



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ

Андрија Тирић

**ОПТИМИЗАЦИЈА И ВАЛИДАЦИЈА ТЕЧНО-
ХРОМАТОГРАФСКЕ МЕТОДЕ ЗА ОДРЕЂИВАЊЕ
ФЛАВАНОНА И ЊИХОВИХ ДЕРИВАТА У
ФАРМАЦЕУТСКИМ ФОРМУЛАЦИЈАМА И ХРАНИ**

Докторска дисертација

Крагујевац, 2014.

I. Аутор

Име и презиме: Андрија Ћирић

Датум и место рођења: 20.07.1981. године, Краљево

Садашње запослење: Асистент Природно-математичког факултета, Крагујевац

II. Докторска дисертација

Наслов: Оптимизација и валидација течно-хроматографске методе за одређивање флаванона и њихових деривата у фармацеутским формулацијама и храни

Број страница: 261

Број слика: 128

Број библиографских података: 353

Установа и место где је рад израђен:

1. Институт за хемију, Природно-математичког факултета, Универзитета у Крагујевцу, Србија
2. Катедра за аналитичку хемију, Факултета за хемију и хемијску технологију, Универзитета у Љубљани, Словенија

Научна област (УДК): Аналитичка хемија (54)

Ментор: проф. др Предраг Ђурђевић, Н.О. Аналитичка и неорганска хемија

III. Оцена и одбрана

Датум пријаве теме: 08.09.2010. године, Одлуком број 790/XII-3

Број одлуке и датум прихватања докторске дисертације: 1877/6, 10.11.2010. године

Комисија за оцену подобности теме и кандидата:

1. Др Предраг Ђурђевић, ред. проф. Природно-математичког факултета у Крагујевцу
2. Др Милена Јеликић-Станков, ред. проф. Фармацеутског факултета у Београду
3. Др Радмила Цудовић, ванред. проф. Природно-математичког факултета у Крагујевцу

Комисија за оцену докторске дисертације:

1. Др Предраг Ђурђевић, ред. проф. Природно-математичког факултета у Крагујевцу
2. Др Душанка Милојковић-Опсеница, ред. проф. Хемијског факултета у Београду
3. Др Милена Јеликић-Станков, ред. проф. Фармацеутског факултета у Београду
4. Др Татјана Анђелковић, ванред. проф. Природно-математичког факултета у Нишу

Комисија за одбрану докторске дисертације:

1. Др Предраг Ђурђевић, ред. проф. Природно-математичког факултета у Крагујевцу
2. Др Душанка Милојковић-Опсеница, ред. проф. Хемијског факултета у Београду
3. Др Милена Јеликић-Станков, ред. проф. Фармацеутског факултета у Београду
4. Др Татјана Анђелковић, ванред. проф. Природно-математичког факултета у Нишу

Датум одбране дисертације: 2014.

Дуњи и Михајлу

Ова дисертација је плод доприноса многих људи који су посредно или непосредно учествовали у њеном обликовању и изради.

Рађена је у Институту за хемију, Природно-математичког факултета у Крагујевцу и Факултету за хемију и хемијску технологију, Универзитета у Љубљани, Словенија, под руководством др Предрага Ђурђевића, редовног професора.

Захваљујем се др Предрагу Ђурђевићу, који је предложио тему дисертације, руководио њеном израдом и указао ми помоћ током израде и писања.

Неизмерну захвалност дугујем др Хелени Просен, ванредном професору Факултета за хемију и хемијску технологију у Љубљани, која је руководила израдом једног дела дисертација и пружила ми несебичну помоћ приликом писања докторске дисертације.

Др Милени Јеликић-Станков, редовном професору Фармацеутског факултета у Београду, др Александри Ђурђевић, начелнику инструменталне лабораторије Агенције за лекове и медицинска средства Србије, Београд и др Љубинки Јоксовић, доценту Природно-математичког факултета у Крагујевцу, захваљујем на корисним саветима и сугестијама током израде и прегледа рукописа докторске дисертације. Такође се захваљујем и колегама са Института за хемију Природно-математичког факултета у Крагујевцу на помоћи и подршци приликом израде и писања дисертације.

Посебну захвалност дугујем породици на подршци и разумевању.

Списак скраћеница

γ	– Површински напон
s_r	– Стандардна девијација одступања поновљених мерења
\bar{x}	– Средња вредност мерења
1D	– Једноимензионална мапа резолуције
2D	– Дводимензионална мапа резолуције
2λ	– Константа која је приближно једнака 1
3GT	– Флаванон 3-глукозид трансфераза
4CL	– 4-Кумарил-СоА лигаза
6,8DF	– 1-циклопропил-7-[(S,S)-2,8-диазабицикло[4.3.0]нон-8-ил]-6,8-дифлуоро-1,4-дихидро-4-оксо-3-хинолон карбоксилна киселина
6,8DM	– 1-циклопропил-7-[(S,S)-2,8-диазабицикло[4.3.0]нон-8-ил]-6,8-диметокси-1,4-дихидро-4-оксо-3-хинолон карбоксилна киселина
6F8E	– 1-циклопропил-7-[(S,S)-2,8-диазабицикло[4.3.0]нон-8-ил]-8-етокси-6-флуоро-1,4-дихидро-4-оксо-3-хинолон карбоксилна киселина
6M8F	– 1-циклопропил-7-[(S,S)-2,8-диазабицикло[4.3.0]нон-8-ил]-8-флуоро-6-метокси-1,4-дихидро-4-оксо-3-хинолон карбоксилна киселина
A_{ext}	– Екстраполисана вредност апсорбације
A_{max}	– Измерена максимална апсорбација
ANS	– Антоцианидин синтетаза
br	– Развучен
C4H	– Цинамат-4-хидроксилаза
SEC	– Капиларна електро хроматографија
CE-MS	– Капиларна електрофореза – масена спектрометрија
CHI	– Халкон изомераза
CHR	– Халкон редуктаза
CHS	– Халкон синтетаза
CID	– Дисоцијација изазвана сударом
C_L	– Концентрација лиганда
C_M	– Концентрација јона метала
CoA	– Коензим А
CV	– Коефицијент варијације
CZE	– Капиларна зонска електрофореза
d	– Дублет
dd	– Дублет дублета
DFT	– Дихидрофлаванон редуктаза
D_m	– Дифузиони коефицијент анализата у мобилну фазу
DMSO	– Диметил-сулфоксид
d_p	– Просечна величина честица пуњења
E	– Диелектрична константа растварача
EI	– Удар електрона
ESI-MS	– Електроспреј јонизациони масени спектрометар
FAB-MS	– Брзо бомбардовање атома масени спектрометри
FHT	– Флаванон хидрокситрансфераза
FID	– Пламени јонизациони детектор
FLD	– Флуориметријски детектор
FLS	– Флавонол синтетаза
FSI	– Флаванон синтетаза

GC-MS	– Гасна хроматографија – масена спектрометрија
HETP	– Висина еквивалентна теоретском поду
HILIC	– Течна хроматографија хидрофилних интеракција
HSCCC	– Хроматографија брзе измене струје
HTLC	– Високо-температурна течна хроматографија
ICH	– Међународна Конференција о Хармонизацији Техничких Захтева за Регистрацију Лекова
IFS	– Изофлаванон синтетаза
IR	– Инфрацрвена област електромагнетног зрачења
k	– Ретенциони фактор
K _a	– Константа дисоцијације
K ^e	– Молекуларни параметар растварача
L	– Лиганд
LAR	– Леукоантоцианидин редуктаза
LC×LC	– Дводимензионална течна хроматографија
LC-MS/MS	– Течна хроматографија-масена спектрометрија
LOD	– Граница детекције
LOQ	– Граница квантификације
m	– Мултиплет
MAE	– Микроталасна екстракција
MALDI-MS	– Масена спектрометрија са ласерском десорпционом јонизацијом потпомогнутом матриксом
МЕКС	– Мицеларна електрокинетичка хроматографија
MOX	– Моксифлоксацин хидрохлорид
N	– Број теоретских подова
NMR	– Нуклеарна магнетна резонанца
PAL/TAL	– Фенилаланин-тирозин амонијум лаза
PDA	– Фотодиодни детектор
PLE	– Течна екстракција при повишеном притиску
P _o	– Атмосферски притисак
R	– Универзална гасна константа
RP-C18	– Реверзно-фазне C18 колоне
RP-HPLC	– Реверзно-фазна високо-ефикасна течна хроматографија
R _s	– Резолуција између два суседна пика
RSD	– Релативна стандардна девијација
s	– Синглет
S	– Растворак
s _b	– Стандардна девијација
SEL	– Селективност/специфичност
SFE	– Суперкритична флуид екстракција
SIM	– Мониторинг изабраног јона
THF	– Тетрахидрофуран
t _r	– Ретенционо време
UHPLC	– Ултра високо-ефикасна течна хроматографија
UV	– Ултраљубичасто електромагнетно зрачење
Vis	– Видљива област електромагнетног зрачења
W	– Ширина пика у основи
H _p	– Висину еквивалентна теоријском поду који зависи од брзине протока мобилне фазе
ΔG ⁰	– Промена стандардне слободне енергије

- ΔH^0 – Промена стандардне енталпије
- ΔS^0 – Промена стандардне ентропије
- ν – Брзина протока мобилне фазе
- ω – Коefицијент одређен величином пора, обликом и величином честица

Садржај

Извод.....	1
Summary	4
Увод.....	7
1. ОПШТИ ДЕО	10
1.1. Флавоноиди.....	11
1.1.1. Историјат флавоноида.....	11
1.1.2. Номенклатура флавоноида.....	12
1.1.3. Распрострањеност и улога флавоноида у природним производима.....	14
1.1.4. Биосинтеза флавоноида.....	16
1.1.5. Физичко-хемијске особине флавоноида.....	17
1.1.5.1. Липофилност биофлавоноида	17
1.1.5.2. Киселинско-базне особине флавоноида.....	18
1.1.5.3. UV/Vis апсорпциони спектри флавоноида	20
1.1.5.4. Флуоресцентни спектри флавоноида	21
1.1.5.5. IR спектри флавоноида	22
1.1.5.6. NMR спектри флавоноида	24
1.1.5.7. Масени спектри флавоноида	27
1.1.6. Комплекси флавоноида са јонима метала	29
1.1.6.1. Карактеризација комплекса флавоноида и метала применом IR спектроскопије.....	35
1.1.6.2. Карактеризација комплекса флавоноида са јонима метала применом масене спектрометрије.....	36
1.1.7. Екстракција полифенолних једињења из биљних узорака	37
1.1.8. Одређивање фенолних једињења	38
1.1.8.1. Течна хроматографија (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)	38
1.1.8.2. Гасна хроматографија (GC).....	40
1.1.8.3. Спектрофотометријске методе.....	41
1.1.8.4. Друге методе за одвајање и квантификацију фенолних једињења.....	41
1.1.9. Антиоксидативна активност флавоноида	42
1.1.9.1. Механизам и кинетика антиоксидативне активности флавоноида	44

1.1.9.2. Веза између структуре и антиоксидативне активности флавоноида (QSAR студија)	48
1.1.10. Значај флавоноида и њихова фармаколошка активност	49
1.2. Хинолони	50
1.2.1. Природни извор хинолона и њихових деривата	51
1.2.2. Биосинтеза хинолона и њихових деривата	51
1.2.3. Методе за синтезу 2-арил-4-хинолонских деривата	52
1.2.4. Номенклатура флуорохинолона	52
1.2.5. Моксифлоксацин	53
1.2.5.1. Синтеза моксифлоксацина	54
1.2.5.2. Физичко-хемијске карактеристике моксифлоксацина	57
1.2.5.3. Стабилност моксифлоксацина	61
1.2.5.4. Литературни преглед метода за одређивање моксифлоксацина и његових деградационих производа	62
1.3. Припрема узорка за анализу	63
1.3.1. Прикупљање биљног материјала	63
1.3.2. Обрада прикупљене сировине	63
1.3.3. Сушење.....	64
1.3.4. Узорковање	64
1.3.5. Припрема узорка таблете за анализу	65
1.3.6. Екстракција	65
1.3.6.1. Екстракција на чврстој фази (Solid-phase extraction, SPE)	67
1.4. Инструменталне методе анализе	70
1.4.1. Високо-ефикасна течна хроматографија (HPLC)	70
1.4.1.1. Теорија хроматографије	71
1.4.1.2. Термодинамика ретенције	73
1.4.1.3. HPLC систем	75
1.4.1.4. HPLC колоне	76
1.4.1.5. Хроматографски параметри	78
1.4.1.6. Утицај рН на сепарацију анализата.....	79
1.4.1.7. Развој и оптимизација HPLC методе	81
1.5. Масена спектрометрија	82
1.5.1. Проблем састава мобилних фаза	84

1.5.2. Јонски извори	85
1.5.3. Електроспреј јонизација	86
1.5.4. Хемија јонизације	87
1.5.5. Анализатори маса	87
1.5.5.1. Квадрупол	88
1.5.5.2. Јонска замка	88
1.6. Утицај матричног ефекта на одређивање анализата применом MS	89
1.7. UV/Vis спектрофотометријске методе	91
1.8. Оптимизација инструменталних метода	94
1.8.1. Експериментални дизајн	94
1.8.2. Класични експериментални дизајн	94
1.8.3. Израчунавање ефеката	98
1.8.4. Оптимизациони дизајни	98
1.8.5. Факторски и централно композитни дизајн	99
1.9. Валидација модела (анализа варијанси, ANOVA)	101
1.10. Компјутерска симулација коришћењем програма Dry Lab [®] и LC-Simulator	103
1.11. Валидација аналитичке методе	105
1.11.1. Линеарност и опсег	105
1.11.2. Селективности/специфичност	105
1.11.3. Осетљивост	106
1.11.4. Тачност	106
1.11.5. Прецизност	106
1.11.6. Граница детекције	107
1.11.7. Граница квантификације	107
1.11.8. Робусност	107
1.12. Циљ и задатак рада	108
2. Експериментални део	109
2.1. Реагенси	110
2.1.1. Стандарди биофлавоноида	110
2.1.2. Стандарди хинолона	111
2.1.3. Узорци таблета и инфузија	112

2.1.4. Општи реагенси	112
2.2. Раствори	113
2.2.1. Основни раствори стандарда биофлавоноида	113
2.2.2. Основни раствори стандарда флуорохинолона.....	115
2.2.3. Основни раствори општих реагенаса	116
2.2.4. Радни раствори	117
2.3. Припрема узорака за анализу биофлавоноида	119
2.3.1. Поступак екстракције биофлавоноида из различитих узорака хране	120
2.3.2. Екстракција по Сокслету	120
2.3.3. Ултразвучна екстракција	120
2.3.4. Екстракција мацерацијом	121
2.3.5. Екстракција водом.....	121
2.4. Припрема узорка таблете и инфузије	121
2.5. Метода стандардног додатка.....	122
2.6. Апаратура и инструменти.....	124
2.6.1. Уситњавање, хомогенизација и течно-чврста екстракција	124
2.6.2. Хроматографски системи	126
2.6.3. LC-MS/MS систем	127
2.6.4. UV/Vis спектрофотометар.....	127
3. Експериментални резултати	129
3.1. Екстракција биофлавоноида из узорака хране биљног порекла	131
3.1.1. Течно-чврста екстракција биофлавоноида из екстраката коре поморанце, црвеног лука и меда.....	133
3.1.2. Оптимизација LC-MS/MS методе за одређивање биофлавоноида	135
3.1.3. Испитивање утицаја матричног ефекта на одређивање биофлавоноида у екстрактима хране	142
3.1.4. Одређивање биофлавоноида у узорцима црвеног лука, коре поморанце и меда	148
3.2. Оптимизација HPLC методе за одређивање биофлавоноида у узорцима фамилије <i>Brassica</i>	153
3.2.1. Прелиминарна испитивања	153
3.2.2. Оптимизација RP-HPLC методе за одређивање биофлавоноида у узорцима фамилије <i>Brassica</i>	154

3.2.3. Одређивање биофлавоноида у узорцима фамилије <i>Brassica</i>	159
3.2.4. Одређивање антиоксидативне активности екстракта фамилије <i>Brassica</i>	161
3.3. Оптимизација HPLC методе за одређивање моксифлоксацина и сродних супстанци у таблетама и инфузији	166
3.3.1. Прелиминарна испитивања	166
3.3.2. Развој HPLC методе за одвајање моксифлоксацина и сродних једињења	170
3.3.3. Одређивање сродних једињења моксифлоксацина	183
3.3.4. Одређивање нечистоћа у фармацеутским формулацијама “Avelox-a”	187
3.3.5. Одређивање производа присилне деградације моксифлоксацина	188
3.4. Спектрофотометријско одређивање моксифлоксацина у серуму	192
3.4.1. Прелиминарна испитивања	192
3.4.2. Оптимизација спектрофотометријских услова мерења	193
4. Дискусија резултата	206
4.1. Екстракција биофлавоноида из узорака хране	207
4.1.1. Течно-чврста екстракција биофлавоноида из екстракта хране	211
4.2. Процена матричног ефекта на LC-MS одређивање биофлавоноида у узорцима хране	213
4.3. Одређивање биофлавоноида у узорцима коре поморанце, црвеног лука и меда применом LC-MS/MS методе	217
4.4. Одређивање испитиваних биофлавоноида у узорцима коре поморанце, црвеног лука и меда применом LC-MS/MS методе.....	220
4.5. Поређење наше методе за одређивање биофлавоноида у узорцима хране са литературним подацима	220
4.5.1. Одређивање биофлавоноида у узорцима коре поморанце	220
4.5.2. Одређивање биофлавоноида у узорцима црвеног лука	221
4.5.3. Одређивање биофлавоноида у узорцима меда	222
4.6. HPLC-DAD анализа биофлавоноида узорака фамилије <i>Brassica</i>	223
4.6.1. Оптимизација хроматографских услова коришћењем програма ACD/LC Simulator	223
4.6.2. Одређивање биофлавоноида у узорцима фамилије <i>Brassica</i>	226
4.6.3. Поређење наше методе са литературним подацима одређивања биофлавоноида у узорцима фамилије <i>Brassica</i>	227
4.7. Антиоксидативна активност екстракта фамилије <i>Brassica</i>	228

4.8. HPLC-DAD анализа сродних једињења и нечистоћа моксифлоксацина (аналога флавоноида)	232
4.8.1. Оптимизација хроматографских услова коришћењем DryLab [®] програма	232
4.8.2. Одређивање сродних једињења и нечистоћа моксифлоксацина у Avelox [®] таблетама и инфузији	236
4.8.3. Поређење наше методе за одређивање нечистоћа и деградационих производа са литературним подацима	237
4.9. Спектрофотометријско одређивање моксифлоксацина у хуманом серуму	238
4.9.1. Поређење наше методе одређивања моксифлоксацина са литературним подацима	239
5. Закључак	241
6. Литература	244
7. Биографија	256
8. Научни радови.....	258

Списак слика и шема

Слика 1. Основне структуре скелета флавоноидних агликона	12
Слика 2. Хемијске структуре неких природних флавоноида и њихови извори. А) флавоноли, В) флавоноли, С) катехини, D) флаваноли, Е) флаванони и F) изофлавоноли	14,15
Шема 1. Детаљна шема биосинтезе флаванона и различитих класа флавоноида.....	16
Шема 2. Поступна дисоцијација каемпферола	19
Слика 3. Дистрибуциони дијаграм различитих врста каемпферола у функцији од рН.....	20
Слика 4. UV/Vis спектри флавоноида	21
Слика 5. Флуоресцентни ексцитациони (ex) и емисиони (em) спектар оноина у ацетонитрилу и води	22
Слика 6. IR спектар кверцетина	23
Слика 7. ¹ H NMR спектар даидзеина снимљен у DMSO	24
Слика 8. ¹³ C NMR спектар катехина.....	25
Слика 9. Масени спектар кверцетин3-О-галактозида у 70 % етанолу	28
Слика 10. Потенцијална места координовања метала за флавоноид	29
Слика 11. Потенциометријске титрационе криве за HClO ₄ , HClO ₄ + нарингенин, HClO ₄ + нарингенин + Al(III), HClO ₄ + нарингенин + Fe(II) у NaClO ₄ јонској средини.....	30
Слика 12. Крива формирања за нарингенин	30
Слика 13. Крива формирања комплекса Al(III) + нарингенин.....	31
Слика 14. UV/Vis спектри нарингинина (плава линија) и нарингинин-бакар комплекса (црвена линија).....	32
Слика 15. Job-ова крива за каемпферол-бакар комплекс.....	32
Слика 16. Емисиони флуоресцентни спектар кверцетина и кверцетин метал комплекса у метанолу на собној температури	33
Слика 17. IR спектар (a) морина и (b) морин-Cr(III) комплекса	36
Слика 18. Структурни критеријуми за антиоксидативну активност флавоноида.....	43
Слика 19. Механизам антиоксидативне активности 3',4'-дихидрокси флавоноида.....	45
Слика 20. Механизам антиоксидативне активности 3-хидроксифлавона.....	45
Слика 21. Апсорпциони спектар метанолског раствора DPPH.....	46
Слика 22. Шема антиоксидативне активности DPPH у реакцији са полифенолима	47
Слика 23. Кинетика радикалске реакције екстракта кумина праћена DPPH методом	47
Слика 24. Општа структура хинолона.....	50
Слика 25. Структуре хинолин-4(1H)-она (a) и ароматични хинолонски дериват (б)	50
Слика 26. Хемијске структуре гравеолина (a), едулеина (б).....	51
Слика 27. Синтеза гравеолина.....	51
Слика 28. Основне структуре хинолонских прстена	52

Слика 29. Структура моксифлоксацина.....	54
Шема 3. Први корак синтезе моксифлоксацина.....	54
Шема 4. Други ступањ синтезе моксифлоксацина.....	55
Шема 5. Пречишћавање моксифлоксацина за инфузију	55
Слика 30. UV спектар моксифлоксацина у метанолу на pH = 7,4	58
Слика 31. IR спектар моксифлоксацина снимљен КВг техником	59
Слика 32. ¹ H-NMR спектар моксифлоксацина снимљен техником Фурије-ове трансформације	59
Слика 33. ¹³ C-NMR спектар моксифлоксацина снимљен техником Фурије-ове трансформације.....	60
Слика 34. Масени спектар моксифлоксацина.....	60
Слика 35. Ток припреме узорка за анализу.....	63
Слика 36. Van Deemter-ова крива	73
Слика 37. Van Hoff-ове криве за два различита дистрибуциона система	75
Слика 38. Систем за HPLC анализу	76
Слика 39. Интеракције које се одвијају на површини силика-гела	77
Слика 40. Хроматограм добијен раздвајањем двокомпонентне смеше (1) и (2).....	78
Слика 41. Утицај pH на ретенцију базног анализата у хроматографији	79
Слика 42. Различити типови јонизације под атмосферским притиском.....	86
Слика 43. Електроспреј.....	86
Слика 44. Квадрупол	88
Слика 45. Јонска замка.....	88
Слика 46. Повезаност фактора и карактеристика процеса	94
Слика 47. Ток експерименталног дизајна	97
Слика 48. Централни композитни дизајн за два и три фактора. Сиви кругови образују коцку - број ранава 22 и 23. Црни кругови образују облик звезде	100
Слика 49. Изглед криве за методу стандардног додатка	123
Слика 50. Хомогенизатор Silent Crusher M Homogenizer	124
Слика 51. Апаратура за екстракцију по Сокслету.....	125
Слика 52. Ултразвучно купатило Sonorex DT 52 H	125
Слика 53. SPE манифолд Agilent	126
Слика 54. HPLC Agilent 1100 Series.....	126
Слика 55. HPLC систем Shimadzu.....	127
Слика 56. LC-MS/MS систем Perkin-Elmer / Applied Biosystems.....	127
Слика 57. UV/Vis спектрофотометар Perkin Elmer Lambda 35	128
Слика 58. Ефикасност екстракције биофлавоноида добијена ултразвучном екстракцијом из коре поморанце и црвеног лука у поређењу са екстракцијом по Сокслету (ефикасност екстракције = 100 %).....	133

Слика 59. Изглед радног прозора програма Analyst	136
Слика 60. Масени спектар кверцетина	138
Слика 61. Масени спектар рутина	138
Слика 62. Масени спектар хесперетина	138
Слика 63. Масени спектар хесперидина	138
Слика 64. Масени спектар каемпферола	138
Слика 65. Фрагментације рутина, кверцетина, каемпферола, хесперидина и хеспетерина	139
Слика 66. HPLC-DAD хроматограм смеше стандарда биофлавоноида снимљен под оптималним условима	141
Слика 67. TIC (total ion chromatogram) смеше стандарда биофлавоноида	141
Слика 68. HPLC-UV хроматограм редоследа елуирања полифенолних киселина и биофлавоноида	147
Слика 69. HPLC-UV хроматограм екстракта црвеног лука добијен ултразвучном екстракцијом на 280 nm	149
Слика 70. TIC екстракта црвеног лука	149
Слика 71. HPLC-UV хроматограм екстракта коре поморанце добијен ултразвучном екстракцијом на 280 nm	149
Слика 72. TIC екстракта коре поморанце	150
Слика 73. HPLC-UV хроматограм екстракта меда добијен ултразвучном екстракцијом на 280 nm	150
Слика 74. TIC екстракта меда	150
Слика 75. Калибрациона крива и крива за методу стандардног додатка за хесперетин	151
Слика 76. 1D мапа резолуције добијена у tG/% ацетнитрила оптимизацији са 2 % сирћетном киселином и на температури од 30 °C	155
Слика 77. 2D мапа резолуције добијена рачунарском симулацијом применом програма LC-Simulator	157
Слика 78. Хроматограм биофлавоноида добијен компјутерском симулацијом коришћењем програма LC-Simulator	157
Слика 79. Хроматограм стандарда биофлавоноида под оптималним условима	158
Слика 80. Хроматограм екстракта свежег броколија	159
Слика 81. Одређивање кверцетина у узорку свежег карфиола методом стандардног додатка ..	159
Слика 82. Калибрациона крива DPPH у метанолу за одређивање концентрације у растворима екстракта	162
Слика 83. Кинетика антиоксидативне активности свежег екстракта карфиола	163
Слика 84. Кинетика антиоксидативне активности екстракта замрзнутог карфиола	163
Слика 85. Кинетика антиоксидативне активности екстракта свежег броколија	164
Слика 86. Кинетика антиоксидативне активности екстракта замрзнутог броколија	164
Слика 87. Кинетика антиоксидативне активности екстракта прокеља	164

Слика 88. Потенциометријска титрација 1,07 mmol/L моксифлоксацина у 0,1 mol/L LiCl средини на 25°C у и без присуства SDS-а.....	167
Слика 89. Мртва запремина HPLC система	170
Слика 90. 1D мапа резолуције добијена оптимизацијом tG/%ACN при pH= 5,5 и T = 30°C	172
Слика 91. 2D мапа резолуције за оптимизацију tG/температуре при pH = 6,12.....	172
Шема 6. Експериментални дизајн за оптимизацију LC- tG/pH.....	173
Слика 92. Сет хроматограма за оптимизацију у LC-RP Gradient/pH. T = 30 °C, tG = 30 min.....	173
Слика 93. Сет хроматограма за оптимизацију у LC-RP Gradient/pH. T = 30 °C, tG = 60 min.....	174
Слика 94. 2D робусна мапа резолуције добијена коришћењем програма DryLab	175
Слика 95. Израчунати (симулирани) хроматограм добијен у програму DryLab.....	175
Слика 96. Површина одговора израчуната на основу дизајна	181
Слика 97. Хроматограм смеше стандарда моксифлоксацина (200 ng/mL), сродних једињења (1 ng/mL), и офлоксацина (1 ng/mL) при утврђеним експерименталним условима	183
Слика 98. Радна калибрациона права за одређивање 6F8E у воденој фази. P_{6F8E}/P_O – однос површина 6F8E и офлоксацина (ИС), C_{6F8E}/C_O – однос концентрација 6F8E и офлоксацина (ИС)	184
Слика 99. Радна калибрациона права за одређивање 6M8F у воденој фази. P_{6M8F}/P_O – однос површина моксифлоксацина и офлоксацина (ИС), C_{6M8F}/C_O – однос концентрација 6M8F и офлоксацина (ИС)	185
Слика 100. Радна калибрациона права за одређивање 6,8DM у воденој фази. $P_{6,8DM}/P_O$ – однос површина 6,8DM и офлоксацина (ИС), $C_{6,8DM}/C_O$ – однос концентрација 6,8DM и офлоксацина (ИС)	186
Слика 101. Радна калибрациона права за одређивање 6,8DF у воденој фази. $P_{6,8DF}/P_O$ – однос површина 6,8DF и офлоксацина (ИС), $C_{6,8DF}/C_O$ – однос концентрација 6,8DF и офлоксацина (ИС)	187
Слика 102. Хроматограм таблете “Avelox” (активна компонента моксифлоксацин) у присуству интерног стандарда офлоксацина (1 µg/mL)	188
Слика 103. Хроматоргам производа деградације инфузије моксифлоксацина у киселој средини у присуству интерног стандарда офлоксацина	189
Слика 104. Хроматоргам производа деградације инфузије моксифлоксацина у базној средини у присуству интерног стандарда офлоксацина	189
Слика 105. Хроматоргам производа деградације таблете моксифлоксацина у киселој средини у присуству интерног стандарда офлоксацина	190
Слика 106. Хроматоргам производа деградације таблете моксифлоксацина у базној средини у присуству интерног стандарда офлоксацина	190
Слика 107. Спектри моксифлоксацина различитих концентрација у присуству 0,1 mol/L LiCl, у pH опсегу од 5 – 6	194
Слика 108. Апсорпциони спектри моксифлоксацина концентрације $5,35 \times 10^{-5}$ mol/L при различитим pH вредностима у 0,1 mol/L раствору LiCl.....	194

Слика 109. Издвојени апсорпциони спектри моксифлоксацина концентрације $5,35 \times 10^{-5}$ mol/L у интервалу рН од 1,80 до 8,84 у 0,1 mol/L раствору LiCl	195
Слика 110. Апсорпциони спектар моксифлоксацина концентрације $5,35 \times 10^{-5}$ mol/L у присуству 12 mmol/L SDS у 0,1 mol/L раствору LiCl	195
Слика 111. Апсорпциони спектри моксифлоксацина концентрације $5,35 \times 10^{-5}$ mol/L у присуству 12 mmol/L SDS у 0,1 mol/L раствору LiCl где је рН подешавано јаком киселином и/или јаком базом	196
Слика 112. Апсорпциони спектри моксифлоксацина концентрације $5,35 \times 10^{-5}$ mol/L у пуферима различитих рН вредности у 0,1 mol/L раствору LiCl	197
Слика 113. Издвојени апсорпциони спектри моксифлоксацина концентрације $5,35 \times 10^{-5}$ mol/L у пуферима од рН 5 до 7,2 у 0,1 mol/L раствору LiCl	197
Слика 114. Издвојени апсорпциони спектри моксифлоксацина концентрације $5,35 \times 10^{-5}$ mol/L у пуферима од рН 7,2 до 9,0 у 0,1 mol/L раствору LiCl	198
Слика 115. Апсорпциони спектри моксифлоксацина концентрације $5,35 \times 10^{-5}$ mol/L у присуству 12 mmol/L SDS пуферима у 0,1 mol/L раствору LiCl	198
Слика 116. Апсорпциони спектри серума без и у присуству SDS концентрације 12 mmol/L у 0,1 mol/L LiCl	199
Слика 117. Апсорпциони спектри серума без и у присуству моксифлоксацина концентрације $5,35 \times 10^{-5}$ mmol/L у 0,1 mol/L LiCl средини	199
Слика 118. Апсорпциони спектри серума и моксифлоксацина концентрације $5,35 \times 10^{-5}$ mmol/L без и у присуству SDS концентрације 12 mmol/L у 0,1 mol/L LiCl средини	200
Слика 119. Апсорпциони спектри различитих концентрација моксифлоксацина у серуму за калибрациону криву у присуству SDS концентрације 12 mmol/L у 0,1 mol/L LiCl средини	201
Слика 120. Други извод апсорпционих спектра различитих концентрација моксифлоксацина у серуму за калибрациону криву у присуству SDS концентрације 12 mmol/L у 0,1 mol/L LiCl средини	201
Слика 121. Калибрациона права за одређивање моксифлоксацина у плазми	202
Слика 122. Апсорпциони спектри различитих концентрација моксифлоксацина у серуму у присуству 12 mmol/L SDS на рН = 7,2	203
Слика 123. Други извод апсорпционих спектра различитих концентрација моксифлоксацина у серуму у присуству 12 mmol/L SDS на рН = 7,2	203
Слика 124. UV спектар плазме пацијента без и у присуству SDS-а	204
Слика 125. Хроматограм плазме пацијента узет 1 сат након примене „Avelox“ таблете (400 mg)	205
Слика 126. Ефикасност SPE екстракције биофлавоноида на различитим кертрицима.....	212
Слика 127. Процена матричног ефекта (%) приликом коришћења различитих растварача	214
Слика 128. Процењен матрични ефекат (%) приликом одређивања биофлавоноида у узорцима хране.....	215

Списак табела

Табела 1. Подела флавоноида на подгрупе.....	13
Табела 2. Вредност $\log P_{exp}$ за флавоноиде	18
Табела 3. Вредности сукцесивних константи дисоцијације флавоноида	20
Табела 4. Таласне дужине (nm) максимума апсорпције неких флавоноида у метанолу	21
Табела 5. Прелази у IR спектрима флавоноида и њихова асигнација	23
Табела 6. ^1H NMR померања појединих атома водоника у одређеним флавоноидима	25
Табела 7. ^{13}C NMR спектри флавоноида	26
Табела 8. Масени спектри неких флавоноида	28
Табела 9. Методе одређивања, врсте и константе стабилности комплекса флавоноида и метала	35
Табела 10. Апсорпционе траке у IR спектроскопији слободних флавоноида и одговарајућих комплекса	36
Табела 11. Номиналне вредности m/z јона који се јављају у позитивном моду ESI-MS спектра комплекса нарингинина и бакра	37
Табела 12. Вредности константе брзине реакције DPPH радикала са флавоноидима.....	48
Табела 13. Предвиђене и експерименталне вредности антиоксидативне активности флавоноида	49
Табела 14. Класификација хинолона по генерацијама и индикације	53
Табела 15. Структуре и називи сродних и деградационих производа моксифлоксацина.....	56
Табела 16. Растворљивост (g/L) моксифлоксацина у различитим растварачима на 25°C.....	57
Табела 17. Таласне дужине маскимальне апсорпције моксифлоксацина у различитим растварачима	58
Табела 18. Табеларни приказ фрагментације моксифлоксацина.	60
Табела 19. Хроматографски параметри, формуле за израчунавање и оптималне вредности	79
Табела 20. Матрица дизајна за 2^3 факторијални експеримент	95
Табела 21. Нивои кодираних вредности за централно композитни дизајн за двофакторске и трофакторске системе.....	100
Табела 22. Анализа варијанси за најмање квадрате линеарног модела са параметрима.....	102
Табела 23. Концентрације биофлавоноида (кверцетин, рутин, хесперетин, хесперидин и каемпферол) (у $\mu\text{g/mL}$):	117
Табела 24. Концентрације биофлавоноида (кверцетин, каемпферол, апигенин, лутеолин, катехин и епикатехин) (у $\mu\text{g/mL}$).	118
Табела 25. Концентрације једињења сродних моксифлоксацину (у $\mu\text{g/mL}$).	118
Табела 26. Карактеристике испитиваних Supelco кертрица	134
Табела 27. Вредности ефикасности SPE екстракције \pm SD (%) флавоноида добијених применом различитих врста SPE кертрица и растварача коришћених за елуирање	135

Табела 28. Оптимални услови SPE екстракције биофлавоноида.....	135
Табела 29. Оптимални инструментални услови за анализу у ESI-MS/MS.	137
Табела 30. Јони у MS/MS спектру биофлавоноида.....	138
Табела 31. Регресиони параметри за калибрационе криве ($Y=a+bX$; Y = интензитет сигнала, X = концентрација анализата, $\mu\text{g/mL}$) за калибрационе криве за најинтензивније SRM прелазе	142
Табела 32. Процењени матрични ефекат приликом одређивања биофлавоноида екстрахованих водом из узорака хране коришћењем методе пост-екстракције.....	144
Табела 33. Ефекат матрикса (%) на одређивање биофлавоноида у узорцима хране методом стандардног додатка у различитим екстрактима	145
Табела 34. Садржај биофлавоноида у узорцима хране и поређење са литературним подацима.....	152
Табела 35. Експериментални услови и одговарајући подаци добијени из хроматограма који су коришћени за оптимизацију методе.....	156
Табела 36. Оптимални услови за сепарацију и одређивање биофлавоноида у узорцима хране утврђени компјутерском симулацијом	158
Табела 37. Садржај биофлавоноида ($\text{mg}/100\text{g}$ свеже масе) за различите врсте <i>Brassica</i>	160
Табела 38. Антиоксидативна активност (% преосталог DPPH \pm SD) за различите врсте купуса добијене DPPH методом.....	165
Табела 39. Експериментални услови за оптимизацију изократског извођења анализе.....	171
Табела 40. Поређење симулираних и експерименталних ретенционих података за оптимизовано одвајање модела једињења (10 % ацетонитрила; $\text{pH} = 6,10$)	176
Табела 41. Експериментални подаци за факторски дизајн.....	177
Табела 42. ANOVA анализа израчунавања факторског дизајна	177
Табела 43. Хроматографски фактори и њихове кодиране вредности	178
Табела 44. Експериментални дизајн. Укупни одговор фактора, $R_x = R_{1,2}+R_{2,3}+R_{3,4}+R_{4,5}$	179
Табела 45. ANOVA анализа квадратног хроматографског модела	179
Табела 46. Израчунати коефицијенти за квадратни модел хроматографског раздвајања.....	181
Табела 47. Оптимални услови за раздвајање и одрђивање моксифлоксацина и сродних једињења у фармацеутским формулацијама утврђени експерименталним дизајном ..	182
Табела 48. Основне хроматографске карактеристике раздвајања моксифлоксацина и четири сродне нечистоће раздвојене на XTerra колони при оптималним условима	182
Табела 49. Валидациони параметри за одређивање 6F8E у води	184
Табела 50. Валидациони параметри за одређивање 6M8F у води	185
Табела 51. Валидациони параметри за одређивање 6,8DM у води.....	186
Табела 52. Валидациони параметри за одређивање 6,8DF у води.....	187
Табела 53. Услови и подаци присилне деградације стандарда, таблете и инфузије моксифлоксацина.....	191
Табела 54. Вредности за конструкцију калибрационе криве за одређивање концентрације моксифлоксацина у серуму	202

Табела 55. Резултати погодности методе за одређивања моксифлоксацина у серуму	204
Табела 56. Физичко-хемијске карактеристике растварача који се најчешће користе за екстракцију биофлавоноида.....	209
Табела 57. Хроматографски параметри добијени на Phenomenex Gemini C18 колони под оптималним условима	218
Табела 58. Параметри валидације методе за LC-MS/MS анализу биофлавоноида у храни	219
Табела 59. Хроматографски параметри добијени на Hypersil GOLD aQ колони под оптималним условима	225
Табела 60. Валидациони параметри хроматографске методе за одређивање биофлавоноида у узорима фамилије <i>Brassica</i>	226
Табела 61. Вредности константе брзине реакције \pm стандардна грешка ($\times 10^{-2}$) реакције DPPH радикала са екстрактима фамилије <i>Brassica</i>	230
Табела 62. Подаци за испитивање прецизности методе за смешу стандарда сродних једињења моксифлоксацина.....	235

ИЗВОД

У овом раду развијене су LC-MS/MS и HPLC-UV/DAD методе за истовремено одређивање биофлавоноида: рутина, кверцетина, хесперидина, хесперетина, каемпферола, апигенина, лутеолина, катехина и епикатехина у неким узорцима хране (кора поморанце, црвени лук, мед, карфиол, броколи и прокељ).

Такође, развијене су и HPLC-DAD и спектрофотометријске методе за одређивање моксифлоксацина (аналога флавоноида) и његових сродних једињења и деградационих производа у фармацеутским формулацијама и хуманој крвној плазми.

Процењен је матрични ефекат приликом одређивања рутина, кверцетина, хесперетина, хесперидина и каемпферола у узорцима коре поморанце, црвеног лука и меда. Утицај матрикса процењен је коришћењем методе пост-екстракције при чему се добијене негативне вредности у опсегу од -44 до -0,5 %, што указује на јонску супресију. Матрични ефекат јако зависи од концентрације испитиваних биофлавоноида. Јонска супресија се може објаснити присуством коелуираних фенолних киселина, које због својих киселинско-базних и хидрофилних карактеристика утичу на јонизацију биофлавоноида у гасној плазми.

Екстракти узорака хране су добијени применом различитих начина екстракције (екстракција по Соклету, ултразвучна екстракција, екстракција мацерацијом и екстракција кључалом водом). За пречишћавање и преконцентрисавање добијених екстраката анализата коришћена је екстракција на чврстој фази применом Supelco кертрица.

Ефикасност екстракције изражена преко искоришћења креће се од 88 до 96 %, што указује на веома добро изоловање анализата из узорака. Екстракти узорака хране добијени екстракцијом по Соклету и ултразвучном екстракцијом су анализирани на садржај биофлавоноида праћењем реакција њихове фрагментације LC-MS/MS методом уз троструки квадрупол као детектор. Раздвајање испитиваних анализата постигнуто је применом Phenomenex Gemini C18 колоне при градијентном начину елуирања мобилне фазе састављене од фазе А: 2 % сирћетна киселина у води и фазе В: ацетонитрила. Вредности резолуције (R_s) између два суседна пика су се кретале у опсегу од 1,3 до 3,2, указујући на добру селективност методе. Метода стандардног додатка, као најпогоднија, је коришћена за квантитативно одређивање анализата за овај тип узорака. Добијени резултати квантификације биофлавоноида (mg/100 g свежe масе) су: за рутин

0,16; за кверцетин у опсегу 0,65 – 56; за хесперидин 0,016 – 24; за хесперетин 0,0068 – 36,4 и за каемпферол 0,14 – 1,63 и у доброј су сагласности са литературним подацима. Ниске вредности границе детекције (0,039 – 0,076 mg/mL) су добијене са прихватљивом тачношћу (86 – 114 %). Укупно време анализе је мање од 40 min, тако да предложена метода представља значајно побољшање постојећих метода.

Такође, оптимизована је RP-HPLC метода са UV (DAD) детекцијом за истовремено одређивање биофлавоноида: кверцетин, апигенин, катехин, епикатехин, каемпферол и лутеолин у узорцима хране фамилије *Brassica* (карфиол, броколи, прокељ) применом програма LC-Simulator (ACD Labs® suite).

Оптимални услови за раздвајање и квантификацију биофлавоноида су постигнути применом Нуперсил GOLD аQ колоне са изократским елуирањем мобилном фазом А: 2 % сирћетна киселина у води и В: ацетонитрил у односу 91 : 9 (v/v %). Добијене вредности резолуције између пикова су биле у опсегу од 1,3 до 3,1, указујући на добру селективност методе. Добијени резултати квантификације биофлавоноида у узорцима фамилије *Brassica* показују добро слагање са литературним подацима. Добијене су ниске вредности граница детекције (0,02 – 0,055 µg/mL) са прихватљивом тачношћу (90 - 109 %). Укупно време анализе је мање од 11 min, стога развијена метода представља унапређење већ постојећих метода.

Екстрактима узорака фамилије *Brassica*, добијеним различитим начинима екстракције, одређена је способност да неутралишу кисеоничне слободне радикале. Антиоксидативна активност екстраката фамилије *Brassica* испитивана је спектрофотометријском методом праћењем смањења концентрације DPPH радикала. Реакција између DPPH радикала и екстраката фамилије *Brassica* одвија се према кинетици псеудо првог реда. Вредности брзине ове реакције крећу се у опсегу од $7,1 \times 10^{-2}$ до $17,9 \times 10^{-2}$ L mol⁻¹ s⁻¹. Различите вредности брзине указују на присуство полимеризованих и/или мање активних врста антиоксиданата са различитим механизмом неутрализације.

Развијена је и RP-HPLC метода за раздвајање и одређивање сродних једињења моксифлоксацина (аналога флавоноида), као и производа деградације моксифлоксацина применом програма DryLab® и хеометријског (површина одговора) приступа. Ове методе су валидиране при оптималним условима раздвајања, а након тога коришћене за одређивање сродних једињења моксифлоксацина у фармацеутским формулацијама.

Раздвајање четири синтетичка сродна једињења је постигнуто применом Waters C₁₈ XTerra колоне термостатиране на 45 °C, проток мобилне фазе састављене од (вода + триетиламин (2 %, v/v)) : ацетонитрил = 90 : 10 (v/v %) је био 1,5 mL/min, а рН вредност водене фазе је подешена коришћењем разблажене фосфорне киселине на 6,0. Резолуција између два најмање раздвојена пика била је већа од 1,5. Параметри валидације методе указују на линеарност у концентрационом опсегу од 0,2 до 2,0 µg/mL, са границом квантификације (LOQ) од 0,20 µg/mL и границом детекције (LOD) од 0,05 µg/mL за све анализе.

Развијена метода је примењена за одређивање моксифлоксацина и сродних једињења у таблетама и инфузији (Avelox[®], Bayer AG) и за производе деградације моксифлоксацина приликом испитивања његове стабилности. Садржај сродних једињења моксифлоксацина у таблетама и инфузији био је 0,1 % од укупног моксифлоксацина. Два производа деградације су уочена при хидролитичким условима.

Развијена је једноставна, брза и прецизна спектрофотометријска метода за одређивање моксифлоксацина у хуманој крвној плазми. Одређивање је вршено у цитрат – фосфатном пуферу (рН = 7,2), у присуству натријум додецилсулфата (12,0 mmol/L). За квантификацију коришћен је други извод спектра моксифлоксацина. Линеарни опсег концентрација био је у опсегу од 0,25 до 10 µg/mL, са тачношћу од 95 до 102 % и границом детекције од 0,03 µg/mL. Тачност методе је била између Метода је успешно примењена за анализу моксифлоксацина у хуманој крвној плазми здравих волонтера. Развијена је и HPLC метода као референтна метода, за валидацију и потврду спектрофотометријских резултата.

Методе развијене у овој дисертацији одговарају сврси и могу се користити за контролу квалитета хране, као и у фармацеутским и клиничким испитивањима.

Summary

In the present work the LC-MS/MS and HPLC-UV/DAD methods with solid phase extraction for simultaneous determination of bioflavonoids rutin, quercetin, hesperidin, hesperetin, kaempferol, apigenin, luteolin, catechin and epicatechin in some food samples (red onion, orange peel, honey, cauliflower, broccoli and Brussel sprouts) were developed.

Also, HPLC-UV/DAD and spectrophotometric methods for determination moxifloxacin (flavonoids analog) and their related substances and degradation products in pharmaceutical forms and human plasma were developed.

The matrix effect accompanying determination rutin, quercetin, hesperidin, hesperetin and kaempferol in orange peel, red onion and honey was quantified. The matrix effect evaluated using postextraction addition method was found to be negative in the range -44 – -0,5 %, indicating ionization suppression and strongly depended on bioflavonoid concentration. Ion suppression was explained taking into account the co-elution of phenolic acids, in terms of their acid-base and hydrophilic properties, which affected ionisation of bioflavonoids in gas phase.

Extracts of food samples were obtained by different methods of extraction. Purification and preconcentration of extracts, on the solid phase using the Supelco cartridges was performed.

The efficacy of extraction expressed as the absolute recoveries of flavonoids were 88 – 96 %, indicating very good efficiency of extraction. The extracts of food samples obtained either by Soxhlet or ultrasonic extraction were analyzed for bioflavonoid content by LC-MS/MS method in selected reaction monitoring mode using triple quadrupole detector and standard addition method, which was found to be the most suitable calibration approach for these samples. The optimized separation was achieved on Phenomenex Gemini C18 column with gradient elution and mobile phase composition A: 2% acetic acid in water and B: acetonitrile. R_s values were in the range from 1,3 to 3,1 indicating good selectivity of the method. The obtained results (mg/100 g fresh weight) for different bioflavonoids were for rutin 0,16, for quercetin in the range 0,65 – 56, for hesperidin 0,016 – 24, for hesperetin 0,0068 – 36,4 and for kaempferol 0,14 – 1,63 and generally show good agreement with published data. Low detection limits (0,039 – 0,079 mg/mL) were obtained with acceptable recoveries (86 – 114 %). Total time of analysis was less than 40 min, so that the proposed method represents significant improvement over existing methods.

Also the rapid RP-HPLC method with UV (DAD) detection for simultaneous quantification of bioflavonoids: quercetin, apigenin, catechin, epicatechin, kaempferol and luteolin in some food samples (cauliflower, broccoli and Brussels sprouts, *Brassica oleracea* species) was developed with the aid of LC-Simulator (ACD Labs® suite) software.

The optimal conditions for separation and quantification were established after 9 scouting runs entered to LC-Simulator software. The optimized separation was achieved on Hypersil GOLD aQ column with isocratic elution and mobile phase composition A: 2 % acetic acid in water and B: acetonitrile in 91 : 9 (v/v%) ratio. The R_s values were in the range from 1,3 to 3,1, indicating good selectivity of the method. The obtained results generally show good agreement with published data. Low detection limits (0,02 – 0,055 $\mu\text{g/mL}$) were obtained with acceptable recoveries (90 - 109 %). Total time of analysis was less than 11 min, therefore the proposed method represents significant improvement over existing methods.

Sample extracts the *Brassica* family, obtained by the various methods of extraction have been tested for their radical scavenging effects. The antioxidant activity of extracts of *Brassica* family was investigated by monitoring the spectrophotometric method of reducing the concentration of DPPH radicals. The reaction between the DPPH radicals, and the *Brassica* family extracts is carried out under pseudo-first order kinetics. The values of the reaction rate are in the range of 7.1×10^{-2} to $17.9 \times 10^{-2} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

Different kinetics suggested the presence of polymerized and/or less active antioxidants with different scavenging mechanisms for particular polyphenolic compounds.

A RP-HPLC method for the separation and determination of synthetic impurities of moxifloxacin, in its pharmaceutical forms as well as moxifloxacin degradation products, was developed with the aid of DryLab® software and chemometric (response surface) approach. Both methods were validated under optimal conditions and then used for the determination of related substances of moxifloxacin in pharmaceutical formulations.

The separation of four synthesis - related impurities was achieved on a Waters C₁₈ XTerra column using a mobile phase with the composition (water + triethylamine (2 %, v/v)) : acetonitrile = 90 : 10 (v/v %); the pH of water phase being adjusted with dil. phosphoric acid to 6.0. Flow rate of the mobile phase was 1,5 ml/min and UV detection at 290 nm was employed. The column was thermostated at 45 °C. The resolution between two the least resolved impurity peaks was in average, $R_{s,\text{min}} > 1.5$. Method validation parameters indicate linear dynamic range 0,2 – 2,0 $\mu\text{g/ml}$ with LOQ ca. 0,20 $\mu\text{g/ml}$ and LOD ca. 0,05 $\mu\text{g/ml}$ for all analytes.

The method was applied for the impurities determination in drug tablets and infusion (Avelox[®], Bayer AG) and for degradation products of moxifloxacin determination in a stability indicating study of moxifloxacin. The impurity content in the tablets and infusion was quantified as 0,1 % of total drug. Two degradation products were noted under hydrolytic conditions.

The simple yet rapid and accurate spectrophotometric method for the determination of fluoroquinolone family member, moxifloxacin in human plasma was developed. The determination was carried out in a citrate – phosphate buffer (pH = 7,2) in the presence of sodium dodecylsulfate (12,0 mmol/L). Second order derivative spectra were employed for the quantitation of moxifloxacin by measuring peak – to – peak amplitude in a wavelength range 335 – 345 nm. Linear dynamic range was 0,25 – 10 µg/mL with a limit of detection 0,03 µg/mL. Recovery was between 95 – 102 %. The method was successfully applied for the analysis of plasma of healthy volunteers. A HPLC method was also developed as a reference method, to validate and confirm spectrophotometric results.

Methods are appropriate for the purpose and can be used for quality control of food , as well as in the pharmaceutical and clinical practice.

Увод

Феноли и полифенолна једињења су широко распрострањени у природи, првенствено у биљном свету. Биљке које се користе у људској исхрани садрже велики број једињења која су по саставу полифеноли или супституисани феноли. Почетком овог века откривено је да једињења из ове групе имају веома важне биолошке функције у људском организму. То се пре свега односи на деривате фенола: флаваноне и флавоноиде. По свом хемијском саставу ове две групе садрже бензо- γ -пиронско језгро и у природи су углавном гликолизовани тј. конјуговани са различитим врстама шећера. У слободном облику ретко се срећу. Биљке их производе као секундарне метаболите па су стога распрострањени готово у свим деловима биљака (семену, корену, зеленим деловима и плодовима) где се акумулирају у највећој мери. Испитивања ових класа једињења привукло је последњих година велику пажњу због њихове антиоксидативне активности, односно способности да делују као хватачи кисеоничних слободних радикала. Утврђена је и корелација између антиоксидативне способности појединих врста биљне хране и садржаја биофлавоноида у њима. Имајући у виду повољан ефекат антиоксидативне активности природних флавоноида на људско здравље развијене су методе синтетичке органске хемије за синтезу једињења аналогних по структури природним флаванонима и флавоноидима. Једна класа тих једињења, под називом хинолони, привукла је велику пажњу имајући у виду њихов снажни антибактеријски ефекат. Наведене особине биофлавоноида и хинолона довеле су до потребе за развојем аналитичких метода за њихово одређивање у различитим типовима узорака (тј. матрицама). При томе биофлавоноиди се најчешће одређују у различитим деловима биљака, док се хинолони, као синтетички производи, одређују у фармацеутским дозираним облицима. Одређивање у хуманој крвној плазми представља посебан изазов имајући у виду сложеност матрикса и ниске нивое концентрација које ове супстанце достижу у крви.

Развој методе за одређивање биофлавоноида, у биљном материјалу, мора да обухвати све фазе анализе од начина прикупљања биљака, чувања, одабира делова за анализу, сушења узорака, екстракције анализата и избора инструменталне методе за квантификацију. Посебан проблем код анализе биолошких узорака представља матрични ефекат, односно утицај других компоненти узорка на сигнал анализата. Метода избора за квантификацију биофлавоноида, а такође и за њихову квалитативну

идентификацију је HPLC са масеном и/или UV детекцијом. У литератури је описан велики број примена HPLC методе за одређивање биофлавоноида при чему су хроматографски параметри готово увек били оптимизовани. Међутим, испитивању утицаја матричног ефекта посвећено је релативно мање пажње, стога је било потребно проучити матрични ефекат у HPLC анализи биофлавоноида и на основу тога оптимизовати ову методу за одређивање биофлавоноида у различитим узорцима биљне хране.

Осим матричног ефекта, на квантификацију биофлавоноида утиче велики број променљивих од којих се неке могу контролисати, а неке не могу. Велики проблем представља узорковање. Узорци су природно варијабилни у погледу количине биофлавоноида, на пример, због различитог садржаја воде (конституционе и као влаге), температуре околине, састава земљишта, итд. Осим тога, садржај биофлавоноида варира у поједним деловима биљке па је потребно водити рачуна о томе који се део анализира. Начин чувања узорка је такође извор варијабилитета тј. садржај биофлавоноида зависи од тога да ли је узорак замрзнут или свеж, сушен на ваздуху или у сушници (сушари) и слично. Хомогенизовање узорка за анализу је значајан извор варијабилитета нарочито у погледу величине честица до којих се узорак мрви, као и присуства нежељеног чврстог материјала (нпр. делова стабљике при анализи листова). Наведени узроци варијабилитета тешко се могу контролисати, мада је у овом раду велика пажња посвећена хомогенизацији узорка, а материјал за анализу био је комерцијалног порекла.

Следећи проблем је екстракција биофлавоноида где су извори варијабилитета били избор:

- начина екстракције,
- одговарајућег растварача,
- величина додирне површине између узорка и растварача
- температуре на којој се врши екстракција,
- времена трајања екстракције,
- количине употребљеног растварача.

Стога је било потребно обратити посебну пажњу и оптимизовати процес екстракције анализата из узорка. Ради обезбеђивања пожељне репродуктивности резултата оптимизован је начин екстракције, тип (врста) растварача, температура и

време трајања екстракције. Екстракти су подгврнути HPLC анализи, при чему је посебна пажња посвећена оптимизацији резолуције сигнала анализата. Квантификација садржаја анализата вршена је методом стандардног додатка и статистичком обрадом резултата мерења.

Знатно мањи проблем у погледу узорковања и екстракције представља анализа хинолона и њихових деградационих производа у фармацеутским формулацијама. Практично, ту је била потребна само оптимизација резолуције сигнала, што је урађено одговарајућим статистичким методама и компјутерском симулацијом.

Овај рад треба да представља допринос разради HPLC методе за одређивање биофлавоноида и њихових аналога у различитим типовима узорака.

1. Општи део

1.1. Флавоноиди

Флавоноиди (или биофлавоноиди) представљају највећу групу биљних полифенола. Они су биљни пигменти и назив им потиче од латинске речи *flavus*, што значи жут. До сада је изоловано преко 8000 једињења која припадају овој групи. Већина флавоноида се налази у воћу, поврћу као и напицима (чај, кафа, пиво, вино итд.) који се добијају од воћа и поврћа. Широко су распрострањени, како у вишим биљкама (*Betulaceae* – бреза, *Sambucaceae* – зова, *Tiliaceae* – липа, *Rosaceae* – глог, *Ginkgoaceae* – гинко) [1], тако и у нижим, као што су маховине и лишцајеви [2]. Биљке их користе у различите сврхе као што су заштита од сунчеве светлости, као унутрашње регулаторе и као одбрану од инсеката. Неки флавоноиди (антицианидини) су јако обојени и од њих потиче црвена, плава или љубичаста боја цвета и плода биљака. Иако су флавоноиди широко распрострањени у биљном свету, свака биљна врста синтетизује флавоноиде карактеристичне само за ту врсту [3]. Корелација између специјације биљака и флавоноида од изузетне је важности у биљној хемотаксономији (класификација врста заснована на хемијском саставу) [4].

1.1.1. Историјат флавоноида

Проучавање флавоноида почело је, као и код већине природних производа, од потребе за добијањем нових једињења са корисним физиолошким функцијама.

Најстарији документ у којем се помињу флавоноиди је дело „Experiments and Considerations Touching Colours“ Robert-a Boyle-a из 1664. године [5], у којем се описује утицај киселина и база на боју екстракта цвета и других ткива биљака. Хемијски састав флавоноида, посебно плавог пигмента цвета кукуруза и црвеног пигмента из вина, описани су средином деветнаестог века и укључивали су изоловање и одређивање елементарног састава, (тј. односа и садржаја угљеника, водоника и кисеоника) [6, 7]. Касније су проучаване и безбојне супстанце повезане са антоцианидним пигментима [8,9].

Интензивније проучавање флавоноида почело је 1936. године, када је мађарски научник Albert Szent-Gyorgi са сарадницима [10] установио да флавоноиди изоловани из паприке (*Capsicum annuum*) и коре поморанце (*Citrus limon*) помажу у опоравку заморчића оболелих од скорбута када у њиховој исхрани није био присутан витамин Ц. Као објашњење својих истраживања Szent-Gyorgi и сарадници су закључили да флавоноиди битно утичу на интегритет малих крвних судова, и на тај начин могу заменити витамин Ц код особа оболелих од скорбута. Они су ову групу једињења сврстали у класу витамина и назвали их витамин П (P – permeability – пропустљивост) [11].

H. Scarborough и A.L. Bacharach [12] су 1949. године објавили прегледни рад у којем су сумирали радове између 1935. и 1949. године и при томе одбацили тврдњу да витамин П може заменити витамин Ц. Међутим, они су истакли утицај биофлавоноида на пропустљивост крвних судова.

Опште мишљење до 1950. године било је да су флавоноиди физиолошки значајни и да је њихов главни утицај (издржљивост капилара) независан од витамина Ц. На основу тога, Уједињени Комитет Биохемијске Номенклатуре (Joint Committee on Biochemical Nomenclature) Сједињених Држава је предложио да се термин „витамин П“ замени термином „биофлавоноиди“, а 1980. године Комитет за Додатак храни и Одбор за исхрану (Committee on Dietary Allowances of the Food and Nutrition Board, СОМА) Велике Британије су указали да биофлавоноиде треба сматрати фармаколошким супстанцама.

