

UNIVERZITET U BEOGRADU
FAKULTET ZA FIZIČKU HEMIJU

Leposava A. Pavun

**SPEKTROFLUORIMETRIJSKO
ISPITIVANJE KOMPLEKSNIH
JEDINJENJA MORINA, HESPERIDINA I
KVERCETINA SA ALUMINIJUMOM**

doktorska disertacija

Beograd, 2013

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF PHYSICAL CHEMISTRY

Leposava A. Pavun

**SPECTROFLUORIMETRIC
INVESTIGATION OF COMPLEX
COMPOUNDS OF MORIN, HESPERIDIN
AND QUERCETIN WITH ALUMINIUM**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2013

Mentori:

dr Jasmina Dimitrić Marković, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu, Fakultet za fizičku hemiju

dr Milena Jelikić-Stankov, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet

Članovi komisije:

dr Miroslav Kuzmanović, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu, Fakultet za fizičku hemiju

Datum odbrane:

Ova disertacija urađena je u Laboratoriji Odseka za nauku o živim sistemima Instituta za multidisciplinarna istraživanja Univerziteta u Beogradu.

Izuzetno mi je zadovoljstvo da izrazim zahvalnost mom mentoru, prof. dr Mileni Jelikić Stankov, redovnom profesoru Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, koja mi je pružila nesebičnu pomoć i podršku tokom izrade i pisanja ove disertacije.

Iskreno se zahvaljujem svom mentoru, prof. dr Jasmini Dimitrić Marković, vanrednom profesoru Fakulteta za fizičku hemiju Univerziteta u Beogradu, na korisnim savetima i sugestijama kao i na pomoći tokom izrade i pisanja disertacije.

Zahvaljujem se prof. dr Miroslavu Kuzmanoviću, vanrednom profesoru Fakulteta za fizičku hemiju Univerziteta u Beogradu, na korisnim primedbama i sugestijama.

Prof. dr Predragu Đurđeviću, redovnom profesoru Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Kragujevcu veliko hvala na pomoći, savetima i sugestijama tokom izrade teze.

Mojoj koleginici dr Danieli Đikanović Golubović iz Instituta za multidisciplinarna istraživanja, i kolegi Andriji Ćiriću sa Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Kragujevcu, zahvaljujem se na ogromnoj pomoći u eksperimentalnom radu.

Prof. dr Dušanu Maleševu, redovnom profesoru u penziji Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, puno hvala na korisnim primedbama i sugestijama tokom izrade i pisanja teze.

Hvala profesorima i saradnicima Katedre za fizičku hemiju i instrumentalne metode Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu na kolegijalnosti i podršci.

Mojoj porodici, Siniši, Sonji i Kseniji beskonačno hvala za nesebičnu podršku, pomoć i razumevanje bez koje ne bih uspela sve što sam postigla u životu.

Leposava Pavun

Naslov doktorske disertacije:

SPEKTROFLUORIMETRIJSKO ISPITIVANJE KOMPLEKSNIH JEDINJENJA MORINA, HESPERIDINA I KVERCETINA SA ALUMINIJUMOM

Rezime:

Morin, hesperidin i kvercetin pripadaju flavonoidima, koji imaju značajnu biološku i fiziološku aktivnost, zbog čega je bilo potrebno razviti jednostavne, precizne i tačne metode za njihovo određivanje u različitim uzorcima.

Predložena je spektrofotometrijska metoda za određivanje morina u 70 v/v % etanolu i u humanom serumu, zasnovana na fluorescenciji kompleksa aluminijum(III)–morin. Ovaj kompleks ima sastav aluminijum(III) : morin = 1 : 2. Formirani kompleks je stabilan u *pH* oblasti od 3,0 do 6,0 i pokazuje intenzivnu fluorescenciju na $\lambda_{em} = 500$ nm pri ekscitaciji na $\lambda_{ex} = 410$ nm. Intenzitet fluorescencije nastalog kompleksa zavisi od *pH* vrednosti rastvora, i najveći je na *pH* = 4,40, a vrednost konstante stabilnosti na ovoj vrednosti *pH* iznosi $\log \beta_2 = 16,96$. Dobijena je linearna zavisnost intenziteta emitovanog zračenja od koncentracije morina u oblasti od 1,5 do 30,5 ng cm⁻³. Granica detekcije je iznosila 0,02 ng cm⁻³ a granica kvantifikacije 0,06 ng cm⁻³. Pouzdanost predložene metode proverena je referentnom RP-HPLC/UV metodom.

Razvijena je spektrofotometrijska metoda za određivanje hesperidina u humanoj plazmi i farmaceutskim preparatima koja se zasniva na fluorescenciji kompleksa aluminijum(III)–hesperidin, čiji je sastav aluminijum(III) : hesperidin = 1 : 1. Kompleks pokazuje intenzivnu fluorescenciju u prisustvu surfaktanta SB 12 na $\lambda_{em} = 476$ nm pri ekscitaciji na $\lambda_{ex} = 390$ nm i stabilan je u *pH* opsegu od 3,0 do 7,0. Konstanta stabilnosti ovog kompleksa na *pH* = 4,50 je $\log \beta_1 = 9,20$. Linearna zavisnost intenziteta fluorescencije od koncentracije, pri određivanju hesperidina u farmaceutskim preparatima dobijena je u koncentracionom opsegu 0,06–24,4 µg cm⁻³ sa granicom detekcije od 0,016 µg cm⁻³ i granicom kvantifikacije od 0,049 µg cm⁻³. Dobijene „recovery“ vrednosti u intervalu od 99,3–99,7 % pokazuju veliku tačnost metode. Linearna zavisnost intenziteta fluorescencije kompleksa od koncentracije hesperidina pri određivanju u uzorcima humane plazme dobijena je u koncentracionom opsegu od 0,1–12,2 µg cm⁻³ sa granicom detekcije od 0,032 µg cm⁻³ i granicom kvantifikacije od 0,096 µg cm⁻³. „Recovery“ vrednosti su dobijene u opsegu 98,4 do 99,8

%. Pouzdanost metode proverena je LC–MS/MS metodom za određivanje hesperidina u humanoj plazmi, a HPLC/UV metodom prilikom određivanja hesperidina u farmaceutskim preparatima. Linearna zavisnost pri određivanju hesperidina u farmaceutskim preparatima dobijena je u intervalu od 0,05–10,00 $\mu\text{g cm}^{-3}$. Granica detekcije, *LOD* je iznosila 0,01 $\mu\text{g cm}^{-3}$, granica kvantifikacije, *LOQ* 0,03 $\mu\text{g cm}^{-3}$. Linearna zavisnost pri određivanju hesperidina u humanoj plazmi je dobijena u intervalu 0,02–10,00 $\mu\text{g cm}^{-3}$ sa granicom detekcije od 0,005 $\mu\text{g cm}^{-3}$ i granicom kvantifikacije od 0,015 $\mu\text{g cm}^{-3}$. Dobro slaganje između ove dve metode pokazuje primenljivost spektrofotometrijske metode u kliničkim laboratorijama i laboratorijama za kontrolu kvaliteta. Predložena fluorimetrijska metoda je jednostavna, pouzdana i precizna za određivanje hesperidina u humanom serumu i farmaceutskim preparatima.

Predložena je spektrofotometrijska metoda za određivanje sadržaja hesperidina u sokovima od pomorandže zasnovana na fluorescenciji kompleksa aluminijum–hesperidin. Linearna zavisnost za određivanje hesperidina u rastvorima metanol–voda dobijena je u koncentracionom intervalu od 0,08 do 18,0 $\mu\text{g cm}^{-3}$, pri čemu je granica detekcije iznosila *LOD* = 0,023 $\mu\text{g cm}^{-3}$, a granica kvantifikacije *LOQ* = 0,070 $\mu\text{g cm}^{-3}$. Predložena metoda je pojednostavljena izostavljanjem površinski aktivnih materija koje se koriste u sličnim procedurama i uspešno je primenjena za određivanje sadržaja hesperidina u sokovima od pomorandže prisutnim na tržištu Srbije.

Predložena je spektrofotometrijska metoda za određivanje kvercetina u farmaceutskim preparatima, koja je zasnovana na fluorescenciji kompleksa aluminijum(III)–kvercetin, sastava aluminijum(III) : kvercetin = 2 : 1. Kompleks aluminijum(III)–kvercetin pokazuje intenzivnu fluorescenciju na $\lambda_{\text{em}} = 480$ nm pri eksitaciji na $\lambda_{\text{ex}} = 420$ nm, i stabilan je u *pH* oblasti od 2,0 do 5,5. Intenzitet fluorescencije nastalog kompleksa zavisi od *pH* vrednosti rastvora, i najveći je na *pH* = 3,33. Konstanta stabilnosti ovog kompleksa na *pH* = 3,20 iznosi $\log \beta = 27,79$. Linearnost je dobijena u koncentracionom opsegu od 1,5 do 60,5 ng cm^{-3} kvercetina. Granica detekcije je iznosila *LOD* = 0,09 ng cm^{-3} , a granica kvantifikacije *LOQ* = 0,27 ng cm^{-3} . Pouzdanost predložene metode proverena je referentnom RP–HPLC/UV metodom. Linearnost je dobijena u koncentracionom opsegu od 1,0 do 200,0 $\mu\text{g cm}^{-3}$ Granica detekcije kvercetina RP–HPLC/UV metodom je iznosila 0,066 $\mu\text{g cm}^{-3}$ a granica kvantifikacije 0,200 $\mu\text{g cm}^{-3}$ kvercetina.

Predložena je spektrofotometrijska metoda za određivanje ukupnog sadržaja polifenola u soku od jabuka pri čemu je sadržaj ukupnih polifenola izražen u odnosu ekvivalent kvercetin (*QE*), koji je određivan spektrofotometrijski

Ključne reči: morin, hesperidin, kvercetin, aluminijum(III), spektrofotometrijsko određivanje, konstanta stabilnosti kompleksa

Naučna oblast: Fizička hemija

Uža naučna oblast: Spektrohemijska

TITLE:**SPECTROFLUORIMETRIC INVESTIGATION OF COMPLEX COMPOUNDS OF MORIN, HESPERIDIN AND QUERCETIN WITH ALUMINIUM****Abstract:**

Morin, hesperidin and quercetin belong to flavonoids, a large class of compounds. Flavonoids have important biological and physiological activity. Thus, it is of interest to develop simple, accurate and precise method for the determination of morin, hesperidin and quercetin in different samples.

Morin is a flavonol antioxidant. In ethanol–water mixtures (70 v/v % of ethanol) it reacts with aluminium (III) ion to give $\text{Al}(\text{Mor})_2$ in the *pH* range 3–6. The complex shows strong fluorescence emission at 500 nm upon excitation at 410 nm. The fluorescence intensity is *pH* dependent with maximum emission at *pH* 4,40. The conditional stability constant of this complex at 298 K was found to be $\log \beta_2 = 16,96$ at *pH* 4,40. Since the complexation reaction enhances the fluorescence of morin, this property was used for the determination of morin in human serum. A linear dependence of the intensity of fluorescence of the complex on the concentration of morin was obtained in morin concentration range from 1,5–30,5 ng cm^{-3} . The limit of detection, *LOD* was 0,02 ng cm^{-3} while limit of quantification, *LOQ* was 1,0 ng cm^{-3} . Serum concentration of morin was also determined using RP-HPLC as a reference method.

A spectrofluorometric method, based on the fluorescence properties of the aluminium(III)–hesperidin complex, AlHesp^{2+} , for the determination of hesperidin in human plasma and pharmaceutical forms has been developed and validated. The complex shows a strong emission in the presence of the surfactant betain sulphonate SB 12 at 476 nm with excitation at 390 nm. The conditional stability constant of this complex at 298 K was found to be $\log \beta_1 = 9,20$ at *pH* 4,50. The linearity range for pharmaceutical forms of hesperidin was 0,06–24,4 $\mu\text{g cm}^{-3}$ with a limit of detection, *LOD*, of 0,016 $\mu\text{g cm}^{-3}$ and a limit of quantification, *LOQ*, of 0,049 $\mu\text{g cm}^{-3}$. Recovery values in the range 99,3–99,7 % indicate good accuracy of the method. A linear dependence of the intensity of fluorescence of the complex on the concentration of hesperidin in plasma was obtained

in concentration range from 0,1–12,2 $\mu\text{g cm}^{-3}$. The *LOD* was 0,032 $\mu\text{g cm}^{-3}$ while *LOQ* was 0,096 $\mu\text{g cm}^{-3}$. Recovery values were in the range 98,4–99,8 %. The reliability of the method was checked by an LC–MS/MS method for plasma samples and an HPLC/UV method for tablets with direct determination of hesperidin after separation. Linearity range in determination of hesperidin in pharmaceutical forms was obtained in the range from 0,05 to 10,00 $\mu\text{g cm}^{-3}$. The *LOD* was 0,01 $\mu\text{g cm}^{-3}$ and the *LOQ* was 0,03 $\mu\text{g cm}^{-3}$. The linearity range for the determination of hesperidin in human plasma was 0,02–10,00 $\mu\text{g cm}^{-3}$ with an *LOD* 0,005 $\mu\text{g cm}^{-3}$ and an *LOQ* of 0,015 $\mu\text{g cm}^{-3}$. The good agreement between the two methods indicates the usability of the proposed fluorometric method for the simple, precise and accurate determination of hesperidin in clinical and quality control laboratories.

The spectrofluorometric method based on fluorescence ability of aluminium – hesperidin complex for the determination of hesperidin in orange juice is proposed. The linearity range of hesperidin in methanolic-aqueous solution was 0,08 – 18,0 $\mu\text{g cm}^{-3}$ with *LOD* and *LOQ* values as 0,023 $\mu\text{g cm}^{-3}$ and 0,070 $\mu\text{g cm}^{-3}$, respectively. Method was simplified by omitting any of surfactant agents usually applied in similar procedures, and successfully applied for the determination of hesperidin in orange juices commercially available on the Serbian market.

Quercetin is a flavonol antioxidant. In methanol – water mixtures (70 v/v % of ethanol) it reacts with aluminium (III) ion to give $\text{Al}_2\text{Querc}^{+4}$ in the *pH* range 2,0–5,5. The complex shows strong fluorescence emission at 480 nm upon excitation at 420 nm. The fluorescence intensity is *pH* dependent with maximum emission at *pH* 3,33. The conditional stability constant of this complex at 298 K was found to be $\log \beta = 27,79$ at *pH* 3,20. Since the complexation reaction enhances the fluorescence of quercetin, this property was used for the determination of quercetin in dosage forms. A linear dependence of the intensity of fluorescence of the complex on the concentration of quercetin was obtained in quercetin concentration range from 1,5 to 60,5 ng cm^{-3} . The *LOD* was 0,09 ng cm^{-3} while *LOQ* was 0,27 ng cm^{-3} . Concentration of quercetin was also determined using RP-HPLC as a reference method.

Quercetin and aluminium(III)-ion form a stable complex and the resulted emission at 480 nm can be used for the determination of the total phenols concentration expressed in terms of “quercetin equivalent” (*QE*).

Keywords: Morin, hesperidin, quercetin, aluminium (III), determination, spectrofluorimetry, constant stability of complex

Scientific Field: Physical Chemistry

Field of Academic Expertise: Spectrochemistry

SADRŽAJ:

1. UVODNI DEO	1
1.1. Uvod	1
1.2. Cilj rada	2
2. OPŠTI DEO	3
2.1. Flavonoidi	3
<i>2.1.1. Hemijska struktura flavonoida</i>	3
<i>2.1.2. Kompleksna jedinjenja flavonoida sa jonima metala</i>	5
<i>2.1.2.1. Kompleksna jedinjenja morina</i>	6
<i>2.1.2.2. Kompleksna jedinjenja hesperidina</i>	9
<i>2.1.2.3. Kompleksna jedinjenja kvercetina</i>	10
<i>2.1.3. Farmakološka svojstva flavonoida</i>	12
<i>2.1.3.1. Farmakološka svojstva morina</i>	14
<i>2.1.3. 2. Farmakološka svojstva hesperidina</i>	15
<i>2.1.3.3. Farmakološka svojstva kvercetina</i>	17
2.2. Aluminijum(III)-jon kao izabrani centralni metalni jon i njegova svojstva	19
3. EKSPERIMENTALNI DEO	22
3.1. Metode	22
<i>3.1.1. Spektrofluorimetrija</i>	22
<i>3.1.2. Tečna hromatografija</i>	25
<i>3.1.3. Ekstrakcija na čvrstoj fazi</i>	27
3.2. Instrumenti i reagensi	30
<i>3.2.1. Instrumenti</i>	30
<i>3.2.1.1. Spektrofluorimetar</i>	30
<i>3.2.1.2. Hromatografski sistemi</i>	31
<i>3.2.1.3. Uslovi za LC-MS/MS određivanje hesperidina</i>	32
<i>3.2.1.4. pH-metar</i>	32
<i>3.2.1.5. Ultrazvučno kupatilo</i>	33
<i>3.2.2. Reagensi i hemikalije</i>	33

3.3. Generalna procedura	34
3.3.1. Osnovni rastvori	34
3.3.1.1. Osnovni rastvor aluminijum(III)-nitrata	34
3.3.1.2. Osnovni rastvori flavonoida	35
3.3.1.3. Osnovni rastvori površinski aktivnih materija	35
3.3.2. Ispitivanje kompleksa	36
3.3.2.1. Ekscitaciono-emisioni spektri kompleksa	36
3.3.2.2. Određivanje sastava kompleksa	36
3.3.3. Reakcija formiranja kompleksa	38
3.3.4. Izračunavanje koncentracionih konstanti stabilnosti kompleksa	39
3.4. Spektrofluorimetrijsko određivanje flavonoida u alkoholno-vodenim rastvorima	42
3.4.1. Spektrofluorimetrijsko određivanje morina u 70 % v/v etanolu	44
3.4.2. Spektrofluorimetrijsko određivanje hesperidina u 70 % v/v metanolu	44
3.4.3. Spektrofluorimetrijsko određivanje hesperidina u 70 % v/v metanolu u prisustvu površinski aktivne materije SB 12 (n-dodecil sulfobetaina)	45
3.4.4. Spektrofluorimetrijsko određivanje kvercetina u 70 % v/v metanolu	45
3.5. Spektrofluorimetrijsko određivanje flavonoida u različitim uzorcima	46
3.5.1. Spektrofluorimetrijsko određivanje morina u uzorcima humanog seruma	46
3.5.2. Spektrofluorimetrijsko određivanje hesperidina u uzorcima humane plazme	46
3.5.3. Spektrofluorimetrijsko određivanje hesperidina u tabletama	47
3.5.4. Spektrofluorimetrijsko određivanje hesperidina u soku od pomorandže	48
3.5.5. Spektrofluorimetrijsko određivanje kvercetina u kapsulama	48
3.5.6. Spektrofluorimetrijsko određivanje polifenola u soku od jabuke	49
3.6. Procedure za određivanje flavonoida referentnim metodama	50

3.6.1. HPLC određivanje morina	50
3.6.2. HPLC i maseno - spektrometrijsko određivanje hesperidina	50
3.6.3. HPLC određivanje kvercetina	52
4. REZULTATI I DISKUSIJA	53
4.1. Kompleks aluminijum(III)-morin	53
4.1.1. Ekscitaciono-emisioni spektri kompleksa aluminijum(III)-morin	53
4.1.2. Određivanje sastava kompleksa aluminijum(III)-morin	55
4.1.3. Reakcija formiranja kompleksa	59
4.1.4. Određivanje koncentracionih konstanti stabilnosti kompleksa aluminijum (III)-morin	60
4.1.5. Spektrofluorimetrijsko određivanje morina u 70 %v/v etanolu	63
4.1.6. Spektrofluorimetrijsko određivanje morina u uzorcima humanog seruma	64
4.1.7. HPLC određivanje morina	65
4.2. Kompleks aluminijum(III)-hesperidin	68
4.2.1. Ekscitaciono-emisioni spektri kompleksa aluminijum(III)-hesperidin	68
4.2.2. Određivanje sastava kompleksa aluminijum(III)-hesperidin	69
4.2.3. Reakcija formiranja kompleksa	72
4.2.4. Određivanje koncentracionih konstanti stabilnosti kompleksa aluminijum(III)-hesperidin	73
4.2.5. Uticaj prisustva cviterjonske površinski aktivne materije SB 12 na intenzitet fluorescencije ispitivanog kompleksa aluminijum(III)-hesperidin	76
4.2.6. Određivanje koncentracionih konstanti stabilnosti kompleksa aluminijum(III)-hesperidin u prisustvu SB 12	79
4.2.7. Spektrofluorimetrijsko određivanje hesperidina u 70 %v/v metanolu	82
4.2.7.1. Spektrofluorimetrijsko određivanje hesperidina u sokovima od pomorandže	83
4.2.8. Spektrofluorimetrijsko određivanje hesperidina u 70 %v/v metanolu u prisustvu SB 12	85

4.2.8.1. Spektrofluorimetrijsko određivanje sadržaja hesperidina u farmaceutskim preparatima	87
4.2.9. Spektrofluorimetrijsko određivanje hesperidina u uzorcima humane plazme u prisustvu SB 12	89
4.2.10. Uticaj surfaktanta SB 12 na spektrofluorimetrijsko određivanje hesperidina u 70 %v/v metanolu	90
4.2.11. HPLC određivanje hesperidina u farmaceutskim preparatima	91
4.2.12. LC-MS/MS određivanje sadržaja hesperidina u uzorcima humane plazme	93
4.3. Kompleks aluminijum(III)- kvercetin	96
4.3.1. Ekscitaciono-emisioni spektri kompleksa aluminijum(III)-kvercetin	96
4.3.2. Određivanje sastava kompleksa aluminijum(III)-kvercetin	97
4.3.3. Reakcija formiranja kompleksa	101
4.3.4. Određivanje koncentracionih konstanti stabilnosti kompleksa aluminijum(III)-kvercetin	103
4.3.5. Spektrofluorimetrijsko određivanje kvercetina u 70 %v/v metanolu	106
4.3.5.1. Spektrofluorimetrijsko određivanje kvercetina u farmaceutskim preparatima	107
4.3.4.2. Spektrofluorimetrijsko određivanje polifenola u sokovima od jabuke	109
4.3.6. HPLC određivanje kvercetina u farmaceutskim preparatima	110
5. ZAKLJUČAK	115
6. LITERATURA	120

1. UVODNI DEO

1.1. Uvod

Flavonoidi su sekundarni ćelijski metaboliti koji, pored karotenoida i hlorofila, predstavljaju najveću klasu biljnih pigmenata u prirodi. Učestvujući u procesima fotosinteze, rasta, reprodukcije, fosforilacije i pigmentacije, flavonoidi ispoljavaju veoma važnu ulogu u fiziologiji biljaka. Oni takođe doprinose rezistenciji prema patogenim mikroorganizmima i štite biljke od negativnog dejstva ultraljubičastog zračenja. Veliki broj radova pokazuje da flavonoidi preventivno deluju na razvoj oksidativnog stresa koji se, kao jedan od uzročnika nastajanja slobodnih radikalskih vrsta (prvenstveno reaktivnih kiseoničnih vrsta (*reactive oxygen species*) - ROS), nalazi u osnovi većine, ako ne i svih, patoloških stanja u organizmima kao i samog procesa starenja. Predpostavlja se da je biološka i fiziološka aktivnost flavonoida, pre svega, zasnovana na njihovom antioksidativnom dejstvu koje se ispoljava i kroz antimutageno, antibakterijsko, antiinflamatorno, antialergijsko, antivirusno, antitrombolitično, vazodilatatorno i antikancerogeno delovanje.

Flavonoidi imaju izraženu sposobnost kompleksiranja jona prelaznih metala. Pored toga što ove reakcije predstavljaju veoma važan faktor stabilizacije obojenja, strukture, u prirodnom medijumu one su takođe i jedan od mehanizama kojim se postiže akumulacija metala u perifernim tkivima čime se smanjuje njihov štetni efekat i mogućnost njihove mobilizacije u ekosisteme. Građenjem kompleksa sa metalnim jonima se pospešuje odbrambeni mehanizam biljaka od patogena i biljojeda. Sposobnost kompleksiranja flavonoida sa metalnim jonima služi i kao kvalitativni test njihovog prisustva u biljnim ekstraktima, biološkim i drugim uzorcima, a takođe se ova osobina često koristi i u kolorimetrijske svrhe za detekciju metala u tragovima.

Zbog svega navedenog, postoji potreba za razvojem i validiranjem odgovarajućih metoda koje se zasnivaju na analizi flavonoid-metal kompleksa, a u cilju ispitivanja kvaliteta proizvoda koji sadrže flavonoide (farmaceutski preparati, uzorci hrane) i određivanja njihovog sadržaja u biološkim uzorcima. Činjenica je da flavonoidi imaju strukturne karakteristike koje omogućavaju fluorescenciju molekula, što pruža

moćnost primene spektrfluorimetrije kao metode u njihovoj analizi. Izuzetno velika osetljivost spektrofluorimetrijske metode daje prednost ovoj metodi u odnosu na druge i svrstava je u jednu od veoma primenjivanih metoda u savremenim istraživanjima flavonoida.

1.2. Cilj rada

Cilj ove disertacije je da se ispituju kompleksna jedinjenja flavonoida: morina, hesperidina i kvercetina sa aluminijum(III)-jonom, da se odredi sastav i izračunaju konstante stabilnosti nastalih kompleksnih jedinjenja aluminijuma i navedenih flavonoida.

Formiranje navedenih kompleksa biće primenjeno za određivanje flavonoida - morina, hesperidina i kvercetina u farmaceutskim preparatima, uzorcima hrane, humanog seruma i plazme. Biće određeni optimalni uslovi za kvantitativnu analizu navedenih flavonoida, a zatim razvijena spektrofluorimetrijska metoda za određivanje morina, hesperidina i kvercetina u različitim uzorcima. Ispitivaće se parametri za validaciju datih metoda sa posebnim osvrtom na validaciju metoda koje se primenjuju u analizi bioloških uzoraka i definišu optimalni uslovi za određivanje njihovog sadržaja u različitim uzorcima. Predložene spektrofluorimetrijske metode treba da omoguće brzo i jednostavno određivanje ispitivanih flavonoida sa velikom osetljivošću i u širem opsegu koncentracija u odnosu na postojeće metode. Tako razvijene i validirane spektrofluorimetrijske metode omogućile bi određivanje ispitivanih flavonoida - morina, hesperidina i kvercetina u kliničkim laboratorijama i laboratorijama za kontrolu kvaliteta farmaceutskih preparata i hrane.

2. OPŠTI DEO

2.1. Flavonoidi

2.1.1. Hemijska struktura flavonoida

Flavonoidi ili bioflavonoidi su velika grupa biljnih jedinjenja koji predstavljaju slobodne ili glikozidno vezane žute ćelijske pigmente. Ova grupa jedinjenja se sintetiše u biljkama. Najčešće se mogu naći u korenju, lišću, semenkama, cvetu viših biljaka, zatim u povrću, voću i napicima kao što su čaj, vino, kafa i voćni sokovi.

Oni predstavljaju najveću grupu polifenolnih jedinjenja i imaju prepoznatljivu hemijsku strukturu. Ime su dobili po *flavonu* (lat. *flavus*- žut), koji predstavlja osnovnu strukturnu jedinicu. Ova grupa jedinjenja predstavlja derivate γ -pirona, to jest benzo γ -pirona, za koji je vezan jedan fenilni prsten. Osnovnu strukturu flavonoida čini difenilpropan:

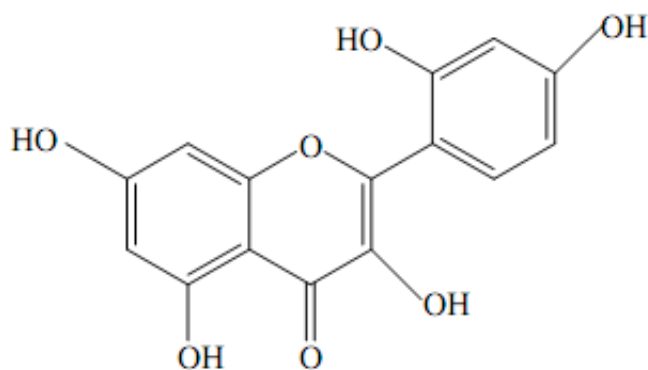


odnosno 1-fenil-3-(2- hidroksifenil) propan-1-ol iz kojeg se gubitkom vode i zatvaranjem C-prstena dobija flavan od kog se izvodi određeni broj osnovnih struktura. Oznake A i B odnose se na benzenske prstenove, a oznaka C₃ na prsten γ -pirona. Različite klase jedinjenja u okviru ove grupe, sa istom osnovnom strukturom, nastaju promenom oksidacionog stanja alifatičnog niza, odnosno heterocikličnog prstena C. U zavisnosti od stepena oksidovanosti prstena C, može se izvršiti podela flavonoida na: flavanone, flavan-3-ole (katehine), flavone, flavon-3-ole, antocijanidine i izoflavone. Svi oni mogu biti hidroksilovani, metoksilovani i glikozidirani s monosaharidima ili oligosaharidima, a često sadrže i acilne grupe u različitim položajima osnovne flavonoidne strukture ili glikozidnog dela.¹ Osim toga, kod flavonoida je izražena i velika sklonost ka umrežavanju i polimerizaciji. Zahvaljujući ovoj činjenici, može se

zaključiti da su flavonoidi polifenoli široke rasprostranjenosti u biljnom svetu (poznato je preko 6000 jedinjenja koja pripadaju flavonoidima).¹

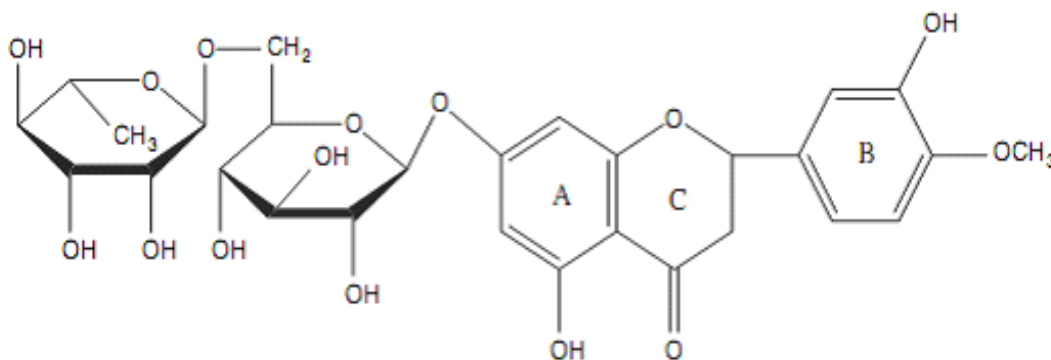
Predmet ove disertacije je proučavanje kompleksnih jedinjenja flavonoida- morina, hesperidina i kvercetina sa aluminijum(III)-jonima. Strukture ovih jedinjenja su prikazane Shemama 1a, 1b, 1c :

➔ Morin, $C_{15}H_{10}O_7$, iz grupe flavonola (2',3,4',5,7-pentahidroksiflavon)



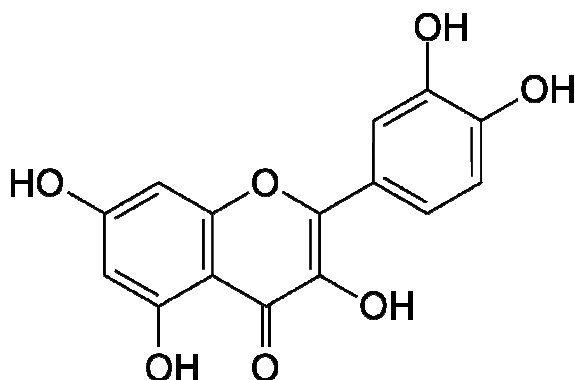
Shema 1a. Struktura morina

➔ Hesperidin, $C_{28}H_{34}O_{15}$, iz grupe flavanona (hesperitin-7-rutinozid)



Shema 1b. Struktura hesperidina

- kvercetin $C_{15}H_{10}O_7$, iz grupe flavonola (3',3,4',5,7-pentahidroksiflavon)



Shema 1c. Struktura kvercetina

Morin i kvercetin pripadaju flavonolima,² koji su zastupljeni u povrću kao što je luk, kelj, brokoli, zelena salata, paradajz, a manje ih ima u voću (nalaze se u jabukama, grožđu, bobičastom voću). Ranija istraživanja su pokazala da se flavonoidi,³ a naročito kvercetin, nalaze u vinu i da od njih potiče gorak i opor ukus vina. Takođe ih ima u zelenom i crnom čaju.

Hesperidin pripada flavanonima, i u velikoj meri se nalazi u unutrašnjoj kori ploda citrusa, takozvanom albedo delu, nešto manje ga ima u unutrašnjem, sočnom delu ploda, dok se u spoljašnjoj kori ploda (flavedo deo) uglavnom nalaze polimetoksilovani flavonoidi.^{4,5}

2.1.2. Kompleksna jedinjenja flavonoida sa jonima metala

Zahvaljujući svojoj specifičnoj strukturi, flavonoidi grade obojena kompleksna jedinjenja sa velikim brojem jona metala. Reakcije kompleksiranja flavonoida u velikoj meri su ispitivane tokom šezdesetih i početkom sedamdesetih godina prošlog veka (najviše flavona i flavonola). Pregledom literaturnih podataka uočava se da su se u ovom periodu kompleksnim jedinjenjima flavonoida najviše bavili ruski naučnici, u čijim se radovima mogu naći podaci o stehiometrijskom sastavu kompleksa, uslovima pod kojima su ispitivanja vršena (*pH*, jonska jačina), kao i optimizacija reakcija za kvantitativnu analizu jona metala.⁶⁻⁹ Tokom osamdesetih, interes za ovu problematiku opada, pa se stoga javlja srazmerno manji broj radova koji se odnose na kompleksna

jedinjenja flavonoida sa jonima metala. Međutim, početkom devedesetih godina, flavonoidi ponovo ulaze u središte pažnje, zato što se sve više ljudi okreću zdravom načinu življenja, što između ostalog uključuje i zdravu ishranu. U tom periodu nastupa i trend povratka lečenju prirodnim proizvodima, što dovodi do sve intenzivnijih istraživanja biološki i farmakološki aktivnih flavonoida.¹⁰⁻¹³

S hemijskog aspekta, razvojem savremenih hromatografskih tehnika, radovi iz ovog perioda, su uglavnom posvećeni izolovanju flavonoida iz biljaka, zatim identifikaciji novootkrivenih flavonoidnih jedinjenja.¹⁴⁻¹⁷

Flavonoidi su se pokazali kao efikasni helatni reagensi za metalne jone koji formiraju stabilna kompleksna jedinjenja koja intenzivno fluoresciraju. Ova njihova osobina se koristi u analitičkim metodama za određivanje metala u tragovima, kao i za određivanje samih flavonoida. Dobro je poznato da flavonoidi mogu da heliraju metalne jone kao što su berilijum(II), aluminijum(III), gvožđe(III) i cink(II).¹⁸⁻²⁰

Za naša ispitivanja od posebnog značaja bila su kompleksna jedinjenja morina, hesperidina i kvercetina sa aluminijumom, jer su se u sva tri slučaja dobijala kompleksna jedinjenja koja su pokazivala veliki intenzitet fluorescencije, što je omogućilo uvođenje metoda za spektrofluorimetrijsko određivanje sadržaja ovih flavonoida u farmaceutskim preparatima, humanom serumu i plazmi, kao i u prehrambenim proizvodima.

2.1.2.1. Kompleksna jedinjenja morina

Morin je flavonol koji relativno lako stupa u reakciju sa metalnim jonima, pri čemu najčešće formira komplekse sastava $MMor$ i $MMor_2$. U relativno starijoj literaturi²¹ nalaze se podaci da morin u prisustvu različitih surfaktanata formira kompleks sa gvožđe(III)-jonom sastava 1:4 na $pH = 4,0$. Dobija se kompleks koji ima visoku vrednost koncentracione konstante stabilnosti ($k = 3,90 \times 10^{22}$), što je iskorišćeno za definisanje uslova za određivanje gvožđe(III)-jona. Reakcija nastajanja kompleksa gvožđe(III)-morin je primenjena za određivanje gvožđe(III)-jona u farmaceutskim preparatima koji pored ovog jona sadrže i gvožđe(II)-jon.²² U ovom radu pokazano je da je reakcija morina sa gvožđe(III)-jonom selektivna, odnosno da ne dolazi do interferencije gvožđe(II)-jona sa morinom.

S. Blagojević²³ i saradnici su ispitivali kompleks paladijum(II)-morin u 70 % v/v etanolu. U etanolnoj sredini nastaje kompleks sastava paladijum(II): morin = 1:1. kome su određene koncentracione konstante stabilnosti na nekoliko različitih *pH* vrednosti: $\log \beta_1 = 4,55$ (*pH* = 4,0), $\log \beta_2 = 4,01$ (*pH* = 5,0) i $\log \beta_2 = 4,17$ (*pH* = 6,0). Određeni su uslovi za spektrofotometrijsko određivanje morina u koncentracionom opsegu od 1×10^{-5} - 1×10^{-3} mol dm⁻³.

Za određivanje koncentracije antimona u bronzi adsorptivnom striping voltametrijom²⁴ primenjena je reakcija formiranja kompleksa antimon(III)-morin (sastav kompleksa 1:3, na *pH* = 2,3).

Spektrofotometrijski je ispitan titanil oksalat-morin kompleks u 50% v/v etanolu.²⁵ U etanolnoj sredini formira se kompleks $\text{TiO}(\text{C}_2\text{O}_4)_2^{2-}$: morin = 1:2. kome su određene koncentracione konstante stabilnosti na nekoliko različitih *pH* vrednosti: $\log \beta_2 = 5,83$ (*pH* = 6,0), $\log \beta_2 = 6,40$ (*pH* = 7,0) i $\log \beta_2 = 7,35$ (*pH* = 8,0). Dobijena je linearna zavisnost apsorbancije kompleksa od koncentracije morina, i na osnovu toga je razvijena metoda za kvantitativno određivanje morina.

Studija Q. K. Panhwara²⁶ i autora se odnosi na sintezu, karakterizaciju kompleksa bakar(II)-morin na osnovu spektroskopskih ispitivanja. Zbog velike biološke aktivnosti morina kao i njegovih kompleksa, u ovom radu je ispitan i antioksidacioni potencijal nastalog kompleksa. Pokazano je da morin gradi kompleks sa bakar(II)-jonom sastava 1:1, koji ima jače antioksidativno dejstvo u odnosu na čist morin.

Razvijena je metoda za simultano određivanje sadržaja olova i kadmijuma u vodi²⁷ na *pH* vrednosti koja iznosi 2,9 adsorptivnom striping-voltametrijom. Metoda je zasnovana na formiranju kompleksa olovo(II)-morin sastava 1:1 i kadmijum(II)-morin kompleksa sastava 1:2.

Kompleksi morina koji fluoresciraju dobijeni su u reakciji morina sa cirkonijum (IV)-jonom²⁸ (nastaje kompleks sastava 1:1 u prisustvu surfaktanta CTABa-cetiltrimetilamonijum bromida, i sulfatne kiseline), zink(II)-jonom²⁹ (formira se kompleks koji intenzivno fluorescira na *pH* = 4,7), berilijum(II)-jonom³⁰ (dobija se kompleks sastava 1:1, stabilan u *pH* oblasti od 5,8 do 6,2, u heksaamin puferu u prisustvu surfaktanta Triton X-100, odnosno polietilen glikol p-(1,1,3,3-tetrametilbutil)-fenil etra). Formiranje kompleksa morina sa navedenim jonima metala uglavnom je iskorišćeno za određivanje prisustva ovih jona u tragovima u različitim uzorcima.

Nukleinske kiseline interaguju sa velikim brojem hemijskih vrsta kao što su mali organski katjoni, molekuli aktivnih principa farmaceutskih preparata, joni i njihovi kompleksi, od kojih većina pokazuje specifične interakcije sa nukleinskim kiselinama. Ispitivanjem ovih interakcija dobijaju se značajne informacije o specifičnom načinu vezivanja ovih vrsta sa nukleinskim kiselinama, kao i mestima u molekulu nukleinskih kiselina gde se ostvaruju veze. Ispitivan je kompleks morina sa lantan(III)-jonom u prisustvu molekula DNK³¹ (nastaje 1:1 kompleks u *pH* opsegu od 4,5 – 6,5) Korišćenjem lantan(III)-morin kompleksa kao fluorescentnog reagensa, razvijena je metoda za kvantitativnu analizu DNK na *pH* vrednosti od 5,5.

Ispitivanje interakcija DNK i molekula aktivnih principa lekova je od opšteg značaja posebno za dizajniranje novih lekova sa DNK kao ciljnim mestom delovanja. Morin je flavonoid koji pokazuje veliku biološku aktivnost, pa je interakcija morina i molekula DNK bila predmet ispitivanja Ensafija i grupe autora.³² Ispitivana je interakcija morina i DNK, kao i interakcija kompleksa bizmut(III)-morin (sastava 1:2) i DNK. Utvrđeno je da u prisustvu DNK intenzitet fluorescencije kompleksa raste, dok prisustvo DNK gasi fluorescenciju čistog morina.

Jedan od najpoznatijih kompleksa koji pokazuje intenzivnu fluorescenciju je aluminijum(III)-morin kompleks koji je izučavan od strane većeg broja autora. A. Gutierrez i M. H. Gehlen³³ ispitivali su ovaj kompleks u metanolu i utvrdili da je sastav kompleksa aluminijum(III) : morin = 1 : 2 u metanolu, i 1 : 1, u kiseloj sredini.

Dati kompleks pokazuje intenzivnu fluorescenciju, pa su zahvaljujući toj činjenici, uvedene metode za određivanje, najčešće, aluminijuma u različitim uzorcima. Tako je formiranje ovog kompleksa primenjeno za određivanje sadržaja aluminijum(III)- jona u kulturi *Nicotiana tabacum*.³⁴

U nekim od ovih radova, reakcija kompleksiranja aluminijum(III)-jona i morina bila je primenjena za određivanje aluminijuma u tragovima u različitim uzorcima vode³⁵⁻³⁷ i u tečnosti za hemodijalizu.³⁸

2.1.2.2. Kompleksna jedinjenja hesperidina

U literaturi ima malo podataka o kompleksnim jedinjenjima hesperidina, što je verovatno posledica slabe rastvorljivosti hesperidina u relativno ograničenom broju rastvarača.

Hesperidin formira nekoliko kompleksnih vrsta sa gvožđe(III)-jonom⁹ u zavisnosti od *pH* vrednosti (u *pH* intervalu od 1,2- 2,2 nastaje kompleks sastava 1:1, kompleks sastava 1:2 nastaje u oblasti *pH* od 3,5- 4,0, a u intervalu *pH* od 6,5- 7,0 nastaje 1:3 kompleks). Sa cirkonijum(IV)-jonom nastaje kompleks sastava 1:1, na *pH* = 3,6.³⁹ Spektrofotometrijski je ispitivan aluminijum(III)-hesperidin kompleks koji nastaje u 70% v/v metanolu.⁴⁰ Utvrđeno je da nastaje kompleks sastava 1:1, određene su koncentracione konstante stabilnosti na različitim *pH* vrednostima ($\log \beta_1 = 3,46$ na *pH* = 4,0 a na *pH* = 5,0 $\log \beta_1 = 4,54$). Spektrofotometrijski, hesperidin se može odrediti na osnovu linearne zavisnosti apsorbancije kompleksa od koncentracije hesperidina u koncentracionom opsegu od $2,50 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ - $1,75 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ hesperidina.

Uranil(II)-hesperidin kompleks je ispitivan spektrofotometrijski.⁴¹ Određeni su sastav i koncentraciona konstanta stabilnosti kompleksa. Utvrđeno je da uranil(II)-jon i hesperidin formiraju 1:2 kompleks u kome je uranil(II)-jon vezan za molekul hesperidina preko karbonilne i 5-hidroksilne grupe. Relativna konstanta stabilnosti datog kompleksa iznosi $\log \beta_2 = 5,77$ na *pH* = 4,0 $\log \beta_2 = 7,00$ na *pH* = 6,0. Ispitani su uslovi za spektrofotometrijsko određivanje hesperidina na osnovu optimalnih uslova formiranja ovog kompleksa. Dobijena je linearna zavisnost apsorbancije kompleksa od koncentracije hesperidina u koncentracionom opsegu od $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ do $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ hesperidina.

Sintetisan je vanadil(IV)-hesperidin kompleks i okarakterisan fizičko-hemijskim metodama.⁴² Određen je sastav ovog kompleksa (nastaje 1:1 kompleks) i ispitani njegovi antioksidativni efekti. Kompleks je ispitan na dve kulture tumorskih ćelija, pri čemu je pokazano da ovaj kompleks poboljšava proliferativne efekte samog liganda-hesperidina.

Literaturni podaci za komplekse hesperidina koji pokazuju fluorescenciju odnose se na komplekse aluminijum(III)-hesperidin (nastaje 1:1 kompleks, optimalan opseg *pH* vrednosti je od 5,4- 5,6)⁴³ i kompleks hesperidina sa terbijum(III)-jonom (formira se TbHesp_3 kompleks sa intenzivnom fluorescencijom na *pH* = 8,0).⁴⁴ Reakcija

kompleksiranja hesperidina primenjena je za određivanje hesperidina u kori od pomorandže i soku od pomorandže,⁴³ farmaceutskim preparatima i humanoj plazmi.⁴⁴ Navedeni kompleksi pokazuju intenzivnu fluorescenciju. Intenzitet fluorescencije se povećava sa porastom koncentracije metala.

2.1.2.3. Kompleksna jedinjenja kvercetina

Kvercetin pripada flavonolima, i slično morinu formira veći broj kompleksa sa jonima metala. U literaturi koja je publikovana osamdesetih i devedesetih godina dvadesetog veka ispitivani su (najčešće spektrofotometrijski) kompleksi kvercetina sa različitim jonima metala pri čemu su definisani uslovi za određivanje kvercetina ili jona metala u različitim uzorcima na osnovu zavisnosti apsorbcije kompleksa od koncentracije kvercetina ili jona metala. Tako je ispitan kompleks nikel(II)-kvercetin u etanolnoj sredini.⁴⁵ Utvrđeno je da se formira kompleks sastava nikel(II) : kvercetin = 1:1. Određena je koncentraciona konstanta stabilnosti kompleksa $\log\beta_1 = 3,1$ i uslovi za održavanje nikla na osnovu zavisnosti apsorbcije formiranog kompleksa od koncentracije nikel(II)-jona.

