апсорпције микроталасног зрачења долази тек када се испуни услов:

$$\Delta E = g\beta B_0 = h\nu$$

Вредност g се израчунава из ν (GHz) и B_0 (G) на следећи начин:

$$g = \frac{h\nu}{\beta B_0}$$

или

$$g = 0,7145 \frac{\nu(\text{MHz})}{B_0(\text{G})}$$

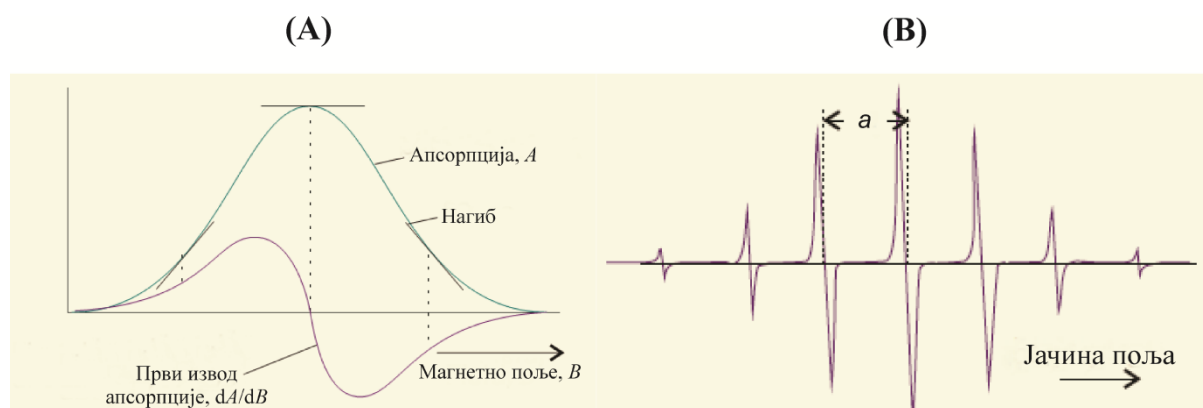
У молекулу се g -вредност повезује са лакоћом којом примењено магнетно поље побуђује електронску струју кроз молекул и снаге магнетног поља које иста генерише тако да g -вредност даје информације о електронској структури узорка. Ова вредност у EPR спектроскопији има улогу попут константе екранирања у NMR спектроскопији. Попут хемијског померања у NMR, g -вредност је анизотропна, тј. њена величина зависи од оријентације радикала у односу на примењено магнетно поље (Atkins *et al.*, 2009).

С обзиром на то да су у последњој једначини експериментално променљиве само две величине – фреквенција упадног зрачења и јачина магнетног поља, EPR спектри се могу добити на два начина. Први је промена ν уз константну вредност B_0 , а други, који заправо пружа боље перформансе и готово искључиво користи у EPR уређајима је промена B_0 уз константну вредност ν . До појаве апсорпционог пика долази када примењено магнетно поље подеси (*tune*-ира) два спинска стања тако да њихова енергетска разлика одговара енергији упадног зрачења. Ово поље се назива „резонантно поље” и није карактеристика једињења јер се спектри могу добити на неколико различитих фреквенција (Табела 1) (Duin, 2013).

Табела 1 Резонантно поље, B_{res} за $g = 2$ сигнал на одабраној фреквенцији микроталаса (Duin, 2013)

Микроталасна трака	Фреквенција (GHz)	B_{res} (G)
L	1,1	392
S	3,0	1070
X	9,75	3480
Q	34,0	12000
W	94,0	34000

Необичан изглед спектра представља апсорпциону линију EPR сигнала коју уређај, због технике детекције осетљиве на нагиб апсорпционе криве, приказује као први извод (Сл.30). Ширина линије се изражава или као ширина на полувисини апсорпционе линије или као растојање између екстрема првог извода док је интензитет укупна амплитуда сигнала између два екстрема (Atkins *et al.*, 2009).



Слика 30 (А) „Порекло” EPR спектра. Када се користи фазно-осетљив детектор, сигнал је први извод интензитета апсорпције. Максимум апсорпционог пика одговара тачки у којој извод пролази кроз нулу. **(В)** EPR спектар радикал анјона бензена, $C_6H_6^-$ у раствору. Растојање a је константа хиперфиног цепања, док центар спектра одређује g -вредност радикала (Atkins *et al.*, 2009).

Најважнија особина EPR спектра је његова хиперфина структура – цепање индивидуалних резонантних линија на компоненте као последица магнетне интеракције између електронског спина неспареног електрона и магнетних диполних момената језгара присутних у радикалима (насталих током хемијске реакције, приликом озрачивања, комплекси d -метала, молекули у триплетном стању). Ако радикал садржи N еквивалентних протона, постоји $N+1$ хиперфиних линија са биномном расподелом интензитета датом Pascal-овим троуглом³⁹ (Atkins *et al.*, 2009).

³⁹ Pascal-ов троугао представља бесконачан низ природних бројева у облику пирамидалне шеме. Сваки број у једном реду представља збир бројева који су изнад њега. Крајњи бројеви шеме су увек јединице. Ови бројеви посматрани по врстама се понашају као биномни коефицијенти.

4 ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО

”Anything that can go wrong, will go wrong.”
Murphy-jev закон

4.1 Припрема узорака

Материјал и прибор: Метанол УНПЛС степена чистоће (Ultra Gradient HPLC Grade; J.T. Baker, Deventer, The Netherlands); смеша фосфолипида⁴⁰ – PL90 (Phospholipon 90®; PHOSPHOLIPID GmbH, Köln, Germany); бензофенон (BZP) (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, USA); рибофлавин (RFL) (98%, Afla Aesar, Karlsruhe, Germany); билирубин (BRB) (Fluka AG, Buchs, Switzerland); кверцетин (QC) (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, USA); натријум хидроксид (AnalaR NORMAPUR® pellets analytical reagent, VWR PROLABO®, Radnor, Pennsylvania, USA); амонијум хидроксид, р.а. ~25% (CENTRONEM d.o.o. Стара Пазова, Србија), редестилована вода, аналитичка вага, аутоматске пипете, нормални судови.

„Почетни” (*stock*) раствори су припремани одмеравањем 0,010 g QC⁴¹; 0,025 g BZP; 0,100 g PL90; 0,0367 g RFL и 0,020 g BRB; растварањем у мало метанола (QC, BZP и PL90); 0,01 moldm⁻³ раствора NaOH (RFL) одн. 1,5 cm³ NH₄OH (BRB); квантитативним преношењем у нормалне судове од 25 cm³ (QC, BZP и RFL), 100 cm³ (PL90) одн. 5 cm³ (BRB) и допуњавањем метанолом (QC, BZP, PL90, BRB), односно 0,01 moldm⁻³ раствором NaOH (RFL) до црте. Тако су добијене концентрације: ~1,3×10⁻³ moldm⁻³ (QC); ~5,5×10⁻³ moldm⁻³ (BZP); ~1,3×10⁻³ moldm⁻³ (PL90); ~3,9×10⁻³ moldm⁻³ (RFL) и ~6,8×10⁻³ moldm⁻³ (BRB). Поред *stock* раствора BRB-а припреман је и *blank* раствор BRB-а одмеравањем 1,5 cm³ NH₄OH у нормални суд од 5 cm³ и допуњавањем метанолом до црте. „Радни” раствори су увек припремани непосредно пре анализе, разблаживањем „почетних” раствора метанолом у одговарајућим односима. Свим компонентама смеша BRB-QC-PL90 и RFL-QC-PL90 је, у одсуству BRB-а одн. RFL-а додаван *blank* раствор BRB-а одн. 0,01 moldm⁻³ раствор NaOH у количини BRB-а одн. RFL-а присутног у смеси BRB-QC-PL90 и RFL-QC-PL90, респективно. Финална концентрација QC-а је, у свим смешама, била ~5×10⁻⁵ moldm⁻³; BZP-а, RFL-а и BRB-а ~1×10⁻⁴ moldm⁻³ а PL90 ~1,3×10⁻³ moldm⁻³.

⁴⁰ Фосфолипиди (PL90) су у облику жутих, воскастих љуспица, добијених из лецитина соје. Према декларацији произвођача се састоје из: фосфатидилхолина 94,7%, лизофосфатидилхолина 0,9%, токоферола 0,21% и масних киселина: палмитинске 12,0±2%; стеаринске 3±1%; олеинске 3±3%; линолне 66±5% и линоленске киселине 5±2%. Пероксидни број смеше је 1,4 (max. 5,0), киселински број 0,2 (max. 0,5) а садржај етанола и воде 0,0% (max. 0,2%) и 0,3% (max. 1,5%), респективно. Чувају се заштићени од светлости, у инертној атмосфери азота.

⁴¹ Растворљивост кверцетина износи 1 g у 290 cm³ алкохола (Fahlman, 2010)

Смеше са фосфолипидима су припремане разблаживањем „почетних” раствора метанолним раствором PL90.

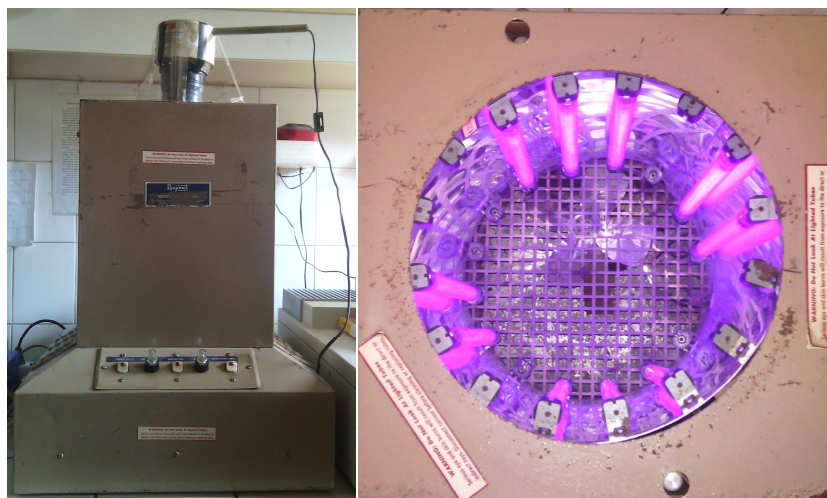
Сви узорци су припремани на собној температури. рН вредности смеша QC-BZP-PL90; QC-RFL-PL90; QC-BRB-PL90; „бинарне” (QC-RFL-BRB-PL90) и „тернарне” (QC-BZP-RFL-BRB-PL90) смеше су биле 7,1; 8,1; 9,3; 9,5 и 9,4, респективно. Раствори су до анализе чувани на 4°C, а како би се избегле евентуалне фотохемијске промене, заштићени су од директне сунчеве светлости обавијањем алуминијумском фолијом.

4.2 UV озрачивање

Материјал и прибор: Метанолни раствори узорака, фотохемијски реактор „Rayonet” (Southern New England Ultraviolet Co., Connecticut, USA), кварцне кивете.

Раствори су озрачивани под идентичним условима (аеробним – смеше са BZP-ом и анаеробним* – смеше са RFL-ом и BRB-ом), у континуалном режиму, помоћу два сета лампи (по 10 симетрично постављених лампи) са емисионим максимумима на 300 nm (UV-B) и 350 nm (UV-A) – **Сл.31**. Озрачивање узорака запремине 2,5 cm³ је вршено у кварцним⁴² киветама са херметичким поклопцем, димензија 1×1×4,5 cm, смештених у ротациони држач за кивете. Држач је позициониран вертикално у осу реактора, ротира брзином од 5 obr·min⁻¹ чиме се обезбеђује равномерно озрачивање узорака из свих позиција, тј. просечно једнак број UV-фотона у јединици времена, по јединици озрачиване површине. Укупни измерени енергетски флуks који узорци примају на овај начин је око 15,0 Wm⁻² на 300 nm одн. 13,0 Wm⁻² на 350 nm. Енергетски флуks је одмерен помоћу UV-метра SOLARMETER SM 8.0 UVC („Solartech” Inc., Michigan, USA), само за UV-C лампе на 254 nm, док је флуks преосталих („емисионих”) таласних дужина израчунат из односа енергија UV-фотона.

⁴² Коришћене су кварцне а не стаклене кивете јер стакло апсорбује у блиској UV-области (200-300 nm).



Слика 31 Цилиндрични фотохемијски реактор „Rayonet“. UV лампе су по конструкцији цеви са живином паром под малим притиском. Пролазак електричног пражњења кроз живину пару условљава, у највећој мери, емитовање UV зрачења таласне дужине 254 nm (UV-C – „провидне лампе“). Емисија лампи се мења премазивањем унутрашње стране цеви слојем фосфора, који се апсорпцијом UV-C фотона побуђује и емитује зрачење веће таласне дужине (мање енергије) (UV-A – „црне лампе“ и UV-B – „беле лампе“). Вентилатор омогућава одржавање температуре током зрачења испод 40°C (Albini and Germani, 2010).

*Припрема узорака за озрачивање под анаеробним условима је приказана на **Сл.32**.



Слика 32 Припрема узорака за озрачивање под анаеробним условима. Анаеробни услови су постигнути дегасирањем раствора азотом (удувавањем азота у раствору) и то тако што се у кивету одмери 2,5 cm³ раствора, ниво раствора обележи маркером на спољашњој (брушеној) страни кивете, дода 200 µl метанола и кивета затвори парафилмом. Кроз парафилм се провлаче две игле, и то тако да се она кроз коју се удубава азот спушта до дна кивете док се другом „даје одушак“. Азот се удубава одговарајућом брзином, у трајању од најмање 10 min (снижавање нивоа раствора до маркиране ознаке се прати све време). Игле се ваде истовремено, кивета брзо затвара парафилмом и одмах креће са озрачивањем.

4.3 HPLC хроматографија

Материјал и прибор: Метанолни раствори узорака; метанол УHPLC степена чистоће; редестилована вода; мравља киселина (Euro Hemija, Београд, Србија); HPLC хроматограф (Agilent 1100 Series system, Waldbron, Germany); филтри (пречника 17 mm и величине пора 0,45 μm ; Thermo Scientific, Germany) за узорке; аутоматске пипете; нормални судови.

Деградација појединачних компоненти – кверцетина, бензофенона и фосфолипида у метанолу (појединачно и у одговарајућим смешама), пре и одмах након UV-озрачивања и настанак потенцијалних производа деградације су праћени RP-HPLC хроматографијом. Наиме, у HPLC хроматограф, опремљен бинарном пумпом (Agilent 1100 Series), аутоматским инјектором (*autosampler*-ом, Agilent 1200 Series) и DAD⁴³ детектором (Agilent 1200 Series, опсега таласних дужина 190-800 nm), је инјектиран узорак (претходно филтриран кроз 0,45 μm филтер) запремине 20 μl , који до колоне долази ношен мобилном фазом протока 1 $\text{cm}^3 \text{min}^{-1}$. На колони (Zorbax Eclipse Plus C18, дужине 25 cm, унутрашњег пречника 4,6 mm и дебљине пуњења 5 μm), температуре⁴⁴ 25°C долази до раздвајања смеше на компоненте, које затим, по редоследу елуирања из колоне стижу до DAD детектора подешеног на таласне дужине апсорпционих максимума појединачних компоненти и то: 210 nm (неоксидовани липиди – NL); 234 nm (конјуровани диени – пероксиди, Per); 250 nm (BZP); 372 nm (QC и потенцијални деградациони производ билирубина – биливердин, BVD), 295 nm (потенцијални деградациони производи кверцетина, QC DP); 445 nm (RFL), 390 nm (потенцијални деградациони производ рибофлавина – лумихром, LC) и 450 nm (BRB). Обрада података је извршена помоћу софтверског пакета Agilent ChemStation (Agilent Technologies, USA).

У раду су искоришћене све предности присуства бинарне пумпе у HPLC систему. Наиме, зависно од природе узорака, једни су елуирани изократским а други градијентним режимом рада. Мобилну фазу су, у свим експериментима, чинили 0,1% (v/v) мравља киселина у води (елуент А) и 0,1% (v/v) мравља киселина у метанолу (елуент В).

⁴³ DAD детектор умрежених фото-диода омогућава не само детекцију раздвојених компонента истовременим „снимањем” HPLC хроматограма на више изабраних таласних дужина, већ и спектралну анализу појединих пикова на хроматограму.

⁴⁴ Температура колоне се одржава константном у току анализе помоћу термостата за колону, што је веома важно јер њена промена утиче на подеони коефицијент, растворљивост компоненти и вискозитет мобилне фазе.

Услови хроматографије за појединачне узорке смеше **BZP-QC-PL90** су били:

- ❖ Кверцетин и бензофенон, појединачно (**QC**, **BZP**) и у смеси (**QC-BZP**), су елуирани изократски, при саставу мобилне фазе од 35% А : 65% В и таласним дужинама детекције подешеним на 372 nm и 295 nm (за **QC**); 250 nm (за **BZP**) одн. 372 nm, 295 nm и 250 nm (за смешу **QC-BZP**).

Смеше кверцетина и бензофенона са фосфолипидима (**QC-PL90**, **BZP-PL90** и **QC-BZP-PL90**) су елуиране градијентно под следећим условима:

- ❖ **QC-PL90**: 0-6 min – изократски – 65% В; 6-9 min – линеарни градијент до 100% В; 9-26 min – изократски – 100% В; 26-30 min – линеарни градијент до 65% В; таласне дужине детекције: 210 nm, 234 nm, 295 nm и 372 nm.
- ❖ **BZP-PL90** и **QC-BZP-PL90**: 0-13 min – изократски – 65% В; 13-15 min – линеарни градијент до 100%В; 15-32 min – изократски – 100% В; 32-35 min – линеарни градијент до 65% В; и таласне дужине детекције: 210 nm, 234 nm и 250 nm (**BZP-PL90**) односно 210 nm, 234 nm, 295 nm, 372 nm и 250 nm (**QC-BZP-PL90**).

Услови хроматографије за појединачне узорке смеше **RFL-QC-PL90** су били:

- ❖ Рибофлавин (**RFL**) је елуиран изократски, при саставу мобилне фазе од 50% А : 50% В и таласним дужинама детекције подешеним на 445 nm (за **RFL**) и 390 nm (за **LC**).

Смеше кверцетина и рибофлавина са фосфолипидима (**RFL-QC**, **QC-PL90** и **RFL-PL90**, **RFL-QC-PL90**) су елуиране градијентно под следећим условима:

- ❖ **RFL-QC**: 0-8,5 min – изократски – 50% В; 8,5-10 min – линеарни градијент до 85% В; 10-15 min – изократски – 85% В; 15-20 min – линеарни градијент до 50% В; таласне дужине детекције: 445 nm, 390 nm, 372 nm и 295 nm.
- ❖ **QC-PL90**: 0-8,5 min – изократски – 50% В; 8,5-10 min – линеарни градијент до 70% В; 10-15 min – изократски – 70% В; 15-17 min – линеарни градијент до 100% В; 17-32 min – изократски – 100% В; 32-35 min – линеарни градијент до 50% В; таласне дужине детекције: 372 nm, 295 nm, 210 nm и 234 nm.
- ❖ **RFL-PL90**: 0-10 min – изократски – 50% В; 10-15 min – линеарни градијент до 100% В; 15-32 min – изократски – 100% В; 32-35 min – линеарни градијент до 50%В; таласне дужине детекције: 445 nm, 390 nm, 210 nm и 234 nm.
- ❖ **RFL-QC-PL90**: 0-10 min – изократски – 50% В; 10-15 min – линеарни градијент до 70% В; 15-18 min – изократски – 70% В; 17-22 min – линеарни градијент до

100% В; 22-42 min – изократски – 100% В; 42-45 min – линеарни градијент до 50% В; таласне дужине детекције: 445 nm, 390 nm, 372 nm, 295 nm, 210 nm и 234 nm.

Услови хроматографије за појединачне узорке смеше **BRB-QC-PL90** су били:

- ❖ **BRB** и **BRB-QC**: 0-10 min – изократски – 70% В; 10-15 min – линеарни градијент до 100% В; 15-30 min – изократски – 100% В; 30-35 min – линеарни градијент до 70% В; таласне дужине детекције: 450 nm, 372 nm (BRB) одн. 450 nm, 372 nm и 295 nm (BRB-QC).
- ❖ **QC-PL90**: 0-5 min – изократски – 70% В; 5-8 min – линеарни градијент до 100% В; 8-25 min – изократски – 100% В; 25-28 min – линеарни градијент до 70% В; таласне дужине детекције: 372 nm, 295 nm, 210 nm и 234 nm.
- ❖ **BRB-PL90** и **BRB-QC-PL90**: 0-5 min – линеарни градијент од 70-80% В; 5-13 min – изократски 80% В; 13-14 min – линеарни градијент до 90% В; 14-33 min – изократски 90% В; 33-34 min – линеарни градијент до 100% В; 34-50 min – изократски 100% В; 50-55 min – линеарни градијент до 70% В; таласне дужине детекције: 450 nm, 372 nm, 210 nm и 234 nm (BRB-PL90) одн. 450 nm, 372 nm, 295 nm, 210 nm и 234 nm (BRB-QC-PL90).

Услови хроматографије смеша **BRB-RFL**, **BRB-RFL-QC**, „бинарне” (**BRB-RFL-QC-PL90**) и „тернарне” (**BRB-RFL-BZP-QC-PL90**) смеше су били:

- ❖ **BRB-RFL** и **BRB-RFL-QC**: 0-10 min – изократски 50% В; 10-15 min – линеарни градијент до 70% В; 15-25 min – изократски 70% В; 25-29 min – линеарни градијент до 100% В; 29-40 min – изократски 100% В; 40-45 min – линеарни градијент до 50% В; таласне дужине детекције: 450 nm, 372 nm, 445 nm и 390 nm (**BRB-RFL**) одн. 450 nm, 372 nm, 445 nm, 390 nm и 295 nm (**BRB-RFL-QC**).
- ❖ **BRB-RFL-PL90**, „бинарна” и „тернарна” смеша: 0-8,5 min – изократски 50% В; 8,5-10 min – линеарни градијент до 70% В; 10-18 min – изократски 70% В; 18-20 min – линеарни градијент до 90% В; 20-35 min – изократски 90% В; 35-36 min – линеарни градијент до 100% В; 36-54 min – изократски 100% В; 54-59 min – линеарни градијент до 50% В; таласне дужине детекције: 450 nm, 372 nm, 445 nm, 390 nm, 210 nm и 234 nm (BRB-RFL- PL90); 450 nm, 372 nm, 445 nm, 390 nm, 295 nm, 210 nm и 234 nm (BRB-RFL-QC-PL90); одн. 450 nm, 372 nm, 445 nm, 390 nm, 250 nm, 295 nm, 210 nm и 234 nm (BRB-RFL-BZP-QC-PL90).

Кверцетин је, из меша са RFL, BRB, „бинарне” и „тернарне” меша, елуиран под следећим хроматографским условима:

- ❖ **QC:** 0-8,5 min – изократски – 50% B; 8,5-10 min – линеарни градијент до 70 % B; 10-15 min – изократски – 70% B; 15-17 min – линеарни градијент до 50% B; таласне дужине детекције: 372 nm и 295 nm.

Хроматографски услови коришћени за раздвајање меша кверцетина и фосфолипида (**QC-PL90**) из BRB-QC-PL90, „бинарне” и „тернарне” меша су били:

- ❖ **QC-PL90:** 0-5 min – изократски – 70% B; 5-8 min – линеарни градијент до 100% B; 8-25 min – изократски – 100% B; 25-28 min – линеарни градијент до 70% B; таласне дужине детекције: 372 nm, 295 nm, 210 nm и 234 nm.

Фосфолипиди (**PL90**) и одговарајуће меша са фосфолипидима (**QC-PL90; BZP-PL90, QC-BZP-PL90; RFL-PL90, RFL-QC-PL90, BRB-PL90, BRB-QC-PL90, BRB-RFL-PL90, BRB-RFL-QC-PL90, BRB-RFL-BZP-PL90, и BRB-RFL-BZP-QC-PL90**) су, у свим мешама, у циљу детекције образованих конјугованих диенских структура елуирани изократски, уз метанол (100% B) као мобилну фазу. Таласне дужине детекције су биле подешене на 210 nm и 234 nm (PL90); 210 nm, 234 nm и 372 nm (QC-PL90); 210 nm, 234 nm и 250 nm (BZP-PL90); 210 nm, 234 nm, 250 nm и 372 nm (QC-BZP-PL90); 210 nm, 234 nm и 445 nm (RFL-PL90); 210 nm, 234 nm, 372 nm и 445 nm (RFL-QC-PL90); 210 nm, 234 nm и 450 nm (BRB-PL90); 210 nm, 234 nm, 372 nm и 450 nm (BRB-QC-PL90; BRB-RFL-PL90; BRB-RFL-QC-PL90) одн. 210 nm, 234 nm, 250 nm и 450 nm (BRB-BZP-RFL-PL90; BRB-BZP-RFL-QC-PL90).

Уравнотежавање колоне (*post time*) је, након сваког појединачног градијентног елуирања, трајало 5 min.

4.4 Електроспреј јонизација (ESI)-масена спектрометрија (MS)

Материјал и прибор: Метанолни раствори кверцетина и бензофенона, концентрације 5 ppm (5 mgdm⁻³); масени спектрометар са јонским трапом као анализатором, LCQ Fleet Ion Trap Mass Spectrometer (Thermo Scientific, Waltham, USA); шприц запремине 500 µl (Hamilton Co., Reno, Nevada, USA); чаше, нормални судови, аутоматске пипете.

Код директног инјектирања (*flow injection*) узорка у јонски извор нема хроматографског раздвајања а све присутне компоненте истовремено дају молекулске јоне у масеном спектру. Метода је погодна за анализу једноставних меша, а параметар који утиче на успешност анализе је брзина протока узорка у извор.

Неозрачени и UV-B лампама озрачивани узорци кверцетина и смеше кверцетина и бензофенона су шприц пумпом (брзином протока од $50 \mu\text{min}^{-1}$) упумпани директно у јонски извор напона 4,95 kV. Проласком кроз капилару температуре 275°C и напона -50 V (негативни модалитет) раствор се распршује у струју азота загрејаног (зависно од узорка) на температуру од $130\text{-}240^\circ\text{C}$; протока 20 au^{45} и 30 au за основни одн. 2 au и 5 au за помоћни ток, респективно. У сваком добијеном масеном спектру је одабран најинтензивнији јон као прекурсор а онда су одговарајућом колизионом енергијом ($15\text{-}30 \text{ eV}$), одн. енергијом судара са атомима хелијума у јонском трапу, добијени MS^2 спектри. Обрада података је извршена помоћу софтверског пакета Xcalibur 2.2 (Thermo Fisher Scientific, USA).

4.5 UHPLC хроматографија-ESI-MS спектрометрија

Материјал и прибор: Метанолни раствори билирубина, рибофлавина и кверцетина, метанол UHPLC степена чистоће (Ultra Gradient HPLC Grade, J.T. Baker, Deventer, The Netherlands); вода (HPLC gradient grade, Fisher Scientific, UK); мравља киселина 99% (Carlo Erba Reagenti S.p.A., Rodano, MI, Italia); UHPLC хроматограф (Dionex Ultimate 3000 UHPLC+ focused, Thermo Fisher Scientific, USA); филтри (пречника 17 mm и величине пора $0,45 \mu\text{m}$; Thermo Scientific, Germany) за узорке; аутоматске пипете; нормални судови.

Деградација узорака (билирубина; рибофлавина, кверцетина и смеше рибофлавина и кверцетина) у метанолу пре и одмах након UV-озрачивања (под аеробним – BRB, RFL, QC, RFL-QC и анаеробним условима – RFL, RFL-QC) је праћена UHPLC хроматографијом. У UHPLC хроматограф, опремљен кватернерном пумпом, аутоматским инјектором (*autosampler*-ом) и DAD детектором (опсега таласних дужина од $200\text{-}800 \text{ nm}$) повезаним са масеним спектрометром (LCQ Fleet Ion Trap Mass Spectrometer) инјектиран је узорак (претходно филтриран кроз $0,45 \mu\text{m}$ филтер) запремине $0,5 \mu\text{l}$ који, ношен мобилном фазом састављеном од: (A) $0,1\%$ мравље киселине у води и (B) $0,1\%$ мравље киселине у метанолу, протока $0,5 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$, долази до колоне. На колони (Hypersil gold aQ C18, дужине 15 cm, унутрашњег пречника 3 mm и дебљине пуњења $3 \mu\text{m}$) температуре 25°C , долази до раздвајања смеше на компоненте које, по редоследу елуирања из колоне, стижу до DAD детектора подешеног на таласне дужине блиске апсорпционим максимумима појединачних компоненти: билирубина

⁴⁵ *arbitrary units* – арбитрарне јединице представљају релативне јединице мере која заправо показују однос количине супстанце, интензитета или неке друге величине према унапред одређеном референтном мерењу дефинисаном у локалној лабораторији.

(450 nm) и његових потенцијалних деградационих производа – дипирола (280 nm) и биливердина (370 nm и 650 nm) одн. рибофлавина (445 nm) и његових потенцијалних деградационих производа – циклодехидрорибофлавина, CDRF (410 nm); формил-метил-флавина, FMF (385 nm) и лумихрома, LC (356 nm); кверцетина (372 nm и 255 nm, максимуми апсорбације Трака I и II, респективно) и његових потенцијалних деградационих производа (295 nm и 300 nm) односно смеше RFL-QC: 445 nm, 410 nm, 385 nm и 372 nm.

За течено-хроматографску анализу раствора **BRB-а** је коришћен следећи градијентни програм: 0-3 min – линеарни градијент од 70% до 85% B; 3-4 min – линеарни градијент до 100% B, 4-14 min – изократски 100% B; 14-14,2 min – линеарни градијент до 70% B; 14,2-15 min – изократски 70% B. Масена (MS) анализа је извршена помоћу LCQ 3D-јонске замке са електроспреј (ESI) јонизацијом у позитивном модалитету. Параметри ESI извора су одабрани по узору на експерименталне услове коришћене у раду Pigone-а и сарадника (Pigone *et al.* 2010) који су вршили HPLC/ESI-MS анализу билирубина екстрахованог из биљке *Strelitzia reginae* (рајска птица) и то: напон извора 4,5 kV, напон капиларе 22 V, напон сочива 65 V, температура капиларе 250°C при протоку основног и помоћног гаса (N₂) од 60 au и 5 au, респективно. Масени спектри су снимани у опсегу *m/z* 100-1000. MS/MS спектри су добијени применом нормализоване колизионе енергије од 12 eV и 15 eV.

Хроматографски услови коришћени за анализу рибофлавина, кверцетина и њихове смеше су били:

RFL: 0-6,5 min – линеарни градијент од 20% до 50% B; 6,5-10 min – изократски 50% B; 10-10,1 min – линеарни градијент од 50% до 20% B; и коначно 10,1-20 min – изократски 20% B.

QC и RFL-QC: 0-2,5 min – изократски 40% B; 2,5-5,5 min – линеарни градијент до 95% B; 5,5-7 min – изократски 95% B; 7-7,1 min – линеарни градијент до 40% B и 7,1-13 min – изократски 40% B.

Масена анализа је извршена помоћу LCQ 3D-јонске замке са електроспреј (ESI) јонизацијом у позитивном и негативном модалитету. Параметри ESI извора: напон извора, напон капиларе, напон сочива, температура капиларе и проток основног и помоћног гаса (N₂) су били: 4,5 kV; 22 V; 65 V; 350°C; 60 au и 5 au, у позитивном, односно 4,5 kV; -60 V; -95 V; 350°C; 42 au и 7 au, у негативном модалитету,

респективно. Масени спектри су снимани у опсезима m/z 150-1000 и m/z 100-650. MS/MS спектри су добијени применом нормализоване колизионе енергије од 15 eV и 17 eV. Обрада података је извршена помоћу софтверског пакета Xcalibur 2.2 (Thermo Fisher Scientific, USA).

4.6 EPR спектроскопија

Материјал и прибор: Метанолни раствори узорака (RFL, BRB, BZP, QC); „спински хватачи” (spin trap-ови) DEPMPO (5-диетоксифосфорил-5-метил-1-пиролин-N-оксид, Alexis Biochemical, Lausen, Switzerland) и TEMP (2,2,6,6-тетраметилпиперидин, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA); EPR спектрометар (Bruker Elexsys II E500 X-band spectrometer); гас-пропусне тефлонске тубе (дужине 5 cm, дебљине зида 0,5 mm и унутрашњег пречника 1 mm – Zeus Industries, Raritan, New York, USA); аутоматске пипете; епендорфе; нормални судови; кварцна капилара; кварцне кивете са херметичким поклопцем.

Детекција краткоживећих радикалских врста насталих као последица UV-B озрачивања метанолних раствора узорака је извршена EPR *spin trapping* методом, коришћењем комерцијалних спинских хватача DEPMPO и TEMP.

У 30 μl одн. 40 μl узорка је, непосредно пре озрачивања, додат 1 μl DEPMPO (концентрације 0,1 mol dm^{-3} у води) одн. 20 μl TEMP⁴⁶ (концентрације 0,0593 mol dm^{-3} у метанола) *spin trap*-а са циљем детекције супероксида одн. синглетног кисеоника, респективно.

Дужине UV-B озрачивања узорака су одабране тако да пружају оптималне услове за праћење сигнала радикалских адуката (DEPMPO/ООН и TEMP). Тако је RFL и смеша RFL-QC са DEPMPO *spin trap*-ом зрачена 7,5 min; BRB и смеша BRB-QC 15 min и коначно BZP и смеша BZP-QC, 4 min. Озрачивање узорака (RFL, RFL-QC; BRB, BRB-QC и BZP) у присуству TEMP спинског хватача је трајало 5 min.

За сваки сет експеримената је снимљен контролни сигнал озрачивањем „blank”-а (метанола са додатком 0,01 mol dm^{-3} раствора NaOH у количини RFL-а присутног у смеси RFL-QC; метанола са додатком NH₄OH-МеОН у количини BRB-а присутног у смеси BRB-QC и метанола за смешу BZP-QC) са DEPMPO одн. TEMP спинским хватачем.

Аликвотима запремине 30 μl озрачених раствора су потом напуњене гас-пропусне тефлонске тубе, савијене на половине и смештене у кварцну капилару, унутрашњег пречника 4 mm тако да је целокупна запремина узорка изложена

⁴⁶ TEMP spin trap је коришћен без претходног пречишћавања.

ефективној површини озрачивања микроталасима. Тако припремљени узорак је коначно смештен у резонатор (*cavity*) уређаја. Сви електрон парамагнетно резонантни (EPR) спектри су снимљени на собној температури (22°C), на Bruker Elexsys II E500 X-band спектрометру, под следећим условима: микроталасна снага 10,02 mW, модулациона амплитуда 2 G, модулациона фреквенција 100 kHz и опсег скенирања 200 G са централним пољем од 3503,7 G (у случају DEPMPO) одн. опсега скенирања од 70 G и централним пољем од 3510,0 G (у случају TEMP спинског хватача). Идентификација радикала је извршена поређењем експериментално добијених са симулационим спектрима DEPMPO/OOH, DEPMPO/OH и DEPMPO/H адуката. Адукт TEMP/¹O₂ (TEMPO) је идентификован поређењем карактеристичних параметара (очитаних са експериментално добијених спектра) адукта – константе хиперфиног цепања, *g*-вредности, ширине и интензитета сигнала, са литературно доступним подацима (Kruk and Michalska, 2010).

Обрада снимљених спектра је извршена помоћу Eleana 2.2 софтверског пакета док су спектри адуката симулирани помоћу WINEPR SimFonia (Bruker Analytische Messtechnik GmbH) софтвера (Moјović *et al.*, 2005; Milenković, 2013).

5 РЕЗУЛТАТИ

„Да смо знали шта је то што радимо, не би се звало истраживање, зар не?“
Albert Einstein

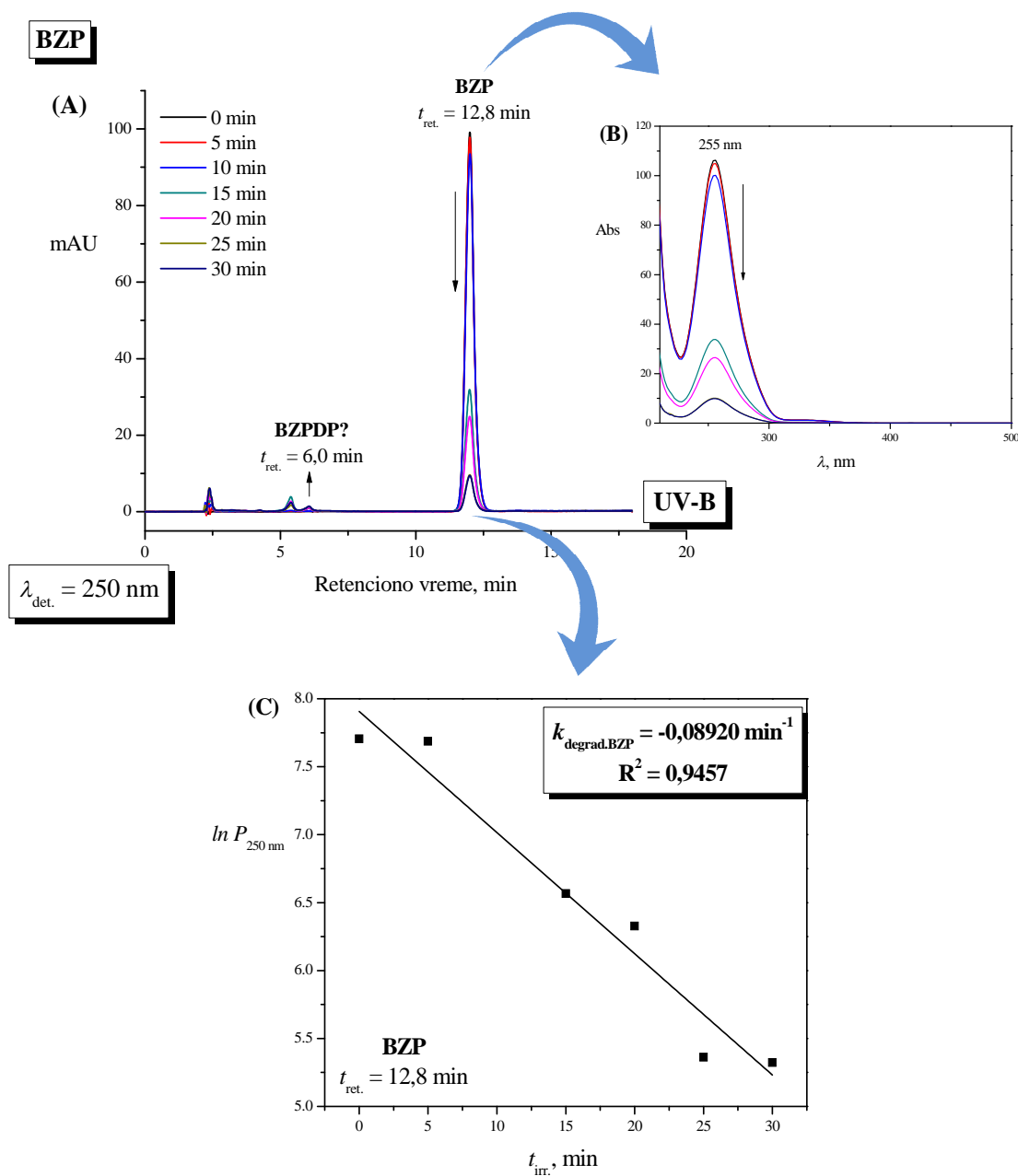
5.1 UV индуковане промене смеше BZP-QC-PL90

5.1.1 RP-HPLC анализа смеше BZP-QC-PL90

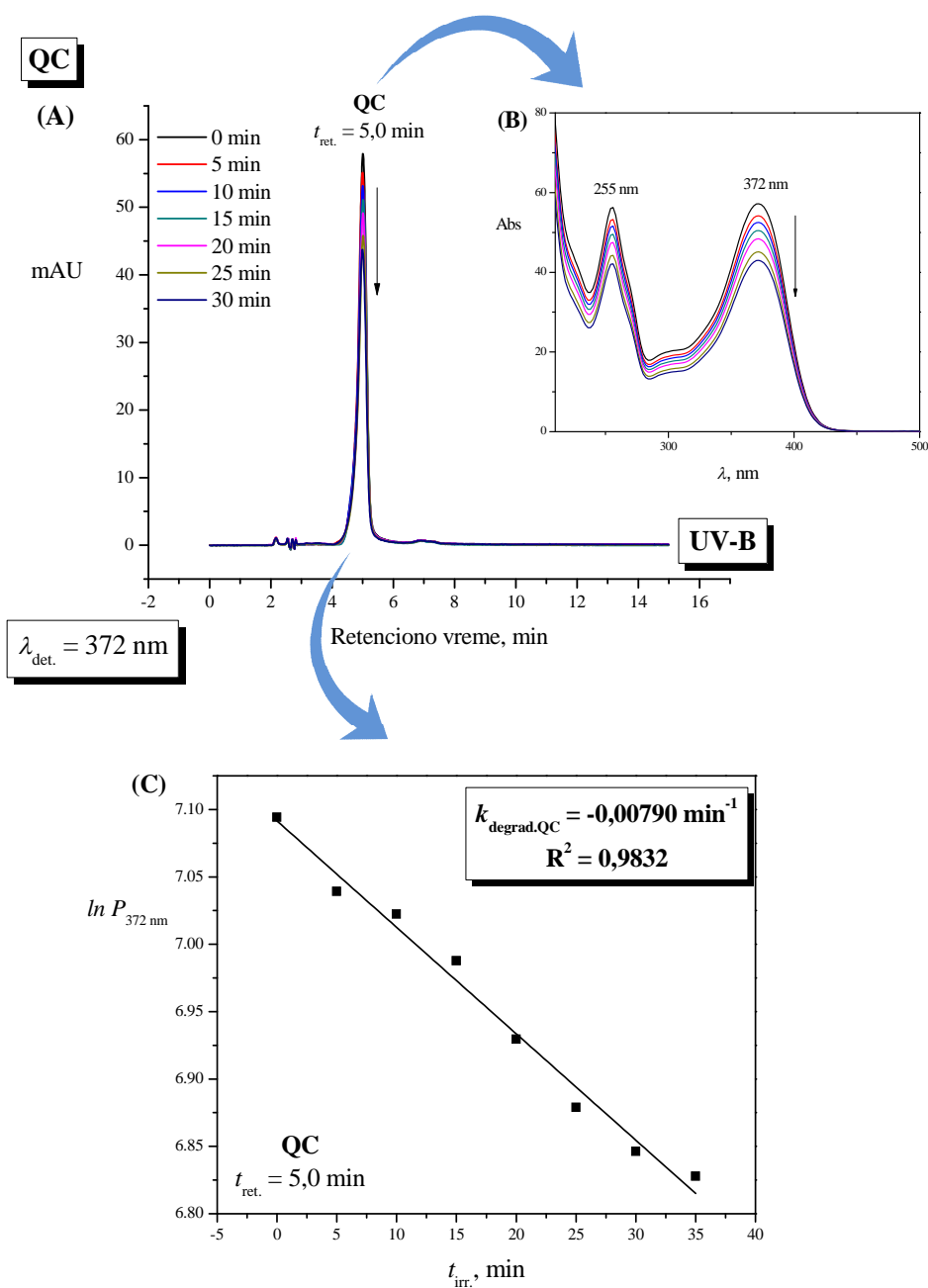
На **Слици 33А** су приказани хроматограми неозраченог и UV-B озрачиваног бензофенона у метанолу. Промене апсорпционих спектра BZP-а, са порастом времена UV-B озрачивања, добијених са снимљених хроматограма, дате су на **Слици 33В**. Кинетика деградације бензофенона, праћена преко смањења површине пика истог, приказана је на **Слици 33С**.

Хроматограми неозраченог и UV-B-озрачиваног кверцетина у метанолу снимљени на 372 nm – таласној дужини максимума Траке I – су приказани на **Слици 34А**, док су промене апсорпционих спектра под датим условима озрачивања приказани на **Слици 34В**. Кинетика *bleaching*-а кверцетина, као последица континуалног UV-B озрачивања, дата је на **Слици 34С**.

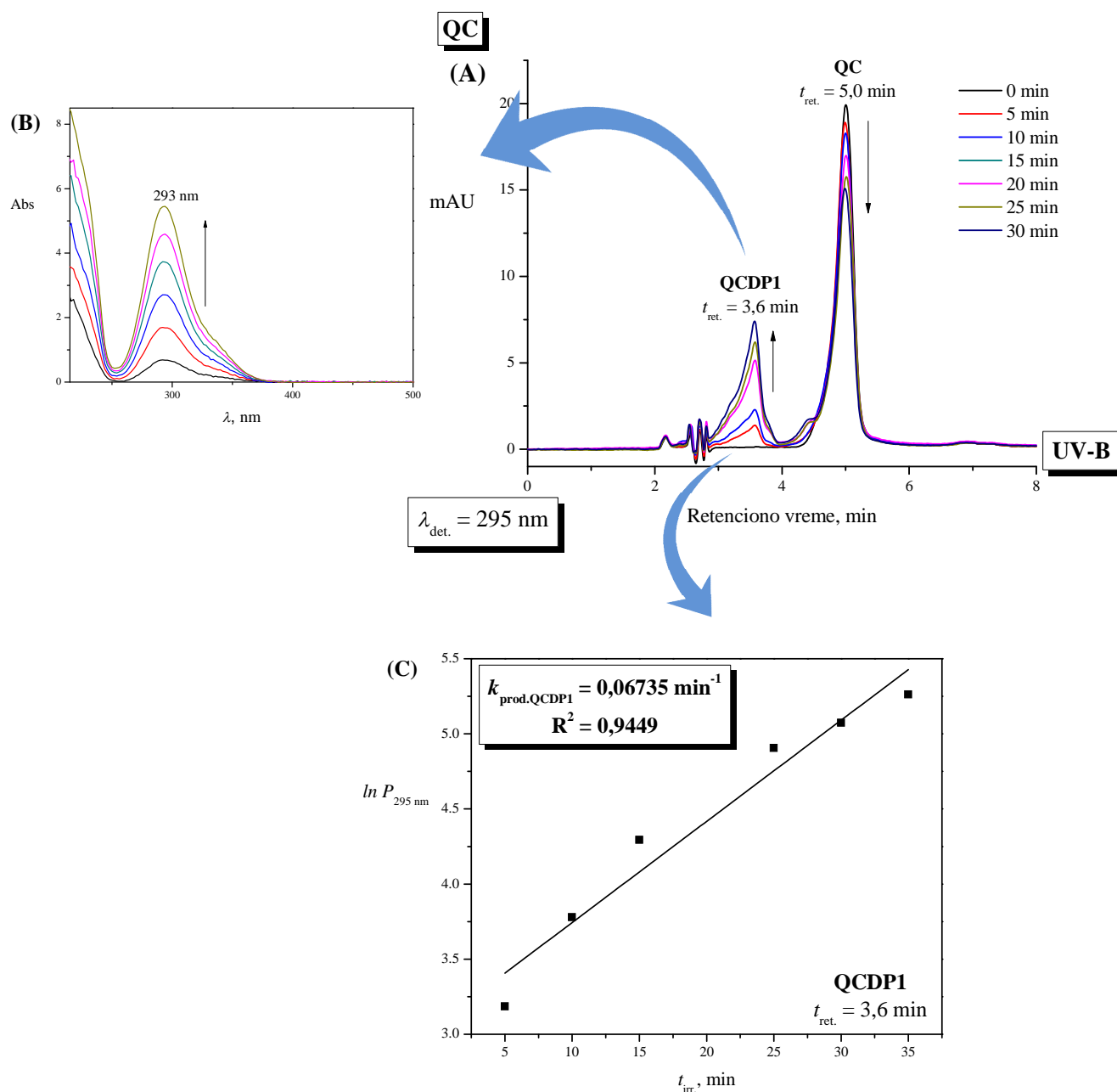
На **Слици 35А** су приказани хроматограми неозраченог и UV-B-озрачиваног кверцетина у метанолу, снимљених на апсорпционом максимуму потенцијалних деградационих производа кверцетина (295 nm). Промене апсорпционих спектра деградационог производа кверцетина означеног са QCDP1, са порастом времена UV-B озрачивања дате су на **Слици 35В**. Кинетика настанка QCDP1 ($t_{ret.} = 3,6 \text{ min}$) праћена преко пораста површине пика са порастом времена континуалног UV-B озрачивања је приказана на **Слици 35С**.



Слика 33 Бензофенон у метанолу. **(А)** Хроматограми неозраченог и UV-B озрачиваног раствора BZP-а у метанолу, снимљени на таласној дужини блиској максимуму апсорбације BZP-а ($\lambda_{det.} = 250$ nm). Ретенционо време ($t_{ret.}$) BZP-а је 12,8 min. **(Б)** Промене апсорпционих спектра BZP-а, добијених са претходно снимљених хроматограма, са порастом времена континуалног UV-B озрачивања ($t_{irr.}$). **(С)** Кинетика UV-B индукованог *bleaching*-а BZP-а, праћена преко смањења површине пика BZP-а ($t_{ret.} = 12,8$ min) на хроматограмима снимљеним на 250 nm, у функцији од времена UV-B озрачивања, $\ln P_{250\text{ nm}} = f(t_{irr.})$. Одговарајућа константа *bleaching*-а ($k_{degrad.BZP}$) и квадрат Pearson-овог коефицијента линеарне корелације (R^2) – коефицијент детерминације, су приказани на слици.



Слика 34 Кверцетин у метанолу. **(А)** Хроматограми неозраченог и UV-B озрачиваног раствора QC-а у метанолу, снимљени на таласној дужини максимума апсорбације Траке I ($\lambda_{det.} = 372$ nm). Ретенционо време QC-а је 5,0 min. **(Б)** Промене апсорпционих спектра QC-а, добијених са претходно снимљених хроматограма, са порастом времена континуалног UV-B зрачења ($t_{irr.}$). **(С)** Кинетика UV-B индукованог *bleaching*-а QC-а, праћена преко смањења површине пика QC-а ($t_{ret.} = 5,0$ min) на хроматограмима снимљеним на 372 nm, у функцији од времена UV-B озрачивања, $\ln P_{372\text{ nm}} = f(t_{irr.})$. Одговарајућа константа *bleaching*-а ($k_{degrad.QC}$) и коефицијент детерминације су приказани на слици.



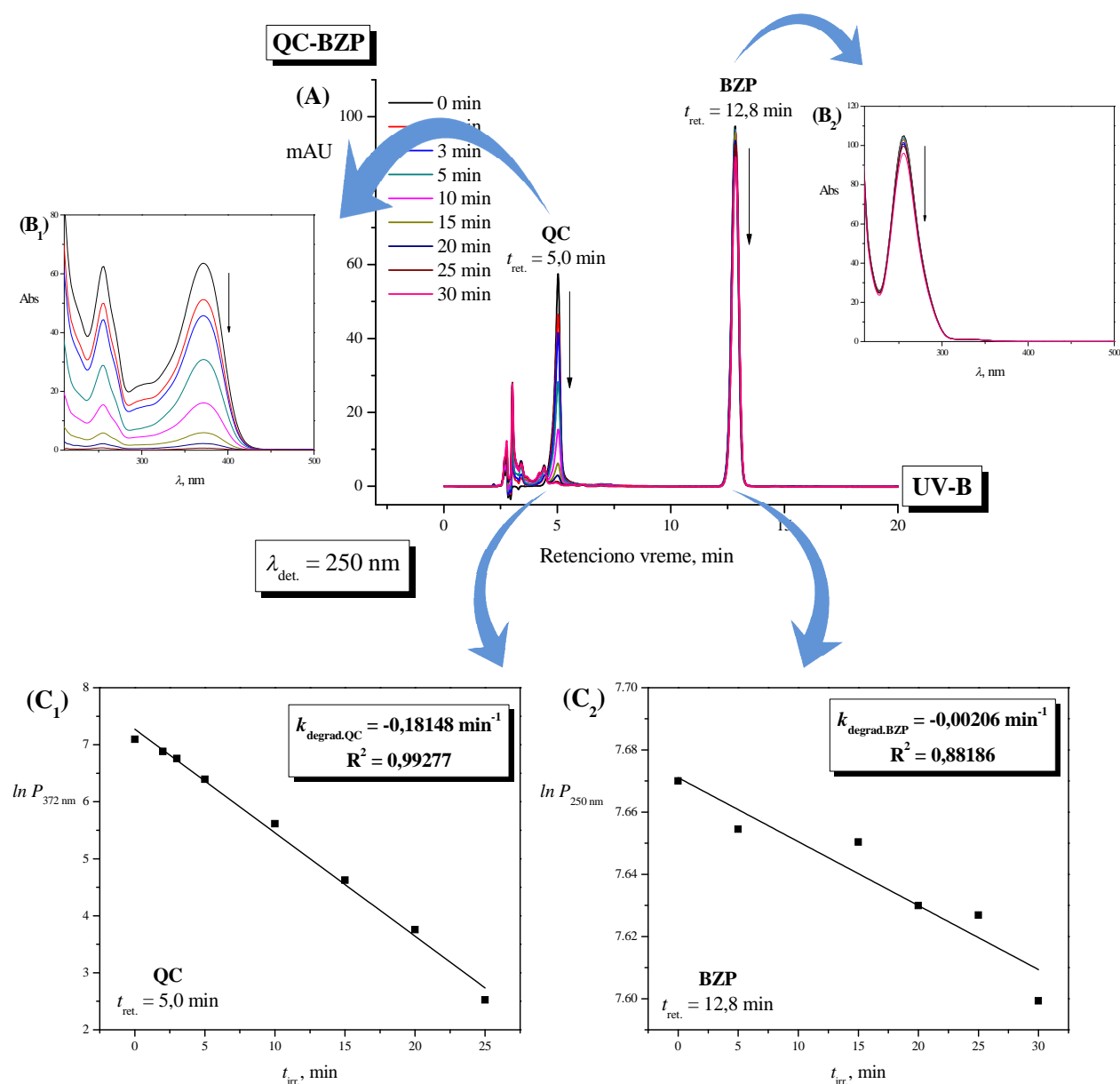
Слика 35 Кверцетин у метанолу. **(А)** Хроматограми неозраченог и UV-B озраченог раствора QC-а у метанолу, снимљени на таласној дужини максимума апсорбанције потенцијалних деградационих производа QC-а (295 nm). Ретенциона времена QC-а и наглађеног деградационог производа (QCDP1) су 5,0 min и 3,6 min, респективно. **(В)** Промене апсорпционих спектра QCDP1, добијених са претходно снимљених хроматограма, са порастом времена континуалног UV-B озрачивања ($t_{irr.}$). **(С)** Кинетика UV-B индукованог настанка QCDP1, праћена преко пораста површине пика истог ($t_{ret.} = 3,6 \text{ min}$) на хроматограмима снимљеним на 295 nm, у функцији од времена UV-B озрачивања, $\ln P_{295 \text{ nm}} = f(t_{irr.})$. Одговарајућа константа продукције ($k_{prod,QCDP1}$) и коефицијент детерминације су приказани на слици.

Хроматограми неозрачене и континуалном UV-B светлошћу озрачиване смеше кверцетина и бензофенона у метанолу (QC-BZP) снимљених на таласној дужини блиској максимуму апсорбације бензофенона (250 nm) су приказани на **Слици 36А**, док су одговарајуће промене апсорпционих спектра компонената смеше дате на **Слици 36В₁** (QC) и **36В₂** (BZP). Кинетика *bleaching*-а кверцетина је праћена преко смањења површине пика на 372 nm (**Сл. 36С₁**) а бензофенона на 250 nm (**Сл.36С₂**) са порастом времена UV-B озрачивања.

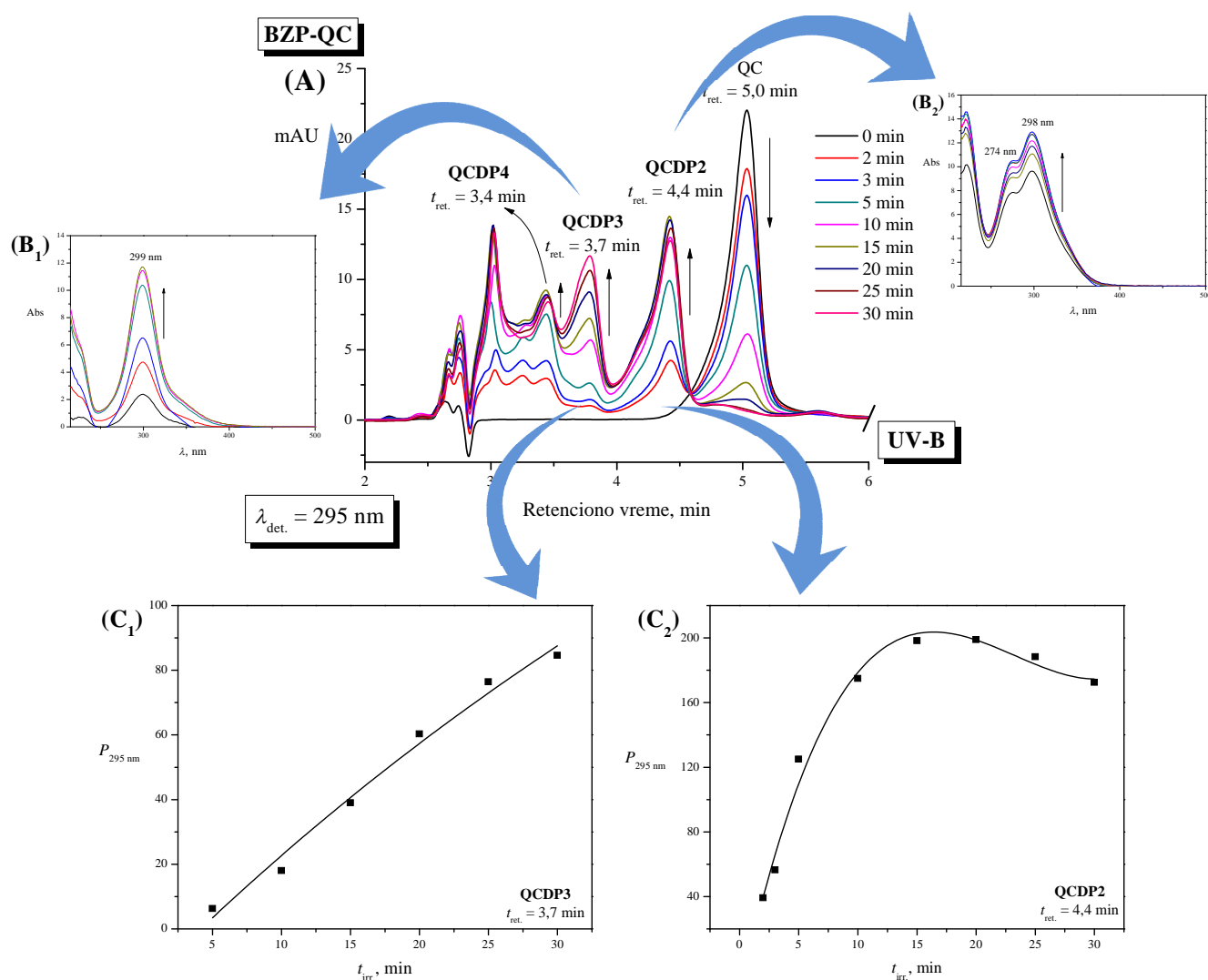
Слика 37 даје приказ смеше QC-BZP, снимљене на таласној дужини од 295 nm. Хроматограми неозрачене и UV-B озрачиване смеше су дати на **Слици 37А**. Промене апсорпционих спектра награђених производа су приказане на **Слици 37В₁** (за QC DP3) и **37В₂** (за QC DP2). Динамика настанка деградационих производа је приказана на **Слици 37С₁** (у случају QC DP3) и **37С₂** (за QC DP2).

Хроматограми неозрачене и UV-B-озрачиване смеше бензофенона и фосфолипида (BZP-PL90) у метанолу, снимљени на таласној дужини од 250 nm су приказани на **Слици 38А**. Промене апсорпционих спектра BZP-а, добијених са хроматограма снимљених на 250 nm, су приказани на **Слици 38В** док је кинетика деградације истог праћена са порастом времена континуалног UV-B озрачивања приказана на **Слици 38С**.

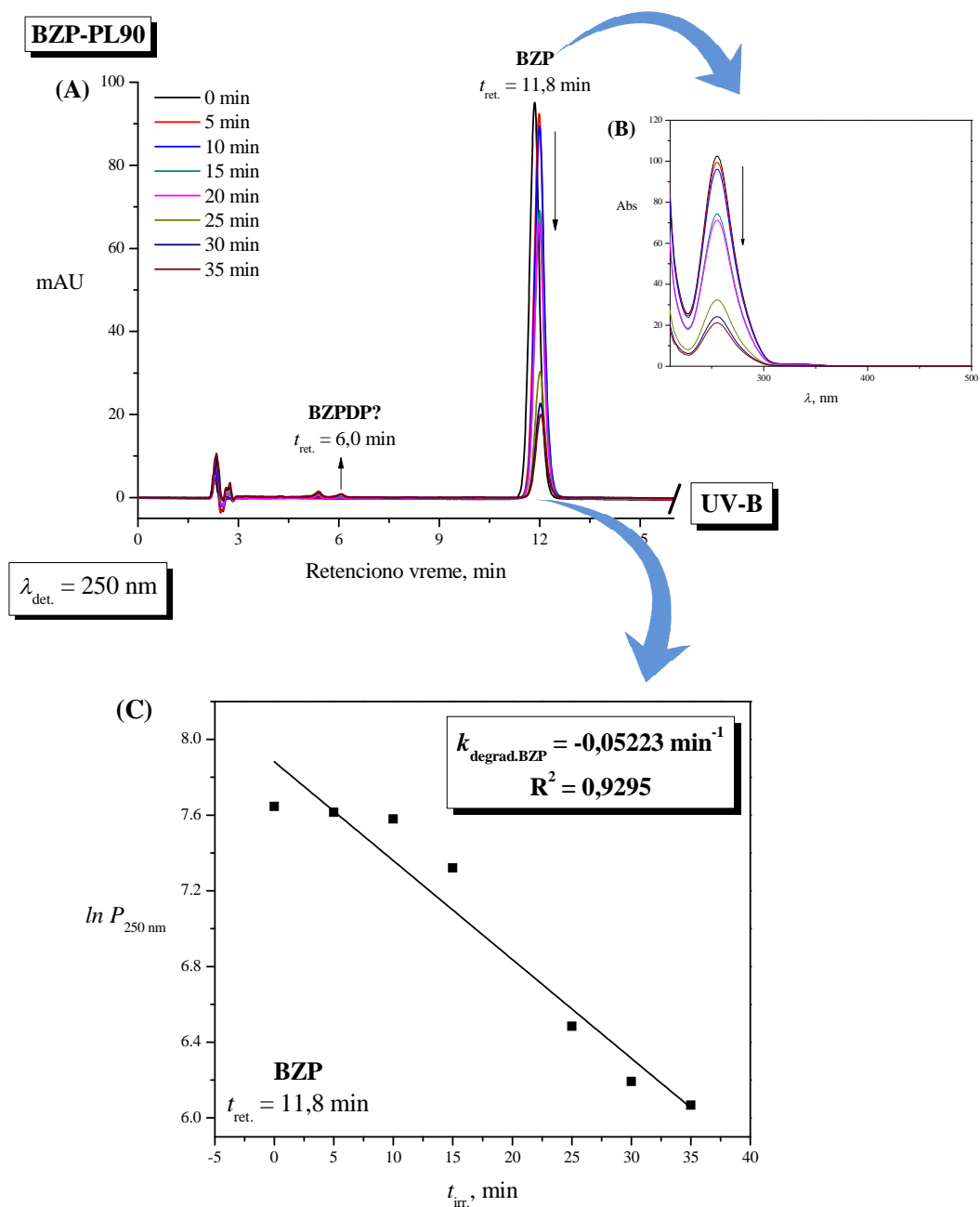
Изократским елуирањем смеше бензофенона и фосфолипида метанолом (као мобилном фазом) и праћењем исте на 234 nm, добијени су хроматограми неозрачене и UV-A озрачиване смеше у метанолу, приказани на **Слици 39А**. Део хроматограма у коме је примећен пораст пикова приписаних награђеним конјугованим диенским структурама је увећан у циљу што јаснијег приказа насталих промена и обележен са 1'. У поменутом делу је упоредно дат и део хроматограма добијен озрачивањем смеше фосфолипида у одсуству бензофенона и обележен са 2' указујући на енормну моћ коришћеног сензибилизатора да иницира процес липидне пероксидације. Одговарајуће промене апсорпционих спектра конјугованих диена обележених са Per1, Per2 и Per3 (поређаних према површини пикова у хроматограму, почев од највеће до најмање) и идентификованих на ретенционим временима од 5,5 min; 6,5 min и 4,5 min, респективно, су приказане на **Слици 39В₁-В₃**. Кинетика настанка конјугованих диена праћена преко повећања површине одговарајућих пикова као последица континуалног UV-A озрачивања је приказана на **Слици 39С₁-С₃**, респективно.



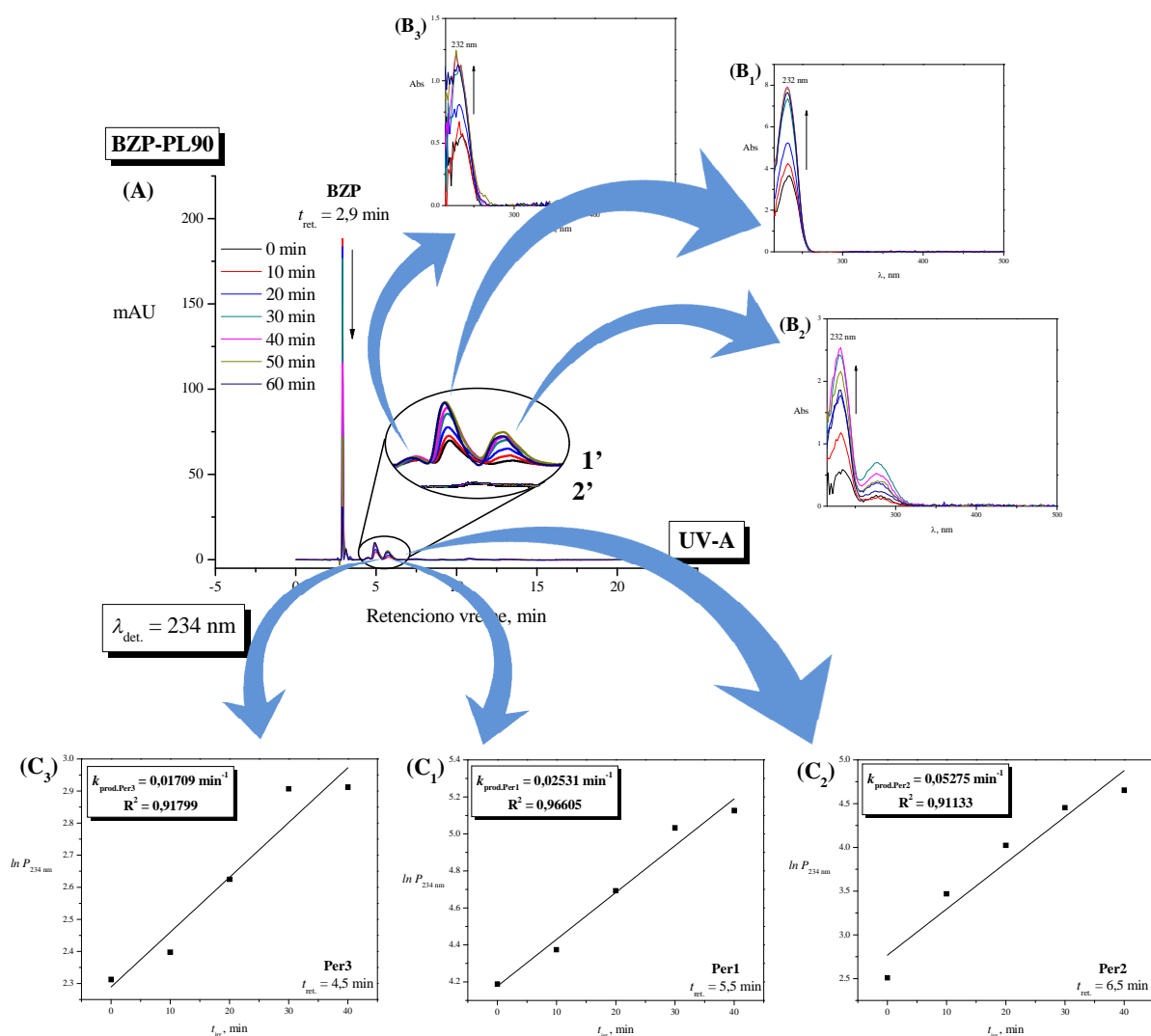
Слика 36 Смеша кверцетина и бензофенона (QC-BZP) у метанолу. **(А)** Хроматограми неозрачене и UV-B озрачене смеше QC-BZP, снимљени на таласној дужини блиској максимуму апсорбанције BZP-а ($\lambda_{det.} = 250$ nm). Ретенциона времена QC-а и BZP-а су 5,0 min и 12,8 min, респективно. **(В)** Промене апсорпционих спектра QC-а (**В₁**) и BZP-а (**В₂**), добијених са хроматограма UV-B озрачене смеше снимљених на 372 nm и 250 nm, респективно, са порастом времена континуалног UV-B озрачивања ($t_{irr.}$). **(С)** Кинетика UV-B индукованог *bleaching*-а QC-а (**С₁**) и BZP-а (**С₂**), праћена преко смањења површине пика QC-а ($t_{ret.} = 5,0$ min) и BZP-а ($t_{ret.} = 12,8$ min) на хроматограмима снимљеним на 372 nm и 250 nm, респективно у функцији од времена UV-B озрачивања – $\ln P_{372\text{ nm}} = f(t_{irr.})$ и $\ln P_{250\text{ nm}} = f(t_{irr.})$. Одговарајуће константе *bleaching*-а ($k_{degrad.QC}$ и $k_{degrad.BZP}$) и коефицијенти детерминације су приказани на слици.



Слика 37 Смеша кверцетина и бензофенона (QC-BZP) у метанолу. **(А)** Хроматограми неозрачене и UV-B озрачиване смеше QC-BZP, снимљени на 295 nm, приказани до 6. min, зарад што бољег уочавања насталих деградационих производа кверцетина (QCDP). Ретенциона времена QC-а и BZP-а су 5,0 min и 12,8 min; а деградационих производа кверцетина, QCDP3 и QCDP2, 3,7 min и 4,4 min, респективно. **(В)** Промене апсорпционих спектра QCDP2 (**B₂**) и QCDP3 (**B₁**), добијених са претходно снимљених хроматограма, са порастом времена континуалног UV-B озрачивања ($t_{irr.}$). **(С)** Динамика UV-B индуковане продукције QCDP3 (**C₁**) и QCDP2 (**C₂**), праћена преко промене површине пикова QCDP3 ($t_{ret.} = 3,7$ min) и QCDP2 ($t_{ret.} = 4,4$ min) на хроматограмима снимљеним на 295 nm у функцији од времена UV-B озрачивања.



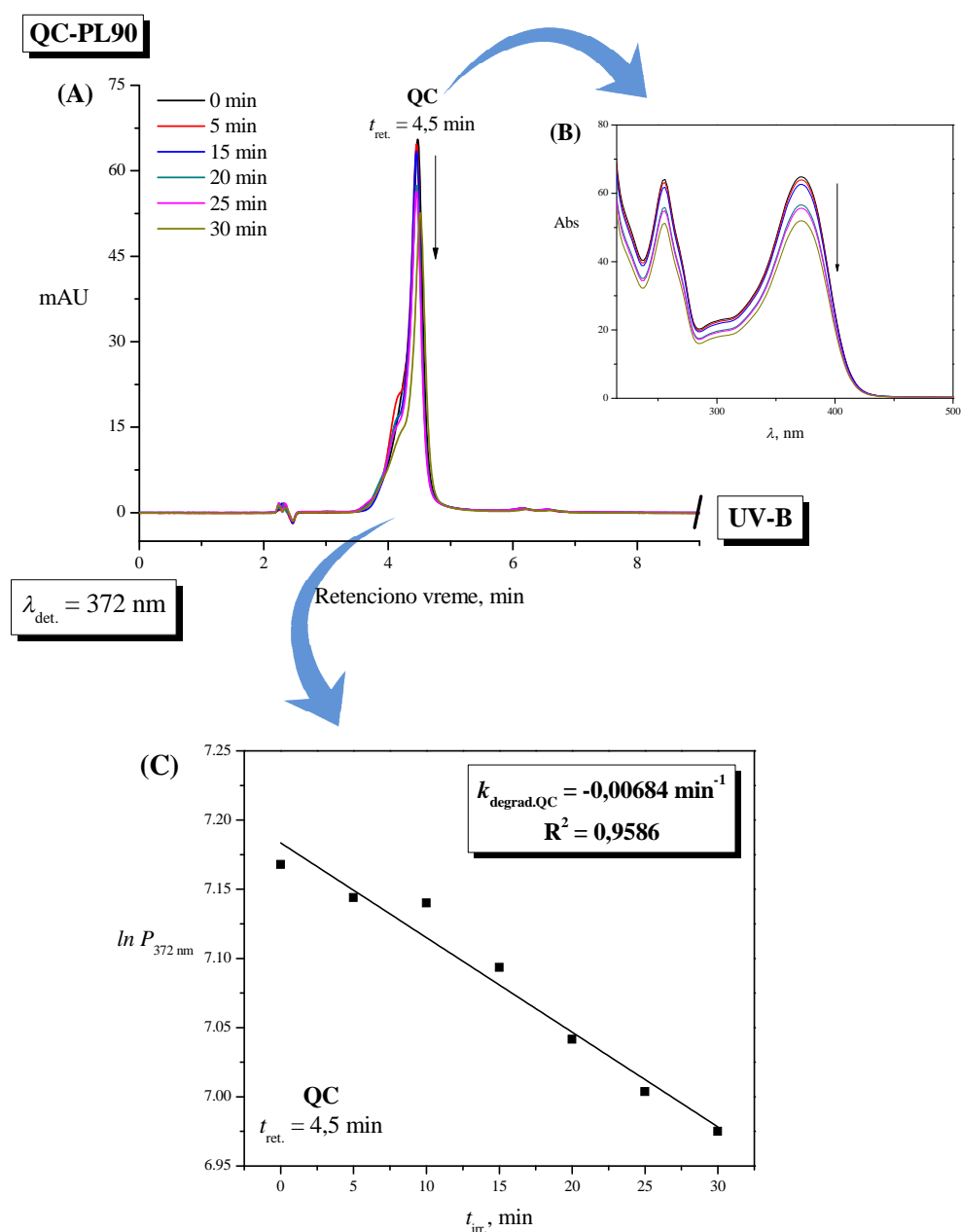
Слика 38 Смеша бензофенона и фосфолипида (PL90) у метанолу. **(А)** Хроматограми неозрачене и UV-B озрачиване смеше BZP-PL90 у метанолу, снимљени на таласној дужини блиској максимуму апсорбанције BZP-а ($\lambda_{det.} = 250$ nm), приказани до 16. min анализе. Ретенциона времена BZP-а и NL-а су 11,8 min и 26,8 min, респективно. **(Б)** Промене апсорпционих спектра BZP-а, добијених са претходно снимљених хроматограма, са порастом времена континуалног UV-B озрачивања ($t_{irr.}$). **(С)** Кинетика UV-B индукованог *bleaching*-а BZP-а, праћена преко смањења површине пика BZP-а ($t_{ret.} = 11,8$ min) на хроматограмима снимљеним на 250 nm, у функцији од времена UV-B озрачивања $-\ln P_{250\text{ nm}} = f(t_{irr.})$. Одговарајућа константа *bleaching*-а ($k_{degrad.BZP}$) и коефицијент детерминације су приказани на слици.



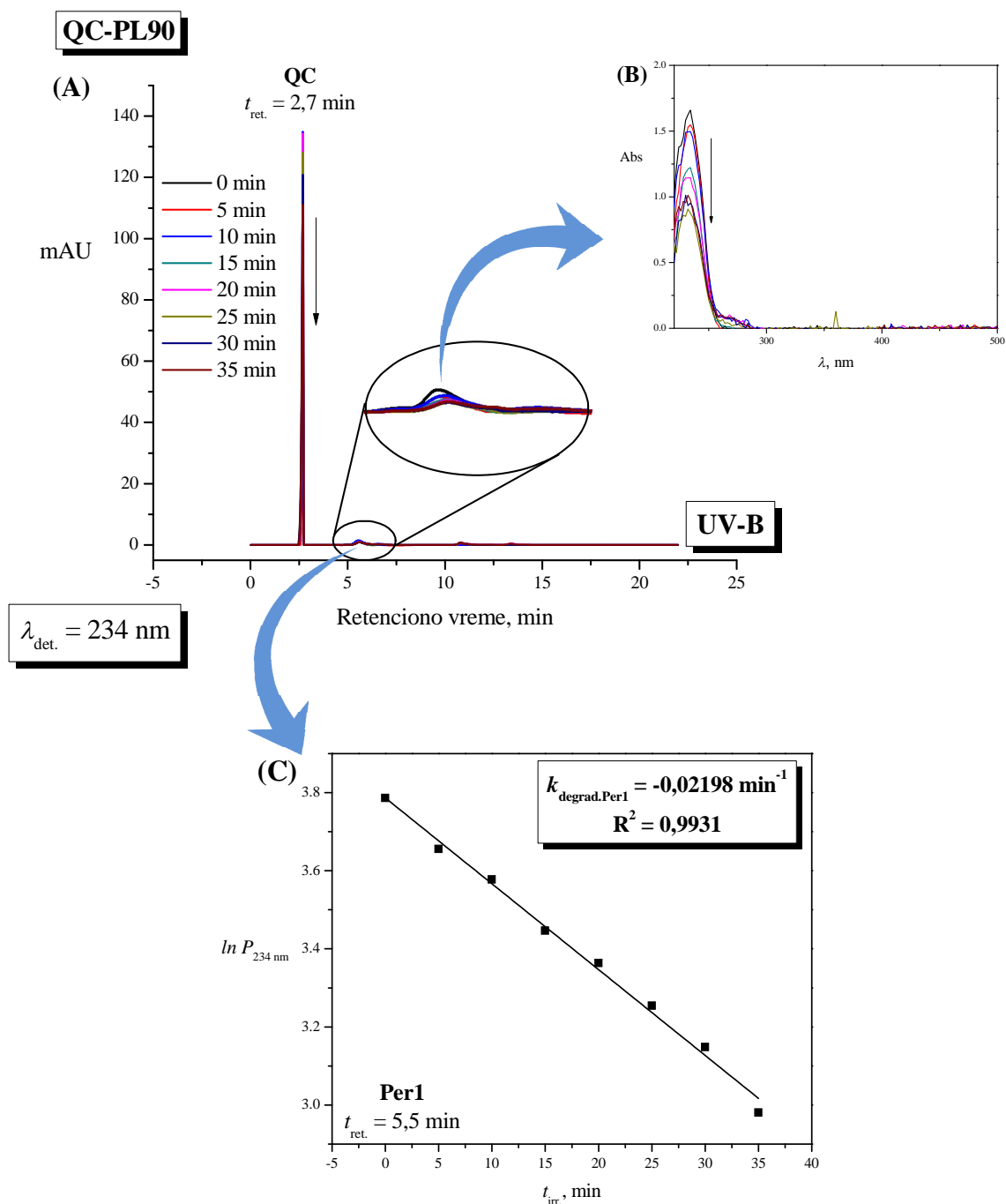
Слика 39 Смеша бензофенона и фосфолипида (PL90) у метанолу. **(А)** Хроматограми неозрачене и UV-A озрачиване смеше BZP-PL90 у метанолу, добијени изократским елуирањем (метанолом као мобилном фазом), снимљени на таласној дужини максимума апсорбације конјугованих диена ($\lambda_{det.} = 234 \text{ nm}$). Ретенциона времена BZP-а и конјугованих диенских структура обележених са Per1, Per2 и Per3 су 2,9 min; 5,5 min; 6,5 min и 4,5 min, респективно. **(Б)** Промене апсорпционих спектра Per1 (**B₁**), Per2 (**B₂**) и Per3 (**B₃**), добијених са претходно снимљених хроматограма, са порастом времена озрачивања ($t_{irr.}$). **(С)** Кинетика UV-A индуковане продукције Per1-3 (**C₁**-**C₃**) праћена преко повећања површине одговарајућих пикова на хроматограмима снимљеним на 234 nm у функцији од времена UV-A озрачивања – $\ln P_{234 \text{ nm}} = f(t_{irr.})$. Одговарајуће константе продукције Per1-3 ($k_{prod,Per1-3}$) и коефицијенти детерминације су приказани на слици.

На **Слици 40А** су приказани хроматограми (до 9. min анализе) неозрачене и UV-B озрачиване смеше кверцетина и фосфолипида у метанолу, снимљених на 372 nm. Промене апсорпционих спектра QC-а на ретенционом времену ($t_{ret.}$) од 4,5 min су приказане на **Слици 40В**, а кинетика његове деградације на **Слици 40С**, респективно.

Изократским елуирањем смеше кверцетина и фосфолипида метанолом и праћењем сигнала на 234 nm добијени су хроматограми неозрачене и UV-B озрачиване смеше у метанолу, приказани на **Слици 41А**. Део хроматограма у коме се очекује појава конјугованих диена је увећан у циљу што јаснијег приказа насталих промена. Промене апсорпционих спектра Per1 идентификованог на ретенционом времену од 5,5 min су приказане на **Слици 41В** док је кинетика његове деградације, праћена преко смањења пика током континуалног UV-B озрачивања приказана на **Слици 41С**.



Слика 40 Смеша кверцетина и фосфолипида (QC-PL90) у метанолу. (A) Хроматограми неозрачене и UV-B озрачиване смеше QC-PL90 у метанолу, снимљени на таласној дужини максимума апсорбанције Траке I QC-а ($\lambda_{det.} = 372 \text{ nm}$), приказани до 9. min анализе. Ретенциона времена QC-а и NL-а су 4,5 min и 20,6 min, респективно. (B) Промене апсорпционих спектра QC-а, добијених са претходно снимљених хроматограма, са порастом времена континуалног UV-B озрачивања ($t_{irr.}$). (C) Кинетика UV-B индукованог *bleaching*-а QC-а, праћена преко смањења површине пика QC-а ($t_{ret.} = 4,5 \text{ min}$) са хроматограма снимљених на 372 nm, у функцији од времена UV-B озрачивања, $\ln P_{372 \text{ nm}} = f(t_{irr.})$. Одговарајућа константа деградације ($k_{degrad.QC}$) и коефицијент детерминације су приказани на слици.

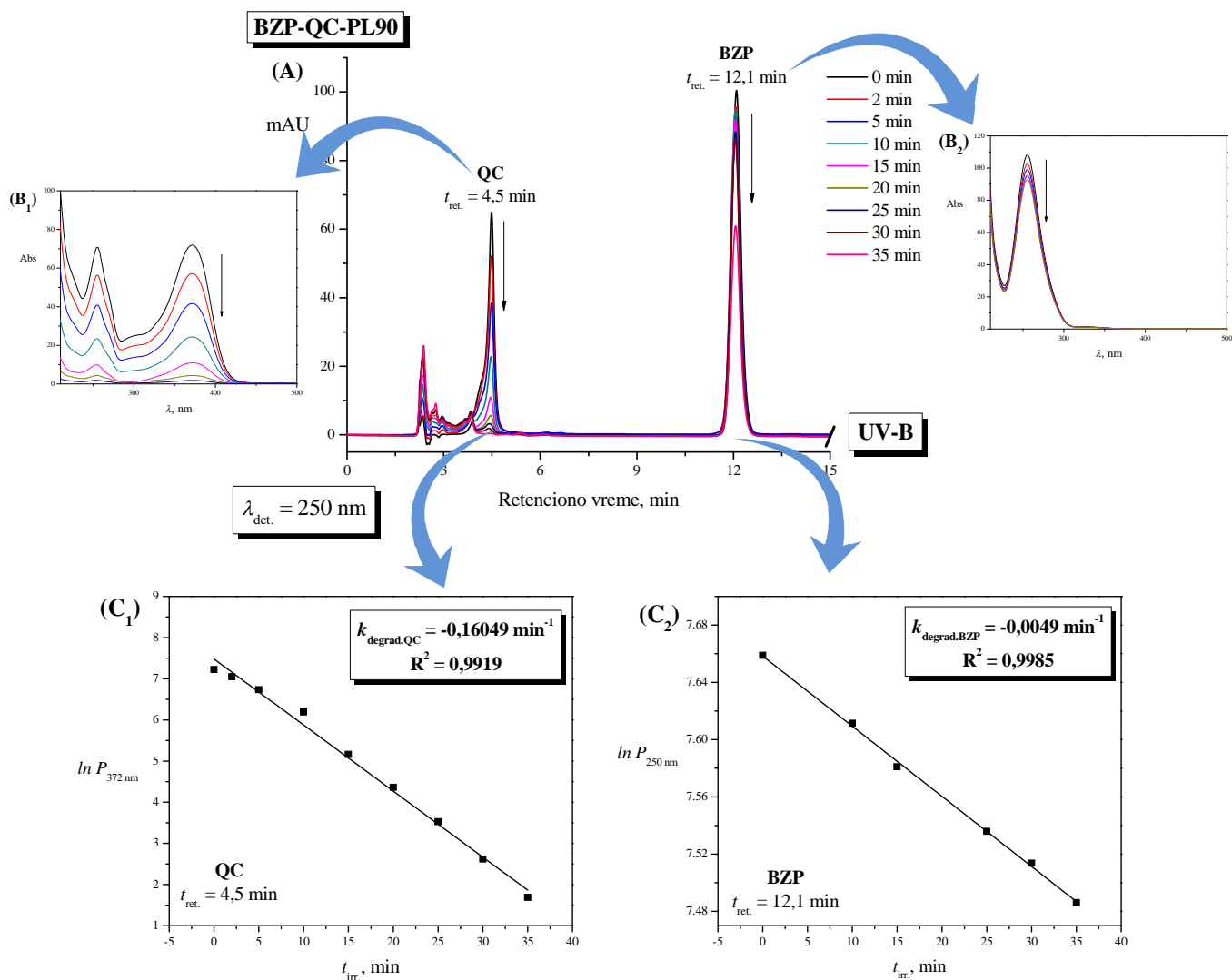


Слика 41 Смеша кверцетина и фосфолипида (QC-PL90) у метанолу. **(A)** Хроматограми неозрачене и UV-B озрачиване смеше QC-PL90 у метанолу, добијени изократским елуирањем метанолом, снимљени на таласној дужини максимума апсорбације конјугованих диена ($\lambda_{\text{det.}} = 234 \text{ nm}$). Ретенциона времена QC-а и конјугованог диена обележеног са Per1 су 2,7 min и 5,5 min, респективно. **(B)** Промене апсорпционих спектра Per1 **(B)**, добијених са претходно снимљених хроматограма, са порастом времена континуалног UV-B озрачивања ($t_{\text{irr.}}$). **(C)** Кинетика UV-B индукованог *bleaching*-а Per1 праћена преко смањења површине пика Per1 ($t_{\text{ret.}} = 5,5 \text{ min}$) са хроматограма снимљених на 234 nm у функцији од времена UV-B озрачивања, $\ln P_{234 \text{ nm}} = f(t_{\text{irr.}})$. Одговарајућа константа деградације ($k_{\text{degrad.Per1}}$) и коефицијент детерминације су приказани на слици.

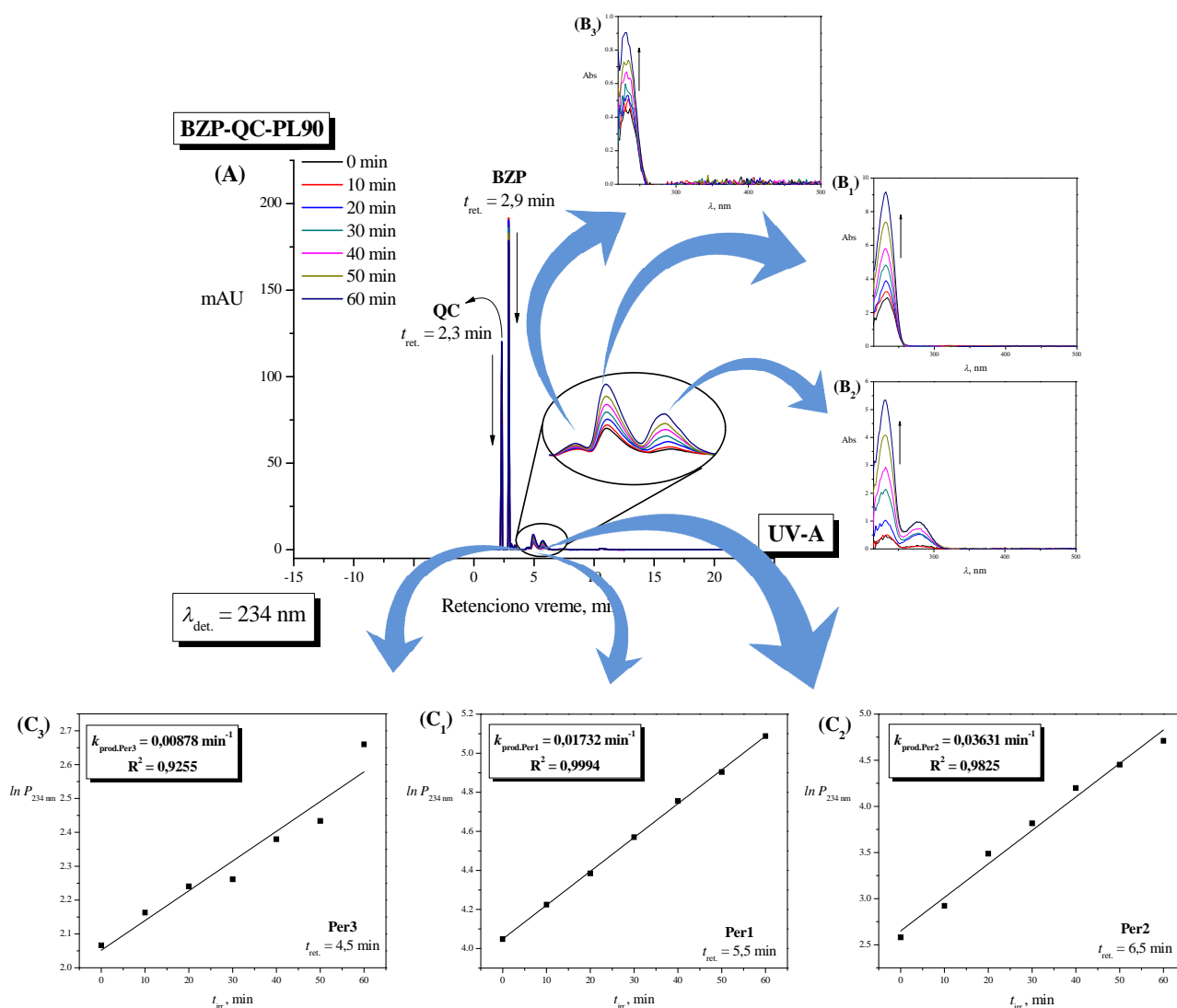
Хроматограми неозрачене и UV-B озрачиване смеше бензофенона, кверцетина и фосфолипида у метанолу (BZP-QC-PL90) су приказани на **Слици 42А**. Промене апсорпционих спектра QC-а (добијених са хроматограма снимљених на 372 nm) и BZP-а (са хроматограма снимљених на 250 nm) у смеши су приказане на **Слици 42В₁** и **В₂**. Кинетика њихове деградације, праћена преко смањења површине пика на 372 nm (у случају QC-а) и 250 nm (у случају BZP-а) са порастом времена континуалног UV-B озрачивања дата је на **Слици 42С₁** и **С₂**, респективно.