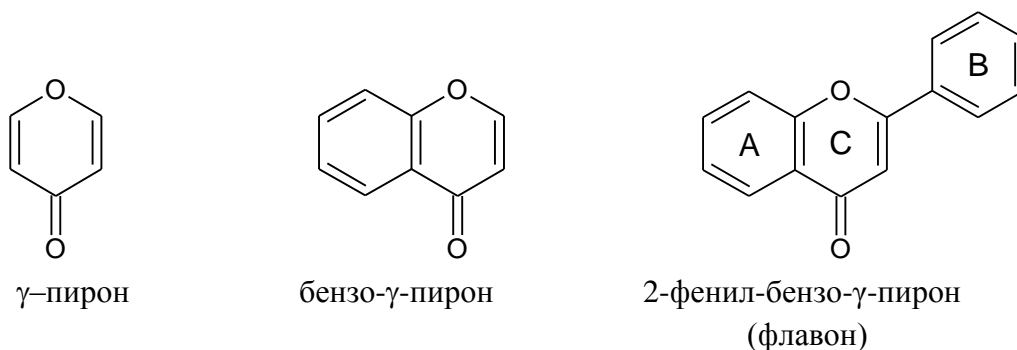
У протеклом периоду главни интерес у проучавању биофлавоноида био је њихов однос са витамином Ц и њихова улога као антиоксиданаса.

Крајем двадесетог и почетком двадесет првог века проучавање биофлавоноида се интензивира јер је потврђено њихово антивирусно, антиалергијско, антиинфламаторно, антитуморно и антиоксидативно дејство.

Коришћење биофлавоноида као додатка исхрани побољшава апсорпцију витамина Ц из гастроинтестиналног тракта, а вероватно и његово задржавање у ткивима [13].

1.1.2. Номенклатура флавоноида

Појам „флавоноид“ се обично користи да се опише велика група природних производа који у свом саставу садрже γ -пирон (пиранон-4), бензо- γ -пирон (хромон) и 2-фенил-бензо- γ -пирон (флавор) чије су структуре приказане на Слици 1.



Слика 1. Основне структуре скелета флавоноидних агликона

Структуру флавоноида карактерише флаворско језгро састављено од два бензенска прстена (А и В) повезана преко хетероцикличног прстена (С), односно, С₆-С₃-С₆ угљенични скелет [14 - 19].

У биљкама се могу наћи у облику агликона, али у већини случајева су везани за шећерну компоненту. Флавоноиди се разликују по броју и распореду хидрокси, метокси и гликозидних супституената [16]. На основу броја двоструких веза и степена оксидације угљеникових атома присутних у хетероцикличном С-прстену флавоноиди

се могу поделити у поткласе [18]. Према њиховој молекулској структури подељени су на 9 група (Табела 1).

Табела 1. Подела флавоноида на подгрупе.

Флавони	Флавоноли	Флаванони
Халкони	Антоцианидини	Дихидрофлавоноли
Изофлавони	Катехини	Аурони

У биљкама су често присутни као О- или С-гликозиди. Код О-гликозида шећерна компонента је везана за хидроксилну групу агликона, обично у положају 3 или 7, док је код С-гликозида шећер везан за угљеников атом агликона обично у положају 6 или 8 [19]. Нађено је неколико различитих и изомерних моносахарида који у природи граде гликозиде са флавоноидима. Шећер који је најчешће везан за биофлавоноиде је глукоза, али се често сусрећу и галактоза, рамноза, арабиноза и ксилоза. Маноза, фруктоза, алоза, глукуронска и галактоуронска киселина се такође сусрећу, али веома ретко [20].

Флавоноид-дигликозиди су такође често присутни. Два најчешћа дисахарида су 1→6 глукозорамнозид, у неохеспериози и 1→2 глукозорамнозид. Шећерне компоненте су често супституисане ацил остацима као што је малонил или ацетил [21].

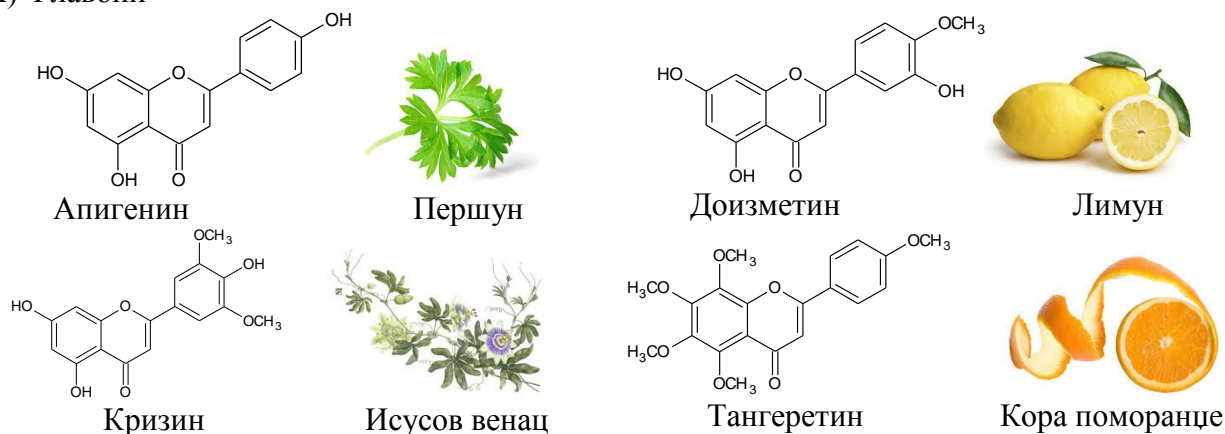
1.1.3. Распрострањеност и улога флавоноида у природним производима

Флавоноли, флаволи и антоцианидини су широко распрострањени у биљном свету [22], док су остале класе знатно мање присутне. Нађени су у чајевима, вину, поврћу, воћу и деловима биљака (семењу, стабљици, цвету и корену), што представља намирнице које се користе у свакодневној исхрани [23 – 25]. Флаванони су карактеристични за породицу цитруса. Катехини се налазе у неколико специфичних биљака као што је на пример кокос.

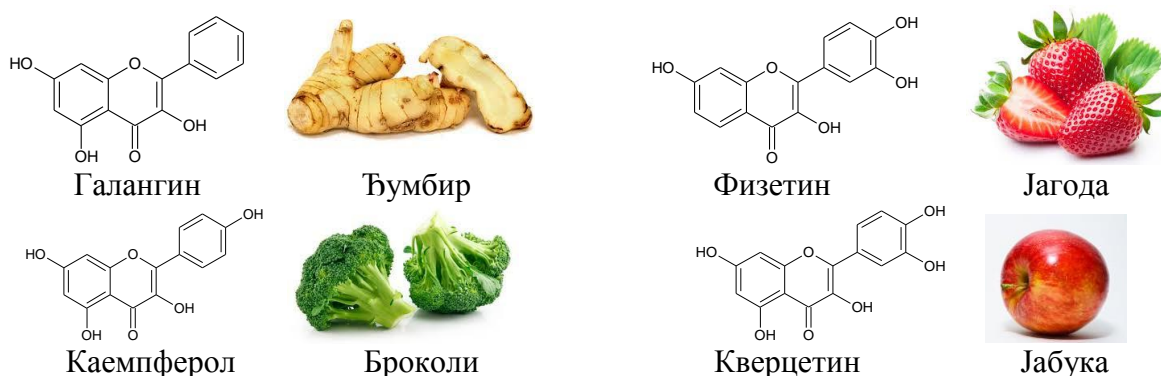
Највећа разноврсност флавоноидних хетерозида налази се у скривеносеменицама; тако је у врстама фамилије *Asteraceae* идентификовано преко тридесет различитих типова флавоноида. Хетерозиди су растворни у води и налазе се у ћелијском соку, вакуолама епидермалних ћелија мезофила. Одговорни су за боју цветова, плодова и листова биљака. Халкони, аурони и неки флавоноиди су жуте боје, док црвена, плава и разне нијансе љубичасте боје потичу од антоцијана. Агликони флавоноида се налазе на површини листова и цветова. Сматра се да оваква локализација штити биљку од штетних ефеката ултраљубичастог зрачења. Заштитна улога флавоноида огледа се и у њиховој антимикробној активности, а за биљку у којој настају су значајни и као саставни делови ензимских система, неопходних за обављање метаболичких процеса.

На Слици 2 представљени су различити флавоноиди биљака заступљених у свакодневној људској исхрани [26, 27].

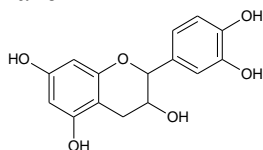
А) Флаволи



В) Флавоноли



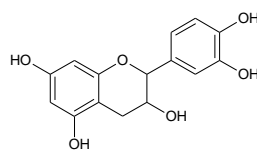
С) Катехини



(-)-Епикатехин



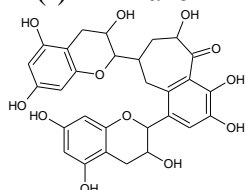
Акација



(-)-Катехин



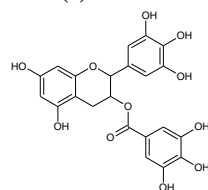
Зелени чај



Теафлавин



Црни чај

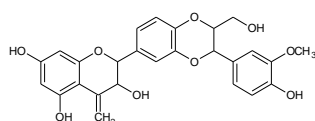


(-)-Епигалокатехин галат



Чај

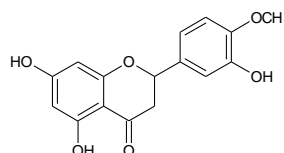
Д) Флаваноли



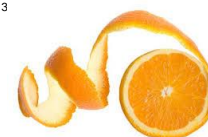
Силибинин



Плава детелина

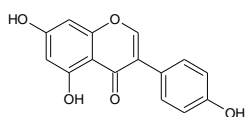


Хесперетин



Кора поморанџе

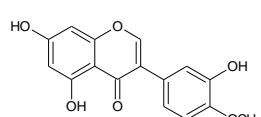
Е) Флаванони



Генистеин



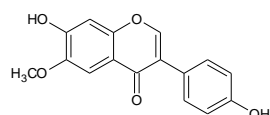
Псоралеа



Пратенсеин



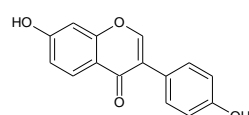
Црвена детелина



Глицитеин



Соја

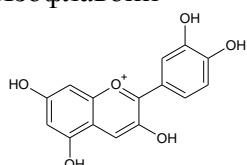


Даидзеин



Kwao krua

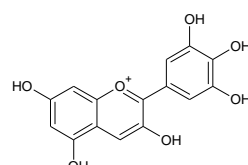
Ф) Изофлаволи



Цианидин



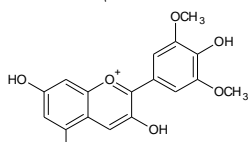
Трешња



Делфинидин



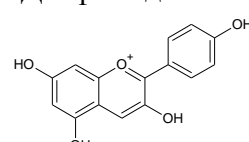
Вишња



Малвидин



Грожђе



Пеларгонидин



Купина

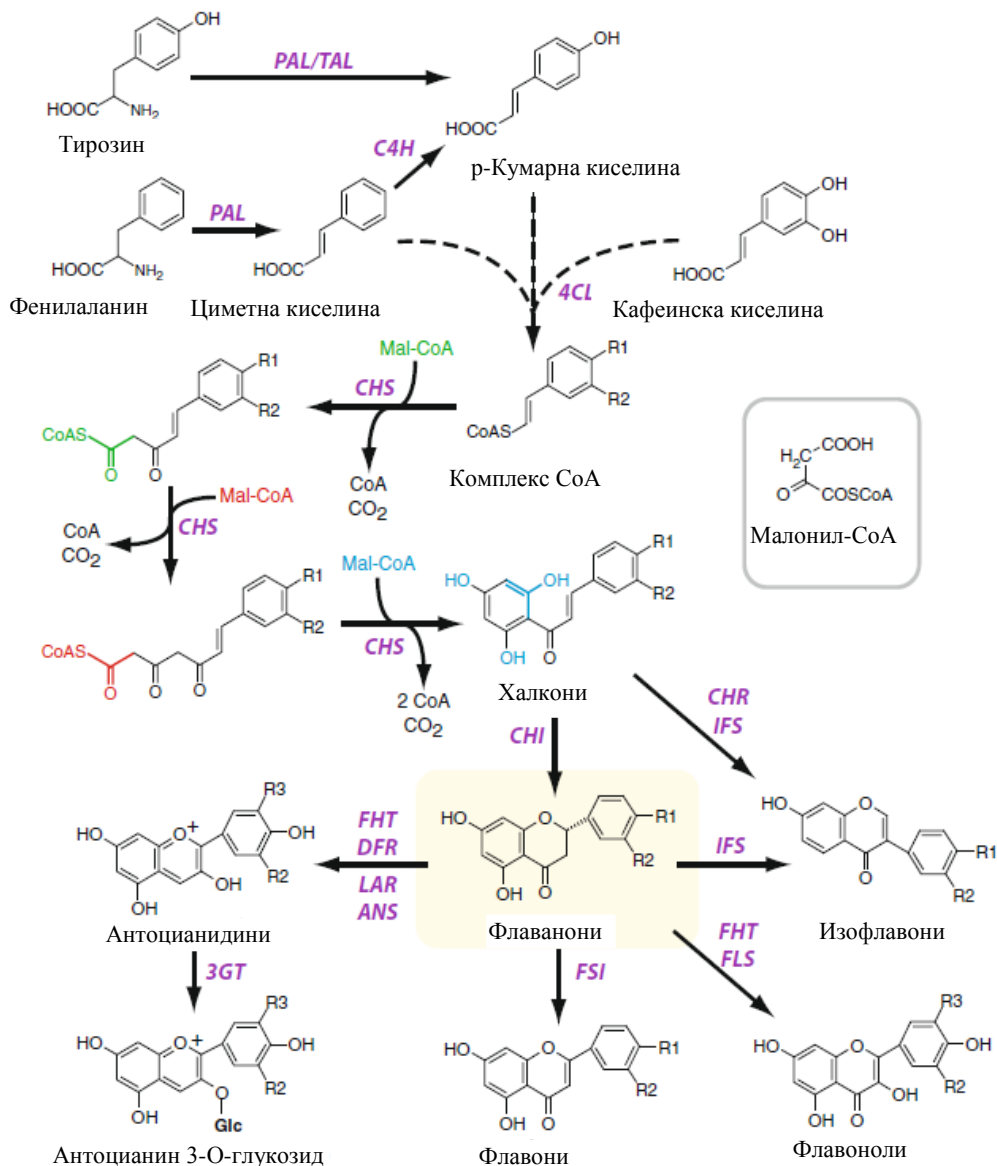
Слика 2. Хемијске структуре неких природних флавоноида и њихови извори.

А) флаволи, В) флаваноли, С) катехини, Д) флаваноли, Е) флаванони и Ф) изофлаволи [26, 27]

1.1.4. Биосинтеза флавоноида

Биосинтеза полифенола се одвија у цветовима и плодовима биљака. Најважнији конституенти ових супстанци су флавоноиди, међу којима су флаванони (као прекурсори свих осталих једињења) најзаступљенији.

Флаванони се синтетизују од аминокиселина фенилаланина или тирозина. Начин биосинтезе флавоноида приказан је на Шеми 1.



Шема 1. Детаљна шема биосинтезе флаванона и различитих класа флавоноида (ознаке у шеми: DFR – дихидрофлаванон редуктаза, LAR – леукоантоцианидин редуктаза, ANS – антоцианидин синтетаза, 3GT уридо – флаванон 3-глюкозид трансфераза, FSI – флаванон синтетаза, CHR – халкон редуктаза, IFS – изофлаванон синтетаза, FHT – флаванон хидрокситрансфераза, FLS – флавонол синтетаза) [28]

Процес биосинтезе флавоноида почиње ензимом фенилаланин-тирозин амонијум лазом (PAL/TAL), који преводи наведене аминокиселине у фенилпропионску киселину. Биосинтетички пут укључује ензиме цитохром-Р450 и цинамат-4-хидроксилазу (С4Н), који додају хидроксилну групу у положају 4 ароматичног прстена фенилаланина. Након тога се синтетизују естри коензима А (СоА) из фенилпропионске киселине деловањем фенилпропионил-СоА лигазе, као што је 4-кумарил-СоА лигаза (4CL). Тип III поликетид синтетазе - халкон синтетазе (CHS) катализује секвенционалну кондензацију три дела малонил-СоА са једним делом СоА-естра образујући халконе. Ово је први корак у биосинтези флавоноида. Крајње структуре флаванона се синтетизују само када се халкони стереоспецифично изомеризују у (2S)-флаваноне у присуству халкон изомеразе (CHI), што се одвија спонтано у алкалној средини.

Након синтезе флаванона, мноштво ензима делује на функционализацију и/или измену конформација тропрстенасте фенилпропаноидне основе дајући преко 8000 различитих хемијских структура. Функционализација се може остварити хидроксилацијом, редукцијом, алкиловањем, оксидацијом и гликозилацијом појединачно или у комбинацији.

1.1.5 Физичко-хемијске особине флавоноида

Биолошка активност неке супстанце зависи од њених структурних, физичких и хемијских особина.

Агликони флавоноида су кристалне супстанце жуте боје са тачком топљења која се креће у опсегу од 230 до 320 °С, док су гликозиди флавоноида светло жуте или беле боје са нижом тачком топљења која се налази у опсегу од 150 до 200 °С.

Уопштено, агликони су липофилни и у већини случаја растворни у поларним органским растварачима: метанолу, етанолу, диетил-етру, ацетону, а готово су нерастворни у води, док су гликозиди ових једињења растворни у врућој води, алкохолима и поларним растварачима. Када имају најмање једну слободну фенолну групу, растварају се у растворима алкалних хидроксида.

1.1.5.1. Липофилност биофлавоноида

Једна од битнијих особина која утиче на биолошку активност супстанци, њихову ресорпцију, расподелу, метаболизам и елиминацију је липофилност.

Липофилност представља тенденцију једињења да се расподели између липофилне органске фазе (која се не меша се водом) и поларне водене фазе. Липофилност се изражава преко логаритма партиционог коефицијента Р (logP) између ове две фазе. Супстанце са великом липофилношћу лако пролазе кроз ћелијску мембрану, најчешће обичном дифузијом. Обично се користе два параметра за објашњење липофилности и то: партициони коефицијент (P) и хидрофобна супституциона константа (π). Први параметар је везан за молекулу као целину, док је други везан за супституенте [29, 30].

Равнотежни однос концентрација активне супстанце у липидној и воденој фази назива се партициони коефицијент и у систему органска средина/водена фаза природна је мера способности супстанце да прође кроз мембрану. Она представља допринос који даје одређена група партиционом коефицијенту и дефинисана је од стране Hansch-а и сарадника једначином:

$$\pi = \log P_{RH} - \log P_{RX} \quad (1)$$

где су P_{RH} и P_{RX} партициони коефицијенти стандардног једињења и његовог моносупституисаног деривата. Међутим, кад је присутно неколико супституената, вредност π за дато једињење представља суму π вредности за сваки супституент посебно.

Вредност партиционог коефицијента за флавоноиде представљена је у Табели 2.

Табела 2. Вредност $\log P_{exp}$ за флавоноиде [31]

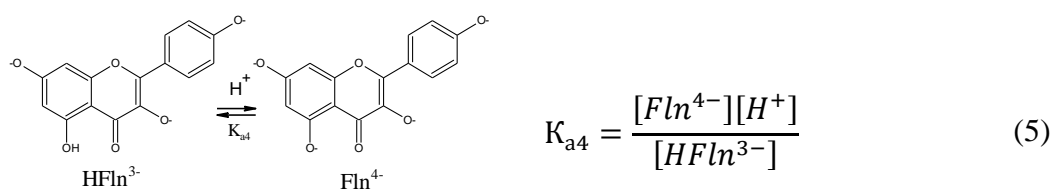
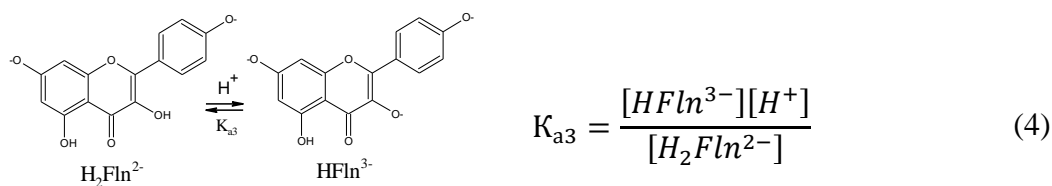
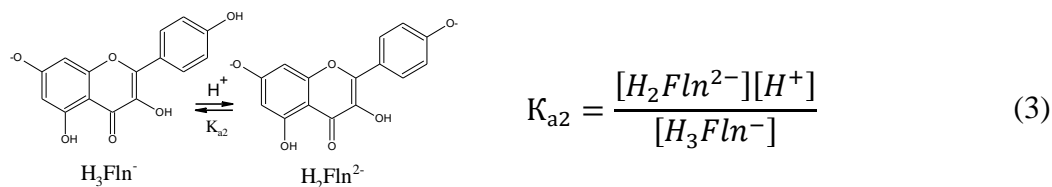
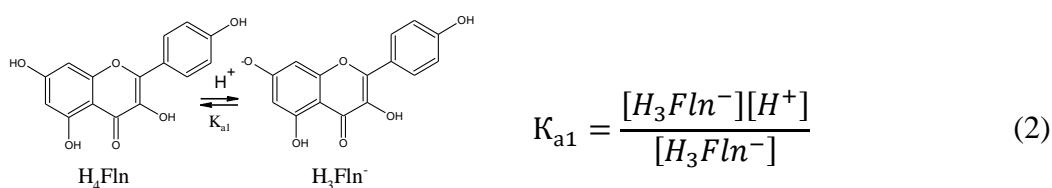
Једињење	$\log P_{exp}$	Једињење	$\log P_{exp}$
Катехин	0,51	Диозметин	3,10
Кверцетин	1,82	Апигенин	2,92
Каемпферол	3,11	Лутеолин	2,53
Кверцетин-3-О-глукозид	0,76	Хризин	3,52
Рутин	-0,64	5-Хидроксифлавоин	4,30
Хесперетин	2,60	7-Хидроксифлавоин	3,62
Фустин	0,87	5,3',4'-Трихидроксифлавоин	3,31
Таксифолин	0,95	Даидзеин	2,51
Нарингенин	2,60	Генистеин	3,04
Нарингин	-0,44	Глицитеин	1,97
Диозмин	0,14	Генистин	0,97

На основу Табеле 2 може се закључити да присуство хидроксилних група које донирају атом водоника, и при томе граде водоничне везе, повећавају растворљивост тих молекула у води, а у исто време смањују липофилност полифенола. Утицај броја хидроксилних група на липофилност, нарочито је изражена код флаванона. Најмању вредност липофилности има нарингин ($\log P = -0,44$).

1.1.5.2. Киселинско-базне особине флавоноида

Како су флавоноиди полифенолна једињења, понашају се као слабе полипротичне киселине. Вредности pK_a веома зависе од природе и положаја супституената у суседним положајима и обично се налазе у опсегу од 8 до 10,5.

Ова група једињења поседује од три до пет хидроксилних група које могу дисосовати са pK_a вредностима релативно блиским једна другој. На Шеми 2 приказана је ступњевита дисоцијација каемпферола као и одговарајуће константе дисоцијације K_{a1} , K_{a2} , K_{a3} и K_{a4} приказане једначинама (2 – 5).



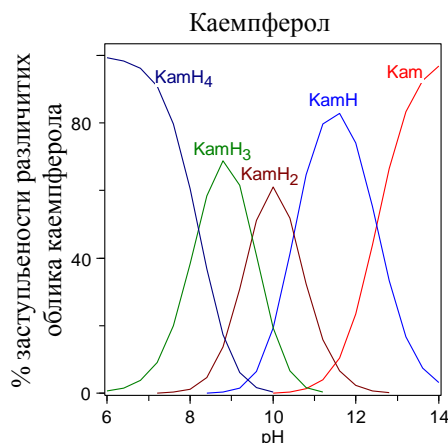
Шема 2. Поступна дисоцијација каемпферола

Као што се може видети са Шеме 2, најкиселије хидроксилне групе су на положају 7 и 4'. Преостале две константе дисоцијације су везане за положаје 3-ОН и 5-ОН. Хидроксилна група везана за С5 битно се разликује по својим особинама од 7- и 4'-хидроксилних група јер је она у пери-позицији у односу на протон-акцепторску карбонилну групу способну да гради интрамолекулске водоничне везе [32].

Хидроксилна група везана за С3 атом угљеника такође гради интрамолекулску водоничну везу са карбонилном групом, али ова веза је значајно слабија него она која се формира са хидроксилном групом на С5 атому.

Склоност ка дисоцијацији сваке хидроксилне групе није константна код свих врста флавоноида и у значајној мери варира у зависности од природе супституената присутних у скелету флавоноида.

Каемпферол постоји у неутралном облику при рН вредностима мањим од 8,0 (тетрапротонована киселина) и као протонувани анјон; као трипротонован између рН 8 и 9,5, дипротонован између 9,5 и 10,5; монопротонован између 10,5 и 12,5 и у депротонованом облику при рН већим од 13. Дистрибуциони дијаграм различитих врста каемпферола у воденом раствору је представљен на Слици 3.



Слика 3. Дистрибуциони дијаграм различитих врста каемпферола у функцији од рН [33]

У Табели 3 су приказане литературне вредности константи дисоцијација неких флавоноида.

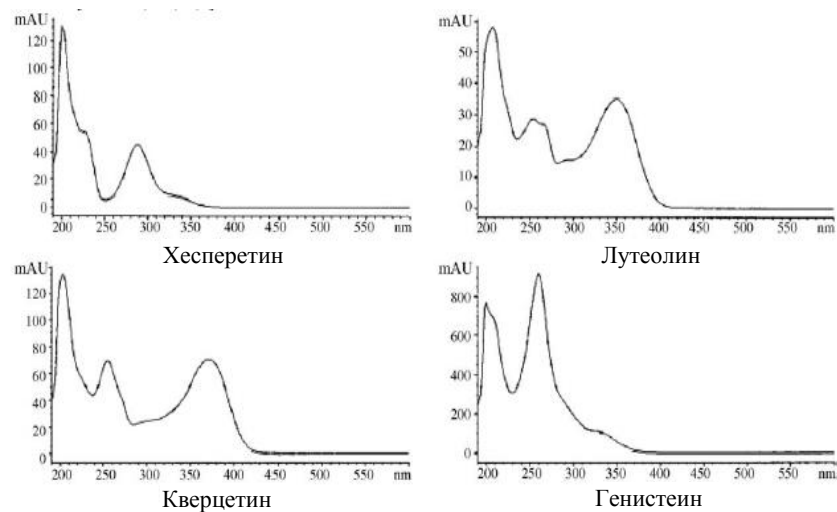
Табела 3. Вредности сукцесивних константи дисоцијације флавоноида

Супстанца	pK ₁	pK ₂	pK ₃	pK ₄	pK ₅	Услови	Реф.
Катехин	8,77	9,97	11,99			$\mu = 0,10 \text{ mol/L NaNO}_3, T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$	34
Епикатехин	9,00	10,20	12,20			$\mu = 0,10 \text{ mol/L NaNO}_3, T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$	34
Каемпферол	8,2	9,5	10,5	12,5		$\mu = 0,10 \text{ mol/L NaNO}_3, T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$	34
Фисетин	8,405	9,965	11,773	11,906		$\mu = 0,10 \text{ mol/L KCl}, T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$	35
Морин	5,702	8,860	10,555	11,642	11,851	$\mu = 0,10 \text{ mol/L KCl}, T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$	35
Кверцетин	8,331	9,667	11,211	11,948	12,378	$\mu = 0,10 \text{ mol/L KCl}, T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$	35
Нарингин	8,238	10,034	11,324			$\mu = 0,10 \text{ mol/L KCl}, T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$	35
Галангин	8,232	10,684	11,694			$\mu = 0,10 \text{ mol/L KCl}, T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$	35
Кризин	7,983	11,406				$\mu = 0,10 \text{ mol/L KCl}, T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$	35

На основу вредности за pK_a флавоноида изводи се закључак да су њихове хидроксилне групе мале киселости.

1.1.5.3. UV/Vis апсорпциони спектри флавоноида

Степен јонизације фенолних група флавоноида у великој мери утиче на апсорпцију светлости (боја) и флуоресцентне спектре ових једињења, што представља битне услове за квалитативну и квантитативну анализу [36]. Као пигменти одговорни су за боју листова и латица биљака, зато што флавоноиди показују интензивну апсорпцију у блиској ултраљубичастој (UV) области спектра. Хетерозиди и агликони имају специфичан апсорпциони спектар, најчешће са две апсорпционе траке: прва између 300 и 400 nm која потиче од прелаза у прстену В, односно циметног система и друга између 240 и 280 nm која потиче од $\pi \rightarrow \pi^*$ прелаза у прстену А.



Слика 4. UV/Vis спектри флавоноида [19]

На Слици 4 су приказани UV/Vis спектри неких флавоноида и може се уочити да се прва трака за флавоне налази у опсегу таласних дужина од 310 до 350 nm, док је за флавоноле та трака између 350 и 385 nm. Друга трака се налази у опсегу од 250 до 290 nm и иста је за све групе флавоноида. Код флаванона и дихидрофлавонола, прва трака је померена ка мањим таласним дужинама у опсегу од 300 до 330 nm, док се друга трака налази у области од 277 до 295 nm и представља главни пик. На основу тога, ове две подгрупе не могу се окарактерисати једноставном UV/Vis анализом. Флаваноли показују максималну апсорпцију на неспецифичној таласној дужини између 270 и 290 nm, на којој већина фенола апсорбује, што не дозвољава њихову селективну детекцију.

У Табели 4 приказане су таласне дужине максимума апсорпције неких флавоноида.

Табела 4. Таласне дужине (nm) максимума апсорпције неких флавоноида у метанолу [37].

Једињење	Прва трака	Друга трака	Једињење	Прва трака	Друга трака
Кверцетин	372	256	Кризин	314	268
Физетин	362	248	Ериодиктиол	336	288
Каемпферол	366	267	Хесперетин	336	288
Флавонол	344	240	Таксифолин	340	288
Лутеолин	350	254	(+)-Катехин	-	280
Апигенин	336	269	(-)-Епикатехин	-	280

1.1.5.4. Флуоресцентни спектри флавоноида

Флавоноиди ретко имају природну флуоресценцију при дневном осветљењу, али под ултраљубичастом светлошћу флуоресцирају. Интензитет флуоресценције и боја се мењају у присуству алкалија или металних комплексирајућих агенаса. За доказивање

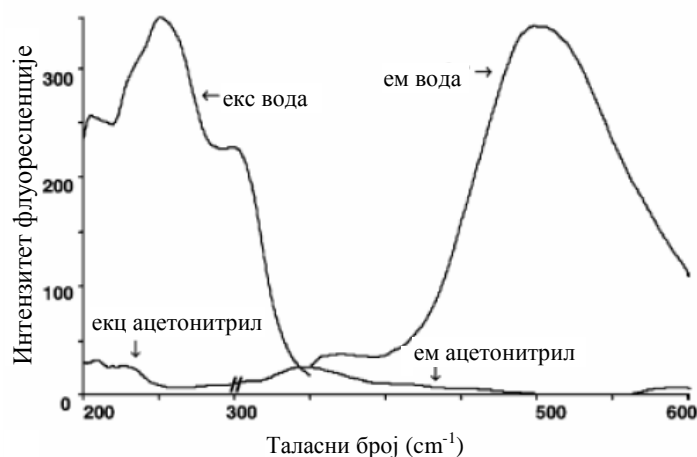
присуства флавоноида може бити искоришћена специфична флуоресценција комплекса ових једињења са оксалном и борном киселином.

У класе флавоноида које показују природну флуоресценцију убрајају се изофлавонони, флавоноиди са ОН групом у положају 3, као и метиловани флавонони.

Природа и број функционалних група одређују да ли одређени флавоноид показује флуоресценцију или не. Само они изофлавоноиди који немају ОН групу у положају 5 показују јаку природну флуоресценцију. Ова једињења показују велика Stokes-ова померања, због промене структуре молекула од непланарне у S_0 стању до планарне у S_1 стању, праћене променом електричног диполног момента. Ова велика померања стварају велику селективност у односу на нечистоће из матрикса, пошто оне омогућају коришћење дужих емисионих таласних дужина.

Флуоресцентна екситација, па стога и емисиони спектри, показују зависност од рН. На рН вредностима које су блиске pK_a вредности анализата јавља се додатна трака на 340 nm. При вишим вредностима рН, супстанца је претежно у анјонском облику. Померање у емисионом спектру је мање изражено: од 495 nm код неутралних молекула до 470 nm за анјоне. Код гликозида овакав ефекат се не јавља јер супституент спречава јонизацију. Такође, 3-ОН група у побуђеном стању је укључена у интрамолекулски пренос протона, што доводи до појаве две траке чији однос зависи од састава растварача.

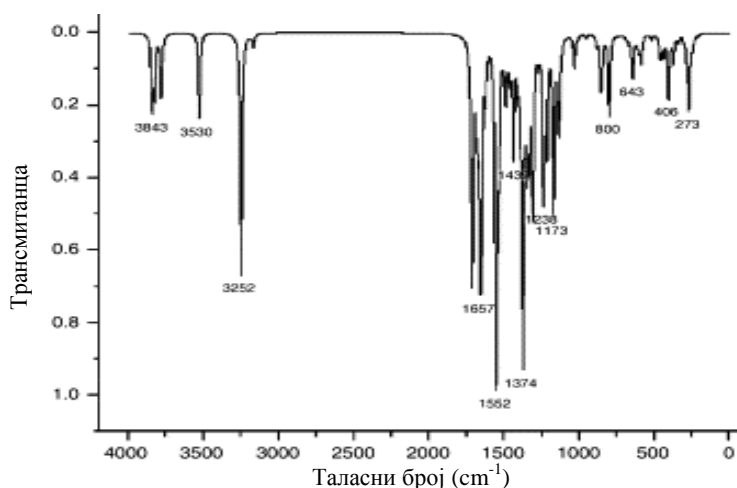
На Слици 5 приказан је флуоресцентни спектар оноина.



Слика 5. Флуоресцентни екситациони (екс) и емисиони (ем) спектар оноина у ацетонитрилу и води [38]

1.1.5.5. IR спектри флавоноида

IR и Raman спектроскопске методе се користе за добијање структурне информације о геометрији флавоноида. Главна примена ових метода је за проучавање места и природе супституената (хидроксилних и метокси група) у молекулској структури, укључујући испитивање диедарског угла између фенилног прстена и хромонског дела молекула. На Слици 6 је приказан IR спектар кверцетина.



Слика 6. IR спектар кверцетина [39]

Вибрациони спектри једноставних флавоноида у чврстом стању су упоређивани са спектрима добијеним у раствору. Разлике између спектра добијених у чврстом стању и раствору су објашњене могућношћу грађења интрамолекулске водоничне везе код чврстих супстанци, а под специфичним условима и у раствору, или грађењем интермолекулске водоничне везе са растварачем (CH₃OH). Раманска спектрометрија се чешће користи код ових проучавања јер је она мање компликована него IR спектрометрија.

На основу броја и места хидроксилних група у пиронском и бензеновом прстену могу се анализирати померања валенционих вибрација карбонилне групе флавоноида. Такође треба разматрати канонске структуре флавоноида и проценити стабилност петочланих и шесточланих прстенова који се формирају грађењем интермолекулске водоничне везе.

Карактеристичне траке које се јављају у IR спектрима неких флавоноида дате су у Табели 5.

Табела 5. Прелазии у IR спектрима флавоноида и њихова асигнација [40]

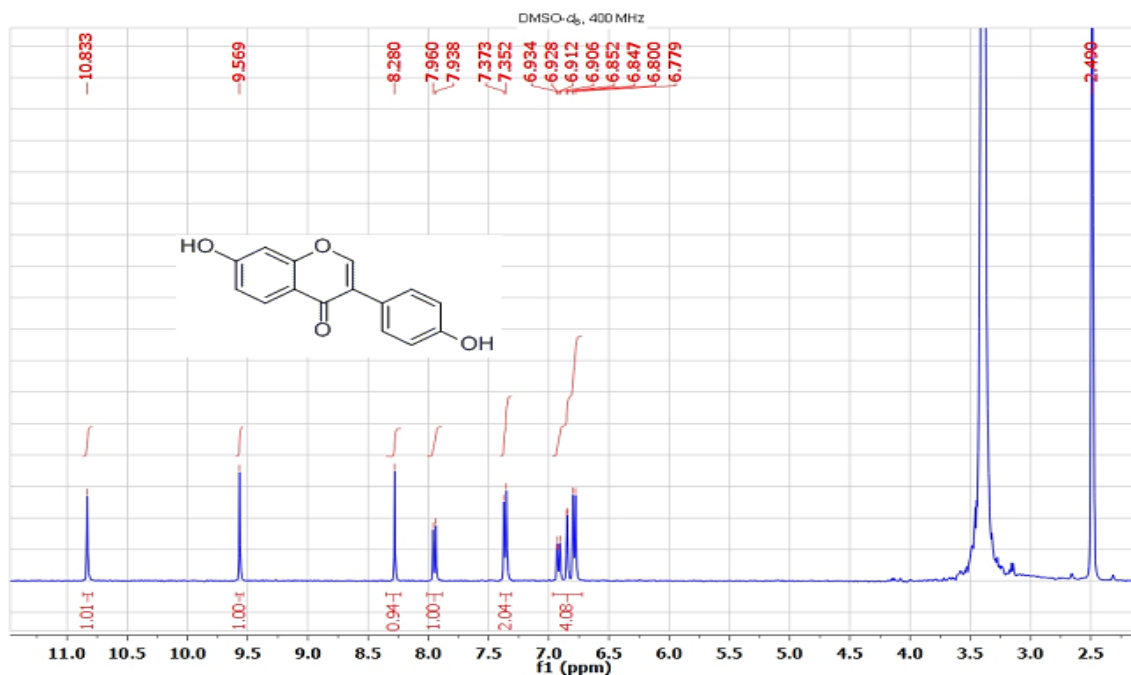
Супстанца	Валенциона веза C=O	Аромарично језгро	-C-OH деформационе вибрације	-C-OH валенционе вибрације
Флавон (2-фенил-γ-бензопирон)	1648s	1604s, 1568s, 1496s, 1465s, 1448s, 1377s	1313w, 1283w, 1260w, 1224m,	1128s, 1079w, 1044, 1028m
Фисетин	1636, 1620s	1603s, 1560s, 1516, 1507s, 1464m, 1447	1304, 1285m, 1252w, 1193m	1020
Мирицетин	1640s	1596s, 1560s, 1520s, 1465s, 1447s	1333, 1326, 1228, 1202, 1186	1110, 1029s
Кверцетин	1664s	1612s, 1564s, 1523s, 1458, 1429	1317, 1296, 1245, 1211	1015m
Морин	1655s	1608s, 1572s, 1508s, 1452s	1320m, 1264m, 1244, 1216w, 1200	1092w
Хесперетин	1652s	1612s, 1584, 1516, 1504, 1472, 1444m	1284, 1264, 1240, 1204, 1188	1092, 1068

s - јака трака, m – трака средње јачине, w – трака слабе јачине.

У Табели нису дате вредности таласних бројева веће од 2000 cm^{-1} где се јавља веома широка трака од вибрација хидроксилне групе која прекрива друге траке.

1.1.5.6. NMR спектри флавоноида

NMR спектроскопија је важна аналитичка метода за одређивање структуре флавоноида [41 – 44], али њена употреба је ограничена због мале осетљивости и потешкоћа које се јављају приликом анализе смеше. Међутим, развој NMR спектроскопије омогућава најкомплетније објашњење структуре флавоноида. Могуће је урадити комплетну асигнацију свих сигнала који потичу од протона или угљеника код свих флавоноида изолованих у малим количинама. Ове асигнације се заснивају на хемијском померању (δ) и константама купловања (J) у 1D ^1H и ^{13}C NMR спектрима. Друге методе, као што је ^{17}O NMR спектроскопија, користе се за проучавање само неких класа флавоноида. На Слици 7 је приказан типичан ^1H NMR спектар флавоноида.



Слика 7. ^1H NMR спектар даидзеина снимљен у DMSO [45]

Сигнали који су карактеристични за све класе флавоноида у ^1H NMR су сигнали атома водоника у бензенском прстену и то на C2' око 8 ppm, C5' око 7 ppm и C6' око 8 ppm. Остали сигнали који се јављају у ^1H NMR су карактеристични за поједине класе флавоноида. Тако, на пример, за флавоне је карактеристичан сигнал на 6,8 ppm који потиче од водоника везаног за C3 угљеников атом, док се за изофлавоноиде и флаваноне овај сигнал јавља на 5 ppm.

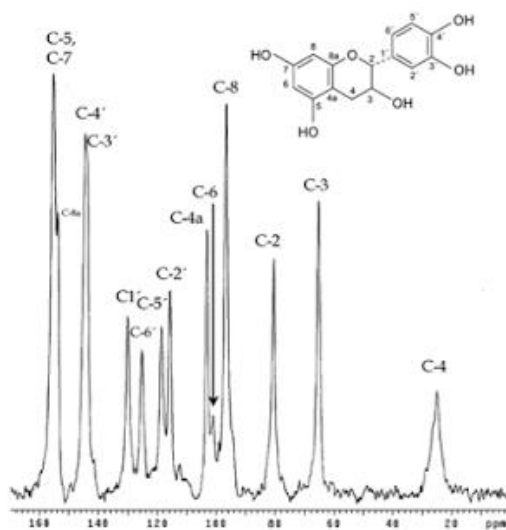
У Табелама 6 и 7 приказане су вредности ^1H и ^{13}C померања за одговарајуће флавоноиде.

Табела 6. ^1H NMR померања појединих атома водоника у одређеним флавоноидима

Флавоноид	3	5	6	7	8	2'	3'	4'	5'	6'	Реф.
Лутеолин	6,76s	12,7s			6,94s	7,44		3,88s	7,11d 8,7	7,54d 8,6	46
Апигенин	6,87s		6,19d		6,51d	7,98 d 9,0	7,15d		7,15d 9,0	7,84d 9,0	47
Изоорнитин	6,55s				6,91s	7,56 s	3,90s OMe		6,88d 7,2	7,57 d 8,6	48
Флавоноли	3	5	6	7	8	2'	3'	4'	5'	6'	
Каемпферол			6,14d 1,9		6,34d 1,9	8,01d 8,8	6,89 d 8,8		6,89d 8,8	8,01d 8,8	49
Кверцетин			6,27		6,47	7,82			6,97	7,72	50
Изорамнетин			6,28		6,48	8,04	4,04 OMe		7,00	7,72	51
Мирицетин			6,17d 2,0		6,35d 2,0	7,23d				7,23d	52
Аурони	α	4	5	6	7	2'	3'	4'	5'	6'	
Маесопсин	3,06s		5,76d 1,5	5,73d 1,5		7,00d 8,4	6,57d 8,4		6,57d 8,4	7,00d 8,4	53
Ликоагроаурон		7,46d 8,5	6,83 d 8,5			7,61 d 2,5			6,96 d 8,5	7,42d d 8,5	54
Изофлавоноиди	2	4	5	6	8	2'	3'	4'	5'	6'	
Јудаицин	4,88s	6,60s	7,05d 8,2	6,59d d 8,2	6,50d 2,1	3,74s OMe	6,82s		7,5 8,8	6,90s	55
Јунипегнин	7,89s			4,04s OMe	6,53s	7,1d 2,0	3,93s OMe	3,92s OMe	6,94d 8,3	7,03d d 8,3	56
Флаванони	2	3eq	3ax	5	6	7	8	2'	3'	4'	
Хесперетин	5,45m	2,78d 10,5	3,15m	12s ОН	6,15d 2,0		6,17d 2,0	6,8m	9,15br s ОН	3,75s Ome	57
Нарингенин	5,46d 2,9 13	2,83d 2,9	3,25d 13,0		6,30d 2,2		6,27d 2,2	7,40d 8,6	6,90d 8,6		58

s – синглет, d – дублет, dd – дублет дублета, br – развучен и m – мултиплет

За све класе флавоноида у ^{13}C NMR карактеристични су сигнали који се јављају у области од 110 – 150 ppm који потичу од угљеникових атома бензенског прстена. Једини карактеристични сигнали за класу флаванона за C2 и C3 атоме јављају се на око 80, односно 45 ppm. На Слици 8 приказан је ^{13}C NMR спектар катехина.

Слика 8. ^{13}C NMR спектар катехина

Табела 7. ^{13}C NMR спектри флавоноида

Флавоноид	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1'	2'	3'	4'	5'	6'	ОМе	Реф.
Лутеолин	164	103	182	147	131	151	93,8	149	106	123	113	147	151	112	119	56	46
Апигенин	166	104	184	163	100	166	95,1	159	105	126	129	118	161	118	129		47
Изоориентин	163	103	182	161	109	163	93,6	156	103	121	110	148	151	116	120	56	48
Спинозин	164	102	182	160	109	164	90,2	157	104	121	128	116	161	116		56	49
Флавоноли	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1'	2'	3'	4'	5'	6'	ОМе	Реф.
Каемпрефол	156	133	177	161	98,9	165	93,7	156	103	121	131	115	160	115	131		49
Кверцетин	148	137	177	162	99,3	165	94,4	158	104	124	116	149	146	116	122		50
Изорамнетин	159	136	179	163	101	163	95,4	159	106	123	115	151	149	116	124		51
Мирицетин	158	135	179	163	99,7	166	94,5	158	106	122	110	147	138	147	110		52
Аурони	2	3	4	5	6	7	8	9	a	1'/1''	2'/2''	3'/3''	4'/4''	5'/5''	6'	ОМе	Реф.
Маскопсин	107	197	174	91,1	172	96,8	160	103	42,1	126	133	116	157	116	133		59
Ликофлавроурон	147	183	123	113	168	113	164	115	112	125	119	146	148	117	126		60
Изофлавоноиди	2	3	4	4a	5	6	7	8	8a/9	23	122	133	18	26	6'	ОСН₂О	Реф.
Јудацин	67,6	129	121	118	127	109	157	103	154	1'	2'	3'	4'	5'	108	101	55
Иригјалонин	153	120	181	107	155	130	155	93,9	154	119	153	96	148	141	109		56
Јунипегенин	152	121	181	106	154	130	155	93,2	153	119	149	147	144	146	123		56
Флаванони	2	3	4	5	6	7	8	9	10	121	112	149	149	111	6'	ОМе	Реф.
Хесперитин	78,5	42,1	197	163	96,5	165	95,7	163	103	1'	2'	3'	4'	5'	118		57
Нарингенин	80,6	44,1	198	159	96,9	167	97,9	165	105	131	114	149	147	112	130		58

1.1.5.7. Масени спектри флавоноида

Већина гликозида флавоноида су термолабилна једињења и немогуће је испаравање таквих једињења, без разлагања, чак и у јонским изворима где је високи вакуум. У овом случају неопходне су методе “soft” јонизације при чему се молекули анализита јонизују без испаравања у високом вакууму (FAB, LSIMS или MALDI) или при атмосферском притиску (ESI, APCI). Из масеног спектра могу се добити информације о молекулској маси целог коњугата, величини шећерне компоненте везене за агликонски део као и молекулској маси самог агликона.

Флавоноид-О-гликозиди дају у позитивном моду масене спектре са интензивним $[M+H]^+$ јоном као и фрагментне јоне настале након раскидања гликозидних веза између флавоноида и шећера. Нешто другачија ситуација се јавља у масеном спектру добијеном у негативном моду где се јавља много мања фрагментација депротонаног молекулског јона $[M-H]^-$. Код О-гликозил-гликозида, долази до премештања шећера током процеса фрагментације, тако да секвенца губљења шећера не одговара редоследу везивања шећера у молекулу.

Другачији путеви фрагментације се јављају код С-гликозида, код којих долази до раскидања прстена шећера и стварања интензивног јона $[M+H-120]^+$. Раскидање шећерног дела примећено је код свих типова С-гликозида приликом позитивног и негативног мода рада.

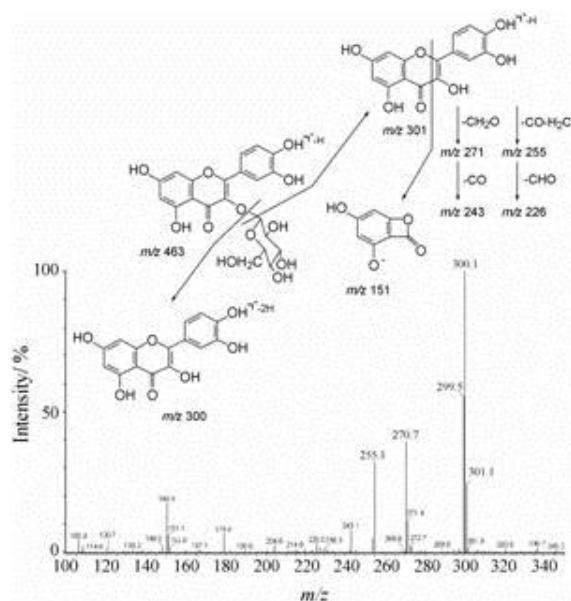
Структурне информације добијене из масених спектра могу се побољшати када се примењују технике тандемске масене спектрометрије. Могуће је повећати степен фрагментације коришћењем CID MS/MS технологије, међутим код LC/MS инструмената са јонизацијом на атмосферском притиску (APCI или ESI) повећање потенцијала између улазног прореза на анализатору и скимера такође доводи до фрагментације молекулског јона, нарочито у позитивном моду.

Највећа предност “soft” техника јонизације је могућност купловања MS са различитим хроматографским техникама као што су гасна хроматографија (GC–MS), капиларна електрофореза (CE–MS) и течна хроматографија (LC–MS).

Могућност одређивања тачне молекулске масе јона и начина фрагментације омогућава:

- a) структурне информације о природи агликона и супституената (шећера, ацил група, итд),
- b) интергликозидно повезивање и место супституције на агликону,
- c) стереохемијске информације

На Слици 9 приказан је типичан масени спектар флавоноида, као и пут фрагментације кверцетин-3-О-галактозида у 70 % етанолу.



Слика 9. Масени спектар кверцетин-3-О-галактозида у 70 % етанолу [61]

У Табели 8 дати су карактеристични фрагменти у масеном спектру неких флавоноида као и њихова релативна заступљеност.

Табела 8. Масени спектри неких флавоноида

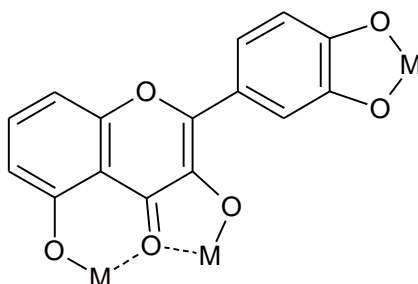
Једињење	Матични јон	Фрагменти	Реф.
Катехин	289 (40 %) [M-H] ⁻	245 (100 %)	62
Епикатехин	289 (40 %) [M-H] ⁻	245 (100 %)	62
Кверцетин	301 (60 %) [M-H] ⁻	151 (100 %)	62
		199 (20 %)	62
Лутеолин	285 (100 %) [M-H] ⁻	175 (20 %)	62
		151 (85 %)	62
		133 (50 %)	62
		177 (20 %)	62
Нарингенин	271 (25 %) [M-H] ⁻	151 (100 %)	62
		119 (75 %)	62
		107 (35 %)	62
Апигенин	269 (60 %) [M-H] ⁻	151 (100 %)	62
		217 (40 %)	62
Каемпферол	285 (100 %) [M-H] ⁻	151 (85 %)	62
		133 (75 %)	62
Изорамнетин	315 (60 %) [M-H] ⁻	300 (100 %)	62
		151 (10 %)	62
		429 (65 %)	62
Лутеолин 6-С-гликозид (изоориентин)	447 (65 %) [M-H] ⁻	357 (100 %)	62
		327 (100 %)	62
Лутеолин 8-С-глукозид (ориентин)	447 (30 %) [M-H] ⁻	375 (70 %)	62
		327 (100 %)	62
Апигенин 8-С-глукозид (витексин)	431 (35 %) [M-H] ⁻	341 (30 %)	62
		311 (100 %)	62
Апигенин 6-С-глукозид (изовитексин)	431 (15 %) [M-H] ⁻	341 (40 %)	62
		311 (100 %)	62

1.1.6. Комплекси флавоноида са јонима метала

Како у свом молекулу флавоноиди садрже одређен број хидроксилних (најчешће две на В прстену и две на положају С3 и С5 на прстену С) односно кето групу (4-карбонил група на С прстену), постоји могућност грађења комплекса са јонима метала. Метали су есенцијални за многе физиолошке функције, као конституенти хемопротеина и кофактори различитих ензима, који су укључени у антиоксидативну одбрану (гвожђе у каталази, бакар у церулоплазмину, и бакар и цинк у супероксид дисмутази).

У зависности од структуре флавоноида постоје три потенцијална места за координовање са јонима метала [63] и то:

- између 5-хидроксилне и 4-карбонилне групе,
- између 3-хидроксилне и 4-карбонилне групе,
- између 3',4'-хидроксилних група у В прстену (Слика 10).



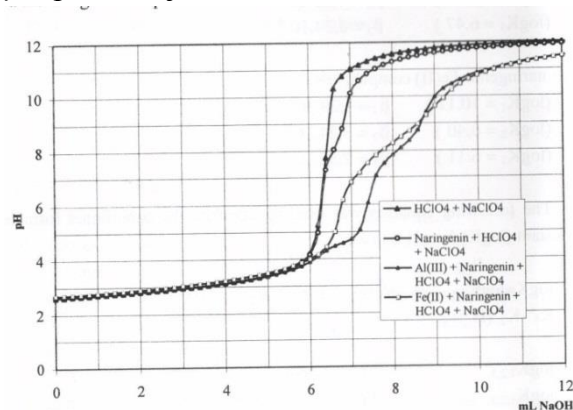
Слика 10. Потенцијална места координовања метала за флавоноид

Према литературним подацима, максимални број молекула флавоноида у комплексима са металима не прелази два. За одређивање састава и стабилности комплекса флавоноида са јонима метала најчешће се користе инструменталне методе: спектофотометрија [64] и потенциометрија [65], а све ширу примену налазе NMR [66] и масена спектрометрија [67]. Јони метала који показују висок афинитет ка кисеоничним донорима (фенокси, карбокси, карбонил) су најчешће “hard” Pearson-ове киселине. Тој групи припадају јони прелазних метала (Cr, Ln, Y, Zr, Al, Sn, Si, Sb) као и јони лантанида. Од *s* и *p* метала “hard” Pearson-ове киселине су Al, Be. Комплексирање биофлавоноида са наведеним јонима метала је интензивно проучавано током протекле деценије.

Јони метала и флавоноида најчешће показују стехиометрију 1 : 1, ређе 1 : 2 док полинуклеарни комплекси нису нађени.

Потенциометријским методама утврђен је састав и стабилност великог броја комплекса метала и флавоноида. При томе се углавном користи техника потенциометријских рН метријских титрација, будући да су флавоноиди слабе киселине у којима јон метала приликом комплексирања истискује водонични јон.

Пример потенциометријског одређивања састава и стабилности комплекса нарингенина и алуминијума и гвожђа приказан је на Слици 11.



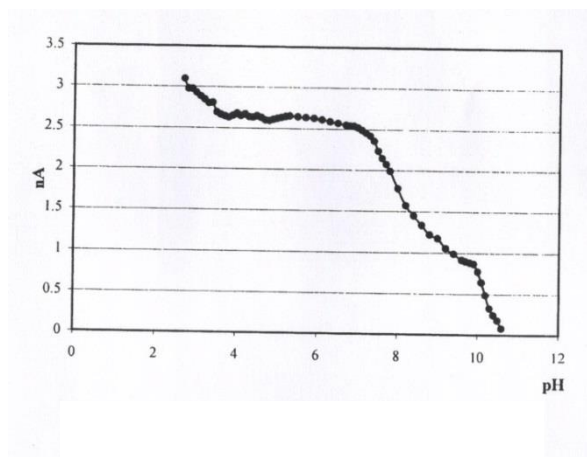
Слика 11. Потенциометријске титрационе криве за HClO_4 , HClO_4 + нарингенин, HClO_4 + нарингенин + Al(III) , HClO_4 + нарингенин + Fe(II) у NaClO_4 јонској средини [68]

Према Irving-Rossotti-јевој методи изводе се три титрације (1) јаке киселине (HClO_4) јаком базом, (2) смеше јаке (HClO_4) и слабе киселине (нарингенин) и (3) јаке киселине (HClO_4), слабе киселине (лиганд) и металног јона. На основу титрационих кривих (1) и (2) израчунава се средњи протонски број, \bar{n}_A , по формули:

$$\bar{n}_A = y + \frac{(V_1 - V_2)(N + C_o)}{(V_o + V_1)C_{L_o}} \quad (6)$$

где је V_o почетна запремина, N концентрација NaOH , C_{L_o} почетна концентрација лиганда, C_o почетна концентрација јаке киселине, а y представља број протона присутних у лиганду који могу дисосовати.

Константе протоновања се одређују са графика зависности \bar{n}_A од pH , где pH вредности \bar{n}_A на 0,5 и 1,5, криве формирања, одговарају вредностима $\log K_1$ односно $\log K_2$, што је представљено на Слици 12.



Слика 12. Крива формирања за нарингенин

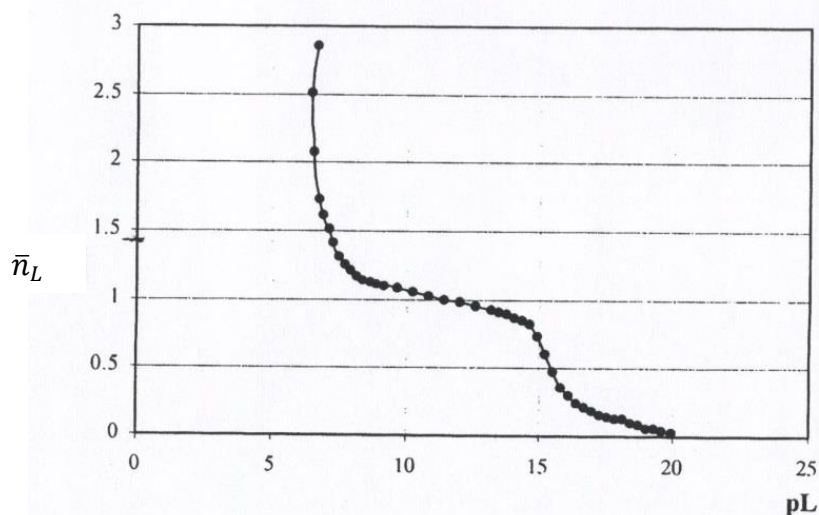
За одређивање константи стабилности користи се крива (3), при чему се рачуна средњи лигандни број, \bar{n}_L , на основу формуле:

$$\bar{n}_L = \frac{(V_3 - V_2)(N + C_o + C_{L_o}(y - \bar{n}_A))}{(V_o + V_1)\bar{n}_A C_M} \quad (7)$$

где су све ознаке исте као код претходне једначине, осим C_M која представља концентрацију метала помоћу које се израчунавају вредности pL , коришћењем формуле:

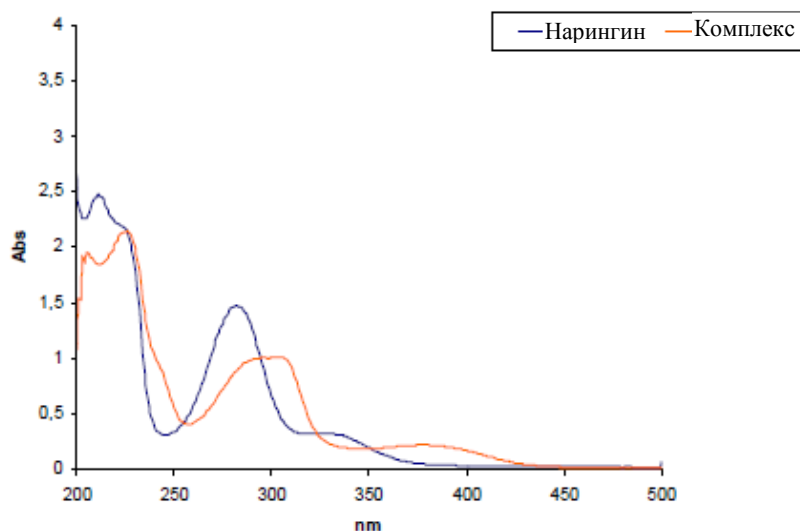
$$pL = \log \left(\frac{1 + K_1^H[H] + K_1^H K_2^H [H]^2 + \dots + K_1^H K_2^H \dots K_j^H [H]^j}{C_L - \bar{n}_L C_M} \right) \quad (8)$$

Константе стабилности се одређују на основу графика зависности \bar{n}_L од pL (Слика 13), где вредности pL на \bar{n}_L једнако 0,5 и 1,5 одговарају константама стабилности.