Sastav i koncentracione konstante stabilnosti paladijum(II)-kvercetin kompleksa u 50 v/v% etanolu određene su odgovarajućim spektrofotometrijskim metodama i *pH*-metrijskim merenjima.⁴⁶ Utvrđeno je da paladijum (II)-jon i kvercetin grade kompleks sastava 1:1 u kome je paladijum(II)-jon ostvaruje koordinativnu vezu u sa molekulom kvercetina preko karbonilne i 3-hidroksilne grupe. Koncentracione konstante stabilnosti iznosile su $\log\beta_1 = 6,05$ na *pH* = 5,00 i $\log\beta_1 = 4,96$ na *pH* = 6,50. Ispitani su uslovi za spektrofotometrijsko određivanje kvercetina i utvrđeno je da Beerov zakon važi u koncentracionom opsegu kvercetina od $5,0 \times 10^{-5}$ - $1,0 \times 10^{-3}$ mol dm⁻³.

Spektrofotometrijski je ispitan kompleks koji nastaje u reakciji kvercetina i kalijum titaniloksalata u 50 v/v% etanolu.⁴⁷ Određene su konstante stabilnosti kvercetin-titaniloksalatnog kompleksa potencijometrijski i spektrofotometrijski na različitim temperaturama (*T* = 26,0 °C, 34 °C i 39,0 °C) i različitim jonskim jačinama (*I* = $5,0 \times 10^{-4}$ mol dm⁻³, $3,0 \times 10^{-2}$ mol dm⁻³ i $6,0 \times 10^{-2}$ mol dm⁻³) i izračunati termodinamički parametri. Predložena je brza, jednostavna i tačna metoda za određivanje kvercetina u farmaceutskim sirovinama i doziranim oblicima. Metoda je bazirana na

spektrofotometrijskom određivanju kvercetina na osnovu formiranja kompleksa kvercetina sa kalijum-titaniloksatom. Kako se kvercetin uobičajeno nalazi zajedno sa vitaminom C u doziranim oblicima, predložene su dve procedure za određivanje kvercetina: bez i u prisustvu askorbinske kiseline. U obe predložene procedure, Beer-ov zakon važi u opsegu koncentracija od $0,85 \mu\text{g cm}^{-3}$ – $16,9 \mu\text{g cm}^{-3}$ kvercetina.

Interakcije olovo(II)-jona sa kvercetinom su ispitivane u metanolnim rastvorima.⁴⁸ Stehiometrijski odnos kvercetina i metalnog jona u kompleksu, kao i ravnotežne konstante stabilnosti kompleksa određene su UV-Vis spektroskopskim metodom u kombinaciji sa hemometrijskim metodama. U rastvoru nastaju tri kompleksne vrste u kojima je odnos metal : ligand 2:1, 1:2, i 1:1. Dominantna vrsta koja nastaje u metanolnom rastvoru je kompleks sastava olovo(II): kvercetin = 1:1.

D. A. Kostić⁴⁹ i saradnici su ispitivali spektrofotometrijski kompleks kvercetina sa bakar(II)-jonima u etanolu. Određen je sastav bakar(II)-kvercetin kompleksa (1:1). Koncentraciona konstanta stabilnosti kompleksa je izračunata iz Žobove krive i iznosila je $\log \beta_1 = 7,53 \pm 0,25$. Razvijena je nova metoda za kvantitativno određivanje sadržaja kvercetina u etanolnoj sredini. U optimalnim uslovima kvercetin se može odrediti u koncentracionom opsegu od 0,202 do 1,006 mg cm^{-3} sa relativnom standardnom greškom od 2,5% do 5,5%. Granica detekcije je iznosila 0,067 mg cm^{-3} . Predložena metoda je veoma precizna, reproduktivna i osetljiva, i njom se mogu određivati mikrokoličine kvercetina u farmaceutskim preparatima.

Kompleks kobalt(II)-kvercetin ispitivan je u metanolnoj sredini.⁵⁰ Spektroskopskim metodama (UV-Vis, $^1\text{H NMR}$ i IR) i TGA, DSC analizom ispitivane su osobine ovog kompleksa. Utvrđeno je da se formira kompleks stehiometrijskog sastava 2:1 (metal / ligand). Antioksidativna aktivnost kompleksa određivana je spektrofotometrijski na osnovu njihovog delovanja na stabilni 1,1-difenil-2-pikril hidrazil (DPPH) radikal. U ovom radu je pokazano da nastali kompleks ima veću antioksidativnu sposobnost u odnosu na čist kvercetin.

Kvercetin kao jedan od najzastupljenijih flavonoida u prehrambenim namirnicama, ispitivan je u prisustvu bakar(II)-jona u metanolu.⁵¹ Spektroskopskim ispitivanjima (UV-Vis, $^1\text{H NMR}$ i IR) ispitivane su interakcije kvercetina sa bakar(II)-jonima kao i mesta u molekulu kvercetina gde dolazi do nastajanja koordinativne veze između kvercetina i bakar(II)-jona. Određen je stehiometrijski sastav kompleksa, metal :

ligand = 2:1. Antioksidativne osobine kompleksa i kvercetina ispitivane su spektrofotometrijski na osnovu njihovog delovanja na stabilni 1,1-difenil-2-pikril hidrazil (DPPH) radikal. Utvrđeno je da kompleks bakar(II)-kvercetin pokazuje mnogo veću antioksidativnu sposobnost u odnosu na čist kvercetin.

Kompleks aluminijum(III)-kvercetin ispitivan je spektrofluorimetrijski u metanolu sa i bez prisustvu surfaktanata, a podaci koji su dobijeni ukazuju da u metanolu nastaje kompleks aluminijum(III): kvercetin = 2:1, a u metanolu kome je dodata 0,1 mol dm⁻³ nitratna kiselina, nastaje kompleks sastava 1:1.³³ Nastajanje ove dve kompleksne vrste takođe je potvrđeno i u prisustvu koloidne silikatne matrice.⁵² Spektroskopska studija⁵³ ovog sistema iz 2002. godine, takođe potvrđuje prisustvo ove dve kompleksne vrste.

Pored ovog kompleksa, kvercetin formira fluorescentne komplekse sa bakar(II)-jonom (formira se kompleks CuKverc₂),⁵⁴ zatim sa terbijum(III)-jonom (na pH = 7,0 formira se stabilan 1:1 kompleks,⁵⁵ a sa germanijum(IV)-jonom nastaje 1:1 kompleks na pH = 8,15 u 90% metanolu u prisustvu površinski aktivne materije Brij-35 (polietilen glikol lauril etar).⁵⁶ Formiranje ovih kompleksa je iskorišćeno za određivanje kvercetina ili jona metala u različitim uzorcima, a formiranje terbijum(III)- kvercetin kompleksa je primenjeno za određivanje ukupnih fenola u čajevima i sokovima.⁵⁵

2.1.3. Farmakološka svojstva flavonoida

Zbog velike biološke i farmakološke aktivnosti flavonoidi su, posebno u poslednje dve decenije, na samom vrhu naučnih i stručnih istraživanja. Proučavanjem njihovog mehanizma delovanja u *in vitro* i *in vivo* eksperimentima, pokazano je da flavonoidi poseduju antialergijske, antiinflamatorne, antiviralne i antioksidativne osobine.

Ova jedinjenja imaju važnu ulogu u održavanju i zaštiti životnih funkcija biljaka, a sličnu ulogu imaju i kod drugih živih bića koja flavonoide u svoj organizam unose kao hranu. Zaštitna uloga flavonoida u biološkim sistemima pripisuje se njihovoj sposobnosti sparivanja ("hvatanja") elektrona slobodnog radikala, helatnog vezivanja jona prelaznih metala (Fe²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺ i Mg²⁺),⁵⁷ aktiviranja antioksidativnih enzima⁵⁸ i inhibiranja *oksidaza*.⁵⁹

Jedinjenja iz ove grupe su do 1962. bila svrstavana u vitamine (vitamin P), koji su neophodni za pravilno delovanje i apsorbovanje vitamina C. Najaktivniji su flavonoidi iz citrusnih jedinjenja. Nalaze se u kori, belom sunderastom sloju ispod kore i u membranama između segmenata ploda. Pokazalo se da su flavonoidi korisni u prevenciji pucanja kapilara naročito kod osoba koje su prisiljene da svakodnevno uzimaju aspirin, protiv hronične venske insuficijencije, kod manjih sportskih povreda gde je nužna brza rehabilitacija, kod manjih ili većih modrica nastalih zbog udaraca tupim predmetima, zatim kod šećerne bolesti, katarakte, retinopatije, otoka i upale desni itd. Takođe, osobe koje u ishrani kontinuirano imaju visok nivo bioflavonoida, imaju značajno manji rizik od pojave malignih bolesti.

Antikancerogena aktivnost flavonoida izražena je preko njihovog agonizma i / ili antagonizma na karcinogenetski povezane receptore, kao što su receptori za epidermalni faktor rasta,⁶⁰ arilhidroksikarbonilni receptori⁶¹ i estrogen-receptori,⁶² odnosno mogu uticati na pojačanje delovanja antikancerogenih enzima,⁶³ ili pak inhibirati uticaj kancer-promotorskih enzima.⁶⁴⁻⁶⁶

Smatra se da utiču i na smanjenje smrtnosti kod **koronarnih srčanih oboljenja**.⁶⁷ Određeni flavonoidi imaju mogućnost inhibicije većeg broja enzima, ali se posebno ispoljava njihova inhibitorna aktivnost na nekoliko enzimskih sistema, koji su povezani sa aktivacionim procesima u ćeliji, kao što su: *protein kinaze*, *protein tirozin kinaze* i *fosfolipaze*.⁶⁸ Zbog njihove mogućnosti inhibicije oksidacije LDL (*low density lipoprotein*) proteina, flavonoidi ispoljavaju **jedinstveni efekat zaštite od kardiovaskularnih oboljenja i infarkta miokarda**.⁶⁹⁻⁷⁰

Antiinflamatorna aktivnost se manifestuje mogućnošću inhibicije nekih enzima kao što su *ciklo-oksigenaze* i *5-lipooksigenaze*, koji u svojim metaboličkim ciklusima izazivaju edeme, artritis, dermatitis i druga patološka stanja.⁷¹

Antioksidativna svojstva flavonoida. Antioksidativne karakteristike pokazuju mnogi prirodni proizvodi, koji u svojoj strukturi poseduju fenolnu ili kateholnu funkcionalnu grupu. Ova jedinjenja pokazuju veliku aktivnost u oksidacionim procesima u kojima učestvuje atmosferski kiseonik, čijom redukcijom nastaju slobodni radikali (superoksid- anjon, hidroksi-, peroksi- i alkoksi-radikali) koji predstavljaju izuzetno reaktivne oksidativne vrste. Kao posledica lančanih i slobodnoradikalskih reakcija u kojima učestvuju gore navedeni slobodni radikali javlja se veći broj

patoloških stanja u organizmu, pri čemu dolazi do oštećenja zdravih ćelija, ubrzavanja procesa starenja, destrukcije tkiva, i pojave mutagenih i kancerogenih procesa. Jedinjenja kao što su vitamin C, E, karoten, fenolna jedinjenja, flavonoidi, estrogeni biljnog porekla imaju antioksidativnu sposobnost,^{72, 73} tako što vezuju kiseonik iz vazduha, i na taj način sprečavaju njegovo štetno delovanje.

Smatra se da flavonoidi u organizmu deluju kao **antioksidansi i hvatači slobodnih radikala** i na taj način imaju važnu ulogu u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji kao lekovi i antioksidansi.⁷⁴ Predpostavlja se da se **antioksidativno delovanje flavonoida** zasniva na njihovoj sposobnosti doniranja vodonikovog atoma ili jednog elektrona nekom reaktivnom, slobodnom radikalumu i na taj način dolazi do "hvatanja" slobodnih radikala dobijenih u reakciji peroksidacije lipida. Na ovaj način, ova jedinjenja štite ljudski organizam od mogućih bolesti, i usporavaju kvarenje hrane bogate lipidima.^{75, 76}

2.1.3.1. Farmakološka svojstva morina

Morin (3,5,7,2',4'-pentahidroksiflavin, žuti pigment) je tipičan predstavnik flavonoida, pripada grupi flavonola, i pokazuje značajna farmakološka svojstva. On je vrlo značajno bioaktivno jedinjenje, koje interaguje sa nukleinskim kiselinama, enzimima i proteinima.⁷⁷ Poznato je da morin može modulirati aktivnost metaboličkih enzima, između ostalog citohroma P450,⁷⁸ a takođe ima izražena antioksidativna svojstva, te štiti različite vrste ćelija u ljudskom organizmu, kao što su miociti, ćelije endotela, hepatocita, eritrocita, od različitih oksidativnih oštećenja.⁷⁹ U novijoj literaturi pokazano je da morin štiti celovitost lizosomalne membrane, održavajući aktivnost lizosomalnih enzima u serumu i srcu.⁸⁰ Morin hidrat se često koristi kao konzervans, jer sprečava oksidaciju lipida.

Antioksidativno delovanje ispitivano je kod kompleksa morina sa lantan(III), gadolinijum(III) i luterijum(III)-jonima. Utvrđeno je da ovi kompleksi pokazuju inhibitorno delovanje na tri bakterijska soja: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* i *Staphylococcus aureus*.⁸¹

Zbog značajnih farmakoloških svojstava koje pokazuje morin, postoji potreba za njegovom kvantitativnom analizom u različitim uzorcima. U literaturi postoji nekoliko navedenih metoda koje se koriste za određivanje morina.

Grupa autora⁸² predložila je HPLC metodu za simultano određivanje morina, kvercetina i njihovih metabolita u uzorcima seruma. Ovom metodom, morin je bilo moguće odrediti u koncentracionom opsegu od 1,6 do 200 $\mu\text{g cm}^{-3}$, a granica detekcije *LOD* (*limit of detection*), za određivanje morina ovom metodom iznosila je 1,6 $\mu\text{g cm}^{-3}$.

Razvijena je kinetičko-spektrofotometrijska metoda za određivanje morina.⁸³ Koncentracioni opseg za određivanje morina ovom metodom je iznosio 2,255 – 22,55 ng cm^{-3} , sa relativnom greškom metode od 1,42–5,1 %. Granica detekcije, *LOD*, iznosila je 0,28 ng cm^{-3} .

P. Xiao i saradnici⁸⁴ su predložili metodu za voltametrijsko određivanje morina u biljnoj drogi *Glycyrrhiza*, (sladić), koja se koristi u kineskoj tradicionalnoj medicini. Prema predloženoj metodi, morin je bilo moguće odrediti u koncentracionom opsegu od $5,0 \times 10^{-9}$ do $1,0 \times 10^{-7}$ mol dm^{-3} sa granicom detekcije, *LOD* od $1,0 \times 10^{-7}$ mol dm^{-3} . Dobijene "recovery" vrednosti nalazile su se u opsegu od 97,0 do 100,5%.

Predložena je HPLC metoda za određivanje dvanaest flavonoida (deset flavonola i dva flavonona) koji se nalaze u crvenom vinu.³ Ovom metodom morin se može odrediti u koncentracionom opsegu od 7,12–114 mg dm^{-3} , a granica detekcije, *LOD* je iznosila 0,023 mg dm^{-3} .

2.1.3. 2. Farmakološka svojstva hesperidina

Hesperidin (hesperitin-7-rutinozid), spada u grupu flavanona, i takođe, ima veliku farmakološku aktivnost. Između ostalog, potpomaže efikasnost vitamina C i sprečava njegovu degradaciju i potpunu razgradnju u prisustvu vazduha. Stoga i ne čudi da se ovaj bioflavonoid u kombinaciji sa rutinom i vitaminom C vrlo često nalazi na tržištu u obliku različitih proizvoda koji se koriste kao dodaci ishrani. Hesperidin pokazuje antiinflamatorne, antialergijske osobine, doprinosi jačanju zidova kapilara, čime sprečava pojavu modrica. Takođe su poznata njegova vazodilatatorska svojstva, kao i uticaj na smanjenje gubitka gustine kostiju.⁸⁵⁻⁸⁷

Uzimajući u obzir biološke efekte hesperidina, značajno je da se razviju jednostavne, precizne i tačne metode za određivanje hesperidina u različitim uzorcima. U literaturi se nalazi nekoliko predloženih metoda koje se koriste za određivanje hesperidina u uzorcima soka od pomorandže, serumu i farmaceutskim preparatima.

Za određivanje hesperidina u preparatima koji se koriste u tradicionalnoj kineskoj medicini, razvijena je HPLC metoda sa UV-Vis detekcijom.⁸⁸ Hesperidin je ovom metodom određivan u koncentracionom opsegu od 15,36 do 122,88 $\mu\text{g cm}^{-3}$.

X. Li i saradnici⁸⁹ predložili su LC-MS/MS metodu za određivanje hesperidina, narginina i neohesperidina u serumu pacova nakon oralne upotrebe preparata koji se koriste u tradicionalnoj kineskoj medicini: *Bulpleurum falcatum* L. i *Fractus aurantii*. Hesperidin se ovom metodom mogao odrediti u koncentracionom opsegu od 2,0 do 50,0 $\mu\text{g dm}^{-3}$.

Adsorptivnom stripping voltametrijom⁹⁰ određivani su rutin i grupa flavonoida među kojima je i hesperidin. Koncentracioni opseg u kom su određivani ovi flavonoidi iznosio je od $1,0 \times 10^{-8}$ do $1,0 \times 10^{-5}$ mol dm^{-3} .

D. Obendorf i E. Reichart⁹¹ razvili su metodu katodne stripping voltetrije za određivanje hesperidina. Koncentracioni opseg u kom je bilo moguće odrediti hesperidin iznosio je od $1,64 \times 10^{-7}$ do $4,1 \times 10^{-5}$ mol dm^{-3} . Ovom metodom bio je određivan sadržaj hesperidina u fitofarmaceutskom preparatu *Helopyrin tablete*, proizvođača Rosh & Handel, (Beč, Austrija) i soku od pomorandže. Sadržaj hesperidina u fitofarmaceutskom preparatu *Helopyrin tablete*, određen je metodom internog standarda i iznosio je 13,6 mg po jednoj tableti, a standardna devijacija ovog određivanja iznosila je 2,96 %. Sadržaj hesperidina u ispitivanim sokovima (analizirane su tri vrste soka) se kretao od 340,3 do 555,3 mg dm^{-3} .

Metodom pulsne pertubacije u oscilatornim sistemima, koju su ustanovili N. Pejić i grupa autora⁹² bilo je moguće odrediti hesperidin u širokom koncentracionom intervalu 7,5 do 599,4 $\mu\text{g cm}^{-3}$ (odnosno $1,2 \times 10^{-5}$ do $9,8 \times 10^{-4}$ mol dm^{-3}).

D. Malešev i saradnici⁴⁰ su spektrofotometrijski ispitivali kompleks aluminijum(III)-hesperidin i predložili jednostavnu spektrofotometrijsku metodu za određivanje hesperidina u sokovima od pomorandže, zasnovanu na merenju apsorbanције ovog kompleksa na $\lambda = 410$ nm. Hesperidin se ovom metodom mogao

odrediti u koncentracionom opsegu od $2,50 \times 10^{-5}$ mol dm⁻³ do $1,75 \times 10^{-4}$ mol dm⁻³ (odnosno od 15 do 10,6 mg dm⁻³).

T. Perez-Ruiz i saradnici⁴³ su razvili i validirali spektrofluorimetrijsku metodu za određivanje hesperidina u kori i soku pomorandže koja se zasniva na kompleksiranju hesperidina i aluminijum(III)-jona u micelarnom medijumu (u prisustvu SDSa, odnosno natrijum-dodecilsulfata). Za određivanje sadržaja hesperidina u uzorcima su korišćene manuelne i *flow injection* procedure, pri čemu je korišćena talasna dužina ekscitacije na 391 nm i emisije na 496 nm. Opseg koncentracija u kom se hesperidin ovom metodom mogao odrediti, je bio između $5,0 \times 10^{-7}$ i $2,0 \times 10^{-5}$ mol dm⁻³ sa granicom detekcije od 79 µg dm⁻³.

2.1.3.3. Farmakološka svojstva kvercetina

Kvercetin (3',3,4',5,7-pentahidroksiflavon), još jedan flavonoid iz grupe flavonola, po strukturi vrlo sličan morinu, pokazuje jaku antioksidativnu i antiinflamatornu aktivnost.^{93, 94} Upotreba kvercetina u tradicionalnoj medicini u lečenju dijareje i dizenterije poznata je godinama unazad.

Antiinflamatorno delovanje postiže se inhibicijom biosinteze metabolita koji nastaju iz proinflamatorne arahidonske kiseline (leukotrieni LT₄ i grupa proinflamatornih prostaglandina PG₂), ali i u inhibicijom proinflamatornih enzima *ciklooksigenaze* i *lipooksigenaze*. Inhibicija oslobađanja histamina uz antialergijsko delovanje ima i antiinflamatorni efekat. Kvercetin je vrlo jak antioksidans, i pokazao je raznovrsno pozitivno delovanje na ljudski organizam, naročito na nivou zaštite ćelijske strukture i krvnih sudova od razornog dejstva slobodnih radikala. Kao i većina bioflavonoida, kvercetin ima i vazodilatatorsku ulogu,⁹⁵ čime utiče na zaštitu krvnih sudova, jer povećava njihovu elastičnost i samim tim utiče na normalizaciju povišenog krvnog pritiska. Kvercetin smanjuje agregaciju trombocita, smanjuje štetni LDL holesterol tj. njegovu oksidaciju i izaziva širenje krvnih sudova a pokazuje i antioksidativni i antiagregacijski efekat. Kvercetrin inhibira enzim *aldoza-reduktazu* i zaustavlja napredovanje katarakte kod dijabetičara. Smatra se da je kvercetin najaktivniji od svih flavonoida. Istraživanja ukazuju i na njegovu antiviralnu i antitumorsku aktivnost.⁹⁶

S obzirom da kvercetin predstavlja jedan od najzastupljenijih flavonola i jedan od najsnažnijih antioksidanasa, bilo je važno da se razviju jednostavne, precizne i tačne metode za određivanje kvercetina u različitim uzorcima. U literaturi se nalazi nekoliko predloženih metoda koje se koriste za određivanje kvercetina u uzorcima sokova i plodova od jabuke i paradajza, vinima, čajevima, serumu i farmaceutskim preparatima.

N. Pejić i grupa autora⁹⁷ razvili su jednostavnu spektrofotometrijsku metodu za određivanje kvercetina u prisustvu vitamina C u doziranim oblicima. Beerov zakon se mogao primeniti na koncentracioni opseg od 1,0–12,0 $\mu\text{g cm}^{-3}$, a granica detekcije kvercetina ovom metodom iznosila je 0,76 $\mu\text{g cm}^{-3}$.

V. Kuntić i saradnici⁴⁷ predložili su brzu, jednostavnu i tačnu metodu za određivanje kvercetina u farmaceutskim sirovinama i doziranim oblicima. Metoda je bazirana na spektrofotometrijskom određivanju kompleksa formiranog između kvercetina i kalijum-titaniloksalata u 50 % etanolu. Kako se kvercetin uobičajeno nalazi zajedno sa vitaminom C u doziranim oblicima, predložene su dve procedure za određivanje kvercetina: bez i u prisustvu askorbinske kiseline. U obe predložene procedure, Beerov zakon važi u opsegu koncentracija od 0,85 – 16,9 $\mu\text{g cm}^{-3}$. Granica detekcije, *LOD*, kvercetina u prisustvu vitamina C je iznosila 0,72 $\mu\text{g cm}^{-3}$, a bez njegovog prisustva 0,67 $\mu\text{g cm}^{-3}$.

Predložena je HPLC metoda⁹⁸ za simultano određivanje kvercetina i luteolina u kapsulama, *LamiopHlomis rotata (Benth.) Kudo*. Granica detekcije luteolina i kvercetina ovom metodom iznosila je 7,5 ng i 16,0 ng respektivno, dok "recovery" vrednosti za određivanje luteolina i kvercetina iznose 96,8 % i 92,6 %, respektivno.

Za određivanje ukupnog sadržaja polifenola, razvijena je fluorimetrijska metoda koja je zasnovana na senzibilisanoj fluorescenciji kompleksnog jedinjenja koje nastaje u reakciji terbijum(III)-jona i flavonola.⁵⁵ Predložena metoda za određivanje ukupnog sadržaja polifenola je primenjena za određivanje sadržaja ukupnih polifenola u soku od jabuka, a sadržaj ukupnih polifenola je izražen u odnosu ekvivalent kvercetina (QE). Ovaj postupak je opravdan činjenicom da je kvercetin jedan od najzastupljenijih flavonola i jedan od najsnažnijih antioksidanasa, i koji se nalazi u voćnom soku od jabuke. Metoda je pokazala odličnu saglasnost određivanja ukupnog sadržaja polifenola, koji su određivani u odnosu ekvivalent kvercetina (QE), u odnosu na određivanje ukupnog sadržaja polifenola referentnom Folin–Ciocalteu

spektrofotometrijskom metodom. Koncentracioni opseg u kom se može odrediti sadržaj polifenola ovom metodom nalazi se u oblasti od 0,01 do 2l $\mu\text{g cm}^{-3}$, a granica detekcije ovom metodom 0,002 $\mu\text{g cm}^{-3}$.

G. J. Volikakis, C. E. Efstathiou⁹⁹ razvili su metodu adsorptivne striping voltametrije za određivanje sadržaja flavonola (kvercetina, kaempferola, miricetina) u soku od paradajza, vinu i čajevima. Za određivanje sadržaja flavonola u navedenim uzorcima korišćena je *flow injection* procedura. Linearnost postignuta ovom metodom je iznosila od 3 do 60 $\mu\text{g cm}^{-3}$, i u ovom slučaju sadržaj flavonola u uzorcima čajeva, sokova i vina izražen je u odnosu ekvivalent kvercetina (QE).

2.2. Aluminijum(III)-jon kao izabrani centralni metalni jon i njegova svojstva

Aluminijum se nalazi u IIIa grupi periodnog sistema elemenata. Redni broj aluminijuma je 13, a atomska masa 26,98 g mol^{-1} . Ima mali atomski radijus (57 pm) koji omogućava stabilnost njegovih jedinjenja. Elektronska konfiguracija aluminijuma je $3s^2 3p^1$. Dovođenjem energije dolazi do prelaska jednog s-elektrona u slobodnu p-orbitalu, pri čemu nastaju tri sp^2 -hibridne orbitale. Zbog toga je aluminijum u svim jedinjenjima u oksidacionom stanju +3, a u vodenim rastvorima ovaj jon postoji kao hidratisan sa šest molekula vode. Sa oksidacionim brojem +3, aluminijum gradi veliki broj jedinjenja jonskog i kovalentnog karaktera.

Aluminijum gradi **kompleksna jedinjenja** sa koordinacionim brojevima +4 i +6 koja sadrže sledeće kompleksne jone: $[\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_3]^{3+}$, $[\text{Al}(\text{OH})_6]^{3-}$, $[\text{AlF}_6]^{3-}$, $[\text{AlCl}_4]^-$, $[\text{AlBr}_4]^-$ i dr. Sa flavonoidima formira kompleksna jedinjenja od kojih neka pokazuju fluorescentna svojstva.

Aluminijum(III)-jon je još pedesetih godina prošlog veka prepoznat kao kompleksirajući reagens za flavonoide. Poređenjem UV spektara samog flavonoida i kompleksa aluminijum(III)-flavonoid, uočava se da reakcijom aluminijum(III)-jona sa molekulom flavonoida dolazi do pomeranja traka u UV spektrima flavonoida.

Utvrđeno je da najčešće nastaju kompleksi sastava AlFlav, AlFlav₂ ili Al₂Flav, ali mogu se formirati i kompleksi sastava AlFlav₃ i Al₂Flav₃.^{7, 9, 100} Generalno, najzastupljeniji je tip kompleksa stehiometrijskog sastava aluminijum(III): flavonoid = 1 : 2, odnosno nastajanje kompleksa koji ima opštu formulu [Al(flavonoid-H)₂]⁺, i koji nastaje kod flavonoida koji imaju bar jednu hidroksilnu grupu (C3-OH, C5-OH ili obe) u blizini karbonilne grupe u položaju C4.¹⁰¹

Aluminijum(III)-jon, pored već pomenutih kompleksa aluminijum(III)-morin, aluminijum(III)-hesperidin i aluminijum(III)-kvercetin, gradi komplekse i sa drugim flavonoidima. Spektroskopskom i strukturnom analizom izučavan je aluminijum(III)-5 hidroksiflavon kompleks,^{102, 103} pri čemu je utvrđeno da nastaje 1:1 kompleks. Sa izokvercetinom, aluminijum(III)-jon formira nekoliko kompleksnih vrsta Al(Iso)₂⁺, Al(Iso)²⁺, i Al₂(Iso)³⁺.¹⁰⁴ Takođe je spektroskopski ispitivan kompleks aluminijum(III)-3 hidroksiflavon, i utvrđeno da nastaje kompleks sastava Al(3HF)₂.¹⁰⁵ Sa 5,7-dihidroksi-flavonom gradi se kompleks aluminijum(III)-5,7-dihidroksi-flavon je sastava 1:2.¹⁰⁶

Od navedenih aluminijum(III)-flavonoid kompleksa, fluorescenciju pokazuju aluminijum(III)-morin, aluminijum(III)-hesperidin, aluminijum(III)-kvercetin i aluminijum(III)-5 hidroksiflavon kompleksi. Međutim, aluminijum(III)-jon i sa nekim organskim molekulima daje fluorescirajuće komplekse, čime je omogućena detekcija i određivanje datih molekula. Tako aluminijum sa pioverdinom (siderofora koju stvara gram negativna bakterija *Pseudomonas fluorescens*), formira 1:1 kompleks, koji se može primeniti u toksikološke i analitičke svrhe.¹⁰⁷ Reakcija aluminijuma i norfloksacina (antibiotik iz grupe hinolona) u prisustvu SDSa (natrijum dodecilsulfata), u kojoj se formira 1:1 kompleks, iskorišćena je za određivanje norfloksacina u humanom serumu.¹⁰⁸ Metoda koja je predložena za određivanje aluminijuma u tragovima (koncentracije reda veličine ng cm⁻³) u pijaćoj, rečnoj i morskoj vodi zasnovana je na formiranju 1:1 kompleksa aluminijuma i hromotropne kiseline (1,8-dihidroksinaftlen-3,6-disulfonska kiselina).¹⁰⁹

Fluorescencija kompleksa aluminijum(III)-N,N'-disalicilidene-1,3-diamino-2-hidroksiopropan (sastav 1:2) primenjena je za određivanje aluminijuma u rastvorima za hemodijalizu.¹¹⁰ Spektrofluorimetrijsko određivanje nukleinskih kiselina zasnovano je na njihovom uticaju na intenzitet fluorescencije aluminijum(III)-8-hidroksihinolin

kompleksa.¹¹¹

Za aluminijum se dugo smatralo da je biološki neaktivan, i da se ne apsorbuje iz gastrointestinalnog trakta. Međutim, rezultati studija koje su rađene devedesetih godina dvadesetog veka su pokazali da akumulacija aluminijuma u organizmu može da dovede do patoloških stanja,^{112, 113} zbog deponovanja u mozgu, pri čemu dolazi do oštećenja funkcije pamćenja, pojave konvulzija, karakteristične promene u EEG-u, pojavu uremije a povezuju ga sa i sa nastankom Alchajmerove bolesti¹¹⁴ i nekih drugih neuroloških oboljenja. Poremećaj u rastu skeleta izazvan je deponovanjem aluminijuma u kostima. Smatra se da prisustvo aluminijuma u organizmu povećava rizik od oboljevanja od raka pluća i pankreasa¹¹⁵ kao i da povećava rizik za pojavu leukemije. Kao posledica dejstva aluminijuma kod radnika koji su u dužem vremenskom periodu bili izloženi ovom dejstvu, uočene su fibroza pluća, odnosno takozvana Šejverova bolest pluća¹¹⁶ i aluminoze praćene pneumotoraksom kod radnika u proizvodnji pirotehničkih sredstava. U drugoj polovini prošlog veka, sprovedena je studija nad pacijentima koji su bili oko tri godine na dijalizi. Uočeno je da kod jednog dela ovih pacijenata dolazi do demineralizacije kostiju. Epidemiološke studije su pokazale da postoji veza između koncentracije aluminijuma u tečnosti za hemodijalizu i njegovog povećanog sadržaja u kostima i mozgu (uočene su pojave encefalopatije ili dijalizne demencije), a smatra se da može biti i uzrok nastanka anemije.¹¹⁷ Prisustvo aluminijum(III)-jona u kostima otežava razmenu katjona i anjona koštanog tkiva sa drugim tkivima, što dovodi do usporenog rasta skeleta, a kao posledica nastaju i osteoporoza i osteomalacija.

Zbog njegovih toksičnih svojstava, od izuzetnog značaja je kontrolisati kvalitet vode, hrane, farmaceutskih preparata, te su stoga razvijene metode kojima se ovaj metal može odrediti u tragovima u uzorcima hrane, vode, rastvorima koji se koriste za hemodijalizu, peritonealnu dijalizu, rastvorima za hemofiltraciju, rastvorima za totalnu parenteralnu ishranu kao i u biološkim fluidima (humani serum, humana plazma, urin).

3. Eksperimentalni deo

3.1. Metode

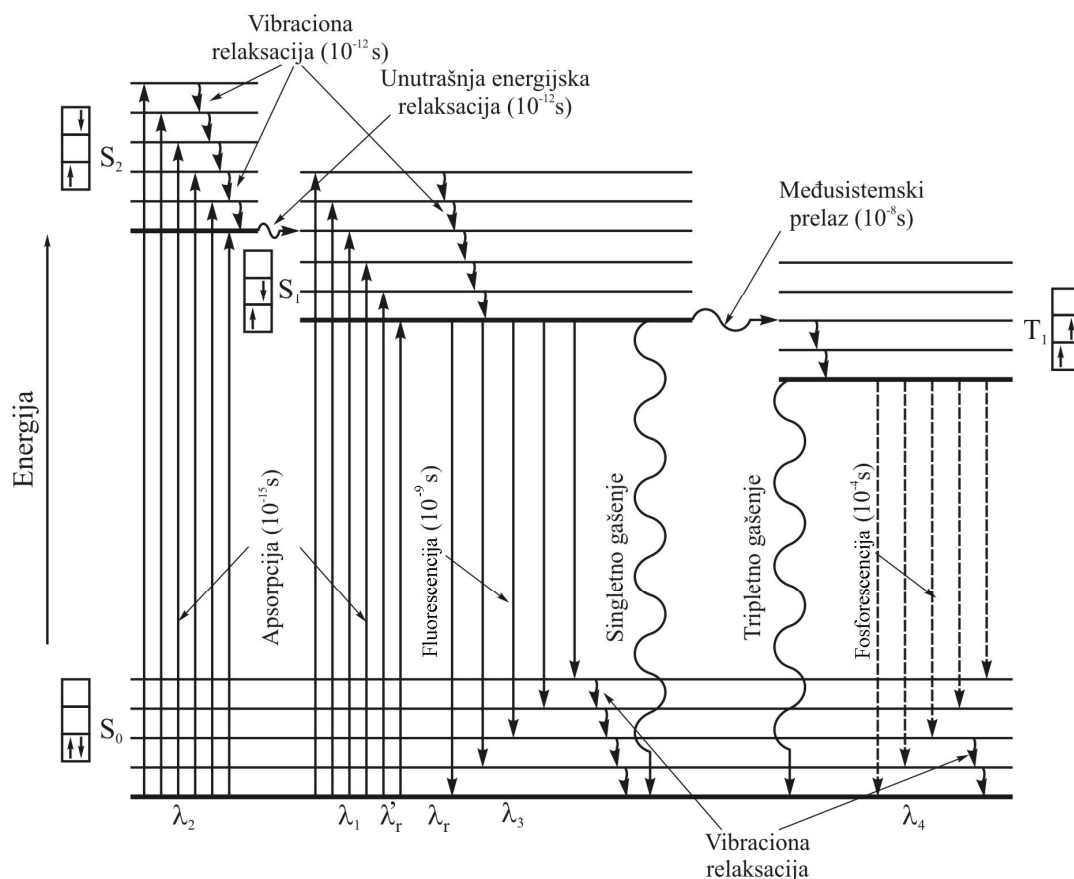
3.1.1. Spektrofluorimetrija

Spektrofluorimetrijska metoda je zasnovana na merenju intenziteta fluorescencije analita u funkciji talasne dužine emitovanog zračenja.

Fluorescencija spada u luminiscentne odnosno fotoluminiscentne pojave. Luminiscencija je zajednički naziv za niz fizičkih, hemijskih i biohemijskih procesa koji imaju za posledicu zračenje svetlosti. Luminiscentne pojave su posledica elektronskih prelaza molekula, tako da se pod pojmom luminiscentnog zračenja podrazumeva svetlost koja se emituje u ULJ i VID oblasti spektra.

Fluorescencija zajedno sa fosforescencijom predstavlja jednu od najstarijih ustanovljenih spektroskopskih metoda. Može se definisati kao radijacioni prelaz između elektronskih stanja iste multipletnosti. Fluorescentna emisija nastaje prelazom sa osnovnog vibracionog nivoa prvog pobuđenog singletnog stanja molekula na neki (bilo koji) od vibracionih nivoa osnovnog elektronskog stanja, $S_1(v' = 0) \rightarrow S_0(v'' = 0, 1, 2, 3, \dots)$.

Posle akta apsorpcije molekuli se prevode na različite vibracione nivoe nekog od pobuđenih elektronskih stanja što zavisi od vrednosti apsorbovane energije. Veoma brzo posle apsorpcije molekul se "oslobađa" viška vibracione energije nekim od procesa neradijacione dezaktivacije (relaksacije) koji su znatno brži od radijacionih procesa kao što su fluorescencija ili fosforescencija. Koji će proces biti dominantan zavisi od strukture i simetrije molekula kao i spoljašnjih faktora: temperature, agregatnog stanja, prisustva drugih molekula u sistemu i dr. Na slici 3.1. prikazan je dijagram Jablonskog sa svim karakterističnim radijacionim i neradijacionim prelazima između dva elektronska stanja.



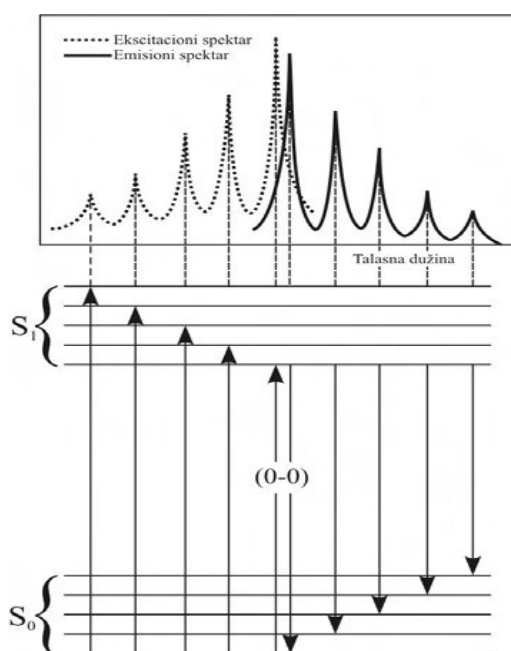
Slika 3.1. Dijagram Jablonskog

U zavisnosti od toga koji fenomen se prati, razlikuju se emisioni i ekscitacioni fotoluminescentni spektri (slika 3.2.). Emisioni spektar predstavlja zavisnost intenziteta fotoluminescentne emisije u funkciji talasne dužine ili frekvencije pri fiksnoj ekscitacionoj talasnoj dužini. Prikazivanjem spektra u zavisnosti od talasne dužine ili frekvencije na istom dijagramu dobiće se dva različita fotoluminescentna profila. Escitacioni spektar predstavlja zavisnost intenziteta fotoluminescentne emisije na konstantnoj talasnoj dužini (obično maksimumu fluorescencije ili fosforescencije) na različitim talasnim dužinama pobuđivačkog zračenja. Spektrofluorimetrijska metoda je zasnovana na fluorescenciji, odnosno pojavi da pri delovanju ultraljubičaste ili vidljive svetlosti na neke molekule dolazi do sekundarne emisije svetlosti veće talasne dužine od pobudne. Emitovana svetlost je karakteristična za supstanciju koja je emituje.

Osnovna karakteristika fluorescentnog zračenja je niža frekvencija (manja energija) od frekvencije apsorbovanog zračenja, odnosno veća talasna dužina

fluorescentnog zračenja od talasne dužine apsorbovanog zračenja. Struktura i izgled fluorescentnog spektra može da pruži informacije o stanju, jačini veze i stabilnosti molekula u osnovnom stanju. Ekscitacioni i emisioni spektri (prikazani na slici 3.2) su obično takvog izgleda da imaju "ogledalsku simetriju" jedan u odnosu na drugi.

Na karakteristike fluorescentnih spektara utiče struktura molekula, koncentracija, efekti okoline (rastvarač, prisustvo molekula drugih rastvoraka, metalnih jona ili kiseonika, *pH* vrednost sredine, temperatura).



Slika 3.2. Shematski prikaz ekscitacionog i emisionog spektra

Spektrofluorimetrija se koristi za kvalitativnu analizu, kao i za određivanje supstancija. Prema talasnoj dužini emitovanog talasa, može se izvršiti kvalitativna analiza, dok se kvantitativna analiza zasniva se na linearnoj zavisnosti intenziteta fluorescentne emisije ispitivane supstancije od koncentracije koji je predstavljen jednačinom:¹¹⁸

$$I_F = QI_0 [1 - 10^{-\epsilon \phi_f L c}] \quad (3.1.)$$

gde I_F predstavlja intenzitet fluorescencije, I_0 intenzitet upadne, ekscitacione, svetlosti, proizvod predstavlja $\epsilon \Phi_f$ senzitivnost fluorofore, sa L je označena debljina sloja supstancije, odnosno dužina optičkog puta svetlosti, a c je koncentracija ispitivane supstancije. U slučaju vrlo razblaženih rastvora, kod kojih je deo apsorbovane svetlosti mali, izraz (3.1.) se može transformisati u izraz:

$$I = 2,303I_0\epsilon L\Phi_f c = kc \quad (3.2.)$$

te se može primeniti metoda kalibracione krive.

Spektrofluorimetrija je osetljiva metoda jer se fluorescencija manifestuje i pri vrlo niskim koncentracijama, tako da se mogu određivati koncentracije i do 10^3 puta manje nego spektrofotometrijskim metodama. Ovom metodom se mogu detektovati vrlo niske koncentracije supstancija ($\sim 10^{-12}$ mol dm⁻³), te je ova metoda našla značajnu primenu u biohemijskim, medicinskim i hemijskim istraživanjima.

3.1.2. Tečna hromatografija

Tečna hromatografija (*LC - liquid chromatography*) je osnovna višenamenska separaciona tehnika koja se primenjuje u savremenim istraživanjima. Za razliku od mnogih drugih separacionih tehnika koje nisu pogodne za razdvajanje termički nestabilnih molekula, tečna hromatografija se može uspešno primeniti za razdvajanje većeg broja molekula kao što su polimeri, mali molekuli farmaceutika ili njihovih metabolita, kao i peptida i proteina.

Tečna hromatografija je tehnika koja se koristi za separaciju hemijskih vrsta iz rastvora. Komponente rastvora u različitoj meri stupaju u interakciju sa stacionarnom i tečnom mobilnom fazom, te imaju različita vremena zadržavanja na hromatografskoj koloni.

Razdvajanje je zasnovano na raspodeli ispitivanih supstanci između dve faze koje se međusobno ne mešaju, od kojih je jedna stacionarna, dok je druga mobilna faza. Ispitivana smeša komponenata je rastvorena u mobilnoj fazi i propušta se kroz kolonu u kojoj se nalazi stacionarna faza. U koloni dolazi do raspodele komponenata smeše između dve faze usled procesa adsorpcije ili procesa raspodele komponenata smeše između dve tečne faze.

U zavisnosti od polarnosti stacionarne i mobilne faze, tečna hromatografija se deli na tečnu hromatografiju normalnih faza (stacionarna faza je polarna, a mobilna faza nepolarna, koristi se za analizu polarnih analita) i reverznofaznu tečnu hromatografiju (tečnu hromatografiju reverznih faza kod koje je stacionarna faza je nepolarna, dok je mobilna faza polarna, i koristi se za analizu nepolarnih analita).

Reverznofazna tečna hromatografija (RP-HPLC, Reverse-phase-high performance liquid chromatography) je razvijena osamdesetih godina dvadesetog veka, i danas predstavlja jednu od najznačajnijih tehnika koja se koristi u modernoj analitičkoj hemiji. Princip razdvajanja ovom tehnikom se zasniva na interakcijama, koje su rezultat odbijajućih sila između polarnog rastvarača i relativno nepolarne supstance koja se analizira i nepolarne stacionarne faze. Najpolarniji molekuli smeše se eluiraju na početku, odnosno imaju najkraća vremena zadržavanja (retenciona vremena), dok se najmanje polarni molekuli, eluiraju na kraju, odnosno, ostaju najduže zadržani na koloni te stoga imaju velike vrednosti retencionih vremena.

Ova tehnika koristi nepolarnu stacionarnu fazu i polarnu mobilnu fazu. *Stacionarnu fazu* predstavlja silikatna porozna površina tretirana sa RMe_2SiCl , gdje je R alkilna grupa ugljovodoničnog lanca (npr. $\text{C}_{18}\text{H}_{37}$ ili C_8H_{17}), te se u praksi upotrebljavaju C4, C8, C18 i C30 kolone. Kao *mobilna faza* se koriste rastvarači ili smeše rastvarača koji su veoma polarni i najčešće su to vodeni rastvori metanola, acetonitrila i tetrahidrofurana.

Vreme zadržavanja (retenciono vreme) komponente analizirane smeše na koloni zavisi, pre svega, od polarnosti same komponente, ali i od eksperimentalnih uslova: sastava mobilne faze, tipa kolone i temperature.¹¹⁹

U RP-HPLC tehnici posebno se mora voditi računa o *pH* vrednosti mobilne faze, jer ako je *pH* vrednost preko 7,5, može doći do razgradnje silikatnih čestica stacionarne faze.¹²⁰

Promenom *pH* mobilne faze utiče se na brzinu eluiranja komponenti analizirane smeše, jer se na taj način može promeniti polarnost analiziranih hemijskih vrsta. Retenciono vreme komponente smeše je duže za manje polarne supstance, i može se povećati dodatkom polarnih rastvarača u mobilnu fazu, odnosno smanjiti dodatkom

hidrofobnih rastvarača. Povećanje temperature dovodi do smanjenja retencionih vremena analiziranih vrsta.

Tečna hromatografija povezana s tandemnom spektrometrijom masa, (Liquid Chromatography Coupled with Tandem Mass Spectrometry LC-MS/MS), predstavlja sistem koji omogućava razdvajanje komponenata smeše i njihovu detekciju na osnovu odnosa mase i naelektrisanja (m/z) jona koji nastaju u MS/MS analizatoru. Usled velike moći razdvajanja masa, postiže se velika selektivnost. LC-MS/MS tehnika omogućava brzo i selektivno određivanje velikog broja jedinjenja u biološkim uzorcima.