Изократским елуирањем смеше бензофенона, кверцетина и фосфолипида метанолом и праћењем истих на 234 nm добијени су хроматограми неозрачене и UV-A озрачиване смеше у метанолу приказани на **Слици 43А**. Увећан је део хроматограма у коме долази до појаве конјугованих диена. Одговарајуће промене апсорпционих спектра конјугованих диена Per1, Per2 и Per3, идентификованих на ретенционим временима од 5,5 min; 6,5 min и 4,5 min, приказане су на **Слици 43В₁-В₃**, респективно. Кинетика њиховог настанка, праћена преко повећања површине одговарајућих пикова као последица континуалног UV-A озрачивања је приказана на **Слици 43С₁-С₃**, респективно.

У **Табели 2** су дате константе брзине деградације (*bleaching-a*) бензофенона и кверцетина у метанолу и у смешама бензофенон/кверцетин, бензофенон/фосфолипиди, кверцетин/фосфолипиди и бензофенон/кверцетин/фосфолипиди у метанолу, добијене са хроматограма снимљених на одговарајућим таласним дужинама, са порастом времена континуалног UV озрачивања. Са друге стране, константе брзине продукције липидних пероксида добијене са хроматограма смеша кверцетин/фосфолипиди, бензофенон/фосфолипиди и бензофенон/кверцетин/фосфолипиди у метанолу, снимљени на таласној дужини од 234 nm су приказане у **Табели 3**.



Слика 42 Смеша бензофенона, кверцетина и фосфолипида (BZP-QC-PL90) у метанолу. **(A)** Хроматограми неозрачене и UV-B озрачиване смеше BZP-QC-PL90 у метанолу, снимљени на таласној дужини блиској максимуму апсорбације BZP-а ($\lambda_{det.}=250$ nm) приказани до 15. min анализе. Ретенциона времена QC-а, BZP-а и NL-а су 4,5 min; 12,1 min и 26,9 min, респективно. **(B)** Промене апсорпционих спектра QC-а (**B₁**) и BZP-а (**B₂**), добијених са хроматограма снимљених на 372 nm (QC) и 250 nm (BZP), са порастом времена континуалног UV-B озрачивања ($t_{irr.}$). **(C)** Кинетика UV-B индукованог *bleaching*-а QC-а (**C₁**) и BZP-а (**C₂**), праћена преко смањења површине пика QC-а ($t_{ret.} = 4,5$ min) и BZP-а ($t_{ret.} = 12,1$ min) на хроматограмима снимљеним на 372 nm и 250 nm у функцији од времена UV-B озрачивања – $\ln P_{372\text{ nm}} = f(t_{irr.})$ и $\ln P_{250\text{ nm}} = f(t_{irr.})$, респективно. Одговарајуће константе деградације ($k_{degrad.QC}$ и $k_{degrad.BZP}$) и коефицијенти детерминације су приказани на слици.



Слика 43 Смеша бензофенона, кверцетина и фосфолипида (BZP-QC-PL90) у метанолу. **(A)** Хроматограми неозрачене и UV-A озрачиване меше BZP-QC-PL90 у метанолу, елуирани под изократским условима, метанолом, снимљени на таласној дужини максимума апсорбанције конјугованих диена ($\lambda_{det} = 234 \text{ nm}$). Ретенциона времена QC-а, BZP-а и Per1-3 су 2,3 min; 2,9 min; 5,5 min; 6,5 min и 4,5 min, респективно. **(B)** Промене апсорпционих спектра Per1-3 (**B₁-B₃**), добијених са претходно снимљених хроматограма, са порастом времена континуалног UV-A озрачивања (t_{irr}). **(C)** Кинетика UV-A индуковане продукције Per1-3 (**C₁-C₃**), праћена преко пораста површине одговарајућих пикова Per1-3 на хроматограмима снимљеним на 234 nm у функцији од времена UV-A озрачивања, $\ln P_{234 \text{ nm}} = f(t_{irr})$. Одговарајуће константе продукције Per1-3 ($k_{prod, Per1-3}$) и коефицијенти детерминације су приказани на слици.

Табела 2 Константе брзине деградације (*bleaching-a*) бензофенона и кверцетина ($k_{\text{degrad.}}$, min^{-1}) добијене као нагиб (праволинијске) зависности \ln -ованих вредности површина пикова на хроматограмима бензофенона (BZP), кверцетина (QC) и смеша бензофенон/кверцетин (BZP-QC), бензофенон/фосфолипиди (BZP-PL90), кверцетин/фосфолипиди (QC-PL90) и бензофенон/кверцетин/фосфолипиди (BZP-QC-PL90) у метанолу, снимљеним на 372 nm (QC) и 250 nm (BZP) у функцији од времена континуалног UV озрачивања – $\ln P_{372/250 \text{ nm}} = f(t_{\text{irr.}})$. Зависност прати кинетику првог реда⁴⁷.

	$k_{\text{degrad.}}, \text{min}^{-1}$			
	BZP		QC	
	$t_{\text{ret.}} = 12,8 \text{ min}$		$t_{\text{ret.}} = 5,0 \text{ min}$	
	UV-A	UV-B	UV-A	UV-B
BZP	-0,03350	-0,08920	x	x
QC	x	x	-0,00138	-0,00790
BZP-QC	-0,00067	-0,00206	-0,09341	-0,18148
BZP-PL90	-0,02602	-0,05223	x	x
QC-PL90	x	x	-0,00113	-0,00684
BZP-QC-PL90	-0,00105	-0,00490	-0,08466	-0,16049

x – компонента није присутна у смеси

Табела 3 Константе брзине стварања пероксида (min^{-1}) – продуката UV-индуковане фотосензибилизације липидне пероксидације, добијене као нагиб (праволинијске) зависности \ln -ованих вредности површина пикова на хроматограмима смеша кверцетин/фосфолипиди (QC-PL90), бензофенон/фосфолипиди (BZP-PL90) и бензофенон/кверцетин/фосфолипиди (BZP-QC-PL90) у метанолу, снимљеним на 234 nm, у функцији од времена континуалног UV озрачивања – $\ln P_{234 \text{ nm}} = f(t_{\text{irr.}})$. Зависност прати кинетику првог реда.

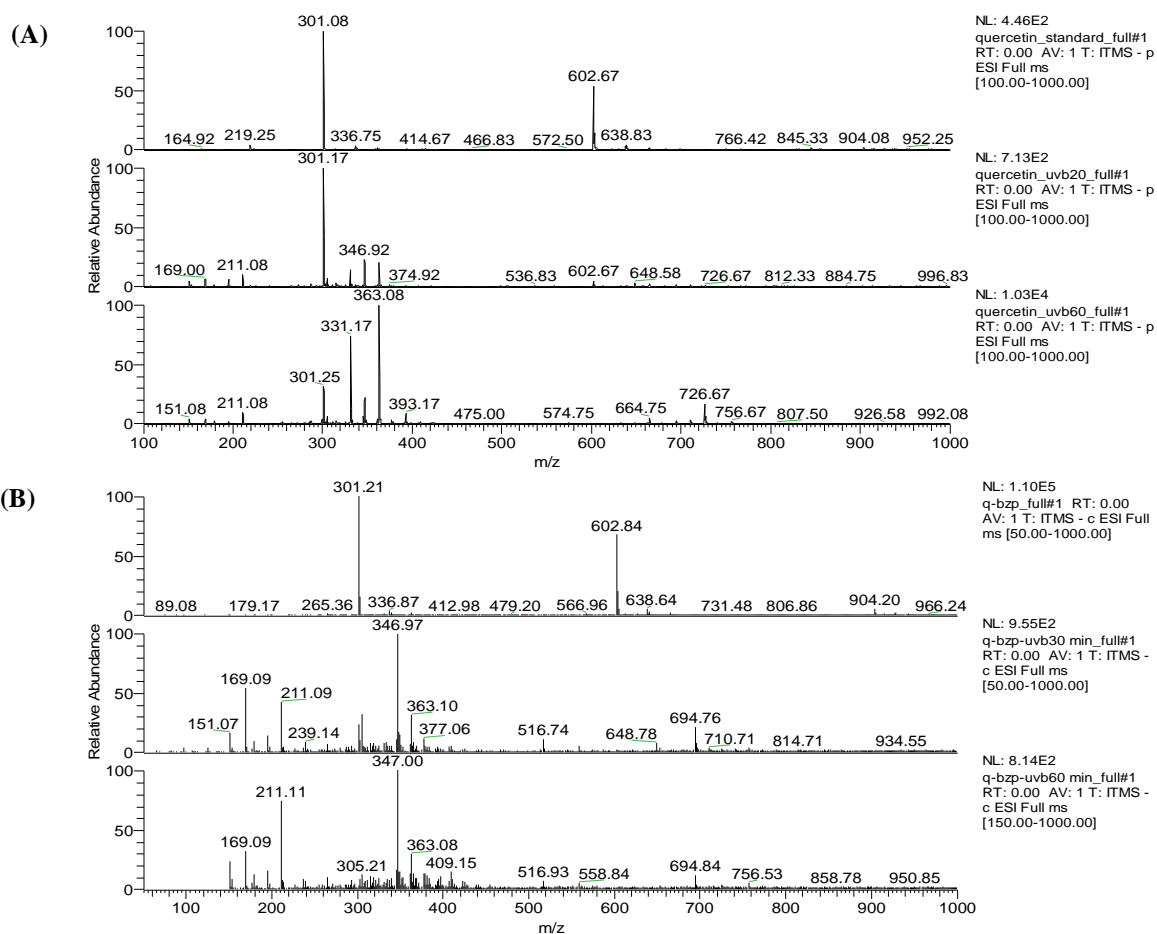
	$k_{\text{prod.}}, \text{min}^{-1}$					
	Per1		Per2		Per3	
	$t_{\text{ret.}} = 4,9 \text{ min}$		$t_{\text{ret.}} = 5,9 \text{ min}$		$t_{\text{ret.}} = 4,5 \text{ min}$	
	UV-A	UV-B	UV-A	UV-B	UV-A	UV-B
QC-PL90	/	-0,02198	/	-0,01830	-0,00435	x
BZP-PL90	0,02531	0,03526	0,05275	0,06682	0,01709	0,02436
QC-BZP-PL90	0,01732	0,02378	0,03631	0,05199	0,00878	0,01505

x- компонента није присутна у смеси; / – промена површине пика са порастом времена озрачивања је динамична

⁴⁷ Континуалним озрачивањем BZP-а је уочено да се исти деградира најпре спорије а онда знатно брже, у оба случаја по кинетици првог реда. У циљу лакше интерпретације резултата, за фитовање података је коришћен модел реакције првог реда – линеарно фитовање.

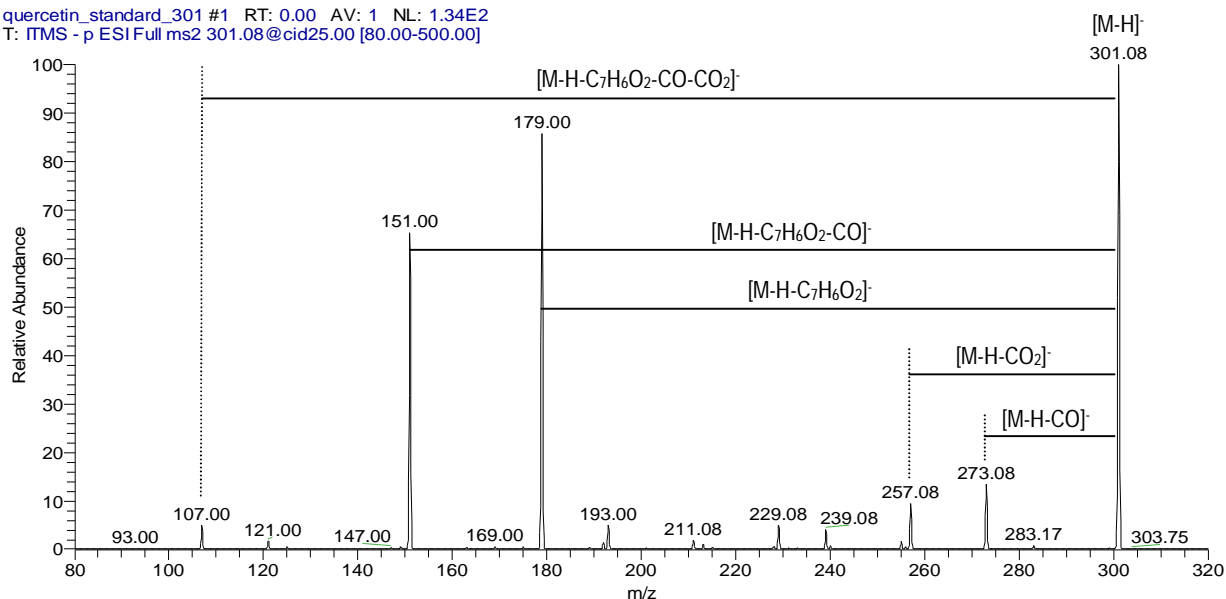
5.1.2 FI-ESI-MS анализа смеше BZP-QC

Директно инјектирање неозраченог, UV-B 20 min и UV-B 60 min озрачиваног раствора кверцетина у метанолу као и неозрачене, UV-B 30 min и UV-B 60 min озрачиване смеше кверцетина и бензофенона у метанолу у ESI извор је имало за циљ идентификацију фотодеградационих производа кверцетина. ESI-MS спектри поменутих узорака снимљени у *full scan*-у су приказани на **Слици 44А и В**, респективно, док су MS² спектар кверцетина у метанолу; MS² (**А**) и MS³ (**В**) спектри деградационог производа кверцетина на m/z 363 и MS² спектар производа на m/z 347, редом приказани на **Сликама 45-47**.

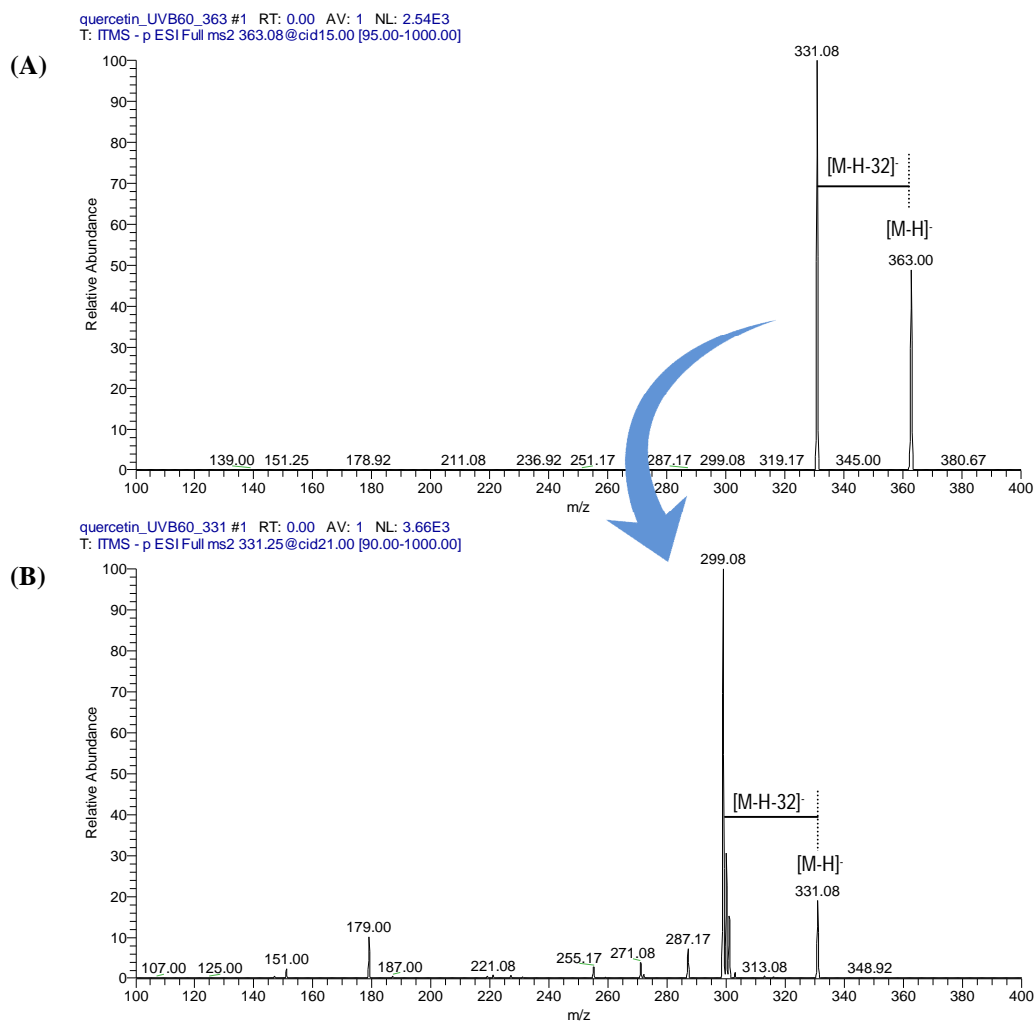


Слика 44 Упоредни приказ full scan ESI-MS спектра (редом: одозго-наниже) неозраченог, UV-B 20 min и UV-B 60 min озрачиваног кверцетина у метанолу (A) и неозрачене, UV-B 30 min и UV-B 60 min озрачиване смеше кверцетина и бензофенона у метанолу (B) снимљених у негативном јонизационом модалитету, у опсегу m/z од 150-1000.

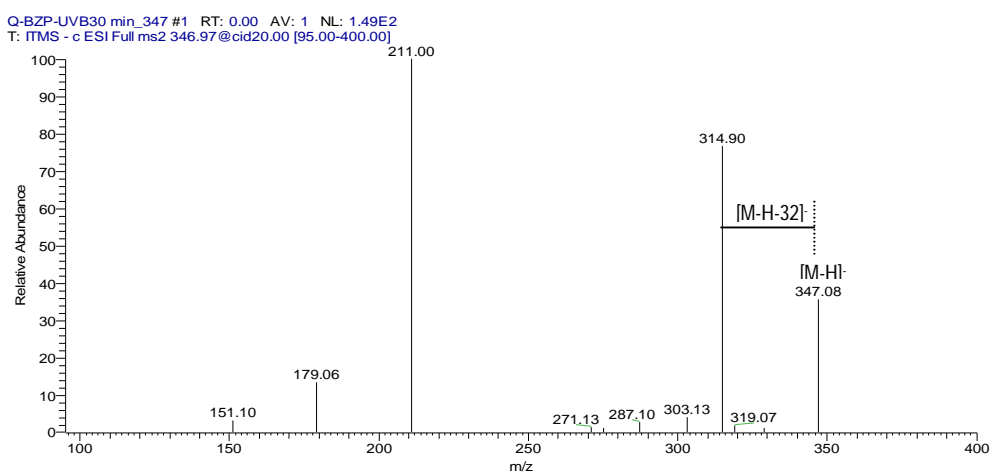
quercetin_standard_301 #1 RT: 0.00 AV: 1 NL: 1.34E2
 T: ITMS - p ESI Full ms2 301.08@cid25.00 [80.00-500.00]



Слика 45 MS/MS спектар кверцетина у метанолу снимљен у негативном јонизационом модалитету, у опсегу m/z од 80-500, добијен фрагментацијом матичног јона на m/z 301 колизионом (CID) енергијом од 25 eV.



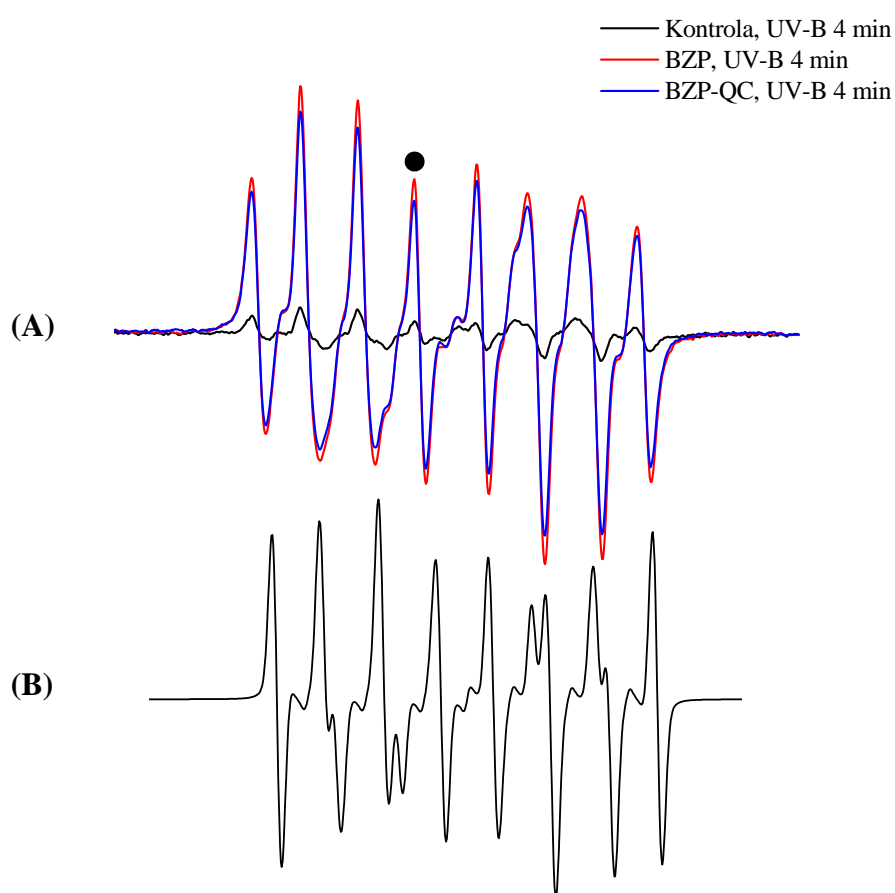
Слика 46 (A) MS^2 и (B) MS^3 спектар деградационог производа кверцетина у метанолу на m/z 363, насталог након 60 min UV-B озрачивања кверцетина, снимљен у негативном јонизационом модалитету, у опсегу m/z од 95-1000 (одн. m/z од 90-1000), добијен фрагментацијом матичног јона на m/z 363 (одн. m/z 331) колизионом (CID) енергијом од 15 eV (одн. 21 eV), респективно.



Слика 47 MS^2 спектар деградационог производа кверцетина у метанолу на m/z 347, насталог након 30 min UV-B озрачивања смеше кверцетина и бензофенона, снимљен у негативном јонизационом модалитету, у опсегу m/z од 95-400, добијен фрагментацијом матичног јона на m/z 347 колизионом (CID) енергијом од 20 eV.

5.1.3 EPR *spin trapping* анализа смеше BZP-QC

Имајући у виду чињеницу да је бензофенон изузетан генератор слободних радикала и да је типичан Тип I фотосензибилизатор, присуство супероксида у раствору бензофенона у метанолу и у смеси бензофенона и кверцетина у метанолу као последица UV-B озрачивања у трајању од 4 min је доказано EPR спектрима адукта DERMPPO/OOH датим на **Слици 48A** заједно са симулационим спектром истог – **Сл. 48B**.



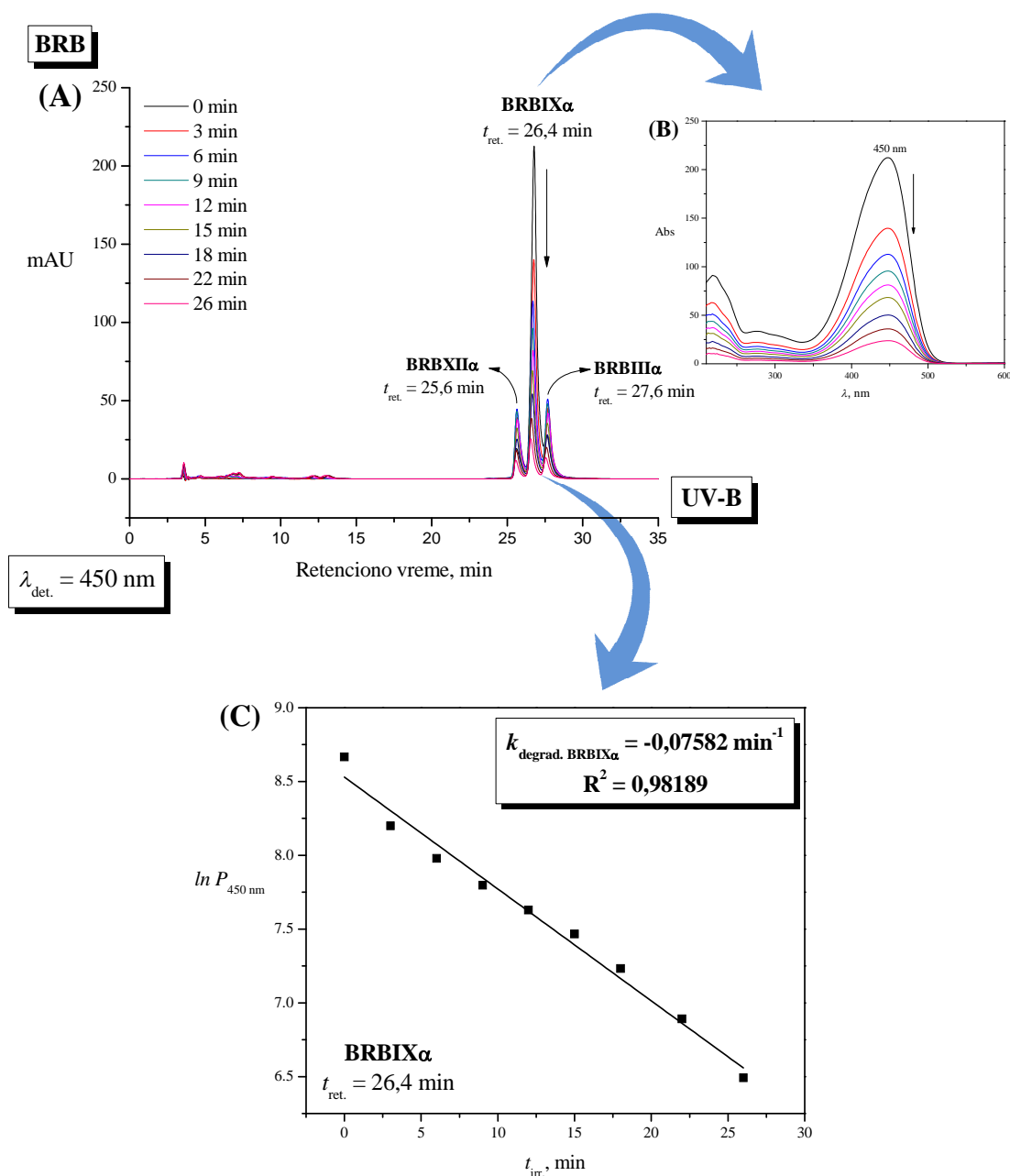
Слика 48 EPR спектри DERMPPO/OOH адукта генерисаног континуалним UV-B озрачивањем бензофенона (BZP) и смеше бензофенона и кверцетина (BZP-QC) у метанолу током 4 min (A). Црним кружићем је обележен карактеристичан пик адукта. (B) Симулациони спектар DERMPPO/OOH адукта.

5.2 UV индуковане промене смеше BRB-QC-PL90

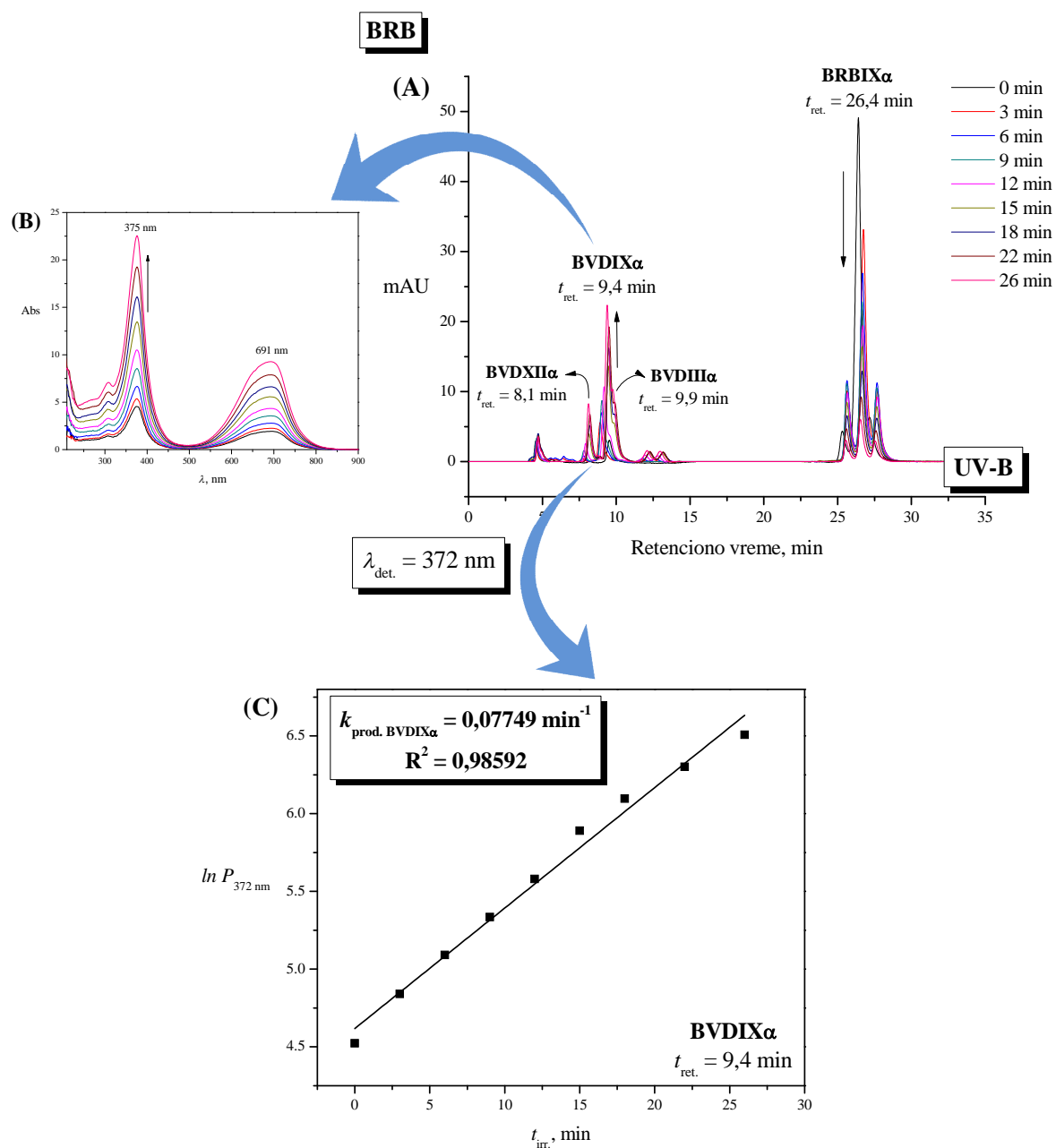
5.2.1 RP-HPLC анализа смеше BRB-QC-PL90

На **Сликама 49А** и **50А** су приказани хроматограми неозраченог и UV-B озрачиваног билирубина у метанолу, снимљени на таласним дужинама блиским максимумима апсорбације BRBIX α (450 nm) и BVDIX α (372 nm), респективно. Промене апсорпционих спектра истих, добијених са претходно снимљених хроматограма су приказане на **Сликама 49В** и **50В**, док је кинетика деградације BRBIX α одн. настанка BVDIX α праћена преко смањења површине пика BRBIX α одн. повећања површине пика BVDIX α на хроматограмима снимљеним на 450 nm одн. 372 nm у функцији од времена континуалног UV-B озрачивања приказана на **Сликама 49С** и **50С**, респективно.

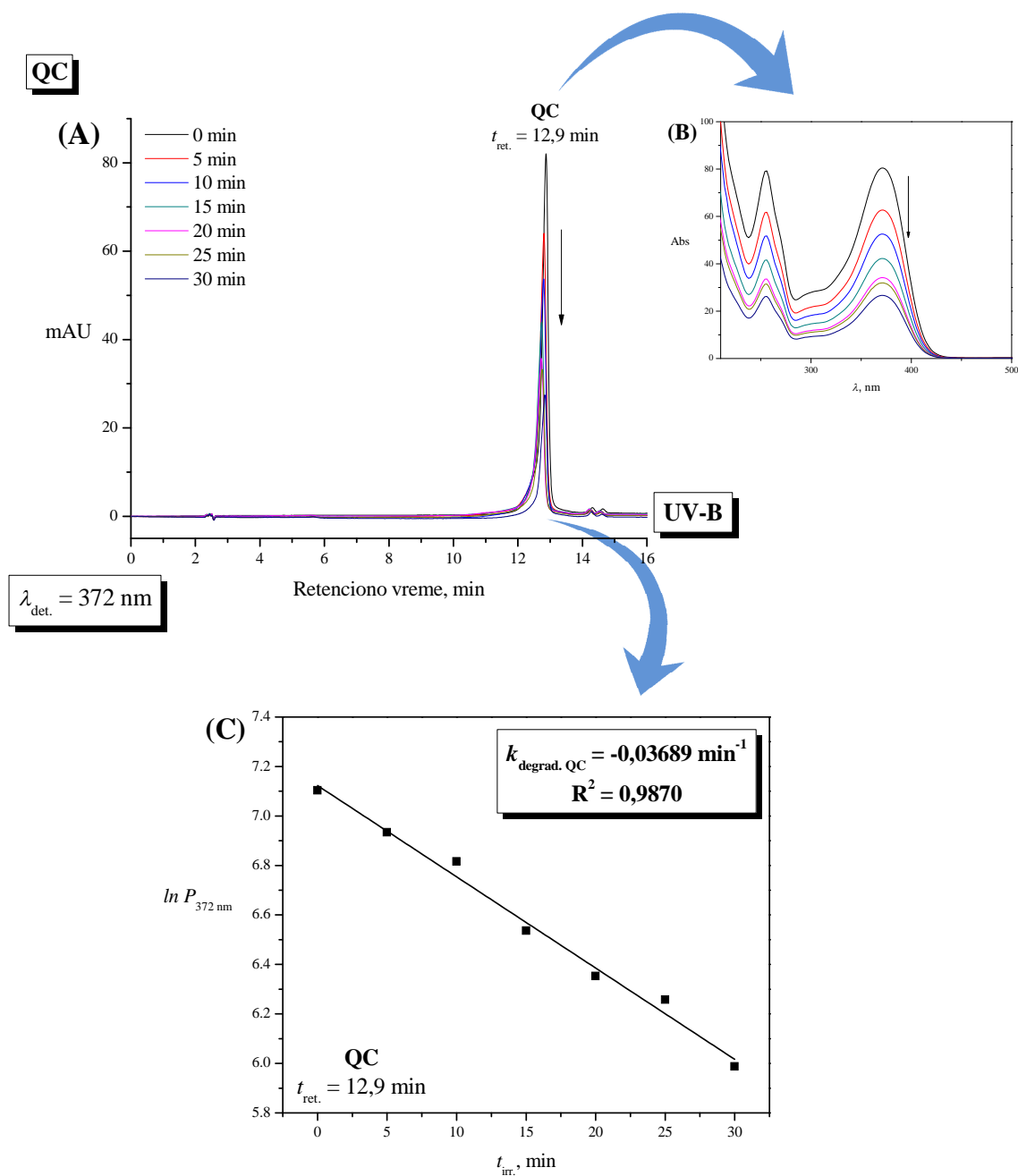
Хроматограми неозраченог и UV-B озрачиваног кверцетина (из смеше BRB-QC-PL90) снимљених на 372 nm и 295 nm су приказани на **Сликама 51А** и **52А**. Промене апсорпционих спектра QC-а и насталог деградационог производа, QCDP1 добијених са претходно снимљених хроматограма су дате на **Сликама 51В** и **52В**. На **Сликама 51С** и **52С** су приказане кинетика деградације QC-а и кинетика настанка QCDP1 праћењем смањења површине пика (у случају QC-а) одн. повећања површине пика (у случају QCDP1) у зависности од времена континуалног UV-B озрачивања, респективно.



Слика 49 Билирубин (BRB) у метанолу. **(А)** Хроматограми неозраченог и UV-B озрачиваног раствора BRB-а у метанолу, снимљени на таласној дужини максимума апсорбанције BRB-а ($\lambda_{\text{det.}} = 450 \text{ nm}$). Ретенционо време ($t_{\text{ret.}}$) изомера BRBIX α је 26,4 min. **(В)** Промене апсорпционих спектра BRBIX α , добијених са претходно снимљених хроматограма, са порастом времена континуалног UV-B озрачивања ($t_{\text{irr.}}$). **(С)** Кинетика UV-B индукованог *bleaching*-а BRBIX α , праћена преко смањења површине пика BRBIX α ($t_{\text{ret.}} = 26,4 \text{ min}$) на хроматограмима снимљеним на 450 nm, у функцији од времена UV-B озрачивања, $\ln P_{450 \text{ nm}} = f(t_{\text{irr.}})$. Одговарајућа константа *bleaching*-а BRBIX α ($k_{\text{degrad. BRBIX}\alpha}$) и коефицијент детерминације су приказани на слици.

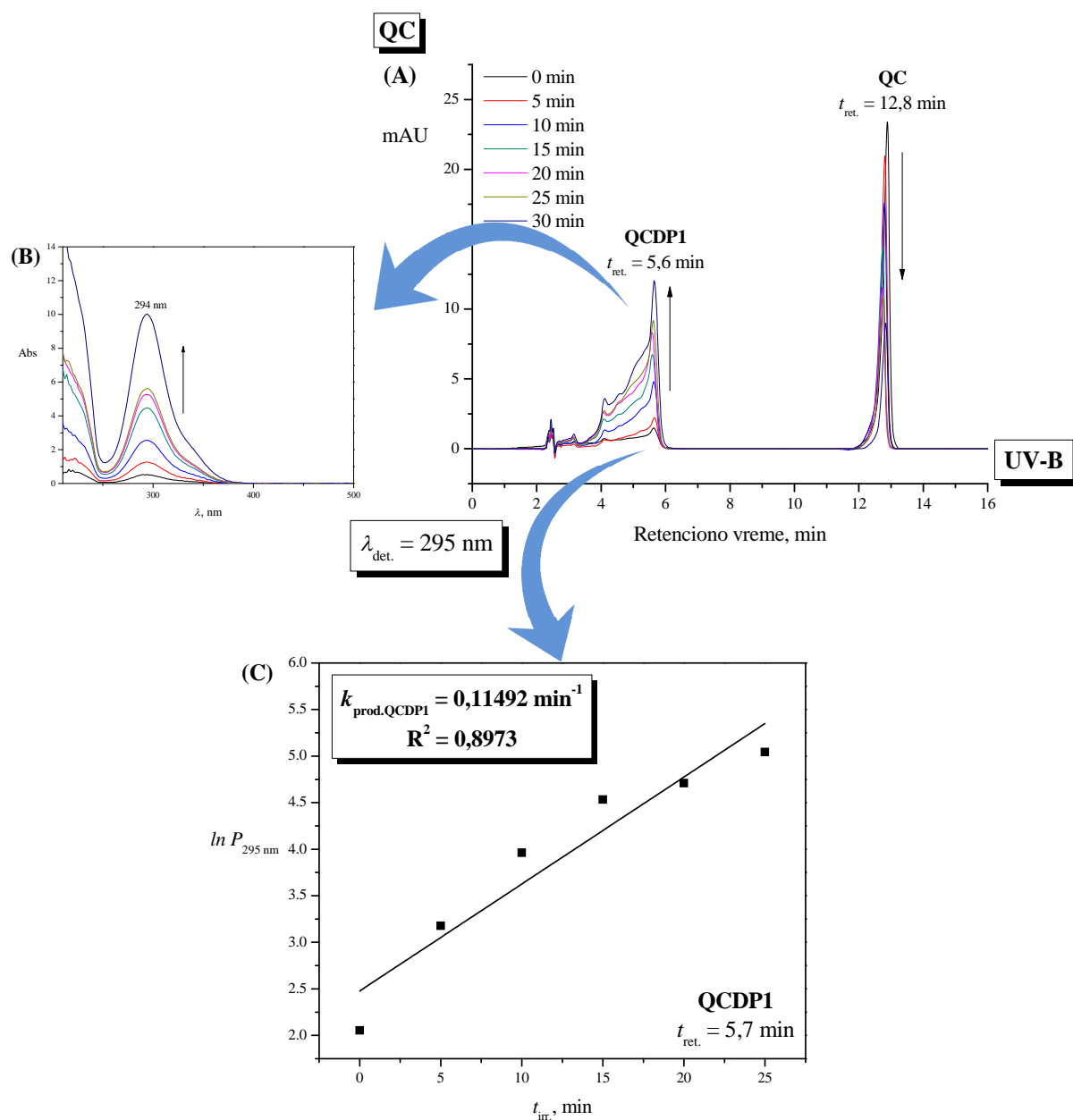


Слика 50 Билирубин (BRB) у метанолу. **(А)** Хроматограми неозраченог и UV-B озрачиваног раствора BRB-а у метанолу, снимљени на таласној дужини блиској максимуму апсорбације BVD-а ($\lambda_{det.} = 372$ nm). Ретенционо време ($t_{ret.}$) изомера BVDIX α је 9,4 min. **(В)** Промене апсорпционих спектра BVDIX α , добијених са претходно снимљених хроматограма, са порастом времена континуалног UV-B озрачивања ($t_{irr.}$). **(С)** Кинетика UV-B индукованог настанка BVDIX α , праћена преко пораста површине пика BVDIX α ($t_{ret.} = 9,4$ min) на хроматограмима снимљеним на 372 nm, у функцији од времена UV-B озрачивања, $\ln P_{372\text{ nm}} = f(t_{irr.})$. Одговарајућа константа продукције BVDIX α ($k_{prod. BVDIX\alpha}$) и коефицијент детерминације су приказани на слици.



Слика 51 Кверцетин (QC) под условима у смеси BRB-QC-PL90⁴⁸ у метанолу. **(A)** Хроматограми неозраченог и UV-B озраченог раствора QC-а снимљени на таласној дужини максимума апсорбације Траке I ($\lambda_{\text{det.}} = 372 \text{ nm}$). Ретенционо време ($t_{\text{ret.}}$) QC-а је 12,9 min. **(B)** Промене апсорпционих спектра QC-а, добијених са претходно снимљених хроматограма, са порастом времена континуалног UV-B озрачивања ($t_{\text{irr.}}$). **(C)** Кинетика UV-B индукованог *bleaching*-а QC-а, праћена преко смањења површине пика QC-а ($t_{\text{ret.}} = 12,9 \text{ min}$) на хроматограмима снимљеним на 372 nm, у функцији од времена озрачивања, $\ln P_{372 \text{ nm}} = f(t_{\text{irr.}})$. Одговарајућа константа *bleaching*-а ($k_{\text{degrad. QC}}$) и коефицијент детерминације су приказани на слици.

⁴⁸ Кверцетин (QC) у метанолу уз додавак *blank* раствора BRB-а у количини BRB-а присутног у смеси BRB-QC-PL90.

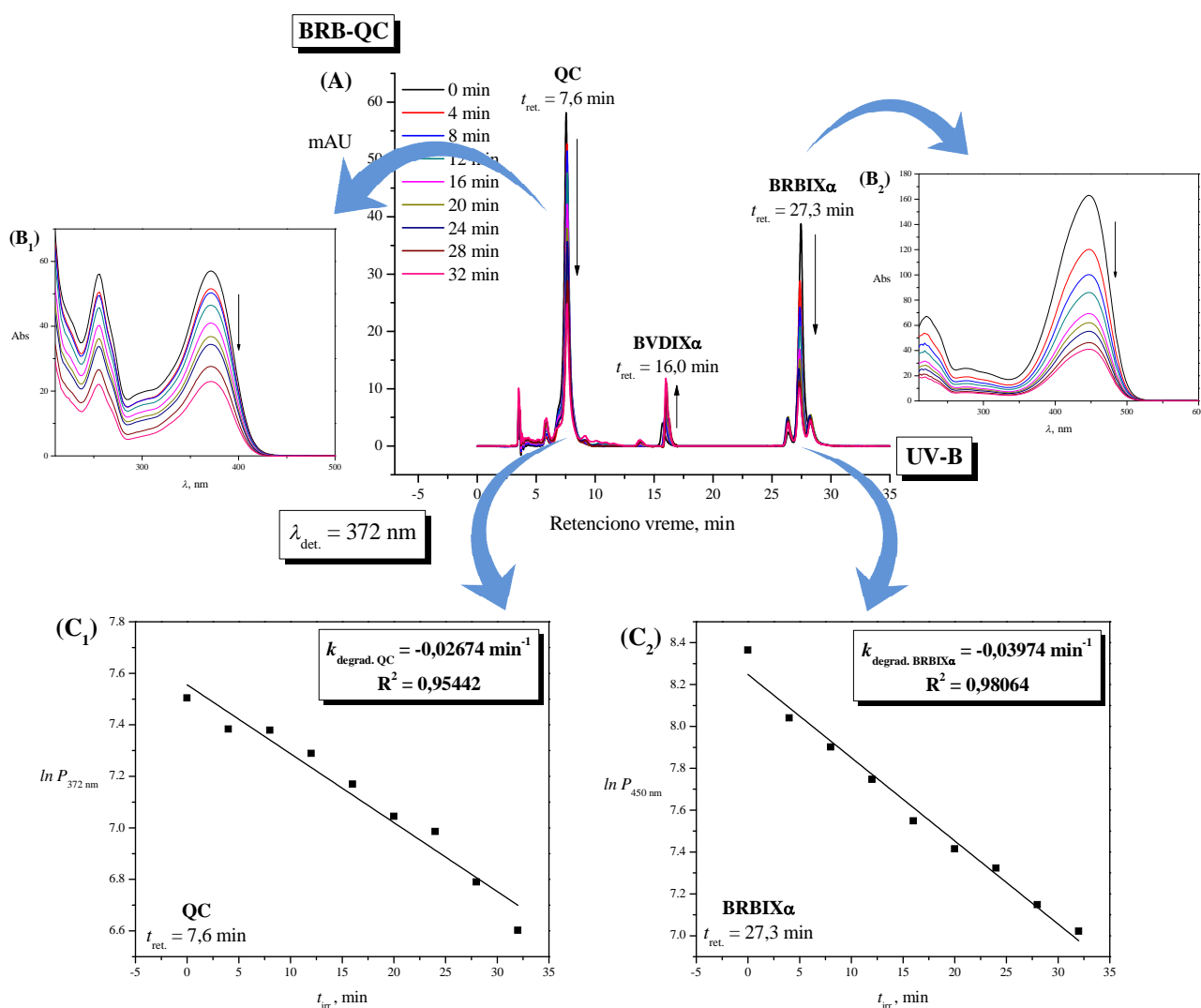


Слика 52 Кверцетин (QC) под условима у смеши BRB-QC-PL90. **(A)** Хроматограми неозраченог и UV-B озрачиваног раствора QC-а снимљени на таласној дужини максимума апсорбације потенцијалних деградационих производа QC-а ($\lambda_{det.} = 295$ nm). Ретенционо време ($t_{ret.}$) QCDP1 је 5,7 min. **(B)** Промене апсорпционих спектра QCDP1, добијених са претходно снимљених хроматограма, са порастом времена континуалног UV-B озрачивања ($t_{irr.}$). **(C)** Кинетика UV-B индукованог настанка QCDP1, праћена преко пораста површине пика QCDP1 ($t_{ret.} = 5,7$ min) на хроматограмима снимљеним на 295 nm, у функцији од времена UV-B озрачивања, $\ln P_{295\text{ nm}} = f(t_{irr.})$. Одговарајућа константа продукције ($k_{prod.QCDP1}$) и коефицијент детерминације су приказани на слици.

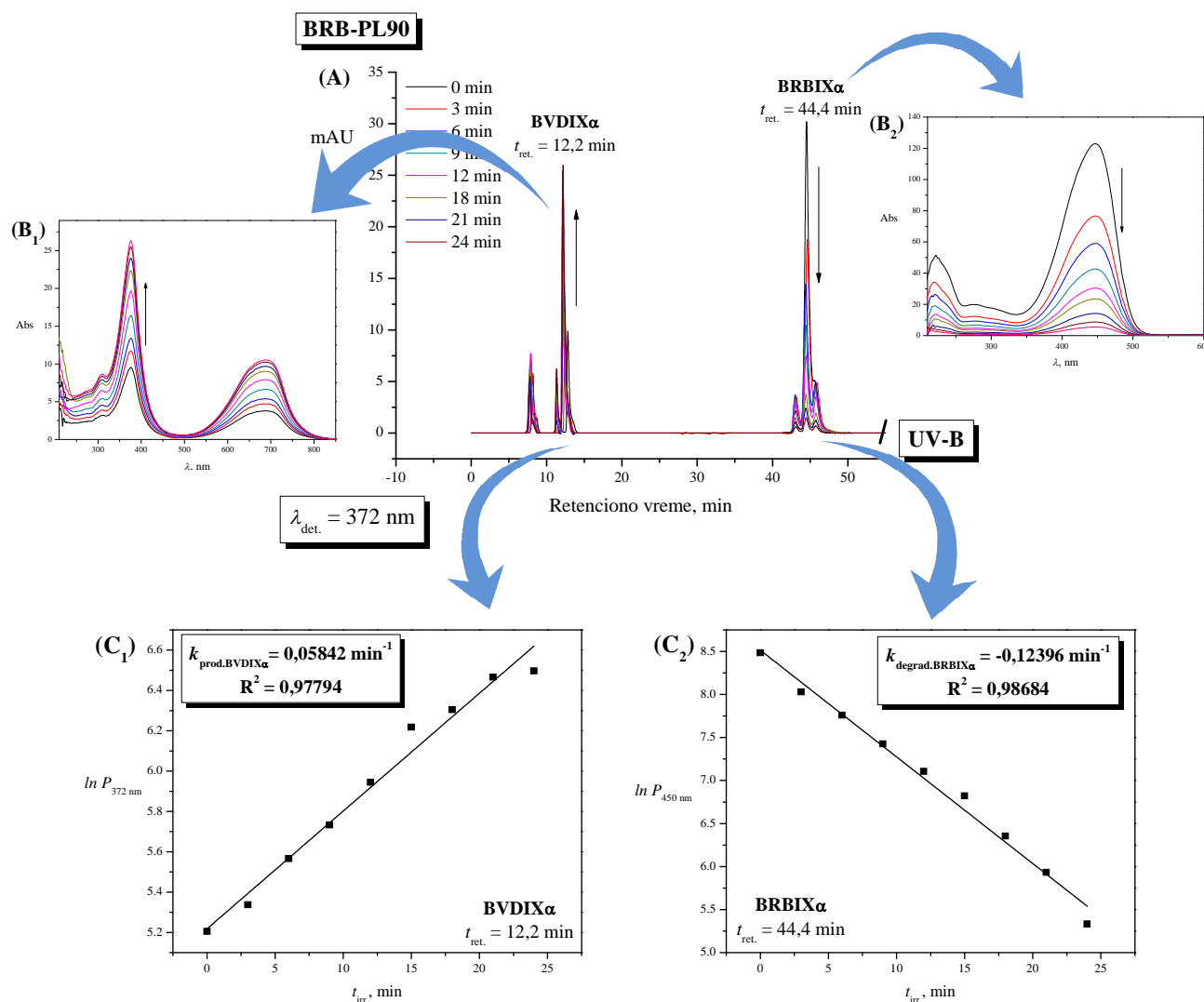
На **Слици 53А** су дати хроматограми неозрачене и UV-B озрачиване смеше билирубина и кверцетина снимљени на 372 nm. Промене апсорпционих спектра компонената смеше добијених са претходно снимљених (372 nm – QC и 450 nm – BRB) хроматограма су приказане на **Слици 53В₁** и **В₂**, док су кинетике *bleaching*-а истих праћене преко смањења површине пикова на одговарајућим хроматограмима са порастом времена континуалног UV-B озрачивања приказане на **Слици 53С₁** и **С₂**, респективно.

Хроматограми неозрачене и UV-B озрачиване смеше билирубина и фосфолипида, снимљени на 372 nm су приказани на **Слици 54А**. Промене апсорпционих спектра BVDIX α и BRBIX α , добијених са хроматограма снимљених на 372 nm и 450 nm су приказане на **Слици 54В₁** и **В₂**, респективно. Кинетика настанка BVDIX α и деградације BRBIX α праћене преко повећања површине пика BVDIX α одн. смањења површине пика BRBIX α , као функција пораста времена континуалног UV-B озрачивања, су приказане на **Слици 54С₁** и **С₂**, респективно.

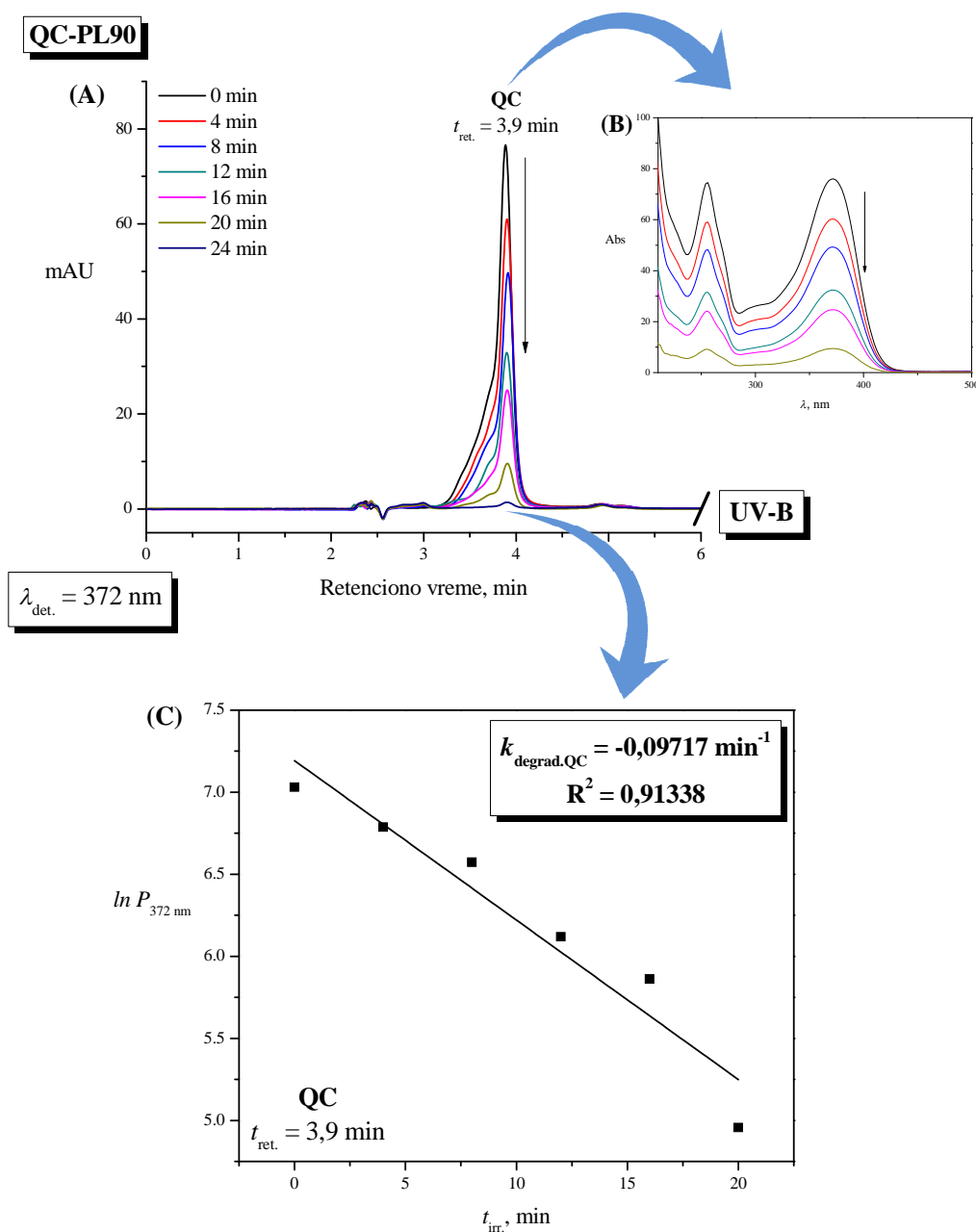
Слика 55А даје приказ хроматограма неозрачене и UV-B озрачиване смеше кверцетина и фосфолипида из смеше BRB-QC-PL90, снимљених на 372 nm. Промене апсорпционих спектра кверцетина добијених са претходно снимљених хроматограма су приказане на **Слици 55В**, док је кинетика његове деградације, праћена преко смањења површине пика на хроматограмима снимљеним на 372 nm у зависности од времена UV-B озрачивања дата на **Слици 55С**.



Слика 53 Смеша билирубина и кверцетина (BRB-QC) у метанолу. **(А)** Хроматограми неозрачене и UV-B озрачиване смеше BRB-QC, снимљени на таласној дужини максимума апсорбанције Траке I QC-а ($\lambda_{det.} = 372$ nm). Ретенциона времена ($t_{ret.}$) QC-а и BRBIX α су 7,6 min и 27,3 min. **(В)** Промене апсорпционих спектра QC-а (**В₁**) и BRBIX α (**В₂**) добијених са претходно снимљених хроматограма на таласним дужинама од 372 nm и 450 nm, респективно са порастом времена континуалног UV-B озрачивања ($t_{irr.}$). **(С)** Кинетика UV-B индукованог *bleaching*-а QC-а (**С₁**) и BRBIX α (**С₂**) праћена преко смањења површине пика QC-а ($t_{ret.} = 7,6$ min) и BRBIX α ($t_{ret.} = 27,3$ min) на хроматограмима снимљеним на 372 nm и 450 nm, респективно у функцији од времена UV-B озрачивања $-\ln P_{372\text{ nm}} = f(t_{irr.})$ и $\ln P_{450\text{ nm}} = f(t_{irr.})$. Одговарајуће константе *bleaching*-а ($k_{degrad.QC}$ и $k_{degrad.BRBIX\alpha}$) и коефицијенти детерминације су приказани на слици.



Слика 54 Смеша билирубина и фосфолипида (BRB-PL90) у метанолу. **(A)** Хроматограми неозрачене и UV-B озрачиване смеше BRB-PL90, снимљени на таласној дужини блиској максимуму апсорбанције BVDIXα ($\lambda_{det.} = 372$ nm). Ретенциона времена ($t_{ret.}$) BVDIXα и BRBIXα су 12,2 min и 44,4 min. **(B)** Промене апсорпционих спектра BVDIXα (**B₁**) и BRBIXα (**B₂**), добијених са претходно снимљених хроматограма на таласним дужинама од 372 nm и 450 nm, респективно, са порастом времена континуалног UV-B озрачивања ($t_{irr.}$). **(C)** Кинетика UV-B индукованог настанка BVDIXα (**C₁**) и *bleaching*-а BRBIXα (**C₂**) праћена преко пораста површине пика BVDIXα ($t_{ret.} = 12,2$ min) одн. смањења површине пика BRBIXα ($t_{ret.} = 44,4$ min) на хроматограмима снимљеним на 372 nm и 450 nm, респективно у функцији од времена UV-B озрачивања – $\ln P_{372\text{ nm}} = f(t_{irr.})$ и $\ln P_{450\text{ nm}} = f(t_{irr.})$. Константе продукције BVDIXα ($k_{prod.BVDIX\alpha}$) односно *bleaching*-а BRBIXα ($k_{degrad.BRBIX\alpha}$) и одговарајући коефицијенти детерминације су приказани на слици.



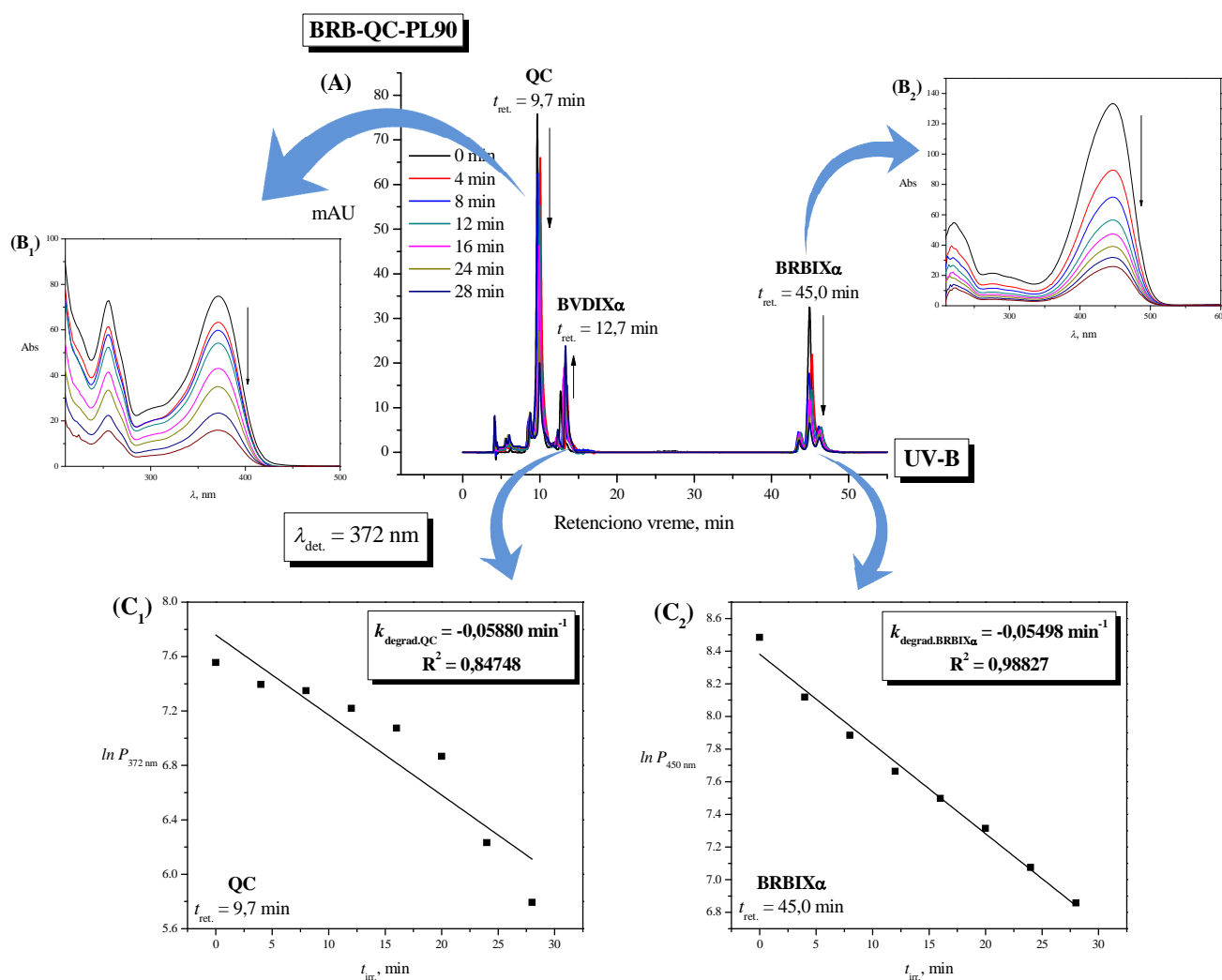
Слика 55 Смеша кверцетина и фосфолипида (QC-PL90) под условима у смеши BRB-QC-PL90⁴⁹. **(A)** Хроматограми неозрачене и UV-B озрачене смеше QC-PL90, снимљени на таласној дужини максимума апсорбације Траке I QC-а ($\lambda_{\text{det.}} = 372 \text{ nm}$). Ретенционо време ($t_{\text{ret.}}$) QC-а и NL-а су 3,9 min и 18,8 min, респективно. **(B)** Промене апсорпционих спектра QC-а, добијених са хроматограма снимљених на 372 nm, са порастом времена континуалног UV-B озрачивања ($t_{\text{irr.}}$). **(C)** Кинетика UV-B индукованог *bleaching*-а QC-а, праћена преко смањења површине пика QC-а ($t_{\text{ret.}} = 3,9 \text{ min}$) на хроматограмима снимљеним на 372 nm, у функцији од времена UV-B озрачивања $-\ln P_{372 \text{ nm}} = f(t_{\text{irr.}})$. Одговарајућа константа *bleaching*-а ($k_{\text{degrad.QC}}$) и коефицијент детерминације су приказани на слици.

⁴⁹ Смеша кверцетина и фосфолипида (QC-PL90) у метанолу уз додаток *blank* раствора BRB-а у количини BRB-а присутног у смеши BRB-QC-PL90.

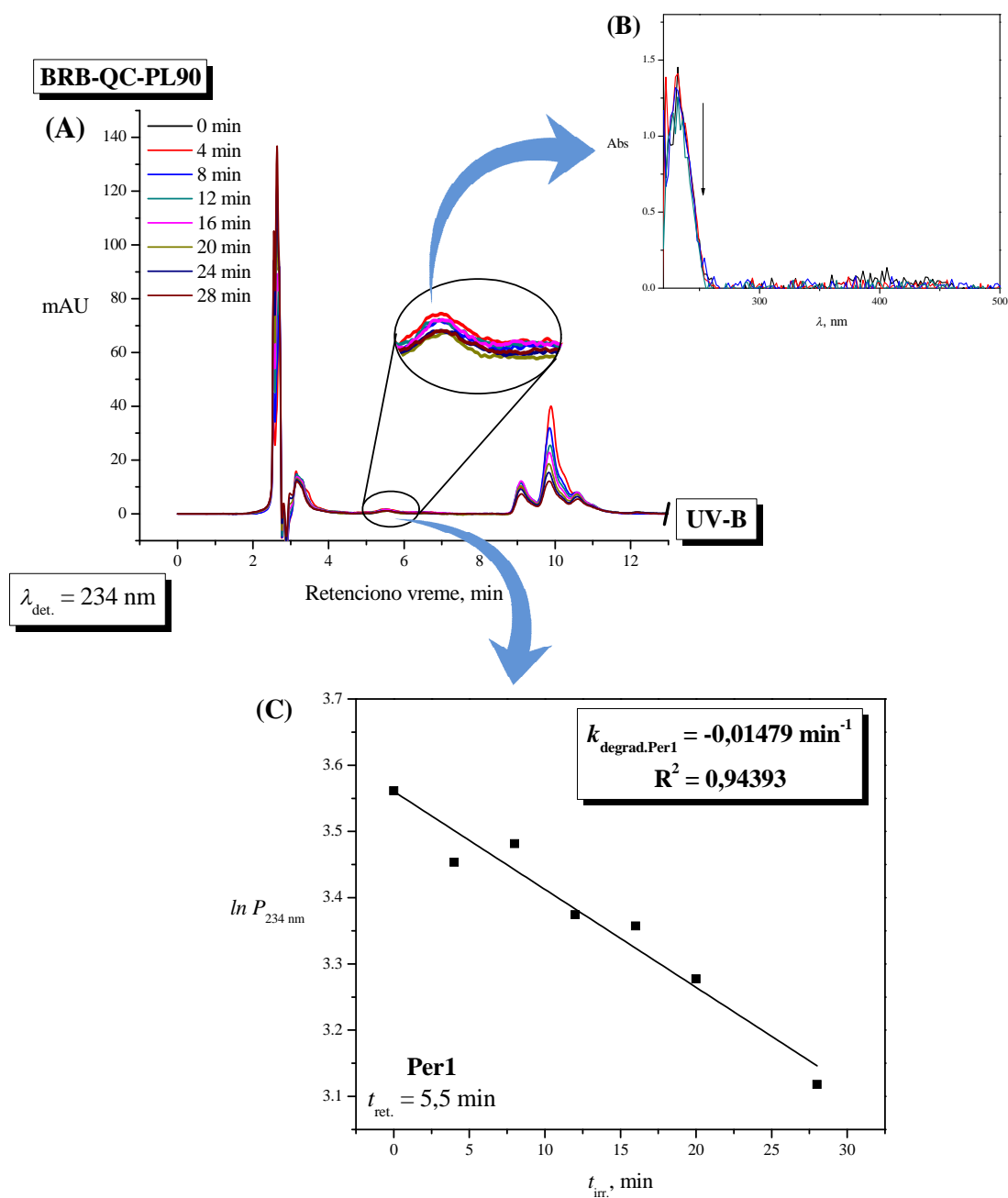
Хроматограми неозрачене и UV-B озрачиване смеше билирубина, кверцетина и фосфолипида, снимљених на 372 nm су приказани на **Слици 56А**. Промене апсорпционих спектра кверцетина и билирубина, добијених са претходно снимљених (на 372 nm – QC и 450 nm – BRB) хроматограма су приказане на **Слици 56В₁** и **В₂**. Кинетика деградације QC-а и BRB-а, праћена преко смањења површине пика на одговарајућим хроматограмима са порастом времена континуалног UV-B озрачивања је дата на **Слици 56С₁** – QC и **Слици 56С₂** – BRB.

Изократским елуирањем смеше билирубина, кверцетина и фосфолипида метанолом и праћењем сигнала на 234 nm су добијени хроматограми неозрачене и UV-B озрачиване смеше у метанолу, приказани на **Слици 57А**. Увећан је део хроматограма у коме се очекује појава конјугованих диена. Промене апсорпционих спектра Per1 идентификованог на 5,5 min су приказане на **Слици 57В**. Кинетика деградације Per1, праћена преко смањења његове површине као последица континуалног UV-B озрачивања је приказана на **Слици 57С**.

У **Табели 4А** су дате константе брзине деградације билирубина и кверцетина у метанолу, појединачно и у смеси билирубин/кверцетин али и у одговарајућим смешама са фосфолипидима: билирубин/фосфолипиди, кверцетин/фосфолипиди и билирубин/кверцетин/фосфолипиди, у аеробним и анаеробним условима, добијених са хроматограма снимљених на одговарајућим таласним дужинама, са порастом времена UV-B озрачивања. У делу **Табеле 4В** су приказане константе брзине продукције биливердина и конјугованих диена, снимљених на таласним дужинама од 372 nm и 234 nm, респективно са порастом времена континуалног UV-B озрачивања.



Слика 56 Смеша билирубина, кверцетина и фосфолипида (BRB-QC-PL90) у метанолу. **(А)** Хроматограми неозрачене и UV-B озрачене меше BRB-QC-PL90, снимљени на таласној дужини максимума апсорбације Траке I QC-а ($\lambda_{det.} = 372 \text{ nm}$). Ретенциона времена ($t_{ret.}$) QC-а, BVDIX α и BRBIX α су 9,7 min; 12,7 min и 45,0 min, респективно. **(В)** Промене апсорпционих спектра QC-а (**В₁**) и BRBIX α (**В₂**) добијених са хроматограма снимљених на 372 nm и 450 nm, респективно, са порастом времена континуалног UV-B озрачивања ($t_{irr.}$). **(С)** Кинетика UV-B индукованог *bleaching*-а QC-а (**С₁**) и BRBIX α (**С₂**), праћена преко смањења површине пика QC-а ($t_{ret.} = 9,7 \text{ min}$) и BRBIX α ($t_{ret.} = 45,0 \text{ min}$) на хроматограмима снимљеним на 372 nm и 450 nm, респективно у функцији од времена UV-B озрачивања – $\ln P_{372 \text{ nm}} = f(t_{irr.})$ и $\ln P_{450 \text{ nm}} = f(t_{irr.})$. Одговарајуће константе *bleaching*-а QC-а и BRBIX α ($k_{degrad.QC}$ и $k_{degrad.BRBIX\alpha}$) и коефицијенти детерминације су приказани на слици.



Слика 57 Смеша билирубина, кверцетина и фосфолипида (BRB-QC-PL90) у метанолу. **(A)** Хроматограми неозрачене и UV-B озрачиване смеше BRB-QC-PL90 у метанолу, елуиране под изократским условима, метанолом, снимљени на таласној дужини максимума апсорбације конјугованих диена ($\lambda_{det.} = 234 \text{ nm}$). Ретенциона времена QC-а, BRBIX α и Per1 су 2,3 min; 9,9 min и 5,5 min, респективно. **(B)** Промене апсорпционих спектра Per1, добијених са хроматограма снимљених на 234 nm, са порастом времена континуалног UV-B озрачивања ($t_{irr.}$). **(C)** Кинетика UV-B индуковане деградације Per1 праћена преко смањења површине пика Per1 ($t_{ret.} = 5,5 \text{ min}$) на хроматограмима снимљеним на 234 nm у функцији од времена UV-B озрачивања, $\ln P_{234 \text{ nm}} = f(t_{irr.})$. Одговарајућа константа деградације Per1 ($k_{degrad.Per1}$) и коефицијент детерминације су приказани на слици.

Табела 4 (А) Константе брзине деградације ($k_{\text{degrad.}}$, min^{-1}) билирубина (BRBIX α) и кверцетина (QC) у аеробним и анаеробним условима, добијене као нагиб (праволинијске) зависности \ln -ованих вредности површина пикова са хроматограма билирубина (BRB), кверцетина (QC) и смеша билирубин/кверцетин (BRB-QC), билирубин/фосфолипиди (BRB-PL90), кверцетин/фосфолипиди (QC-PL90) и билирубин/кверцетин/фосфолипиди (BRB-QC-PL90) у метанола, снимљених на 450 nm (BRB) и 372 nm (QC) у функцији од времена континуалног UV озрачивања – $\ln P_{450/372 \text{ nm}} = f(t_{\text{irr.}})$. Зависност прати кинетику првог реда.

(В) Константе продукције ($k_{\text{prod.}}$) биливердина (BVDIX α) (min^{-1}) и коњугованог диена (Per1) добијене као нагиб (праволинијске) зависности \ln -ованих вредности површина пикова са хроматограма билирубина (BRB) у метанола и смеша билирубин/кверцетин (BRB-QC), билирубин/фосфолипиди (BRB-PL90), и билирубин/кверцетин/фосфолипиди (BRB-QC-PL90) у метанола, снимљених на 372 nm одн. 234 nm у функцији од времена континуалног UV озрачивања – $\ln P_{372/234 \text{ nm}} = f(t_{\text{irr.}})$. Зависност прати кинетику првог реда.

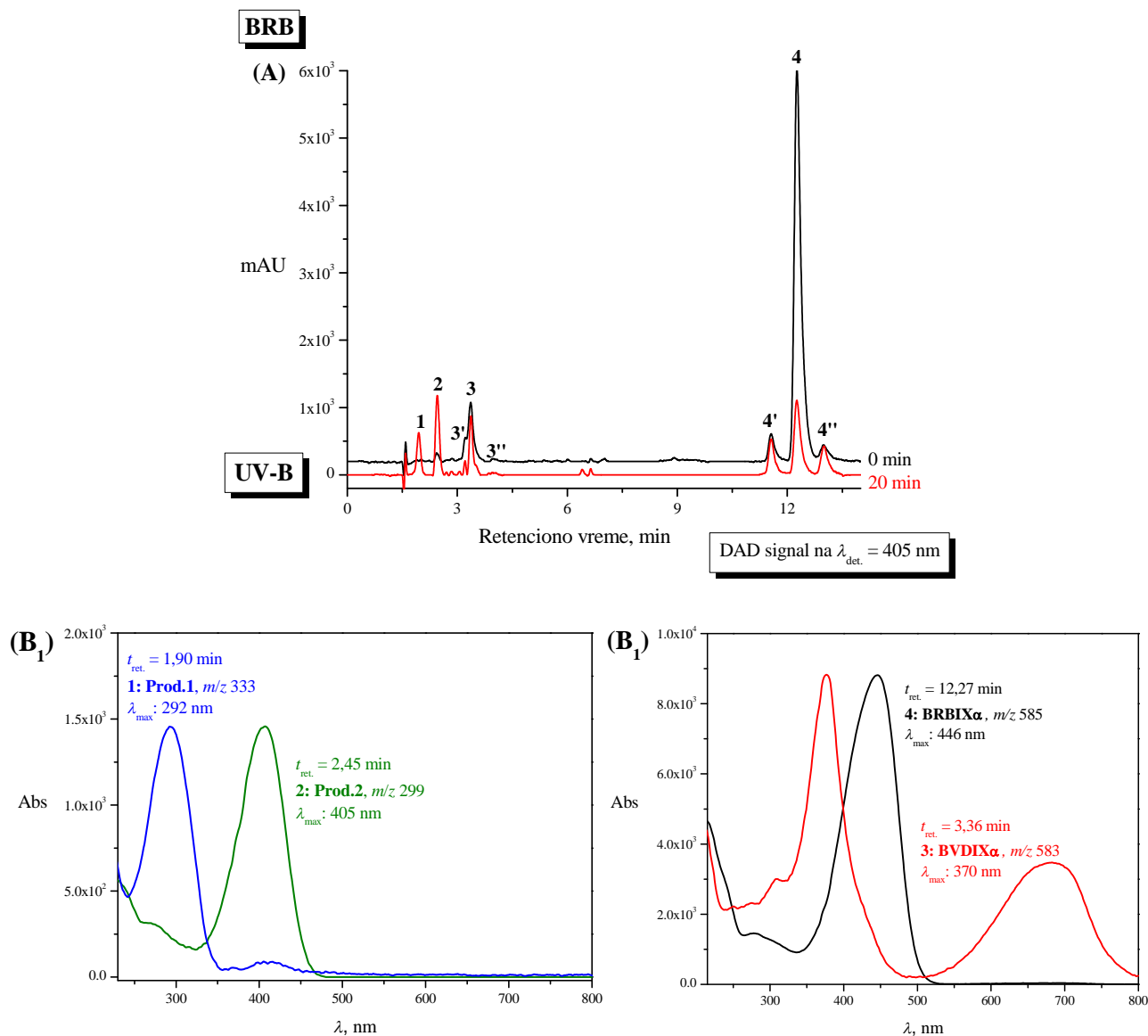
(A)	$k_{\text{degrad.}}$, min^{-1}							
	BRBIX α $t_{\text{ret.}} = 27,3 \text{ min}^*$				QC $t_{\text{ret.}} = 7,6 \text{ min}^*$			
	аеробно		анаеробно		аеробно		анаеробно	
	UV-A	UV-B	UV-A	UV-B	UV-A	UV-B	UV-A	UV-B
BRB	-0,04931	-0,07582	-0,04826	-0,06409	x	x	x	x
QC	x	x	x	x	-0,01417	-0,03689	x	x
BRB-QC	-0,02955	-0,03974	-0,01482	-0,01981	-0,01330	-0,02674	-0,01179	-0,01378
BRB-PL90	-0,05949	-0,12396	-0,02552	-0,04384	x	x	x	x
QC-PL90	x	x	x	x	-0,01299	-0,09717	x	x
BRB-QC-PL90	-0,03593	-0,05498	-0,01582	-0,01789	-0,01373	-0,05880	-0,01114	-0,03080
(B)	$k_{\text{prod.}}$, min^{-1}							
	BVDIX α $t_{\text{ret.}} = 16,0 \text{ min}$				Per1 $t_{\text{ret.}} = 5,5 \text{ min}$			
	аеробно		анаеробно		аеробно		анаеробно	
	UV-A	UV-B	UV-A	UV-B	UV-A	UV-B	UV-A	UV-B
BRB	0,05187	0,07749	0,04231	0,08197	x	x		
BRB-QC	0,03157	0,03456	/	0,02747	x	x		
BRB-PL90	0,05942	0,05842	0,05107	0,04656	/	/		
QC-PL90	x	x	x	x	-0,00206	-0,02540		
BRB-QC-PL90	0,01778	0,02822	0,01150	0,05495	/	-0,01479		

*Ретенциона времена у смеши BRB-QC; x – компонента није присутна у смеши; / - промена површине пика са порастом времена озрачивања је динамична

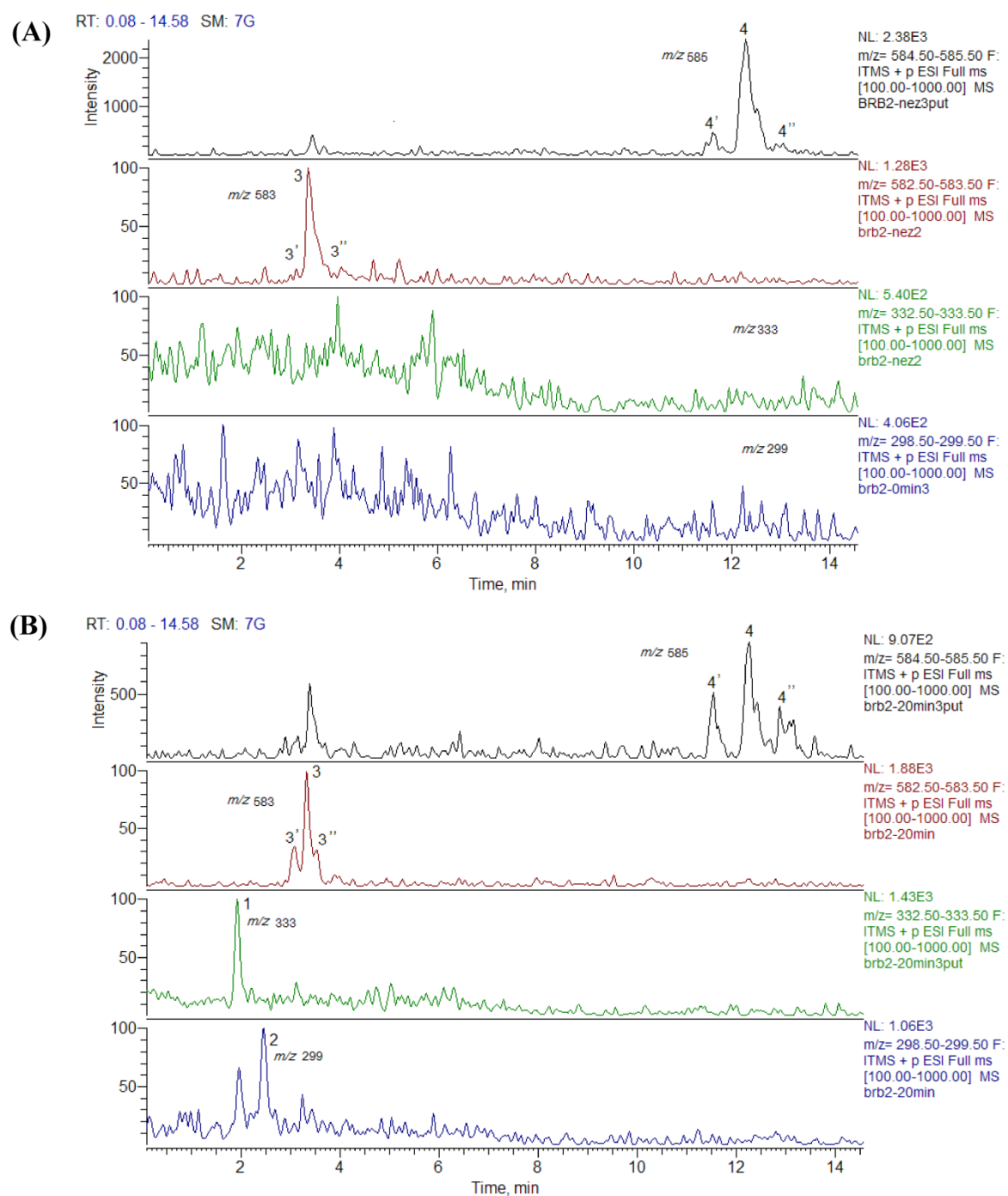
5.2.2 UHPLC-ESI-MS анализа BRB-a

За недвосмислену идентификацију производа UV-B индуковане деградације билирубина у аеробним условима је коришћена UHPLC хроматографија-ESI-MS спектрометрија. UHPLC хроматограми неозраченог и 20 min озрачиваног раствора билирубина су приказани на **Слици 58A**. Сви пикови су обележени бројевима 1-4, по редоследу елуирања из колоне, почев од најполарнијег – Prod1, преко Prod2 и Prod3 (BVDIX α) до најнеполарнијег – BRBIX α . Упоредни приказ апсорпционих спектра деградационих продуката билирубина (Prod1, Prod2, BVDIX α) уочених на претходно снимљеним хроматограмима као и самог BRBIX α је дат на **Слици 58B₁** и **B₂**.

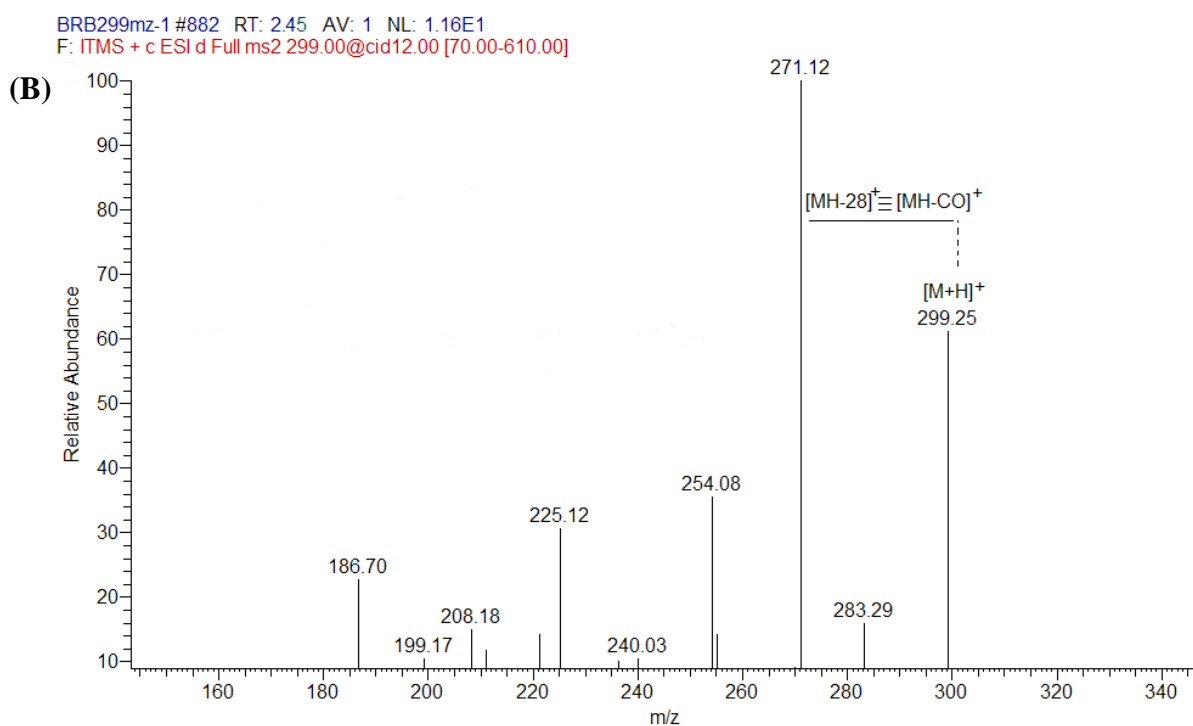
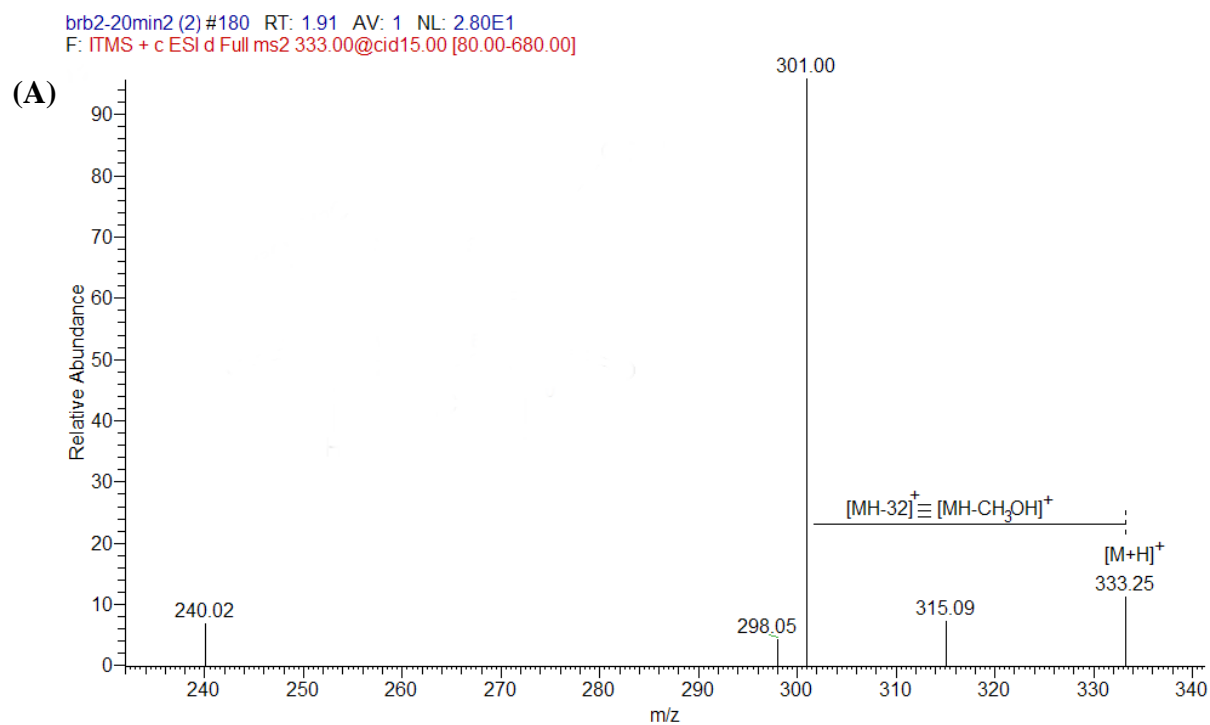
UHPLC/ESI/MS профил неозраченог (**A**) и UV-B 20 min озрачиваног (**B**) билирубина у метанолу је приказан на **Слици 59**. MS² спектри Prod1 и Prod2 су дати на **Слици 60A** и **B** а BVDIX α (Prod3) и BRBIX α на **Слици 61A** и **B**, респективно. Динамика промене површине Prod1, Prod2, BVDIX α и BRBIX α на одговарајућим хроматограмима са порастом времена континуалног UV-B озрачивања је дата на **Слици 62A-D**, респективно.