Слика 13. Крива формирања комплекса Al(III) + нарингенин

Будући да су флавоноиди обојени спектрофотометрија је метода избора за проучавање комплексирања при чему се прати померање карактеристичног апсорпционог пика флавоноида. На Слици 14 је приказана промена у спектру приликом комплексирања нарингина са бакром(II).

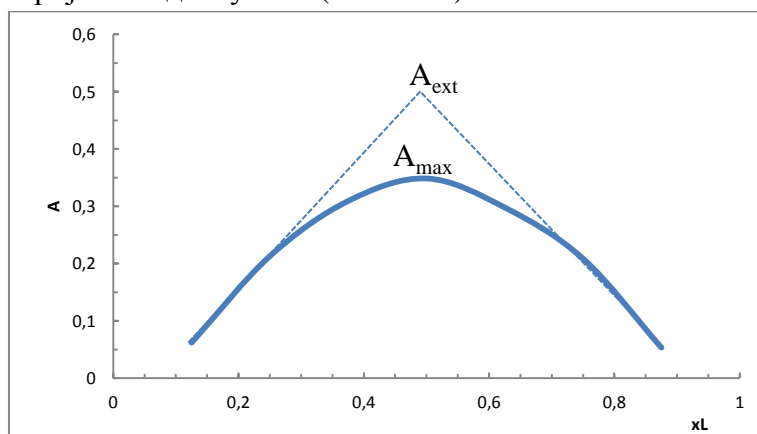


Слика 14. UV/Vis спектри нарингина (плава линија) и нарингин-бакар комплекса (црвена линија) [69]

Може се уочити да метанолски раствор слободног нарингина показује апсорпциони максимум на 282 nm, што одговара $\pi \rightarrow \pi^*$ електронским прелазима који се одвијају у А прстену и слабу траку на 326 nm, што одговара електронским прелазима у В прстену. Приликом комплексирања са јоном бабра апсорпциони максимум је померен на 304 nm, а слаба трака је померена на 379 nm у односу на слободни флавоноид, на основу чега се може закључити да постоји интеракција јона бабра са кондензованим прстеновима флавоноида на позицијама 4 и 5 [69].

Каемпферол даје једноставан спектар у области таласних дужина од 300 до 450 nm са једном асиметричном траком са максимумом апсорпције на 365 nm, док се у присуству бабра ова трака дели на две, и то једну са хипсохромним и другу са батохромним померањем. Батохромна трака ($\lambda_{\max} = 413$ nm) је карактеристична за комплекс и користи се за одређивање састава и константе стабилности комплекса.

Применом методе континуалних варијација и методе молских односа на спектралне податке може се закључити да се комплекс између бабра и каемпферола гради у стехиометријском односу 1 : 1 (Слика 15).



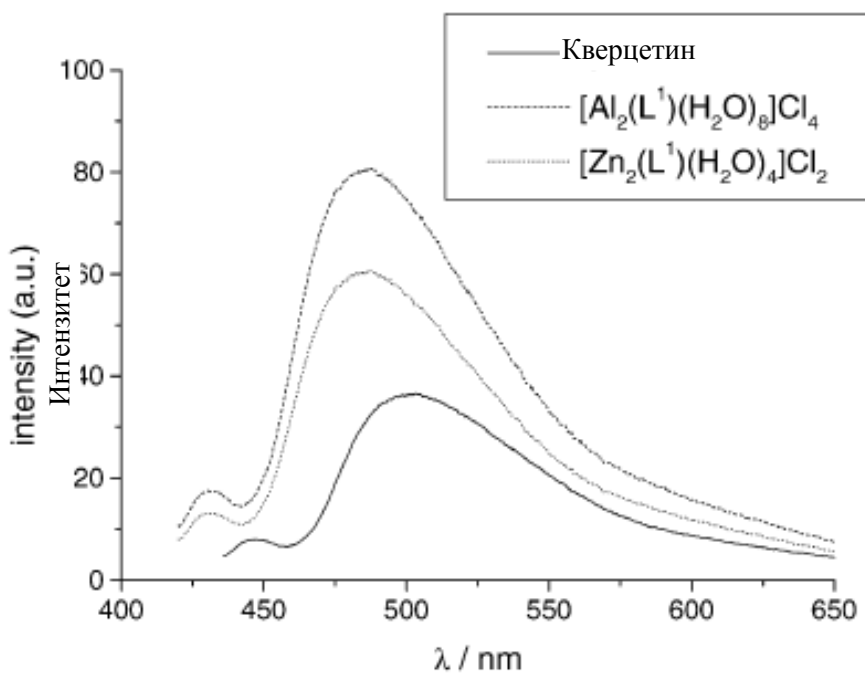
Слика 15. Јоб-ова крива за каемпферол-бакар комплекс [33]

Константа стабилности комплекса, β_1 , се рачуна коришћењем формуле:

$$\beta_1 = \frac{[ML]}{[M][L]} = \frac{\frac{A_{max}}{A_{ext}} C_x}{\left[C_M - \frac{A_{max}}{A_{ext}} C_x \right] \left[C_L - \frac{A_{max}}{A_{ext}} C_x \right]} \quad (9)$$

где је A_{ext} екстраполирана вредност апсорбације, A_{max} измерена максимална апсорбација, C_M концентрација јона метала, C_L концентрација лиганда и C_x концентрација метала и лиганда при максималној апсорбацији.

Сами флавоноиди показују природну флуоресценцију, а у присуству јона метала повећава се природна флуоресценција, па се промена интензитета флуоресценције може искористи за праћење комплексирања. На Слици 16 приказани су флуоресцентни спектри кверцетина и кверцетин металних комплекса [70].



Слика 16. Емисиони флуоресцентни спектар кверцетина и кверцетин метал комплекса у метанолу на собној температури [70]

Повећање интензитета флуоресценције комплекса повезано је са координовањем лиганда са малим, али високо наелектрисаним јонима Al(III) и Zn(II), који ефикасно повећавају ригидност структуре самог лиганда, због чега долази до смањене вероватноће расипања енергије.

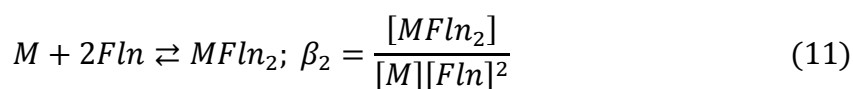
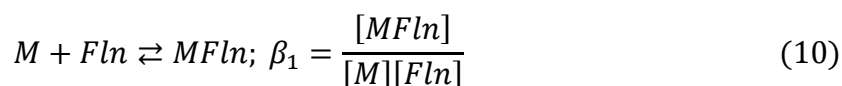
Друго могуће порекло повећања флуоресценције настаје због везивања за дијамагнетичне метале што је повезано са смањењем интрамолекуларног преноса електрона између побуђених стања хидроксилне и кето групе C прстена.

Емисионе таласне дужине свих комплекса су померене ка нижим таласним дужинама у односу на слободни флавоноид, што сугерише да електронско поље јона метала смањује разлику између вишеенергетских попуњених и нискоенергетских слободних молекулских орбитала флавоноида.

Комплекси вишег координационог броја се граде у благо киселом или неутралном раствору, а ретко у базној средини. Оптимална рН вредност за образовање комплекса је око 6, што зависи и од карактеристика јона метала. Стварање комплекса на рН вредностима мањим од 3,0 је отежано, јер се флавоноиди налазе у недисосованом облику. Иако високе вредности рН фаворизују депротоновање флавоноида и могућност стварања више комплексних врста, при вишим вредностима рН јони метала учествују у споредним реакцијама (хидролизе) и образовања хидроксо комплекса.

Комплексирање са флавоноидима као монодентатним или бидентатним лигандима, доводи до образовања комплекса који садрже протон, јон метала и лиганд (протоновани комплекси) који тежи дисоцијацији при вишим вредностима рН. Стога се може јавити батохромно померање у апсорпционом спектру комплекса метал-флавоноид на вишим рН вредностима, које се може приписати дисоцијацији протонованог комплекса, пре него стварању комплекса различитог стехиометријског састава.

У Табели 9 су приказани комплекси неких флавоноида са металима као и вредности константи стабилности, одређених различитим методама, где су одговарајуће константе стабилности дефинисане следећим реакцијама и изразима:



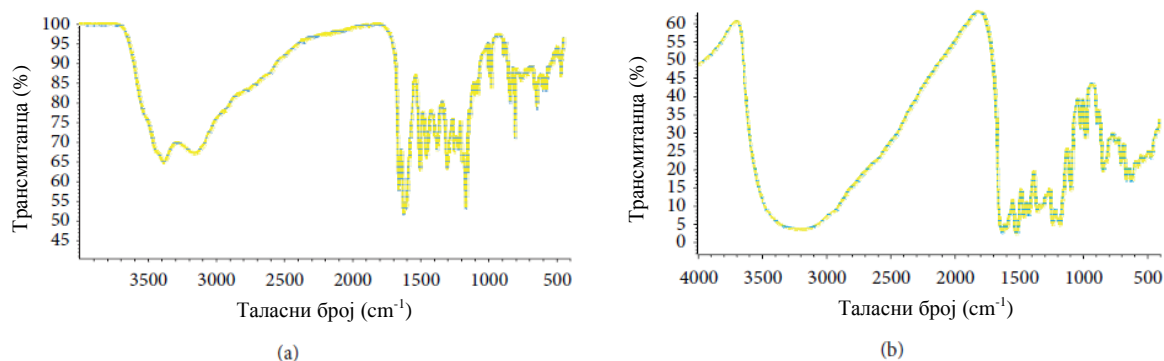
где је М метал, а *Fln* флавоноид.

Табела 9. Методе одређивања, врсте и константе стабилности комплекса флавоноида и метала

Флавоноид	Метал	Метода одређивања	Однос М/Фла	Константа стабилност $\log\beta$	Реф.
Рутин	Cu(II)	Job, MW	1 : 2	10,76	71
	Zn(II)	MW, B-F	1 : 1	4,68	72
	Pb(II)	MW, Nach, Job	1 : 2	13,81	73
	Ni(II)	MW, Nach, Job	1 : 2	8,95	74
	Co(II)	MW, Nach	1 : 1	6,04	75
	MoO ₄ ²⁻	B-F, Job, MW	1 : 1	8,01	76
	WO ₄ ²⁻	MW	1 : 2	13,44	77
	Eu(III)	Job, MW	1 : 2	10,59	78
	UO ₂ (II)	Job, MW	1 : 1	6,57	79
	Pd(II)	Job	1 : 2	10,15	80
	TiO(C ₂ O ₄) ₂ ²⁻	Job, MW	1 : 2	10,80	81
Кверцетин	Ni(II)	MW, Nach	1 : 1	5,57	82
	Co(II)	MW, Nach	1 : 1	4,87	83
	Pd(II)	Job, MW	1 : 1	6,05	84
	TiO(C ₂ O ₄) ₂ ²⁻	Job, MW	1 : 2	11,84	85
Морин	Cu(II)	Job, MW	1 : 2	4,94	86
	Zn(II)	Job, MW, Nach	1 : 2	6,74	87
	WO ₄ ²⁻	Job	1 : 2	11,6	88
	Pd(II)	Job	1 : 1	4,55	89
	TiO(C ₂ O ₄) ₂ ²⁻	Job, MW	1 : 2	7,35	90
	Ba(II)	MW, B-F	1 : 1	4,55	91
3-Хидроксифлавоон	Zn(II)	Job	1 : 1	8,51	92
	Pb(II)	Job, MW, Nach	1 : 1	7,74	93
	Ni(II)	Job, MW	1 : 1	7,63	94
	Co(II)	Job	1 : 1	10,87	95
	MoO ₄ ²⁻	Job, MW	1 : 2	15,13	96
	WO ₄ ²⁻	Job	1 : 2	16,45	7
	Eu(III)	Job	1 : 2	13,47	98
	UO ₂ (II)	Job, MW, B-F	1 : 1	8,68	99
	TiO(C ₂ O ₄) ₂ ²⁻	Job, MW	1 : 2	16,65	100
	Mn(II)	Job, MW	1 : 1	5,43	101
Хесперидин	Cu(II)	Job, MW	1 : 2	5,78	102
	UO ₂ (II)	Job, MW	1 : 2	7,00	103
	Al(III)	Job, MW	1 : 1	4,54	104
Нарингенин		Irving Rossotti	1 : 1	15,39	68
	Al(III)	Irving Rossotti	1 : 2	7,12	68
		Irving Rossotti	1 : 3	6,47	68
		Irving Rossotti	1 : 1	10,11	68
	Fe(III)	Irving Rossotti	1 : 2	6,40	68
		Irving Rossotti	1 : 3	6,11	68

1.1.6.1. Карактеризација комплекса флавоноида и метала применом IR спектроскопије

Да би се добила информација о структури комплекса који се гради између флавоноида и јона метала, неопходно је упоредити апсорпционе траке добијене применом IR спектроскопије за слободан флавоноид и одговарајуће комплексе. На Слици 17 су приказани IR спектри морина и комплекса морина са хромом(III).



Слика 17. IR спектар (a) морина и (b) морин-Cr(III) комплекса [105]

У Табели 10 су приказане одговарајуће траке у IR спектру за неке флавоноиде и њихове комплексе са јонима метала.

Табела 10. Апсорпционе траке у IR спектрима слободних флавоноида и одговарајућих комплекса.

Једињење	ν (O-M)	ν (C=O)	ν (C=C)	ν (C-O-C)	ν (C-OH)	ν (O-H)	Реф.
Кверцетин	-	1666,4	1611,0	1262,6	1319,1	3408,1	106
Кверцетин-Sn(II)	424,8	1642,9			1341,9	3384,8	
Рутин	-	1655	1599	1296		3600-3000	107
Рутин-Cu(II)	623	1630	1600	1286		3600-2800	
Морин	-	1651	1608	1315	1348	3296	108
Морин-Cu(II)	576	1622	1560	1247	1248	3439	
Морин		1662	1613	1310		3000-3400	105
Морин-Cr(III)	466	1623	1594	1320			
Рутин		1655	1505	1362		-	109
Рутин-Fe(III)		1632	1504	1357		3856	

Приликом комплексирања флавоноида са јонима метала највеће промене у IR спектру дешавају се у вибрацијама између карбонилне групе ($C=O$) и хидроксилне групе у положају 5. Стога се може закључити да се гради веза између метала и кисеоника карбонилне групе и да је кисеоник везан за атом угљеника у положају 5.

1.1.6.2. Карактеризација комплекса флавоноида са јонима метала применом масене спектрометрије

У позитивном моду ESI-MS спектра комплекс између нарингина и бабра, у присуству метанола, показује карактеристичне јоне који су представљени у Табели 11 и који су подвргнути дисоцијацији изазваној колизијом, како би се добила њихова структура.

Табела 11. Номиналне вредности m/z јона који се јављају у позитивном моду ESI-MS спектра комплекса нарингина и бакра [69]

Номиналне вредности m/z	Структура
581	Нарингин + H ⁺
603	Нарингин + Na ⁺
619	Нарингин + K ⁺
641	Нарингин-H ⁺ + ⁶³ Cu ²⁺
643	Нарингин-H ⁺ + ⁶⁵ Cu ²⁺
673	Нарингин-H ⁺ + ⁶³ Cu ²⁺ + CH ₃ OH
675	Нарингин-H ⁺ + ⁶⁵ Cu ²⁺ + CH ₃ OH
705	Нарингин-H ⁺ + ⁶³ Cu ²⁺ + 2CH ₃ OH
707	Нарингин-H ⁺ + ⁶⁵ Cu ²⁺ + 2CH ₃ OH
933	Двоструко наелектрисан: 3Нарингин-2H ⁺ + 2 ⁶³ Cu ²⁺
1183	2Нарингин + Na ⁺
1222	Двоструко наелектрисан: 4Нарингин-2H ⁺ + ⁶³ Cu ²⁺ + Na ⁺ + K ⁺

Ови резултати показују да један молекул нарингина интерагује са једним атомом бакра и при томе губи атом водоника, координујући се са два молекула метанола као контра јонима (губи се приликом јонизације) на m/z 705 и 707. У току јонизације адукти метанола се губе дајући при томе јоне на m/z 641, 643, 673 и 675. Адукти нарингина са јонима натријума и калијума су такође присутни и јављају се на m/z 603 и 619. Присутни су у малој количини али се такође јонизују у позитивном моду. Кластери који садрже два или више молекула нарингина су такође присутни у раствору и јављају се на m/z 933, 1183 и 1222 [69].

1.1.7. Екстракција полифенолних једињења из биљних узорка

За анализу флавоноида и њихових коњугата могу се применити различите методе екстраховања које зависе од порекла биолошког материјала из којег се аналит екстрахује. Код изоловања полифенолних једињења, важно је утврдити циљ, идентификовати појединачне компоненте присутних у узорку или одредити укупни садржај полифенолних једињења. Присуство угљених хидрата и/или липида могу утицати на садржај и врсту флавоноида и њихових деривата у екстракту.

Коришћење сувих узорка биљака за екстракцију може довести до смањења приноса коњугата флавоноида. Ациловани гликозиди флавоноида су нестабилни приликом повећања температуре и обично се термички деградирају током припреме узорка. Стога је приликом екстракције коњугата и ацилованих гликозида флавоноида потребно очувати њихову структуру јер су ови облици одговорни за њихову физиолошку и биохемијску улогу у биљкама.

Слободни агликони флавоноида могу се изоловати из биљног ткива (листа или корена) коришћењем неполарних растварача као што су метилен хлорид, етил-етар или етил-ацетат. Међутим, поларнији гликозидни коњугати растварају се у поларним растварачима (метанол и етанол) и обично се екстрахују по Сокслету. Смеша алкохола и воде у различитим односима се примењује за екстракцију флавоноида и њихових коњугата из чврстог биолошког материјала (биљна или животињска ткива). Ефикасност екстракције флавоноида се може побољшати употребом ултразвучне [110, 111] или

течне екстракције при повишеном притиску на температурама од 60 до 200 °C. Суперкритична течна екстракција угљеник(IV)-оксидом се такође користи, али се мора водити рачуна о могућој термалној деградацији флавоноида.

У већини случаја неопходно је даље пречишћавање и/или преконцентровање анализата. За ову сврху најчешће се користи течно-течна екстракција или екстракција на чврстој фази. За процену приноса екстракције потребно је у биолошки материјал додати одговарајући интерни стандард. Као интерни стандард најпогоднија су једињења структурно слична испитиваним једињењима, али која нису присутна у узорку. Једињења са стабилним изотопима (^2H и ^{13}C) су корисна када се примењује масено спектрометријска детекција. Приликом изоловања флавоноида из биолошког материјала, додају се различите класе фенолних једињења. Са друге стране, приликом квантитативне анализе смеше флавоноида потребно је додати референтни стандард у циљу тачне квантификације. Избор начина екстракције флавоноида из биолошког материјала је важан и зависи од циља истраживања. Количина биолошког материјала из кога се врши екстракција флавоноида може бити веома мала и тада се користи техника микроекстракције. У многим случајевима потребно је избећи хемијску и/или ензимску деградацију. Ово је важно приликом одређивања гликозида флавоноида у истраживањима која су везана за функционисање биљака или током физиолошких или биохемијских студија где је потребно познавати све класе флавоноида које су присутне, чак и термално нестабилне ациловане деривате флавоноида. Са друге стране, у фитохемијској анализи биљних врста или фитофармацеутским испитивањима биљног материјала, важније је изоловање свих биолошки активних агликона флавоноида у добром приносу. У том циљу примењују се драстичнији услови изоловања.

1.1.8. Одређивање фенолних једињења

HPLC и гасна хроматографија (GC), и њихова комбинација са масеном спектрометријом су две најчешће примењене методе за квантификацију фенолних једињења. Друге релевантне технике се заснивају на спектрофотометрији.

1.1.8.1. Течна хроматографија (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)

Високо-ефикасна течна хроматографија је техника која се најчешће користи за одвајање и квантификацију фенолних једињења [112].

Неколико фактора утиче на HPLC анализу фенола: чистоћа узорка, састав мобилне фазе, тип колоне и врста детектора [113]. Уопштено, пречишћени узорци фенола се инјектују у HPLC инструмент са реверзно-фазном C18 колоном (RP-C18) и фотодиодним детектором (PDA) и елуирају поларним закишељеним органским растварачем [114]. Постоји неколико радова који описују примену HPLC технике за квантификацију фенолних једињења [115 – 118]. Уопштено, осетљивост HPLC методе

се повећава пречишћавањем фенолних једињења и њиховим преконцентровањем из сложеног матрикса сировог биљног материјала.

Ацетонитрил и метанол, или њихови водени раствори, се најчешће користе као мобилне фазе приликом HPLC квантификације биофлавоноида [119, 120]. У неким случајевима се користе етанол, тетрахидрофуран (THF) и 2-пропанол [121 – 123]. pH мобилне фазе би требало да буде у опсегу од 2 – 4 како би се избегла јонизација фенолних једињења током њихове идентификације. Стога се користе закишељени водени раствори мобилних фаза са сирћетном, мрављом, фосфорном киселином или пуфери на бази амонијум ацетата [124, 125].

Најчешће се користи градијентни начин елуирања, мада се може користити и изократски у зависности од сложености матрикса [115].

Избор одговарајуће колоне је најважнији фактор при идентификацији фенолних једињења. На основу поларности, различите класе фенолних једињења могу бити раздвојене коришћењем нормално-фазних или реверзно-фазних колона дужине од 10 до 30 cm, унутрашњег пречника 3,9 - 4,6 mm и величине честица од 3 до 10 μm [126].

Нови типови колона (монолитне и површинско-порозне) дужине од 3 до 25 cm, унутрашњег пречника од 1 до 4,6 mm и величине честица од 1,7 до 10 μm су у употреби за одређивање фенолних једињења применом савремених HPLC техника као што је UHPLC (ultra-high performance liquid chromatography) и HTLC (high temperature liquid chromatography) као и дводимензионалне течне хроматографије (LC \times LC) [127, 128].

Већина HPLC анализа фенолних једињења се изводи на собној температури. Међутим, у новије време и високе температуре се препоручују приликом примене нових колона и инструмената [129].

Врема трајања HPLC анализе је још један фактор који утиче на раздвајање фенолних једињења и може бити у опсегу од 10 до 150 min. Roggero и сарадници [130] наводе да велика репродуктивност резултата, када је дуго време анализе, захтева константну температуру, да би резултати били репродуктивни.

Фенолна једињења се најчешће идентификују коришћењем UV-VIS и PDA детектора на таласним дужинама од 190 до 380 nm [131]. Међутим, флуорометријски (FLD) [132], колориметријски [133], PDA купловани са флуоресцентним детектором [134] и технике детекције на основу хемијске реакције се такође користе. Масено спектрометријски (MS) детектори везани за течне хроматографе (HPLC–MS) [135, 136], као што су електроспреј јонизациони масени спектрометри (ESI-MS) [137], масена спектрометрија са ласерском десорпционом јонизацијом потпомогнутом матриксом (MALDI–MS) [138, 139], масени спектрометри са брзим бомбардовањем атома (FAB-MS) [140] и удар електрона-масена спектрометрија [140], се такође користе за структурну карактеризацију и потврду различитих класа фенолних једињења. HPLC метода куплована са MS детекторима је веома осетљива и има могућност за постизање велике специфичности на основу избора масе која се детектује [141].

HPLC–NMR и UHPLC су нове технике за идентификацију биоактивних једињења у узорцима биљног порекла [142 – 144].

Нови трендови у анализи фенолних једињења су течна хроматографија хидрофилних интеракција (hydrophilic interaction liquid chromatography, HILIC) као и дводимензионална течна хроматографија (2-dimensional liquid chromatography, 2D LC). У новије време HILIC техника је све популарнија због велике компатибилности мобилне фазе која се користи када се повеже за MS, чиме се повећава прецизност приликом анализе поларних једињења у сложеним матрицама [145]. 2D LC је релативно нова савремена техника у хроматографији која омогућава одвајање и идентификацију структурно сличних или трагова једињења из сложених матрикса, повећавајући капацитативност пика и селективност [146]. Комбинација 2D LC×HILIC и 2D LC×RP-LC, показује велики потенцијал за одвајање компоненти различите поларности из сложеног матрикса, што није могуће применом једнодимензионалне RP-LC [147].

1.1.8.2. Гасна хроматографија (GC)

Гасна хроматографија је техника која се користи за одвајање, идентификацију и квантификацију фенолних једињења као што су фенолне киселине [148], кондензовани танини [149] и флавоноиди [150]. Главна препрека приликом GC анализе, које нема код HPLC технике, су дериватизација и испарљивост фенолних једињења. Квантификација фенола гасном хроматографијом из узорака хране укључује фазе пречишћавања, као што је уклањање липида из екстракта, ослобађање фенола од гликозида и раскидање естарске везе у присуству ензима [151], алкалној [152] и киселој средини [153] и хемијска модификација, као што је превођење у лако испарљиве деривате [154].

Неколико типова реагенаса се користи за модификацију и стварање лако испарљивих деривата. Етил и метил хлороформиат, диазометан и диметил сулфоксид у комбинацији са метил јодатом се користе за синтезу метил или етил естара фенола.

Друга врста реагенаса који имају предности у стварању испарљивих једињења су триметилсилил једињења као што су трифлуороацетамид, N-(*tert*-бутилдиметилсилил)-N-метилтрифлуороацетамид и триметилсилил деривати [155]. Реакција силилације је једноставна, ослобођена нежељених нуспроизвода и ствара веома испарљиве производе. Силил дериватизација је веома добар начин за идентификацију фенолних једињења.

Капиларе пуњене збијеним силикагелом дужине 30 m, унутрашњег пречника 25 – 32 μm и величином честица стационарне фазе од 0,25 μm су најчешће колоне које се користе за квантификацију фенола коришћењем GC технике [155].

Употреба пламеног јонизационог детектора (flame ionization detector, FID) је најчешћа метода за детекцију фенола, али њен примат полако преузима масена спектрометрија (MS). Гасна хроматографија је постала осетљивија и селективнија метода када се комбинује са масеном спектрометријом.

1.1.8.3 Спектрофотометријске методе

Спектрофотометрија је релативно једноставна техника за квантификацију фенола. Примена Folin-Denis и Folin-Ciocalteu реагенаса су две широко распрострањене спектрофотометријске методе које се користе за мерење укупних фенола у биљном материјалу [156, 157]. Обе методе се заснивају на хемијској редукцији која укључује реагенсе који садрже волфрам и молибден [113]. Производи ових редукција, у присуству фенолних једињења, су плаве боје са широким апсорпционим максимумом на 760 nm. Оба реагенса нису специфична само за феноле, већ реагују и са осталим супстанцама као што су аскорбинска киселина, амини и шећери [158]. Квантификација укупних фенола, укупних флавоноида, проантоцијанидина и хидролизабилних танина може се извршити колориметријским методама. Метанолски или етанолски екстракти биљних фенола се мешају са $AlCl_3$ и мери апсорбанција у опсегу од 410 до 423 nm [159, 160].

Ванилин и диметиламиноциметалдехид се користе за одређивање проантоцијанидина [28]. Ове методе дају информације о степену полимеризације и путу хидроксилације као и стереохемији подгрупа флаван-3-ола [161, 162].

Смеша бутанола и HCl се користи за одређивање проантоцијанидина. У реакцији између проантоцијанидина са бутанолом у присуству вруће HCl долази до аутооксидације и настајања антоцианидина црвене боје који показује максимум апсорбанције на око 550 nm [163].

Третирањем узорка албумином таложи се нерастворни танин-протеин комплекс. Танин-протеин комплекс се раствара у натријум-додецил сулфату и триетаноламину и реагује са гвожђе(III)-хлоридом, стварајући љубичасти комплекс са максимумом апсорпције на 510 nm [164].

Хидролизабилни танини се могу одредити коришћењем калијум-јодатне методе, тиоцијанатне методе или натријум нитритне методе. Калијум јодат се најчешће користи за испитивање узорака на садржај танина. Црвена боја са максимумом апсорпције између 500 и 550 nm, настаје као последица реакције између метил галата и калијум јодата [162].

Спектрофотометријска метода за квантификацију флавонона и дихидрофлавонола се заснива на њиховој интеракцији са киселим раствором 2,4-динитрофенилхидразина [126]. Пиноцембрин је стандард који се користи за ова мерења и апсорбанција се мери на 486 nm [165].

1.1.8.4. Друге методе за одвајање и квантификацију фенолних једињења

Хроматографија на хартији (paper chromatography, PC) и танкослојна хроматографија (thin-layer chromatography, TLC) су две адсорпционе технике које се користе за одвајање фенолних једињења из узорака хране [157]. Хроматографија на хартији је једноставна метода, али се мање користи у поређењу са HPLC и GC. Користи

се за одвајање и идентификацију фенолних једињења из листа чаја коришћењем мобилне фазе састава бунанол/сирћетна киселина/вода [166].

Танкослојна хроматографија је применљивија метода од хроматографије на хартији за анализу фенолних једињења, нарочито код сирових биљних екстраката. Ова метода је јефтина и омогућава детекцију више једињења на истој плочи, при кратком времену извођења анализе [114].

Хроматографија брзе измене струје (high-speed counter current chromatography, HSCCC) је двофазна течност-течна партициона метода која се користи за изоловање и одвајање смеше компонената [112]. Ова јединствена техника се широко примењује за пречишћавање и одвајање различитих полифенолних једињења [167 – 170]. Одвајање једињења помоћу HSCCC методе заснива се на њиховим партиционим коефицијентима између две течне фазе, који су одређени њиховом хидрофобношћу [171]. Метода не користи чврсту подлогу која омогућава трајно адсорбовање једињења из узорка [172]. Применом ове методе полифенолна једињења се могу раздвојити из сирових екстраката без претходне припреме узорака (изоловање и пречишћавање).

Капиларна електрофореза (capillary electrophoresis, CE) је погодна техника за идентификацију наелектрисаних једињења малих и средњих молекулских маса. Сама метода је брза и ефикасна са високом резолуцијом и не захтева велике количине узорка и реагенаса [173]. Постоји неколико ревија које се баве проучавањем примене капиларне електрофорезе за одвајање и идентификацију фенолних једињења у биљном материјалу [174 – 178]. Мицеларна електрокинетичка хроматографија (micellar electrokinetic chromatography, МЕКС), капиларна електро хроматографија (capillary electro chromatography, СЕС) и капиларна зонска електрофореза (capillary zone electrophoresis, CZE) купловане са UV, електрохемијском или масеном детекцијом су најраспрострањеније технике капиларне електрофорезе [179 – 181].

1.1.9. Антиоксидативна активност флавоноида

Слободни радикали се константно стварају у људском организму у специфичним метаболичким процесима. Примери кисеоничних слободних радикала укључују слободни кисеоник ($^1\text{O}_2$), супероксид ($\text{O}_2^{\cdot-}$), алкил пероксил (ROO^{\cdot}), алкоксил (RO^{\cdot}) и хидроксил (HO^{\cdot}) радикал. Поред осталих функција, слободни радикали су укључени у стварање енергије и регулисање раста ћелије. Међутим, када се јави неравнотежа између стварања слободних радикала и одбрамбених механизма у организму, долази до реакције између слободних радикала са липидима ћелијске мембране, протеинима ткива и ДНК, при чему долази до оксидације која изазива оштећење мембране, модификацију протеина и оштећење ДНК. Сматра се да ова оксидативна оштећења играју узрочну улогу код неких болести као што су рак, болести срца и превремено старење тела. Човек поседује широк спектар физиолошких антиоксидативних механизма за неутралисање слободних радикала, везивање металних јона укључених у њихово формирање и смањење оштећења. Храна богата полифенолима свакако доприноси овој одбрани. Многа фенолна једињења, као што су флавоноиди, показују

антиоксидативну активност, која је много јача него она коју показују витамини Ц и Е [182]. Особина која најбоље описује антиоксидативну активност флавоноида је њихов велики капацитет да дају водоничне јоне [183 - 187].

Интензитет антиоксидативне активности флавоноида у великој мери зависи од њихове хемијске структуре. Постоје велике несугласице између структуре и антиоксидативне активности флавоноида [188, 189]. Прихваћено је да на антиоксидативну активност флавоноида утиче број и место хидроксилних група везаних за В и А прстен, као и продужена коњугација између В и С прстенова [190 – 199].

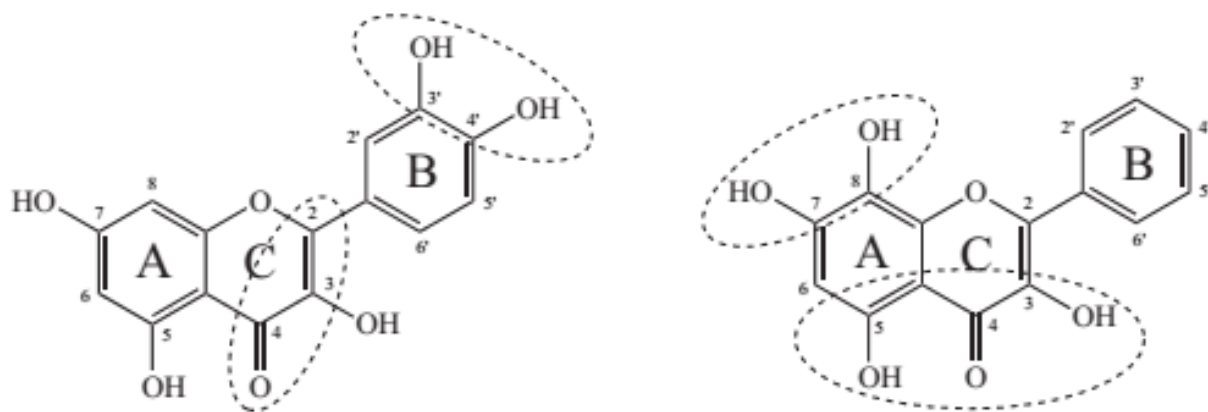
За ефективно уклањање радикала и/или антиоксидативни потенцијал флавоноида потребно је да су испуњена три основна Борова структурна критеријума:

- 1) *o*-дихидрокси (3',4'-дихидрокси, нпр. катехол) структура у В прстену, даје већу стабилност феноксил радикала флавоноида, преко водоничне везе или преко продужене делокализације електрона;
- 2) Двострука веза између С2-С3 (могућа коњугација са 4-оксо групом), која одређује копланарност хетеропрстена и учествује у стабилизацији радикала делокализацијом електрона преко сва три прстена;
- 3) Присуство 3-ОН и 5-ОН група повећава капацитет неутралисања слободних радикала и највећу апсорпцију радикала.

Поред ових критеријума може се додати још један четврти услов:

- 4) У осудству *o*-дихидрокси структуре у В прстену, хидроксил супституенти у структури катехола на А прстену могу се компензовати и утицати на антирадикалску активност флавоноида [200 – 209].

Према van Acker et al. [193], основна структура флавоноида није од великог значаја за антиоксидативну активност. Она постаје значајна само када катехолна група није присутна. Гликолизација флавоноида у већини случајева смањује њихову антиоксидативну активност. Блокирањем хидроксилне групе на С3 положају или померањем 3-ОН смањује се антиоксидативна способност флавоноида. На Слици 18 су сумирани структурни критеријуми који утичу на антиоксидативну активност флавоноида.



Слика 18. Структурни критеријуми за антиоксидативну активност флавоноида

1.1.9.1. Механизам и кинетика антиоксидативне активности флавоноида

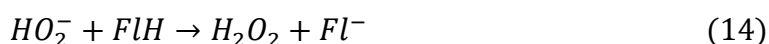
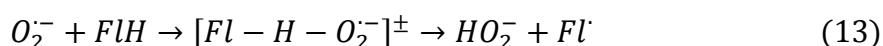
Према Halliwell-у и Gutteridge-у механизам антиоксидативне активности укључује:

- (1) Смањење настајања реактивних кисеоничних врста, било инхибицијом ензима или везивањем трагова метала који су укључени у производњу слободних радикала;
- (2) Удаљавање реактивних кисеоничних врста и
- (3) Регулисање или заштиту антиоксидативних бранилаца.

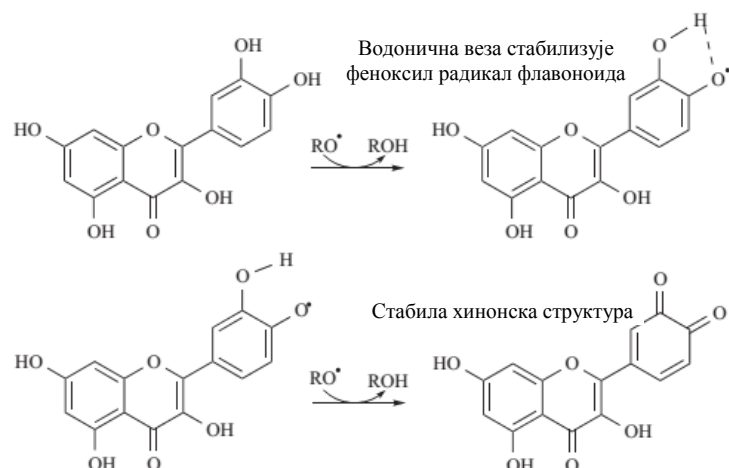
Механизми антиоксидативне активности флавоноида укључују директно везивање и неутралисање реактивних слободних радикала, везивање трагова јона метала који учествују у формирању слободних радикала, инхибицију ензима укључених у настајање слободних радикала и регенерацију антиоксиданата везаних за мембрану [210, 211].

Антиоксидативна активност флавоноида се јавља из директног уклањања реактивних кисеоничних врста. Уопштено се може рећи да је основни механизам уклањања радикала флавоноидима дозирање атома водоника. Они се такође могу понашати и као преносиоци електрона [212]. Структурни захтеви за дозирање атома водоника за антиоксидативну активност укључују *орто*-дихидрокси супституцију у В-прстену, С2-С3 двоструку везу, и С4 карбонилну групу на С прстену [213, 214].

Реактивне кисеоничне врсте реагују са флавоноидима (антиоксидант) стварајући неактивне врсте (феноксид радикал) и коњуговану базу хидроген-пероксид. Долази до прерасподеле електрона и феноксид радикал је стабилизован резонанцијом. Међутим, коњугована база хидроген-пероксид није стабилна и реагује са флавоноидима, везујући протон, дајући релативно стабилан хидроген-пероксид. Предложени механизам интеракције између супероксидног анијонског радикала са флавоноидима се заснива на преносу атома водоника и овај механизам се може описати једначинама:



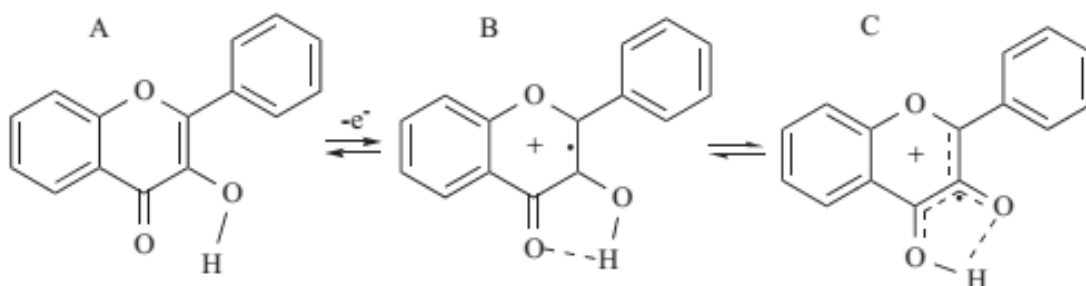
Код механизма преноса атома водоника, хидроксилна група даје водоник радикалу, стабилизујући га и дајући релативно стабилан феноксид радикал флавоноида (Слика 19). Феноксид радикал флавоноида може реаговати са другим алкоксид радикалом ($RO\cdot$), формирајући хинон стабилне структуре:



Слика 19. Механизам антиоксидативне активности 3',4'-дихидрокси флавоноида

Прстен В флавоноида је укључен у реакцију флавоноида и радикала. Хидроксилна група поседује копланарну Аг-О везу у којој π орбитале ароматичног прстена теже преклапању са слободним електронским паром кисеоника из хидроксилне групе, доводећи до делокализације невезивних електрона кисеоника и јачања Аг-О везе. Као резултат наведеног долази до повећања густине електрона код арил угљеничног прстена у *орто* и *пара* хидроксил групама. Стога, присуство С2 и С3 двоструке везе и супституената на позицији 3 у С прстену са кето групом ће стабилизирати радикал резонанцијом унутар молекула. Коњугација је важан фактор за антиоксидативну активност. Прихваћено је да торзиони угао В-прстена утиче на способност везивања за слободне радикале.

Механизам где се даје електрон је валидан само за монохидрокси флавоне, где не постоји могућност да се атом водоника између са других група. Код 3-ОН и/или 5-ОН хидроксифлавона, јака водонична веза између ОН група са атомом кисеоника везаним за С4 карбонилну групу спречава, не само његово ефикасно депротоновање, већ и његову активност за везивање радикала, у смислу донирања атома водоника. Предложени механизам антиоксидативне активности 3-ОН и 5-ОН хидроксифлавона је приказан на Слици 20.



Слика 20. Механизам антиоксидативне активности 3-хидроксифлавона

Структура А је основни неутрални молекул 3-хидроксифлавона, В је почетни радикалски катјон (добијен отпуштањем електрона из неутралног молекула) и С је његов стабилнији таутомерни облик. Таутомерни облик С флавоноида је такође антиоксидант који инхибира ензиме пероксидазе. Овај механизам је одговоран за њихове ефекте *in vivo*.

Флавоноиди показују антиоксидативну активност и везивањем са јонима прелазних метала у првом реду са Fe(II), Fe(III) и Cu(II). Ови јони учествују у реакцијама стварања слободних радикала [215]. Комплекси метала и флавоноида у значајној мери елиминишу слободне радикалске врсте и играју важну улогу у заштити од оксидативног стреса. Флавоноиди могу изоловати металне јоне комплексирањем и на тај начин спречавају стварање метал-прелазног стања приликом настајања слободних радикала штитећи потенцијалне биолошке молекуле од оксидације.

Антиоксидативна активност се не може директно измерити, већ се мери ефекат антиоксиданта у контролисаном процесу оксидације. Постоји више метода за мерење антиоксидативне активности.

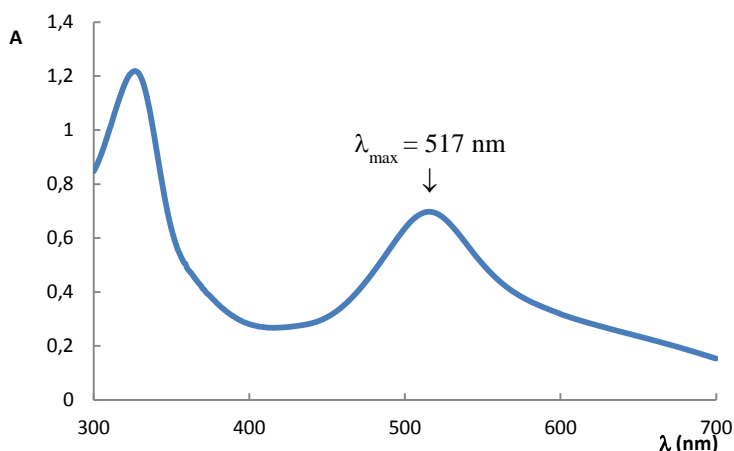
Као што и методе одређивања антиоксидативне активности варирају, тако варирају и методе изражавања резултата.

У спектрофотометријском одређивању антиоксидативне активности, уобичајени начин изражавања антиоксидативне активности је преко релативне антиоксидативне активности (РАА) која је дата изразом:

$$РАА = \frac{AA_1}{AA_{\text{реф}}} \times 100 \quad (15)$$

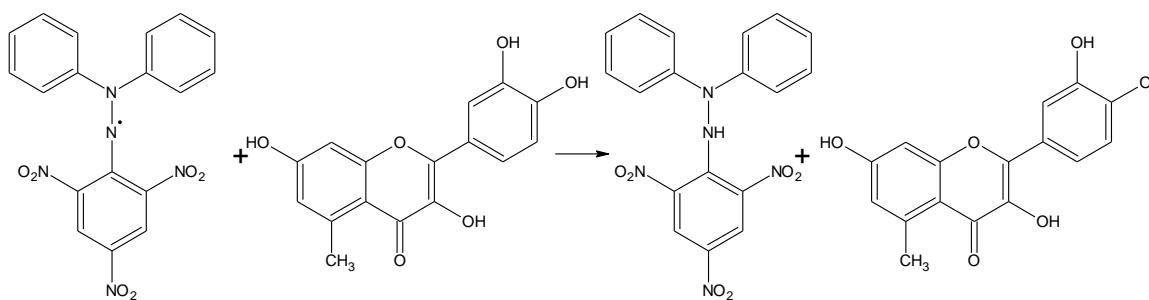
где су AA_1 и $AA_{\text{реф}}$ апсорбанције испитиване и референтне антиоксидативне супстанце при истој моларној концентрацији, на истој таласној дужини.

Једноставан метод који је развијен за одређивање антиоксидативне способности намирница користи стабилан 2,2 дифенил-1-пирилхидразил (DPPH) радикал, чији је апсорпциони спектар приказан на Слици 21.

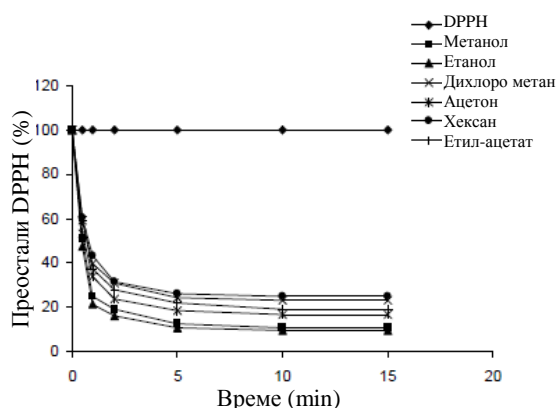


Слика 21. Апсорпциони спектар метанолског раствора DPPH

Присуство неспареног електрона у слободном радикалу DPPH доводи до апсорпционог максимума на 517 nm и љубичасте боје раствора. Боја се мења од љубичасте ка жутој како се моларна апсорпција DPPH радикала смањује (са 9660 на 1640), када је неспарени електрон упарен са водоником из слободних радикала дејонизованог антиоксиданта. Том приликом се формира редукован DPPH-H. Резултујућа деколоризација је стехиометријска у односу на број уклоњених електрона. На Слици 22 је приказана шема реакције између флавоноида и DPPH.



Слика 22. Шема антиоксидативне активности DPPH у реакцији са полифенолима [216]



Слика 23. Кинетика радикалске реакције екстракта кумина праћена DPPH методом [216]

Слика 23 представља кинетику реакције DPPH радикала у присуству полифенола (кумина) у току 15 минута. Реакција између DPPH радикала и полифенола може се поделити у два сегмента, први део „брзе“ реакције који траје до 5 минута и други „спори“ део који почиње након 5 минута и траје до краја реакције.

Спор реакциони период у реакцији полифенола и DPPH може се објаснити формирањем производа који споро реагују са DPPH радикалом или интрамолекулским преуређењем у молекулу антиоксиданса [216].

Реакција флавоноида са DPPH радикалом има брзину другог реда, са одговарајућом константом брзине, k_f .

$$-\frac{d[DPPH]}{dt} = -n \frac{d[F]}{dt} = k_f [DPPH][F] \quad (16)$$

Табличне вредности константе брзине за неке флавоноиде дате су у Табели 12.

Табела 12. Вредности константе брзине реакције DPPH радикала са флавоноидима [208]

Флавоноид	k_f (L mol ⁻¹ s ⁻¹)	Флавоноид	k_f (L mol ⁻¹ s ⁻¹)
Каемпферол	$2,38 \times 10^3$	Баицалеин	$6,3 \times 10^2$
Кверцетин	$4,76 \times 10^2$	Лутеолин	$2,29 \times 10^3$
Робинетин	$1,14 \times 10^2$	Нарингенин	4,0
Кверцетагетин	$4,4 \times 10^3$	Дихидрокверцетин	$2,2 \times 10^2$
Мирицетин	$7,55 \times 10^1$	(+)-Катехин	$5,3 \times 10^2$
Апигенин	0,1	(-)-Епикатехин	$4,89 \times 10^2$

Кинетика антиоксидативне активности различитих врста екстраката који садрже полифеноле показује да она зависи од ефикасности уклањања слободних радикала и садржаја полифенола. Међутим, како је одређивање антиоксидативне активности смеше полифенола компликованије него одређивање антиоксидативне активности појединачних полифенола, тешко је објаснити механизам антиоксидативне активности, али се претпоставља да се одигравају сличне реакције.

1.1.9.2. Веза између структуре и антиоксидативне активности флавоноида (QSAR студија)

Проучавање везе између структуре и антиоксидативне активности флавоноида врши се квантно-механичким методама.

Како постоји велики број флавоноида, тако се и њихове антиоксидативне активности разликују. Стога се често користи QSAR анализа за проналажење корелације између биолошке активности и физичко-хемијских особина флавоноида.

Антиоксидативна активност флавоноида веома зависи од броја и места везивања хидроксилних група у молекулу. Дихидроксиловани В-прстен (катехолна структура), присуство незасићења и кето групе у С-прстену се претпоставља да повећавају антиоксидативни капацитет [16, 192].

Lien и сарадници [218] су применили израчунате параметре као што су топлота формирања, енергија високо-спинских попуњених и ниско-спинских непопуњених молекулских орбитала, и број хидроксилних група за описивање антирадикалске активности флавоноида и других полифенолних једињења. Амић и сарадници [219] су дефинисали индикаторске променљиве као збир бројева и положаја хидроксилних група присутних у флавоноидима.

Farkas-a и сарадници [220] су направили квантитативни модел за дескрипторе и предвиђање антиоксидативне активности за флавоноиде и класификовали их на основу њихове биолошке активности и структурног шифровања. Предвиђене и

експерименталне вредности антиоксидативне активности флавоноида дате су у Табели 13.

Табела 13. Предвиђене и експерименталне вредности антиоксидативне активности флавоноида [220]

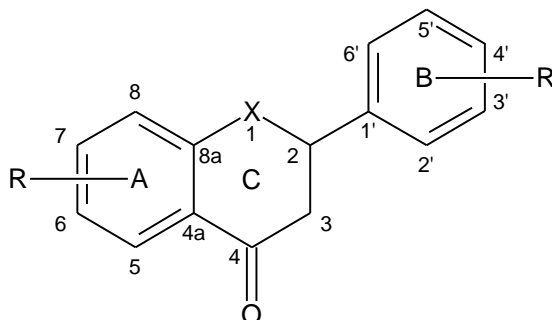
Једињење	Експериментално	Предвиђено
3,5,7,3',4',5'-Хексаметокси флавон	2,6	22,7
3,5,7,3',4'-Пентаметокси флавон	1,1	8,1
3-Хидрокси флавон	59,4	6,1
5-Хидрокси флавон	-4,9	-26,7
7-Хидрокси флавон	0,0	65,8
Галангин	64,9	59,8
Каемпферол	65,3	8,1
Кверцетин	63,6	61,8
Кверцетин 3-О-глукозид-7-О-рамнозид	-6,2	-7,8
Ларицитин	28,5	61,8
Мирицетин	18,4	22,7
Морин	63,5	65,8
Нарингин	47,4	48,1
Рутин	-10,2	-7,4
Фисетин	61,6	57,7
Фустин	-23,4	61,1
Хесперитин	4,7	-5,9

1.1.10. Значај флавоноида и њихова фармаколошка активност

Флавоноиди показују широк спектар биолошке активности. Они имају антиинфламаторно, антибактеријско, антивирално, антиалергијско [22, 23], цитотоксично, антитуморско дејство [18, 221, 222]. Флавоноиди су такође познати као инхибитори липидне пероксидазе, агрегатори тромбоцита, капиларне пермеабилности и фрагилности, утичу на активност цикло-оксигеназе и липооксигеназе. Понашају се као антиоксиданти, хватачи слободних радикала, хелатори метала [222, 223]. Такође, показало се да инхибирају различите ензиме као што су хидролазе, хијалуронидазе, алкалне фосфатазе, арилсулфатазе, липазе, α -глукозидазе, киназе [224].

1.2. Хинолони

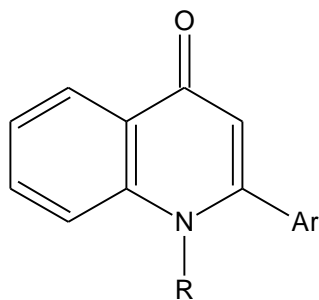
Хинолони су структурни аналози флаванона и тиафлаванона за које је карактеристичан коњугован ароматичан прстен А и фенил супституент В на позицији 2 хетероцикличног прстена С, опште структуре приказане на Слици 24.



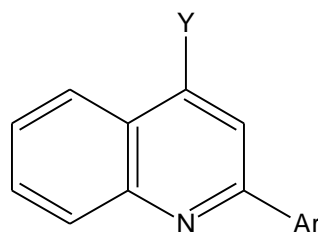
Слика 24. Општа структура хинолона

Флаванони имају у хетероцикличном прстену $X = O$ [225, 226], док хинолони имају аза везу ($X = NR$, $R = H$, ацетил и сулфонил) [227, 228] и тиафлаванони имају тиоетарску везу ($X = S$) [229]. Хинолони (3) и флаванони [230, 231] су распрострањени у биљкама, али могу бити и синтетисани у лабораторији коришћењем различитих метода.

Прстен С хинолона садржи неколико реактивних центара (позиције 1, 3 и 4) и такође дозвољавају различит степен незасићености хетероцикличног прстена, као што се може уочити код хинолин-4(1H)-она и код ароматичних хинолонских деривата приказаних на Слици 25 [232 – 235].



(а) $R = H$, алкил, ацетил или сулфонил



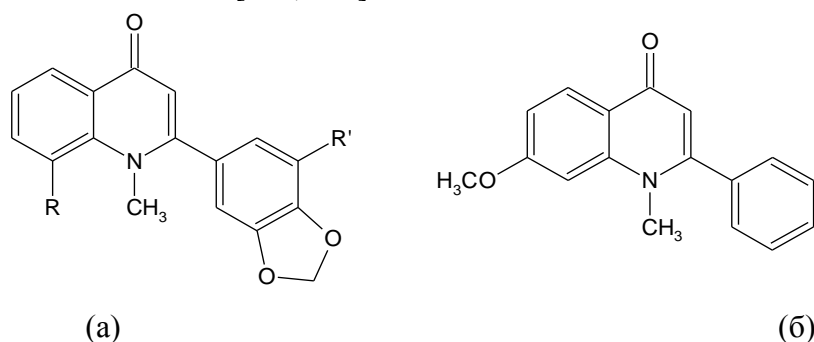
(б) $Y =$ алкокси, амино

Слика 25. Структуре хинолин-4(1H)-она (а) и ароматични хинолонски дериват (б)

Прстен А у општој структури ($R = Cl, Br$) се може модификовати нуклеофилном супституцијом било на позицији 6 или 8 [236, 237].

1.2.1. Природни извор хинолона и њихових деривата

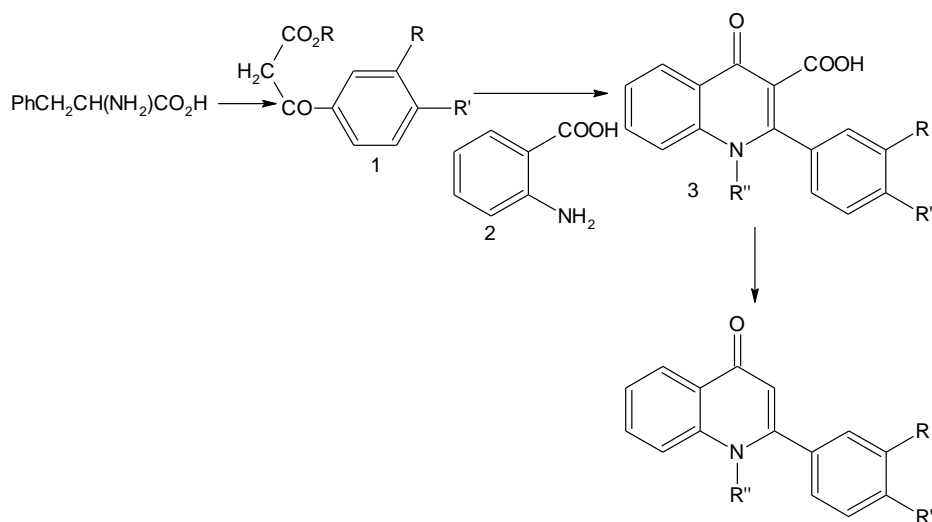
Већина 2-фенилхинолона и њихових алкалоида су широко распрострањени у биљкама фамилије *Rutacea* [238 – 240]. Гравеолин ($R = R' = H$) (Слика 26а), на пример, је први изолован из *Ruta graveolens*, као и његови супституисани деривати, 3'-метоксигравеолин ($R = H, R' = OMe$) и 3',8-диметоксигравеолин ($R = R' = OMe$) такође су изоловани из корена бразилске биљке *Esenbeckia grandiflora* [241]. Едулеин (Слика 26б), дериват 2-фенил-4-хинолона, изолован је из коре мексичког дрвета *Casimiroa edulis* и листова *Lunasia amara* [242, 243].



Слика 26. Хемијске структуре гравеолина (а), едулеина (б)

1.2.2. Биосинтеза хинолона и њихових деривата

Биосинтеза 2-алкилхинолона, 2-арилхинолона и алкалоида 2-арилхинолона укључује кондензацију антранилне киселине и фенилаланина [244 – 247] или ацетата као прекурсора. Гравеолин (Слика 26а), на пример, је производ кондензације β -кето естра (1) и антранилне киселине (2) преко интермедијера 3-карбокси хинолона (3) чија је синтеза приказана на Слици 27.



Слика 27. Синтеза гравеолина

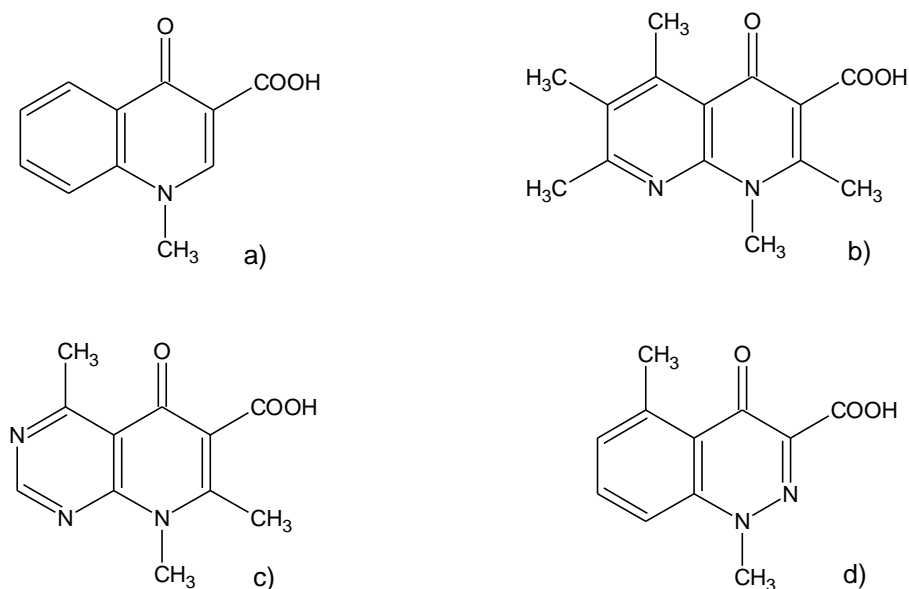
1.2.3. Методе за синтезу 2-арил-4-хинолонских деривата

Већина ових једињења је изолована у малим количинама из велике количине биљног материјала и ово у неким случајевима доводи до интензивне жетве и/или изумирања неких биљних врста. Стога се алтернативне методе стално развијају у лабораторијама за синтезу медицински важних деривата хинолона и њихових аналога.