3.1.3. Ekstrakcija na čvrstoj fazi

Ekstrakcija na čvrstoj fazi (*Solid-phase extraction- SPE*) je separaciona tehnika koja se koristi za izolovanje ispitivanog jedinjenja ili jona, što je potrebno za kvalitativnu i kvantitativnu analizu ciljnog analita. Ovaj tip ekstrakcije omogućava izolovanje analita iz različitih uzoraka čak i veoma složenih matriksa kao što su voda, mleko, urin, krv, tkiva i drugi.¹²⁰

Ekstrakcija na čvrstoj fazi se danas primenjuje najčešće u pripremi uzoraka radi dalje analize pogodnom analitičkom metodom, što je često HPLC metoda. S obzirom na to da su uzorci iz životne sredine veoma složeni po sastavu i sadrže analite u niskim koncentracijama, nije moguće direktno injektovanje uzorka u hromatografski sistem. Neophodno je takav uzorak pripremiti, tj. izolovati, koncentrovati i prečistiti analit, te je stoga ekstrakcija na čvrstoj fazi (SPE) separaciona tehnika od velikog značaja koja ima za cilj da kvantitativno izoluje analite od kontaminenata, da se analiti koncentrišu u mernom opsegu i da se odredi odgovarajuća forma za analizu.

Ekstrakcija na čvrstoj fazi se primenjuje u postupku:

- uklanjanja interferirajućih (ometajućih) supstanci i precišćavanja uzoraka,
- koncentrisanja analita,
- selektivnog razdvajanja jona i
- promena matriksa analita uz primenu drugog rastvarača, ako je to potrebno u daljim analizama.

Za efikasnu ekstrakciju na čvrstoj fazi od posebnog značaja je definisati uzorak:

- matriks (medijum iz koga se izvodi ekstrakcija)
- analit (ispitivani joni ili jedinjenje)

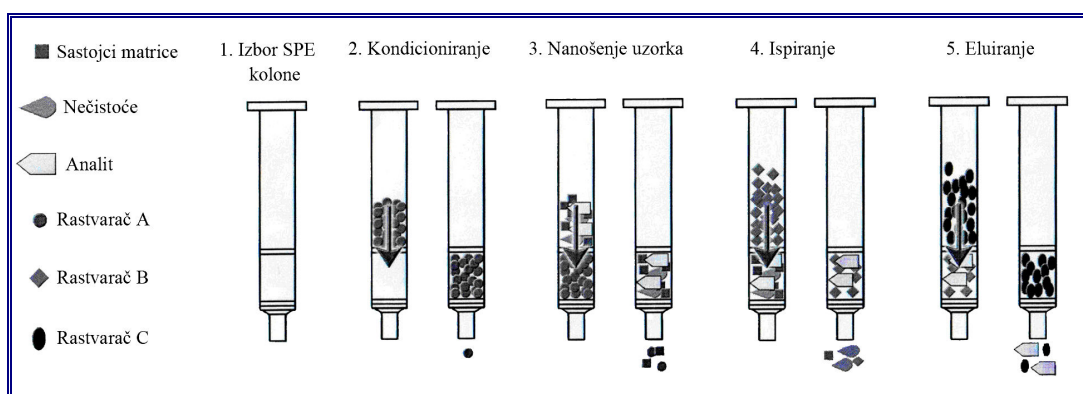
- interferencije (ometajuća jedinjenja ili joni koji se uklanjaju).

Ekstrakcija na čvrstoj fazi zasniva se na izolovanju analita-ispitivanog jedinjenja iz smeše sa drugim komponentama. To se postiže prolaskom uzorka kroz kratku kolonu sa odgovarajućim sorbentom, korišćenjem pritiska ili vakuuma. Postoje dva tipa ekstrakcije, u zavisnosti od namene SPE analize:

- uz retenciju ciljnog analita
- bez retencije ciljnog analita.

Procedura ekstrakcije na čvrstoj fazi prikazana je na slici 3.3. Nakon izbora odgovarajuće SPE kolone, eksperimentalna procedura sastoji se iz četiri faze:

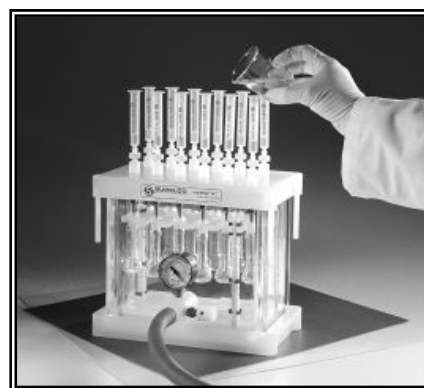
1. kondicioniranje kolone - propuštanje male zapremine odgovarajućeg rastvarača kroz pakovanje kolone u cilju pripreme adsorbensa za adsorpciju analita;
2. nanošenje uzorka - propuštanje uzorka vode kroz kolonu, pri čemu se analit adsorbuje na pakovanju kolone;
3. ispiranje kolone - propuštanje minimalne zapremine odgovarajućeg rastvarača (obično dejonizovane vode sa malim sadržajem organskog rastvarača) kroz kolonu radi uklanjanja polarnih nečistoća i soli iz uzorka vode koja su se zadržala na adsorbensu;
4. eluiranje - propuštanje odgovarajućeg rastvarača u kojem se analit dobro rastvara i desorpcija analita sa kolone.



Slika 3.3. Procedura ekstrakcije na čvrstoj fazi.

Na slici 3.4. je prikazana aparatura potrebna za izvođenje ekstrakcije na čvrstoj fazi koja omogućava istovremenu ekstrakciju iz većeg broja uzoraka. Aparatura se

sastoji od staklene kade na kojoj se nalazi izvod sa manometrom za vezivanje vakuum pumpe, koja je često neophodna. Staklena kada se zatvara perforiranim poklopcem na koji se postavljaju kertridži, tj. SPE kolone sa adsorbensima. U kadu se stavlja stalak sa kivetama, koje se nalaze neposredno ispod svakog kertridža i služe za sakupljanje ekstrakta prilikom eluiranja kolona rastvaračem.



Slika 3.4. Aparatura za ekstrakciju na čvrstoj fazi.

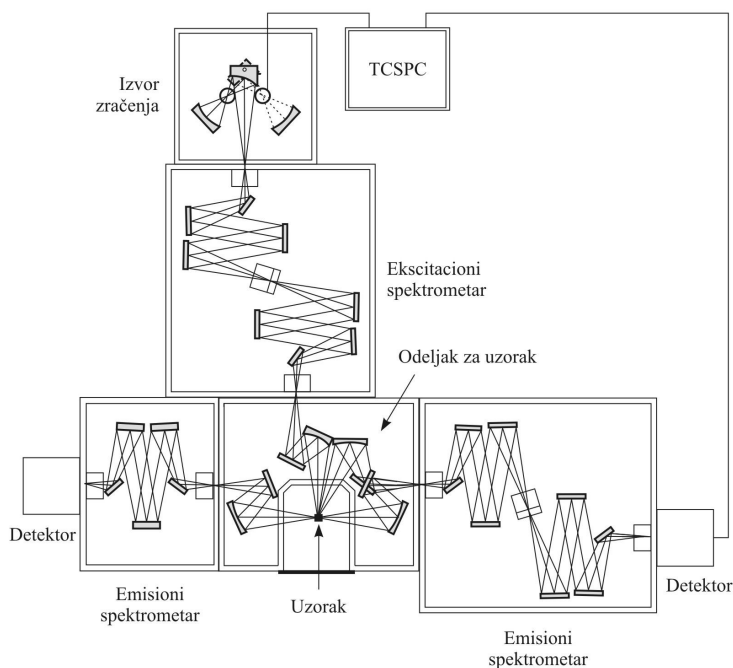
Zahvaljujući jednostavnosti, brzini, efikasnosti i manjoj potrošnji organskih rastvarača, ova tehnika je uzela primat nad klasičnom tečno-tečnom ekstrakcijom. Do zadržavanja analita dolazi tako što se uzorak propušta kroz poroznu čvrstu fazu sa velikim afinitetom prema analitu. Izborom odgovarajućeg rastvarača, analit se kasnije eluira sa čvrste faze. Ograničenja SPE tehnike su unošenje sastojaka matrice uzorka u ekstrakt i upotreba skupih kolona pakovanih čvrstom fazom koje se obično bacaju nakon jedne upotrebe.

3.2. Instrumenti i reagensi

3.2.1. Instrumenti

3.2.1.1. Spektrofluorimetar

Kao i kod većine instrumenata koji se koriste u drugim spektrofotometrijskim metodama, osnovne komponente spektrofluorimetara su: izvor zračenja, monohromatori, ćelija za uzorak i detektori. U sastav instrumenta koji je prikazan na slici.3.5. ulaze i jedan ekscitacioni i dva emisiona spektrometra. Kao izvor zračenja se koristi ksenonska lampa koja emituje zračenje u relativno širokom opsegu talasnih dužina (i do ultraljubičaste oblasti spektra). Uređaj Fluorolog-3 Model FL3-221 (slika 3.5.) je opremljen sa dve ksenonske lampe – kontinualnom, koja se koristi kod snimanja luminiscentnih spektara u statičkom režimu, i pulsnom, koja se koristi za merenja vremenski razloženih luminescentnih spektara i vremena života radijacionih prelaza.



Slika 3.5. Optička shema spektrofluorimetra

Fluorolog-3 Model FL3-221 (HORIBA Jobin-Yvon)

Zračenje iz izvora se usmerava sistemom sočiva na ekscitacioni filter, koji izdvaja monohromatsko ili zračenje veoma uskog opsega talasnih dužina za pobuđivanje

analita. Iz izvora zračenje dospeva u ekscitacioni spektrometar koji ima dva monohromatora vezana u red u cilju dobijanja što kvalitetnijeg pobuđivačkog zračenja. Iz emisionog spektrometra zračenje se usmerava na ćeliju sa uzorkom, koji je u vidu praha presovanog u tabletu. Nosač za uzorak može da se modifikuje i prilagođava tipu uzorka.

Fluorescentni spektri dobijeni su merenjem na uređaju Fluorog-3 spektrofluorimetar (Jobin Yvon Horiba, Paris, France) koji kao izvor polihromatskog zračenja sadrži ksenonsku lampu snage 450 W, a kao fotodetektor emitovanog zračenja se koriste fotomultiplikatorske tube. U zavisnosti od ispitivanog kompleksa, širine otvora za ekscitacione i emisione snopove podešavne su na 3 nm, i 4nm, ili 5nm i 5nm. Spektri su korigovani na tamnu struju. Pri svakom merenju, usrednjeno je deset prolaza. Sva merenja su obavljena na temperaturi od 25 °C , kontrolisanoj pomoću Peltierovog instrumenta. Korišćene su kvarcne kivete optičkog puta 1,00 cm.

3.2.1.2. Hromatografski sistemi

Hromatografska merenja za određivanje morina i kvercetina urađena su na HPLC sistemu (Shimadzu, Japan) koji se sastojao od analitičke pumpe LC-20AT, degazera DGU-20A₃, injektora 7125 (2×10^{-5} dm³), termostata kolone CTO-20A i foto diodnog detektora SPD-M20A i CBM-20A kontrolora sistema. Analiza dobijenih podataka vršena je softverom LC Solution (Shimadzu).

Za određivanje morina korišćena je reverzno fazna kolona RP-18 Thermo-Fisher (USA) Hypersil Gold AQ, dimenzija 150 × 4,6 mm, i prečnikom zrna punila 5,0 μm. Mobilna faza, protoka od 1 cm³ min⁻¹, sadržavala je acetonitril i 0,1% fosforu kiselinu u odnosu 30:70 v/v %. Zapremina od 2×10^{-5} dm³ uzorka injektovana je u HPLC sistem. Detekcija je vršena na talasnoj dužini od 250 nm.

Za određivanje kvercetina korišćena je reverzno fazna AquaGold aQ (150 × 4,6 mm, velicina čestica 5μm) (Thermo, USA) kolona. Mobilna faza je sadržavala vodu (+2% sirćetna kiselina) i acetonitril u odnosu 95:5 (v/v%); protok mobilne faze od 1 cm³ min⁻¹ na temperaturi od 30 °C. Zapremina od 2×10^{-5} dm³ uzorka je injektovana u HPLC sistem. Detekcija je vršena na talasnoj dužini od 254 nm.

Hromatografska merenja za određivanje hesperidina u tabletama vršena su na HPLC sistemu Perkin Elmer PE200 (Norwalk, CT, USA), koji se sastojao od binarne

pumpe, autosamplera (injekcione zapremine od $2 \times 10^{-5} \text{ dm}^3$), uz korišćenje kolone Gemini C18 ($150 \times 4,6 \text{ mm}$, $3 \mu\text{m}$, Phenomenex, California, USA), sa termostatom kolone i ULJ-VID detektorom. Detekcija je vršena na talasnoj dužini od 280 nm . Eksperimentalni uslovi su bili sledeći: mobilna faza A sastojala se od: 2% sirćetne kiseline, mobilna faza B sadržavala je acetonitril; mešanje ovih faza je vršeno u linearnom gradientu: 0 - 5 min: 85% A, 15% B; 25 - 30 min: 10% A, 90% B; 35 - 40 min: 85% A, 15% B; protok: $0,7 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$; injektirana zapremina je iznosila $2 \times 10^{-5} \text{ dm}^3$.

3.2.1.3. Uslovi za LC-MS/MS određivanje hesperidina

Za određivanje hesperidina LC-MS/MS metodom korišćen je maseni spektrometar 3200 QTRAP MS/MS (Applied Biosystems / MDS Sciex, Foster City, USA) sa elektro-sprej i turbo-jon-sprej jonizacijom (*ESI - electro spray ionization*; *TIS - turbo-ion spray*). Analiza dobijenih podataka vršena je softverom Analyst TM (PE Sciex). Vrednosti negativne jonizacije su odabrane tako da se prati samo jedan proizvod fragmentacije, tj. vrši se praćenje odabrane reakcije (engl. *selected reaction monitoring*, SRM) u LC-MS/MS analizi sa periodom prekida od 50 ms . Parametri masenospektrometrijskog određivanja su optimizovani tako se postigne najveća SRM osetljivost injektiranjem $100 \mu\text{g cm}^{-3}$ standardnih rastvora hesperidina u metanolu upotrebom brizgalica. Optimizirani uslovi pri kojima je vršeno određivanje bili su: temperatura interfejsa $500 \text{ }^\circ\text{C}$; TIS napon, -4500 V ; curtain gas (He), 10 psi ; gas raspršivač (nebulizer) (N_2), 40 psi ; TIS gas (He), 60 psi ; declustering potencijal (DP), -57 V ; ulazni potencijal (EP), -5 V ; koliziona energija (CE) -34 eV ; izlazni potencijal kolizione ćelije (CXP) -9 V . Korišćeni signal za detekciju i kvantifikaciju hesperidina je bio SRM signal na $m/z 609 \rightarrow 325$. Maseni spektrometar je bio podešen na jediničnu rezoluciju za oba kvadrupola, Q1 i Q3.

3.2.1.4. pH-metar

Za pH-metrijska merenja korišćen je Metler Toledo mp 120 pH-metar sa kombinovanom elektrodom (osetljivosti $\pm 0.01 \text{ pH}$ jedinica). Ovaj pH-metar ima radni opseg pH od 0 do 14 pH jedinica.

3.2.1.5. Ultrazvučno kupatilo

Za ubrzavanje rastvaranja odmerenih masa flavonoida, uzoraka tableta i kapsula korišćeno je ultrazvučno kupatilo Bandelin Sonorex Super, Model RK 512H.

3.2.2. Reagensi i hemikalije

Za ispitivanje kompleksa aluminijum(III)–flavonoid (morin, hesperidin ili kvercetin), korišćene su sledeće hemikalije:

- Aluminium(III)-nitrat, Fluka AG, Buchs, Nemačka
- morin ($C_{15}H_{10}O_7$ Mr = 302,24 g mol⁻¹; CAS number 6472-38-4), Fluka AG, Buchs, Nemačka
- hesperidin ($C_{28}H_{34}O_{15}$; Mr = 610,56 g mol⁻¹; CAS number 520-26-3), Fluka AG, Buchs, Nemačka
- kvercetin-dihidrat ($C_{15}H_{10}O_7 \cdot 2H_2O$, Mr = 338,27 g mol⁻¹ ; CAS number 6151-25-3), Fluka AG, Buchs, Nemačka
- metanol, Merck, Darmstadt, Nemačka
- etanol, Merck, Darmstadt, Nemačka
- Natrijum- hidroksid, Merck, Darmstadt, Nemačka
- Natrijum-acetat, Merck, Darmstadt, Nemačka
- sirćetna kiselina, Merck, Darmstadt, Nemačka
- Acetonitril J.T. Baker (Deventer, Holandija)

Kao površinski aktivne supstance za proučavanje kompleksa aluminijum(III)-hesperidin korišćene su:

- SB 12, n-dodecil sulfobetain (*n-dodecyl sulphobetaine* ili *3-(N-hexadecyl-N,N-dimethylammonio)propane sulfonate*), Serva, Nemačka i
- SDS, natrijum-dodecilsulfat (*sodium dodecylsulfate*), Sigma Aldrich, Poole, UK

Svi upotrebljavani reagensi su bili p.a. čistoće, i korišćeni su bez prečišćavanja.

Od *komercijalnih preparata* korišćeni su:

- *Helopyrin tablete*, proizvođača Rosh & Handel, (Beč, Austrija) (jedna tableta sadrži: vitamin C 120 mg, bioflavonoide 20 mg, rutin 15 mg, ekscipiente: mikrokristalna celuloza, metilhidroksipropil celuloza, magnezijum(II)- stearat, skrob). U ovim tabletama je određivan sadržaj hesperidina.
- *Vitamin C 1500 tablete sa bioflavonoidima* (sa rutinom i hesperidinom) proizvođača American Nutrition Products, u kojima je, takođe, određivan sadržaj hesperidina (sadržaj vitamina C u jednoj tableti iznosi 1500 mg, a proizvođač u deklaraciji preparata ne navodi sadržaj bioflavonoida- rutina i hesperidina)
- *Quercetin + C kapsule* proizvođača Twinlab, USA (sadržaj vitamina C i kvercetin-dihidrata standardizovan je za dve kapsule i on iznosi: vitamin C 1400 mg, kvercetin-dihidrat 500 mg, a ekscipijenti su: želatin, biljna stearinska kiselina i silicijum-dioksid). U ovim kapsulama je određivan sadržaj kvercetina.

Humana plazma i humani serum koji su korišćeni u ovim eksperimentima su dobijeni u laboratoriji Službe za transfuziju Kliničko-bolničkog centra »Dr Dragiša Mišović«, Beograd, Srbija.

Sadržaj hesperidina određivan je u sokovima od pomorandže, dok je sadržaj polifenola u odnosu ekvivalent kvercetina (QE) određivan u sokovima od jabuke koji se nalaze na tržištu u Srbiji.

3.3. Generalna procedura

3.3.1. Osnovni rastvori

3.3.1.1. Osnovni rastvor aluminijum(III)-nitrata

Osnovni rastvor aluminijum(III)-nitrata (koncentracije $1,0 \times 10^{-3}$ mol dm⁻³) je pripremljen rastvaranjem odgovarajuće mase aluminijum(III)-nitrata u bidestilovanoj vodi, uz dodatak odgovarajuće količine nitratne kiseline, kako bi se sprečila hidroliza aluminijum(III)-jona. Sadržaj aluminijum(III)-nitrata određivan je gravimetrijski, taloženjem sa amonijakom.

3.3.1.2. Osnovni rastvori flavonoida

Ispitivani flavonoidi se slabo rastvaraju u vodi (rastvorljivost morina je 1 g u 4 dm³ vode, hesperidina 1 g u 50 dm³ vode, a prema Merck-ovom indeksu kvercetin je praktično nerastvoran u vodi). Kvercetin i morin su rastvorljivi u etanolu i metanolu, dok se hesperidin rastvara u metanolu.

Jedan od značajnih parametara jeste sastav rastvarača alkohol-voda, zato što on utiče na intenzitet fluorescencije i rastvorljivost samog liganda, a samim tim i kompleksa. Optimalna vrednost odnosa vode i alkohola je utvrđena u cilju postizanja najpovoljnijih uslova za formiranje kompleksa, ali se moralo voditi računa i o potrebi da takav sastav rastvarača omogući i dobijanje maksimalnih intenziteta fluorescencije. U tu svrhu je određivan sastav rastvarača za svaki od ispitivanih kompleksa. Sastavi rastvarača koji su bili ispitivani za svaki kompleks sadržavali su 30, 50, 70 i 90 (v/v%) metanola, odnosno etanola za kompleks aluminijum(III)–morin. Najpovoljniji odnosi alkohola i vode koji su dobijeni za svaki od kompleksa bili su 70 v/v% metanol za komplekse aluminijum(III)-hesperidin i aluminijum(III)-kvercetin, i 70 v/v% etanol za kompleks aluminijum(III)-morin.

Osnovni rastvor morina (koncentracija $1,0 \times 10^{-4}$ mol dm⁻³) je pripremljen rastvaranjem odgovarajuće mase morina u 70 % etanolu.

Osnovni rastvori hesperidina i kvercetin-dihidrata (koncentracije su iznosile $1,0 \times 10^{-4}$ mol dm⁻³) su pripremani rastvaranjem odgovarajuće mase hesperidina, odnosno kvercetin- dihidrata u 70 v/v% metanolu.

3.3.1.3. Osnovni rastvori površinski aktivnih materija

Rastvor n-dodecil sulfobetaina odnosno SB 12, koncentracije 0,5 mol dm⁻³, napravljen je rastvaranjem odmerene mase SB 12 u dejonizovanoj vodi.

Takođe, rastvor natrijum-dodecilsulfata (SDS) koncentracije 0,5 mol dm⁻³ napravljen je rastvaranjem odmerene mase SDS u dejonizovanoj vodi.

Svi rastvori su čuvani u frižideru do korišćenja.

Sva spektrofluorimetrijska merenja su izvođena u acetatnim puferima odgovarajućih *pH* vrednosti, koji su bili napravljeni 70 v/v % etanolu, odnosno 70 v/v % metanolu, a u saglasnosti sa procedurama iz literature.¹²²

3.3.2. Ispitivanje kompleksa

3.3.2.1. Ekscitaciono-emisioni spektri kompleksa

Izmereni su ekscitacioni i emisioni spektri smeše rastvora aluminijum (III)-nitrata i rastvora flavonoida: morina, hesperidina ili kvercetina, a zatim su izmereni ekscitacioni i emisioni spektri rastvora flavonoida. Odnos koncentracija aluminijum(III)-jona i flavonoida u smeši iznosio je 1:50. Ova smeša je pripremana tako da je koncentracija flavonoida bila u velikom višku, odnosno, 50 puta je bila veća od koncentracije aluminijum(III)-jona, da bi se ravnoteža u reakciji nastajanja kompleksa:



maksimalno pomerila udesno, odnosno u smeru nastajanja kompleksa. Koncentracije rastvora flavonoida za koje su snimani ekscitacioni i emisioni spektri bile su iste kao odgovarajuće koncentracije ovih jedinjenja u ispitivanoj smeši aluminijum(III)-nitrata i rastvora flavonoida.

Eksperimentalno je utvrđeno da aluminijum(III)-nitrat u opsegu talasnih dužina u kom su ispitivanja vršena (350-650 nm) ne pokazuje fluorescenciju. Kao slepa proba korišćen je 70 v/v % metanol, odnosno 70 v/v % etanol u zavisnosti od kompleksa koji je ispitivan.

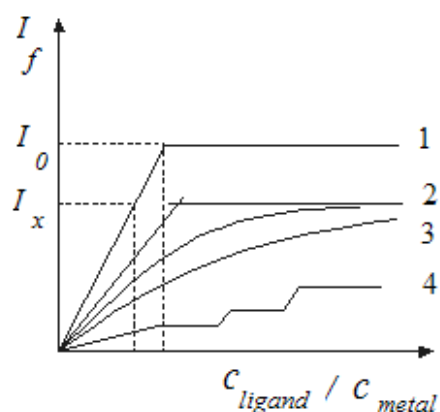
Kod sva tri flavonoida uočeno je da njihovi alkoholni rastvori pokazuju slabu fluorescenciju. Dodatkom odgovarajuće zapremine rastvora aluminijum(III)-nitrata u rastvore flavonoida, dolazi do intenzivnog porasta intenziteta fluorescencije, što je i očekivano, obzirom da nastaju kompleksi, koji pokazuju intenzivnu fluorescenciju.

3.3.2.2. Određivanje sastava kompleksa

Definisanje sastava kompleksnog jedinjenja odnosi se na određivanje broja jona metala i broja molekula liganda u kompleksu. Za određivanje sastava formiranih kompleksa korišćene su metoda molarnih odnosa¹²³ i metoda varijacija ekvimolarnih rastvora, odnosno Žobova metoda.^{124, 125}

Metoda molarnih odnosa

Ova metoda predstavlja jednu od najjednostavnijih metoda za određivanje sastava kompleksnih jedinjenja. Primenuje se za određivanje sastava relativno stabilnih kompleksa. Tokom eksperimenta meren je intenzitet fluorescencije serije smeša rastvora u kojima je koncentracija jedne od komponenata konstantna (obično je to koncentracija metala), a koncentracije liganda su manje, jednake i veće od koncentracije jona metala.



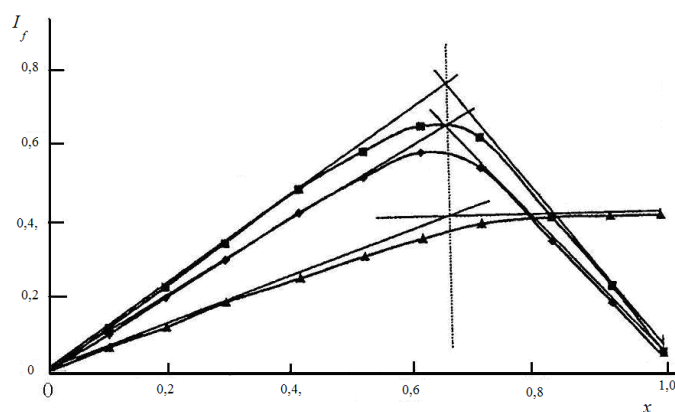
Slika 3.6. Metoda molarnih odnosa. Krive mogućih zavisnosti promena intenziteta fluorescencije kompleksa različitih stabilnosti od stehiometrijskog odnosa komponenata

Merenja su vršena na određenim vrednostima talasnih dužina λ_{ex} i λ_{em} , i odgovarajućih širina otvora za ekscitacione i emisione snopove, a rezultati su prikazani u obliku dijagrama zavisnosti $I_F = f(C_{Fl}/C_M)$, gde je I_F intenzitet fluorescencije smeše (dat u arbitrarnim jedinicama) a C_{Fl}/C_M predstavlja odnos stehiometrijskih koncentracija liganda (odgovarajućeg flavonoida) i metala (slika 3.6.). U idealnom slučaju, ako se formira samo jedan stabilan kompleks, dobijaju se dve prave sa različitim koeficijentima pravca. Tačka preseka ovih prava, pri interpolaciji na apscisu daje stehiometrijski odnos koncentracija liganda- odgovarajućeg flavonoida i metala u kompleksu.

Metoda varijacija ekvimolarnih rastvora (Žobova metoda)

Metoda se zasniva na merenju bilo kog svojstva rastvora, koje linearno zavisi od ravnotežne koncentracije kompleksa u rastvoru, pa su stoga mereni intenziteti fluorescencije serije takvih rastvora, kod kojih je suma stehiometrijskih molarnih koncentracija aluminijuma i flavonoida konstantna.

Predstavljanjem zavisnosti intenziteta fluorescencije rastvora (koja linearno zavisi od ravnotežne koncentracije kompleksa) u funkciji od molskog udela liganda-odgovarajućeg flavonoida (ili metala), može se naći odnos stehiometrijskih koncentracija metala i flavonoida u kompleksu.



Slika 3.7. Metoda varijacija ekvimolarnih rastvora (Žobova metoda)

Kriva zavisnosti intenziteta fluorescencije kompleksa od molske frakcije liganda

Maksimalna koncentracija kompleksa u seriji rastvora dostiže se pri određenoj vrednosti molskog udela liganda (ili metala), x_{max} , i odgovara maksimumu na krivoj zavisnosti intenziteta fluorescencije rastvora u funkciji molskog udela flavonoida (ili metala), koja je prikazana na slici 3.7.

3.3.3. Reakcija formiranja kompleksa

Flavonoidi u kompleksu se mogu naći u molekulskom ili anjonskom obliku. U cilju utvrđivanja oblika flavonoida (jonski ili molekulski) koji je zastupljen u ispitivanom kompleksu primenjen je sledeći postupak:

Pripreme se sledeća tri rastvora: rastvor flavonoida u 70 v/v% metanolu, odnosno 70 v/v % etanolu, zatim se pripremi rastvor aluminijum(III)-nitrata u 70 v/v% metanolu, odnosno 70 v/v% etanolu koji ima istu koncentraciju kao i prethodno napravljeni rastvor flavonoida, i na kraju se napravi smeša flavonoida i aluminijum(III)-nitrata u 70 v/v% metanolu, odnosno etanolu, u kojoj su koncentracije flavonoida i aluminijum(III)- jona iste kao i u rastvorima koji sadrže samo flavonoid odnosno aluminijum(III)- nitrat.

Merenjem i upoređivanjem pH vrednosti ovih rastvora može se zaključiti da li se reakcija nastajanja kompleksa odvija uz oslobađanje vodonikovog jona, odnosno da li se flavonoid u molekulu kompleksnog jedinjenja nalazi u anjonskom obliku. Za sva tri ispitivana kompleksa izmerena pH vrednost smeše bila je niža od pH vrednosti koje su izmerene za rastvore flavonoida i rastvor aluminijum(III)-nitrata, što je ukazivalo da se flavonoid u molekulu kompleksnog jedinjenja nalazi u anjonskom obliku.

3.3.4. Izračunavanje koncentracionih konstanti stabilnosti kompleksa

Za izračunavanje koncentracionih konstanti stabilnosti korišćena je Bjerumova metoda¹²⁶ i jednačine izvedene iz reakcija formiranja kompleksa.^{41, 127, 128} Na različitim pH vrednostima mereni su intenziteti fluorescencije smeše rastvora aluminijuma i flavonoida u 70 v/v% metanolu (odnosno 70 v/v% etanolu, za kompleks aluminijum (III) –morin) a odnos koncentracija bio je $c_{Al^{3+}} : c_{Fl} = 1 : 20$. Kao slepa proba je korišćen je rastvor flavonoida čija je koncentracija u 70 v/v% metanolu (odnosno 70 v/v% etanolu, za kompleks aluminijum(III)–morin) bila ista kao u smeši. Obzirom da je eksperimentalno utvrđeno da aluminijum u datom opsegu talasnih dužina, u kom su ispitivanja vršena (350-650 nm), ne pokazuje fluorescenciju, korekcija intenziteta fluorescencije smeše u odnosu na aluminijum nije bila potrebna.

Dobijene su krive zavisnosti $I_f = f(pH)$, gde vrednosti I_f odgovaraju intenzitetu fluorescencije kompleksa.

Najveća koncentracija kompleksa postoji na maksimumu krive $I_f = f(pH)$, na kome se može uzeti da je koncentracija kompleksa približno jednaka ukupnoj

koncentraciji aluminijuma u smeši, zbog velikog viška liganda- flavonoida, pa je konstanta k^* izračunata preko relacije:

$$k = \frac{I_{f \max}}{[Al^{3+}]_0} \quad (3.4.)$$

gde $I_{f \max}$ predstavlja intenzitet fluorescencije kompleksa očitano sa maksimuma krive $I_{f \max} = f(pH)$.

Reakcija nastajanja kompleksa predstavljena je opštom jednačinom:



a opšta koncentraciona konstanta stabilnosti kompleksa, koga određuje ravnoteža data relacijom (3.5.), se izračunava prema sledećoj jednačini:

$$\beta_n = \frac{[Al_m Fl_n^{3-n}]}{[Al]^m [Fl^{-}]^n} \quad (3.6.)$$

gde su: $[Al^{3+}]$, $[Fl^{-}]$, $[Al_m Fl_n^{3-n}]$ ravnotežne koncentracije centralnog jona, disosovanog oblika flavonoida i kompleksa, a β_n predstavlja opštu koncentracionu konstantu stabilnosti kompleksa.

Na bilo kojoj vrednosti pH određuje se koncentracija kompleksa iz krive $I_f = f(pH)$, prema sledećoj jednačini:

$$[Al_m Fl_n^{3-n}] = \frac{I_f}{k} \quad (3.7.)$$

gde je I_f intenzitet fluorescencije kompleksa aluminijum(III)-flavonoid na određenoj vrednosti pH , pri čemu $I_f \neq I_{f \max}$.

Ukupne (analitičke) koncentracije flavonoida i aluminijuma predstavljene su sledećim jednačinama:

$$[HFl]_0 = [HFl] + [Fl^{-}] + n[Al_m Fl_n^{3-n}] \quad (3.8.)$$

$$[Al^{3+}]_0 = [Al^{3+}] + m[Al_m Fl_n^{3-n}] \quad (3.9.)$$

* $I = 2,303I_0 \epsilon L \Phi_f c = kc$, gde je I intenzitet fluorescencije, I_0 je intenzitet upadne ekscitacione svetlosti, a proizvod $\epsilon \Phi_f$ je senzitivnost fluorofore, i L predstavlja dužinu optičkog puta svetlosti.¹¹⁸

gde je sa $[HFl]_0$ prikazana ukupna koncentracija flavonoida a sa $[Al^{3+}]$, $[Al^{3+}]_0$ date su koncentracije slobodnih jona aluminijuma u rastvoru i ukupna koncentracija aluminijuma, a $[HFl]$ predstavlja ravnotežnu koncentraciju molekulskog oblika flavonoida u smeši.

Jednačinom (3.10.) definisana je prva konstanta disocijacije, k_{d1} , flavonoida, koja je potrebna da bi se odredila ravnotežna koncentracija liganda, tj. flavonoida, pri čemu $[HFl]$ predstavlja koncentraciju nedisosovanog oblika flavonoida, a $[H^+]$ predstavlja koncentraciju vodoničnih jona.

$$k_{d1} = \frac{[H^+][Fl^-]}{[HFl]} \quad (3.10.)$$

Ukoliko nastaje polidentatni ligand¹²⁹ (u molekulu kompleksa se nalaze dva ili više centralnih jona metala), pri izračunavanju koncentracije anjonskog oblika moraju se uzeti u obzir i vrednosti viših konstanti disocijacije (druge, treće, itd). Ukupna konstanta disocijacije flavonoida predstavljena je sledećom jednačinom:

$$k_N = k_1 \cdot k_2 \cdot k_3 \dots k_n \quad (3.11.)$$

Kombinovanjem Bjerumove metode, izraza (3.6.) za opštu koncentracionu konstantu stabilnosti kompleksa, koga određuje ravnoteža data relacijom (3.5.) i jednačina (3.4.)-(3.11.), izračunava se opšta koncentraciona konstanta stabilnosti kompleksa β_n .

3.4. Spektrofluorimetrijsko određivanje flavonoida u alkoholno-vodenim rastvorima

Za kvantitativno određivanje flavonoida primenjena je metoda kalibracione krive koja je zasnovana na zavisnosti relativnog intenziteta fluorescencije od koncentracije ispitivanih flavonoida. Pripremljena je serija standardnih rastvora koji su sadržavali konstantnu koncentraciju aluminijum(III)-nitrata i koja je u odnosu na koncentracije ispitivanih flavonoida bila u velikom višku (u odnosu na standardni rastvor koji je sadržavao najveću koncentraciju flavonoida, koncentracija aluminijum(III)-jona bila je pet puta veća od koncentracije ispitivanog flavonoida). U standardnim rastvorima varirana je koncentracija flavonoida. Sva spektrofluorimetrijska merenja izvođena su u acetatnim puferima pH vrednosti na kojima je ispitivani kompleks aluminijum(III)-flavonoid (morin, hesperidin, kvercetin) pokazivao maksimalan intenzitet fluorescencije. Puferi su bili pripremljeni u 70 v/v% etanolu odnosno 70 v/v% metanolu, a prema sa procedurama koje se navode u literaturi.¹²² Kalibracione krive bile su prikazane na talasnim dužinama, λ_{em} , gde ispitivani kompleks pokazuje maksimum intenziteta fluorescencije. Kao slepa proba korišćeni su rastvori flavonoida u acetatnim puferima, a koji su sadržavali ekvivalentne koncentracije flavonoida kao i ispitivani standardni rastvor.

U oblasti koncentracija flavonoida u kojoj važi relacija (3.2.) bilo je moguće odrediti koncentraciju ispitivanog flavonoida sa odgovarajućom tačnošću.

Za svaku kalibracionu krivu određeni su linearnost, opseg, granica detekcije (*limit of detection, LOD*) granica kvantifikacije (*limit of quantification, LOQ*), tačnost i preciznost.^{130, 131}

Linearnost predstavlja mogućnost metode da da rezultate koji su direktno proporcionalni koncentraciji analita u datom opsegu. Linearnost je utvrđivana merenjem zavisnosti intenziteta fluorescencije od koncentracije i procenjivana je na osnovu vrednosti korelacionog koeficijenta, r^2 . Linearnost je utoliko bolja, ukoliko je vrednost korelacionog koeficijenta, r^2 , bliži 1.

Analitički opseg predstavlja interval između najviše i najniže koncentracije analita, u kome je pokazana preciznost, tačnost i linearnost metode.

Granica detekcije (dokazivanja) se definiše kao najmanja koncentracija ispitivanog analita koja se može detektovati određenom metodom pod optimalnim uslovima i izračunava se na osnovu sledećeg izraza:

$$LOD = \frac{3,3s_b}{a} \quad (3.12.)$$

Granica kvantifikacije (određivanja) je najniža koncentracija analita koja se može meriti u uzorku određenom metodom pod optimalnim uslovima sa prihvatljivom preciznošću i tačnošću, i može se dobiti iz sledeće relacije:

$$LOQ = \frac{10s_b}{a} \quad (3.13.)$$

U jednačinama 3.12. i 3.13. a je vrednost koeficijenta pravca kalibracione prave, a s_b predstavlja vrednost standardne devijacije odsečka.

Tačnost je mera egzaktnosti analitičke metode, ili bliskost slaganja između tačne vrednosti ili prihvaćene referentne vrednosti i nađene vrednosti. Dobijeni podaci se prikazuju kao "recovery" vrednosti date u procentima.

Preciznost označava bliskost ili slaganje između serije ponovljenih merenja iste veličine uzorka. Preciznost analitičke procedure se obično izražava (procenjuje) preko vrednosti S^2 (varijansa ili srenje kvadratno odstupanje), SD (standardna devijacija), KV ili RSD (relativna standardna devijacija izražena u %) u seriji od najmanje 5 ponovljenih merenja.

Za svaku kalibracionu pravu prikazana je njena jednačina, koeficijent korelacije, granica detekcije, granica kvantifikacije i analitički opseg.

Proveravana je tačnost i preciznost metode tako što su u ispitivanom opsegu koncentracija flavonoida bile izabrane tri različite koncentracije za koje je pripremljeno po pet rastvora. Zatim je svakom rastvoru meren intenzitet fluorescencije i iz jednačine kalibracione prave određena koncentracija. Tako dobijeni rezultati su statistički obrađeni, odnosno za svaku izabranu koncentraciju izračunata je standardna devijacija određivanja koncentracije i određene su "recovery" vrednosti.

3.4.1. Spektrofluorimetrijsko određivanje morina u 70 % v/v etanolu

Pripremljeni su standardni rastvori za određivanje koncentracije morina primenom metode kalibracione krive. Ovi rastvori su sadržavali konstantnu koncentraciju aluminijum(III)-nitrata koja je iznosila $5,0 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$, a interval radnih koncentracija morina bio je $5,0 \times 10^{-9}$ - $1,0 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ (odnosno 1,5 – 30,2 ng cm^{-3}). Rastvori su bili pripremljeni u acetatnom puferu u 70 % v/v rastvoru etanol-voda, $pH = 4,40$. Mereni su intenziteti fluorescencije ovako pripremljenih rastvora ($\lambda_{\text{ex}} = 410 \text{ nm}$ i $\lambda_{\text{em}} = 500 \text{ nm}$, širine otvora za ekscitacione i emisije snopove su bile 3 nm i 4 nm, respektivno). Kao slepa proba korišćeni su rastvori morina u acetatnim puferima u 70 % v/v etanolu, a koji su sadržavali ekvivalentne koncentracije morina kao i ispitivani standardni rastvor.

3.4.2. Spektrofluorimetrijsko određivanje hesperidina u 70 % v/v metanolu

Pripremljeni su standardni rastvori za određivanje koncentracije hesperidina primenom metode kalibracione krive. Ovi rastvori su sadržavali konstantnu koncentraciju aluminijum(III)-nitrata koja je iznosila $5,0 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$, a interval radnih koncentracija morina bio je $1,0 \times 10^{-7}$ - $3,0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ (odnosno 0,06 – 18,00 $\mu\text{g cm}^{-3}$). Rastvori su bili napravljeni u acetatnom puferu u 70% v/v rastvoru metanol-voda, $pH = 5,50$. Mereni su intenziteti fluorescencije ovako pripremljenih rastvora ($\lambda_{\text{ex}} = 390 \text{ nm}$ i $\lambda_{\text{em}} = 490 \text{ nm}$ i širine otvora za ekscitacione i emisije snopove su bile 5 nm). Kao slepa proba korišćeni su rastvori hesperidina u acetatnim puferima u 70 % v/v metanola, a koji su sadržavali ekvivalentne koncentracije hesperidina kao i ispitivani standardni rastvor.

3.4.3. Spektrofluorimetrijsko određivanje hesperidina u 70 % v/v metanolu u prisustvu površinski aktivne materije SB 12 (n-dodecil sulfobetaina)

Za određivanje hesperidina u prisustvu površinski aktivnog SB 12 (n-dodecil sulfobetaina), takođe su pripremljeni standardni rastvori i primenjena metoda kalibracione krive. Ovi rastvori su sadržavali konstantnu koncentraciju aluminijum(III)-nitrata koja je iznosila $5,0 \times 10^{-7}$ mol dm⁻³, a interval radnih koncentracija hesperidina bio je $1,0 \times 10^{-7}$ - $4,0 \times 10^{-5}$ mol dm⁻³ (odnosno 0,06 – 24,00 µg cm⁻³). Rastvori su bili pripremljeni u acetatnom puferu u 70% v/v metanolu, *pH* = 4,58. Svi standardni rastvori su sadržavali konstantnu koncentraciju SB 12, *c* = $7,5 \times 10^{-3}$ mol dm⁻³. Mereni su intenziteti fluorescencije ovako pripremljenih rastvora ($\lambda_{\text{ex}} = 390$ nm i $\lambda_{\text{em}} = 476$ nm i širine otvora za ekscitacione i emisione snopove su bile 5 nm). Kao slepa proba korišćeni su rastvori hesperidina u prisustvu SB 12 u acetatnim puferima 70% v/v metanolu, a koji su sadržavali ekvivalentne koncentracije hesperidina kao i ispitivani standardni rastvor.

3.4.4. Spektrofluorimetrijsko određivanje kvercetina u 70 % v/v metanolu

Kvercetin je određivan spektrofluorimetrijski primenom metode kalibracione krive. Pripremljeni standardni rastvori sadržavali su konstantnu koncentraciju aluminijum(III)-nitrata od iznosila $5,0 \times 10^{-7}$ mol dm⁻³, a opseg radnih koncentracija kvercetina bio je $5,0 \times 10^{-9}$ - 2×10^{-7} mol dm⁻³ (odnosno 1,5 – 30,2 ng cm⁻³). Rastvori su bili pripremljeni u acetatnom puferu u 70% v/v metanolu, *pH* = 3,30. Mereni su intenziteti fluorescencije ovako pripremljenih rastvora ($\lambda_{\text{ex}} = 420$ nm i $\lambda_{\text{em}} = 480$ nm, otvori za ekscitacione i emisione snopove su bili 5 nm i 5 nm, respektivno). Kao slepa proba korišćeni su rastvori kvercetina u acetatnim puferima u 70% v/v metanolu, a koji su sadržavali ekvivalentne koncentracije kvercetina kao i ispitivani standardni rastvor.

3.5. Spektrofluorimetrijsko određivanje flavonoida u različitim uzorcima

3.5.1. Spektrofluorimetrijsko određivanje morina u uzorcima humanog seruma

Za određivanje morina u uzorcima humanog seruma primenjena je metoda kalibracione krive zasnovana na zavisnosti relativnog intenziteta fluorescencije kompleksa aluminijum(III)-morin od koncentracije morina. Standardni rastvori za ovu kalibracionu pravu pripremljeni su tako što je napravljena smeša od 0,2 cm³ humanog seruma i 8,8 cm³ acetatnog pufera (pripremljenog u 70 v/v % etanolu) $pH = 4,40$, u odmernom sudu od 10 cm³. Ovako napravljenom rastvoru dodate su odgovarajuće zapremine osnovnog rastvora morina tako da se dobije serija standardnih rastvora morina u opsegu koncentracija 1,5–30,5 ng cm⁻³. Posle inkubacije na 37 °C u trajanju od 30 min, u ovu smešu se doda 0,5 cm³ rastvora aluminijum(III)-nitrata koncentracije 1×10^{-3} mol dm⁻³. Mereni su intenziteti fluorescencije ovako pripremljenih rastvora ($\lambda_{ex} = 410$ nm i $\lambda_{em} = 500$ nm, širine otvora za ekscitacione i emisione snopove su bile 3 nm i 4 nm, respektivno). Slepa proba je pripremljena prema prethodno datoj proceduri za pripremu standardnih rastvora. Ovaj rastvor je sadržavao odgovarajuću zapreminu humanog seruma u acetatnom puferu $pH = 4,40$.

Za kalibracionu krivu za određivanje morina u humanom serumu, data je njena jednačina, koeficijent korelacije, granica detekcije, granica kvantifikacije i analitički opseg koncentracija. Proveravana je tačnost i preciznost metode u ispitivanom opsegu koncentracija morina za tri različite koncentracije.

3.5.2. Spektrofluorimetrijsko određivanje hesperidina u uzorcima humane plazme

Za određivanje hesperidina u uzorcima humane plazme primenjena je metoda kalibracione krive zasnovana na zavisnosti relativnog intenziteta fluorescencije kompleksa aluminijum(III)-hesperidin od koncentracije hesperidina. Standardni rastvori za ovu kalibracionu pravu pripremljeni su tako što je uzeto 0,2 cm³ humane plazme 0,35 cm³ rastvora SB 12 koncentracije 0,5 mol dm⁻³ i različite zapremine osnovnog rastvora

hesperidina, tako da se mešanjem sa odgovarajućom zapreminom acetatnog pufera $pH=4,58$ (pripremljenog u 70 v/v % metanolu) u odmernom sudu zapremine 10 cm^3 dobiju koncentracije hesperidina u opsegu od $0,1\text{--}12,2\text{ }\mu\text{g cm}^{-3}$. Posle inkubacije na $37\text{ }^\circ\text{C}$ (30 min), u ovu smešu se doda $0,5\text{ cm}^3$ rastvora aluminijum(III)-nitrata koncentracije $1\times 10^{-3}\text{ mol dm}^{-3}$. Potom su mereni intenziteti fluorescencije ovako pripremljenih rastvora ($\lambda_{\text{ex}} = 390\text{ nm}$ i $\lambda_{\text{em}} = 476\text{ nm}$, širine otvora za ekscitacione i emisione snopove su bile 5 nm). Rastvor koji je korišćen kao slepa proba pripremljen je prema prethodno datoj proceduri. Slepa proba je sadržavala odgovarajuću zapreminu humane plazme sa dodatkom SB 12 u acetatnom puferu $pH = 4,58$.