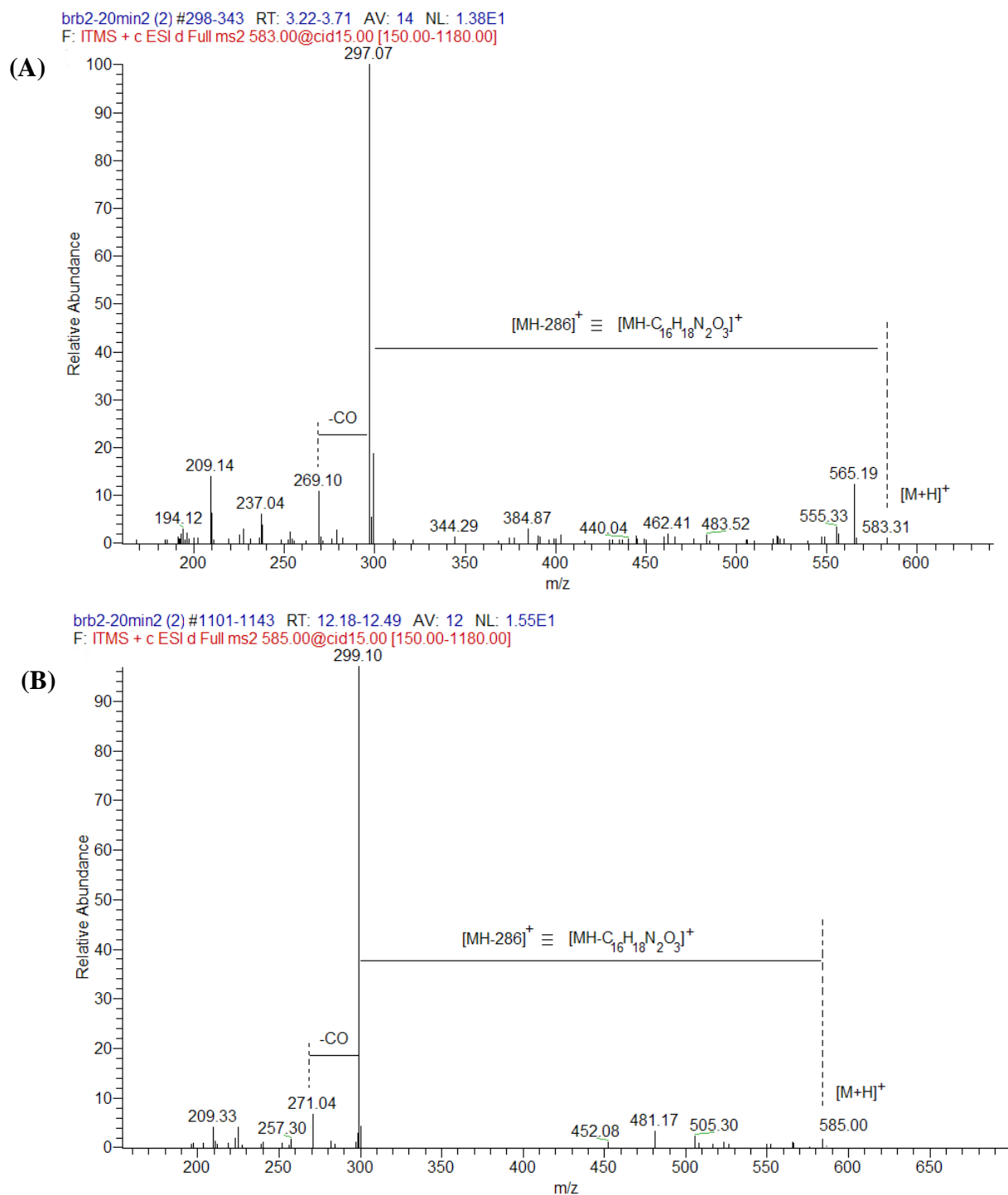
Слика 58 Билирубин (BRB) у метанолу. **(A)** УHPLC хроматограми неозраченог и UV-B 20 min озрачиваног раствора BRB-а, снимљени на таласној дужини од 405 nm. Бројевима 1, 2, 3 (изомери BVD – 3', 3, 3'') и 4 (изомери BRB – 4', 4, 4'') су, по редоследу елуирања из колоне, обележени производи деградације BRB-а: Prod1, Prod2, BVD и сам BRB, респективно. **(B)** Упоредни приказ апсорпционих спектра Prod1 ($t_{ret.} = 1,90$ min) и Prod2 ($t_{ret.} = 2,45$ min) **(B₁)**, 3 – BVDIX α ($t_{ret.} = 3,36$ min) и 4 – BRBIX α ($t_{ret.} = 12,27$ min) **(B₂)** добијених са хроматограма снимљених на таласним дужинама максимума апсорбанције Prod2, BVDIX α и BRBIX α (405 nm, 370 nm и 446 nm, респективно) односно у случају Prod1 са масених хроматограма за m/z 333.



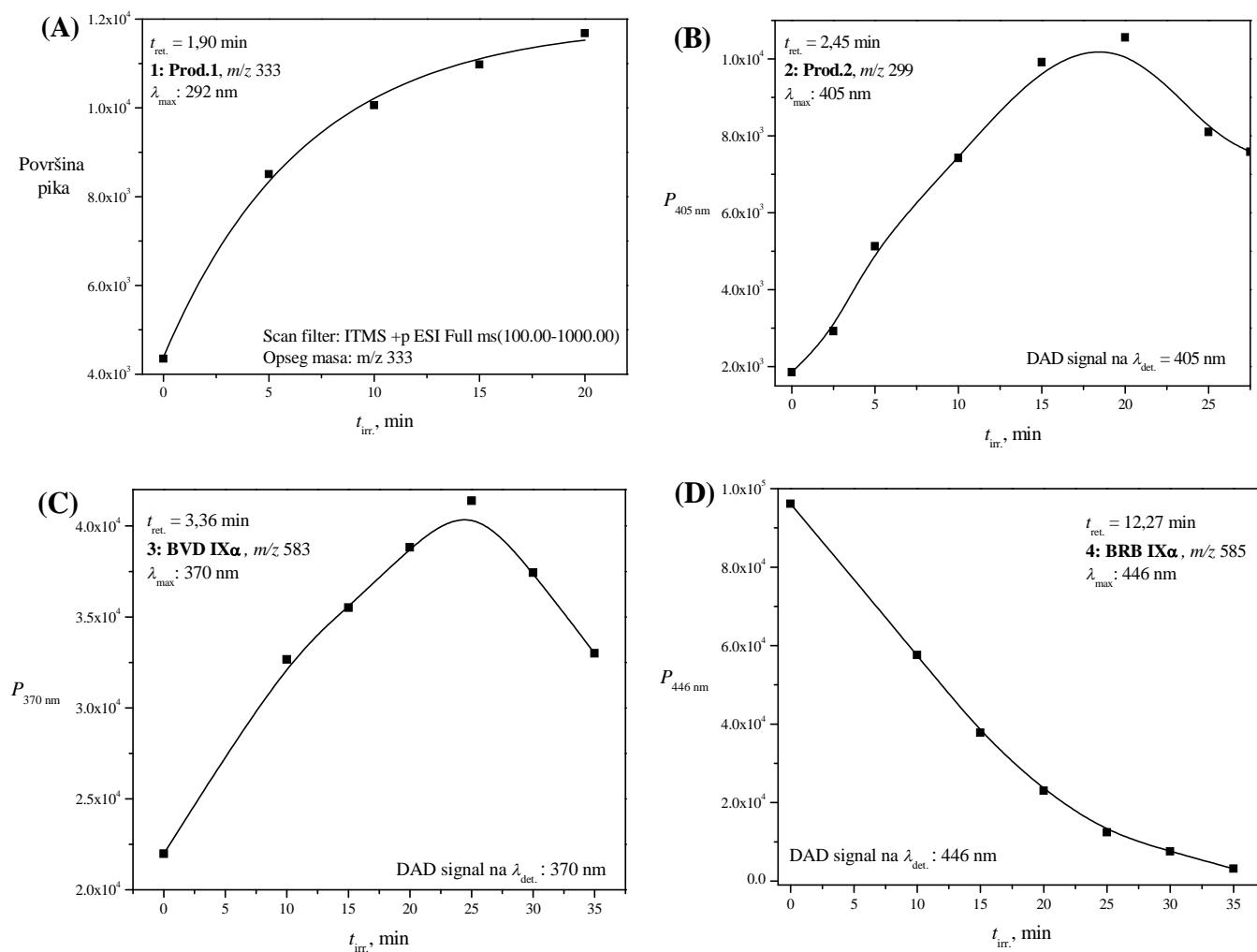
Слика 59 UHPLC/ESI/MS профил неозраченог **(A)** и UV-B 20 min озрачиваног **(B)** билирубина у метанолу. Детектовани јони су на масеним хроматограмима обележени бројевима по редоследу елуирања из колоне и то: 1 – m/z 333; 2 – m/z 299; 3 – изомери BVD-а на m/z 583 (3, 3', 3'') и 4 – изомери BRB-а на m/z 585 (4, 4', 4'').



Слика 60 MS/MS спектри производа деградације билирубина – Prod1 (A) и Prod2 (B) (пикови обележени бројевима 1 – $t_{\text{ret.}}=1,90$ min и 2 – $t_{\text{ret.}}=2,45$ min на хроматограмима приказаним на Слици 57A, респективно).



Слика 61 MS/MS спектри биливердина BVDIX α (A) и BRBIX α (B) (пикови обележени бројевима 3 – $t_{ret.} = 3,36$ min и 4 – $t_{ret.} = 12,27$ min на хроматограмима приказаним на Слици 57A, респективно).



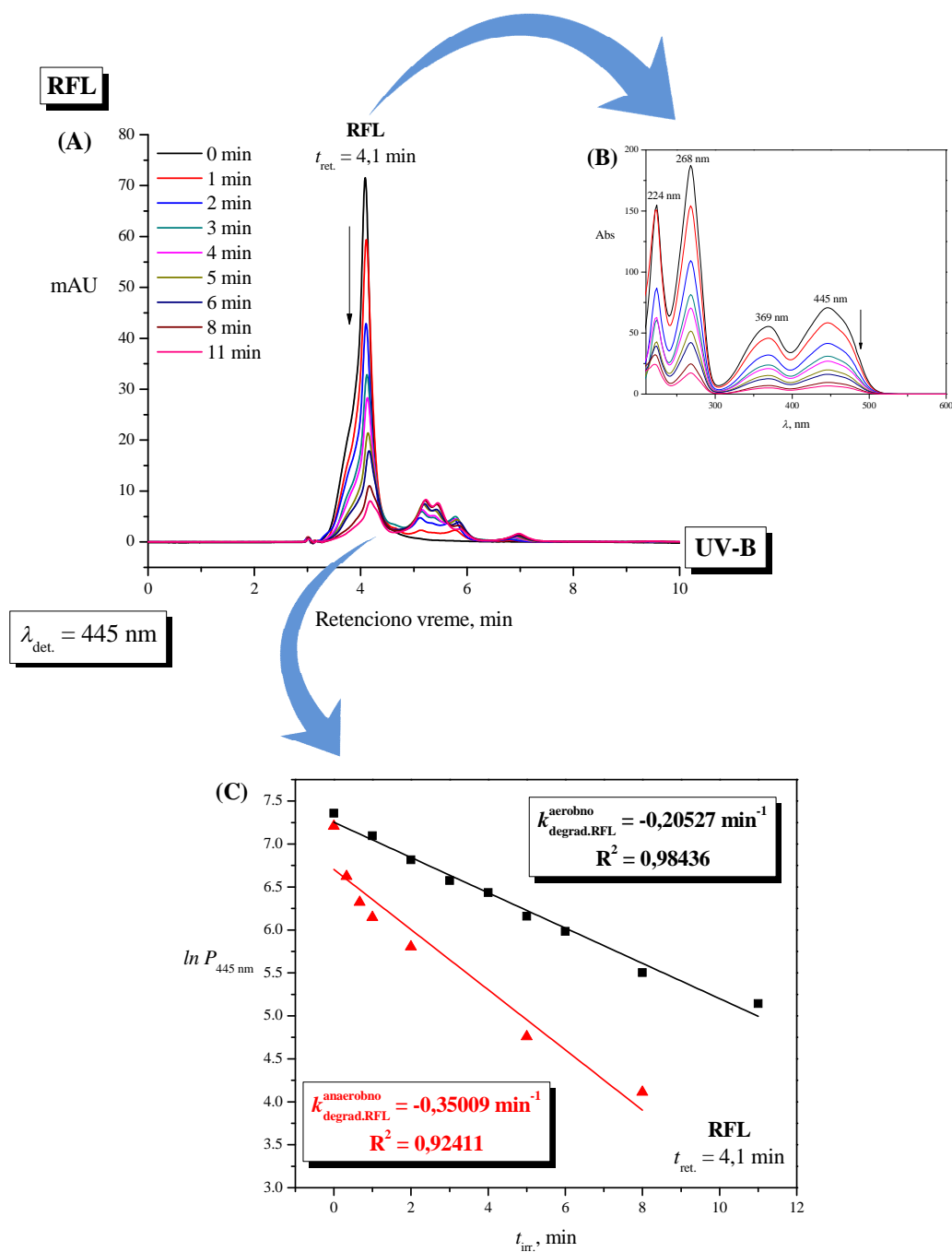
Слика 62 Динамика промене површине пикова (A) Prod1, (B) Prod2, (C) BVDIX α и (D) BRBIX α (пикови на ретенционим временима од 1,90 min; 2,45 min; 3,36 min и 12,27 min на хроматограмима приказаним на Слици 57A, респективно) са порастом времена континуалног UV-B озрачивања. Површине пикова Prod2, BVDIX α и BRBIX α су добијене са хроматограма снимљених на апсорпционим максимума истих и то: 405 nm, 370 nm и 446 nm, респективно док су површине пика Prod1 добијене са ESI-MS хроматограма за m/z 333.

5.3 UV индуковане промене смеше RFL-QC-PL90

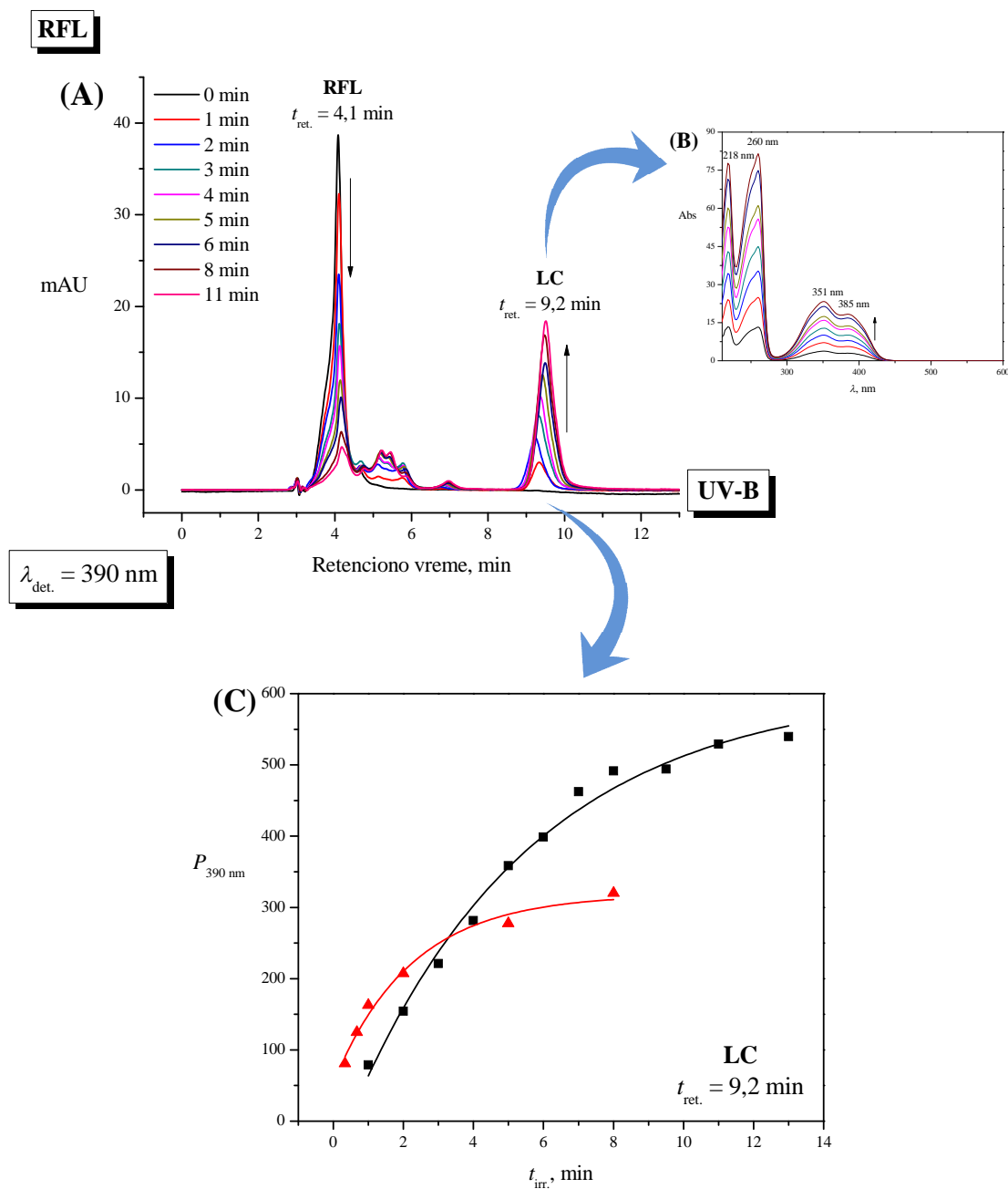
5.3.1 RP-HPLC анализа смеше RFL-QC-PL90

Хроматограми неозраченог и UV-B озрачиваног раствора рибофлавина у метанолу снимљени на таласној дужини максимума апсорбације рибофлавина (445 nm) и таласној дужини блиској максимуму апсорбације деградационог производа рибофлавина – лумихрома (390 nm) су приказани на **Сликама 63А** и **64А**. Промене апсорпционих спектра рибофлавина одн. лумихрома, добијених са претходно снимљених (на 445 nm за RFL и 390 nm за LC) хроматограма су дате на **Сликама 63В** и **64В**, док су кинетика деградације RFL-а и динамика настајања LC-а, у аеробним и анаеробним условима, праћене на одговарајућим хроматограмима са порастом времена континуалног UV-B озрачивања – **Сл.63С** и **64С**, респективно.

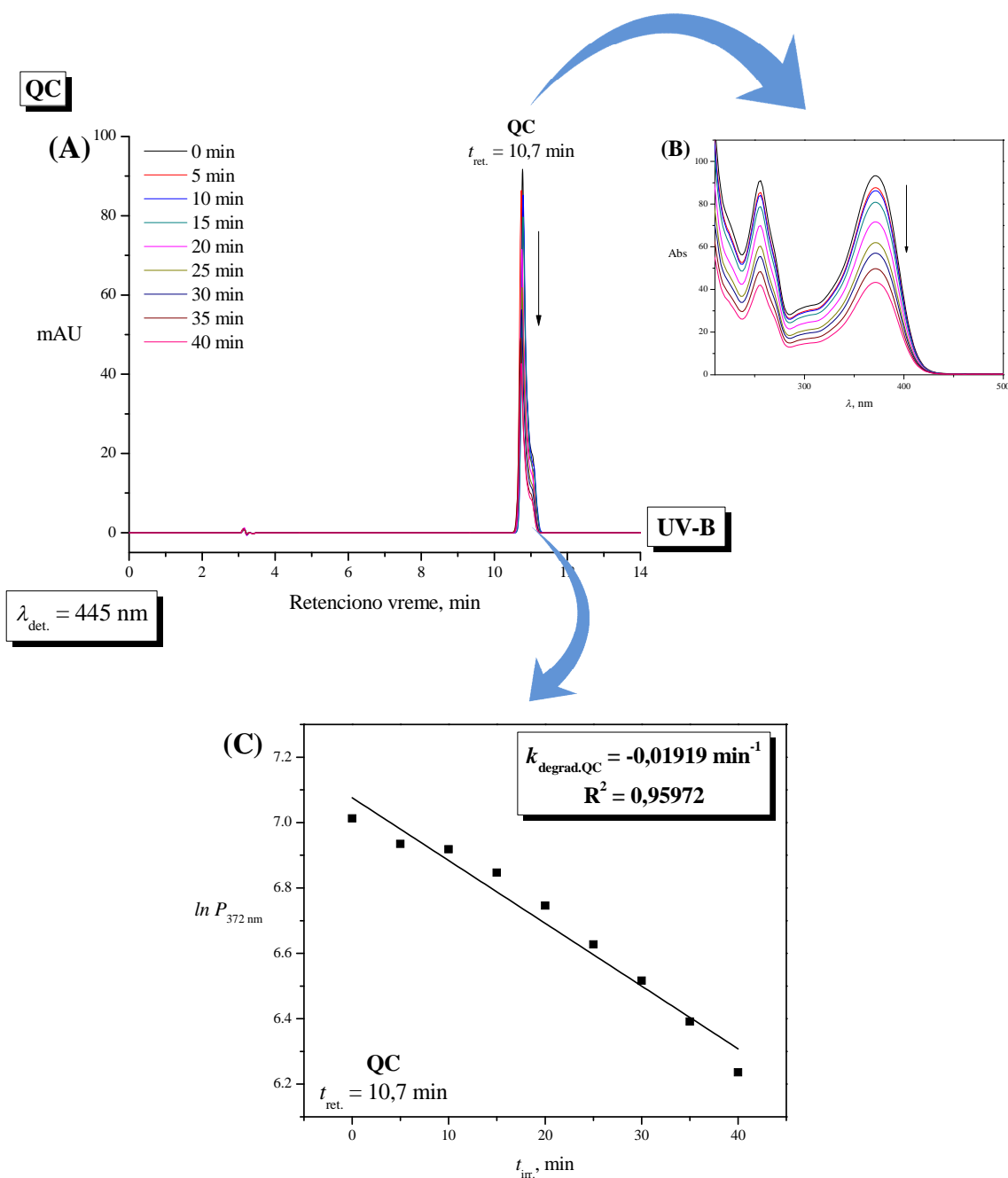
На **Сликама 65А** и **66А** су приказани хроматограми неозраченог и UV-B озрачиваног раствора кверцетина (под условима у смеши RFL-QC-PL90) у метанолу, снимљени на 372 nm и 295 nm, респективно. Промене апсорпционих спектра кверцетина и наглађеног деградационог производа, QCDP1 добијених са претходно снимљених хроматограма су дате на **Сликама 65В** и **66В**, респективно. Кинетика деградације QC-а и кинетика настанка QCDP1, праћене преко промене површине пика са порастом времена UV-B озрачивања на одговарајућим хроматограмима, су приказане на **Сликама 65С** и **66С**, респективно.



Слика 63 Рибофлавин у метанолу. (A) Хроматограми неозраченог и UV-B озрачиваног раствора RFL-а у метанолу, снимљени на таласној дужини максимума апсорбанције RFL-а ($\lambda_{det.} = 445 \text{ nm}$). Ретенционо време ($t_{ret.}$) RFL-а је 4,1 min. (B) Промене апсорпционих спектра RFL-а, добијених са хроматограма снимљених на 445 nm, са порастом времена континуалног UV-B озрачивања ($t_{irr.}$). (C) Кинетика UV-B индукованог *bleaching*-а RFL-а под аеробним (■) и анаеробним (▲) условима, праћена преко смањења површине пика RFL-а ($t_{ret.} = 4,1 \text{ min}$) на хроматограмима снимљеним на 445 nm, у функцији од времена UV-B озрачивања, $\ln P_{445 \text{ nm}} = f(t_{irr.})$. Одговарајуће константе *bleaching*-а ($k_{deggrad.RFL}^{aerobno}$ и $k_{deggrad.RFL}^{anaerobno}$) и коефицијенти детерминације су приказани на слици.

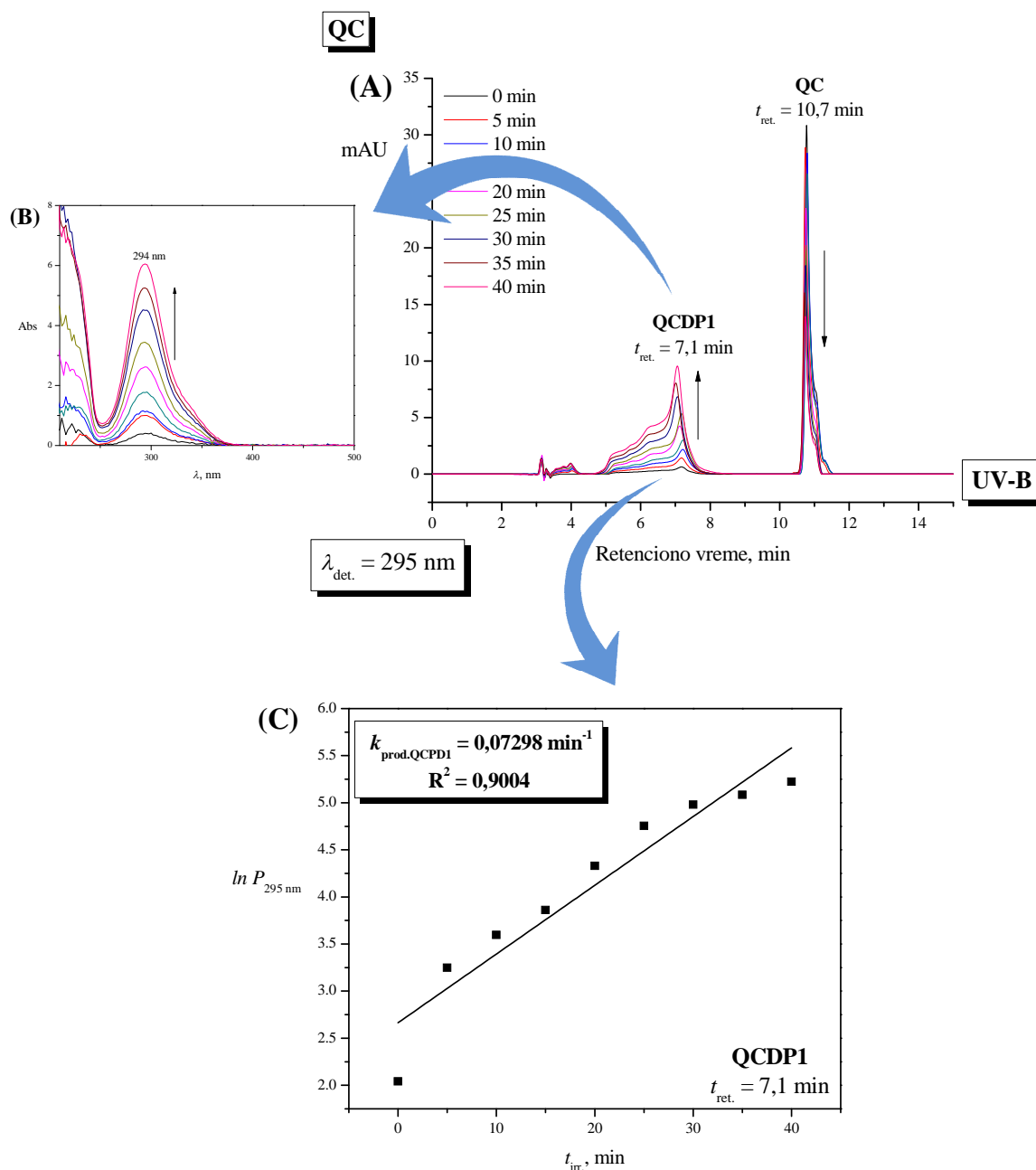


Слика 64 Рибофлавин у метанолу. **(А)** Хроматограми неозраченог и UV-B озраченог раствора RFL-а у метанолу, снимљени на таласној дужини блиској максимуму апсорбације LC-а ($\lambda_{det.} = 390$ nm). Ретенциона времена ($t_{ret.}$) RFL-а и LC-а су 4,1 min и 9,2 min, респективно. **(Б)** Промене апсорпционих спектра LC-а, добијених са хроматограма снимљених на 390 nm, са порастом времена континуалног UV-B озрачивања ($t_{irr.}$). **(С)** Динамика UV-B индукованог настанка LC-а под аеробним (■) и анаеробним (▲) условима, праћена преко промене површине пика LC-а ($t_{ret.} = 9,2$ min) на хроматограмима снимљеним на 390 nm, у функцији од времена UV-B озрачивања.



Слика 65 Кверцетин (QC) под условима у смеси RFL-QC-PL90⁵⁰ у метанолу. **(A)** Хроматограми неозраченог и UV-B озрачиваног раствора QC-а у метанолу, снимљени на таласној дужини максимума апсорбације Траке I ($\lambda_{det.} = 372$ nm). Ретенционо време ($t_{ret.}$) QC-а је 10,7 min. **(B)** Промене апсорпционих спектра QC-а, добијених са хроматограма снимљених на 372 nm, са порастом времена континуалног UV-B озрачивања ($t_{irr.}$). **(C)** Кинетика UV-B индукованог *bleaching*-а QC-а под аеробним условима, праћена преко смањења површине пика QC-а ($t_{ret.} = 10,7$ min) на хроматограмима снимљеним на 372 nm, у функцији од времена UV-B озрачивања, $\ln P_{372\text{ nm}} = f(t_{irr.})$. Одговарајућа константа *bleaching*-а ($k_{degrad.QC}$) и коефицијент детерминације су приказани на слици.

⁵⁰ Кверцетин (QC) у метанолу уз додаток 0,01 mol dm⁻³ раствора NaOH у количини RFL-а присутног у смеси RFL-QC-PL90.

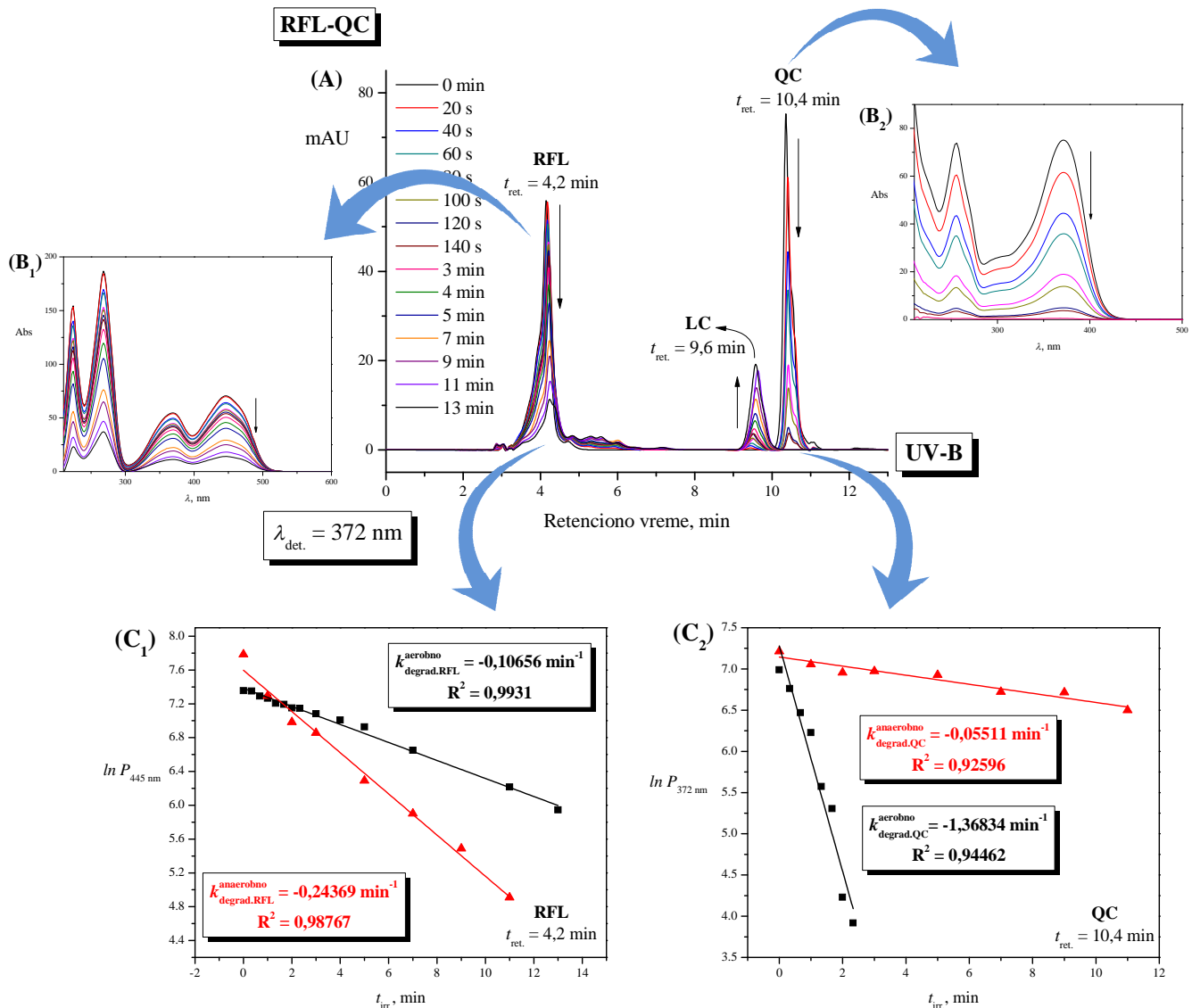


Слика 66 Кверцетин под условима у смеси RFL-QC-PL90. **(A)** Хроматограми неозраченог и UV-B озраченог раствора QC-а у метанолу, снимљени на таласној дужини максимума апсорбанције потенцијалних деградационих производа QC-а ($\lambda_{det.} = 295$ nm). Ретенциона времена ($t_{ret.}$) QCDP1 и QC-а су 7,1 min и 10,7 min, респективно. **(B)** Промене апсорпционих спектра QCDP1, добијених са хроматограма снимљених на 295 nm, са порастом времена континуалног UV-B озрачивања ($t_{irr.}$). **(C)** Кинетика UV-B индукованог настанка QCDP1, праћена преко пораста површине пика QCDP1 ($t_{ret.} = 7,1$ min) на хроматограмима снимљеним на 295 nm, у функцији од времена UV-B озрачивања, $\ln P_{295\text{ nm}} = f(t_{irr.})$. Одговарајућа константа продукције ($k_{prod.QCDP1}$) и коефицијент детерминације су приказани на слици.

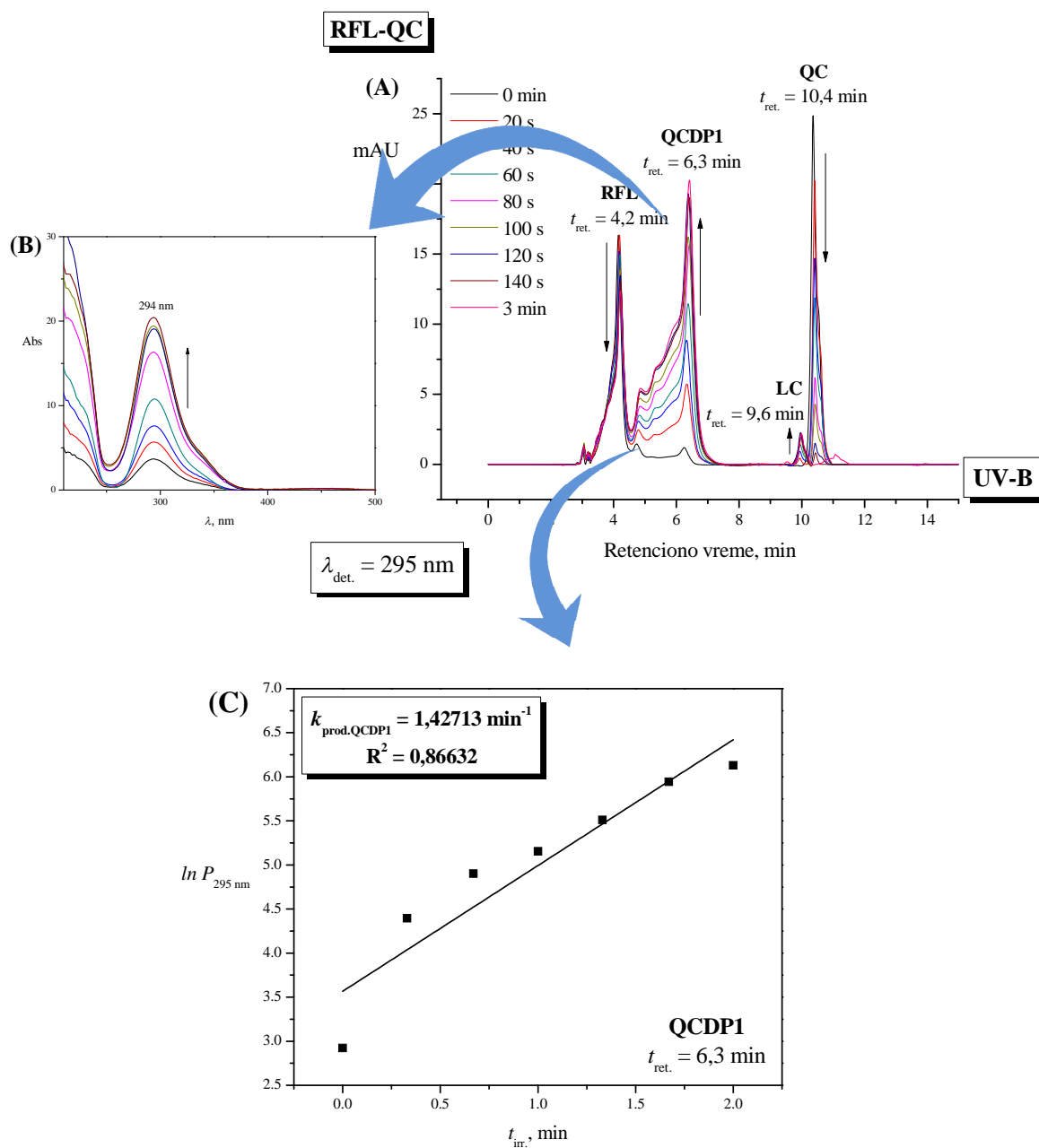
Слике 67А и **68А** дају приказ хроматограма неозрачене и UV-B озрачиване смеше рибофлавина и кверцетина, снимљених на 372 nm и 295 nm, респективно. На **Слици 67В₁** и **В₂** су приказане промене апсорпционих спектра рибофлавина и кверцетина а на **Слици 68В** QCDP1, добијених са хроматограма снимљених на 445 nm и 372 nm (за RFL и QC) односно 295 nm (за QCDP1), респективно. Кинетика *bleaching*-а RFL-а и QC-а, у аеробним и анаеробним условима и са друге стране кинетика настанка QCDP1 добијене праћењем промене површина пикова на одговарајућим хроматограмима са порастом времена континуалног UV-B озрачивања су приказане на **Слици 67С₁** и **С₂** и **Слици 68С**, респективно.

На **Слици 69А** су дати хроматограми неозрачене и UV-B озрачиване смеше рибофлавина и фосфолипида, снимљени на 390 nm и приказани до 13. min анализе. Промене апсорпционих спектра RFL-а и LC-а добијених са хроматограма снимљених на 445 nm и 390 nm су приказане на **Слици 69В₁** и **В₂**, респективно. Кинетика деградације RFL-а и динамика настанка LC-а, у аеробним и анаеробним условима, са порастом времена континуалног UV-B озрачивања су приказане на **Слици 69С₁** и **С₂**, респективно.

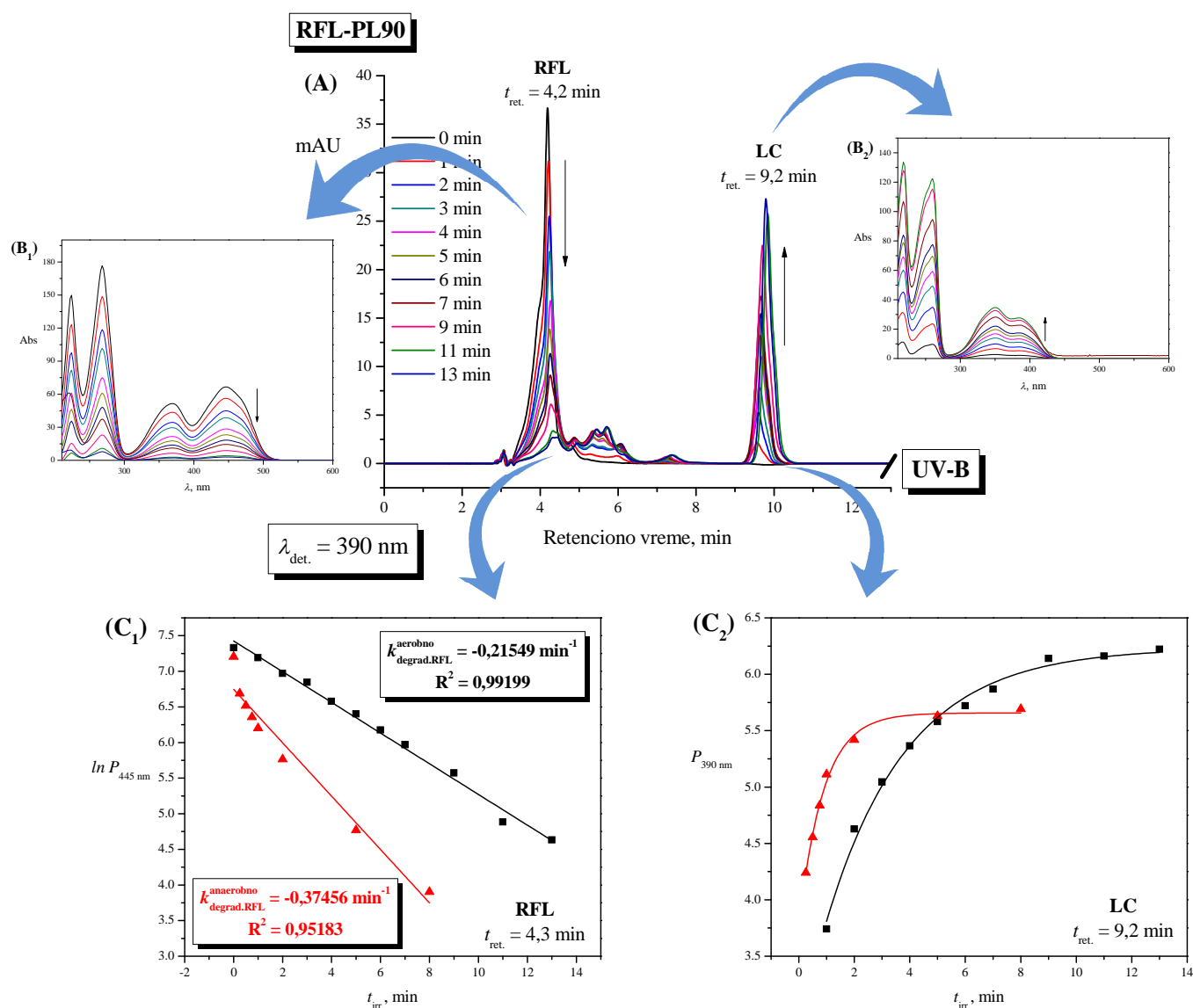
Изократским елуирањем смеше рибофлавина и фосфолипида метанолом и праћењем сигнала на 234 nm су добијени хроматограми неозрачене и UV-A озрачиване смеше у метанолу приказани на **Слици 70А**. Увећан је део хроматограма у коме је уочена појава конјугованих диена. Промене апсорпционих спектра Per1-3 идентификованих на ретенционим временима од 5,5 min; 6,5 min и 4,5 min су приказане на **Слици 70В₁₋₃**. Кинетика продукције Per1-3 праћена преко пораста њихове површине као последица континуалног UV-A озрачивања је приказана на **Слици 57С₁₋₃**.



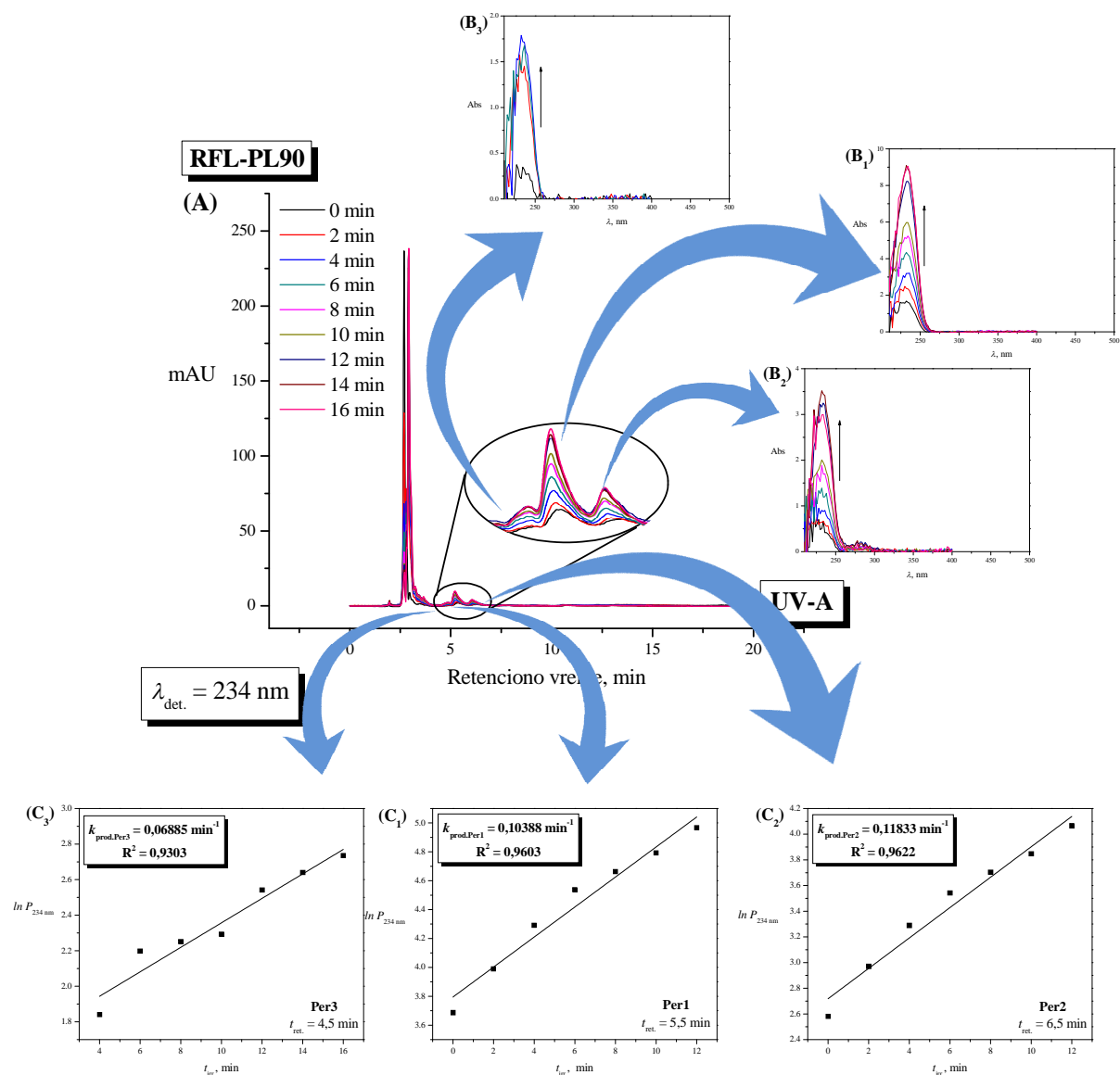
Слика 67 Смеша рибофлавина и кверцетина (RFL-QC) у метанолу. **(А)** Хроматограми неозрачене и UV-B озрачиване меше RFL-QC, снимљени на таласној дужини максимума апсорбанције Траке I QC-а ($\lambda_{det.} = 372 \text{ nm}$). Ретенциона времена RFL-а, LC-а и QC-а су 4,2 min; 9,6 min и 10,4 min, респективно. **(В)** Промене апсорпционих спектра RFL-а (**В₁**) и QC-а (**В₂**), добијених са хроматограма снимљених на 445 nm и 372 nm, респективно, са порастом времена континуалног UV-B озрачивања ($t_{irr.}$). **(С)** Кинетика UV-B индукованог *bleaching*-а RFL-а (**С₁**) и QC-а (**С₂**) у аеробним (■) и анаеробним условима (▲), праћена преко смањења површине пика RFL-а ($t_{ret.} = 4,2 \text{ min}$) и QC-а ($t_{ret.} = 10,4 \text{ min}$) на хроматограмима снимљеним на 445 nm и 372 nm, респективно у функцији од времена UV-B озрачивања – $\ln P_{445 \text{ nm}} = f(t_{irr.})$ и $\ln P_{372 \text{ nm}} = f(t_{irr.})$. Одговарајуће константе *bleaching*-а ($k_{degrad.RFL}^{aerobno}$, $k_{degrad.RFL}^{anaerobno}$, $k_{degrad.QC}^{aerobno}$ и $k_{degrad.QC}^{anaerobno}$) и коефицијенти детерминације су приказани на слици.



Слика 68 Смеша рибофлавина и кверцетина (RFL-QC) у метанолу. **(A)** Хроматограми неозрачене и UV-B озрачиване смеше RFL-QC, снимљени на 295 nm ($\lambda_{det.} = 295$ nm). Ретенциона времена RFL-а, QCDP1, LC-а и QC-а су 4,2 min; 6,3 min; 9,6 min и 10,4 min, респективно. **(B)** Промене апсорпционих спектра QCDP1, добијених са хроматограма снимљених на 295 nm, са порастом времена континуалног UV-B озрачивања ($t_{irr.}$). **(C)** Кинетика UV-B индукованог настанка QCDP1, праћена преко пораста површине пика QCDP1 ($t_{ret.} = 6,3$ min) на хроматограмима снимљеним на 295 nm, у функцији од времена UV-B озрачивања, $\ln P_{295\text{ nm}} = f(t_{irr.})$. Одговарајућа константа продукције ($k_{prod.QCDP1}$) и коефицијент детерминације су приказани на слици.



Слика 69 Смеша рибофлавина и фосфолипида (RFL-PL90) у метанолу. **(А)** Хроматограми неозрачене и UV-B озрачиване мешае RFL-PL90, снимљени на таласној дужини блиској максимуму апсорбанције LC-а ($\lambda_{det.} = 390$ nm), приказани до 13. min анализе. Ретенциона времена RFL-а и LC-а су 4,2 min и 9,2 min, респективно. **(В)** Промене апсорпционих спектра RFL-а (**В₁**) и LC-а (**В₂**), добијених са хроматограма снимљених на 445 nm и 390 nm, респективно са порастом времена континуалног UV-B озрачивања ($t_{irr.}$). **(С)** Кинетика UV-B индукованог *bleaching*-а RFL-а (**С₁**) и динамика UV-B индукованог настанка LC-а (**С₂**), респективно у аеробним (■) и анаеробним (▲) условима, праћена преко смањења површине пика RFL-а ($t_{ret.} = 4,2$ min) одн. промене површине пика LC-а ($t_{ret.} = 9,2$ min) на хроматограмима снимљеним на 445 nm и 390 nm, у функцији од времена UV-B озрачивања $-\ln P_{445\text{ nm}} = f(t_{irr.})$. Одговарајуће константе *bleaching*-а RFL-а ($k_{degrad.RFL}^{aerobno}$ и $k_{degrad.RFL}^{anaerobno}$) и коефицијенти детерминације су приказани на слици.



Слика 70 Смеша рибофлавина и фосфолипида (RFL-PL90) у метанолу. **(А)** Хроматограми неозрачене и UV-A озрачене смеше RFL-PL90 у метанолу, елуиране под изократским условима, метанолом, снимљени на таласној дужини максимума апсорбације конјугованих диена ($\lambda_{det.} = 234 \text{ nm}$). Ретенциона времена Per1-3 су 5,5 min; 6,5 min и 4,5 min, респективно. **(В)** Промене апсорпционих спектра Per1-3 (**В₁-В₃**), добијених са хроматограма снимљених на 234 nm, са порастом времена континуалног UV-A озрачивања ($t_{irr.}$). **(С)** Кинетика UV-A индуковане продукције Per1-3 (**С₁-С₃**), праћена преко пораста површине одговарајућих пикова Per1-3 на хроматограмима снимљеним на 234 nm у функцији од времена UV-A озрачивања, $\ln P_{234 \text{ nm}} = f(t_{irr.})$. Одговарајуће константе продукције Per1-3 ($k_{prod,Per1-3}$) и коефицијенти детерминације су приказани на слици.

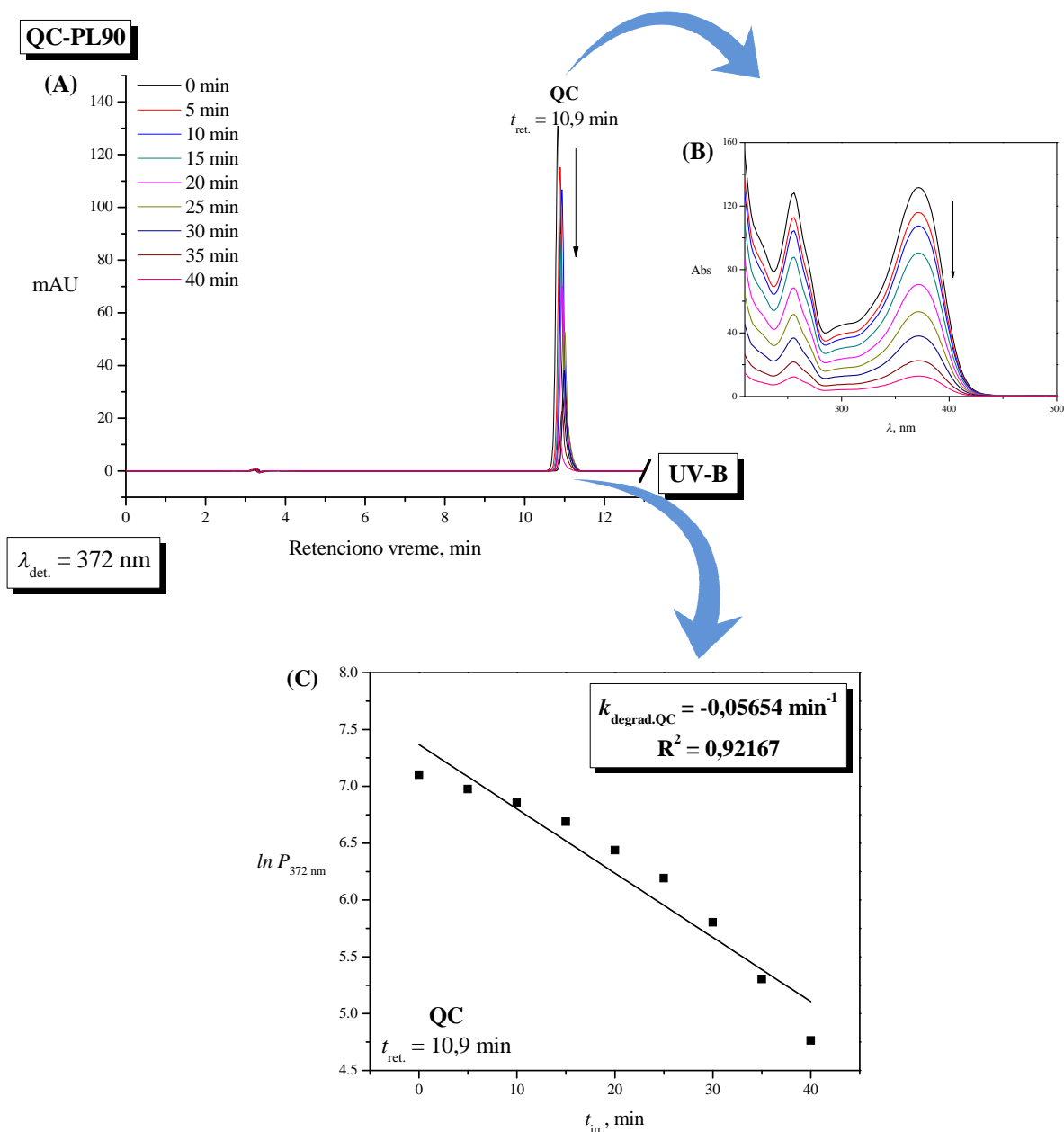
Хроматограми неозрачене и UV-B озрачиване смеше кверцетина и фосфолипида (из смеше RFL-QC-PL90) у метанолу снимљени на 372 nm су приказани на **Слици 71А**. Промене апсорпционих спектра QC-а, добијених са претходно снимљених хроматограма су дате на **Слици 71В**, док је кинетика његове деградације, праћена преко смањења површине пика на хроматограмима снимљеним на 372 nm са порастом времена континуалног UV-B озрачивања дата на **Слици 71С**.

На **Слици 72А** су дати хроматограми неозрачене и UV-B озрачиване смеше рибофлавина, кверцетина и фосфолипида у метанолу, снимљени на 390 nm и приказани до 13. min анализе. **Слика 72В₁** и **В₂** даје приказ промена апсорпционих спектра рибофлавина и кверцетина, добијених са хроматограма снимљених на 445 nm и 372 nm, респективно док је кинетика њихове деградације, у аеробним и анаеробним условима, са порастом времена UV-B озрачивања приказана на **Слици 72С₁** и **С₂**, респективно.

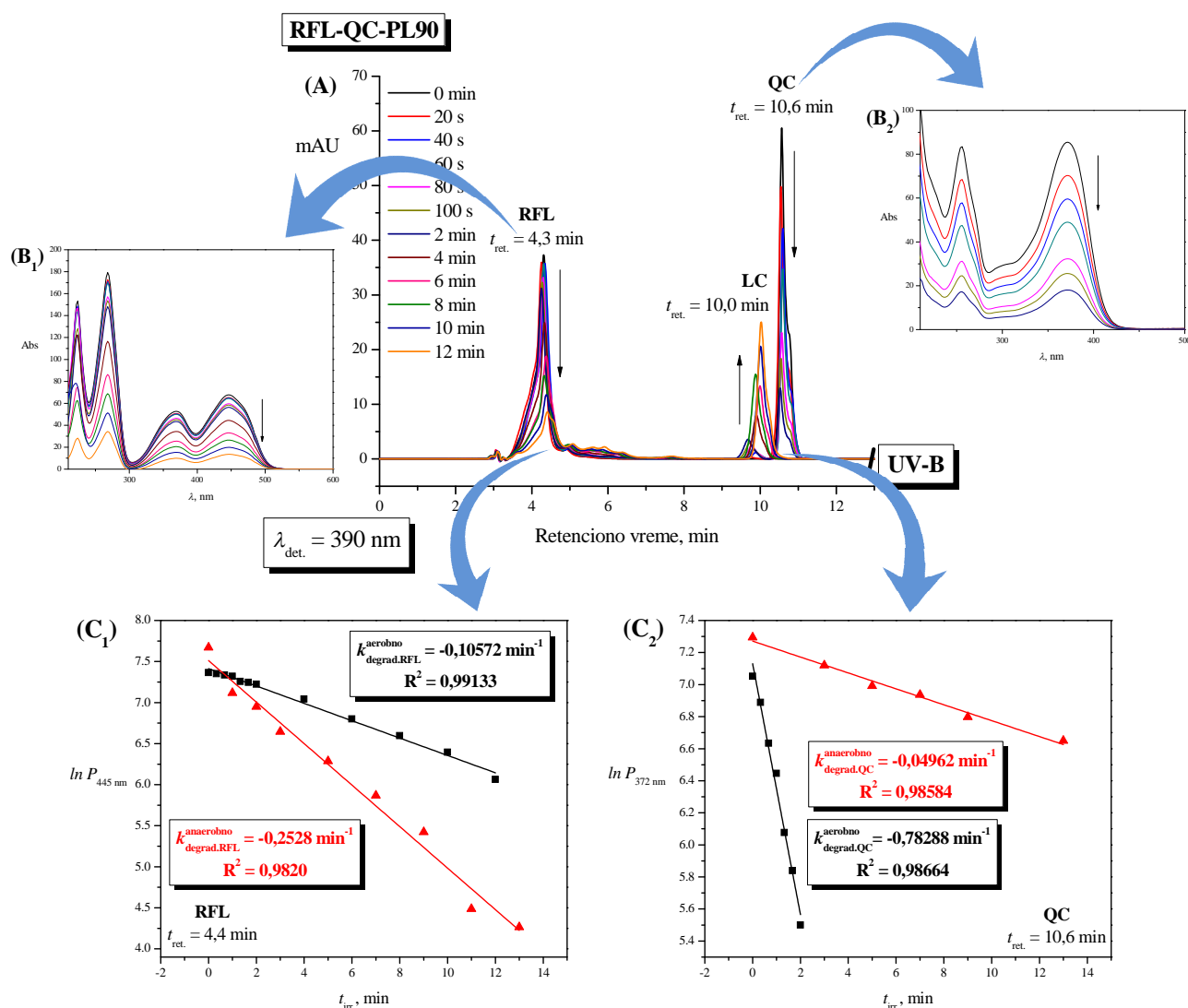
Изократским елуирањем смеше рибофлавина, кверцетина и фосфолипида метанолом и праћењем сигнала на 234 nm добијени су хроматограми неозрачене и UV-A озрачиване смеше у метанолу, приказани на **Слици 73А**. Део хроматограма у коме је уочена појава конјугованих диенских структура је увећан. На **Слици 73В₁** и **В₂** су приказане промене апсорпционих спектра Per1 и 2 идентификованих на ретенционим временима од 5,5 min и 6,5 min, респективно. Кинетика продукције Per1-3 праћена преко пораста површине истих са порастом времена континуалног UV-A озрачивања је дата на **Слици 73С₁₋₃**.

У **Табели 5** су дате константе брзине деградације рибофлавина и кверцетина у метанолу, појединачно и у смешама рибофлавин/кверцетин, рибофлавин/фосфолипиди, кверцетин/фосфолипиди, рибофлавин/кверцетин/фосфолипиди, у аеробним и анаеробним условима, добијене са хроматограма снимљених на одговарајућим таласним дужинама са порастом времена континуалног UV озрачивања.

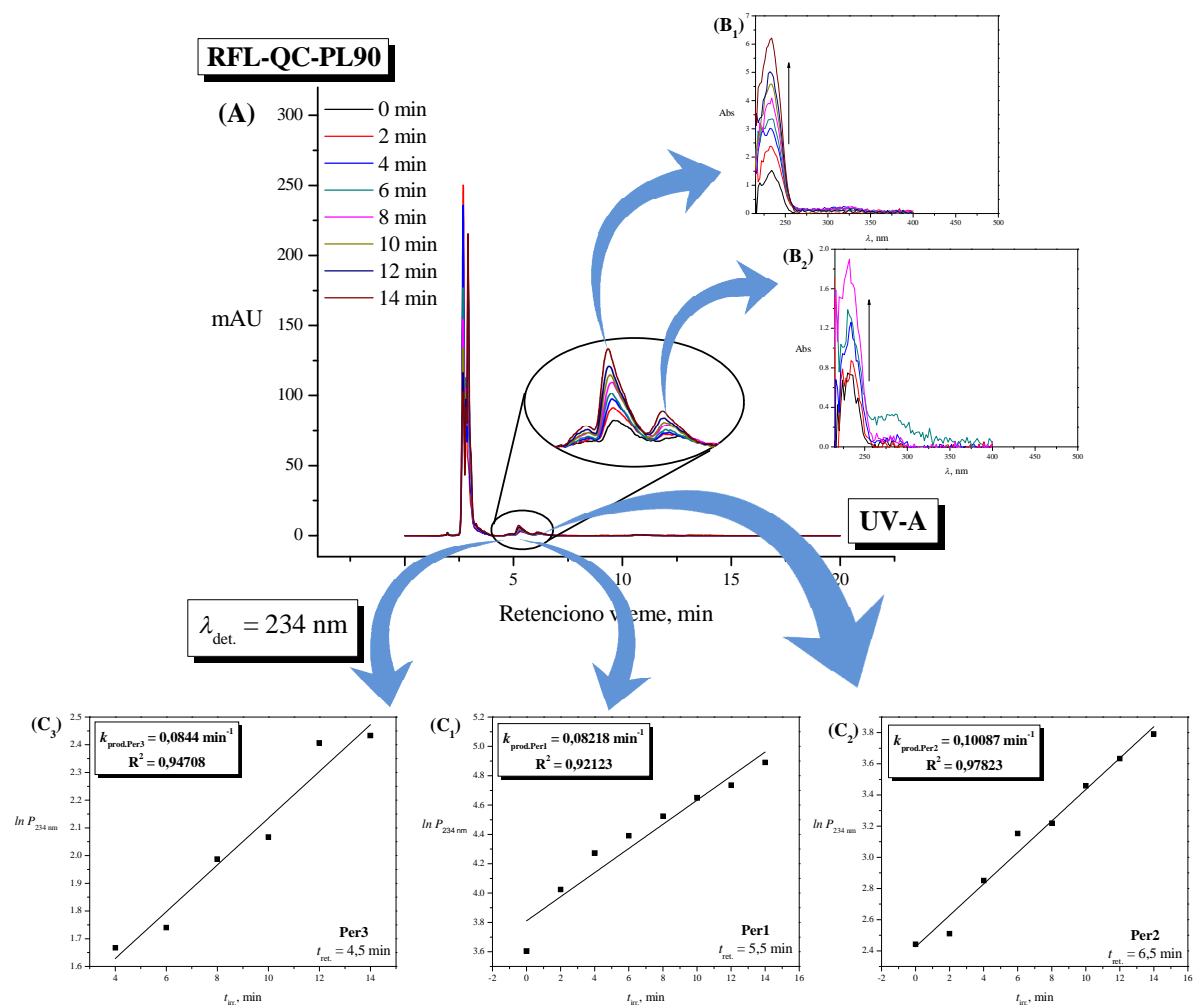
Табела 6 приказује константе брзине стварања пероксида, добијене са хроматограма смеша кверцетина и рибофлавина са фосфолипидима: кверцетин/фосфолипиди, рибофлавин/фосфолипиди и рибофлавин/кверцетин/фосфолипиди, у аеробним условима, са порастом времена озрачивања.



Слика 71 Смеша кверцетина и фосфолипида (QC-PL90) под условима у смеси RFL-QC-PL90. (A) Хроматограми неозрачене и UV-B озрачиване смеше QC-PL90 у метанолу, снимљени на таласној дужини максимума апсорбације Траке I QC-а ($\lambda_{det.} = 372 \text{ nm}$) приказани до 13. min анализе. Ретенциона времена ($t_{ret.}$) QC-а и NL-а су 10,9 min и 21,3 min, респективно. (B) Промене апсорпционих спектра QC-а, добијених са хроматограма снимљених на 372 nm, са порастом времена континуалног UV-B озрачивања ($t_{irr.}$). (C) Кинетика UV-B индукованог *bleaching*-а QC-а под аеробним условима, праћена преко смањења површине пика QC-а ($t_{ret.} = 10,7 \text{ min}$) на хроматограмима снимљеним на 372 nm, у функцији од времена UV-B озрачивања, $\ln P_{372 \text{ nm}} = f(t_{irr.})$. Одговарајућа константа *bleaching*-а ($k_{degrad.QC}$) и коефицијент детерминације су приказани на слици.



Слика 72 Смеша рибофлавина, кверцетина и фосфолипида (RFL-QC-PL90) у метанолу. (A) Хроматограми неозрачене и UV-B озрачиване смеше RFL-QC-PL90, снимљени на таласној дужини блиској максимуму апсорбанције LC-а ($\lambda_{det.} = 390$ nm), приказани до 13. min анализе. Ретенциона времена RFL-а, LC-а и QC-а су 4,3 min; 10,0 min и 10,6 min, респективно. (B) Промене апсорпционих спектра RFL-а (B₁) и QC-а (B₂), добијених са хроматограма снимљених на 445 nm и 390 nm, респективно, са порастом времена континуалног UV-B озрачивања ($t_{irr.}$). (C) Кинетика UV-B индукваног *bleaching*-а RFL-а (C₁) и QC-а (C₂) у аеробним (■) и анаеробним (▲) условима, праћена преко смањења површине пика RFL-а ($t_{ret.} = 4,3$ min) и QC-а ($t_{ret.} = 10,6$ min) на хроматограмима снимљеним на 445 nm и 372 nm, респективно у функцији од времена UV-B озрачивања – $\ln P_{445\text{ nm}} = f(t_{irr.})$ и $\ln P_{372\text{ nm}} = f(t_{irr.})$. Одговарајуће константе *bleaching*-а RFL-а ($k_{degrad.RFL}^{aerobno}$, $k_{degrad.RFL}^{anaerobno}$, $k_{degrad.QC}^{aerobno}$ и $k_{degrad.QC}^{anaerobno}$) и коефицијенти детерминације су приказани на слици.



Слика 73 Смеша рибофлавина, кверцетина и фосфолипида (RFL-QC-PL90) у метанолу. **(А)** Хроматограми неозрачене и UV-A озрачиване меше RFL-QC-PL90 у метанолу, елуиране под изократским условима, метанолом, праћени на таласној дужини максимума апсорбанције конјугованих диена ($\lambda_{det.} = 234 \text{ nm}$). Ретенциона времена Per1-3 су 5,5 min; 6,5 min и 4,5 min, респективно. **(В)** Промене апсорпционих спектра Per1-3 (**В₁**-**В₃**), добијених са хроматограма снимљених на 234 nm, са порастом времена континуалног UV-A озрачивања ($t_{irr.}$). **(С)** Кинетика UV-A индуковане продукције Per1-3 (**С₁**-**С₃**), праћена преко пораста површине одговарајућих пикова Per1-3 на хроматограмима снимљеним на 234 nm у функцији од времена UV-A озрачивања, $\ln P_{234 \text{ nm}} = f(t_{irr.})$. Одговарајуће константе продукције Per1-3 ($k_{prod,Per1-3}$) и коефицијенти детерминације су приказани на слици.

Табела 5 Константе брзине деградације ($k_{\text{degrad.}}, \text{min}^{-1}$) рибофлавина (RFL) и кверцетина (QC) у аеробним и анаеробним условима, добијених као нагиб (праволинијске) зависности \ln -ованих вредности површина пикова са хроматограма рибофлавина (RFL), кверцетина (QC) и смеша рибофлавин/кверцетин (RFL-QC), рибофлавин/фосфолипиди (RFL-PL90), кверцетин/фосфолипиди (QC-PL90) и рибофлавин/кверцетин/фосфолипиди (RFL-QC-PL90) у метанолау, снимљених на 445 nm (RFL) и 372 nm (QC) у функцији од времена континуалног UV озрачивања – $\ln P_{445/372 \text{ nm}} = f(t_{\text{irr.}})$. Зависност прати кинетику првог реда.

	$k_{\text{degrad.}}, \text{min}^{-1}$							
	RFL $t_{\text{ret.}} = 4,2 \text{ min}$				QC $t_{\text{ret.}} = 10,4 \text{ min}$			
	аеробно		анаеробно		аеробно		анаеробно	
	UV-A	UV-B	UV-A	UV-B	UV-A	UV-B	UV-A	UV-B
RFL	-0,38563	-0,20527	-1,43168	-0,35009	x	x	x	x
QC	x	x	x	x	-0,00389	-0,01919	x	x
RFL-QC	-0,15990	-0,10656	-0,23308	-0,24369	-1,14472	-1,36834	-0,02774	-0,05511
RFL-PL90	-0,22386	-0,21549	-0,38263	-0,37456	x	x	x	x
QC-PL90	x	x	x	x	-0,00296	-0,05654	x	x
RFL-QC-PL90	-0,12812	-0,10572	-0,24251	-0,25280	-1,60921	-0,78288	-0,05631	-0,04461

x – компонента није присутна у смеси

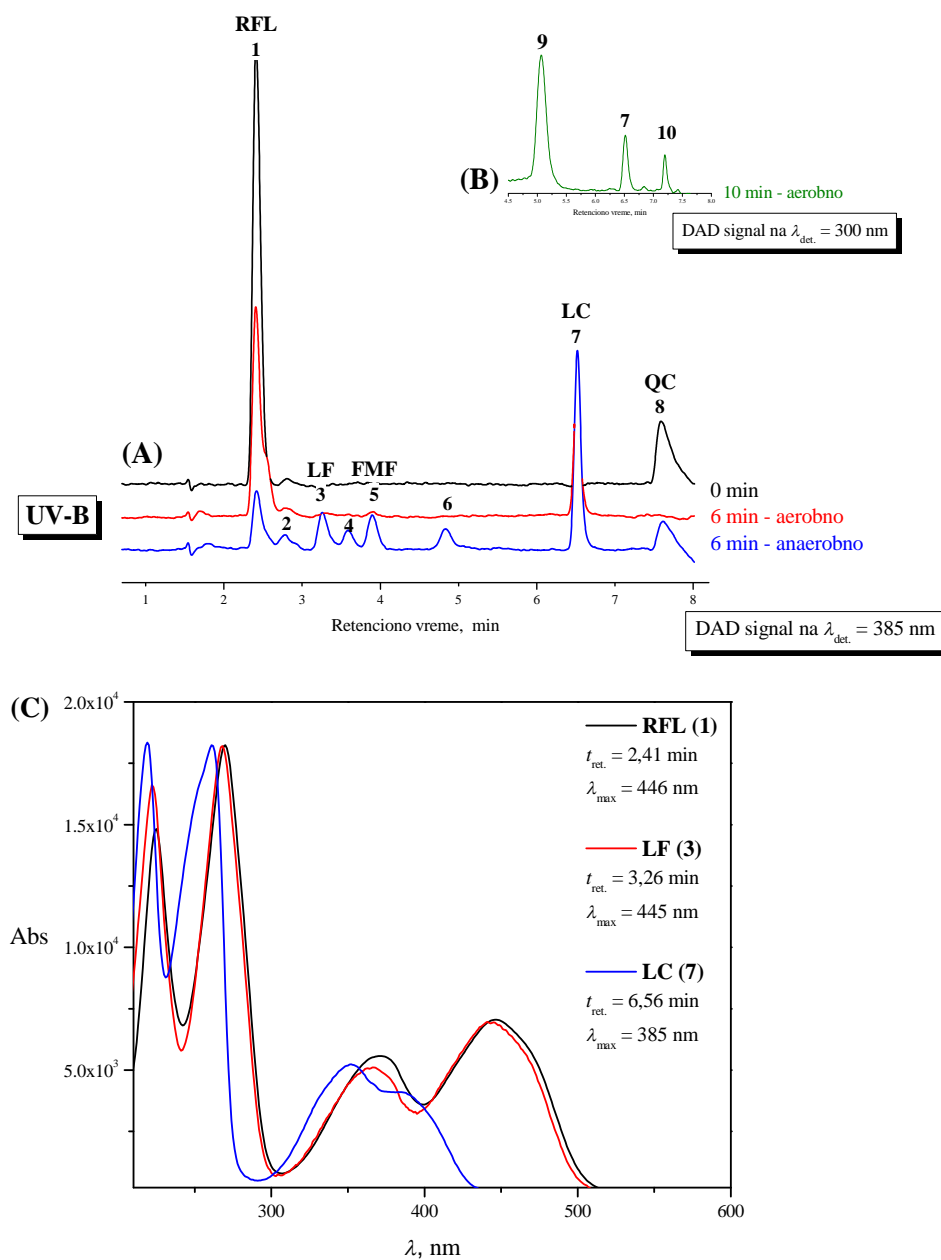
Табела 6 Константе брзине стварања пероксида (min^{-1}) – продуката UV-индуковане фотосензибилизације липидне пероксидације, добијених као нагиб (праволинијске) зависности \ln -ованих вредности површина пикова добијених са хроматограма смеша кверцетин/фосфолипиди (QC-PL90), рибофлавин/фосфолипиди (RFL-PL90) и рибофлавин/кверцетин/фосфолипиди (RFL-QC-PL90) у метанолау, снимљених на 234 nm, у функцији од времена континуалног UV озрачивања – $\ln P_{234 \text{ nm}} = f(t_{\text{irr.}})$. Зависност прати кинетику првог реда.

	$k_{\text{prod.}}, \text{min}^{-1}$					
	Per1 $t_{\text{ret.}} = 5,5 \text{ min}$		Per2 $t_{\text{ret.}} = 6,5 \text{ min}$		Per3 $t_{\text{ret.}} = 4,5 \text{ min}$	
	UV-A	UV-B	UV-A	UV-B	UV-A	UV-B
QC-PL90	0,00164	-0,02005	0,00541	-0,02120	x	x
RFL-PL90	0,10388	0,05103	0,11833	0,06769	0,06885	x
RFL-QC-PL90	0,08218	0,04859	0,10087	0,04820	0,08440	x

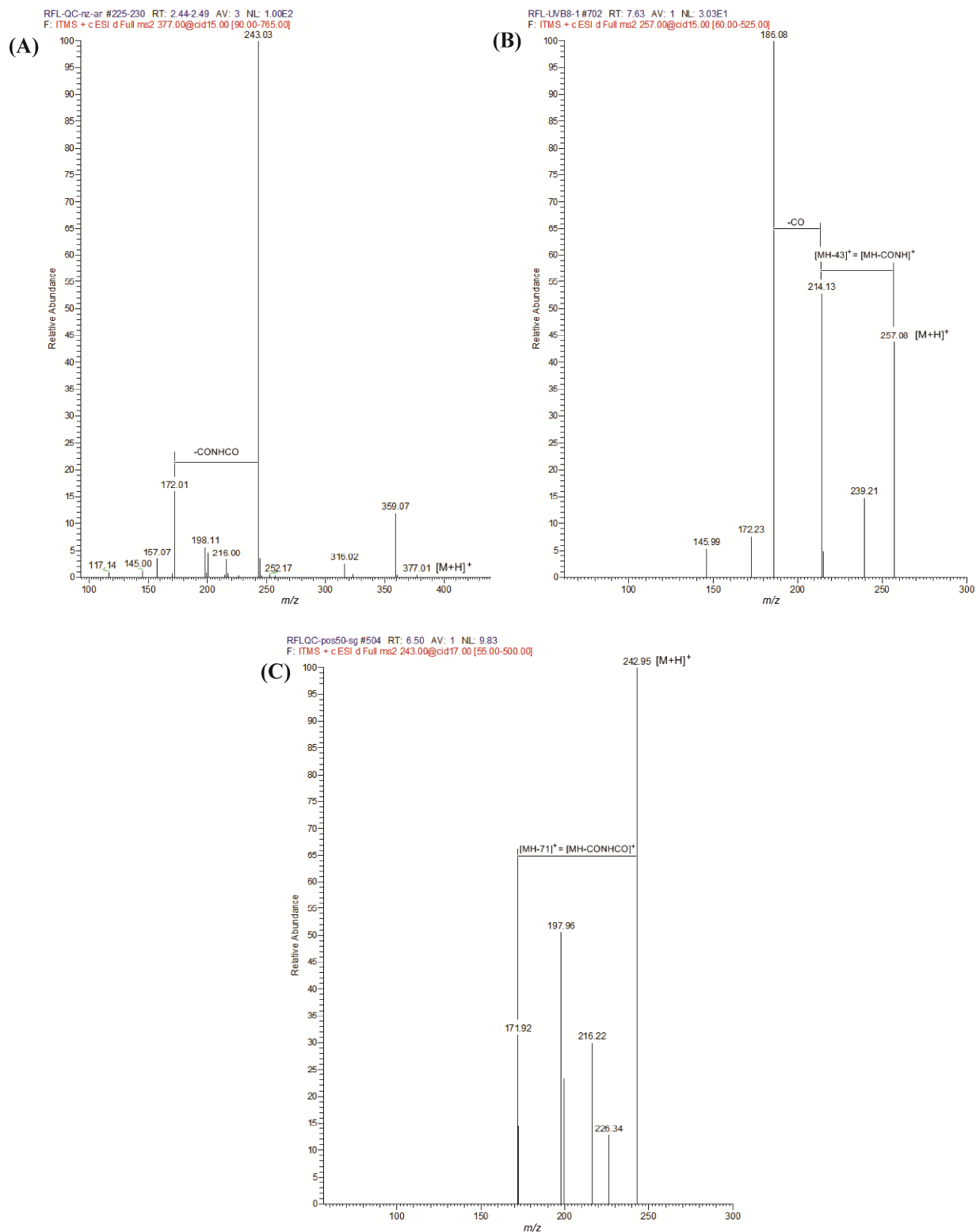
x – компонента није присутна у смеси

5.3.2 UHPLC-ESI-MS анализа смеше RFL-QC

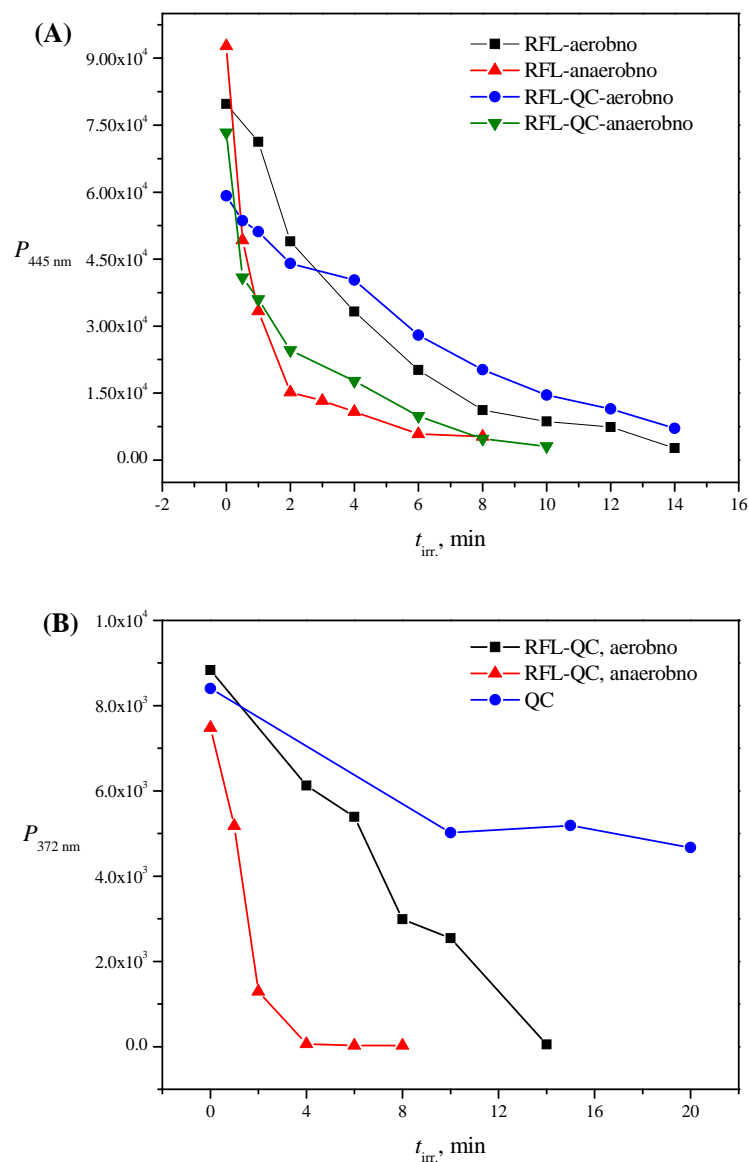
Као код билирубина, и са рибофлавином је, у циљу идентификације његових деградационих производа коришћена UHPLC-ESI-MS техника. Хроматограми неозрачене и UV-B 6 min озрачиване смеше рибофлавина и кверцетина у метанолу, под аеробним и анаеробним условима, снимљени на таласној дужини максимума апсорбанције LC-а (385 nm) су приказани на **Слици 74А**. Део хроматограма, снимљен на таласној дужини максимума апсорбанције деградационих производа кверцетина (300 nm) је дат у инкременту Сликe 74А – **Сл.74В**. Упоредни приказ апсорпционих спектра рибофлавина и награђених фотопродуката – лумифлавина и лумихрома је дат на **Слици 74С** док су њихови MS² спектри приказани на **Слици 75А-С**, респективно. Динамика промене површине пикова рибофлавина „самог” и у смеши са кверцетином односно кверцетина „самог” и у смеши са рибофлавином у метанолу, на DAD хроматограмима снимљеним на 445 nm (RFL) и 372 nm (QC), у аеробним и анаеробним условима, је приказана на **Слици 76А** и **В**, респективно. Са друге стране, динамика настајања лумифлавина и лумихрома, у раствору рибофлавина у метанолу и у смеши рибофлавина и кверцетина, под аеробним и анаеробним условима, на хроматограмима снимљеним на 445 nm (LF) и 385 nm (LC) је приказана на **Слици 77А** и **В**, респективно. Коначно, **Табела 7** даје ESI-MS/MS спектралне податке рибофлавина, кверцетина и њихових деградационих производа насталих под дејством континуалног UV-B озрачивања.



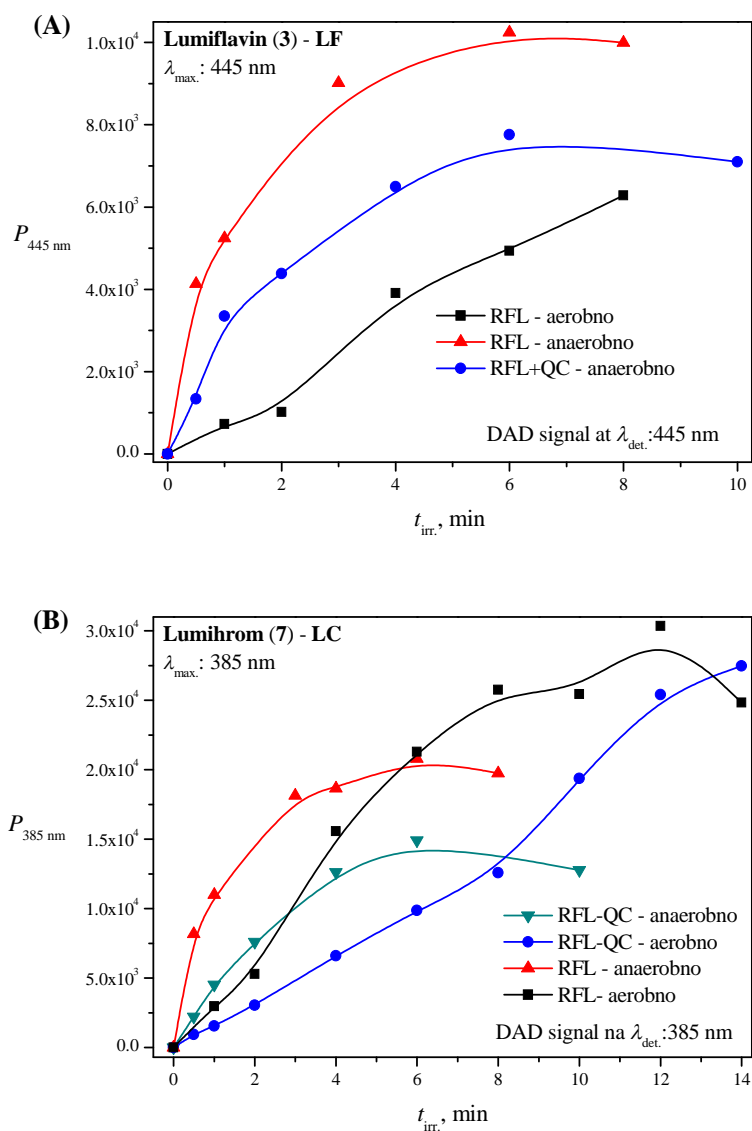
Слика 74 Смеша рибофлавина и кверцетина у метанолу. **(А)** УНПЛС хроматограми неозраченог и UV-B 6 min озраченог раствора (у **аеробним** и **анаеробним** условима), снимљени на таласној дужини ($\lambda_{det.}$) максимума апсорбације LC-а, 385 nm. У инкременту **(В)** је приказан део хроматограма мешане RFL-QC зрачен 10 min UV-B светлошћу под **аеробним** условима, снимљен на 300 nm. **(С)** Апсорпциони спектри рибофлавина (RFL, $t_{ret.} = 2,41$ min) и наглађених деградационих производа RFL-а: лумифлавина (LF, $t_{ret.} = 3,26$ min) и лумихрома (LC, $t_{ret.} = 6,56$ min) – пикови обележени бројевима 1, 3 и 7 на хроматограмима приказаним под **(А)**, респективно.



Слика 75 ESI-MS/MS спектри рибофлавина (A) и његових деградационих продуката, лумифлавина (B) и лумихрома (C).



Слика 76 Динамика промене површине пикова рибофлавина „самог” (под аеробним и анаеробним условима) и у смеси са кверцетином у метанолу (под аеробним и анаеробним условима) **(А)**; кверцетина „самог” и у смеси са рибофлавином у метанолу (под аеробним и анаеробним условима) **(В)** на DAD хроматограмима снимљеним на таласним дужинама максимума апсорбанције RFL-а и QC-а – 445 nm и 372 nm, респективно, са порастом времена континуалног UV-B озрачивања.



Слика 77 Динамика промене површине пикова лумифлавина – LF (A) и лумихрома – LC (B) (пикови обележени бројевима 3 и 7 на хроматограмима приказаним на **Слици 74A**) из раствора рибофлавина (RFL) и из смеше рибофлавина и кверцетина (RFL-QC) у метанолу (под аеробним и анаеробним условима), добијених са DAD хроматограма снимљених на таласним дужинама максимума апсорбанције RFL-а и LC-а – 445 nm и 385 nm, респективно, са порастом времена континуалног UV-B озрачивања.