У литератури је описано неколико путева синтезе деривата 2-арил-4-хинолона. Лабораторијска припрема деривата 2-арил-4-хинолона углавном укључује реакције комерцијално доступних реагенаса, као што је анилин [248, 249] или деривата аминокетона [250] са карбонилним једињењима.

1.2.4. Номенклатура флуорохинолона

Иако читава група ових антибиотика носи назив 4-хинолони, технички, нису сви припадници ове групе деривати хинолона. Наиме, овој групи припадају и деривати нафтиридина, пиридопиримидина и цинолина, који садрже додатне атоме азота у једном или другом коњугованом прстену. Оно што је заједничко за сва ова једињења је да имају 4-оксо-1,4-дихидрохинолинско језгро (Слика 28а). Краћи израз 4-хинолони је предложен као генеричко име за све ове антибактеријске агенсе. Оваква номенклатура даје тачан опис веза у пиридинском прстену. Тако су на овај начин, деривати нафтиридина означени као 8-аза-4-хинолони (Слика 28b), једињења са пиридопиримидинским прстеном су 6,8-диаза-4-хинолони (Слика 28c), а једињења са цинолинским системом 2-аза-4-хинолони (Слика 28d) [251].



Слика 28. Основне структуре хинолонских прстена

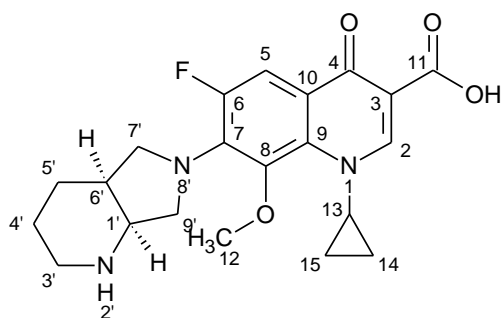
До данас не постоји стандардна класификација хинолона по генерацијама или групама [252]. Најчешће се класификација врши према спектру дејства и према индикацијама, тако да се хинолони могу поделити у четири генерације при чему свака следећа генерација има проширен спектар дејства (Табела 14).

Табела 14. Класификација хинолона по генерацијама и индикације.

Генерација хинолона	Припадници	Индикације
Прва генерација	Налидиксинска киселина	Неkomplиковане инфекције уринарног тракта
	Оксолинска киселина	
	Циноксацин	
	Пиромидинска киселина	
	Пипемидинска киселина	
Друга генерација	Флумекин	Компликоване инфекције уринарног тракта, сексуално преносиве болести
	Норфлоксацин	
	Ципорфлоксацин	
	Еноксацин	
	Флероксацин	
	Ломефлоксацин	
	Офлоксацин	
Левифлоксацин		
Трећа генерација	Руфлоксацин	Пнеумонија у болничким условима
	Спарфлоксацин	
	Тосуфлоксацин	
	Гатифлоксацин	
	Пазуфлоксацин	
Четврта генерација	Грапафлоксацин	Интра-абдоминалне инфекције
	Тровафлоксацин	
	Клинафлоксацин	
	Ситафлоксацин	
	Моксифлоксацин	
	Гемифлоксацин	

1.2.5. Моксифлоксацин

Моксифлоксацин хидрохлорид, (1-циклопропил-7[S,S]-2',8'-диазабицикло [4,3,0]нон-8-ил-6-флуоро-8-метокси-1,4-дихидро-4-оксо-3-хинолон карбоксилна киселина хидрохлорид, MOX) је синтетички антибактеријски агенс активан на Грам-негативне и неке Грам-позитивне бактерије. Састоји се од бицикличног ароматичног језгра са атомом флуора на положају C6, метокси групом на положају C8, на N1 циклопропил групом и азобицикло групом на положају C7 (Слика 29).



Слика 29. Структура моксифлоксацина

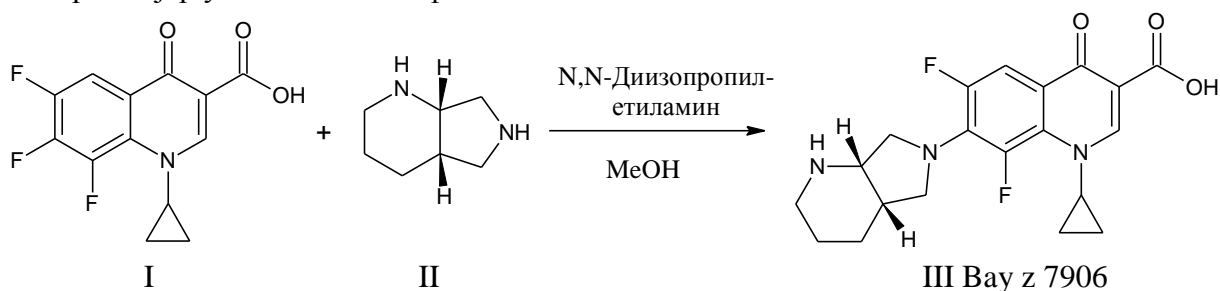
Моксифлоксацин је први синтетисао и описао Petersen средином 90-тих година двадесетог века [253].

	Молекулска формула:	Молекулска маса
Хидрохлорид	$C_{21}H_{21}FN_3O_4 \times HCl$	437,90
База	$C_{21}H_{24}FN_3O_4$	401,44

Препоручена доза је 400 mg моксифлоксацина, а фармацеутске формулације које садрже ову количину лека су таблете од 400 mg и раствор инфузије који садржи 400 mg/ 250 mL. У фармацеутским формулацијама се јавља у облику таблета и инфузија (Avelox[®], Avalox[®], Tovon[®], Bayer AG). Синтетизује се различитим процедурама које обухватају две фазе: (а) синтеза хинолонског језгра и (b) увођење разилитих супституената [254, 255]. Произвођач Bayer AG (Лeverкузен, Немачка) патентирао је неколико синтетичких поступака [256].

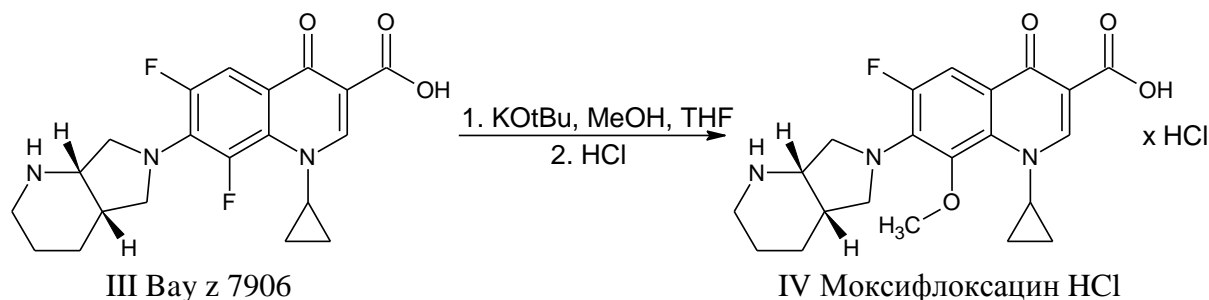
1.2.5.1. Синтеза моксифлоксацина

Синтеза моксифлоксацин-хидрохлорида се одвија у два ступња: У првом ступњу реагују трифлуорохинолонска киселина (I) и S,S-пиролидопиперидин (II) (Шема 3). Реакција се одвија у присуству терцијарног амина N,N-диизопропилетиламина да би се неутралисала киселина која настаје у току реакције. Као систем растварача користи се смеша N-метил-2-пиролидинона и метанола. Смеша се рефлуктује 3 сата на температури од 70 °C. После хлађења суспензија се филтрира, испира метанолом и суши у вакууму. Као производ ове реакције добија се Bay Z 7906 (III), који је интермедијер у синтези моксифлоксацина.



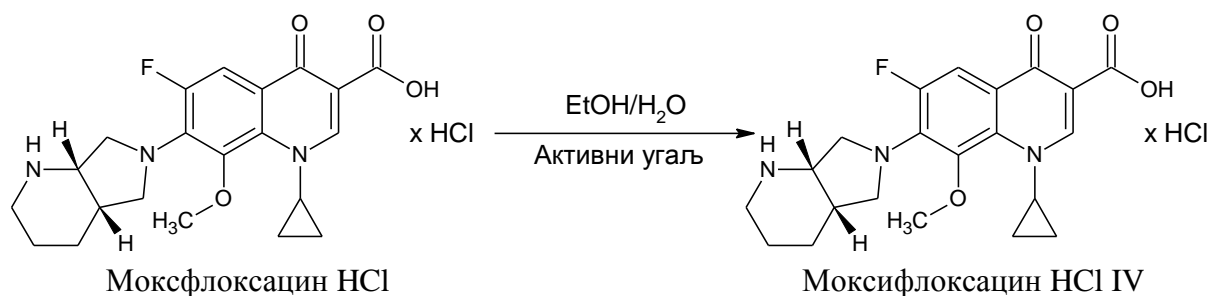
Шема 3. Први корак синтезе моксифлоксацина

У другом ступњу Вау z 7906 се преводи у моксифлоксацин-хидрохлорид (IV), заменом атома флуора метокси групом на положају 8 (Шема 4). Ово се постиже реакцијом Вау z 7906 и калијум-*tert*-бутоксида у присуству тетраhydroфурана и метанола. Смеша се рефлукује 2,5 сата на 70 °C. После хлађења, раствор се пребацује у други суд који садржи разблажену хлороводоничну киселину. Раствор се хлади и меша све док се не заврши преципитација. Преципитат се издваја и испира водом и етанолом.



Шема 4. Други ступањ синтезе моксифлоксацина

Уколико се моксифлоксацин хидрохлорид користи за производњу инфузионих раствора онда постоји још један степен пречишћавања: преципитат добијен у другом ступњу се раствори у пречишћеној води и рефлукује. Кристали који се формирају након хлађења се скупљају филтрирањем и испирају етанолом. Кристали који су настали после ове прве кристализације се поново растварају у смеси воде и етанола (70 : 30, v/v) и рефлукују. Раствор се третира активним угљем и филтрира. Кристали који настану после хлађења се скупљају филтрирањем, испирају етанолом и суше док производ не достигне температуру од 43 °C. Овако добијен моксифлоксацин има минималан садржај нечистоћа.

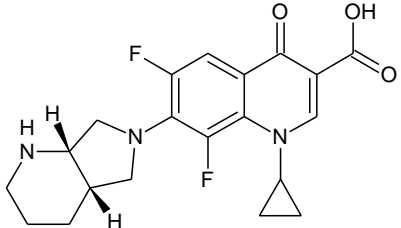
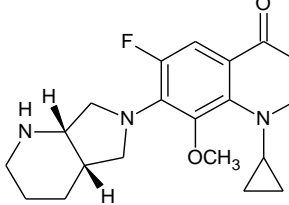
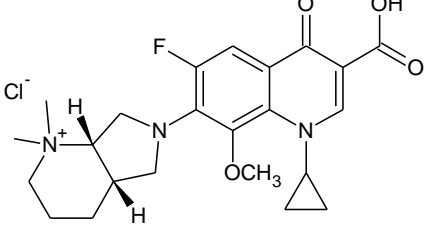
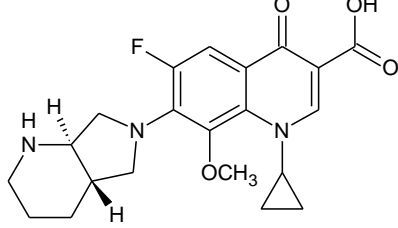
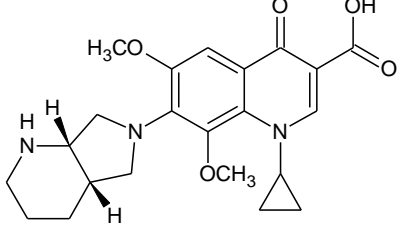
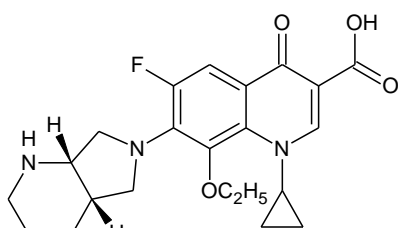
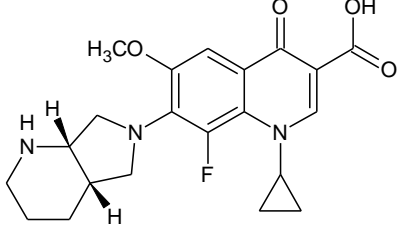
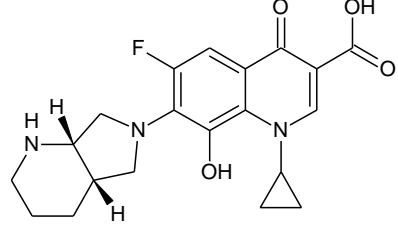


Шема 5. Пречишћавање моксифлоксацина за инфузију

Током синтезе развијене од стране Вауег AG, могу се јавити не само неизрегована дифлуорована једињења већ и сродни аналози: 1-циклопропил-7-[(S,S)-2,8-диазабицикло[4.3.0]нон-8-ил]-6,8-дифлуоро-1,4-дихидро-4-оксо-3-хинолон карбоксилна киселина [6,8DF], 1-циклопропил-7-[(S,S)-2,8-диазабицикло[4.3.0]нон-8-ил]-6,8-диметокси-1,4-дихидро-4-оксо-3-хинолон карбоксилна киселина [6,8DM], 1-

циклопропил-7-[(S,S)-2,8-диазабицикло[4.3.0]нон-8-ил]-8-флуоро-6-метокси-1,4-дихидро-4-оксо-3-хинолон карбоксилна киселина [6M8F] и 1-циклопропил-7-[(S,S)-2,8-диазабицикло[4.3.0]нон-8-ил]-8-етокси-6-флуоро-1,4-дихидро-4-оксо-3-хинолон карбоксилна киселина [6F8E], који су присутни у малим количинама у производима моксифлоксацина [253, 257]. Хемијске структуре родних једињења и деградационих производа моксифлоксацина приказани су у Табели 15.

Табела 15. Структуре и називи родних и деградационих производа моксифлоксацина

 <p>Вау z 7906 (нуспроизвод синтезе)</p>	 <p>Декарбокси једињење (деградациони производ)</p>
 <p>N-метил једињење (потенцијални нуспродукт синтезе)</p>	 <p>Моксифлоксацин HCl диастереоизомер (потенцијални производ синтезе)</p>
 <p>6,8-диметокси једињење (нуспроизвод синтезе)</p>	 <p>8-етокси једињење (прекурсор синтезе)</p>
 <p>6-метокси-8-флуоро једињење (нуспроизвод синтезе)</p>	 <p>8-хидрокси једињење (нуспроизвод синтезе)</p>

Сваки лек може садржавати нечистоће или деградационе производе који настају приликом производње или тестирања стабилности, приликом присилне деградације или при условима складиштења. Дозвољена максимална количина за сваку нечистоћу је установљена према правилнику Међународне Конференције о Хармонизацији Техничких Захтева за Регистрацију Лекова, ICH (The International Conference on

Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use) [258], која уједињује стручњаке из регулаторног подручја и фармацеутске индустрије из три регије (Европа, Сједињене Америчке Државе и Јапан) који се са научног и технолошког аспекта договарају о регистрацији лека и уколико превазилазе одређене границе, нечистоће се морају идентификовати и квантификовати [259, 260].

1.2.5.2. Физичко-хемијске карактеристике моксифлоксацина

Моксифлоксацин-хидрохлорид је кристална супстанца светложуте боје, горког укуса. Хигроскопан је и може да веже до једног мола воде, што зависи од температуре и релативне влажности. На повишеној температури може да изгуби везану воду.

Моксифлоксацин-хидрохлорид нема изражену тачку топљења, али на температурама изнад 250 °С долази до његове разградње. Специфична ротација раствора моксифлоксацина концентрације 10 mg/mL у 50 % ацетонитрилу износи $[\alpha]_D^{20} - 131^\circ$.

Растворљивост моксифлоксацин-хидрохлорида у води износи 24 g/L. Растворљивост се смањује у присуству хлоридног јона. Испитивања растворљивости на различитим рН вредностима на 25 °С, показала су да нема промене растворљивости у опсегу рН од 3 до 5 и она износи 27 g/L. На рН = 1 (0,1 mol/L HCl) растворљивост опада на 4,7 g/L, због присуства хлоридних јона. Са повећањем рН вредности растворљивост незнатно расте, да би на рН = 7 била 38 g/L. Растворљивост моксифлоксацина у различитим растварачима дата је у Табели 16.

Табела 16. Растворљивост (g/L) моксифлоксацина у различитим растварачима на 25 °С

Растварач	Растворљивост	Растварач	Растворљивост
Вода	24	0,1 mol/L HCl	4,7
Вода + 0,1 mol/L NaCl	5,1	0,1 mol/L NaOH	67
Вода + 0,5 mol/L NaCl	0,85	Метанол	26
Вода + 1,0 mol/L NaCl	0,40	N,N-Диметилформаид	7,6
Вода + 2,0 mol/L NaCl	0,18	Етанол	2,5
0,15 mol/L фосфатни пуфер рН = 3	27	2-Пропанол	0,24
0,15 mol/L фосфатни пуфер рН = 4	27	Ацетонитрил	0,27
0,15 mol/L фосфатни пуфер рН = 5	27	Дихлорметан	0,068
0,15 mol/L фосфатни пуфер рН = 6	29	Ацетон	0,072
0,15 mol/L фосфатни пуфер рН = 7	38	Етил-ацетат	0,00085
0,15 mol/L фосфатни пуфер рН = 8	45	Толуен	0,00015
0,15 mol/L фосфатни пуфер рН = 9	46	n-Хептан	<0,0001

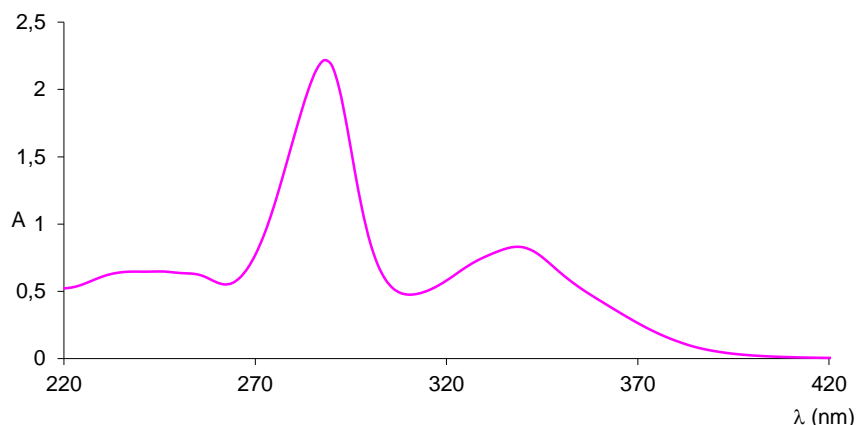
Пошто је моксифлоксацин у облику хидрохлорида, рН вредност воденог раствора моксифлоксацина концентрације 10 mg/mL износи 4,4.

Моксифлоксацин има две рК_а вредности. Прва рК_а износи 6,38 и потиче од карбоксилне групе, а друга рК_а износи 9,53 и потиче од азота у С-7 супституенту. Ове константе су одређене потенциометријски коришћењем воденог раствора моксифлоксацина концентрације 1 mg/mL.

Партициони коефицијенти моксифлоксацина имају вредност $\log P_{o/w} = -1,87$ за октанол/воду и $\log P_{o/w} = -0,61$ за октанол/фосфатни пуфер.

Моксифлоксацин је чист S,S-енантиомер са два стереогена центра. Одговарајућа стереохемијска конфигурација је одређена полазним материјалом S,S-пиролидопиперидином, па није потребна стерео-селективна синтеза нити раздвајање рацемата.

UV спектар моксифлоксацина је врло сличан спектру осталих флуорованих хинолона тј. има два максимума: први максимум је на 294 nm и потиче од апсорпције делокализованог π електронског система хинолонског језгра. Други максимум се налази на 330 nm и потиче од апсорпције пиперидинског супституента и π електрона карбонила и пиперидинског прстена. Специфичан коефицијент апсорпције A_m је 1122, а моларни апсорпциони коефицијент ϵ_{max} је $4,9126 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. UV спектар моксифлоксацина у метанолу приказан је на Слици 30.



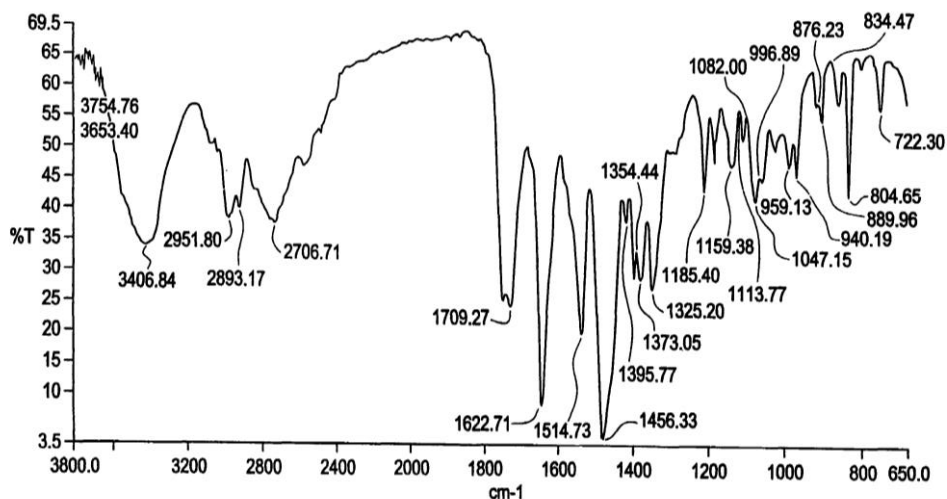
Слика 30. UV спектар моксифлоксацина у метанолу на рН = 7,4

Изглед и карактеристике спектра моксифлоксацина јако зависе од рН вредности растварача. У Табели 17 су приказани положаји најизраженијих максимума у спектру за различите средине.

Табела 17. Таласне дужине маскимальне апсорпције моксифлоксацина у различитим срединама.

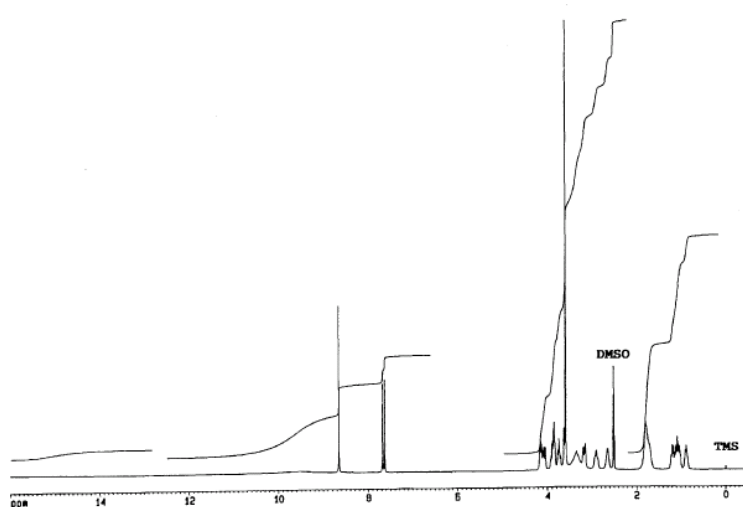
Растварач	0,1 mol/L HCl	Пуфер рН = 7	0,1 mol/L NaOH
Максимум 1	295 nm	288 nm	291 nm
Максимум 2	327 nm	338 nm	339 nm

IR спектар моксифлоксацина показује карактеристичне траке на следећим таласним бројевима (cm^{-1}): 3528 – 3470, 3068 – 2830, 2796 – 2083, 1709 – 1623 и 1515 – 1352. Најизраженије траке су у области 1515 – 1352 cm^{-1} и оне потичу од вибрација истезања C=C ароматичног језгра и вибрација савијања N–H, C–H и C–N–C прстена. Такође су изражене и вибрације истезања карбонилне групе у области 1709–1623 cm^{-1} . IR спектар моксифлоксацина снимљен КВг техником приказан је на Слици 31.



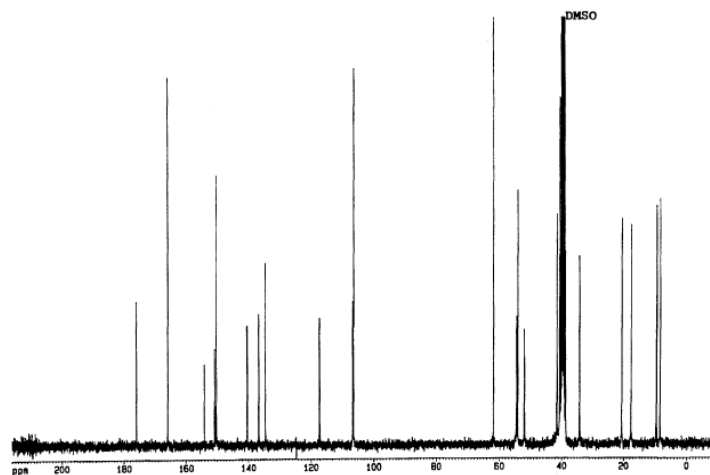
Слика 31. IR спектар моксифлоксацина снимљен КВг техником [261]

$^1\text{H-NMR}$ спектар моксифлоксацина (Слика 32) снимљен је техником Fourије-ове трансформације на радној фреквенцији од 300,135 MHz. Као растварач коришћен је диметилсулфоксид, а као интерни стандард тетраметилсилан. Спектрална ширина је била 20,07 ppm, а дигитална резолуција 0,368 Hz/Pt (Слика 32) [257].



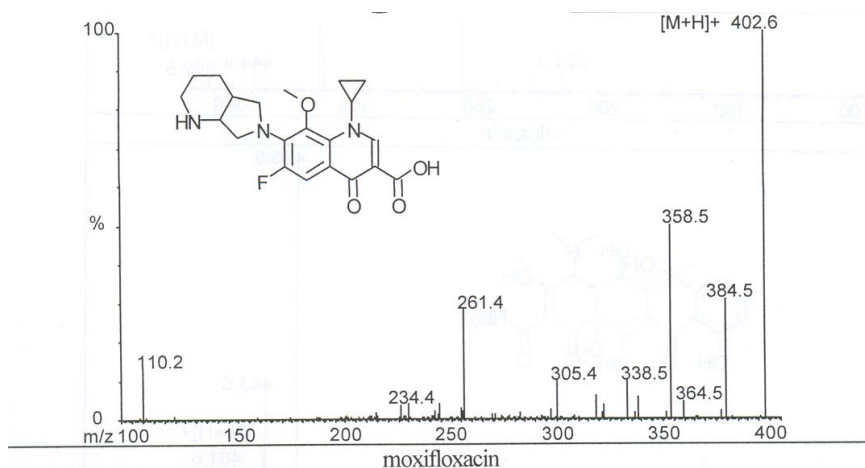
Слика 32. $^1\text{H-NMR}$ спектар моксифлоксацина снимљен техником Fourије-ове трансформације [257]

^{13}C -NMR спектар моксифлоксацина (Слика 33) снимљен је техником Fourије-ове трансформације на радној фреквенцији од 75,48 MHz. Као растварач коришћен је диметилсулфоксид, а као интерни стандард тетраметилсилан. Спектрална ширина је била 301,1 ppm, а дигитална резолуција 0,694 Hz/Pt. Брзина аквизиције је била 1,442 секунде, а дужина пулса 7,4 msec, 90° угао пулса. Број слободно индукованих распада био је 3200 [257].



Слика 33. ^{13}C -NMR спектар моксифлоксацина снимљен техником Fourије-ове трансформације [257]

Масени спектри нам помажу код одређивања молекулског јона, као и фрагмената који из њега настају. На Слици 34 је приказан масени спектар моксифлоксацина, а у Табели 18 молекулски јон и фрагменти моксифлоксацина.



Слика 34. Масени спектар моксифлоксацина [262]

Табела 18. Табеларни приказ фрагментације моксифлоксацина.

		358,5	$[\text{M}-\text{CO}_2+\text{H}]^+$
Моксифлоксацин (MW = 401,4 g/mol)	402,6 $[\text{M}+\text{H}]^+$	384,5	$[\text{M}-\text{HF}+\text{H}]^+$
		261,4	$[\text{M}-\text{C}_6\text{H}_{13}\text{N}-\text{CO}_2+\text{H}]^+$

1.2.5.3. Стабилност моксифлоксацина

Да би се утврдила термална стабилност моксифлоксацин-хидрохлорида испитивани су узорци који су чувани на 25 °C и 60 % релативне влажности и на 40 °C и 75 % релативне влажности. У анализираним узорцима није примећена никаква деградација, односно, узорци су имали непромењен изглед, бистрину и боју раствора, садржај воде и органске нечистоће. Ово такође значи да се не дешава ни изомеризација на хиралним центрима, јер би то довело до пораста садржаја диастереомера моксифлоксацина. На основу тих података закључено је да је моксифлоксацин-хидрохлорид стабилан на температурама до 25 °C.

Испитивања фотостабилности су изведена, како на чврстој супстанци, тако и на 10^{-3} mol/L раствору у 25 %-тном метанолу. Узорци су били изложени светлости коју је емитовала ксенонова лампа. Анализом озрачених узорака утврђено је да је супстанца мало осетљива на светлост, док је раствор осетљивији и због тога је растворе потребно заштитити од светлости.

Хемијска стабилност је испитана анализирањем узорака 0,1 %-тног раствора моксифлоксацин-хидрохлорида који су чувани у 0,1 mol/L NaOH и у води током 24 сата на температури од 90 °C. Мала деградација је запажена у 0,1 %-тном раствору који је чуван под истим условима у фосфатном пуферу pH = 7 и у 0,1 mol/L HCl. После једне недеље чувања на 90 °C добијени су исти резултати као и после једног дана.

Испитивање оксидационе стабилности обављено је на узорцима 0,1 %-тног раствора у присуству 3 % H₂O₂ у води и у фосфатном пуферу pH = 7, на собној температури, током 24 сата и током 7 дана. Када је чуван у води на 25 °C, моксифлоксацин-хидрохлорид показује само трагове деградације после 24 сата, док се око 5% деградационих производа награди после 7 дана на 40 °C. Када је чуван у пуферу на pH = 7, запажена је већа деградација чак и после 24 сата на 25 °C (око 8 %), док се после 7 дана чувања на 40°C у истом пуферу награди 80 % деградационих производа.

1.2.5.4. Литературни преглед метода за одређивање моксифлоксацина и његових деградационих производа

Због широке употребе моксифлоксацина у клиничкој пракси јавила се потреба за увођењем брзе и поуздане методе за његово одређивање у фармацутским формулацијама и биофлуидима. Међутим, само неколико HPLC метода је развијено за одређивање моксифлоксацина у биолошким формулацијама и узорцима [263 – 265] али ниједна за испитивање стабилности. Изоловање и идентификација деградационих производа објављена је до сада у свега неколико радова.

Kumar и сарадници [266] изоловали су и структурно окарактерисали четири нечистоће у формулацији моксифлоксацина: 1-циклопропил-6-флуоро-1,4-дихидро-8-метокси-7-[(S,S)-N-метил-2,8-диазабицикло(4,3,0)нон-8ил]-4-оксо-3-хинолин карбоксилну киселину, метил-1-циклопропил-6-флуоро-1,4-дихидро-8-метокси-7-[(S,S)-2,8-диазабицикло(4,3,0)нон-8-л]-4-оксо-3-хинолински карбоксилат, 1-цикло-

пропил-6-флуоро-1,4-дихидро-8-хидрокси-7-[(S,S)-2,8-диазабицикло(4,3,0)нон-8-ил]-4-оксо-3-хинолин карбоксилну киселину и 1-циклопропил-6,7-дифлуоро-8-хидрокси-4-оксо-1,4-дихидро-3-хинолин карбоксилну киселину.

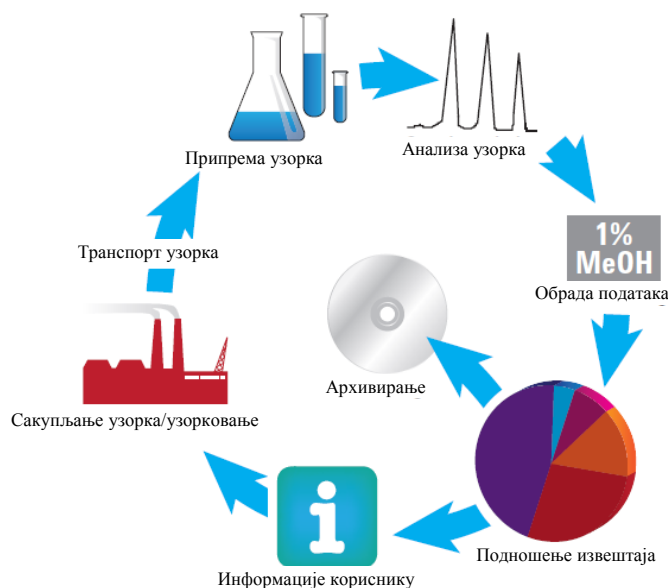
Motwani и сарадници [267] су идентификовали три деградациона производа користећи HPTLC методу. Активну супстанцу су такође подвргли киселој и базној хидролизи, оксидацији, сувом и мокром третману као и фотодеградацији. Значајна деградација је примећена под хидролитичким условима (седам производа), док под осталим условима деградација је умерена (три производа).

Salem и сарадници [268] су применили две методе, дензитометријску TLC и деривативну спектрофотометрију за одређивање ломефлоксацина, моксифлоксацина и спарфлоксацина, у присуству њихових киселих деградационих производа. Главно једињење деградације је декарбоксилован производ одвојен применом TLC.

Wei и сарадници [269] окарактерисали су неке нечистоће моксифлоксацина коришћењем спектрофотометријске методе.

1.3. Припрема узорка за анализу

Припрема узорка је најбитнији део пре хроматографске или спектроскопске анализе. Овим поступком потребно је припремити репрезентативни, поновљиви и хомогени раствор који је погодан за анализу. Операције које је потребно урадити обухватају: прикупљање узорка, складиштење и конзервирање, транспорт, прелиминарну обраду и лабораторијско узорковање, мерење и растварање (Слика 35).



Слика 35. Ток припреме узорка за анализу

1.3.1. Прикупљање биљног материјала

Опште је правило да се брање биљака обавља по лепом и сунчаном времену. Правило је да се увек бере само једна врста да не би дошло до замене и мешања материјала. У зависности од тога који се део биљке користи, али и од хемијске природе физиолошки активних састојака, сакупљање се одвија у различитим фазама развоја биљке.

1.3.2. Обрада прикупљеног материјала

После скупљања, биљни материјал мора да се пречисти. Одвајају се сви делови биљке који се не користе, друге биљке, земља и камење. Затим се одстрањују оштећени, оболели или трули делови. Подземни делови се перу у води, да би се очистили од земље и песка. Најчешће се, пре сушења, биљни делови секу на начин и до величине која је уобичајена за дату сировину.

1.3.3. Сушење

Сушење је најбржи и најједноставнији начин конзервирања сирове биљне масе; овај процес представља максимално смањење влаге у ћелијама. Сушењем долази до умањења масе активне компоненте у односу на сирово биљно ткиво. Биљна ћелија садржи 60 – 95 % слободне воде и њено присуство је главни узрок кварења. Због неправилног или неадекватног паковања и складиштења, активне компоненте могу накнадно да поприме атмосферску влагу. Технологија сушења је веома значајна јер се њоме обезбеђује добар изглед и квалитет активне компоненте. Неправилним сушењем се добија сировина слабијег квалитета са аспекта активних састојака.

Процес сушења се може обављати природним и вештачким путем. Природним путем се сировине суше у танком растреситом слоју на одговарајућим подлогама на сеновитом и промајном месту или директно изложене сунчевој светлости. Дужина процеса зависи од структуре ткива, али и од временских услова. Данас се много чешће примењују вештачке методе сушења. Опште је правило да сировина мора бити удаљена најмање 15 cm од загрејаних површина и да у унутрашњости сушара мора бити обезбеђена циркулација топлог ваздуха и одвођење водене паре. Сировине које садрже лако испарљиве састојке, суше се на 35 – 40 °C, док је за сушење грубљих делова неопходна температура од 50 – 60 °C.

Све више се за сушење сировог материјала и екстракта користи процес лиофилизације. Замрзнуто ткиво се ставља у специјалне коморе у којима се успоставља вакуум, тако да долази до постепене сублимације замрзнуте воде, а ткиво постаје суво и порозно.

1.3.4. Узорковање

Сви чврсти узорци су хетерогеног састава, стога се мора добити репрезентативни узорак у циљу одређивања његовог стварног састава. Током смањења количине узорка све величине узорка морају бити узете у обзир у зависности од њихове заступљености. Пожељно је чврст узорак свести на ситне честице због:

- Спрашен узорак је хомоген и омогућава репрезентативно подузорковање са већом тачношћу и прецизношћу;
- Спрашен узорак се брже раствара и лакше екстрахује због веће додирне површине.

Основне методе за уситњавање узорака су сецкање, дробљење, сечење, млевење, хомогенизација, мацерација, пресовање, пулверизација [270]. Избор начина уситњавања узорка зависи од:

- Врсте узорка, односно његове чврстине,
- Почетне величине честица узорка,
- Крајње величине честица које је потребно добити,
- Количине узорка или потребне количине за анализу,
- Нечистоћа које могу интераговати са испитиваним анализом.

Компаније које производе уређаје за сечење, дробљење, млевење, хомогенизацију, мацерацију, пресовање и пулверизацију су Retsch Technology (Haan, Немачка), Spx SamplePrep (Metuchen, САД), Fritsch (Idar-Oberstein, Немачка) и Buehler (Lake Bluff, САД).

Када је узорак уситњен и компактан наставља се са даљом обрадом. Иако је величина честица униформна потребно је узети само мали део целокупне количине за припрему лабораторијског узрока. У ту сврху примењује се метода четвртања све док се не добије потребна количина узорка.

Након добијања потребне количине лабораторијског узорка потребно је класификовати честице на основу њихове величине; у ту сврху користе се сита различитих промера отвора, односно броја окаца [271]. Што је већи број окаца то се добија мања величина честица односно прах. За аналитичка испитивања употребљавају се сита чији промер окца није већи од 5 μm . Након тога се примењују различити растварачи или смеше растварача за превођење узорка у растворан облик.

1.3.5. Припрема узорка таблете за анализу

Када се анализирају узорци таблета или прашка, узорковање мора осигурати добијање репрезентативног узорка који се даље користи за испитивања. Приликом анализе таблета потребно је узети 20 таблета или капсула, након чега следи хомогенизација и растварање целокупног узорка у одговарајућој мобилној фази уз коришћење ултразвука у периоду од 15 минута.

1.3.6. Екстракција

Екстракција представља процес којим се из неке чврсте супстанце или течности врши изоловање неке компоненте помоћу погодног растварача. Циљ екстракције је да се жељена компонента која се налази у узорку помоћу погодног растварача изолује, а након тога, ако је потребно, одстрањивањем растварача добије у чистом облику. Екстракција супстанци из чврстог материјала назива се ослобађање и заснива се на дифузији жељене компоненте из унутрашњости носеће материје у растварач који је у сталном додиру са узорком и одабран према жељеној компоненти. Дифузија траје све док постоји разлика у концентрацији жељене компоненте у узорку и растварачу. На брзину екстракције утиче:

1. Величина додирне површине растварача и узорка,
2. Поларност растварача,
3. Време трајања екстракције и
4. Температура система.

Повећање додирне површине између растварача и узорка се постиже уситњавањем узорка. У зависности од поларности жељене компоненте која се изолује врши се и избор растварача који се користи. Растварачи који се користе за екстракцију требало би да буду селективни, да имају ниску температуру кључања, малу топлоту

испаривања, да су једнородни и чисти, да нису отровни и да нису агресивни према апаратури која се користи за екстракцију. Као растварачи се углавном употребљавају: вода, метанол, етанол, ацетон и течни угљоводоници. Дужим временом трајања екстракције, као и вишом температуром повећава се и ефикасност екстракције, али треба водити рачуна да при тим условима екстракције не дође до деградације испитиване компоненте.

Брзина екстракције се може дефинисати као количник масе изоловане жељене компоненте (m) у јединици времена (t) и дата је изразом:

$$\frac{m}{t} = \beta_t \cdot A \cdot (x_g - x) \quad (17)$$

где је β_t коефицијент преноса жељене компоненте кроз гранични слој и пропорционалан је температури, A површина додира, x_g концентрација компоненте у узорку и x концентрација компоненте у растварачу.

Поступак екстракције се изводи у три фазе:

1. Узорак који подлеже екстракцији доводи се у контакт са растварачем,
2. Врши се одвајање насталих фаза
3. Уклањање и регенерација растварача

Један од услова који утичу на екстракцију је растворљивост супстанце у различитим растварачима који се дефинише коефицијентом расподеле, K_D .

$$K_D = \frac{[A_1]}{[A_2]} \quad (18)$$

где $[A_1]$ и $[A_2]$ представљају равнотежне концентрације супстанце A у различитим растварачима. Коефицијент расподеле говори о расподели неке супстанце између две фазе, али не и о томе колико ће се супстанце екстраховати при датим условима. Ефикасност екстракције дефинише се као проценат екстракције и дат је изразом:

$$E(\%) = \frac{\text{количина екстраховане супстанце}}{\text{укупна количина супстанце}} \times 100 \quad (19)$$

Процент екстракције зависи од коефицијента расподеле и релативног односа запремина две фазе и дат је изразом:

$$E = \frac{100K_D}{K_D + \frac{V_1}{V_2}} \quad (20)$$

где су V_1 и V_2 запремине фаза.

Ако у условима екстракције проценат екстракције није 100 %, што се често дешава, њена ефикасност се може побољшати вишеструком екстракцијом са малим запреминама органске фазе. Још боља ефикасност екстракције се постиже континуалном екстракцијом.

1.3.6.1. Екстракција на чврстој фази (Solid-phase extraction, SPE)

Претходна припрема узорка за анализу модерним инструменталним методама анализе (HPLC, GC, UV) захтева два услова, а то су пречишћавање и преконцентровање. Пречишћавање узорка је потребно извршити када су присутне нечистоће у матриксу узорка које интерагују са испитиваним анализитом. Нечистоће које могу скратити живот HPLC и GC колоне морају се елиминисати пре инјектовања узорка на колону. Преконцентровање анализита је важно када је раствор превише разблажен за директно мерење.

Изоловање анализита из узорка најчешће се врши течно-течно екстракцијом. Традиционална течно-течна екстракције се изводи у левковима за одвајање што ову методу чини заморном, дуготрајном и скупом. Ова метода не само што захтева неколико корака, већ се јављају и други проблеми приликом анализе, као што су мешање растварача, велика запремина растварача, нечисти и мокри узорци, као и немогућност квантитативне и репродуктивне екстракције. Друге класичне технике припреме узорка укључују центрифугирање, филтрирање, дестилацију, таложење и лиофилизацију.

Средином 70-их година двадесетог века уводи се једноставнији алтернативни метод, екстракција на чврстој фази (solid phase extraction, SPE) [272, 273]. Слично течној хроматографији при ниском притиску, садржи мале колоне за једнократну употребу пуњене различитим сорбентима. Ове полипропиленске колоне су пуњене са 100, 200, 500, 1000 или 2000 mg сорбента између полиетиленских фритова. Запремина колоне је 1, 3 или 6 mL. Велике запремине узорка (неколико литара) се пропуштају кроз колону при чему се анализити сорбују. Велики број колоне сличних конфигурација могу се наћи на тржишту.

Колоне се прво кондиционирају одговарајућим растварачем (метанол, хексан или хлороформ) како би се солватисале функционалне групе сорбента. Након што је сорбент кондициониран матриксом узорка, раствор узорка се наноси на сорбент аспирирањем или применом притиска. Колона задржава испитивани анализит који се након тога испира одговарајућим растварачем који селективно елуира нечистоће, али оставља анализит на колони. Пречишћени анализит се на крају елуира растварачем довољно «јаким» да десорбује анализит са сорбента.

Механизми који се одвијају приликом екстракције на чврстој фази укључују:

- Интермолекулске силе,
- Факторе који утичу на јоно-измењивачку селективност.

Механизми одвајања који се заснивају на интермолекулским интеракцијама између анализита и функционалних група сорбента укључују следеће силе:

- Јонске,
- Водоничну везу,
- Дипол-дипол привлачење,
- Дипол-индуковани дипол,
- Дисперзионе силе.

Водоничне везе се граде између молекула код којих је атом водоника ковалентно везан за јако електронегативан елемент као што је кисеоник, азот или флуор. Јачина водоничне везе је око 8,5 – 42 kJ/mol, односно око 10 % јачине ковалентне везе. На релативну јачину водоничне везе утиче електронегативност и величина везујућег елемента. Тако на пример, азот и хлор имају једнаку електронегативност, али мањи атом азота има већи афинитет за водоничну везу.

Дипол-дипол привлачење се јавља између диполних молекула који поседују спољашње електрично поље, које је много слабије од електричног поља јона. Молекул има диполни моменат само када се средишта негативног и позитивног наелектрисање молекула не поклапају. Дипол-дипол интеракције између молекула су слабијег интензитета од водоничне везе.

Дисперзионе силе (van der Waals-ове или London-ове силе) су слабе међумолекулске силе, које потичу из квантно индуковане тренутне поларизације мултипола у молекулима. Ако је симетричан молекул унет у електрично поље, електронски облак молекула може бити благо померен, стварајући индуковани диполни моменат. Дисперзионе силе могу бити привлачне или одбојне, у зависности од интермолекулског растојања и слабијег су интензитета од водоничне везе и дипол-дипол интеракција. Дисперзионе силе, иако појединачно слабе, су значајне код молекула састављених од великог броја атома.

Јонске интеракције су примарне силе укључене код јоно-измењивачке екстракције. Интеракције се јављају између ковалентно везане наелектрисане групе јоно-измењивача и раствора јона супротног наелектрисања. Ово је електростатичко, реверзибилно привлачење.

Фактори који утичу на јоно-измењивачку селективност су:

- Поларност органског растварача,
- рН растварача којим се врши елуирање,
- Величина контра јона са којим се врши измена,
- Јонска јачина раствора којим се врши елуирање,
- Проток.

Ретенција једињења на чврстој фази постигнута је њиховом јонизацијом. Оптимално рН за јонске анализе зависи од њихове pK_a вредности. Киселина ће бити у одговарајућем облику за ретенцију на анјон изменљивој колони ако се рН подеси за две рН јединице веће од њене pK_a вредности, када се кисели облик преводи у нејонизовану форму. Насупрот томе, базе се најефикасније екстрахују на катјон изменљивој колони из раствора који је за две рН јединице испод њене pK_a вредности.

Селективност контра јона ових везивних фаза је важна за ретенцију. За SAX сорбенте, контра јони као што су Li^+ , H^+ , Na^+ и NH_4^+ , се најлакше замењују катјонском групом анализата. Контра јони, Cu^{2+} , Ca^{2+} или Ba^{2+} , се теже замењују. Код SAX измењивача OH^- , F^- и $C_2H_3O_2^-$, контра јони се најлакше замењују, док $H_2PO_4^-$ и HCO_3^- се умерено лако замењују. Контра јони као што су HSO_4^- , NO_3^- , CN^- , Cl^- се умерено тешко замењују. Лоши резултати екстракције се јављају када су цитрати, јодиди или бензен сулфонат контра јони у матриксу узорка.

Јонска јачина је мера укупне концентрације јонских врста у матриксу која утиче на ретенцију јонских анализата. Велика концентрација страних катјона у матриксу узорка ће утицати на везивање катјонских анализата за слободна кисела места јоноизмењивача. Ниска јонска јачина фаворизује ретенцију, док велика јонска јачина тежи лакшем елуирању.

У неким случајевима растворљивост неутралног облика киселине или базе је много мања у води у поређењу са јонским обликом. Као последица тога анализат може постати нерастворан када је растварач за елуирање такав да анализат преводи у неутралан облик. Органски растварачи који се мешају са водом морају се додати у растварач за елуирање како би се ефикасно елуирале такве компоненте.

Проток растварача мањи од 5 mL/min препоручује се за растворе узорка, пошто се јоно-измењивачке интеракције одвијају у мањем обиму неко поларне или неполарне интеракције.

1.4. Инструменталне методе анализе

1.4.1. Високо-ефикасна течна хроматографија (HPLC)

Хроматографска метода је дефинисана од стране Интернационалне уније за чисту и примењену хемију [274] као:

„Хроматографија је физичка метода раздвајања у којој се компоненте смеше које треба раздвојити расподељују између две фазе, од којих је једна непокретна (стационарна фаза) и друге која се креће кроз или дуж стационарне фазе у дефинисаном правцу (мобилна фаза). Мобилна фаза може да буде течност, гас или суперкритични флуид, док стационарна фаза може бити чврста, гел или течност, која је распоређена на чврстој основи која може, али не мора да учествује у процесу раздвајања“.

Хроматографске методе се деле према физичком стању фаза, према физичко хемијским реакцијама које се дешавају приликом раздвајања компоненти или механизму раздвајања.

Подела према физичком стању фаза

1. Течна хроматографија
 - Адсорпциона (течно/чврсто), TLC, HPLC
 - Јонска
 - Ексклузиона
2. Гасна хроматографија
 - Гас/течно
 - Гас/чврсто
3. Суперкритична флуидна хроматографија

Подела према облику система

1. Колонска хроматографија
2. Планарна хроматографија

Подела према механизму раздвајања

1. Адсорпциона хроматографија
2. Партициона (подеона) хроматографија
3. Јоноизмењивачка (јонска) хроматографија
4. Ексклузиона хроматографија

Течна хроматографија, нарочито високо-ефикасна течна хроматографија (High Performance Liquid Chromatography – HPLC) је најважнија и најчешће примењивана метода хроматографије [275]. Овом методом могу се анализирати готово сви узорци, лекови, храна, индустријске хемикалије, козметички производи, узорци из животне средине и многи други.

1.4.1.1. Теорија хроматографије

Постоје две теорије којима се могу описати хроматографски процеси и то теорија подова [276] и кинетичка теорија [277].

Према теорији подова, хроматографска колона се посматра као велики број хоризонталних слојева, који се називају теоријски подови. Приликом кретања мобилне фазе и узорка, на подовима се успоставља равнотежна расподела анализата између стационарне и мобилне фазе. Равнотежа се описује равнотежном константом, K , која се назива партициони коефицијент, и представља однос моларне концентрације анализата у стационарној и мобилној фази:

$$K = \frac{C_{stac.faza}}{C_{mob.faza}} \quad (21)$$

На колони се могу раздвојити супстанце које имају различите партиционе коефицијенте. Што је партициони коефицијент већи, супстанца ће се спорије кретати кроз колону. Теоретски подови служе и као мера ефикасности колоне, било да се она изражава преко броја теоретских подова N , или преко висине еквивалентне теоретском поду.

Број теоретских подова (N) се израчунава са хроматограма према следећој једначини:

$$N = 16 \times \left(\frac{t_r}{W} \right)^2 \quad (22)$$

где је:

t_r – ретенционо време, W – ширина пика у основи

Теорија теоретских подова претпоставља да се равнотежа успоставља великом брзином, што није тачно, јер се у стварности равнотежа никад не може достићи због сталног кретања мобилне фазе.

Кинетичка теорија објашњава да ширење пика потиче од три фактора и то:

1. Вишеструке путање анализата кроз паковање колоне,
2. Дифузије молекула,
3. Трансфера масе између фаза.

Van Deemter је 1956. године развио теорију брзине хроматографског процеса која се темељи на наведеним факторима. Своју теорију Van Deemter је представио у облику једначине која даје зависност висине еквивалентне теоријском поду (НЕТР) од линеарне брзине мобилне фазе. Ова теорија се у почетку односила на гасну хроматографију, али се касније показало да се исти физички процеси одигравају и код високо-ефикасне течне хроматографије.

Брзина мобилне фазе кроз колону може зависити од величине унутрашњег пречника колоне, од облика честица пуњења, порозности као и од структуре честица. Сви ови фактори који доводе до ширења пика могу се описати једначином:

$$H_p = 2\lambda d_p \quad (23)$$

где H_p представља висину еквивалентну теоријском поду која зависи од брзине протока мобилне фазе, d_p је просечна величина честица пуњења и 2λ је константа која је приближно једнака 1.

Ова једначина показује да се H_p може смањити (повећава ефикасност) ако се смањи величина честица (долази до повећања повратног притиска) тј. коефицијент λ зависи од облика и величине честица. Уколико честице нису сферног облика и неједнаке величине добијају се мање вредности λ .

Познато је да расподела молекула, или њихово мешање, долази услед дифузије. Лонгитудинална дифузија (кроз колону) доводи до ширења пика. Висина еквивалентна теоријском поду зависна од дифузије, H_d , може се представити изразом:

$$H_d = 2 \frac{\gamma D_m}{v} \quad (24)$$

где је D_m дифузиони коефицијент анализата у мобилној фази, γ је фактор који је повезан са спречавањем дифузије од стране паковања колоне и v брзина протока мобилне фазе.

На основу једначине 24 очигледно је да веће брзине мобилне фазе доводе до мањег дифузионог ефекта на ширење пика. Дифузија молекула у течну фазу је за пет редова величине нижа него код гасне фазе, стога је овај ефекат занемарљив при уобичајеним протоцима код течне хроматографије.

Трансфер масе је најмање испитиван параметар. За савремене типове паковања колоне долази до комбиновања два ефекта: адсорпциона кинетика и трансфер масе унутар честица.

Адсорпциона кинетика је занемарљив члан у односу на дифузију унутар честица, и простирање пика може се дифинисати једначином:

$$H_m = \omega \frac{d_p^2}{D_m} v \quad (25)$$

где H_m представља висину еквивалентну теоријском поду која зависи од трансфера масе, d_p је пречник честица, D_m дифузиони коефицијент анализата у мобилној фази, ω коефицијент који зависи од величине пора, облика и величине честица, v брзина протока.

Једначина 25 описује линеарну зависност висине еквивалентне теоријском поду од протока мобилне фазе. Мање брзине и молекули анализата уједначене величине могу проћи унутар честица паковања, и на тај начин могу утицати на ефикасност раздвајања анализата.

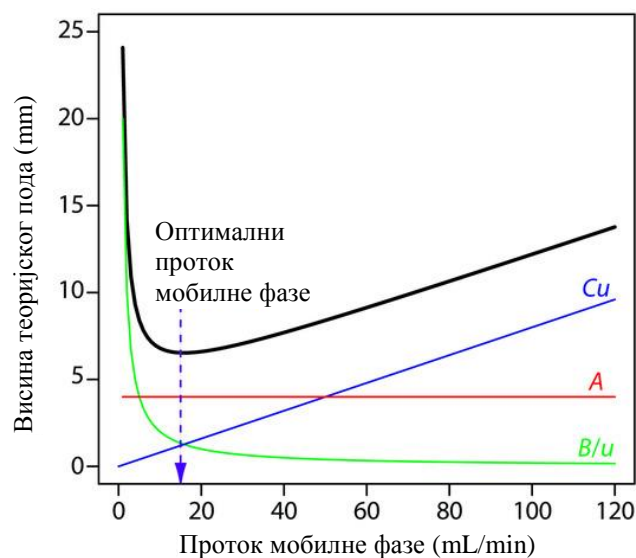
Сви фактори претходно разматрани утичу на укупно ширење пика, стога њихов збир даје укупну висину подова колоне:

$$HETP = H_p + H_d + H_m \quad (26)$$

Односно заменом једначина 23, 24 и 25 у једначину 26 добија се

$$HETP = 2\lambda d_p + 2 \frac{\gamma D_m}{v} + \omega \frac{d_p^2}{D_m} v \quad (27)$$

Van Deemter-ова једначина је хиперболична функција која показује оптималну брзину при којој је ефикасност колоне максимална и дата је на Слици 36.



Слика 36. Van Deemter-ова крива

1.4.1.2. Термодинамика ретенције

Ретенција анализата у хроматографском систему је одређена вредношћу дистрибуционог коефицијента између две фазе и количином стационарне фазе која је доступна за интеракције. Како је коефицијент дистрибуције у хроматографији равнотежна константа, може се разматрати са термодинамичке тачке гледишта [278].

Класична термодинамика омогућава описивање промене слободне енергије растворене супстанце, када се она преноси из једне у другу фазу, као функција константе равнотеже (дистрибуционог коефицијента) и дата је изразом:

$$RT \ln K = -\Delta G^0 \quad (28)$$

где је R – универзална гасна константа, T – апсолутна температура, ΔG^0 – промена стандардне слободне енергије.

Пошто је:

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0 \quad (29)$$

где је ΔH^0 – промена стандардне енталпије, ΔS^0 – промена стандардне ентропије одакле следи:

$$\ln K = -\left(\frac{\Delta H^0}{RT} - \frac{\Delta S^0}{R}\right) \quad (30)$$

односно,

$$K = e^{-\left[\frac{\Delta H^0}{RT} - \frac{\Delta S^0}{R}\right]} \quad (31)$$

На основу једначина 30 и 31 може се видети да ако се промене стандардне ентропије и енталпије могу израчунати, онда се може предвидети и коефицијент дистрибуције супстанце између две фазе, односно ретенциона запремина. Нажалост, ове две величине је тешко проценити, стога је немогуће израчунати коефицијент дистрибуције на овај начин. Међутим, када се изаберу мобилна и стационарна фаза и окарактеришу довољним бројем експерименталних података, може се извести емпиријска једначина за оптимизацију датог дистрибуционог система за специфично раздвајање. Рачунарски програми, који се заснивају на овој релацији, могу извести овакве оптимизације за смешу растварача за раздвајање три или више супстанци.

Одговарајућа стационарна фаза се бира на основу типа интеракција које је потребно искористити за раздвајање компоненти.

Преуређењем једначине 30 или 31 добија се:

$$\ln K = -\frac{\Delta H^0}{RT} + \frac{\Delta S^0}{R} \quad (32)$$

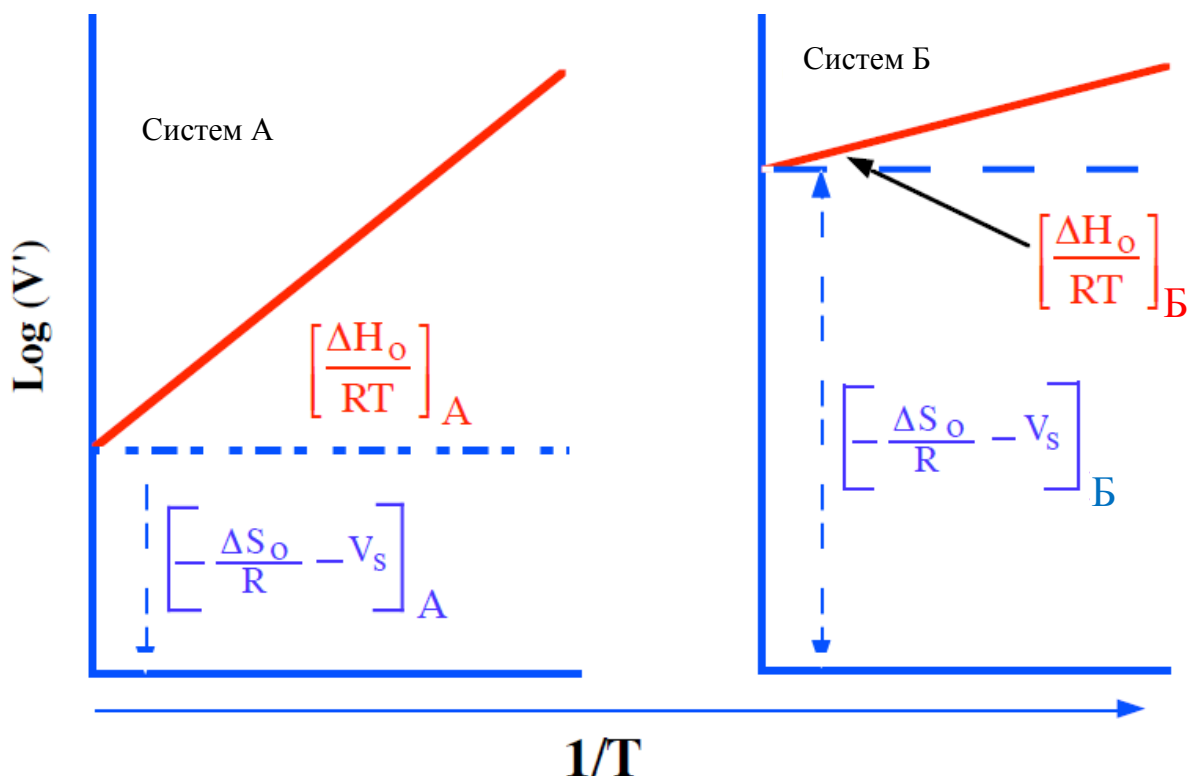
и имајући у виду да је:

$$V' = KV_s \quad (33)$$

добија се једначина:

$$\log V' = -\frac{\Delta H_o}{RT} + \frac{\Delta S_o}{R} - \log V_s \quad (34)$$

Мерењем ретенционе запремине растворене супстанце у испитиваном опсегу температура на основу једначине 34 може се идентификовати тип ретенционог механизма на коме се заснива раздвајање компоненти. Конструисањем графика зависности $\log V'$ од $1/T$ добија се права линија, чији је нагиб пропорционалан стандардној енталпији а одсечак стандардној ентропији. Ова крива се назива Van't Hoff-ова крива и приказана је на Слици 37.