Za kalibracionu krivu za određivanje hesperidina u humanoj plazmi, prikazana je njena jednačina, koeficijent korelacije, granica detekcije, granica kvantifikacije i analitički opseg koncentracija. Proveravana je tačnost i preciznost metode u ispitivanom opsegu koncentracija hesperidina za tri različite koncentracije.

3.5.3. Spektrofluorimetrijsko određivanje hesperidina u tabletama

Za određivanje hesperidina u tabletama primenjena je sledeća procedura: na analitičkoj vagi je izmereno pojedinačno 10 tableta i izračunata je srednja vrednost mase tablete. Zatim su tablete sprašene u tarioniku do praškaste usitnjenosti. Odmerena je količina koja odgovara srednjoj vrednosti mase jedne tablete, i rastvorena u 100 cm^3 70 v/v % metanola, a rastvor je mešan 15 minuta u ultrazvučnom kupatilu na temperaturi $25\text{ }^\circ\text{C}$ i filtriran kroz Millipore membrane filter sa veličinom pora $0,45\text{ }\mu\text{m}$. Od ovako pripremljenog rastvora u odmerni sud od 10 cm^3 odmereno je $0,25\text{ cm}^3$, kome je dodato $0,35\text{ cm}^3$ $0,5\text{ mol dm}^{-3}$ rastvora SB 12, i $0,5\text{ cm}^3$ rastvora aluminijum(III)-nitrata koncentracije $1\times 10^{-3}\text{ mol dm}^{-3}$. Odmerni sud je dopunjen do marke acetatnim puferom $pH = 4,58$, koji je pripremljen u 70 % v/v metanolu.

Ovako pripremljenom rastvoru izmeren je intenzitet fluorescencije pri odgovarajućim eksperimentalnim uslovima ($\lambda_{\text{ex}} = 390\text{ nm}$ i $\lambda_{\text{em}} = 476\text{ nm}$ i širine otvora za ekscitacione i emisione snopove su 5 nm). Iz jednačine kalibracione prave određena je koncentracija hesperidina u tabletama. Za statističku obradu dobijenih rezultata, bilo je potrebno uraditi 10 merenja. Tačnost metode data je preko "recovery" vrednosti, izražene u %, koja predstavlja odnos nađene i deklarisanе mase aktivne supstance (hesperidina) pomnožene sa 100.

3.5.4. Spektrofluorimetrijsko određivanje hesperidina u soku od pomorandže

Za određivanje sadržaja hesperidina u soku od pomorandže primenjen je sledeći postupak: zapremeni od 2 cm³ ispitivanog soka od pomorandže dodato je 5,5 cm³ acetatnog pufera pripremljenog u 70 % v/v metanolu, pH = 5,40, a potom je rastvor centrifugiran 10 minuta na 900 obrtaja. Supernatant* se filtrira kroz filter papir Whatman No. 1. Zapremeni od 5 cm³ supernatanta je dodato 0,25 cm³ rastvora aluminijum (III)-nitrata koncentracije 1×10⁻³ mol dm⁻³ a zatim je 1 cm³ ove smeše razblažen sa 9 cm³ acetatnog pufera pH = 5,40.

Ovako pripremljenom rastvoru izmeren je intenzitet fluorescencije pri odgovarajućim eksperimentalnim uslovima ($\lambda_{\text{ex}} = 390 \text{ nm}$ i $\lambda_{\text{em}} = 490 \text{ nm}$ i otvori za ekscitacione i emisione snopove su bili 5 nm). Iz jednačine kalibracione prave (bez prisustva površinski aktivnog SB 12) određen je sadržaj hesperidina u soku.**

3.5.5. Spektrofluorimetrijsko određivanje kvercetina u kapsulama

Za određivanje kvercetina u kapsulama primenjen je sličan postupak kao kod određivanja hesperidina u tabletama. Na analitičkoj vagi je izmeren pojedinačno sadržaj 10 kapsula i izračunata srednja vrednost mase sadržaja kapsule. Zatim je sadržaj kapsula sprušen u tarioniku do praškaste usitnjenosti. Potom je odmerena količina koja odgovara srednjoj vrednosti mase sadržaja jedne kapsule, i rastvorena u 100 cm³ 70 v/v % metanola i mešana 15 minuta u ultrazvučnom kupatilu na temperaturi 25 °C. Dobijeni rastvor je filtriran kroz Millipore membrane filter sa veličinom pora od 0,45 μm. Od ovako pripremljenog rastvora u odmerni sud od 10 cm³ odmereno je 0,25 cm³, kome je dodato 0,5 cm³ rastvora aluminijum(III)-nitrata koncentracije 1×10⁻³ mol dm⁻³.

* Supernatant predstavlja tečnost koja se nalazi iznad taloga nakon centrifugiranja

** Određivanje sadržaja flavonona koristi se za kontrolisanje kvaliteta u proizvodnji sokova. Tako, visoke vrednosti koncentracije hesperidina u soku navode na zaključak da se tokom procesa proizvodnje sokova koristio ceo plod, bez odstranjivanja kore, dok znatno manji sadržaj hesperidina ukazuju da je za dobijanje soka korišćen samo unutrašnji deo ploda, što je u skladu sa propisima. Sadržaj hesperidina u soku od pomorandže, određen je prema posebnim *Zahtevima koji definišu kvalitet citrusnih sokova*- dati u *Code of Practice for evaluation of quality and authenticity of fruit and vegetable juices*, od strane AIJN - European Fruit Juice Association.^{1,32}

Odmerni sud je dopunjen do marke acetatnim puferom $pH = 3,30$ koji je pripremljen u 70 % v/v metanolu.

Ovako pripremljenom rastvoru izmeren je intenzitet fluorescencije pri odgovarajućim eksperimentalnim uslovima ($\lambda_{ex} = 420$ nm i $\lambda_{em} = 480$ nm i širina otvora za ekscitacione i emisione snopove su bile 5 nm). Iz jednačine kalibracione prave određena je koncentracija kvercetina u kapsulama. Za statističku obradu dobijenih rezultata, bilo je potrebno uraditi 10 merenja. Tačnost metode data je preko "recovery" vrednosti, izražene u %.

3.5.6. Spektrofluorimetrijsko određivanje polifenola u soku od jabuke

Ukupni sadržaj polifenola u različitim uzorcima sokova od jabuke, koji se nalaze na tržištu u Srbiji, je izražen u odnosu ekvivalent kvercetina (QE- *quercetin equivalent*).¹³³ Predložena spektrofluorimetrijska metoda za određivanje ukupnog sadržaja polifenola bazirana na fluorescenciji kompleksa aluminijum(III)-kvercetin, je primenjena za određivanje sadržaja ukupnih polifenola u soku od jabuka, a sadržaj ukupnih polifenola je izražen u odnosu ekvivalent kvercetina (QE). Ovaj postupak je opravdan činjenicom da je kvercetin jedan od najzastupljenijih flavonola i jedan od najsnažnijih antioksidanasa, koji se nalazi u voćnom soku od jabuke. Osim toga što je najzastupljeniji flavonol u sokovima od jabuke, kvercetin predstavlja i najzastupljeniji flavonol u napicima kao što su vina, čajevi, sokovi od paradajza.³

Za određivanje sadržaja polifenola u soku od jabuke primenjen je sledeći postupak: u odmerni sud od 10 cm³ je odmerena zapremina od 0,05 cm³ ispitivanog soka od jabuke, kojoj je dodato 0,1 cm³ rastvora aluminijum(III)-nitrata koncentracije 1×10⁻⁵ mol dm⁻³ a zatim je odmerni sud dopunjen acetatnim puferom $pH = 3,30$, pripremljenim u 70 % v/v metanolu.

Ovako pripremljenom rastvoru izmeren je intenzitet fluorescencije pri odgovarajućim eksperimentalnim uslovima ($\lambda_{ex} = 420$ nm i $\lambda_{em} = 480$ nm i širine otvora za ekscitacione i emisione snopove su bile 5 nm). Iz jednačine kalibracione krive određen je sadržaj kvercetina, a sadržaj polifenola u soku je izražen preko vrednosti ekvivalenta kvercetina (QE).

3.6. Procedure za određivanje flavonoida referentnim metodama

3.6.1. HPLC određivanje morina

Da bi se proverila pouzdanost predložene spektrofluorimetrijske metode za određivanje morina u humanom serumu, kao referentna metoda razvijena je i modifikovana HPLC metoda za njegovo određivanje.¹³⁴

Za određivanje sadržaja morina u rastvorima etanol-voda i humanom serumu, korišćena je metoda kalibracione krive, pri čemu su dobijene dve kalibracione krive, po jedna kriva za svaku sredinu.

Procedura za pripremu standardnih rastvora za određivanje morina u rastvorima etanol-voda metodom kalibracione krive

Od osnovnog rastvora morina u 70 v/v% etanolu pripremljeni su standardni rastvori za kalibracionu krivu koncentracija 1,6; 6,4; 25,0; 50,0; 100,0 i 200,0 $\mu\text{g cm}^{-3}$. Standardni rastvori su bez prethodne pripreme injektirani u kolonu.

Procedura za pripremu rastvora za određivanje morina u humanom serumu

Pripremljeno je šest standardnih rastvora za kalibracionu krivu koji su sadržavali $2 \times 10^{-4} \text{ dm}^3$ čistog seruma, $1 \times 10^{-4} \text{ dm}^3$ acetatnog pufera ($pH = 4,50$) i morin u koncentracijom opsegu od 1,0 do 200 $\mu\text{g cm}^{-3}$. Rastvori su inkubirani na temperaturi od 37 °C u trajanju od 30 minuta, intenzivno su mućkani i zatim je svakom od njih dodata smeša etra i acetona (90:10 v/v %). Tako dobijeni rastvori su ponovo mešani u šejkeru. Eterski sloj je isparen u atmosferi azota, a ostatak je rastvoren u mobilnoj fazi.

3.6.2. HPLC i maseno - spektrometrijsko određivanje hesperidina

Da bi se proverila pouzdanost predložene spektrofluorimetrijske metode, kao referentna metoda je razvijena je i modifikovana direktna HPLC metoda¹³⁵ za određivanje hesperidina i to u uzorcima humane plazme LC-MS/MS metoda i HPLC/UV metoda za određivanje sadržaja hesperidina u tabletama.

Za određivanje sadržaja hesperidina u metanolno-vodenim rastvorima i u humanoj plazmi, korišćena je metoda kalibracione krive, pri čemu su dobijene dve kalibracione krive, po jedna kriva za svaku sredinu (u metanolno-vodenim rastvorima, i u metanolno-vodenoj sredini u prisustvu humane plazme).

Priprema rastvora za HPLC i maseno - spektrometrijsko određivanje hesperidina

Osnovni rastvor hesperidina (koncentracije $1,0226 \text{ mg cm}^{-3}$) pripremljen je u metanolu. Serija standardnih rastvora hesperidina u koncentracionom opsegu: $0,02\text{--}12,2 \text{ } \mu\text{g cm}^{-3}$ je pripremljena razblaživanjem osnovnog rastvora hesperidina metanolom.

Ekstrakcija hesperidina iz uzoraka humane plazme na čvrstoj fazi (SPE)

Hesperidin je ekstrahovan iz uzoraka humane plazme upotrebom LC-18 (500 mg) Supelco kertridža. Kertridži su bili prekondicionirani sa 5 cm^3 metanola a zatim 5 cm^3 ultračiste vode (Milli-Q). Nakon toga je 5 cm^3 uzorka propušteno kroz kertridž sa protokom od $0,5 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$. Nakon propuštanja uzorka, SPE kertridž je ispran sa 5 cm^3 ultračiste vode (Milli-Q), a zatim je sušen na vakuumu 10 minuta. Na kraju, uzorak je eluiran sa $2,5 \text{ cm}^3$ metanola. Uzorci humane plazme su termostatirani na $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$, i nakon opterećivanja sa hesperidinom bili su podvrgnuti precipitaciji proteina i tečno-tečnoj ekstrakciji. U levak za odvajanje unet je $1,0 \text{ cm}^3$ humane plazme kojoj je dodato $0,5 \text{ cm}^3$ metanola ili standardnog rastvora hesperidina. Zatim je dodat $1,0 \text{ cm}^3$ 2-propanola da bi se istaložili proteini. Ova smeša, nakon intenzivnog mešanja koje je trajalo 1 minut, centrifugirana je na 10000 obrtaja, u trajanju od 10 minuta. Gornji bistri sloj rastvora je odvojen i dodato mu je $0,5 \text{ cm}^3$ vode i $0,5 \text{ cm}^3$ zasićenog rastvora kalijum hlorida. Nakon mešanja u trajanju 15 s, dodato je 5 cm^3 etil-acetata i uzorak je intenzivno mešan 1 minut, a zatim mućkan 10 minuta. Nakon centrifugiranja na 3500 obrtaja koje je trajalo 5 minuta, gornji, organski sloj je prebačen u drugi levak za odvajanje i isparen u atmosferi azota na $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Ostatak je rastvoren u 1 cm^3 metanola, a potom je $20 \times 10^{-6} \text{ dm}^3$ ovog rastvora injektirano je u HPLC – MS/MS sistem.¹³⁶ Ekstrakt je prvo injektovan u Gemini kolonu u HPLC/UV sistem sa gradijentnim eluiranjem i UV detekcijom. Dobijeni rezultati potvrdili su da se u ovako pripremljenom uzorku nalazi

isključivo hesperidin bez drugih, interferirajućih supstanci u ekstraktu. Kvantitativno određivanje se vrši injektiranjem $20 \times 10^{-6} \text{ dm}^3$ ekstrakta u MS sistem upotrebom autosamplera HPLC sistema koji je povezan sa hromatografskom kolonom.

3.6.3. HPLC određivanje kvercetina

Da bi se proverila pouzdanost predložene spektrofluorimetrijske metode, kao referentna metoda razvijena je RP-HPLC/UV metoda za određivanje sadržaja kvercetina u tabletama.

Za pripremanje osnovnog rastvora kvercetina na analitičkoj vagi je odmereno 13,9 mg standarda kvercetin dihidrata, a zatim je odmerena količina prenetu u odmerni sud od 25 cm^3 kojoj je dodata zapremina od 10 cm^3 metanola. Ova smeša je ostavljena u ultrazvučnom kupatilu 15 min, nakon čega je odmerni sud dopunjen metanolom do 25 cm^3 . Koncentracija kvercetina u pripremljenom rastvoru je iznosila $0,5560 \text{ mg cm}^{-3}$.

Od osnovnog metanolnog rastvora kvercetina pripremljeni su standardni rastvori za kalibracionu krivu koncentracije 1,6; 6,4; 25,0; 50,0; 100,0 i 200,0 $\mu\text{g cm}^{-3}$. Standardni rastvori su bez prethodne pripreme injektirani u kolonu.

Priprema uzorka kapsula

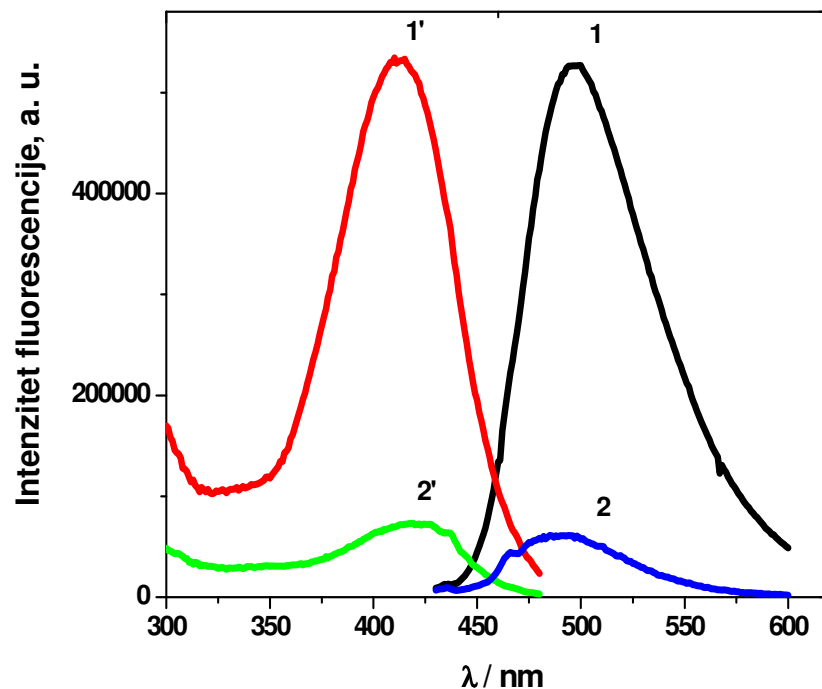
Deset kapsula je izmereno na analitičkoj vagi, a zatim je određena prosečna masa kapsule koja je iznosila 1,1365 g. Kapsule su zatim fino sprasene u avanu sa tučkom. Nakon homogenizovanja, odmerena je masa od 1,1365 g, koja je prenetu u odmerni sud od 50 cm^3 . Ovoj količini uzorka je dodata zapremina od 30 cm^3 metanola. Rastvaranje uzorka je vršeno u ultrazvučnom kupatilu 15 min. Od ovako pripremljenog rastvora odmerena je zapremina od 1 cm^3 i prenetu u odmerni sud od 10 cm^3 , pri čemu je sud dopunjen metanolom do crte. Od ovako pripremljenog rastvora injektirana je zapremina od $20 \times 10^{-6} \text{ dm}^3$ uzorka u kolonu.

4. REZULTATI I DISKUSIJA

4.1. Kompleks aluminijum(III)- morin

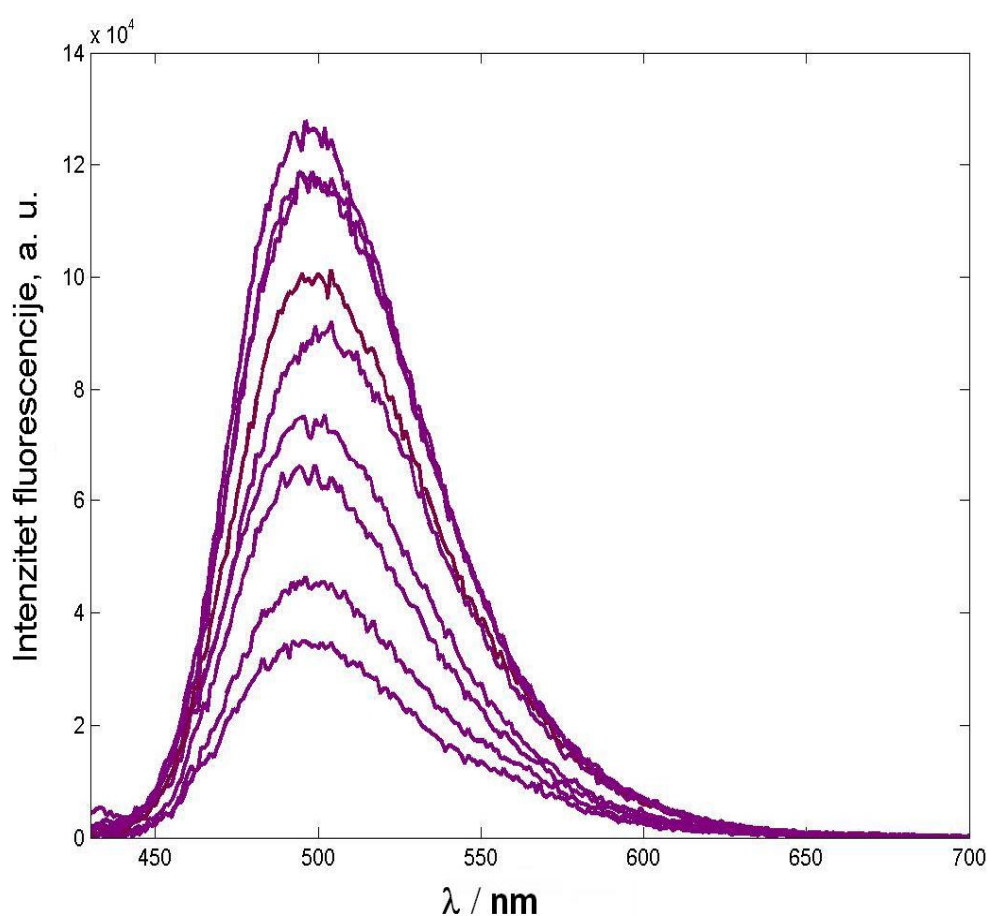
4.1.1. *Ekscitaciono-emisioni spektri kompleksa aluminijum(III)-morin*

Aluminijum(III)-jon i morin grade kompleks intenzivne žuto-zelene boje u rastvoru etanol-voda, koji je stabilan u pH oblasti od 3,0 do 6,0. Na slici 4.1.1. prikazani su ekscitacioni spektri morina (kriva 2'), kompleksa aluminijum(III)–morin (kriva 1') i emisioni spektri morina (kriva 2), kompleksa aluminijum(III)–morin (kriva 1). Ekscitacioni maksimum kompleksa nalazi se na $\lambda_{ex} = 410$ nm, a emisioni maksimum na $\lambda_{em} = 500$ nm. Fluorescencija rastvora morina ($c = 2,0 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$), koji sam pokazuje relativno nizak intenzitet fluorescencije na $\lambda_{em} = 490$ nm, intenzivno raste postepenim dodavanjem rastvora aluminijum(III)-nitrata.



Slika 4.1.1. Ekscitaciono-emisioni spektri kompleksa aluminijum(III)-morin (1, 1') i morina (2, 2')

To je očekivano, s obzirom da dolazi do formiranja kompleksa aluminijum(III)–morin, koji pokazuje intenzivnu fluorescenciju na $\lambda_{em} = 500$ nm, i čiji se emisijski maksimum batohromno pomera za 10 nm u odnosu na emisijski maksimum čistog morina. Na slici 4.1.2. prikazani su emisijski spektri rastvora morina koncentracije $c = 2,0 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$, izmereni na $\lambda_{ex} = 410$ nm, koji sadrže različite koncentracije aluminijum(III)-nitrata u koncentracionom opsegu $5,0 \times 10^{-9} \text{ mol dm}^{-3}$ do $1,0 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$.



Slika 4.1.2. Emisioni spektri kompleksa aluminijum(III)–morin

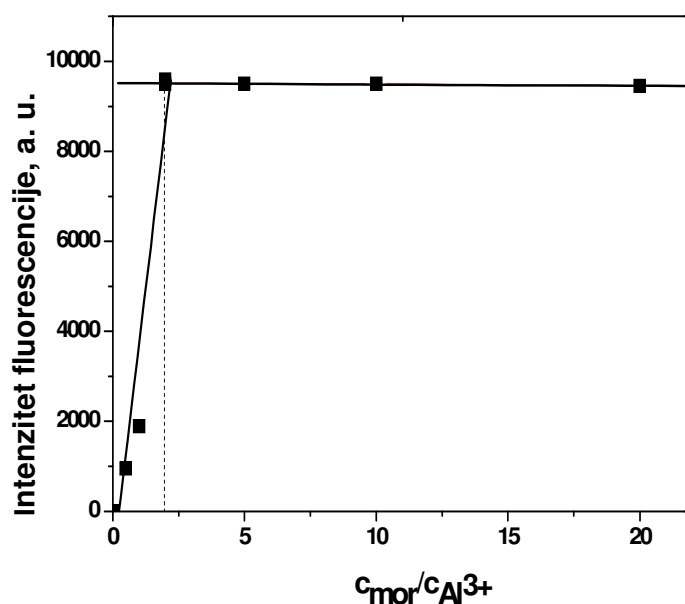
($c_{mor} = \text{const} = 2,0 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ i $c_{Al(III)} = 5,0 \times 10^{-9} \text{ mol dm}^{-3}$ do $1,0 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$; $\lambda_{ex} = 410$ nm, širine otvora za ekscitacione i emisijne snopove su bile 3 nm i 4 nm, respektivno)

4.1.2. Određivanje sastava kompleksa aluminijum(III)-morin

Aluminijum(III)-jon i morin grade kompleks sastava *Aluminijum(III): morin = 1 : 2*.

Sastav kompleksa je određen metodom molarnih odnosa, merenjem intenziteta fluorescencije rastvora koji sadrže konstantnu koncentraciju aluminijum(III)-nitrata ($c = 1,0 \times 10^{-8} \text{ mol dm}^{-3}$) i različite koncentracije morina ($5,0 \times 10^{-9}$ do $2,0 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$). Merenja su izvršena na $\lambda_{\text{ex}} = 410 \text{ nm}$ i $\lambda_{\text{em}} = 500 \text{ nm}$ u acetatnom puferu koji je pripremljen u 70 v/v% etanolu, na $pH = 4,40$. Širine otvora za ekscitacione i emisione snopove podešene su na 4 nm i 3 nm, respektivno. Kao slepa proba korišćen je rastvor aluminijum(III)-nitrata koncentracije $1,0 \times 10^{-8} \text{ mol dm}^{-3}$, pripremljen u acetatnom puferu (u 70 v/v% etanolu) $pH = 4,40$. Predstavljanjem zavisnosti intenziteta fluorescencije ovih rastvora u funkciji odnosa koncentracija morina i aluminijum(III)-jona, dobija se eksponencijalna zavisnost koju karakteriše prelomna tačka na određenoj vrednosti molskih odnosa komponenata (slika 4.1.3.).

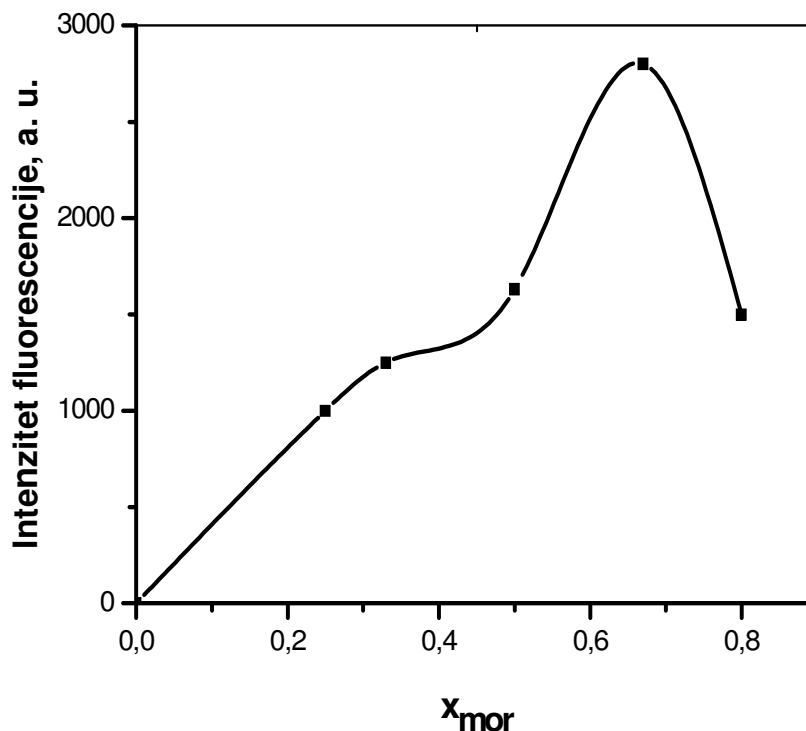
Presek tangenti, koje se povlače na pravolinijske delove krive, daje odnos koncentracija morina i aluminijum(III)-jona u formiranom kompleksu. Sa slike 4.1.3. dobija se odnos $c_{\text{mor}} / Al^{3+} = 2$, što ukazuje da se gradi kompleks sastava aluminijum(III):morin = 1:2.



Slika 4.1.3. Metoda molarnih odnosa. Zavisnost intenziteta fluorescencije kompleksa aluminijum(III)-morin od odnosa koncentracija morina i aluminijum(III)-jona, $c_{mor}/c_{Al^{3+}}$; $\lambda_{ex} = 410$ nm i $\lambda_{em} = 500$ nm, širine otvora za ekscitacione i emisione snopove su iznosile 3 nm i 4 nm, respektivno

Metodom varijacija ekvimolarnih rastvora takođe je određen sastav ovog kompleksa. Izmereni su intenziteti fluorescencije serije rastvora, koja je dobijena mešanjem ekvimolarnih rastvora aluminijum(III)-nitrata i morina, čije su koncentracije iznosile $1,0 \times 10^{-7}$ mol dm^{-3} . Sva merenja su izvršena na $\lambda_{ex} = 410$ nm i $\lambda_{em} = 500$ nm u acetatnom puferu koji je pripremljen u 70 v/v% etanolu čija je *pH* vrednost iznosila 4,40. Otvori za ekscitacione i emisione snopove podešeni su na 4 nm i 3 nm, respektivno. Slepа proba za svaki rastvor ove serije bila je različita, i sadržavala je ekvimolarnu koncentraciju aluminijum(III)-nitrata u acetatnom puferu koji je pripremljen u 70 v/v% etanolu, *pH* = 4,40 za svaki rastvor pojedinačno. Molski udeo aluminijum(III)-jona kretao se od 0,2 do 0,8; koncentracija aluminijum(III)-jona se nalazila u opsegu od $2,0 \times 10^{-8}$ mol dm^{-3} do $8,0 \times 10^{-8}$ mol dm^{-3} . Zavisnost intenziteta

fluorescencije rastvora od molskog udela aluminijum(III)-jona prikazana je krivom na slici 4.1.4.



4.1.4. Metoda varijacija ekvimolarnih rastvora. Zavisnost intenziteta fluorescencije kompleksa aluminijum(III)-morin od molske frakcije morina, x_{mor} . ($\lambda_{ex} = 410$ nm i $\lambda_{em} = 500$ nm širine otvora za ekscitacione i emisijne snopove su 3 nm i 4 nm, respektivno)

Dobijena kriva ima maksimum na $x_{Mor} = 0,67$ što potvrđuje formiranje kompleksa sastava aluminijum(III): morin = 1:2.

Obe metode kojima je određivan sastav kompleksa aluminijum(III)-morin potvrdile su da nastaje kompleks sastava $AlMor_2^+$. Na dijagramu zavisnosti intenziteta fluorescencije kompleksa aluminijum(III)-morin od molske frakcije morina (metoda varijacija ekvimolarnih rastvora) pored maksimuma na $x_{Al} = 0,33$, uočava se prevoj ("rame") na $x_{Al} = 0,5$, što ukazuje na to, da pored preovlađujuće kompleksne vrste

$AlMor_2^+$, nastaje i kompleks $AlMor^{2+}$. Može se zaključiti da se formiranje kompleksa sastava $AlMor_2^+$ odvija u dva stupnja, odnosno preko nastajanja $AlMor^{2+}$:



Postojanje male koncentracije kompleksne vrste $AlMor^{2+}$ moguće je objasniti na taj način što je koncentracija anjonskog oblika liganda, kao slabe kiseline, na pH vrednosti na kojoj su vršena merenja, mala.¹²⁹ Verovatno je da bi postojala samo jedna kompleksna vrsta sastava $AlMor_2^+$ da su ispitivanja vršena na većim pH vrednostima ($pH > 5$), ali s obzirom da je intenzitet fluorescencije kompleksa najveći oko pH vrednosti na kojoj su vršena ispitivanja, rad na višim pH -vrednostima nije svrsishodan.

Prema podacima dostupnim iz literature, uočava se da stehiometrijski sastav aluminijum(III)-morin kompleksa zavisi od sredine u kojoj se formira kompleks, odnosno od pH vrednosti i vrste rastvarača.

B. A. Browne i saradnici¹³⁷ ispitivali su aluminijum(III)-morin kompleks u vodenim rastvorima i utvrdili su da nastaju tri kompleksne vrste: $Al(III) : morin = 1:1$; $1:2$ i/ili $1:3$. Pokazano je da se u kiselim rastvorima u kojima koncentracija morina ne prelazi vrednost od $1 \mu mol dm^{-3}$, formira kompleks sastava $1:1$. Porastom pH vrednosti rastvora kao i koncentracije morina, u rastvoru će nastati i druge dve kompleksne vrste: $AlMor_2^+$ i $AlMor_3$.

A. Gutierrez i M. Gehlen,³³ su utvrdili metodom molarnih odnosa, da u reakciji morina sa aluminijum(III)-jonom nastaju dve kompleksne vrste: u metanolu nastaje kompleks sastava $Al(III) : morin = 1 : 1$, a u metanolu kome je dodata nitrata kiselina nastaje kompleks $Al(III) : morin = 1 : 2$.

Septum i saradnici¹³⁸ su utvrdili metodom molarnih odnosa da u vodenim rastvorima, bez podešavanja pH , nastaje kompleksna vrsta Al_3Mor_2 , a u acetatnom puferu, u vodenoj sredini nastaje kompleks sastava $AlMor^{2+}$.

4.1.3. Reakcija formiranja kompleksa

Izvršena su merenja pH ekvimolarnih rastvora morina i aluminijum(III)-nitrata u 70% v/v etanolu, a zatim je meren pH rastvora koji je sadržavao aluminijum(III)-jon i morin u koncentraciji koja je bila ista kao i njihova koncentracija u posebnim rastvorima. Rezultati su prikazani u Tabeli 4.1.1.

Tabela 4.1.1. Rezultati pH -metrijskih merenja ekvimolarnih rastvora morina, $Al(NO_3)_3$ i njihove smeše u 70% v/v etanolu

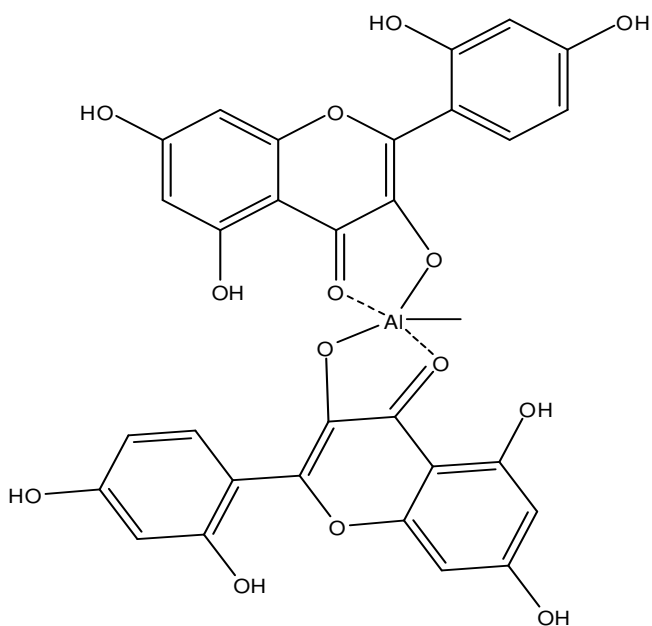
		Morin, $c = 1 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$	$Al(NO_3)_3$, $c = 1 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$	Smeša
pH		6,35	6,72	4,16
c_{H^+}		$4,47 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$	$1,91 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$	$6,92 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$
Σc_{H^+}	c_{sm}	$6,38 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$		$6,92 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$
$\Delta c_{H^+} = c_{sm} - \Sigma c_{H^+}$		$6,856 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$		

Niže vrednosti pH smeše pokazuju da se reakcija odvija uz oslobađanje vodonikovih jona, odnosno da morin učestvuje u reakciji građenja kompleksa u anjonskom obliku. Na višim pH vrednostima ($pH > 5,0$), smanjuje se koncentracija kompleksne vrste u rastvoru, što može biti posledica hidrolize kompleksa. Reakcija formiranja kompleksa morina i aluminijum(III)-jona može se prikazati jednačinom (4.2.) a struktura kompleksa Shemom 2:



Porast intenziteta fluorescencije, nakon heliranja morina sa aluminijum(III)-jonom pripisuje se povezanosti dva važna efekta:

- inhibiciji ekscitovanog stanja intramolekulskog protonskog transfera između C3-hidroksilne i C4-karbonilne grupe na A i C prstenu, i
- opadanju sposobnosti formiranja vodoničnih veza molekula morina sa molekulima rastvarača koja se javlja kao posledica reakcije kompleksiranja



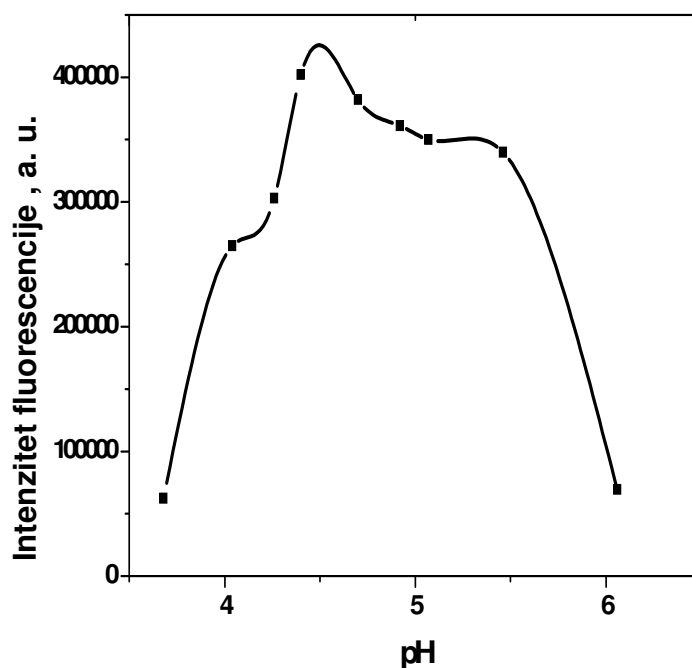
Schema 2: Pretpostavljena struktura kompleksa aluminijum(III)-morin

U ispitivanom kompleksu aluminijum(III)-morin dolazi do intenzivne emisije koja je posledica $\pi^* \rightarrow \pi$ singletnog prelaza, pri čemu je emisija formiranog kompleksa značajno veća u odnosu na slabu emisiju samog morina. Intenzitet fluorescencije ispitivanog kompleksa veoma zavisi od pH sredine zbog inter- i intra- molekulskog transfera protona. Na to ukazuje i oblik krive zavisnosti intenziteta fluorescencije kompleksa od pH sredine, prikazan na slici 4.1.5.

4.1.4. Određivanje koncentracionih konstanti stabilnosti kompleksa aluminijum (III)- morin

Izračunavanje koncentracionih konstanti stabilnosti kompleksa aluminijum(III)-morin vršeno je prema jednačinama datim u poglavlju 3.3. Za smešu rastvora aluminijum(III)-nitrata i morina izmereni su intenziteti fluorescencije na različitim vrednostima pH (eksperimentalni uslovi $\lambda_{ex} = 410$ nm i $\lambda_{em} = 500$ nm i širine otvora za ekscitacione i emisione snopove su bili 3 nm i 4 nm, respektivno). Zavisnost intenziteta fluorescencije od pH vrednosti smeše predstavljena je na slici 4.1.5. Koncentracija aluminijum(III)-nitrata u smeši bila je $1,0 \times 10^{-8}$ mol dm^{-3} , a koncentracija morina je iznosila $2,0 \times 10^{-7}$ mol dm^{-3} . Slepa proba je bio rastvor morina u acetatnom puferu u

70% v/v etanolu, odgovarajuće pH vrednosti i koncentracije kao u ispitivanoj smeši ($2,0 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$).



Slika 4.1.5. Zavisnost intenziteta fluorescencije kompleksa aluminijum(III)-morin od pH . ($\lambda_{ex} = 410 \text{ nm}$ i $\lambda_{em} = 500 \text{ nm}$; širine otvora za ekscitacione i emisione snopove su 3 nm i 4 nm , respektivno)

Iz maksimalne vrednosti intenziteta fluorescencije, I_{Fmax} , sa krive $I_F = f(pH)$ (slika 4.1.5.), a koja se nalazi na $pH = 4,40$, izračunata je, prema jednačini (3.4.), konstanta $k = 4,26 \times 10^{13}$.

Iz podataka za intenzitet fluorescencije na različitim vrednostima pH , dobijenih sa krive na slici 4.1.5, jednačina izvedenih iz reakcije formiranja kompleksa (jednačina 3.5.2.) i konstante disocijacije morina¹³⁹ ($k_d = 3,55 \times 10^{-6}$), izračunate su opšte koncentracione konstante stabilnosti kompleksa β_2 :

$$\beta_2 = \frac{[AlMor_2^+]}{[Al^{3+}][Mor^-]^2} \quad (4.3.)$$

gde su sa $[AlMor_2^+]$, $[Al^{3+}]$, $[Mor^-]$ označene koncentracije kompleksa aluminijum(III)-morin, aluminijum(III)-jona i morina u anjonskom obliku.

Vrednosti opšte koncentracione konstante stabilnosti kompleksa β_2 na različitim vrednostima pH , date su u tabeli 4.1.2.

Tabela 4.1.2. Vrednosti opšte koncentracione konstante stabilnosti β_2 kompleksa aluminijum(III)-morin

pH	c_{kompl}	c_{Al}	c_{mor}	β_2	$\log \beta_2$
4,00	$6,08 \times 10^{-9}$	$3,92 \times 10^{-9}$	$6,44 \times 10^{-9}$	$3,74 \times 10^{16}$	16,57
4,40	$9,57 \times 10^{-9}$	$4,32 \times 10^{-10}$	$1,57 \times 10^{-8}$	$8,98 \times 10^{16}$	16,96
4,75	$8,73 \times 10^{-9}$	$1,27 \times 10^{-9}$	$3,04 \times 10^{-8}$	$7,44 \times 10^{15}$	15,87
5,00	$8,25 \times 10^{-9}$	$1,75 \times 10^{-9}$	$4,81 \times 10^{-8}$	$2,04 \times 10^{15}$	15,31
5,25	$8,20 \times 10^{-9}$	$1,80 \times 10^{-9}$	$7,11 \times 10^{-8}$	$9,01 \times 10^{14}$	14,95
5,50	$8,08 \times 10^{-9}$	$1,92 \times 10^{-9}$	$9,72 \times 10^{-8}$	$4,45 \times 10^{14}$	14,65

U literaturi nema mnogo podataka za vrednosti opštih koncentracionih konstanti stabilnosti kompleksa aluminijum(III)-morin. Prema podacima M. S. Shumana¹⁴⁰, konstanta stabilnosti kompleksa aluminijum(III)-morin sastava 1:1, koji je ispitivan u pH oblasti od 2 do 5 pH jedinica, iznosi $\log k = 6,47$ pri čemu se ne navodi pH vrednost na kojoj je određena ova konstanta.

Iz podataka prikazanih u tabeli 4.1.2. može se zaključiti da pH vrednost značajno utiče na formiranje, a samim tim i na vrednost opšte koncentracione konstante stabilnosti. Iz tabele 4.1.2. jasno se vidi da su najveće vrednosti konstante stabilnosti za ispitivani kompleks dobijene u oblasti između 4,00-4,50 pH jedinica. Očekivano bi bilo da vrednost opšte koncentracione konstante stabilnosti kompleksa raste pri povećanju pH , jer se povećanjem pH favorizuje disocijacija morina, što povećava mogućnost ugradnje anjonskog oblika morina u kompleks. Iz tabele 4.1.2. se takođe uočava da sa porastom pH vrednosti raste koncentracija anjonskog oblika morina. Međutim, sa porastom pH vrednosti opada koncentracija slobodnog aluminijum(III)-jona, što je očekivana posledica njegove hidrolize, te otuda jasno sledi da vrednost konstante stabilnosti neće bezuslovno rasti sa porastom pH vrednosti, već to zavisi od

koncentracija svih učesnika u reakciji kompleksiranja: koncentracije kompleksa i ravnotežnih koncentracija aluminijum(III)-jona i morina.

4.1.5. Spektrofluorimetrijsko određivanje morina u 70 %v/v etanolu

Dobijena vrednost opšte koncentracione konstante stabilnosti aluminijum(III)-morin kompleksa je velika, što ukazuje da se u datim eksperimentalnim uslovima (pH 4,40, u 70 v/v% etanolu) formira stabilan kompleks. Morin je određivan spektrofluorimetrijski na osnovu kalibracionog dijagrama koji predstavlja zavisnost intenziteta fluorescencije kompleksa aluminijum(III)-morin od koncentracije morina. Koncentracija aluminijum(III)-jona je uzeta u višku, pa se može smatrati da je koncentracija kompleksa proporcionalna koncentraciji morina.

Dobijena je linearna zavisnost intenziteta fluorescencije ispitivanog kompleksa od koncentracije morina, koja se može predstaviti regresionom jednačinom:

$$I_F = (3,19 \pm 0,07) c_{Mor} + (0,81 \pm 0,04) \quad (4.4)$$

gde I_F predstavlja relativni intenzitet fluorescencije izražen u %, (meren na $\lambda_{ex} = 410$ nm i $\lambda_{em} = 500$ nm, širine otvora za ekscitacione i emisione snopove su iznosile 3 nm i 4 nm, respektivno), a c_{Mor} je koncentracija morina. Koeficijent korelacije iznosi $r = 0,99874$.

Linearnost je dobijena u koncentracionom intervalu od 1,5–30,5 ng cm⁻³ morina.

Vrednosti granice detekcije LOD i granice kvantifikacije LOQ računane su prema jednačinama (3.12.) i (3.13.) koje su date u poglavlju 3.4. Granica detekcije je iznosila $LOD = 0,015$ ng cm⁻³, a granica kvantifikacije je $LOQ = 0,045$ ng cm⁻³.

Tačnost i preciznost metode je proverena na tri različite koncentracije morina i predstavljena je u Tabeli 4.1.3.

Tabela 4.1.3. Rezultati spektrofluorimetrijskog određivanja morina

Odmereno (ng cm ⁻³)	Nađeno (ng cm ⁻³)	"Recovery" (%)	SD	KV(%)
3,03	2,95	97,4	2,5×10 ⁻²	0,84
6,06	6,08	100,4	2,9×10 ⁻²	0,47
9,09	9,14	100,6	2,8×10 ⁻²	0,31

n=5

"Recovery" vrednosti koje se nalaze između 97,4 i 100,6 % i niske vrednosti standardne devijacije ukazuju na veoma dobru reproduktivnost merenja.

4.1.6. Spektrofluorimetrijsko određivanje morina u uzorcima humanog seruma

Morin je, takođe, određivan spektrofluorimetrijski u rastvorima humanog seruma metodom kalibracione krive koja predstavlja zavisnost intenziteta fluorescencije kompleksa aluminijum(III)-morin od koncentracije morina. Koncentracija aluminijum(III)-jona je u višku, pa se može smatrati da je koncentracija kompleksa proporcionalna koncentraciji morina.