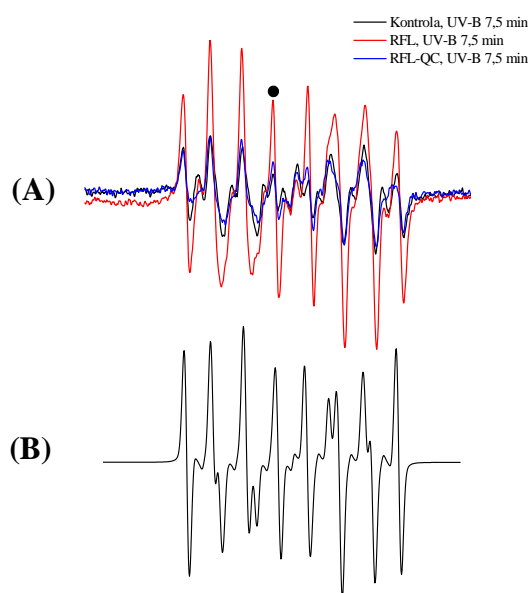
Табела 7 MS/MS спектрални подаци рибофлавина, кверцетина и њихових деградационих продуката добијених ESI-MS спектрометријом као последица континуалног UV-B озрачивања смеше RFL-QC у метанолу

Пик	$t_{ret.}, min$		λ_{max}, nm	$m/z [M-H]^-$	$m/z [M+H]^+$	MS/MS од ^b $[M+H]^+ / ^c[M-H]^-$
	1.	2.				
1	2,41	6,49	446	375	377	359 ^b , 243(100%), 216, 198, 172
2	2,58	6,76	445	-	375	243 ^b
3	3,26	7,60	445	255	257	214 ^b , 186(100%)
4	3,64	8,01	445	-	283	-
5	3,90	8,30	449	283	285	253 ^b
6	4,81	8,93	450			
9^a	5,11		295	363	365	347 ^b , 333(100%) 331 ^c
7	6,56	9,99	385	241	243	216 ^b , 198, 172
10^a	7,20		300	347	349	211 ^c
8	7,60		372	301	303	285 ^b

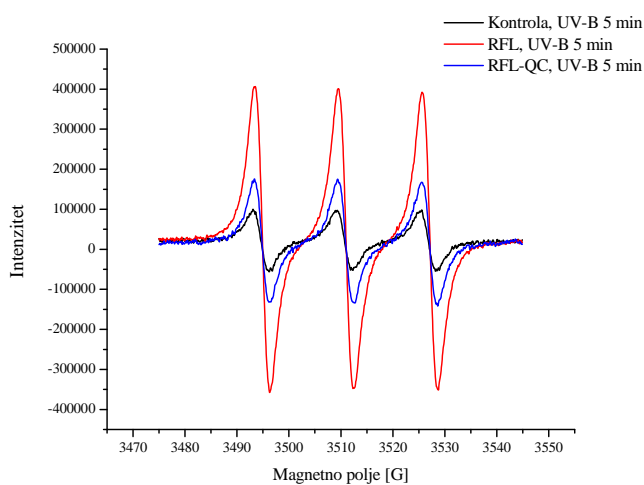
^a Деградациони производи кверцетина; MS/MS фрагментни јони у ^bпозитивном и ^cнегативном модалитету

5.3.3 EPR *spin trapping* анализа смеше RFL-QC

Потенцијал генерисања слободних радикала рибофлавином је анализиран EPR спектроскопијом. На Сликама 78А и 79 су приказани EPR спектри DEPMPO/OOH (црним кружићем је обележен карактеристичан пик адукта) и TEMPO адуката, генерисаних у метанолном раствору рибофлавина и смеси рибофлавина и кверцетина у метанолу, током UV-B озрачивања у трајању од 7,5 min и 5 min, респективно. EPR спектар симулираног DEPMPO/OOH адукта је приказан на Слици 78В.



Слика 78 EPR спектри DEPMPO/OOH адукта генерисаног континуалним UV-B озрачивањем рибофлавина (RFL) и смеше рибофлавина и кверцетина (RFL-QC) у метанолу током 7,5 min (А). Црним кружићем је обележен карактеристичан пик адукта. (В) Симулациони спектар DEPMPO/OOH адукта.



Слика 79 EPR спектри TEMPO/¹O₂ (TEMPO) адукта генерисаног континуалним UV-B озрачивањем рибофлавина (RFL) и смеше рибофлавина и кверцетина (RFL-QC) у метанолу током 5 min.

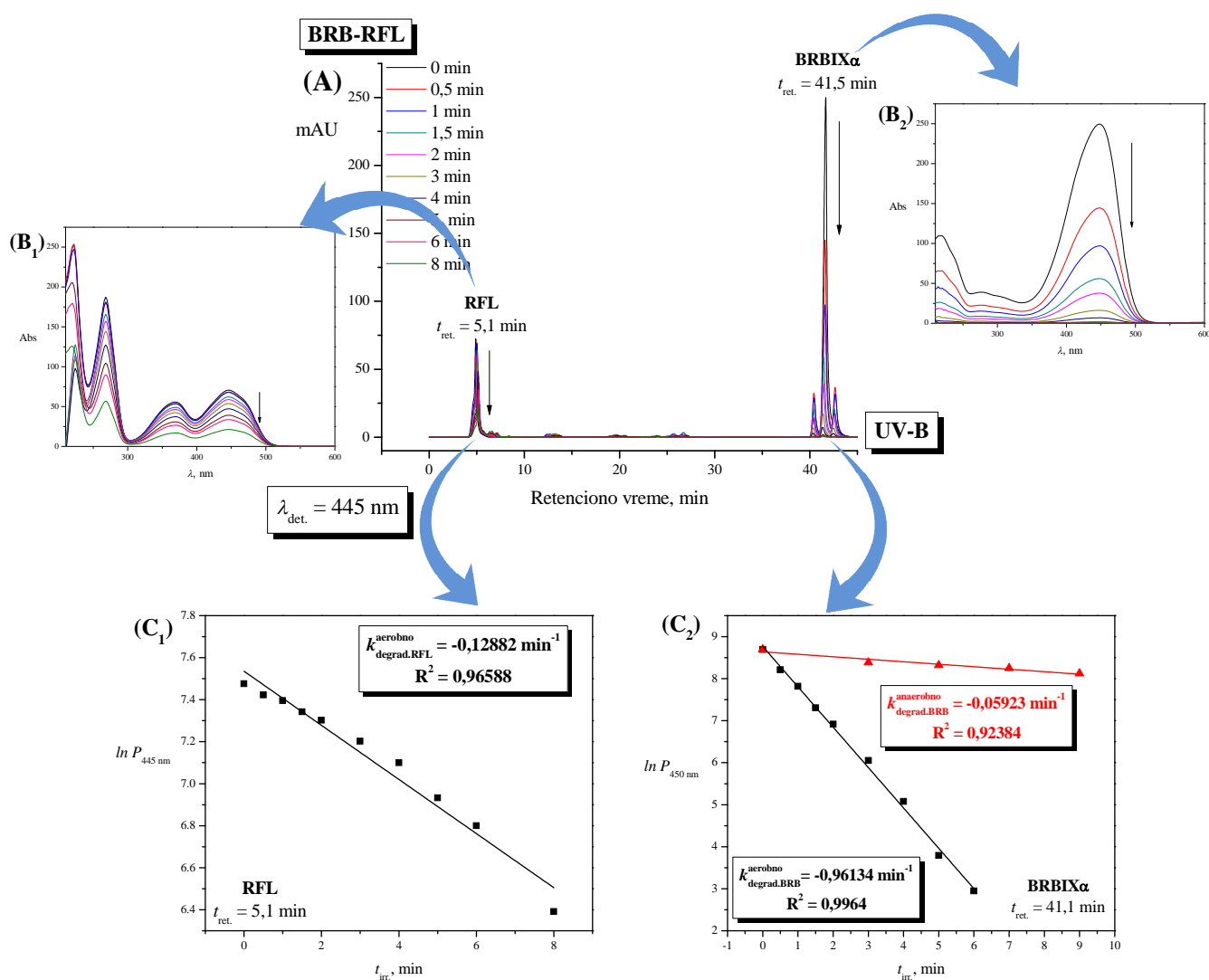
5.4 UV индуковане промене „бинарне” смеше

5.4.1 RP-HPLC анализа „бинарне” смеше

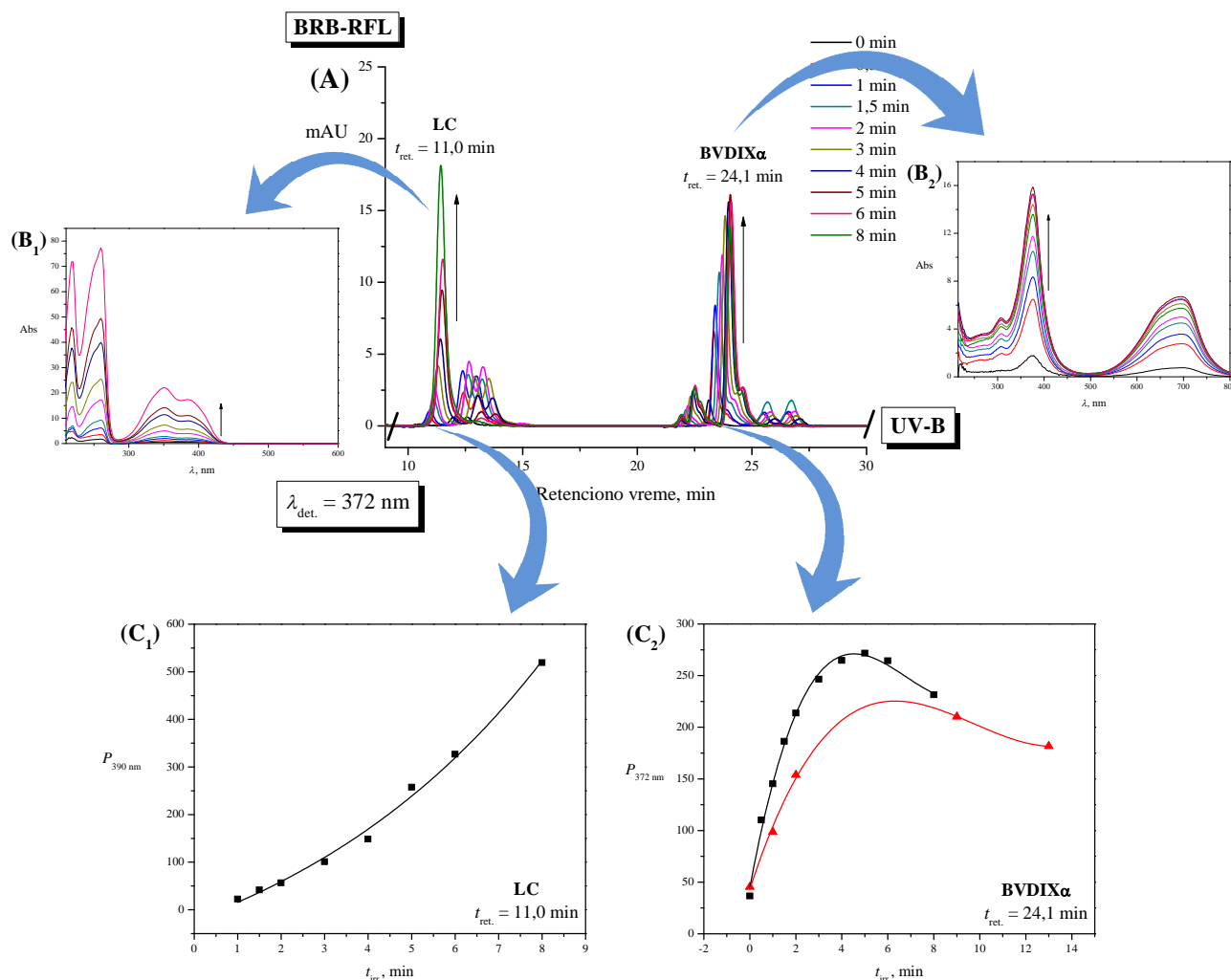
Хроматограми неозрачене и UV-B озрачиване смеше билирубина и рибофлавина, снимљени на таласној дужини од 445 nm и 372 nm (приказани од 9. до 30. min анализе) су дати на **Сликама 80А** и **81А**, респективно. Промене апсорпционих спектра рибофлавина и билирубина одн. лумихрома и биливердина са хроматограма снимљених на 445 nm и 450 nm одн. 390 nm и 372 nm су приказани на **Слици 80В₁** и **В₂** односно **Слици 81В₁** и **В₂**, респективно. Кинетика деградације рибофлавина у аеробним условима и билирубина у аеробним и анаеробним условима са порастом времена континуалног UV-B озрачивања је дата на **Слици 80С₁** и **С₂**, док је динамика настанка лумихрома и биливердина праћена преко промена површина њихових пикова на одговарајућим хроматограмима приказана на **Слици 81С₁** и **С₂**, респективно.

На **Слици 82А** су дати хроматограми неозраченог и UV-B озрачиваног раствора билирубина (под условима у смеши BRB-RFL) у метанолу, снимљени на 372 nm. Промене апсорпционих спектра биливердина и билирубина, добијених са хроматограма снимљених на 372 nm и 450 nm са порастом времена UV-B озрачивања су приказане на **Слици 82В₁** и **В₂**, респективно. Кинетика настанка биливердина и деградације билирубина у аеробним условима праћене преко смањења (BRBIX α) одн. пораста (BVDIX α) површине пика на одговарајућим хроматограмима, са порастом времена UV-B озрачивања је приказана на **Слици 82С₁** и **С₂**, респективно.

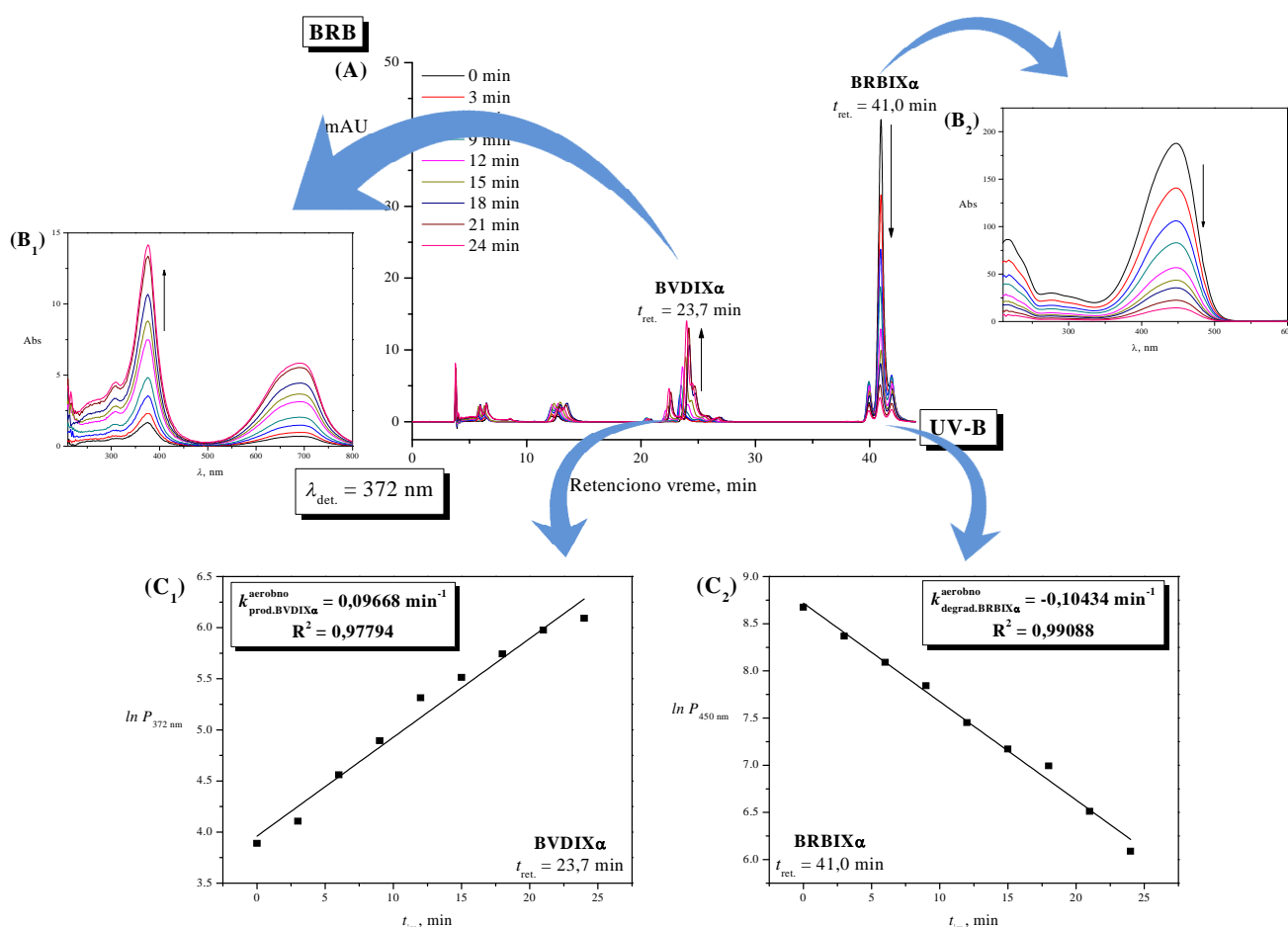
Хроматограми неозраченог и UV-B озрачиваног раствора кверцетина (из „бинарне” – BRB-RFL-QC-PL90 и „тернарне” – BZP-BRB-RFL-QC-PL90 смеше) у метанолу, у аеробним условима, снимљени на 372 nm и 295 nm су приказани на **Сликама 83А** и **84А**. Промене апсорпционих спектра кверцетина и наgraђеног QCDP1, добијених са претходно (на 372 nm и 295 nm) снимљених хроматограма су приказане на **Сликама 83В** и **84В**, док су кинетика деградације QC-а и кинетика настанка QCDP1 праћене са порастом времена континуалног UV-B озрачивања приказане на **Сликама 83С** и **84С**.



Слика 80 Смеша билирубина и рибофлавина (BRB-RFL) у метанолу. **(A)** Хроматограми неозрачене и UV-B озрачиване смеше BRB-RFL, снимљени на таласној дужини максимума апсорбанције RFL-а ($\lambda_{det} = 445 \text{ nm}$). Ретенциона времена RFL-а и BRBIX α су 5,1 min и 41,5 min, респективно. **(B)** Промене апсорпционих спектра RFL-а (**B₁**) и BRBIX α (**B₂**), добијених са хроматограма снимљених на 445 nm и 450 nm, респективно, са порастом времена континуалног UV-B озрачивања (t_{irr}). **(C)** Кинетика UV-B индукованог *bleaching*-а RFL-а у аеробним условима (**C₁**) и BRBIX α (**C₂**) у аеробним (■) и анаеробним (▲) условима, праћена преко смањења површине пика RFL-а ($t_{ret} = 5,1 \text{ min}$) и BRBIX α ($t_{ret} = 41,5 \text{ min}$) на хроматограмима снимљеним на 445 nm и 372 nm, респективно у функцији од времена UV-B озрачивања $-\ln P_{445 \text{ nm}} = f(t_{irr})$ и $\ln P_{450 \text{ nm}} = f(t_{irr})$. Одговарајуће константе *bleaching*-а ($k_{degrad.RFL}^{aerobno}$, $k_{degrad.BRBIX\alpha}^{aerobno}$ и $k_{degrad.BRBIX\alpha}^{anaerobno}$) и коефицијенти детерминације су приказани на слици.

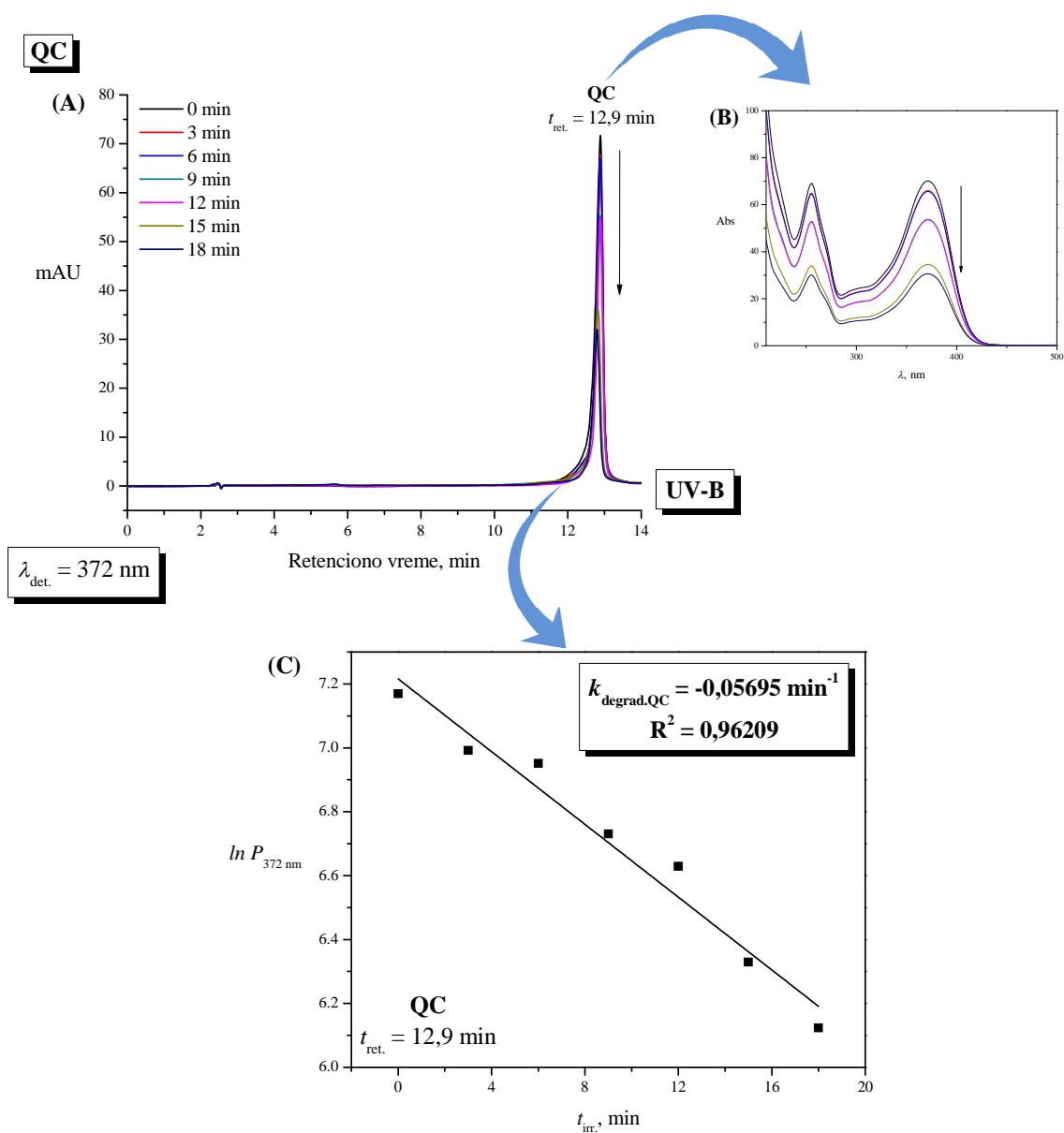


Слика 81 Смеша билирубина и рибофлавина (BRB-RFL) у метанолу. **(А)** Хроматограми неозрачене и UV-B озрачиване смеше BRB-RFL у метанолу, снимљени на таласној дужини блиској максимуму апсорбанције BVD-a ($\lambda_{det.} = 372$ nm). Ретенциона времена ($t_{ret.}$) LC-а и BVDIX α су 11,0 min и 24,1 min, респективно. **(В)** Промене апсорпционих спектра LC-а (**В₁**) и BVDIX α добијених са хроматограма снимљених на 390 nm и 372 nm, респективно са порастом времена континуалног UV-B озрачивања ($t_{irr.}$). **(С)** Динамика UV-B индукованог настанка LC-а под аеробним условима (**С₁**) и BVDIX α под аеробним (■) и анаеробним (▲) условима (**С₂**) праћена преко промене површине пика LC-а ($t_{ret.} = 11,0$ min) и BVDIX α ($t_{ret.} = 24,1$ min) на хроматограмима снимљеним на 390 nm и 372 nm, респективно у функцији од времена UV-B озрачивања.



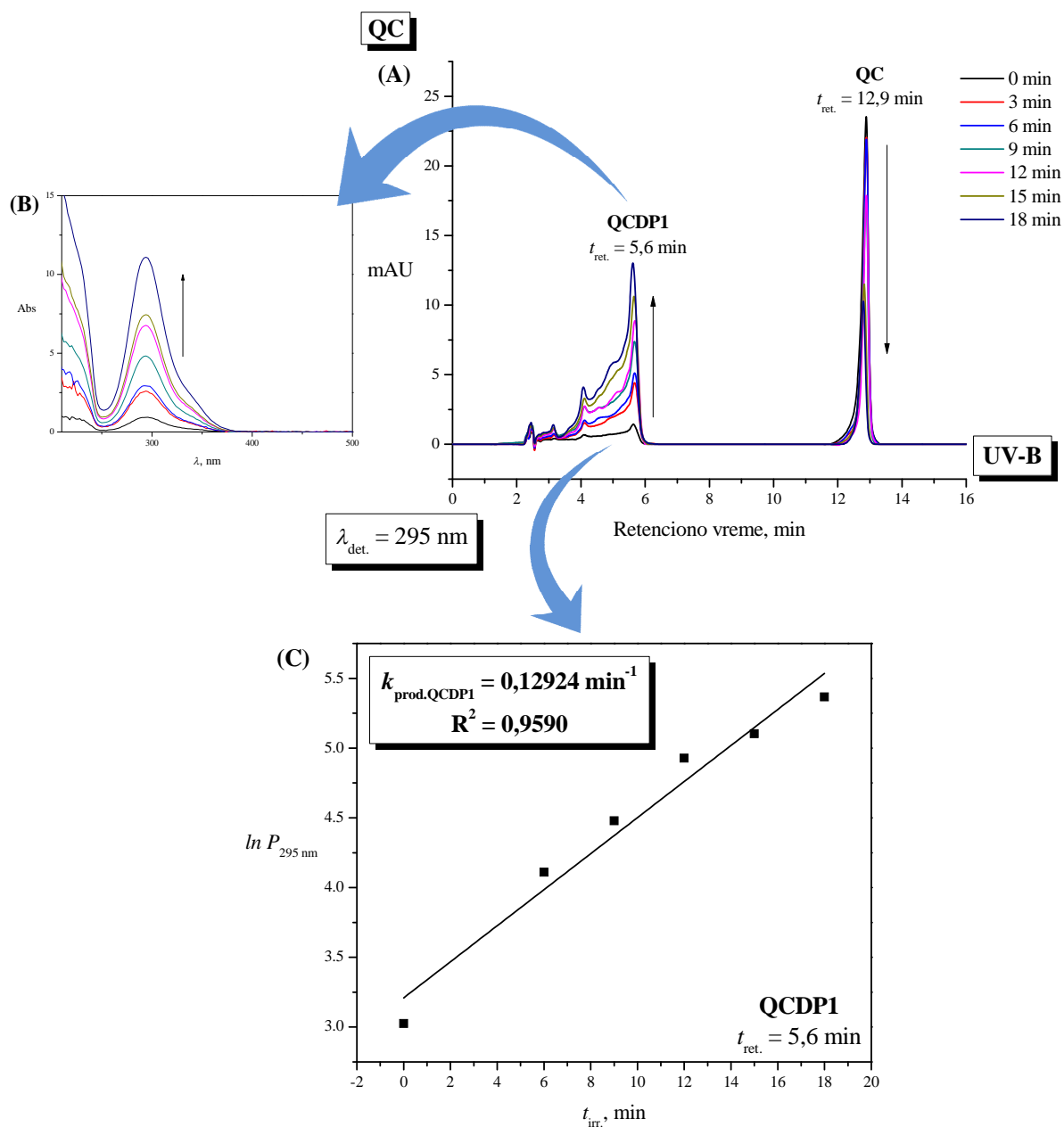
Слика 82 Билирубин (BRB) под условима у смеси BRB-RFL⁵¹ у метанолу. **(A)** Хроматограми неозраченог и UV-B озраченог раствора BRB-а, у аеробним условима, снимљени на таласној дужини блиској максимуму апсорбације BVDIXα ($\lambda_{\text{det.}} = 372 \text{ nm}$). Ретенциона времена ($t_{\text{ret.}}$) BVDIXα и BRBIXα су 23,7 min и 41,0 min, респективно. **(B)** Промене апсорпционих спектра BVDIXα (**B₁**) и BRBIXα (**B₂**) добијених са хроматограма снимљених на 372 nm и 450 nm, са порастом времена континуалног UV-B озрачивања ($t_{\text{irr.}}$), респективно. **(C)** Кинетика UV-B индукованог настанка BVDIXα (**C₁**) и *bleaching*-а BRBIXα (**C₂**) праћена преко повећања површине пика BVDIXα ($t_{\text{ret.}} = 23,7 \text{ min}$) и смањења површине пика BRBIXα ($t_{\text{ret.}} = 41,0 \text{ min}$) на хроматограмима снимљеним на 372 nm и 450 nm, респективно у функцији од времена UV-B озрачивања, $\ln P_{372 \text{ nm}} = f(t_{\text{irr.}})$ и $\ln P_{450 \text{ nm}} = f(t_{\text{irr.}})$. Константа продукције BVDIXα ($k_{\text{prod.BVDIX}\alpha}$) и *bleaching*-а BRBIXα ($k_{\text{degrad.BRBIX}\alpha}$) и одговарајући коефицијенти детерминације су приказани на слици.

⁵¹ Билирубин (BRB) у метанолу уз додаток 0,01 moldm⁻³ раствора NaOH у количини RFL-а присутног у смеси BRB-RFL.



Слика 83 Кверцетин под условима у смеши BRB-RFL-QC-PL90⁵² у метанолу. **(A)** Хроматограми неозраченог и (у аеробним условима) UV-B озрачиваног раствора QC-а у метанолу, снимљени на таласној дужини максимума апсорбанције Траке I ($\lambda_{det.} = 372 \text{ nm}$). Ретенционо време ($t_{ret.}$) QC-а је 12,9 min. **(B)** Промене апсорпционих спектра QC-а, добијених са хроматограма снимљених на 372 nm, са порастом времена континуалног UV-B озрачивања ($t_{irr.}$). **(C)** Кинетика UV-B индукованог *bleaching*-а QC-а, праћена преко смањења површине пика QC-а ($t_{ret.} = 10,7 \text{ min}$) на хроматограмима снимљеним на 372 nm, у функцији од времена UV-B озрачивања, $\ln P_{372 \text{ nm}} = f(t_{irr.})$. Одговарајућа константа *bleaching*-а ($k_{degrad.QC}$) и коефицијент детерминације су приказани на слици.

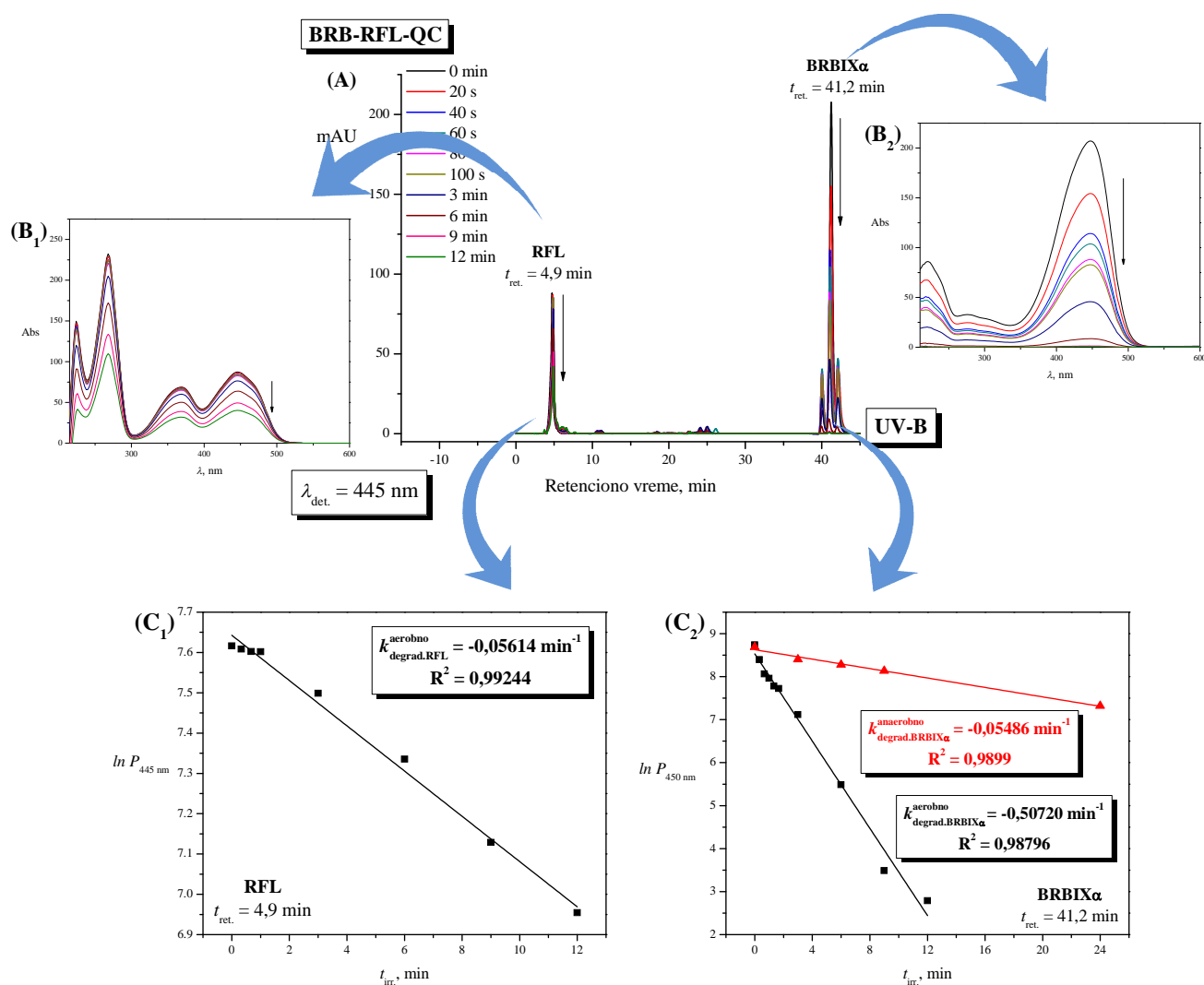
⁵² Кверцетин у метанолу уз додаток *blank* раствора BRB-а и 0,01 mol dm⁻³ раствора NaOH у количини BRB-а и RFL-а присутних у смеши BRB-RFL-QC-PL90, респективно.



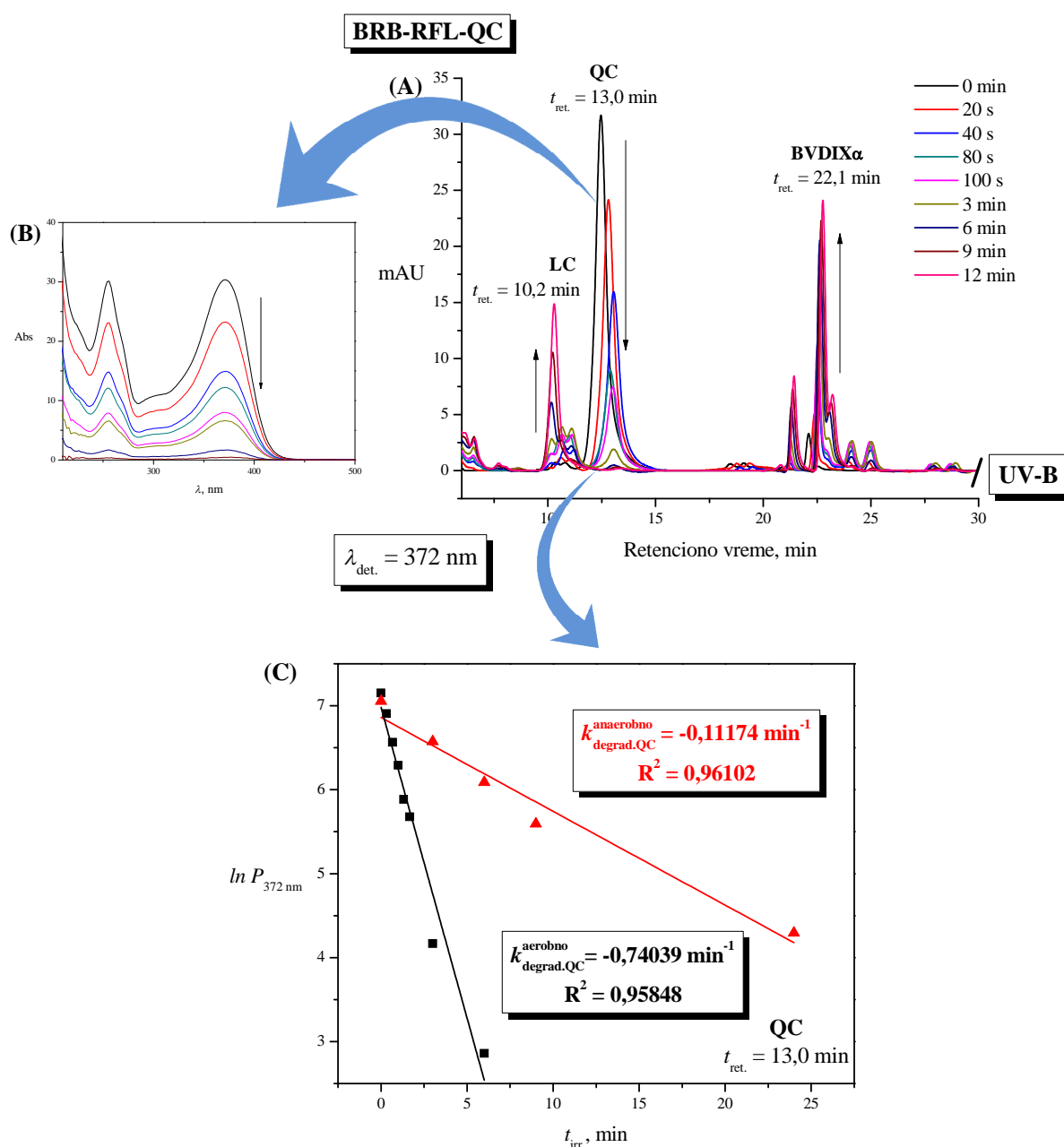
Слика 84 Кверцетин под условима у смеши BRB-RFL-QC-PL90 у метанолу. **(А)** Хроматограми неозраченог и UV-B озраченог раствора QC-а у метанолу, у аеробним условима, снимљени на таласној дужини максимума апсорбације потенцијалних деградационих производа QC-а ($\lambda_{det.} = 295 \text{ nm}$). Ретенционо време ($t_{ret.}$) QCDP1 је 5,6 min. **(Б)** Промене апсорпционих спектра QCDP1, добијених са хроматограма снимљених на 295 nm, са порастом времена континуалног UV-B озрачивања ($t_{irr.}$). **(С)** Кинетика UV-B индукованог настанка QCDP1, праћена преко пораста површине пика QCDP1 ($t_{ret.} = 5,6 \text{ min}$) на хроматограмима снимљеним на 295 nm, у функцији од времена UV-B озрачивања, $\ln P_{295 \text{ nm}} = f(t_{irr.})$. Одговарајућа константа продукције ($k_{prod.QCDP1}$) и коефицијент детерминације су приказани на слици.

Слике 85А и **86А** дају приказ хроматограма неозрачене и UV-B озрачиване смеше билирубина, рибофлавина и кверцетина у метанолу, снимљених на 445 nm и 372 nm, респективно. Промене апсорпционих спектра рибофлавина, билирубина и кверцетина, добијених са хроматограма снимљених на 445 nm, 450 nm и 372 nm су приказане на **Слици 85В₁** и **В₂** и **Слици 86В**, респективно. Кинетика деградације RFL-а у аеробним условима односно BRB-а и QC-а, у аеробним и анаеробним условима, добијене праћењем смањења површине њихових пикова на одговарајућим хроматограмима са порастом времена континуалног UV-B озрачивања су приказане, редом на **Слици 85С₁** и **С₂** и **Слици 86С**.

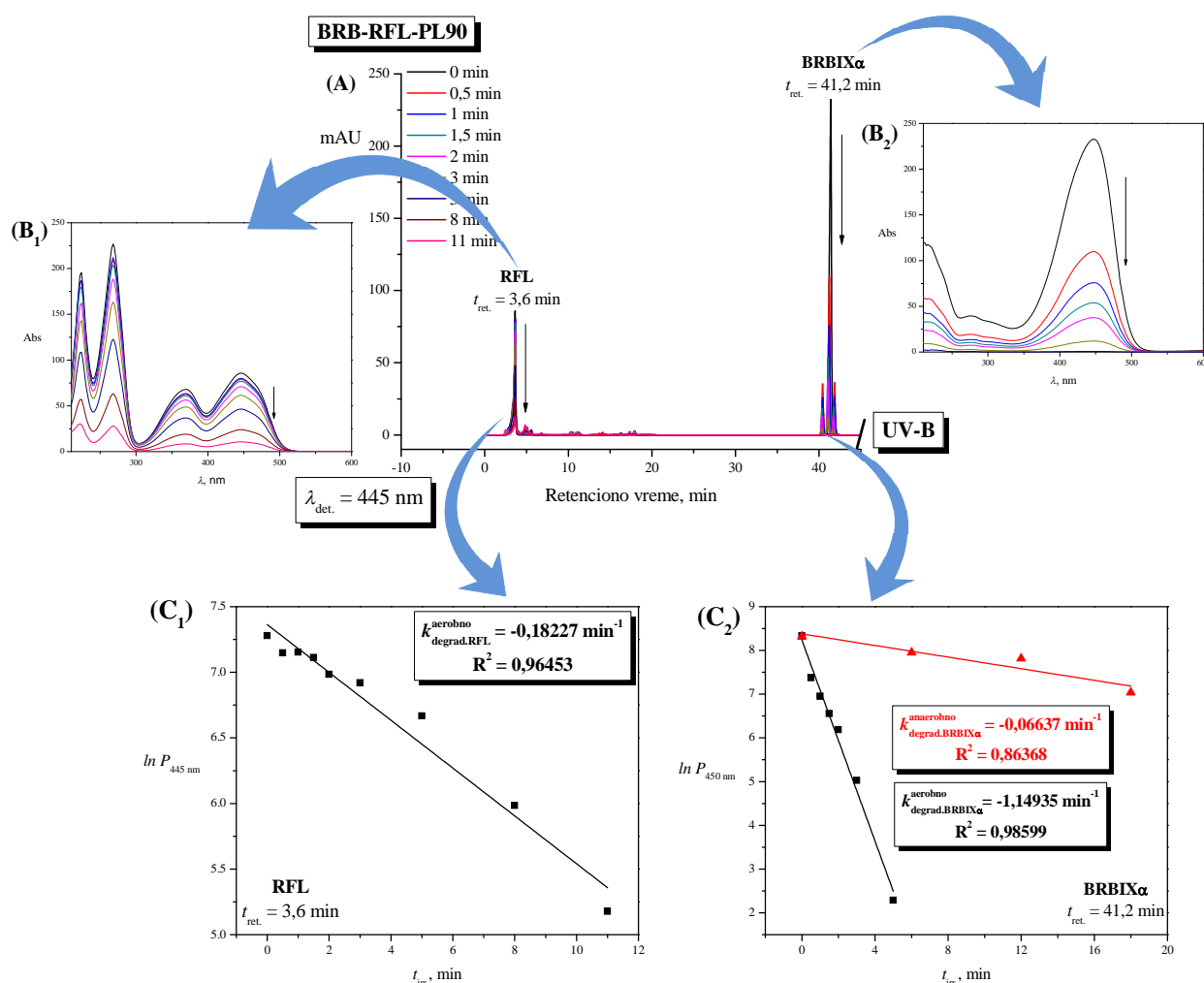
На **Сликама 87А** и **88А** су дати хроматограми неозрачене и UV-B озрачиване смеше билирубина, рибофлавина и фосфолипида у метанолу, снимљени на 445 nm и 372 nm, респективно. **Слика 87В₁** и **В₂** и **Слика 88В₁** и **В₂** дају, редом, приказ промена апсорпционих спектра рибофлавина и билирубина односно лумихрома и биливердина добијених са хроматограма снимљених на 445 nm и 450 nm односно 390 nm и 372 nm, са порастом времена UV-B озрачивања. Кинетика деградације рибофлавина у аеробним условима и билирубина, у аеробним и анаеробним условима, праћене преко смањења површине пика истих на одговарајућим хроматограмима, у зависности од времена континуалног UV-B озрачивања је приказана на **Слици 87С₁** и **С₂**, респективно. Динамика продукције њихових деградационих производа – LC-а у аеробним и BVDIXα у аеробним и анаеробним условима, са порастом времена UV-B озрачивања је приказана на **Слици 88С₁** и **С₂**, респективно.



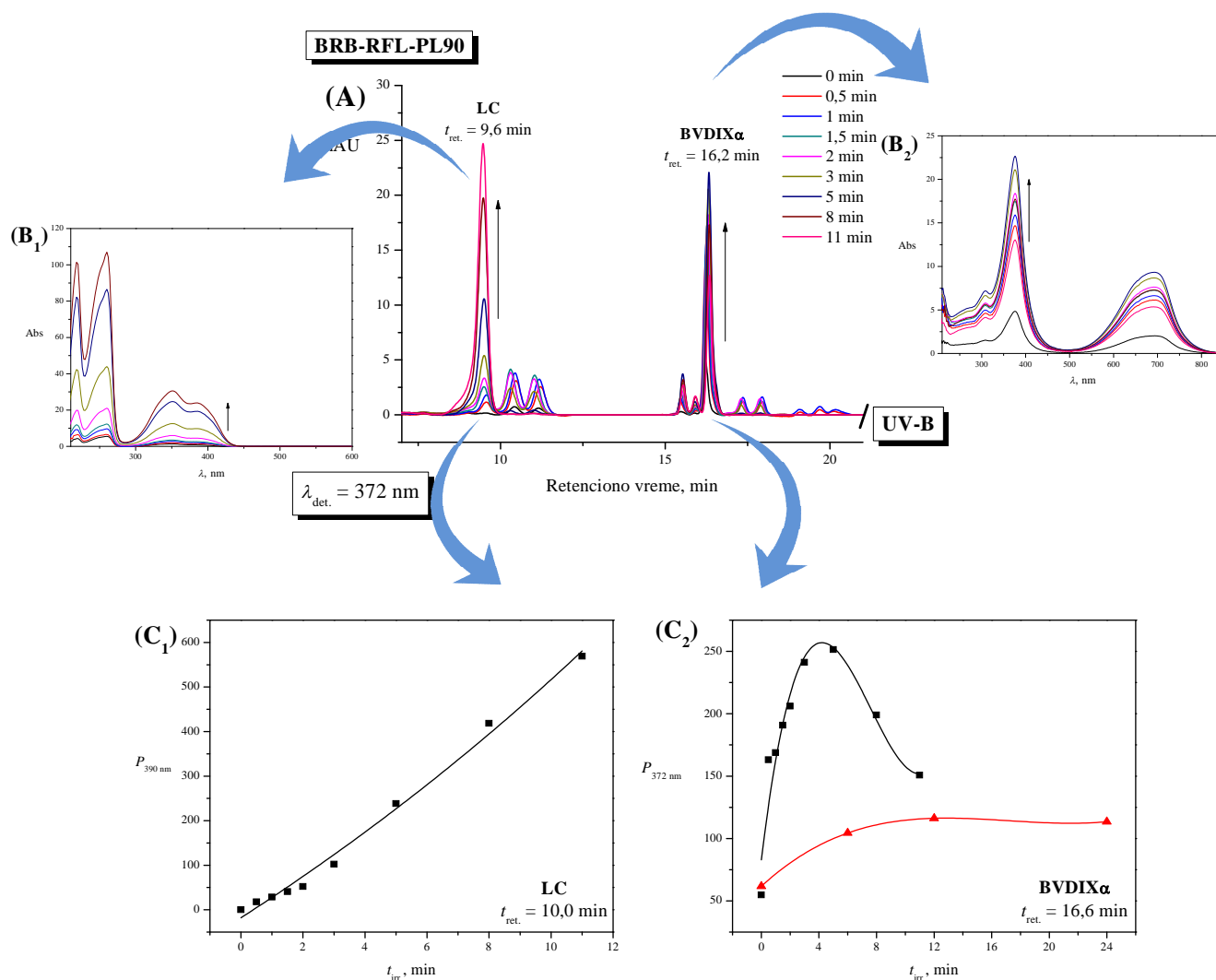
Слика 85 Смеша билирубина, рибофлавина и кверцетина (BRB-RFL-QC) у метанолу. **(А)** Хроматограми неозрачене и UV-B озрачиване меше BRB-RFL-QC, снимљени на таласној дужини максимума апсорбације RFL-а ($\lambda_{det.} = 445$ nm). Ретенциона времена ($t_{ret.}$) RFL-а и BRBIX α су 4,9 min и 41,2 min, респективно. **(Б)** Промене апсорпционих спектра RFL-а (**Б₁**) и BRBIX α (**Б₂**), добијених са хроматограма снимљених на 445 nm и 450 nm, респективно са порастом времена континуалног UV-B озрачивања ($t_{irr.}$). **(С)** Кинетика UV-B индукованог *bleaching*-а RFL-а у аеробним условима (**С₁**) и BRBIX α у аеробним (\blacksquare) и анаеробним (\blacktriangle) условима (**С₂**), праћена преко смањења површине пика RFL-а ($t_{ret.} = 4,9$ min) и BRBIX α ($t_{ret.} = 41,2$ min) на хроматограмима снимљеним на 445 nm и 450 nm, у функцији од времена UV-B озрачивања – $\ln P_{445\text{ nm}} = f(t_{irr.})$ и $\ln P_{450\text{ nm}} = f(t_{irr.})$, респективно. Одговарајуће константе *bleaching*-а ($k_{degrad.RFL}^{aerobno}$, $k_{degrad.BRBIX\alpha}^{aerobno}$ и $k_{degrad.BRBIX\alpha}^{anaerobno}$) и коефицијенти детерминације су приказани на слици.



Слика 86 Смеша билирубина, рибофлавина и кверцетина (BRB-RFL-QC) у метанолу. **(А)** Хроматограми неозрачене и UV-B озрачиване смеше BRB-RFL-QC, снимљени на таласној дужини максимума апсорбанције Траке I QC-а ($\lambda_{det.} = 372$ nm) приказани од 8. до 30. min анализе. Ретенциона времена ($t_{ret.}$) LC-а, QC-а и BVDIX α -а су 10,2 min; 13,0 min и 22,1 min, респективно. **(Б)** Промене апсорпционих спектра QC-а, добијених са хроматограма снимљених на 372 nm, са порастом времена континуалног UV-B озрачивања ($t_{irr.}$). **(С)** Кинетика UV-B индукованог *bleaching*-а QC-а у аеробним (■) и анаеробним (▲) условима, праћена преко смањења површине пика QC-а ($t_{ret.} = 13,0$ min) на хроматограмима снимљеним на 372 nm, у функцији од времена UV-B озрачивања – $\ln P_{372\text{ nm}} = f(t_{irr.})$. Одговарајуће константе *bleaching*-а ($k_{degrad.QC}^{aerobno}$ и $k_{degrad.QC}^{anaerobno}$) и коефицијенти детерминације су приказани на слици.



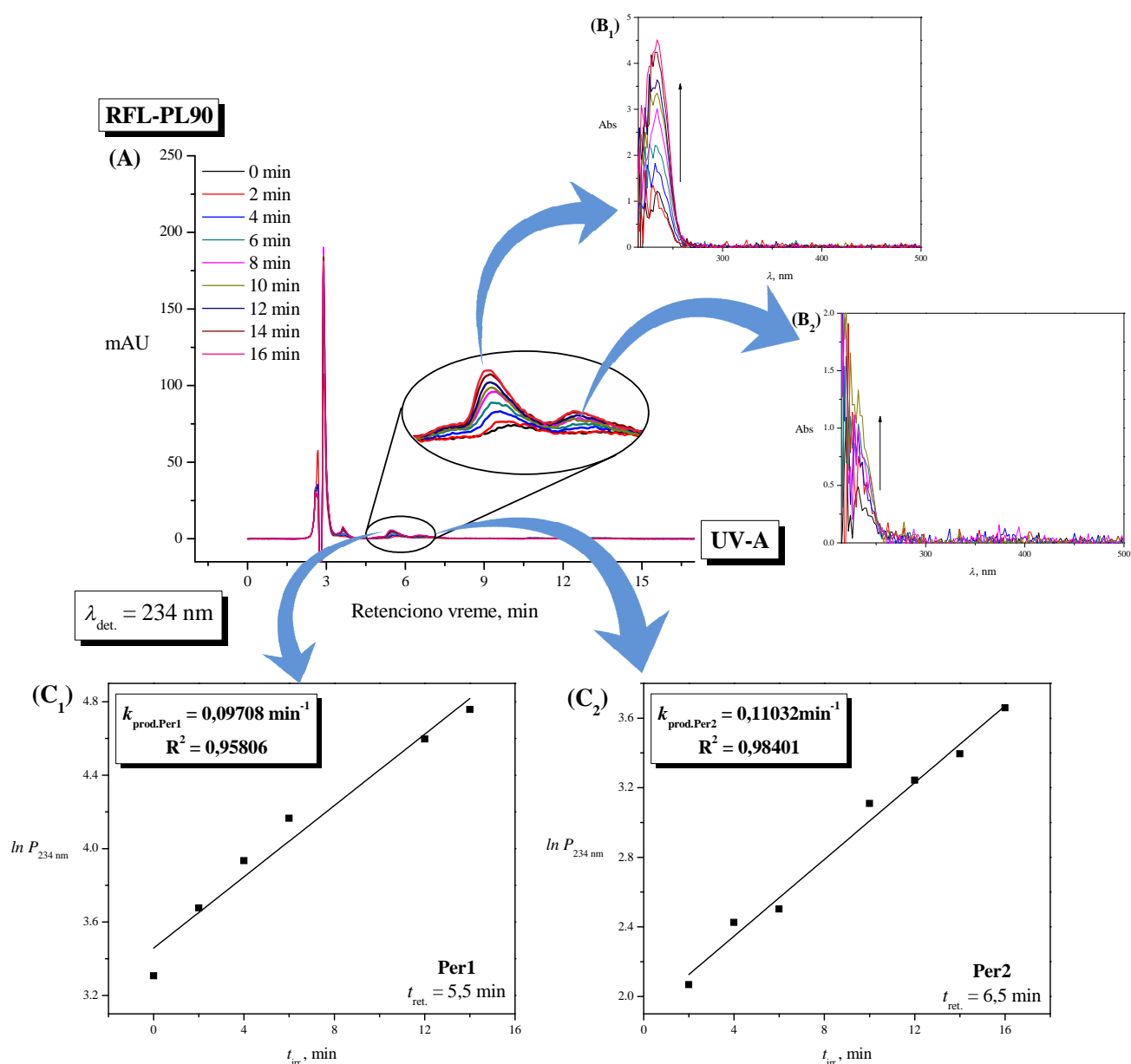
Слика 87 Смеша билирубина, рибофлавина и фосфолипида (BRB-RFL-PL90) у метанолу. **(A)** Хроматограми неозрачене и UV-B озрачиване меше BRB-RFL-PL90, снимљени на таласној дужини максимума апсорбације RFL-а ($\lambda_{\text{det.}} = 445 \text{ nm}$). Ретенциона времена ($t_{\text{ret.}}$) RFL-а и BRBIX α су 3,6 min и 41,2 min, респективно. **(B)** Промене апсорпционих спектра RFL-а (**B₁**) и BRBIX α (**B₂**), добијених са хроматограма снимљених на 445 nm и 450 nm, респективно са порастом времена континуалног UV-B озрачивања ($t_{\text{irr.}}$). **(C)** Кинетика UV-B индукованог *bleaching*-а RFL-а у аеробним условима (**C₁**) и BRB-а у аеробним (\blacksquare) и анаеробним (\blacktriangle) условима (**C₂**), праћена преко смањења површине пика RFL-а ($t_{\text{ret.}} = 3,6 \text{ min}$) и BRBIX α ($t_{\text{ret.}} = 41,2 \text{ min}$) на хроматограмима снимљеним на 445 nm и 450 nm, у функцији од времена UV-B озрачивања $-\ln P_{445 \text{ nm}} = f(t_{\text{irr.}})$ и $\ln P_{450 \text{ nm}} = f(t_{\text{irr.}})$, респективно. Одговарајуће константе *bleaching*-а ($k_{\text{degrad.RFL}}^{\text{aerobno}}$, $k_{\text{degrad.BRBIX}\alpha}^{\text{aerobno}}$ и $k_{\text{degrad.BRBIX}\alpha}^{\text{anaerobno}}$) и коефицијенти детерминације су приказани на слици.



Слика 88 Смеша билирубина, рибофлавина и фосфолипида (BRB-RFL-PL90) у метанолу. **(А)** Хроматограми неозрачене и UV-B озрачиване смеше BRB-RFL-PL90 у метанолу, снимљени на таласној дужини блиској максимуму апсорбације BVD-a ($\lambda_{det.} = 372 \text{ nm}$) приказани од 7. до 21. min анализе. Ретенциона времена ($t_{ret.}$) LC-a и BVDIX α су 9,6 min и 16,2 min, респективно. **(В)** Промене апсорпционих спектра LC-a (**В₁**) и BVDIX α добијених са хроматограма снимљених на 390 nm и 372 nm, респективно са порастом времена континуалног UV-B озрачивања ($t_{irr.}$). **(С)** Динамика UV-B индукованог настанка LC-a под аеробним условима (**С₁**) и BVDIX α под аеробним (\blacksquare) и анаеробним (\blacktriangle) условима (**С₂**) праћена преко промене површине пика LC-a ($t_{ret.} = 9,6 \text{ min}$) и BVDIX α ($t_{ret.} = 16,2 \text{ min}$) на хроматограмима снимљеним на 390 nm и 372 nm, респективно у функцији од времена UV-B озрачивања.

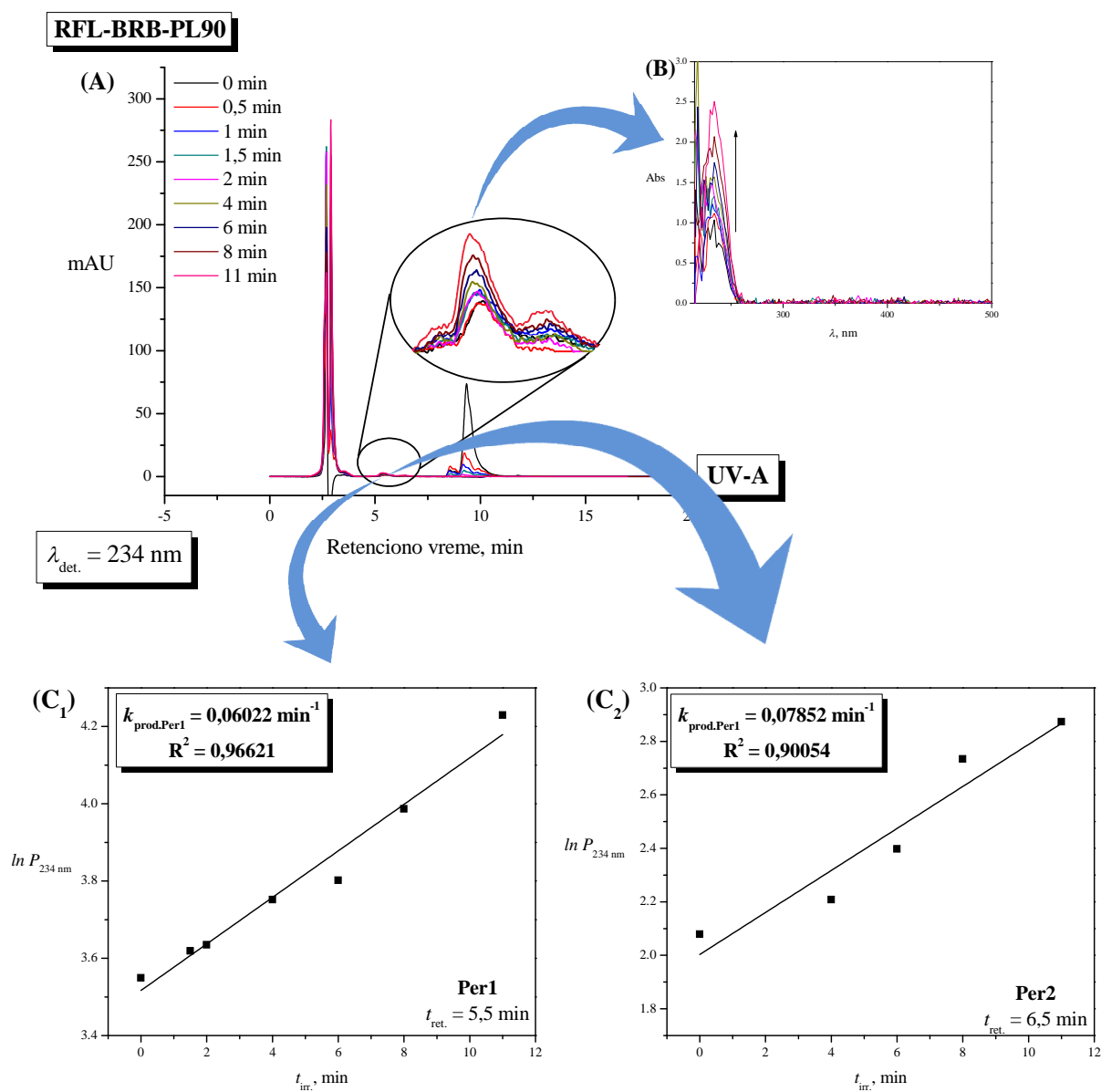
Изократским елуирањем смеше рибофлавина и фосфолипида (из „бинарне” и „тернарне” смеше) метанолом и праћењем сигнала на 234 nm добијени су хроматограми неозрачене и UV-A озрачиване смеше RFL-PL90 у метанолу, приказани на **Слици 89А**. Увећан је део хроматограма у коме је уочена појава конјугованих диена. На **Слици 89В₁** и **В₂** су приказане промене апсорпционих спектра Per1 и Per2 идентификованих на ретенционим временима од 5,5 min и 6,5 min, док је кинетика продукције Per1 и Per2 праћена преко пораста њихове површине као последица континуалног UV-A озрачивања дата на **Слици 89С₁** и **С₂**, респективно.

Када се неозрачена и UV-A озрачивана смеша рибофлавина, билирубина и фосфолипида елуира изократским режимом рада уз метанол као мобилну фазу и снима на 234 nm добијају се хроматограми приказани на **Слици 90А**. Увећан је део хроматограма у коме је уочена појава конјугованих диенских структура. На **Слици 90В** су приказане промене апсорпционих спектра Per1 идентификованог на ретенционом времену од 5,5 min. Кинетика продукције Per1 и Per2 праћена преко пораста њихове површине као последица континуалног UV-A озрачивања је дата на **Слици 90С₁** и **С₂**, респективно.



Слика 89 Смеша рибофлавина и фосфолипида под условима меше BRB-RFL-PL90⁵³ у метанолу. **(А)** Хроматограми неозрачене и UV-A озрачене меше RFL-PL90 у метанолу, елуиране под изократским условима, метанолом, снимљени на таласној дужини максимума апсорбанције конјугованих диена ($\lambda_{\text{det.}} = 234 \text{ nm}$). Ретенциона времена ($t_{\text{ret.}}$) Per1 и Per2 су 5,5 min и 6,5 min, респективно. **(Б)** Промене апсорпционих спектра Per1 и 2 (**Б₁** и **Б₂**), добијених са хроматограма снимљених на 234 nm, са порастом времена континуалног UV-A озрачивања ($t_{\text{irr.}}$), респективно. **(С)** Кинетика UV-A индуковане продукције Per1 и Per2 (**С₁** и **С₂**), праћена преко пораста површине пикова Per1 ($t_{\text{ret.}} = 5,5 \text{ min}$) и Per2 ($t_{\text{ret.}} = 6,5 \text{ min}$) на хроматограмима снимљеним на 234 nm у функцији од времена UV-A озрачивања, $\ln P_{234 \text{ nm}} = f(t_{\text{irr.}})$. Одговарајуће константе продукције Per1 и Per2 ($k_{\text{prod,Per1,2}}$) и коефицијенти детерминације су приказани на слици.

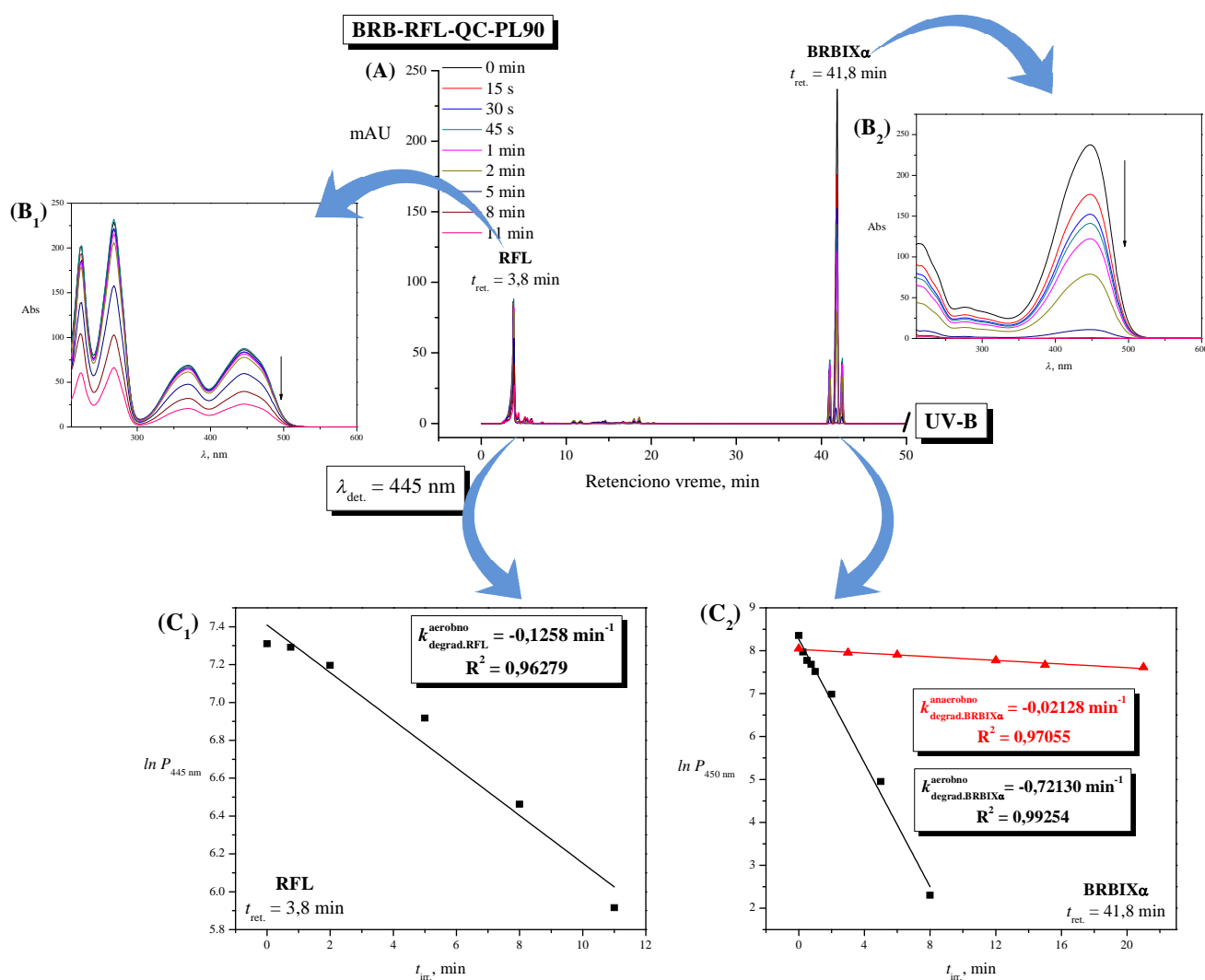
⁵³ Смеша рибофлавина и фосфолипида у метанолу уз додатак blank раствора BRB-а у количини BRB-а присутног у меши (BRB-RFL-PL90).



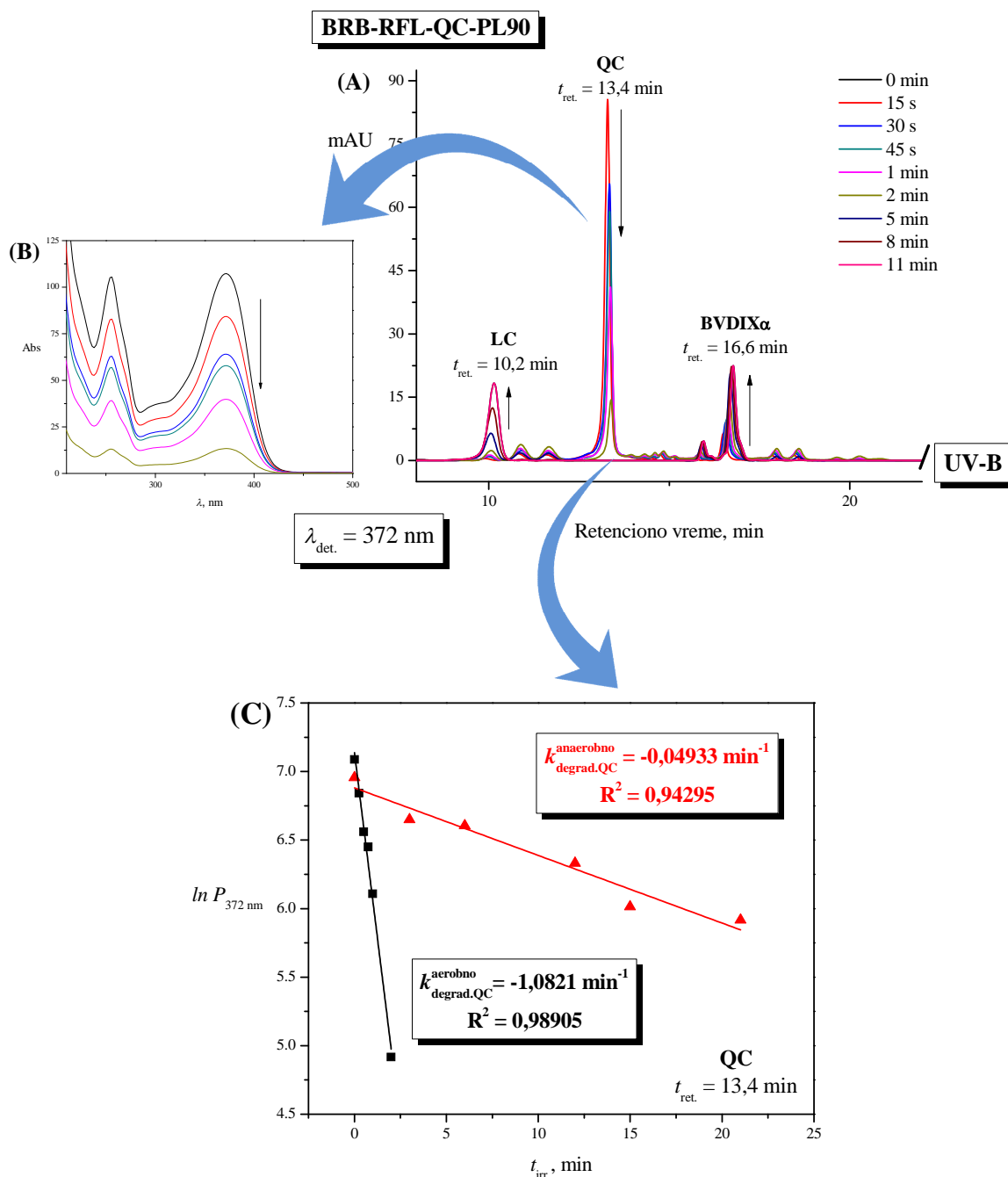
Слика 90 Смеша рибофлавина, билирубина и фосфолипида (RFL-BRB-PL90) у метанолу. **(A)** Хроматограми неозрачене и UV-A озрачене смеше BRB-RFL-PL90 у метанолу, елуиране под изократским условима, метанолом, праћени на таласној дужини максимума апсорбације конјугованих диена ($\lambda_{\text{det.}} = 234 \text{ nm}$). Ретенциона времена ($t_{\text{ret.}}$) Per1 и Per2 су 5,5 min и 6,5 min, респективно. **(B)** Промене апсорпционих спектра Per1, добијених са хроматограма снимљених на 234 nm, са порастом времена континуалног UV-A озрачивања ($t_{\text{irr.}}$). **(C)** Кинетика UV-A индуковане продукције Per1 и Per2 (**C₁** и **C₂**), респективно, праћена преко пораста површине пикова Per1 ($t_{\text{ret.}} = 5,5 \text{ min}$) и Per2 ($t_{\text{ret.}} = 6,5 \text{ min}$) на хроматограмима снимљеним на 234 nm у функцији од времена UV-A озрачивања, $\ln P_{234 \text{ nm}} = f(t_{\text{irr.}})$. Одговарајуће константе продукције Per1 и Per2 ($k_{\text{prod.Per1,2}}$) и коефицијенти детерминације су приказани на слици.

На **Сликама 91А** и **92А** су приказани хроматограми смеше билирубина, рибофлавина, кверцетина и фосфолипида („бинарна” смеша) у метанолу, снимљени на 445 nm и 372 nm. Промене апсорпционих спектра рибофлавина, билирубина и кверцетина, добијених са хроматограма снимљених на 445 nm, 450 nm и 372 nm су приказани на **Слици 91В₁** и **В₂** и **Слици 92В**, респективно. Кинетика деградације RFL-а у аеробним условима, BRBIX α и QC-а, под аеробним и анаеробним условима, добијена праћењем смањења површине њихових пикова на одговарајућим хроматограмима са порастом времена континуалног UV-B озрачивања је приказана, редом на **Слици 91С₁** и **С₂** и **Слици 92С**.

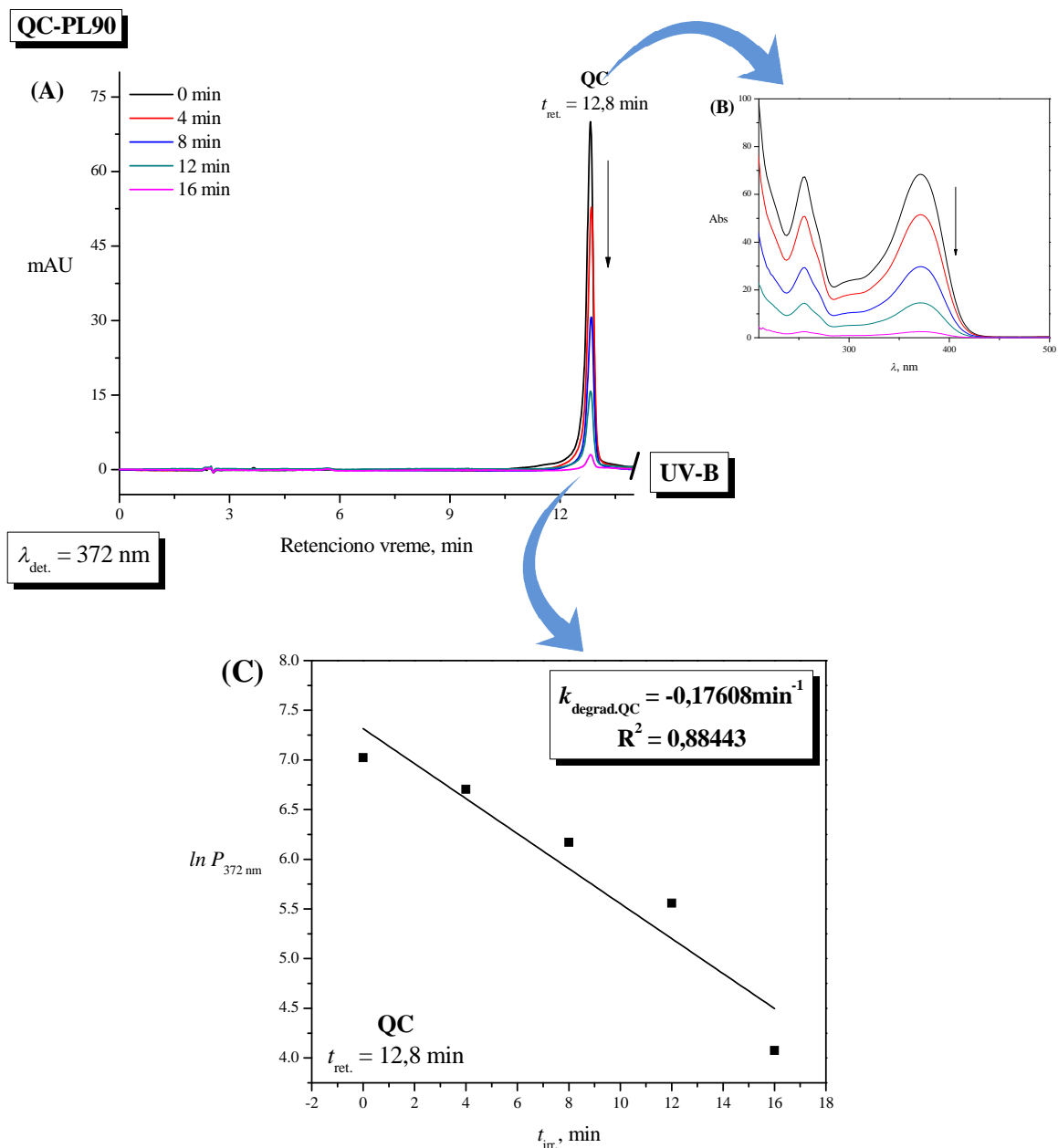
Хроматограми неозрачене и UV-B озрачване смеше кверцетина и фосфолипида (из „бинарне” и „тернарне” смеше) у метанолу, праћени на 372 nm су приказани на **Слици 93А**. Промене апсорпционих спектра QC-а, добијених са претходно снимљених хроматограма, са порастом времена UV-B озрачивања су приказане на **Слици 93В**. Кинетика деградације QC-а у аеробним условима, праћена преко смањења површине пика на хроматограмима снимљеним на 372 nm, са порастом времена континуалног UV-B озрачивања је приказана на **Слици 93С**.



Слика 91 Смеша билирубина, рибофлавина, кверцетина и фосфолипида (BRB-RFL-QC-PL90) – „бинарна” меша у метанолу. **(A)** Хроматограми неозрачене и UV-B озрачиване „бинарне” меша, снимљени на таласној дужини максимума апсорбанције RFL-а ($\lambda_{det.} = 445$ nm). Ретенциона времена ($t_{ret.}$) RFL-а и BRBIX α су 3,8 min и 41,8 min, респективно. **(B)** Промене апсорпционих спектра RFL-а (**B₁**) и BRBIX α (**B₂**), респективно добијених са хроматограма снимљених на 445 nm и 450 nm, респективно са порастом времена континуалног UV-B озрачивања ($t_{irr.}$). **(C)** Кинетика UV-B индукованог *bleaching*-а RFL-а у аеробним условима (**C₁**) и BRBIX α у аеробним (\blacksquare) и анаеробним (\blacktriangle) условима (**C₂**), праћена преко смањења површине пика RFL-а ($t_{ret.} = 3,8$ min) и BRBIX α ($t_{ret.} = 42,0$ min) на хроматограмима снимљеним на 445 nm и 450 nm, респективно у функцији од времена UV-B озрачивања – $\ln P_{445\text{ nm}} = f(t_{irr.})$ и $\ln P_{450\text{ nm}} = f(t_{irr.})$. Одговарајуће константе *bleaching*-а ($k_{degrad.RFL}^{aerobno}$, $k_{degrad.BRBIX\alpha}^{aerobno}$ и $k_{degrad.BRBIX\alpha}^{anaerobno}$) и коефицијенти детерминације су приказани на слици.



Слика 92 „Бинарна” смеша (BRB-RFL-QC-PL90) у метанолу. **(А)** Хроматограми неозрачене и UV-B озрачиване „бинарне” смеше, снимљени на таласној дужини максимума апсорбанције Траке I QC-а ($\lambda_{det.} = 372$ nm) приказани од 9. до 30. min анализе. Ретенциона времена ($t_{ret.}$) LC-а, QC-а и BVDIX α су 10,2 min; 13,4 min и 16,6 min, респективно. **(Б)** Промене апсорпционих спектра QC-а, добијених са хроматограма снимљених на 372 nm, са порастом времена континуалног UV-B озрачивања ($t_{irr.}$). **(С)** Кинетика UV-B индукованог *bleaching*-а QC-а у аеробним (■) и анаеробним (▲) условима, праћена преко смањења површине пика QC-а ($t_{ret.} = 13,4$ min) на хроматограмима снимљеним на 372 nm, у функцији од времена UV-B озрачивања – $\ln P_{372\text{ nm}} = f(t_{irr.})$. Одговарајуће константе *bleaching*-а ($k_{degrad.QC}^{aerobno}$ и $k_{degrad.QC}^{anaerobno}$) и коефицијенти детерминације су приказани на слици.



Слика 93 Смеша кверцетина и фосфолипида (QC-PL90) под условима у „бинарној” меши (BRB-RFL-QC-PL90)⁵⁴ у метанолу. **(A)** Хроматограми неозрачене и, у аеробним условима, UV-B озрачиване меше QC-PL90, снимљени на таласној дужини максимума апсорбације Траке I QC-а ($\lambda_{det.} = 372 \text{ nm}$) приказани до 14. min анализе. Ретенциона времена ($t_{ret.}$) QC-а и NL-а су 12,8 min и 16,6 min, респективно. **(B)** Промене апсорпционих спектра QC-а, добијених са хроматограма снимљених на 372 nm, са порастом времена континуалног UV-B озрачивања ($t_{irr.}$). **(C)** Кинетика UV-B индукованог *bleaching*-а QC-а, праћена преко смањења површине пика QC-а ($t_{ret.} = 12,8 \text{ min}$) на хроматограмима снимљеним на 372 nm, у функцији од времена UV-B озрачивања – $\ln P_{372 \text{ nm}} = f(t_{irr.})$. Одговарајућа константа *bleaching*-а ($k_{degrad.QC}$) и коефицијент детерминације су приказани на слици.

⁵⁴ Смеша кверцетина и фосфолипида у метанолу уз додаток *blank* раствора BRB-а и $0,01 \text{ mol dm}^{-3}$ раствора NaOH у количини BRB-а и RFL-а присутних у меши BRB-RFL-QC-PL90, респективно.

5.5 UV индуковане промене „тернарне” смеше

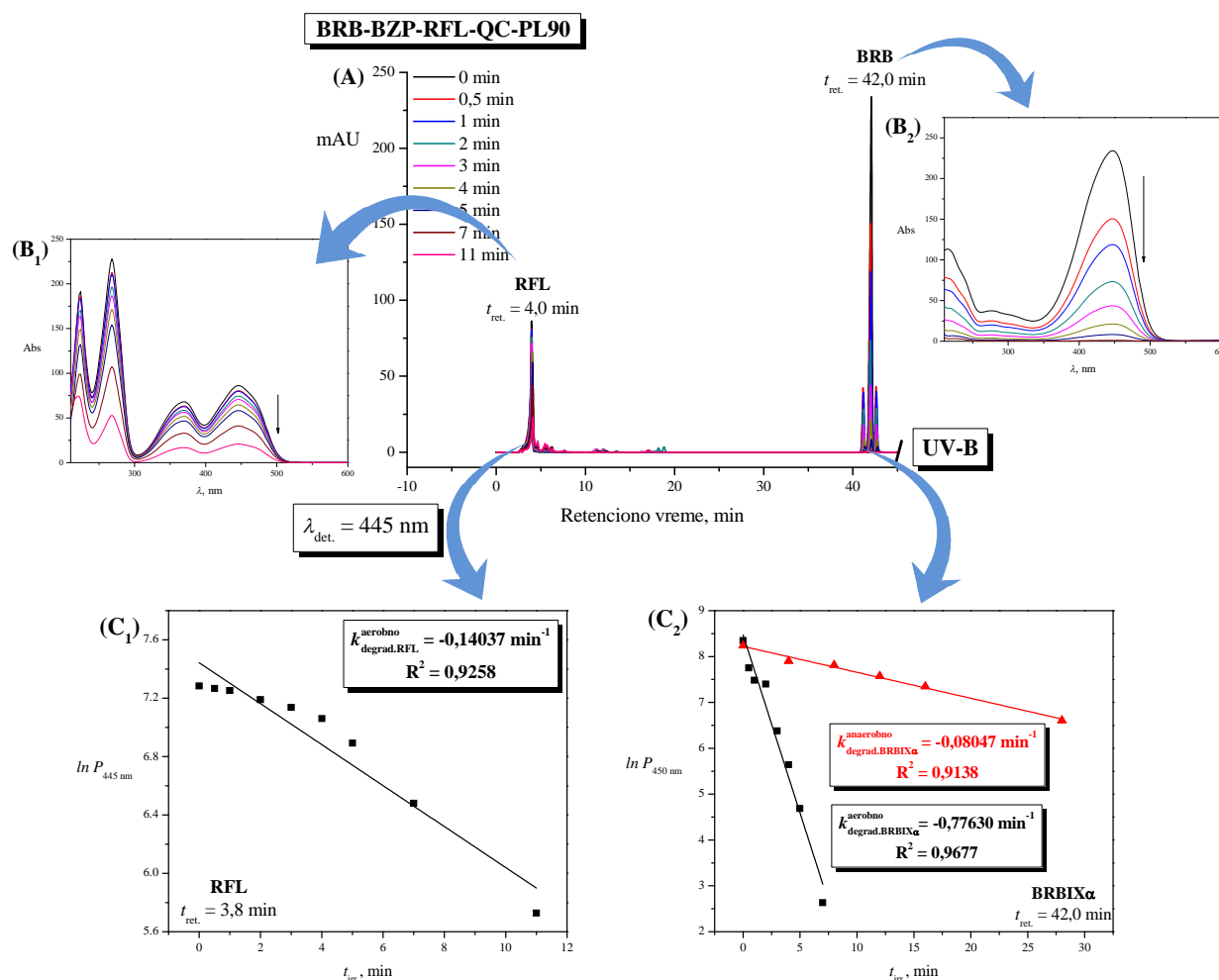
5.5.1 RP-HPLC анализа „тернарне” смеше

Слике 94А и 95А дају приказ хроматограма неозрачене и UV-B озрачиване смеше билирубина, бензофенона, рибофлавина, кверцетина и фосфолипида („тернарна смеша”) снимљених на 445 nm и 250 nm, респективно. На Слици 94В₁ и В₂ и Слици 95В₁ и В₂ је дат приказ промене апсорпционих спектра RFL-а и BRB-а одн. QC-а и VZP-а, добијених са хроматограма снимљених на таласним дужинама од 445 nm, 450 nm одн. 372 nm и 250 nm, респективно са порастом времена континуалног UV-B озрачивања. Кинетика деградације RFL-а у аеробним условима, BRBIX α у аеробним и анаеробним условима, одн. QC-а и VZP-а у аеробним и анаеробним условима праћена преко смањења површине истих на одговарајућим хроматограмима, је приказана на Слици 94С₁ и С₂ одн. Слици 95С₁ и С₂, респективно.

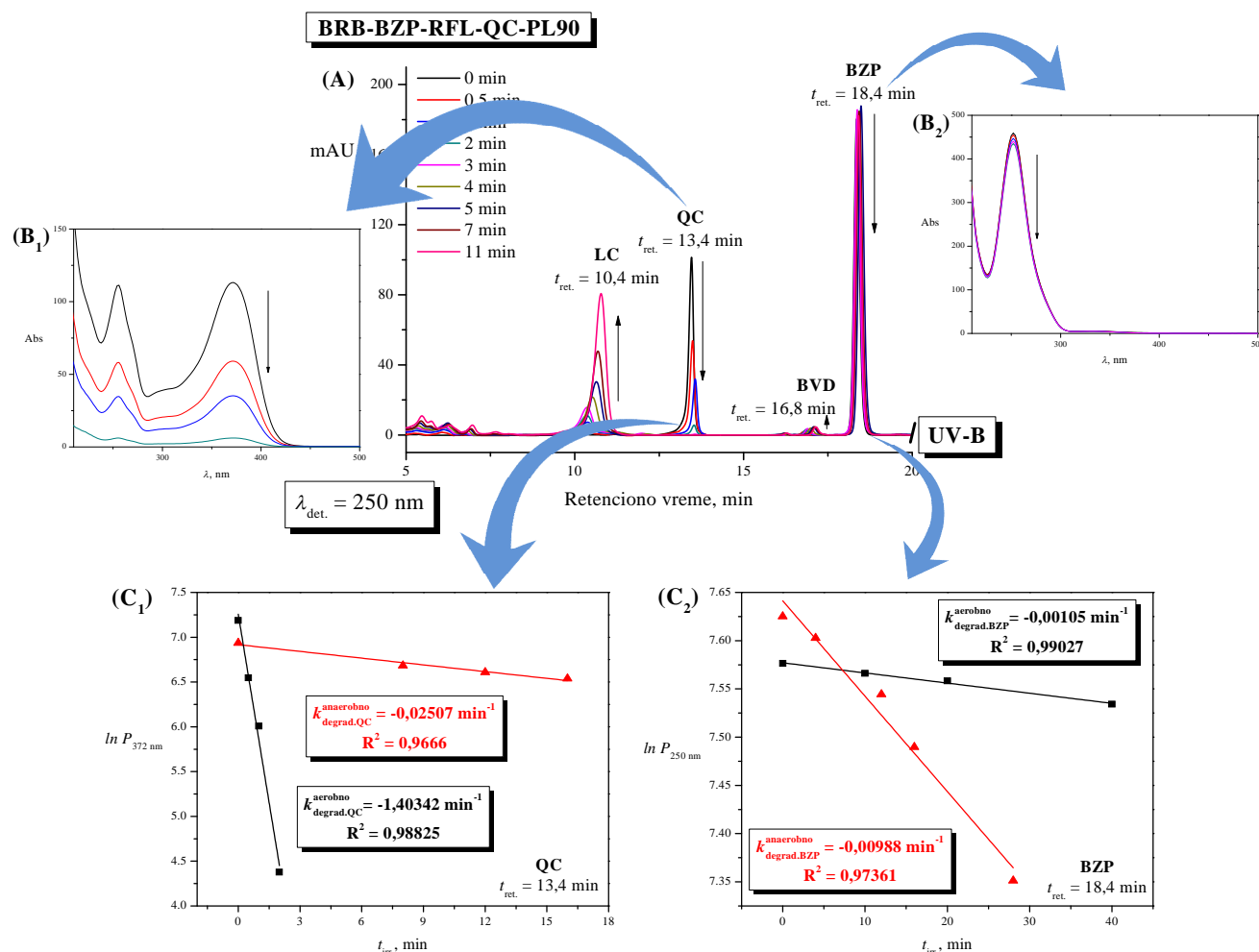
Изократским елуирањем „тернарне” смеше метанолом и праћењем сигнала на 234 nm су добијени хроматограми неозрачене и UV-A озрачиване смеше у метанолу, приказани на Слици 96А. Део хроматограма у коме је уочена појава конјугованих диена је увећан. На Слици 96В₁-В₃ су приказане промене апсорпционих спектра Per1-3 идентификованих на ретенционим временима од 5,5 min; 6,5 min и 4,5 min, респективно. Кинетика продукције Per1-3 праћена преко пораста њихових површина као последица континуалног UV-A озрачивања је дата на Слици 96С₁-С₃.