Слика 37. Van't Hoff-ове криве за два различита дистрибуциона система

На основу Сlike 37 може се уочити да систем А има велику вредност енталпије и малу вредност ентропије, што значи да је расподела контролисана молекулским силама. Растворена супстанца се распоређује у стационарној фази као резултат њене јаче интеракције са стационарним фазом него са мобилном фазом.

Насупрот томе, систем Б поседује малу вредност енталпије и велику вредност ентропије. Стога расподела растворене супстанце није контролисана молекулским силама. Негативна вредност промене ентропије показује да растворена супстанца у мањој мери реагује са стационарним фазом.

1.4.1.3. HPLC систем

Систем за високо-ефикасну течну хроматографију се састоји од пумпе која обезбеђује константан проток, инјектора који служи за уношење узорка у систем, термостатског дела који одржава температуру колоне константном, колоне на којој се врши раздвајање компоненти, детектора и система за аквизицију података. Хроматограм представља графички приказ раздвајања који се десио на колони и који служи за квалитативну хемијску анализу и за квантитативно одређивање анализата [278].

Изглед типичног HPLC система је приказана на Слици 38.



Слика 38. Систем за HPLC анализу

1.4.1.4. HPLC колоне

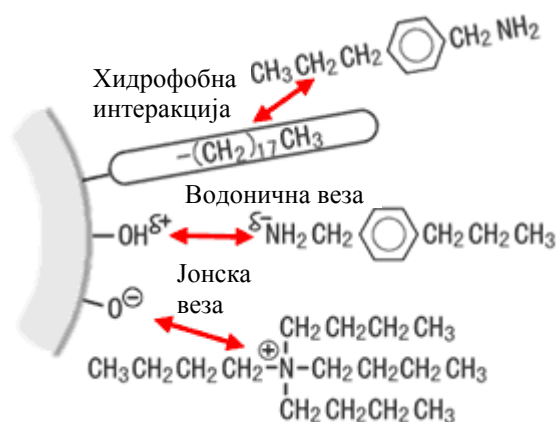
Стационарна фаза (HPLC колоне), поред мобилне фазе, активно учествује у процесу раздвајања. Због тога је избор HPLC колоне од кључног значаја за постизање раздвајања. Избор стационарне фазе зависи пре свега од компонената које треба раздвојити, односно од типа хроматографије. Приликом избора HPLC колоне треба водити рачуна о врсти стационарне фазе, величини честица и величини пора, као и о димензијама колоне.

Већина хроматографских раздвајања се изводи на стационарним фазама чије су апсорпционе особине модификоване ковалентним везивањем различитих функционалних група за површину силика-гела. Површина носача може да се модификује и превлачењем површине хемијски стабилним апсорпционим или адсорпционим слојем. Хемијски стабилне везе између носача и лиганда могуће су само на силика гелу и полимерним носачима и оне су одговорне за ретенцију и селективност. Површина силика гела се може лако дериватизовати процесом силанизације. Најчешће

коришћене HPLC стационарне фазе се добијају дериватизацијом површине силицијум диоксида алифатичним силанским реагенсима дугог ланца.

Уколико су колоне пуњене силика-гелом које су хемијски модификоване октадецилсилан групама такве колоне се називају ODS или C18 колоне. Ове врсте колоне примењују се у великој мери због брзог кондиционирања и великог броја теоријских подова.

Приликом кондиционирања колоне, односно њене еквилибрације, мора се водити рачуна о адсорпционим силама које делују на површину силика-гела. Међутим, увођењем октадецилсилан група које су волуминозне и нереактивне, већи број силанолних група преостаје неизреагован.



Слика 39. Интеракције које се одвијају на површини силика-гела

Хидрофобне интеракције се јављају између једињења мале поларности и алифатичних октадецил остатака. Силе задржавања које се при томе јављају одговорне су за реверзно-фазну хроматографију.

Неизреаговале силанолне групе на површини силика гела код којих долази до делимичног привлачења електрона од стране кисеоника и стварања делимичног позитивног наелектрисања на водонику, могу да граде водоничне везе.

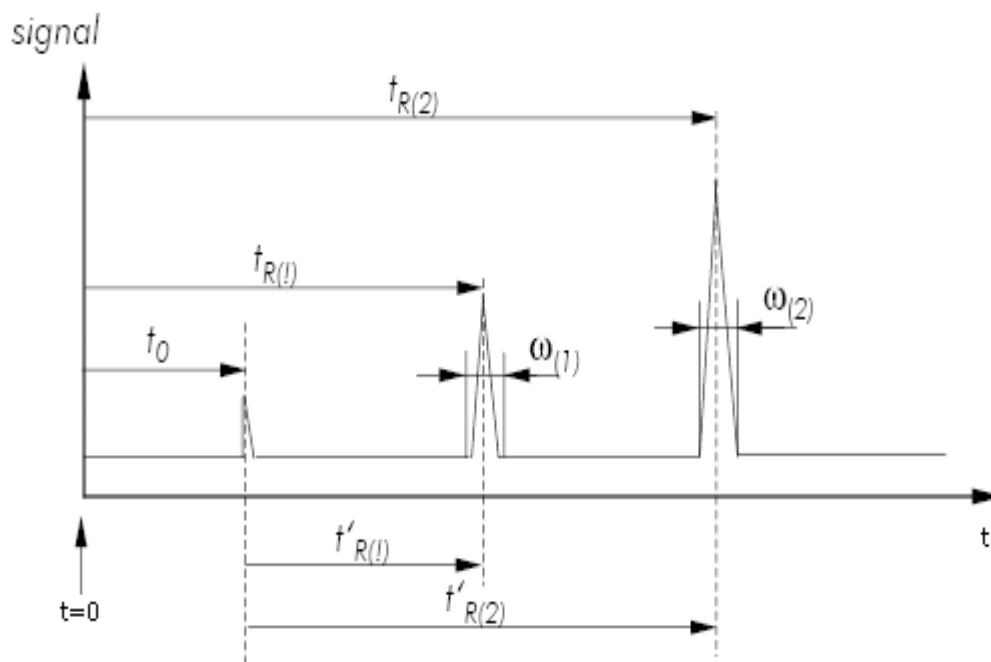
Честице паковања могу бити сферне или неправилног облика. Већина колоне данас се пуни сферним честицама. Такве колоне се одликују добром стабилношћу, малим позадинским притиском и добром репродуктивношћу. Честице неправилног облика се добијају млевењем великих честица. Колоне пуњене овим честицама су мање стабилне од оних које су пуњене сферним честицама. Величина сферичних честица се креће од 3 – 20 μm . Најчешће се користе честице од 5 μm , али постоји тренд смањења величине честица чиме се добија краће време анализе. Тако се данас врло често користе честице од 3 μm , а све чешће и од 1,7 μm .

1.4.1.5. Хроматографски параметри

Хроматографско раздвајање компонената узорка може се постићи оптимизацијом хроматографских услова: састава мобилне фазе, протока, начина елуирања, температуре, врсте и димензија колоне. Квалитет раздвајања и ефикасност колоне процењује се преко хроматографских параметара [279]:

- ретенциони фактор
- сепарациони фактор
- број теоретских подова
- висина еквивалентна теоретском поду
- симетрија пика
- резолуција

Сви ови параметри се могу израчунати са хроматограма:



Слика 40. Хроматограм добијен раздвајањем двокомпонентне смеше (1) и (2)

Формуле за израчунавање хроматографских параметара и њихове оптималне вредности дати су у Табели 19.

Табела 19. Хроматографски параметри, формуле за израчунавање и оптималне вредности

Параметар	Формула	Оптималне вредности
Ретенциони фактор	$k = \frac{(t_r - t_0)}{t_0}$	2 – 10
Сепарациони фактор	$\alpha = \frac{k_2}{k_1}$	≥ 1
Ефикасност, теоретски број подова	$N = 16 \times \left(\frac{t_r}{W}\right)^2$	≥ 2000
Ефикасност, НЕТР	$NETP = \frac{L}{N}$	
Симетрија пика	$A_s = \frac{b}{a}$	1
Резолуција	$R_s = \frac{2\Delta t}{(W_1 + W_2)}$	≥ 1

Ретенциони фактор (k) представља меру задржавања анализата на хроматографској колони. Велике вредности ретенционог фактора показује јаку интеракцију анализата са стационарном фазом.

Сепарациони фактор (α) представља способност хроматографског система да хемијски раздвоји два једињења.

Ефикасност, теоријски број подова (N) је мера расподеле пика анализата на хроматографској колони, указујући на перформансе колоне.

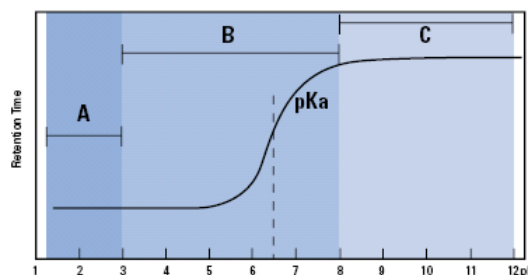
Ефикасност, ефикасна висина теоријских подова (НЕТР)

Симетрија пика (A_s) говори о изгледу пика и представља утицај мртве запремине инструмента, утицај адсорпције стационарне фазе и квалитет паковања колоне. У идеалном случају симетрија је 1. Вредности веће од 1 указују на предуго задржавање компонената на колони, а мање од 1 указују на пресићеност колоне.

Резолуција (R_s) представља способност хроматографског система да раздвоји анализате на базној линији.

1.4.1.6. Утицај рН на раздвајање анализата

Зависност ретенције јонизујућих анализата од рН вредности мобилне фазе за базне компоненте може се објаснити на основу Сlike 41.



Слика 41. Утицај рН на ретенцију базног анализата у хроматографији

Са Сlike 41 се јасно види да постоје три одвојене области:

- Област А – аналит је потпуно протонан (налази се у облику катјона) и има слабу ретенцију. Налази се у свом најхидрофилнијем облику и интеракције са хидрофобном стационарном фазом су потпуно потиснуте.

- Област В – ово је област делимичног протоновања. Овде се аналит налази у два облика, протонаном и депротонаном, и због тога се добија лош изглед пика. Пошто аналит у неутралном облику има много већу ретенцију, молекули дуже остају у стационарној фази. Због тога долази да померања равнотеже у мобилној фази према формирању депротонаних молекула и даљег повећавања ретенције. У овој области мала промена рН вредности мобилне фазе доводи до великог померања ретенционих времена.

- Област С – аналит је у неутралном облику (највише хидрофобном) и има највећу ретенцију.

Исти облик ретенциона крива има и за киселе компоненте, али би та крива била као одраз у огледалу криве за базне компоненте.

Ови ретенциони профили би се могли описати следећим једначинама, као функција рН вредности мобилне фазе и pK_a вредности аналита:

$$k = \frac{k_0 + k_1 \frac{[H^+]}{K_{a(B^+)}}}{1 + \frac{[H^+]}{K_{a(B^+)}}} \quad (35)$$

или

$$k = \frac{k_0 + k_1 \exp[2,3(pK_a - pH)]}{\exp[2,3(pK_a - pH)]} \quad (36)$$

где је:

k_1 – ретенциони фактор јонизованог облика (протонаног облика за базе и анјонског облика за киселине)

k_0 – ретенциони фактор неутралних облика за киселине и базе

k – ретенциони фактор на датој рН вредности

K_a – јонизациона константа аналита

Генерални приступ у раздвајању компонената смеше која садржи јонизујуће компоненте јесте супресија њихове јонизације. Супресија јонизације смањује снагу молекулске солватације чиме се хидрофобни (органски) део молекула излаже површинским интеракцијама. Супресија јонизације се обично постиже додавањем пуфера у растварач, чиме се постиже одређена рН вредност.

У одсуству пуфера, лако јонизујуће компоненте се елуирају са колоне као веома широки пикови јер је према Le Chatelier-овом принципу, растворена јонизујућа компонента у раствору присутна као смеша јона и нејонизованих молекула.

Хроматографско понашање јона и неутралних молекула је различито. Ако претпоставимо да ће неутрални молекули бити задржани, а да ће се јони кроз колону кретати брже, значи да ће у првом тренутку те две врсте бити развојене. Међутим, из

наведене равнотеже следи да ће у одсуству неутралних молекула, јони тежити да формирају нове неутралне молекуле који ће такође бити задржани. Тај процес се понавља и доводи до развлачења анализата дуж колоне и појаве широких пикова. Уколико се равнотежа помери додатком пуфера чија је рН вредност најмање 2 јединице различита од рК компоненте, то се не дешава [280].

1.4.1.7. Развој и оптимизација HPLC методе

Пре почетка експеримента потребно је знати све информације о узорку. Такође је потребно дефинисати циљеве хроматографског раздвајања. Најважније информације које треба знати су број присутних анализата, хемијску структуру анализата, молекулске масе, pK_a вредности, UV спектре, опсег концентрација анализата и растворљивост.

Уколико је познат хемијски састав узорка могуће је изабрати најбоље почетне услове за HPLC раздвајање. У зависности од тога како ће се користити те информације, два различита приступа у развоју HPLC методе су могућа. Први приступ је теоријски, и у том случају се проба да се хемијска природа узорка уклопи са условима за HPLC раздвајање. При томе је пресудно искуство аналитичара, као и додатне информације (нпр. подаци из литературе). Други приступ је емпиријски и ту се не поклања превише пажње природи узорка већ се емпиријски одаберу неки почетни услови раздвајања. И теоријски и емпиријски приступ у развоју HPLC методе могу бити успешни, а најчешће је најбоља комбинација оба приступа.

При развоју HPLC методе, без обзира да ли се то ради мануелно или коришћењем софтвера за развој метода, увек се до жељеног раздвајања долази на исти начин, односно истим поступком. Најпре, треба добити прихватљива ретенциона времена са изабраном мобилном фазом и колоном. Након тога треба подесити селективност, променом мобилне фазе или додавањем неког реагенса у мобилну фазу. Након што је постигнута задовољавајућа селективност, следи фино подешавање протока, величине честица и димензија колоне, чиме се даље побољшава метода.

Резолуција између пикова зависи од три фактора: ефикасности колоне, селективности и ретенције. Са јонизованим анализатима, киселинама и базама, сви ови фактори зависе и јако се мењају са рН. Променом рН вредности мобилне фазе такође се може побољшати ефикасност колоне, јер се могу мењати јонизација анализата и остатака силанолних група, чиме се смањују секундарне интеракције између анализата и површине силика гела. Постизање оптималне резолуције такође захтева промену рН мобилне фазе у току елуирања.

При развоју HPLC методе, у случају малих молекула, најбоље је почети са пуферисаном мобилном фазом на ниским рН вредностима, рН 2 – 3. Коришћењем мобилних фаза са ниским рН вредностима, добијају се оштри пикови за базне компоненте на колонама испуњеним силика гелом, јер су на ниским рН вредностима, силанолне групе на силика гелу потпуно протоноване, тако да позитивно наелектрисана, протонована базна једињења не интерагују. Већина једињења са киселим особинама нису наелектрисана, због чега при ниским рН вредностима имају

максималну ретенцију. Ово су најважније предности развоја методе при ниским рН вредностима. Зато развој методе обично почиње са мобилном фазом која садржи ацетонитрил као органски модификатор и 25 – 50 mmol/L фосфатни пуфер (рН 2 – 3), као водени део фазе. Овим се обезбеђује добра контрола рН вредности која је потребна за репродуктивне анализе јонизованих једињења. За почетак се узима С18 колона, евентуално С8 колона. Уколико се под овим почетним условима не добије задовољавајуће раздвајање, ацетонитрил се може приметити метанолом или тетрахидрофураном, или се може променити колона.

Неке компоненте се не могу раздвојити на ниским рН вредностима јер имају бољу растворљивост и стабилност у средишњој области рН. У тој области, базна једињења (нпр. амини) још увек могу имати позитивно наелектрисање, а површина силика гела може бити негативно наелектрисана. Због тога, што је више силанолних група депротоновано, то је бољи изглед пика. Треба водити рачуна да се рН мобилне фазе разликује за најмање једну рН јединицу од pK_a вредности анализата да би се смањила могућност промене ретенционих времена са променом рН. Најбољи избор за мобилну фазу на рН 7 је фосфатни пуфер, јер је његов пуферски опсег у области рН 6,1 - 8,1. Други избор је ацетатни пуфер (опсег рН 3,8 - 5,8).

Нека базна једињења на ниским или средњим вредностима рН немају довољну ретенцију. За таква једињења раздвајање се врши на високим рН вредностима, јер су у тој области базна једињења у облику слободне базе. Колоне произведене по новим технологијама су заштићене од растварања силика гела, тако да се могу користити и на високим рН вредностима. Зато се као мобилне фазе могу користити органски пуфери, као што је триетиламин.

1.5. Масена спектрометрија

Према дефиницији „основни принцип масене спектрометрије (MS) је стварање јона било из неорганских или органских једињења погодном методом, одвајање насталих јона на основу односа масе и наелектрисања (m/z), њихова квалитативна детекција и квантитативно одређивање на основу заступљености. Анализат се може јонизовати термалним путем, применом електричног поља или сударом са електронима, јонима или фотонима. Јони могу бити једном јонизовани атоми, кластери, молекули или њихови фрагменти или асоцијати. Одвајање јона врши се статичким или динамички деловањем електричног или магнетног поља“. Иако ова дефиниција масене спектрометрије датира од 1968. године када је органска масена спектрометрија била на почетку [281], треба додати и две новине. Прва, поред електрона, јона или фотона, енергетски неутрални атоми и кластери тешких метала се могу користити за ефективну јонизацију анализата.

Друго, одвајање јона по односу m/z , може се извести у области без утицаја електричног или магнетног поља, уколико јони поседују дефинисану кинетичку енергију на уласку у путању лета.

У последњих 20 година комбинација течне хроматографије и масене спектрометрије се развила у широко примењивану и рутински коришћену детекцију у течно хроматографским анализама.

При комбиновању ове две аналитичке технике јављају се три основна проблема:

- Протоци нису компатибилни, јер елуирање са конвенционалне HPLC колоне се обично врши при протоку од 1 mL/min, а тај елуент треба да уђе у подручје високог вакуума које влада у масеном спектрометру.

- Мобилне фазе које се користе у течној хроматографији често нису компатибилне са масеним спектрометром, јер се користе неиспарљиви пуфери.

- Јонизација неиспарљивих и/или термолабилних једињења.

Јонизација је нарочито представљала проблем у самом почетку развоја LC-MS технике, када су се за јонизацију органских једињења користиле само технике удара електрона (electron impact - EI), хемијска јонизација (chemical ionization - CI) и десорпција/јонизација у пољу (field desorption/ionization - FD). FD се не може применити у комбинацији са течном хроматографијом. За јонизације EI и CI, узорак мора бити у гасовитом стању, док је LC-MS посебно значајна за анализу неиспарљивих анализата. У међувремену су развијене технике меке јонизације, као што су бомбардовање брзим електронима (fast-atom bombardment - FAB), термоспреј, електроспреј и MALDI (matrix-assisted laser desorption ionization), чиме је превазиђен проблем јонизације елуента.

При директном увођењу течности (direct liquid introduction interface) небулизација елуента се постиже формирањем млаза на малој дијафрагми и даљом дезинтеграцијом до малих капљица. Небулизација се одиграва у десолватационој комори у којој влада снижени притисак, а која је повезана са CI јонским извором. Десолватација капљица обезбеђује се превођење неиспарљивих и термолабилних једињења из течног у гасовито стање. Хемијска јонизација десолватизованог анализата се постиже коришћењем реверзно-фазних растварача као реактивног гаса. Овај интерфејс је врло брзо замењен другим, пре свега због протока који је ограничен на 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ и због честог запушавања дијафрагме чији је пречник свега 4 μm . Код термоспреј интерфејса млаз паре и малих капљица се формира на излазу загрејане цеви за испаравање. Распршивање се дешава због ширења паре која настаје на зиду цеви приликом испаравања течности. Пре него што започне испаравање у цеви део топлоте се преноси на растварач. Ова топлота касније потпомаже десолватацију капљица у области сниженог притиска. Применом јаких и ефикасних механичких пумпи које се вежу директно на јонски извор, у вакуумски систем масеног детектора се може увести до 2 mL/min воденог растварача. До јонизације анализата долази услед хемијске јонизације помоћу растварача, а затим се дешава процес испаравања јона. Реактивни гас који је потребан за хемијску јонизацију може да се добије коришћењем енергетских електрона из ужареног влакна или електроде, или процесом термојонизације, где се користи испарљиви пуфер који је растворен у елуенту. Иако је термоспреј годинама био највише коришћен, данас је скоро у потпуности замењен другим интерфејсима.

Код интерфејса са константним протоком или динамичким бомбардовањем брзим атомима (continuous-flow or dynamic fast atom bombardment – CF-FAB) мала струја течности, обично 5 – 15 $\mu\text{L}/\text{min}$, која је помешана са одговарајућим FAB матрикс растварачем, протиче кроз узану капилару према фриту од нерђајућег челика или златној FAB плочици. На фрити или плочици успоставља се равнотежа између испаравања растварача и стварања униформног филма течности. Јони се стварају бомбардовањем тог филма течности брзим атомима или јонима. Динамичка природа овог процеса даје динамичком FAB неколико предности над статичким FAB. Обнављање површинског слоја у CF-FAB је динамичнији процес, који није одређен само дифузијом анализата. Због тога је разлика у одговорима хидрофобних и хидрофилних анализата у смеси, која је примећена код статичког FAB, овде знатно мања. Поред тога, позадински сигнал који потиче од јона из матрикса је у великој мери смањен, тако да су побољшани апсолутни лимити детекције. Коришћење CF-FAB је смањено од када су уведени електроспреј интерфејси.

Код интерфејса са зраком честица (particle-beam) елуент се распршује или пнеуматски или термоспреј јонизацијом, у десолвационој комори која је на скоро атмосферском притиску, а која је повезана са моментним сепаратором, у којем се анализи велике молекулске масе преносе у јонски извор масеног детектора, а молекули растварача који имају мање масе се одводе пумпама из сепаратора. Молекули анализата су у јонском извору у облику малих честица и ту се дезинтегришу при судару са загрејаним зидовима извора. Настали гасовити молекули се могу јонизовати у судару са електронима или хемијском реакцијом. Могућност да се добију електроспреј масени спектри је највећа предност овог интерфејса.

Два различита приступа за увођење узорка се користе код уређаја са јонизацијом на атмосферском притиску. Они се првенствено разликују у принципу распршивања и у подручју примене. Код загрејаног распршивача, елуент се пнеуматски распршује у загрејаној цеви, где растварач скоро потпуно испари. Хемијска јонизација под атмосферским притиском (atmospheric pressure chemical ionization – APCI), која започиње електронима из корона игле, се дешава у тој истој области. Затим се ти јони уводе у област високог вакуума, који влада у масеном детектору, у анализатор маса. Код електроспреј интерфејса, елуент се распршује на атмосферском притиску, а као резултат деловања јаког електричног поља ствара се услед разлике потенцијала од 3 kV који влада између узане спреј капиларе и супротно наелектрисане електроде. Растварач који излази из капиларе је у облику млаза који се даље дезинтегрише у мале капљице.

1.5.1. Проблем састава мобилних фаза

За већину једињења масени спектрометар је осетљивији и специфичнији у односу на друге детекторе који се користе у течной хроматографији. Коришћењем масеног детектора могу се анализирати и једињења која немају хромофоре. Такође, могу се идентификовати компоненте које нису хроматографски раздвојене, чиме се умањује потреба за идеалном хроматографијом.

Подаци који се добију са масеног детектора употпуњују податке добијене са других детектора. Два једињења могу имати сличне UV спектре или сличне масене спектре, али је врло ретко да имају слична оба спектра. Два ортогонална сета података су врло корисна за потврду идентитета, као и за квантификацију.

Неки масени спектрометри имају могућност да изводе масену спектрометрију једног узорка у више корака. Могу да снимају масени спектар, да одвоје специфичан јон из тог спектра, фрагментишу јон и генеришу други масени спектар; тај циклус се може понављати много пута. Такви спектрометри могу да врше разлагање молекула део по део, док се не утврди његова структура.

Масени спектрометри раде на принципу јонизације молекула, а затим се јони разврставају и идентификују према односу масе и наелектрисања (m/z). Два кључна дела масеног спектрометра су јонски извор, где настају јони и анализатор маса, који разврстава јоне. Неколико различитих типова јонских извора се користи у LC-MS анализи. Сваки од њих је погодан за различите класе једињења. Такође се користи неколико врста анализатора маса. Сваки од њих има своје предности и мане, у зависности од тога која је врста информација потребна.

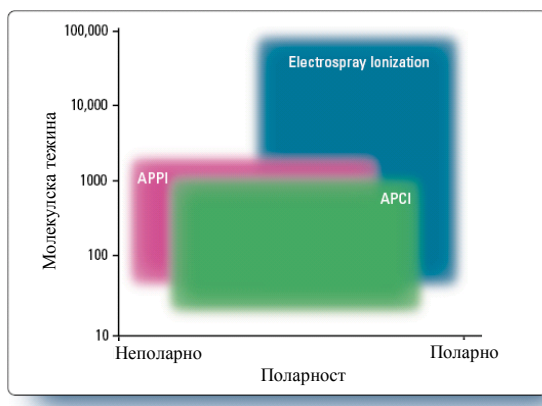
1.5.2. Јонски извори

Највећи напредак у развоју LC-MS последњих година је постигнут у развоју јонских извора и техника којима се јонизују молекули анализата и добијени јони раздвајају од мобилне фазе.

Ранији LC-MS системи су имали јонске изворе који нису могли да раздвоје молекуле мобилне фазе од молекула анализата (директни течни улаз, термоспреј) или су то радили пре јонизације (зрак честица). Молекули анализата су били јонизовани у масеном спектрометру у вакууму, често традиционалном јонизацијом, електронима. Увођењем техника јонизације под атмосферским притиском, знатно је проширило број једињења која се могу анализирати LC-MS. Код оваквог начина јонизације, молекули анализата се најпре јонизују на атмосферском притиску, а затим се ти јони механички или електростатички одвајају од неутралног молекула. Уобичајене технике јонизације под атмосферским притиском су:

- Електроспреј јонизација (EI)
- Хемијска јонизација под атмосферским притиском (APCI)
- Фотојонизација под атмосферским притиском (APPI)

Примена различитих типова јонизације под атмосферским притиском приказана је на Слици 42.

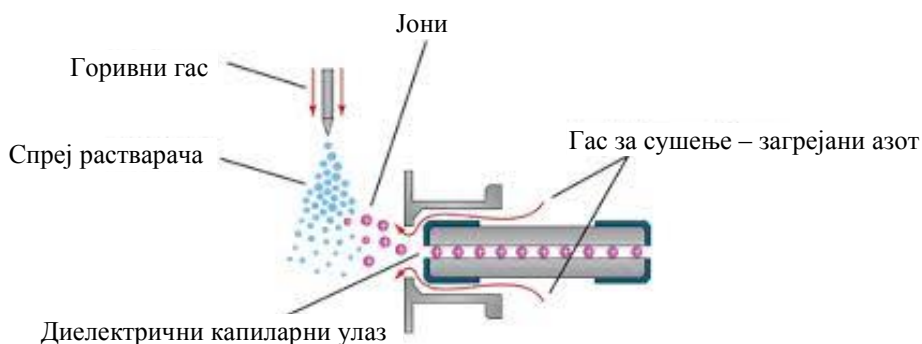


Слика 42. Различити типови јонизације под атмосферским притиском

1.5.3. Електроспреј јонизација

Код електроспреј јонизације (Слика 43) јони анализата се генеришу у раствору пре него што анализат доспе у масени спектрометар. Елуент из течног хроматографа се распршује у комору на атмосферском притиску у присуству јаког електростатичког поља и загрејаног гаса за сушење. У електростатичком пољу долази до даље дисоцијације молекула анализата, а загрејани гас за сушење доводи до испаравања растварача из капљица. Како се капљице смањују, тако расте концентрација наелектрисања у њима. На крају, одбојна сила између јона са истим наелектрисањем премашује кохезионе силе и јони бивају избачени у гасну фазу. Ти јони бивају привучени због електростатичког привлачења електростатичких огледала и пролазе кроз капилару у анализатор маса. У гасној фази се могу десити и неке друге реакције, углавном трансфер протона и размена наелектрисања, и то у тренутку када су јони избачени из капљица, а пре него што дођу до анализатора маса.

Велики молекули често имају више од једног наелектрисања. Захваљујући вишеструком наелектрисавању, електроспреј се може користити и за анализу великих молекула (до 150000 u), иако је опсег маса за типичне LC-MS инструменте око 3000 m/z . Да би се тачно одредила молекулска маса вишеструко наелектрисаних великих молекула, често се користи математички процес који се назива деконволуција.



Слика 43. Електроспреј

1.5.4. Хемија јонизације

Пошто је формирање јона анализата од пресудне важности за добијање добрих резултата, посебна пажња се мора посветити припреми мобилне фазе. Зато је за електроспреј важно:

- Да се изабери испарљиви пуфери да би се избегло нагомилавање соли у јонском извору,
- Подешавање рН раствора према поларности жељених јона,
- Коришћење растварача који имају мале топлоте испаравања и мале површинске напоне да би се побољшала десорпција јона,
- Обезбедити да реакције у гасној фази не доведу до неутрализације јона.

Ако подешена рН вредност не одговара хроматографији, треба модификовати растварач после колоне. На тај начин се може побољшати MS одговор без угрожавања хроматографије.

Припрема мобилне фазе је мање критична за рад АРСИ, јер се јонизација ту дешава у гасној, а не течној фази. Ипак избор растварача може имати значајан ефекат на одговор анализата. Зато је овде важно:

- Изабрати испарљиве раствараче,
- Изабрати раствараче који се теже јонизују од анализата,
- За позитивну јонизацију изабрати протичне раствараче који су бољи од непротичних,
- За негативну јонизацију изабрати раствараче који имају велики афинитет за електроне,
- Избегавати соли амонијака у мобилној фази, јер могу довести до формирања адуката,
- Температура испаривача такође мора да се подеси тако да испари растварач, али да не изазове термалну деградацију молекула анализата.

1.5.5. Анализатори маса

Иако се теоретски сви типови анализатора маса могу користити за LC-MS, најчешће се користе следећи:

- Квадрупол,
- Време прелета (Time of flight),
- Јонска замка (Ion trap),
- Циклотрон резонанција Fourier-трансформисаних јона (СТ-ICR или FT-MS).

1.5.5.1. Квадрупол

Овај анализатор маса састоји се од четири паралелне шипке које су поређане у облику квадрата. Јони анализата су усмерени у центар квадрата. Напон који се примењује на шипке ствара електромагнетно поље. Ово поље одређује однос масе и наелектрисања јона који могу да прођу кроз филтер у датом тренутку. Квадруполи су најједноставнији и најјефтинији анализатори.

Квадруполи могу да раде на два начна:

- Скенирање (scan mode),
- Мониторинг изабраног јона (selected ion monitoring – SIM).

Код скенирања, прате се сви јони у одређеном опсегу масе и наелектрисања. Код SIM начина, анализира се само неколико јона са изабраним односом масе и наелектрисања. SIM начин рада је много осетљивији од скенирања, али даје информације о малом броју јона. Користи се за праћење и квантификацију тачно одређеног једињења. Скенирање се користи за квалитативне анализе, или за квантификацију, када су масе анализата унапред познате.

Изглед квадрупола је дат на Слици 44.

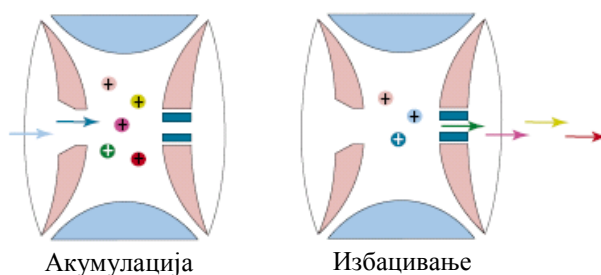


Слика 44. Квадрупол

1.5.5.2. Јонска замка

Овај анализатор се састоји од електроде у облику кружног прстена и две електроде – улазне и излазне, што заједно чини комору. Јони који уђу у комору бивају задржани електромагнетним пољем. Поље другачије јачине се може применити да би се јони селективно избацивали из коморе.

Предност јонске замке је у томе што се може изводити вишефазна масена спектрометрија, без додатних анализатора. Изглед јонске замке је дат на Слици 45.



Слика 45. Јонска замка

Технике јонизације под атмосферским притиском су релативно меке технике јонизације. Код меких јонизација обично настају:

- Молекулски јони M^+ или M^+ ,
- Протоновани молекули $[M+H]^+$,
- Једноставни адукти јона $[M + Na]^+$,
- Јони настали губитком неког дела молекула нпр. губитком воде $[M+H - H_2O]^+$.

Информација која се добија је молекулска маса, али су често потребне и додатне структурне информације. Да би се те информације добиле, јони анализата се фрагментисају у сударима са неутралним молекулима у процесу који се назива дисоцијација изазвана сударом (collision induced dissociation – CID). Додатни напон се примењује на јоне анализата да би им се додала енергија за сударе и да би се фрагментисали.

CID се примењује и код обичне масене спектрометрије и код тандем масене спектрометрије. У првом случају, CID се дешава у јонском извору. Јони анализата се убрзавају и сударају са неутралним молекулима и дају фрагменте. Овај начин је прилично једноставан и релативно јефтин. Недостатак је што се фрагментисају сви присутни јони, јер не постоји начин да се изаберу одређени јони. Добијени спектри зато поред пикова анализата од интереса, садрже и пикове од позадинских јона.

Код тандем масене спектрометрије CID се дешава између појединачних анализатора. Тако нпр. код троструког квадрупол први квадрупол служи да се изабере јон који ће се фрагментисати. CID се дешава у следећем квадруполу који се назива колизиона ћелија. Трећи квадрупол тада даје спектар јона насталих фрагментацијом.

Модерни LC-MS системи могу да издрже протоке до 2 mL/min. Са малим модификацијама, исти инструменти могу да дају одличне резултате и са микролитарским или нанолитарским протоцима. Јонски извори са ортогоналним распршивачима боље подносе неиспарљиве пуфере.

Измене LC метода које захтевају модерни LC-MS системи обично обухватају измене у припреми узорка:

- Подешавање одговарајућих концентрација анализата,
- Избор одговарајућих растварача и пуфера да би се обезбедила максимална јонизација,
- Смањивање присуства других једињења која могу да јонизују или могу да врше супресију сигнала реакцијама у гасној фази.

1.6. Утицај матричног ефекта на одређивање анализата применом MS

Високо осетљива тандемска масена спектрометрија, са успешним одвајањем маса, доводи до малог утицаја интерференција, чак иако је њихово присуство велико, које су се истовремено екстраховале и елуирале са испитиваним једињењима.

Како HPLC-ESI-MS/MS техника има карактеристике високе селективности, осетљивости, није изненађујуће што се ова техника све чешће користи у клиничким

лабораторијама. Једини проблем који се мора разматрати приликом развоја методе, валидације и рутинске употребе, је матрични ефекат. Матрични ефекат је измена јонизације у присуству супстанци које су се заједно елуирале.

Матрични ефекат се јавља када се молекули коелуирају са једињењем од интереса, при чему врше промену јонизационе ефикасности електроспреј извора. Овај феномен први су описали Kebarle и Tang [282] и показали да се одговор електроспреја органских база смањује када концентрација осталих органских база расте. Тачан механизам матричног ефекта је непознат, али вероватно потиче од конкуренције између анализата и коелуираних, недетектованих анализата матрикса.

King са сарадницима [283] је показао, преко серије експеримената, да је матрични ефекат резултат конкуренције између испарљивих компоненти матрикса и јона анализата за долазак на површину капљице која се преноси у гасну фазу. У зависности од средине у којој се јонизација и испаравање врши, ова конкуренција може смањити (позната као *suppression*) или повећати (*ion enhancement*) ефикасност формирања жељеног јона анализата пристуног у истој концентрацији на интерфејсу. Ефикасност формирања јона анализата веома зависи од уношења матрикса у извор електроспреј јонизације.

Матрични ефекат такође зависи од једињења која се анализирају. Vonfiglio са сарадницима [284] је навео да хемијска природа једињења има значајан утицај на степен матричног ефекта. Они су проучавали четири једињења различите поларности под истом условима. За најполарније једињење је нађено да има највеће смањење јонизације, а за најнеполарније има мали утицај.

Утицај матричног ефекта на поузданост HPLC-ESI-MS/MS у погледу прецизности и тачности [285], осетљивости и лимита квантификације методе може неповољно утицати на одређивање анализата [286]. На основу тога приликом развоја поуздане HPLC-ESI-MS/MS методе, треба изводити експерименте који разјашњавају утицај матричног ефекта на одређивање анализата.

Две главне технике које се користе за одређивање матричног ефекта приликом HPLC-ESI-MS/MS анализе су постекстракциони додаток супстанце или постколонска инфузија. Техника постекстракционог додатка захтева екстракте узорка са анализатом од интереса, додатог после екстракције и упоређивање са стандардним растворима припремљених у мобилној фази која садржи еквивалентну количину анализата од интереса [287 – 291]. Разлика у одговору између постекстрахованог узорка и стандардног раствора подељена са одговором стандардног раствора даје степен матричног ефекта који се јавља приликом одређивања анализата у испитиваном раствору, под одређеним хроматографским условима.

Техника постекстракционог додатка се сматра статичном техником која даје само информације о матричном ефекту на анализат од интереса. Динамичнија техника за утврђивање матричног ефекта је постколонска инфузија [292]. Пумпа се користи за испоруку константног протока анализата у HPLC систем, у тренутку после хроматографске колоне, а пре масеног извора јонизације. Узорак екстракта (без додатог анализата) се убризгава под жељеним хроматографским условима. Постинфузиона техника омогућава одређивање утицаја матрикса на одговор анализата током целог

времена хроматографисања. Резултати постколонске инфузије омогућавају да се процени утицај матричног ефекта на одређивање анализата изолованог из узорка различитим техникама.

Да би се добила робусна HPLC-ESI-MS/MS метода, потребно је да се уклони или минимизира матрични ефекат (присуство коелуираних супстанци). Утицај матрикса на одређивање испитиваних компоненти мора бити узет у обзир. До сметњи може доћи од узорка који се убризгава, или нагомилавања и преоптерећења аналитичке колоне [293]. Два приступа су могућа да би се уклонили или минимизирали ефекти матрикса. То су модификација методологије екстракције узорка и побољшано хроматографско одвајање [294]. Ова два параметра су међусобно повезана у развоју квантитативне HPLC-ESI-MS/MS методе.

1.7. UV/Vis спектрофотометријске методе

Апсорпциона спектрофотометрија је метода спектралне анализе заснована на физичком феномену апсорпције светлости. Апсорпција светлости је процес у којем нека хемијска врста у транспарентној средини смањује интензитет електромагнетног зрачења које кроз ту средину пролази.

Зависност апсорбанције од таласне дужине упадног зрачења представља апсорпциони спектар. Апсорпциони спектар даје информације о квалитативном и квантитативном саставу апсорбујуће супстанце.

Зависност интензитета пропуштене светлости од концентрације раствора дата је Lambert-Beer-овим законом апсорпције:

$$I_p = I_0 \times 10^{-\epsilon bc} \quad (37)$$

односно,

$$A = -\log T = \log \frac{I_0}{I_p} = \epsilon \times b \times c \quad (38)$$

где је A апсорбанција, I_p интензитет пропуштеног зрачења, а I_0 интензитет упадног зрачења, b дебљина апсорпционог слоја, c моларна концентрација, ϵ моларни апсорпциони коефицијент који не зависи од концентрације, већ је функција таласне дужине и природе супстанце.

Квантитативна анализа се заснива на Lambert-Beer-овом закону. Како је код спекрофотометара b једнако дебљини кивете и константно, то апсорбанција зависи само од концентрације и моларног коефицијента апсорптивности. За квантитативну анализу је битно да се читавање апсорбанције врши са највећом могућом тачношћу и осетљивошћу. Да би се то постигло битан је избор таласне дужине на којој се врши мерење. Она мора да испуни неколико услова:

1. да се мерењем постиже максимална осетљивост,
2. да мала промена таласне дужине не утиче на репродуктивност,
3. да важи Lambert-Beer-ов закон апсорпције.

На основу ових захтева, а у зависности од услова, читавање апсорбанције се врши:

- a) на таласној дужини максималне апсорпције, λ_{\max} , ако у посматраној области спектра апсорбује само анализирана супстанца, јер је онда осетљивост мерења највећа. Да би се постигла добра репродуктивност потребно је да λ_{\max} лежи на равни максимума у апсорпционом спектру. Код оштрих, уских максимума, мала промена у таласној дужини доводи до грешке и погоршава репродуктивност одређивања.
- b) на таласној дужини оптималне апсорпције, λ_{opt} , ако у испитиваној области поред анализираних супстанци апсорбује и нека компонента или додати реагенс, и представља таласну дужину где је највећа разлика у апсорбанцији апсорбујућих супстанци.
- c) на таласној дужини изобестичке тачке, λ_{izob} , ако испитивана супстанца постоји у раствору у два облика који имају различите максимуме апсорпције и представља таласну дужину на којој оба равнотежна облика имају исту апсорбанцију.

Уколико је познат број анализата у смеши и ако сви апсорбују светлост у UV/Vis области спектра могу се квантификовати користећи спектрофотометријску мултикомпоненту анализу.

Код мултикомпонентне анализе, вредност апсорбанције при одређеној таласној дужини, једнака је збиру апсорбанције свих компоненти на тој таласној дужини, што се може представити једначином:

$$A_1 = K_{11}C_1 + K_{12}C_2 + \dots + K_{1n}C_n \quad (39)$$

где је A апсорбанција на таласној дужини, K константа у коју улазе моларни апсорптивитет и ширина кивете и C концентрација.

Уколико се мери апсорбанција на i таласних дужина, n компонената може се написати следећи систем једначина:

$$\begin{aligned} A_1 &= K_{11}C_1 + K_{12}C_2 + \dots + K_{1n}C_n \\ A_2 &= K_{21}C_1 + K_{22}C_2 + \dots + K_{2n}C_n \\ &\vdots \\ &\vdots \\ &\vdots \\ A_i &= K_{i1}C_1 + K_{i2}C_2 + \dots + K_{in}C_n \end{aligned} \quad (40)$$

или у облику матрице:

$$\begin{bmatrix} A_1 \\ A_2 \\ \vdots \\ A_i \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} K_{11} & K_{12} & \dots & K_{1n} \\ K_{21} & K_{22} & \dots & K_{2n} \\ \vdots & \vdots & \dots & \vdots \\ K_{i1} & K_{i2} & \dots & K_{in} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} C_1 \\ C_2 \\ \vdots \\ C_n \end{bmatrix} \quad (41)$$

или у облику:

$$A = K C \quad (42)$$

где A , K и C представљају матрице апсорбација, коефицијената и концентрације.

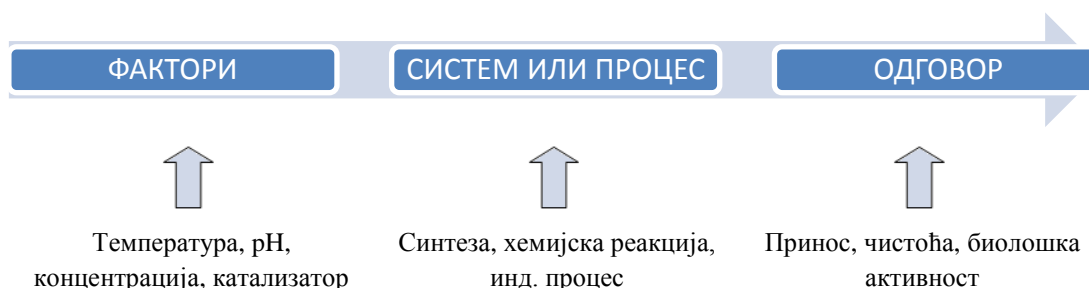
Након одређивања коефицијента матрице, непознате концентрације појединачних једињења се израчунавају из измерене апсорбације и инверзне матрице (K^{-1}).

$$C_n = A_i K^{-1} \quad (43)$$

1.8. Оптимизација инструменталних метода

1.8.1. Експериментални дизајн

Већина експеримената обухвата више фактора (независних променљивих) и изводи се или у циљу оптимизације процеса, или ради испитивања повезаности фактора и карактеристика самог процеса (Слика 46) [295].



Слика 46. Повезаност фактора и карактеристика процеса

Основна идеја се састоји у томе да се обави мали број експеримената у којима се сви релевантни фактори мењају систематски. Обично није потребно извршити више од 10-20 експеримената. Статистичка анализа експерименталних резултата треба да омогући успостављање оптималних услова, идентификацију фактора који имају највећи утицај на резултате и оних који немају, постојање интеракција и синергизма између фактора [295].

Експериментални дизајн почиње јасном формулацијом проблема који треба да да одговор на питање шта је сврха и циљ истраживања, који фактори утичу на посматрани процес и колики је распон њихове промене, као и на који начин треба извршити експеримент. У другом ступњу врши се скрининг фактора, при чему се утврђује који су фактори релевантни, а који нису.

1.8.2. Класични експериментални дизајн

Као основни пример примене експерименталног дизајна, претпоставља се да је могуће идентификовати само две вредности, или нивоа, сваког од улазних фактора. Не постоји универзални рецепт за то како поставити те нивое, али требало би их подесити да буду по природи “супротни”, али не толико да то буде неприродно. Ако има k улазних фактора, онда постоји 2^k различитих комбинација улазних фактора, од којих сваки дефинише различиту конфигурацију модела; то се зове 2^k факторски дизајн. Обележавајући два нивоа сваког фактора као “-” и “+” ниво, може се формирати матрица дизајна која тачно описује шта је свака од 2^k различите конфигурације модела, изражена у нивоима својих улазних фактора. На пример, ако постоји $k = 3$ фактора,

било би $2^3 = 8$ конфигурација, а матрица дизајна би била као што је приказано у Табели 20, где R_i означава одзив из i -те конфигурације.

Табела 20. Матрица дизајна за 2^3 факторијални експеримент

Пролаз (i)	Фактор 1	Фактор 2	Фактор 3	Одзив
1	-	-	-	R_1
2	+	-	-	R_2
3	-	+	-	R_3
4	+	+	-	R_4
5	-	-	+	R_5
6	+	-	+	R_6
7	-	+	+	R_7
8	+	+	+	R_8

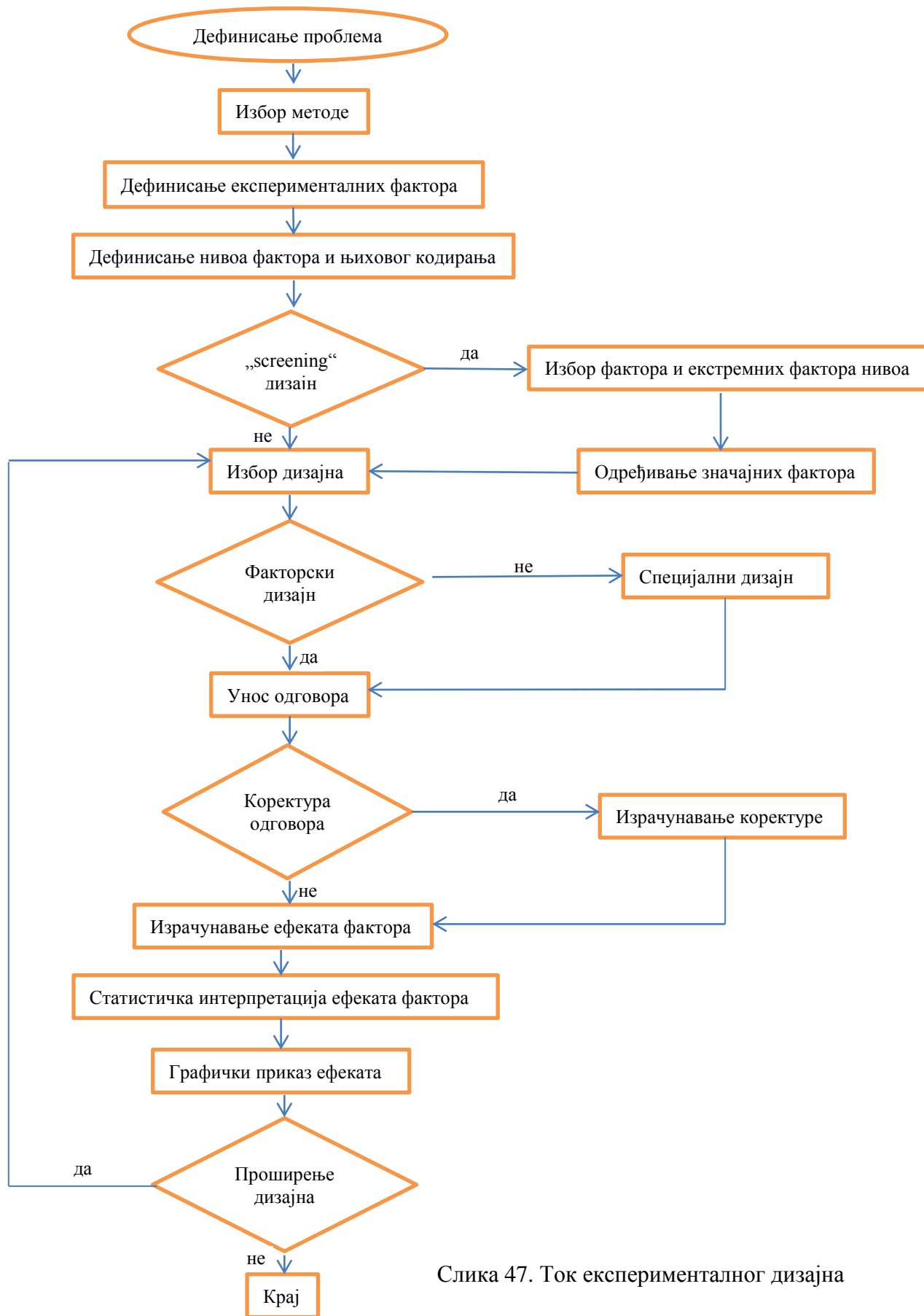
Поред тога, може се испитивати да ли би ефекат једног фактора на неки начин могао да зависи од нивоа једног или више других фактора, што се назива интеракцијом између фактора. Ако постоји интеракција између два фактора, онда главни ефекат тих фактора не може да се интерпретира изоловано.

Друга тешкоћа са потпуним факторијалним дизајном је то што ако број фактора постане чак и умерено велики, број експеримената је огроман (експоненцијално расте са бројем фактора). Начин да се ово заобиђе је да се користи фракционално - факторијални дизајн, где се извршава само мали део свих могућих комбинација фактора. Међутим, мора се водити рачуна о пажљивом избору подскупа експеримената. Лоша страна извршавања само дела експеримената је што није могуће проценити неке од могућих интеракција, јер што је мањи број пролаза, мањи је и број интеракција које се могу проценити [295].

У раним фазама извођења експеримената битно је идентификовати који фактори су важни, а који нису. Безначајне факторе треба фиксирати на неке разумне вредности и изоставити их из разматрања, а даље истраживање се може извршити са значајним факторима.

У најширој примени су потпуни факторски, фракционо факторски, Plackett-Burman-ов, Taguchi-јев, Vox-Behnken-ов дизајн који се називају још скрининг дизајни на два нивоа. Ако се пође од чињенице да одабрани дизајн мора да задовољи услов статистичке интерпретације ефеката фактора на експериментални одговор, онда одабрани дизајн није увек онај са најмањим бројем експеримената, због тога што се одређени број степени слободе мора проценити да би се израчунала вредност експерименталних грешка (извори варијабилности). Наведени дизајни дозвољавају само интерпретацију главних ефеката фактора, док су факторске интеракције укључене у главни ефекат. Најчешће се користи Plackett-Burman-ов дизајн у којем могу да се процене интеракције два фактора у скрининг дизајну [296]. Осим експеримената предвиђених дизајном изводи се више поновљених мерења при номиналном нивоу. Ови реплицирани номинални експерименти служе за контролу одговора уколико се одговори на номиналном нивоу мењају током времена. Уколико је то случај, одговори

експерименталног дизајна морају се кориговати. У скрининг дизајну експерименти се најчешће изводе у случајној секвенци. Међутим, понекад се експерименти изводе тако што се групишу према вредностима одређеног фактора тј. прво се изведу сви експерименти при једном нивоу одређеног фактора, затим при другом нивоу тог фактора, итд. Овакво извођење експеримената представља сортирано извођење или извођење у блоковима. Унутар блока експерименти се изводе у случајном распореду. Ово је груписање по факторима, оно није повезано са груписањем у односу на екстерне факторе који се не тестирају у дизајну, на пример, када се експерименти изводе током више дана. На основу изведених експеримената дефинише се одговор дизајна тј. експериментални резултат. Одговори могу бити квантитативни, као што је на пример количина анализата, површина пика, висина пика у хроматографским методама. Експериментални одговори могу бити квалитативни и у хроматографији они описују квалитет раздвајања или анализе: резолуција, релативна ретенција, ретенциони фактор и фактор асиметрије. Треба напоменути да се у статистичком дизајну квантитативни и квалитативни фактори другачије дефинишу. Квантитативни фактори су они који се у одређеним границама могу мењати континуално и то су сви горе поменути фактори. Квалитативни фактори могу имати само дискретне нивое и то су, на пример, произвођач колоне или стационарне фазе и слично. Општа шема експерименталног дизајна у хроматографији дата је на Слици 47 [297].



Слика 47. Ток експерименталног дизајна

1.8.3. Израчунавање ефекта

Ефекти фактора на одзив експеримента се израчунавају из измерених одговора. Када се фактори испитују на два нивоа за сваки фактор одговарајући ефекат се израчунава по једначини:

$$E_X = \frac{\sum Y(+1)}{N/2} - \frac{\sum Y(-1)}{N/2} \quad (44)$$

где X представља факторе, интеракције фактора или празну вредност у Plackett-Virmanовом дизајну. E_X је ефекат X на одговор Y ; $\sum Y(+1)$ и $\sum Y(-1)$ су суме одговора где је фактор X на нивоу $+1$ и -1 , а N је број експеримената у дизајну.

Средња вредност квадрата сваке варијабле се рачуна према формули:

$$V_{xi} = \frac{(\sum Y(+1) - \sum Y(-1))^2}{N} \quad (45)$$

Експериментална грешка мерења се рачуна као однос средње вредности квадрата и броја споредних фактора по формули:

$$R = \frac{\sum V_{xd}}{n} \quad (46)$$

Фактори који показују велики утицај се проналазе коришћењем F-теста.

$$F_{test} = \frac{V_{xi}}{R} \quad (47)$$

где је R експериментална грешка, V_{xd} средња вредност квадрата споредних фактора, V_{xi} средња вредност квадрата фактора и n број споредних фактора.

Критични ефекат F_{tab} се израчунава при нивоу сигнификантности 0,05 и 0,01.

1.8.4. Оптимизациони дизајни

За одређивање површина одговора (response surface) користи се оптимизациони дизајни користе се потпуни или делимични факторски дизајн, централно композитни, Вох-Већке-ов дизајн, Doehlert-ов и дизајн смеше.

Потпуни или делимични факторски дизајни најчешће се користе као скрининг дизајни. Међутим, они се могу користити и као први корак у мултиваријантном испитивању, где је површина одговора линеарна. У двофакторском случају површина одговора дата је линеарним моделом.

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_{12}X_1 \times X_2 \quad (48)$$

Ако је интеракциони члан мали, површина одговора је планарна; што је већи интеракциони члан површина одговора је све више извијена. Ако линеарни модел није довољан за адекватно представљање експерименталних података онда се мора извести више експеримената него што предвиђа факторски дизајн. У том случају се користи централно композитни дизајн да би се дефинисала квадратна површина.

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_{11}X_{12} + b_{22}X_{22} + b_{12}X_1 \times X_2 \quad (49)$$

Површина одговора се користи за предвиђање оних нивоа фактора који дају максимални или минимални одговор.

Box-Benkhet-ов и Doehler-тов дизајн такође се користе за добијање површине одговора и оптимизацију хроматографских фактора као што су температура, карактеристике колоне и проток.

Дизајн смеше се користи за оптимизовање састава мобилне фазе. Овај дизајн оптимизује укупну количину материјала коришћеног у експерименту.

Мултиваријантна оптимизација хроматографског система врши се према следећој преоцедури:

- а) изабрати статистички дизајн за испитивање експерименталне области фактора
- б) извести експеримент случајним хронолошким редом
- в) извршити анализу варијансе (ANOVA) регресионих резултата тако да се потврди адекватност модела без појаве значајне вредности “*lack of fit*” [298].

1.8.5. Факторски и централно композитни дизајн

Централно композитни дизајн (CCD) комбинује потпуни и делимични факторски дизајн са два нивоа са додатним аксијалним или звездасто постављеним тачкама и барем једном тачком у центру дизајна. Овај дизајн дозвољава израчунавање и линеарног и квадратног модела. CCD за k фактора (X_1, \dots, X_k) састоји се из три дела.

- 1) факторски или кубни дизајн који садржи n_{fact} тачака са координатама $X_i = -1$ или $X_i = +1$ за $i = 1, \dots, k$,
- 2) аксијални или звезда део који се формира од $n_{\text{ax}} = 2k$ тачака чије су све координате једнаке нули осим једне која је једнака α (или $-\alpha$),
- 3) укупно n_c тачака које се формирају у центру дизајна и где су све координате једнаке нули.

Кодирање вредности фактора врши се по следећој формули:

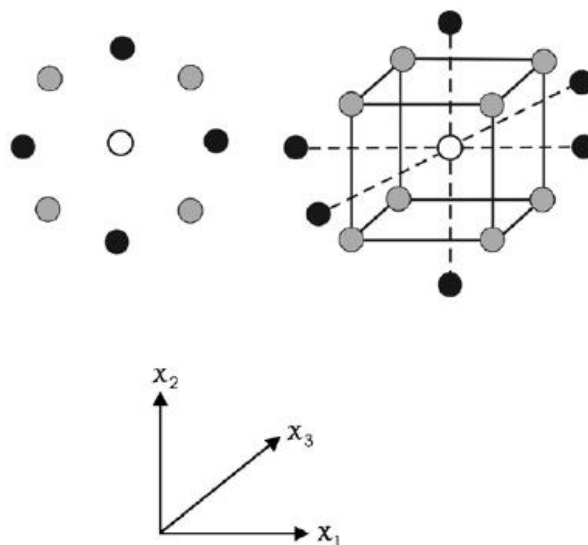
$$X_{\text{кодирано}} = \frac{X_{\text{измерено}} - \frac{X_{\text{измерено,max}} - X_{\text{измерено,min}}}{2}}{\frac{X_{\text{измерено,max}} - X_{\text{измерено,min}}}{2}} \quad (50)$$

Кодирање измерених вредности тј. превођење реалних вредности у кодне, омогућава ефикасније рачунање са матрицама дизајна.

За CCD се мора знати колико се кубних тачака користи и која је вредност за α и колико ће се експеримената извести у централној тачки. Дизајн је представљен у Табели 21 и на Слици 48.