Dobijena je linearna zavisnost intenziteta fluorescencije ispitivanog kompleksa od koncentracije morina u rastvorima humanog seruma, koja se može predstaviti regresionom jednačinom:

$$I_F = (3,30 \pm 0,05) c_{Mor} + (0,76 \pm 0,03) \quad (4.5)$$

gde I_F predstavlja relativni intenzitet fluorescencije izražen u %, (meren na $\lambda_{ex} = 410$ nm i $\lambda_{em} = 500$ nm, širine otvora za ekscitacione i emisione snopove iznosile su 3 nm i 4 nm, respektivno), a sa c_{Mor} je predstavljena koncentracija morina. Koeficijent korelacije je iznosio $r = 0,99944$.

Linearnost je dobijena u koncentracionom opsegu od 1,5–30,5 ng cm⁻³ morina.

Vrednosti granice detekcije LOD i granice kvantifikacije LOQ , izračunate su prema jednačinama (3.12.) i (3.13.) koje su date u poglavlju 3.4. Granica detekcije je iznosila $LOD = 0,02$ ng cm⁻³, a granica kvantifikacije je $LOQ = 0,06$ ng cm⁻³.

Tačnost i preciznost metode je proverena na tri različite koncentracije morina u uzorcima humanog seruma (predstavljena u Tabeli 4.1.3.).

I u ovom slučaju dobijene visoke "recovery" vrednosti koje se nalaze između 100,00 i 100,15 % i niske vrednosti standardne devijacije ukazuju na vema dobru reproduktivnost merenja.

Tabela 4.1.3. Rezultati spektrofluorimetrijskog određivanja morina[□] u uzorcima humanog seruma

Dodato ($\mu\text{g cm}^{-3}$)	Nađeno ($\mu\text{g cm}^{-3}$)	"Recovery" (%)	SD	KV(%)
0,1515	0,1515	100,00	$2,1 \times 10^{-3}$	1,40
0,3030	0,3036	100,15	$3,5 \times 10^{-3}$	1,15
0,4545	0,4551	100,11	$3,5 \times 10^{-3}$	0,77

n=5

4.1.7. HPLC određivanje morina

RP-HPLC metoda je već primenjena za određivanje morina u smeši morina i kvercetina i njihovih konjugovanih metabolita u serumu.⁸² Za proveru pouzdanosti predložene spektrofluorimetrijske metode za određivanje morina u rastvorima voda-etanol, kao i u uzorcima humanog seruma koji sadrže morin, razvijena je i modifikovana navedena RP-HPLC metoda

Dobijene su dve kalibracione krive za određivanje morina, jedna za vodeno-etanolnu sredinu, a druga za određivanje morina u uzorcima humanog seruma. Dobijeni validacioni parametri za određivanje morina u 70 v/v% etanolu i u humanom serumu. Dobijeni validacioni parametri za navedeno određivanje morina prikazani su u Tabeli 4.1.4.

"Recovery" vrednost je izračunata kao odnos između nagiba kalibracionih krivih u 70 v/v% etanolu i u humanom serumu. Dobijena vrednost od 86% je u prihvatljivom opsegu.

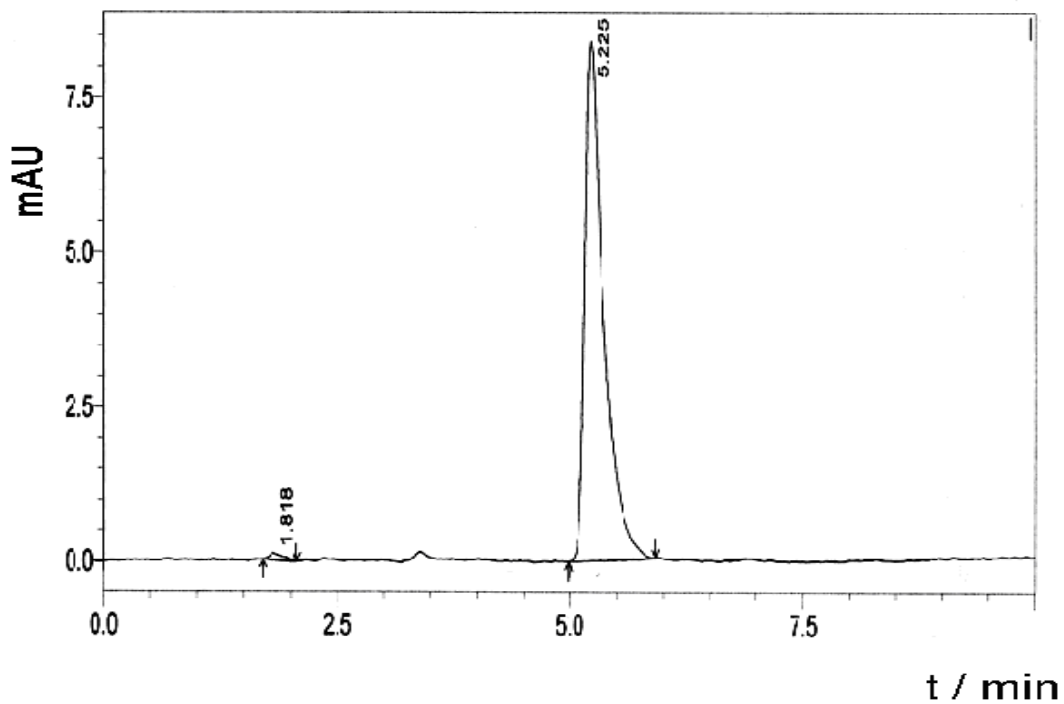
[□] U koloni 1 ove tabele prikazane su koncentracije morina u humanom serumu. Serum je zatim, prema proceduri za pripremu standardnih rastvora za serumsku kalibracionu krivu, opisanoj u poglavlju 3, dalje tretiran i razblaživan. Usled razblaživanja, koncentracije morina koje su određivane u humanom serumu spektrofluorimetrijski, ulaze u opseg linearnosti, koji je 1000 puta manji od stvarnih koncentracija morina u humanom serumu.

Spektrofluorimetrijska metoda omogućuje direktno i jednostavno određivanje morina bez ekstrakcije morina iz uzorka, koja se primenjuje kod HPLC metode sa UV-Vis detekcijom. Spektrofluorimetrijski se takođe, dobijaju mnogo niže vrednosti za granicu detekcije, LOD, i granicu kvantifikacije, LOQ, od vrednosti dobijenih HPLC metodom, što nesumnjivo predstavlja prednost. Dobijene "recovery" vrednosti HPLC metodom su niže u odnosu na "recovery" vrednosti koje se dobijaju spektrofluorimetrijski. To se može objasniti činjenicom da je prilikom pripreme uzoraka humanog seruma za HPLC analizu, korišćeno duže vreme inkubacije uzoraka na temperaturi 37 °C, što može dovesti do transformacije molekula morina.

Tabela 4.1.4. Validacioni parametri za određivanje morina u uzorcima humanog seruma i u rastvorima etanol-voda

Validacioni parametri	Serum	rastvori etanol-voda (v/v 70: 30)
regresiona jednačina (n=6) Y(površina pika), X (C_{Mor} u $\mu\text{g cm}^{-3}$)	$Y = (4,29 \pm 0,08) \times 10^3 X + (5,56 \pm 0,08) \times 10^3$	$Y = (5,0 \pm 0,1) \times 10^3 X + (10,9 \pm 0,1) \times 10^3$
Linearnost dobijena u opsegu koncentracija ($\mu\text{g cm}^{-3}$)	1,0 -200,0	1,6 -200,0
Koeficijent korelacije (r)	0,9987	0,9988
LOD ($\mu\text{g cm}^{-3}$)	0,056	0,055
LOQ ($\mu\text{g cm}^{-3}$)	0,169	0,166

Kod spektrofluorimetrijskog određivanja morina u uzorcima humanog seruma, nespecifična emisija komponenata seruma je izbegnuta velikim razblaženjem uzoraka prilikom pripreme rastvora za spektrofluorimetrijsku analizu. Osim toga, RP-HPLC metodom morin se razdvaja od proteina i drugih interferirajućih komponenti koje se nalaze u serumu, čime se omogućuje dobijanje tačnih i preciznih rezultata. Na slici 4.1.6. prikazan je hromatogram uzorka seruma koji sadrži morin.



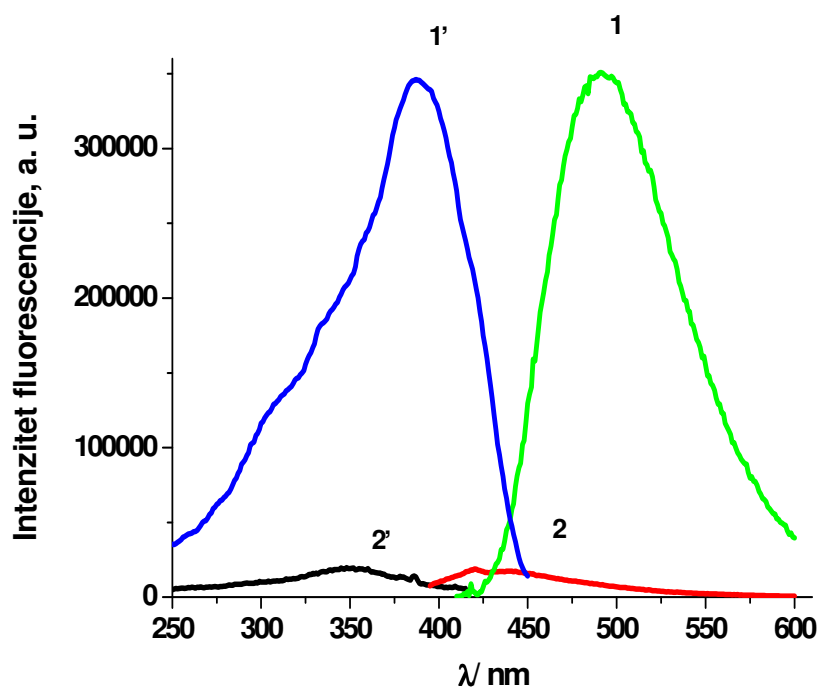
Slika 4.1.6. Hromatogram uzorka humanog seruma koji sadrži morin

U poređenju sa postojećim metodama za određivanje morina u različitim uzorcima,^{3, 82, 84} predložena spektrofluorimetrijska metoda je jednostavna, brza, pokazuje visoku osetljivost, u širokom koncentracionom opsegu gde je dobijena linearna zavisnost.

4.2. Kompleks aluminijum(III)- hesperidin

4.2.1. *Ekscitaciono-emisioni spektri kompleksa aluminijum(III)-hesperidin*

U reakciji aluminijum(III)-jona i hesperidina u 70 % v/v metanolu nastaje kompleks žute boje, koji je stabilan u *pH* oblasti od 3,0 do 7,0. Na slici 4.2.1. prikazani su ekscitacioni spektri kompleksa aluminijum(III)–hesperidin (kriva 1'), hesperidina (kriva 2'), i emisioni spektri kompleksa aluminijum(III)–hesperidin (kriva 1) i hesperidina (kriva 2). Ekscitacioni maksimum kompleksa se nalazi na $\lambda_{ex} = 390$ nm, a emisioni maksimum je na $\lambda_{em} = 490$ nm. Sam rastvor hesperidina pokazuje vrlo slabu fluorescenciju na $\lambda_{em} = 420$ nm. Fluorescencija rastvora hesperidina u 70 %v/v metanolu ($c = 5,0 \times 10^{-5}$ mol dm⁻³), intenzivno raste postepenim dodavanjem rastvora aluminijum(III)-nitrata.



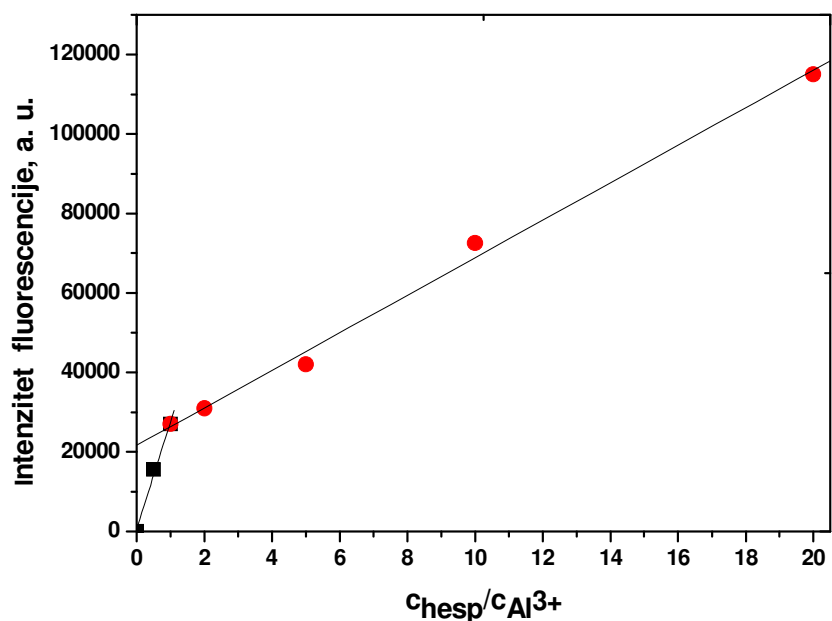
Slika 4.2.1. Ekscitaciono- emisioni spektri kompleksa aluminijum(III)-hesperidin (1, 1') i hesperidina (2, 2')

Porast intenziteta fluorescencije je očekivana posledica reakcije kompleksiranja do koje dolazi u rastvoru, pri čemu se gradi kompleks aluminijum(III)–hesperidin, koji pokazuje značajnu fluorescenciju na $\lambda_{em} = 490$ nm, i čiji je emisijski maksimum batohromno pomeren za 70 nm u odnosu na emisijski maksimum čistog hesperidina.

4.2.2. Određivanje sastava kompleksa aluminijum(III)-hesperidin

Aluminijum(III)-jon i hesperidin grade kompleks sastava *Aluminijum(III): hesperidin* =1:1.

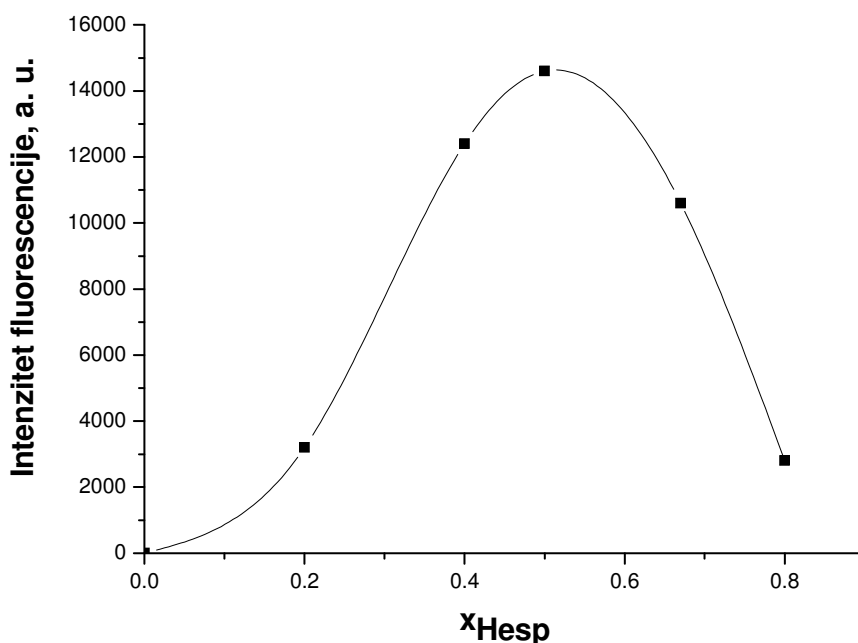
Sastav kompleksa je određen metodom molarnih odnosa, prema kojoj su izmereni intenziteti fluorescencije rastvora koji sadrže konstantnu koncentraciju aluminijum(III)-nitrata, koja je iznosila $1,0 \times 10^{-6}$ mol dm⁻³ i različite koncentracije hesperidina, koje su se kretale od $5,0 \times 10^{-7}$ do $2,0 \times 10^{-5}$ mol dm⁻³. Merenja su izvršena na $\lambda_{ex} = 390$ nm i $\lambda_{em} = 490$ nm u acetatnom puferu koji je pripremljen u 70 v/v % metanolu, čija je vrednosti *pH* iznosila 4,58. Širine otvora za ekscitacione i emisijske snopove podešene su na vrednosti od 5 nm za oba otvora. Kao slepa proba korišćen je $1,0 \times 10^{-6}$ mol dm⁻³ rastvor aluminijum(III)-nitrata u acetatnom puferu *pH* = 4,58 a koji je pripremljen u 70% v/v metanolu. Dijagram zavisnosti intenziteta fluorescencije kompleksa aluminijum(III)-hesperidin od odnosa koncentracija hesperidina i aluminijum(III)-jona prikazan je na slici 4.2.2. Presek tangenti koje se povlače na krivu koja predstavlja zavisnost intenziteta fluorescencije ispitivanih rastvora u funkciji odnosa koncentracija hesperidina i aluminijum(III)-jona, se nalazi u tački $c_{hesp} / c_{Al} = 1$ što ukazuje na nastajanje kompleksa sastava aluminijum(III) : hesperidin =1:1.



Slika 4.2.2. Metoda molarnih odnosa. Zavisnost intenziteta fluorescencije kompleksa aluminijum(III)-hesperidin od odnosa koncentracija hesperidina i aluminijum(III)-jona, $c_{Hesp} / c_{Al^{3+}}$; ($\lambda_{ex} = 390$ nm i $\lambda_{em} = 490$ nm, širine otvora za ekscitacione i emisijne snopove iznosile su 5 nm)

Kao uporedna metoda kojom je određivan sastav nastalog kompleksa korišćena je metoda varijacija ekvimolarnih rastvora. Izmereni su intenziteti fluorescencije serije rastvora, koja je dobijena mešanjem ekvimolarnih rastvora aluminijum(III)-nitrata i hesperidina u acetatnom puferu koji je pripremljen u 70 v/v % metanolu, na pH vrednosti 4,58, čije su koncentracije iznosile $1,0 \times 10^{-5}$ mol dm^{-3} . Slepa proba svakog rastvora u seriji sadržavala je ekvimolarnu koncentraciju aluminijum(III)-nitrata u acetatnom puferu na pH vrednosti 4,58. Sva merenja su vršena na $\lambda_{ex} = 390$ nm i $\lambda_{em} = 490$ nm. Širine otvora za ekscitacione i emisijne snopove podešene su na vrednosti od 5 nm za oba otvora. Molski udeo aluminijum(III)-jona u rastvorima iznosio je od 0,2 do 0,8, a odgovarajuće koncentracije aluminijum(III)-jona su se nalazile u opsegu od $2,0 \times 10^{-6}$ mol dm^{-3} do $8,0 \times 10^{-6}$ mol dm^{-3} . Zavisnost intenziteta fluorescencije rastvora od molskog udela aluminijuma (III), prikazana je na slici 4.2.3. Na dobijenoj krivoj uočava

se maksimum na $x_{Al} = 0,5$, što pokazuje da se gradi kompleks sastava aluminijum(III) : hesperidin =1:1.



4.2.3. Metoda varijacija ekvimolarnih rastvora. Zavisnost intenziteta fluorescencije kompleksa aluminijum(III)-hesperidin od molske frakcije hesperidina, x_{Hesp} . ($\lambda_{ex} = 390$ nm i $\lambda_{em} = 490$ nm širine otvora za ekscitacione i emisione snopove su 5 nm)

Obe metode kojima je određivan sastav kompleksa, su potvrdile da nastaje jedna kompleksna vrsta sastava $AlHesp^{2+}$.

Literaturni podaci pokazuju, pre svega, da kompleksna jedinjenja hesperidina sa jonima metala nisu mnogo istraživana, što je verovatno posledica slabe rastvorljivosti samog hesperidina u relativno velikom broju rastvarača.

Kompleks aluminijum(III)-hesperidin ispitivan je u 70 v/v% metanolu spektrofotometrijski,⁴⁰ i utvrđeno je da nastaje kompleks sastava 1:1. T. Perez-Ruiz i grupa autora⁴³ su takođe ispitivali ovaj kompleks u rastvorima metanol-voda, a zatim su ispitivali kompleks u prisustvu većeg broja anjonskih, katjonskih i nejonskih surfaktanata u takođe u rastvorima metanol-voda. Ova grupa autora je utvrdila da u

svim slučajevima (u prisustvu i bez prisustva surfaktanata) nastaje kompleks sastava 1:1.

4.2.3. Reakcija formiranja kompleksa

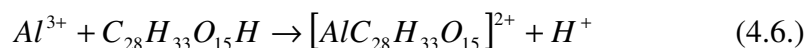
Izvršena su merenja pH ekvimolarnih rastvora hesperidina i aluminijum(III)-nitrata u 70% v/v metanolu, a zatim je meren i pH rastvora koji je sadržavao aluminijum(III)-jon i hesperidin u koncentraciji koja je bila ista kao i njihova koncentracija u posebnim rastvorima. Rezultati su prikazani u Tabeli 4.2.1.

Tabela 4.2.1. Rezultati pH -metrijskih merenja ekvimolarnih rastvora hesperidina, $Al(NO_3)_3$ i njihove smeše u 70% v/v metanolu

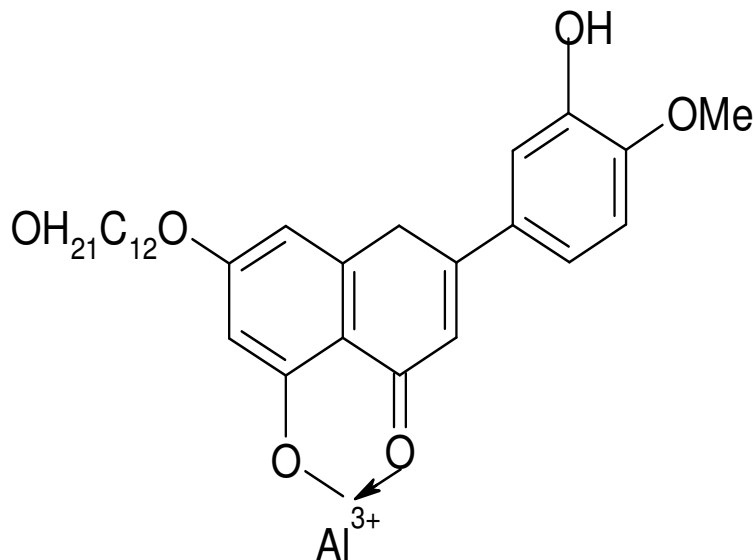
	hesperidin, $c = 5 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$	$Al(NO_3)_3$, $c = 5 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$	Smeša
pH	7,57	6,72	3,80
c_{H^+}	$2,69 \times 10^{-8} \text{ mol dm}^{-3}$	$1,91 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$	$6,92 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$
Σc_{H^+} c_{sm}	$2,18 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$		$1,58 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$
$\Delta c_{H^+} = c_{sm} - \Sigma c_{H^+}$	$1,578 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$		

Niže pH vrednosti smeše u odnosu na pojedinačne rastvore hesperidina i aluminijum(III)-jona pokazuju da se reakcija formiranja kompleksa odvija uz oslobađanje vodonikovih jona, odnosno da hesperidin učestvuje u građenju kompleksa u anjonskom obliku.

Na višim pH vrednostima ($pH > 5,0$), smanjuje se koncentracija kompleksne vrste u rastvoru, što može biti posledica hidrolize kompleksa. Reakcija formiranja kompleksa između hesperidina i aluminijum(III)-jona može se prikazati jednačinom:



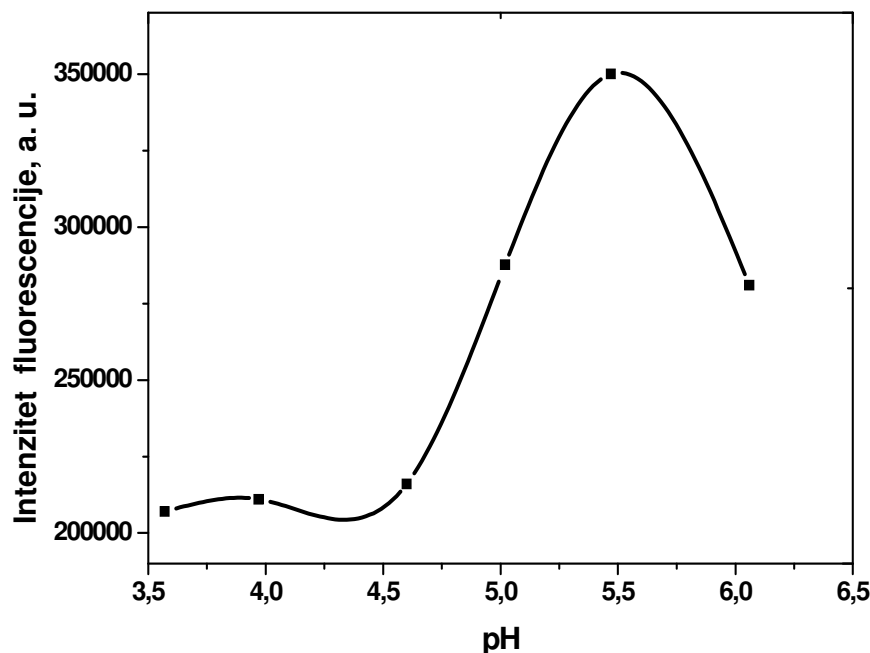
Predpostavlja se da formirani kompleks ima strukturu prikazanu Shemom 3:



Shema 3: Predpostavljena struktura kompleksa aluminijum(III)-hesperidin

4.2.4. Određivanje koncentracionih konstanti stabilnosti kompleksa aluminijum(III)- hesperidin

Za izračunavanje koncentracionih konstanti stabilnosti kompleksa **aluminijum(III)-hesperidin** korišćen je postupak opisan u poglavlju 3.3. Izmereni su intenziteti fluorescencije smeše rastvora aluminijum(III)-nitrata i hesperidina na različitim *pH* vrednostima, (eksperimentalni uslovi $\lambda_{\text{ex}} = 390 \text{ nm}$ and $\lambda_{\text{em}} = 490 \text{ nm}$ i širine otvora za ekscitacione i emisione snopove bile su 5 nm). Zavisnost intenziteta fluorescencije od *pH* smeše predstavljena je krivom na slici 4.2.4. Koncentracija aluminijum(III)-nitrata u smeši je bila $2,5 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$, a koncentracija hesperidina je iznosila $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$. Slepa proba je bio rastvor hesperidina koncentracije $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ u acetatnom puferu koji je pripremljen u 70%v/v metanolu, odgovarajuće *pH* vrednosti.



Slika 4.2.4. Zavisnost intenziteta fluorescencije kompleksa aluminijum(III)-hesperidin od pH . ($\lambda_{ex} = 410$ nm i $\lambda_{em} = 500$ nm; širine otvora za ekscitacione i emisione snopove su iznosile 5 nm)

Iz maksimalne vrednosti intenziteta fluorescencije, dobijene sa krive $I_F = f(pH)$ (slika 4.2.4.), za $pH = 5,50$, izračunata je prema jednačini 3.4. konstanta $k = 1,41 \times 10^{12}$.

Iz podataka dobijenih sa krive, slika (4.2.4.), jednačina izvedenih iz reakcije obrazovanja kompleksa i konstante disocijacije hesperidina,¹⁴¹ koja iznosi $k_d = 3,00 \times 10^{-7}$, izračunate su opšte koncentracione konstante stabilnosti kompleksa β_1 :

$$\beta_1 = \frac{[AlHesp^{2+}]}{[Al^{3+}][Hesp^-]} \quad (4.7)$$

gde su sa $[AlHesp^{2+}]$, $[Al^{3+}]$, $[Hesp^-]$ označene koncentracije kompleksa aluminijum(III)-hesperidin, aluminijum(III)-jona i hesperidina u anjonskom obliku.

Vrednosti opšte koncentracione konstante stabilnosti kompleksa β_1 na različitim vrednostima pH , date su u tabeli 4.2.2.

Tabela 4.2.2. Vrednosti opšte koncentracione konstante stabilnosti β_1 kompleksa aluminijum(III)-hesperidin

<i>pH</i>	I_F	C_{kompl}	C_{Al}	C_{Hesp}	β_1	log β_1
4,00	210900	$1,50 \times 10^{-7}$	$1,00 \times 10^{-7}$	$1,45 \times 10^{-8}$	$1,03 \times 10^8$	8,01
4,25	205000	$1,45 \times 10^{-7}$	$1,45 \times 10^{-7}$	$2,56 \times 10^{-8}$	$5,36 \times 10^7$	7,73
4,50	208900	$1,48 \times 10^{-7}$	$1,02 \times 10^{-7}$	$4,56 \times 10^{-8}$	$3,18 \cdot 10^7$	7,50
5,00	287700	$2,04 \times 10^{-7}$	$4,6 \times 10^{-8}$	$1,40 \times 10^{-7}$	$3,60 \times 10^7$	7,56
5,25	332000	$2,35 \times 10^{-7}$	$1,5 \times 10^{-8}$	$2,41 \times 10^{-7}$	$6,49 \times 10^7$	7,81
6,00	295000	$2,09 \times 10^{-7}$	$4,6 \times 10^{-8}$	$1,11 \times 10^{-6}$	$5,61 \times 10^6$	6,75

T. Perez-Ruiz i grupa autora⁴³ su u izučavali kompleks aluminijum(III)-hesperidin i dobili vrednost opšte koncentracione konstante stabilnosti ovog kompleksa koja iznosi $\log K = 5,73 \pm 0,02$. Treba napomenuti da se u radu ne navode eksperimentalni uslovi pri kojima je vrednost konstante stabilnosti izračunata (*pH* vrednost, prisustvo surfaktanata).

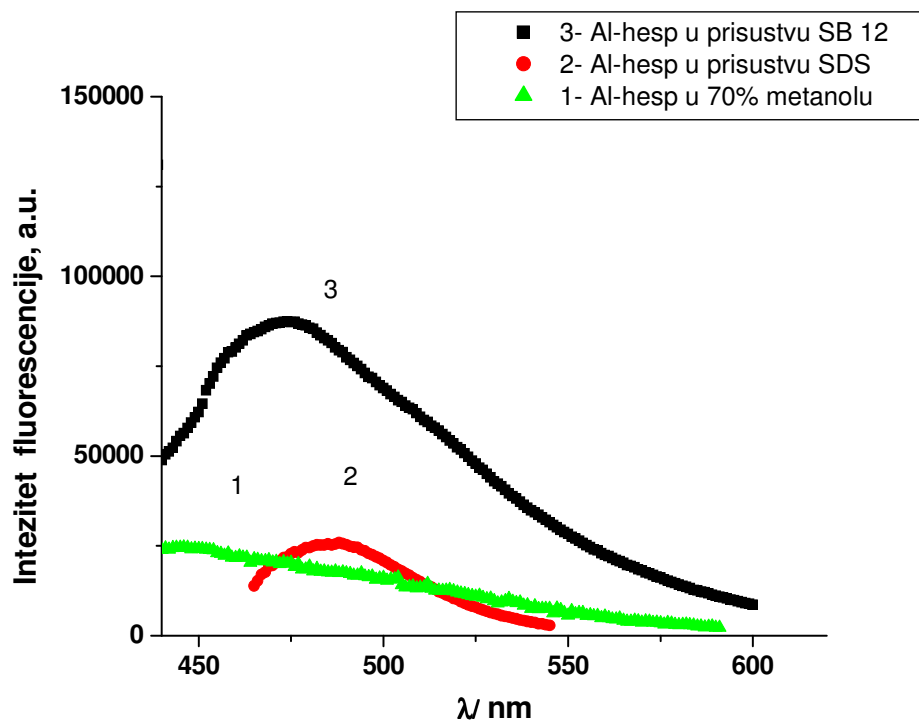
Ovaj kompleks je ispitivan u 70 v/v% metanolu spektrofotometrijski, od strane D. Maleševa i grupe autora.⁴⁰ Na *pH* = 5,00 i jonskoj jačini rastvora $I = 0,01 \text{ mol dm}^{-3}$ dobijena je vrednost relativne koncentracione konstante stabilnosti kompleksa $\log K = 4,54$.

Podaci prikazani u tabeli 4.2.2. ukazuju da *pH* vrednost utiče na formiranje, a samim tim i na vrednost opšte koncentracione konstante stabilnosti kompleksa. Iz tabele 4.2.2. jasno se vidi da su najveće vrednosti konstante stabilnosti za ispitivani kompleks dobijene na *pH* = 4,00. Očekivano bi bilo, kao i u slučaju morina, da vrednost opšte koncentracione konstante stabilnosti kompleksa raste pri povećanju *pH*, jer se povećanjem *pH* favorizuje disocijacija hesperidina, kao slabe kiseline, odnosno sa povećanjem *pH* raste koncentracija anjonskog oblika hesperidina. Osim toga, porast *pH* vrednosti dovodi do hidrolize aluminijum(III)-jona, pa njegova koncentracija opada, što dovodi do smanjenja vrednosti opšte konstante stabilnosti kompleksa na višim *pH* vrednostima.

4.2.5. *Uticaj prisustva cviterjonske površinski aktivne materije SB 12 na intenzitet fluorescencije ispitivanog kompleksa aluminijum(III)-hesperidin*

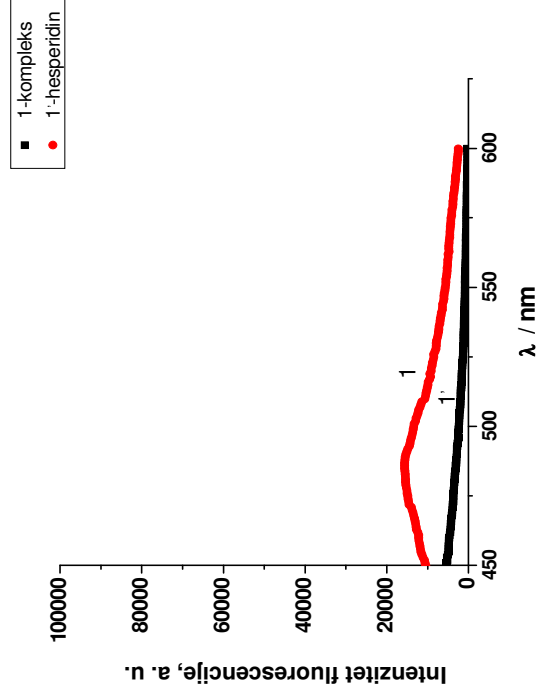
U radu T. Perez-Ruiz i saradnika,⁴³ pokazano je da prisustvo površinski aktivnih materija u reakcionom sistemu u kom nastaje ispitivani aluminijum(III)-hesperidin kompleks ima značajan uticaj na intenzitet fluorescencije ovog kompleksa. Ova grupa autora je ispitivala kompleks aluminijum(III)-hesperidin u prisustvu većeg broja anjonskih, katjonskih i nejonskih surfaktanata u rastvorima metanol-voda. U literaturi nije bilo podataka o uticaju cviterjonskih surfaktanta na fluorescenciju aluminijum(III)-hesperidin kompleksa, što nas je opredelilo za izbor SB 12, kao cviterjonskog surfaktanta u čijem prisustvu je bila izučavana fluorescencija kompleksa aluminijum(III)-hesperidin. Prema ovoj grupi autora, surfaktant koji je pokazao najveći uticaj na intenzitet fluorescencije kompleksa je SDS (natrijum-dodecilsulfat). Da bi se ispitao i uporedio uticaj SDS-a i SB 12 na intenzitet fluorescencije kompleksa aluminijum(III)-hesperidin snimljeni su emisijski spektri ovog kompleksa u: 70 v/v% metanolu bez prisustva površinski aktivnih materija (kriva 1, slika 4.2.5); u 70 v/v% metanolu u prisustvu SDS-a (kriva 2, slika 4.2.5) i u 70 v/v% metanolu u prisustvu SB 12 (kriva 3, slika 4.2.5). Emisijski spektri ispitivanog kompleksa su izmereni za onaj odnos koncentracija aluminijum(III)-jona i hesperidina u smeši, koji je naveden u radu T. Perez-Ruiz i saradnika (koncentracija aluminijum(III)-jona je 1×10^{-5} mol dm⁻³ a hesperidina 1×10^{-5} mol dm⁻³). Koncentracija površinski aktivnih materija bila je oko tri puta veća od njihove kritične micelarne koncentracije.* Prema dobijenim rezultatima, koji su prikazani na slici 4.2.5., nedvosmisleno je potvrđeno da SB 12 ima mnogo veći uticaj na intenzitet fluorescencije ispitivanog kompleksa u odnosu na SDS.

* Sa povećanjem koncentracije molekuli površinski aktivnih materija se grupišu u veće agregate (micele). Područje koncentracije površinski aktivnih materija u kojem se stvaraju micelle relativno je usko, ali se može odrediti sa priličnom tačnošću. Ova karakteristična koncentracija površinski aktivnih materija pri kojoj se micelle mogu smatrati formiranim naziva se kritična micelarna koncentracija (KMK). U području koncentracija pri kojima dolazi do formiranja micela, dolazi i do naglih promjena različitih osobina rastvora površinski aktivnih materija kao što su npr. osmotski pritisak, površinski napon, električna provodljivost, rasipanje svetlosti...



Slika 4.2.5. Uticaj surfaktanata na intenzitet fluorescencije kompleksa aluminijum(III)–hesperidin: emisioni spektar kompleksa bez prisustva surfaktanata (kriva 1), emisioni spektri kompleksa u prisustvu SDS (kriva 2) i SB 12 (kriva 3).

U 70 v/v% metanolu, u kome su ispitivanja vršena, koncentracija surfaktanta SB 12 bila je oko tri puta veća od njegove kritične micelarne koncentracije.¹⁴² Intenzitet fluorescencije formiranog kompleksa aluminijum(III)-hesperidin u prisustvu surfaktanta SB 12 intenzivno raste u odnosu na intenzitet fluorescencije aluminijum(III)-hesperidin kompleksa u 70 v/v% metanolu bez prisustva SB 12, što je prikazano na slici 4.2.6. Uočava da se talasna dužina maksimuma u emisionom spektru kompleksa u prisustvu površinski aktivnog SB 12 hipsokromno pomera sa $\lambda_{em}= 490$ nm na $\lambda_{em}= 476$ nm i da je intenzitet fluorescencije ispitivanog kompleksa između četiri do pet puta veći u odnosu na intenzitet fluorescencije kompleksa u 70 v/v% metanolu bez prisustva SB 12. U skladu sa dobijenim rezultatima, naredna ispitivanja kompleksa su urađena u 70 v/v% metanolu u prisustvu SB 12.

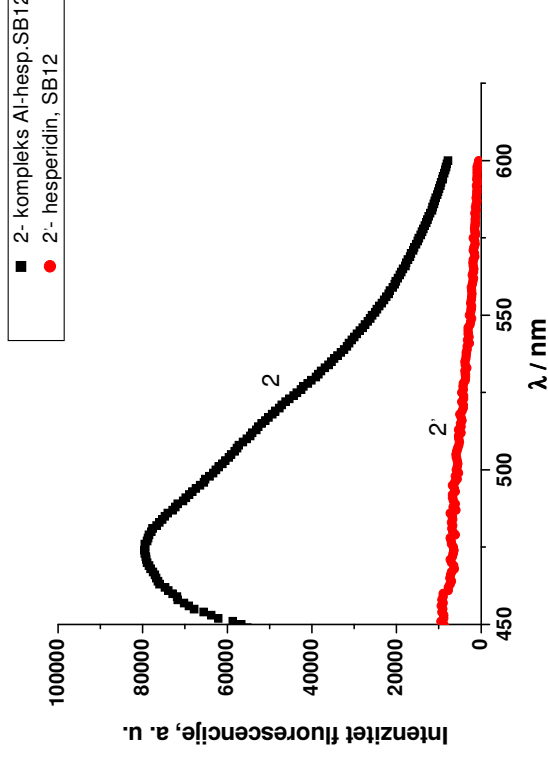


(a)

Slika 4.2.6. Emisioni spektri kompleksa aluminijum(III)-hesperidin izmereni na $\lambda_{ex} = 390$ nm; širine otvora za ekscitacione i emisione snopove su 5 nm

(a) bez prisustva SB 12

kriva 1- emisioni spektar kompleksa aluminijum(III)-hesperidin,
kriva 1' emisioni spektar hesperidina



(b)

(b) u prisustvu SB 12

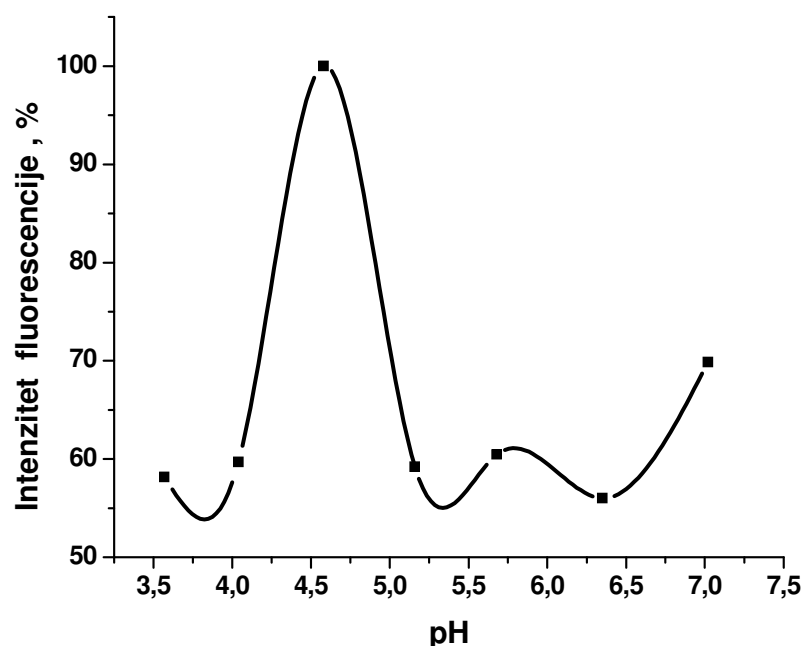
kriva 2- emisioni spektar kompleksa aluminijum(III)-hesperidin
kriva 2' emisioni spektar hesperidina

4.2.6. *Određivanje koncentracionih konstanti stabilnosti kompleksa aluminijum(III)- hesperidin u prisustvu SB 12*

Da bi se odredile opšte koncentracione konstante stabilnosti kompleksa aluminijum(III)-hesperidin u prisustvu SB 12 prema postupku koji je opisan u poglavlju 3.3., bilo je potrebno ispitati uticaj *pH* na intenzitet fluorescencije kompleksa u prisustvu SB 12.

Uticaj *pH* vrednosti na intenzitet fluorescencije kompleksa aluminijum(III)-hesperidin je ispitan u *pH* oblasti 3,0–7,0. Izmereni su intenziteti fluorescencije smeše rastvora aluminijum(III)-nitrata i hesperidina na različitim vrednostima *pH*, (eksperimentalni uslovi: $\lambda_{\text{ex}} = 390$ nm i $\lambda_{\text{em}} = 476$ nm; širine otvora za ekscitacione i emisione snopove su bile 5 nm). Zavisnost intenziteta fluorescencije od *pH* smeše predstavljena je na slici 4.2.7. Korišćena koncentracija aluminijum(III)-nitrata u smeši bila je $2,5 \times 10^{-7}$ mol dm⁻³, dok je koncentracija hesperidina iznosila $5,0 \times 10^{-6}$ mol dm⁻³. Slepa proba je bio rastvor hesperidina koncentracije 5×10^{-6} mol dm⁻³ u acetatnom puferu koji je pripremljen u 70% metanolu u prisustvu SB 12. Vrednosti *pH* slepe probe su odgovarale *pH* vrednostima svakog pojedinačnog rastvora za koji su ispitivanja vršena.

Na slici 4.2.7. se uočava da je intenzitet fluorescencije kompleksa na nižim *pH* vrednostima mnogo manji u odnosu na maksimalnu vrednost na *pH* = 4,58, što je posledica težnje protona da istisne aluminijum(III)-jon iz kompleksa, a što dovodi do razgradnje kompleksa. Međutim, intenzitet fluorescencije kompleksa na *pH* vrednostima većim od 4,58 veoma brzo opada, što se može pripisati nastajanju aluminijum(III)-hidrokso kompleksa. Optimalna *pH* vrednost za nastajanje kompleksa aluminijum(III)-hesperidin u prisustvu SB 12 je oko 4,5 *pH* jedinica.



Slika 4.2.7. Zavisnost intenziteta fluorescencije kompleksa aluminijum(III)-hesperidin u prisustvu SB 12 od pH . ($\lambda_{ex} = 390$ nm i $\lambda_{em} = 476$ nm; širine otvora za ekscitacione i emisione snopove iznosile su 5 nm)

Iz maksimalne vrednosti intenziteta fluorescencije, očitane sa krive $I_F = f(pH)$ (slika 4.2.7.), koja se nalazi na $pH = 4,58$, izračunata je prema jednačini (3.4.) konstanta $k=1,41 \times 10^{12}$. Iz podataka dobijenih sa krive prikazane na slici (4.2.7.), jednačina izvedenih iz reakcije stvaranja kompleksa i konstante disocijacije hesperidina koja iznosi $k_d = 3,00 \times 10^{-7}$ izračunate su opšte koncentracione konstante stabilnosti kompleksa β_1 :

$$\beta_1 = \frac{[AlHesp^{2+}]}{[Al^{3+}][Hesp^{-}]} \quad (4.8.)$$

gde su sa $[AlHesp^{2+}]$, $[Al^{3+}]$, $[Hesp^{-}]$ označene koncentracije kompleksa aluminijum(III)-hesperidin, aluminijum(III)-jona i hesperidina u anjonskom obliku.