Коначно, Табела 8 даје константе брзине деградације билирубина, рибофлавина и кверцетина, појединачно и у смешама билирубин/рибофлавин, билирубин/рибофлавин/кверцетин, билирубин/рибофлавин/фосфолипиди, „бинарне” и „тернарне” смеше као и бензофенона из „бинарне” и „тернарне” смеше, под аеробним и анаеробним условима, праћењем смањења површине пикова на хроматограмима снимљеним на одговарајућим таласним дужинама, са порастом времена континуалног UV озрачивања.

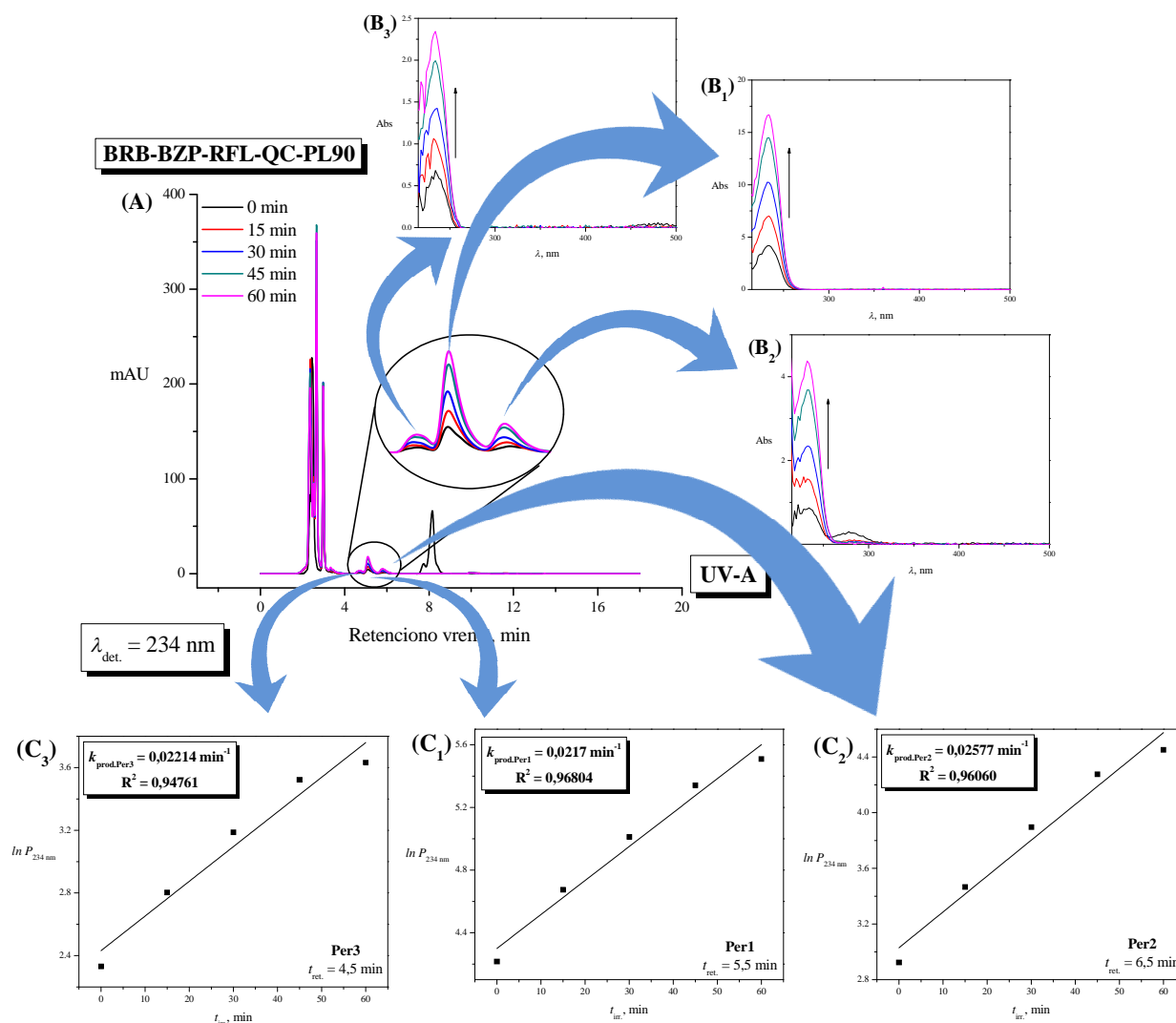
У Табели 9 су дате константе брзине настајања пероксида у „бинарној” смеси, „тернарној” смеси и смешама рибофлавин/фосфолипиди, рибофлавин/билирубин/фосфолипиди и бензофенон/билирубин/рибофлавин/фосфолипиди.



Слика 94 Смеша билирубина, бензофенона, рибофлавина, кверцетина и фосфолипида (BRB-BZP-RFL-QC-PL90) – „тернарна” смеша у метанолу. **(А)** Хроматограми неозрачене и UV-B озрачиване „тернарне” смеше, снимљени на таласној дужини максимума апсорбације RFL-а ($\lambda_{\text{det.}} = 445 \text{ nm}$). Ретенциона времена ($t_{\text{ret.}}$) RFL-а и BRBIX α су 4,0 min и 42,0 min, респективно. **(В)** Промене апсорпционих спектра RFL-а (**В₁**) и BRBIX α (**В₂**) добијених са хроматограма снимљених на 445 nm и 450 nm, респективно са порастом времена континуалног UV-B озрачивања ($t_{\text{irr.}}$). **(С)** Кинетика UV-B индукованог *bleaching*-а RFL-а у аеробним условима (**С₁**) и BRBIX α у аеробним (\blacksquare) и анаеробним (\blacktriangle) условима (**С₂**), праћена преко смањења површине пика RFL-а ($t_{\text{ret.}} = 4,0 \text{ min}$) и BRBIX α ($t_{\text{ret.}} = 42,0 \text{ min}$) на хроматограмима снимљеним на 445 nm и 450 nm, респективно у функцији од времена UV-B озрачивања – $\ln P_{445 \text{ nm}} = f(t_{\text{irr.}})$ и $\ln P_{450 \text{ nm}} = f(t_{\text{irr.}})$. Одговарајуће константе *bleaching*-а ($k_{\text{degrad.RFL}}^{\text{aerobno}}$, $k_{\text{degrad.BRBIX}\alpha}^{\text{aerobno}}$ и $k_{\text{degrad.BRBIX}\alpha}^{\text{anaerobno}}$) и коефицијенти детерминације су приказани на слици.



Слика 95 „Тернарна” смеша у метанолу. (А) Хроматограми неозрачене и UV-B озрачиване „тернарне” смеше, снимљени на таласној дужини максимума апсорпције BZP-а ($\lambda_{det.} = 250$ nm), приказани од 5. до 20. min. Ретенциона времена ($t_{ret.}$) LC-а, QC-а, BVDIX α и BZP-а су 10,4 min; 13,4 min; 16,8 min и 18,4 min, респективно. (Б) Промене апсорпционих спектра QC-а (B₁) и BZP-а (B₂), добијених са хроматограма снимљених на 445 nm и 250 nm, респективно са порастом времена континуалног UV-B озрачивања ($t_{irr.}$). (С) Кинетика UV-B индукованог *bleaching*-а QC-а (C₁) и BZP-а у аеробним (■) и анаеробним (▲) условима (C₂), праћена преко смањења површине пика QC-а ($t_{ret.} = 13,4$ min) и BZP-а ($t_{ret.} = 18,4$ min) на хроматограмима снимљеним на 372 nm и 250 nm, респективно у функцији од времена UV-B озрачивања – $\ln P_{372\text{ nm}} = f(t_{irr.})$ и $\ln P_{250\text{ nm}} = f(t_{irr.})$. Одговарајуће константе *bleaching*-а ($k_{degrad.QC}^{aerobno}$, $k_{degrad.QC}^{anaerobno}$, $k_{degrad.BZP}^{aerobno}$ и $k_{degrad.BZP}^{anaerobno}$) и коефицијенти детерминације су приказани на слици.



Слика 96 „Тернарна” смеша. **(А)** Хроматограми неозрачене и UV-A озрачиване „тернарне” смеше у метанолу, елуиране под изократским условима метанолом, снимљени на таласној дужини максимума апсорбације конјугованих диена ($\lambda_{det.} = 234 \text{ nm}$). Ретенциона времена Per1-3 су 5,5 min; 6,5 min и 4,5 min, респективно. **(В)** Промене апсорпционих спектра Per1-3 (**В₁-В₃**), добијених са хроматограма снимљених на 234 nm, са порастом времена континуалног UV-A озрачивања ($t_{irr.}$). **(С)** Кинетика UV-A индуковане продукције Per1-3 (**С₁-С₃**), праћена преко пораста површине пикова Per1-3 на хроматограмима снимљеним на 234 nm у функцији од времена UV-A озрачивања, $\ln P_{234 \text{ nm}} = f(t_{irr.})$. Одговарајуће константе продукције Per1-3 ($k_{prod,Per1-3}$) и коефицијенти детерминације су приказани на слици.

Табела 8 Константе брзине деградације ($k_{\text{degrad.}}, \text{min}^{-1}$) билирубина (BRB), рибофлавина (RFL), кверцетина (QC) и бензофенона (BZP) из „бинарне” и „тернарне” смеше у аеробним и анаеробним условима, добијене као нагиб (праволинијске) зависности \ln -ованих вредности површина пикова са хроматограма билирубина (BRB), кверцетина (QC), рибофлавина (RFL) и смеша билирубин/рибофлавин (BRB-RFL), билирубин/рибофлавин/кверцетин (BRB-RFL-QC), билирубин/рибофлавин/фосфолипиди (BRB-RFL-PL90), билирубин/рибофлавин/кверцетин/фосфолипиди (BRB-RFL-QC-PL90), кверцетин/фосфолипиди (QC-PL90) и бензофенон/билирубин/рибофлавин/кверцетин/фосфолипиди (BZP-BRB-RFL-QC-PL90) у метанолу, снимљених на 450 nm (BRB), 445 nm (RFL), 372 nm (QC) и 250 nm (BZP) у функцији од времена континуалног UV озрачивања – $\ln P_{450/445/372/250 \text{ nm}} = f(t_{\text{irr.}})$. Зависност прати кинетику првог реда.

		$k_{\text{degrad.}}, \text{min}^{-1}$							
		BRB		RFL		QC		BZP	
		$t_{\text{ret.}} = 42,0 \text{ min}^*$		$t_{\text{ret.}} = 4,0 \text{ min}^*$		$t_{\text{ret.}} = 13,4 \text{ min}^*$		$t_{\text{ret.}} = 18,4 \text{ min}^*$	
		UV-A	UV-B	UV-A	UV-B	UV-A	UV-B	UV-A	UV-B
BRB	аеробно	-0,06383	-0,10434	x	x	x	x	x	x
QC	аеробно	x	x	x	x	-0,02805	-0,05695	x	x
RFL	аеробно	x	x	-1,15195	x	x	x	x	x
BRB-RFL	аеробно	-1,38458	-0,96134	-0,19349	-0,12882	x	x	x	x
	анаеробно	-0,05829	-0,05923	-0,28206	-0,17440	x	x	x	x
BRB-RFL-QC	аеробно	-0,86055	-0,50720	-0,15820	-0,05614	-2,43674	-0,74039	x	x
	анаеробно	-0,02617	-0,05486	-0,18304	-0,06858	-0,03407	-0,11174	x	x
BRB-RFL-PL90	аеробно	-1,86065	-1,14935	-0,23609	-0,18227	x	x	x	x
	анаеробно	-0,06909	-0,06637	-0,30120	-0,13717	x	x	x	x
BRB-RFL-QC-PL90	аеробно	-1,18520	-0,72130	-0,21313	-0,12580	-3,57635	-1,08210	x	x
	анаеробно	-0,03290	-0,02128	-0,20413	-0,12682	-0,04869	-0,04933	x	x
QC-PL90	аеробно	x	x	x	x	-0,04220	-0,17608	x	x
BZP-BRB-RFL-QC-PL90	аеробно	-1,15028	-0,77630	-0,19178	-0,14037	-3,36884	-1,40342	-0,00025	-0,00105
	анаеробно	-0,02361	-0,08047	-0,08685	-0,03365	-0,03344	-0,02507	/	-0,00988

*Ретенциона времена у „тернарној” смеси; x – компонента није присутна у смеси; / – промена површине пика са порастом времена озрачивања је динамична

Табела 9 Константе брзине стварања пероксида ($k_{\text{prod.}}, \text{min}^{-1}$) – продуката UV-индуковане фотосензибилизоване липидне пероксидације у „бинарној” (RFL-BRB-QC-PL90) и „тернарној” (BZP-BRB-RFL-QC-PL90) смеши под аеробним условима, добијене као нагиб (праволинијске) зависности \ln -ованих вредности површина пикова са хроматограма смеша рибофлавин/фосфолипиди (RFL-PL90), рибофлавин/билирубин/фосфолипиди (RFL-BRB-PL90) и рибофлавин/билирубин/кверцетин/фосфолипиди (RFL-BRB-QC-PL90), бензофенон/билирубин/рибофлавин/фосфолипиди (BZP-BRB-RFL-PL90) и бензофенон/билирубин/рибофлавин/кверцетин/фосфолипиди (BZP-BRB-RFL-QC-PL90) у метанолау, снимљених на 234 nm, у функцији од времена континуалног UV озрачивања – $\ln P_{234 \text{ nm}} = f(t_{\text{ир.}})$. Зависност прати кинетику првог реда.

	$k_{\text{prod.}}, \text{min}^{-1}$					
	Per1		Per2		Per3	
	$t_{\text{ret.}} = 5,5 \text{ min}$		$t_{\text{ret.}} = 6,5 \text{ min}$		$t_{\text{ret.}} = 4,5 \text{ min}$	
	UV-A	UV-B	UV-A	UV-B	UV-A	UV-B
RFL-PL90	0,09708	0,05985	0,11032	0,09135	x	0,01088
BRB-PL90	/	-0,01638	x	x	x	x
RFL-BRB-PL90	0,06022	0,03193	0,07852	/	x	x
QC-PL90	/	-0,03894	x	x	x	x
RFL-BRB-QC-PL90	0,04375	/	/	/	x	x
BZP-BRB-RFL-PL90	0,04190	0,02215	0,06437	0,02626	0,05159	0,00807
BZP-BRB-RFL-QC-PL90	0,02170	0,01794	0,02577	0,02616	0,02214	0,01265

x – компонента није присутна у смеши; / – промена површине пика са порастом времена озрачивања је динамична

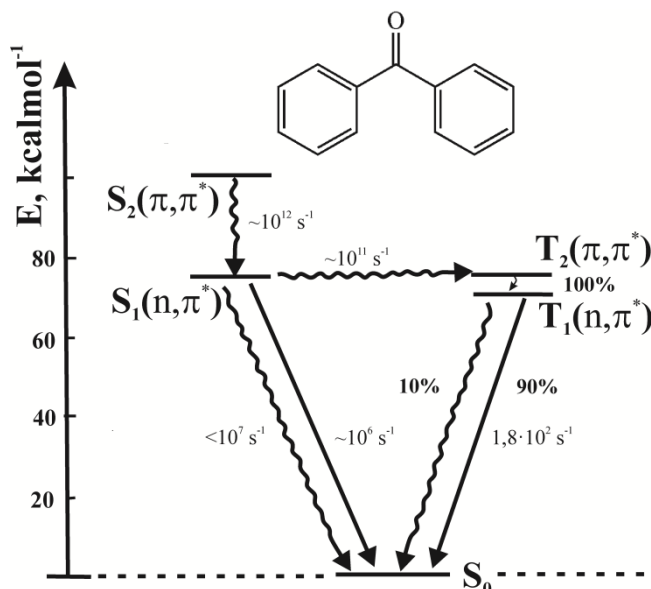
6 ДИСКУСИЈА

„Желео бих да се ово није морало догодити у моје време”, рече Фродо.
 „И ја бих”, рече Гандалф, „као и сви који доживе таква времена.
 Али није на њима да о томе одлучују. На нама је само да одлучимо шта ћемо учинити с
 временом које нам је дато.”
 одломак из књиге „Господар прстенова” – John Ronald Reuel Tolkien

6.1 UV индуковане промене смеше BZP-QC-PL90

6.1.1 UV индуковани *bleaching* BZP-а у метанолу

Фоторедуција бензофенона, односно његово превођење у алкохол услед интермолекуларне апстракције водоника кисеоником из карбонилне групе са одговарајућег Н-донора је прва истражена фотореакција која се одвија преко триплетног стања молекула (Rohatgi-Mukherjee, 1986). Бензофенон садржи карбонилну групу конјуговану са двоструким везама двају бензенових прстенова (Сл.97) због чега апсорбује UV ($\lambda_{\max} \sim 250$ nm у метанолу) али не и VIS фотоне ЕМ зрачења. Молекул се озрачивањем активира што омогућава одвијање реакција које су под другим условима мало вероватне⁵⁵ (AL-Azawy, 2014).



Слика 97 Jablonski дијаграм бензофенона (Klessinger and Michl, 1995)

⁵⁵ Бензофенон се под нормалним условима не редукује лако – штавише један је од најнерактивнијих кетона. Изопропил алкохол, са друге стране, није најмоћнији редукујући агенс. Међутим, када се њихова смеша изложи светлости бензофенон се са изузетном лакоћом редукује до бензпинакола (AL-Azawy, 2014).

Код већине простих алдехида и кетона, укључујући и бензофенон, прелаз праћен појавом апсорпционе траке на највећој таласној дужини је $n \rightarrow \pi^*$. Када n -електрон ексцитацијом пређе у π^* орбиталу за њим, на атому кисеоника, остаје „позитивна рупа”. Истовремено се густина наелектрисања на С-атому повећава док се диполни момент $>C=O$ везе смањује. Тако образована n, π^* стања су електрофилног карактера. По способности апстракције водониковог атома парирају алкокси радикалима, па током фотохемијског процеса, између осталог, подлежу следећим реакцијама:

(1) Интермолекулској апстракцији водоника из одговарајућег Н-донора – самог растварача или неког другог једињења. Парови радикала (кетона и Н-донора) настали током реакције могу дати одговарајуће фотоадicione производе док се радикали који потичу из кетона могу димеризовати. Да би реакција била ефикасна, донор водоника мора бити једињење са слабијом С-Н везом као што су примарни алкохоли али и одговарајући амини, угљоводоници, феноли и амиди. Одвија се преко два механизма: радикалског и не-радикалског (Formosinho and Arnaut, 1991).

(2) Хомолитичком цепању једноструких веза суседних карбонилној групи (обично α -везе $(O=C)-C$, тзв. α - или Тип I цепање) када генеришу радикалске интермедијере и

(3) Адицијом на двоструке везе дају оксетане (Cowan and Drisko, 1976; Coyle, 1986) што треба имати на уму када се конјуговани диени користе као *quencher*-и ексцитованих стања карбонилних једињења јер у интеракцији са триплетним (n, π^*) стањем арил кетона дају управо оксетане (Coyle, 1986).

Иако је, као што се са **Слике 97** види, најниже ексцитовано стање арил кетона синглетно (n, π^* карактера), већина њихових фотохемијских реакција се одвија преко триплета јер је интерсистемски прелаз (из n, π^* ексцитованог синглетног стања (S_1) у енергетски блиско T_2 (π, π^*) триплетно стање а затим и брзи прелаз у нискоенергетско T_1 (n, π^*) стање – **Сл.97**) врло ефикасан⁵⁶ (Rohatgi-Mukherjee, 1986; AL-Azawy, 2014; Klan and Wirz, 2009) – толико да се реакције из синглетних стања ароматичних кетона, пре свих бензофенона, у растворима обично не уочавају (Cowley, 1997).

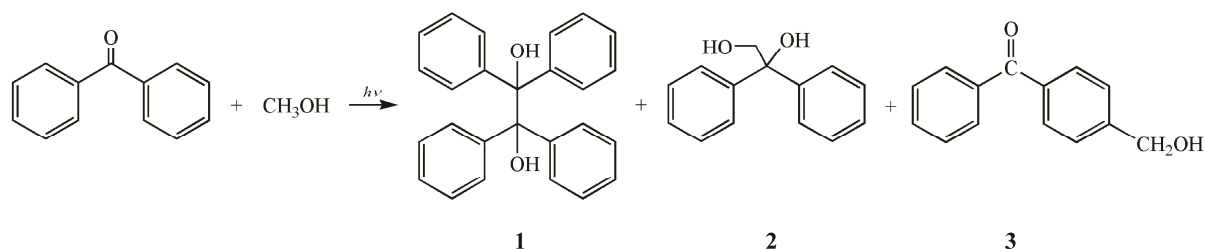
У **Теоријском делу** је било речи да бензофенон поседује све особине пожељне за један ефикасан триплетни сензибилизатор и то: способност апсорпције релативно

⁵⁶ Релаксација молекула флуоресценцијом и не-радијационим прелазима са S_1 у S_0 стање је <1% у поређењу са ISC-ом у T_2 . У одсуству *quencher*-а T_1 се враћа у S_0 фосфоресценцијом и не-радијационим прелазом (AL-Azawy, 2014).

великих таласних дужина, ефикасан ISC и малу енергетску разлику између синглетног (S_1 , 74 kcal mol^{-1}) и триплетног (T_1 , 69 kcal mol^{-1}) стања (Klan and Wirz, 2009).

Фотохемија (пре свега фоторедукција) бензофенона у раствору је била у фокусу бројних опсежних истраживања у прошлом веку, а интересовање не јењава ни дан-данас. Праћена је у алифатичним алкохолима: изопропанолу – под аеробним (Rubin, 1982; AL-Azawy, 2014) и анаеробним условима (Filipescu and Minn, 1968; Weiner, 1971; Demeter and Bérces, 1989), етанолу и метанолу (Hoshino *et al.*, 1980), органским растварачима: циклохексану, бензену и толуену (Johnston *et al.*, 1988), ацетонитрилу и бензену уз изопропанол као H-донор (Viltres Costa *et al.*, 1996) итд. ексцитовањем бензофенона ласером (Johnston *et al.*, 1988; Demeter and Bérces 1989; AL-Azawy, 2014) сунчевом светлошћу, IR (AL-Azawy, 2014), UV (Weiner, 1971; Rubin, 1982) или γ -зрацима (Hoshino *et al.*, 1980). Све поменуте реакције се одвијају преко слободних кетил радикала (Horiuchi and Ji, 2004).

Озрачивањем дегасираног раствора бензофенона у метанолу (концентрације $0,019 \text{ mol dm}^{-3}$) светлошћу таласне дужине 366 nm (UV-A) настају производи са уделом од 30% бензпинакола (структура **1** на Сл.98). Како је механизам настанка бензпинакола истражен до детаља закључено је да је за настанак два арил кетил радикала потребан један једини фотон, јер радикал који потиче из алифатичног алкохола размењује водоников атом са другим молекулом арил кетона у основном стању (Coyle, 1986). Доминанти производ поменуте реакције, са уделом од $\sim 70\%$ је 1,1-дифенил-1,2-етандиол (структура **2** на Сл.98), који настаје као производ реакције бензофенон кетил радикала ($BZPH^{\bullet}$) и метокси радикала (CH_3O^{\bullet}). HPLC-UV анализом реакционе смеше је доказано присуство још једног (додуше минорног) производа ($\sim 1\%$) са максимумом апсорбације на 254 nm идентификованог као 4-хидроксиметилбензофенон (структура **3** на Сл.98) (Rubin, 1982).



Слика 98 Фоторедукциони производи дегасираног раствора бензофенона у метанолу настали озрачивањем UV-A лампама (Rubin, 1982; Coyle, 1986)

Coyle (1986) такође наводи фотоадициони производ (2) уочен у претходном раду (Rubin, 1982) као доминантни производ озрачивања разблажених раствора ($c = 1 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) BZP-а у метанолу, са уделом од >90% (Coyle, 1986).

Диарил кетони су генерално фотостабилни и не фрагментишу током озрачивања у раствору (Coyle, 1986), што је уочено и у овој дисертацији. На HPLC хроматограмима неозраченог и UV-B озрачиваног BZP-а у метанолу (али и у смешама BZP-PL90 и BZP-QC-PL90), снимљеним на таласној дужини блиској максимуму апсорбанције BZP-а – 250 nm и приказаним на **Слици 33А**, пик елуиран на 12,8 min је, на основу својих спектралних карактеристика (апсорпција у области ~227-313 nm – таласна дужина максимума апсорбанције, $\lambda_{\text{max}} = 255 \text{ nm}$, **Сл.33В**), идентификован као бензофенон. Са порастом времена континуалног UV озрачивања долази до смањења његове површине као последица *bleaching*-а односно деградације и истовременог пораста површине пика на $t_{\text{ret.}} = 6 \text{ min}$, што наводи на закључак да уочени пик вероватно потиче од деградационог односно фотоадиционог производа бензофенона. Максимум апсорбанције новонасталог пика је 258 nm (хромофора бензофенона је очувана), а поларност већа (краће ретенционо време у односу на бензофенон). Генерално, структура производа се може наслутити на основу спектралних карактеристика, међутим за недвосмислену идентификацију потребно је примењену течну хроматографију комбиновати и са детектором као што је масени спектрометар.

Брзина UV индуковане деградације BZP-а тј. промена концентрације BZP-а са временом, изражена као нагиб линеарне зависности \ln -оване вредности површине пика BZP-а од времена озрачивања (за случај UV-B озрачивања приказана на **Сл.33С**) из две UV под-области (UV-A и UV-B) је приказана у **Табели 2**. Резултати указују да брзина деградације BZP-а ($k_{\text{degrad.BZP}}$) зависи од врсте упадних фотона (тј. упадне енергије) јер је константа брзине деградације узроковане UV-B светлошћу ($k_{\text{degrad.BZP}}^{\text{UV-B}}$) 2,7 пута већа од константе брзине деградације добијене након озрачивања UV-A светлошћу ($k_{\text{degrad.BZP}}^{\text{UV-A}}$). Деградација BZP-а се одвија по кинетици првог реда.

6.1.2 Кверцетин као антиоксиданс

Претпоставља се да су кверцетин и његови гликозиди одговорни за превенцију UV зрачењем индукованих оштећења у боранији (*Vicia faba*), каноли – репици (*Brassica napus*) и јабуци (*Malus domestica*), јер је у овим биљкама појачана биосинтеза

кверцетина након излагања UV-B зрачењу. Међутим, тачан механизам његовог фотопротективног деловања још увек није у потпуности јасан. С обзиром на то да кверцетин растворен у метанолу апсорбује UV зрачење са апсорпционим максимумима у UV-A ($\lambda_{\max} = 365 \text{ nm}$, $\varepsilon = 28\,400 \text{ dm}^3\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$) и UV-C ($\lambda_{\max} = 256 \text{ nm}$, $\varepsilon = 28\,300 \text{ dm}^3\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$) области, један од могућих механизма је директна апсорпција UV зрачења и последично спречавање њиме индукованог настанка ROS врста (Fahlman and Krol, 2009). Апсорбована енергија се расипа у виду топлоте, светлости (флуоресценција) (Falkovskaia *et al.*, 1998) или доводи до деградације кверцетина. Други могући механизам се огледа у „хватању” слободних кисеоничних радикала и спречавању иницијације ЛП (Fahlman and Krol, 2009b). Треба међутим имати на уму да се механизми међусобно не искључују већ највероватније делују синергистички.

6.1.2.1 UV-индуковани *bleaching* QC-а у метанолу: мера „превентивне” АО активности QC-а

Молекул кверцетина од самог открића не губи на својој атрактивности па је његова (не)стабилност праћена у различитим медијумима, под различитим експерименталним (стресним) условима. Како су за овај рад од интереса само дешавања у најједноставнијем медијуму – раствору, дискусија ће надаље бити усредсређена само на растворе.

Велики број хидроксилних група, ниске pK_a^{57} вредности (6,74; 9,02 и 11,55) – због чега је негативно наелектрисан на неутралним рН вредностима и висок редокс потенцијал⁵⁸ (0,06 eV) чине кверцетин веома осетљивим на оксидацију (Fahlman, 2010). Досад је изолован и идентификован велики број оксидационих производа кверцетина – само су Zhou и Sadik (2008) у свом истраживању идентификовали 22 (Zhou and Sadik, 2008). Оксидација (деградација) QC-а је праћена под дејством UV светлости (Fahlman and Krol, 2009a; Vicentini *et al.*, 2007; Dall'Acqua *et al.*, 2012), γ зрака (Marfak *et al.*, 2003), током електрохемијске (Timbola *et al.*, 2006; Nematollahi and Malakzadeh, 2003; Zare *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2007; Brett and Ghica, 2003; Hendrickson *et al.*, 1994), и ензимске оксидације (Awad *et al.*, 2000; Momić *et al.*, 2009; Makris and Rossiter, 2002; Steiner *et al.*, 2002; Kubo *et al.*, 2004; Savić *et al.*, 2013); оксидације јонима прелазних

⁵⁷ pK_a – константа дисоцијације киселине указује на рН вредност на којој ће једињење донирати или примити протон. Што је pK_a вредност мања, једињење је јача киселина одн. способност донирања протона је већа.

⁵⁸ Редокс потенцијал је мера афинитета једињења да прими електроне и притом се редукује. Већа вредност указује на већи афинитет.

метала попут бакра – Cu^{2+} (Utaka and Takeda, 1985; Jungbluth *et al.*, 2000) и гвожђа – Fe^{2+} и Fe^{3+} (Jungbluth *et al.*, 2000), калијум ферицијанидом (Gülşen *et al.*, 2007), атмосферским кисеоником (Zenkevich *et al.*, 2007; Dangles *et al.*, 1999), липосолубилним азо иницијатором AIBN-ом (Krishnamachari *et al.*, 2002; Krishnamachari *et al.*, 2004); DPPH радикалом (Dangles *et al.*, 1999; Hvattum *et al.*, 2004); у воденим, алкохолним, пуферским растворима (Bancirova, 2015) и органским растварачима. Идентификовани деградациони производи су углавном депсиди, фенолне киселине, (хомо- и хетеро-) димери и адициони производи (настали адицијом растварача на молекул кверцетина).

С обзиром на велику моћ апсорпције (пре свега UV зрачења) кверцетина, студије његове фотоосетљивости су посебно интересантне и имају за циљ пре свега процену његовог доприноса заштити биљака али и људи, који га на дневном нивоу уносе у великим количинама, од штетног зрачења. Експерименти изведени у растворима су од суштинске важности јер су ослобођени утицаја структурне организације а опет пружају базичне податке за наставак рада у сложенијим медијумима – мицелама, липозомима и на крају *in vivo*. Зато је у овом раду UV озрачивање кверцетина у метанолу одабрано као модел оксидативних реакција које се потенцијално одигравају *in vivo*. Одабир алкохола за припрему раствора је последица нерастворљивости QC-а у води.

Резултати добијени проучавањем UV фотодеградације кверцетина у раствору су различити, што је и разумљиво с обзиром на то да ефекат озрачивања између осталог зависи од концентрације QC-а, енергије зрачења, врсте коришћеног растварача (QC је стабилнији у апротичним (ацетонитрилу) у односу на протичне раствараче (води и алкохолима)), запремине озрачиваног раствора, озрачиване површине и удаљеност узорка од извора зрачења.

У етанолном раствору долази до потпуне деградације кверцетина (праћене смањењем интензитета Траке I UV-VIS спектрофотометријом) током излагања озрачивању живиним лампама високог притиска, снаге 200 W (UV-C зрачењу) у трајању од 18-37 h (Kaneta and Sugiyama, 1971). У метанолном раствору се интензитет апсорбације кверцетина смањује за 17% након 15 h-овног озрачивања комбинацијом UV-A и UV-B лампи (Smith *et al.*, 2000). Група истраживача на челу са Dall'Acqua-ом

(2012) је ирадијацијом⁵⁹ кверцетина (концентрације $2 \times 10^{-5} \text{ moldm}^{-3}$ – у метанолау и етанолу) од $0,30 \text{ Jcm}^{-2} \text{ min}$ ($50,0 \text{ Wm}^{-2}$) и $0,20 \text{ Jcm}^{-2} \text{ min}$ ($33,3 \text{ Wm}^{-2}$) UV-A и UV-B лампама, респективно, саопштавајући притом узорцима ирадијанцију⁶⁰ од $50\text{-}70 \text{ Jcm}^{-2}$ односно $\sim 36\text{-}50 \text{ Wm}^{-2}$, масеном спектрометријом идентификовала само један производ деградације, за који је претпостављено да је настао оксидацијом QC-а кисеоником из ваздуха (аутооксидацијом) и адицијом растварача на 2,3-двоструку везу флавона (процеси се могу одвијати и обрнутим редоследом) (Dall'Acqua *et al.*, 2012). Са друге стране, фотостабилност QC-а концентрације 5 mgcm^{-3} ($\sim 2 \times 10^{-2} \text{ moldm}^{-3}$) је доказана у пропилен гликолу након седмодневног излагања UV-B зрачењу ирадијанције $0,26 \text{ mWcm}^{-2}$ ($2,6 \text{ Wm}^{-2}$) (Vicentini *et al.*, 2007).

Ова дисертација се једним својим делом бави проучавањем фотодеградације кверцетина у метанолау индуковане UV-A и UV-B зрачењем. На хроматограмима неозраченог и UV-B озрачиваног раствора, снимљеним на 372 nm , пик елуиран на ретенционом времену ($t_{\text{ret.}}$) од $5,0 \text{ min}$ (Сл.34А) је, на основу својих спектралних карактеристика, идентификован као кверцетин. Апсорпциони (UV) спектар кверцетина чине две главне апсорпционе траке – Трака I (последница апсорпције В-С система прстенова, Сл.14) и Трака II (апсорпција А-С система прстенова) са максимумима апсорбанције на 372 nm и 255 nm , респективно (Сл.34В). Трећа, слаба трака са максимумом апсорбанције на 300 nm се приписује апсорпцији пиранског, С-прстена. Праћењем неозраченог и UV-B озрачиваног раствора QC-а на таласној дужини ($\lambda_{\text{det.}}$) од 295 nm (Сл.35А) уочавају се одређене, UV-индуковане промене. Наиме, на хроматограму неозраченог раствора је присутан само пик кверцетина ($t_{\text{ret.}} = 5,0 \text{ min}$), чија површина (концентрација) са порастом времена континуалног UV-B озрачивања пропорционално опада (стрелица усмерена наниже поред пика на хроматограмима указује на деградацију QC-а), док истовремено расте површина пика елуираног на ретенционом времену од $3,6 \text{ min}$ (стрелица усмерена навише указује на продукцију). UV спектар новонасталог једињења (Сл.35В), означеног са QCDP1 се састоји од само једне апсорпционе траке са максимумом апсорбанције на 293 nm . Разлика у односу на спектар кверцетина је очигледна – нестале су обе карактеристичне траке. Поређењем промена површине њихових пикова се уочава да се, са порастом времена озрачивања,

⁵⁹ Ирадијација (озраченост) је густина енергије зрачења која у посматраном времену падне на јединичну површину. Добија се интегралом озрачења по времену и изражава као Whm^{-2} или Jm^{-2} . Зависно од посматраног временског интервала назива се сатна, дневна, месечна или годишња сума зрачења.

⁶⁰ Ирадијанција (озрачење) представља густину енергетског флукса зрачења пропорционална односу енергетског флукса истог и површине нормалне на правац зрачења. Изражава се јединицама Wm^{-2} .

процеси деградације QC-а и продукције QCDP1 одвијају синхронизовано, по кинетици првог реда (Сл.34С и 35С). На основу израчунатих вредности константи деградације QC-а ($k_{\text{degrad.QC}}^{\text{UV-B}} / k_{\text{degrad.QC}}^{\text{UV-A}}$) приказаних у Табели 2 (стр. 104) закључује се да енергија упадних UV-фотона игра врло важну улогу у процесу деградације (*bleaching*-а) QC-а – деградација је скоро 6 пута бржа под дејством UV-B у поређењу са UV-A озрачивањем.

Хемијски UV-филтри типа бензофенона се и дан-данас користе у препаратима за заштиту од Сунца. У Теоријском делу је наведено да се из врло оправданих разлога одустало од употребе самог бензофенона, а како је данас акценат на коришћењу природних производа (чињеница је да су флавоноиди, са кверцетином као најпознатијим представником, одлични UV апсорбери), спроведена су бројна истраживања са циљем изналажења начина инкорпорације ових производа у одговарајуће формулације за заштиту од штетних ефеката UV зрака.

Очигледно је да су ове две групе једињења сушта супротност једна другој – док је бензофенон изузетан генератор слободних радикала, флавонол кверцетин је доказано ефикасан антиоксиданс. С тим у вези, у раду је праћена међусобна интеракција BZP-а и QC-а под дејством континуалног UV озрачивања.

На хроматограмима неозрачене и UV-B озрачиване смеше QC-BZP, снимљеним на таласној дужини од 250 nm (Сл.36А), јављају се два пика елуирани на ретенционим временима од 5,0 min и 12,8 min, на основу UV спектра идентификовани као QC и BZP, респективно (Сл.36В₁ и В₂). На основу вредности константи њихових брзина деградације, евидентно је да присуство BZP-а значајно убрзава деградацију кверцетина: скоро 68 пута ($k_{\text{degrad.QC izQCBZP}}^{\text{UV-A}} / k_{\text{degrad.QC}}^{\text{UV-A}}$) током UV-A озрачивања и готово 23 пута ($k_{\text{degrad.QC izQCBZP}}^{\text{UV-B}} / k_{\text{degrad.QC}}^{\text{UV-B}}$) у случају UV-B озрачивања. Са друге стране, превентивни ефекат QC-а је очигледан. Наиме, деградација BZP-а у смеси је спорија ~43 пута ($k_{\text{degrad.BZP}}^{\text{UV-B}} / k_{\text{degrad.BZP izBZP-QC}}^{\text{UV-B}}$) у случају UV-B односно 50 пута у случају UV-A ($k_{\text{degrad.BZP}}^{\text{UV-A}} / k_{\text{degrad.BZP izBZP-QC}}^{\text{UV-A}}$) озрачивања. Енергија упадних фотона одређује брзину деградације QC-а и BZP-а и када су у смеси. Деградација QC-а под дејством UV-B зрачења је ~2 пута ($k_{\text{degrad.QC izQCBZP}}^{\text{UV-B}} / k_{\text{degrad.QC izQC-BZP}}^{\text{UV-A}}$) а BZP-а ~3 пута ($k_{\text{degrad.BZP izBZP-QC}}^{\text{UV-B}} / k_{\text{degrad.BZP izBZP-QC}}^{\text{UV-A}}$) бржа него под дејством UV-A зрачења, респективно (Табела 2). Другим речима, 35 min-тно озрачивање кверцетина UV-B светлошћу доводи до његове деградације од 23,4% односно од свега 9,42% током 75 min-ог

озрачивања UV-A светлошћу. У присуству BZP-а тај проценат достиже чак 99% током 25 min-тног озрачивања UV-B односно 30 min-тног озрачивања UV-A светлошћу.

Да присуство BZP-а значајно убрзава деградацију QC-а уочено је и у раду Fahlman-a and Krol-a (2009a). Наиме, у њиховим експериментима је деградација QC-а у метанолу концентрације $50 \mu\text{M}^{61}$ ($5 \times 10^{-5} \text{ moldm}^{-3}$) током 11 h-овног озрачивања UV-A ($7,4 \text{ Wm}^{-2}$) и UV-B (13 Wm^{-2}) светлошћу била свега 17%. Присуство BZP-а у 5 пута већој концентрацији (од QC-а) је за само 1 h узроковало конверзију >90% QC-а у фотопроизводе (Fahlman and Krol, 2009a). Дакле, резултати добијени у овој дисертацији у начелу потврђују закључке изведене у разматраном истраживању (Fahlman and Krol, 2009a).

Праћењем неозрачене и UV-B озрачиване смеше BZP-QC на таласној дужини од 295 nm (Сл.37А) уочава се појава бар три нова пика, елуираних на ретенционим временима од 3,4 min; 3,7 min и 4,4 min, обележених са QCDP4, QCDP3 и QCDP2, респективно, чија површина са порастом времена континуалног UV-B озрачивања расте. На UV спектрима QCDP3 и QCDP2 (Сл.37В₁ и В₂) се уочава губитак трака карактеристичних за кверцетин и хиперхромо померање у области таласних дужина од 246-378 nm, са максимумима апсорбације на 299 nm односно 298 nm и „раменом“ на 274 nm, респективно. Површина QCDP3 у смеси расте експоненцијално, док QCDP2 расте до 15. min, достиже плато до 20. min, а онда лагано опада до 30. min (Сл.37С₁ и С₂).

У радовима Fahlman-a и Krol-a (2009a) и Maini-је и сарадника (2012) се наводи да додатак BZP-а не мења врсту насталих деградационих производа QC-а, али свакако појачава њихову продукцију (Fahlman and Krol, 2009a; Maini *et al.*, 2012). Резултати добијени у овој дисертацији указују да то овде није случај. На основу спектралних карактеристика идентификованих продуката, њихове структуре нису исте, што указује на различитост механизма фотодеструкције QC-а у одсуству и присуству BZP-а.

Производи деградације QC-а готово идентичних спектралних карактеристика као у овој дисертацији су уочени у једној од наших ранијих публикација (Zvezdanović *et al.*, 2012a). Наиме, у раду је фотодеградација кверцетина у метанолу и рутина у метанолу и води под дејством континуалног UV-B и UV-C озрачивања праћена UV-VIS спектрофотометријом и HPLC хроматографијом. Том приликом су уочена 4 производа деградације кверцетина (од којих је 3 уочено у овој дисертацији) и 2

⁶¹ Ова концентрација је коришћена како би се спречило „ауто-гашење“ (*self-quenching*) кверцетина!

производа рутина. На основу сличности спектралних карактеристика награђених продуката кверцетина са спектрима доступним у литератури, предложене су њихове структуре.

Најполарнијем производу (најкраће ретенционо време), са максимумом апсорбанције на 294 nm (сличан QCDP1 из ове дисертације), је приписана структура једињења 2,4,6-трихидроксифенилглиоксилна киселина – детектована током електрохемијске оксидације кверцетина (Zhou *et al.*, 2007). За производ са максимумом апсорбанције на 294 nm и „раменом” на 325 nm (није уочен у овој дисертацији) је предложена структура једињења 2-(3,4-дихидроксибензоил)-2,4,6-трихидрокси-3(2H)-бензофуранона, који је детектован током електрохемијске оксидације, ензимске оксидације, оксидације азо иницијатором AIBN и аутооксидације QC-а (Zhou and Sadik, 2008). Предложена структура производа са максимумом апсорбанције на 300 nm (сличан QCDP3 из ове дисертације) је једињење 1,3,8-трихидрокси-9aH,11H-бензофурано[3,2-b]-[1]бензопиран-7,11-дион – циклични етар који систем прстенова А-С повезује са прстеном В, производ електрохемијске оксидације кверцетина (Timbola *et al.*, 2006). За последњи, најнеполарнији производ (најдуже ретенционо време), са максимумом апсорбанције на 297 nm и „раменом” на 275 nm (сличан QCDP2) је предложена структура 3,5-дихидрокси-2-[метокси(оксо)ацетил]фенил 3,4-дихидроксибензоата, идентификованог током γ -озрачивања кверцетина (Marfak *et al.*, 2002).

Очигледно је да ниједан од продуката са чијим спектром су поређени спектри продуката представљени у раду Zvezdanović и сарадника (Zvezdanović *et al.*, 2012a) није настао као последица UV озрачивања кверцетина. Једино се већ разматрани рад Fahlman-а и Krol-а (Fahlman and Krol, 2009a) бави озрачивањем QC-а у метанолу ирадијанцијом врло блиској оној коришћеној како у овој дисертацији тако и у поменутом раду (Zvezdanović *et al.*, 2012a). По Fahlman-у и Krol-у, последице озрачивања QC-а се огледају у отварању С-прстена и настанку производа идентификованих као 2,4,6-трихидроксибензалдехид, 2(3',4'-дихидроксибензоилокси)-4,6-дихидроксибензоева киселина и 3,4-дихидроксифенилетанол. Међутим, како аутори нису приказали апсорпционе спектре деградационих производа за које су предложили структуре, није постојала могућност поређења са производима добијеним у раду Zvezdanović и сарадника (Zvezdanović *et al.*, 2012a), самим тим ни и овој дисертацији.

Ипак, предлог структура у раду Fahlman-а и Krol-а (2009) је оправдан колуирањем идентичних стандарда и масеном анализом. Молекулски јони $[M-H]^-$ на m/z 153 одговара првом; $[M-H]^-$ на m/z 305 и основни пик на m/z 168,86 другом а $[M-H]^-$ на m/z 153 и основним пиком на m/z 121,12 трећем идентификованом производу (Fahlman and Krol, 2009). Ниједна од поменутих фрагментација није детектована у овој дисертацији.

Циљ пилот-експеримента у коме је анализиран неозрачен и UV-B озрачиван раствор кверцетина у метанолау, као и неозрачена и UV-B озрачивана смеша кверцетина и бензофенона у метанолау техником електроспреј јонизација-масене спектрометрије је била недвосмислена идентификација насталих продуката.

6.1.2.2 Идентификација деградационих производа QC-а ESI-MS техником

Најучесталији (најинтензивнији) пик у масеном спектру се назива основни или базни пик и њему се приписује нормализовани интензитет од 100% (Cody, 2002).

У масеним спектрима неозраченог кверцетина и смеше кверцетина и бензофенона се уочавају два пика (Сл.44А и В). Први, на m/z 301,08 припада молекулском јону (депротонованом молекулу) кверцетина $[M-H]^-$ док други, на m/z 602,58, потиче од димера кверцетина и представља чест проблем у интерпретацији резултата добијених „меким” техникама јонизације јер се тенденција формирања димера повећава са порастом концентрације анализата, односно смањује са смањењем исте (Cody, 2002). У ESI(-) масеним спектрима UV-B озрачиваних узорка кверцетина у метанолау (Сл.44А) се уочава пораст релативног интензитета пикова на m/z 331 и m/z 363 са порастом времена UV-B озрачивања од 20 min (14,4% и 21%) на 60 min (52% и 100%) уз истовремено смањење интензитета пика кверцетина (m/z 301) са 100% на 29%, респективно.

Са друге стране, у ESI(-) масеним спектрима UV-B 30 min и UV-B 60 min озрачиване смеше кверцетина и бензофенона основни пик је на m/z 347 док се пораст релативног интензитета пика на m/z 211 уочава са порастом времена UV-B озрачивања од 30 min (42,03%) на 60 min (74,4%), уз истовремено смањење релативног интензитета пика кверцетина са 100% у спектру неозрачене смеше на 23,2% у спектру смеше озрачене 30 min. Молекулски пик кверцетина се, на спектру смеше озрачене 60 min не уочава (Сл.44В).

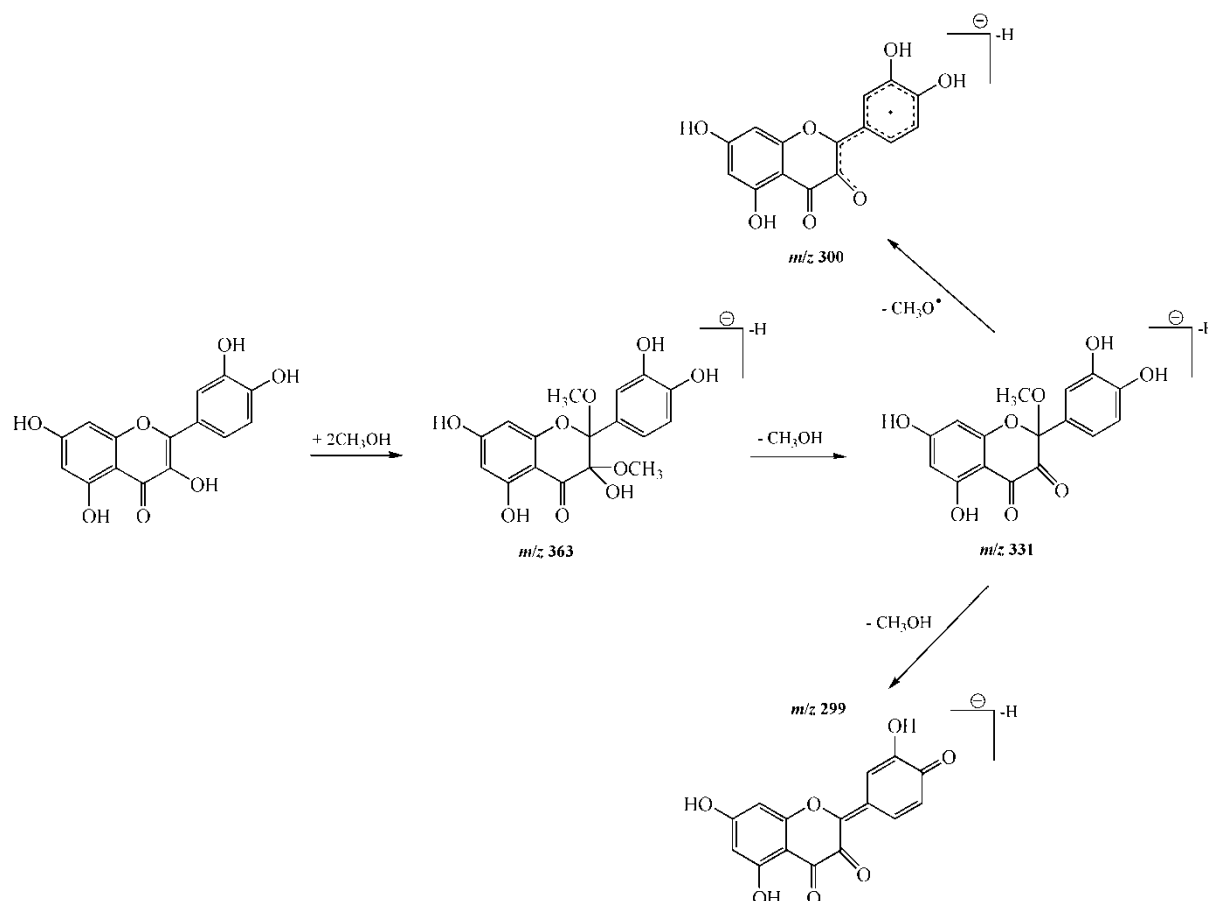
Добијени резултати потврђују закључак изведен на основу снимљених хроматограма – да механизам деградације кверцетина у одсуству и присуству бензофенона није исти. Поменути јони су, као што је већ објашњено у **Експерименталном делу**, одабрани као прекурсори за даљу фрагментацију.

Фрагментација кверцетина је иначе истражена до детаља, зато ће овде карактеристични, фрагментни јони бити само побројани. Применом колизионе енергије (CID) од 25 eV на молекулски јон QC-а: $[M-H]^-$ (m/z 301) долази до његове фрагментације на јоне: $[M-H-CO]^-$ (m/z 273); $[M-H-CO_2]^-$ (m/z 257); $[M-H-C_7H_6O_2]^-$ (m/z 179); $[M-H-C_7H_6O_2-CO]^-$ (m/z 151) и $[M-H-C_7H_6O_2-CO-CO_2]^-$ (m/z 107) – **Сл.45**.

Применом колизионе енергије од 15 eV на јон m/z 363 настаје MS^2 спектар са основним пиком на m/z 331 (**Сл.46А**), чијом се даљом фрагментацијом (CID енергијом од 21 eV) добија спектар (MS^3) са основним пиком на m/z 299 (**Сл.46В**).

Јон са односом масе и наелектрисања (m/z) 363 представља молекулски јон кверцетина на који су адирани два молекула растварача, што је уочено у раду Hvattum-а и сарадника (Hvattum *et al.*, 2004).

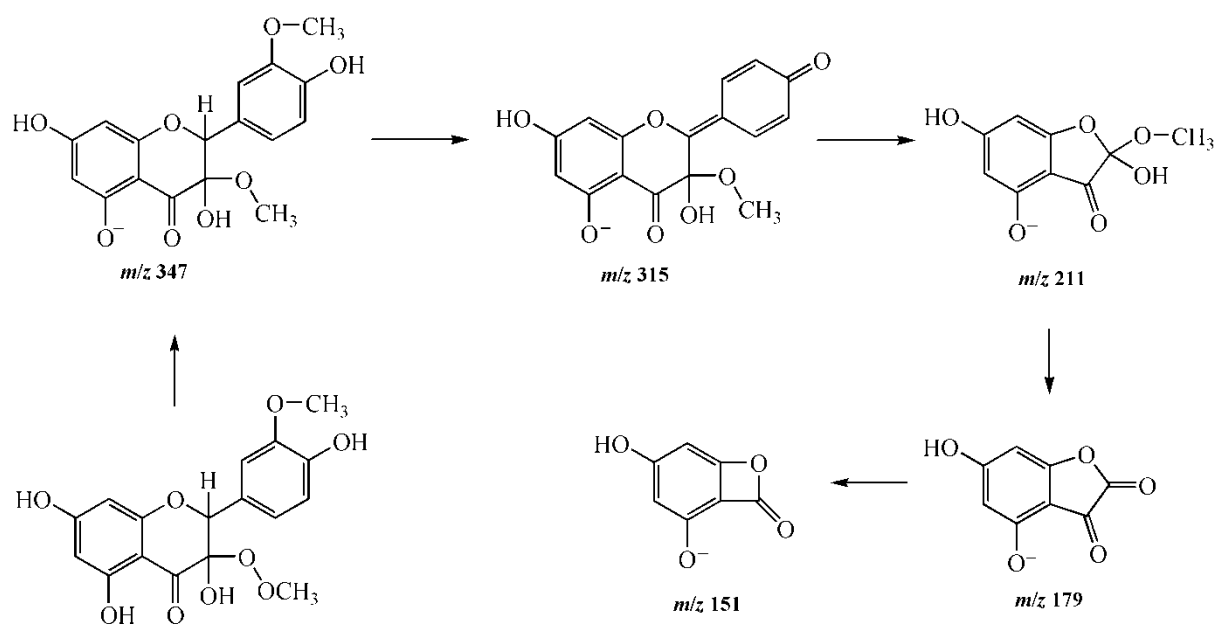
Структуру једињења потврђује најпре смањење масе базног пика за 32 Da током фрагментације, која одговара маси CH_3OH молекула а онда и губитак друге метокси групе која се одвија или издвајањем метокси радикала (смањење за 31 Da) – фрагментни јон на m/z 300,08 или метанола (смањење за 32 Da) – фрагмент на m/z 299. Идентична фрагментациона шема је уочена у реакцији кверцетина са DPPH радикалом у метанолу (**Сл.99**). Штавише, апсорпциони максимум посматраног једињења је 295 nm а исто је, помоћу 1H и ^{13}C NMR спектроскопије, идентификовано као 2-(3,4-дихидроксифенил)-3,5,7-трихидрокси-2,3-диметокси-2,3-дихидро-4H-хромен-4-он (Hvattum *et al.*, 2004).



Слика 99 Фрагментациона шема деградационог производа кверцетина на m/z 363 према Hvattum-у и сарадницима (Hvattum *et al.*, 2004).

Фрагментацијом „родитељског” јона $[\text{M}-\text{H}]^-$ на m/z 347 колизионом енергијом од 20 eV настају „потомци” на m/z 315 (губитак неутралног молекула масе 32 Da – CH_3OH), m/z 211 (смањење масе јона на m/z 315 за 104 Da), као и фрагменти на m/z 179 и m/z 151, карактеристични за кверцетин – Сл.47.

Идентична фрагментациона шема је уочена током термалне деградације кверцетина на температури од 100°C (Buchner *et al.*, 2006). Смањење масе за 107 Da или 121 Da се обично уочава када прстен В у молекулу неког једињења има *o*-дихидрокси структуру. Како се након губитка фрагмента од 104 Da фрагментација молекула даље одвија као код кверцетина долази се до закључка да су прстенови А и С деградационог производа кверцетина и самог кверцетина идентични, док се прстенови В разликују. Зато је за једињење са молекулским јоном на m/z 347 предложена структура приказана на Слици 100. Једињење је идентификовано као 2-(3'-метокси-4-хидроксифенил)-3,5,7-трихидрокси-3-метокси-2,3-дихидрохромен-4-он, масе 348 Da (Buchner *et al.*, 2006).



Слика 100 Фрагментациона шема деградационог производа кверцетина на m/z 347 према Buchner-у и сарадницима (Buchner *et al.*, 2006).

Структура једињења идентификованог као 2,4,6-трихидрокси-2-метоксибензофуран-3-он са молекулским јоном на m/z 211 (маса 212 Da) је такође приказана на **Слици 100** (Buchner *et al.*, 2006).

Међутим, молекулски јон $[M-H]^-$ на m/z 347 је уочен и на LC-ESI(-)-MS спектрима добијених праћењем продуката радиоллизе (озрачивања γ зрацима⁶²) раствора кверцетина у метанолу (Marfak *et al.*, 2003). ESI(-)-MS анализа је у ствари потврда структуре предвиђене NMR спектроскопијом једињења молекулске формуле $C_{16}H_{21}O_9$ и молекулске масе 348 Da. Спектралне карактеристике производа су готово идентичне оним код производа QCDP2 из ове дисертације – максимум апсорбанције на 298 nm и „раме” на 275 nm (Marfak *et al.*, 2003).

Рад Marfak-а и сарадника (Marfak *et al.*, 2003) заслужује пажњу с обзиром на то да истиче веома битне чињенице не само за дискусију резултата добијених у овој дисертацији већ и за будући рад, а тичу се првенствено ефеката озрачивања.

Наиме, истакнуто је да озрачивање испољава директне и индиректне ефекте на озрачивани раствор. Директни ефекти доводе до оксидације и јонизације молекула и јављају се приликом озрачивања раствора високих концентрација или молекула

⁶² Гама зрачење (γ зрачење) припада јонизујућем делу ЕМ спектра, има најпродорније фотоне (највеће енергије = најмање таласне дужине), фреквенције преко 10 ексагерца ($>10^{19}$ Hz), енергије преко 100 keV и таласне дужине испод 10 пикометара (10^{-11} m) што је мање од пречника атома.

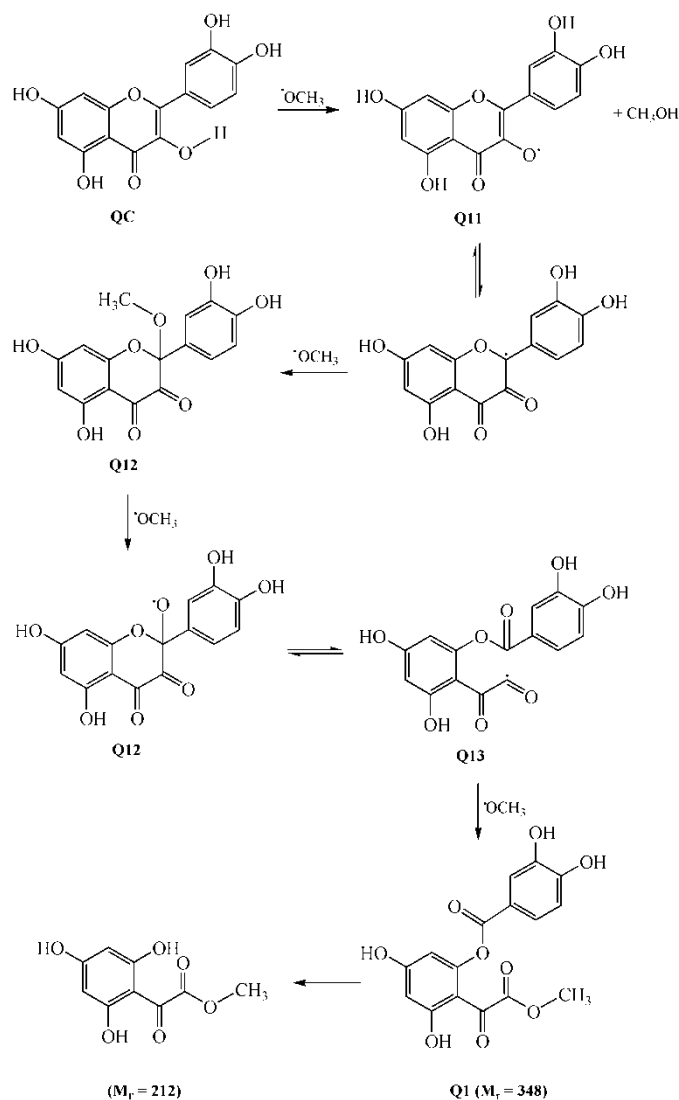
великих молекулских маса, као што су полимери, ДНК, итд. Конкретно, допринос директних ефеката на деградацију кверцетина концентрације $\sim 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ је мали. Индиректни ефекти (под којим се подразумевају производи радиолизе растварача, пре свега алкохола, који „рађају” врло реактивне врсте) су ти који доводе до хемијске деградације молекула. У раду се такође наводи да „након 50 ns континуалног озрачивања, озрачивани раствор постаје хомогени раствор реактивних врста а уколико је концентрација растворене супстанце довољно ниска ($< 5 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$), за њену деградацију су одговорне зрачењем генерисане радикалске врсте!”. Радиолизом метанола настају: солватисани електрон (e_s^-), H_2 , H^\bullet , CH_3O^\bullet , $^\bullet CH_2OH$, $(CH_2OH)_2$, H_2CO и H^+ као што је $CH_3OH_2^+$ (Marfak *et al.*, 2003).

Гама зрачење је изузетно јако (као део јонизујућег дела ЕМ спектра), знатно јаче од UV зрачења коришћеног у овој дисертацији, али податак на који је скренута пажња треба увек имати на уму. Иако током UV озрачивања метанолних раствора не настају све побројане реактивне врсте, присуство метокси (CH_3O^\bullet) радикала је готово извесно. Штавише, CH_3O^\bullet се наводи као најреактивија врста у озрачиваним метанолним растворима. По реактивности и агресивности CH_3O^\bullet је пандан $^\bullet OH$ радикалу добијеном радиолизом воде тако да га треба узети у обзир приликом предлагања структуре деградационих производа једињења (у овом случају QC-а) индукованих озрачивањем у метанолу. У прилог томе говоре и структуре деградационих производа QC-а предложене у напред наведеним радовима (Buchner *et al.*, 2006 и Hvattum *et al.*, 2004).

У Теоријском делу је између осталог истакнуто да се АО активност кверцетина приписује $-OH$ групама у положајима 3 (прстена C), 5 и 7 (прстена A) које омогућавају пренос електрона, као и делокализацији π електрона између прстена B, двоструке везе у положају 2,3 и кето групе у положају 4 прстена C (Сл.13) одговорне за стабилизацију радикала насталих током АО деловања.

Оксидација кверцетина зависи од експерименталних услова, посебно од радикала који напада флавонол. Мето оксиданаса су пре свега (а) прстен B јер је богатији електронима од прстена A, преносом електрона настаје фенокси радикал а онда и одговарајући хинон; (б) кето група у положају 4 и (в) $-OH$ група у положају 3 чијом оксидацијом долази до отварања C-прстена и настанка депсида (Krishnamachari *et al.*, 2002; Krishnamachari *et al.*, 2004; Steiner *et al.*, 2002). Последња мета је препозната као најслабије место у молекулу за предлагање механизма настанка производа уоченог на m/z 347 по Marfak-у и сарадницима (Marfak *et al.*, 2003). Наиме, $^\bullet OCH_3$ радикали

најпре нападају –ОН групу у положају 3 прстена С дајући флавоноидни фенокси (флавонокси) радикал Q11. Радикал $\cdot\text{OCH}_3$ се даље адирала на положај 2 прстена С дајући интермедијер Q12. Елиминацијом метил ($-\text{CH}_3$) из метокси групе једињења Q12 у реакцији са $\cdot\text{OCH}_3$ радикалом даје диметил етар (CH_3OCH_3) док метокси радикал и кето група у положају 2 узрокују цепање молекула до Q13 радикала који у реакцији са $\cdot\text{OCH}_3$ радикалом даје депсид Q1 (Сл.101) – 3,5-дихидрокси-2-[метокси(оксо)ацетил]фенил 3,4-дихидроксибензоат.



Слика 101 Механизам настанка деградационих производа кверцетина (идентификованих на m/z 347 – Q1 у негативном и m/z 213 у позитивном јонизационом моду) током радиолитске деградације раствора кверцетина у метанолу дозама од 1-20 kGy предложен према Marfak-у и сарадницима (Marfak *et al.*, 2003).

Нестанак карактеристичних трака QC-а у UV спектрима његових деградационих производа се у литератури тумачи као смањење конјугације (Buchner *et al.*, 2006) због чега се обично предлажу структуре настале адицијом растварача на молекул

кверцетина или феномен објашњава нарушавањем фенолног језгра (Marfak *et al.*, 2003) и предлажу структуре са отвореним C-прстеном. Конкретан пример је дат у овом раду. Иако се фрагментациона шема деградационог производа кверцетина на m/z 347 у овој дисертацији поклапа са шемом датом од стране Buchner-а и сарадника (Buchner *et al.*, 2006), производу је ипак приписана структура предложена од стране Marfak-а и сарадника (Marfak *et al.*, 2003).

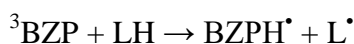
Разлог је чињеница да посматрани производ у овој дисертацији настаје у смеси кверцетина и бензофенона који, као триплетни сензибилизатор, своју ексцитациону енергију може пренети директно на молекул кверцетина узрокујући његово цепање (Fahlman, 2010). Производ деградације депсида (m/z 347) уочен на m/z 213 у позитивном јонизационом модалитету (Marfak *et al.*, 2003), структуре приказане на **Слици 101**, је идентификован као метил-оксо(2,4,6-трихидроксифенил)ацетат и приписан фотодеградационом производу кверцетина обележеном са QCDP3.

6.1.3 UV индуковане промене смеше BZP-PL90 у метанолу

Као што је већ објашњено у **Теоријском делу**, апсорпцијом UV светлости бензофенон достиже дугоживеће триплетно стање (^3BZP):

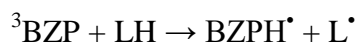


врло реактивно према својој околини (нпр. према фосфолипидима, кверцетину или њиховој смеси). У директној реакцији са липидима, која за резултат има продукцију липидних радикала (L^\bullet), се иницира процес липидне пероксидације:



где су: ${}^3\text{BZP}$ – триплетно стање бензофенона; LH – незасићени липид; BZPH^\bullet – BZP-кетил радикал и L^\bullet – липидни радикал.

Хромофора триплетног бензофенона, ${}^3\text{BZP}$ са олефинским структурама реагује преко два компетитивна (конкурентна) механизма:



Први (радикалски) механизам подразумева апстракцију алилних и двоструко алилних водоникових атома са дате олефинске структуре триплетним бензофеноном уз настанак два радикала: бензофенон-кетил радикала, BZPH^\bullet и липидног радикала, L^\bullet (Marković, 2004; Walling and Gibian, 1965; McTiernan *et al.*, 2014). По другом механизму, бензофенон не нестаје као хемијска врста (што је случај са првим

механизмом), већ се физички деактивира (*quenching*-ом одн. „гашењем” триплета) двоструким везама олефина. Поред поменутих механизма су присутни и други, зависно од медијума у коме се реакција одиграва. У раствору долази до интеракције ВЗР-а са молекулима растварача (Johnston *et al.*, 1988; Viltres Costa *et al.*, 1996; von Raumer *et al.*, 1997), о чему је било речи у делу **6.1.1**, док у мицелама (Marković *et al.*, 1990; Marković and Patterson, 1993; Marković, 2004) и сабијеним мономолекулским слојевима липида долази до тзв. „ефекта кавеза” тј. рекомбинације створених (кетил и липидних) радикала унутар ограниченог простора мицела и спречавања даље пропација ЛП ланца, што представља природни механизам самоодбране биолошких мембрана од процеса ЛП (Marković, 1999; Marković, 2001).

Фосфолипиди (PL90) коришћени у овом раду су смеша липоидних једињења (састава датог у декларацији произвођача – стр. 78). За сам процес ЛП хидрофилне „главе” фосфолипида су нерелевантне. Оно што је заиста важно су хидрофобни „репови” – масне киселине односно број двоструких веза, самим тим број алилних и двоструко алилних Н-атома (Marković *et al.*, 1989; Marković and Patterson, 1989).

Највећи допринос процесу, на основу удела у фосфолипидној смеси (више од 60%), има линолна киселина, са две двоструке везе (2 двоструко алилна и 4 алилна Н-атома). Међутим, иако је квантитативни удео линоленске киселине скоро маргиналан (5%), њен значај за процес ЛП је велики. Четири двоструко алилна и 4 алилна Н-атома је чине „најексплозивнијом” тачком липидне смеше, с обзиром на врло селективну иницијацију процеса ВЗР-ом. Наиме, брзина апстракције Н-атома на двоструко алилном месту је скоро 4 пута већа од брзине апстракције у остатку молекула. Чак 90% апстракција Н-атома у линоленској киселини се одвија на двоструко алилним местима (Marković and Patterson, 1989). До овако прецизних података се дошло проучавањем селективности ВЗР-а (и његових деривата) као сензибилизатора према серији чистих, незасићених масних киселина, одабраних према порасту броја двоструких веза (од олеинске (са једном), преко линолне (са две) и линоленске (са три) до арахидонске киселине (са четири двоструке везе)) у раствору бензена, техником флеш-фотолизе (Marković and Patterson, 1989). Утицај олеинске киселине, удела ~3% у укупној смеси је маргиналан с обзиром на то да она нема двоструко алилне Н-атоме већ само 4 алилна Н-атома. На крају, иако утицај засићених масних киселина (стеаринске и палмитинске – без алилних и двоструко алилних Н-атома) – посебно палмитинске киселине (~12%) није занемарљив, за сам процес ЛП није од важности.

Разноликост масних киселина садржаних у коришћеној фосфолипидној смеши, од олеинске до линоленске киселине, обезбеђује знатну продукцију липидних радикала, прекурсора крајњих продуката ЛПП – липидних пероксида.

На хроматограмима неозрачене и UV-B озрачиване смеше бензофенона и фосфолипида, снимљених на таласној дужини од 250 nm (Сл.38А) се уочавају два пика, елуирана на 6 min и 11,8 min, окарактерисана својим UV спектралним карактеристикама као потенцијални деградациони производ бензофенона – BZPDP (спектар није приказан), о коме је било речи у делу 6.1.1, и бензофенон, респективно (Сл.38В). Хроматограм је приказан до 16. min анализе јер неоксидовани липиди (NL) елуирани на ретенционим временима од 25,2 min; 26,8 min и 28,9 min не апсорбују у овој области. Међутим, иако апсорпција NL у UV области није значајна, они се ипак могу детектовати у области од 203-210 nm захваљујући присуству двоструких веза у ацил групама масних киселина или функционалним групама попут карбонилне, карбоксилне, фосфатне, аминокиселине или кватернерне амонијум групе (Akoh and Min, 2002). Неоксидовани липиди и све смеше са (фосфо)липидима у овој дисертацији су праћени на таласној дужини од 210 nm, међутим хроматограми нису приказивани.

Брзину деградације бензофенона у смеши са фосфолипидима одређује енергија упадних UV фотона (на Сл.38С је приказан случај UV-B озрачивања). На основу вредности константи брзине деградације ($k_{\text{degrad.BZPizBZPPL90}}^{\text{UV-B}} / k_{\text{degrad.BZPizBZPPL90}}^{\text{UV-A}}$) датих у Табели 2 (стр. 104) се закључује да је деградација током континуалног UV-B у односу на UV-A озрачивање 2 пута бржа.

Способност фотосензибилизације процеса ЛПП бензофеноном у смеши BZP-PL90 је праћена тестом „конјуговани диени” на таласној дужини од 234 nm.

Још 1933. године је откривено да се образовањем конјугованих диена у мастима и уљима јавља апсорпциони пик у UV области таласних дужина од 230-235 nm. Посматрање њиховог настанка '60-их година прошлог века се показало као врло користан метод за праћење оксидације липида при чему је пораст интензитета апсорбанције указивао на настанак примарних продуката оксидације – „кварење” масти. Најбржи и свакако најједноставнији метод детекције конјугованих диена је UV-VIS спектрофотометрија, јер не захтева неке посебне реагенсе а користе се и мале количине узорка. Међутим специфичност и осетљивост методе су ниске, јер на резултате може утицати присуство бројних других једињења која апсорбују у истој

области (Akoh and Min, 2002). Зато је у овој дисертацији тест „конјуговани диени” праћен HPLC хроматографијом.

На хроматограмима неозрачене и UV-A озрачиване смеше BZP-PL90 снимљеним на таласној дужини максимума апсорбанције конјугованих диенских структура (234 nm) се, поред пика елуираног на 2,9 min, који потиче од бензофенона (изократски режим елуирања), чија површина са порастом времена озрачивања опада (симболизовано стрелицом усмерном наниже) јављају три нова пика, приписана конјугованим диенским структурама (Сл.39А). Елуирани су на ретенционим временима од 5,5 min; 6,5 min и 4,5 min и обележени са Per1-3 (поређани према површини пикова – од највеће ка најмањој). Њихову појаву у неозраченој смеши, као последицу аутооксидације је готово немогуће спречити, иако су фосфолипиди, као што је наведено у **Експерименталном делу**, чувани у атмосфери азота. У сваком случају, са порастом времена озрачивања, расте и површина свих диена (приказано стрелицом усмереном навише на UV спектрима диена).

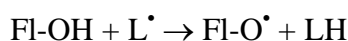
Разлика у апсорционим спектрима Per1 и Per3 у односу на Per2 односно одсуство и присуство десног „рамена” са максимумом апсорбанције на око 280 nm⁶³ (Сл.39В_{1,3}) – указује да они имају донекле другачије структуре. Ипак, основна хромофора конјугованих диена, одговорна за максимум апсорбанције на 234 nm, је очигледно присутна у сва три случаја. Фотосензибилизаторске способности бензофенона се најлакше уочавају на увећаном делу хроматограма где је дат упоредни приказ дела хроматограма у присуству (1') и одсуству бензофенона (2').

Продукција пероксида се одвија по кинетици првог реда (приказана на Сл.39С₁₋₃ у случају озрачивања UV-A светлосћу) а брзину одређује енергија упадних фотона – бржа је током UV-B озрачивања и то 1,4 пута у случају Per1 и Per3, односно 1,3 пута у случају Per2 ($k_{\text{prod.Per1-3izBZPPL90}}^{\text{UV-B}} / k_{\text{prod.Per1-3izBZPPL90}}^{\text{UV-A}}$ – Табела 3 на стр.104).

⁶³ Апсорпција у области 260-280 nm се приписује присуству конјугованих кетон диена и/или конјугованих триена (Wheatley, 2000; Goel *et al.*, 1986; Recknagel and Glende, 1984). Генерално, на 210 nm апсорбују неоксидовани липиди; апсорпција на 234 nm је карактеристична за *trans-trans* конјугацију а на 244 nm за *cis-trans* конјугацију диена (Wheatley, 2000).

6.1.4 Антиоксидативна активност QC-а у смеси са липидима: мера АО *chain-breaking* активности QC-а

Способност „хватања” слободних радикала флавоноидима (антирадикалска активност) пре свега зависи од броја и положаја фенолних хидроксилних група, тј. доступности фенолних водоникових атома и могућности стабилизације накнадно створених фенокси радикала. Кверцетин прекида ланац ЛП донирањем водоникових атома липидним радикалима, L^\bullet и/или липидним перокси радикалима, LOO^\bullet из својих бројних фенолних хидроксилних група:



Настали флавоноидни фенокси радикали ($Fl-O^\bullet$) су резонантно стабилизовани, реактивност им је мања него код L^\bullet радикала а у реакцији са новим L^\bullet радикалом заузимају стабилну, хинонску структуру (Сл.13).

Генерално, антиоксидативна активност флавоноида (у овом раду кверцетина) у присуству „заштитне мете” (у овом раду фосфолипида) се изражава на 1) превентивни и/или 2) *chain-breaking* начин, имајући притом на уму да се ове две активности међусобно не искључују већ су несумњиво повезане тако да што су израженији превентивни ефекти (преко апсорпције UV зрачења), мања је потреба за *chain-breaking* активношћу.

Антиоксидативна активност кверцетина је била предмет бројних истраживања (нпр. Gordon and Roedig-Penman, 1998; Chen and Ahn, 1998), међутим за ову дисертацију су од интереса само она које прате дешавања у раствору. Проучавањем АО активности кверцетина (у метанолу) и рутина (у метанолу и води) према лецитину као „заштитној мети” под дејством континуалног озрачивања из три UV под-опсега (UV-A, UV-B и UV-C) је закључено да је, упркос мањој стабилности, способност QC-а да заштити липидну смешу од пероксидације већа у поређењу са његовим гликозилованим аналогом – рутином (Cvetković *et al.*, 2011). Антиоксидативна активност је у поменутом раду квантификована мерењем апсорбанције награђеног $(TBA)_2$ -MDA комплекса на таласној дужини од 532 nm UV-VIS спектрофотометријом. У овој дисертацији је коришћена HPLC хроматографија а квантификација АО активности је постигнута праћењем супресије („гушења”) процеса ЛП преко смањења површине пикова награђених пероксида.

На хроматограмима неозрачене и UV-B озрачиване смеше кверцетина и фосфолипида у метанолу, снимљеним на таласној дужини од 372 nm, кверцетин је

елуиран на ретенционом времену од 4,5 min (Сл.40А) и недвосмислено идентификован на основу својих спектралних карактеристика (Сл.40В). Хроматограм је приказан до 9. min анализе јер на овој таласној дужини неоксидовани липиди не апсорбују. Они су елуирани на ретенционим временима од 18,9 min; 20,6 min и 22,7 min и идентификовани на основу својих UV спектра добијених са хроматограма снимљених на таласној дужини од 210 nm (резултати нису приказани). Поређењем вредности константи деградације QC-а у присуству (Сл.40С) – $(k_{\text{degrad.QCizQCPL90}}^{\text{UV-A/B}})$ и одсуству фосфолипида (Сл.34С) – $(k_{\text{degrad.QC}}^{\text{UV-A/B}})$ се уочава да нема неких битних промена (Табела 2 на стр. 104). Међутим, анализирањем хроматограма снимљених на таласној дужини максимума апсорбације конјугованих диенских структура (234 nm) се уочавају UV индуковане промене смеше QC-PL90 (Сл.41А).

На хроматограмима неозрачене и UV-В озрачиване смеше се уочавају два пика – први, елуиран на ретенционом времену од 2,7 min (изократски режим елуирања) потиче од QC-а, док је други, елуиран на ретенционом времену од 5,5 min, на основу својих UV спектралних карактеристика окарактерисан као Per1 (Сл.41В). Ово је уједно и најупечатљивији пример супресије процеса ЛП кверцетином дат у виду зависности *ln*-оване вредности површине пика Per1 од времена UV-В озрачивања. Деградација Per1 се одвија по кинетици првог реда (Сл.41С). На истим хроматограмима је уочен још један пероксид (Per2), елуиран на ретенционом времену од 6,5 min, чија се кинетика деградације такође одвија по моделу првог реда са константом брзине продукције (тачније деградације) приказаној у Табели 3. Како је површина Per2 изузетно мала, приказ промене спектра са порастом времена озрачивања је било немогуће, тако да је идентификован на основу спектра добијеног са хроматограма неозрачене смеше, али није приказан. Са друге стране, на хроматограмима неозрачене и UV-А озрачиване смеше поред ова два пероксида је уочен још један (Per3) са ретенционим временом од 4,5 min и док се његова деградација одвија по кинетици првог реда, површине Per1 и Per2 се мењају динамично.

Једно од могућих објашњења смањене АО активности кверцетина током озрачивања UV-А светлошћу је његова фотодеградација као последица јаке апсорпције у UV-А области (372 nm).

6.1.5 Супресија антиоксидативне активности QC-а бензофеноном

Трагом добијених резултата смеси кверцетин/фосфолипиди (QC-PL90) је додат бензофенон. Циљ његовог увођења је појачање продукције радикала, пре свега липидних радикала, јер је BZP не само врло ефикасан већ и врло селективан сензибилизатор (Marković and Patterson, 1993; Marković and Patterson, 1989; Marković *et al.*, 1990). Самим тим, нови систем (BZP-QC-PL90) доприноси бољем разумевању како превентивног (заштитног) деловања QC-а током континуалног UV озрачивања (праћеног преко UV-индуковане деградације) тако и антиоксидативног (праћењем експанзије UV индукованог процеса ЛП, израженог преко стварања пероксида у присуству и одсуству бензофенона). Како UV зрачење у овом систему може испољити утицај на све три присутне врсте: иницијатор (BZP), антиоксиданс (QC) и липиде (PL90); најпре су снимани „чисти” фосфолипиди и „чист” бензофенон као својеврсна слепа проба – *blank* (одвојено – обрађено у делу 6.1.1 и у смеси – 6.1.3) са циљем да се, у следећем кораку, прати контрола ЛП кверцетином током UV озрачивања односно процени разлика између брзине продукције липидних пероксида у присуству и одсуству антиоксиданса, тј. присуству и одсуству фотосензибилизатора.

Иако је антиоксидативна активност кверцетина у виду супресије („гушења”) процеса ЛП кверцетином доказана (у делу 6.1.4), његова ефикасност у присуству BZP-а је смањена. Резултати добијени у овој дисертацији потврђују раније публиковане резултате (Zvezdanović *et al.*, 2012b и Stanojević *et al.*, 2013).

Наиме, деградација QC-а из сва три под-опсега (UV-A, -B и -C) и промена његове АО активности индукована UV светлошћу, у присуству две различите смеше фосфолипида (PL80 и PL90) у метанолу, у присуству и одсуству BZP-а, је праћена UV-VIS спектрофотометријом. Уочено је да енергија упадних UV фотона игра важну улогу у процесима који се у овако сложеном систему одвијају мање-више синхронизовано. Реч је о иреверзибилној деградацији BZP-а и QC-а с једне и процеса ЛП с друге стране. Такође је уочено да је деградација QC-а 3 пута бржа у присуству BZP-а, што последично доводи до смањења његове АО активности у UV-озрачиваним смешама са фосфолипидима (Zvezdanović *et al.*, 2012b). С обзиром на ограниченост UV-VIS спектрофотометрије код анализе комплексних смеша попут ове (QC-BZP-PL80/90), услед очигледног преклапања апсорпционих спектра појединачних компоненти ($\lambda_{\max} = 255 \text{ nm}$ и 372 nm за QC; 250 nm за BZP и 234 nm за конјуговане диене) немогуће

је извести неки дубљи закључак. Зато се проучавању система пришло из другог угла – променом саме методе.

Дакле, UV-V светлосту индуковане промене смеше QC-BZP-PL90 су праћене HPLC хроматографијом, која омогућава кинетичку анализу раздвојених врста (Stanojević *et al.*, 2013). Због сложености посматраног система смеша BZP-PL90 је најпре (како у овој дисертацији – разматрана у делу **6.1.3** тако и у напред цитираним радовима – Svetković *et al.*, 2011 и Zvezdanović *et al.*, 2012b) озрачивана као својеврсна „слепа проба” (*blank*) у циљу евалуације моћи QC-а да уношењем у систем контролише процес ЛП. Изократским елуирањем одговарајућих смеша метанолом добијени су хроматограми снимљени на апсорпционим максимумима раздвојених компоненти: QC – $t_{\text{ret.}} = 2,6 \text{ min}$ на 371 nm; BZP – $t_{\text{ret.}} = 3,3 \text{ min}$ на 250 nm; неоксидованих липида NL – $t_{\text{ret.}} = 10,1 \text{ min}$; 12,2 min и 15,5 min на 210 nm и наглађених конјугованих диена, обележених са Per1 – $t_{\text{ret.}} = 5,5 \text{ min}$ и Per2 – $t_{\text{ret.}} = 6,5 \text{ min}$ на 234 nm. Кинетички подаци добијени интеграљењем површина пикова на одговарајућим хроматограмима осликавају „чистије понашање” компонената смеше у поређењу са „мешовитим понашањем” добијеним током UV-VIS спектрофотометријске анализе (Zvezdanović *et al.*, 2012b).

Констатација се пре свега односи на смешу кверцетина и бензофенона у којој је немогуће пратити кинетику деградације бензофенона услед потпуног преклапања његовог апсорпционог максимума (252 nm) са Траком II (255 nm) кверцетина. Нови приступ (HPLC хроматографија) омогућава несметано праћење кинетике деградације бензофенона, али са собом доноси и нови проблем – немогућност праћења кинетике деградације кверцетина. Наиме, промене апсорпционих спектра пика QC-а ($t_{\text{ret.}} = 2,6 \text{ min}$), добијених са хроматограма снимљених на таласној дужини максимума апсорбанције Траке I, показују драстичне промене спектра у односу на спектар неозраченог једињења (са максимумима апсорбанције на 372 nm и 255 nm), са порастом времена озрачивања. Наиме, не само да се интензитети двеју посматраних апсорбанци смањују, већ долази и до истовременог пораста интензитета апсорбанције у области таласних дужина од 273-322 nm. Другим речима, уочава се хипохромно (мања апсорбанција) померање Трака I и II уз истовремено хиперхромно (већа апсорбанција) померање у поменутој (273-322 nm) области тј. хипсохромно (ка мањим таласним дужинама) померање Траке I (која, подсећања ради, потиче од конјугованог В-С система) и батохромно (ка већим таласним дужинама) померање Траке II (од

конјугованог А-С система). Сем тога, појава двеју изозбестичних („превојних“) тачака на таласним дужинама од 273 nm и 322 nm указују на настанак бар једног деградационог производа.

Експерименти спроведени у овој дисертацији су још један корак напред у проучавању смеше BZP-QC-PL90 у смислу да је зарад решавања новонасталог проблема промењена сама хроматографска метода. Наиме, промена састава мобилне фазе увођењем воде са уделом од 35% омогућава несметано праћење кинетике деградације кверцетина. Кверцетин и бензофенон су, на хроматограмима неозрачене и UV-B озрачиване смеше BZP-QC-PL90 снимљених на 250 nm (Сл.42А), елуирани на 4,5 min и 12,1 min и идентификовани на основу својих спектралних карактеристика (Сл.42В₁ и В₂). Хроматограми су приказани до 15. min анализе јер NL не апсорбују на овој таласној дужини, због чега су, праћењем сигнала на 210 nm идентификовани на 25,3 min; 26,9 min и 29,0 min (хроматограми нису приказани).

Питање које се намеће приликом разматрања кинетике деградације QC-а у смеши BZP-QC-PL90 је улога бензофенона. Поређењем брзине деградације кверцетина у присуству (QC-BZP-PL90) и одсуству (QC-PL90) бензофенона ($k_{\text{degrad.QCizQCZBPPL90}}^{\text{UV-B}}$ према $k_{\text{degrad.QCizQCPL90}}^{\text{UV-B}}$) током UV-B и ($k_{\text{degrad.QCizQCZBPPL90}}^{\text{UV-A}}$ према $k_{\text{degrad.QCizQCPL90}}^{\text{UV-A}}$) UV-A озрачивања, указује да присуство бензофенона драматично убрзава деградацију кверцетина и то: ~75 пута и ~24 пута током UV-A и UV-B озрачивања, респективно. Резултати добијени током UV-B озрачивања смеше опет потврђују закључке изведене у претходним радовима (Zvezdanović *et al.*, 2012b, Stanojević *et al.*, 2013) иако однос двеју посматраних деградационих константи није тако велики као у овој дисертацији: ~3 и ~10 према ~24. Ипак, имајући у виду најпре објективна ограничења UV-VIS спектрофотометрије (Zvezdanović *et al.*, 2012b) а онда и изократског елуирања смеше (Stanojević *et al.*, 2013), подаци из Табеле 2 не само да потврђују претходне резултате већ су и много тачнији.

На основу вредности константи брзине деградације BZP-а у смеши са фосфолипидима у одсуству ($k_{\text{degrad.BZPizBZPPL90}}^{\text{UV-B/A}}$) и присуству QC-а ($k_{\text{degrad.BZPizQCZBPPL90}}^{\text{UV-B/A}}$), BZP се деградира ~25 пута односно ~11 пута спорије под дејством UV-A односно UV-B озрачивања, респективно (Табела 2). Самим тим је сензибилизаторска активност BZP-а (апстракција Н-атома) у присуству QC-а спорија. Узрок ученог феномена вероватно почива на узајамној интеракцији BZP-а (тј. ³BZP) и QC-а.

Друго питање које намеће интеракција VZP-QC се тиче АО активности QC-а у целокупној смеси и гласи: „Да ли и како ова интеракција утиче на АО активност кверцетина у смеси са фосфолипидима?”. У циљу евалуације евентуалних разлика урађен је својеврстан *blank* експеримент озрачивањем смеше QC-PL90 (обрађен у делу **6.1.4**). Конкретно, са графика приказаног на **Слици 41С** је добијена константа продукције Per1-а ($k_{\text{prod.Per1}}^{\text{UV-B}}$) вредности $-0,02198 \text{ min}^{-1}$. Линеарно смањење продукције пероксида представља очигледан АО ефекат кверцетина. Међутим, са уношењем VZP-а у систем ситуација се драматично мења. Пре свега, долази до промене знака константе продукције пероксида, из минуса (-) у одсуству у плус (+) у присуству VZP-а (**Табела 3**). Док у смеси QC-PL90, озрачиваној UV-B светлошћу, није уочена продукција Per3, брзину његовог настанка у смеси са VZP-ом карактерише константа вредности $0,01505 \text{ min}^{-1}$ (**Табела 3**). Дакле, АО активност QC-а у VZP-ом индукованом процесу ЛП је значајно смањена.

Иако резултати наводе на закључак да би узрок оваквог понашања требало евентуално потражити у молском односу QC-а и VZP-а у смеси – овде 2:1 у корист VZP-а, исти феномен је уочен и када је однос QC:VZP био скоро 2:1 у корист кверцетина (Zvezdanović *et al.*, 2012b). На основу овог се долази до закључка да одговор ипак лежи у већ претпостављеној интеракцији VZP-а и QC-а, дискутованој у делу **6.1.2.2**, односно настанку депсида отварањем пиронског, С-прстена, чиме се АО активност полазног молекула QC-а значајно смањује. Док је у делу **6.1.2.2** интеракција дискутована са акцентом на QC; смањење фотосензибилизаторске активности VZP-а би можда требало посматрати у светлу „гашења” његовог триплета QC-ом. Иако доказ ове претпоставке није нађен у доступној литератури, барем не конкретна комбинација – VZP-QC, Jacques (1987) наводи да до гашења триплетног бензофенона доводе донори електрона (Jacques, 1987).