Табела 21. Нивои кодираних вредности за централно композитни дизајн за двофакторске и трофакторске системе.

Два фактора		Три фактора		
x_1	x_2	x_1	x_2	x_3
-1	-1	-1	-1	-1
1	-1	1	-1	-1
-1	1	-1	1	-1
1	1	1	1	-1
0	0	-1	-1	1
0	0	1	1	1
0	0	-1	1	1
-1,414	0	1	1	1
1,414	0	0	0	0
0	-1,414	0	0	0
0	1,414	0	0	0
		-1,683	0	0
		1,683	0	0
		0	-1,683	0
		0	1,683	0
		0	0	-1,683
		0	0	1,683



Слика 48. Централни композитни дизајн за два и три фактора. Сиви кругови образују коцку - број ранова 22 и 23. Црни кругови образују облик звезде

Двофакторски CCD (лево у Табели 21) састоји се из четири експеримента који чине кубни део, три поновљена експеримента у централној тачки и четири експеримента у дизајну звезде.

Трофакторски експеримент има 8 кубних тачака, 4 централне и 6 аксијалних тачака са $\alpha = 1,683$.

Укупан број тачака у CCD је $22 + 2 \times k + c_0$, где је c_0 број централних тачака. Потпуни квадратни модел за k фактора садржи $((k+1) \times (k+2))/2$ параметара, што за двофакторски модел даје 6 фактора. Вредност α обично се креће од 1 до \sqrt{k} . Када је α једнак \sqrt{k} и кубне и аксијалне тачке се налазе на површини сфере, па се дизајн назива сферични. То је случај са двофакторским дизајном у Табели 19, где се све периферне тачке налазе на кружници. Ако је α једнак 1, тачке се налазе у центру стране површи кубног дела дизајна. Да би се одредила вредност α , Вох-Hunter су предложили да се користи тзв. концепт ротабилности као критеријум за избор вредности α .

1.9. Валидација модела (анализа варијанси, ANOVA)

Метода за упоређивање средњих вредности више популација врши се анализом варијанси познатој као ANOVA. Ова метода користи један тест како би се одредило да ли постоји или не, разлика између средњих вредности популација. Уколико ANOVA покаже постојање разлике, користи се процедура вишеструког упоређивања како би се идентификовала популација која се разликује од осталих [299].

Тестира се нулта хипотеза да су средње вредности популација једнаке, што се може представити у облику:

$$H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \dots = \mu_l \quad (51)$$

као и алтернативна хипотеза H_a , код које је потребно да се макар две средње вредности разликују.

Осим познавања средњих вредности свих популација и њихових варијанси, потребно је знати и укупну средњу вредност за цео низ мерења, која се може израчунати по формули:

$$\bar{x} = \left(\frac{N_1}{N}\right) \bar{x}_1 + \left(\frac{N_2}{N}\right) \bar{x}_2 + \left(\frac{N_3}{N}\right) \bar{x}_3 + \dots + \left(\frac{N_l}{N}\right) \bar{x}_l \quad (52)$$

где је N_1 број мерења у групи 1, N_2 број мерења у групи 2 и тако даље.

Да би се утврдила истинитост нулте хипотезе израчуната вредност за F тест се упоређује са табличном при одређеном степену сигнификантности, а нулта хипотеза се одбацује ако је израчуната вредност F теста већа од критичне (табличне) вредности.

ANOVA табела за валидацију модела иста је за све експерименталне дизајне и представљена је у Табели 22.

Табела 22. Анализа варијанси за најмање квадрате линеарног модела са параметрима

Извор варијација	Сума квадрата	Број степени слободе	Средњи квадрати
Регресија	$SS_R = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_i - \bar{y})^2$	$p - 1$	$MS_R = \frac{SS_R}{p - 1}$
Резидуал	$SS_r = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_{ij} - y_i)^2$	$n - p$	$MS_r = \frac{SS_r}{n - p}$
Lack of fit	$SS_{lof} = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_i - \bar{y})^2$	$m - p$	$MS_{lof} = \frac{SS_{lof}}{m - p}$
Pure error	$SS_{pe} = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_{ij} - y_i)^2$	$n - m$	$MS_{pe} = \frac{SS_{pe}}{n - m}$
Укупно	$SS_T = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \bar{y})^2$	$n - 1$	

Укупна варијанса дели се на два главна доприноса, варијансу која потиче од грешке модела тј. варијансу објашњену регресијом SS_R и варијансу која потиче од резидуала експеримента тј. варијансу од суме квадрата резидуала SS_r . Обе суме се израчунавају преко свих нивоа експерименталног дизајна и свих репликација извршених на тим нивоима. Ако је број коефицијената у моделу p , онда је SS_R сума квадрата разлика вредности одговора предвиђених регресионим моделом и укупне средње вредности свих одговора и има $p - 1$ степени слободе. SS_r је сума квадрата резидуала, који представљају разлику између одговора добијеног експериментом и одговора предвиђеног моделом. Ова сума има $n - p$ степени слободе, где је n укупан број експерименталних тачака. Ако модел тачно описује експерименталне податке онда је SS_R велико, а SS_r мало. Сума ове две величине је SS_T , укупна сума квадрата разлика између експерименталних података и укупне средње вредности свих одговора. Однос SS_R/SS_T представља објашњену варијансу и означава се са R^2 где је R коефицијент корелације. Квалитет модела одређује се на основу вредности SS_r . Ова вредност представља се у облику два сабирка: *lack of fit*, SS_{lof} и *pure error*, SS_{pe} . *Pure error* је сума квадрата разлике појединачне експерименталне вредности и средње вредности на истом факторском нивоу. Док је *lack of fit* једнака суми квадрата између предвиђене вредности и средње експерименталне вредности на истом факторском нивоу. Модел се тестира на следећи начин: F -тест, $F = SS_{lof}/SS_{pe}$, се пореди са табличном вредношћу за $n - p$ и $n - m$ степена слободе при нивоу поверења 95%. Ако је F_{calc} веће од F_{table} модел се одбацује, у супротном модел је прихваћен. Сигнификантност регресије се одређује поређењем F дистрибуције, $F = SS_R/SS_r$ са табличном за $p - 1$ и $n - p$ степена слободе. Регресија је сигнификантна ако је F_{calc} веће од F_{table} .

1.10. Компјутерска симулација коришћењем програма Dry Lab[®] и LC-Simulator

Код HPLC одређивања параметри који се најчешће оптимизују су: састав и рН мобилне фазе, концентрација органског модификатора у мобилној фази, брзина протока мобилне фазе и други. Истовремена оптимизација овако великог броја параметара захтева рачунски оријентисан, хеометријски поступак како би се поједноставио. Термодинамички приступ је реализован у облику рачунарског програма DryLab, који је првобитно био развијен од стране фирме LC Resources и њиховог истраживачког тима J. Dolan, J.R. Snyder, Cs. Horvath. Касније је програм битно дограђен, и додате су две нове функције „Chrom Merge“ и „Peak Tracking“, а дистрибуцију и развој даље је наставио Молнаров институт у Берлину, под руководством Imre Molnar-а [300 – 302].

Приликом употребе програма DryLab за оптимизацију неопходни су пробни хроматограми. Најчешће се полази од градијентног елуирања, али постоји могућност да се калибрација програма изврши и преко изократског начина рада. Улазни подаци за DryLab се могу поделити у три групе: а) подаци о колони, б) подаци о мобилној фази и ц) хроматографски подаци.

Подаци о колони обухватају: дужину колоне, унутрашњи пречник колоне, величину честица, притисак на колони, температуру и тип колоне. Програм израчунава број теоријских подова колоне. За оба начина елуирања (изократски и градијентни), у програм је потребно да се унесе податак о мртвој запремини (dwell volume).

Подаци о мобилној фази обухватају: састав растварача А (водени део мобилне фазе), састав растварача В (органски део фазе), концентрацију пуфера и концентрацију модификатора воденог дела мобилне фазе. У градијентном моду потребно је задати време и нагиб градијента.

Хроматографски подаци се уносе за сваки пик и обухватају: ретенционо време, површину и ширину пика. Уношење ових података у сложенијим случајевима захтева идентификацију пикова хроматограма. Идентификацију пикова DryLab може да ради аутоматски укључивањем опције „Peak Tracking“. Са улазним пробним хроматограмима програм израчунава критичну резолуцију R_s , као функцију једног или два хроматографска параметра за сваки пар пикова. Графички, представљањем критичне мапе резолуције у функцији једног или два параметра, добија се мапа критичне резолуције из које се идентификују оптимални услови и робусне области хроматографске методе.

Техника критичне мапе резолуције, коју је увео Molnar, је ефективна за проналажење оптималних услова раздвајања и заснована је на једначини изведеној из термодинамичког разматрања хроматографског процеса:

$$\ln k = A + B \times D + C \times \Delta A + D(K^e - 1)V^{2/3} \times \gamma + E + \ln(RT/P_0 V) \quad (53)$$

$$C = \frac{N\gamma}{RT} \quad (54)$$

$$\Delta A = A_S + A_L + A_{SL} \quad (55)$$

где је: k – ретенциони фактор, A – електростатичка сила, $B \times D$ – van der Waals-ове силе, V – моларна запремина растварача, K^c – молекуларни параметар растварача, P_0 – атмосферски притисак, γ – површински напон, T – температура, N – број подова, E – диелектрична константа растварача, S – растворак и L – стационарна фаза (C_{18}).

Једначина 53 описује утицај састава елуента на ретенцију на основу површинског напона, који је пропорционалан $\%A$, температури, молекуларним својствима узорка и хемијски везаног лиганда, ΔA и електростатичким својствима, као што је концентрација пуфера.

Програм DryLab омогућава симултану оптимизацију једног или два хроматографска параметра на основу улазних података (ретенционо време, површина и ширина пика) под дефинисаним хроматографским условима (врста колоне, температура, начин елуирања). Програм омогућава визуелизацију померања пикова што је неопходно за процену робусности методе. Једноимензионална мапа резолуције (1D) представља дводимензионални дијаграм зависности критичне резолуције од одабраног хроматографског параметра. Дводимензионална мапа резолуције (2D) је тродимензионални контурни дијаграм, где је критична резолуција као трећа димензија означена различитим бојама. У 2D оптимизацији на дијаграму се види маркер чијим померањем у области максималне критичне резолуције се идентификују оптималне вредности хроматографских параметара. За оптимално хроматографско раздвајање се захтева да минимална критична вредност резолуције буде већа од 1,5.

На сличном принципу на коме ради DryLab ради и LC-Simulator. Компјутерски потпомогнут развој хроматографске методе је неопходан за праћење померања пикова како се мењају услови одвајања. Прираштај пика се користи за прављење математичког модела помоћу којег се минимизира број експеримената потребних за оптимизацију.

Програм LC-Simulator изводи оптимизацију методе на основу експерименталних хроматограма и прави модел који се заснива на експерименталним варијаблама ($\%$ елуента, концентрација пуфера, температура итд.) са ретенционим фактором [303]. Резултати оптимизације се приказују као мапа резолуције дајући резолуцију критичног пара пикова. Мапа резолуције показује промене у методи које утичу на одвајање анализата. Концентрациони профил се добија применом средњих вредности најмањих квадрата мултиваријантне анализе.

Програм омогућава истовремену оптимизацију једне или две променљиве где се као подаци уносе: ретенционо време, површина пика анализата и ширина пика при одређеним хроматографским условима (врста и карактеристике колоне, температура, проток, градијентни или изократски начин елуирања) и праћење померања пика које је битно за разумевање робусности HPLC методе. Померањем курсора облика дијаманта у области максималне критичне резолуције, могу се оптимизовати вредности параметара и идентификовати најбољи експериментални услови при чему се добија симулирани хроматограм.

1.11. Валидација аналитичке методе

Валидација аналитичке методе је поступак којим се, лабораторијским испитивањем, утврђује да ли је метода поуздана за предвиђена аналитичка одређивања и дефинише се као „процес којим се документује да је метода одговарајућа за дату намену“ [280].

Параметри валидације зависе од предвиђене намене методе. Према упутствима ИСН [258], валидација методе подразумева дефинисање параметара као што су: селективност/специфичност, линеарност и опсег, тачност, прецизност, граница детекције, граница квантификације, робусност за одговарајући систем.

1.11.1. Линеарност и опсег

У једнокомпонентној анализи резултат је калибрациона права, код које је одговор инструмента, y , функција концентрације анализата, c , што се може изразити као:

$$y = a c + b + e \quad (56)$$

при чему је a нагиб, b одсечак, c концентрација, а e стохастична грешка сигнала.

Зависно од процеса мерења, та грешка у мерењу сигнала може бити нормално расподељена случајна променљива са аритметичком средином једнаком 0 и са варијансом σ^2 .

Линеарност подразумева резултате који су директно пропорционални концентрацији анализата у датом опсегу. Како се у пракси обавља ограничени број мерења, могућа одступања од идеалне линеарности израчунавају се регресионом анализом. Линеарна зависност може се потврдити визуелно, статистичком провером (коэффициентом корелације) или F-тестом, при чему се упоређују варијансе тачке која одступа од правца и укупне варијансе свих тачака. Према упутствима ИСН, потребно је најмање пет концентрационих нивоа у датом опсегу. За одређивање садржаја минималан опсег је 80 – 120 % од циљане концентрације [280].

1.11.2. Селективности/специфичност

Метода је селективна уколико аналит од интереса може тачно да се одреди у присуству других компоненти које се могу очекивати у матриксу, а специфична уколико одговор детектора потиче само од компоненте од интереса. Селективност се изражава као однос дела сигнала који недвосмислено потиче од анализата (r^*) и укупног сигнала (r). То је бездимензиона величина и има вредности од 0 до 1, а приказује се као:

$$SEL = \frac{r^*}{r} \quad (57)$$

1.11.3. Осетљивост

Осетљивост је промена одзива инструмента (Δr) са променом концентрације анализита (Δc), односно нагиб регресионог правца a , и изражава се као:

$$a = \frac{\Delta r}{\Delta c} \quad (58)$$

1.11.4. Тачност

Тачност је мера слагања између тачне или референтне вредности и нађене вредности. За одређивање тачности анализира се синтетичка смеша у коју је додата позната количина анализита. Према упутствима ИСН, препоручено је најмање десет одређивања за најмање три концентрације у датом опсегу. Добијени подаци се приказују као повратни принос, односно однос додате и нађене количине или као разлика између средње и тачне вредности са интервалима поузданости [280].

1.11.5. Прецизност

Прецизност је мера степена поновљивости аналитичке методе под оптималним хроматографским условима и обично се изражава као релативна стандардна девијација за статистички значајан број узорака. Према упутствима ИСН, прецизност треба одредити на три различита нивоа концентрација анализита:

1. Поновљивост – односи се на резултате добијене у кратком временском интервалу под истим условима. Препоручено је да се уради најмање девет одређивања на три концентрациона нивоа или шест одређивања на циљаној концентрацији.
2. Интермедијарна прецизност – односи се на резултате добијене у истој лабораторији, али у току различитих дана, или када анализу раде различити аналитичари на различитој опреми. Да би се пратили ефекти појединачних променљивих, треба користити експериментални дизајн.
3. Репродуктивност – односи се на резултате добијене у различитим лабораторијама.

Прецизност се изражава као релативна стандардна девијација или коефицијент варијације:

$$CV = RDS = \frac{s_r}{\bar{x}} (\times 100) \quad (59)$$

где је s_r стандардна девијација одступања поновљених мерења, а \bar{x} средња вредност мерења.

Прихватљиве вредности за прецизност зависе од врсте анализе. За анализу дозираних облика, релативна срандардна девијација може да има вредност мању од 1 %, а при анализи биолошких узорака релативна срандардна девијација може бити 16 % на граничним вредностима концентрације и 10 % на осталим концентрацијама.

1.11.6. Граница детекције

Граница детекције (limit of detection – LOD) се дефинише као најмања концентрација анализата у узорку која се може детектовати, али не и квантификовати [280].

Граница детекције се изражава као концентрација и може се израчунати преко односа сигнал/шум. Лимит детекције се може израчунати преко стандардне девијације одговора (s_b) и нагиба калибрационе праве (a) на нивоима блиским лимиту, по формули:

$$LOD = 3,3 \times \frac{s_b}{a} \quad (60)$$

Стандардна девијација одговора се може одредити на основу стандардне девијације слепе пробе, стандардне девијације резидуала регресионе праве, или стандардне девијације одсечка регресионе праве.

1.11.7. Граница квантификације

Граница квантификације (limit of quantification - LOQ) се дефинише као најмања концентрација анализата у узорку која се може квантификовати са прихватљивом прецизношћу и тачношћу, под условима који су наведени у методи.

Граница детекције се изражава као концентрација и може се израчунати преко односа сигнал/шум. Лимит детекције се може израчунати преко стандардне девијације одговора (s_b) и нагиба калибрационе праве (a) на нивоима блиским лимиту, по формули:

$$LOD = 10 \times \frac{s_b}{a} \quad (61)$$

1.11.8. Робусност

Робусност методе је њен капацитет да остане непромењена при малим, али намерним променама параметара методе. Робусност методе се процењује варирањем параметара као што су промена рН вредности, јонске јачине раствора, температуре и других, и утврђивање ефекта тих параметара на резултате методе [280]. Ефекат ових фактора може се проценити појединачно или као део факторског експеримента.

1.12. Циљ и задатак рада

Циљ истраживања ове докторске дисертације био је развијање аналитичких (спектрофотометријских, HPLC и LC-MS) метода за одређивање биофлавоноида и сродних једињења у храни, крвној плазми и фармацеутским формулацијама.

Резултате добијене применом развијених метода требало је поредити са подацима описаним у литератури.

На основу изложеног, задатак овог рада је:

1. Избор оптималног поступка за течно-чврсту екстракцију биофлавоноида из узорака хране.
2. Процена утицаја матричног ефекта на одређивање биофлавоноида у узорцима хране.
3. Предходно испитивање услова и оптимизација LC-MS методе за одређивање хесперетина, хесперидина, кверцетина, рутина и каемпферола у узорцима хране.
4. Предходно испитивање услова и оптимизација HPLC методе за одређивање кверцетина, каемпферола, лутеолина, апигенина, катехина и епикатехина у узорцима хране.
5. Предходно испитивање услова и оптимизација HPLC методе за одређивање једињења моксифлоксацина и једињења сродних њему у фармацеутским формулацијама. (Оптимизација обухвата симулацију хроматографских експеримената употребом програма DryLab, као и статистичку оптимизацију коришћењем методе експерименталног дизајна).
6. Валидација методе и одређивање валидационих параметара.
7. Валидираним методама извршити одређивање биофлавоноида у узорцима хране, активне супстанце моксифлоксацина у серуму и сродних супстанци у таблетама и инфузији.

2. Експериментални део

2.1. Реагенси

2.1.1. Стандарди биофлавоноида

Кверцетин ($C_{15}H_{10}O_7$), (2-(3,4-дихидроксифенил)-3,5,7-трихидрокси-4*H*-хромен-4-он): коришћен је стандард кверцетина ($MW = 302,236 \text{ g/mol}$), чистоће $> 99 \%$, производ фирме Sigma-Aldrich (Беч, Аустрија).

Рутин хидрат ($C_{27}H_{30}O_{16} \times H_2O$), (2-(3,4-дихидроксифенил)-5,7-дихидрокси-3-[α -L-рамнопиранозил-(1 \rightarrow 6)- β -D-глукопиранозил]-4*H*-хромен-4-он): коришћен је стандард рутин хидрата ($MW = 628,52$), чистоће $> 94 \%$, производ фирме Sigma-Aldrich (Беч, Аустрија).

Хесперетин ($C_{16}H_{14}O_6$), ((*S*)-2,3-дихидро-5,7-дихидрокси-2-(3-хидрокси-4-метоксифенил)-4*H*-1-бензопиран-4-он): коришћен је стандард хесперетина ($MW = 302,27 \text{ g/mol}$), чистоће $> 95 \%$, производ фирме Sigma-Aldrich (Беч, Аустрија).

Хесперидин ($C_{28}H_{34}O_{15}$) (2*S*)-5-хидрокси-2-(3-хидрокси-4-метоксифенил)-7-[(2*S*,3*R*,4*S*,5*S*,6*R*)-3,4,5-трихидрокси-6-[(2*R*,3*R*,4*R*,5*R*,6*S*)-3,4,5-трихидрокси-6-метилоксан-2-ил]оксиметил]оксан-2-ил]окси-2,3-дихидрохромен-4-он): коришћен је стандард хесперидина ($MW = 610,56 \text{ g/mol}$), чистоће 80% , производ фирме Sigma-Aldrich (Беч, Аустрија).

Каемпферол ($C_{15}H_{10}O_6$), (3,5,7-трихидрокси-2-(4-хидроксифенил)-4*H*-хромен-4-он): коришћен је стандард каемпферола ($MW = 286,23 \text{ g/mol}$), чистоће $> 95 \%$, производ фирме Sigma-Aldrich (Беч, Аустрија).

Катехин ($C_{15}H_{14}O_6$), ((2*R*,3*S*)-2-(3,4-дихидроксифенил)-3,4-дихидро-2*H*-хромен-3,5,7-триол) коришћен је стандард катехина ($MW = 290,27 \text{ g/mol}$), чистоће $> 98 \%$, производ фирме Sigma-Aldrich (Беч, Аустрија).

Епикатехин ($C_{15}H_{14}O_6$), ((2*R*,3*R*)-2-(3,4-дихидроксифенил)-3,4-дихидро-1(2*H*)-бензопиран-3,5,7-триол) коришћен је стандард епикатехина ($MW = 290,27 \text{ g/mol}$), чистоће $> 90 \%$, производ фирме Sigma-Aldrich (Беч, Аустрија).

Апигенин ($C_{15}H_{10}O_5$), (5,7-дихидрокси-2-(4-хидроксифенил)-4*H*-1-бензопиран-4-он) коришћен је стандард апигенина ($MW = 290,27 \text{ g/mol}$), чистоће $> 95 \%$, производ фирме Sigma-Aldrich (Беч, Аустрија).

Лутеолин ($C_{15}H_{10}O_6$), (2-(3,4-дихидроксифенил)-5,7-дихидрокси-4-хроменон) коришћен је стандард лутеолина ($MW = 286,24 \text{ g/mol}$), чистоће $> 94 \%$, производ фирме Sigma-Aldrich (Беч, Аустрија).

2.1.2. Стандарди хинолона

Моксифлоксацин хидрохлорид ($C_{21}H_{24}FN_3O_4 \times HCl$), (1-циклопропил-7-[(1*S*,6*S*)-2,8-диазабицикло[4.3.0]нон-8-ил]-6-флуоро-8-метокси-4-оксо-хинолин-3-карбоксилна киселина хидрохлорид [МОХ]: коришћен је стандард моксифлоксацин хидрохлорида ($MW = 437,9 \text{ g/mol}$), чистоће веће од $99,9 \%$ производ фирме BayerPharma AG (Леверкузен, Немачка).

Синтетичка нечистоћа 1: 1-циклопропил-7-[(*S,S*)-2,8-диазабицикло[4.3.0]нон-8-ил]-6,8-дифлуоро-1,4-дихидро-4-оксо-3-хинолон карбоксилна киселина [6,8DF] коришћен је стандард ($MW = 413 \text{ g/mol}$), чистоће веће од $99,9 \%$, производ фирме BayerPharma AG (Леверкузен, Немачка).

Синтетичка нечистоћа 2: 1-циклопропил-7-[(*S,S*)-2,8-диазабицикло[4.3.0]нон-8-ил]-6,8-диметокси-1,4-дихидро-4-оксо-3-хинолон карбоксилна киселина [6,8DM] коришћен је стандард ($MW = 413,5 \text{ g/mol}$), чистоће веће од $99,9 \%$, производ фирме BayerPharma AG (Леверкузен, Немачка).

Синтетичка нечистоћа 3: 1-циклопропил-7-[(*S,S*)-2,8-диазабицикло[4.3.0]нон-8-ил]-8-флуоро-6-метокси-1,4-дихидро-4-оксо-3-хинолон карбоксилна киселина [6M8F] коришћен је стандард ($MW = 401,4 \text{ g/mol}$), чистоће веће од $99,9 \%$, производ фирме BayerPharma AG (Леверкузен, Немачка).

Синтетичка нечистоћа 4: 1-циклопропил-7-[(*S,S*)-2,8-диазабицикло[4.3.0]нон-8-ил]-8-етокси-6-флоро-1,4-дихидро-4-оксо-3-хинолон карбоксилна киселина [6F8E] коришћен је стандард ($MW = 415,5 \text{ g/mol}$), чистоће веће од $99,9 \%$, производ фирме BayerPharma AG (Леверкузен, Немачка).

Офлоксацин ($C_{18}H_{20}FN_3O_4$), ((*RS*)-7-флуоро-2-метил-6-(4-метилпиперазин-1-ил)-10-оксо-4-окса-1-азатрицикло[7.3.1.0]тридека-5(13),6,8,11-тетраен-11-карбоксилна киселина [OFLO]: коришћен је стандард офлоксацина ($MW = 361,368 \text{ g/mol}$), чистоће 100% производ фирме Rhone Poulenc Rorer (Париз, Француска).

2.1.3. Узорци таблета и инфузија

Avelox таблете: Анализиран је узорак „Avelox” таблета номиналне масе 400 mg произвођача Bayer Pharma AG (Леверкузен, Немачка).

Avelox инфузија: Анализиран је узорак „Avelox” инфузије номиналне концентрације 400 mg/250 mL произвођача BayerPharma AG (Леверкузен, Немачка).

2.1.4. Општи реагенси

Folin-Ciocalteu реагенс фирме Merck (Дармштад, Немачка).

Бутиловани хидроксилтолуен, ВНТ ($C_{15}H_{24}O_2$) (2,6-бис(1,1-диметилетил)-4-метилфенол) (MW = 220,35 g/mol) фирме Sigma-Aldrich (Беч, Аустрија).

α -токоферол, ($C_{29}H_{50}O_2$) ((2R)-2,5,7,8-тетрамтил-2-[(4R,8R)-(4,8,12-триметилтридецил)]-6-хроманол) MW = 430,71 g/mol) фирме Sigma-Aldrich (Беч, Аустрија).

ДРРН ($C_{18}H_{12}N_5O_6$) (дефенил-(2,4,6-тринитрофенил)иминоазаниум) (MW = 394,32 g/mol) фирме Sigma-Aldrich (Беч, Аустрија).

Ацетонитрил (CH_3CN) (MW = 41,05 g/mol) хроматографског степена чистоће без даљег пречишћавања произвођача J.T. Baker (Девентер, Холандија).

Метанол (CH_3OH) (MW = 32,04 g/mol) хроматографског степена чистоће без даљег пречишћавања произвођача J.T. Baker (Девентер, Холандија).

Сирћетна киселина (CH_3COOH) (MW = 60,05 g/mol), чистоће 99,5 %, д.д. „Зорка Фарма“, (Шабац, Србија).

Литијум-хлорид (LiCl) р.а. чистоће произвођача Merck (Дармштад, Немачка).

Натријум-додецил-сулфат (SDS) ($C_{12}H_{25}OSO_3$)Na, (MW = 288,38 g/mol) р.а. чистоће произвођача Merck (Дармштад, Немачка).

Хлороводонична киселина (HCl); Коришћена је хлороводонична киселина р.а. стандардне концентрације 12 mol/L “Suprapure”, Merck (Дармштад, Немачка).

Натријум-хидроксид (NaOH): Стандардни, ампулирани 0,1 mol/L раствор натријум-хидроксида, р.а. чистоће је коришћен за припремање раствора радне концентрације 0,01 mol/L, Merck (Дармштад, Немачка).

Лимунска киселина ($C_6H_8O_7 \times H_2O$) чистоће 99,5 % ($MW = 210,14 \text{ g/mol}$), д.д. „Зорка Фарма“, (Шабац, Србија).

Фосфорна киселина (H_3PO_4): За подешавање рН вредности мобилне фазе коришћена је концентрована фосфорна киселина р.а. концентрације 83% Merck (Дармштад, Немачка),

Динатријум-хидрогенфосфат (Na_2HPO_4) р.а., ($MW = 141,958 \text{ g/mol}$). произвођача Merck (Дармштад, Немачка).

Натријум-тетраборат декахидрат ($Na_2B_4O_7 \times 10H_2O$), ($MW = 381,37 \text{ g/mol}$) р.а. чистоће “Зорка” (Шабац Србија).

Триетиламин ($N(CH_2CH_3)_3$), ($MW = 101,19 \text{ g/mol}$) (99,5 %, v/v) од Fluka (Busse, Швајцарска).

Серум: Узорци хуманог серума „pool“ добијени су из Института за трансфузију крви Србије (Београд). Узорци су чувани у фрижидеру на $-10^\circ C$ до употребе.

Вода за хроматографију: Вода за мобилну фазу добијена је дејонизацијом воде помоћу апарата „Easy-Pure“. Измерена је проводљивост од $18,3 \text{ M}\Omega\text{cm}^{-1}$.

2.2. Раствори

2.2.1. Основни раствори стандарда биофлавоноида

Кверцетин. Одмерена маса кверцетина (0,025789 g) је разблажена метанолом у нормалном суду од 25 mL до црте. Концентрација тако добијеног раствора је износила 1,0316 mg/mL. Раствори других концентрација су добијени разблаживањем основног раствора кверцетина.

Рутин. Одмерена маса рутина (0,026250 g) је разблажена метанолом у нормалном суду од 25 mL до црте. Концентрација тако добијеног раствора је износила 1,05 mg/mL. Раствори других концентрација су добијени разблаживањем основног раствора рутина.

Хесперетин. Одмерена маса хесперитина (0,026173 g) је разблажена метанолом у нормалном суду од 25 mL до црте. Концентрација тако добијеног раствора је износила 1,047 mg/mL. Раствори других концентрација су добијени разблаживањем основног раствора хесперетина.

Хесперидин. Одмерена маса хесперидина (0,035731 g) је разблажена метанолом у нормалном суду од 25 mL до црте. Концентрација тако добијеног раствора је износила 1,1433 mg/mL. Раствори других концентрација су добијени разблаживањем основног раствора хесперидина.

Каемпферол. Одмерена маса каемпферола (0,025447 g) је разблажена метанолом у нормалном суду од 25 mL до црте. Концентрација тако добијеног раствора је износила 1,0179 mg/mL. Раствори других концентрација су добијени разблаживањем основног раствора каемпферола.

Катехин. Одмерена маса катехина (0,025447 g) је разблажена метанолом у нормалном суду од 25 mL до црте. Концентрација тако добијеног раствора је износила 1,0179 mg/mL. Раствори других концентрација су добијени разблаживањем основног раствора катехина.

Епикатехин. Одмерена маса епикатехина (0,025447 g) је разблажена метанолом у нормалном суду од 25 mL до црте. Концентрација тако добијеног раствора је износила 1,0179 mg/mL. Раствори других концентрација су добијени разблаживањем основног раствора епикатехина.

Апигенин. Одмерена маса апигенина (0,025447 g) је разблажена метанолом у нормалном суду од 25 mL до црте. Концентрација тако добијеног раствора је износила 1,0179 mg/mL. Раствори других концентрација су добијени разблаживањем основног раствора апигенина.

Лутеолин. Одмерена маса лутеолина (0,025447 g) је разблажена метанолом у нормалном суду од 25 mL до црте. Концентрација тако добијеног раствора је износила 1,0179 mg/mL. Раствори других концентрација су добијени разблаживањем основног раствора лутеолина.

2.2.2. Основни раствор стандарда флуорохинолона

Моксифлоксацин-хидрохлорид

Основни раствор стандарда моксифлоксацина концентрације 10,01 mg/mL припремљен је директним одмеравањем 0,5005 g и растварањем стандардне супстанце у нормалном суду од 50 mL са 0,1 v/v % фосфорне киселине. Раствори других концентрација су добијени разблаживањем основног раствора.

Синтетичка нечистоћа 1

Основни раствор стандарда 6M8F концентрације 55,0 µg/mL припремљен је директним одмеравањем 0,0055 g и растварањем стандардне супстанце у нормалном суду од 100 mL са 0,1 v/v % фосфорне киселине. Раствори других концентрација су добијени разблаживањем основног раствора.

Синтетичка нечистоћа 2

Основни раствор стандарда 6F8E концентрације 51,0 µg/mL припремљен је директним одмеравањем 0,0051 g и растварањем стандардне супстанце у нормалном суду од 100 mL са 0,1 v/v % фосфорне киселине. Раствори других концентрација су добијени разблаживањем основног раствора.

Синтетичка нечистоћа 3

Основни раствор стандарда 6,8DM концентрације 51,0 µg/mL припремљен је директним одмеравањем 0,0051 g и растварањем стандардне супстанце у нормалном суду од 100 mL са 0,1 v/v % фосфорне киселине. Раствори других концентрација су добијени разблаживањем основног раствора.

Синтетичка нечистоћа 4

Основни раствор стандарда 6,8DF концентрације 52,0 µg/mL припремљен је директним одмеравањем 0,0052 g и растварањем стандардне супстанце у нормалном суду од 100 mL са 0,1 v/v % фосфорне киселине. Раствори других концентрација су добијени разблаживањем основног раствора.

Офлоксацин

Основни раствор стандарда офлоксацина концентрације 53,0 $\mu\text{g/mL}$ припремљен је директним одмеравањем 0,0053 g и растварањем стандардне супстанце у нормалном суду од 100 mL са 0,1 v/v % фосфорне киселине. Раствори других концентрација су добијени разблаживањем основног раствора.

2.2.3. Основни раствори општих реагенаса

DPPH

Раствор је припремљен одмеравањем 0,0059 g 2,2-дифенил-1-пикрилхидразил радикала и његовим растварањем у нормалном суду од 10 mL у метанолу. Концентрација тог раствора је била 1,5 mmol/L.

LiCl

Раствор је припремљен одмеравањем 1,8772 g литијум-хлорида и његовим растварањем у нормалном суду од 50 mL у бидестилованој води. Концентрација тог раствора је била 0,8846 mol/L. Литијум-хлорид се додаје у испитиване растворе због константности јонске силе.

SDS

За добијање 0,1 mol/L раствора SDS потребно је на аналитичкој ваги одмерити 14,4190 g чисте супстанце и пренети у нормални суд од 500 mL и разблажити до црте.

Динатријум-хидрогенфосфат

За добијање раствора концентрације 0,2 mol/L потребно је одмерити 11,8968 g Na_2HPO_4 и разблажити бидестилованом водом до 500 mL у нормалном суду.

Лимунске киселина

Концентрација полазног раствора лимунске киселине износила је 0,1 mol/L. Добијен је растварањем 10,507 g кристалне супстанце у нормалном суду од 500 mL.

Натријум-тетраборат декахидрат

За припремање полазног раствора треба измерити 4,7671 g чисте супстанце и разблажити бидестилованом водом до 500 mL. Концентрација тако добијеног раствора је износила 0,025 mol/L.

2.2.4. Радни раствори

Хлороводонична киселина

Радни раствор HCl концентрације 0,1 mol/L добијен је одмеравањем 4,17 mL раствора „Suprapure“ киселина и његовим разблаживањем до 500 mL у нормалном суду до црте. Стандардизован је потенциометријском методом са 0,1 mol/L раствором NaOH.

Раствори пуфера

Цитратни пуфер припреман је одмеравањем одређене запремине 0,1 mol/L раствора лимунске киселине и 0,2 mol/L раствора динатријум-хидрогенфосфата.

Боратни пуфер је припреман одмеравањем одређене запремине 0,025 mol/L $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \times 10\text{H}_2\text{O}$ и X mL 0,1 mol/L HCl.

Радни раствори стандарда биофлавоноида за калибрациону криву

Серија раствора за конструисање калибрационе криве припремљена је разблаживањем аликвота основног раствора биофлавоноида.

Табела 23. Концентрације биофлавоноида (кверцетин, рутин, хесперетин, хесперидин и каемпферол) (у $\mu\text{g/mL}$):

Ниво калибрације	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Кверцетин	0,053	0,106	0,212	0,532	1,06	2,12	5,32	10,6	21,2
Рутин	0,052	0,105	0,263	0,525	1,05	2,63	5,25	10,5	21,0
Хесперетин	0,052	0,104	0,262	0,523	1,05	2,62	5,23	10,5	20,9
Хесперидин	0,057	0,114	0,286	0,572	1,14	2,86	5,72	11,4	22,9
Каемпферол	0,051	0,102	0,204	0,511	1,02	2,04	5,11	10,2	20,4

Калибрациона крива представља зависност површине пика биофлавоноида у функцији од концентрације биофлавоноида. За сваку концентрацију раствори су инјектовани по три пута и узете су средње вредности површине пикова.

Радни раствори стандарда биофлавоноида за калибрациону криву

Серија раствора за конструисање калибрационе криве припремљена је разблаживањем аликвота основног раствора биофлавоноида.

Табела 24. Концентрације биофлавоноида (кверцетин, каемпферол, апигенин, лутеолин, катехин и епикатехин) (у $\mu\text{g/mL}$).

Ниво калибрације	1	2	3	4
Кверцетин	0,512	1,024	2,048	5,12
Каемпферол	0,525	1,05	2,1	5,25
Апигенин	0,528	1,056	2,112	5,28
Лутеолин	0,582	1,164	2,328	5,82
Катехин	0,571	1,034	2,068	5,17
Епикатехин	0,546	1,092	2,184	5,46

Калибрациона крива представља зависност површине пика биофлавоноида у функцији од концентрације биофлавоноида. За сваку концентрацију су иницирани по три пута и узете су средње вредности површине пикова.

Радни раствори стандарда сродних начистоћа моксифлоксацина за калибрациону криву

Серија раствора за конструисање калибрационе криве припремљена је разблаживањем аликвота основног раствора стандарда нечистоће коме је додата одговарајућа запремина основног раствора офлоксацина.

Табела 25. Концентрације једињења сродних моксифлоксацину (у mg/mL).

Ниво калибрације	1	2	3	4	5	6	7
6F8E	0,4856	0,6799	0,9714	1,1653	1,4570	1,6513	1,9427
6,8DF	0,5179	0,7251	1,0358	1,2430	1,5538	1,7609	2,0717
6M8F	0,5060	0,7084	1,0120	1,2144	1,5180	1,7204	2,0240
6,8DM	0,4922	0,6890	0,9843	1,1812	1,4765	1,6733	1,9686

Калибрациона крива представља зависност односа површине пикова сродних супстанци моксифлоксацину и офлоксацина у функцији од односа концентрација

сродних супстанци и офлоксацина. За сваку концентрацију раствори су инјектовани три пута и узете су средње вредности површине пикова.

Радни раствори стандарда DPPH за калибрациону криву

Серија раствора за конструисање калибрационе криве припремљена је разблаживањем аликвота основног раствора стандарда DPPH.

Концентрације нечистоће сродне моксифлоксацину (у $\mu\text{mol/L}$) су следеће:

Ниво калибрације	1	2	3	4	5
Концентрација DPPH ($\mu\text{mol/L}$)	10	25	50	75	100

Калибрациона крива представља зависност односа површине пикова сродних супстанци моксифлоксацину и офлоксацина у функцији од односа концентрација сродних супстанци и офлоксацина. За сваку концентрацију раствори су инјектовани по три пута и узете су средње вредности површине пикова.

2.3. Припрема узорка за анализу биофлавоноида

Шест узорка хране је изабрано за анализу биофлавоноида и то: црвени лук, кора поморанце, цветни мед, карфиол, броколи и прокељ као различити облици матрикса. Храна је купљена у продавници и одмах након куповине вршена је припрема узорка за екстракцију.

Пре почетка припреме узорци црвоног лука и поморанце су опрани под млазом воде како би се уклонила прљавштина. Прикупљено је око 1 kg узорка и кухињским ножем су уситњени на ситније комаде погодне за даље уситњавање у блендеру.

У блендеру се величина узорка свела на малу величину (0,5 mm) који су даље хомогенизовани употребом Silent Crusher хомогенизатора (Heidolph, Schwabach, Немачка). Хомогенизација је вршена 5 минута док величина честица није била уједначена и мања од 5 μm .

Узорак меда је хомогенизован у присуству одговарајућег растварача (метанол, вода).

2.3.1. Поступак екстракције биофлавоноида из различитих узорака хране

Процес екстракције је рађен по узору на Васек-а и сараднике [304]. Одмерена је одређена маса уситњених узорака хране и додата одговарајућа средства за екстракцију. За екстракцију флавоноида из испитиваних узорака коришћени су раствори метанола, ацетонитрила и воде.

Узорак меда је енергично мешан док се није добро хомогенизовао. У случају меда није била могућа екстракција ацетонитрилом јер се стварала нерастворна вискозна маса.

2.3.2. Екстракција по Сокслету

Уситњен узорак масе 5 g унет је у папирну капсулу и додато 50 mL метанола. Екстракција је вршена 120 min на температури од 60 °C [305]. После завршене екстракције екстракт је одвојен од заосталог узорка којем је додато нових 50 mL метанола и екстракција настављена још 60 min до завршетка екстракције. Екстракти су сједињени и упарени на вакуум упаривачу до запремине од 5 mL након чега је екстракт пропуштен кроз 0,45 µm мембрански филтер, и разблежен метанолом до црте у нормалном суду запремине 10 mL. Све екстракције су поновљене три пута.

Како би се установило да преостали узорак не садржи фенолна једињења урађен је квалитативни тест, тј. реакције са Fe(III) [306] и Folin-Ciocalteu-овим реагенсом [307]. Реакције су биле негативне, односно показале су да у заосталом екстракту нису присутна фенолна једињења.

2.3.3. Ултразвучна екстракција

Уситњеном узорку масе 2,5 g, у чаши, додато је 50 mL растварача и чаша обложена парафилмом ради смањења губитка растварача. Чаша је смештена у ултразвучно купатило, фреквенције 35 kHz и снаге 150 W, 30 min на температури од 40 °C. Након 30 min екстракт је одвојен од заосталог узорка којем је додато нових 50 mL растварача и екстракција настављена још 15 min до завршетка екстракције. Екстракти су сједињени и упарени на вакуум упаривачу до запремина од 5 mL након чега је пропуштен кроз 0,45 µm мембрански филтер, и разблежен метанолом до црте у

нормалном суду запремине 10 mL. Све екстракције су поновљене три пута ради статистичке анализе.

2.3.4. Екстракција мацерацијом

Уситњеном узорку масе 2,5 g, у авану, додато је 25 mL 70 % метанола. Даља процедура је била иста као код екстракције по Сокслету.

2.3.5. Екстракција водом

Уситњеном узорку масе 2,5 g, у чаши, додато је 100 mL воде. Даља процедура је била иста као код екстракције по Сокслету.

2.4. Припрема узорка таблете и инфузије

Прецизно је измерена маса три таблете (како би се добила просечна маса једне таблете) након чега су фино спрашене и 273,2 mg хомогенизованог праха пренето у нормални суд запремине 25 mL. У нормални суд додато је око 20 mL растварача и раствор смештен у ултразвучно купатило на 15 min, након чега је нормални суд допуњен до црте растварачем. Тако добијен раствор је профилиран кроз најлон филтер промера 0,22 mm. Одмерено је тачно 175 μ L филтрата што је еквивалентно концентрацији моксифлоксацина од 200 μ g/mL, у два нормална суда од 5 mL. Раствор у два нормална суда је разблажен до црте растварачем и један је коришћен за анализу нечистоћа, док је други употребљен за испитивање деградационих производа.

Одмерена је запремина од 0,625 mL инфузије која је пренета у нормални суд од 5 mL и разблажена растварачем до ознаке. Овај раствор је коришћен за одређивање нечистоћа.

2.5. Метода стандардног додатка

Због комплексности испитиваних узорака у којима су одређивани биофлавоноиди и због њихове мале концентрације као метода избора намеће се метода стандардног додатка.

У свим литературним техникама које се користе у аналитичкој хемији, метода стандардног додатка се користи за одређивање анализата у сложеним узорцима где није могуће уклонити ометајуће супстанце. Иако савремени инструменти који се користе имају велику осетљивост и одличну линеарност, апсолутна вредност сигнала може варирати из дана у дан и од анализе до анализе. Корисно је стога упоредити непознати узорак са познатим. Многе процедуре дају лажан утисак да је најбољи прилаз поређење непознатог узорка са стандардним или поређење једног непознатог са калибрационом кривом. Ова друга процедура је валидна само ако су сви узорци идентични. Уколико се стандардне супстанце и непознати узорак разликују по рН, јонској јачини, температури, вискозности или врсти нечистоћа или интерферирајућих супстанци, метода калибрационе криве не може се применити. У сваком случају одговарајућа метода стандардног додатка може дати најбоље резултате за непознати узорак смањујући наведене грешке али често има и предност, јер се може проценити и грешка приликом одређивања.

Линеарни инструменти су они чији је сигнал, S , директно пропорционалан концентрацији, c , дат у облику $S = k c$, где је k константа пропорционалности. Многи инструменти, као што су спектрофотометри, поларографи, раде на овом принципу. Обично, корекција за бланк и основну линију су неопходни за дирекну пропорционалност.

Припрема се серија раствора који имају константну запремину, V_x , раствора непознате концентрације, c_x , и NV_s јединица стандарда, c_s , где N , представља целе јединице ($N = 0, 1, 2, \dots$), константне запремине, V_s . Сваки раствор се даље разблажује до константне запремине, V_t . Линеарни одговор, R_n , добија се за сваки раствор при чему се добија:

$$R_n = k \left[\frac{V_x c_x}{V_t} + \frac{NV_s c_s}{V_t} \right] \quad (62)$$

при чему је

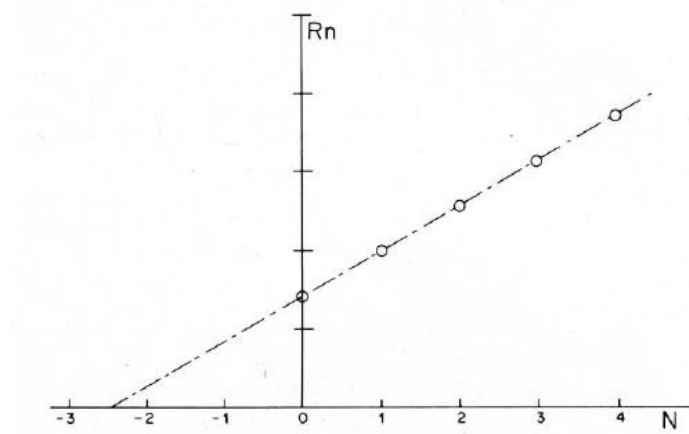
$$f_x = V_x/V_t \text{ и } f_s = V_s/V_t \quad (63)$$

након чега се добија

$$R_n = k(f_x c_x + N f_s c_s) \quad (64)$$

Као што је приказано на Слици 49, једначина 2, је права линија ако се R_n црта у функцији од N . Нагиб, m , је дат изразом, $k f_s c_s$, а одсечак, b , дат изразом, $k f_x c_x$. Непозната концентрација, c_x , може се добити из нагиба, m , и одсечка, b .

$$c_x = \frac{b V_s c_s}{m V_x} \quad (65)$$



Слика 49. Изглед криве за методу стандардног додатка

Анализом праве линије методе најмањих квадрата, може се добити стандардна девијација нагиба, dm , и одсечка, db . Коришћењем једначина (3), грешка за, c_x , dc_x , може се апроксимирати једначином:

$$\frac{dc_x}{c_x} = \left[\left(\frac{db}{b} \right)^2 + \left(\frac{dm}{m} \right)^2 \right]^{1/2} \quad (66)$$

где су db и dm грешке одговора инструмента, а не припреме раствора. На исти начин грешка за k , dk , може се изразити као:

$$\frac{dk}{k} = \frac{dm}{m} \quad (67)$$

Метода стандардног додатка је изведена додавањем 125 μL стандардних раствора у одређену запремину раствора екстракта у нормалом суду од 5 mL и разблажено до црте метанолом. Непозната концентрација је очитана као x – одсечак на графику. Несигурност одсечка је израчуната коришћењем формуле:

$$SD_x = \frac{s_y}{|a|} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{\bar{y}^2}{a^2 \times \sum (x_i - \bar{x})^2}} \quad (68)$$

где је s_y стандардна девијација у очитавању y , a је нагиб, n број тачака, x је концентрација и y хроматографски одговор. Интервал поверења је израчунат као $t \times SD_x$, где је t Студентов t параметар за $n - 2$ степени слободе.

2.6. Апаратура и инструменти

2.6.1. Уситњавање, хомогенизација и течно-чврста екстракција

За уситњавање и хомогенизацију узорака хране био је коришћен хомогенизатор Silent Crusher M Homogenizer (Heidolph, Немачка) приказан на Слици 50.



Слика 50. Хомогенизатор Silent Crusher M Homogenizer

За екстракцију по Соклету коришћена је апаратура састављена од грејног тела, балона са округлим дном, Соклетовим наставком, папирне капсуле, спиралног концензатора, приказана на Слици 51.



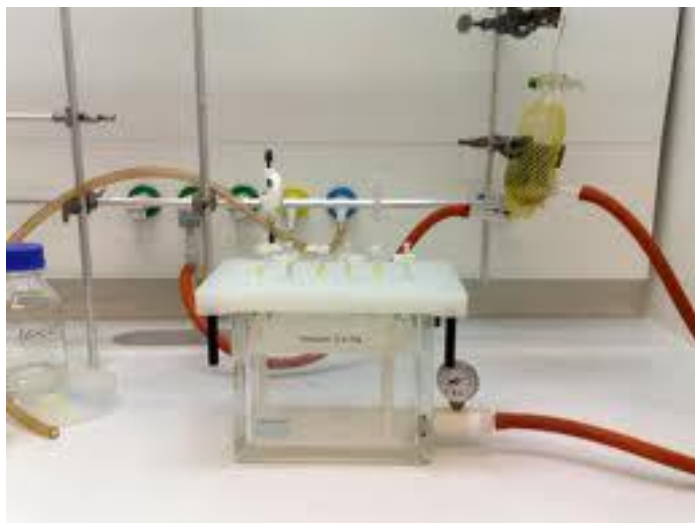
Слика 51. Апаратура за екстракцију по Соклету

Ултразвучна екстракција је извођена у ултразвучном купатилу Sonorex DT 52 Н, снаге 150 W и фреквенције 35 kHz произвођача Vandelin (Берлин, Немачка).



Слика 52. Ултразвучно купатило Sonorex DT 52 Н

За течно-чврсту екстракцију анализата из екстрактата хране коришћен је SPE манифолд произвођача Agilent (Санта Клара, САД) приказан на Слици 53.



Слика 53. SPE манифолд Agilent

2.6.2. Хроматографски системи

Хроматографски систем (Слика 54) је модуларни HPLC систем Agilent 1100 који се састоји од дегазера, бинарне пумпе, аутосемплера, термостата колоне, UV/Vis детектора. Аквизиција и обрада података је вршена помоћу софтвера ChemStation (Agilent, Санта Клара, САД).



Слика 54. HPLC Agilent 1100 Series

Други хроматографски систем који је коришћен је Shimadzu (Кјото, Јапан) састављен од дегазера DGU-20As, кватернерне пумпе LC-20AT, мануелног инјектора 7125, термостара за колону, DAD детектора SPD-M20A и контролора CBM-20A (Слика

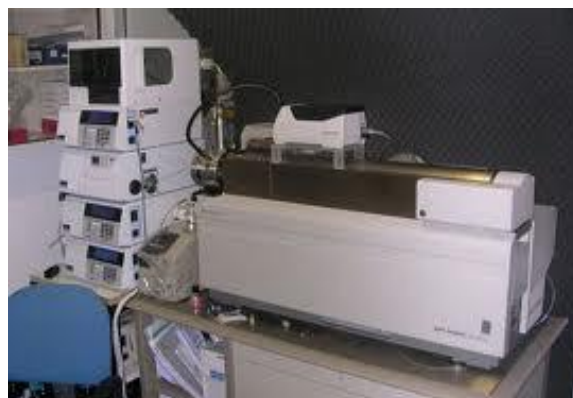
55). Прикупљање и обрада података је вршена помоћу софтвера LC Solution (Shimadzu, Кјото, Јапан).



Слика 55. HPLC систем Shimadzu

2.6.3. LC-MS/MS систем

Хроматографски систем који је био спрегнут са масеним детектором се састојао од пдегазера, бинарне пумпе, аутосемплера, термостара за колону и UV/Vis детектора, произвођача Perkin-Elmer. Масени детектор који је коришћен, је Q-Trap, произвођача Applied Biosystems (Луцерн, Швајцарска) (Слика 56).



Слика 56. LC-MS/MS систем Perkin-Elmer / Applied Biosystems (Луцерн, Швајцарска)

2.6.4. UV/Vis спектрофотометар

Спектрофотометријска мерења су вршена помоћу UV/Vis спектрофотометра модел Lambda 35 (Слика 57), фирме Perkin-Elmer (Валтман, САД). Спектрофотометар има радни опсег таласних дужина од 200 – 1000 nm, а спектри су снимани при ширини

разреза од 1 nm и брзини скенирања од 50 nm/min. За обраду података коришћен је програм UV WinLab (Perkin-Elmer, Валтман, САД).



Слика 57. UV/Vis спектрофотометар Perkin Elmer Lambda 35

За мерење рН коришћен је систем састављен од рН-метра Веckман (Бреа, САД), стакленог балона (титрациони суд) са двоструким зидовима и комбиноване електроде. Калибрација рН-метра је вршена пуферима рН 4,00 и 7,00.

3. Експериментални резултати

Експериментални резултати у овој дисертацији сврстани су у две целине:

У првој целини описује се одређивање биофлавоноида у храни (црвени лук, мед, кора поморанце, карфиол, прокељ и броколи) и то:

- Екстракција анализата
 - а) Екстракција по Сокслету и ултразвучна екстракција биофлавоноида из узорака црног лука и коре поморанце.
 - б) Течно-чврста екстракција биофлавоноида из екстраката истих узорака.
 - с) Екстракција по Сокслету, ултразвучна, мацерација и екстракција кључалом водом биофлавоноида из узорака различитих врста фамилије *Brassica*.
- Оптимизација методе
 - а) Оптимизација LC-MS/MS методе за одређивање биофлавоноида у црном луку, кори поморанце и меду.
 - б) Оптимизација HPLC-DAD методе за одређивање биофлавоноида у екстрактима фамилије *Brassica*.
- Испитивање утицаја матричног ефекта на одређивање биофлавоноида у екстрактима црвеног лука, меда и коре поморанце
- Одређивање биофлавоноида у црвеном луку, меду, кори поморанце, карфиолу, прокељу и броколију.
 - а) Одређивање биофлавоноида у узорцима меда, црвеног лука и коре поморанце.
 - б) Одређивање биофлавоноида у узорцима фамилије *Brassica*.
- Одређивање антиоксидативне активности екстраката фамилије *Brassica*.

У другој целини приказује се одређивање моксифлоксацина и сродних једињења у фармацеутским формулацијама и хуманом крвном серуму и то.

- Оптимизација методе
 - а) Оптимизација HPLC методе за одређивање моксифлоксацина и сродних супстанци у таблетама и инфузији.
 - б) Оптимизација спектофотометријских услова за одређивање моксифлоксацина у хуманом крвном серуму.
- Одређивање сродних једињења моксифлоксацина у таблетама и инфузији.
- Одређивање деградационих производа моксифлоксацина у таблетама и инфузији.
- Спектрофотометријско одређивање моксифлоксацина у хуманом крвном серуму.

3.1. Екстракција биофлавоноида из узорака хране биљног порекла

Избор начина екстракције жељених флавоноида из биолошког материјала је веома важан и зависи од циља истраживања. До сада примењивани начини екстракције за изоловање и одређивање активних полифенолних киселина у биљном ткиву и храни су описани у прегледним радовима [335, 336].

Најчешће примењивани начини екстракције у аналитици биљног материјала су:

- Екстракција по Сокслету,
- Ултразвучна екстракција,
- Суперкритична флуид екстракција (Supercritical fluid extraction, SFE),
- Микроталасна екстракција (Microwave-assisted extraction, MAE),
- Течна екстракција при повишеном притиску (Pressurized liquid extraction, PLE),

Екстракција по Сокслету је потпуна јер се одвија при континуалној циркулацији растварача којим се екстрахују испитивани аналити. Међутим, заједно са жељеним аналитима се екстрахују и друге, нежељене супстанце, које могу сметати приликом одређивања аналита. Још једна мана екстракције по Сокслету је висока температура која се мора одржавати, а која није погодна за екстракцију аналита који су термолабилни. Други недостатак је и дуго одвијање екстракције које може трајати и сатима. У циљу отклањања ових недостатака развијају се други начини екстракције којима ће се екстраховати испитивани аналити, при нижим температурама и у краћем временском периоду. Како би се установила ефикасност екстракције аналита било којим начином екстракције врши се упоређивање концентрација аналита добијених неком методом са Сокслетовом методом и ефикасност се рачуна по формули:

$$\text{Ефикасност екстракције(\%)} = \frac{\text{концентрација аналита добијена неким начином екстракције}}{\text{концентрација аналита добијена екстракцијом по Сокслету}} \times 100 \quad (69)$$

Биљна ткива имају веома танак омотач који се може разорити деловањем ултразвука који представља још један начин за изоловање аналита. Ултразвук такође изазива бубрење и хидратацију биљног материјала што доводи до ширења пора пуцања ћелијског зида.

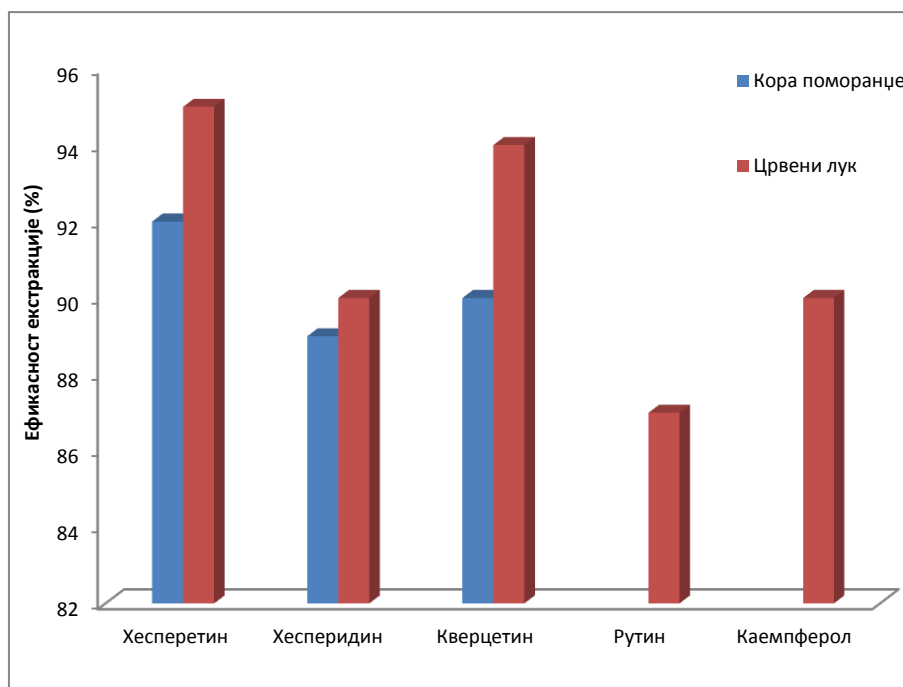
Суперкритична течна екстракција, SFE, се користи за екстракцију испарљивих једињења, као што су есенцијална уља и ароматична једињења из биљног материјала.

Предност SFE је кратко време извођења екстракције за мање од 30 минута, приликом чега се смањује употреба отровних растварача и коришћење гаса или течности за елуирање. Главна предност SFE је да се овим начином екстракције избегава деградација једињења која се јавља као резултат излагања узорка повишеној температури и атмосферском кисеонику.

Микроталасна екстракција користи енергију микроталаса за загревање раствора при чему долази до знатног скраћења времена екстракције. МАЕ такође омогућава знатно смањење употребе органских растварача (мање од 40 mL) у поређењу са Сокслетовом екстракцијом.

Екстракција при повишеном притиску је брза и ефикасна метода за екстракцију анализата из чврстих узорака као што је биљни материјал. Температура екстракције је важан експериментални фактор чијим повећањем долази до значајног повећања капацитета растварача, односа транспорта масе између течне и чврсте фазе, ефикасности квашења узорка и продирања у матрикс, при чему долази до побољшања екстракције и десорпције анализата са површине и активних места на чврстом узорку. Међутим, да би се постигле ове карактеристике потребно је повећавати притисак како би растварач и даље био у течном стању на повишеној температури.