Vrednosti opšte koncentracione konstante stabilnosti kompleksa β_1 na različitim pH vrednostima, date su u tabeli 4.2.3.:

Tabela 4.2.3. Vrednosti opštih koncentracionih konstanti stabilnosti β_1 kompleksa aluminijum(III)-hesperidin u prisustvu površinski aktivne materije SB 12

<i>pH</i>	I_F	C_{kompl}	C_{Al}	C_{hesp}	β_1	$\log \beta_1$
4,25	49000	$3,47 \times 10^{-8}$	$1,53 \times 10^{-8}$	$5,12 \times 10^{-9}$	$4,40 \times 10^8$	8,62
4,5	65000	$4,61 \times 10^{-8}$	$3,9 \times 10^{-9}$	$8,90 \times 10^{-9}$	$1,32 \times 10^9$	9,20
5,0	53700	$3,81 \times 10^{-8}$	$1,29 \times 10^{-8}$	$2,8 \times 10^{-8}$	$1,05 \times 10^8$	8,02
5,25	43400	$3,08 \times 10^{-8}$	$1,92 \times 10^{-8}$	$4,91 \times 10^{-8}$	$3,27 \times 10^7$	7,51
5,50	43000	$3,05 \times 10^{-8}$	$1,95 \times 10^{-8}$	$8,40 \times 10^{-8}$	$1,86 \times 10^7$	7,27
6,0	44700	$3,17 \times 10^{-8}$	$1,83 \times 10^{-8}$	$2,23 \times 10^{-7}$	$7,75 \times 10^6$	6,89

Poređenjem vrednosti konstanti stabilnosti ovog kompleksa koje su izračunate u prvom slučaju za rastvore u kompleksa u 70 v/v% metanolu, u acetatnom puferu bez prisustva SB 12 (Tabela 4.2.2.) i u drugom slučaju za za rastvore u kompleksa u 70 v/v% metanolu, u acetatnom puferu u prisustvu SB 12 (Tabela 4.2.3.), uočava se da se u prisustvu surfaktanta povećava stabilnost kompleksa, konstanta stabilnosti na svim poređenim *pH* vrednostima je veća u prisustvu SB 12. Takođe, poređenjem podataka koji su prikazani u ove dve tabele, uočava se da na višim *pH* vrednostima, porast konstante stabilnosti za rastvore u kompleksa u 70 v/v% metanolu, u acetatnom puferu u prisustvu SB 12 nije tako značajan u odnosu na vrednosti konstante stabilnosti kompleksa na odgovarajućim *pH* vrednostima (*pH* > 5,0) bez prisustva surfaktanta. Vrednosti konstanti stabilnosti kompleksa u prisustvu SB 12 značajno rastu na nižim *pH* vrednostima (oko *pH* 4,0) u odnosu na vrednosti konstante stabilnosti kompleksa u 70 v/v% metanolu u acetatnom puferu bez prisustva surfaktanta. Ova pojava može se objasniti činjenicom da porast *pH* vrednosti dovodi do hidrolize aluminijum(III)-jona, pa njegova koncentracija opada, a samim tim dolazi do smanjenja vrednosti opšte konstante stabilnosti kompleksa na višim *pH* vrednostima.

Međutim, ako se uporede vrednosti konstante *k*, koja je izračunata prema jednačini (3.4.) koje samo zavise od karakteristika molekula koji pokazuje fluorescenciju (te je stoga ova vrednost karakteristična za dati molekul), dobijaju se gotovo identične vrednosti: vrednost ove konstante računata za kompleks koji je

formiran u 70 %v/v metanolu iznosi $k = 1,41 \times 10^{12}$, a njena vrednost za kompleks u 70 %v/v metanolu u prisustvu surfaktanta, iznosi $k = 1,40 \times 10^{12}$. Saglasnost ovih podataka pokazuje da prisustvo SB 12 ne utiče na prirodu formiranog kompleksa, ali povećava intenzitet fluorescencije nastalog kompleksa četiri do pet puta, što omogućava njegovu analizu pri nižim vrednostima koncentracija u prisustvu SB 12, kao i određivanje sadržaja hesperidina u različitim uzorcima.

4.2.7. Spektrofluorimetrijsko određivanje hesperidina u 70 %v/v metanolu

Hesperidin i aluminijum(III)-jon formiraju stabilan kompleks sastava 1 : 1, na šta ukazuju i dobijene vrednosti opšte koncentracione konstante stabilnosti ovog kompleksa, pa se u datim eksperimentalnim uslovima (acetatni pufer $pH = 5,40$, pripremljen u 70 v/v% metanolu) hesperidin može spektrofluorimetrijski odrediti na osnovu kalibracionog dijagrama koji predstavlja zavisnost intenziteta fluorescencije kompleksa aluminijum(III)-hesperidin od koncentracije hesperidina. Koncentracija aluminijum(III)-jona je uzeta u višku, te se može smatrati da je koncentracija kompleksa proporcionalna koncentraciji hesperidina.

Dobijena linearna zavisnost intenziteta fluorescencije ispitivanog kompleksa od koncentracije hesperidina, predstavljena je regresionom jednačinom:

$$I_F = (3,13 \pm 0,05) c_{Hesp} + (0,06 \pm 0,02) \quad (4.9)$$

gde I_F predstavlja relativni intenzitet fluorescencije izražen u % (meren na $\lambda_{ex} = 390$ nm i $\lambda_{em} = 490$ nm, širine otvora za ekscitacione i emisione snopove iznose 5 nm), a c_{Hesp} je koncentracija hesperidina data u $\mu\text{g cm}^{-3}$. Koeficijent korelacije iznosi $r = 0,99845$.

Linearnost je dobijena u koncentracionom intervalu od $0,08 - 18,0 \mu\text{g cm}^{-3}$ hesperidina.

Vrednosti granice detekcije, LOD i granice kvantifikacije, LOQ , računane su prema jednačinama (3.12.) i (3.13.) koje su date u poglavlju 3.4. Granica detekcije je iznosila $LOD = 0,023 \mu\text{g cm}^{-3}$, a granica kvantifikacije je $LOQ = 0,070 \mu\text{g cm}^{-3}$.

Tačnost i preciznost metode su proverene na četiri različite koncentracije hesperidina (predstavljena u Tabeli 4.2.4.).

Tabela 4.2.4. Rezultati dobijeni spektrofotometrijskim određivanjem hesperidina u 70% v/v metanolu

Odmereno ($\mu\text{g cm}^{-3}$)	Nađeno ($\mu\text{g cm}^{-3}$)	"Recovery" (%)	SD	KV(%)
1.83	1.79	97.8	$2.3 \cdot 10^{-2}$	1.31
3.05	2.99	98.0	$1.7 \cdot 10^{-2}$	0.57
6.10	6.08	99.6	$2.2 \cdot 10^{-2}$	0.36
12.21	12.18	99.8	$2.8 \cdot 10^{-2}$	0.23

n=5

Tačnost i reproduktivnost metode je veoma dobra, na šta ukazuju visoke "recovery" vrednosti i niske vrednosti standardne devijacije.

4.2.7.1. Spektrofotometrijsko određivanje hesperidina u sokovima od pomorandže

Koncentracija hesperidina određivana je u različitim sokovima od pomorandže, koji se nalaze na tržištu u Srbiji. Uzorci za određivanje hesperidina u soku od pomorandže pripremljeni su prema proceduri opisanoj u poglavlju 3.5, a rezultati ovog određivanja prikazani su u tabeli 4.2.5.

Tabela 4.2.5. Rezultati dobijeni spektrofotometrijskim određivanjem sadržaja hesperidina u soku od pomorandže

Vrsta soka	Sadržaj hesperidina, g dm^{-3}	SD
Life (Nectar)	0,308	0,0042
Happy day	0,350	0,0050
Next (100%)	0,317	0,0046
Pago	0,573	0,0067
Bravo	0,477	0,0042

n=5

Sadržaj hesperidina u soku od pomorandže, određen je prema posebnim *Zahtevima koji definišu kvalitet citrusnih sokova* (od limuna, pomorandže, grejpfruta), a koji su dati u dokumentu *Code of Practice for evaluation of quality and authenticity of fruit and vegetable juices*, od strane AIJN - European Fruit Juice Association.¹³² Prema ovom dokumentu, koncentracija hesperidina u citrusnim sokovima treba da se nalazi u koncentracionom opsegu od 250 do 700 mg dm⁻³.

Količina bioaktivnih jedinjenja u voću, uključujući citrusne flavonoide u koje spada i hesperidin, je veličina koja zavisi od mnogo faktora: geografske regije u kojoj je voće proizvedeno, klime, svojstava tla, vrste i sorte voća, sezone (godine u kojoj je korišćeno voće proizvedeno), načina skladištenja, broja sunčanih dana, i drugih uslova.

Dobijene vrednosti sadržaja hesperidina u ispitivanim sokovima od pomorandže, prikazane u Tabeli 4.2.5., nalaze se u okvirima dozvoljenih vrednosti koje propisuje AIJN (European Fruit Juice Association). Imajući u vidu da su za sve vrste sokova koje su bile ispitivane, dobijene vrednosti koje se nalaze ispod 700 mg dm⁻³, potvrđeno je da je poštovana procedura o upotrebi očišćenog ploda za dobijanje soka. S obzirom da ispitivani sokovi nemaju deklarisan sadržaj hesperidina, nije bilo moguće odrediti "Recovery" vrednosti.

Pregledom literature ustanovljeno je da je sadržaj hesperidina u sokovima određivan metodom katodne stripping voltametrije, spektrofotometrijskom metodom i spektrofluorimetrijskom metodom gde su za određivanje analita korišćene manuelne i *flow injection* procedure.

Metoda katodne stripping voltametrije, predložena od strane D. Obendorfa i E. Reicharta,⁹¹ bila je primenjena za određivanje sadržaja hesperidina u tri komercijalne vrste soka. Sadržaj hesperidina u ispitivanim sokovima kretao se od 340,3 do 555,3 mg dm⁻³. Određivanje sadržaja hesperidina bilo je otežano usled pojave značajnog pada intenziteta analitičkog signala (jačine struje koja se meri) u toku vremena nakon pripreme uzorka. Autori smatraju da do ove pojave najverovatnije dolazi usled procesa oksidacije u ispitivanim rastvorima. Oni predlažu da navedenu analitičku proceduru za određivanje treba izvesti što je moguće brže nakon pripreme uzorka, kako bi se izbegao gubitak hesperidina u ispitivanom rastvoru usled procesa oksidacije, i samim tim bi i određivanje sadržaja hesperidina u uzorcima soka bilo tačnije.

Tokom spektrofluorimetrijskog ispitivanja kompleksa aluminijum(III)-hesperidin i pripreme uzoraka za kvantitativnu analizu hesperidina u sokovima od pomorandže, procedurom koju smo predložili, nije primećena zavisnost analitičkog signala (intenziteta fluorescencije kompleksa) od vremena. Na osnovu ove činjenice, kao i činjenice da je predložena priprema uzoraka soka za spektrofluorimetrijsku analizu jednostavnija, može se smatrati da je određivanje sadržaja hesperidina u soku predloženom spektrofluorimetrijskom metodom jednostavnije i pouzdanije.

U odnosu na spektrofotometrijsku metodu za određivanje hesperidina koja je predložena od strane D. Maleševa i saradnika,⁴⁰ i primenjena za određivanje sadržaja hesperidina u komercijalnim sokovima od pomorandže (koncentracioni opseg od $2,50 \times 10^{-5}$ mol dm⁻³ - $1,75 \times 10^{-4}$ mol dm⁻³), spektrofluorimetrijska metoda koju smo razvili ima veću osetljivost, odnosno ovom metodom se mogu uspešno odrediti niže koncentracije hesperidina u rastvorima (koncentracioni opseg od $1,3 \times 10^{-7}$ mol dm⁻³ - $3,0 \times 10^{-6}$ mol dm⁻³).

U poređenju sa metodom za određivanje hesperidina u kori i soku pomorandže koja se zasniva na kompleksiranju hesperidina i aluminijum(III)-jona u micelarnom medijumu-SDS, koju predlažu T. Perez-Ruiz i autori⁴³ (koncentracioni opseg od 5×10^{-7} do 2×10^{-5} mol dm⁻³ sa granicom detekcije LOD = 79 µg dm⁻³), našom metodom postignuta je nešto veća osetljivost, a granica detekcije LOD, je smanjena oko 3,5 puta.

4.2.8. Spektrofluorimetrijsko određivanje hesperidina u 70 %v/v metanolu u prisustvu SB 12

Reakcija dobijanja stabilnog kompleksa aluminijum(III)-hesperidin sastava 1 : 1, u prisustvu surfaktanta SB 12, upotrebljena je za postavljanje spektrofluorimetrijske metode za određivanje hesperidina metodom kalibracione krive. Dobijeni kalibracioni dijagram predstavlja zavisnost intenziteta fluorescencije formiranog kompleksa u prisustvu SB 12, od koncentracije hesperidina. Aluminijum(III)-jon se nalazi u višku, te se može smatrati da je koncentracija kompleksa proporcionalna koncentraciji hesperidina.

Dobijena linearna zavisnost intenziteta fluorescencije ispitivanog kompleksa od koncentracije hesperidina, predstavljena je regresionom jednačinom:

$$I_F = (4,06 \pm 0,01) c_{Hesp} + (1,27 \pm 0,02) \quad (4.10.)$$

gde I_F predstavlja relativni intenzitet fluorescencije kompleksa u prisustvu SB 12 na pH vrednosti 4,58, izražen u % (meren na $\lambda_{ex} = 390$ nm i $\lambda_{em} = 476$ nm, širine otvora za ekscitacione i emisione snopove iznose 5 nm), a c_{Hesp} je koncentracija hesperidina data u $\mu\text{g cm}^{-3}$. Dobijeni koeficijent korelacije iznosi $r = 0,99999$.

Linearna zavisnost intenziteta fluorescencije kompleksa od koncentracije hesperidina dobijena je u opsegu od 0,06–22,4 $\mu\text{g cm}^{-3}$.

Vrednosti granice detekcije, LOD i granice kvantifikacije LOQ , su izračunate prema jednačinama (3.12.) i (3.13.) koje su date u poglavlju 3.4. Granica detekcije je iznosila $LOD = 0,016 \mu\text{g cm}^{-3}$, a granica kvantifikacije $LOQ = 0,049 \mu\text{g cm}^{-3}$.

Tačnost i preciznost metode su proverene na četiri različite koncentracije hesperidina (Tabela 4.2.6.).

Tabela 4.2.6. Rezultati dobijeni spektrofluorimetrijskim određivanjem hesperidina u 70% v/v metanolu u prisustvu SB 12

Odmereno ($\mu\text{g cm}^{-3}$)	Nađeno ($\mu\text{g cm}^{-3}$)	"Recovery" (%)	SD	KV (%)
0,305	0,303	99,3	$2,45 \cdot 10^{-3}$	0,81
0,611	0,609	99,7	$1,71 \cdot 10^{-3}$	0,28
1,222	1,218	99,7	$2,92 \cdot 10^{-3}$	0,24
6,110	6,085	99,6	$7,8 \cdot 10^{-3}$	0,13

n=5

Tačnost i reproduktivnost metode je veoma dobra, na šta ukazuju vrlo visoke "recovery" vrednosti (od 99,3 do 99,7 %) i niske vrednosti standardne devijacije.

4.2.8.1. Spektrofluorimetrijsko određivanje sadržaja hesperidina u farmaceutskim preparatima

Koncentracija hesperidina određivana je u dva farmaceutska oblika: *Helopyrin tabletama*, proizvođača Rosh & Handel, (Beč, Austrija) (jedna tableta sadrži: vitamin C 120 mg, bioflavonoide 20 mg, rutin 15 mg, ekscipiente: mikrokristalna celuloza, metilhidroksipropil celuloza, magnezijum(II)- stearat, skrob) i u *Vitamin C 1500 tabletama sa bioflavonoidima* (sa rutinom i hesperidinom) proizvođača American Nutrition Products, (sadržaj vitamina C u jednoj tableti iznosi 1500 mg, a proizvođač u deklaraciji preparata ne navodi sadržaj bioflavonoida- rutina i hesperidina) . Uzorci za određivanje hesperidina u tabletama pripremljeni su prema proceduri opisanoj u poglavlju 3, a rezultati ovog određivanja prikazani su u tabeli 4.2.7.

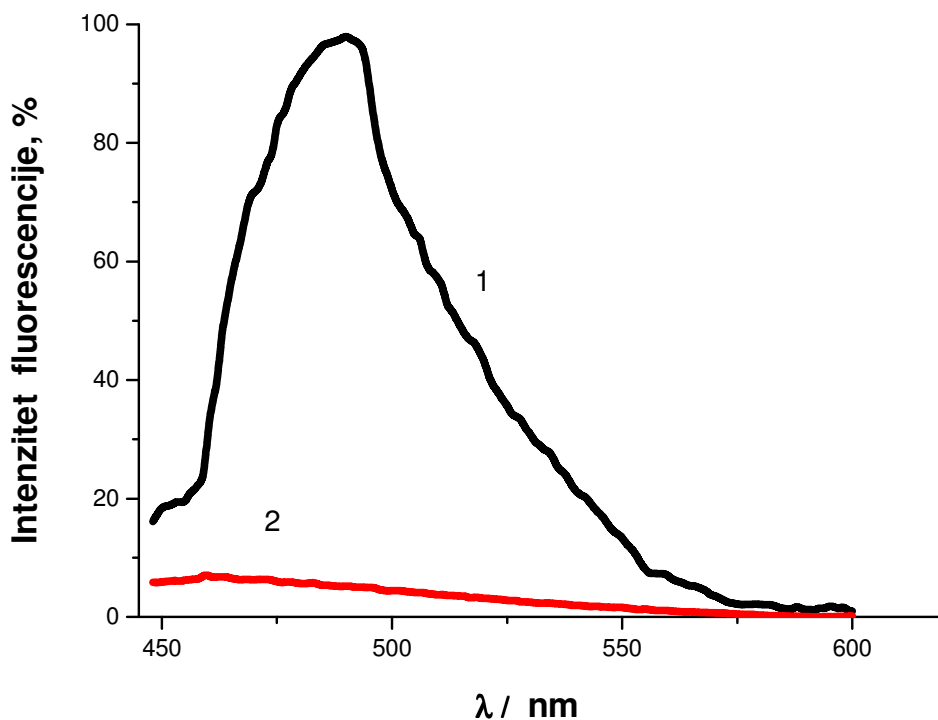
Tabela 4.2.7. Rezultati spektrofluorimetrijskog određivanja sadržaja hesperidina u farmaceutskim preparatima

	Odreden sadržaj hesperidina, mg	„Recovery“ (%)	SD (%)	KV (%)
<i>Helopyrin</i> tabl. sadržaj bioflavonoida deklarisan na 20 mg	18,06	90,3	0,12	0,66
<i>Vitamin C</i> , tabl. sadržaj hesperidina i rutina nije deklarisan	117,38		0,81	0,69

n=5

Da bi predložena spektrofluorimetrijska metoda mogla biti uspešno primenjena za određivanje sadržaja hesperidina u fitofarmaceutskom preparatu *Helopyrin tablete*, kod kojih je sadržaj bioflavonoida (od kojih je najzastupljeniji hesperidin) deklarisan na 20 mg, bilo je potrebno utvrditi uticaj prisutnog vitamina C, rutina i ekscipijenata na intenzitet fluorescencije rastvora koji je dobijen od pripremljenog uzorka tableta *Helopyrin* prema proceduri opisanoj u poglavlju 3. U tu svrhu napravljena je smeša koja je sadržavala vitamin C, rutin i navedene ekscipijente u odnosu u kome se oni nalaze u preparatu *Helopyrin tablete*. Ova smeša je tretirana na isti način, odnosno prema predloženoj proceduri za analizu hesperidina u preparatu *Helopyrin tablete*. Izmeren je

emisioni spektar dobijenog rastvora koji je sadržavao ekscipijente i vitamin C. Uslovi u kojima je snimljen ovaj spektar bili su $\lambda_{ex}= 390$ nm i $\lambda_{em} = 476$ nm, širine otvora za ekscitacione i emisione snopove iznosile su 5 nm. Emisioni spektar je prikazan na slici 4.2.8.



Slika 4.2.8. Emisioni spektar aluminijum(III)–hesperidin kompleksa u preparatu *Helopyrin tablete* (1) i smeše ekscipijenata (2).

Iz emisionog spektra rastvora koji je pripremljen u 70 %v/v metanolu i koji je sadržavao ekscipijente, rutin i vitamin C, prikazanog krivom 1 na slici 4.2.8., uočava se da ekscipijenti ne pokazuju interferenciju pri određivanju hesperidina. U okviru izabranih eksperimentalnih uslova, utvrđeno je da kompleksi koje aluminijum(III)-jon formira sa rutinom i drugim citrusnim flavonoidima takođe, ne dovode do interferencija, pa se predložena spektrofluorimetrijska metoda može uspešno koristiti za određivanje hesperidina u preparatu *Helopyrin tablete*.

Sadržaj hesperidina u *Helopyrin tabletama* određen predloženom spektrofluorimetrijskom metodom je u dobroj saglasnosti sa rezultatima određivanja

sadržaja hesperidina u istom preparatu metodom adsorptivne katodne voltametije predložene od strane autora D. Obendorfa i E. Reicharta.⁴³

Predložena spektrofluorimetrijska metoda za određivanje hesperidina u prisustvu SB 12, u poređenju sa metodama za određivanje hesperidina koje su navedene u pregledu literature (u poglavlju 2), pokazuje veću osetljivost, preciznost, nižu granicu detekcije, LOD u odnosu na metode za koje je vrednost LOD navedena. Takođe, priprema uzoraka za spektrofluorimetrijsku analizu je, u odnosu na većinu navedenih metoda, jednostavnija.

4.2.9. Spektrofluorimetrijsko određivanje hesperidina u uzorcima humane plazme u prisustvu SB 12

Hesperidin je, takođe, određivan spektrofluorimetrijski u uzorcima humane plazme metodom kalibracione krive koja predstavlja zavisnost intenziteta fluorescencije kompleksa aluminijum(III)-hesperidin od koncentracije hesperidina u prisustvu SB 12. Koncentracija aluminijum(III)-jona je u višku, pa se može smatrati da je koncentracija kompleksa proporcionalna koncentraciji hesperidina.

Dobijena je linearna zavisnost intenziteta fluorescencije ispitivanog kompleksa od koncentracije hesperidina u rastvorima humane plazme, koja se može predstaviti regresionom jednačinom:

$$I_F = (4,12 \pm 0,02) c_{Hesp} + (2,13 \pm 0,04) \quad (4.11.)$$

gde I_F predstavlja relativni intenzitet fluorescencije kompleksa u prisustvu SB 12 na pH vrednosti 4,58, izražen u % (meren na $\lambda_{ex} = 390$ nm i $\lambda_{em} = 476$ nm, širine otvora za ekscitacione i emisione snopove iznose 5 nm), a c_{Hesp} je koncentracija hesperidina data u $\mu\text{g cm}^{-3}$. Dobijeni koeficijent korelacije iznosi $r = 0,99998$.

Linearna zavisnost intenziteta fluorescencije kompleksa od koncentracije hesperidina u uzorcima humane plazme dobijena je u opsegu od 0,1 – 12,2 $\mu\text{g cm}^{-3}$.

Vrednosti granice detekcije, LOD i granice kvantifikacije LOQ , su izračunate prema jednačinama (3.12.) i (3.13.) koje su date u poglavlju 3.4. Granica detekcije je iznosila $LOD = 0,032 \mu\text{g cm}^{-3}$, a granica kvantifikacije $LOQ = 0,096 \mu\text{g cm}^{-3}$.

Tačnost i preciznost metode su proverene na tri različite koncentracije hesperidina (predstavljena u Tabeli 4.2.8.).

Tabela 4.2.8. Rezultati spektrofluorimetrijskog određivanja hesperidina u uzorcima humane plazme u prisustvu SB 12

Dodato ($\mu\text{g cm}^{-3}$)	Nađeno ($\mu\text{g cm}^{-3}$)	„Recovery“ (%)	SD	KV (%)
0,122	0,120	98,4	$1,08 \times 10^{-3}$	0,86
0,611	0,610	99,8	$1,22 \times 10^{-3}$	0,20
6,110	6,091	99,7	$1,3 \times 10^{-3}$	0,21

n=5

Visoke "recovery" vrednosti (od 98,3 do 99,8 %) i niske vrednosti standardne devijacije, pokazuju veliku tačnost i reproduktivnost metode.

4.2.10 Uticaj surfaktanta SB 12 na spektrofluorimetrijsko određivanje hesperidina u 70 %v/v metanolu

Poređenjem analitičkih parametara za spektrofluorimetrijsko određivanje hesperidina u prisustvu surfaktanta SB 12 i analitičkih parametara za određivanje hesperidina bez surfaktanta, uočava se da se spektrofluorimetrijskim određivanjem hesperidina u prisustvu SB 12 postiže veća osetljivost i preciznost određivanja, koja je i neophodna za njegovo određivanje u biološkim tečnostima i doziranim oblicima. Međutim, imajući u vidu očekivani opseg koncentracija hesperidina u voćnim sokovima, jasno je da dobijene vrednosti sadržaja hesperidina, predloženom procedurom za njegovo spektrofluorimetrijsko određivanje bez prisustva surfaktanta SB 12, pokazuju zadovoljavajuću tačnost. Predložena procedura za pripremu uzoraka bez prisustva surfaktanta SB 12, za spektrofluorimetrijsko određivanje sadržaja hesperidina, može se uspešno primeniti za analizu uzoraka koji imaju povećan sadržaj hesperidina kao što su na primer voćni sokovi citrusa (pomorandže, limuna, grejpfruta).

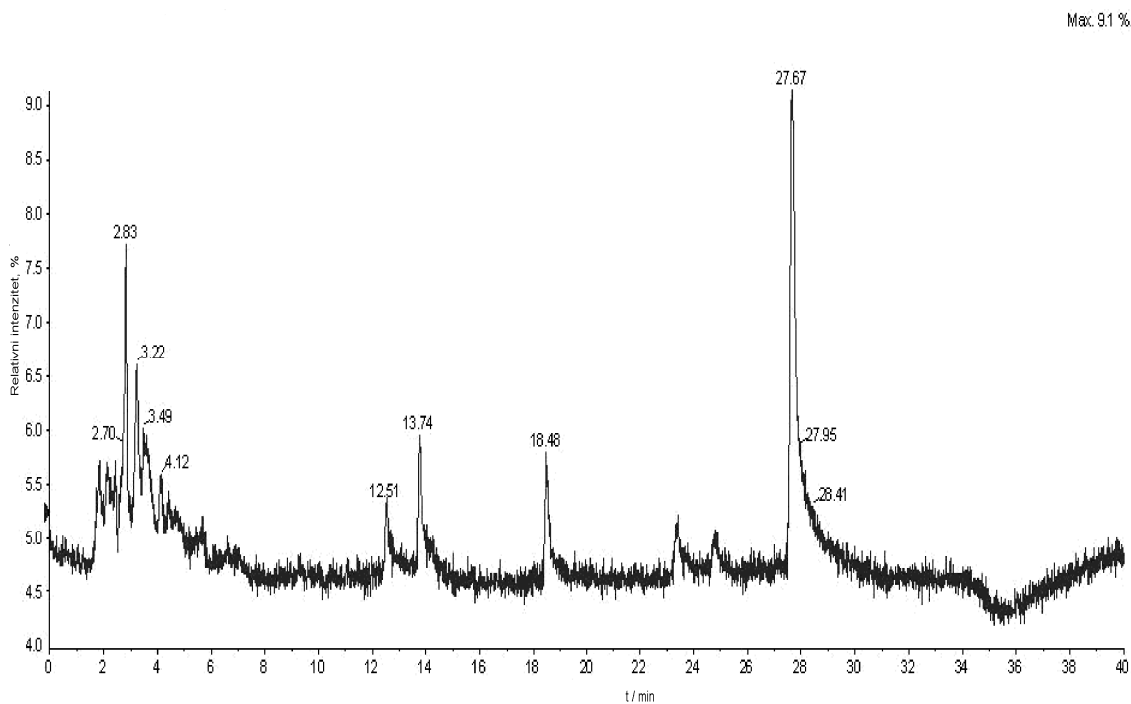
U Tabeli 4.2.9. je prikazano kako prisustvo surfaktanta SB 12 u ispitivanim rastvorima utiče na analitičke parametre za spektrofluorimetrijsko određivanje hesperidina.

Tabela 4.2.9. Uticaj surfaktanta SB 12 na analitičke parametre za spektrofluorimetrijsko određivanje hesperidina

	U prisustvu SB 12	Bez SB 12
Talasna dužina ekscitacije	390 nm	390 nm
Talasna dužina emisije	476 nm	490 nm
Regresiona jednačina	$I_F=(4,06\pm 0,01)c + (1,27\pm 0,02)$	$I_F=(3,13\pm 0,05)c + (0,06\pm 0,02)$
Linearni opseg	0,06 – 24,4 $\mu\text{g cm}^{-3}$	0,08 – 18,0 $\mu\text{g cm}^{-3}$
LOD	0,016 $\mu\text{g cm}^{-3}$	0,023 $\mu\text{g cm}^{-3}$
LOQ	0,049 $\mu\text{g cm}^{-3}$	0,070 $\mu\text{g cm}^{-3}$
„Recovery“	99,3 – 99,7 %	97,8-99,8 %
KV	0,13-0,81%	0,23-1,31%

4.2.11. HPLC određivanje hesperidina u farmaceutskim preparatima

Sadržaj hesperidina u fitopreparatu *Helopyrin tablete*, proizvođača Rosh & Handel, (Beč, Austrija), određivan je i RP-HPLC metodom sa UV-Vis detekcijom. Uzorci tableta za RP-HPLC analizu pripremljeni su na isti način kako to propisuje procedura za pripremu uzoraka tableta za spektrofluorimetrijsko određivanje hesperidina, tako da u ovom slučaju nije korišćena nijedna ekstrakciona procedura. Različiti alikvoti ovako pripremljenog rastvora tableta analizirani su u HPLC sistemu sa Gemini kolonom, gradijentnim eluiranjem i UV detektorom. Hromatogram dobijen analizom fitopreparata *Helopyrin tableta*, prikazan je na slici 4.2.9. Pik hesperidina na ovom hromatogramu se pojavljuje na vrednosti retencionog vremena od 13,74 minuta (ova vrednost retencionog vremena za hesperidin potvrđena je hromatogramom standardne supstance- hesperidina i proverom UV i masenih spektara odgovarajućeg pika).



Slika 4.2.9. Hromatogram dobijen analizom fitopreparata *Helopyrin tableta*; pik hesperidina dobijen na retencionom vremenu $t_r = 13,74$ min

Regresiona jednačina kalibracione prave za RP-HPLC određivanje hesperidina ima oblik:

$$A = (4,83 \pm 0,05) \cdot 10^4 c_{Hesp} + (2,1 \pm 0,2) \cdot 10^3 \quad (N = 10, r^2 = 0,9998) \quad (4.12.)$$

Gde A predstavlja površinu pika i c_{Hesp} je koncentracija uzorka data $\mu\text{g cm}^{-3}$. Linearnost je postignuta u koncentracionom opsegu hesperidina od 0,05–10,0 $\mu\text{g cm}^{-3}$. Vrednost granice detekcije, LOD, računata iz parametara kalibracione prave, iznosi 0,01 $\mu\text{g cm}^{-3}$, a vrednost granice kvantifikacije, LOQ, iznosi 0,03 $\mu\text{g cm}^{-3}$.

Sadržaj hesperidina određivan je u fitopreparatu *Helopyrin tablete*, proizvođača Rosh & Handel, (Beč, Austrija) i u preparatu *Vitamin C 1500 tablete sa bioflavonoidima* (sa rutinom i hesperidinom) proizvođača American Nutrition Products. Rezultati dobijeni RP-HPLC analizom *Helopyrin tableta* i *Vitamin C 1500 tableta sa bioflavonoidima* prikazani su u tabelama 4.2.10. i 4.2.11. respektivno.

Tabela 4.2.10. Rezultati određivanja sadržaja hesperidina u *Helopyrin tabletama* HPLC/UV metodom

Dodato ($\mu\text{g cm}^{-3}$)	Nađeno ($\mu\text{g cm}^{-3}$)	„Recovery“, %	SD	KV(%)
1,5	1,26	84,00	0,25	0,17
3,0	2,84	94,66	0,36	0,12
6,0	5,75	95,83	0,39	0,07

n=5

Tabela 4.2.11. Rezultati određivanja sadržaja hesperidina u *Vitamin C 1500 tabletama sa bioflavonoidima* HPLC/UV metodom

Dodato ($\mu\text{g cm}^{-3}$)	Nađeno ($\mu\text{g cm}^{-3}$)	„Recovery“, %	SD (%)	KV (%)
0,1	0,075	75,00	0,3	8,3
0,2	0,176	88,00	0,7	3,65
0,3	0,286	95,33	0,2	0,76

n=5

Niže "recovery" vrednosti dobijene za određivanje hesperidina u *Vitamin C 1500 tabletama sa bioflavonoidima*, mogu se objasniti apsorpcijom drugih supstancija koje se nalaze u ovim tabletama, na istoj talasnoj dužini na kojoj i sam hesperidin apsorbuje. Ove komponente i njihov uticaj nisu mogli biti uklonjeni SPE ekstrakcijom.

4.2.12. LC-MS/MS određivanje sadržaja hesperidina u uzorcima humane plazme

Sadržaj hesperidina u uzorcima humane plazme određivan je LC-MS/MS metodom. U dobijenim masenim spektrima uočeno je šest signala (pikova) različitog intenziteta što je prikazano u tabeli 4.2.12.

Tabela 4.2.12. Maseni spektar hesperidina

m/z	Zastupljenost, %
609/343	31
609/325	72
609/301	100
609/265	16
609/253	12
609/174	24
609/151	32

Praćene su promene intenziteta pika na vrednosti m/z : 609→325. Dobijena kalibraciona kriva predstavljena je jednačinom:

$$A = (4,83 \pm 0,02) \cdot 10^4 c_{Hesp} + (1,75 \pm 0,09) \cdot 10^3 \quad (N = 10, r^2 = 0,9998) \quad (4.13.)$$

Gde A predstavlja površinu pika i c_{Hesp} je koncentracija analita data u $\mu\text{g cm}^{-3}$. Linearnost je postignuta u koncentracionom opsegu hesperidina od 0,02–10,0 $\mu\text{g cm}^{-3}$. Vrednost granice detekcije, LOD , računata je iz sedam ponovljenih merenja u koncentracionom opsegu od 0,002–0,05 $\mu\text{g cm}^{-3}$, u odnosu na metanol kao slepu probu. Dobijena je vrednost granice detekcije, LOD od 5 ng cm^{-3} , a vrednost granice kvantifikacije, LOQ , iznosila je 15 ng cm^{-3} .

Tačnost i preciznost metode suproverene na četiri različite koncentracije hesperidina. Rezultati analize hesperidina u uzorcima humane plazme prikazani su u tabeli 4.2.13.

Tabela 4.2.13. Rezultati određivanja hesperidina u uzorcima humane plazme LC-MS/MS metodom

Dodato ($\mu\text{g cm}^{-3}$)	Nađeno ($\mu\text{g cm}^{-3}$)	„Recovery“, %	SD	KV(%)
0,5	0,497	99,4	0,006	1,21
1,0	1,02	102,0	0,06	5,88
2,5	2,48	99,2	0,05	2,02
5,0	5,19	102,0	0,03	0,58

n=5

Dobijene su veoma visoke "recovery" vrednosti u opsegu od 99,2 do 102,0 %, i niske vrednosti standardne devijacije, što ukazuje da je tačnost i reproduktivnost metode je veoma dobra, i da se metoda može uspešno primeniti za određivanje hesperidina u biološkim tečnostima kao što su humani serum i humana plazma.

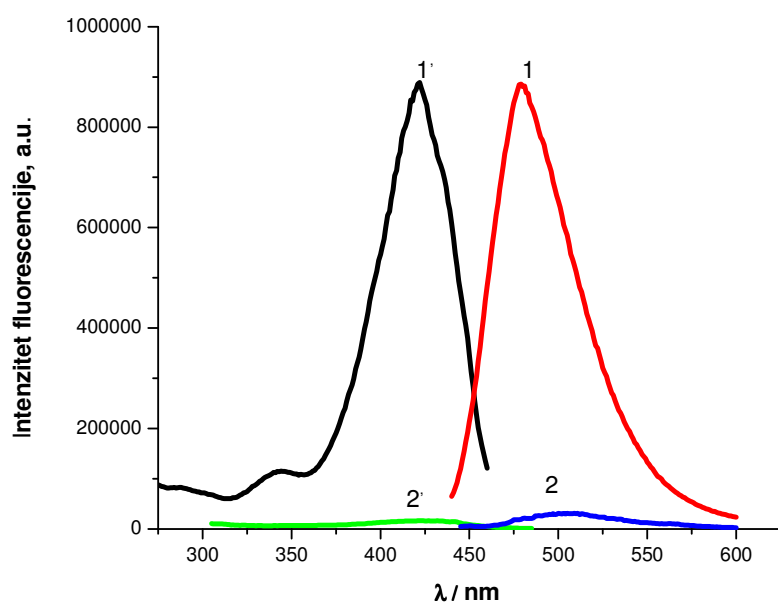
Dobijene veoma visoke "recovery" vrednosti objašnjavaju se činjenicom da je detekcija komponenata analiziranog uzorka LC-MS/MS metodom znatno osetljivija i specifičnija u poređenju sa drugim metodama, tako da je i opseg koncentracija koje se ovom metodom mogu određivati od 10 do 100 puta niži nego u slučaju kada se određivanje vrši HPLC/UV metodom. Ovaj opseg koncentracija je optimalan, zato što se koncentracija hesperidina u uzorcima humane plazme, posle oralne upotrebe tableta koje sadrže hesperidin, upravo nalazi u ovom koncentracionom opsegu.

Predložena spektrofluorimetrijska metoda za određivanje hesperidina u farmaceutskim preparatima i uzorcima humane plazme je jednostavna, tačna, precizna i reproduktivna, i omogućuje direktno i jednostavno određivanje hesperidina bez njegove ekstrakcije iz uzorka. Određivanje hesperidina u doziranim oblicima je uspešno, pod uslovom da analizirani preparati ne sadrže flavonoide koji bi kompleksiranjem sa aluminijum(III)-jonom dali specifičnu fluorescenciju na $\lambda_{ex} = 390$ nm i $\lambda_{em} = 476$ nm u prisustvu SB 12. Spektrofluorimetrijsko određivanje hesperidina u uzorcima humane plazme, nakon kompleksiranja sa aluminijum(III)-jonom, pokazuje visoku preciznost i tačnost, pa se metoda može primeniti za rutinsku analizu hesperidina u kliničkim laboratorijama. Takođe, spektrofluorimetrijska metoda je jednostavnija i brža u odnosu na LC-MS/MS metodu.

4.3. Kompleks aluminijum(III)- kvercetin

4.3.1. *Ekscitaciono-emisioni spektri kompleksa aluminijum(III)-kvercetin*

Aluminijum(III)-jon i kvercetin formiraju kompleks u 70 %v/v metanolu intenzivne žuto-narandžaste boje, koji je stabilan u *pH* oblasti 2,0–5,5. Na slici 4.3.1. prikazani su ekscitacioni spektri metanolnih rastvora aluminijum(III)–kvercetin kompleksa (kriva 1'), kvercetina (kriva 2') i emisioni spektri aluminijum(III)–kvercetin kompleksa (kriva 1) i kvercetina (kriva 2). Ekscitacioni maksimum kompleksa nalazi se na $\lambda_{\text{ex}} = 420$ nm, a emisioni maksimum na $\lambda_{\text{em}} = 480$ nm. Fluorescencija rastvora kvercetina ($c = 2,0 \times 10^{-7}$ mol dm⁻³) koji pokazuje slabu fluorescenciju na $\lambda_{\text{em}} = 500$ nm, intenzivno raste postepenim dodavanjem rastvora aluminijum(III)- nitrata. To je očekivano, s obzirom da dolazi do formiranja kompleksa aluminijum(III)–kvercetin, koji pokazuje intenzivnu fluorescenciju na $\lambda_{\text{em}} = 480$ nm.



Slika 4.3.1. Ekscitaciono-emisioni spektri kompleksa aluminijum(III)-kvercetin (1, 1') i kvercetina (2, 2')

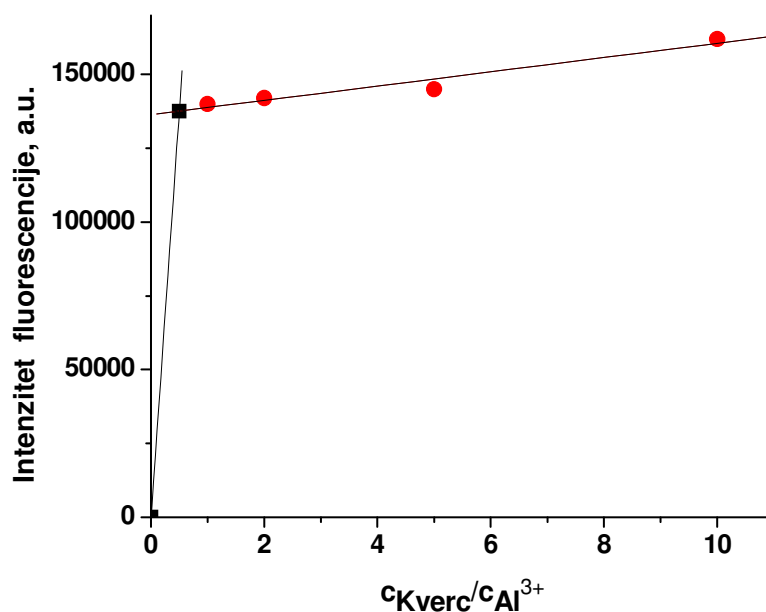
Formirani kompleks aluminijum(III)–kvercetin pokazuje značajnu fluorescenciju na $\lambda_{em} = 480$ nm. Emisioni maksimum ovog kompleksa hipsokromno je pomeren za 20 nm u odnosu na emisioni maksimum čistog kvercetina.

4.3.2. *Određivanje sastava kompleksa aluminijum(III)-kvercetin*

Aluminijum(III)-jon i kvercetin reakcijom kompleksiranja grade kompleks sastava *Aluminijum(III): kvercetin =2:1*.

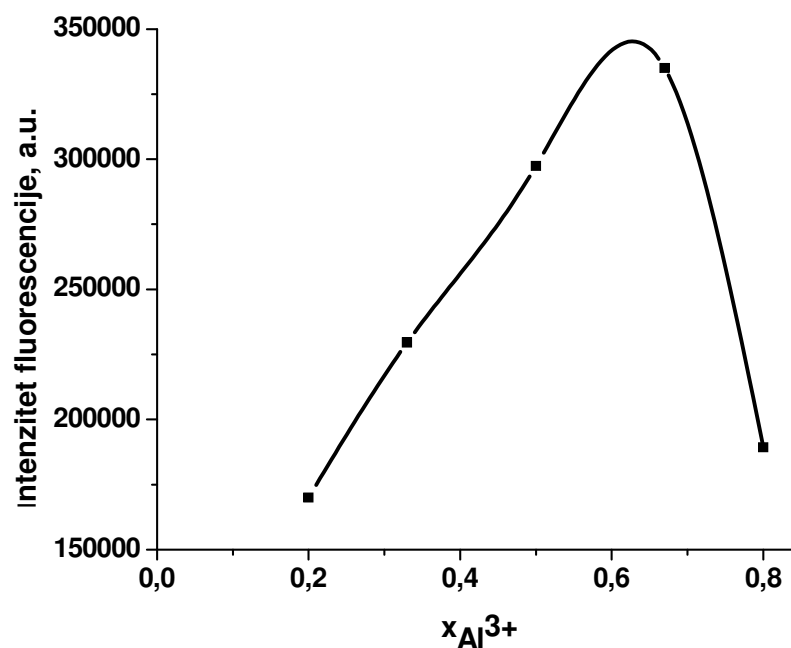
Sastav kompleksa je određen metodom molskih odnosa, merenjem intenziteta fluorescencije rastvora koji sadrže konstantnu koncentraciju aluminijum(III)-nitrata koja je iznosila $1,0 \times 10^{-8}$ mol dm⁻³ i različite koncentracije kvercetina (od $5,0 \times 10^{-9}$ do $2,0 \times 10^{-7}$ mol dm⁻³). Merenja su izvršena na $\lambda_{ex} = 420$ nm i $\lambda_{em} = 480$ nm u acetatnom puferu pripremljenom u 70 %v/v metanolu, kome je vrednost iznosila $pH = 3,30$. Širine otvora za ekscitacione i emisione snopove podešene su na 5 nm. Predstavljanjem intenziteta fluorescencije ispitivanih rastvora u funkciji odnosa koncentracija kvercetina i aluminijum(III)-jona dobija se eksponencijalna zavisnost. Presek tangenti na pravolinijske delove krive javlja se na vrednosti $c_{Kverc} / c_{Al} = 0,5$, što pokazuje da nastaje kompleks sastava Al(III): kvercetin =2:1. Kao slepa proba korišćen je $1,0 \times 10^{-8}$ mol dm⁻³ rastvor aluminijum(III)-nitrata u acetatnom puferu $pH = 3,30$ u 70% v/v metanolu.

Dijagram zavisnosti intenziteta fluorescencije kompleksa aluminijum(III)-kvercetin od odnosa koncentracija kvercetina i aluminijum(III)-jona prikazan je na slici 4.3.2.



Slika 4.3.2. Metoda molarnih odnosa. Zavisnost intenziteta fluorescencije kompleksa aluminijum(III)-kvercetin od odnosa koncentracija kvercetina i aluminijum(III)-jona, $c_{Kverc} / c_{Al^{3+}}$. ($\lambda_{ex} = 420$ nm i $\lambda_{em} = 480$ nm, širine otvora za ekscitacione i emisione snopove su bile 5 nm)

Metodom varijacija ekvimolarnih rastvora takođe je određen sastav ovog kompleksa. Izmereni su intenziteti fluorescencije serije rastvora, koja je dobijena mešanjem ekvimolarnih rastvora aluminijum(III)-nitrata i kvercetina, čije su koncentracije iznosile $1,0 \times 10^{-6}$ mol dm^{-3} . Sva merenja su izvršena na $\lambda_{ex} = 420$ nm i $\lambda_{em} = 480$ nm u metanolnom acetatnom puferu $pH = 3,30$. Slepa proba za svaki rastvor ove serije bila je različita, i sadržavala je ekvimolarnu koncentraciju aluminijum(III)-nitrata. Molski udeo aluminijum(III)-jona iznosio je od 0,2 do 0,8; koncentracija aluminijum(III)-jona se nalazila u opsegu od $2,0 \times 10^{-7}$ mol dm^{-3} do $8,0 \times 10^{-7}$ mol dm^{-3} . Zavisnost intenziteta fluorescencije rastvora od molskog udela aluminijum(III)-jona predstavljena je krivom prikazanom na slici 4.3.3. Prikazana kriva ima maksimum na $x_{Al} = 0,67$, što potvrđuje sastav kompleksa Al(III): kvercetin = 2:1

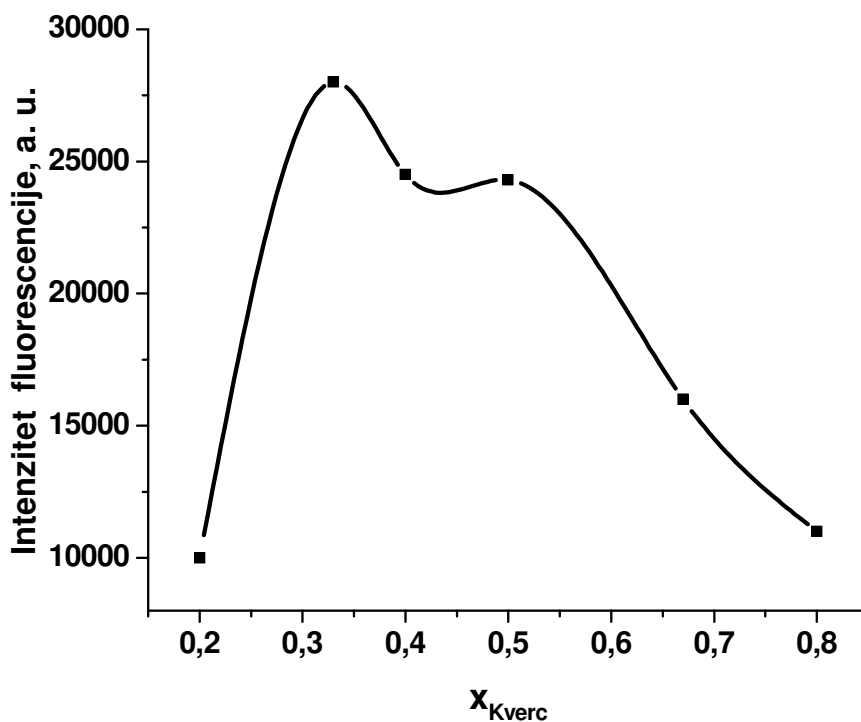


4.3.3. Metoda varijacija ekvimolarnih rastvora. Zavisnost intenziteta fluorescencije kompleksa aluminijum(III)-kvercetin od molske frakcije aluminijum(III)-jona, $x_{Al^{3+}}$ na $pH = 3,30$. ($\lambda_{ex} = 420$ nm i $\lambda_{em} = 480$ nm širine otvora za ekscitacione i emisione snopove su bile 5 nm)

Sastav kompleksa aluminijum(III)-kvercetin određivan je metodom molarnih odnosa i metodom varijacija ekvimolarnih rastvora. Obe metode su potvrdile da na pH vrednosti $pH = 3,30$ nastaje samo jedna kompleksna vrsta sastava Al_2Querc^{4+} .