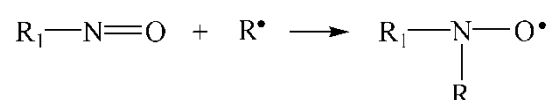
Сама чињеница да кверцетин апсорпцијом фотона прелази у ексцитовано стање, из кога је, у односу на основно стање, олакшан пренос електрона (Momić *et al.*, 2007) говори у прилог овој претпоставци.

6.2 Идентификација слободних радикала EPR *spin trapping* методом

Техника EPR *spin trapping*-а се врло често користи за детекцију и квантификацију слободних радикала како у хемијским тако и у биолошким системима. С обзиром на то да је директна детекција ових реактивних врста (због њиховог изузетно кратког живота, нпр. $\cdot\text{OH}$ радикала $\sim 10^{-9}$ s а $\text{O}_2\cdot^-$ радикала $\sim 10^{-6}$ s) немогућа, у проучавани систем се уноси специфично (дијамагнетично) једињење, тзв. „спински хватач”. У реакцији са слободним радикалима, спински хватачи граде стабилне, дугоживеће слободно-радикалске (парамагнетне) адукте – тзв. „спинске адукте” (углавном нитроксиде⁶⁴) који се лако детектују EPR спектроскопијом. Сваки „ухваћени” радикал показује сопствени, специфични EPR спектар, који служи за његову идентификацију. Оно што EPR *spin trapping*, поред високе осетљивости и специфичности⁶⁵ издваја из „мора” других метода је то што, за разлику од хемијских процедура којим се обично проучавају биолошки системи, није деструктивна. Зато је, поред идентификације радикала од интереса често техника избора за процену способности појединачних једињења али и екстракта да из система уклоне специфичне реактивне врсте, као што су $\text{O}_2\cdot^-$, $\cdot\text{OH}$, $\text{LOO}\cdot$ итд. Предност једног оваквог прилаза почива на способности разликовања АО ефеката према различитим слободним радикалима, чак и када су истовремено присутни у систему (Spasojević *et al.*, 2011).

Подобност одређеног спинског хватача за одговарајућу анализу одређује његова способност да селективно „ухвати” слободни радикал од интереса или да се, уколико „хвата” различите радикале, они могу лако разликовати на основу EPR спектра награђених адуката (Spasojević *et al.*, 2011).

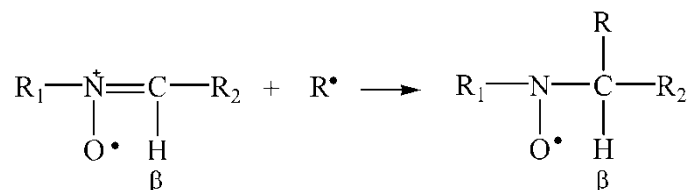
Данас је доступан велики број спинских хватача из групе нитрозо и нитронских једињења. Иако нитрозо (нпр. 2-метил-2-нитрозопропан, MNP; 3,5-дибромо-4-нитрозобензен сулфонска киселина, DNBNS) спински хватачи пружају више информација од нитронских, јер се радикал адира директно на азот из нитрозо групе:



⁶⁴ Нитроксиди су релативно стабилни јер је неспарени електрон резонантно стабилизован (Buettner, 1987).

⁶⁵ EPR *spin trapping* детекција $\text{O}_2\cdot^-$ је 40 пута осетљивија од спектрофотометријске анализе са цитохромом *c* (Ваџић *et al.*, 2008).

што повећава количину информација садржану у параметрима хиперфиног цепања), њихови адукти са кисеонично-центрираним радикалима су веома нестабилни. Зато се за проучавање ROS врста користе нитронски спински хватачи. Код њих неке информације (у односу на нитрозо једињења) недостају јер се радикал адире на угљеник суседан азоту (где R^\bullet може бити $O_2^{\bullet-}$, $\bullet OH$ итд.):

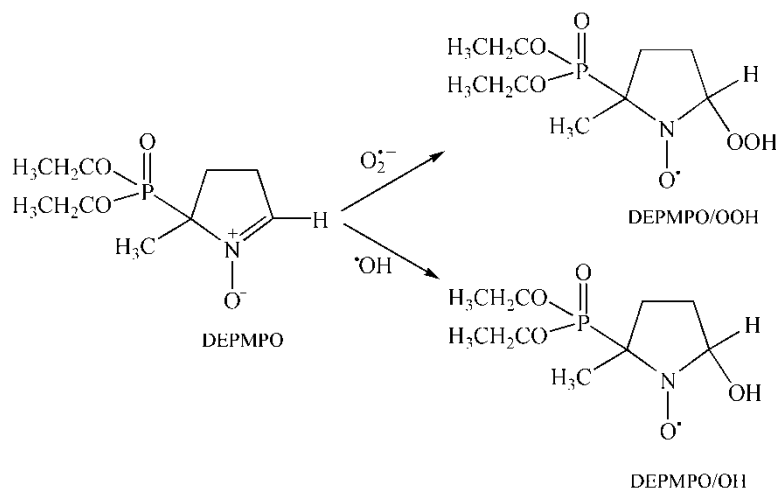


Ипак, већина популарних спинских хватача, као што су на пример 5,5-диметилпиролин N-оксид (DMPO), α -фенил-N-*terc*-бутилнитрон (PBN) и α -(4-пиридил-1-оксид)-N-*terc*-бутилнитрон (POBN) садрже водоник у β -положају, који у ствари даје вредне информације о ухваћеном радикалу.

DMPO (5,5-диметил-1-пиролин N-оксид) се веома често користи јер је лако доступан и јефтин. Међутим, његов адукт са $O_2^{\bullet-}$ радикалом (DMPO/OOH) је кратког живота ($t_{1/2} = 50$ s) и спонтано прелази у адукт са $\bullet OH$ радикалом (DMPO/OH), неретко доводећи до погрешног тумачења добијених резулата. Зато је фосфорилувани аналог DMPO-а, DEPMPO (5-(диетоксифосфорил)-5-метил-1-пиролин N-оксид), код кога је ова трансформација незнатна⁶⁶, привукао пуно пажње (Moјović *et al.*, 2005; Вајић and Moјović, 2005).

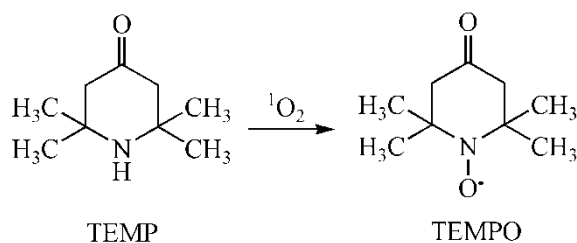
Спински хватач DEPMPO (Сл.102) је један од најефикаснијих хватача за детекцију $-O$, $-C$, $-N$ и $-S$ центрираних радикала у *in vivo* и *in vitro* условима. Посебно је погодан за истовремени *spin trapping* $\bullet OH$ и $O_2^{\bullet-}$ (радикала од посебног физиолошког значаја, на који је указано у Теоријском делу) јер прави јасну разлику између ова два радикала захваљујући додатном ^{31}P хиперфином купловању, што за последицу има сложеније EPR спектре адуката.

⁶⁶ Време полу-живота ($t_{1/2}$) DEPMPO/OOH адукта је 900 s (Karoui *et al.*, 2011).



Слика 102 Структурне формуле DEPMPO спинског хватача и његових адуката са супероксидом (тј. хидропероксилним радикалом) – DEPMPO/OOH и хидрокси радикалом – DEPMPO/OH (Moјović *et al.*, 2005; Ваџић *et al.*, 2008).

За детекцију 1O_2 се, због своје специфичности, обично користи спински хватач 2,2,6,6-тетраметилпиперидин (ТЕМР), с обзиром на то да ниједан други радикал не продукује нитроксид, због чега је коришћен и у овом раду. Производ њихове реакције (Сл.103) је 2,2,6,6-тетраметил-пиперидин-1-оксил (ТЕМРО) чија структура даје ЕРР спектре који пружају недвосмислену идентификацију синглетног кисеоника.



Слика 103 Структурне формуле ТЕМР спинског хватача и његовог адукта са синглетним кисеоником – ТЕМРО (Min and Boff, 2002).

Електрон парамагнетно резонантни спектри DEPMPO/OOH адуката, генерисаних континуалним UV-B озрачивањем бензофенона и рибофлавина као и њихових смеша са кверцетином у метанолу током 4 min и 7,5 min, респективно представљају типичан спектар DEPMPO/OOH адукта (Сл.48А и 78А). Ипак, за недвосмислену идентификацију супероксида су урађене симулације ЕРР спектра DEPMPO/OOH, DEPMPO/OH и DEPMPO/H адуката који су потом упоређени са експериментално добијеним спектрима (Сл.48В и 78В). Симулациони спектар DEPMPO/OOH адукта представља комбинацију доприноса изомера I, II и III. Параметри коришћени за симулацију DEPMPO/OOH адукта су били: (изомер I (55%)

$a^P = 50,15$; $a^N = 13,0$; $a^H_\beta (1H) = 11,3$; $a^H_\gamma (1H) = 0,85$; $a^H_\gamma (1H) = 0,35$; $a^H_\gamma (3H) = 0,53$; изомер II (37%) $a^P = 48,68$; $a^N = 13,08$; $a^H_\beta (1H) = 0,88$; $a^H (1H) = 10,2$; $a^H_\gamma (1H) = 0,41$; $a^H_\gamma (1H) = 0,34$; изомер III (8,5%) $a^P = 40,8$; $a^N = 13,3$; $a^H_\beta (1H) = 1,5$; $a^H (1H) = 10$); док је у случају DEPMPO/ОН адукта ($a^P = 46,7$; $a^N = 13,9$; $a^H (1H) = 13,5$) (Moјović *et al.*, 2005). Након поређења симулационих и експериментално добијених спектра, $O_2^{\cdot-}$ је недвосмислено идентификован (Сл.48А и В; Сл.78А и В).

На спектрима нема ни трага од хидрокси радикала, између осталог и зато што, чак и када би настали, највероватније не би били идентификовани с обзиром на то да је метанол „хватач” $\cdot OH$ радикала [$k(OH + CH_3OH) = 0,9 \cdot 10^9 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$] (Getoff and Solar, 1978).

Електрон парамагнетно резонантни спектри приказани на Слици 79 представљају типичне спектре TEMPO адуката генерисаних у раствору рибофлавина у метанолу и смеси рибофлавина и кверцетина у метанолу након UV-B озрачивања у трајању од 5 min. Спектар карактерише триплет једнаких интензитета (1:1:1) линија, хиперфине константе од $15,9 \pm 0,2 \text{ G}$ и ширине линија од $0,40 \pm 0,02 \text{ G}$ (g вредност од 2,0062) (Kruk and Michalska, 2010).

Озрачивањем раствора билирубина у метанолу у присуству TEMP спинског хватача није детектован сигнал TEMPO адукта (спектри нису приказани).

У циљу евалуације АО активности кверцетина праћена је промена интензитета пика карактеристичног за награђени адукт (обележен црним кружићем на Сл.48А и 78А) након зрачења BZP-а и RFL-а у одсуству и његовом присуству. На спектрима се уочава смањење интензитета карактеристичног пика у присуству кверцетина (ефекат је израженији у случају рибофлавина) указујући на *quenching* $O_2^{\cdot-}$ кверцетином.

Антиоксидативна активност се рачуна на основу следеће једначине:

$$AO (\%) = \frac{I_0 - I}{I_0} \times 100$$

где су I_0 и I интензитети карактеристичног пика у одсуству и присуству QC-а, респективно.

На сигналима контролних експеримената (озрачиваног растварача у присуству спинског хватача) се уочава сигнал радикала интензивнији од очекиваног што не чуди када је у питању TEMP, с обзиром на то да је коришћен без претходног пречишћавања. Уочена нелогичност у случају DEPMPO спинског хватача се може приписати потенцијалној деградацији спинског хватача под дејством UV-B озрачивања, коришћеног у овој дисертацији. На овакву претпоставку наводи чињеница да

озрачивање DMPPO спинског хватача у метанолу UV-C светлошћу доводи до продукције алкокси највероватније преко перокси радикала, што треба имати на уму код интерпретације резултата (Chignell *et al.*, 1994). Како су структуре доста сличне није искључено да се тако нешто може десити и са DEPMPO. Сем тога, треба имати на уму и чињеницу да је у контролама присутна и вода која, иако у малој количини, у комбинацији са кисеоником и UV-B озрачивањем можда може довести до продукције супероксида.

Због свега наведеног, интензитети пикова карактеристичних за DEPMPO/OOH и TEMPO адукте на спектрима узорака су кориговани (умањени) за вредност интензитета пика у контролама. За прерачунавање АО активности кверцетина у обе смеше су коришћене кориговане вредности за I_0 . Антиоксидативна активност QC-а према 1O_2 је 48,92% у смеси са RFL-ом; док је АО према $O_2^{\cdot-}$ већа у смеси са RFL-ом (53,24%) него са BZP-ом (6,35%), што потврђује резултате добијене HPLC хроматографијом.

6.3 Дејство UV зрачења на смешу BRB-QC-PL90

6.3.1 Интеракција BRB-а са UV зрачењем – пресек стања

Чињеница је да се део укупног BRB-а складишти у *epidermis*-у коже и да реагује са сунчевим зрачењем, укључујући и најенергетичније делове, UV-A и нарочито UV-B светлост (Wondrak *et al.* 2006). Као што је већ истакнуто у **Теоријском делу**, и UV-A и UV-B (као интегрални део природне сунчеве светлости) доводе до оштећења коже „на дуже стазе” као последица генотоксичности и канцерогенезе, углавном иницираних преко фотосензибилизаторских активности (UV-апсорбујућих) једињења након апсорпције UV зрачења. Зато је интеракција BRB-а са UV зрачењем сама по себи вредна истраживања, а најједноставнији прилаз за добијање основних информација је проучавање у најпростијем систему – метанолном раствору.

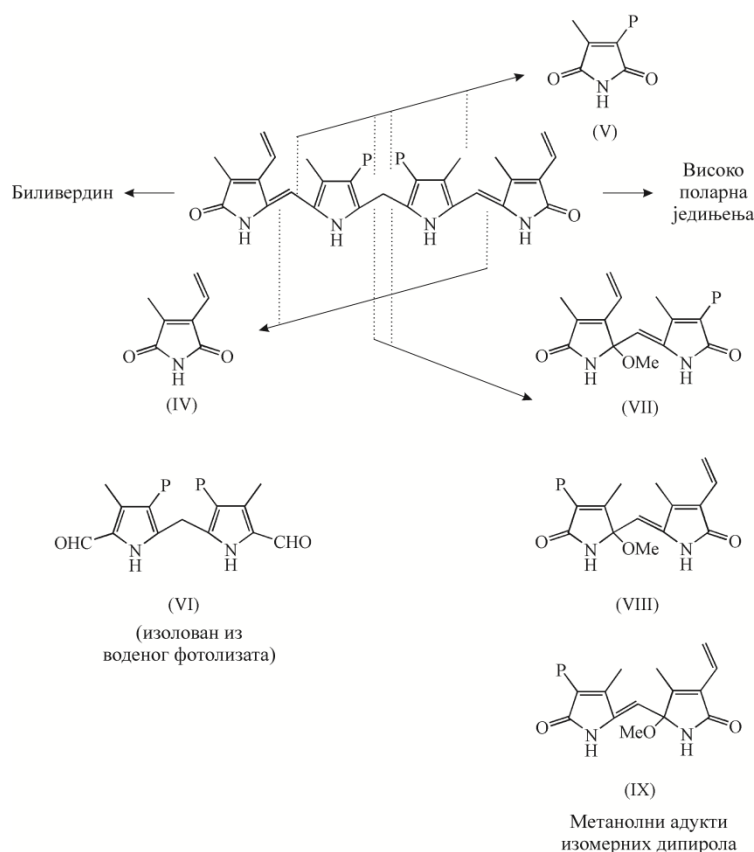
Базичних података о интеракцији BRB-а са светлошћу (посебно са UV-светлошћу) готово да нема. Постоји неколико радова из '70-их година прошлог века који се баве проучавањем фотооксидације BRB-а у раствору (хлороформу, метанолу) под дејством природних (сунчева, дневна светлост) и вештачких светлосних извора (UV и VIS лампе), узрокујући настанак различитих фотопродуката, претежно моно- и

дипирола – Сл.104 (Lightner and Quistad 1972a; Lightner and Quistad 1972b; Bonnett and Stewart 1972a; Gray *et al.*, 1972).

Наиме, Lightner и Quistad (1972a) су проучавањем фотохемије BRB-а у оксигенисаном амонијачно-метанолном раствору озрачиваном живиним лампама средњег притиска, снаге 100 W током 12 h поред BVD-а као доминантног производа, изоловали и доказали присуство монопирола метилвинилмалеимида (MVM) (Lightner and Quistad, 1972a). Озрачивањем истог узорка волфрамовим халогеним лампама (250-2700 nm) снаге 500 W током 36 h исти аутори су изоловали и идентификовали монопирол (хематинску киселину) и два изомерна дипирола (Lightner and Quistad, 1972b). Озрачивањем метанолно-амонијачног раствора билирубина мање од 24 h видљивом светлошћу (снаге 2×500 W) настаје комплексна смеша продуката највећим делом састављена од дипирола на које је адиран метанол; у мањем проценту су заступљени монопироли (пре свега MVM) док најмање има BVD-а (Bonnett and Stewart, 1972a). Сви поменути производи се, између осталог, јављају током продуженог озрачивања дневном светлошћу (500 дана) билирубина у хлороформу (Gray *et al.*, 1972). Дакле, из наведеног се може закључити да коришћење различитих емисионих извора и времена озрачивања даје не само биливердин већ и моно- и дипироле који настају цепањем матичног молекула билирубина. Треба нагласити да принос биливердина добијеног фотооксидацијом билирубина зависи од растварача (више BVD-а настаје у хлороформу него у метанолу што указује на могући слободно-радикалски механизам) и концентрације BRB-а (BRB у већој концентрацији даје више BVD-а) (Lightner *et al.*, 1973).

Неке од новијих публикација се баве проучавањем дејства плаво-беле и зелене светлости на комплекс BRB-HSA⁶⁷ у аеробним и анаеробним условима (Itoh *et al.* 1999; Yasuda *et al.*, 2001).

⁶⁷ *Human Serum Albumin* – албумин из серума (крвне плазме без фибриногена, протромбина и других фактора коагулације) људске крви.



Слика 104 Производи фотооксидације билирубина у свеже дестилованом анхидрованом метанолу (коме је у циљу растварања билирубина додат анхидровани амонијак) настали током озрачивања видљивом светлошћу (извор светлости је волфрамова лампа). До фрагментације долази кидањем веза (метинских мостова) око *meso*⁶⁸ – моста (метиленски мост); P је ознака пропионил, а Me метил групе (Lightner and Quistad, 1972a,b; Bonnett and Stewart, 1972a).

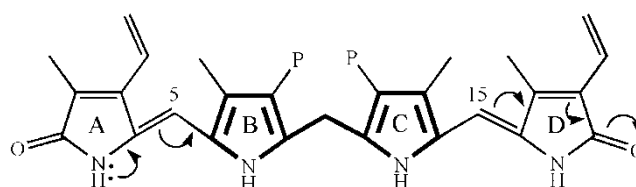
6.3.2 (Не)стабилност BRB-а у раствору

Претрагом литературе се стиче утисак да се са проучавањем фотохемије билирубина у раствору стало '70-их година прошлог века када је све и почело – као да је постигнуто све што се на том пољу могло постићи. Можда разлог томе делимично лежи у уоченој нестабилности билирубина пре свега у базним воденим растворима (растварањем у 0,1 mol dm⁻³ NaOH, NH₄OH или Na₂CO₃ (високе pH вредности) билирубин се деградира брзином од 2-10% на сат). Деградацију међутим инхибира присуство аскорбинске киселине, цистеина и етилен-диаминотетрасирћетне киселине (EDTA), а убрзава присуство јона метала (Lightner *et al.*, 1976).

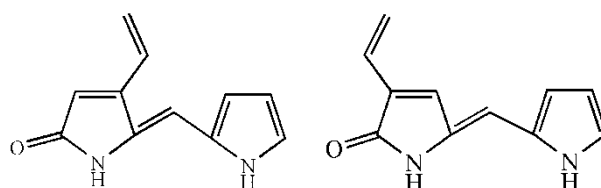
⁶⁸ *Meso* (мезо) облик, мезо једињење или мезо изомер је хемијско једињење чији молекули садрже више од два асиметрична атома (стереоцентра) али не показују оптичку активност најчешће услед присуства интрамолекулске равни симетрије.

До деградације долази и на нижим рН вредностима при којима се BRB јавља у облику димера или дианјона. Штавише, при рН вредностима раствора у опсегу од 7,4-9,0 нестабилности доприносе и други фактори. Наиме, BRB у присуству кисеоника подлеже изомеризацији у смешу својих спектроскопски сличних IIIa, IXa и XIIIa изомера, која се највероватније одвија радикалским механизмом. До изомеризације BRB-а долази и у овом раду, што не чуди с обзиром на рН вредност раствора (рН = 9,5). Алкалне растворе стабилизује додаток протеина (посебно серум албумина) или детерџената (Lightner *et al.*, 1976).

Апсорпциони спектар билирубина карактерише широка трака са максимумом на таласној дужини од 450 nm која потиче од хромофора II и III и одговара енергији од 265 kJmol^{-1} првог ексцитованог стања (S_1) билирубина:



(I) BRB (P = $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$)



(II)

(III)

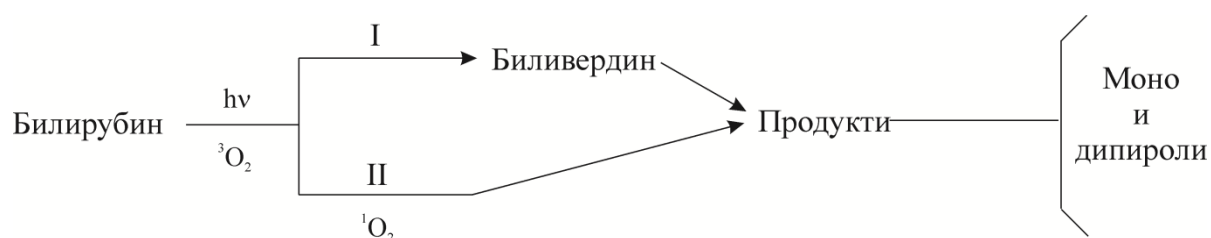
Наиме, молекул билирубина се може посматрати као дипироллилметан (подебљано у формули I) конјугован супституентима у положајима 5 и 15, који су међусобно врло слични, али не и идентични (упоредити структуре II и III). Штавише, делује да су у погледу амидне везе међусобно супротни одн. да показују тзв. „електронску дихотомију”⁶⁹. Наиме, иако имају могућност да донирају електроне (прстенови A и B, структура I) вероватноћа да због природе пиролног система привлаче електроне је ипак већа (приказано на прстеновима C и D) (Bonnett, 1976).

⁶⁹ Дихотомија је дељење или подељеност целине на два једнака непреклапајућа дела. У таквој подели нешто што је део једне половине не може никако бити део друге половине.

6.3.3 Фотохемија BRB-а

Примарни процес који се одвија озрачивањем BRB-а у раствору светлошћу таласне дужине 420-460 nm је његова екситација у синглетно стање (1) које даље, зависно од реакционих услова, подлеже секундарним процесима: (2) не-радијационој релаксацији којом се враћа назад у основно стање (најмање битан процес), (3) фотоадицији (озрачивањем BRB-а у присуству алкохола или тиола долази до Markovnikoff-љеве адиције алкохола на егзо-винилне групе молекула – у поређењу са фотооксидацијом је спора и одиграва се једино под анаеробним условима) или (4) фотооксидацији, која је од највеће важности за овај рад.

Фотооксидација се истовремено одвија преко два главна пута: I) продукција биливердина а онда врло спором фотохемијском реакцијом настајак продуката мање молекулске масе (претпоставља се да биливердин настаје радикалским (Тип I) механизмом) и II) директна продукција моно- и дипирола Тип II механизмом, у коме је билирубин и сензибилизатор и „супстрат” синглетног кисеоника.

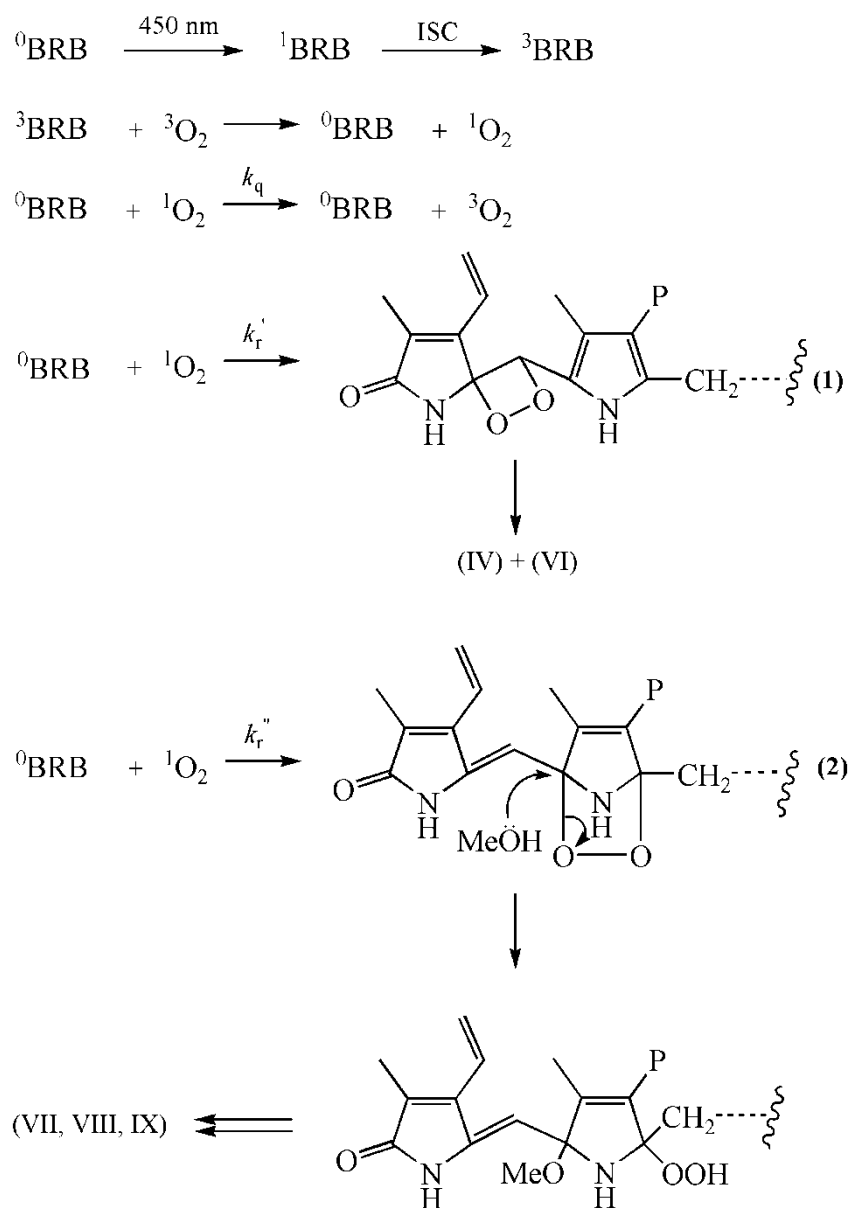


Слика 105 Пuteви фотооксидације билирубина (McDonagh, 1974)

Релативни значај путева деградације BRB-а зависи од реакционих услова, пре свега од природе растварача и почетне концентрације BRB-а. Ипак, фотооксидација се *in vitro*, у аеробним условима, претежно одвија по механизму Тип II фотосензибилизоване реакције. Конкретно, доминантни производи фотооксидације BRB-а у метанолу су дипиролни адукти са метанолом док кратким (<24 h) озрачивањем настаје BVD (Bonnet and Stewart, 1972a) – Сл.106.

Дакле, апсорпцијом светлости BRB из основног (^0BRB) прелази у прво ексцитовано синглетно стање (^1BRB), које не-радијационим интерсистемским прелазом (ISC) даје триплетно стање (^3BRB). Триплетни билирубин се „гаси” кисеоником у основном стању ($^3\text{O}_2$) дајући билирубин у основном стању и врло реактивни синглетни

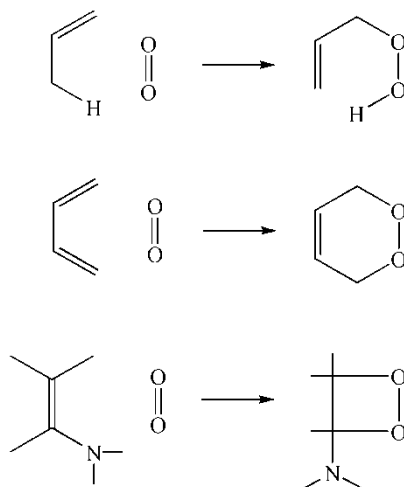
кисеоник ($^1\text{O}_2$) (Lightner, 1977). Брзи напад синглетног кисеоника на билирубин на крају доводи до његове деградације (Сл.106).



Слика 106 Продукција дипирола током фотооксидације билирубина у метанолу механизмом Тип 2 фотосензибилизоване реакције (Bonnett and Stewart, 1972).

Генерално, синглетни кисеоник реагује са органским супстратима на три начина (приказана на **Сл.107**, редом, одозго-наниже): преко тзв. „ен” реакције (познате и као Alder-ен реакција – одиграва се између алкена са алилним („ен”) водоником и једињења која садрже двоструку везу – енофила); Diels-Alder-ове реакције (1,4-адиција синглетног кисеоника када производи настају преко интермедијарних ендопероксида)

и 1,2-адисије на двоструке везе богате електронима (производи настају преко интермедијарних диоксетана).



Слика 107 Карактеристичне реакције синглетног кисеоника са органским супстратима (одозго-наниже): „ен” реакција, Diels-Alder-ова реакција и 1,2 адисија на двоструке везе енаминске функционалне групе (Lightner, 1974).

Проучавањем структуре молекула билирубина у потрази за местима на којима би се ове „типске” реакције могле одиграти, дошло се до закључка да су главне мете напада синглетног кисеоника винилне групе и енамински мостови (структуре интермедијера (1) и (2) на Сл.106 су резултат напада синглетног кисеоника на енамински мост и Diels-Alder-ове реакције на централном пиролном прстену В, респективно).

Врста и расподела фотооксидационих продуката зависи од:

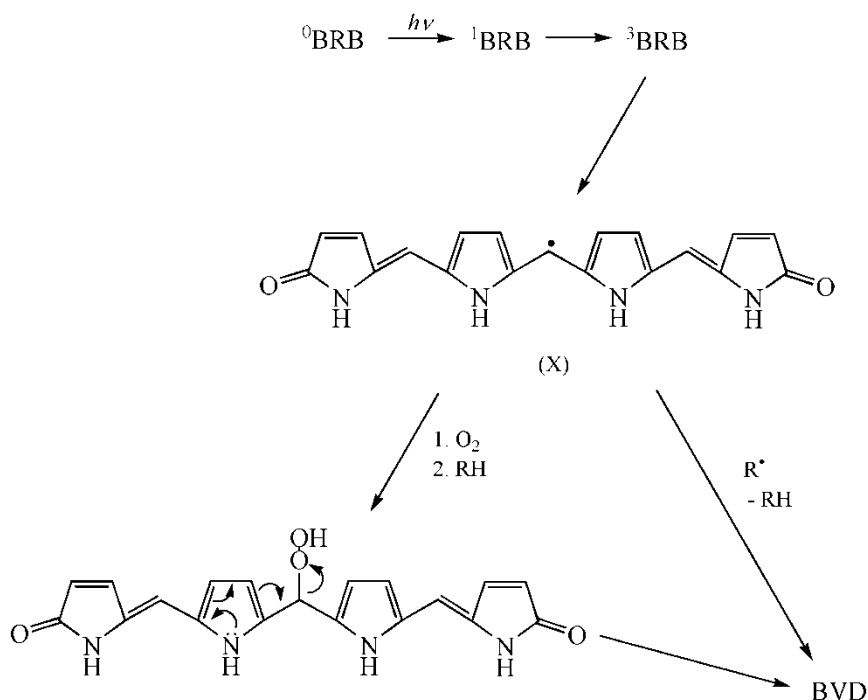
1) Растварача – који може директно учествовати у „мрачним” реакцијама након ексцитације, док свој индиректни ефекат испољава променом конформације молекула. Наиме, интрамолекулске водоничне везе које молекул билирубина одржавају у ригидној конформацији (у кристалима и највероватније у неполарним растварачима), слабе са порастом поларности растварача, толико да се у поларним растварачима раскидају уз формирање ањона.

2) Ексцитационе енергије. Генерално, ако се молекул озрачи светлошћу довољно мале таласне дужине (велике енергије), продукују се виша ексцитована стања (S_2 , S_3 , ...) и подлежу реакцијама које се не уочавају код првог синглетног стања (S_1). Како код BRB-а S_1 стање лежи на око 265 kJmol^{-1} ($= 450 \text{ nm}$) за ексцитацију је довољна само видљива светлост (плави крај спектра) што се и користи у фототерапији; и

3) Присуства фотосензибилизатора и/или *quencher*-а. Билирубин сензибилише настанак синглетног кисеоника, који га врло брзо напада и „сноси одговорност” за његову фотооксидацију у аеробним условима, због чега се неретко наводи да BRB у ствари „сензибилише сопствену деградацију” (McDonagh, 1971). Штавише, кинетичке студије наводе да је BRB један од најреактивнијих акцептора $^1\text{O}_2$ и то тако да је брзина њихове хемијске реакције $3 \times 10^9 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ а брзина физичког *quenching*-а $9 \times 10^8 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Фотооксидација је спорија у анаеробним условима, у присуству 2,5-диметилфурана („замке” за синглетни кисеоник), β -каротена и DABCO-а (који „гасе” синглетни кисеоник) (McDonagh, 1971; Foote and Ching, 1975); а бржа у присуству фотосензибилизатора који поспешују настанак синглетног кисеоника (нпр. метиленско плаво, розе бенгал) (Bonnet and Stewart, 1972b; Bonnett, 1976). Другим речима, BRB је сензибилизатор синглетног кисеоника (у не-радикалском Тип II механизму), иако не баш ефикасан, јер фотоексцитациону енергију губи изомеризацијом и другим не-радијационим процесима (Bonnett and Stewart, 1972b; McDonagh, 2011).

Биливердин је први производ за који је претпостављено да настаје фотооксидацијом BRB-а (Сл.108) с обзиром на то да се његова појава уочава „на први поглед” – по зеленој боји коју раствор BRB-а добија када се изложи светлости. Самим тим се наметнуло питање да ли је баш он примарни фотопроизвод BRB-а током фотооксидације и ако јесте да ли је прекурсор и свим осталим производима BRB-а?

Поређењем брзине деградације BRB-а и настанка BVD-а у метанолу је доказано да BVD *није* прекурсор идентификованих моно- и дипирола у протичним растварачима јер се спорије гради него што се BRB деградира. Међутим, BVD се разграђује на исте производе као BRB – метилвинилмалеимид, хематинску киселину и један од изомерних метокси деривата дипирола (Lightner, 1974; Lightner and Crandall, 1972). Штавише, брзина деградације BRB-а је мања што је већа концентрација BVD-а, што наводи на закључак да BVD заправо „гаси” синглетни кисеоник (Lightner, 1974; Bonnett, 1976).



Слика 108 Радикалски (Тип I) механизам продукције биливердина. Апстракцијом водоника са централног метиленског моста (положај 10) триплетним сензибилизатором настаје радикал (X) а онда у реакцији са кисеоником и резонантно стабилизовани интермеђијер из кога настаје BVD (претпоставља се да до настанка BVD-а може доћи и „ен” реакцијом у близини централног метиленског моста BRB-а када настаје хидропероксид који затим подлеже депротонизацији на азоту и уз елиминацију хидропероксидног јона даје BVD (Lightner, 1974)).

Ова дисертација се једним својим делом бави проучавањем дејства континуалног UV-A и UV-B зрачења на смешу билирубина, кверцетина и фосфолипида, под аеробним и анаеробним условима, HPLC хроматографијом. Имајући на уму комплексност смеше и чињеницу да UV зрачење може испољити свој ефекат на све компоненте (кверцетин, билирубин и фосфолипиде), проучавање UV индукованих промена појединачних компоненти (QC, BRB, PL90) и када су у одговарајућим смешама (BRB-QC, QC-PL90, BZP-PL90) представљају својеврсне *blank* експерименте, а све у циљу процене утицаја присуства/одсуства антиоксиданса и присуства/одсуства сензибилизатора.

6.3.4 UV индуковани *bleaching* BRB-а у метанолу

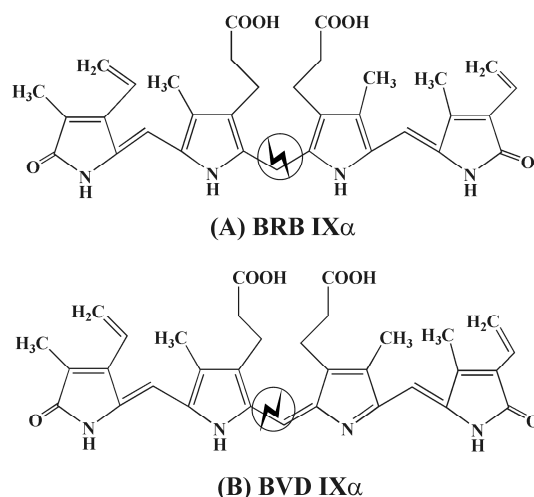
На хроматограмима неозраченог и UV озраченог раствора билирубина, снимљеним на 450 nm су, на ретенционим временима од 25,6 min; 26,4 min и 27,6 min, редом елуирани изомери билирубина: BRBXII α , BRBIX α и BRBIII α (Сл.49А)

окарактерисани идентичним, а опет карактеристичним UV-VIS спектром, са апсорпционим максимумом на 450 nm (Сл.49В). „Средњи по поларности” изомер, BRBIX α , је најдоминантнији па је у овој дисертацији праћена његова UV индукована деградација (симболизована стрелицом усмереном наниже поред пика на одговарајућим хроматограмима). У даљем тексту ће се под појмом „билирубин” (BRB) подразумевати изомер BRBIX α .

Праћењем раствора на таласној дужини од 372 nm се, поред смањења површине (концентрације) пика BRB-а, уочава пораст површине пикова елуираних на ретенционим временима од 8,1 min; 9,4 min и 9,9 min указујући на настанак деградационих производа (симболизован стрелицом усмереном навише поред пика на хроматограмима) – Сл.50А. С обзиром на то да пикови имају идентичне UV-VIS спектре (Сл.50В) са апсорпционим максимумима на 375 nm и 691 nm (битно другачијим у поређењу са спектром BRB-а) идентификовани су као изомери биливердина (BVD) и то: BVDXII α , BVDIX α и BVDIII α , респективно. Како је и у случају BVD-а „средњи по поларности” изомер BVDIX α најдоминантнији, у овој дисертацији је праћена његова UV индукована продукција (симболизована стрелицом усмереном навише поред пика на одговарајућим хроматограмима). У даљем тексту ће се под појмом „биливердин” (BVD) подразумевати изомер BVDIX α .

Структуре изомера BRB-а и његовог производа BVD-а, у отвореној, линеарној форми⁷⁰ – BRBIX α и BVDIX α су приказане на Сл.109А и В. Структурне разлике између ова два тетрапирила су минималне: у средишту молекула (између два дипиролна ентитета), BRBIX α „само” нема двоструку везу у поређењу са BVDIX α . Међутим, ова „скоро безначајна” разлика доводи до драматичне промене у апсорпционом спектру BVD-а. Наиме, продужена конјугација, поред хипсохромног померања апсорпционог максимума на око 375 nm доводи до појаве новог, мањег пика са апсорпционим максимумом на 691 nm (Сл.50В).

⁷⁰ Важно је имати на уму да је једина исправно приказана структура BRB-а она на Сл.22В. Приказ структура као на Сл.109А је погрешан јер не осликава реалне, биолошке особине молекула (пре свега високу липофилност BRB-а). Оваква структура молекула би, под условом да постоји, била поларна и хидрофилна, али је дата у овом облику ради лакшег уочавања структурних разлика између BRB-а и BVD-а (McDonagh and Lightner, 1985).



Слика 109 Структуре изомера билирубина – BRBIX α (A) и биливердина – BVDIX α (B)

На основу константи брзине деградације првог реда, добијених као нагиб линеарне зависности \ln -ованих вредности површина пикова BRB-а на хроматограмима снимљеним на 450 nm од времена континуалног UV озрачивања (на Сл.50C је приказан случај UV-B озрачивања) датих у Табели 4A (стр. 121), закључује се да енергија упадних фотона одређује брзину деградације BRB-а ($k_{\text{degrad.BRB}}^{\text{UV-B}} / k_{\text{degrad.BRB}}^{\text{UV-A}}$), како у аеробним, тако и у анаеробним условима. Наиме, деградација је 1,5 пута бржа у аеробним условима односно 1,3 пута бржа у анаеробним условима током UV-B у поређењу са UV-A озрачивањем, респективно. Такође, деградација BRB-а је нешто спорија у анаеробним у односу на аеробне услове (Табела 4A).

Енергија упадних фотона одређује и брзину продукције биливердина (процеса који се одиграва мање-више синхронизовано са деградацијом билирубина) ($k_{\text{prod.BVD}}^{\text{UV-B}} / k_{\text{prod.BVD}}^{\text{UV-A}}$): продукција је 1,5 пута односно 1,9 пута бржа током UV-B озрачивања у аеробним односно анаеробним условима озрачивања, респективно.

6.3.5 UV индуковани *bleaching* QC-а у смеши BRB-QC-PL90 – *blank* експеримент

Праћењем неозраченог и UV-B озрачиваног раствора кверцетина у метанолу (под условима у смеши BRB-QC-PL90), на таласним дужинама од 372 nm (Сл.51A) и 295 nm (Сл.52A), пикови елуирани на ретенционим временима од 12,9 min и 5,6 min су, на основу спектралних карактеристика идентификовани као кверцетин и његов деградациони производ – QCDP1, респективно (Сл.51B и 52B). Апсорпциони (UV)

спектар доминантног деградационог производа кверцетина је идентичан спектру производа чија је структура предложена у делу **6.1.2.2**.

Поређењем константи брзине деградације кверцетина током континуалног UV-A и UV-B озрачивања (кинетика деградације индукована UV-B озрачивањем је приказана на **Сл.51C**) се увиђа утицај енергије упадног зрачења. Наиме, енергија упадних фотона одређује брзину деградације QC-а (самим тим и брзину продукције QCDP1) тако да је 2,6 пута (у случају деградације QC-а: $k_{\text{degrad.QC}}^{\text{UV-B}} / k_{\text{degrad.QC}}^{\text{UV-A}}$) односно 1,3 пута ($k_{\text{prod.QCDP1}}^{\text{UV-B}} / k_{\text{prod.QCDP1}}^{\text{UV-A}}$)⁷¹ = 0,11492 min⁻¹/ 0,08738 min⁻¹ у случају продукције QCDP1) већа под дејством UV-B у поређењу са UV-A озрачивањем (**Табела 4А**, стр. 121).

Са друге стране, озрачивање кверцетина у метанолу при рН вредности раствора од 9,3 (услови у смеши BRB-QC-PL90), узрокује 10,3 пута односно 4,7 пута бржу деградацију у поређењу са његовом деградацијом при рН 7,1 (под условима у смеши VZP-QC-PL90) током континуалног UV-A односно UV-B озрачивања, респективно (кинетика деградације током UV-B озрачивања је дата на **Сликама 51C** и **34C**). Аналогно деградацији кверцетина и продукција QCDP1 је 4,5 пута односно 1,7 пута бржа под условима у смеши BRB-QC-PL90 у поређењу са продукцијом у смеши VZP-QC-PL90.

Добијени резултати не чуде с обзиром на добро познату чињеницу да кверцетин подлеже спонтаној деградацији (аутооксидацији) у органским растварачима и воденим растворима чија је рН вредност изнад 8 (базна средина). Озрачивање једног таквог раствора додатно убрзава деградацију QC-а услед настанка фотооксидационих продуката (Momić *et al.*, 2007).

На хроматограмима неозрачене и UV-B озрачване смеше билирубина и кверцетина снимљеним на таласној дужини максимума апсорбанције Траке I кверцетина – 372 nm, уочавају се пикови елуирани на ретенционим временима од 7,6 min; 16,0 min и 27,3 min (**Сл.53А**) идентификовани на основу спектралних карактеристика као QC (најполарнији) – **Сл.53В₁**, BVD и BRB (најнеполарнији) – **Сл.53В₂**, респективно. Фотоиндуковане промене у виду ирверзибилне деградације QC-а и BRB-а и продукције BVD-а су праћене преко смањења (QC и BRB), односно пораста (BVD) површина одговарајућих пикова на основу којих су добијене и одговарајуће кинетичке зависности.

⁷¹ Константе брзине продукције QCDP1 нису приказане у **Табелама**.

Поређењем константи брзине деградације датих у **Табели 4А** се стиче утисак о међусобној интеракцији компонената смеше BRB-QC. Дакле, додаток BRB-а успорава деградацију QC-а индуковану UV-B озрачивањем 1,4 пута (аеробни услови). То међутим није случај са UV-A зрачењем што се може приписати јакој апсорпцији кверцетина у UV-A и минималној у UV-B области. Са друге стране, заштитни ефекат QC-а у процесу деградације BRB-а је евидентан – BRB се у смеси BRB-QC деградира 1,7 пута односно 1,9 пута спорије под аеробним условима тј. 3,3 пута односно 2,95 пута спорије под анаеробним условима током озрачивања UV-A односно UV-B светлосћу, респективно, у односу на деградацију у одсуству QC-а ($k_{\text{degrad.BRB}}^{\text{UV-A,B}} / k_{\text{degrad.BRBizBRBQC}}^{\text{UV-A,B}}$). Енергија упадних фотона је и у смеси BRB-QC фактор који одређује брзину деградације – BRB се деградира 1,3 пута брже током UV-B него током UV-A озрачивања ($k_{\text{degrad.BRBizBRBQC}}^{\text{UV-B}} / k_{\text{degrad.BRBizBRBQC}}^{\text{UV-A}}$) под аеробним и анаеробним условима. Деградација QC-а под аеробним условима је 1,9 пута бржа него у анаеробним условима током UV-B озрачивања док је током озрачивања UV-A светлосћу готово идентична (**Табела 4А**, стр. 121).

Деградација BRB-а и QC-а је спорија у анаеробним условима. Како је BRB сензибилизатор настанка синглетног кисеоника а уједно и његов супстрат, у недостатку $^1\text{O}_2$ (анаеробни услови) деградација је смањена. Спорија деградација QC-а у анаеробним условима се такође приписује одсуству ROS врста – синглетног кисеоника у конкретном случају. Наиме, QC је доказани физички *quencher* синглетног кисеоника (Montaña *et al.*, 2010).

Спорију деградацију BRB-а прати спорија продукција BVD-а и то 1,6 пута односно 1,7 пута спорија током UV-A односно UV-B озрачивања у аеробним ($k_{\text{prod.BVDizBRB}}^{\text{UV-A,B,aerobno}} / k_{\text{prod.BVDizBRBQC}}^{\text{UV-A,B,aerobno}}$ – **Табела 4В**, стр. 121), тј. 3 пута спорија током UV-B озрачивања у анаеробним условима озрачивања у односу на деградацију билирубина у одсуству кверцетина ($k_{\text{prod.BVDizBRB}}^{\text{UV-B,anaerobno}} / k_{\text{prod.BVDizBRBQC}}^{\text{UV-B,anaerobno}}$ – **Табела 4В**, стр. 121).

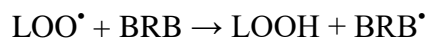
6.3.6 Билирубин као фотосензибилизатор у смеси са фосфолипидима

Праћењем UV-B индукованих промена смеше BRB-PL90 на таласној дужини од 372 nm се уочавају пикови BVD-а и BRB-а, елуирани на ретенционим временима од 12,2 min и 44,4 min, респективно (**Сл.54**). Брзину деградације BRB-а у смеси са фосфолипидима, како у аеробним тако и у анаеробним условима, одређује енергија

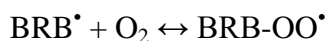
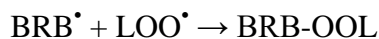
упадних фотона. Деградиација BRB-а континуалним UV-B озрачивањем је 2 пута бржа у аеробним ($k_{\text{degrad.BRBizBRBPL90}}^{\text{UV-B,aerobno}} / k_{\text{degrad.BRBizBRBPL90}}^{\text{UV-A,aerobno}}$) односно 1,7 пута бржа у анаеробним условима ($k_{\text{degrad.BRBizBRBPL90}}^{\text{UV-B,anaerobno}} / k_{\text{degrad.BRBizBRBPL90}}^{\text{UV-A,anaerobno}}$) у односу на деградиацију током UV-A озрачивања (Табела 4А). Разлог скоро 2 пута спорије деградиације BRB-а у анаеробним условима лежи у одсуству синглетног кисеоника.

Смеша BRB-PL90 је, у циљу детекције конјугованих диенских структура праћена и на таласној дужини од 234 nm. Детектовано је присуство само Per1 елуираног на ретенционом времену од 5,5 min (Табела 4А). Међутим, промена његове површине са порастом времена озрачивања има динамични карактер. Са друге стране, уколико се упореде константе деградиације BRB-а у присуству и одсуству фосфолипида у аеробним условима ($k_{\text{degrad.BRBizBRBPL90}}^{\text{UV-A,B,aerobno}} / k_{\text{degrad.BRB}}^{\text{UV-A,B,aerobno}}$) закључује се да је деградиација бржа 1,2 пута односно 1,6 пута у њиховом присуству током UV-A односно UV-B озрачивања, респективно. Ситуација у анаеробним условима је потпуно другачија – брзина деградиације у присуству липида је 1,9 пута односно 1,5 пута спорија у односу на деградиацију у њиховом одсуству ($k_{\text{degrad.BRB}}^{\text{UV-A,B,anaerobno}} / k_{\text{degrad.BRBizBRBPL90}}^{\text{UV-A,B,anaerobno}}$), током UV-A односно UV-B озрачивања, респективно. Овакво понашање наводи на претпоставку да је посредни антиоксидативно деловање BRB-а.

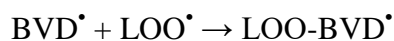
Претрагом литературе је утврђено да се BRB врло често наводи као молекул са изузетним антиоксидативним деловањем. Штавише, сврстан је у групу *chain-breaking* антиоксиданаса (Stocker *et al.*, 1987; Arumalla *et al.*, 2012). Наиме, у микроларним концентрацијама BRB „хвата” перокси радикале донирањем водоника везаног у положају 10 молекула тетрапирила дајући резонантно стабилизовани угљенично центрирани радикал (BRB[•]):



који може даље реаговати са новим перокси радикалом (дајући не-радикалски производ) или са кисеоником:



Биливердин поседује још боље антиоксидативне активности од BRB-а, приписане пре свега резонантно стабилизованом угљенично центрираном радикалу награђеном адисијом перокси радикала (Stocker *et al.*, 1987; Arumalla *et al.*, 2012):



Иако је концентрација BRB-а коришћена у овој дисертацији знатно већа, присуство BVD-а, као главног производа деградације се ипак не може занемарити. Наиме, деградацију BRB-а прати продукција BVD-а као главног деградационог производа.

6.3.7 UV индуковане промене смеше BRB-QC-PL90

Увођењем кверцетина у смешу BRB-PL90 и праћењем сигнала пре и након UV-B озрачивања на 372 nm добијају се хроматограми приказани на **Сл.56А**. Идентитет пикова елуираних на 9,7 min; 12,7 min и 45,0 min је потврђен анализом UV-VIS спектра (на **Сл.56В₁** и **В₂** су приказани спектри QC-а и BRB-а, респективно). На основу вредности њихових константи брзине деградације (на **Сл.56С₁** и **С₂** су приказане за случај UV-B озрачивања) увиђа се да брзину деградације QC-а и BRB-а у смеси одређује енергија упадних фотона – бржа је под дејством UV-B светлости ($k_{\text{degrad.QCizBRBQCPL90}}^{\text{UV-B}} / k_{\text{degrad.QCizBRBQCPL90}}^{\text{UV-A}}$ и $k_{\text{degrad.BRBizBRBQCPL90}}^{\text{UV-B}} / k_{\text{degrad.BRBizBRBQCPL90}}^{\text{UV-A}}$). Заштитни ефекат QC-а према BRB-у у смеси (BRB-QC-PL90) се огледа у скоро 2 пута споријој деградацији у односу на систем без кверцетина (BRB-PL90) како у аеробним ($k_{\text{degrad.BRBizBRBPL90}}^{\text{UV-A,B,aerobno}} / k_{\text{degrad.BRBizBRBQCPL90}}^{\text{UV-A,B,aerobno}}$) тако и у анаеробним условима ($k_{\text{degrad.BRBizBRBPL90}}^{\text{UV-A,B,anaerobno}} / k_{\text{degrad.BRBizBRBQCPL90}}^{\text{UV-A,B,anaerobno}}$) – **Табела 4А** на стр. 121. Смањење брзине деградације BRB-а у смеси BRB-QC у аеробним условима се може приписати „такмичењу” QC-а и BRB-а за $^1\text{O}_2$.

Изгледа да и BRB испољава своје заштитно деловање према QC-у – његова деградација у смеси BRB-QC-PL90 у аеробним условима током UV-B озрачивања је 1,7 пута спорија у односу на деградацију у смеси QC-PL90 ($k_{\text{degrad.QCizQCPL90}}^{\text{UV-B,aerobno}} / k_{\text{degrad.QCizBRBQCPL90}}^{\text{UV-B,aerobno}}$).

Процес деградације BRB-а и у смеси BRB-QC-PL90 прати продукција BVD-а као главног деградационог производа.

Кверцетин се и под условима у овом систему показао као добар антиоксиданс – ефикасно сузбија продукцију Per1 – **Сл.55**. Међутим, као и досад, антиоксидативна активност је јача током озрачивања UV-B светлошћу (**Табела 4В**, стр. 121).

До продукције пероксида међутим не долази ни када је у систему присутан BRB. Наиме, праћењем продукције пероксида у смеси BRB-QC-PL90 на

хроматограмима снимљеним на 234 nm се уочава линеаран пад површине пика са порастом времена континуалног UV-B озрачивања (Сл.57).

6.3.8 Идентификација деградационих производа BRB-а UHPLC-ESI-MS техником

Активност BRB-а пре свега зависи од његове конформације. У Теоријском делу је истакнуто да BRB нема фиксни облик, већ је флексибилан, са стабилним формама које зависе од његовог молекулског окружења. Облик доминантан у кристалима и неполарним растварачима је „пресавијена” форма (Сл.22B), настала интрамолекулском стабилизацијом постигнутом грађем Н-веза између NH/O и OH/O група (McDonagh and Lightner, 1985). Како су хидрофилне, поларне –COOH и –NH групе у таквој структури повезане међусобним интеракцијама и неприступачне поларним групама растварача (нпр. води, метанолу итд.), BRB је у њима практично нерастворан.

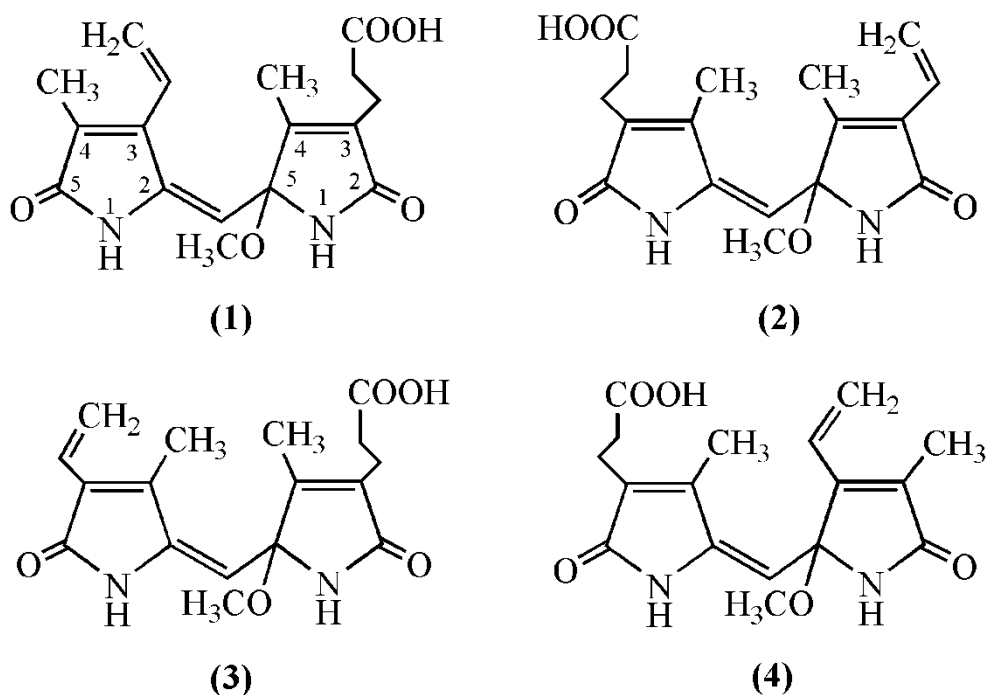
Зато је у овом раду BRB најпре растворен у NH₄OH, који кида интрамолекулске Н-везе, чинећи рН раствора базнијим (рН = 9,3) што омогућава растварање BRB-а превођењем у дианјон и његову трансформацију из увијеног у линеарни облик.

Континуалним UV-B озрачивањем раствора BRB-а у метанолу у овом раду су детектована следећа једињења (поређана по порасту ретенционог времена, $t_{ret.}$, и приказана на Сл.58А и 59): први производ, обележен са Prod1, на m/z 333 ($t_{ret.} = 1,90$ min); други – Prod2 на m/z 299 ($t_{ret.} = 2,45$ min); трећи – Prod3, на m/z 583 – три изомера BVD-а, са ретенционим временима од 3,09 min; 3,36 min и 3,51 min (пикови обележени бројевима 3', 3 и 3'', респективно); и коначно три изомера BRB-а елуираних на 11,55 min; 12,27 min и 13,00 min (пикови обележени бројевима 4', 4 и 4'', респективно).

MS/MS спектри BRB-а и његових UV-B светлошћу индукованих продуката (са хроматограма приказаним на Сл.58А), су показали очекиване [M+H]⁺ (протоноване) молекулске јоне на m/z 333, m/z 299, m/z 583 и m/z 585 респективно (Сл.60 и 61). Најзаступљенији фрагментни јони у ESI-MS/MS спектрима снимљеним у позитивном јонизационом модалитету различитих пигмената билина обично потичу од фрагментације, односно цепања тетрапиролног централног положаја (види Сл.109А и В), дајући као најистакнутији дипиролни продуктни јон (Lim, 2009).

Протоновани молекулски јон BRB-а ($[M+H]^+$ – m/z 585) даје најинтензивнији продукт јон на m/z 299 настао кидањем централног метиленског моста (Сл.61B) – као што је предложено од стране Quinn-а и сарадника (2012) у тандемским масеним експериментима (Quinn *et al.*, 2012). Исто важи за протоновани BVD (Prod.3: $[M+H]^+$ – m/z 583) који, на аналоган начин, даје најинтензивнији јон на m/z 297 (Сл.61A), издвајањем фрагмента од 286 масених јединица. Јони m/z 299 (у случају BRB-а) и m/z 297 (у случају BVD-а) даље фрагментишу губљењем CO фрагмента (28 масених јединица) дајући јоне на m/z 271 и m/z 269, респективно (Сл.61A и B), што је у складу са резултатима датим од стране Lim-а (Lim, 2009).

Са друге стране, MS/MS спектри Prod1 и Prod2 (Сл.60A и B, респективно) имају другачије фрагментационе шеме указујући на различите структуре. MS/MS спектар Prod1 (са $[M+H]^+$ на m/z 333) као један од 4 могућа изомера (Сл.110) структуре (1) предложене од стране Lightner-а (Lightner, 1977) даје основни (најзаступљенији, најинтензивнији) пик на m/z 301, настао губљењем фрагмента масе 32 ($[MH - 32]^+ = [MH - CH_3OH]^+$).

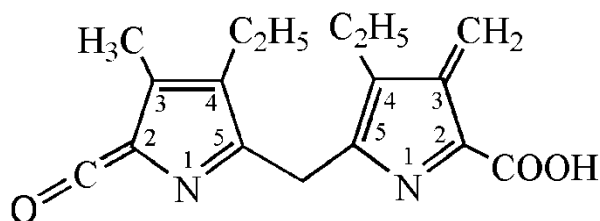


Слика 110 Структура Prod1: 3-{5-[(E)-(3-етенил-4-метил-5-оксо-1,5-дихидро-2H-пирол-2-илиден)метил]-5-метокси-4-метил-2-оксо-2,5-дихидро-1H-пирол-3-ил} пропионска киселина и њена три позната изомера идентификованих на $[M+H]^+ = m/z$ 333 (адаптирано према Lightner, 1977)

DeMatteis са сарадницима (2006) је такође детектовао фрагмент на m/z 333 и предложио другачију структуру дипирола (De Matteis *et al.*, 2006), као и Abu-Bakar са

сарадницима (2012) који су проучавали метаболизам BRB-а цитохромом 450 из људи (Abu-Bakar *et al.*, 2012). Међутим, ни једна ни друга студија се не бави фотоозрачивањем већ хемијском и ензимском оксидацијом, респективно.

Prod2 на m/z 299 је уочен у растворима BRB-а деградираног водоник пероксидом и Fe-EDTA на тамном, у аеробним условима (DeMatteis *et al.*, 2006) а описан је и као фрагменти јон у ESI-MS студији Jackson-а и сарадника (Jackson *et al.*, 1967) који су предложили дипиролну структуру насталу фрагментацијом централног метиленског моста, најслабије тачке молекула BRB-а (Сл.109А). MS/MS спектар Prod2 чине фрагментни јони на m/z 271 (губитак CO фрагмента, масе 28 Da), пик на m/z 254 (губитак фрагмента масе 17 Da – највероватније од –ОН групе) и пик на m/z 225, настао додатним губитком од 29 масених јединица, што је у складу са предложеном структуром:



Слика 111 Предложена структура Prod2: 4-етил-5-{[4-етил-3-метил-2-(оксометилиден)-2H-пирол-5-ил]метил}-3-метилен-3H-пирол-2-карбоксилна киселина идентификована на $[M+H]^+ = m/z$ 299

На основу предложених структура деградационих продуката (Prod1 и Prod2) је немогуће дати поуздану слику механизма. Међутим, деградациони пут који води до Prod1 може бити доведен у везу са ауто-сензибилизацијом BRB-а преко продукције синглетног кисеоника. Наиме, након претпостављеног кидања метиленског моста Prod1 садржи два додатна атома кисеоника у систему (види Сл.110). То међутим није случај са Prod2 јер у преуређеном фрагменту који потиче од BVD-а нема доказа који подржавају претходно изнешену тврдњу (Сл.111). Према томе, може се закључити да је деградација BRB-а у метанолу, тј. фотооксидација, бар делимично ауто-сензибилизована.

Док су MS/MS спектри били од помоћи у разјашњавању дипиролних структура UV-В светлошћу индукованих продуката, за додатно разјашњење механизма који доводе до продукције структура приказаних на Сликама 110 и 111 треба испратити динамику промене површине одговарајућих пикова са порастом времена озрачивања приказаних на Слици 62А-D.

График зависности приказан на **Сл.62D**, добијен интегралњем пика 4 на хроматограмима приказаним на **Слици 58A** – који припада „централном” изомеру BRB-a, за различита времена UV-B озрачивања показује јасан пад концентрације BRB-a са порастом времена озрачивања до 35. min. Пад је оштар и делује линеарно у првих 20 min, праћен благим падом до краја. Када се временска скала на овом графику упореди са истом временском скалом UV-B озрачивања на графицима приказаним на **Сл.62A-C** (на којима су дате промене концентрација Prod1-3 а који одговарају пиковима 1-3 на хроматограмима приказаним на **Сл.58A**) евидентно је да је оштар пад концентрације BRB-a синхронизован са порастом концентрације продукта. Prod1 показује експоненцијални раст који се завршава платоом за време озрачивања, $t_{\text{ит.}}$ од 20 min (**Сл.62A**); Prod2 има много оштрији, линеарни облик раста, који достиже највишу тачку у првих 20 min озрачивања, праћену последичним падом (**Сл.62B**); и на крају, Prod3 тј. BVD (једини производ који је присутан у неозраченом раствору поред самог BRB-a) показује тренд врло сличан оном описаном за Prod2 са једном малом разликом: највиша тачка је благо померена на $t_{\text{ит.}}$ од 25 min (**Сл.62C**).

Из динамичких зависности и MS/MS спектра може се закључити следеће: прво, евидентно је да је настајање дипиролног Prod1 (m/z 333) повезано са деградацијом BRB-a иако исти није нађен у MS/MS спектру BRB-a (иначе би било тешко објаснити синхронизованост између ове две динамичке зависности (**Сл.62A** и **D**); друго, Prod2 несумњиво потиче директно од BRB-a – доказ лежи у MS/MS спектру BRB-a (**Сл.60B**) тако да је степен синхронизованости две динамике разумљив (**Сл.62 B** и **D**).

На крају, динамично понашање BVD-a (приказано на **Сл.62C**) би требало да помогне разумевању улоге BVD-a током UV-B индуковане деградације BRB-a. У неким радовима се наводи да је настанак BVD-a интермедијарна фаза, тј. BVD је прекурсор из кога настају монопиролни деградациони производи (Gray *et al.*, 1972), док други наводе да BVD има сопствени пут деградације такође дајући монопиролне и дипиролне деградационе производе, независне од пута деградације BRB-a (Lightner, 1974; Lightner and Crandall, 1972). На основу резултата добијених у овој дисертацији, ниједна од претпоставки не делује логично.

Наиме, пораст површине пика BVD-a (**Сл.62C**) се може довести у везу са деградацијом BRB-a, али је тешко уочити његову улогу као прекурсора јер је динамика пораста BVD-a слична или иста као динамика уочена код Prod1 и Prod2 на

истој временској скали озрачивања. Било која друга могућност независног пута деградације BVD-а се не може поставити на основу ових експеримената, што не значи нужно да се неће променити под нешто другачијим експерименталним условима (промена интензитета UV-B зрачења или озрачивање из других опсега, нпр. UV-A заједно са дужим или краћим временом озрачивања итд.).

Треба додати и чињеницу да су производи деградације BRB-а, слични производима детектованим у овој дисертацији уочени и у условима без озрачивања, тј. коришћењем водоник пероксида за оксидацију билирубина (Wurster *et al.*, 2008) или диазонијум соли (Kufer and Scheer, 1983).

Анаеробна фотодеградација BRB-а није праћена у овој дисертацији, с обзиром на то да би она највероватније подразумевала потпуно другачији, вероватно Тип I механизам сензибилизације. Међутим, постоје и публикације у којима је уочено да у благим условима озрачивања (видљивом светлошћу) долази до појаве геометријских тј. конфигурационих фотоизомера BRB-а (Itoh *et al.*, 1999; Yasuda *et al.*, 2001).

Такође је важно нагласити да су дипиролна једињења слична дипиролима уоченим у овој дисертацији детектовани у урину беба које су услед хипербилирубинемije била под фототерапијом (Lightner *et al.*, 1984). Аутори су у цитираном раду користили HPLC хроматографију за детекцију добијених продуката а један од 8 детектованих једињења је изомер Prod1. То је уједно и доказ да су неки од добијених фотопродуката током фототерапије резултат фотохемијске деградације, тј. фотооксидације (као у овој дисертацији).

Податак је врло важан ако се има на уму све оно што је о фототерапији, као методи лечења, речено у **Теоријском делу**. Све ово даје биомедицински значај истраживањима спроведеним у овој дисертацији упркос чињеници да су експерименти изведени најједноставнијем могућем систему, и са светлошћу веће енергије (UV-B у поређењу са видљивом светлошћу која се користи у фототерапији). Иако је фотооксидација, у поређењу са фотоизомеризацијом, минорни процес *in vivo*, до ње дефинитивно долази а образовани дипироли су излучиви преко бубрега (McDonagh, 1985).

Ипак, комбинована истраживања деградације BRB-а *in vitro* и *in vivo* коришћењем како UV тако и видљиве светлости би дефинитивно скупила више доказа и омогућила бољи увид у механизме укључене у целокупан процес.

Узевши у обзир чињеницу изнешену у делу **6.3.3**, да је „за ексцитацију BRB-а довољна само видљива светлост”, појава BVD-а на хроматограмима BRB-а „самог”

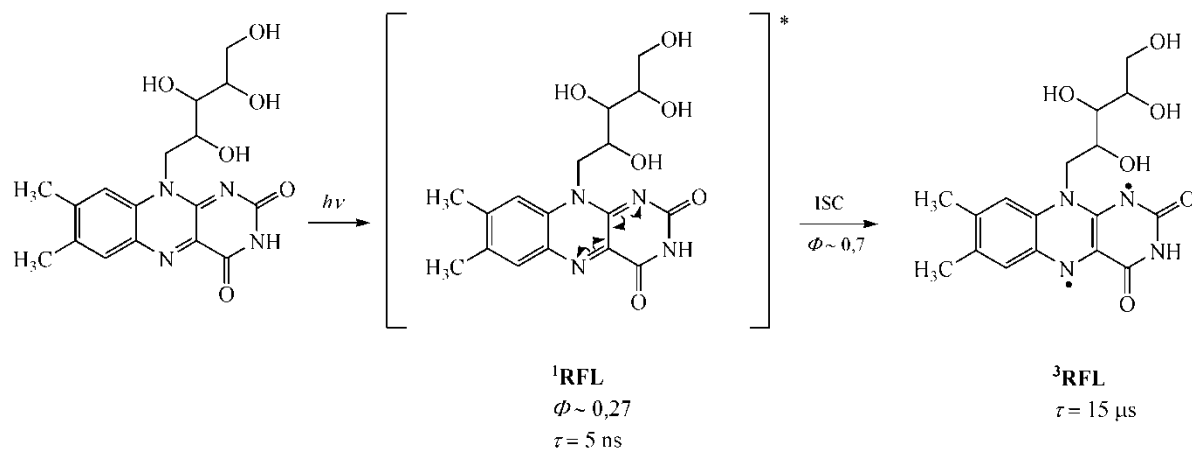
али и у свим смешама (BRB-QC, BRB-PL90, BRB-QC-PL90) пре озрачивања се може објаснити једино његовом интеракцијом са дневном светлошћу приликом припреме узорака. Његова продукција се највероватније одвија по радикалском, Тип I механизму, претпостављеном и приказаном на Сл.108.

6.4 Дејство UV зрачења на смешу RFL-QC-PL90

6.4.1 Ефекат UV зрачења на RFL

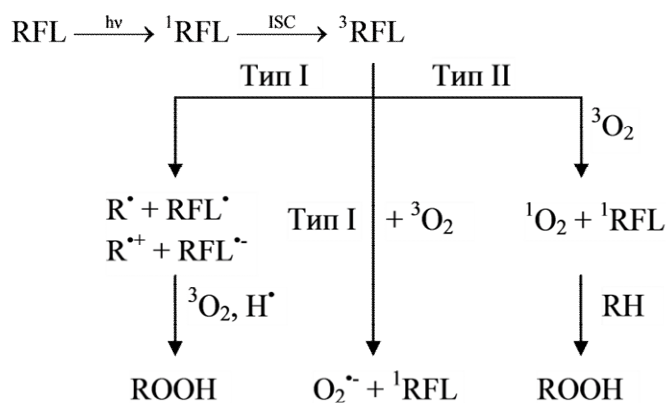
Рибофлавин је добро познат по својим фотосензибилизаторским способностима у бројним биолошким процесима, где делује и као Тип I и као Тип II сензибилизатор. Присуство бројних конјугованих двоструких веза и атома азота у изоалоксазинском прстену су одговорни за карактеристичан апсорпциони спектар RFL-а у воденим растворима, са максимумима на таласним дужинама од 223 nm, 267 nm ($\epsilon = 32\ 500\ \text{dm}^3\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$), 373 nm ($\epsilon = 10\ 600\ \text{dm}^3\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$) и 444 nm ($\epsilon = 12\ 500\ \text{dm}^3\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$) и апсорпцију у плавом делу спектра видљивог зрачења (траке на 375 nm и 445 nm). Однос апсорбанција на 373 nm и 267 nm је у опсегу 0,31-0,33 док је код 444 nm и 267 nm између 0,36-0,39. На положај апсорпционих максимума и вредности моларних апсорптивности између осталог утиче врста растварача, рН и грађење водоничних веза (Ahmed, 2009).

У молекулу рибофлавина апсорпцијом светлости долази до $\pi \rightarrow \pi^*$ прелаза (високе вредности моларних апсорптивности ($>10^4\ \text{dm}^3\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$) су типичне за ове прелазе) и последичне ексцитације из основног у кратко-живеће синглетно стање (^1RFL). Врло ефикасним интерсистемским прелазом настаје триплетно стање (^3RFL) – Сл.112 које преноси вишак енергије на молекулски кисеоник продукујући синглетни кисеоник (Тип II механизам). Алтернативно, триплетни рибофлавин је (као бирадикал) веома моћан оксиданс ($E \sim +1,7\ \text{V}$) који у радикалској реакцији деградира супстрате (Тип I механизам) (Cardoso *et al.*, 2012).



Слика 112 Настанак екситованих стања рибофлавина (синглетног – ${}^1\text{RFL}$ и триплетног – ${}^3\text{RFL}$) након апсорпције светлости; τ означава време „живота”, а Φ квантни принос екситованог стања (Cardoso *et al.*, 2012).

Због изузетно јаке апсорпције у UV и VIS области, до фотоекситације RFL-а може потенцијално доћи и у органима и ткивима најизложенијим светлости, пре свега кожи (рибофлавин се налази у базалним ћелијама и *dermis*-у) и очима (у сочиву је присутан у концентрацији од $4,5 \mu\text{mol dm}^{-3}$), оштећујући друге компоненте ћелије. Рибофлавин оксидује бројне биомолекуле укључујући протеине (тј. аминокиселине, попут триптофана) (Silva *et al.*, 1994), угљене хидрате (Silva *et al.*, 1999), липиде (Chien *et al.*, 2003; Nuvaere *et al.*, 2010), нуклеинске киселине (Joshi and Keane, 2010) као и друге витамине (Akhtar *et al.*, 2000; King and Min, 2002), мешаним Тип I и Тип II фотосензибилизаторским механизмима (Sikorska *et al.*, 2005; Cardoso *et al.*, 2012). У директном хемијском *quenching*-у његовог синглетног или триплетног стања (оба су реактивна) (Cardoso *et al.*, 2012) различитим супстратима (попут фенолних једињења) RFL донира или прима протон/електрон, дајући слободне радикале (Тип I механизам) који даље реагују са кисеоником или другим органским молекулима. Не-радикалски Тип II механизам подразумева физички *quenching* (тј. пренос енергије) са ${}^3\text{RFL}$ на молекулски кисеоник у основном стању (${}^3\text{O}_2$) дајући веома реактивни синглетни кисеоник (${}^1\text{O}_2$) – Сл.113. Преовладавање једног од ова два механизма зависи од врсте супстрата и реакционих услова – рН вредности, растварача, концентрације кисеоника, концентрације једињења укључених у реакцију итд. (Heelis, 1982). Генерално, ниске концентрације кисеоника фаворизују Тип I механизам (Min and Boff, 2002).



Слика 113 Рибофлавин као Тип I и Тип II сензибилизатор. У директној интеракцији супстрата и ${}^3\text{RFL}$ (Тип I механизам) настају радикали супстрата (R^\bullet) и рибофлавина (RFL^\bullet) односно радикал катјони ($\text{R}^{\bullet+}$) супстрата и радикал ањони ($\text{RFL}^{\bullet-}$) рибофлавина, преносом водоника односно електрона, респективно. Оксидацијом насталих радикала триплетним кисеоником (${}^3\text{O}_2$) настају врло електрофилни супероксид ($\text{O}_2^{\bullet-}$), који се са изузетном лакоћом адире на двоструке везе биомолекула. Друга могућност интеракције (<1%) је пренос електрона са ${}^3\text{RFL}$ на ${}^3\text{O}_2$ уз генерисање супероксида. Ипак, више од 99% реакција ових двају реактаната дају синглетни кисеоник (${}^1\text{O}_2$), преносом енергије са ${}^3\text{RFL}$ на ${}^3\text{O}_2$ (триплет-триплет анихилација) и последичне адисије на двоструке везе или друга места богата електронима у супстрату (Тип II механизам). Синглетни кисеоник такође може оксидовати рибофлавин последично доводећи до његове деградације, што одступа од концепта правог сензибилизатора (Cardoso *et al.*, 2012).

Осетљивост рибофлавина на дејство светлости потиче од изоалоксазинског прстена. Промене апсорпционих спектра које указују на деградацију се огледају у смањењу интензитета апсорпционог максимума у видљивој области, на таласној дужини од 445 nm – траке карактеристичне за флаване (изоалоксазине) – уз истовремени пораст апсорбанције у области 340-400 nm карактеристичне за алоксазински тип флавина – лумихром. Бројни фотопроизводи рибофлавина (код којих се промене дешавају у рибитил ланцу) међутим садрже изоалоксазинску хромофору апсорбујући у области од 300-450 nm (Insińska-Rak and Sikorski, 2014). Самим тим је квантификација фотопродуката рибофлавина спектроскопским техникама доста ограничена.

Зато је у овом раду коришћена HPLC хроматографија, а хроматограми су снимљени на таласним дужинама максимумима апсорбанције изоалоксазина и алоксазина – 445 nm и 390 nm, респективно. На хроматограмима неозраченог и UV-B озрачиваног раствора рибофлавина у метанолу снимљеним на 445 nm се уочава смањење површине пика (означено стрелицом усмереном наниже на хроматограмима), елуираног на 4,1 min и на основу спектралних карактеристика ($\lambda_{\text{max}} = 445 \text{ nm}, 369 \text{ nm}, 268 \text{ nm}$ и 224 nm) идентификованог као RFL уз истовремени пораст површине пикова

елуираних од 5.-7. min (Сл.63А и В). Новонастали пикови несумњиво одговарају мање поларним, деградационим производима рибофлавина. Међутим, идентичне спектралне карактеристике као код полазног једињења наводе на закључак да је изоалоксазински прстен очуван а да је промена уследила у рибитил ланцу. О идентитету насталих продуката се може спекулисати и нагађати, али недвосмислена идентификација је немогућа. То није случај са деградационим производом елуираним на ретенционом времену од 9,2 min на хроматограмима снимљеним на 390 nm (Сл.64А).

Наиме, спектралне карактеристике овог једињења су знатно другачије од оних код рибофлавина. У поређењу са спектром рибофлавина, долази до хипсохромног (плавог) померања свих апсорпционих трака: $\lambda_{\max} = 389 \text{ nm}, 351 \text{ nm}, 260 \text{ nm}$ и 218 nm , због чега је једињење идентификовано као лумихром (LC) (Сл.64А и В). Поређењем динамике промене површина пикова рибофлавина и лумихрома, добијених са одговарајућих хроматограма (Сл.63С и 64С), уочава се синхронизованост деградације првог и настанка другог како у аеробним тако и у анаеробним условима. Промена површине лумихрома током озрачивања има експоненцијални тренд – површина линеарно расте у почетку а онда достиже плато (Сл.64С). Поређењем константи брзине његовог настанка под аеробним и анаеробним условима у линеарном делу зависности (до 2. min озрачивања), закључује се да је под аеробним условима бржи, што се јасно види и са самих графика динамичких зависности површина пикова од времена континуалног UV-B озрачивања – Сл.64С.

Деградација рибофлавина је ~4 пута односно ~2 пута бржа у анаеробним него у аеробним условима ($k_{\text{degrad.RFL}}^{\text{UV-A,B,anaerobno}} / k_{\text{degrad.RFL}}^{\text{UV-A,B,aerobno}}$) и у оба случаја се одвија по кинетици првог реда, током континуалног UV-A односно UV-B озрачивања, респективно (Табела 5, стр. 142).

По Green-у и Tollin-у (1968) фотолиза рибофлавина у растварачима који садрже хидроксилну групу (нпр. етанол, метанол) се одвија преко његовог триплетног стања (Green and Tollin, 1968). У једном скоријем истраживању које се бави фотолизом деривата рибофлавина (5-деаза-рибофлавина, изо-6,7-рибофлавина, 3-метил-тетра-ацетил-рибофлавина и 3-бензил-лумифлавина) континуалним UV-A зрачењем у аеробним и аргоном засићеним метанолним растворима (анаеробним условима) аутори такође претпостављају да се деградација фламина и последично образовање производа одвијају преко њихових триплетних стања. Уочено је такође да је фотолиза деривата рибофлавина ефикаснија под анаеробним условима, при чему настају и

изоалоксазински (једињења типа лумифлавина) и алоксазински деривати (једињења типа лумихрома) (Insińska-Rak *et al.*, 2012), што је у неку руку потврда резултата добијених у овом раду.

Са друге стране, у присуству кисеоника се не одигравају реакције које захтевају присуство ^3RFL због чега се реакције у аеробним условима углавном одвијају преко и даље активних ^1RFL када настају производи типа алоксазина (Insińska-Rak *et al.*, 2012). Разлог овог феномена почива на чињеници да иако је ^3RFL изузетан сензибилизатор настанка $^1\text{O}_2$ у исто време је и одличан „супстрат” за $^1\text{O}_2$ од кога у аеробним условима „страда”. Наиме, синглетни кисеоник је веома електрофилна ROS врста а мете његовог напада су двоструке везе којима је молекула RFL-а богат. Сем тога, реакција између рибофлавина и синглетног кисеоника ($1,01 \times 10^{10} \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$) је једна од најбржих познатих реакција (Huang *et al.*, 2004), што објашњава релативно брзу деградацију рибофлавина у аеробним условима, уочену у овом раду.

Међутим, с обзиром на то да се интерсистемски прелаз одвија независно од присуства кисеоника, триплетно стање је ипак присутно у аеробним условима (Insińska-Rak *et al.*, 2012). Зато и не чуди појава како алоксазинских тако и изоалоксазинских продуката деградације током озрачивања рибофлавина у аеробним и анаеробним условима уочених у овој дисертацији (детаљније у делу **6.4.5**).

Додатак кверцетина смањује брзину деградације рибофлавина како у аеробним тако и у анаеробним условима. Наиме, на основу вредности константи брзине деградације рибофлавина у смеси са кверцетином (RFL-QC), уочава се 2,4 пута односно 1,9 пута спорија деградација рибофлавина у аеробним условима ($k_{\text{degrad.RFL}}^{\text{UV-A,B,aerobno}} / k_{\text{degrad.RFLizRFLQC}}^{\text{UV-A,B,aerobno}}$) и 6 пута односно 1,4 пута спорија у анаеробним условима ($k_{\text{degrad.RFL}}^{\text{UV-A,B,anaerobno}} / k_{\text{degrad.RFLizRFLQC}}^{\text{UV-A,B,anaerobno}}$), током UV-A односно UV-B озрачивања (Табела 5, стр. 142). Како рибофлавин од деградације могу заштитити само *quencher*-и његових ^1RFL и ^3RFL стања (Huvaere *et al.*, 2009) закључује се да спорија деградација рибофлавина потиче управо од способности QC-а да „угаси” (*quench*-ује) ексцитована стања RFL-а.

6.4.2 UV индуковани *bleaching* QC-а у смеси RFL-QC-PL90: *blank* експеримент

Озрачивање кверцетина у метанолу, под условима у смеси RFL-QC-PL90 (рН вредност раствора 8,1) – Сл.65, узрокује 2,8 пута односно 2,4 пута бржу деградацију у поређењу са његовом деградацијом при рН 7,1 (под условима у смеси

BZP-QC-PL90) током континуалног UV-A односно UV-B озрачивања ($k_{\text{degrad.QCizRFLQCPL90}}^{\text{UV-A,B}} / k_{\text{degrad.QCizBZPQCPL90}}^{\text{UV-A,B}}$), респективно. На хроматограмима добијеним истовременим праћењем деградације кверцетина на таласној дужини од 295 nm (Сл.66) доминира производ са максимумом апсорбанције на 294 nm (2-(3,4-дихидроксифенил)-3,5,7-трихидрокси-2,3-диметокси-2,3-дихидро-4H-хромен-4-он), структуре предложене у делу 6.1.2.2.

Бржа деградација кверцетина под условима у смеши RFL-QC-PL90 се, аналогно дискусији датој у делу 6.3.5 (за BRB), поред фотооксидације приписује и аутооксидацији. Деградацију прати и нешто бржи ($0,02328 \text{ min}^{-1} / 0,01947 \text{ min}^{-1}$ у случају UV-A и $0,07298 \text{ min}^{-1} / 0,06735 \text{ min}^{-1}$ у случају UV-B озрачивања) настанак QC DP1.

6.4.3 UV индуковане промене смеше RFL-QC

Озрачивање смеше кверцетина и рибофлавина је одабрано као модел евалуације *in vivo* заштитног ефекта биолошких мета (у овом случају ендогеног фотосензибилизатора – рибофлавина) флавонолима. Да би испољили своје главно физиолошко дејство (приписано њиховој АО активности према ROS врстама), флавоноиди морају бити стабилни. Зато је важно проучити како реактивност тако и потенцијалну деградацију QC-а у присуству фотогенерисаних ROS врста.

На основу вредности константи брзине деградације кверцетина приказаних у Табели 5 (стр. 142) и Табели 4А (стр. 121) закључује се да присуство RLF-а убрзава деградацију QC-а чак 294 пута односно 71 пут током UV-A односно UV-B озрачивања, респективно, у односу на деградацију у метанолу ($k_{\text{degrad.QCizRFLQC}}^{\text{UV-A,B}}$ (Табела 5) / $k_{\text{degrad.QC}}^{\text{UV-A,B}}$ (Табела 4А)). Имајући на уму чињеницу да озрачивањем RFL-а у метанолу настају врло реактивне ROS врсте: $^1\text{O}_2$ и $\text{O}_2^{\cdot-}$ (идентификованих у овој дисертацији и дискутованих у делу 6.3) са квантним приносима од 0,49 и 0,009, респективно (Krishna *et al.*, 1991) њихово присуство једним делом утиче и на деградацију QC-а уочену у овој дисертацији. Потврда претпоставке је потражена озрачивањем смеше у анаеробним условима, што је успорило деградацију QC-а 41 пут односно ~25 пута у односу на деградацију у аеробним условима ($k_{\text{degrad.QCizRFLQC}}^{\text{UV-A,B,aerobno}} / k_{\text{degrad.QCizRFLQC}}^{\text{UV-A,B,anaerobno}}$), током континуалног UV-A односно UV-B озрачивања, респективно (Сл.67С₂ и Табела 4). Узрок и даље

изузетно брзе деградације уочене чак и у анаеробним условима је требало потражити у литератури.

Рад групе истраживача на челу са Montaña-ом (2003), који се бави проучавањем активности 3-хидроксифлавона (3-OHF) и 7-хидроксифлавона (7-OHF) као „хватача” O_2^{\bullet} генерисаног фотоекситованим RFL-ом (Montaña *et al.*, 2003) је врло важан за дискусију резултата добијених у овој дисертацији због чега ће поједини аспекти рада бити детаљније описани. Наиме, по ауторима поменутог рада, озрачивање смеше RFL-а и 3-OHF/7-OHF видљивом светлошћу у аеробним условима покреће низ компетитивних процеса који зависе како од концентрација RFL-а тако и од концентрације QC-а. Реч је пре свега о *quenching*-у синглетних (1RFL) и триплетних стања (3RFL) рибофлавина са једне и реакција које се одвијају посредством O_2^{\bullet} са друге стране. „Судбина” RFL-а зависи од концентрације присутног флавоноида у смислу да када је концентрација $\geq 50 \text{ mmoldm}^{-3}$ ($\geq 0,05 \text{ moldm}^{-3}$) практично не долази до фотохемијских промена RFL-а због „гашења” 1RFL флавоноидима. Међутим, када су концентрације флавоноида реда величине mmoldm^{-3} или мање, долази до генерисања 3RFL (Montaña *et al.*, 2003).

Како се анаеробна фотодеградација RFL-а индукована видљивом светлошћу претежно одвија преко 3RFL , у циљу проучавања утицаја флавоноида на анаеробну деградацију RFL-а метанолни раствори RFL-а засићени азотом су озрачивани у одсуству и присуству 3-OHF/7-OHF (концентрације од око $0,05 \text{ mmoldm}^{-3}$). Брзина деградације RFL-а у присуству флавона је мања, па је закључено да је посредни *quenching* ексцитованих стања RFL-а флавоноидима. На крају, аутори су способност флавона да „гасе” ексцитовано триплетно стање рибофлавина концентрације $0,02 \text{ mmoldm}^{-3}$ у метанолу проучавали тако што су 3RFL генерисали ласерским пулсом таласне дужине зрачења од 355 nm (таласна дужина у опсегу UV-A зрачење). Ниска концентрација рибофлавина и ниска енергија ласерског пулса су коришћене како би се спречили нежељени ефекти у виду „само-гашења” (*self-quenching*) и триплет-триплет анихилације, респективно (Montaña *et al.*, 2003).

Montaña са сарадницима (Montaña *et al.*, 2010) је проучавала још и стабилност кверцетина, морина и рутина у метанолу, у присуству RFL-ом генерисаних (дејством видљиве светлости) ROS врста UV-VIS спектрофотометријом. На основу добијених резултата закључено је да су за оксидацију кверцетина у аеробним условима одговорни 1O_2 , O_2^{\bullet} и H_2O_2 (Montaña *et al.*, 2010).