У циљу испитивања ефикасности екстракције биофлавоноида из узорака коре поморанце и црвеног лука применом ултразвучне екстракције вршено је упоређивање концентрација испитиваних биофлавоноида добијених ултразвучном и Сокслетовом екстракцијом. Одређивање концентрација испитиваних анализата вршено је применом методе стандардног додатка на добијене екстракте. Добијени раствори су хроматографисани развијеном LC-MS/MS методом (колона Phenomenex 150×4,6 mm, 3 μm, мобилна фаза А: 2 % сирћетна киселина и В: ацетонитрил у градијентном начину елуирања, при пртоку мобилне фазе 0,7 mL/min и собној температури). Ефикасност ултразвучне екстракције биофлавоноида из узорака коре поморанце и црвеног лука представљен је на Слици 58. За ефикасност екстракције по Сокслету узето је да је 100 %.



Слика 58. Ефикасност екстракције биофлавоноида добијена ултразвучном екстракцијом из коре поморанџе и црвеног лука у поређењу са екстракцијом по Сокслету (ефикасност екстракције = 100 %)

Анализа резултата приказаних на Слици 58 применом једнофакторског ANOVA теста, показује да не постоји значајна разлика у ефикасности екстракције између Сокслетове и ултразвучне екстракције за оба узорка јер је $F_{crit} = 5,14$ мање од $F_{tab} = 23,84$. Због једноставности и брзине извођења ултразвучна екстракција је изабрана за даљи рад.

3.1.1. Течно-чврста екстракција биофлавоноида из екстраката коре поморанџе, црвеног лука и меда

Екстракција на чврстој фази је оптимизирана у циљу избора одговарајућег кертрица, запремине испитиваног анализата и врсте растварача за елуирање. За развој најефикасније SPE методе коришћено је пет различитих кертрица (LC-18, ENVI-18, DSC-18, LC-C8 и DSC-SAX) од истог произвођача (Supelco, САД). Карактеристике наведених кертрица дате су у Табели 26.

Табела 26. Карактеристике испитиваних Supelco кертрица.

DSC-18	<ul style="list-style-type: none"> • Полимерно везани октадецил остаци. • Више од 18 % угљеника за повећање капацитета везивања. • Мање осетљива фаза: задржава већину органских анализата из водене средине. • Погодна за екстракцију великог броја анализата различите структуре из истог узорка.
DSC-SAX	<ul style="list-style-type: none"> • Полимерно везан кветернерни амин који остаје наелектрисан на свим рН вредностима • Обично се користи за екстракцију слабих катјона (нпр. карбоксилне киселине) које се не везују довољно јако за слабији анјонски измењивач • Селективност се може модификовати мењањем контра јона са одговарајућим пуфером током кондиционирања
ENVI-18	<ul style="list-style-type: none"> • Полимерно везани октадецил остаци • Одлична за пречишћавање, екстракцију и концентровање анализата за водених раствора узорка • Више од 17 % угљеника, чиме се повећава капацитет везивања и добије веће искоришћење
LC-18	<ul style="list-style-type: none"> • Мономерно везани октадецил остаци • Више од 10 % угљеника • За реверзно-фазну екстракцију неполарних до умерено поларних једињења
LC-C8	<ul style="list-style-type: none"> • Мономерно везани октил остаци • Више од 7 % угљеника

Према препоруци произвођача кертрици су предкондиционирани са 5 mL метанола након чега је додато 5 mL дејонизоване воде. Припремљен је раствор смеше стандардних супстанци у води, у нормалном суду од 10 mL, након чега је овако добијен раствор пропуштени кроз кертриц при протоку од 1 mL/min. После наношења анализата, SPE кертриц је испран са 5 mL воде и остављен да се суши уз примену вакуума. На овај начин уклоњена је заостала вода са кертрица. Анализати су елуирани са 5 mL растварача (метанол, ацетонитрил). Екстракти добијени на овај начин су хроматографисани и ефикасност SPE методе је рачуната по формули:

$$\text{Ефикасност SPE екстракције (\%)} = \frac{\text{површина пика анализата после SPE}}{\text{површина пика анализата пре SPE}} \times 100 \quad (70)$$

Добијене вредности ефикасности SPE екстракције (\pm стандардна девијација, SD) за екстракцију флавоноида применом различитих врста кертрица приказане су у Табели 27.

Табела 27. Вредности ефикасности SPE екстракције \pm SD (%) флавоноида добијених применом различитих врста SPE кетрица и растварача коришћених за елуирање.

Биофлавоноиди	Ефикасност SPE екстракције (%) \pm SD									
	LC-C18		ENVI-18		DSC-18		LC-C8		DSC-SAX	
	MeOH	ACN	MeOH	ACN	MeOH	ACN	MeOH	ACN	MeOH	ACN
Кверцетин	97 \pm 2	56 \pm 2	77 \pm 2	59 \pm 3	54 \pm 1	42 \pm 2	70 \pm 2	56 \pm 2	74 \pm 1	67 \pm 2
Рутин	95 \pm 1	43 \pm 1	66 \pm 2	53 \pm 2	48 \pm 2	40 \pm 1	72 \pm 2	49 \pm 3	68 \pm 2	63 \pm 2
Хесперетин	96 \pm 2	50 \pm 2	86 \pm 2	52 \pm 3	54 \pm 2	46 \pm 2	64 \pm 2	64 \pm 3	65 \pm 1	64 \pm 3
Хесперидин	96 \pm 1	48 \pm 3	95 \pm 1	51 \pm 1	42 \pm 1	47 \pm 3	61 \pm 2	60 \pm 4	58 \pm 2	59 \pm 4
Каемпферол	93 \pm 4	57 \pm 3	95 \pm 1	53 \pm 2	48 \pm 2	42 \pm 1	67 \pm 2	61 \pm 2	61 \pm 2	58 \pm 2

На основу изложеног оптимални услови SPE екстракције за све испитиване биофлавоноиде сумирани су у Табели 28.

Табела 28. Оптимални услови SPE екстракције биофлавоноида.

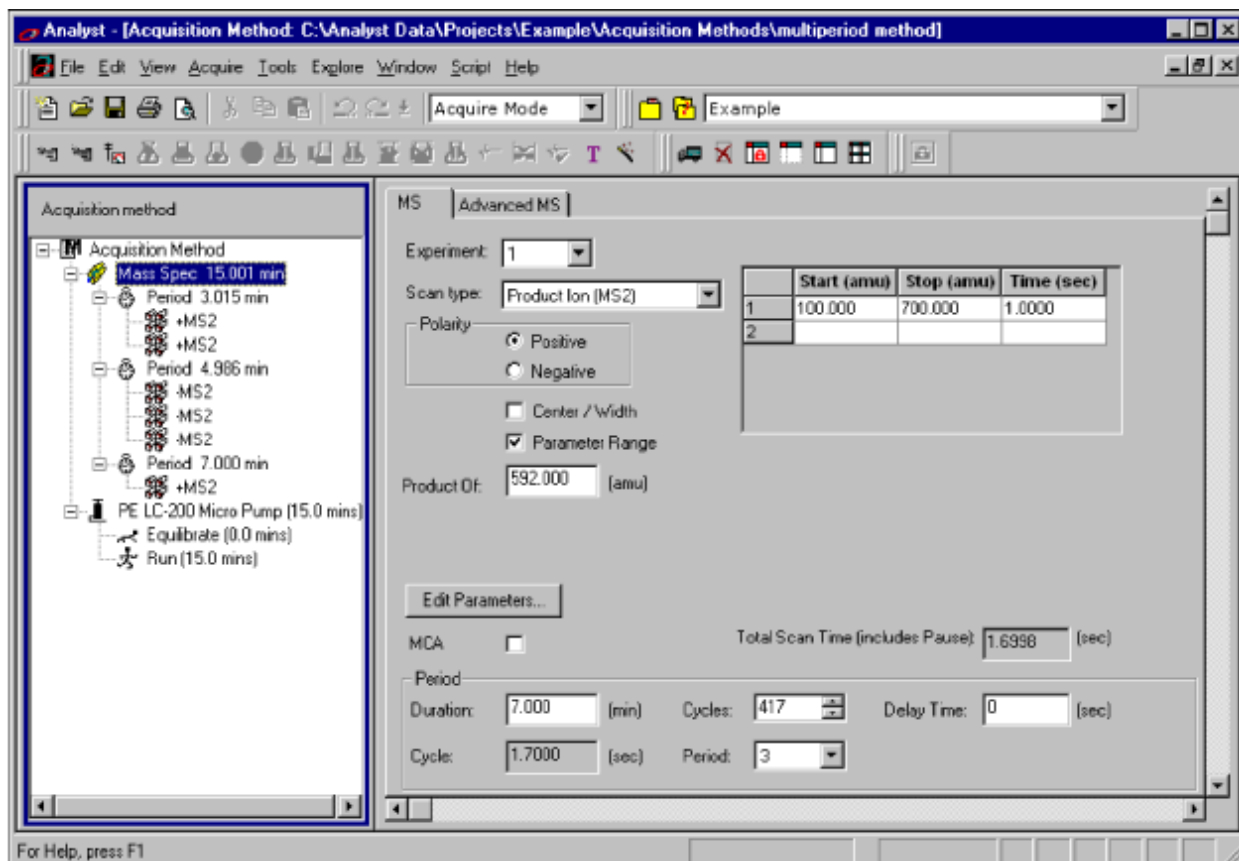
Врста кетрица	Supelco LC-18
Кондиционирање	5 mL метанола
	5 mL воде
Запремина узорка	10 mL
Проток	1 mL/min
Испирање	5 mL воде
Сушење	10 min под вакуумом
Елуент	5 mL метанол

Најбоља вредност ефикасности SPE екстракције за све испитиване анализе добијена је применом Supelco LC-18 кетрица и метанола као елуента, па је у даљем раду коришћен овај кетриц и растварач.

3.1.2. Оптимизација LC-MS/MS методе за одређивање биофлавоноида

Да би се повећала осетљивост квантитативне LC-ESI-MS/MS анализе изабран је негативни мод јонизације јер су флавоноиди, због депротонавања, негативно наелектрисани. Оптимални ESI услови су установљени тако што су појединачно инјектовани стандардни раствори рутина, кверцетина, хесперидина, хесперетина и каемпферола. Изабрани су потенцијали фокусирања који су дали максимум резолуције и интензитета сигнала, чист спектар, као и минималну позадинску емисију. Мерења су вршена при температури од 500 °C и напону спреја од - 4500 V. Задатак се заснивао на

праћењу [M–H]⁺ јона анализата у првом квадруполу и њиховог одговарајућег продукт јона у трећем квадруполу са временом задржавања од 50 ms. Подаци су прикупљени и обрађени коришћењем софтвера Analyst. Приказ радног прозора дат је на Слици 59.



Слика 59. Изглед радног прозора програма Analyst

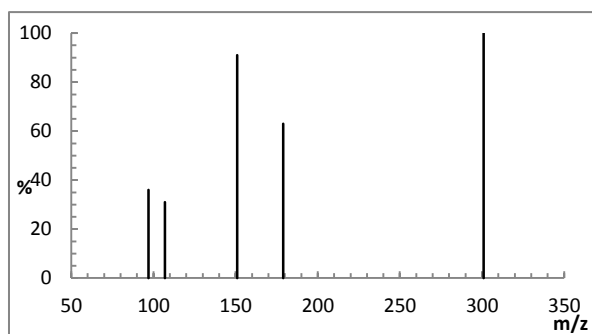
Радни параметри и други инструментални параметри су мануелно подешавани како би се добиле што боље перформансе инструмента за анализу. Мануелно подешавање инструмента се састоји у оптимизацији резолуције, сензитивности и калибрацији скале масе. Калибрација скале масе је урађена коришћењем калибрационог стандарда кофеина концентрације 100 µg/mL.

Након калибрације скале масе појединачни раствори анализата у метанолу концентрације 100 µg/mL директно су инјектовани помоћу шприца, при протоку од 10 µL/min. Оптимални експериментални параметри ESI интерфејса за максималну јонизацију испитиваних биофлавоноида дати су у Табели 29.

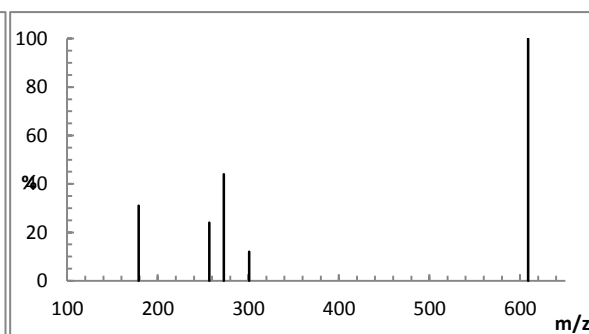
Табела 29. Оптимални инструментални услови за анализу у ESI-MS/MS.

	Хесперетин	Хесперидин	Рутин	Кверцетин	Каемпферол
Гас за распршивање, GS1 (mL/min)			20		
Помоћни гас, GS2 (mL/min)			60		
Температура, TEM (°C)			500		
Застор гаса, CUR			10		
Напон јонског спреја (V)			-4500		
Напон разлагања, DP (V)	-40	-57	-86	-21	-22
Напон на улазу, EP (V)	-5	-5	-8	-8	-3
Енергија судара, CE (eV)	-25	-34	-56	-31	-45
Напон на излазу из колизионе ћелије, CXP (V)	-6	-9	-4	-12	-6

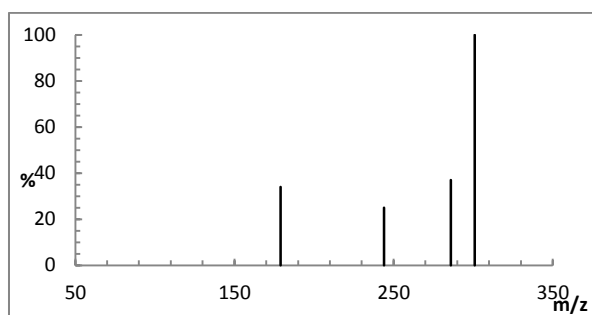
У свим анализима јон прекурсор био је $[M-H]^-$ где је М молекулска маса одређеног анализата, из кога као резултат губитка протона настаје негативно наелектрисани молекулски јон. Вредности молекулског јона m/z и његова релативна заступљеност за кверцетин је m/z 301 (100 %), рутин m/z = 609 (100 %), хесперетин m/z 301 (100 %), хесперидин m/z 609 (100 %), и за каемпферол m/z 285 (100 %). Како су вредности m/z исте за рутин и хесперидин и за кверцетин и хесперетин рађена је даља фрагментација (MS/MS мод) за њихову идентификацију и квантификацију. Прекурсор и главни јони и њихова релативна заступљеност у процентима је праћена у изабраном реакционом моду (selected reaction mode, SRM). Фрагментација молекулског јона кверцетина (m/z 301) дала је следеће јоне 179 (63 %), 151 (95 %), 107 (31 %), 97 (36 %), рутина m/z 609: 301 (12 %), 273 (44 %), 257 (24 %), 179 (31 %), хесперетина (m/z 301): 286 (37 %), 244 (25 %), 179 (34 %), 151 (63 %), хесперидина (m/z 609): 343 (45 %), 325 (30 %), 174 (37 %), 151 (24 %) и каемпферола (m/z 285): 256 (43 %), 243 (29 %), 228 (86 %), 125 (61 %). Ови MS/MS фрагменти су изабрани јер су најинтензивнији у MS спектру молекулског јона. Масени спектри испитиваних једињења дати су на Сликама 60, 61, 62, 63 и 64.



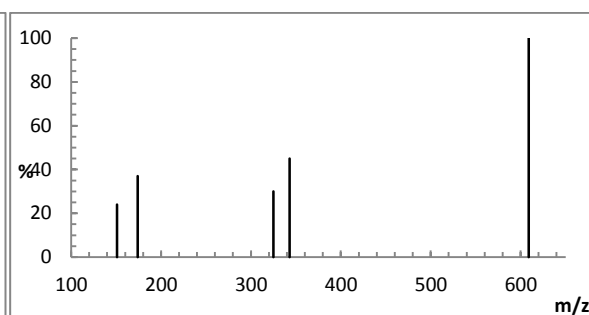
Слика 60. Масени спектар кверцетина



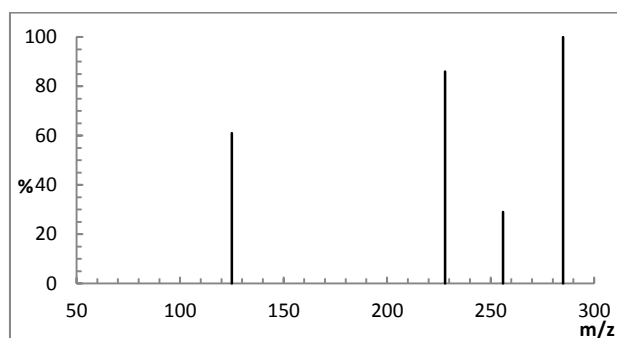
Слика 61. Масени спектар рутина



Слика 62. Масени спектар хесперетина



Слика 63. Масени спектар хесперидина



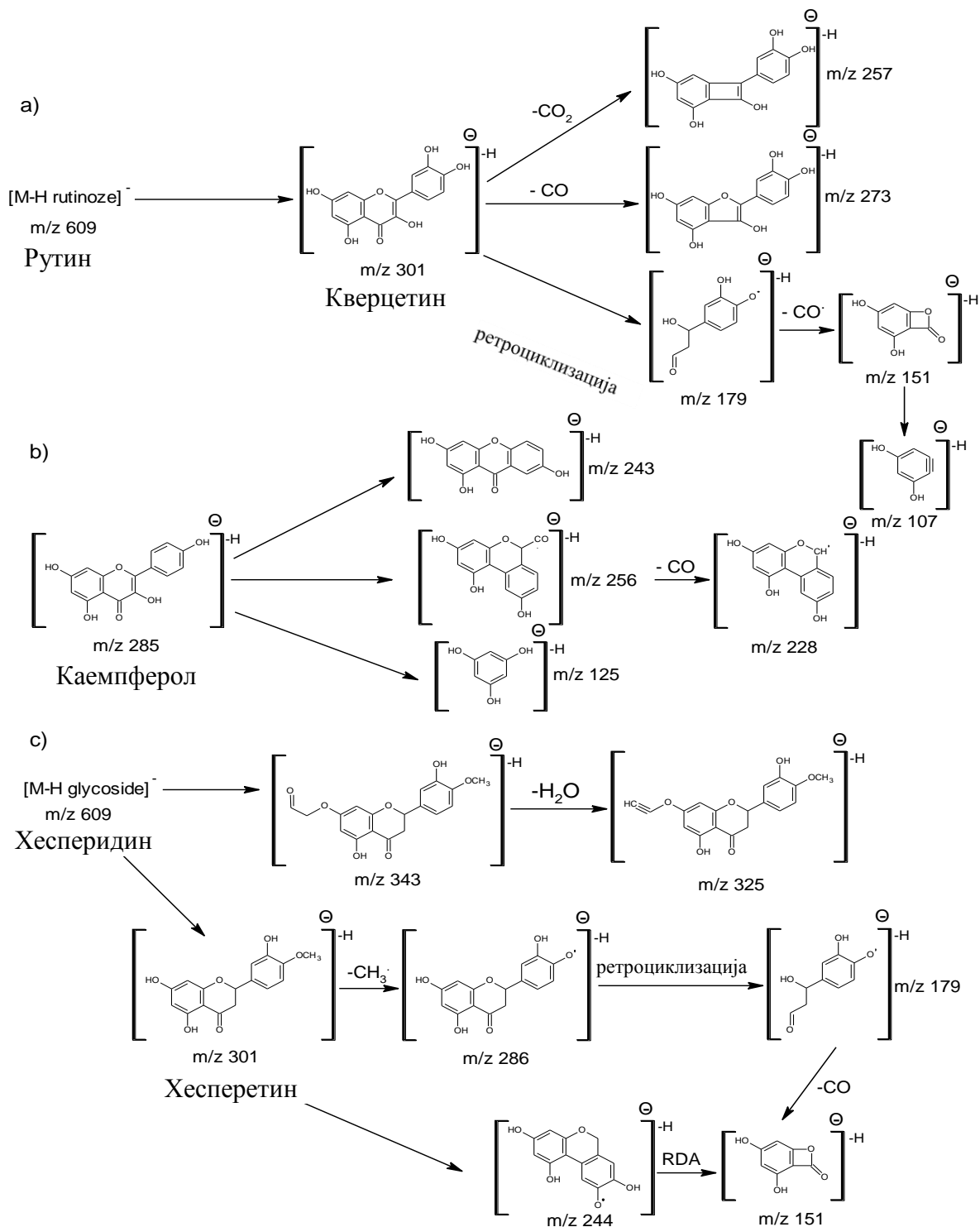
Слика 64. Масени спектар каемпферола

Избор јона у MS/MS спектру који су коришћени за идентификацију и квантификацију биофлавоноида дати су у Табели 30.

Табела 30. Јони у MS/MS спектру биофлавоноида

Биофлавоноид	m/z			
Кверцетин	301/179	301/151	301/107	301/97
Рутин	609/301	609/273	609/257	609/179
Хесперетин	301/286	301/244	301/179	301/151
Хесперидин	601/343	609/325	609/174	609/151
Каемпферол	285/256	285/243	285/228	285/125

На основу могуће фрагментације јона анализата одређене су врсте фрагмената који могу настати. На Слици 65 приказан је литературни пут фрагментације биофлавоноида [308, 309].



Слика 65. Фрагментације рутина, кверцетина, каемпферола, хесперидина и хеспетерина [308, 309]

Након оптимизације услова за масену идентификацију и квантификацију испитиваних анализата приступило се изналагању оптималних хроматографских услова за њихово одвајање. На основу литературних података уочено је да се користи градијентно елуирање. Мобилна фаза се састоји од смеше метанола и воде или ацетонитрила и воде. Као органски адитив користи се мравља или сирћетна киселина.

На почетку оптимизације хроматографских услова испитивана је мобилна фаза састављена од метанола и воде у којој је концентрација мравље киселина била 5 % v/v при линеарној промени градијента у току 60 минута од 5 – 90 % метанола. При овим условима испитивани анализати су елуирани сувише брзо и долазило је до преклапања пикова кверцетина и каемпферола. У следећем кораку метанол је замењен ацетонитрилом и снимљени су појединачни хроматограми стандардних супстанци при истој концентрацији мравље киселине и истом градијенту. Применом ових услова дошло је до споријег елуирања анализата са колоне, али се јављало развлачење пикова свих анализата.

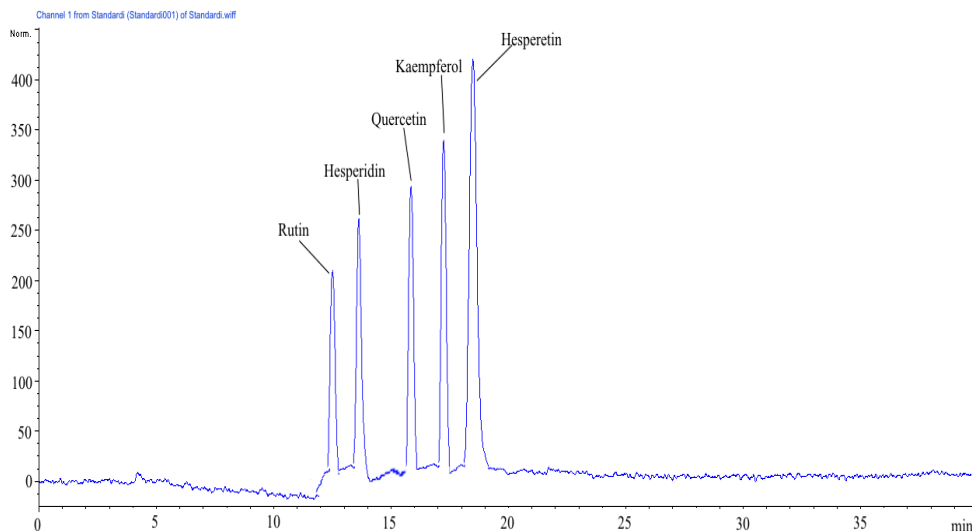
Да би се поправио изглед пикова мравља киселина је замењена сирћетном киселином и снимљени су појединачни спектри стандардних супстанци. Изглед пика је био значајно бољи, па је даље настављено са мобилном фазом састављеном од ацетонитрила и воде којој је додата сирћетна киселина у концентрацији од 5 % v/v.

У следећем кораку је мењана концентрација сирћетне киселине од 1 – 5 % како би се смањила њена потрошња. Концентрација сирћетне киселине при којој је и даље био добар изглед пика износила је 2 % v/v.

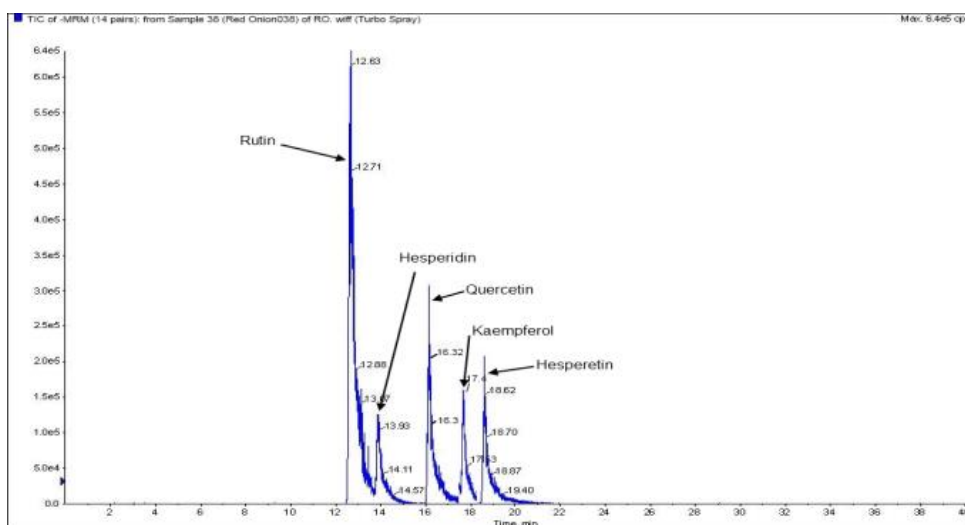
У циљу скраћења времена извођења анализе мењан је почетни однос мобилних фаза стим да се водило рачуна да се анализати не елуирају сувише брзо како би се избегло њихово заједничко елуирање са фенолним киселинама. Почетни однос мобилних фаза који је испунио задате услове износио је 15 % ацетонитрила и 85 % воде у којој је концентрација сирћетне износила 2 % v/v.

На основу претходних разматрања као оптимални услови за хроматографско раздвајање коришћена је мобилна фаза састављена од А: 2% сирћетне киселине у води и В: ацетонитрила. Растварачи су мешани у линеарном градијенту: 0 min – 85 % А и 15 % В, 5 min – 85 % А и 15 % В, 25 min – 10 % А и 90 % В, 30 min – 10 % А и 90 % В, 35 min – 85 % А и 15 % В, 40 min – 85 % А и 15 % В при протоку мобилне фазе од 0,7 mL/min на собној температури, а инјектована запремина износила је 20 µL.

При наведеним хроматографским условима снимљен је хроматограм смеше биофлавоноида концентрације 0,1 $\mu\text{g/mL}$ као и њихов ТИС (total ion chromatogram) који су приказани на Сликама 66 и 67.



Слика 66. HPLC-DAD хроматограм смеше стандарда биофлавоноида снимљен под ОПТИМАЛНИМ УСЛОВИМА



Слика 67. ТИС (total ion chromatogram) смеше стандарда биофлавоноида

Са Слика 66 и 67 може се видети да су испитивани флавоноиди добро раздвојени са резолуцијама $R_{s1,2} = 1,3$ за рутин и хесперидин, $R_{s2,3} = 3,2$ за хесперидин и кверцетин, $R_{s3,4} = 2,1$ за кверцетин и каемпферол и $R_{s4,5} = 1,3$ за каемпферол и хесперетин. Пикови су раздвојени на основној линији тако да су услови за добру хроматографију испуњени. Асигнација пикова у хроматограмима екстракта хране (кора поморанце, црвени лук и

мед) је урађена на основу ретенционих времена и масених спектра одговарајућих максимума пикова упоређивањем са стандардним једињењима.

Да би се испитала поузданост HPLC-MS/MS методе за анализу на садржај биофлавоноида проверене су перформансе ове методе анализирањем стандардних раствора анализата припремљених у метанолу. Калибрационе криве за сваки анализит су конструисане доношењем зависности површине пика анализата од одговарајуће концентрације. Калибрационе криве су линеарне у области концентрација од 0,05 до 10,00 $\mu\text{g/mL}$ и одговарајући регресиони параметри дати су у Табели 31.

Табела 31. Регресиони параметри за калибрационе криве ($Y=a+bX$; Y = интензитет сигнала, X = концентрација анализата, $\mu\text{g/mL}$) за калибрационе криве за најинтензивније SRM прелазе.

Једињење	Хесперетин		Хесперидин		Кверцетин		Рутин		Каемпферол	
SRM прелаз	301/286	301/244	609/325	609/174	301/179	301/151	609/301	609/273	285/256	285/243
Број тачака (N)	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
Нагиб (a) ($\times 10^5$)	3,1 \pm 0,8	1,8 \pm 0,1	4,8 \pm 0,1	9,6 \pm 0,1	3,0 \pm 0,1	1,8 \pm 0,1	4,6 \pm 0,1	1,4 \pm 0,1	7,6 \pm 0,1	3,6 \pm 0,1
Опсег ($\mu\text{g/mL}$)	0,05-10	0,05-10	0,05-10	0,05-10	0,05-10	0,05-10	0,05-10	0,05-10	0,05-10	0,05-10
Одсечак (b) ($\times 10^4$)	4,4 \pm 0,3	2,6 \pm 0,2	1,3 \pm 0,3	1,9 \pm 0,1	1,6 \pm 0,1	3,1 \pm 0,3	0,7 \pm 0,1	0,7 \pm 0,1	3,7 \pm 0,1	2,3 \pm 0,1
Стандардна грешка ($\times 10^4$)	7,9	4,8	0,4	8,6	2,6	4,8	6,7	1,9	5,6	3,7
Коефицијент детерминације (r^2)	0,9948	0,9945	0,9995	0,9994	0,9987	0,9937	0,9984	0,9986	0,9941	0,9976
LOD ($\mu\text{g/mL}$)	0,055	0,046	0,045	0,049	0,043	0,041	0,076	0,062	0,039	0,041
LOQ ($\mu\text{g/mL}$)	0,167	0,139	0,136	0,148	0,130	0,124	0,229	0,189	0,118	0,121

На основу вредности података приказаних у Табели 31 може се закључити да је развијена прецизна, тачна, осетљива и специфична LC-MS/MS метода за одређивање испитиваних биофлавоноида у узорцима хране (кора поморанџе, црвени лук и мед).

3.1.3. Испитивање утицаја матричног ефекта на одређивање биофлавоноида у екстрактима хране

Електроспреј јонизација (ESI) и хемијска јонизација при атмосферском притиску (APCI) су најчешће примењиване технике јонизације. Упркос чињеници да се

јонизација код њих заснива на различитим механизмима формирања јона, оба начина се сматрају „soft“ методама јонизације, који пре свега воде ка стварању депротонваног или протонваног молекула без фрагментације. Међутим, приликом анализе комплексних узорака долази до појачања или смањења интензитета MS сигнала који се назива матрични ефекат. Овај нежељени феномен је непоновљив и нерепродуктибилан између различитих анализа истог узорка, стога може утицати на квантитативно одређивање анализата. Предложени су различити механизми који објашњавају матрични ефекат код ESI јонизације, али је прихваћено да је он резултат конкуренције приликом јонизације између различитих врста које се заједно елуирају са колоне. Стога је потребно проценити матрични ефекат приликом развоја LC-ESI-MS/MS методе.

Квантификован је матрични ефекат приликом истовременог одређивања кверцетина, рутина, хесперидина, хесперетина и каемпфеола у узорцима екстракта хране (кора поморанце, црвени лук и мед) користећи LC-ESI-MS/MS методу.

Матрични ефекат у току развоја аналитичке методе може се проценити поређењем MS/MS одговора (површина пика и одговарајућа висина) анализата додатог у екстракт узорка са MS/MS одговором истог анализата присутног у мобилној фази, на неколико нивоа концентрација. Релативни ефекат матрикса, ME (%), се дефинише као однос између разлике површина MS/MS одговора стандардног раствора додатог у изоловани матрикса и одговора истог стандардног раствора раствореног у мобилној фази или растварачу и површине одговора стандардног раствора у мобилној фази или растварачу и дат је изразом:

$$ME(\%) = \frac{\text{површина пика оптерећеног матрикса} - \text{површина пика чистог раствора стандарда}}{\text{површина пика чистог раствора стандарда}} \times 100 \quad (71)$$

Да би се испитао утицај матричног ефекта на одређивање биофлавоноида методом пост-екстракције, у изоловани матрикс додате су одговарајуће запремине познатих концентрација (од 0,5 до 5,0 µg/mL) стандардних раствора анализата (четири нивоа концентрација). Водени екстракти узорака хране су припремљени, након чега су екстракти пропуштени кроз SPE кертрице на којима су се апсорбовали биофлавоноиди. Ефикасно пречишћавање анализата из екстракта узорака је постигнуто коришћењем Supelco LC-18 кертрица при чему су добијени екстракти ослобођени одређених супстанци и ендогених интерферирајућих супстанци. У преостали изоловани матрикс су након тога додате одређене запремине раствора познате концентрације биофлавоноида и израчунат ефекат матрикса користећи једначину 71. Добијени резултати приказани су у Табели 32.

Табела 32. Процењени матрични ефекат приликом одређивања биофлавоноида екстрахованих водом из узорак хране коришћењем методе пост-екстракције.

		Конс. ($\mu\text{g/mL}$)	0,5	1,0	2,5	5,0
		SRM прелаз	(ME \pm SD) (%)	(ME \pm SD) (%)	(ME \pm SD) (%)	(ME \pm SD) (%)
Кора поморанце	Хесперетин	301/286	-33 \pm 8	-30 \pm 2	-28 \pm 1	-24,45 \pm 0,03
		301/244	-41 \pm 2	-40 \pm 2	-38 \pm 1	-30,8 \pm 0,7
		301/179	-41 \pm 6	-39 \pm 2	-39 \pm 2	-30,2 \pm 0,9
		301/151	-36 \pm 3	-35 \pm 3	-34 \pm 1	-29 \pm 2
	Хесперидин	609/343	-40,3 \pm 0,2	-36,84 \pm 0,06	-30,1 \pm 0,5	-21,9 \pm 0,4
		609/325	-43,4 \pm 0,2	-36,00 \pm 0,09	-32,8 \pm 0,1	-23,9 \pm 0,1
		609/174	-43 \pm 1	-38,3 \pm 0,7	-34 \pm 1	-23,5 \pm 0,5
		609/151	-39,4 \pm 0,2	-35,4 \pm 0,2	-29,9 \pm 0,6	-23 \pm 2
	Кверцетин	301/179	-27 \pm 2	-22 \pm 5	-18 \pm 3	-16 \pm 2
		301/151	-26 \pm 2	-23 \pm 4	-17 \pm 2	-14 \pm 1
		301/107	-29 \pm 3	-24 \pm 3	-17 \pm 2	-15 \pm 2
		301/97	-29 \pm 3	-25 \pm 4	-18 \pm 3	-15 \pm 2
Мед	Хесперетин	301/286	-10 \pm 1	-8 \pm 1	-6 \pm 2	-5 \pm 2
		301/244	-13 \pm 2	-11 \pm 3	-9 \pm 1	-6 \pm 4
		301/179	-12 \pm 3	-7 \pm 2	-6 \pm 2	-6 \pm 1
		301/151	-4 \pm 3	-3 \pm 2	-3 \pm 2	-0,6 \pm 0,3
	Хесперидин	609/343	-15 \pm 5	-8 \pm 3	-6 \pm 2	-3 \pm 1
		609/325	-23 \pm 2	-16 \pm 2	-8 \pm 3	-8 \pm 2
		609/174	-15 \pm 2	-10 \pm 5	-5 \pm 2	-4 \pm 2
		609/151	-25 \pm 2	-20 \pm 2	-9 \pm 4	-5 \pm 3
	Кверцетин	301/179	-16 \pm 4	-10 \pm 2	-6 \pm 3	-4 \pm 1
		301/151	-16 \pm 3	-11 \pm 2	-7 \pm 2	-4 \pm 2
		301/107	-16 \pm 2	-11 \pm 2	-7 \pm 3	-3 \pm 1
		301/97	-16 \pm 3	-10 \pm 2	-7 \pm 3	-4 \pm 2
Кампферол	285/256	-11 \pm 2	-8 \pm 3	-6 \pm 1	-3 \pm 2	
	285/243	-11 \pm 2	-8 \pm 3	-6 \pm 1	-2 \pm 2	
	285/228	-13 \pm 2	-8 \pm 3	-6 \pm 2	-3 \pm 3	
	285/125	-11 \pm 2	-8 \pm 4	-5 \pm 1	-3 \pm 3	
Црвени лук	Хесперетин	301/286	-9,3 \pm 0,4	-7,4 \pm 0,7	-5 \pm 2	-1 \pm 5
		301/242	-11 \pm 1	-10 \pm 1	-8 \pm 1	-3,0 \pm 0,4
		301/174	-13 \pm 4	-12,2 \pm 0,6	-10 \pm 1	-6 \pm 6
		301/150	-6 \pm 2	-3 \pm 2	-2 \pm 2	-1,0 \pm 0,8
	Хесперидин	609/343	-14 \pm 2	-8 \pm 4	-5,66 \pm 0,05	-5 \pm 3
		609/325	-23 \pm 7	-16,10 \pm 0,03	-8,1 \pm 0,9	-7,8 \pm 0,2
		609/174	-48 \pm 7	-10 \pm 2	-9 \pm 2	-5 \pm 1
		609/151	-21 \pm 5	-16 \pm 7	-7 \pm 3	-5 \pm 1
	Кверцетин	301/179	-22 \pm 2	-17 \pm 2	-11 \pm 3	-5 \pm 4
		301/151	-23 \pm 5	-16 \pm 5	-12 \pm 4	-5 \pm 3
		301/107	-22 \pm 6	-15 \pm 4	-12 \pm 4	-5 \pm 4
		301/97	-23 \pm 4	-14 \pm 4	-11 \pm 2	-5 \pm 2
Рутин	609/300	-17,2 \pm 0,6	-15 \pm 4	-10 \pm 3	-6,4 \pm 0,3	
	609/271	-15 \pm 2	-12,6 \pm 0,5	-6,8 \pm 0,2	-5 \pm 1	
	609/255	-48 \pm 1	-20 \pm 7	-14 \pm 1	-9 \pm 5	
	609/179	-14 \pm 4	-12 \pm 4	-9 \pm 1	-3 \pm 2	
Кампферол	285/256	-20 \pm 4	-16 \pm 3	-12 \pm 2	-4 \pm 2	
	285/243	-19 \pm 5	-15 \pm 7	-11 \pm 4	-5 \pm 2	
	285/228	-19 \pm 5	-14 \pm 3	-10 \pm 4	-5 \pm 1	
	285/125	-18 \pm 3	-15 \pm 4	-10 \pm 3	-5 \pm 2	

Као што се може приметити из Табеле 32 у свим анализираним узорцима јавља се негативан матрични ефекат. Негативни матрични ефекат представља губитак аналитичког сигнала (јонска супресија) и за то је одговорна промена ефикасности јонизације. Матрични ефекат се смањује са повећањем концентрације анализата, а повећава са повећањем концентрације хесперидина. Ефекат матрикса је уопштено много мањи код узорка меда него код осталих узорака хране. Такође, на најинтензивније пикове у MS/MS спектру биофлавоноида утицај матрикса је најмањи. Покушана је оптимизација настајања продуктивних јона повећањем енергије колизије у трећем квадруполу (Q3), међутим, добијен је велики број фрагмената без побољшања осетљивости анализе.

Да би се испитао утицај растварача на количину супстанци које се елуирају заједно са испитиваним једињењима из реалних узорака као и на интензитет MS сигнала, стандардни раствор флавоноида концентрације 0,5 mg/mL додат је у екстракт узорка добијеног применом различитих растварача (метанол, ацетонитрил и вода). Ефекат матрикса је израчунат коришћењем једначине 72.

$$ME(\%) = \frac{\text{површина пика анализата по додатку стандарда} - \text{површина пика анализата из калибрационе криве}}{\text{површина пика анализата из калибрационе криве}} \quad (72)$$

Резултати испитивања дати су у Табели 33.

Табела 33. Ефекат матрикса (%) на одређивање биофлавоноида у узорцима хране методом стандардног додатка у различитим екстрактима.

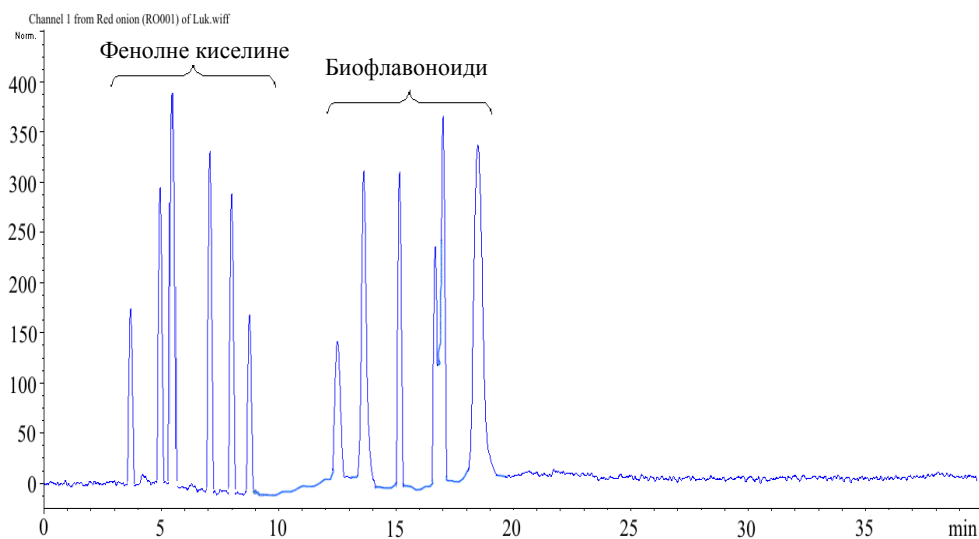
Узорак	Једињење	SRM прелаз	MeOH	H ₂ O	ACN
			Средња вредност ME (%) ± SD (%)	Средња вредност ME (%) ± SD (%)	Средња вредност ME (%) ± SD (%)
Кора поморанџе	Хесперетин	301/286	-110 ± 1	-102 ± 1	-112 ± 1
		301/244	-110 ± 1	-103 ± 1	-110 ± 1
		301/179	-108 ± 1	-103 ± 1	-110 ± 1
		301/151	-127 ± 1	-102 ± 1	-111 ± 1
	Хесперидин	609/343	-151 ± 2	-109 ± 7	
		609/325	-103 ± 3	-108 ± 1	
		609/174	-101 ± 3		
		609/151	-98 ± 4	-96 ± 2	
Кверцетин	301/179	-87 ± 2	-77 ± 3	-95 ± 3	
	301/151	-85 ± 3	-74 ± 4	-93 ± 3	
	301/107	-85 ± 3	-76 ± 5		
	301/97	-85 ± 2	-76 ± 4		

Мед	Хесперетин	301/286	-89 ± 2	-5 ± 6	
		301/244	-80 ± 2	-5 ± 7	
		301/179	-85 ± 1	-6 ± 5	
		301/151	-84 ± 2	-4 ± 5	
	Хесперидин	609/343	-15 ± 4	-46 ± 8	
		609/325	-19 ± 4	-42 ± 5	
		609/174	-15 ± 3	-48 ± 4	
		609/151	-12 ± 3	-44 ± 2	
	Кверцетин	301/179	-76 ± 5	-8 ± 4	
		301/151	-74 ± 4	-8 ± 4	
		301/107	-76 ± 5	-8 ± 4	
		301/97	-75 ± 5	-7 ± 4	
	Каемпферол	285/256	-63 ± 3	-13 ± 6	
		285/243	-63 ± 2	-14 ± 7	
		285/228	-63 ± 4	-12 ± 7	
		285/125	-62 ± 4	-12 ± 8	
Црвени лук	Хесперетин	301/286	-72 ± 2	-94 ± 1	-87 ± 1
		301/244	-74 ± 1	-96 ± 1	-85 ± 1
		301/179	-75 ± 1	-95 ± 2	
		301/151	-76 ± 2		-87 ± 1
	Хесперидин	609/343	-64 ± 3		-63 ± 4
		609/325	-64 ± 2		-69 ± 1
		609/174	-64 ± 5		
		609/151	-68 ± 6		
	Кверцетин	301/179	-71 ± 3	-52 ± 5	-32 ± 3
		301/151	-71 ± 4	-53 ± 4	
		301/107	-71 ± 3	-52 ± 5	-31 ± 3
		301/97	-71 ± 4	-51 ± 5	
	Рутин	609/301	-37 ± 1	-96 ± 4	-63 ± 2
		609/273			-65 ± 2
		609/257	-30 ± 6	-99 ± 5	-66 ± 9
		609/179	-34 ± 6		
Каемпферол	285/256	-64 ± 4	-38 ± 6	-49 ± 2	
	285/243	-64 ± 5	-38 ± 6		
	285/228	-61 ± 4	-39 ± 6	-47 ± 1	
	285/125	-65 ± 4			

Повећање јонске супресије примећено је у метанолу као растварачу у поређењу са водом, за узорак меда, док је код узорка коре поморанце и црвеног лука матрични ефекат скоро исти за све употребљене раствараче. Јонска супресија је много мање изражена код методе пост-екстракције него код методе стандардног додатка (поређење са Табелом 32). Метода пост-екстракције као калибрациони приступ, је изводљива само са матриксом који има састав сличан саставу екстракта (који не садржи аналит). Стога је одлучено да се ослонимо на методу стандардног додатка као калибрациону методу, која је препоручена као најпоузданија метода за анализу узорака који садрже доста интерферирајућих супстанци [53].

Примењена метода за припрему и пречишћавање узорака, не даје чист екстракт. Недостатак методе је у недовољном отклањању ендогених супстанци као што су фенолне киселине и фосфолипиди из анализата.

У нашем случају фенолне киселине се елуирају пре флавоноида, што је приказано на Слици 68.



Слика 68. HPLC-UV хроматограм полифенолних киселина и биофлавоноида

Приказан хроматограм показује да супстанце које се заједно елуирају изазивају једнаку супресију због смањења ефикасности јонизације.

Други биомакромолекули (липиди, масне киселине) заостају на SPE кертрицима. Главне сметње приликом електроспреј јонизације и хроматографског раздвајања биофлавоноида долазе од фенолних киселина, тако да развој LC методе укључује одвајање фенолних киселина од анализата.

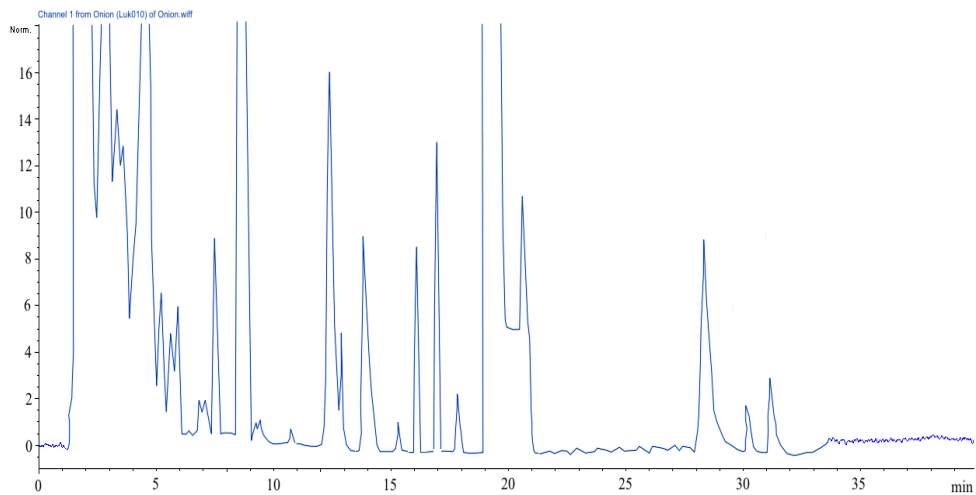
3.1.4. Одређивање биофлавоноида у узорцима црвеног лука, коре поморанце и меда

Начин побољшања тачности квантификоване методе и елиминисање интерференција треба разматрати приликом одређивања количине биофлавоноида у узорцима хране. Комплетно уклањање супстанци које се заједно елуирају приликом пречишћавања узорка није могуће постићи у случају наших узорака. Матрице су сложене и разликују се по саставу од узорка до узорка. Као последица тога чак и код истих поступака екстракције истих узорака, раствор екстракта може варирати између узорака. Ово значи да степен супресије сигнала изазваног од коелуираних супстанци такође варира од узорка до узорка. Може се закључити да је тешко и непрактично потпуно уклањање коелуираних супстанци које утичу на супресију сигнала. На основу тога, метода избора у нашем случају је метода стандардног додатка. У анализирани раствор екстракта се додаје позната количина стандардног раствора, а за израчунавање количине флавоноида се користи формула:

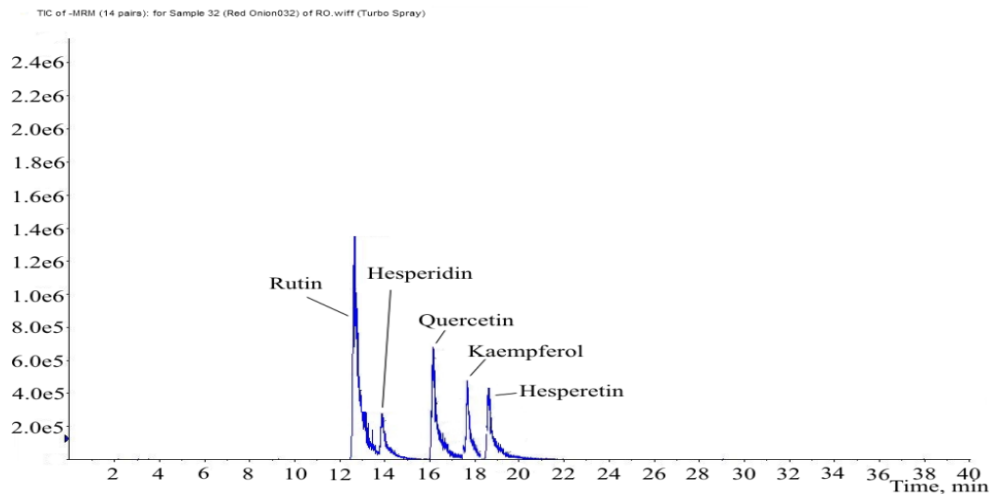
$$X_i = \frac{I_x}{I_{s+i}} (S_f + X_f) \quad (73)$$

где је X_i количина биофлавоноида у раствору екстракта; S_f је количина биофлавоноида додатог у раствор екстракта; I_x је интензитет сигнала биофлавоноида у раствору екстракта и I_{s+x} је интензитет сигнала биофлавоноида у оптерећеном раствору.

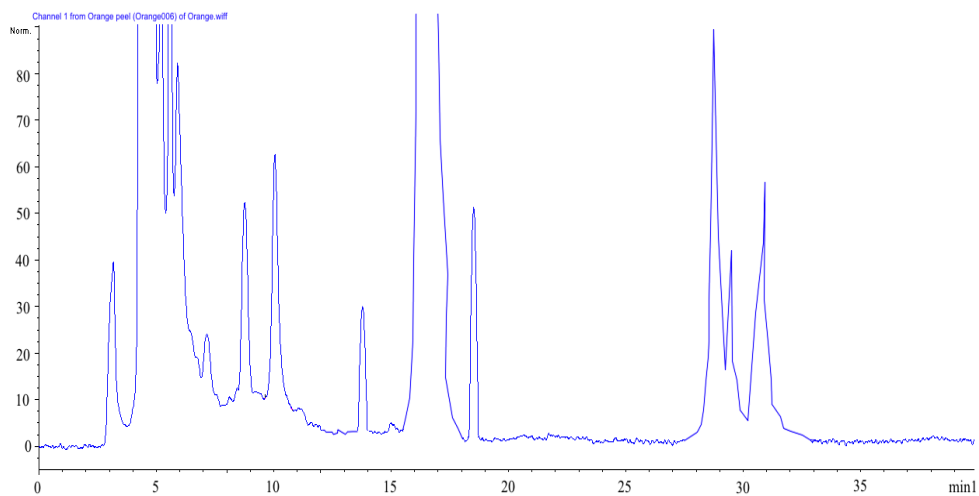
Репрезентативни HPLC-UV и укупни хроматограми јона (TIC) метанолских екстраката коре поморанце, црвеног лука и меда, приказани су на Сликама 69, 70, 71, 72, 73 и 74.



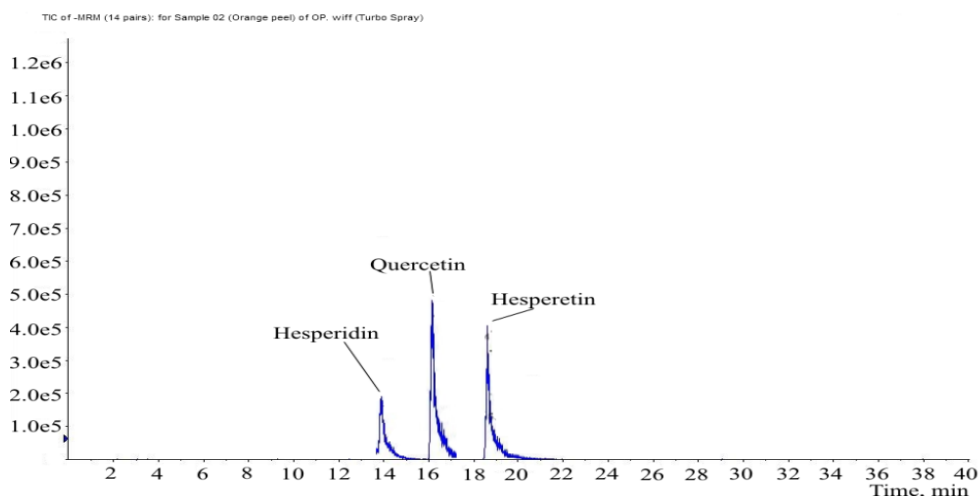
Слика 69. HPLC-UV хроматограм екстракта црвеног лука добијеног ултразвучном екстракцијом на 280 nm



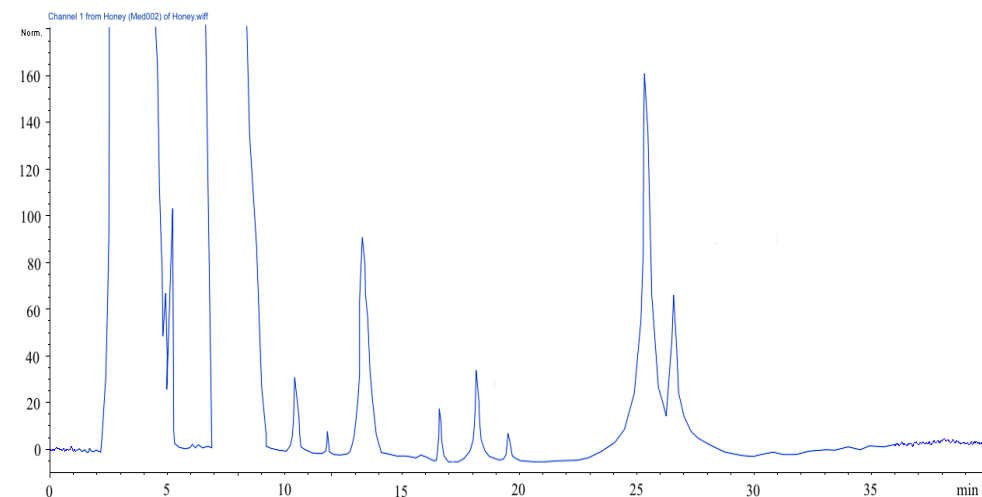
Слика 70. ТИС екстракта црвеног лука



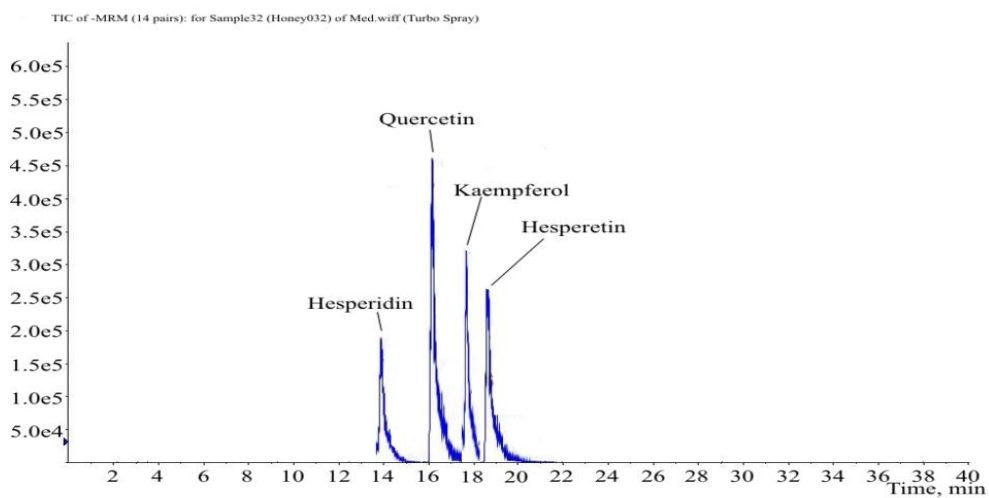
Слика 71. HPLC-UV хроматограм екстракта коре поморанџе добијеног ултразвучном екстракцијом на 280 nm



Слика 72. ТИС екстракта коре поморанце



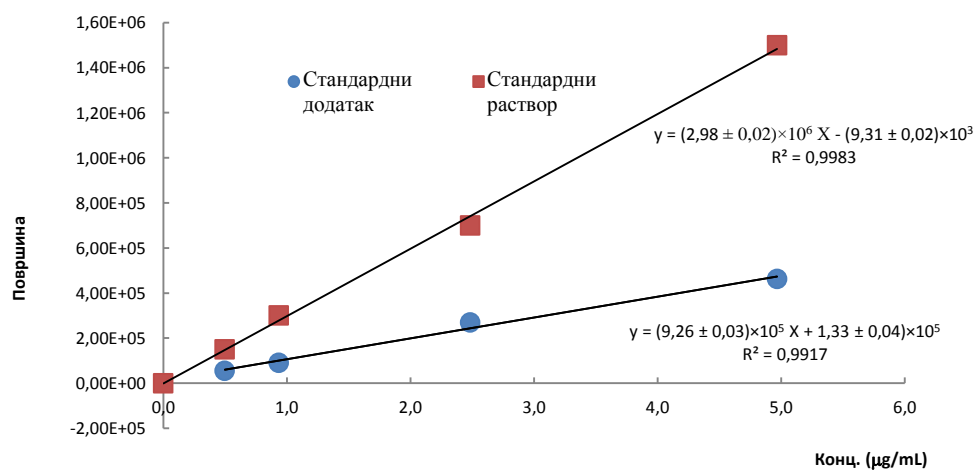
Слика 73. HPLC-UV хроматограм екстракта меда добијеног ултразвучном екстракцијом на 280 nm



Слика 74. ТИС екстракта меда

Након развоја процедуре за одређивање испитиваних једињења, извршена су специфична масено спектрометријска мерења за растворе анализираних узорака. Процес идентификације и квантификације се заснива само на сигналу циљаних анализита и може бити веома критичан у случају јонске супресије.

Узорци коре поморанце, црвеног лука и меда су анализирани на садржај кверцетина, рутина, хесперетина, хесперидина и каемпферола коришћењем методе стандардног додатка. На Слици 75 је приказана калибрациона крива за хесперетин у метанолу и крива за методу стандардног додатка за одређивање хесперетина у кори поморанце.