Sastav ovog kompleksa je određivan i na višim pH vrednostima (4,00; 4,50) i na obe pH vrednosti pored kompleksne vrste Al_2Querc^{4+} nastajala je i izvesna količina kompleksa sastava aluminijum(III): kvercetin = 1:1. Određivanje sastava kompleksa metodom varijacija ekvimolarnih rastvora (Žobova metoda) na vrednosti $pH = 4,50$ prikazano je na slici 4.3.4. Izmereni su intenziteti fluorescencije serije rastvora, koja je dobijena mešanjem ekvimolarnih rastvora aluminijum(III)-nitrata i kvercetina, čije su koncentracije iznosile $1,0 \times 10^{-6}$ mol dm^{-3} . Sva merenja su izvršena na $\lambda_{ex} = 420$ nm i $\lambda_{em} = 480$ nm u acetatnom puferu koji je pripremljen u 70 v/v% metanolu, na $pH = 4,50$. Slepa proba za svaki rastvor ove serije bila je različita, i sadržavala je ekvimolarnu

koncentraciju aluminijum(III)-nitrata. Molski udeo aluminijum(III)-jona iznosio je od 0,2 do 0,8; koncentracija aluminijum(III)-jona se nalazila u opsegu od $2,0 \times 10^{-7}$ mol dm^{-3} do $8,0 \times 10^{-7}$ mol dm^{-3} .



4.3.4. Metoda varijacija ekvimolarnih rastvora. Zavisnost intenziteta fluorescencije kompleksa aluminijum(III)-kvercetin od molske frakcije kvercetina, x_{Kverc} na pH vrednosti 4,50. ($\lambda_{ex} = 420$ nm i $\lambda_{em} = 480$ nm, širine otvora za ekscitacione i emisione snopove iznosile su 5 nm)

Nastajanje kompleksne vrste $AlKverc^{2+}$ je očekivano, jer porastom pH , dolazi do disocijacije kvercetina. Kako kvercetin u reakciji kompleksiranja učestvuje u anjonskom obliku, raste verovatnoća da će pored kompleksne vrste Al_2Kverc^{4+} , doći i do građenja kompleksa sastava $AlKverc^{2+}$.

Prema podacima dostupnim iz literature, uočava se da u reakciji kompleksiranja aluminijum(III)-jona i kvercetina nastaju kompleksne čestice različitog stehiometrijskog sastava.

A. Gutierrez i M. Gehlen,³³ su utvrdili metodom molarnih odnosa, da u reakciji kompleksiranja kvercetina sa aluminijum(III)-jonom nastaju tri kompleksne vrste: u metanolu nastaju kompleksi sastava $\text{Al}_2\text{Kverc}_3^{3+}$, $\text{Al}_2\text{Kverc}^{4+}$ i AlKverc^{2+} a u metanolu kome je dodata nitratna kiselina nastaje kompleks aluminijum(III) : kvercetin = 1 : 1.

Ovaj kompleks je ispitivan spektrofotometrijski u rastvorima metanol-voda sa i bez prisustva surfaktanata. Podaci koji su dobijeni ukazuju da u rastvoru metanol-voda nastaje kompleks aluminijum(III): kvercetin = 2:1, a u rastvorima metanol-voda u koji je dodata 0,1 mol dm^{-3} nitratna kiselina, nastaje kompleks sastava 1:1.³³ Takođe je potvrđeno nastajanje ove dve kompleksne vrste u prisustvu koloidne silikatne matrice.⁵²

Spektroskopska studija ovog sistema iz 2002. godine,⁵³ takođe potvrđuje prisustvo dve kompleksne vrste u 90 % v/v metanolu: Al_2Kverc i AlKverc_2 u rastvoru metanol-voda, a uz dodatak 0,01 mol dm^{-3} hloridne kiseline, formira se kompleksna vrsta AlKverc , dok su u alkalnoj sredini prisutne sve tri kompleksne vrste.

Septum i grupa autora¹³⁸ su utvrdili metodom molarnih odnosa da u vodenim rastvorima, bez podešavanja pH , nastaje kompleksna vrsta AlKverc , a u acetatnom puferu na pH vrednosti $pH = 4,50$, u vodenoj sredini, nastaje takođe kompleks sastava AlKverc .

E.A. Saad i autori¹⁴³ su pokazali da aluminijum(III)-jon i kvercetin u prisustvu površinski aktivne materije PVPa (polivinilpirolidon) nastaje kompleks sastava aluminijum(III): kvercetin = 1:3.

Na osnovu iznetih činjenica do kojih smo došli pregledom literature, može se zaključiti da u reakciji kompleksiranja aluminijum(III)-jona i kvercetina ne nastaje samo jedna kompleksna vrsta, već da na stehiometrijski sastav značajno utiču osobine sredine u kojoj nastaje kompleks (pH vrednost i vrsta rastvarača).

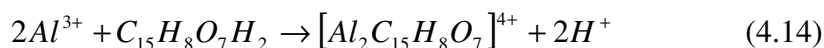
4.3.3. Reakcija formiranja kompleksa

Izvršena su merenja pH ekvimolarnih rastvora kvercetina i aluminijum(III)-nitrata u 70% v/v metanolu, a zatim je meren i pH rastvora koji je sadržavao aluminijum(III)-jon i kvercetin u koncentraciji koja je bila ista kao i njihova koncentracija u posebnim rastvorima. Rezultati su prikazani u Tabeli 4.3.1.

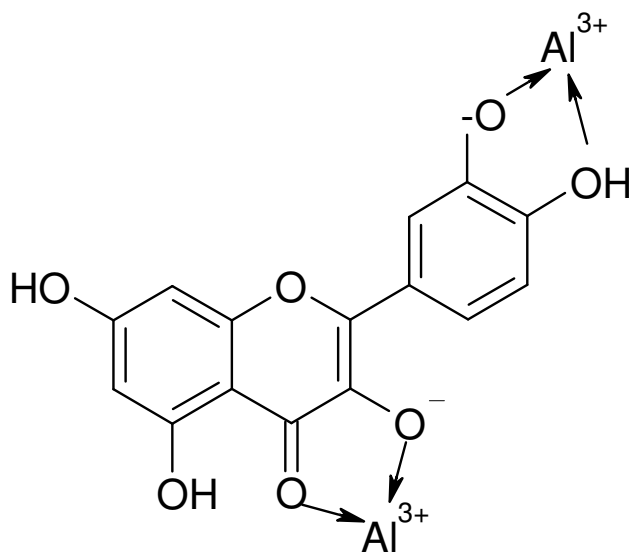
Tabela 4.3.1. Rezultati dobijeni *pH*-metrijskim merenjima ekvimolarnih rastvora kvercetina, aluminijum(III)-nitrata i njihove smeše u 70% v/v metanolu

		Kvercetin, $c = 1 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$	$\text{Al}(\text{NO}_3)_3$, $c = 1 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$	Smeša
<i>pH</i>		8,05	6,72	3,97
c_{H^+}		$8,91 \times 10^{-9} \text{ mol dm}^{-3}$	$1,91 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$	$1,07 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$
Σc_{H^+}	c_{sm}	$2,00 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$		$1,07 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$
$\Delta c_{\text{H}^+} = c_{sm} - \Sigma c_{\text{H}^+}$		$1,070 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$		

Niže vrednosti *pH* smeše pokazuju da se reakcija odvija uz oslobađanje vodonikovih jona, odnosno, da kvercetin učestvuje u reakciji građenja kompleksa u anjonskom obliku. Na višim *pH* vrednostima (*pH* >4,0), smanjuje se koncentracija kompleksne vrste u rastvoru, što može biti posledica hidrolize kompleksa. Reakcija formiranja kompleksa kvercetina i aluminijum(III)-jona može se prikazati na sledeći način:



Predpostavlja se da nastaje kompleks koji ima stukturu prikazanu Shemom 4:



Schema 4: Predpostavljena struktura kompleksa aluminijum(III)-kvercetin

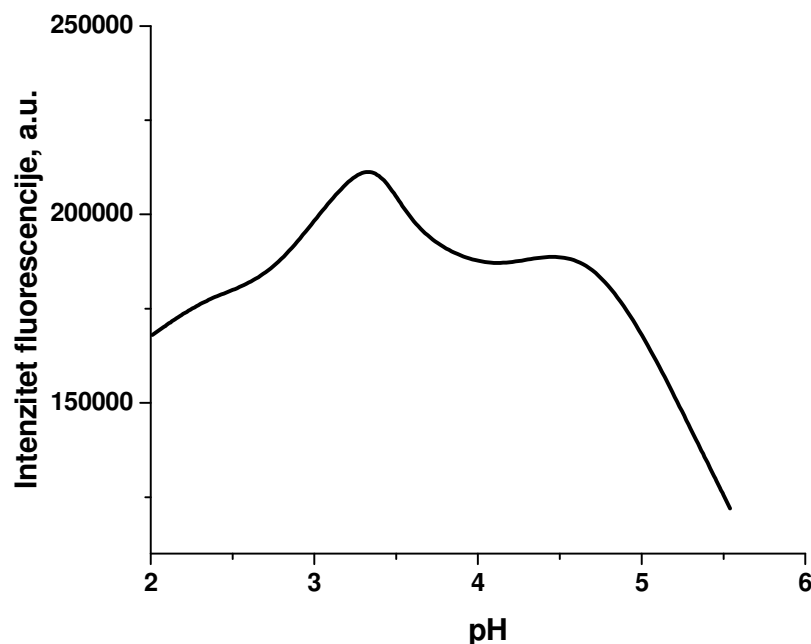
Porast intenziteta fluorescencije nakon heliranja kvercetina sa aluminijum(III)-jonom, slično kao i kod formiranja kompleksa aluminijum(III)-morin, pripisuje se povezanosti dva važna efekta:

- (a) inhibiciji ekscitovanog stanja intramolekularnog transfera protona između C3-hidroksilne i C4-karbonilne grupe na A i C prstenu, i
- (b) opadanju sposobnosti formiranja vodoničnih veza molekula morina sa molekulima rastvarača usled kompleksiranja.

U ispitivanom kompleksu aluminijum(III)-kvercetin dolazi do intenzivne emisije koja je posledica $\pi^* \rightarrow \pi$ singletnog prelaza. Emisija formiranog kompleksa je značajno veća u odnosu na slabu emisiju čistog kvercetina. Intenzitet fluorescencije ispitivanog kompleksa veoma zavisi od *pH* sredine zbog inter i intramolekulskog transfera protona. Na to ukazuje i oblik krive zavisnosti intenziteta fluorescencije kompleksa od *pH* sredine, prikazan na slici 4.3.5.

4.3.4. Određivanje koncentracionih konstanti stabilnosti kompleksa aluminijum(III)- kvercetin

Izračunavanje koncentracionih konstanti stabilnosti kompleksa aluminijum(III)-kvercetin izvršeno je prema jednačinama datim u poglavlju 3.3. Za smešu rastvora aluminijum(III)-nitrata i kvercetina izmereni su intenziteti fluorescencije na različitim vrednostima *pH* (eksperimentalni uslovi: $\lambda_{ex} = 420$ nm i $\lambda_{em} = 480$ nm, širine otvora za ekscitacione i emisione snopove su bile 5 nm). Zavisnost intenziteta fluorescencije od *pH* vrednosti smeše predstavljena je na slici 4.3.5. Koncentracija aluminijum(III)-nitrata u smeši bila je $1,0 \times 10^{-8}$ mol dm⁻³, a koncentracija kvercetina je iznosila $2,0 \times 10^{-7}$ mol dm⁻³. Slepa proba je bio rastvor kvercetina u acetatnom puferu koji je pripremljen u 70 v/v% metanolu, odgovarajuće *pH* vrednosti, i čija je koncentracija bila kao u ispitivanoj smeši ($2,0 \times 10^{-7}$ mol dm⁻³).



Slika 4.3.5. Zavisnost intenziteta fluorescencije kompleksa aluminijum(III)-kvercetin od pH vrednosti. ($\lambda_{ex} = 420$ nm i $\lambda_{em} = 480$ nm; širine otvora za ekscitacione i emisione snopove su bile 5 nm)

Iz maksimalne vrednosti intenziteta fluorescencije, očitane sa krive $I_F = f(pH)$ (slika 4.3.5.), koja se nalazi na pH vrednosti 3,33, izračunata je prema jednačini (3.4.) konstanta k koja iznosi $k = 4,24 \times 10^{13}$.

Iz podataka za intenzitete fluorescencije na različitim vrednostima pH , dobijenih sa krive prikazane na slici 4.3.5. i jednačina izvedenih iz reakcije formiranja kompleksa datih u poglavlju 3.4. i konstanti disocijacije kvercetina,¹⁴⁴ $k_{d1} = 3,02 \times 10^{-4}$ i $k_{d2} = 4,37 \times 10^{-10}$ izračunate su opšte koncentracione konstante stabilnosti formiranog kompleksa β :

$$\beta = \frac{[Al_2Kverc^{4+}]}{[Al^{3+}]^2[Kverc^-]} \quad (4.15.)$$

gde su sa $[Al_2Kverc^{4+}]$, $[Al^{3+}]$, $[Kverc^-]$ označene koncentracije kompleksa aluminijum(III)-kvercetin, aluminijum(III)-jona i kvercetina u anjonskom obliku.

Vrednosti koncentracionih konstanti stabilnosti kompleksa β na različitim pH vrednostima, date su u tabeli 4.3.2.

Tabela 4.3.2. Vrednosti opštih koncentracionih konstanti stabilnosti β kompleksa aluminijum(III)-kvercetin

pH	I_F	C_{kompl}	C_{Al}	C_{Kverc}	β	$\log \beta$
3,00	199000	$4,68 \times 10^{-9}$	$6,1 \times 10^{-10}$	$2,58 \times 10^{-17}$	$4,88 \times 10^{26}$	26,69
3,20	209000	$4,93 \times 10^{-9}$	$1,4 \times 10^{-10}$	$4,08 \times 10^{-17}$	$6,16 \times 10^{27}$	27,79
3,50	203000	$4,79 \times 10^{-9}$	$4,2 \times 10^{-10}$	$8,15 \times 10^{-17}$	$3,33 \times 10^{26}$	26,52
3,75	192000	$4,48 \times 10^{-9}$	$9,4 \times 10^{-10}$	$1,45 \times 10^{-16}$	$3,49 \times 10^{25}$	25,54
4,00	187500	$4,42 \times 10^{-9}$	$1,16 \times 10^{-9}$	$2,58 \times 10^{-16}$	$1,27 \times 10^{25}$	25,10
4,50	188700	$4,45 \times 10^{-9}$	$1,10 \times 10^{-9}$	$8,16 \times 10^{-16}$	$4,51 \times 10^{24}$	24,65
4,75	183000	$4,32 \times 10^{-9}$	$1,37 \times 10^{-9}$	$1,45 \times 10^{-15}$	$1,59 \times 10^{24}$	24,20
5,00	168000	$3,96 \times 10^{-9}$	$2,08 \times 10^{-9}$	$2,59 \times 10^{-15}$	$3,54 \times 10^{23}$	23,55

U literaturi nema mnogo podataka za vrednosti opštih koncentracionih konstanti stabilnosti kompleksa aluminijum(III)-kvercetin.

G. Erdogan i grupa autora¹⁴⁵ u svom radu iz 1981. godine, su spektrofotometrijski i potenciometrijski određivali konstante stabilnosti kompleksa aluminijum(III)-kvercetin sastava 1:1, i dobili da vrednost ove konstante iznosi $\log K = 14,05$.

Prema E.A. Saadu i autorima¹⁴³ koji su ispitivali aluminijum(III)-kvercetin kompleks sastava $AlKverc_3$, u prisustvu površinski aktivne materije PVPa, konstanta stabilnosti ovog kompleksa iznosi $\log K = 13,42$ (ne navodi se pH vrednost na kojoj je konstanta stabilnosti izračunata).

Prema izračunatim vrednostima konstanti stabilnosti ispitivanog kompleksa Al_2Kverc^{4+} koje su prikazane u tabeli 4.3.2. može se zaključiti da pH vrednost značajno utiče na reakciju formiranja kompleksa, a samim tim i na vrednost opšte koncentracione konstante stabilnosti. S obzirom da nastaje kompleks sastava Al_2Kverc^{4+} dobijaju se vrlo velike vrednosti za konstantu stabilnosti kompleksa. Iz tabele 4.3.2. jasno se vidi da su najveće vrednosti konstante stabilnosti dobijene u opsegu između 3,00-4,00 pH jedinica. U ovoj oblasti najveće su i vrednosti intenziteta fluorescencije kompleksa, što je i prikazano na slici 4.3.5. Očekivano bi bilo da vrednost opšte koncentracione konstante stabilnosti kompleksa raste pri povećanju pH preko 4,00, jer

se povećanjem pH vrednosti favorizuje disocijacija kvercetina, (porastom pH vrednosti dolazi do porasta koncentracije anjonskog oblika kvercetina, što i sledi iz tabele 4.3.2.), čime se povećava mogućnost njegove ugradnje u kompleks. Međutim, sa porastom pH vrednosti opada koncentracija slobodnog aluminijum(III)-jona, što je očekivana posledica njegove hidrolize, pa kao rezultat ove pojave, dolazi do smanjenja vrednosti konstante stabilnosti kompleksa na pH vrednostima preko 3,50.

4.3.5. Spektrofluorimetrijsko određivanje kvercetina u 70 %v/v metanolu

Dobijena vrednost opšte koncentracione konstante stabilnosti aluminijum(III)-kvercetin kompleksa ima veliku vrednost, što ukazuje da se u datim eksperimentalnim uslovima ($pH = 3,30$, u 70 %v/v metanolu) formira stabilan kompleks. Kvercetin je određivan spektrofluorimetrijski na osnovu kalibracionog dijagrama koji predstavlja zavisnost intenziteta fluorescencije kompleksa aluminijum(III)-kvercetin od koncentracije kvercetina. Koncentracija aluminijum(III)-jona je uzeta u višku, te se može smatrati da je koncentracija kompleksa proporcionalna koncentraciji kvercetina.

Dobijena je linearna zavisnost intenziteta fluorescencije ispitivanog kompleksa od koncentracije kvercetina, koja se može predstaviti regresionom jednačinom:

$$I_F = (1,47 \pm 0,01) c_{Kverc} + (0,56 \pm 0,04) \quad (4.16.)$$

gde I_F predstavlja relativni intenzitet fluorescencije izražen u % (meren na $\lambda_{ex} = 420$ nm i $\lambda_{em} = 480$ nm, širine otvora za ekscitacione i emisione snopove iznosile su 5 nm), a c_{Kverc} je koncentracija kvercetina izražena u $ng\ cm^{-3}$. Koeficijent korelacije iznosi $r = 0,9998$.

Linearnost je dobijena u koncentracionom opsegu od 1,5 do 60,5 $ng\ cm^{-3}$ kvercetina.

Vrednosti granice detekcije, LOD i granice kvantifikacije, LOQ računata su prema jednačinama (3.12.) i (3.13.) koje su date u poglavlju 3.4. Granica detekcije je iznosila $LOD = 0,09\ ng\ cm^{-3}$, a granica kvantifikacije $LOQ = 0,27\ ng\ cm^{-3}$.

Tačnost i preciznost metode proverene su na tri različite koncentracije kvercetina. Rezultati određivanja su predstavljeni u Tabeli 4.3.3.

Tabela 4.3.3. Rezultati dobijeni spektrofluorimetrijskim određivanjem kvercetina

Odmereno (ng cm ⁻³)	Nađeno (ng cm ⁻³)	„Recovery“ (%)	SD	KV (%)
6,06	6,07	100,17	2,1·10 ⁻²	0,35
12,12	12,11	99,92	2,0·10 ⁻²	0,17
24,24	24,23	99,96	1,8·10 ⁻²	0,08

n=5

„Recovery“ vrednosti koje se nalaze između 99,92 i 100,17 % i niske vrednosti standardne devijacije ukazuju na veoma dobru reproduktivnost merenja.

4.3.5.1. Spektrofluorimetrijsko određivanje kvercetina u farmaceutskim preparatima

Sadržaj kvercetina određivan je u preparatu *Quercetin + C kapsule* (nominalni sadržaj jedne kapsule iznosi: 700 mg vitamina C, 250 mg kvercetin-dihidrata, ekscipijenti: želatin, biljna stearinska kiselina i silicijum-dioksid), proizvođača Twinlab, USA u kojima je određivan sadržaj kvercetina. Uzorci za određivanje kvercetina u tabletama pripremljeni su prema proceduri opisanoj u poglavlju 3, a rezultati ovog određivanja prikazani su u tabeli 4.3.4.

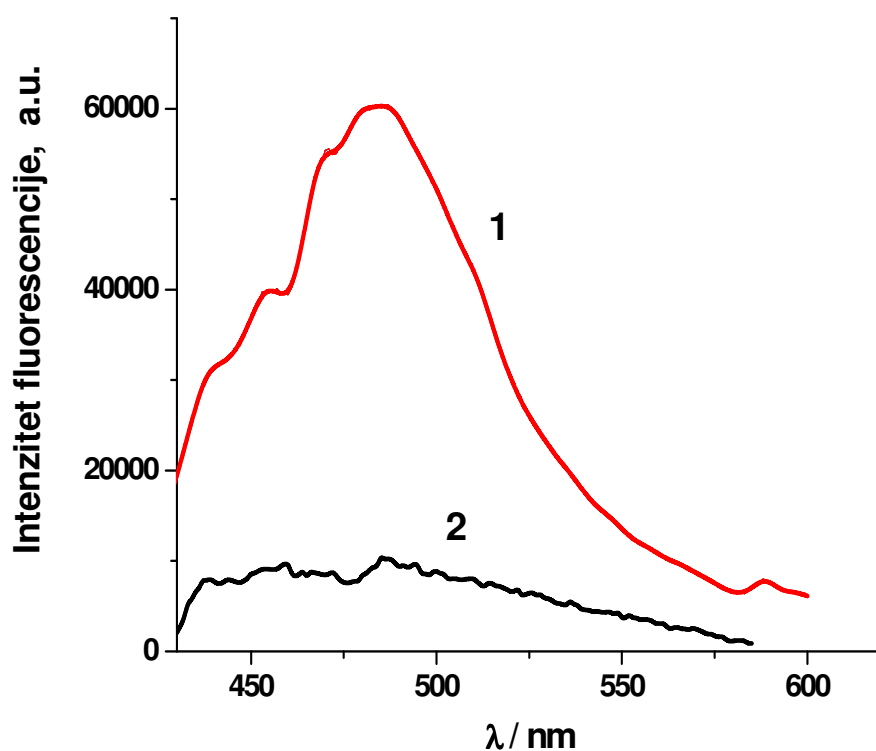
Tabela 4.3.4. Rezultati dobijeni spektrofluorimetrijskim određivanjem kvercetina u farmaceutskim preparatima

	Određen sadržaj kvercetin-dihidrata, mg	„Recovery“ (%)	SD (%)	KV (%)
<i>Quercetin + C kapsule</i> sadržaj kvercetin dihidrata deklarisan na 500 mg u dve kapsule	245,7	98,28	0,22	0,09

n=5

Da bi predložena spektrofluorimetrijska metoda mogla biti uspešno primenjena na određivanje sadržaja kvercetina u farmaceutskim preparatima koji ga sadrže, mora se utvrditi uticaj ekscipijenata i drugih prisutnih materija na intenzitet fluorescencije ispitivanog kompleksa aluminijum(III)-kvercetin. Pri određivanju sadržaja kvercetina u

preparatu *Quercetin + C kapsule*, bilo je potrebno utvrditi uticaj prisutnog vitamina C i ekscipijenata na intenzitet fluorescencije rastvora koji je dobijen od pripremljenog uzorka *Quercetin + C kapsula* prema proceduri opisanoj u poglavlju 3. Zbog toga je napravljena smeša koja je sadržavala vitamin C, i navedene ekscipijente u odnosu u kome se oni nalaze u preparatu. Ova smeša je tretirana na isti način, odnosno prema predloženoj proceduri za analizu kvercetina u preparatu. Izmeren je emisijski spektar dobijenog rastvora koji je sadržavao ekscipijente i vitamin C. Uslovi u kojima je snimljen ovaj spektar bili su $\lambda_{ex} = 420$ nm i $\lambda_{em} = 480$ nm, širine otvora za ekscitacione i emisije snopove iznosile su 5 nm. Emisioni spektar uzorka kapsula prikazan je krivom 1 na slici 4.3.6., a kriva 2 predstavlja emisijski spektar uzorka koji je sadržavao samo vitamin C i ekscipijente.



Slika 4.3.6. Emisioni spektar aluminijum(III)-kvercetin kompleksa u preparatu *Quercetin + C kapsule* (1) i smeše ekscipijenata (2).

Iz emisionog spektra rastvora koji je sadržavao ekscipijente i vitamin C u 70 v/v% metanolu, prikazanog krivom 2 na slici 4.3.6., uočava se da ekscipijenti ne

pokazuju značajnu interferenciju pri određivanju kvercetina. U okviru izabranih eksperimentalnih uslova, utvrđeno je da se predložena spektrofluorimetrijska metoda može uspešno koristiti za određivanje kvercetina u preparatu *Quercetin + C kapsule*.

U odnosu na metode koje su razvijene za određivanje sadržaja kvercetina u farmaceutskim preparatima i sirovinama, a koje su zasnovane na spektrofotometrijskim merenjima,^{47, 97} kao i u odnosu na HPLC metodu⁹⁸ koja je razvijena za simultano određivanje kvercetina i luteolina u kapsulama, predložena spektrofluorimetrijska metoda pokazuje veću osetljivost, preciznost, ima niže vrednosti granice detekcije *LOD* i granice kvantifikacije *LOQ* oko 1000 puta.

4.3.5.2. *Spektrofluorimetrijsko određivanje polifenola u sokovima od jabuke*

Spektrofluorimetrijski je određivan ukupni sadržaj polifenola u različitim uzorcima sokova od jabuke, koji se nalaze na tržištu u Srbiji. Sadržaj polifenola u uzorcima je izražen u odnosu ekvivalent kvercetina (QE- *quercetin equivalent*). Predložena spektrofluorimetrijska metoda za određivanje ukupnog sadržaja polifenola bazirana je na merenju intenziteta fluorescencije kompleksa aluminijum(III)-kvercetin i izražavanju sadržaja ukupnih polifenola preko ekvivalent kvercetina (QE).

Uzorci za određivanje sadržaja polifenola u soku od jabuke pripremljeni su prema proceduri opisanoj u poglavlju 3, a rezultati određivanja prikazani su u tabeli 4.3.5. U drugoj koloni ove tabele prikazan je sadržaj polifenola izražen u odnosu ekvivalent kvercetina (QE).

Tabela 4.3.5.: Rezultati spektrofotometrijskog određivanjae sadržaja ukupnih polifenola u soku od jabuke

Vrsta soka	Sadržaj polifenola, mg dm ⁻³	SD
Life (Nectar)	3,90	3,2×10 ⁻³
Happy day	4,52	3,4×10 ⁻³
Next (100%)	9,77	2,9×10 ⁻³
Next	5,64	3,2×10 ⁻³
Nectar	8,76	2,6×10 ⁻³
Golf	9,70	2,7×10 ⁻³
Bravo	5,59	3,0×10 ⁻³

n=5

Kako se iz tabele vidi, ukupan sadržaj polifenola u voćnim sokovima varira u zavisnosti od vrste i sorte jabuka od koje je sok proizveden, od geografske regije u kojoj je voće proizvedeno, klime, svojstava tla, sezone, načina skladištenja, broja sunčanih dana, i drugih uslova. S obzirom da ukupan sadržaj polifenola u voću nije deklarisan, nije bilo moguće odrediti "recovery" vrednosti.

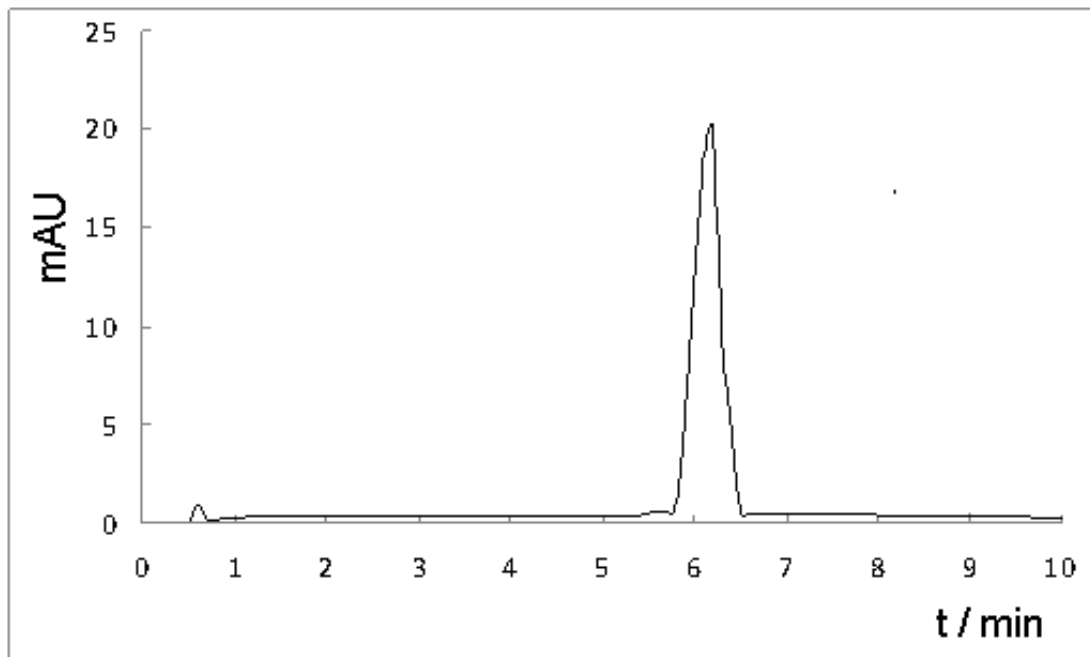
U odnosu na metodu za određivanje sadržaja polifenola u sokovima od jabuke, paradajza, i u čajevima, a koja je zasnovana na senzibilisanoj fluorescenciji kompleksnog jedinjenja koje nastaje u reakciji terbijum(III)-jona i flavonola,¹³³ predloženom spektrofotometrijskom metodom se mogu određivati niže koncentracije polifenola u uzorcima (linearnost se postiže u opsegu koncentracija od od 1,5 do 60,5 ng cm⁻³ kvercetina). Postignute vrednosti granice detekcije spektrofotometrijskom metodom ($LOD = 0,09 \text{ ng cm}^{-3}$) su oko dvadeset puta niže u odnosu na metodu koju su razvili M. Shaghaghia i saradnici.¹³³

43.6. HPLC određivanje kvercetina u farmaceutskim preparatima

Za proveru pouzdanosti predložene spektrofotometrijske metode za određivanje kvercetina u rastvorima metanol-voda razvijena je RP-HPLC metoda sa

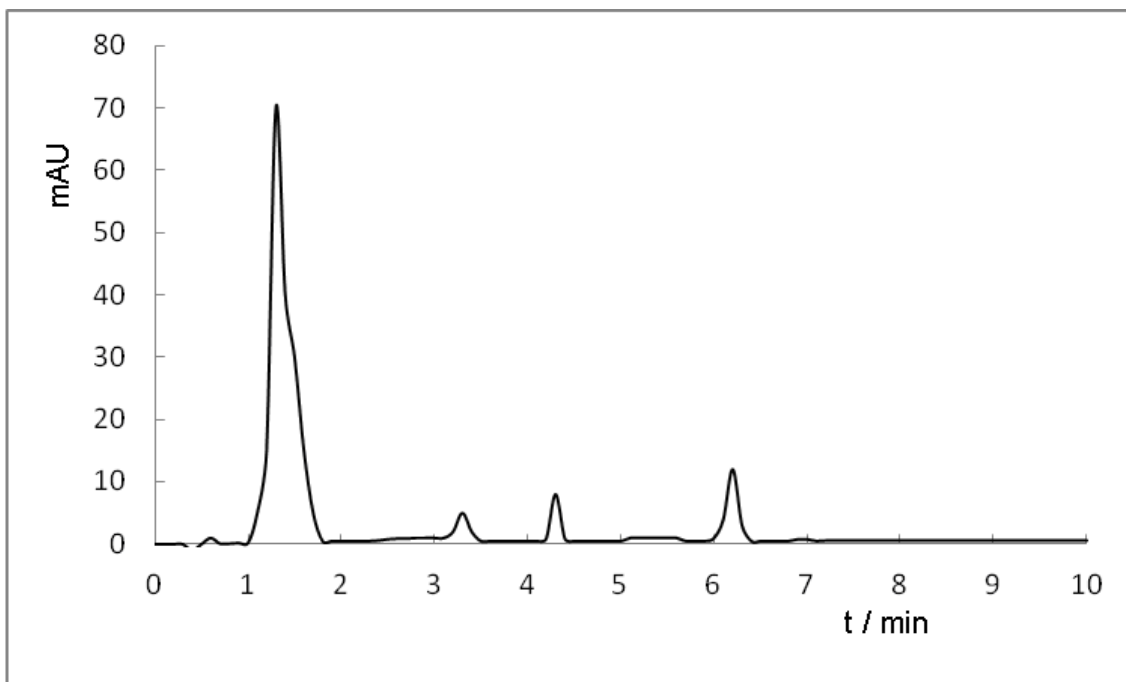
UV-Vis detekcijom za određivanje kvercetina. Na slici 4.3.7. prikazan je hromatogram standardnog rastvora kvercetina pod optimalnim uslovima.

Uzorci kapsula preparata *Quercetin + C kapsula* za RP-HPLC analizu pripremljeni su na način kako to propisuje procedura za pripremu uzorka kapsula koja je opisana u poglavlju 3. Različiti alikvoti ovako pripremljenog rastvora kapsula analizirani su u HPLC sistemu sa AquaGold aQ kolonom i UV detekcijom.



Slika 4.3.7. Hromatogram kvercetina pod optimalnim uslovima

Hromatogram dobijen analizom preparata *Quercetin + C kapsula* prikazan je na slici 4.3.8. Pik kvercetina na ovom hromatogramu se pojavljuje na vrednosti retencionog vremena od 6,18 minuta (ova vrednost retencionog vremena za kvercetin potvrđena je hromatogramom standardne supstance- kvercetina i proverom UV i masenih spektara odgovarajućeg pika- slika 4.3.7.).



Slika 4.3.8. Hromatogram dobijen analizom preparata *Quercetin + C kapsule*; pik kvercetina dobijen na retencionom vremenu $t_r = 6,18$ min

Regresiona jednačina kalibracione prave za određivanje kvercetina RP-HPLC metodom, ima oblik:

$$A = (4,38 \pm 0,05) \times 10^3 c_{Kverc} + (0,05 \pm 0,002) \times 10^3 \quad (N = 7, r = 1,0000) \quad (4.17.)$$

gde A predstavlja površinu pika a c_{Kverc} predstavlja koncentraciju kvercetina izraženu u $\mu\text{g cm}^{-3}$. Linearnost je postignuta u koncentracionom opsegu hesperidina od 0,05–200,0 $\mu\text{g cm}^{-3}$. Vrednost granice detekcije, LOD , izračunata iz parametara kalibracione prave, iznosila je 0,066 $\mu\text{g cm}^{-3}$, a vrednost granice kvantifikacije, LOQ , 0,02 $\mu\text{g cm}^{-3}$.

Tačnost metode je proverena za tri nivoa različitih koncentracija kvercetina i to za nivoe: 80%, 100% i 120%, tehnikom standardnog dodatka. Sve analize su urađene tri puta i izračunata je standardna devijacija i "recovery" vrednosti. Iz tabele 4.3.6. se uočava da su "recovery" vrednosti u opsegu od 99,12 – 103,37 %, što potvrđuje da je metoda tačna i prezina za određivanje kvercetina.

Tabela 4.3.6. Rezultati određivanja sadržaja kvercetina RP-HPLC/UV metodom

		Kvercetin
80%	Dodato ($\mu\text{g cm}^{-3}$)	73,00
	Nađeno ($\mu\text{g cm}^{-3}$)	75,4 \pm 0,8
	„Recovery“ (%)	103,37
100%	Dodato ($\mu\text{g cm}^{-3}$)	91,26
	Nađeno ($\mu\text{g cm}^{-3}$)	90,46 \pm 0,7
	„Recovery“ (%)	99,12
120%	Dodato ($\mu\text{g cm}^{-3}$)	109,51
	Nađeno ($\mu\text{g cm}^{-3}$)	108,77 \pm 0,6
	„Recovery“ (%)	99,32

n=3

Sadržaj kvercetina u kapsulama određen je RP-HPLC/UV metodom, a rezultati određivanja su prikazani u tabeli 4.3.7.

Tabela 4.3.7. Rezultati spektrofotometrijskog određivanja kvercetina u preparatu

Quercetin + C kapsula

	Određen sadržaj kvercetin-dihidrata, mg	Recovery (%)	SD (%)	KV (%)
<i>Quercetin + C kapsule</i> sadržaj kvercetin dihidrata deklarisan na 500 mg u dve kapsule	243,0	97,2	0,31	0,15

n=5

Predložena spektrofotometrijska metoda za određivanje kvercetina u farmaceutskim preparatima je jednostavna, tačna, precizna i reproduktivna, i omogućava direktno i jednostavno određivanje kvercetina bez njegove ekstrakcije iz uzorka. Spektrofotometrijski se i u ovom slučaju dobijaju mnogo niže vrednosti za granicu detekcije, *LOD*, i granicu kvantifikacije, *LOQ*, od vrednosti dobijenih RP-HPLC/UV metodom. Određivanje kvercetina u doziranim oblicima je uspešno, pod

uslovom da analizirani preparati ne sadrže flavonoide koji bi kompleksiranjem sa aluminijum(III)-jonom dali specifičnu fluorescenciju na $\lambda_{em} = 480$ nm uz ekscitaciju molekula na $\lambda_{ex} = 420$ nm.

5. ZAKLJUČAK

Na osnovu prikazanih eksperimentalnih rezultata može se zaključiti sledeće:

- Aluminijum(III)-jon i morin grade kompleks intenzivno žuto-zelene boje u 70 % v/v etanolu, koji je stabilan u pH oblasti od 3,0 do 6,0. Formirani kompleks ima sastav aluminijum(III) : morin = 1:2. Aluminijum(III)-morin kompleks pokazuje intenzivnu fluorescenciju na $\lambda_{em} = 500$ nm, pri ekscitaciji na $\lambda_{ex}=410$ nm, a emisioni maksimum formiranog kompleksa se batohromno pomera za 10 nm u odnosu na emisioni maksimum čistog morina.
- U reakciji aluminijum(III)-jona i hesperidina u 70 % v/v metanolu nastaje kompleks žute boje, koji je stabilan u pH oblasti od 3,0 do 7,0. U reakciji kompleksiranja gradi se kompleks koji ima sastav aluminijum(III) : hesperidin = 1:1. Formirani kompleks aluminijum(III)-hesperidin, pokazuje značajnu fluorescenciju na $\lambda_{em} = 490$ nm pri ekscitaciji na $\lambda_{ex} = 390$ nm, a emisioni maksimum kompleksa je batohromno pomeren za 70 nm u odnosu na emisioni maksimum čistog hesperidina.
- Utvrđeno je da se intenzitet fluorescencije formiranog kompleksa aluminijum(III)-hesperidin u 70 % v/v metanolu u prisustvu surfaktanta SB 12 značajno povećava u odnosu na intenzitet fluorescencije ovog kompleksa u 70 % v/v metanolu bez prisustva SB 12. Uočeno je da se talasna dužina maksimuma u emisionom spektru kompleksa, u prisustvu površinski aktivne materije SB 12, hipsokromno pomera sa $\lambda_{em}= 490$ nm na $\lambda_{em}= 476$ nm i da je intenzitet fluorescencije ispitivanog kompleksa oko četiri do pet puta veći u odnosu na intenzitet fluorescencije kompleksa u metanolno-vodenim rastvorima bez prisustva SB 12.
- Aluminijum(III)-jon i kvercetin formiraju kompleks u 70 % v/v metanolu intenzivne žuto-narandžaste boje, koji je stabilan u pH oblasti od 2,0 do 5,5 pH jedinica. U reakciji kompleksiranja u 70 % v/v metanolu nastaje kompleks sastava aluminijum(III) : kvercetin = 2:1. Ekscitacioni

maksimum kompleksa nalazi se na $\lambda_{ex} = 420$ nm, a emisijski maksimum na $\lambda_{em} = 480$ nm. Formirani kompleks aluminijum(III)–kvercetin pokazuje značajnu fluorescenciju na $\lambda_{em} = 480$ nm. Emisijski maksimum ovog kompleksa hipsokromno je pomeren za 20 nm u odnosu na emisijski maksimum čistog kvercetina.

- Reakcija kompleksiranja u kojoj učestvuju aluminijum(III)-jon i ispitivani flavonoidi (morin, hesperidin i kvercetin) odvija se uz oslobađanje vodonikovih jona, što potvrđuje da ispitivani flavonoidi učestvuju u reakciji građenja kompleksa u anjonskom obliku.
- Formirani kompleksi imaju veoma visoke vrednosti konstanti stabilnosti kompleksa. Konstanta stabilnosti kompleksa aluminijum(III)–morin na pH vrednosti $pH = 4,40$ iznosi $\log \beta_2 = 16,96$. Za kompleks aluminijum(III)–hesperidin izračunata konstanta stabilnosti na $pH = 4,50$ ima vrednost $\log \beta_1 = 7,50$, dok konstanta stabilnosti ovog kompleksa u prisustvu površinski aktivne materije, SB 12, na istoj vrednosti pH iznosi $\log \beta_1 = 9,20$. Poređenjem vrednosti konstanti stabilnosti ovog kompleksa koje su izračunate u jednom slučaju za rastvorenje kompleksa u 70 % v/v metanolu bez prisustva SB 12 a u drugom za rastvorenje kompleksa u 70 % v/v metanolu u prisustvu SB 12, uočava se da se u prisustvu surfaktanta povećava stabilnost kompleksa, odnosno da su konstante stabilnosti formiranog kompleksa veće u prisustvu SB 12 na svim poređenim pH vrednostima. Vrednost konstante stabilnosti kompleksa aluminijum(III)–kvercetin iznosi $\log \beta = 27,79$ na pH vrednosti $pH = 3,20$.
- Opšte koncentracijske konstante stabilnosti kompleksa aluminijum(III)-flavonoid (morin, hesperidin, kvercetin) imaju velike vrednosti, što ukazuje da se u datim eksperimentalnim uslovima (odgovarajuća vrednost pH , u smešama etanol-voda odnosno metanol-voda) formiraju stabilni kompleksi. Stoga je bilo moguće razviti metode za spektrofluorimetrijsko određivanje ovih flavonoida u različitim uzorcima.

- Razvijena je spektrofotometrijska metoda za određivanje morina u 70 %v/v etanolu i u uzorcima humanog seruma primenom metode kalibracione krive. Za proveru pouzdanosti predložene spektrofotometrijske metode za određivanje morina, razvijena RP-HPLC/UV metoda za njegovo određivanje. Spektrofotometrijska metoda omogućava direktno i jednostavno određivanje morina bez njegove ekstrakcije iz uzorka, koja se primenjuje kod HPLC metode sa UV-Vis detekcijom. Spektrofotometrijski se takođe, dobijaju mnogo niže vrednosti za granicu detekcije, *LOD*, i granicu kvantifikacije, *LOQ*, od vrednosti dobijenih HPLC metodom, što nesumnjivo predstavlja prednost pri primeni ove metode.
- Razvijena je spektrofotometrijska metoda za određivanje hesperidina u 70 %v/v metanolu primenom kalibracionog dijagrama. Predloženu spektrofotometrijsku metodu bilo je moguće primeniti za određivanje sadržaja hesperidina u različitim sokovima od pomorandže, koji se nalaze na tržištu u Srbiji.
- Reakcija dobijanja stabilnog kompleksa aluminijum(III)-hesperidin, u prisustvu surfaktanta SB 12, upotrebljena je za postavljanje spektrofotometrijske metode za određivanje sadržaja hesperidina u farmaceutskim preparatima i uzorcima humane plazme. Da bi se proverila pouzdanost predložene spektrofotometrijske metode, kao referentna metoda je razvijena je i modifikovana HPLC metoda za određivanje hesperidina. U uzorcima humane plazme korišćena je LC-MS/MS metoda, a HPLC/UV metoda je upotrebljena za određivanje sadržaja hesperidina u tabletama. Predložena spektrofotometrijska metoda za određivanje hesperidina u farmaceutskim preparatima i uzorcima humane plazme je jednostavna, tačna, precizna i reproduktivna, i omogućuje direktno i jednostavno određivanje hesperidina bez njegove ekstrakcije iz uzorka. Određivanje hesperidina u doziranim oblicima je uspešno, pod uslovom da analizirani preparati ne sadrže flavonoide koji bi kompleksiranjem sa aluminijum(III)-jonom dali specifičnu fluorescenciju na $\lambda_{ex} = 390 \text{ nm}$ i $\lambda_{em} = 476 \text{ nm}$. Spektrofotometrijsko određivanje hesperidina u uzorcima

humane plazme, nakon kompleksiranja sa aluminijum(III)-jonom, pokazuje visoku preciznost i tačnost, pa se metoda može primeniti za rutinsku analizu hesperidina u kliničkim laboratorijama. a u odnosu na LC-MS/MS metodu, spektrofluorimetrijska metoda je jednostavnija i brža.