За разлику од услова коришћених у наведеним радовима где је извор светлости било зрачење из видљивог дела спектра, у коме су флавоноиди транспарентни, у овој дисертацији под дејством UV зрачења долази до деградације и једне и друге компоненте смеше. С обзиром на то да је концентрација кверцетина $\sim 5 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, несметано се генеришу и синглетна и триплетна стања рибофлавина. Дакле, за деградацију кверцетина је одговорно како „гашење” ексцитованих стања рибофлавина тако и присуство супроксида и синглетног кисеоника. Спорија деградација рибофлавина у анаеробним условима се приписује физичком „гашењу” ^3RFL .

На крају, како је концентрација рибофлавина коришћена у овом раду $\sim 1 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$, релативно брза деградација рибофлавина у условима озрачивања се може приписати „само-гашењу” рибофлавина.

6.4.4 UV индуковани *bleaching* RFL-а у смеси са фосфолипидима

Интеграљењем пика рибофлавина на хроматограмима неозрачене и UV-B озрачиване смеше RFL-PL90 у аеробним и анаеробним условима и представљањем њене *ln*-оване вредности у зависности од времена озрачивања (Сл.69) закључује се да долази до скоро 1,7 пута брже деградације RFL-а (уз истовремени настанак LC-а) у анаеробним него у аеробним условима за обе врсте зрачења ($k_{\text{degrad.RFLizRFLPL90}}^{\text{UV-A,B,anaerobno}} / k_{\text{degrad.RFLizRFLPL90}}^{\text{UV-A,B,aerobno}}$ – Табела 5 на стр. 142). Деградација се одвија по моделу кинетике првог реда.

Како рибофлавин у свом триплетном стању има већи редуковани потенцијал од аминокиселина, протеина, липида и бројних витамина неретко је узрок њихове деградације у храни. Најтипичнији пример је оксидација липида RFL-ом која доводи до појаве непријатних мириса хране изложене светлости. Ту се пре свега мисли на полинезасићене масне киселине као што је линолна киселина у липидима хране (нпр. сојином уљу) и млечним производима која се под дејством светлости врло лако оксидује синглетним кисеоником продукованим ^3RFL -ом (Choe *et al.*, 2005). Чињеница је да брзина оксидације ПНМК синглетним кисеоником више зависи од броја него од врсте (конјуговане или не-конјуговане) двоструких веза. Брзина реакције између $^1\text{O}_2$ и олеинске, линолне, линоленске и арахидонске киселине је редом: $0,7 \times 10^5 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$; $1,3 \times 10^5 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$; $1,9 \times 10^5 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ и $2,4 \times 10^5 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ – пропорционално броју двоструких веза. Сем тога, брзина реакције линолне киселине и $^1\text{O}_2$

($1,3 \times 10^5 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$) је бржа од њене реакције са $^3\text{O}_2$ ($8,9 \times 10^1 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (Min and Boff, 2002).

Како у састав фосфолипидне смеше коришћене у овој дисертацији улазе и линолна и линоленска киселина (о чијем доприносу процесу ЛП је било речи у делу **6.1.3**) не чуди појава конјугованих диенских структура током континуалног UV озрачивања смеше RFL-PL90.

Наиме, на хроматограмима снимљеним на таласној дужини од 234 nm је уочена појава три конјугована диена, обележених са Per1-3, елуираних на ретенционим временима од 5,5 min; 6,5 min и 4,5 min, респективно. Брзина продукције Per1 и Per2 је скоро 2 пута већа током UV-A у поређењу са UV-B озрачивањем. И док током UV-A озрачивања долази до продукција Per3, на хроматограмима добијеним UV-B озрачивањем смеше исти није уочен. Овако нешто не чуди из разлога што је емисиони спектар UV-A лампи ван области апсорпције конјугованих диенских структура, за разлику од UV-B, чији се опсег емисије једним делом поклапа са апсорпционим спектром пероксида. Зато озрачивање UV-A лампама обично доводи до несметане продукције пероксида, док код UV-B лампи у одређеном временском периоду долази до пораста површине пероксида, вредност онда достиже плато (указујући на равнотежу између процеса продукције и деградације пероксида) и на крају почиње да опада.

На основу UV спектра конјугованих диена датих на **Слици 70B₁-B₃**, структуре насталих пероксида су идентичне структурама диена уочених у случају BZP-ом сензибилизоване ЛП (**Сл.39B₁-B₃**). Поређењем вредности константи брзине продукције пероксида BZP-ом и RFL-ом закључује се да је RFL бољи сензибилизатор, барем на основу вредности добијених током UV-A озрачивања (које је очигледно релевантније). Наиме, брзина продукције Per1 и Per3 је скоро 4 пута, а Per2 скоро 2 пута већа током RFL-ом сензибилизованог процеса ЛП (**Табела 3** на стр. 104 и **Табела 6** на стр. 142) што такође не чуди јер се рибофлавин наводи као „ендогени UV-A фотосензибилизатор” (Wondark *et al.*, 2006). Треба међутим имати на уму и чињеницу да су лумихром и лумифлавин врло ефикасни фотосензибилизатори (Huang, 2006) а како су у овом раду идентификовани као главни производи деградације RFL-а, изузетна моћ продукције липидних пероксида се може приписати и њиховом врло вероватном доприносу сензибилизаторским способностима RFL-а.

6.4.5 UV индуковане промене смеше RFL-QC-PL90

Циљ увођења кверцетина у смешу рибофлавина и фосфолипида је контрола процеса ЛП. Све промене индуковане UV озрачивањем се најлакше уочавају на хроматограмима добијеним праћењем смеше RFL-QC-PL90 на таласним дужинама од 390 nm (Сл.72) и 234 nm (Сл.73). Праћено је смањење површине пикова рибофлавина, кверцетина и неоксидованих липида елуираних на 4,3 min; 10,6 min и 20,9 min, респективно и истовремени пораст површина пикова Per1-3 елуираних на 5,5 min; 6,5 min и 4,5 min, QCDP1 на 6,9 min и лумихрома на 10,0 min. Закључује се да се озрачивањем смеше RFL-QC-PL90 деградација RFL-а, QC-а и NL-а одвија истовремено са продукцијом пероксида, QCDP1 и лумихрома. Хроматограми дати на Сл.72 су приказани до 13. min анализе јер неоксидовани липиди, који су као најнеполарније компоненте смеше елуирани последњи, не апсорбују таласну дужину детекције сигнала (390 nm).

На основу вредности константи брзине деградације приказаних у Табели 5 (стр. 142) заштитни ефекат QC-а је очигледан. Његово присуство смањује брзину деградације RFL-а и под аеробним (~2 пута) и под анаеробним условима (~1,5 пута) у односу на деградацију у смеси RFL-PL90 ($k_{\text{degrad.RFLizRFLPL90}}^{\text{UV-A,B}} / k_{\text{degrad.RFLizRFLQCPL90}}^{\text{UV-A,B}}$ – Табела 5), а све на рачун сопствене деградације која је у односу на смешу QC-PL90 ($k_{\text{degrad.QCizRFLQCPL90}}^{\text{UV-A,B}} / k_{\text{degrad.QCizQCPL90}}^{\text{UV-A,B}}$ – Табела 5) у аеробним условима бржа чак ~544 пута током UV-A односно ~14 пута током UV-B озрачивања, респективно. Међутим, у поређењу са деградацијом у смеси RFL-QC ($k_{\text{degrad.QCizRFLQCPL90}}^{\text{UV-A,B}} / k_{\text{degrad.QCizRFLQC}}^{\text{UV-A,B}}$ – Табела 5) присуство фосфолипида (липидних пероксида) доприноси 1,4 пута (~29%) бржој аеробној деградацији QC-а током UV-A озрачивања.

На хроматограмима неозрачене и UV-A озрачване смеше RFL-QC-PL90 снимљеним на таласној дужини од 234 nm уочавају се пикови који потичу од пероксида (Per1-3) елуираних на ретенционим временима од 5,5 min; 6,5 min и 4,5 min (Сл.73).

Иако је QC под условима у смеси RFL-QC-PL90 несумњиво добар антиоксиданс – бољи током UV-B него током UV-A индукованог процеса ЛП, додаток RFL-а драстично мења ситуацију. Поређењем брзине продукције пероксида у смеси RFL-QC-PL90 са неконтролисаном продукцијом у смеси RFL-PL90 закључује се да је

продукција нешто спорија али да је АО активност QC-а драстично смањена што и не чуди с обзиром на брзину његове деградације у присуству RFL-а.

У циљу недвосмилене идентификације UV-индукованих продуката, смеша рибофлавина и кверцетина у метанолу је озрачивана UV-B светлошћу у аеробним и анаеробним условима и анализирана UHPLC-ESI-MS техником.

6.4.6 Идентификација деградационих производа смеше RFL-QC UHPLC-ESI-MS техником

Као што је истакнуто у **Теоријском делу**, захваљујући способности да прими и/или донира пар водоникових атома и притом се редукује и/или оксидује (Choe *et al.*, 2005), фотохемија рибофлавина је комплексна и може се поделити у три групе: интра- и интермолекулска фоторедукција, интра- и интермолекулска фотоадиција и интрамолекулска фотодеалкилација. Неке, или све побројане, фотореакције се могу одиграти истовремено дајући циклодехидрорибофлавин (CDRF), формилметилфлавин (FMF), лумихром (LC), лумифлавин (LF) и бројне друге деградационе производе, зависно од реакционих услова, посебно рН вредности раствора (Ahmad *et al.*, 2004; Ahmad *et al.*, 2005; Ahmad *et al.*, 2010).

Људска кожа је богата ендогеним фотосензибилизаторима (ту је пре свих RFL) који апсорпцијом светлости доводе до бројних оштећења. С друге стране, акценат на употреби природне козметике је довео до инкорпорације природних производа, пре свега кверцетина, у бројне козметичке препарате, који је поред снажних биолошких ефеката које испољава још и апсорбер UV-B зрачења (Wondrak *et al.*, 2006), смањујући тако количину најопаснијег дела сунчевог зрачења које допире до површине коже. Самим тим, долази до неминовног међусобног контакта ових једињења у људском организму, тј. људској кожи. Међутим, механизми њиховог међусобног деловања су мало познати; тако да је њихова потенцијална интеракција – посредована UV-B светлошћу – још увек прилично нејасна и једва нешто више од пуког нагађања. Зато би базични подаци о интеракцији RFL-QC у најједноставнијем окружењу – метанолном раствору, под дејством континуалног UV-B озрачивања добијених помоћу UHPLC-ESI-MS технике, могли бити од значаја за увид у аналогну интеракцију *in vivo*.

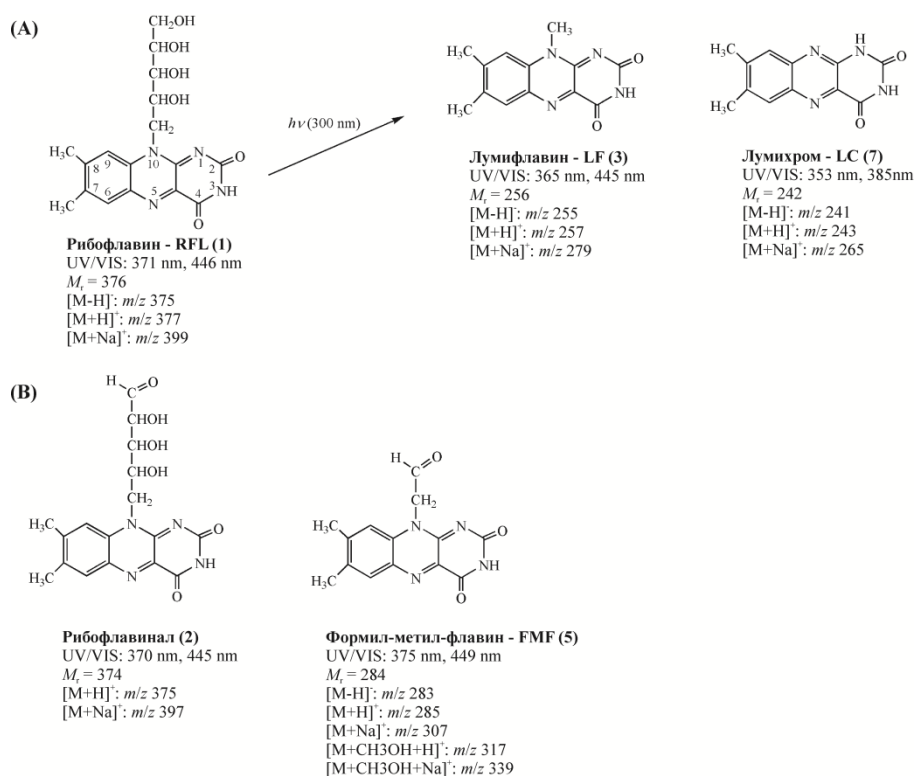
Рад у овој дисертацији представља корак напред у односу на рад Insińska-Rak и сарадника (Insińska-Rak *et al.*, 2012) јер се бави UV-B озрачивањем раствора рибофлавина у метанолу у присуству кверцетина, добро познатог по својим АО

особинама и понашању као потенцијалног *quencher*-а ^3RFL и „хватача” евентуално продукованих радикала (Huvaere *et al.*, 2009; Becker *et al.*, 2005).

Ефекат континуалног UV-B озрачивања на смешу рибофлавина и кверцетина у метанолном раствору је приказана UHPLC хроматограмима датим на Сл.74А. Сигнали су праћени на таласној дужини детекције ($\lambda_{\text{det.}}$) од 385 nm. Највиши сигнал одговара неозраченој смеси, док средњи и најнижи сигнал одговарају смеси озраченој 6 min, под аеробним и анаеробним условима, респективно.

Таласна дужина детекције је одабрана на основу апсорпционих спектра RFL-а (пик обележен бројем 1, на $t_{\text{ret.}} = 2,41$ min), LF-а: 7,8,10-триметилизоалоксазина (пик број 3, $t_{\text{ret.}} = 3,26$ min) и LC-а: 7,8-диметилалоксазин (пик број 7 на $t_{\text{ret.}} = 6,56$ min), приказаним на Сл.74С.

Евидентно је да сва три једињења јако апсорбују на 385 nm. Пик број 2 је приписан рибофлавиналу: 5-(7,8-диметил-2,4-диоксобензо[*g*]птеридин-10-ил)-2,3,4-трихидроксипентаналу. Пикови обележени бројевима 4 и 6 (Сл.74А) нису идентификовани, али на основу њихових апсорпционих спектра, имају структуру сличну LF-у. Пик обележен бројем 5 је идентификован као формил-метил-флавин, FMF: 7,8-диметил-10-формилметилизоалоксазин (Сл.114).



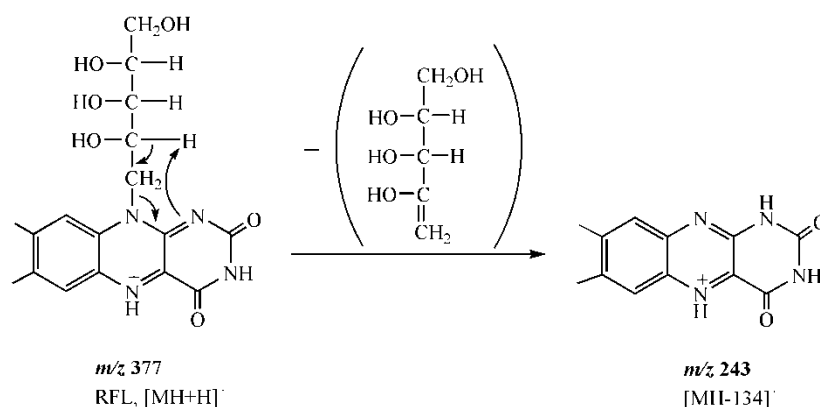
Слика 114 Структуре главних (А) и минорних (В) продуката деградације рибофлавина у метанолу индуковане континуалним UV-B озрачивањем (адаптирано према Insińska-Rak *et al.*, 2012).

Део хроматограма приказан у инкременту Сл.74А – (В), између $t_{ret.} = 4\text{--}8$ min снимљен на таласној дужини ($\lambda_{det.}$) од 300 nm, омогућава праћење могућих деградационих продуката QC-а – уочених у ранијим експериментима са UV озрачивањем раствора кверцетина у метанолау – са апсорпционим максимумом на 300 nm (Fahlman and Krol, 2009; Zvezdanović *et al.*, 2012a; Zvezdanović *et al.*, 2012b).

На хроматограму је евидентна појава два нова пика, обележених бројевима 9 и 10. На основу фрагментација приказаних у Табели 7 (стр. 148) пик обележен бројем 9 одговара структури производа кверцетина приказаној на Сл.99 (m/z 363: 2-(3,4-дихидроксифенил)-3,5,7-трихидрокси-2,3-диметокси-2,3-дихидро-4H-хромен-4-он), а пик обележен бројем 10 структуре предложеној на Сл.101 (m/z 347: 3,5-дихидрокси-2-[метокси(оксо)ацетил]фенил 3,4-дихидроксибензоат).

MS/MS спектри (добијени тандемском масеном спектрометријом са сударима индукованом фрагментацијом (CID) молекулских јона) приказани на Сл.75 потврђују структуру главних продуката, лумифлавина (Сл.75В – пик број 3 на хроматограмима приказаним на Сл.74А) и лумихрома (Сл.75С – пик број 7 на хроматограмима приказаним на Сл.74А).

Сам рибофлавин даје LC као главни фрагментациони производ (Сл.75А, по механизму приказаном на Сл.115), а наредна фрагментација се одвија цепањем трећег прстена изоалоксазина као последица ослобађања неутралног CONHCO фрагмента, идентично фрагментацији самог LC-а (Сл.75С).



Слика 115 Механизам интрамолекуларне фотодеалкилације – настанак лумихрома из рибофлавина током континуалног UV-B озрачивања.

Према MS/MS спектру LF-а елиминација CONHCO фрагмента се одвија у два узастопна корака дајући фрагменте на m/z 214 ([MH-CONH]⁺) и m/z 186 (додатни губитак CO фрагмента) (Табела 7 на стр. 148).

Ahmad и сарадници (Ahmad *et al.*, 2006) су проучавали утицај интензитета светлости и таласне дужине зрачења на реакције фотодеградације воденог раствора RFL-а (фотоадиција и фоторедукција) у присуству фосфатног пуфера, помоћу UV и VIS извора светлости. Идентификовали су LC и LF као главне производе и закључили да се однос LF/LC повећава са променом од UV на VIS зрачење, што је у складу са подацима приказаним у овој дисертацији: јасно је да је LC доминантнији над LF-ом након 6 min UV-B озрачивања под анаеробним условима (LF чак није ни детектован након озрачивања у истом трајању под аеробним условима, **Сл.74А**).

Динамика деградације рибофлавина у метанолу током озрачивања UV-B светлошћу у присуству и одсуству кверцетина, под анаеробним и аеробним условима је приказана на **Сл.76А**. За боље разумевање утицаја кверцетина, посматрана је само његова деградација у метанолу као и у смеси са рибофлавином – у аеробним и анаеробним условима (**Сл.76В**).

Током првих 15 min UV-B озрачивања у аеробним условима стиче се утисак да је кверцетин отпорнији од RFL-а; сам рибофлавин се деградира много брже у анаеробним условима (**Сл.76А**). Јасно је да QC штити RFL од примењеног UV-B озрачивања тј. редослед динамике деградације RFL-а је следећи: RFL-анаеробно > (RFL-QC)-анаеробно > RFL-аеробно > (RFL-QC)-аеробно (**Сл.76А**). Истовремено, редослед динамике смањења површине QC-а са повећањем времена озрачивања је: QC < (RFL-QC)-анаеробно < (RFL-QC)-аеробно (**Сл.76В**).

Другачију деградацију RFL-а под анаеробним и аеробним условима (у одсуству QC-а) очигледно диктирају његове фотосензибилишуће особине (Sikorska *et al.*, 2005; Cardoso *et al.*, 2012). Најбржа деградација RFL-а у одсуству кверцетина, под анаеробним условима је јасно повезана са његовом Тип I фотосензибилишућом активношћу која се одвија преко ^3RFL и образовања семихинон RFL-радикала (Insinska-Rak *et al.*, 2012). Аеробна деградација RFL-а у присуству QC-а је мало спорија.

Већ је истакнуто да QC своју АО активност према UV светлошћу индукованим ефектима испољава на два различита начина: (1) јаком апсорпцијом UV зрачења (Strid and Porra, 1992; Strid *et al.*, 1994) и/или (2) *chain-breaking* активношћу, тј. „хватањем” присутних радикала, спречавајући притом оксидативна оштећења коже (Schoemaker *et al.*, 1995; Casagrande *et al.*, 2006; Choquenot *et al.*, 2008). Иако се може спекулисати да оба начина доприносе смањењу деградације RFL-а (и RFL и QC су UV-B апсорбери) (Wondrak *et al.*, 2006), други начин ће, преко могућег „хватања” RFL-ом створених

радикала, свакако утицати на брзину деградације RFL-а, тј. смањити је, што је и приказано на **Слици 76А**. У исто време, уочен је јасан пад концентрације QC-а у анаеробним условима у присуству RFL-а, у поређењу са деградацијом (QC-а) у његовом (RFL) одсуству (**Сл.76В**).

Заштитни ефекат QC-а (према RFL-у) је такође видљив под аеробним условима. Пре свега, евидентно је да је деградација самог RFL-а под аеробним условима спорија у поређењу са анаеробним условима (како у одсуству тако и у присуству QC-а). Додатак QC-а у систем под аеробним условима чини деградацију RFL-а још споријом (**Сл.76А**). Јасно је да QC доприноси смањењу деградације RFL-а и под анаеробним и под аеробним условима, али више у другом случају (**Сл.76А**). До истог закључка се долази праћењем промене концентрације QC-а у присуству RFL-а, под анаеробним и аеробним условима (имајући притом у виду промену концентрације QC-а у аеробним условима у одсуству RFL-а – **Сл.76В**). Дакле, RFL свакако делује као Тип II фотосензибилизатор, тако да заштита рибофлавина кверцетином подразумева његову интеракцију са продукованим синглетним кисеоником (Insinska-Rak *et al.*, 2012).

Праћење динамике продукције два главна производа, лумифлавина и лумихрома (**Сл.77**) је углавном у складу са напред приказаним резултатима, премда је конзистентније у случају лумифлавина (**Сл.77А**). Наиме, структура LF-а је за разлику од LC-а сличнија RFL-у (**Сл.114**), иако је у оба случаја изоалоксазински прстен преживео примењено UV-B озрачивање. Анаеробна деградација RFL-а током озрачивања од 8 min (**Сл.76А**, најнижи сигнал) се поклапа са истовременим експоненцијалним обликом раста LF-а у истим (анаеробним) условима (**Сл.77А**, највиши сигнал). Исти облик раста али са ранијим постизањем платоа је уочен када се QC дода у систем (**Сл.77А**, средњи сигнал) што се поклапа са анаеробном деградацијом RFL-а у присуству QC-а (види **Сл.76А**). Коначно, LF у аеробним условима показује најспорији, скоро линеарни облик раста (**Сл.77А**, најнижи сигнал), што се поклапа са аеробном деградацијом RFL-а (**Сл.76А**). Постоји само један изузетак од синхронизованости процеса деградације RFL-а и продукције LF-а. Наиме, када се QC дода у раствор RFL-а под аеробним условима нема ни трага од LF-а (види **Сл.74А**, средњи сигнал).

Динамика продукције LC-а (**Сл.77В**) испољава врло слично понашање са лумифлавином (**Сл.77А**). Иста зависност је уочена у анаеробним условима током истог (8 min-утног озрачивања), док је у аеробним условима (на нешто дужи скали

озрачивања) заштитни ефекат QC-а према деградацији RFL-а (Сл.76А и В) још једном недвосмислено доказан: више LC-а настаје у одсуству него у присуству QC-а (Сл.77В).

И даље се намеће питање: зашто се у једном истом (RFL-QC) систему, у аеробним условима, под истим режимом UV-В озрачивања, један од два главна производа (LC) ствара док је други (LF) одсутан (Сл.74А, средњи и најнижи сигнал)?

Питање је веома битно имајући на уму чињеницу да оба производа имају врло сличне структуре, са очуваним основним изоалаксазинским прстеном током озрачивања (Сл.114). Тешко је објаснити како структурне разлике, попут присуства (LF) или одсуства (LC) унутрашње конјугације, поред различитог спектралног понашања (Сл.74С), могу фаворизовати настанак два различита производа. Ипак, несумњиво је да ово има везе са дејством QC-а, и највероватније присуства синглетног кисеоника, свакако створеног у систему Тип II механизмом деловања RFL-а (Insinska-Rak *et al.*, 2012). График приказан на Сл.76В подржава ову претпоставку.

Из свега наведеног се закључује да континуално UV-В озрачивање раствора рибофлавина у метанолу доводи до његове деградације како у анаеробним тако и у аеробним условима (брже у првом случају) што је у вези са сензибилишућим особинама RFL-а (Тип I сензибилизатор у првом и Тип II у другом случају). Додатак кверцетина у систем смањује деградацију RFL-а у оба случаја; што се у анаеробним условима свакако може приписати АО активношћу QC-а као „хватача” слободних радикала, док је спорија деградација у аеробним условима у вези са настанком синглетног кисеоника.

Динамика деградације – у оба система, у присуству и одсуству QC-а – је врло добро синхронизована са динамиком продукције два главна производа, лумифлавина и лумихрома. Не-појављивање LF-а у (RFL-QC) систему у аеробним условима је нешто што свакако треба даље истраживати.

Ипак, објашњење се можда назире у запажању Нуваере и сарадника (Нуваере *et al.*, 2012) по коме додатак фенолних једињења мења реакциони пут фламина вероватно зато што су интеракције триплет-триплет или триплет-основно стање у фламинима „пресечене” брзим преносом електрона са антиоксиданса уз редукцију ексцитованог триплетног стања фламина (Нуваере *et al.*, 2012).

6.5 Дејство UV зрачења на „бинарну” и „тернарну” смешу

Сложенија смеша од досад разматраних, састављена из билирубина, рибофлавина, кверцетина и фосфолипида („бинарна” смеша) је још „реалнији” модел евалуације *in vivo* заштитног ефекта биолошких „мета” кверцетином.

Комплексност „бинарне” смеше захтева проучавање фотохемијских промена појединачних компонената, „самих” (BRB, RFL, QC, PL90) и у различитим смешама (BRB-RFL; BRB-RFL-QC; BRB-RFL-PL90; QC-PL90), под условима у целокупној смеси (BRB-RFL-QC-PL90).

6.5.1 UV индуковане промене смеше BRB-RFL

На хроматограмима неозрачене и UV-озрачване смеше билирубина и рибофлавина праћене на 445 nm и 372 nm (Сл.80 и 81) пикови елуирани на 5,1 min; 11,0 min; 24,1 min и 41,5 min су, на основу спектралних карактеристика, идентификовани као рибофлавин (RFL) (најполарнији), лумихром (LC), биливердин (BVD) и билирубин (BRB) (најмање поларан), респективно. Фотохемијске промене индуковане UV озрачивањем су праћење преко смањења површине (концентрације) рибофлавина и билирубина (симболизовано стрелицом усмереном наниже) односно пораста површине (концентрације) лумихрома и биливердина (стрелица усмерена навише поред пика на хроматограму). Уочене промене указују на истовремено одвијање бар два процеса – иреверзибилне деградације RFL-а и BRB-а (по кинетици првог реда), и продукције њихових фотодеградационих продуката – LC-а и BVD-а.

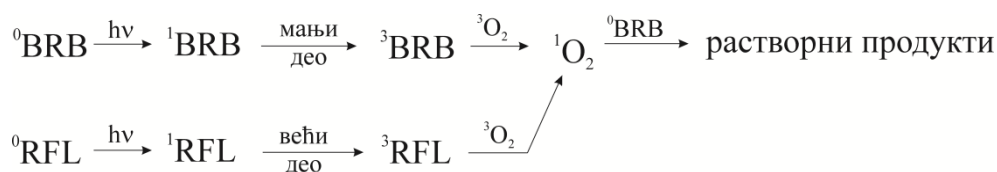
Константе брзине деградације приказане у **Табели 8** (стр. 172) су добијене као нагиб линеарне зависности \ln -ованих вредности површина пикова на одговарајућим хроматограмима од времена континуалног UV озрачивања. Поређењем вредности добијених константи се закључује да се деградација BRB-а у смеси са RFL-ом ($k_{\text{degrad.BRBizBRBFL}}^{\text{UV-A,B}}$ – **Табела 8** на стр. 172) под аеробним условима одвија врло брзо, чак 28 односно 24 пута брже у поређењу са деградацијом у одсуству рибофлавина ($k_{\text{degrad.BRB}}^{\text{UV-A,B}}$ – **Табела 4A** на стр. 121) током континуалног UV-A односно UV-B озрачивања, респективно.

Зато је раствор билирубина у метанолу под условима у смеси BRB-RFL (тј. уз додаток $0,01 \text{ mol dm}^{-3}$ раствора NaOH у количини присутног RFL-а) озрачиван као

својеврстан *blank* – Сл.82. Циљ експеримента је био откривање узрока значајно убрзане деградације билирубина.

Деградација билирубина у одсуству рибофлавина ($k_{\text{degrad.BRB}}^{\text{UV-A,B}}$ – под условима у смеси BRB-RFL) је скоро 22 пута односно 9 пута спорија током континуалног UV-A односно UV-B озрачивања, респективно, у односу на деградацију у присуству рибофлавина ($k_{\text{degrad.BRBizBRBFL}}^{\text{UV-A,B}}$) – Табела 8 на стр. 172. Тиме је елиминисана могућност да је главни узрок деградације BRB-а његова аутооксидација. Дакле, за деградацију је дефинитивно одговорно присуство рибофлавина. Како је деградација билирубина у анаеробним условима скоро 24 односно 16 пута спорија у поређењу са деградацијом у аеробним условима под дејством UV-A односно UV-B светлости, респективно, за исту су одговорне ROS врсте (Табела 8, стр. 172).

Овим експериментом је, додуше на индиректан начин, доказано деловање билирубина као Тип II фотосензибилизатора односно посредовање синглетног кисеоника у његовој иреверзибилној деградацији. Наиме, у делу 6.3.3 је наведено да је у Тип II механизму „фотооксидација билирубина спорија у анаеробним условима” (у овој дисертацији ~24 пута односно 16 пута спорија током UV-A односно UV-B озрачивања, респективно) односно „бржа у присуству сензибилизатора који поспешују настанак синглетног кисеоника” (у овој дисертацији ~22 пута односно 9 пута брже током UV-A односно UV-B озрачивања, респективно). Рибофлавин је свакако један од таквих сензибилизатора (Сл.116). Наиме, на основу EPR спектра дискутованих у делу 6.2 доказано је да рибофлавин између осталог генерише и синглетни кисеоник.



Слика 116 Механизам деградације билирубина у присуству рибофлавина као сензибилизатора ${}^1\text{O}_2$ (адаптирано према Foote and Ching, 1975)

Када се све досад речено узме у обзир: (1) да билирубин сензибилише настанак синглетног кисеоника али да и врло ефикасно реагује са њим, као и (2) да биливердин, иначе главни деградациони производ билирубина у експериментима изведеним у овој дисертацији врло ефикасно „гаси” синглетни кисеоник, али и то да је (3) живот синглетног кисеоника краћи у хидроксилованим него у деутерисаним растварачима,

немогућност детекције присуства синглетног кисеоника на EPR спектрима добијеним помоћу TEMP спинског хватача под експерименталним условима коришћеним у овој дисертацији ни мало не чуди.

У доступној литератури није пронађен ниједан једини рад у коме је на директан начин доказано присуство синглетног кисеоника у метанолном раствору билирубина. Највероватније баш због његових напред наведених особина. Зато се присуство ове ROS врсте у раствору билирубина доказује само индиректним методама – додатком *quencher*-а или пак сензибилизатора настанка синглетног кисеоника, што је искоришћено у овој дисертацији.

Аналогно билирубину, озрачивање рибофлавина под условима у смеши BRB-RFL (тј. уз додатак *blank* раствора BRB-а) је имало за циљ одређивање доприноса аутооксидације и присуства билирубина деградацији рибофлавина.

Деградација рибофлавина под условима у смеши са билирубином (Табела 8, стр. 172) је скоро 3 пута бржа у поређењу са његовом деградацијом у метанолу (Табела 5, стр. 142). Међутим, скоро 6 пута спорија UV-A индукована деградација рибофлавина у смеши BRB-RFL у аеробним условима се може приписати чињеници да је BRB један од најреактивнијих акцептора $^1\text{O}_2$. Деградација рибофлавина у анаеробним је и у смеши BRB-RFL $\sim 1,5$ пута односно $\sim 1,4$ пута бржа у односу на аеробне услове током UV-A односно UV-B озрачивања, респективно (Табела 8, стр. 172).

Уколико се посматрање смеше BRB-RFL сведе на молекуларни ниво долази се до закључка да током фотохемијске оксидације смеше RFL делује као реверзибилни акцептор електрона и подлеже трансформацији у свој леуко облик док истовремено долази до иреверзибилне деградације BRB-а. У анаеробним условима смеша се понаша као електрохемијски равнотежни систем док се у аеробним условима очекивана фотохемијска равнотежа не постиже вероватно због реоксидације леукоформе рибофлавина кисеоником (Knobloch *et al.*, 1982).

6.5.2 UV индуковани *bleaching* QC-а у „бинарној” смеши: *blank* експеримент

Истовремено праћење неозраченог и UV озрачиваних раствора кверцетина у метанолу, под условима у „бинарној” смеши (тј. уз додатак *blank* раствора BRB-а и $0,01 \text{ mol dm}^{-3}$ раствора NaOH у количини присутног BRB-а односно RFL-а у „бинарној”

смеси, респективно) на таласним дужинама од 372 nm и 295 nm омогућава праћене фотохемијских промена индукованих континуалним озрачивањем (Сл.83 и 84).

Иреверзибилна фотодеградација кверцетина је праћена преко смањења површине пика елуираног на 12,9 min на хроматограмима снимљеним на 372 nm (Сл.83). Под условима у „бинарној” и „тернарној” смеси (pH вредност раствора 9,5 и 9,4, респективно) – Табела 8 на стр. 172, кверцетин се деградира ~7 пута односно ~3 пута брже у поређењу са његовом деградацијом при pH 8,1 (услови у смеси RFL-QC-PL90) – Табела 5 на стр. 142, тј. ~2 пута односно 1,5 пута брже у односу на деградацију при pH 9,3 (под условима у смеси BRB-QC-PL90) – Табела 4А на стр. 121, током континуалног UV-A односно UV-B озрачивања, респективно.

Међу производима деградације (Сл.84), праћених на 295 nm доминира QCDP1: 2-(3,4-дихидроксифенил)-3,5,7-трихидрокси-2,3-диметокси-2,3-дихидро-4H-хромен-4-он, структуре предложене у делу 6.1.2.2. Аналогно деградацији кверцетина, и настанак QCDP1 је бржи под условима у „бинарној” и „тернарној” смеси у поређењу са његовим настанком у смеси RFL-QC-PL90 и BRB-QC-PL90.

6.5.3 UV индуковане промене смеше BRB-RFL-QC

Хроматограми снимљени на 445 nm и 372 nm омогућавају праћење UV-индукованих промена у смеси билирубина, рибофлавина и кверцетина (Сл.85А и 86А, респективно). На основу спектралних карактеристика идентификовани су рибофлавин, елуиран на 4,9 min; лумихром на 10,2 min; кверцетин на 13,0 min; биливердин на 22,1 min и билирубин на 41,2 min, поређаних по поларности, почев од најполарнијег (рибофлавина) до најнеполарнијег (билирубина) (Сл.85В и 86В). Иреверзибилна деградација RFL-а, QC-а и BRB-а уз истовремену продукцију LC-а, QCDP1 и BVD-а су праћени преко смањења (RFL, QC, BRB) односно пораста површине пикова (LC, QCDP1, BVD) на одговарајућим хроматограмима. Зависност \ln -ованих вредности површина пикова од времена озрачивања омогућава праћење брзине UV индукованих промена (Сл.85С и 86С). Све деградације у смеси се одвијају по моделу кинетике првог реда.

На основу вредности константи брзине деградације добијених као нагиб линеарне зависности $\ln P = f(t_{\text{ир.}})$ приказаних у Табели 8 (стр. 172) стиче се увид у међусобну интеракцију компонената смеше. Закључује се да присуство кверцетина у смеси BRB-RFL-QC успорава деградацију билирубина и рибофлавина како у

аеробним тако и у анаеробним условима (Табела 8). У односу на систем BRB-RFL аеробна деградација BRB-а у „бинарној” смеси је 1,6 пута односно 1,9 пута, а RFL-а 1,2 пута односно 2,3 пута спорија током UV-A односно UV-B озрачивања, респективно. Кверцетин своје АО деловање према „заштитној” мети (у овом случају смеси ендогених фотосензибилизатора) испољава на рачун сопствене деструкције.

Наиме, *bleaching* QC-а у смеси са билирубином и рибофавином (BRB-RFL-QC) је ~87 пута односно 13 пута бржи у поређењу са његовом деградацијом у одсуству сензибилизатора (под условима смеше BRB-RFL-QC-PL90 тј. уз додатак *blank* раствора BRB-а односно $0,01 \text{ mol dm}^{-3}$ раствора NaOH, у количини BRB-а односно RFL-а присутног у целокупној смеси) под дејством континуалног UV-A односно UV-B озрачивања, респективно. Како је утицај аутооксидације у овом случају узет у обзир, наметнула се потреба за проучавањем промена у одсуству кисеоника, јер је његово присуство очигледно фактор који детерминише брзину деградације. Вредности константи брзине деградација које су скоро 72 пута односно скоро 7 пута мање у анаеробним условима наводе на закључак да су за деградацију кверцетина у овим условима одговорне ROS врсте (између осталих синглетни кисеоник и супероксид, које генерише рибофлавин) – Табела 8 на стр. 172.

6.5.4 UV индуковане промене смеше BRB-RFL-PL90

Циљ озрачивања смеше билирубина, рибофлавина и фосфолипида је праћење неконтролисане продукције пероксида ендогеним фотосензибилизаторима.

Праћење UV индукованих промена на хроматограмима снимљеним на таласним дужинама од 445 nm (Сл.87), 372 nm (Сл.88) и 234 nm (Сл.89 и 90) наводи на закључак да се у смеси поред иреверзибилне деградације рибофлавина и билирубина истовремено одвија продукција лумихрома, биливердина и липидних пероксида.

Поређење константи брзине деградације билирубина и рибофлавина у смеси са фосфолипидима (BRB-RFL-PL90) са константама добијеним у смеси без фосфолипида (BRB-RFL) наводи на закључак да присуство фосфолипида не мења битно брзину деградације BRB-а и RFL-а (Табела 8 на стр. 172). Међутим, поређењем брзине деградације билирубина у смешама BRB-PL90 и BRB-RFL-PL90 се уочава знатна разлика. Наиме, деградација билирубина у смеси са рибофлавином и фосфолипидима је 31 пут односно 9 пута бржа у аеробним а скоро 3 пута односно 1,5 пута бржа у

анаеробним условима под дејством UV-A односно UV-B озрачивања, респективно, што би се могло приписати његовој АО активности.

За потврду претпостављене активности, смеша је елуирана изократски а промене су праћене на хроматограмима снимљеним на 234 nm. Али пре тога је неопходно испратити ефекте појединачних компоненти у смеси са липидима.

Рибофлавин се у досадашњим експериментима у смеси са фосфолипидима показао као одличан сензибилизатор процеса ЛП (Табела 5 на стр. 142). За разлику од њега, билирубин (Табела 4В на стр. 121) не само да није ефикасан сензибилизатор већ се његов ефекат на процес ЛП чак може дискутовати у светлу антиоксидативне активности (део 6.3.6). Зато су у циљу процене ефеката рибофлавина и билирубина на процес продукције пероксида у смеси BRB-RFL-PL90, смеше рибофлавина и фосфолипида с једне, и билирубина и фосфолипида, с друге стране, озрачиване као својеврстан *blank* под условима у „бинарној” смеси (уз додатак *blank* раствора BRB-а смеси RFL-PL90 односно 0,01 mol dm⁻³ раствора NaOH смеси BRB-PL90).

На хроматограмима смеше RFL-PL90 (Сл.89) снимљеним на 234 nm се уочава појава конјугованих диенских структура елуираних на 5,5 min (Per1), 6,5 min (Per2) и 4,5 min (Per3) (Табела 9). На Слици 89 су приказани само Per1 и Per2 јер је због мале површине пика Per3 било немогуће приказати промену његових спектра.

Поређењем вредности константи брзине продукције пероксида рибофлавином под условима у „бинарној” смеси (Табела 9 на стр. 173) са вредностима добијеним у смеси RFL-PL90 у метанолу датим у Табели 6 (стр. 142) се не уочава нека битна разлика што значи да рибофлавин задржава своје сензибилизаторске особине и у „бинарној” смеси. Анализа хроматограма UV озрачиване смеше билирубина и фосфолипида наводи на закључак да билирубин и у „бинарној” смеси задржава деловање наслеђено у смеси BRB-RFL у метанолу (Табела 4В на стр. 121). Наиме, током континуалог UV-B озрачивања смеше BRB-PL90 (под условима у „бинарној” смеси) је уочена супресија процеса ЛП праћена преко смањења површине јединог детектованог пероксида – Per1 (Табела 9 на стр. 173) – хроматограми нису приказани.

Озрачивањем смеше рибофлавина и билирубина са фосфолипидима и праћењем UV индукованих промена на хроматограмима снимљеним на таласној дужини од 234 nm (Сл.90), стиче се утисак о њиховој међусобној интеракцији. Продукција пероксида (Per1) у смеси BRB-RFL-PL90 је скоро 2 пута спорија у поређењу са продукцијом у смеси RFL-PL90. Са друге стране, поређењем са смешом BRB-PL90 вредност константе брзине мења знак из (-) у (+) (Табела 9 на стр. 173) услед већ

дискутованог ефекта рибофлавина на билирубин. Узорци су озрачивани само под аеробним условима јер за процес ЛП анаеробни услови нису од значаја.

6.5.5 UV индуковане промене „бинарне” смеше

Циљ увођења кверцетина у смешу билирубина, рибофлавина и фосфолипида је контрола процеса ЛП („бинарна” смеша). Праћење UV индукованих промена смеше на хроматограмима снимљеним на 445 nm (Сл.91), 372 nm (Сл.92) и 234 nm указује да се у смеси истовремено одигравају два главна процеса – иреверзибилна деградација рибофлавина, кверцетина и билирубина (елуираних на ретенционим временима од 3,8 min; 13,4 min и 41,8 min, респективно) и продукција липидних пероксида (Per1, $t_{ret.} = 5,5$ min), лумихрома и биливердина (елуираних на ретенционим временима од 10,2 min и 16,6 min, респективно).

На основу вредности константи брзине деградације у смеси BRB-RFL-PL90 и „бинарној” смеси (BRB-RFL-QC-P90) закључује се да увођење кверцетина успорава деградацију фотосензибилизатора како у аеробним тако и у анаеробним условима (Табела 8 на стр. 172). Ефекат је израженији у случају билирубина и може се приписати њиховој међусобној интеракцији. Наиме, деградација билирубина у „бинарној” смеси је 1,6 пута спорија у аеробним условима ($k_{degad.BRBizBRBFLQCPL90}^{UV-A,B} / k_{degad.BRBizBRBFLPL90}^{UV-A,B}$ – Табела 8 на стр. 172) тј. 2 пута односно 3 пута спорија у анаеробним условима током UV-A односно UV-B озрачивања, респективно.

Билирубин се и у „бинарној” смеси деградира брже (у односу на деградацију у смеси BRB-RFL-QC) у аеробним условима, из већ дискутованих разлога и то: 36 пута односно 17 пута брже током континуалног UV-A односно UV-B озрачивања, респективно (Табела 8 на стр. 172). Већи однос константи брзина деградације у аеробним и анаеробним условима у „бинарној” смеси у поређењу са смешом BRB-RFL-QC (36 према 31 и 17 према 9) би се могао приписати АО деловању билирубина.

Деградација кверцетина у „бинарној” смеси је, услед присуства ROS врста, скоро 41 пут односно ~22 пута бржа у аеробним него у анаеробним условима. На АО активност кверцетина у „бинарној” смеси указује однос вредности константи његове деградације у „бинарној” смеси и смеси BRB-RFL-QC: 1,5 пута односно 3 пута брже у „бинарној” смеси током UV-A односно UV-B озрачивања, респективно.

На хроматограмима изократски елуиране „бинарне” смеше снимљеним на 234 nm уочава се појава Per1 ($t_{\text{ret.}} = 5,5 \text{ min}$) и Per2 ($t_{\text{ret.}} = 6,5 \text{ min}$) с тим што је кинетику продукције могуће пратити само за Per1 (хроматограми нису приказани). Његов UV-A озрачивањем индуован настанак је 2,2 пута спорији у поређењу са продукцијом у смеши RFL-PL90 (Табела 9 на стр. 173).

6.5.6 Антиоксидативна активност QC-а у „бинарној” смеши

У циљу евалуације АО активности кверцетина у „бинарној” смеши, смеша кверцетина и фосфолипида је озрачивана у аеробним условима (уз додатак *blank* раствора BRB-а и $0,01 \text{ mol dm}^{-3}$ раствора NaOH у количини BRB-а и RFL-а присутних у „бинарној” смеши, респективно) – Сл.93. Поређењем константи брзине деградације кверцетина у смеши QC-PL90 (под условима у „бинарној” смеши) и у „бинарној” смеши ($k_{\text{degrad.QCizBRBRFLQCPL90}}^{\text{UV-A,B}} / k_{\text{degrad.QCizQCPL90}}^{\text{UV-A,B}}$ – Табела 8 на стр. 172) закључује се да се кверцетин деградира чак 91 пута односно 6 пута спорије него у „бинарној” смеши, током UV-A односно UV-B озрачивања, респективно. Уколико се међутим упореде константе деградације кверцетина „самог” и у смеши са фосфолипидима (под условима „бинарне” смеше: $k_{\text{degrad.QCizQCPL90}}^{\text{UV-A,B}} / k_{\text{degrad.QC}}^{\text{UV-A,B}}$ – Табела 8 на стр. 172) закључује се да долази до 1,5 пута односно 3 пута брже деградације у смеши са фосфолипидима (у присуству перокси радикала), током UV-A односно UV-B озрачивања, респективно.

Све ово пружа могућност грубе процене АО активности кверцетина у једној овакво сложеној смеши. Наиме, ако је судити по константама брзине деградације кверцетина „самог” (QC) (мера превентивне активности), у смеши са фосфолипидима (QC-PL90) и у целокупној „бинарној” смеши (QC-BRB-RFL-PL90) (мера *chain breaking* активности) – Табела 8 на стр. 172, могло би се рећи да је допринос превентивне активности свега 0,8% (у случају UV-A) односно 5,3%⁷² (у случају UV-B озрачивања). Преосталих 99,2% (у случају UV-A) односно 94,7% (у случају UV-B озрачивања) би се могло приписати *chain breaking* активности од чега око 1,2% (у случају UV-A) односно 16,3%⁷³ (у случају UV-B озрачивања) припада активности према перокси радикалима а 98,2% (у случају UV-A) односно 78,4% (у случају UV-B озрачивања) интеракцији са

⁷² Удео константе брзине деградације кверцетина када је „сам” у константи брзине деградације када је члан „бинарне” смеше (Табела 8 на стр. 173).

⁷³ Удео константе брзине деградације кверцетина у смеши QC-PL90 у константи брзине деградације када је члан „бинарне” смеше (Табела 8 на стр. 173).

супероксидом, синглетним кисеоником и ексцитованим стањима сензибилизатора (пре свега рибофлавина).

6.5.7 UV индуковане промене „тернарне” смеше

Циљ увођења бензофенона у „бинарну” смешу (сада „тернарна” смеша: BZP-BRB-RFL-QC-PL90) је био појачана продукција радикала, пре свега липидних радикала. Праћење UV индукованих промена „тернарне” смеше на хроматограмима снимљеним на таласним дужинама од 445 nm (Сл.94), 250 nm (Сл.95) и 234 nm (Сл.96) указује на истовремено одвијање процеса деградације рибофлавина, кверцетина, бензофенона и билирубина (елуираних на 4,0 min; 13,4 min; 18,4 min и 42,0 min, респективно) и продукцију пероксида (Per1-3), QCDP1, лумихрома и биливердина (елуираних на 5,5 min; 6,5 min; 4,5 min; 5,9 min; 10,4 min и 16,8 min, респективно).

Хроматограми на **Слици 94** су приказани до 45. min анализе јер неоксидовани липиди (елуирани на 44,6 min; 46,1 min и 47,8 min на хроматограмима снимљеним на 210 nm) не апсорбују у овој области.

Поређењем константи брзине деградације датих у **Табели 8** закључује се да присуство бензофенона („тернарна” смеша) не мења битно ситуацију у односу на „бинарну” смешу, бар што се деградације билирубина и рибофлавина тиче.

Међутим, брзина деградације кверцетина је 1,3 пута (око 23%) већа (у „тернарној” смеси) током континуалног UV-B озрачивања што и не чуди ако се има у виду појачана продукција радикала у присуству BZP-а (више пута је истицано да кверцетин испољава бољу АО активност током UV-B озрачивања).

Брзина деградације свих компонената „тернарног” система је мања у анаеробним него у аеробним условима. Билирубин се деградира скоро 49 пута односно скоро 10 пута спорије; рибофлавин 2 пута односно 4 пута спорије; кверцетин скоро 101 пута односно скоро 56 пута спорије, током UV-A односно UV-B озрачивања, респективно (**Табела 8** на стр. 172).

Већи однос двеју константи деградације (у аеробним и анаеробним условима) кверцетина у „тернарној” смеси у односу на „бинарну” смешу – скоро 101 према 73 односно 56 према 23 током континуалног UV-A односно UV-B озрачивања се може приписати „вишку” липидних радикала и супероксида које са собом доноси озрачивање BZP-а (присуство супероксида је доказано EPR спектроскопијом, дискутованој у делу **6.2**)

Поређењем константи брзине деградације бензофенона у метанолу (**Табела 2** на стр. 104) и у „тернарној” смеши (**Табела 8** на стр. 172), се увиђа 134 пута односно 85 пута спорија деградација у „тернарној” смеши, током UV-A односно UV-B озрачивања, респективно, што не чуди ако се има на уму комплексност читаве смеше и велики број једињења која апсорбују у коришћеним областима озрачивања.

На самом крају разматрања „тернарне” смеше хроматограми снимљени на таласној дужини од 234 nm откривају присуство пероксида (Per1-3) елуираних на ретенционим временима од 5,5 min; 6,5 min и 4,5 min (**Сл.96**). На основу вредности константи брзине продукције пероксида у „тернарној” и смеши у одсуству QC-a (BZP-BRB-RFL-PL90) може се констатовати да је продукција нешто спорија у присуству кверцетина (**Табела 9** на стр. 173). Ипак, његова АО активност је итекако смањена у односу на активност у смеши QC-PL90 (**Табела 9** на стр. 173) из већ дискутованих разлога.

7 ЗАКЉУЧЦИ

„Ово још није крај. Није чак ни почетак краја. Али је можда крај почетка.”
Winston Churchill

Основна идеја за рад на овој докторској дисертацији је заправо везана за шему приказану на **Слици 3** (стр. 7). Наиме, очигледна нелогичност са енергетске тачке гледишта (зрачење веће енергије (UV-B) је апсорбовано у површинском слоју коже, или у најближем подслоју, *epidermis*-у док UV-A зрачење продире до дубљег подслоја, *dermis*-а) се заснива на присуству ефикасних UV-апсорбера у епидермалном подслоју. Међутим подаци о томе шта се са њима дешава након апсорпције UV-фотона, посебно у *in vivo* условима, је непознаница.

Напросто, велики број варијабли које потенцијално могу да утичу на посматрани процес, а које проистичу из огромне структурне и организационе сложености ткива коже, објективно могу да омету посматрање, а нарочито тумачење ових процеса. Структурна разноликост се огледа у чињеници да је у *in vivo* условима најчешће немогуће избећи симултано побуђивање више апсорбера, нарочито сличних структура, и њихову могућу интеракцију у побуђеним стањима. Такође је немогуће игнорисати утицај околног липо-протеинског матрикса, и то како у структурном смислу (нпр. триптофан, а делом и тирозин, често присутни аминокиселински „блокови” протеина су и сами UV-апсорбери), тако и у организационим смислу („паковање” у мембранама и ткивима, ефекат „кавеза”).

Зато је, ради тачних и поузданих информација рационалније симплификовати проблем, што је у овом раду постигнуто тако што су поменути процеси (у овом случају фотосензибилизација, и са њом повезани ефекти) посматрани у најједноставнијем молекуларном окружењу, тј. раствору (чиме се „фиксира” утицај организационог фактора). Такође, поред присуства фотосензибилизатора, корисно је, ради бољег увида у његово дејство, имати и посматрану „мету”, као и фактор корекције, или још тачније, контроле.

У конкретном случају, изабрана су три фотосензибилизатора, бензофенон, билирубин и рибофлавин, као посматрана „заштитна мета” коришћена је смеша липида (и засићених и незасићених), а као „контролни фактор” (оксидације липида) коришћен је кверцетин, представник флавонола који се овде јавља у улози антиоксиданса.

Избор ових једињења није случајан, јер су скоро сва присутна у *stratum*-у коже. Најпре је намерно изабрана смеша липида, и то углавном фосфолипида јер је и хемијски састав липидне компоненте (липо-протеинског) матрикса ћелија коже (као и већине других типова ћелија) мешовит (са засићеним и незасићеним липидима), али са доминантном фосфолипидном компонентом. Билирубин (BRB) и рибофлавин (RFL) су врло често присутни UV-апсорбери у епидермалном подслоју; при томе су оба проносни фотосензибилизатори, и то кад је у питању BRB Типа II, док за RFL постоје докази да, зависно од околности, функционише као фотосензибилизатор оба типа (Тип I и Тип II). Једино је бензофенон (BZP) од три изабрана фотосензибилизатора – и свих изабраних једињења у овом раду – одсутан у самом *stratum*-у коже (или бар природно није присутан) мада се, као врло ефикасан пре свега UV-B (а делом и UV-A) апсорбер некада користио као „филтер” док се данас користе његови бројни деривати у разним козметичким *sunscreen* препаратима који се наносе на површину коже. Међутим, он се овде користи више као нека врста еталона понашања, јер је његова интеракција са незасићеним масним киселинама (као кључним липоидалним компонентама) како у раствору, тако и у уређеним системима добро испитана – у свим случајевима BZP реагује као фотосензибилизатор Типа I који иницира ланчану реакцију липидне пероксидације.

Коначно, као „контролни елемент” фотосензитивно-иницираног ланчаног процеса липидне пероксидације, коришћен је кверцетин у улози антиоксиданса (као што антиоксиданси једним делом контролишу процес липидне пероксидације *in vivo*, доприносећи стварању баланса у организму). Додуше, кверцетин може имати и друге биоактивне функције *in vivo* (укључујући чак и фотосензибилизаторску) међутим антиоксидативна активност углавном доминира. Наравно и кверцетин је присутан у *stratum*-у коже у који доспева екстерним путем, уношењем хране, с обзиром на то да је широко распрострањен у природи, углавном у биљном свету.

Ефекат UV светлости на смешу BZP-QC-PL90

- ❖ Бензофенон је, као и остали арил кетони, фотостабилан и не фрагментише током озрачивања већ даје фотоадиционе производе. Брзина његове деградације зависи од врсте упадних фотона (тј. упадне енергије) – већа је у случају озрачивања UV-B светлосту и одвија се по кинетици првог реда.

- ❖ Под дејством UV(-A и -B) светлости BZP се ексцитује у прво синглетно а онда врло ефикасним интерсистемским прелазом ($\Phi_{ISC} = 1$) даје триплетно стање. Триплетни бензофенон је не само ефикасан већ и врло селективан сензибилизатор пре свега према двоструко алилним водониковим атомима присутним у незасићеним масним киселинама као интегралним састојцима „заштитне мете” – фосфолипида коришћених у овом раду, чиме иницира продукцију конјугованих диена и триена (липидних пероксида).
- ❖ Фотодеградацијом кверцетина „самог” (QC) и у смеши са фосфолипидима (QC-PL90) настаје 2-(3,4-дихидроксифенил)-3,5,7-трихидрокси-2,3-диметокси-2,3-дихидро-4*H*-хромен-4-он (QCDP1). Антиоксидативна активност кверцетина је неоспорна (мања је под дејством UV-A светлости).
- ❖ Бензофенон као типичан Тип I сензибилизатор генерише супероксид (радикал ањон).
- ❖ Упркос додатку QC-а смеши BZP-PL90 као „контролора” процеса липидне пероксидације, пероксиди се несметано стварају као последица међусобне интеракције BZP-а и QC-а (смањење сензибилизаторских особина BZP-а с једне и антиоксидативних активности QC-а са друге стране).
- ❖ Смањење сензибилизаторских особина BZP-а је највероватније последица „гашења” ^3BZP -а кверцетином.
- ❖ Присуство BZP-а мења механизам деградације QC-а уз продукцију 3,5-дихидрокси-2-[метокси(оксо)ацетил]фенил 3,4-дихидроксибензоат (QCDP2) и метил-оксо(2,4,6-трихидроксифенил)ацетата (QCDP3) уз последично смањење његове антиоксидативне активности.
- ❖ Озрачивањем смеше BZP-QC-PL90 ултраљубичастом светлошћу синхронизовано, по моделу кинетике првог реда, се одвијају бар три процеса: иреверзибилна деградација (*bleaching*) QC-а и BZP-а с једне и продукција липидних пероксида са друге стране.

Ефекат UV светлости на смешу BRB-QC-PL90

- ❖ Енергија упадних фотона одређује брзину деградације BRB-а и последично брзину продукције BVD-а како у аеробним, тако и у анаеробним условима – деградација се одвија по кинетици првог реда и бржа је током UV-B него током UV-A озрачивања.

- ❖ Билирубин као типичан Тип II сензибилизатор (слабији у односу на све остале Тип II сензибилизаторе) преноси енергију са свог ексцитованог триплетног стања на кисеоник у основном (триплетном) стању генеришући синглетни кисеоник. Нападом врло реактивног и електрофилног $^1\text{O}_2$ на BRB по Тип II механизму настају моно- и дипироли. У овом раду су од дипирола идентификовани 3-{5-[(E)-(3-етенил-4-метил-5-оксо-1,5-дихидро-2H-пирол-2-илиден)метил]-5-метокси-4-метил-2-оксо-2,5-дихидро-1H-пирол-3-ил} пропионска киселина и 4-етил-5-{[4-етил-3-метил-2-(оксометилиден)-2H-пирол-5-ил]метил}-3-метилен-3H-пирол-2-карбоксилна киселина.
- ❖ Продукција најдоминантнијег производа UV индуковане фотодеградације BRB-a – BVD-a се одвија по радикалском (Тип I) механизму.
- ❖ Биливердин ефикасно „гаси” $^1\text{O}_2$ чиме онемогућава његову детекцију у озрачиваним растворима BRB-a EPR спектроскопијом.
- ❖ Иако слаб сензибилизатор, BRB у присуству фосфолипида, под условима коришћеним у овом раду, испољава антиоксидативне особине, највероватније због продукције BVD-a, који, као врло ефикасан антиоксиданс (ефикаснији од билирубина), онемогућава продукцију липидних пероксида.
- ❖ Спорија деградација BRB-a и QC-a у анаеробним условима се приписује одсуству синглетног кисеоника (BRB је истовремено сензибилизатор и супстрат а QC физички *quencher* $^1\text{O}_2$).
- ❖ Енергија упадних фотона одређује брзину деградације QC-a, самим тим и брзину продукције QCDP1: 2-(3,4-дихидроксифенил)-3,5,7-трихидрокси-2,3-диметокси-2,3-дихидро-4H-хромен-4-он – бржа је током озрачивања UV-B светлошћу.
- ❖ UV индуковану фотодеградацију QC-a у метанолу, под условима у смеси BRB-QC-PL90 (при рН вредности раствора од 9,3), у поређењу са његовом деградацијом при рН 7,1 (услови у смеси BZP-QC-PL90) поред аутооксидације убрзава и продукција 2-(3,4-дихидроксифенил)-3,5,7-трихидрокси-2,3-диметокси-2,3-дихидро-4H-хромен-4-он.
- ❖ Озрачивањем смеше BRB-QC-PL90 синхронизовано, по кинетици првог реда, се одвија деградација BRB-a и QC-a с једне и продукција BVD-a и QCDP1 с друге стране.

Ефекат UV светлости на смешу RFL-QC-PL90

- ❖ Рибофлавин се апсорпцијом UV светлости ексцитује у прво синглетно а ефикасним интерсистемским прелазом ($\Phi_{ISC} = 0,7$) генерише триплетно стање. Оба ексцитована стања су активна.
- ❖ Фотодеградација RFL-а под анаеробним условима, која се одвија преко триплетног стања RFL-а, је бржа у односу на деградацију под аеробним условима, која се углавном одвија преко синглета.
- ❖ Фотодеградациони производи RFL-а су типа алоксазина и изоалоксазина. У овом раду су на основу UHPLC-ESI-MS спектра идентификовани лумихром (LC) – 7,8-диметилалоксазин (производ типа алоксазина) и производи типа изоалоксазина лумифлавин (LF) – 7,8,10-триметилизоалоксазин као главни, формил-метил-флавин (FMF) – 7,8-диметил-10-(формилметил)изоалоксазин и рибофлавинал – 5-(7,8-диметил-2,4-диоксобензо[g]птеридин-10-ил)-2,3,4-трихидроксипентанал као минорни.
- ❖ Кверцетин „гаси” ексцитована стања RFL-а чиме смањује брзину његове деградације како у аеробним тако и у анаеробним условима.
- ❖ Спречавање настанка LF-а кверцетином у аеробним условима је највероватније последица преноса електрона и последичне редукције ексцитованих стања RFL-а кверцетином.
- ❖ Присуство супероксида и синглетног кисеоника на EPR спектрима UV-озрачиваних раствора RFL-а је доказ његовог деловања мешаним Тип I и Тип II механизмом, респективно.
- ❖ UV индуковану фотодеградацију QC-а у метанолу, под условима у смеси RFL-QC-PL90 (при рН вредности раствора од 8,1), у поређењу са његовом деградацијом при рН 7,1 (услови у смеси BZP-QC-PL90) поред аутооксидације убрзава и фотооксидација 2-(3,4-дихидроксифенил)-3,5,7-трихидрокси-2,3-диметокси-2,3-дихидро-4H-хромен-4-он.
- ❖ За енормну деградацију QC-а у смеси RFL-QC је одговорно како „гашење” ексцитованих стања RFL-а тако и присуство $O_2^{\cdot -}$ и 1O_2 . Са друге стране, спорија деградација RFL-а (у смеси RFL-QC) у анаеробним условима се приписује физичком „гашењу” 3RFL кверцетином.
- ❖ Иако због услова коришћених у раду (пре свега концентрације) долази до „само-гашења” RFL-а, на основу константи брзине продукције пероксида, RFL је бољи

сензибилизатор од бензофенона. Разлог највероватније лежи у чињеници да су његови главни деградациони производи идентификовани у овом раду (лумихром и лумифлавин) такође врло ефикасни фотосензибилизатори.

- ❖ Контрола процеса липидне пероксидације кверцетином је онемогућена међусобном интеракцијом RFL-а и QC-а и последичног настанка 3,5-дихидрокси-2-[метокси(оксо)ацетил]фенил 3,4-дихидроксибензоата и метил-оксо(2,4,6-трихидроксифенил)ацетата.
- ❖ Током континуалног озрачивања смеше RFL-QC-PL90 ултраљубичастом светлошћу се, уз иреверзибилну деградацију (*bleaching*) RFL-а и QC-а и последичног настанка њихових деградационих продуката синхронизовано одвија и продукција липидних пероксида.

Ефекат UV светлости на „бинарну” и „тернарну” смешу

- ❖ Смеша састављена из билирубина, рибофлавина, кверцетина и фосфолипида („бинарна” смеша) је можда „најреалнији” модел евалуације *in vivo* заштитног ефекта биолошких „мета” кверцетином.
- ❖ Значајним повећањем фотодеградације BRB-а у присуству RFL-а под аеробним условима с једне и значајним смањењем његове фотодеградације у анаеробним условима с друге стране је на индиректан начин потврђено да BRB припада сензибилизаторима Типа II.
- ❖ Поред аутооксидације, за деградацију кверцетина у метанолу, под условима у „бинарној” и „тернарној” смеши је одговорна и фотооксидација. Међу производима доминира QCDP1: 2-(3,4-дихидроксифенил)-3,5,7-трихидрокси-2,3-диметокси-2,3-дихидро-4*H*-хромен-4-он.
- ❖ Присуство QC-а у смеши BRB-RFL успорава деградацију BRB-а и RFL-а како у аеробним тако и у анаеробним условима. Своје АО деловање према „заштитној” мети (у овом случају смеши ендогених фотосензибилизатора) кверцетин испољава на рачун сопствене деградације. Знатно мање вредности константи брзине деградација кверцетина добијене озрачивањем смеши QC-BRB-RFL у анаеробним условима указују да су за деградацију QC-а одговорне ROS врсте (између осталих синглетни кисеоник и супероксид које генерише RFL).
- ❖ У присуству фосфолипида (BRB-RFL-PL90) и један и други фотосензибилизатор задржавају особине уочене у појединачним смешама са

фосфолипидима (BRB-PL90, RFL-PL90). Рибофлавин је ефикасан сензибилизатор док билирубин испољава претежно антиоксидативно деловање.

- ❖ Присуство кверцетина у „бинарној” смеши (BRB-RFL-QC-PL90) успорава деградацију BRB-а и RFL-а како под аеробним тако и под анаеробним условима.
- ❖ За деградацију кверцетина у „бинарној” смеши су пре свега одговорне присутне ROS врсте (супероксид, синглетни кисеоник, липидни пероксиди) односно *chain-breaking* активност кверцетина а у знатно мањем степену и апсорпција UV светлости у виду његове превентивне активности.
- ❖ Додатак бензофенона у „бинарну” смешу не убрзава процес липидне пероксидације док га присуство кверцетина незнатно смањује.
- ❖ Већа брзина деградације кверцетина у „тернарној” смеши се приписује појачаној *chain-breaking* активности услед појачане продукције радикала (супероксида и липидних радикала) у присуству BZP-а.
- ❖ Спорија деградација BZP-а у „тернарној” смеши у односу на деградацију у смеши BZP-QC-PL90 је последица присуства бројних једињења која апсорбују у коришћеним областима озрачивања.
- ❖ Озрачивањем „тернарне” смеше (као најсложеније проучаване смеше у овом раду) поред иреверзибилне деградације BZP-а, BRB-а, RFL-а и QC-а долази до синхронизоване продукције њихових деградационих продуката и липидних пероксида.

Антиоксидативна активност кверцетина током UV-A озрачивања

Максимуми апсорбанције кверцетина се налазе у UV-A и UV-C а минимум у UV-B области, што за последицу има слабију заштиту „мете” директном апсорпцијом UV-B али и максималну заштиту у UV-A области. Међутим, услед губитка конјугације у молекулу, сви фотодеградациони производи кверцетина имају апсорпциони максимум у UV-B области што наводи на закључак да је у биљкама у којима долази до појачане синтезе QC-а током UV озрачивања заштита од UV-A зрачења само делимична а да се биљке заправо „ослањају” на фотодеградационе производе QC-а који ће их штитити од UV-B зрачења.

ЗАВРШНИ ЗАКЉУЧАК

„Тајна успеха у животу није да човек ради оно што воли, већ да воли оно што ради.”
Winston Churchill

Људска кожа садржи читав арсенал ендогених сензибилизатора, који се под дејством сунчеве светлости (пре свега све присутнијег UV зрачења) могу побудити и иницирати бројне биолошке одговоре, између осталог дегенеративни процес липидне пероксидације. Сви сензибилизатори проучавани у овом раду су способни за тако нешто, а редослед њихове активности опада од рибофлавина преко бензофенона до билирубина.

Експерименти изведени у овој дисертацији имају свој биомедицински значај. Почев од UV индиковане фотодеградација рибофлавина, на којој почива CXL (*Corneal Collagen Crosslinking*) преко фотооксидације билирубина до које дефинитивно долази *in vivo* при чему су образовани дипироли излучиви преко бубрега, све до евалуације антиоксидативног деловања кверцетина. На основу добијених резултата се закључује да кверцетин испољава антиоксидативну активност на рачун сопствене деградације и то синергизмом између превентивног (апсорпцијом зрачења) и *chain-breaking* („хватањем” слободно-радикалских врста) деловања. Како фотодеградациони производи кверцетина испољавају минималну токсичност, уколико би до њихове појаве на/у кожи дошло, највероватније не би било штетних ефеката по здравље људи.

Ипак, најважнији резултати се тичу одговора „бинарне” и „тернарне” смеше, бар са тачке гледишта фототерапије, као ефикасног начина „лечења” новорођенчади од неонаталне хипербилирубинемije. Наиме, одигравање идентичне фотохемијске реакције (пре свега између билирубина и рибофлавина) *in vivo* заправо нуди начин за побољшање ефикасности фототерапије систематском администрацијом одговарајућих агенаса – у овом случају рибофлавина, који је између осталог саставни део млека.

Међутим, за неку дубљу дискусију сензибилизаторских способности проучаваних сензибилизатора и фотопротективног деловања кверцетина у *in vivo* условима је неопходно најпре проучити њихов одговор у моделима биолошких мембрана, пре свега почев од мицела и липозома.

ЛІТЕРАТУРА

- Abu-Bakar A., Arthur D.M., Wikman A.S., Rahnasto M., Juvonen R.O., Vepsäläinen J., Raunio H., Ng J.C. and Lang M.A. (2012): Metabolism of bilirubin by human cytochrome P450 2A6, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 261(1), 50-58.
- Acworth I.N. (2003): *The handbook of redox biochemistry*, ESA Analytical, Ltd., Chelmsford, MA, USA.
- Adibhatla R.M. and Hatcher J.F. (2010): Lipid oxidation and peroxidation in CNS health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities, *Antioxidants & Redox Signaling*, 12(1), 125-169.
- Afaq F. (2011): Natural agents: cellular and molecular mechanisms of photoprotection, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 508(2), 144-151.
- Agati G., Brunetti C., Di Ferdinando M., Ferrini F., Pollastri S. and Tattini M. (2013): Functional roles of flavonoids in photoprotection: New evidence, lessons from the past, *Plant Physiology and Biochemistry*, 72, 35-45.
- Agati G. and Fusi F. (1990): New trends in photobiology (invited review). Recent advances in bilirubin photophysics, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 7(1), 1-14.
- Aguilar M.-I. (2004): *Reversed-phase high-performance liquid chromatography, from: HPLC of peptides and proteins: methods and protocols*, Humana Press Inc., Totowa, NJ, USA.
- Ahmad I., Ahmed S., Sheraz M.A., Vaid F.H.M and Ansari I.A. (2010): Effect of divalent anions on photodegradation kinetics and pathways of riboflavin in aqueous solution, *International Journal of Pharmaceutics*, 390(2), 174-182.
- Ahmad I., Fasihullah Q. and Vaid F.H.M. (2004): A study of simultaneous photolysis and photoaddition reactions of riboflavin in aqueous solution, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 75(1-2), 13-20.
- Ahmad I., Fasihullah Q. and Vaid F.H.M. (2005): Effect of phosphate buffer on photodegradation reactions of riboflavin in aqueous solution, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 78(3), 229-234.
- Ahmad I., Fasihullah Q. and Vaid F.H.M. (2006): Effect of light intensity and wavelengths on photodegradation reactions of riboflavin in aqueous solution, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 82(1), 21-27.
- Ahmed S. (2009): Effect of complexing agents on photodegradation of riboflavin in aqueous solution, PhD thesis, Baqai Medical University, Karachi, Pakistan.
- Ahuja S. (2003): *Chromatography and separation science*, Academic Press, San Diego, California, USA.
- Akhtar M.J., Khan M.A. and Ahmad I. (2000): Effect of riboflavin on the photolysis of folic acid in aqueous solution, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 23(6), 1039-1044.
- Akoh C.C. and Min D.B. (2002): *Food lipids – Chemistry, nutrition, and biotechnology*, 2nd edition, revised and expanded, Marcel Dekker Inc., New York, USA.
- AL-Azawy Y.Q.S. (2014): Preparation of benzopinacole using photochemical irradiation reductions and thermodynamic computational study, *Iraqi National Journal of Chemistry*, 53, 56-65.
- Albini A. and Germani L. (2010): *Photochemical methods from: Handbook of synthetic photochemistry*, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany.
- Andrasik S.J. (2007): Singlet oxygen generation using new fluorene-based photosensitizers under one- and two-photon excitation, PhD thesis, University of Central Florida, Orlando, Florida.

- Anonymous (2008): Riboflavin. Monograph, *Alternative Medicine Review*, 13(4), 334-340.
- Apak R., Güçlü K., Demirata B., Özyürek M., Çelik S.E., Bektaşoğlu B., Işıl Berker K. and Özyurt D. (2007): Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay, *Molecules*, 12(7), 1496-1547.
- Apel K. and Hirt H. (2004): Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction, *Annual Review of Plant Biology*, 55, 373-399.
- Ardrey R.E. (2003): *Liquid chromatography – mass spectrometry: an introduction*, John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, England.
- Arthur D.M. (2010): Bilirubin metabolism during arsenic toxicity of the liver: involvement of murine cytochrome P450 2a5 and its human orthologue CYP2A6, PhD thesis, The University of Queensland, Australia.
- Arumalla V.K., Gopal N. and Rao B.N. (2012): Role of serum bilirubin in coronary artery disease, *International Journal of Medical and Health Sciences*, 1(2), 56-62.
- Аст Т. (2007): Масена спектрометрија од MS до MS^n : зашто и како?, *Хемијски преглед*, 48(4), 86-99.
- Atkins P., de Paula J. and Friedman R. (2009): *Quanta, matter, and change: a molecular approach to physical chemistry*, W. H. Freeman and Company, New York, USA.
- Awad H.M., Boersma M.G., Vervoort J. and Rietjens I.M.C.M. (2000): Peroxidase-catalyzed formation of quercetin quinone methide-glutathione adducts, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 378(2), 224-233.
- Ayala A., Muñoz M.F. and Argüelles S. (2014): Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014, Article ID 360438.
- Bachelor M.A. and Bowden G.T. (2004): UVA-mediated activation of signaling pathways involved in skin tumor promotion and progression, *Seminars in Cancer Biology*, 14(2), 131-138.
- Balasubramanian D. (2000): Ultraviolet radiation and cataract, *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*, 16(3), 285-97.
- Bancirova M. (2015): Changes of the quercetin absorption spectra in dependence on solvent, *Chemistry Journal*, 1(2), 31-34.
- Bačić G. and Mojović M. (2005): EPR spin trapping of oxygen radicals in plants. A methodological overview, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1048, 230-243.
- Bačić G., Spasojević I., Šećerov B. and Mojović M. (2008): Spin-trapping of oxygen free radicals in chemical and biological systems: New traps, radicals and possibilities, *Spectrochimica Acta Part A*, 69, 1354-1366.
- Baynes J.W. and Dominiczak M.H. (2014): *Medical Biochemistry*, 4th edition, Saunders Elsevier, Edinburgh, Scotland.
- Becker E.M., Cardoso D.R. and Skibsted L.H. (2005): Deactivation of riboflavin triplet-excited state by phenolic antioxidants: mechanism behind protective effects in photooxidation of milk-based beverages, *European Food Research Technology*, 221(3), 382-386.
- Beckett A., McClure B. and Zimmerman K. (2004): Benzophenone and padimate-O protect *Saccharomyces cerevisiae* from UV radiation and cause little harm from UV-induced reactive chemical species, *Journal of Experimental Microbiology and Immunology*, 5, 37-43.
- Benzie I.F.F. (2003), Evolution of dietary antioxidants, *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 136(1), 113-126.

- Bolaji B.O. and Huan Z. (2013): Ozone depletion and global warming: case for the use of natural refrigerant – a review, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 18, 49-54.
- Bonan G. (2002): *Ecological climatology concepts and applications*, 1st edition, Cambridge University Press, UK.
- Bonina F., Lanza M., Montenegro L., Puglisi C., Tomaino A., Trombetta D., Castelli F. and Saija A. (1996): Flavonoids as potential protective agents against photo-oxidative skin damage, *International Journal of Pharmaceutics*, 145(1-2), 87-94.
- Bonnett R. (1976): Mechanism of the photodegradation of bilirubin, *Biochemical Society Transactions*, 4(2), 222-226.
- Bonnett R. and Stewart J.C.M. (1972a): Photo-oxidation of bilirubin in hydroxylic solvents: propentdyopent adducts as major products, *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, (10), 596-597.
- Bonnett R. and Stewart J.C.M. (1972b): Singlet oxygen in the photo-oxidation of bilirubin in hydroxylic solvents, *Biochemical Journal*, 130(3), 895-897.
- Brett A.M.O. and Ghica M.-E. (2003): Electrochemical oxidation of quercetin, *Electroanalysis*, 15(22), 1745-1750.
- Brohem C.A., da Silva Cardeal L.B., Tiago M., Soengas M.S., de Moraes Barros S.B. and Maria-Engler S.S. (2011): Artificial skin in perspective: concepts and applications, *Pigment Cell and Melanoma Research*, 24(1), 35-50.
- Brower J.O. and Lightner D.A. (2001): Fluorophenyl bilirubins: synthesis and stereochemistry, *Monatshefte für Chemie*, 132(12), 1527-1546.
- Bruhn D., Albert K.R., Mikkelsen T.N. and Ambus P. (2014): UV-induced N₂O emission from plants, *Atmospheric Environment*, 99, 206-214.
- Buchner N., Krumbein A., Rohn S. and Kroh L.W. (2006): Effect of thermal processing on the flavonols rutin and quercetin, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 20(21), 3229-3235.
- Buer C.S., Imin N. and Djordjevic M.A. (2010): Flavonoids: new roles for old molecules, *Journal of Integrative Plant Biology*, 52(1), 98-111.
- Buettner G.R. (1987): Spin trapping: ESR parameters of spin adducts, *Free Radical Biology & Medicine*, 3, 259-303.
- Cao G., Sofic E. and Prior R.L. (1997): Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships, *Free Radical Biology and Medicine*, 22(5), 749-760.
- Cardoso D.R., Libardia S.H. and Skibsted L.H. (2012): Riboflavin as a photosensitizer. Effects on human health and food quality, *Food & Function*, 3(5), 487-502.
- Casagrande R., Georgetti S.R., Verri Jr. W.A., Dorta D.J., dos Santos A.C. and Fonseca M.J.V. (2006): Protective effect of topical formulations containing quercetin against UVB-induced oxidative stress in hairless mice, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 84(1), 21-27.
- Castro G.T., Blanco S.E. and Giordano O.S. (2000): UV spectral properties of benzophenone. Influence of solvents and substituents molecules, *Molecules*, 5(3), 424-425.
- Cech N. B. and Enke C. G. (2001): Practical implications of some recent studies in electrospray ionization fundamentals, *Mass Spectrometry Reviews*, 20(6), 362-387.
- Chen X. and Ahn D.U. (1998): Antioxidant activities of six natural phenolics against lipid oxidation induced by Fe²⁺ or Ultraviolet light, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75(12), 1717-1721.
- Cheng L. and Lightner D.A. (1999): A new photoisomerization of bilirubin, *Photochemistry and Photobiology*, 70(6), 941-948.
- Chien J.-T., Lu Y.F., Hu P.C. and Chen B.H. (2003): Cholesterol photooxidation as affected by combination of riboflavin and fatty acid methyl esters, *Food Chemistry*, 81(3), 421-431.

- Chignell C.F., Motten A.G., Sik R.H., Parker C.E. and Reszka K. (1994): A spin trapping study of the photochemistry of 5,5-dimethyl-1-pyrroline N-oxide (DMPO), *Photochemistry and Photobiology*, 59(1), 5-11.
- Cho S., Shin M.H., Kim Y.K., Seo J.-E., Lee Y.M., Park C.-H. and Chung J.H. (2009): Effects of infrared radiation and heat on human skin. Aging *in vivo*, *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*, 14(1), 15-19.
- Choe E., Huang R.M. and Min D.B. (2005): Chemical reactions and stability of riboflavin in foods, *Journal of Food Science*, 70(1), R28-R36.
- Choquet B., Couteau C., Papis E. and Coiffard L.J.M. (2008): Quercetin and rutin as potential sunscreen agents: determination of efficacy by an *in vitro* method, *Journal of Natural Products*, 71(6), 1117-1118.
- Chowdhury N.R., Arias I.M., Wolkoff A.W., Chowdhury J.R. (2001): Disorders of bilirubin metabolism, from: *The liver: biology and pathobiology*, 4th edition, Lippincott Williams & Wilkins, Inc., Philadelphia, USA.
- Cody R. B. (2002): *Electrospray ionization mass spectrometry history, theory, and instrumentation, from applied electrospray mass spectrometry*, Taylor & Francis, USA.
- Combs G.F., Jr. (2012): *The vitamins Fundamental aspects in nutrition and health*, 4th edition, Academic Press, Amsterdam, Netherlands.
- Cowan D.O. and Drisko R.L. (1976): *Elements of organic photochemistry*, Plenum Press, New York, USA.
- Cowley N.J. (1997): *The mechanistic photochemistry of 4-hydroxybenzophenone*, MSc thesis, Queen's University Kingston, Ontario, Canada.
- Coyle J.D. (1986): *Introduction to organic photochemistry*, John Wiley & Sons Ltd, Great Britain.
- Cushnie T.P. and Lamb A.J. (2005): Antimicrobial activity of flavonoids, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26(5), 343-356.
- Cvetković D., Marković D., Cvetković D. and Radovanović B. (2011): Effects of continuous UV-irradiation on the antioxidant activities of quercetin and rutin in solution in the presence of lecithin as the protective target, *Journal of Serbian Chemical Society*, 76(7), 973-985.
- Dall'Acqua S., Miolo G., Innocenti G. and Caffieri S. (2012): The photodegradation of quercetin: relation to oxidation, *Molecules*, 17(8), 8898-8907.
- Dangles O., Fargeix G. and Dufour C. (1999): One-electron oxidation of quercetin and quercetin derivatives in protic and non protic media, *Journal of the Chemical Society Perkin Transactions 2*, (7), 1387-1396.
- Dayal D. (2005): *An introduction to singlet oxygen chemistry*, Free Radical and Radiation Biology, University of Iowa Health Care, Carver College of Medicine, 77:222.
- De Matteis F., Lord G.A., Kee Lim C., Pons N. (2006): Bilirubin degradation by uncoupled cytochrome P450. Comparison with a chemical oxidation system and characterization of the products by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 20(8), 1209-1217.
- Demeter A. and Bérces T. (1989): Study of the long-lived intermediate formed in the photoreduction of benzophenone by isopropyl alcohol, *Journal of Photochemistry and Photobiology, A: Chemistry*, 46(1), 27-40.
- Deng W., Fang X. and Wu J. (1997): Flavonoids function as antioxidants: by scavenging reactive oxygen species or by chelating iron?, *Radiation Physics and Chemistry*, 50(3), 271-276.
- Deore S.L., Kombade S., Baviskar B.A., Khadabadi S.S. (2012): Photoprotective antioxidant phytochemicals, *International Journal of Phytopharmacy*, 2(3), 72-76.

- DeRosa M.C. and Crutchley R.J. (2002): Photosensitized singlet oxygen and its applications, *Coordination Chemistry Reviews*, 233-234, 351-371.
- Devasagayam T.P.A., Bolor K.K. and Ramasarma T. (2003): Methods for estimating lipid peroxidation: An analysis of merits and demerits, *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics*, 40, 300-308.
- Dey S.K. and Lightner D.A. (2010): Lipid- and water-soluble bilirubins, *Monatshefte für Chemie*, 141(1), 101-109.
- Di Carlo G., Mascolo N., Izzo A.A. and Capasso F. (1999): Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs, *Life Sciences*, 65(4), 337-353.
- Dobrikova A.G., Krasteva V. and Apostolova E.L. (2013): Damage and protection of the photosynthetic apparatus from UV-B radiation. I. Effect of ascorbate, *Journal of Plant Physiology*, 170(3), 251-257.
- Duin E. (2013): "Electron Paramagnetic Resonance Theory", Auburn University-Lecture Note, (https://www.auburn.edu/~duinedu/epr/1_theory.pdf).
- Erlund I. (2004): Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology, *Nutrition Research*, 24(10), 851-874.
- Fahlman B.M. (2010): *In vitro* studies to assess the potential of quercetin as a topical sunscreen; photooxidative properties, photostability and inhibition of UV radiation-mediated skin damage, PhD thesis, College of Pharmacy and Nutrition, University of Saskatchewan, Saskatoon, Canada.
- Fahlman B.M. and Krol E.S. (2009a): UVA and UVB radiation-induced oxidation products of quercetin, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 97(3), 123-131.
- Fahlman B.M. and Krol E.S. (2009b): Inhibition of UVA and UVB radiation-induced lipid oxidation by quercetin, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(12), 5301-5305.
- Fahy E., Cotter D., Sud M. and Subramaniam S. (2011): Lipid classification, structures and tools, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1811(11), 637-647.
- Falkovskaia E., Sengupta P.K. and Kasha M. (1998): Photophysical induction of dual fluorescence of quercetin and related hydroxyflavones upon intermolecular H-bonding to solvent matrix, *Chemical Physics Letters*, 297(1-2), 109-114.
- Feverly J. (2008): Bilirubin in clinical practice: a review, *Liver International*, 28(5), 592-605.
- Fiedor J., Fiedor L., Haeßner R. and Scheer H. (2005): Cyclic endoperoxides of β -carotene, potential pro-oxidants, as products of chemical quenching of singlet oxygen, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1709(1), 1-4.
- Filipescu N. and Minn F.L. (1968): Photoreduction of benzophenone in isopropyl alcohol, *Journal of the American Chemical Society*, 90(6), 1544-1547.
- Foote C.S. (1968): Mechanisms of photosensitized oxidation, *Science*, 162(3857), 963-970.
- Foote C.S. (1974): Photooxidation, from: *Phototherapy in the newborn: An overview*, National academy of sciences, Washington, D.C., USA.
- Foote C.S. and Ching T.Y. (1975): Chemistry of singlet oxygen. XXI. Kinetics of bilirubin photooxygenation, *Journal of the American Chemical Society*, 97(21), 6209-6214.
- Formosinho S. J. and Arnaut L. G. (1991): A unified view of ketone photochemistry, In: *Advances in Photochemistry*, Volume 16, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, USA.
- Fornstedt T., Forssén P. and Westerlund D. (2015): Basic HPLC theory and definitions: retention, thermodynamics, selectivity, zone spreading, kinetics, and resolution, in: *analytical separation science*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany.

- Galleano M., Verstraeten V. S., Oteiza I. P., Fraga G. C. (2010): Antioxidant actions of flavonoids: Thermodynamic and kinetic analysis, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 501(1), 23-30.
- Getoff N. and Solar S. and McCormick D.B. (1978): Photoejection of electrons from flavins in polar media, *Science*, 201(4356), 616-618.
- Girotti A.W. (2001): Photosensitized oxidation of membrane lipids: reaction pathways, cytotoxic effects, and cytoprotective mechanisms, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 63(1-3), 103-113.
- Goel S.K., Lalwani N.D. and Reddy J.K. (1986): Peroxisome proliferation and lipid peroxidation in rat liver, *Cancer Research*, 46(3), 1324-1330.
- González S., Fernández-Lorente M. and Gilaberte-Calzada Y. (2008): The latest on skin photoprotection, *Clinics in Dermatology*, 26(6), 614-626.
- Gordon M.H. and Roedig-Penman A. (1998): Antioxidant activity of quercetin and myricetin in liposomes, *Chemistry and Physics of Lipids*, 97(1), 79-85.
- Gray C.H., Kulczycka A. and Nicholson D.C. (1972): The photodecomposition of bilirubin and other bile pigments, *Journal of the Chemical Society Perkin Transactions 1*, (0), 288-294.
- Green M. and Tollin G. (1968): Flash photolysis of flavins-II. Quenching of the photoreactions, *Photochemistry and Photobiology*, 7(2), 145-153.
- Guéraud F., Atalay M., Bresgen N., Cipak A., Eckl P.M., Huc L., Jouanin I., Siems W. and Uchida K. (2010): Chemistry and biochemistry of lipid peroxidation products, *Free Radical Research*, 44(10), 1098-1124.
- Gülşen A., Makris D.P. and Kefalas P. (2007): Biomimetic oxidation of quercetin: Isolation of a naturally occurring quercetin heterodimer and evaluation of its *in vitro* antioxidant properties, *Food Research International*, 40(1), 7-14.
- Halbwirth H. (2010): The creation and physiological relevance of divergent hydroxylation patterns in the flavonoid pathway, *International Journal of Molecular Sciences*, 11(2), 595-621.
- Halliwell B. and Chirico S. (1993): Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance, *American Journal of Clinical Nutrition*, 57(suppl), 715S-725S.
- Hansen T.W.R. (2010): Core concepts: bilirubin metabolism, *NeoReviews*, 11(6), e316-e322.
- Harborne J.B. and Williams C.A. (2000): Advances in flavonoid research since 1992, *Phytochemistry*, 55(6), 481-504.
- Havsteen B.H. (2002): The biochemistry and medicinal significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics*, 96(2-3), 67-202.
- Heelis P.F. (1982): The photophysical and photochemical properties of flavins (isoalloxazines), *Chemical Society Reviews*, 11(1), 15-39.
- Heim K.E., Tagliaferro A.R., Bobilya D.J. (2002): Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships, *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 13(10), 572-584.
- Hendrickson H.P., Kaufman A.D. and Lunte C.E. (1994): Electrochemistry of catechol-containing flavonoids, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 12(3), 325-334.
- Herbert C.G. and Johnstone R.A.W. (2003): *Mass spectrometry basics*, CRC Press LLC, Boca Raton, Florida, USA.
- Herrling T., Jung K. and Fuchs J. (2006): Measurements of UV-generated free radicals/reactive oxygen species (ROS) in skin, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 63(4), 840-845.
- Higgins C. (2010): Bilirubin: not just a toxic metabolic waste product, *The Biomedical Scientist*, 400-403.