- Poređenjem analitičkih parametara za spektrofluorimetrijsko određivanje hesperidina u prisustvu surfaktanta SB 12 i analitičkih parametara za određivanje hesperidina u ispitivanim rastvorima bez prisustva surfaktanta, uočava se da se spektrofluorimetrijskim određivanjem hesperidina u prisustvu SB 12 postiže veća osetljivost i preciznost određivanja, koja je i neophodna za određivanje hesperidina u biološkim tečnostima i doziranim oblicima. Međutim, imajući u vidu očekivani opseg koncentracija hesperidina u voćnim sokovima, jasno je da dobijene vrednosti sadržaja hesperidina predloženom procedurom za njegovo spektrofluorimetrijsko određivanje bez prisustva surfaktanta SB 12, pokazuju zadovoljavajuću osetljivost i tačnost.
- Postavljena je spektrofluorimetrijska metoda za određivanje kvercetina u 70 %v/v metanolu primenom kalibracionog dijagrama. Da bi se proverila pouzdanost predložene spektrofluorimetrijske metode, kao referentna metoda razvijena je RP-HPLC/UV metoda za određivanje sadržaja kvercetina u tabletama. Predložena spektrofluorimetrijska metoda je primenjena za određivanje sadržaja kvercetina u farmaceutskim preparatima. Predložena spektrofluorimetrijska metoda za određivanje kvercetina u farmaceutskim preparatima je jednostavna, tačna, precizna i reproduktivna, i omogućava direktno i jednostavno određivanje kvercetina bez njegove ekstrakcije iz uzorka. Spektrofluorimetrijski se i u ovom slučaju dobijaju mnogo niže vrednosti za granicu detekcije, LOD, i granicu kvantifikacije, LOQ, od vrednosti dobijenih RP-HPLC/UV metodom. Određivanje kvercetina u doziranim oblicima je uspešno, pod uslovom da analizirani preparati ne sadrže flavonoide koji bi kompleksiranjem sa aluminijum(III)-jonom dali specifičnu fluorescenciju na $\lambda_{em} = 480$ nm uz ekscitaciju molekula na $\lambda_{ex} = 420$ nm.

- Predložena je spektrofotometrijska metoda za određivanje ukupnog sadržaja polifenola u soku od jabuka pri čemu je sadržaj ukupnih polifenola izražen u odnosu ekvivalent kvercetina (*QE*), koji je određivan spektrofotometrijski.

6. LITERATURA

1. J. B. Harborne, H. Baxter (Ed.). *Handbook of Natural flavonoids. Vol 2.* Chichester (UK): Wiley & Sons; (1999)
2. S.B. Lotito, B. Frei: "Consumption of flavonoid rich foods and increased plasma antioxidant capacity in humans: cause, consequence, or epiphenomenon". *Free Radic Biol Med.* 41 (2006) 1727-1746
3. Fang Fang, Jing-Ming Li, Qiu-Hong Pan, Wei-Dong Huang: "Determination of red wine flavonoids by HPLC and effect of aging". *Food Chem.* 101 (2007) 428–433
4. R. Omidbaigi, M. Faghih Nasiri: "Quantitative distribution of hesperidin in *Citrus* species, during fruit maturation and optimal harvest time". *Natural Product Radiance* 3 (2004) 1: 12-15);
5. Y. Nogata, K. Sakamoto, H. Shiratsuchi, T. Ishii, M. Yano, H. Ohta: "Flavonoid composition of fruit tissues of citrus species". *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 70 (2006) 1: 178–192
6. N. A. Tykavina, N. N. Pogodaeva, E. I. Brodskaya, Yu. M. Sapozhnikov: "Ultraviolet absorption of flavonoids. V. The structure of 3- and 5-hydroxyflavones." *Chemistry of Natural Compounds* 11 (1975) 5: 613-616
7. M. Katyal: "Flavones as analytical reagents". *Talanta* 15 (1968) 95-106
8. E.M. Nevskaya, V.A. Nazarenko: "Hydroxyflavones in analytical chemistry". *Zh. Analit. Khim.* 27 (1972) 1699-1714
9. M. Katyal, S. Prakash: "Analytical reactions of hydroxyflavones". *Talanta*, 24 (1977) 367-375
10. G. Cao, E. Sofic, R.L. Prior: "Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships". *Free Radic. Biol. Med.* 5 (1997) 749–760
11. J. E. Middleton, C. Kandaswami, T. C. Theoharides: "The Effects of Plant Flavonoids on Mammalian Cells: Implications for Inflammation, Heart Disease, and Cancer". *PHarmacol. Rev.* 52 (2000) 4: 673-751

12. E. Jr. Middleton, C. Kandaswami: *"Effects of flavonoids on immune and inflammatory cell functions"*. *Biochem. Pharmacol.* 43 (1992) 1167-1179
13. R. J. Williams, J. P. Spencer, C. Rice-Evans: *"Flavonoids: antioxidants or signalling molecules?"* *Free Radic. Biol. Med.* 36(2004) 7: 838-849
14. G. Weber: *"HPLC with electrochemical detection of metal-flavonoid-complexes isolated from food"*. *Chromatographia*, 26 (1988) 133 -138
15. Y. C. Lee, C. Y. Huang, T. T. Wen, K. C. Suen: *"Determination of liquiritin, glycyrrhizin, hesperidin, cinnamic acid, cinnamaldehyde, honokiol and magnolol in the traditional Chinese medicinal preparation Wu-Ji-San by high-performance liquid chromatography"* *J. Chromatogr. A* 692 (1995) 137-145
16. U. Justesen, P. Knuthsen, T. Leth: *"Quantitative analysis of flavonols, flavones, and flavanones in fruits, vegetables and beverages by high-performance liquid chromatography with photo-diode array and mass spectrometric detection"*. *J. Chromatogr. A*, 79 (1998) 101-110
17. B. Liu, D. Anderson, D.R. Ferry, L.W. Seymour, P.G. de Takats, D.J. Kerr: *"Determination of quercetin in human plasma using reversed-phase high-performance liquid chromatography"*. *J. Chromatogr. B*, 666 (1995) 149-155
18. S. G. Schulman (Ed.): *Molecular Luminescence Spectroscopy: Methods and applications. Part I*, Wiley, New York, (1985) 371-546
19. X. F. Long, S. P. Bi, H. Y. Ni, X. C. Tao, N. Gan: *"Resonance Rayleigh scattering determination of trace amounts of Al in natural waters and biological samples based on the formation of an Al(III)-morin-surfactant complex"*. *Anal. Chim. Acta* 501 (2004) 89-97
20. R. Ghavami, A. Najafi, B. Hemmateenejad: *"Chemometrics-assisted spectrophotometric methods for simultaneous determination and complexation study of Fe(III), Al(III) and V(V) with morin in micellar media"*. *Spectrochim. Acta Part A*, 70 (2008) 824-834

21. F. Hernandez Hernandez, J. Medina Escriche, R. Marin Saez, M. C. Roig Barreda: *"Spectrophotometric study of the iron(III)-morin complex in a micellar medium"*. Analyst, 111 (1986), 1045-1049
22. M. Balcerzak, A. Tyburska, E. Swiecicka- Fűchsel: *"Selective determination of Fe(III) in Fe(II) samples by UV-spectrophotometry with the aid of quercetin and morin"*. Acta PHarm. 58 (2008) 327–334).
23. S. Blagojević, D. Malešev, Z. Radović: *"Spectrophotometric and pH-metric investigation of Pd(II)-morin complex in 70% ethanolic solution"*. Arh. farm. (1999) 5-6: 387-396.
24. Chang-li Zhou, Yan Lu, Xiu-ling Li, Chuan-Nan Luo, Zhen-wei Zhang, Jin-mao You: *"Adsorptive stripping voltammetric determination of antimony"*. Talanta, 46 (1998) 1531 – 1536
25. S. Blagojević, M. Aleksić, D. Malešev, Z. Radović: *"Spektrofotometrijsko ispitivanje kompleksa titanil oksalat-morin u 50% V/V etanolu"*, Arh. farm. 53 (2003) 1-2: 17-26
26. Q. K. Panhwar, S. Memon, M. I. Bhangar: *"Synthesis, characterization, spectroscopic and antioxidation studies of Cu(II)-morin complex"*. J. Molec. Struct. 967 (2010) 47–53
27. E. Nagles, V. Arancibia, R. Ríos, C. Rojas: *"Simultaneous Determination of Lead and Cadmium in the Presence of Morin by Adsorptive Stripping Voltammetry with a Nafion-Ionic Liquid-coated Mercury Film Electrode"*. Int. J. Electrochem. Sci., 7 (2012) 5521 – 5533
28. Zing-Xin Fan, Yong-Xi Zheng: *"Effect of cationic micelles on the fluorescence of the zirconium-morin complex"*. Analyt. Chim. Acta, 281 (1993) 2: 353-360
29. F. Hernandez Hernandez, J. Medina Escriche, M.T. Gasco Andreu: *"Enhancement of the fluorescence of the zinc-morin complex by a non-ionic surfactant"*. Talanta, 33 (1986) 6: 537–540
30. F. Wei, E. Ten, Z. Wu: *"Enhancement of the fluorescence of the beryllium-morin complex by non-ionic surfactants"*. Talanta 37 (1990) 9: 947-950

31. Xiao-jing Liu , Yuan-zong Li, Yun-xiang Ci: *"Interaction of the La³⁺-Morin Complex with DNA"*. Analytical Sciences, 13 (1997) 939-944
32. A. A. Ensafi, R. Hajian, S. Ebrahimi: *"Study on the interaction between Morin-Bi(III) complex and DNA with the use of methylene blue dye as a fluoropHore probe"*. J. Braz. Chem. Soc., 20 (2009) 2: 266-276
33. A. C. Gutierrez, M.H. Gehlen: *"Time resolved fluorescence spectroscopy of quercetin and morin complexes with Al³⁺"*. Spectrochim. Acta Part A, 58 (2002) 83-89
34. V. A. Vitorello, A. Haug: *"An aluminum-morin fluorescence assay for the visualization and determination of aluminum in cultured cells of Nicotiana tabacum L. cv. BY-2"*. Plant Science, 122 (1997) 35-42
35. H. Z. Lian, Y. F. Kang, S. P. Bi, A. Yasin, D. L. Shao, Y. J. Chen, L. M. Dai, L. C. Tian: *"Morin applied in speciation of aluminium in natural waters and biological samples by reversed-pHase high-performance liquid chromatography with fluorescence detection"*. Anal. Bioanal. Chem., 376 (2003) 4:542-548
36. J. Tria, E. C. V. Butler, P. R. Haddad, A. R. Bowie: *"Determination of aluminium in natural water samples"*. Analyt. Chim. Acta 588 (2007) 153–165
37. S. M. Z. Al-Kindy, F. O. Suliman, S. B. Salama: *"A sequential injection method for the determination of aluminum in drinking water using fluorescence enhancement of the aluminum–morin complex in micellar media"*. Microchem. J., 74 (2003) 173-179
38. M. A. Raggi, G. Varan, V. Cavrini, D. Lacche, L. Nobile: *"Fluorimetric Determination of Aluminium Traces (ppb) in Hemodialysis Solutions Using Morin and Pontochrome Blue Black"*. Analyt. Lett., 19 (1986) 13-14: 1435-1441
39. Z. Radović, D. Malešev, M. Jelikić-Stankov: *"Spectrophotometric determination of hesperidin by Zr(IV)-hesperidin complexation"*. PHarmazie, 51 (1996) 8: 604-604

40. D. Malešev, Z. Radović, V. Kuntić, M. Kosanić: *"Spectrophotometric determination of hesperidin by Al(III)-hesperidin complex in water-methanol solution"*. *Analyt. Lett.* 30 (1997) 5: 917-926
41. V. Kuntić, M. Kosanić, D. Malešev, Z. Radović U. Mioč: *"Spectrophotometric investigation of the uranyl(II)-hesperidin complex in 70% methanol"*. *J. Serb. Chem. Soc.* 63 (1998) 7: 565-572
42. S. B. Etcheverry, E. G. Ferrer, L. Naso, J. V. Salinas, P. A. M. Williams: *"Antioxidant effects of the VO(IV) hesperidin complex and its role in cancer chemoprevention"* *J. Biol. Inorg. Chem.* 13 (2008) 435-447
43. T. Perez-Ruiz, C. Martinez-Lozano, V. Tomas, J. Fenoll *"Spectrofluorometric determination of hesperidin by manual and flow-injection methods"*. *Fresenius J. Anal. Chem.* 364 (1999) 279-283
44. D. Mohamed, S. M. Tawakkol: *"Fluorimetric determination of diosmin and hesperidin in combined dosage forms and in plasma through complex formation with terbium"*. *Bulletin of Faculty of PHarmacy, Cairo University* <http://dx.doi.org/10.1016/j.bfopcu.2012.12.001>.
45. Z. Radović, D. Malešev: *"Untersuchungen des Ni(II)-Quercetin-Komplexes Investigation of the Complex of Ni(II) and Quercetin"*. *Arch. PHarm* 320 (1987), 188-189
46. V. Kuntić, S. Blagojević, V. Vukojević, D. Malešev, Z. Radović: *"Spectrophotometric investigation of the Pd(II)-quercetin complex in 50% ethanol"*. *Monatshefte für Chemie* 129, (1998) 41-48.
47. V. Kuntić, N. Pejić, S. Mičić, V. Vukojević, Z. Vujić, D. Malešev: *"Determination of quercetin in pharmaceutical formulations via its reaction with potassium-titanyloxalate: Determination of the stability constants of the quercetin-titanyloxalato complex"*. *J. Serb. Chem. Soc.* 70 (2005) 5: 753-763
48. J. P. Cornard, L. Dangleterre, C. Lapouge: *"Spectroscopic and structural study of complexes of quercetin with Al(III)"*. *J. Phys. Chem. A* 109 (2005) 10044-10051

49. D. A. Kostić, G. Ž. Miletić, S. S. Mitić, I. D. Rašić, V. V. Živanović: *"Spectrophotometric determination of microamounts of quercetin based on its complexation with copper(II)"*. Chemical Papers, 61 (2007) 2: 73-76
50. S. Birjees Bukhari, S. Memon, M. Mahroof-Tahir, M. I. Bhangar: *"Synthesis, characterization and investigation of antioxidant activity of cobalt–quercetin complex"*. J. Molec. Struct. 892 (2008) 39–46
51. S. Birjees Bukhari, S. Memon, M. Mahroof-Tahir, M. I. Bhangar: *"Synthesis, characterization and antioxidant activity copper–quercetin complex"*. Spectrochim. Acta Part A, 71 (2009) 1901–1906
52. R. Frederice, A. P. G. Ferreira, M. H. Gehlen: *"Molecular fluorescence in silica particles doped with quercetin-Al³⁺ complexes"*. J. Braz. Chem. Soc. 21, (2010) 7: 1213-1217
53. J. P. Cornard, J. C. Merlin: *"Spectroscopic and structural study of complexes of quercetin with Al(III)"*. J. Inorg. Biochem. 92 (2002) 19–27
54. Y. Ni, S. Du, S. Kokot: *"Interaction between quercetin-copper(II) complex and DNA with the use of the Neutral Red dye fluorophore probe"* Analyt. Chim. Acta, 584 (2007) 1: 19–27
55. M. Shaghghi, J.L. Manzoori, A. Jouyban: *"Determination of total phenols in tea infusions, tomato and apple juice by terbium sensitized fluorescence method as an alternative approach to the Folin–Ciocalteu spectrophotometric method"*. Food Chem. 108 (2008) 695–701
56. A. M. Garcia-Campaña, F. Alés Barrero, A. Lupiáñez González, M. Román Ceba: *"Non-ionic micellar solubilization — spectrofluorimetric determination of trace of germanium(IV) with quercetin in real samples"*. Analyt. Chim. Acta 447 (2001) 219–228
57. M. Ferrali, C. Signorini, B. Caciotti, L. Sugherini, L. Ciccoli, D. Giachetti, M. Comporti: *"Protection against oxidative damage of erythrocyte membranes by the flavonoid quercetin and its relation to iron chelating activity"*. FEBS Lett. 416 (1997) 123-129

58. A. J. Elliott, S. A. Scheiber, C. Thomas, R. S. Pardini: *"Inhibition of glutathione reductase by flavonoids"*. *Biochem. PHarmacol.* 44 (1992)1603-1608
59. P. Cos, L. Ying, M. Calomme, Jp. Hu, K. Cimanga, B. Van Poel, L. Pieters, A. J. Vlietinck, V. Vander-Berghe: *"Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers"*. *J. Nat Prod.* 61 (1998) 71-76
60. G. Agullo, L. Gamet-Payrastre, S. Manenti, C. Viala, C. Remesy, H. Chap, B. Payrastre: *"Relationship between flavonoid structure and inhibition of pHospHatidylinositol 3-kinase: A comparison with tyrosine kinase and protein kinase C inhibition"*. *Biochem. PHarmacol.* 53 (1997) 1649–1657
61. H. Ashida, I. Fukuda, T. Yamashita, K. Kanazawa: *"Flavones and flavonols at dietary levels inhibit a transformation of aryl hydrocarbon receptor induced by dioxin"*. *FEBS Lett.* 476 (2000) 213–217
62. J. An, C. Tzagarakis-Foster, T. C. Scharschmidt, N. Lomri, D. C. Leitman: *"Estrogen receptor beta-selective transcriptional activity and recruitment of coregulators by pHytoestrogens"*. *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 17808–17814
63. G. Williamson, G. W Plumb, Y. Uda, K. R. Price, M. J. C. Rhodes: *"Dietary quercetin glycosides: antioxidant activity and induction of the anticarcinogenic pHase II marker enzyme quinone reductase in Hepal1c7 cells"*. *Carcinogenesis*, 17 (1996) 2385-2387
64. M. Soriani, C. Rice-Evans, R. M. Tyrrell: *"Modulation of the UVA activation of haem oxygenase, collagenase and cyclooxygenase gene expression by epigallocatechin in human skin cells"*. *FEBS Lett.* 439 (1998) 253-257.
65. T. L.Wadsworth, D. R. Koop: *"Effects of the wine polypHenolics quercetin and resveratrol on pro-inflammatory cytokine expression in RAW 264.7 macropHages"*. *Biochem. PHarmacol.* 57 (1999) 941-949
66. Y.-C. Liang, S.-H. Tsai, D.-C. Tsai, S.-Y. Lin-Shiau, J.-K. Lin: *"Suppression of inducible cyclooxygenase and nitric oxide synthase through activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma by flavonoids in mouse macropHages"*. *FEBS Lett.* 496 (2001)12-18.

67. M. G. L. Hertog, D. Kromhout, C. Aravanis, H. Blackburn, R. Buzina, F. Fidanza, S. Giampaoli, A. Jansen, A. Menotti, S. Nedeljković, M. Pekkarinen, B. S. Simic, H. Toshima, E. J. M. Feskens, P. C. H. Hollman, M. B. Katan: *"Flavonoid Intake and Long-term Risk of Coronary Heart Disease and Cancer in the Seven Countries Study"*. Arch. Intern. Med. 155 (1995) 381–386
68. E. Middleton: *"Biological Properties of Plant Flavonoids: An Overview"*. PHarmaceutical Biology, 34 (1996) 5: 344 – 348
69. A. Mazur, D. Bayle, C. Lab, E. Rock, Y. Rayssiguier: *"Inhibitory effect of procyanidin-rich extracts on LDL oxidation in vitro"*. Atherosclerosis, 145 (1999) 421–422
70. M. G. L. Hertog, E. J. M. Feskens, P. C. H. Hollman, M. B. Katan, D. Kromhout: *"Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen elderly study"*. Lancet, 342 (1993) 1007–1011
71. H. Wang, M. G. Nair, G. M. Strasburg, Y. C. Chang, A. M. Booren, J. I. Gray, D. L. Dewitt: *"Antioxidant and Antiinflammatory Activities of Anthocyanins and Their Aglycon, Cyanidin from Tart Cherries"*. J. Natural Products, 62 (1999) 294 – 301
72. J. M. Gaziano, J. E. Manson, J. E. Buring, C. H. Hennekens: *"Dietary antioxidants and cardiovascular disease"*. Ann. New York Acad Sci. 669 (1992) 249-259
73. K. F. Gey, P. Puska, P. Jordan, U. K. Moser: *"Inverse correlation between plasma Vitamin E and mortality from ischemic-heart-disease in cross cultural epidemiology"*. Am. J. Clin. Nutr. 53 (1991) 326–334
74. S. A. B. E. Van Acker, D. J. Van Den Berg, M. N. J. L. Tromp, D. H. Griffioen, W. P. Van Bennekom, W. J. F. Van Der Vijgh, A. Bast: *"Structural aspect of antioxidant activity of flavonoids"*. Free Radical Biology & Medicine, 20 (1996) 3: 331-342
75. J. E. Kinsella, E. Frankel, B. German, J. Kanner: *"Possible mechanisms for the protective role of antioxidants in wine and plant foods"*. Food Technol. 47 (1993) 4: 85–89

76. W. A. Pryor: *"The antioxidant nutrients and disease prevention - what do we know and what do we need to find out?"*. Am. J. Clin. Nutr. 53 (1991) 391–393
77. S. Subash, P Subramanian: *"Morin a flavonoid exerts antioxidant potential in chronic hyperammonemic rats: a biochemical and histopathological study"*. Mol. Cell Biochem. 327 (2009) 1-2:153-61
78. P. Hodek, P. Trefil, M. Stiborova: *"Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450"*. Chem. Biol. Interact. 139 (2002) 1-21
79. S. Kitagawa, H. Sakamoto, H. Tano: *"Inhibitory effects of flavonoids on free radical-induced hemolysis and their oxidative effects on hemoglobin"*. Chem. PHarm. Bull. 52 (2004) 999-1001
80. K. S. Al-Numair, G. Chandramohan, C. Veeramani, M. A. Alsaif: *"Morin, a flavonoid, prevents lysosomal damage in experimental myocardial ischemic rats"*. J. Medicinal Plants Research, 6 (2012) 18: 3445-3449
81. M. Kopacz, E. Woznicka, J. Gruszecka: *"Antibacterial activity of morin and its complexes with La(III), Gd(III) and Lu(III) ions"*. Acta Pol. PHarm. 62 (2005) 65-67
82. S. L. Hsiu, C. W. Tsao, Y. C. Tsai, H. J. Ho, P. D. L. Chao: *"Determination of Morin, Quercetin and Their Conjugate Metabolites in Serum"* Biol. PHarm. Bull. 24 (2001) 8: 967–969
83. D. A. Kostić, S. S. Mitić, G. Ž. Miletić: *"Kinetic determination of morin nanoamounts"*. J. Serb. Chem. Soc. 69 (2004) 6: 477–483
84. P. Xiao, Q. Zhou, F. Xiao, F. Zhao, B. Zeng: *"Sensitive voltammetric determination of morin on multi-walled carbon nanotubes-paraffin oil paste electrode"*. Int. J. Electrochem. Sci.1 (2006) 228–237
85. J. B. Harborne, C. A. Williams: *"Advances in flavonoid research since 1992"*. PHYtochemistry 55 (2000) 481-454
86. A. Garg, S. Garg, L. J. Zaneveld, A. K. Singla: *"Chemistry and pHarmacology of the Citrus bioflavonoid hesperidin"*. PHytother. Res. 15 (2001) 655-669

87. H. Chiba, M. Uehara, J. Wu, X. Wang, R. Masuyama, K. Suzuki, K. Kanazawa, Y. Ishimi: "*Hesperidin, a citrus flavonoid, inhibits bone loss and decreases serum and hepatic lipids in ovariectomized mice*". J. Nutr. 133 (2003) 1892-1897
88. Y. C. Lee, C. Y. Huang, T. T. Wen, K. C. Suen: "*Determination of liquiritin, glycyrrhizin, hesperidin, cinnamic acid, cinnamaldehyde, honokiol and magnolol in the traditional Chinese medicinal preparation Wu-Ji-San by high-performance liquid chromatography*". J. Chromatogr. A, 692 (1995) 137-145
89. X. Li, H. Xiao, X. Liang, D. Shi, J. Liu: "*LC-MS/MS determination of naringin, hesperidin and neohesperidin in rat serum after orally administering the decoction of Bulpleurum falcatum L. and Fractus aurantii*". J. Pharm. Biomed. Anal. 34 (2004) 159-166
90. G. J. Volikakis, C. E. Efstathiou: "*Determination of rutin and other flavonoids by flow-injection/adsorptive stripping voltammetry using nujol-graphite and diphenylether-graphite paste electrodes*". Talanta 51 (2000) 775-785
91. D. Obendorf, E. Reichart: "*Determination of hesperidin by cathodic stripping voltammetry in orange juice and helopyrin, a phytopharmaceutical preparation*", Electroanalysis 7 (1995) 11: 1075-1081
92. N. Pejić, S. Blagojević, S. Anić, V. Vukojević, Lj. Kolar-Anić: "*Microquantitative determination of hesperidin by pulse perturbation of the oscillatory reaction system*". Anal. Bioanal. Chem. 381 (2005) 775-780
93. T. Guardia, A. E. Rotelli, A. O. Juarez, L. E. Pelzer: "*Anti-inflammatory properties of plant flavonoids. Effects of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat*". Il Farmaco, 56 (2001) 9: 683 – 687
94. M. Comalada, D. Camuesco, S. Sierra, I. Ballester, J. Xaus, J. Galvez, A. Zarzuelo: "*In vivo quercetin anti-inflammatory effect involves release of quercetin, which inhibits inflammation through down-regulation of the NF-kappaB pathway*". Eur. J. Immunol. 35 (2005).584–592
95. M. Ibarra, L. Moreno, R. Vera, A. Cogolludo, J. Duarte, J. Tamargo, F. Perez-Vizcaino: "*Effects of the Flavonoid Quercetin and its Methylated Metabolite*

- Isorhamnetin in Isolated Arteries from Spontaneously Hypertensive Rats*".
 Planta Med. 69 (2003) 11: 995-1000.
96. M. P.N. Naira, C. Kandaswami, S. Mahajan, K. C. Chadha, R. Chawda, H. Nair, N. Kumar, R.E. Nair, S. A. Schwartz: "*The flavonoid, quercetin, differentially regulates Th-1 (IFN γ) and Th-2 (IL4) cytokine gene expression by normal peripheral blood mononuclear cells*". Biochimica et Biophysica Acta, 1593 (2002) 29–36
 97. N. Pejić, V. Kuntić, Z. Vujić, S. Mičić: "*Direct spectrophotometric determination of quercetin in the presence of ascorbic acid*". Il Farmaco, 59 (2004) 21–24
 98. S. Wang, D. Di, X. Liu, S. Jiang: "*Determination of Luteolin and Quercetin in the Capsule of *Lamiophlomis Rotata* (Benth.) Kudo by HPLC Coupled with Weighted Least Squares Linear Regression*". J. Liquid Chromatography & Related Technologies 30(2007) 13:1991-1999
 99. G. J. Volikakis, C. E. Efstathiou: "*Fast screening of total flavonols in wines, tea-infusions and tomato juice by flow injection/adsorptive stripping voltammetry*". Analyt. Chim. Acta, 551 (2005) 124–131
 100. M. J. Ahmed, J. Hossan: "*Spectrophotometric determination of aluminium by morin*". Talanta, 42 (1995) 1135-1142
 101. J. Zhang, J. Wang, J. S. Brodbelt: "*Characterization of flavonoids by aluminum complexation and collisionally activated dissociation*". J. Mass Spectrom. 40 (2005) 350 – 363
 102. J.P. Cornard, J.C. Merlin: "*Structural and spectroscopic investigation of 5-hydroxyflavone and its complex with aluminium*". J. Molec. Struct, 569 (2001) 129-138
 103. R. Sai Sathish, A. Goutam Raju, G. Nageswara Rao, C. Janardhana: "*A fluorescent fluoride ion probe based on a self-organized ensemble of 5-hydroxyflavone–Al(III) complex*". Spectrochim. Acta Part A, 69 (2008) 282–285

104. J.P. Cornard, J.C. Merlin: *"Complex of aluminium (III) with isoquercitrin : spectroscopic characterization and quantum chemical calculations"*. Polyhedron 21 (2002) 2801-2810
105. A.C. Boudet, J. Cornard, J.C. Merlin: *"Conformational and spectroscopic investigation of 3-hydroxyflavone-aluminium chelates"*. Spectrochim. Acta Part A, 56 (2000) 829 – 839
106. G. T. Castro, S. E. Blanco: *"Structural and spectroscopic study of 5,7-dihydroxyflavone and its complex with aluminum."* Spectrochim. Acta Part A, 60 (2004) 2235–2241
107. A. del Olmo, C. Caramelo, C. SanJose: *"Fluorescent complex of pyoverdin with aluminum"* J. Inorg. Biochem. 97 (2003) 384–387
108. P. Đurđević, M. Jelikić-Stankov, D. Stankov: *"Fluorescence reaction and complexation equilibria between norfloxacin and aluminium(III) ion in chloride medium"*. Analyt. Chim. Acta 300 (1995) 253-259
109. Chan-II Park, Ki-Won Cha: *"Spectrofluorimetric method for determination of aluminium with chromotropic acid and its application to water samples"*. Talanta 51 (2000) 769 – 774
110. S. Beniz Gündüz, S. Küçükkolbaşı, O. Atakol, E. Kylyç: *"Spectrofluorimetric determination of trace aluminum in diluted hemodialysis solutions"*. Spectrochim. Acta Part A, 61 (2005) 913–921
111. Cheng Zhi Huang, Yuan Fang Li, Shen Yang Tong: *"Spectrofluorimetric Determination of Nucleic Acids with Aluminum(III)/8-Hydroxyquinoline Complex"*. Analyt. Lett. 30 (1997) 7: 1305-1319
112. L. Friberg, G.F. Nordberg V.B. Vouk (Eds.): *Handbook on the Toxicology of Metals*, 2nd edn., Vol. 2, (1986), Chapter 1, Elsevier, Amsterdam, 1-209
113. C.G. Elinder L. Ahrengart, V. Lidums, E. Petterson B. Sjogren: *" Evidence of aluminium accumulation in aluminium welders"*. Br. J. Ind. Med. 48 (1991) 11: 735–738
114. D. R. Craper, S. S. Krishnan, A. J. Dalton: *"Brain aluminium distribution in Alzheimer's disease and experimental neurofibrillary degeneration"*. Science, 108 (1973) 511-513

115. R. K. Iyer, S. G. Jadhav, *Science Today*, 24 (1990) 9
116. B. Venugopal, T. D. Luckey: *"Aluminium, in Metal Toxicity in Mammals-2"*. Plenum Press, New York, (1979), 104, 112
117. A. K. De: *Chemical Toxicology in Environmental Chemistry*, Wiley Eastern Limited, New Delhi, (1989) p. 66
118. J.R. Albani: *"Structure and dynamics of macromolecules: Absorption and fluorescence studies"*, Elsevier, (2004) p. 61
119. J. E. Haky: *"Resolution in HPLC: Selectivity, Efficiency, and Capacity; Encyclopedia of Chromatography"*. Marcel Dekker, INC, New York (2001)
120. D. A. Skoog, D. M. West, F. J. Holler, S.R.Crouch: *"Fundamentals of Analytical Chemistry"*. 8. ed. Belmont: Brooks / Cole (2004)
121. J. D. Winefordner: *"Sample preparation techniques in analytical chemistry"*. Institute of Technology, New Jersey (2003)
122. D. D. Perrin, B. Dempsey: *"Buffers for pH and Metal Ion Control"*. Chapman and Hall, London, (1974) p. 77–94
123. J. Yoe, A. Jones: *"Colorimetric determination of iron with disodium-1,2-dihydroxybenzene-3,5-disulfonate"*. *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.* 16 (1944) 111-115
124. H. Irving, T. Pierce: *"Observations on Job's method of continuous variations and its extension to two-pHase systems"*. *J. Chem. Soc.* (1959) 2565-2574
125. P. Job: *"Formation and stability of inorganic complexes in solution"*. *Annali di Chimica Applicata*, 9, (1928) 113–203
126. J. Inczédy: *Analytical Applications of Complex Equilibria*, Horwood and Willy, New York, (1976) p. 137
127. D. Malešev, Z. Radović, M. Jelikić-Stankov: *"Investigation of the molybdate(II)-3-hydroxyflavone complex"*. *Monatsh. Chem.* 122 (1991) 429-434
128. D. Malešev, Z. Radović, M. Jelikić-Stankov, *"Investigation of europium(III)-rutin complex in water-ethanolic solution"*. *Spectrosc. Lett.* 26 (1993) 1985-1995

129. M. Obradović, D. Veselinović, P. Đurđević: *"Fizičko-hemijske metode ispitivanja ravnoteža u kompleksirajućim sredinama"*. Filozofski fakultet, Niš, Fakultet za fizičku hemiju, Beograd, (1996)
130. J. N. Miller, J. C. Miller: *In Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*, 5th ed. Pearson Education, London, (2005), p. 121;
131. *Validation of analytical procedures: Methodology*, ICH Guideline Q2B. (1997), Federal Register 62, No. 96, p. 27463–27467
132. <http://www.aijn.org/pages/cop/cop.html>
133. M. Shaghaghia, J. L. Manzooria, A. Jouyban: *"Determination of total pHenols in tea infusions, tomato and apple juice by terbium sensitized fluorescence method as an alternative approach to the Folin–Ciocalteu spectrophotometric method"*. Food Chemistry 108 (2008) 695–701
134. S. L. Hsiu, C. W. Tsao, Y. C. Tsai, H. J. Ho, P. D. L. Chao: *"Determinations of Morin, Quercetin and Their Conjugate Metabolites in Serum"*. Biol. PHarm. Bull. 24 (2001) 8: 967–969
135. A. Ćirić, H. Prosen, M. Jelikić-Stankov, P. Đurđević: *"Evaluation of matrix effect in determination of some bioflavonoids in food samples by LC-MS/MS method"*. Talanta, 99 (2012) 780-790
136. Y. Yang, H. Li, K Gao, M. Liu, Y. Sun, T. Yan, J. P. Fawcett, Y. Cui, J. Gu: *"Simultaneous quantitation of dexamethasone palmitate and dexamethasone in human plasma by liquid chromatography/tandem mass spectrometry"*. J. Chromatogr. B 862 (2008) 119-124
137. A. Browne, J. G. McColl, C. T. Driscoll: *Aluminum speciation using morin. I, Morin and its complexes with aluminum II.* J. Environ. Qual. 19,(1990) 1: 65-72, 73-82
138. C. Septhum, V. RattanapHani, S. RattanapHani: *UV-Vis spectroscopic study of natural dyes with alum as a mordant.* Suranaree J. Sci. Technol. 14, (2007) 1: 91-97
139. K. Jagasia, B. Haldar, *Acid dissociation constants of morin in ethanol-water mixture* J. Ind. Chem. Soc. 40 (1963) 287-292

140. M. S. Shuman: *Dissociation pathways and species distribution of aluminum bound to an aquatic fluvic acid*. Environmental Science and Technology. 26 (1992) 593–598
141. S. V. Jovanović, S. Steeden, M. Tošić, B. Marjanović, M. G. Simić: *"Flavonoids as Antioxidants"*, J. Am. Chem. Soc., 116 (1994) 4846-4851
142. K. Behera, S. Pandey, *"Interaction between ionic liquid and zwitterionic surfactant: A comparative study of two ionic liquids with different anions"*. J. Colloid and Interface Sci. 331 (2009) 196–205
143. E. A. Saad, L. H. Khalil, M.T. M. Zaki, A. A. Abu El-Ella: *"Determination of Zirconium (IV) and Aluminium (III) in Waste Water"*. Microchim. Acta, 140 (2002)1-2: 87-91
144. V. Kuntić, N. Pejić, S. Mičić, D. Malešev, Z. Vujić: *"Determination of dissociation constants of quercetin"*. PHarmazie, 58 (2003) 6: 439-440
145. G. Erdogan, R. Karadag, E. Dolen: *"Potentiometric and Spectrophotometric Determination of the Stability Constants of Quercetin Complexes with Aluminium(III) and Iron(II)"*. Reviews in Analytical Chemistry, 24 (1981) 4: 247–262

BIOGRAFIJA AUTORA

Leposava Pavun (rođ. Popović), rođena je 20. 05. 1966. godine u Užicu, gde je završila osnovnu i srednju školu prirodno-tehničke struke. Prirodno-matematički fakultet Univerziteta u Beogradu, studijska grupa fizička hemija, upisala je školske 1984/85. gde je 09. 07. 1990. godine diplomirala sa srednjom ocenom 8,08 u toku studija i ocenom 10 na diplomskom radu. Tema diplomskog rada bila je “Sorpcija n-heksana na LiX iLiY zeolitima: Izosterne toplote sorpcije”.

Magistarsku tezu pod nazivom ”Ispitivanje kompleksa gvožđe (III) i uranil-jona sa fenilefrinom i orciprenalinom” odbranila je 17. 11. 1998. na Fakultetu za fizičku hemiju Univerziteta u Beogradu.

Od oktobra 1990. do 01. aprila 1991. Leposava Pavun je radila kao honorarni saradnik u praktičnoj nastavi u Zavodu za fizičku hemiju Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Aprila 1991. god. izabrana je u zvanje asistenta-pripravnika na predmetu Fizička hemija i instrumentalne metode na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Od 01. januara 1997. do 24. januara 1999. radila je kao stručni saradnik u Institutu za fizičku hemiju Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. U januaru 1999. god. izabrana je u zvanje asistenta za premet Fizička hemija i instrumentalne metode na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu. U januaru 2003. god. i septembru 2007. god. izabrana je u zvanje asistenta za užu naučnu oblast Fizička hemija na istom fakultetu. U isto zvanje je reizabrana 01. oktobra 2010. god.

Leposava Pavun je objavila 8 naučnih radova u domaćim i međunarodnim časopisima, a na domaćim i inostranim naučnim skupovima je učestvovala sa 7 radova.

BIBLIOGRAFIJA

OBJAVLJENI NAUČNI RADOVI I SAOPŠTENJA PROISTEKLI IZ DOKTORSKE DISERTACIJE

Radovi u istaknutim međunarodnim časopisima (M 22):

1. **Leposava Pavun**, Daniela Đikanović, Predrag Đurđević, Milena Jelikić -Stankov, Dušan Malešev, Andrija Ćirić; Spectrofluorimetric and HPLC Determination of Morin in Human Serum, *Acta Chim. Slov.* (2009), (56): 967–972.

IF 2007 = 1,039 (59/127)

Radovi u međunarodnim časopisima (M 23):

1. **Leposava A. Pavun**, Jasmina M. Dimitrić- Marković, Predrag T. Đurđević, Milena D. Jelikić-Stankov, Daniela B. Đikanović, Andrija R. Ćirić, Dušan L. Malešev; Development and validation of a fluorometric method for the determination of hesperidin in human plasma and pharmaceutical forms, *J. Serb. Chem. Soc.* (2012), 77 (11): 1625–1640.

IF 2011 = 0,879 (103/154)

Radovi u časopisima nacionalnog značaja (M 52)

1. **Leposava Pavun**, Jasmina Dimitrić Marković, Predrag Đurđević, Milena Jelikić Stankov, Daniela Đikanović, Dušan Malešev, Snežana Uskoković-Marković; Fluorometric determination of hesperidin in orange juices available on Serbian market, *Acta Agriculturae Serbica* (2012), 17(34): 93-103.

**OBJAVLJENI NAUČNI RADOVI I SAOPŠTENJA KOJI NISU PROISTEKLI
IZ DOKTORSKE DISERTACIJE**

Radovi u međunarodnim časopisima (M 23):

1. **Leposava Pavun**, Dušan Malešev, Dragan Veselinović;
Spectrophotometric investigation of the uranyl-phenylephrine system, *J. Serb. Chem. Soc.* (2007), 72 (8-9): 799-807.

IF 2007 = 0,536 (95/127)

Radovi u međunarodnim časopisima koji nisu na SCI listi

1. **Leposava Pavun**, Snežana Uskoković-Marković, Dušan Malešev;
Spectrophotometric Study of Uranyl - Orciprenaline Complex and its Application for Orciprenaline Determination in Pharmaceutical Preparations, *Technologica Acta* (2011), 4(2): 19-26.

Radovi u časopisima nacionalnog značaja (M 52)

1. Dušan Malešev, Dragan Veselinović, Zorica Radović, **Leposava Pavun**;
Određivanje fenilefrina pomoću kompleksa Fe (III) - fenilefrin, *Arh. Farm.* (1995), (1-2): 9-13.
2. Dušan Malešev, Dragan Veselinović, Zorica Radović, **Leposava Pavun**;
Spektrofotometrijsko ispitivanje kompleksa Fe (III) -orciprenalin, *Arh. Farm.* (1995), (3-4): 85-88.

3. **Leposava Pavun**, Dušan Malešev, Dragan Veselinović; Termodinamičke konstante stabilnosti kompleksa Fe (III) -jona sa fenilefrinom i orciprenalinom, *Arh. Farm.* (2003), 27-36.

Radovi sopšteni na međunarodnim skupovima štampani u celini (M 33):

1. **Leposava Pavun**, Dušan Malešev, Zorica Radović, Dragan Veselinović; The Determination of Thermodynamic Stability Constants of Complexes of Fe (III)- ion with Orciprenaline and Phenylephrine, *Physical Chemistry '98*, 4th International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry, 23-25. September 1998. Belgrade, p. 588-590.

2. **Leposava Pavun**, Dušan Malešev, Milica Bogavac, Dragan Veselinović; Spectrophotometric Investigation of Uranil- orciprenaline Complex; *Physical Chemistry '98*, 4th International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry, 23-25. September 1998. Belgrade, p. 615-617.

3. **Leposava Pavun**, Dušan Malešev, Zorica Radović, Dragan Veselinović; The Determination of Thermodynamic Stability Constant of the Complex of Uranil Ion with Phenylephrine, *Physical Chemistry 2000* 5th International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry, 27-29. September 2000, Belgrade, p. 625-627.

Radovi sopšteni na međunarodnim skupovima štampani u izvodu (M 34):

1. **Leposava Pavun**, Dušan Malešev, Ankica Jovanović, Milica Bogavac, Vesna Kuntić;

Spectrophotometric Determination of Phenylephrine by Uranil-ion, *Pharmacy World Congress '98*, 58th International Congress of FIP; Hague, Netherlands 30. August - 4. September 1998, Abstracts FIP '98. p. 183

Radovi sopšteni na domaćim skupovima štampani u izvodu (M 64):

1. **Leposava A. Pavun**, Radmila V. Hercigonja, Vukosava M. Radak; Izosterne toplote sorpcije n-heksana na LiX i LiY zeolitima, I savetovanje Društva fizikohemičara "Fizička hemija 92", Beograd, knjiga izvoda str. 260.

2. **Leposava Pavun**, Dušan Malešev, Zorica Radović; Spektrofotometrijsko određivanje fenilefrina pomoću Fe^{3+} jona, I kongres farmaceuta SRJ, Vrnjačka Banja, 17-20. april 1994., knjiga izvoda str. 122-123.

3. **Leposava Pavun**, Dušan Malešev, Dragan Veselinović, Zorica Radović; Spektrofotometrijsko određivanje alupenta pomoću Fe(III) jona, II savetovanje Društva fizikohemičara "Fizička hemija 94", 26-28. septembar 1994. Beograd, knjiga izvoda str. 26-28.

Odbranjena magistarska teza (M 72)

1. **Leposava Pavun** "Ispitivanje kompleksa gvožđe (III) i uranil-jona sa fenilefrinom i orciprenalinom", Magistarski rad, Fakultet za fizičku hemiju, Univerzitet u Beogradu, (1998).

Dodatne aktivnosti:

1. Vesna Kuntić, Mara Aleksić, **Leposava Pavun** i Nataša Pejić; *Zbirka zadataka iz fizičke hemije*, Ed: mr Leposava Pavun, Beograd 2003.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписана: **Лепосава А. Павун**

број уписа

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом:

**СПЕКТРОФЛУОРИМЕТРИЈСКО ИСПИТИВАЊЕ КОМПЛЕКСНИХ ЈЕДИЊЕЊА МОРИНА,
ХЕСПЕРИДИНА И КВЕРЦЕТИНА СА АЛУМИНИЈУМОМ**

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

Лепосава Павун

У Београду, 20. 05. 2013.

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора: **Лепосава А. Павун**

Број уписа

Студијски програм

Наслов рада: **СПЕКТРОФЛУОРИМЕТРИЈСКО ИСПИТИВАЊЕ КОМПЛЕКСНИХ
ЈЕДИЊЕЊА МОРИНА, ХЕСПЕРИДИНА И КВЕРЦЕТИНА СА
АЛУМИНИЈУМОМ**

Ментори: **др Јасмина Димитрић Марковић, ванредни професор**

др Милена Јеликић – Станков, редовни професор

Потписани: **Лепосава А. Павун**

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду.**

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

Лепосава Павун

У Београду, 20.05. 2013.

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

**СПЕКТРОФЛУОРИМЕТРИЈСКО ИСПИТИВАЊЕ КОМПЛЕКСНИХ ЈЕДИЊЕЊА МОРИНА,
ХЕСПЕРИДИНА И КВЕРЦЕТИНА СА АЛУМИНИЈУМОМ**

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство

2. Ауторство - некомерцијално

3. Ауторство – некомерцијално – без прераде

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима

5. Ауторство – без прераде

6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

Лепосава Павун

У Београду, 20. 05. 2013.

1. Ауторство - Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. Ауторство – без прераде. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписана: **Лепосава А. Павун**

број уписа

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом:

**СПЕКТРОФЛУОРИМЕТРИЈСКО ИСПИТИВАЊЕ КОМПЛЕКСНИХ ЈЕДИЊЕЊА МОРИНА,
ХЕСПЕРИДИНА И КВЕРЦЕТИНА СА АЛУМИНИЈУМОМ**

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 20. 05. 2013.



Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора: **Лепосава А. Павун**

Број уписа

Студијски програм

Наслов рада: **СПЕКТРОФЛУОРИМЕТРИЈСКО ИСПИТИВАЊЕ КОМПЛЕКСНИХ
ЈЕДИЊЕЊА МОРИНА, ХЕСПЕРИДИНА И КВЕРЦЕТИНА СА
АЛУМИНИЈУМОМ**

Ментори: **др Јасмина Димитрић Марковић, ванредни професор**

др Милена Јеликић – Станков, редовни професор

Потписани: **Лепосава А. Павун**

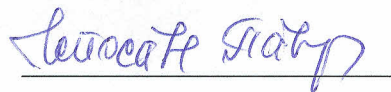
изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 20.05. 2013.



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

**СПЕКТРОФЛУОРИМЕТРИЈСКО ИСПИТИВАЊЕ КОМПЛЕКСНИХ ЈЕДИЊЕЊА МОРИНА,
ХЕСПЕРИДИНА И КВЕРЦЕТИНА СА АЛУМИНИЈУМОМ**

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 20. 05. 2013.

Светозар Марковић

1. Ауторство - Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.