- Horiuchi C.A. and Ji S.-J. (2004): Photochemical reactions of α -halocyclic ketones and related systems, from: CRC Handbook of organic photochemistry and photobiology, 2nd Edition, CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
- Hoshino M., Arai S., Imamura M., Ikehara K. and Hama Y. (1980): Mechanism of benzophenone ketyl radical formation in acid alcohols studied by pulse-radiolysis and rigid-matrix techniques, *The Journal of Physical Chemistry*, 84(20), 2576-2579.
http://www.activ-balance.com/images/health2b_pic3.jpg
<http://blog.lib.umn.edu/tupp0008/environment/uvrayjp.gif>
- Huang R. (2006): Kinetics and effects of riboflavin photosensitized degradation on soymilk flavor stability, PhD thesis, The Ohio State University, USA.
- Huang R., Choe E., and Min D.B. (2004): Kinetics for singlet oxygen formation by riboflavin photosensitization and the reaction between riboflavin and singlet oxygen, *Journal of Food Science*, 69(9), C726-C732.
- Huché-Thélier L., Crespel L., Le Gourrierc J., Morel P., Sakr S. and Leduc N. (2016): Light signaling and plant responses to blue and UV radiations – Perspectives for applications in horticulture, *Environmental and Experimental Botany*, 121, 22-38.
- Hui R., Li X., Zhao R., Liu L., Gao Y. and Wei Y. (2015): UV-B radiation suppresses chlorophyll fluorescence, photosynthetic pigment and antioxidant systems of two key species in soil crusts from the Tengger Desert, China, *Journal of Arid Environments* 113, 6-15.
- Huvaere K., Cardoso D.R., Homem-de-Mello P., Westermann S. and Skibsted L.H. (2010): Light-induced oxidation of unsaturated lipids as sensitized by flavins, *The Journal of Physical Chemistry B*, 114(16), 5583-5593.
- Huvaere K., Olsen K. and Skibsted L.H. (2009): Quenching of triplet-excited flavins by flavonoids. Structural assessment of antioxidative activity, *The Journal of Organic Chemistry*, 74(19), 7283-7293.
- Huvaere K., Sinnaeve B., Van Bocxlaer J. and Skibsted L.H. (2012): Flavonoid deactivation of excited state flavins: reaction monitoring by mass spectrometry, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(36), 9261-9272.
- Hvattum E., Stenstrøm Y. and Ekeberg D. (2004): Study of the reaction products of flavonols with 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl using liquid chromatography coupled with negative electrospray ionization tandem mass spectrometry, *Journal of Mass Spectrometry*, 39(12), 1570-1581.
- Inal M.E. and Kahraman A. (2000): The protective effect of flavonol quercetin against ultraviolet A induced oxidative stress in rats, *Toxicology*, 154(1), 21-29.
- Insińska-Rak M., Golczak A. and Sikorski M. (2012): Photochemistry of riboflavin derivatives in methanolic solutions, *Journal of Physical Chemistry A*, 116(4), 1199-1207.
- Insińska-Rak M. and Sikorski M. (2014): Riboflavin interactions with oxygen—a survey from the photochemical perspective, *Photochemistry*, 20(47), 15280-15291.
- International Agency for Research on Cancer (IARC) (2006): Exposure to artificial UV radiation and skin cancer, IARC working group reports No 1.
- International Agency for Research on Cancer (IARC) (2013): Some chemicals present in industrial and consumer products, food and drinking water, IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, volume 101, Lyon, France.
- Itoh S., Isobe K. and Onishi S. (1999): Accurate and sensitive high-performance liquid chromatographic method for geometrical and structural photoisomers of bilirubin IX alpha using the relative molar absorptivity values, *Journal of Chromatography A*, 848(1-2), 169-177.

- Jackson A.H., Kenner G.W., Budzikiewicz H., Djerassi C. and Wilson J.M. (1967): Pyrroles and related compounds – X1: Mass spectrometry in structural and stereochemical problems – XC2 Mass spectra of linear di-, tri- and tetrapyrrolic compounds, *Tetrahedron*, 23(2), 603-632.
- Jacques P. (1987): Quenching of triplet benzophenone by electron donors: Does the linear inverse relation $\ln k_q$ versus IP really work?, *Chemical Physics Letters*, 142(1-2), 96-98.
- Jain J.L., Jain S. and Jain N. (2005): *Fundamentals of biochemistry*, 6th revised and enlarged edition, S. Chand & Company Ltd., New Delhi, India.
- Jansen M.A.K., Hectors K., O'Brien N.M., Guisez Y. and Potters G. (2008): Plant stress and human health: Do human consumers benefit from UV-B acclimated crops?, *Plant Science*, 175(4), 449-458.
- Jeon H.-K., Sarma S.N., Kim Y.-J. and Ryu J.-C. (2008): Toxicokinetics and metabolisms of benzophenone-type UV filters in rats, *Toxicology* 248, 89-95.
- Johnston L.J., Lougnot D.J., Wintgens V. and Scaiano J.C. (1988): Photochemistry of diphenylketyl radicals: spectroscopy, kinetics, and mechanisms, *Journal of the American Chemical Society*, 110(2), 518-524.
- Joshi P.C. and Keane T.C. (2010): Investigation of riboflavin sensitized degradation of purine and pyrimidine derivatives of DNA and RNA under UVA and UVB. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 400(4), 729-773.
- Joshi U.J., Gadge A.S., D'Mello P., Sinha R., Srivastava S. and Govil G. (2011): Anti-inflammatory, antioxidant and anticancer activity of quercetin and its analogues, *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences*, 2(4), 1756-1766.
- Juarranz A, Jaén P, Sanz-Rodríguez F, Cuevas J and González S. (2008): Photodynamic therapy of cancer. Basic principles and applications, *Clinical and Translational Oncology* 10(3), 148-154.
- Jungbluth G., Rühling I. and Ternes W. (2000): Oxidation of flavonols with Cu(II), Fe(II) and Fe(III) in aqueous media, *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, (9), 1946-1952.
- Kane R.P. (2008): Is ozone depletion really recovering?, *Journal of Atmospheric and Solar-Terrestrial Physics*, 70(11-12), 1455-1459.
- Kaneta M. and Sugiyama N. (1971): The light resistance of the flavones and the flavonols, *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 44(11), 3211-3211.
- Karoui H., Chalier F., Fineta J.-P. and Tordo P. (2011): DEPMPO: an efficient tool for the coupled ESR-spin trapping of alkylperoxyl radicals in water, *Organic & Biomolecular Chemistry*, 9(7), 2473-2480.
- Kasprzak M.M., Erxleben A. and Ochocki J. (2015): Properties and applications of flavonoid metal complexes, *RSC Advances*, 5(57), 45853-45877.
- Kataria S., Jajoo A. and Guruprasad K.N. (2014): Impact of increasing Ultraviolet-B (UV-B) radiation on photosynthetic processes, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 137, 55-66.
- Kazazić S.P. (2004): Antioksidacijska i antiradikalska aktivnost flavonoida, *Arhiv za Higijenu Rada i Toksikologiju*, 55, 279-290.
- King J.M. and Min D.B. (2002): Riboflavin-photosensitized singlet oxygen oxidation product of vitamin D₂, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 79(10), 983-987.
- Kirkby K.A. and Adin C.A. (2006): Products of heme oxygenase and their potential therapeutic applications, *American Journal of Physiology – Renal Physiology*, 290(3), F563-F571.

- Klán P. and Wirz J. (2009): Photochemistry of organic compounds: from concepts to practice, John Wiley & Sons Ltd., Chichester, United Kingdom.
- Klessinger M. and Michl J. (1995): Excited states and photochemistry of organic molecules, VCH Publishers, Inc., New York, USA.
- Klundt T., Bocola M., Lütge M., Beuerle T., Liu B. and Beerhues L. (2009): A single amino acid substitution converts benzophenone synthase into phenylpyrone synthase, *The Journal of Biological Chemistry*, 284(45), 30957-30964.
- Knobloch E., Hodr R., Herzman J. and Houdková V. (1982): Function of flavins in photolysis of bilirubin *in vitro*, *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*, 47(5), 1514-1522.
- Kovács E. and Keresztes Á. (2002): Effect of gamma and UV-B/C radiation on plant cells, *Micron*, 33(2), 199-210.
- Kraïnev A.G., Viner R.I. and Bigelow D.J. (1997): Benzophenone-sensitized photooxidation of sarcoplasmic reticulum membranes: site-specific modification of the Ca²⁺-ATPase, *Free Radical Biology and Medicine*, 23(7), 1009-1020.
- Krishna C.M., Uppuluri S., Riesz P., Zigler J.S. and Balasubramanian D. (1991): A study of the photodynamic efficiencies of some eye lens constituents, *Photochemistry and Photobiology*, 54(1), 51-58.
- Krishnamachari V., Levine L.H. and Paré P.W. (2002): Flavonoid oxidation by the radical generator AIBN: A unified mechanism for quercetin radical scavenging, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(15), 4357-4363.
- Krishnamachari V., Levine L.H., Zhou C. and Paré P.W. (2004): *In vitro* flavon-3-ol oxidation mediated by a B ring hydroxylation pattern, *Chemical Research in Toxicology*, 17(6), 795-804.
- Kruk I. and Michalska T. (2010): Electronic spin resonance detection of hydroxyl radicals and singlet oxygen during peroxidation of bopindolol in the presence of copper ions, *Current Topics in Biophysics*, 33 (suppl A), 119-124.
- Krutmann J. (2000): Ultraviolet A radiation-induced biological effects in human skin: relevance for photoaging and photodermatosis, *Journal of Dermatological Science*, 23 Suppl. 1, S22-S26.
- Kubo I., Nihei K.-I. and Shimizu K. (2004): Oxidation products of quercetin catalyzed by mushroom tyrosinase, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 12(20), 5343-5347.
- Kufer W. and Scheer H. (1983): The diazo reaction of bilirubin: structure of the yellow products. *Tetrahedron*, 1983; 39(11), 1887-1892.
- Kupiec T. (2004): Quality-control analytical methods: high-performance liquid chromatography, *International Journal of Pharmaceutical Compounding*, 8(3), 223-227.
- Kvam E. and Tyrrell R.M. (1997): Induction of oxidative DNA base damage in human skin cells by UV and near visible radiation, *Carcinogenesis*, 18(12), 2379-2384.
- Laguerre M., Lecomte J. and Villeneuve P. (2007): Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges, *Progress in Lipid Research*, 46(5), 244-282.
- Lassalle H.-P. (2005): Etude des mécanismes du photoblanchiment de la 5,10,15,20-tetrakis(m-hydroxyphenyl)bactéριοchlorine, en solution, *in vitro* et *in vivo*, PhD thesis, Université Henri Poincaré-Nancy I, Nancy, France.
- Li J., Han W. and Yu Y. (2013): Chromatography method from protein engineering – technology and application, InTech, Rijeka, Hrvatska.
- Li J., Wang X., Zhang T., Wang C., Huang Z., Luo X. and Deng Y. (2015): A review on phospholipids and their main applications in drug delivery systems, *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 10(2), 81-98.

- Li Y. (2011): Antioxidants in biology and medicine: essentials, advances, and clinical applications, Nova Science Publishers, Inc., New York, USA.
- Lichtman J.W. and Conchello J.-A. (2005): Fluorescence microscopy, *Nature methods*, 2(12), 910-919.
- Lightner D.A. (1974): *In vitro* photooxidation products of bilirubin, In: Phototherapy in the newborn: An overview, National academy of sciences, Washington, D.C., USA.
- Lightner DA (1977): The photoreactivity of bilirubin and related pyrroles. *Photochemistry and Photobiology*, 26(4), 427-436.
- Lightner D.A. and Crandall D.C. (1972): Biliverdin photo-oxidation. *In vitro* formation of methylvinylmaleimide, *FEBS Letters*, 20(1), 53-56.
- Lightner D.A., Crandall D.C., Gertler S. and Quistad G.B. (1973): On the formation of biliverdin during photooxygenation of bilirubin *in vitro*, *FEBS Letters*; 30(3), 309-312.
- Lightner D.A., Cu A., McDonagh A.F. and Palma L.A. (1976): On the autoxidation of bilirubin, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 69(3), 648-657.
- Lightner D.A., Linnane W.P. 3rd and Ahlfors C.E. (1984): Bilirubin photooxidation products in the urine of jaundiced neonates receiving phototherapy, *Pediatric Research*, 18(8), 696-700.
- Lightner D.A. and Quistad G.B. (1972a): Methylvinylmaleimide from bilirubin photooxidation, *Science*, 175(4019), 324.
- Lightner D.A. and Quistad G.B. (1972b): Hematinic acid and propentdyopents from bilirubin photo-oxidation *in vitro*, *FEBS Letters*, 25(1), 94-96.
- Lim, C. K. (2009): High-performance liquid chromatography and mass spectrometry of porphyrins, chloropylls and bilins, World Scientific Publishing Co Inc, Singapore.
- Llorens L., Badenes-Pérez F.R., Julkunen-Tiitto R., Zidorn C., Fereres A. and Jansene M.A.K. (2015): The role of UV-B radiation in plant sexual reproduction, *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 17(3), 243-254.
- Longstreth J., de Gruijl F.R., Kripke M.L., Abseck S., Arnold F., Slaper H.I., Velders G., Takizawa Y. and van der Leun J.C. (1998): Health risks, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 46(1-3), 20-39.
- Lovell M.A. and Markesbery W.R. (2003): Analysis of aldehydic markers of lipid peroxidation in biological tissues by HPLC with fluorescence detection, In: *Methods in pharmacology and toxicology: methods in biological oxidative stress*, Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, USA.
- Mahns A., Melchheier I., Suschek C.V., Sies H., Klotz L.-O. (2003): Irradiation of cells with Ultraviolet-A (320-400 nm) in the presence of cell culture medium elicits biological effects due to extracellular generation of hydrogen peroxide, *Free Radical Research*, 37(4), 391-397.
- Maini S., Hodgson H.L., and Krol E.S. (2012): The UVA and aqueous stability of flavonoids is dependent on B-ring substitution, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(28), 6966-6976.
- Maisels M.J. and McDonagh A.F. (2008): Phototherapy for neonatal jaundice, *The New England Journal of Medicine*, 358(9), 920-928.
- Makdoui K. (2011): Ultraviolet light A (UVA) photoactivation of riboflavin as a potential therapy for infectious keratitis, PhD thesis, Örebro University, Örebro, Sweden.
- Makris D. P. and Rossiter J.T. (2002): An investigation on structural aspects influencing product formation in enzymic and chemical oxidation of quercetin and related flavonols, *Food Chemistry*, 77(2), 177-185.
- Marais J.P.J., Deavours B., Dixon R.A. and Ferreira D. (2006): The stereochemistry of flavonoids, from: *The science of flavonoids*, Springer, New York, USA.

- Marfak A., Trouillas P., Allais D.P., Calliste C.A. and Duroux J.L. (2003): Redox reactions obtained by gamma irradiation of quercetin methanol solution are similar to *in vivo* metabolism, *Radiation Research*, 159(2), 218-227.
- Marković D.Z. (1990): Kinetika i mehanizam fotosenzibilizovane peroksidacije lipidnih konstituenata biomembrana, doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu, Prirodno-matematički fakulteti, Fakultet za fizičku hemiju.
- Marković D.Z. (1999): Fotoliza benzofenona u sabijenim monomolekulskim slojevima lipida: slučaj fotosenzibilizovane peroksidacije, *Hemijska Industrija* 53(9-10), 247-254.
- Marković D.Z. (2001a): Photolysis of incorporated benzophenone derivatives inside compressed lipid monolayers, *Journal of the Serbian Chemical Society*, 66(5), 309-322.
- Marković D.Z. (2001b): Benzophenone-sensitized peroxidation in compressed lipid monolayers at air-water interface, *Collect Collection of Czechoslovak Chemical Communications*, 66(11), 1603-1614.
- Marković D.Z. (2004): Photochemistry of aromatic ketones in sodium dodecyl sulphate micelles in the presence of unsaturated fatty acids, *Journal of Serbian Chemical Society*, 69(2), 107-115.
- Marković D.Z., Durand T. and Patterson L.K. (1990): Hydrogen abstraction from lipids by triplet states of derivatized benzophenone photosensitizers, *Photochemistry and Photobiology*, 51(4), 389-394.
- Marković D.Z. and Patterson L.K. (1989): Radical processes in lipids. Selectivity of hydrogen abstraction from lipids by benzophenone triplet, *Photochemistry and Photobiology* 49(5), 531-535.
- Marković D.Z. and Patterson L.K. (1993): Benzophenone-sensitized lipid peroxidation in linoleate micelles, *Photochemistry and Photobiology* 58(3), 329-334.
- Marković D.Z. i Zvezdanović J.B., *Hromatografija u organskoj analizi*, Studentski informativno-izdavački centar, Niš, 2010.
- Materska M. (2008): Quercetin and its derivatives: chemical structure and bioactivity – a review, *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 58(4), 407-413.
- McDonagh A.F. (1974): The photochemistry and photometabolism of bilirubin, from: *Phototherapy in the newborn: An overview*, National academy of sciences, Washington, D.C., USA.
- McDonagh A.F. (1985): Light effects on transport and excretion of bilirubin in newborns, 453, 65-72.
- McDonagh A.F. (2001): Turning green to gold, *Nature Structural Biology*, 8(3), 198-200.
- McDonagh A.F. (2010): Controversies in bilirubin biochemistry and their clinical relevance, *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine*, 15(3), 141-147.
- McDonagh A.F. (2011): Bilirubin, copper-porphyrins, and the bronze-baby syndrome, *Journal of Pediatrics*, 158(1), 160-164.
- McDonagh A.F. and Lightner D.A. (1985): "Like a shrivelled blood orange" – bilirubin, jaundice, and phototherapy, *Pediatrics*, 75(3), 443-455.
- McFarland M. and Kaye J. (1992): Chlorofluorocarbons and ozone, *Photochemistry and Photobiology*, 55(6), 911-929.
- McPolin O. (2009): *An Introduction to HPLC for Pharmaceutical Analysis*, Mourn Training Services, UK.
- McTiernan C.D., Alarcon E.I., Hallett-Tapley G.L., Murillo-Lopez J., Arratia-Perez R., Netto-Ferreira J.C. and Scaiano J.C. (2014): Electron transfer from the benzophenone triplet excited state directs the photochemical synthesis of gold nanoparticles, *Photochemical & Photobiological Sciences*, 13(2), 149-153.

- Medvidović-Kosanović M., Šeruga M., Jakobek L. and Novak I. (2010): Electrochemical and antioxidant properties of (+)-catechin, quercetin and rutin, *Croatica Chemica Acta* 83(2), 197-207.
- Menaa F., Menaa A. and Tréton J. (2013): Polyphenols against skin aging from: Polyphenols in human health and disease, Academic Press, New York, USA.
- Meyer V.R. (2004): Practical High-Performance Liquid Chromatography, 4th edition, John Wiley & Sons, Chichester, England.
- Milenković M.C. (2013): Ispitivanje kinetike i modeliranje reakcije kalijum-jodida i vodonik-peroksida u kiseloj sredini, doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu, Fakultet za fizičku hemiju.
- Min D.B. and Boff J.M. (2002): Chemistry and reaction of singlet oxygen in foods, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 1(2), 58-72.
- Mirković S. (2002): Aktivni principi lekovitih biljaka koje se primenjuju u stomatologiji, *Stomatološki Glasnik Srbije*, 49, 101-105.
- Mišović J. i Ast T. (1989): Instrumentalne metode hemijske analize, Tehnološko-metalurški fakultet Univerzitet u Beogradu, Srbija.
- Mojović M., Spasojević I. and Bačić G. (2005): Detection of hydrogen atom adduct of spin-trap DEPMPO. The relevance for studies of biological systems, *Journal of Chemical Information and Modeling*, 45, 1716-1718.
- Momić T., Savić J. and Vasić V. (2009): Oxidation of quercetin by myeloperoxidase, *Research Letters in Physical Chemistry*, 2009, Article ID 614362.
- Montaña M.P., Massad W.A., Criado S., Biasutti A. and García N.A. (2010): Stability of flavonoids in the presence of riboflavin-photogenerated reactive oxygen species: a kinetic and mechanistic study on quercetin, morin and rutin, *Photochemistry and Photobiology*, 86(4), 827-834.
- Montaña P., Pappano N., Debattista N., Ávila V., Posadaz A., Bertolotti S.G., García N.A. (2003): The activity of 3- and 7-hydroxyflavones as scavengers of superoxide radical anion generated from photo-excited riboflavin, *Canadian Journal of Chemistry*, 81(8), 909-914.
- Moore J.T. and Langley R. (2008): *Biochemistry for dummies*, Wiley Publishing, Inc., Indianapolis, Indiana, USA.
- Moran L.A., Horton H.R., Scrimgeour K.G. and Perry M.D. (2011): *Principles of Biochemistry*, 5th edition, Pearson publishing, Boston, MA, USA.
- Mukherjee P.K., Maity N., Nema N.K. and Sarkar B.K. (2011): Bioactive compounds from natural resources against skin aging, *Phytomedicine*, 19(1), 64-73.
- Murota K. and Terao J. (2003): Antioxidative flavonoid quercetin: implication of its intestinal absorption and metabolism, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 417(1), 12-17.
- Ndhlala A.R., Moyo M. and Staden J.V. (2010): Natural antioxidants: fascinating or mythical biomolecules?, *Molecules*, 15(10), 6905-6930.
- Negre-Salvayre A. *et al.* (2010): Pathological aspects of lipid peroxidation, *Free Radical Research*, 44(10): 1125-1171.
- Niki E., Yoshida Y., Saito Y. and Noguchi N. (2005): Lipid peroxidation: Mechanisms, inhibition, and biological effects, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 338(1), 668-676.
- Nematollahi D. and Malakzadeh M. (2003): Electrochemical oxidation of quercetin in the presence of benzenesulfinic acids, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 547, 191-195.
- Niessen W.M.A. and Falck D. (2015): Introduction to mass spectrometry, a tutorial, from: *Analyzing biomolecular interactions by mass spectrometry*, 1st edition, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany.

- Nijveldt R.J., van Nood E., van Hoorn D.E.C., Boelens P.G., van Norren K. and van Leeuwen P.A.M. (2001): Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 74(4), 418-425.
- NTP technical report on the toxicology and carcinogenesis studies of benzophenone (CAS no. 119-61-9) in F344/N rats and B6C3F₁ mice (feed studies), National Institutes of Health Public Health Service U.S. department of health and human services, February 2006.
- Paillous N. and Fery-Forgues S. (1994): Interest of photochemical methods for induction of lipid peroxidation, *Biochimie*, 76(5), 355-368.
- Palmieri B. and Sblendorio V. (2007): Oxidative stress tests: overview on reliability and use. Part I., *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 11(5), 309-342.
- Pannala A.S., Chan T.S., O'Brien P.J. and Rice-Evans C.A. (2001): Flavonoid B-ring chemistry and antioxidant activity: fast reaction kinetics, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 282(5), 1161-1168.
- Parisi A.V., Schouten P., Downs N.J. and Turner J. (2010): Solar UV exposures measured simultaneously to all arbitrarily oriented leaves on a plant, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 99(2), 87-92.
- Pérez J.A.M. and Aguilar T.A.F. (2013): Chemistry of natural antioxidants and studies performed with different plants collected in Mexico, from: Oxidative stress and chronic degenerative diseases – a role for antioxidants, In Tech, Rijeka, Hrvatska.
- Pestotnik K., Kosjek T., Krajnc U. and Heath E. (2012): Photodegradation of benzophenones, 4th Jožef Stefan International Postgraduate School Students Conference, May 25 2012, IPS Ljubljana, Slovenia.
- Pham-Huy L.A., Hua H. and Pham-Huy C. (2008): Free radicals, antioxidants in disease and health, *International Journal of Biomedical Science*, 4(2), 89-96.
- Pilarski J. (2005): Light after darkness, *Research in Progress Plant Physiology*, 4(8), 33-35.
- Pinnell S.R. (2003): Cutaneous photodamage, oxidative stress, and topical antioxidant protection, *Journal of the American Academy of Dermatology*, 48(1), 1-22.
- Pimple B.P. and Badole S.L. (2013): Polyphenols: a remedy for skin wrinkles, from: Polyphenols in human health and disease, Academic Press, New York, USA.
- Pirone C., Johnson J.V., Quirke J.M.E., Priestap H.A. and Lee D.W. (2010): The animal pigment bilirubin identified in *Strelitzia reginae*, the bird of paradise flower, *HortScience*, 45(9), 1411-1415.
- Pouillot A., Polla L.L., Tacchini P., Neequaye A., Polla A. and Polla B. (2011): Natural antioxidants and their effects on the skin, from: Formulating, packaging, and marketing of natural cosmetic products, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, USA.
- Powers H.J. (2003): Riboflavin (vitamin B-2) and health, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 77, 1352-1360.
- Pramanik B.N., Ganguly A.K., Gross M.L. (2002): Applied electrospray mass spectrometry: practical spectroscopy series Volume 32, CRC Press, USA.
- Procházková D., Boušová I. and Wilhelmová N. (2011): Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids, *Fitoterapia*, 82(4), 513-523.
- Pryor W.A., Houk K.N., Foote C.S., Fukuto J.M., Ignarro L.J., Squadrito G.L. and Davies K.J.A. (2006): Free radical biology and medicine: it's a gas, man!, *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 291(3), R491-R511.
- Quinn K.D., Nguyen N.Q., Wach M.M. and Wood T.D. (2012): Tandem mass spectrometry of bilin tetrapyrroles by electrospray ionization and collision-induced dissociation, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 26(16), 1767-1775.

- Quintero B. and Miranda M.A. (2000): Mechanisms of photosensitization induced by drugs: A general survey, *Ars Pharmaceutica*, 41(1), 27-46.
- Ramos S., Homem V., Alves A. and Santos L. (2015): Advances in analytical methods and occurrence of organic UV-filters in the environment – A review, *Science of the Total Environment*, 526, 278-311.
- Rohatgi-Mukherjee K.K. (1986): *Fundamentals of photochemistry* (revised edition), Jadavpur University, Calcuta, New Age International (P) Ltd., Publishers, New Delhi, India.
- Radka T. (2010): Ultraviolet A split-dose therapy, a novel approach to improve the aminolevulinic acid-based photodynamic therapy of skin lesions, MPhil thesis, University of Bath, Faculty of Science, Somerset, UK.
- Rathe M., Bhorla M. and Kundu R. (2013): Vitamin C and oral health: a review. *Indian Journal of Applied Research*, 3(9), 462-463.
- Raven P.H. and Johnson G.B. (1999): *Biology*, 5th edition, McGraw-Hill, Boston, MA, USA.
- Ravichandran R., Rajendran M. and Devapriyam D (2014): Antioxidant study of quercetin and their metal complex and determination of stability constant by spectrophotometry method, *Food Chemistry*, 146, 472-478.
- Recknagel R.O. and Glende E.A. Jr. (1984): Spectrophotometric detection of lipid conjugated dienes, *Methods in Enzymology*, 105, 331-337.
- Ren W., Qiao Z., Wang H., Zhu L. and Zhang L. (2003): Flavonoids: promising anticancer agents, *Medicinal Research Reviews*, 23(4), 519-534.
- Repetto M., Semprine J. and Boveris A. (2012): Lipid peroxidation: chemical mechanism, biological implications and analytical determination, In: *Lipid peroxidation*, InTech, Rijeka, Hrvatska.
- Rice-Evans C.A., Miller N.J. and Paganga G. (1996): Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids, *Free Radical Biology and Medicine*, 20(7), 933-956.
- Rittié L. and Fisher G.J. (2002): UV-light-induced signal cascades and skin aging, *Ageing Research Reviews*, 1(4), 705-720.
- Rozema J. et al., (2002): The role of UV-B radiation in aquatic and terrestrial ecosystems-an experimental and functional analysis of the evolution of UV-absorbing compounds, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 66(1), 2-12.
- Rubin M.B. (1982): New observations on the photopinacolization of benzophenone in aliphatic alcohols, *Tetrahedron Letters*, 23(44), 4615-4618.
- Sadek P.C. (2004): *Illustrated pocket dictionary of chromatography*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, USA.
- Saija A., Scalese M., Lanza M., Marzullo D., Bonina F. and Castelli F. (1995): Flavonoids as antioxidant agents: importance of their interaction with biomembranes, *Free Radical Biology & Medicine*, 19(4), 481-486.
- Saija A., Tomaino A., Trombetta D., Pellegrino M.L., Tita B., Messina C., Bonina F.P., Rocco C., Nicolosi G. and Castelli F. (2003): "In vitro" antioxidant and photoprotective properties and interaction with model membranes of three new quercetin esters, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 56(2), 167-174.
- Sakihama Y., Cohen M.F., Grace S.C. and Yamasaki H. (2002): Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants, *Toxicology*, 177(1), 67-80.
- Savić S.R., Stanojević J.S., Marković D.Z. and Petronijević Ž.B. (2013): Quercetin oxidation by horseradish peroxidase: the effect of UV-B irradiation, *Hemijaska Industrija*, 67(3), 411-418.

- Schade N., Esser C. and Krutmann J. (2005): Ultraviolet B radiation-induced immunosuppression: molecular mechanisms and cellular alterations, *Photochemical and Photobiological Sciences*, 4(9), 699-708.
- Schmalhausen E.V., Zhlobek E.B., Shalova I.N., Firuzi O., Saso L. and Muronetz V.I. (2007): Antioxidant and prooxidant effects of quercetin on glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, *Food and Chemical Toxicology*, 45(10), 1988-1993.
- Schoemaker J.H., Bousema M.T., Zijlstra H. and van der Horst F.A. (1995): Treatment of erythropoietic protoporphyria with hydroxyethylrutinosides, *Dermatology*, 191(1), 36-38.
- Scott R.P.W. (2012): *Principles and Practice of Chromatography*, Reese-Scott Partnership.
- Sedlak T.W. and Snyder S.H. (2004): Bilirubin benefits: cellular protection by a biliverdin reductase antioxidant cycle, *Pediatrics*, 113(6), 1776-1782.
- Sekulović D. (2009): *Kozmetologija I, Visoka medicinska škola strukovnih studija, Čuprija, Clipart, Čuprija*.
- Shafique S., Shafique S., Bajwa R., Akhtar N. and Hanif S. (2011): Fungitoxic activity of aqueous and organic solvent extracts of *Tagetes erectus* on phytopathogenic fungus *Ascochyta rabiei*, *Pakistan Journal of Botany*, 43(1), 59-64.
- Shah H. and Mahajan S.R. (2013): Photoaging: new insights into its stimulators, complications, biochemical changes and therapeutic interventions, *Biomedicine & Aging Pathology*, 3(3), 161-169.
- Sikorska E. *et al.* (2005): Spectroscopy and photophysics of flavin related compounds: Riboflavin and iso-(6,7)-riboflavin, *Chemical Physics*, 314(1-3), 239-247.
- Silva E., Edwards A.M. and Pacheco D. (1999): Visible light-induced photooxidation of glucose sensitized by riboflavin, *Journal of Nutritional Biochemistry*, 10(3), 181-185.
- Silva E., Ugarte R., Andrade A. and Edwards A.M. (1994): Riboflavin-sensitized photoprocesses of tryptophan, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 23(1), 43-48.
- Simić A., Manojlović D., Šegan D. and Todorović M. (2007): Electrochemical behavior and antioxidant and prooxidant activity of natural phenolics, *Molecules*, 12(10), 2327-2340.
- Simmonds M.S.J. (2003): Flavonoid – insect interactions: recent advances in our knowledge, *Phytochemistry*, 64(1), 21-30.
- Smith G.J., Thomsen S.J., Markham K.R., Andary C. and Cardon D. (2000): The photostabilities of naturally occurring 5-hydroxyflavones, flavonols, their glycosides and their aluminium complexes, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 136(1-2), 87-91.
- Sochor J., Ruttkay-Nedecky B., Babula P., Adam V., Hubalek J. and Kizek R. (2012): Automation of methods for determination of lipid peroxidation, from: *Lipid peroxidation*, InTech, Rijeka, Hrvatska.
- Södergren, E. (2000): *Lipid peroxidation in vivo. Evaluation and application of methods for measurement*, Acta Universitatis Upsaliensis, Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Medicine 949, Uppsala.
- Spasojević I., Mojović M., Ignjatović A. and Bačić G. (2011): The role of EPR spectroscopy in studies of the oxidative status of biological systems and the antioxidative properties of various compounds, *Journal of the Serbian Chemical Society*, 76(5), 647-677.
- Stanojević J.S., Marković D.Z. and Zvezdanović J.B. (2013): Benzophenone suppression of quercetin antioxidant activity towards lipids under UV-B irradiation regime: detection by HPLC chromatography, *Journal of Chemistry*, 2013, 1-9, Article ID 761675.
- Stapleton A.E. (1992): Ultraviolet radiation and plants: burning questions, *The Plant Cell*, 4(11), 1353-1358.

- Stevanović J., Borozan S., Jović S. i Ignjatović I. (2011): Fiziologija slobodnih radikala, Veterinarski glasnik, 65(1-2), 95-107.
- Stevenson D.K., Vreman H.J. and Wong R.J (2011): Bilirubin production and the risk of bilirubin neurotoxicity, Seminars in Perinatology, 35(3), 121-126.
- Steiner R.A., Kalk K.H. and Dijkstra B.W. (2002): Anaerobic enzyme•substrate structures provide insight into the reaction mechanism of the copper-dependent quercetin 2,3-dioxygenase, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 99 (26), 16625-16630.
- Strid Å., Chow W.S. and Anderson J.M. (1994): UV-B damage and protection at the molecular level in plants, Photosynthesis Research, 39(3), 475-489.
- Strid A. and Porra R.J. (1992): Alterations in pigment content in leaves of *Pisum sativum* after exposure to supplementary UV-B, Plant and Cell Physiology, 33(7), 1015-1023.
- Stocker R., Yamamoto Y., McDonagh A.F., Glazer A.N. and Ames B.N. (1987): Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance, Science, 235(4792), 1043-1046.
- Sugihara, N., Arakawa T., Ohnishi M. and Furuno K. (1999): Anti- and pro-oxidative effects of flavonoids on metal-induced lipid hydroperoxide-dependent lipid peroxidation in cultured hepatocytes loaded with alpha-linolenic acid, Free Radical Biology and Medicine, 27(11-12), 1313-1323.
- Svobodová A., Psotová J. and Walterová D. (2003): Natural phenolics in the prevention of UV-induced skin damage. A review, Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czech Republic, 147(2), 137-145.
- Tahara S. (2007): A journey of twenty-five years through the ecological biochemistry of flavonoids, Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 71(6), 1387-1404.
- Tapas A.R., Sakarkar D.M. and Kakde R.B. (2008): Flavonoids as nutraceuticals: a review, Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 7(3), 1089-1099.
- Timbola A.K., de Souza C. D., Giacomelli C. and Spinelli A. (2006): Electrochemical oxidation of quercetin in hydro-alcoholic solution, Journal of the Brazilian Chemical Society, 17(1), 139-148.
- Trouillas P., Marsal P., Siri D., Lazzaroni R., Duroux J.-L. (2006): A DFT study of the reactivity of OH groups in quercetin and taxifolin antioxidants: the specificity of the 3-OH site, Food Chemistry, 97(4), 679-688.
- Utaka M. and Takeda A. (1985): Copper(II)-catalysed oxidation of quercetin and 3-hydroxyflavone, Journal of the Chemical Society, Chemical Communications, 18(24), 1824-1826.
- van de Staaij J., de Bakker N.V., Oosthoek A., Broekman R., van Beem A., Stroetenga M., Aerts R. and Rozema J. (2002): Flavonoid concentrations in three grass species and a sedge grown in the field and under controlled environment conditions in response to enhanced UV-B radiation, Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 66(1), 21-29.
- van der Woude H. (2006): Mechanisms of toxic action of the flavonoid quercetin and its phase II metabolites, PhD thesis, Wageningen University, Wageningen, The Netherlands.
- Venturi S. and Venturi M. (2007): Evolution of dietary antioxidant defences, European Epi-Marker, 11(3), 1-12.
- Vertuani S., Angusti A. and Manfredini S. (2004): The antioxidants and pro-antioxidants network: an overview, Current Pharmaceutical Design, 10(14), 1677-1694.
- Vicentini F.T.M.C., Georgetti S.R., Jabor J.R., Caris J.A., Bentley M.V.L.B. and Fonseca M.J.V. (2007): Photostability of quercetin under exposure to UV irradiation, Latin American Journal of Pharmacy, 26(1), 119-124.

- Vihakas M. (2014): Flavonoids and other phenolic compounds: characterization and interactions with lepidopteran and sawfly larvae, PhD thesis, University of Turku, Turku, Finland.
- Viltres Costa C., Grela M.A. and Churio M.S. (1996): On the yield of intermediates formed in the photoreduction of benzophenone, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 99(1), 51-56.
- Vlaisavljević S. (2014): Hemijska, biohemijska i mikrobiološka karakterizacija *Trifolium pratense* L., doktorska disertacija, Univerzitet u Novom Sadu, Prirodno-matematički fakultet, Novi Sad.
- Vollhardt K.P.C and Schore N.E. (1996): *Organska hemija*, drugo izdanje, Hajdigraf, Beograd.
- von Raumer M., Suppan P. and Jacques P. (1997): Photoinduced charge transfer processes of triplet benzophenone in acetonitrile, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 105(1), 21-28.
- Walling C. and Gibian M.J. (1965): Hydrogen abstraction reactions by the triplet states of ketones, *Journal of the American Chemical Society*, 87(15), 3361-3364.
- Wang X., Chowdhury J.R., Chowdhury N.R. (2006): Bilirubin metabolism: applied physiology, *Current Paediatrics*, 16, 70-74.
- Weiner S. A. (1971): Behavior of photochemically generated ketyl radicals. Modified mechanism for benzophenone photoreduction, *Journal of the American Chemical Society*, 93(2), 425-429.
- Wheatley R.A. (2000): Some recent trends in the analytical chemistry of lipid peroxidation, *trends in analytical chemistry*, 19(10), 617-628.
- Wixom R.L., Gehrke C.W., Berezkin V.G. and Janak J. (2010): *Chromatography-a new discipline of science, from: Chromatography: a science of discovery*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, USA.
- Wondrak G.T., Jacobson M.K. and Jacobson E.L. (2006): Endogenous UVA-photosensitizers: mediators of skin photodamage and novel targets for skin photoprotection, *Photochemical & Photobiological Sciences*, 5(2), 215-237.
- Wu S.-B., Long C. and Kennelly E.J. (2014): Structural diversity and bioactivities of natural benzophenones, *Natural Product Reports*, 31, 1158-1174.
- Wurster W.L., Pyne-Geithman G.J., Peat I.R. and Clark J.F. (2008): Bilirubin oxidation products (BOXes): synthesis, stability and chemical characteristics, *Acta Neurochirurgica Supplement*, 104, 43-50.
- Yanishlieva-Maslarova N.V. (2001): Inhibiting oxidation, from: *Antioxidants in food: practical applications*, CRC Press, USA.
- Yao L.H., Jiang Y.M., Shi J., Tomás-Barberán F.A., Datta N., Singanusong R. and Chen S.S. (2004): Flavonoids in food and their health benefits, *Plant Foods for Human Nutrition* 59(3), 113-122.
- Yasuda S., Itoh S., Imai T., Isobe K and Onishi S. (2001): Cyclobilirubin formation by *in vitro* photoirradiation with neonatal phototherapy light, *Pediatrics International*, 43(3), 270-275.
- Yokawa K. and Baluška F. (2015): Pectins, ROS homeostasis and UV-B responses in plant roots, *Phytochemistry*, 112, 80-83.
- Young A.R. (2006): Acute effects of UVR on human eyes and skin, *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 92(1), 80-85.
- Yoon T.H. and Kim I.H. (2002): Phosphatidylcholine isolation from egg yolk phospholipids by high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 949(1-2), 209-216.

- Zare H.R., Namazian M. and Nasirizadeh N. (2005): Electrochemical behavior of quercetin: experimental and theoretical studies, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 584(2), 77-83.
- Zenkevich I.G., Eshchenko A.Y., Makarova S.V., Vitenberg A.G., Dobryakov Y.G. and Utsal V.A. (2007): Identification of the products of oxidation of quercetin by air oxygen at ambient temperature, *Molecules*, 12(3), 654-672.
- Zhang F., Zhang J., Tong C., Yadong C., Shulin Z. and Weiping L. (2013): Molecular interactions of benzophenone UV filters with humanserum albumin revealed by spectroscopic techniques and molecular modeling, *Journal of Hazardous Materials*, 263(Part 2), 618-626.
- Zhou A., Kikandi S. and Sadik O.A. (2007): Electrochemical degradation of quercetin: isolation and structural elucidation of the degradation products, *Electrochemistry Communications*, 9(9), 2246-2255.
- Zhou A. and Sadik O.A. (2008): Comparative analysis of quercetin oxidation by electrochemical, enzymatic, autoxidation, and free radical generation techniques: a mechanistic study, *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 56(24), 12081-12091.
- Zietz B (2006): An ultrafast spectroscopic and quantum-chemical study of the photochemistry of bilirubin initial processes in the phototherapy for neonatal jaundice, PhD thesis, Umeå University, Department of Chemistry, Biophysical Chemistry, Sweden.
- Zvezdanović J.B., Stanojević J.S., Marković D.Z. and Cvetković D.J. (2012a): Irreversible UV-induced quercetin and rutin degradation in solution studied by UV spectrophotometry and HPLC chromatography, *Journal of Serbian Chemical Society* 77(3) 297-312.
- Zvezdanović J.B., Marković D.Z., Cvetković D.J. and Stanojević J.S. (2012b): UV-induced change in the antioxidant activity of quercetin toward benzophenone-initiated lipid peroxidation, *Journal of Serbian Chemical Society*, 77(11), 1571-1588.

БИОГРАФИЈА

Јелена С. Станојевић је рођена 05.03.1987. године у Лесковцу. Основну школу „8. октобар” у Власотинцу и средњу Медицинску школу у Лесковцу завршила је као носилац Вукове дипломе.

Технолошки факултет у Лесковцу, смер Фармацеутско-козметичко инжењерство, уписала је 2006. године. Основне академске студије завршила је 2010. године просечном оценом 9,82, одбраном дипломског рада: „Стабилност флавонола и флавона према дејству UV-зрачења: случај кверцетина, морина и рутина” оценом 10. У току студија је била носилац више награда и признања – 2009. године, поводом 30 година рада факултета, добија захвалницу за значајан допринос развоју факултета и захвалницу за постигнут успех у IV години студија а 2010. године и признање Службеног гласника као најбољи студент завршне године основних студија. У току школске 2009/10. године била је стипендиста Фонда за младе таленте Републике Србије.

Докторске академске студије на матичном факултету уписала је 2010. године, на смеру Технолошко инжењерство. Била је стипендиста Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије. Као најбоља из области Материјали и хемијске технологије Републике Србије, почастована је личним уручењем уговора о стипендирању од стране Министра. Положила је све испите предвиђене планом и програмом са просечном оценом 10. За изузетан успех у току студија Српско хемијско друштво јој додељује специјално признање за 2011. годину.

Похађала је „Летњу школу масене спектрометрије” (7th International Mass Spectrometry School, 30.05-01.06.2012, Ниш), у организацији Природно-математичког факултета Ниш и Универзитета Пјер и Марија Кири (Universite Pierre et Marie Curie) из Париза. Обучена је за рад на LC-MS и GC-MS хроматографима.

Као стипендиста Министарства је била ангажована на извођењу лабораторијских вежби из предмета Биохемија, Колоидна хемија и Мембрански сепарациони процеси на Технолошком факултету у Лесковцу. Изабрана је у звање асистента априла 2015. године, на предметима Биохемија, Технологија природних органских производа, Технологија лековитог и зачинског биља, Колоидна хемија и Мембрански сепарациони процеси на Технолошком факултету у Лесковцу.

Боравила је на стручном усавршавању на Факултету за биохемију, биофизику и биотехнологију Универзитета у Кракову, Пољска (Faculty of Biochemistry, Biophysics and Biotechnology, Jagiellonian University of Krakow, Poland) фебруара 2015. године. Такође учествује у реализацији пројекта „Биљни и синтетички биоактивни производи новије генерације” (Ев. бр: ТР-34012 – од 2010. год), који финансира Министарство просвете, науке и технолошког развоја.

БИБЛИОГРАФИЈА

* Звездицом су обележени радови у вези са докторском дисертацијом

Радови објављени у истакнутом међународном часопису (M22)

1. Ljiljana P. Stanojević, Mihajlo Z. Stanković, Dragan J. Cvetković, Milorad D. Cakić, Dušica P. Ilić, Vesna D. Nikolić, **Jelena S. Stanojević**, The effect of extraction techniques on yield, extraction kinetics, and antioxidant activity of aqueous-methanolic extracts from nettle (*Urtica dioica* L.) leaves, *Separation Science and Technology*, 55(11) (2016) 1817-1829.

Рад у међународном часопису (M23)

2. * Jelena B. Zvezdanović, **Jelena S. Stanojević**, Dejan Z. Marković, Dragan J. Cvetković, Irreversible UV-induced quercetin and rutin degradation in solution studied by UV spectrophotometry and HPLC chromatography, *Journal of the Serbian Chemical Society*, 77 (3) (2012) 297-312.
3. * Jelena B. Zvezdanović, Dejan Z. Marković, Dragan J. Cvetković, **Jelena S. Stanojević**, UV-induced change in the antioxidant activity of quercetin toward benzophenone-initiated lipid peroxidation, *Journal of the Serbian Chemical Society*, 77 (11) (2012) 1571-1588.
4. * Saša R. Savić, **Jelena S. Stanojević**, Dejan Z. Marković, Živomir B. Petronijević, Quercetin oxidation by horseradish peroxidase: the effect of UV-B irradiation, *Hemijska Industrija*, 67 (3) (2013) 411-418.
5. * **Jelena S. Stanojević**, Dejan Z. Marković, Jelena B. Zvezdanović, Benzophenone suppression of quercetin antioxidant activity towards lipids under UV-B irradiation regime: detection by HPLC chromatography, *Journal of Chemistry*, 2013 (2013) 1-9. Article ID761675.
6. * **Jelena S. Stanojević**, Jelena B. Zvezdanović, Dejan Z. Marković, Bilirubin degradation in methanol induced by continuous UV-B irradiation: a study by UHPLC – ESI-MS method, *Pharmazie*, 70(4) (2015) 225-230.
7. * **Jelena S. Stanojević**, Jelena B. Zvezdanović, Dejan Z. Marković, Riboflavin degradation in the presence of quercetin in methanol under continuous UV-B irradiation: the ESI-MS-UHPLC analysis, *Monatshefte für Chemie - Chemical Monthly*, 146(11) (2015) 1787-1794.
8. Ljiljana P. Stanojević, **Jelena S. Stanojević**, Dragan J. Cvetković, Milorad D. Cakić, Dušica P. Ilić, Antioksidativna aktivnost etanolnog ekstrakta lista gajene jagode (*Fragariae folium*), *Hemijska industrija*, 69(5) (2015) 567-576.
9. Ljiljana P. Stanojevic, Zeljka R. Marjanovic-Balaban, Vesna D. Kalaba, **Jelena S. Stanojevic**, Dragan J. Cvetkovic, Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity of chamomile flowers essential oil (*Matricaria chamomilla* L.), *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 19(8) (2016) 2017-2028.

Рад у часопису националног значаја (M52)

10. **Jelena S. Stanojević**, Ljiljana P. Stanojević, Dragan J. Cvetković, Bojana R. Danilović, Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity of the turmeric essential oil (*Curcuma longa* L.), *Advanced technologies*, 4(2) (2015) 19-25.

11. Ljiljana P. Stanojević, Mihajlo Z. Stanković, **Jelena S. Stanojević**, Dragan J. Cvetković, Milorad D. Cakić, Dušica, P. Ilić, Vesna D. Nikolić, The effect of the extracton techniques on the yield, kinetics and total phenolic and favonoids content of aqueous-methanolic extracts from nettle root (*Urtica dioica* L.), *Technologica acta* (Journal of Science-professional from Chemistry and Technology), Tuzla, 9(1) (2016) 39-47.
12. * Jelena S. Stanojević, Dragan J. Cvetković, Jelena B. Zvezdanović, Ljiljana P. Stanojević, Milorad D. Cakić, Andrija A. Šmelcerović, Dejan Z. Marković, Quercetin degradation induced by continuous UV-B irradiation in the presence of benzophenone, *Advanced Technologies*, 6(1) (2017), Accepted for publication, UDC 547.972.3+547.572:543.42.

Предавање по позиву са скупа националног значаја штампано у целини (M61)

13. * Dragan Cvetković, Jelena Zvezdanović, Sanja Milenković, **Jelena Stanojević**, Dejan Marković, Fotoaktivni biljni pigmenti – ingredientni u fotoprotektivnim farmaceutsko-kozmetičkim formulacijama, VI simpozijum: „Promocija zaštite od sunca kao doprinos javnom zdravlju”, Medicinski fakultet u Nišu, 02.06.2012.

Саопштење са међународног скупа штампано у изводу (M34)

14. * **Jelena Stanojević**, Dejan Marković, Riboflavin-sensitized lipid oxidation induced by UV-B irradiation – a study by HPLC chromatography, 20th International Symposium on Separation Sciences (ISSS 2014), Prague, Czech Republic, 30.08-02.09.2014, Book of proceedings, p. 173.
15. * Jelena Zvezdanović, Dragan Cvetković, Sanja Petrović, **Jelena Stanojević**, Dejan Marković, Plant pigments interaction with UV-light: *in vivo* and *in vitro* approach, 3rd International Conference on Radiation and Applications in Various Fields of Research, Budva, Montenegro, June 8-12 2015, Book of Abstracts, RAD 2015, p. 505.
16. Ljiljana Stanojević, **Jelena Stanojević**, Dragan Cvetković, Antioxidant activity of hesperidin isolated from orange peel; 3rd Congress REDOX MEDICINE: Reactive species signaling, analytical methods, phytopharmacy, molecular mechanisms of disease; Belgrade, Serbia, September 25-26 2015, Book of Abstracts, SSMFRP-2015 P31, p. 52.
17. Ljiljana P. Stanojević, **Jelena S. Stanojević**, Bojana R. Danilović, Dragan J. Cvetković, Antimicrobial activity of the cumin essential oil (*Cuminum cyminum* L.), 13th Congress of nutrition (food and nutrition-A Roadmap to Better Health), Belgrade, Serbia, October 26-28 2016, Book of abstracts, p. 173.

Саопштења са скупа националног значаја штампана у изводу (M64)

18. * **Jelena Stanojević**, Jelena Zvezdanović, Dragan Cvetković, Dejan Marković, The degradation of quercetin and rutin in the solution induced by UV-irradiation, 9th Symposium "Novel Technologies and Economic Development", Leskovac, Serbia, October 21-22 2011, Book of abstracts, OHT-10/OCT-10, p. 86.
19. Dragan Cvetković, **Jelena Stanojević**, Ljiljana Stanojević, Zoran Ilić, Ljubomir Šunić, The determination of the β -carotene content in carrot root using HPLC method, 10th Symposium "Novel Technologies and Economic Development", Leskovac, Serbia, October 22-23 2013, Book of abstracts, OHT-5/OCT-5, p. 103.

20. * **Jelena S. Stanojević**, Dejan Z. Marković, Jelena B. Zvezdanović, Benzophenone suppression of the quercetin antioxidant activity towards lipids under UV-B irradiation regime, 10th Symposium "Novel Technologies and Economic Development", Leskovac, Serbia, October 22-23 2013, Book of abstracts, OHT-41/OCT-41, p. 139.
21. Dragan Cvetković, **Jelena Stanojević**, Ljiljana Stanojević, Dušica Ilić, Milorad Cakić, Antioxidant activity of ethanolic extracts of cultivated strawberries leaves (*Fragariae folium*) estimated by TBA-MDA test, 23rd Congress of Chemists and Technologists of Macedonia, Ohrid, Republic of Macedonia, October 08-11 2014, Book of abstracts, MPCE 002, p. 171.
22. Dragan Cvetković, Ljiljana Stanojević, Goran Nikolić, Jelena Zvezdanović, **Jelena Stanojević**, The antioxidant activity of the ethanolic extract from Guelder-rose leaves (*Viburnum opulus* L.); 11th Symposium "Novel Technologies and Economic Development", Leskovac, Serbia, October 23-24 2015, Book of abstracts, BPT-11/BFT-11, p. 49.
23. Dragan Cvetković, Ljiljana Stanojević, **Jelena Stanojević**, Chemical composition and antioxidant activity of turmeric essential oil (*Curcuma longa* L.), 11th Symposium "Novel Technologies and Economic Development", Leskovac, Serbia, October 23-24 2015, Book of abstracts, BPT-12/BFT-12, p. 50.
24. Dušica Ilić, Vesna Nikolić, Ljiljana Stanojević, Ana Tačić, **Jelena Stanojević**, Ljubiša Nikolić, The chemical composition of the essential oil from disintegrated and non-disintegrated fennel fruit (*Foeniculi fructus*), 11th Symposium "Novel Technologies and Economic Development", Leskovac, Serbia, October 23-24 2015, Book of abstracts, BPT-20/BFT-20, p. 58.
25. * **Jelena Stanojević**, Jelena Zvezdanović, Dragan Cvetković, Dejan Marković, Riboflavin degradation in the presence of quercetin in methanol under continuous UV-B irradiation: the ESI-MS-UHPLC analysis, 11th Symposium "Novel Technologies and Economic Development", Leskovac, Serbia, October 23-24 2015, Book of abstracts, BPT-27/BFT-27, p. 65.
26. Ljiljana Stanojević, Mihajlo Stanković, Dragan Cvetković, Milorad Cakić, **Jelena Stanojević**, Dušica Ilić, Vesna Nikolić, The effect of the extraction techniques on the yield, kinetics, total phenolic and flavonoids of aqueous-methanolic extracts from nettle root (*Urtica dioica* L.); 4th Scientific symposium "Environmental resources, sustainable development and food production" Tuzla, Bosnia and Herzegovina, November 12-13 2015, Book of Abstracts, OPORPH – 2015 P/2, p. xxx (In press).
27. Stanojević Ljiljana P., **Stanojević Jelena S.**, Cvetković Dragan J., Ilić Dušica P., Antioxidant activity of oregano essential oil (*Origanum vulgare* L.), 12th Symposium on the Flora of Southeastern Serbia and Neighboring Regions, Kopaonik Mt., Serbia, June 16-19 2016, Book of abstracts, p. 95.
28. Stojković Marijana, Nikolić Vesna, Stanojević Ljiljana, Nikolić Ljubiša, Tačić Ana, **Stanojević Jelena**, Danilović Bojana, The chemical composition and antimicrobial activity of essential oil from birch buds, 12th Symposium on the Flora of Southeastern Serbia and Neighboring Regions, Kopaonik Mt., Serbia, June 16-19 2016, Book of abstracts, p. 99.
29. Tačić Ana, Nikolić Vesna, Stanojević Ljiljana, **Stanojević Jelena**, Nikolić Ljubiša, Danilović Bojana, The chemical composition and antimicrobial activity of nutmeg (*Myristica fragrans* Houtt.) seeds essential oil, 12th Symposium on the Flora of Southeastern Serbia and Neighboring Regions, Kopaonik Mt., Serbia, June 16-19 2016, Book of abstracts, p. 108.

30. **Stanojević Jelena S.**, Stanojević Ljiljana P., Marjanović-Balaban Željka R., Kalaba Vesna D., Cvetković Dragan J., Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity of chamomile flowers essential oil (*Matricaria chamomilla* L.), 12th Symposium on the Flora of Southeastern Serbia and Neighboring Regions, Kopaonik Mt., Serbia, June 16-19 2016, Book of abstracts, p. 124.
31. Ljiljana Stanojević, Bojana Danilović, **Jelena Stanojević**, Dragan Cvetković, Dušica Ilić, Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil from cultivated (*Origanum vulgare* L.) and wild oregano (*Origanum minutiflorum* O. Schwarz & P.H. Davis), 24th Congress of Chemists and Technologists of Macedonia, Ohrid, Republic of Macedonia, September 11-14 2016, Book of Abstracts, MPCE 007, p. 211.
32. Ljiljana Stanojević, Dragan Cvetković, Bojana Danilović, Milorad Cakić, **Jelena Stanojević**, Antioxidant and antimicrobial activity of aqueous extracts from cultivated strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) leaves from Serbia, 24th Congress of Chemists and Technologists of Macedonia, Ohrid, Republic of Macedonia, September 11-14 2016, Book of Abstracts, MPCE 008, p. 212.
33. * **Jelena Stanojević**, Dragan Cvetković, Ljiljana Stanojević, Photosensitizing properties of riboflavin and benzophenone in the process of UV-A induced lipid peroxidation, 24th Congress of Chemists and Technologists of Macedonia, Ohrid, Republic of Macedonia, September 11-14 2016, Book of Abstracts, MPCE 009, p. 213.
34. Vesna Savić, Ljiljana Stanojević, Marija Tasić-Kostov, Ivana Arsić, **Jelena Stanojević**, Dragan Cvetković, Topical application of essential oils – test safety, 24th Congress of Chemists and Technologists of Macedonia, Ohrid, Republic of Macedonia, September 11-14 2016, Book of Abstracts, MPCE 011, p. 215.

Техничка решења: нови технолошки поступак (M83)

35. Sanja Petrović, Ljiljana Stanojević, Dragan Cvetković, **Jelena Stanojević**, Tehnološki postupak izolacije etarskog ulja iz cveta *Lonicera caprifolium* L., Ev. br. 06-2460/1 od 08.12.2014, NIO realizator: Tehnološki fakultet Leskovac, Participant-korisnik: Društvo za proizvodnju i trgovinu „DIAPHARM” DOO, Niš.
36. Ljiljana Stanojević, Dragan Cvetković, **Jelena Stanojević**, Milorad Cakić, Saša Savić, Snežana Ilić-Stojanović, Laboratorijski tehnološki postupak izolacije hesperidina iz kore slatke pomorandže (*Citrus sinensis* L.), karakterizacija i antioksidativna aktivnost, Ev. br. 04/1162/1 od 08.07.2016, NIO realizator: Tehnološki fakultet Leskovac, Participant-korisnik: Društvo za proizvodnju i trgovinu „DIAPHARM” DOO, Niš.

Техничка решења: нова метода (M85)

37. * **Jelena Stanojević**, Dejan Marković, HPLC metoda za detekciju lipidnih peroksida u rastvoru, Ev. br. 06-2181/1 od 28.12.2012, NIO realizator: Tehnološki fakultet Leskovac, Participant-korisnik: Društvo za proizvodnju i trgovinu „DIAPHARM” DOO, Niš.
38. **Jelena Stanojević**, Ljiljana Stanojević, Dragan Cvetković, Identifikacija bioaktivnih komponenti u ekstraktu lista koprive (*Urtica dioica*) elektrosprej-jonizacionom masenom spektrometrijom, Ev. br. 06-2362/1 od 20.12.2013, NIO realizator: Tehnološki fakultet Leskovac, Participant-korisnik: Društvo za proizvodnju i trgovinu „DIAPHARM” DOO, Niš.

39. Ljiljana Stanojević, **Jelena Stanojević**, Dragan Cvetković, Milorad Cakić, Dušica Ilić, Određivanje stepena inhibicije lipidne peroksidacije etanolnim ekstraktom lista jagode (*Fragariae folium*), Ev. br. 06-1154/1 od 02.07.2014, NIO realizator: Tehnološki fakultet Leskovac, Participant-korisnik: Društvo za proizvodnju i trgovinu „DIAPHARM” DOO, Niš.
40. **Jelena Stanojević**, Ljiljana Stanojević, Dragan Cvetković, Sanja Petrović, GC-MS analiza etarskog ulja ploda morača (*Foeniculi fructus*), Ev. br. 06-2461/1 od 08.12.2014, NIO realizator: Tehnološki fakultet Leskovac, Participant-korisnik: Društvo za proizvodnju i trgovinu „DIAPHARM” DOO, Niš.
41. Ljubiša Nikolić, Ana Tačić, Nikola Gligorijević, Milena Kostić, Nebojša Krunić, **Jelena Stanojević**, Vesna Nikolić, Razvoj MHE-GC-MS i GC-FID metode za određivanje monomera metilmetakrilata u hladno-polimerizujućem i toplo-polimerizujućem poli(metil metakrilatu), Ev. br. 04-1161/1 od 08.07.2016, NIO realizator: Tehnološki fakultet Leskovac, Participant-korisnik: Društvo za proizvodnju i trgovinu „DIAPHARM” DOO, Niš.

Некатегорисани радови:

42. Ljiljana P. Stanojević, Mihajlo Z. Stanković, Dragan J. Cvetković, Bojana R. Danilović, **Jelena S. Stanojević**, Dill (*Anethum graveolens* L.) seeds essential oil as a potential natural antioxidant and antimicrobial agent, *Biologica Nyssana*, 7(1) (2016) 31-39.
43. Ljiljana P. Stanojević, **Jelena S. Stanojević**, Dragan J. Cvetković, Dušica P. Ilić, Antioxidant activity of oregano essential oil (*Origanum vulgare* L.), *Biologica Nyssana*, 7(2) (2016) 131-139.

Помоћни уџбеник:

44. Љиљана П. Станојевић, Михајло З. Станковић, **Јелена С. Станојевић**, Практикум из биохемије, Технолошки факултет Лесковац, 2017, ISBN 978-86-89429-17-6.

ТЕХНОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ
ЛЕСКОВАЦ

Примљено:	28. 10. 2017.	
Орган:	Б:	Чланост:
04	699/11	-

УНИВЕРЗИТЕТ У НИШУ
ТЕХНОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ ЛЕСКОВАЦ
НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ

Предмет: Извештај Комисије за оцену и одбрану докторске дисертације Јелене Станојевић

На седници Наставно-научног већа Технолошког факултета у Лесковцу бр. 4/22-XVI одржаној 29.03.2017. године, именовани смо за чланове Комисије за оцену и одбрану докторске дисертације Јелене Станојевић, под насловом „Фотосензибилизована оксидација липида у раствору индукована континуалним UV-стресом у присуству кверцетина“. После прегледа рада, подносимо следећи:

ИЗВЕШТАЈ

Докторска дисертација Јелене Станојевић, дипломираног инжењера технологије фармацеутско-козметичког инжењерства изложена је на 275 страна формата А4 (проред 1,5), садржи 116 слика и графичких приказа и 9 табела. Рад је подељен на следећа поглавља: *Увод* (три стране), *Теоријски део* (58 страна), поглавље о теоретским основама коришћених метода – *Коришћене методе* (16 страна), *Експериментални део* (11 страна), *Резултати* (85 страна), *Дискусија* (76 страна), *Закључци* (8 страна), *Литература* (18 страна и 335 цитираних референци). Поред наведеног докторска дисертација садржи *Податке о докторској дисертацији* на српском и енглеском језику (по две стране), *Изразе захвалности* (једна страна), *Листу скраћеница и симбола* (три стране), *Биографију* (једна страна) и *Библиографију* (5 страна).

У *Уводу* је у најкраћем дефинисан проблем који је довео до рада на овој тези. Појава малигнитета као последица хроничног (продуженог) излагања организма, посебно коже, дејству сунчевог зрачења у последњих неколико година је алармантно порасла. За овако нешто је одговорно UV зрачење којег, услед појаве „озонских рупа“, има све више у спектру сунчевог зрачења које допире до површине Земље. И док озонски омотач још увек успешно задржава најштетнију, UV-C компоненту, све присутнији UV-B зраци као најактивнији конституент UV области су нешто што забрињава како због веће генотоксичности у односу на UV-A зраке тако и због њихове способности да иницирају туморогенезу. Са друге стране, UV-A зраци иако најмање енергије продиру дубље у кожу

и поспешују напредовање тумора. Предуслов за испољавање штетних ефеката UV зрака у кожи је њихова апсорпција од стране ендогених UV апсорбера, посебно из реда фотосензибилизатора (нпр. порфирина, фламини, ...). Ове молекуле карактерише способност да из својих побуђених стања након апсорпције фотона вишак енергије преносе на околне молекуле притом их побуђујући или сензибилишући, уз неизбежно генерисање слободних радикала. Иако нормално присутни у ткивима и органима људи, слободни радикали (нарочито реактивне кисеоничне врсте – ROS) своје штетно дејство испољавају према примарним биомолекулима: протеинима, угљеним хидратима, нуклеинским киселинама и липидима као „метама“, узрокујући разне поремећаје у организму. Један од дегенеративних и неизбежних процеса који је немогуће зауставити а кога иницирају како ROS врсте тако и ендогени фотосензибилизатори је липидна пероксидација (ЛП). Ову оксидацију незасићених компоненти ћелијских мембрана је међутим могуће само делимично контролисати дејством антиоксиданаса.

Који сензибилизатори (синтетски – бензофенон или природни, ендогени – билирубин, рибофлавин) су најефикаснији у иницирању процеса ЛП? Да ли је фотосензибилизатор процес ЛП заиста могуће контролисати? И ако јесте како то чине егзогени антиоксиданси (конкретно флавонол кверцетин (QC) из класе флавоноида)? је нешто на шта је кандидат пробао да одговори. С обзиром на изузетну сложеност реалног система, проучаваном систему у овом раду је „одузета“ молекуларна организација као и велики део реалног хемијског састава (други пигменти, протеини, итд.). Зато је систем фотосензибилизатор + антиоксиданс + липиди (смеша фосфолипида – PL90) посматран у најједноставнијем могућем окружењу – метанолном раствору и праћен одговор сваке од компонената на продужено деловање UV (-А и -В) зрачења. У циљу извођења недвосмислених закључака кандидат је користио хроматографске и спектроскопске технике (RP-HPLC, UHPLC-ESI-MS и EPR *spin trapping*).

Теоријски део је генерално подељен на пет под-целина. Први део се бави општим карактеристикама UV-зрачења и његовим најприсутнијим ефектима (међу које спада формирање слободних радикала и осталих високо-реактивних ROS врста) на људе и биљни свет. Други део се тиче антиоксиданаса, њихових особина и начина деловања, са посебним освртом на флавоноиде, као репрезентативне примере природних антиоксиданаса из групе фенолних једињења. Истакнута је веза између структуре флавоноида, њихове антиоксидативне односно прооксидативне активности и спектралних карактеристика. Трећи део је посвећен основама фотохемије и селекционим правилима који детерминишу електронске прелазе у атомима и молекулима. У четвртм делу је дефинисан процес липидне пероксидације, прегледом механизма преко којих се одвија (са нарочитом нагласком на фотосензибилизовану пероксидацију), начина његове инхибиције преко односа флавоноиди – липидна пероксидација као и метода за детекцију створених финалних продуката, липидних пероксида. Последњи део је посвећен фотосензибилизаторима проучаваним у овом раду (бензофенон – BZP, билирубин – BRB, рибофлавин – RFL), њиховим физичко-хемијским и фотосензибилизаторским особинама.

У поглављу *Коришћене методе* кандидат даје теоријске основе хроматографских и спектроскопских метода – HPLC хроматографије, UHPLC хроматографије-ESI-MS спектрометрије и EPR спектроскопије, коришћених у овом раду за раздвајање, идентификацију и праћење кинетике UV индукованих промена компонената проучаваних смеша, детекцију и идентификацију потенцијалних деградационих продуката и генерисаних ROS врста, респективно. Сматрамо да је овако издвојено поглавље о теоријским основама коришћених експерименталних метода не само оправдано него и изузетно корисно за боље разумевање добијених резултата.

У *Експерименталном делу* описани су поступци и процедуре (заједно са припадајућом опремом и апаратима) који се тичу припреме и саме анализе узорака за планиране експерименте. Експерименталне методе (посебно хроматографске) за сваку од проучаваних смеша фотосензибилизатора, антиоксиданса и липида се битно разликују по експерименталним детаљима. Зато је за сваку понаособ било неопходно развити посебан, аутономан поступак анализе и кандидат је у том смислу уложио несумњив али и успешан напор (посебно RP-HPLC хроматографија проучаваних смеша).

У поглављу *Резултати* приказани су резултати добијени одговарајућим техникама за сваки од проучаваних система (BZP-QC-PL90, BRB-QC-PL90, RFL-QC-PL90, BRB-RFL-QC-PL90 – „бинарна смеша“ и BZP-BRB-RFL-QC-PL90 – „тернарна смеша“) појединачно. Дато је укупно 64 графичких приказа, већина у виду груписаних хроматограма, спектара и кинетике UV индукованих промена појединачних компоненти као и 8 табела. Одговарајуће хроматографске и спектроскопске методе коришћене за карактеризацију сваког од проучаваних система су приказане на једном месту. Наиме, компоненте свих проучаваних смеша су раздвојене, идентификоване на основу својих UV-VIS спектара а потом је кинетика деградације сензибилизатора и антиоксиданса односно настанка липидних пероксида праћена преко смањења односно пораста пикова на добијеним HPLC хроматограмима. Недвосмислену идентификацију деградационих продуката (BRB, RFL) је омогућила UHPLC хроматографија-ESI-MS спектрометрија, док је детекција супероксид анјон радикала и синглетног кисеоника у смешама BZP-QC и RFL-QC постигнута EPR спектроскопијом.

У поглављу *Дискусија* кандидат је на 76 страна дискутовао добијене резултате, редоследом датим у *Резултатима*.

У оквиру резултата добијених HPLC хроматографијом дискутована је међусобна интеракција компонената проучаваних смеша (фотосензибилизатор + антиоксиданс + липиди) преко промене површина пикова истих. Фотодеградација сензибилизатора и антиоксиданса индукована UV светлошћу, с једне стране је доведена у везу са иницирањем и/или успоравањем/заустављањем процеса ЛП, с друге. Тестом „конјуговани диени“ доказано је да BZP и RFL као одлични сензибилизатори ефикасно иницирају процес ЛП. Сем тога, у условима примењеног континуалног UV-стреса долази до додатне деградације (фотолизе, *bleaching*-а) коришћеног антиоксиданса (QC) због његове појачане

антиоксидативне активности кроз тзв. *chain-breaking* ефекат (тј. супресију ширења липидног пероксидног ланца).

Дубљи увид у међусобну интеракцију фотосензибилизатора и антиоксиданса недвосмисленом идентификацијом њихових деградационих продуката пружио је УНPLC-хроматографија-ESI-MS спектрометрија.

EPR спектроскопијом су потврђени и пре свега разјашњени резултати добијени хроматографским методама, идентификовањем супероксид анјон радикала и синглетног кисеоника што је омогућило класификовање сензибилизатора као Тип I и Тип II.

У *Закључцима* су концизно сумирани добијени резултати, и то сваки од проучаваних система, са методама коришћеним за њихову карактеризацију. На самом крају је дат „завршни закључак“.

ЗАКЉУЧАК


Прегледом докторске дисертације, спроведених истраживања и резултата, чланови Комисије констатују следеће:

- ❖ Кандидат је испунио захтеве и циљеве истраживања постављене у раду и приликом пријаве докторске дисертације;
- ❖ Методологија разматрања, анализе и решавања проблема су на потребном научном и стручном нивоу;
- ❖ Развијене су нове хроматографске методе за анализу коришћених система (фотосензибилизатор + антиоксиданс + липиди);
- ❖ Разјашњена је фотохемија коришћених сензибилизатора;
- ❖ Добијени резултати, поред научног имају и биомедицински значај почев од чињенице да CXL (*Corneal Collagen Crosslinking*) – у скорије време развијен метод лечења кератоконуса почива на UV индукованој деградацији рибофлавина. Затим следи фотооксидација билирубина, до које дефинитивно долази *in vivo*, при чему су образовани дипироли излучиви преко бубрега. Потом евалуација антиоксидативне активности кверцетина где је закључено да исти делује синергизмом између превентивног (апсорпције зрачења) и *chain-breaking* (хватањем ROS врста) механизма деловања. И на крају, резултати добијени проучавањем „бинарне“ и „тернарне“ смеше, који нуде начин побољшања ефикасности фототерапије преко системске администрације одговарајућих агенса, конкретно рибофлавина у „борби“ са повећаном количином билирубина;
- ❖ Дисертација представља самосталан и оригиналан научни допринос кандидата
- ❖ Резултати презентовани у овој докторској дисертацији су већ доступни широкој научној јавности јер је кандидат из области докторске дисертације објавио 6 радова у часописима међународног значаја (M23), два рада саопштио на међународном скупу штампаном у изводу (M34), четири рада на скуповима од националног значаја штампаних у изводу (M64,) док је један рад прихваћен за


објављивање у часопису националног значаја (M52). Остали радови из биографије кандидата који имају више или мање везе са овом докторском дисертацијом (један рад категорије M22, 2 рада категорије M23, 2 рада категорије M52, један рад категорије M61, 2 рада категорије M34, 13 радова категорије M64, 2 рада категорије M83, 5 радова категорије M85, 2 некатегорисана рада и ко-ауторство на једном помоћном уџбенику) дата су у Прилогу.

На основу изложеног, чланови Комисије за преглед и оцену докторске дисертације Јелене Станојевић, под насловом: „Фотосензибилизована оксидација липида у раствору индукована континуалним UV-стресом у присуству кверцетина“, позитивно оцењују рад и предлажу Наставно-научном већу Технолошког факултета у Лесковцу да га прихвати и да сагласност за његову одбрану.

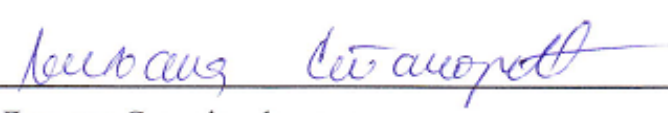
Комисија:


проф. др Милорад Накић, председник
Технолошки факултет у Лесковцу, Универзитет у Нишу


др Драган Цветковић, доцент, ментор
Технолошки факултет у Лесковцу, Универзитет у Нишу


др Андрија Шмелцеровић, ванредни професор, члан
Медицински факултет, Универзитет у Нишу


др Јелена Звездановић, доцент, члан
Технолошки факултет у Лесковцу, Универзитет у Нишу


др Љиљана Станојевић, доцент, члан
Технолошки факултет у Лесковцу, Универзитет у Нишу

ПРИЛОГ

БИБЛИОГРАФИЈА

* Звездицом су обележени радови у вези са докторском дисертацијом

Радови објављени у истакнутом међународном часопису (M22)

1. Ljiljana P. Stanojević, Mihajlo Z. Stanković, Dragan J. Cvetković, Milorad D. Cakić, Dušica P. Ilić, Vesna D. Nikolić, **Jelena S. Stanojević**, The effect of extraction techniques on yield, extraction kinetics, and antioxidant activity of aqueous-methanolic extracts from nettle (*Urtica dioica* L.) leaves, Separation Science and Technology, 55(11) (2016) 1817-1829.

Рад у међународном часопису (M23)

2. * Jelena B. Zvezdanović, **Jelena S. Stanojević**, Dejan Z. Marković, Dragan J. Cvetković, Irreversible UV-induced quercetin and rutin degradation in solution studied by UV

Рад у часопису националног значаја (M52)

10. **Jelena S. Stanojević**, Ljiljana P. Stanojević, Dragan J. Cvetković, Bojana R. Danilović, Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity of the turmeric essential oil (*Curcuma longa* L.), *Advanced technologies*, 4(2) (2015) 19-25.
11. Ljiljana P. Stanojević, Mihajlo Z. Stanković, **Jelena S. Stanojević**, Dragan J. Cvetković, Milorad D. Cakić, Dušica P. Ilić, Vesna D. Nikolić, The effect of the extraction techniques on the yield, kinetics and total phenolic and flavonoids content of aqueous-methanolic extracts from nettle root (*Urtica dioica* L.), *Technologica acta (Journal of Science-professional from Chemistry and Technology)*, Tuzla, 9(1) (2016) 39-47.
12. * **Jelena S. Stanojević**, Dragan J. Cvetković, Jelena B. Zvezdanović, Ljiljana P. Stanojević, Milorad D. Cakić, Andrija A. Šmelcerović, Dejan Z. Marković, Quercetin degradation induced by continuous UV-B irradiation in the presence of benzophenone, *Advanced Technologies*, 6(1) (2017), ADVTECHN-1-17/7, Accepted for publication. UDC 547.972.3 + 547.572 : 543.42

Предавање по позиву са скупа националног значаја штампано у целини (M61)

13. * Dragan Cvetković, Jelena Zvezdanović, Sanja Milenković, **Jelena Stanojević**, Dejan Marković, Fotoaktivni biljni pigmenti – ingredientni u fotoprotektivnim farmaceutsko-kozmetičkim formulacijama, VI simpozijum: „Promocija zaštite od sunca kao doprinos javnom zdravlju“, Medicinski fakultet u Nišu, 02.06.2012.

Саопштење са међународног скупа штампано у изводу (M34)

14. * **Jelena Stanojević**, Dejan Marković, Riboflavin-sensitized lipid oxidation induced by UV-B irradiation – a study by HPLC chromatography, 20th International Symposium on Separation Sciences (ISSS 2014), Prague, Czech Republic, 30.08-02.09.2014, Book of proceedings, p. 173.
15. * Jelena Zvezdanović, Dragan Cvetković, Sanja Petrović, **Jelena Stanojević**, Dejan Marković, Plant pigments interaction with UV-light: *in vivo* and *in vitro* approach, 3rd International Conference on Radiation and Applications in Various Fields of Research, Budva, Montenegro, June 8-12 2015, Book of Abstracts, RAD 2015, p. 505.
16. Ljiljana Stanojević, **Jelena Stanojević**, Dragan Cvetković, Antioxidant activity of hesperidin isolated from orange peel; 3rd Congress REDOX MEDICINE: Reactive species signaling, analytical methods, phytopharmacy, molecular mechanisms of disease; Belgrade, Serbia, September 25-26 2015, Book of Abstracts, SSMFRP-2015 P31, p. 52.
17. Ljiljana P. Stanojević, **Jelena S. Stanojević**, Bojana R. Danilović, Dragan J. Cvetković, Antimicrobial activity of the cumin essential oil (*Cuminum cyminum* L.), 13th Congress of nutrition (food and nutrition-A Roadmap to Better Health), Belgrade, Serbia, October 26-28 2016, Book of abstracts, p. 173.

Саопштења са скупа националног значаја штампана у изводу (M64)

18. * **Jelena Stanojević**, Jelena Zvezdanović, Dragan Cvetković, Dejan Marković, The degradation of quercetin and rutin in the solution induced by UV-irradiation, 9th

- Symposium "Novel Technologies and Economic Development", Leskovac, Serbia, October 21-22 2011, Book of abstracts, OHT-10/OCT-10, p. 86.
19. Dragan Cvetković, **Jelena Stanojević**, Ljiljana Stanojević, Zoran Ilić, Ljubomir Šunić, The determination of the β -carotene content in carrot root using HPLC method, 10th Symposium "Novel Technologies and Economic Development", Leskovac, Serbia, October 22-23 2013, Book of abstracts, OHT-5/OCT-5, p. 103.
 20. * **Jelena S. Stanojević**, Dejan Z. Marković, Jelena B. Zvezdanović, Benzophenone suppression of the quercetin antioxidant activity towards lipids under UV-B irradiation regime, 10th Symposium "Novel Technologies and Economic Development", Leskovac, Serbia, October 22-23 2013, Book of abstracts, OHT-41/OCT-41, p. 139.
 21. Dragan Cvetković, **Jelena Stanojević**, Ljiljana Stanojević, Dušica Ilić, Milorad Cakić, Antioxidant activity of ethanolic extracts of cultivated strawberries leaves (*Fragariae folium*) estimated by TBA-MDA test, 23rd Congress of Chemists and Technologists of Macedonia, Ohrid, Republic of Macedonia, October 08-11 2014, Book of abstracts, MPCE 002, p. 171.
 22. Dragan Cvetković, Ljiljana Stanojević, Goran Nikolić, Jelena Zvezdanović, **Jelena Stanojević**, The antioxidant activity of the ethanolic extract from Guelder-rose leaves (*Viburnum opulus* L.); 11th Symposium "Novel Technologies and Economic Development", Leskovac, Serbia, October 23-24 2015, Book of abstracts, BPT-11/BFT-11, p. 49.
 23. Dragan Cvetković, Ljiljana Stanojević, **Jelena Stanojević**, Chemical composition and antioxidant activity of turmeric essential oil (*Curcuma longa* L.), 11th Symposium "Novel Technologies and Economic Development", Leskovac, Serbia, October 23-24 2015, Book of abstracts, BPT-12/BFT-12, p. 50.
 24. Dušica Ilić, Vesna Nikolić, Ljiljana Stanojević, Ana Tačić, **Jelena Stanojević**, Ljubiša Nikolić, The chemical composition of the essential oil from disintegrated and non-disintegrated fennel fruit (*Foeniculi fructus*), 11th Symposium "Novel Technologies and Economic Development", Leskovac, Serbia, October 23-24 2015, Book of abstracts, BPT-20/BFT-20, p. 58.
 25. * **Jelena Stanojević**, Jelena Zvezdanović, Dragan Cvetković, Dejan Marković, Riboflavin degradation in the presence of quercetin in methanol under continuous UV-B irradiation: the ESI-MS-UHPLC analysis, 11th Symposium "Novel Technologies and Economic Development", Leskovac, Serbia, October 23-24 2015, Book of abstracts, BPT-27/BFT-27, p. 65.
 26. Ljiljana Stanojević, Mihajlo Stanković, Dragan Cvetković, Milorad Cakić, **Jelena Stanojević**, Dušica Ilić, Vesna Nikolić, The effect of the extraction techniques on the yield, kinetics, total phenolic and flavonoids of aqueous-methanolic extracts from nettle root (*Urtica dioica* L.); 4th Scientific symposium "Environmental resources, sustainable development and food production" Tuzla, Bosnia and Herzegovina, November 12-13 2015, Book of Abstracts, OPORPH – 2015 P/2, p. xxx (In press).
 27. Stanojević Ljiljana P., **Stanojević Jelena S.**, Cvetković Dragan J., Ilić Dušica P., Antioxidant activity of oregano essential oil (*Origanum vulgare* L.), 12th Symposium on the Flora of Southeastern Serbia and Neighboring Regions, Kopaonik Mt., Serbia, June 16-19 2016, Book of abstracts, p. 95.
 28. Stojković Marijana, Nikolić Vesna, Stanojević Ljiljana, Nikolić Ljubiša, Tačić Ana, **Stanojević Jelena**, Danilović Bojana, The chemical composition and antimicrobial

activity of essential oil from birch buds, 12th Symposium on the Flora of Southeastern Serbia and Neighboring Regions, Kopaonik Mt., Serbia, June 16-19 2016, Book of abstracts, p. 99.

29. Tačić Ana, Nikolić Vesna, Stanojević Ljiljana, **Stanojević Jelena**, Nikolić Ljubiša, Danilović Bojana, The chemical composition and antimicrobial activity of nutmeg (*Myristica fragrans* Houtt.) seeds essential oil, 12th Symposium on the Flora of Southeastern Serbia and Neighboring Regions, Kopaonik Mt., Serbia, June 16-19 2016, Book of abstracts, p. 108.
30. **Stanojević Jelena S.**, Stanojević Ljiljana P., Marjanović-Balaban Željka R., Kalaba Vesna D., Cvetković Dragan J., Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity of chamomile flowers essential oil (*Matricaria chamomilla* L.), 12th Symposium on the Flora of Southeastern Serbia and Neighboring Regions, Kopaonik Mt., Serbia, June 16-19 2016, Book of abstracts, p. 124.
31. Ljiljana Stanojević, Bojana Danilović, **Jelena Stanojević**, Dragan Cvetković, Dušica Ilić, Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil from cultivated (*Origanum vulgare* L.) and wild oregano (*Origanum minutiflorum* O. Schwarz & P.H. Davis), 24th Congress of Chemists and Technologists of Macedonia, Ohrid, Republic of Macedonia, September 11-14 2016, Book of Abstracts, MPCE 007, p. 211.
32. Ljiljana Stanojević, Dragan Cvetković, Bojana Danilović, Milorad Cakić, **Jelena Stanojević**, Antioxidant and antimicrobial activity of aqueous extracts from cultivated strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) leaves from Serbia, 24th Congress of Chemists and Technologists of Macedonia, Ohrid, Republic of Macedonia, September 11-14 2016, Book of Abstracts, MPCE 008, p. 212.
33. * **Jelena Stanojević**, Dragan Cvetković, Ljiljana Stanojević, Photosensitizing properties of riboflavin and benzophenone in the process of UV-A induced lipid peroxidation, 24th Congress of Chemists and Technologists of Macedonia, Ohrid, Republic of Macedonia, September 11-14 2016, Book of Abstracts, MPCE 009, p. 213.
34. Vesna Savić, Ljiljana Stanojević, Marija Tasić-Kostov, Ivana Arsić, **Jelena Stanojević**, Dragan Cvetković, Topical application of essential oils – test safety, 24th Congress of Chemists and Technologists of Macedonia, Ohrid, Republic of Macedonia, September 11-14 2016, Book of Abstracts, MPCE 011, p. 215.

Техничка решења: нови технолошки поступак (M83)

35. Sanja Petrović, Ljiljana Stanojević, Dragan Cvetković, **Jelena Stanojević**, Tehnološki postupak izolacije etarskog ulja iz cveta *Lonicera caprifolium* L., Ev. br. 06-2460/1 od 08.12.2014, NIO realizator: Tehnološki fakultet Leskovac, Participant-korisnik: Društvo za proizvodnju i trgovinu „DIAPHARM“ DOO, Niš.
36. Ljiljana Stanojević, Dragan Cvetković, **Jelena Stanojević**, Milorad Cakić, Saša Savić, Snežana Ilić-Stojanović, Laboratorijski tehnološki postupak izolacije hesperidina iz kore slatke pomorandže (*Citrus sinensis* L.), karakterizacija i antioksidativna aktivnost, Ev. br. 04/1162/1 od 08.07.2016, NIO realizator: Tehnološki fakultet Leskovac, Participant-korisnik: Društvo za proizvodnju i trgovinu „DIAPHARM“ DOO, Niš.

Техничка решења: нова метода (M85)

37. * **Jelena Stanojević**, Dejan Marković, HPLC metoda za detekciju lipidnih peroksida u rastvoru, Ev. br. 06-2181/1 od 28.12.2012, NIO realizator: Tehnološki fakultet Leskovac, Participant-korisnik: Društvo za proizvodnju i trgovinu „DIAPHARM“ DOO, Niš.
38. **Jelena Stanojević**, Ljiljana Stanojević, Dragan Cvetković, Identifikacija bioaktivnih komponenti u ekstraktu lista koprive (*Urtica dioica*) elektrosprej-jonizacionom masenom spektrometrijom, Ev. br. 06-2362/1 od 20.12.2013, NIO realizator: Tehnološki fakultet Leskovac, Participant-korisnik: Društvo za proizvodnju i trgovinu „DIAPHARM“ DOO, Niš.
39. Ljiljana Stanojević, **Jelena Stanojević**, Dragan Cvetković, Milorad Cakić, Dušica Ilić, Određivanje stepena inhibicije lipidne peroksidacije etanolnim ekstraktom lista jagode (*Fragariae folium*), Ev. br. 06-1154/1 od 02.07.2014, NIO realizator: Tehnološki fakultet Leskovac, Participant-korisnik: Društvo za proizvodnju i trgovinu „DIAPHARM“ DOO, Niš.
40. **Jelena Stanojević**, Ljiljana Stanojević, Dragan Cvetković, Sanja Petrović, GC-MS analiza etarskog ulja ploda morača (*Foeniculi fructus*), Ev. br. 06-2461/1 od 08.12.2014, NIO realizator: Tehnološki fakultet Leskovac, Participant-korisnik: Društvo za proizvodnju i trgovinu „DIAPHARM“ DOO, Niš.
41. Ljubiša Nikolić, Ana Tačić, Nikola Gligorijević, Milena Kostić, Nebojša Krunic, **Jelena Stanojević**, Vesna Nikolić, Razvoj MHE-GC-MS i GC-FID metode za određivanje monomera metilmetakrilata u hladno-polimerizujućem i toplo-polimerizujućem poli(metil metakrilatu), Ev. br. 04-1161/1 od 08.07.2016, NIO realizator: Tehnološki fakultet Leskovac, Participant-korisnik: Društvo za proizvodnju i trgovinu „DIAPHARM“ DOO, Niš.

Некатегорисани радови:

42. Ljiljana P. Stanojević, Mihajlo Z. Stanković, Dragan J. Cvetković, Bojana R. Danilović, **Jelena S. Stanojević**, Dill (*Anethum graveolens* L.) seeds essential oil as a potential natural antioxidant and antimicrobial agent, *Biologica Nyssana*, 7(1) (2016) 31-39.
43. Ljiljana P. Stanojević, **Jelena S. Stanojević**, Dragan J. Cvetković, Dušica P. Ilić, Antioxidant activity of oregano essential oil (*Origanum vulgare* L.), *Biologica Nyssana*, 7(2) (2016) 131-139.

Помоћни уџбеник:

44. Љиљана П. Станојевић, Михајло З. Станковић, **Јелена С. Станојевић**, Практикум из биохемије, Технолошки факултет Лесковац, 2017, ISBN 978-86-89429-17-6.



Универзитет у Нишу

ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Изјављујем да је докторска дисертација, под насловом

**ФОТОСЕНЗИБИЛИЗОВАНА ОКСИДАЦИЈА ЛИПИДА У РАСТВОРУ
ИНДУКОВАНА КОНТИНУАЛНИМ UV-СТРЕСОМ У ПРИСУСТВУ
КВЕРЦЕТИНА**

која је одбрањена на Технолошком факултету Универзитета у Нишу:

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да ову дисертацију, ни у целини, нити у деловима, нисам пријављивао/ла на другим факултетима, нити универзитетима;
- да нисам повредио/ла ауторска права, нити злоупотребио/ла 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 Лесковцу, _____

Потпис аутора дисертације:

Јелена Станојевић
Др Јелена С. Станојевић



Универзитет у Нишу

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

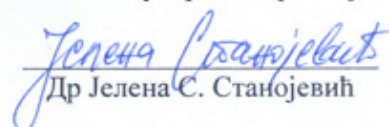
Наслов дисертације:

**ФОТОСЕНЗИБИЛИЗОВАНА ОКСИДАЦИЈА ЛИПИДА У РАСТВОРУ
ИНДУКОВАНА КОНТИНУАЛНИМ UV-СТРЕСОМ У ПРИСУСТВУ
КВЕРЦЕТИНА**

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

У Лесковцу, _____.

Потпис аутора дисертације:


Др Јелена С. Станојевић



Универзитет у Нишу

ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

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

ФОТОСЕНЗИБИЛИЗОВАНА ОКСИДАЦИЈА ЛИПИДА У РАСТВОРУ ИНДУКОВАНА КОНТИНУАЛНИМ UV-СТРЕСОМ У ПРИСУСТВУ КВЕРЦЕТИНА

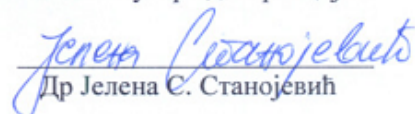
Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском облику, погодном за трајно архивирање.

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/ла.

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 Лесковцу, _____.

Потпис аутора дисертације:


Др Јелена С. Станојевић