Слика 75. Калибрациона крива и крива за методу стандардног додатка за хесперетин

Велика разлика у положајима кривих показује јак утицај матричног ефекта. Линеарна крива за методу стандардног додатка је добијена у концентрационом опсегу за додати стандардни раствор биофлавоноида од 0,05 – 0,5 µg/mL (четири нивоа концентрација). Линеарност је потврђена вредностима регресионог коефицијената већим од 0,98 и Cochran-овим тестом хомосхедастичности ($G_{\max} = s_{\max}^2 / \sum s_i^2$) који је поређен са табеларним вредностима. Нулта хипотеза је једнакост појединих тачака стандардне девијације, прихватљива ако је $G_{\max} < G_{\text{table}}$, показујући хомогену дистрибуцију стандардне девијације.

На основу методе стандардног додатка, за сваки узорак, одређена је количина испитиваних биофлавоноида. Резултати одређивања биофлавоноида у изабраним узорцима приказани су у Табели 34.

Табела 34. Садржај биофлавоноида у узорцима коре поморанце, црвеног лука и меда и поређење са литературним подацима.

Храна	Једињење	Садржај (mg/100 g fw)	CV (%)	Искоришћење (%)	Вредност одсечка $\pm SD_x$	t-тест	Садржај (mg/100 g fw) литературна
Кора поморанце	Хесперетин	36,4	5,87	91,5	0,14 \pm 0,08	0,2535	31 – 41,4 [29,30]
	Хесперидин	24,3	3,42	103,5	0,06 \pm 0,01	0,1205	18 – 66,5 [29,30]
	Кверцетин	0,65	2,56	93,47	0,10 \pm 0,11	0,1758	0,00 – 2,20 [31,32]
Црвени лук	Хесперетин	0,0068	2,36	108,7	0,19 \pm 0,01	0,2402	0,0064 – 0,0076 [33-35]
	Хесперидин	0,016	3,59	87,6	0,04 \pm 0,04	0,0932	0,001 – 0,03 [33-35]
	Кверцетин	56,3	3,68	99,37	0,24 \pm 0,02	0,2873	0,00 – 191,7 [35-41]
	Рутин	0,16	4,73	93,4	0,62 \pm 0,11	0,2663	0,17 – 0,27 [41]
	Каемпферол	1,63	5,61	92,4	0,41 \pm 0,11	0,1873	0,00 – 4,5 [42-44]
Мед	Хесперетин	0,072	3,38	105,6	0,63 \pm 0,23	0,2617	0,028 – 0,084 [45,46]
	Хесперидин	14	6,48	106,4	0,13 \pm 0,02	0,2822	12 – 26 [46]
	Кверцетин	0,67	3,56	91,4	0,19 \pm 0,02	0,3014	0,02 – 1,3 [45-50]
	Каемпферол	0,14	4,1	87,65	0,38 \pm 0,06	0,1489	0,05 – 0,17 [45-50]

fw – свеж тежина, CV- коефицијент варијације, SD_x – стандардна девијација одсечка

Наши резултати у поређењу са литературним подацима [29 - 50] за садржај биофлавоноида у храни (Табела 34), показује одговарајуће слагање.

3.2. Оптимизација HPLC методе за одређивање биофлавоноида у узорцима фамилије *Brassica*

У циљу оптимизације HPLC методе за одређивање биофлавоноида у узорцима фамилије *Brassica* извршена су:

- Прелиминарна испитивања,
- Избор одговарајуће HPLC колоне за одвајање анализата,
- Избор одговарајуће мобилне фазе,
- Избор температуре,
- Избор погодне таласне дужине детекције,
- Рачунарски потпомогнута оптимизација RP-HPLC методе,
- Примена оптимизоване RP-HPLC методе за одређивање биофлавоноида у узорцима фамилије *Brassica*

3.2.1. Прелиминарна испитивања

Прелиминарна испитивања хроматографских услова за одвајање биофлавоноида (кверцетина, каемпферола, апигенина, лутеолина, катехина и епикатехина) вршена су коришћењем стандардних супстанци фирме Sigma-Aldrich (Беч, Аустрија).

На основу испитивања физичко-хемијских особина биофлавоноида изводи се закључак да су они слабе хетероцикличне киселине које имају константе дисоцијације (pK_a) у области од 6 – 12.

Највише пажње, током прелиминарних испитивања, било је посвећено избору органског растварача мобилне фазе као и одговарајућег пуфера којим је подешавано рН мобилне фазе (мравља и сирћетна киселина). Како су биофлавоноиди умерено поларна једињења најбоља растворљивост се постиже у мобилној фази умерене поларности, а то изискује примену реверзно-фазне хроматографије.

Током прелиминарних испитивања коришћена је само Thermo Science Hypersil GOLD aQ (150×4,6 mm, 5 μ m) колона, која је намењена за одређивање анализата из комплексног узорка, уз малу потрошњу мобилне фазе. Колона је пуњена силика-гелом са октадецил остацима који су хемијски везани за порозни силика-гел. Сферне хибридне честице садрже и неорганске (силика-гел) и органске (органосилоксан) компоненте хемијски модификоване на површини са трифункционалним

октадецилсилил групама. На тај начин се смањује интеракција октадецилсилил група са базним једињењима. У прелиминарним испитивањима је био циљ да се употребе до сада описани поступци у литератури.

Како је одвајање биофлавоноида на реверзно-фазним колонама тешко, јавља се проблем око ширења пика и брзог проласка кроз колону (процент ацетонитрила већи од 15) са малом ефикасношћу раздвајања, стога је потребно оптимизовати хроматографске услове за њихово одвајање.

3.2.2. Оптимизација RP-HPLC методе за одређивање биофлавоноида у узорцима фамилије *Brassica*

Циљ оптимизације RP-HPLC методе, за одређивање биофлавоноида, био је да се избегне градијентно елуирање и на тај начин скрати време извођења анализе, али да су при томе задовољени сви хроматографски параметри добре хроматографије, као и да због примене DAD детекције метода буде селективна, прецизна, тачна и поуздана. У ту сврху било је потребно наћи оптимални удео органске фазе као и процентни садржај органског адитива (сирћетне киселине) у мобилној фази.

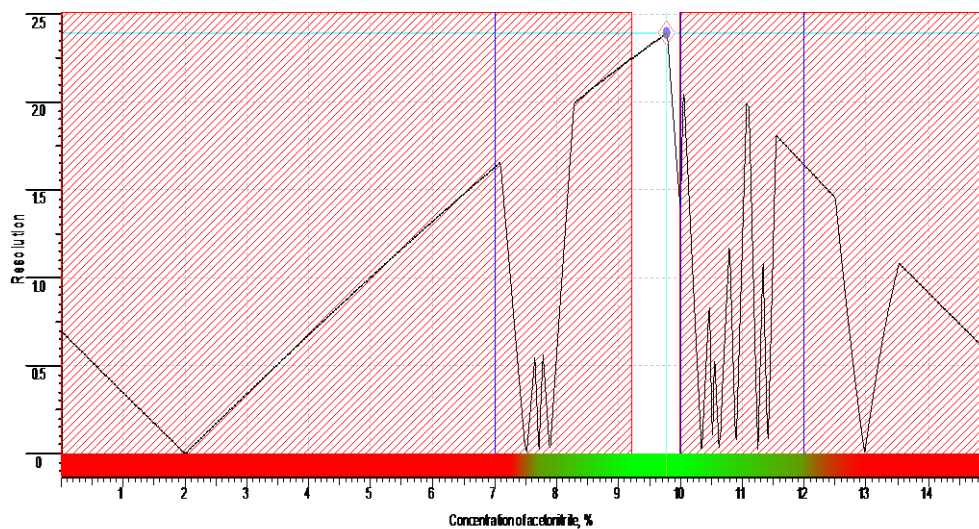
Развој хроматографске методе за ову класу једињења представља изазов имајући у виду сличност њихових структура, а самим тим и физичко-хемијских карактеристика. Услови за развој методе су изабрани на основу поларности анализата и мобилне фазе.

Развој методе почео је коришћењем Hypersil GOLD aQ колоне (150×4,6 mm, 5 μm величина честице). Колона садржи хибридни органско/неоргански материјал. Коришћене су различите мобилне фазе како би се добили хроматограми са задовољавајућом резолуцијом између пикова анализата, у прихватљивом временском интервалу. Састав мобилне фазе је изабран након неколико покушаја са метанолом, ацетонитрилом и водом у различитим односима и при различитим рН вредностима, при градијентном начину елуирања. Да би се побољшао облик пика сирћетна киселина је додата у мобилну фазу како би се спречила дисоцијација хидроксилних група биофлавоноида [310 – 312]. Промене рН вредности мобилне фазе такође утичу на резолуцију пикова. Према Michalkiewicz-у и сарадницима [313], повећање рН мобилне фазе смањује ретенцију биофлавоноида. Уколико се примени градијентни начин елуирања са мобилном фазом у којој преовлађује вода и у коју је додата киселина и постепено повећава удео метанола, одвајање биофлавоноида се врши у дугом

временском интервалу и са лошом резолуцијом пикова. Ако се уместо метанола примени ацетонитрил, одвајање биофлавоноида се побољшава и скраћује се време анализе.

Из нашег претходног рада [314] нађено је да оптимална температура колоне износи 30 °С. Оптимизација одвајања анализата је почела са две линеарне градијентне анализе: $t_G = 30 \text{ min}$ и $t_G = 60 \text{ min}$; % ацетонитрила се мењао од 15 – 85 % и са 2 % сирћетне киселине у циљу проналажења оптималног процента ацетонитрила и минималног броја експеримената за извођење изократских анализа. Таласне дужине на којима се вршило мерење износиле су 260 и 280 nm, а изабране су на основу апсорпционих максимума испитиваних анализата. Идентификација пикова је потврђена инјектовањем појединачних раствора стандарда.

Подаци потребни за анализу (ретенциона времена, површина и ширина пикова) из добијених хроматограма су ручно унети у програм LC-Simulator. Добијена 1D мапа резолуције приказана је на Слици 76.



Слика 76. 1D мапа резолуције добијена у $t_G/\%$ ацетонитрила оптимизацији са 2 % сирћетном киселином и на температури од 30 °С

Погодни услови за раздвајање испитиваних биофлавоноида изражени су преко различитих боја: зелена за прихватљиве услове, а црвена за неприхватљиве услове раздвајања биофлавоноида.

У следећој фази истовремено су оптимизовани концентрација сирћетне киселине и удео ацетонитрила за изократско извођење анализа. На основу експериментаног дизајна изведено је девет изократских анализа у току $t_I = 20 \text{ min}$. Експериментални

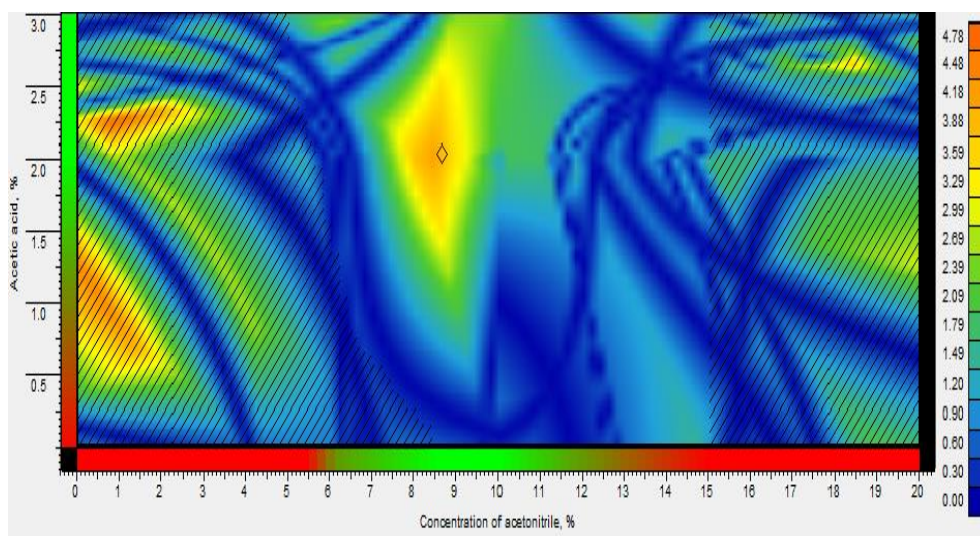
подаци и добијени резултати за компјутерску оптимизацију експерименталних услова дати су у Табели 35.

Табела 35. Експериментани услови и одговарајући подаци добијени са хроматограма који су коришћени за оптимизацију методе.

Колона Нуперсил GOLD aQ (150×4,6 mm, 5 μm), таласна дужина 260 nm, температура 30 °C, проток 1 mL/min									
Услови	95 : 5; 1% сирћетна киселина : ацетонитрил			90 : 10; 1% сирћетна киселина : ацетонитрил			85 : 15; 1% сирћетна киселина : ацетонитрил		
	t _r	Површина	Ширина	t _r	Површина	Ширина	t _r	Површина	Ширина
Кверцетин	3,149	78324	0,284	3,564	32648	0,193	3,077	10452	0,204
Каемпферол	9,865	53837	0,357	3,568	12364	0,387	3,659	14756	0,208
Катехин	8,756	57658	0,272	5,359	18651	0,268	3,454	14698	0,256
Лутеолин	18,07	73159	0,348	6,385	13684	0,268	8,696	10479	0,326
Апигенин	16,52	76825	0,239	7,326	23265	0,365	6,879	17856	0,172
Епикатехин	14,49	47689	0,342	11,326	10946	0,462	3,785	10752	0,136
Услови	95 : 5; 2% сирћетна киселина : ацетонитрил			90 : 10; 2% сирћетна киселина : ацетонитрил			85 : 15; 2% сирћетна киселина : ацетонитрил		
	t _r	Површина	Ширина	t _r	Површина	Ширина	t _r	Површина	Ширина
Кверцетин	2,146	54492	0,200	2,074	37282	0,090	2,077	10092	0,204
Каемпферол	5,949	28749	0,308	2,525	15740	0,260	2,458	10088	0,208
Катехин	6,670	15524	0,292	4,163	17251	0,230	1,454	15566	0,182
Лутеолин	16,06	10398	0,348	4,482	12994	0,190	7,696	10059	0,326
Апигенин	13,63	20808	0,332	6,448	21418	0,320	4,879	18448	0,172
Епикатехин	12,52	20846	0,310	9,613	10157	0,320	1,785	10702	0,136
Услови	95 : 5; 3% сирћетна киселина : ацетонитрил			90 : 5; 3% сирћетна киселина : ацетонитрил			85 : 15; 3% сирћетна киселина : ацетонитрил		
	t _r	Површина	Ширина	t _r	Површина	Ширина	t _r	Површина	Ширина
Кверцетин	2,949	28749	0,308	0,895	15740	0,260	1,358	40088	0,208
Каемпферол	3,470	15524	0,292	1,163	17251	0,230	0,875	35566	0,182
Катехин	1,146	33544	0,200	2,074	37282	0,090	1,237	10092	0,204
Лутеолин	10,43	40846	0,310	4,613	10157	0,320	1,255	10702	0,136
Апигенин	11,24	20808	0,332	6,448	21418	0,320	2,879	18448	0,172
Епикатехин	14,05	10398	0,348	7,482	12994	0,190	5,496	10059	0,326

Хроматографски параметри (ретенционо време, површина и ширина пика) су ручно унети у програм при датим експерименталним условима.

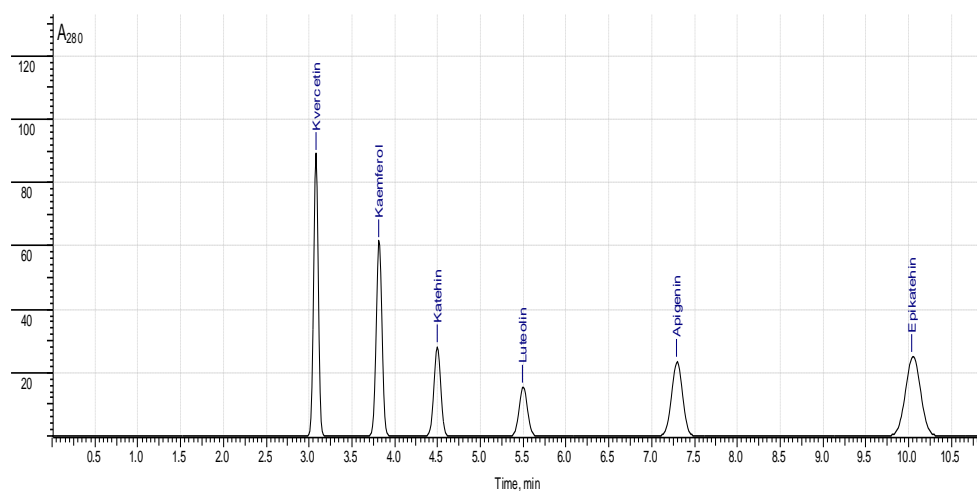
Програм LC-Simulator је дао мапу резолуције приказану на Слици 77.



Слика 77. 2D мапа резолуције добијена рачунарском симулацијом применом програма LC-Simulator

Мапа резолуције је представљена као тродимензионални график, при чему се два фактора (концентрација сирћетне киселине и проценат ацетонитрила) који се налазе на осам координативног система, а трећа димензија (укупна резолуција) је приказана различитим бојама.

На Слици 78 је представљен симулирани хроматограм добијен при оптималним условима.



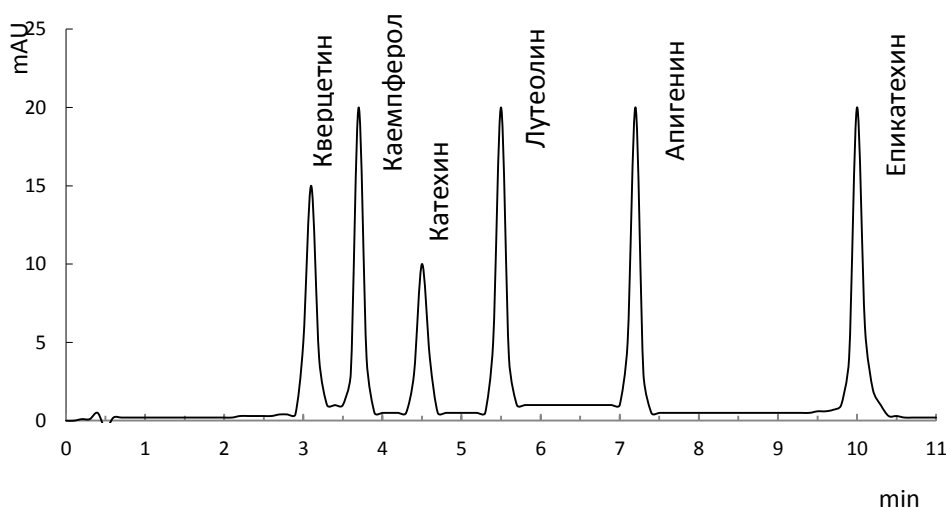
Слика 78. Хроматограм биофлавоноида добијен компјутерском симулацијом коришћењем програма LC-Simulator

На основу тога оптимални услови за одвајање испитиваних биофлавоноида су дати у Табели 36.

Табела 36. Оптимални услови за сепарацију и одређивање биофлавоноида у узорцима фамилије *Brassica* утврђени компјутерском симулацијом.

Параметар	Опимални услови
Колона	Hypersil GOLD aQ (150×4,6 mm, 5 μm)
Проток	1 mL/min
Температура	30 °C
Детекција	UV 260 nm
Запремина инјектовања	20 μL
% ацетонитрила	9 %
pH вредности мобилне фазе	4,0
% сирћетне киселине	2 %

При нађеним оптималним хроматографским условима снимљен је хроматограм смеше стандарда биофлавоноида. Добијени хроматограм смеше биофлавоноида под оптималним условима дат је на Слици 79.

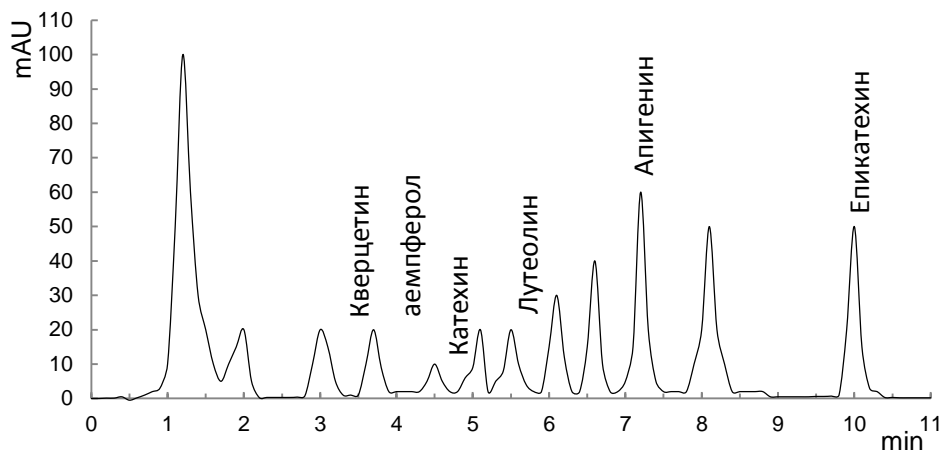


Слика 79. Хроматограм стандарда биофлавоноида под оптималним условима

Са Слика 78 и 79 уочава се веома добро слагање између симулираног и експерименталног хроматограма добијеног под оптималним условима са просечном грешком од 1 до 5 % за ретенциона времена и резолуцију. Пре саме анализе узорака купуса, проверене су перформансе хроматографске методе анализирањем раствора стандардних супстанци у метанолу.

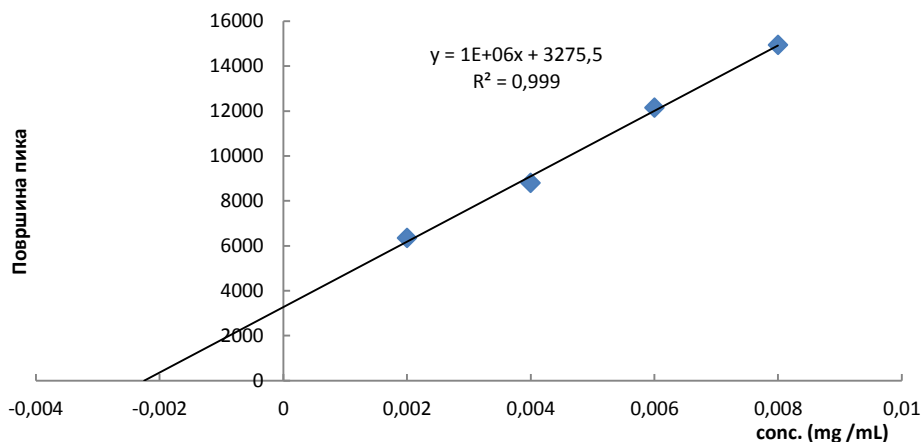
3.2.3. Одређивање биофлавоноида у узорцима фамилије Brassica

Због сложености матрикса као метода избора за одређивање биофлавоноида у узорцима фамилије *Brassica* намеће се метода стандардног додатка, тј. у анализиране растворе екстракта запремине 3 mL су додате одређене запремине (100, 200, 300 и 400 μ L) смеше стандарда тачно познате концентрације и разблажене метанолом у нормалном суду од 5 mL. Тако припремљени раствори фамилије *Brassica* су хроматографисани. Репрезентативни хроматограм екстракта свежег броколија приказан је на Слици 80.



Слика 80. Хроматограм екстракта свежег броколија

Анализом добијених хроматограма конструисане су криве за методу стандардног додатка помоћу којих је одређен садржај биофлавоноида у узорцима фамилије *Brassica*. На Слици 81 је представљен график за одређивање кверцетина у екстракту карфиола добијеном ултразвучном екстракцијом.



Слика 81. Одређивање кверцетина у узорку свежег карфиола методом стандардног додатка

Непознате концентрације флавоноида су одређене из конструисаних кривих за сваки аналит као зависност површине пика аналита од концентрације додатог стандарда. Непозната концентрација је очитана као одсечак на x-оси, а несигурност одсечка је израчуната по формули:

$$SD = \frac{s_y}{|a|} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{\bar{y}^2}{a^2 \times (x_i - \bar{x})^2}} \quad (74)$$

где је s_y стандардна девијација у очитавању сигнала, a нагиб, n број испитиваних тачака, x концентрација аналита и y површина пика. Интервал поверења је рачунат као производ између t и SD_x , где је t вредност Student-овог параметра за $n-2$ степена слободе.

Применом описане методе одређен је садржај биофлавоноида у екстрактима карфиола, броколија и прокеља (свежег и смрзнутог) (Табела 37).

Табела 37. Садржај биофлавоноида (mg/100g свеже масе) за различите врсте *Brassica*.

Карфиол	Једињење	Сокслетова екстракција	Ултразвучна екстракција	Екстракција мацерацијом	Екстракција водом	Литературна вредност	Реф
Свеж	Кверцетин	0,94 ± 0,05	0,9 ± 0,1	0,75 ± 0,09	0,64 ± 0,10	0,83	315
	Каемпферол	0,14 ± 0,08	0,11 ± 0,09	0,09 ± 0,08	0,1 ± 0,05	0,25	315
	Катехин	0,52 ± 0,07	0,48 ± 0,06	0,42 ± 0,08	0,31 ± 0,03		
	Лутеолин	0,07 ± 0,04	0,06 ± 0,07	0,05 ± 0,05	0,03 ± 0,09	0,07	315, 316, 317
	Апигенин	0,025 ± 0,05	0,022 ± 0,08	0,015 ± 0,1	0,01 ± 0,07	0,03	315, 316, 317
	Епикатехин	0,52 ± 0,06	0,41 ± 0,09	0,30 ± 0,06	0,25 ± 0,06		
Смрзнут	Кверцетин	0,73 ± 0,04	0,75 ± 0,09	0,61 ± 0,09	0,56 ± 0,08		
	Каемпферол	0,22 ± 0,06	0,21 ± 0,08	0,19 ± 0,08	0,12 ± 0,05	0,25	318
	Катехин	0,88 ± 0,08	0,87 ± 0,08	0,77 ± 0,08	0,54 ± 0,03	0,83	318
	Лутеолин	0,32 ± 0,09	0,35 ± 0,04	0,28 ± 0,05	0,18 ± 0,08		
	Апигенин	0,12 ± 0,06	0,12 ± 0,1	0,09 ± 0,1	0,03 ± 0,09		
	Епикатехин	0,26 ± 0,05	0,29 ± 0,08	0,24 ± 0,06	0,18 ± 0,06		
Броколи	Једињење	Сокслетова екстракција	Ултразвучна екстракција	Екстракција мацерацијом	Екстракција водом	Литературна вредност	Реф
Свеж	Кверцетин	2,78 ± 0,05	2,71 ± 0,1	2,65 ± 0,09	2,54 ± 0,10	2,51	319, 320
	Каемпферол	3,71 ± 0,08	3,60 ± 0,09	3,52 ± 0,08	3,52 ± 0,05	4,01	319, 320
	Катехин	0,60 ± 0,07	0,58 ± 0,06	0,32 ± 0,08	0,28 ± 0,03		
	Лутеолин	0,81 ± 0,04	0,77 ± 0,07	0,55 ± 0,05	0,36 ± 0,09	0,86	316, 319
	Апигенин	0,32 ± 0,05	0,27 ± 0,08	0,12 ± 0,1	0,11 ± 0,07		
	Епикатехин	0,38 ± 0,06	0,31 ± 0,09	0,40 ± 0,06	0,15 ± 0,06		
Смрзнут	Кверцетин	2,33 ± 0,04	2,25 ± 0,09	2,11 ± 0,09	1,46 ± 0,08	2,40	318
	Каемпферол	2,32 ± 0,06	2,28 ± 0,08	1,78 ± 0,08	1,41 ± 0,05	2,49	318
	Катехин	0,47 ± 0,08	0,35 ± 0,08	0,36 ± 0,08	0,34 ± 0,03		
	Лутеолин	0,36 ± 0,09	0,32 ± 0,04	0,26 ± 0,05	0,19 ± 0,08		
	Апигенин	0,22 ± 0,06	0,15 ± 0,1	0,19 ± 0,1	0,13 ± 0,09		
	Епикатехин	0,27 ± 0,05	0,23 ± 0,08	0,22 ± 0,06	0,16 ± 0,06		
Прокељ	Једињење	Сокслетова екстракција	Ултразвучна екстракција	Екстракција мацерацијом	Екстракција водом	Литературна вредност	Реф
Свеж	Кверцетин	0,34 ± 0,05	0,29 ± 0,1	0,15 ± 0,09	0,10 ± 0,10	0,3	315, 317
	Каемпферол	0,65 ± 0,08	0,50 ± 0,09	0,62 ± 0,08	0,52 ± 0,05	0,95	315, 317
	Катехин	0,42 ± 0,07	0,41 ± 0,06	0,52 ± 0,08	0,35 ± 0,03		
	Лутеолин	0,28 ± 0,04	0,23 ± 0,07	0,15 ± 0,05	0,11 ± 0,09	0,34	315, 317
	Апигенин	0,32 ± 0,05	0,27 ± 0,08	0,25 ± 0,1	0,08 ± 0,07		
	Епикатехин	0,35 ± 0,06	0,31 ± 0,09	0,20 ± 0,06	0,15 ± 0,06		
Смрзнут	Кверцетин	0,23 ± 0,04	0,21 ± 0,09	0,21 ± 0,09	0,16 ± 0,08		
	Каемпферол	0,52 ± 0,06	0,52 ± 0,08	0,47 ± 0,08	0,39 ± 0,05		
	Катехин	0,48 ± 0,08	0,37 ± 0,08	0,37 ± 0,08	0,24 ± 0,03		
	Лутеолин	0,22 ± 0,09	0,20 ± 0,04	0,18 ± 0,05	0,11 ± 0,08		
	Апигенин	0,12 ± 0,06	0,12 ± 0,1	0,09 ± 0,02	0,03 ± 0,01		
	Епикатехин	0,26 ± 0,05	0,29 ± 0,08	0,24 ± 0,06	0,18 ± 0,06		

Као што се може уочити из Табеле 37 садржај биофлавоноида код свих врста купуса је већи код свежих него код замрзнутих узорака. То се може објаснити начином припреме замрзнутих узорака као и дужином времена у којем су били замрзнути. Још једна разлика се јавља у садржају биофлавоноида, а то је у начину њихове екстракције из узорка и највећи је применом екстракције по Сокслету. Ова разлика се може објаснити разликом у температури и времену трајања екстракције као и од врсте растварача који је употребљен за екстракције.

3.2.4. Одређивање антиоксидативне активности екстракта фамилије Brassica

Настајања слободних радикала, или реактивних кисеоничних врста, током метаболизма биолошких система одговорни су за оксидативни стрес који доводи до болести срца, неуродегенеративних поремећаја, рака и старења. Антиоксиданси су супстанце које су присутне у малој концентрацији и реагују са слободним радикалима, при чему спречавају њихову активност, односно спречавају деструкцију ћелијске мембране.

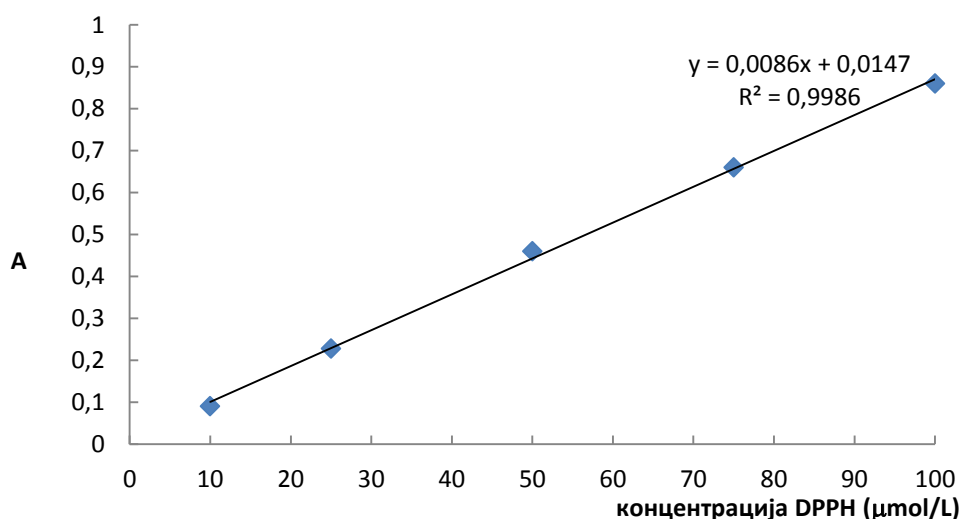
Познато је да хемијски састав и структура молекула који улазе у састав биљака утичу на пут радикалске реакције. Између различитих природних једињења која показују антиоксидативну активност, флавоноиди су међу најзначајнијима. Број и распоред хидроксилних група и места гликолизације одређују антиоксидативну активност полифенолних једињења. Гликолизација на позицији 7 значајно смањује антиоксидативну активност биофлавоноида у поређењу са њиховим слободним агликонским делом. Међутим, и други фактори као што су рН и особине растварача утичу на антиоксидативну активност.

Методе за испитивање антиоксидативне активности најчешће се заснивају на спектрофотометријском мерењу промене апсорбанције током одвијања реакције између слободних радикала и антиоксиданса. Од метода које се најчешће користе за *in vitro* испитивања су: ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity), TRAP (Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter), TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity), DPPH (2,2'-дифенил-1-пикрилхидразил радикала), TOSC (Total Oxiradical Scavengin Capacity), PSC (Peroxyl Radical Scavenging), FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power).

DPPH тест је најстарија индиректна метода за одређивање антиоксидативне активности, која се заснива на способности стабилног слободног радикала DPPH да

реагује са донорима водоника укључујући феноле [321, 322]. Стабилни DPPH радикал се користи за процену способности антиоксиданса да реагују са радикалима [316, 323] и за боље разумевање њиховог антиоксидативног механизма.

Антиоксидативни капацитет екстраката врсте *Brassica* су анализирани коришћењем DPPH методе. Припремљен основни раствор DPPH у метанолу (1,5 mmol/L) је додат у 3 mL свеже припремљених екстраката фамилије *Brassica* добијених различитим методама екстракције и мерена је апсорбанција тако добијених раствора на 517 nm (DPPH показује максимум апсорпције). Праћено је смањење концентрације у различитим временским интервалима и то одмах након додатка DPPH, а након тога на сваких 5 минута. Преостала концентрација DPPH у реакционој смеси је израчуната на основу калибрационе криве за DPPH приказана на Слици 82.



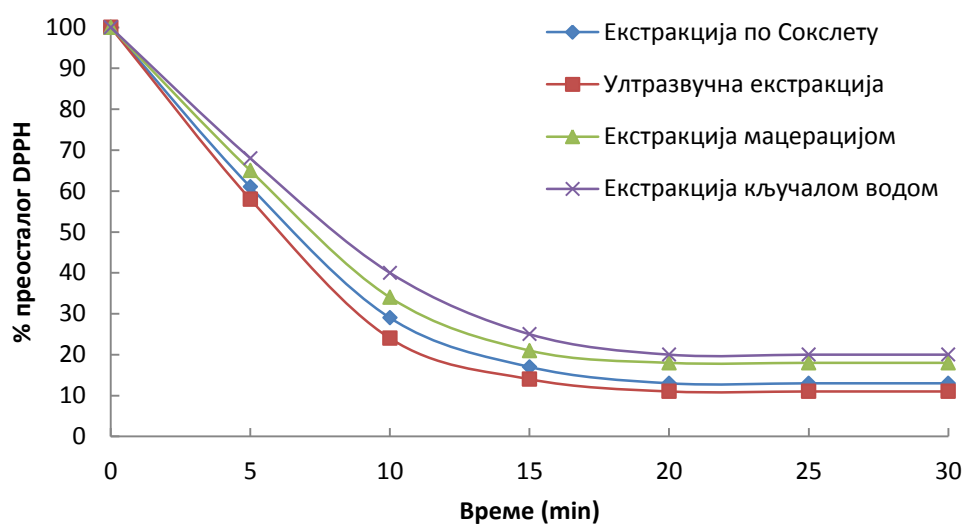
Слика 82. Калибрациона крива DPPH у метанолу за одређивање концентрације у растворима екстраката

Како би се одредио утицај начина припреме, чувања и различитости врста испитиваних узорака фамилије *Brassica* на антиоксидативну активност, израчунате су вредности процента преосталог DPPH у раствору на основу формуле:

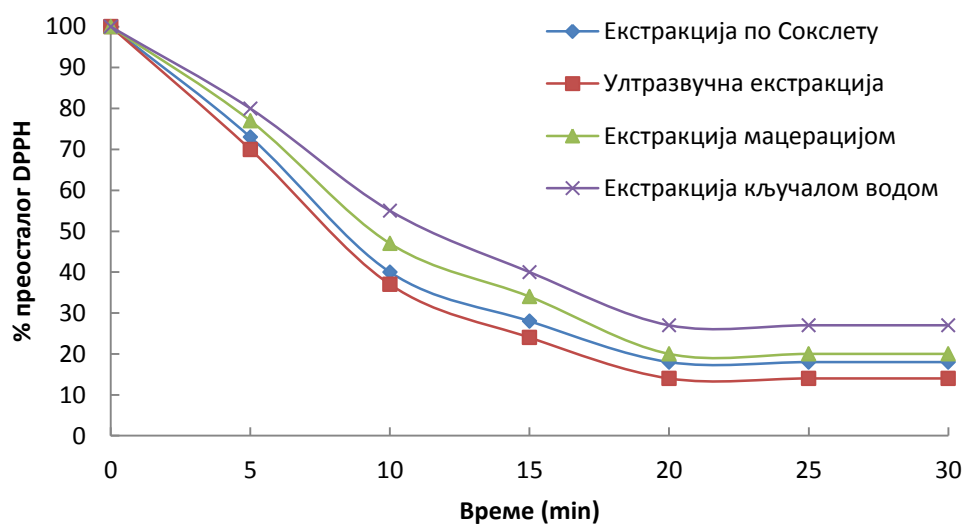
$$\% \text{ преосталог DPPH} = \frac{[\text{DPPH}]_t}{[\text{DPPH}]_{t=0}} \times 100 \quad (75)$$

где је t временски интервал у којем је вршено мерење.

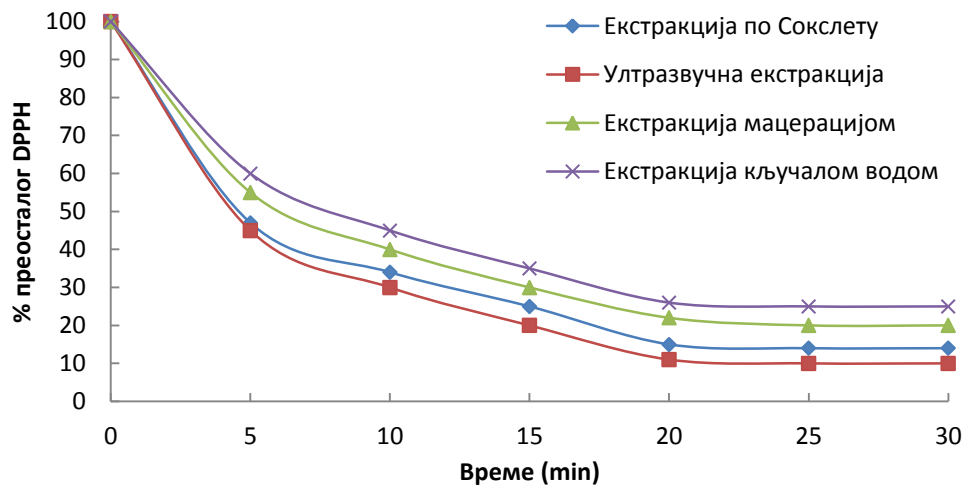
Графици зависности процента преосталог DPPH у раствору у функцији времена за различите врсте фамилије *Brassica*, начине екстракције и чувања приказани су на Сликама 83, 84, 85, 86 и 87.



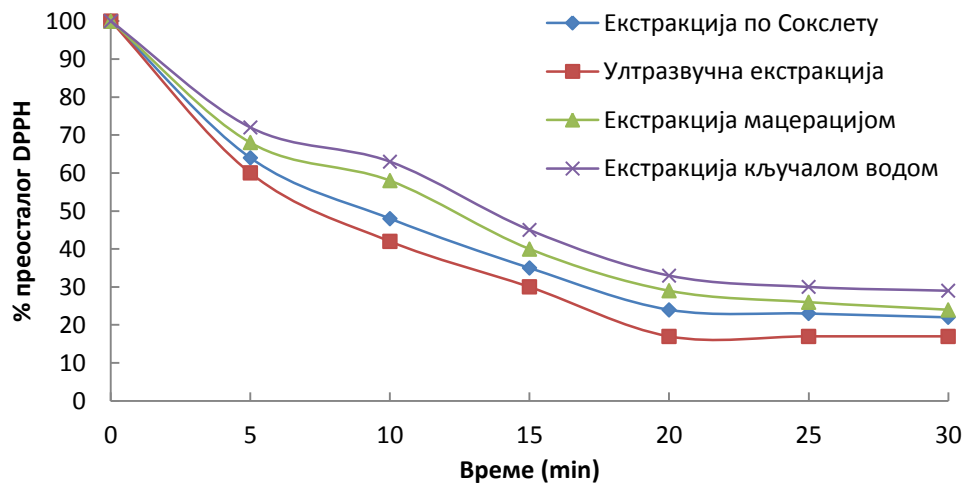
Слика 83. Кинетика антиоксидативне активности свежег екстракта карфиола



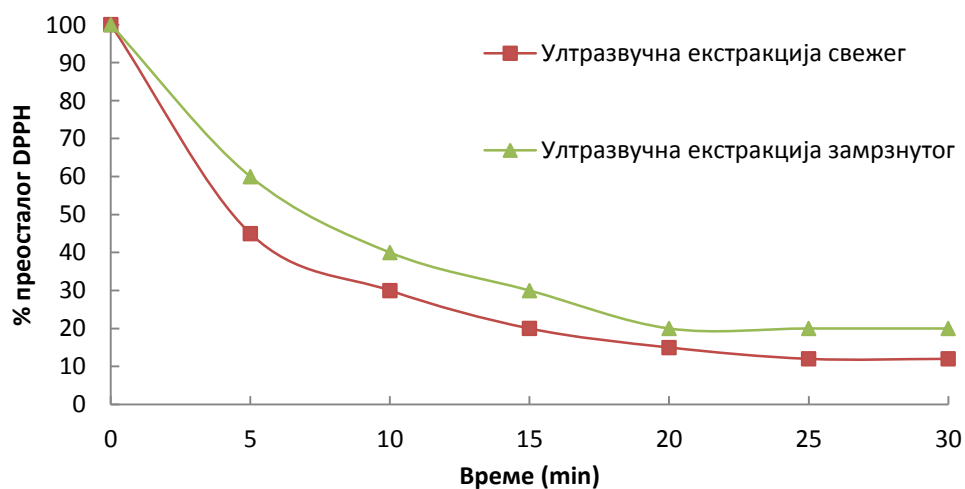
Слика 84. Кинетика антиоксидативне активности екстракта замрзнутог карфиола



Слика 85. Кинетика антиоксидативне активности екстракта свежег броколија



Слика 86. Кинетика антиоксидативне активности екстракта замрзнутог броколија



Слика 87. Кинетика антиоксидативне активности екстракта проклеља

Сумирани резултати испитиване антиоксидативне активности су приказани у Табели 38.

Табела 38. Антиоксидативна активност (% преосталог DPPH \pm SD) за различите врсте купуса добијене DPPH методом.

Узорак	Време (min)	Екстракција по Сокслету		Ултразвучна екстракција		Екстракција мацерацијом		Екстракција кључалом водом	
		Свеж	Смрзнут	Свеж	Смрзнут	Свеж	Смрзнут	Свеж	Смрзнут
Карфиол	0	100 \pm 2	100 \pm 7	100 \pm 5	100 \pm 3	100 \pm 5	100 \pm 1	100 \pm 4	100 \pm 9
	5	61 \pm 5	73 \pm 3	58 \pm 6	70 \pm 5	65 \pm 3	77 \pm 2	68 \pm 6	80 \pm 7
	10	29 \pm 6	40 \pm 4	24 \pm 4	37 \pm 7	34 \pm 2	47 \pm 3	40 \pm 7	55 \pm 6
	15	17 \pm 4	28 \pm 6	14 \pm 2	24 \pm 9	21 \pm 3	34 \pm 2	25 \pm 5	40 \pm 4
	20	13 \pm 3	18 \pm 5	12 \pm 1	14 \pm 2	18 \pm 4	20 \pm 4	20 \pm 3	27 \pm 8
	25	13 \pm 4	18 \pm 4	11 \pm 1	14 \pm 6	18 \pm 5	20 \pm 5	20 \pm 4	27 \pm 2
	30	13 \pm 6	18 \pm 6	11 \pm 1	14 \pm 7	18 \pm 6	20 \pm 8	20 \pm 2	27 \pm 5
Броколи	0	100 \pm 4	100 \pm 4	100 \pm 5	100 \pm 3	100 \pm 2	100 \pm 5	100 \pm 4	100 \pm 5
	5	47 \pm 7	64 \pm 7	45 \pm 6	60 \pm 4	55 \pm 5	68 \pm 2	60 \pm 6	72 \pm 6
	10	34 \pm 6	48 \pm 6	30 \pm 7	42 \pm 6	40 \pm 8	58 \pm 2	45 \pm 5	63 \pm 8
	15	25 \pm 5	35 \pm 7	20 \pm 2	30 \pm 7	30 \pm 3	40 \pm 2	35 \pm 7	45 \pm 4
	20	15 \pm 4	24 \pm 5	14 \pm 7	17 \pm 2	22 \pm 5	29 \pm 2	26 \pm 5	33 \pm 6
	25	14 \pm 3	23 \pm 3	12 \pm 6	17 \pm 6	20 \pm 2	26 \pm 2	25 \pm 7	30 \pm 5
	30	14 \pm 9	22 \pm 4	12 \pm 7	17 \pm 5	20 \pm 5	24 \pm 8	25 \pm 4	29 \pm 3
Прокељ	0			100 \pm	100 \pm 6				
	5			45 \pm 7	60 \pm 3				
	10			30 \pm 6	40 \pm 5				
	15			20 \pm 4	30 \pm 7				
	20			13 \pm 3	20 \pm 4				
	25			10 \pm 7	20 \pm 5				
	30			10 \pm 4	20 \pm 4				

Смањење апсорбанције DPPH радикала је последица реакције између молекула антиоксиданса и радикала, при чему долази до неутралисања радикала који прима атом водоника. Као што је приказано у Табели 38 уочено је значајно смањење концентрације DPPH у току реакције са екстрактима купуса на основу чега се може закључити да су екстракти богати антиоксидансима.

Проучавање кинетике реакције између DPPH и екстраката врши се у циљу одређивања реда и величине брзине хемијске реакције. На почетку реакција се одвија према кинетици другог реда и веома је брза. Ово се може објаснити реакцијом између молекула антиоксиданаса мале молекулске масе (фенолне киселине), док се други део одиграва по кинетици псеудо првог реда и за њу су одговорни молекули велике молекулске масе (полимери фенолних киселина). Добијени резултати показују значајну разлику у антиоксидативној активности између различитих врста купуса као и између свежих и замрзнутих узорака. Највећу антиоксидативну активност показује узорак свежег броколија.

3.3. Оптимизација HPLC методе за одређивање моксифлоксацина и сродних супстанци у таблетама и инфузији

У циљу развоја HPLC методе за одређивање моксифлоксацина и сродних супстанци извршена је оптимизација методе која је обухватала:

- Прелиминарна испитивања
- Избор хроматографске колоне
- Оптимизацију интерног стандарда
- Оптимизацију мобилне фазе
- Избор начина елуирања
- Оптимизацију температуре одређивања
- Оптимизацију рН вредности мобилне фазе
- Избор начина детекције
- Оптимизацију „displacing“ реагенса
- Статистичку обраду експерименталног дизајна

3.3.1. Прелиминарна испитивања

Хроматографско раздвајање јонизујућих компоненти – киселина и база, јако зависи од рН вредности мобилне фазе. Ретенција на неполарним колонама се може побољшати мењањем рН вредности мобилне фазе, тако што се једињења преведу у свој нејонизовани облик. Такође, интеракције између поларних силанолних група на носачу колоне и анализата, које доводе до развлачења пикова, могу се смањити правилним избором састава и рН вредности мобилне фазе.

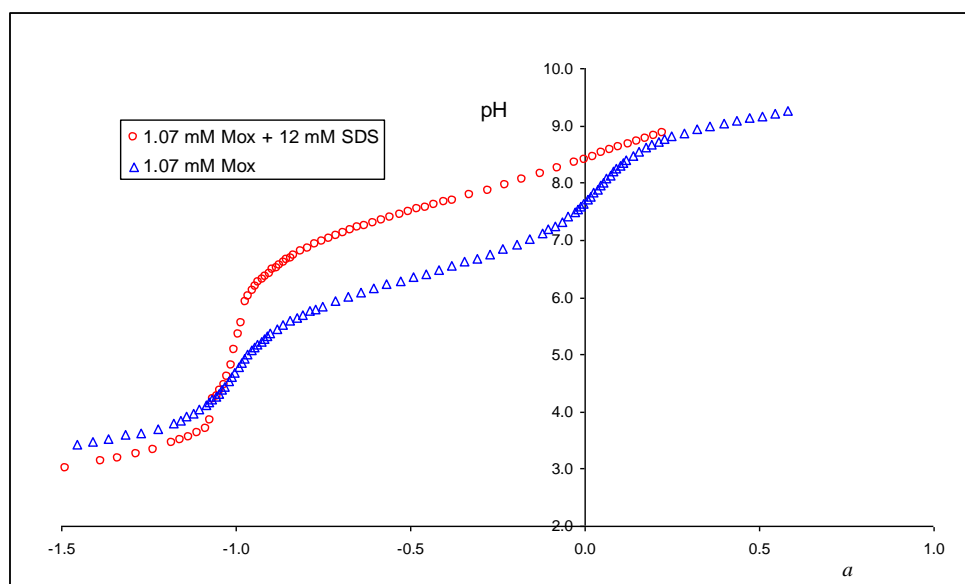
Да би се нашла оптимална мобилна фаза за раздвајање моксифлоксацина и сродних супстанци из таблета и инфузије, треба имати на уму да су они слабе хетероцикличне аминокиселине са два места за јонизацију: једно одговара протоновању 3'-N секундарне аминокиселине пиперазинил групе, а друго депротоновању карбоксилне групе. Према томе, моксифлоксацин и сродне супстанце у раствору могу постојати у облику катјона, анјона, цвистерјона и у неутралном облику. Релативна заступљеност ових облика зависи од рН вредности раствора. Пошто се на стационарној фази најдуже задржавају неутрални облици и цвистерјон, треба одредити интервал рН вредности у коме су они највише заступљени. Такође, треба одредити изоелектричну

тачку моксифлоксацина и сродних супстанци, што значи да треба одредити обе константе дисоцијације у одређеном растварачу.

У циљу одређивања константи дисоцијације моксифлоксацина извршена је потенциометријска титрација раствора моксифлоксацина концентрације 1,07 mmol/L у и без присуства 12 mmol/L SDS-а у 0,1 mol/L LiCl јонској средини на 298 K. Титрација је вршена стандардним раствором NaOH концентрације 0,1 mol dm⁻³. Праћена је зависност рН раствора од запремине додате базе. На Слици 88 је приказана титрациона крива у облику зависности рН од титрационог параметра, a . Титрациони параметар једнак је односу концентрација додате јаке базе, $[BOH]$, у раствору и укупне концентрације слабе киселине, C_A , и рачунат је по формули:

$$a = \frac{[BOH]}{C_A} \quad (76)$$

Са Слике 88 се види да на титрационој кривој постоје два превоја, један у слабо киселој, а други у базној средини. Оба превоја су јако изражена и показују да протонисани моксифлоксацин, при дисоцијацији, ступњевито отпушта два протона, при чему су рН вредности при којима долази до дисоцијације јасно раздвојене.



Слика 88. Потенциометријска титрација 1,07 mmol/L моксифлоксацина у 0,1 mol/L LiCl средини на 25°C у и без присуства SDS-а

На основу испитивања физичко-хемијских карактеристика, може се извести закључак да се у воденим растворима моксифлоксацин понаша као амфотерна аминокиселина.

киселина са изоелектричном тачком $pI = 7,44$. Дистрибуциони дијаграм различитих јонизованих и нејонизованих облика моксифлоксацина одређен је на основу измерених константи дисоцијације моксифлоксацина што указује да моксифлоксацин постоји у катјонском облику при рН мањем од 5 (у облику катјона $H_2(MOX)^+$) и при рН већем од 8,0 (као анјон $(MOX)^-$). Највише прелиминарних испитивања је урађено у циљу проналажења оптималне мобилне фазе. За регулисање рН вредности мобилне фазе коришћени су различити пуфери. Посто су ово поларни облици моксифлоксацина најбоља растворљивост постиже се у мобилној фази повишене поларности, а то изискује употребу реверзно-фазне хроматографије.

Прелиминарна испитивања хроматографских услова за раздвајање моксифлоксацина од осталих сродних нечистоћа вршена су употребом стандардних раствора моксифлоксацина и сродних нечистоћа фирме Bayer.

Током прелиминарних испитивања коришћена је само ABZ колона. ABZ колона је пуњена сферним честицама силика-гела на чијој површини се као активне групе налазе остаци алкиламида. Колона има јединствену деактивациону технологију која омогућава одличне реверзно-фазне перформансе како за базна и кисела, тако и за поларна и неполарна једињења. Раздвајање анализата на силанолним површинама јавља се као последица њихове интеракције са алкиламинима, тако да за добијање доброг изгледа пика нису потребне велике јонске силе и екстремна подешавања рН мобилне фазе. Применом ове колоне могу се анализирати веома комплексни узорци, без предходног пречишћавања узорка, чиме се избегавају могући губици анализата. Међутим, у прелиминарним испитивањима циљ је био да се упореди поступак на овој колони са стандардним поступцима описаним до сада у литератури. За одређивање моксифлоксацина и хинолона уопште, у литератури се најчешће помињу RP-HPLC методе на ODS колони. Због тога прелиминарна су испитивања обухватила и хроматографисање на XTerra C18 колони, под сличним експерименталним условима као и на ABZ колони. Пунилац XTerra C18 колона је прва генерација хибридних (неорганско/органичних) честица. Колона комбинује најбоље карактеристике силика гела и полимера код које је свака трећа силанолна група замењена метил групом. Ова хидрофобност је распоређена кроз целу структуру честица, дајући на тај начин чврсте хидридне честице, на којима се може радити при вишим протоцима, вишим температурама и вишим рН вредностима. Приликом прелиминарних испитивања, као начин детекције изабрана је UV/Vis детекција.

Прелиминарна испитивања су рађена на собној температури (25 °C) и на 40 °C. Пошто рад при повишеним температурама не доводи до значајног побољшања хроматографских параметара, одлучено је да радна температура буде собна, јер у том случају нема потребе за коришћењем термостата за колону.

Прелиминарна испитивања показују да је интензитет апсорпције анјонског облика већи од катјонског, из чега произилази да би се већа осетљивост одређивања постигла при вишим рН вредностима. Међутим, хроматографски параметри, стабилност колоне и ретенциона времена за све колоне веома су неповољни при повишеним рН вредностима. Стога је оптимизација вршена у области рН вредности од 2 – 6. За одржавање константне рН вредности коришћени су различити пуфери и пуферске смеше (фосфати, PIPES, HEPES).

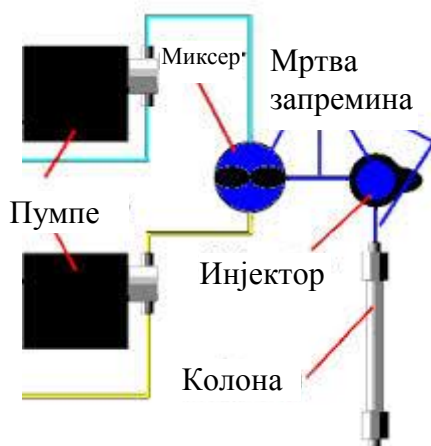
На основу физичко-хемијских карактеристика моноксифлоксацина и сродних супстанци и прелиминарних испитивања састав мобилне фазе треба да обухвати ацетонитрил као органски модификатор у проценту не већем од 20 % v/v (%B) и воду као поларну компоненту (%A). Наиме, због присуства ексципијената у узорку, мобилна фаза мора да буде таква да не долази до њиховог таложења. То значи да мобилна фаза не сме да садржи више од 20 % органског растварача.

У циљу проналажења најбољег интерног стандарда за одређивање моноксифлоксацина у таблетама и инфузији, током прелиминарних испитивања, као могући интерни стандарди анализирани су офлоксацин, пефлоксацин, ципрофлоксацин, флероксацин и еноксацин.

На основу извршених прелиминарних испитивања квалитета раздвајања може се закључити да при изократском начину елуирања на квалитет раздвајања утиче проценат ацетонитрила у мобилној фази, рН вредност воденог дела мобилне фазе и температура

3.3.2. Развој HPLC методе за одвајање моксифлоксацина и сродних једињења

Пре почетка анализе одређена је мртва запремина HPLC система. Мртва запремина HPLC система представља запремину која се налази од миксера мобилних фаза до изласка из инјектора (Слика 89).



Слика 89. Мртва запремина HPLC система

Потребно је одредити мртву запремину како би се развијена метода пренела са једног на други HPLC систем. Приликом одређивања мртве запремина уклоњена је HPLC колона, а инјектор и детектор су повезани што краћим цревом. Урађене су градијентне анализе приликом чега је коришћен ацетонитрил као растварач А и 0,1 % раствор ацетона у ацетонитрилу као растварач В. Примењен је линеарни градијент у трајању од 10 минута са променом мобилне фазе од 0 – 100 % В и проток од 2 mL/min. На основу добијеног графика зависности %В од t_R и ретенционог времена на средишњој тачки градијента израчуната је мртва запремина [300].

За Agilent систем мртва запремина износила је 1,7 mL а за Shimadzu систем 2,7 mL. Ови подаци су унети у програм који повезује ретенције узорака и градијентни састав мобилне фазе.

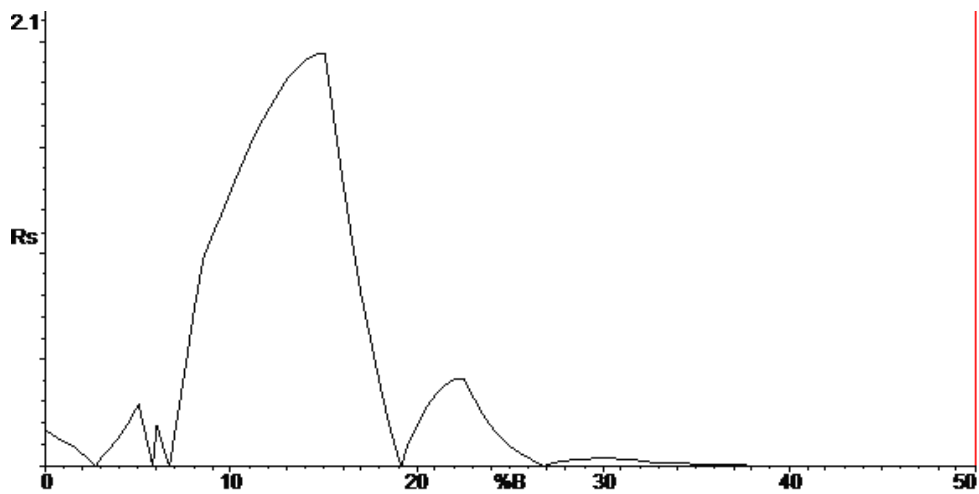
Развој методе почео је са АВЗ колоном, а мобилну фазу је чинила вода (А) (фосфатни пуфер рН = 6,0 + 2 % ТЕА) - тетрахидрофуран, THF (В) и смеша вода (А) (фосфатни пуфер рН = 6,0 + 2 % ТЕА) - метанол, MeOH (В) са линеарним градијентом од 0 до 50 % В за 20 и 40 минута. Није примећено раздвајање пикова приликом употребе THF, док применом MeOH није постигнута боља резолуција од $R_s = 1,1$ између критичних парова пикова. У следећем кораку мобилна фаза је замењена са

смешом вода (А) – ацетонитрил, АСН (В). Оптимизација раздвајања анализата почела је са две линеарне градијентне анализе: $t_G = 30$ минута и $t_G = 60$ минута; % ацетонитрила се мењао од 5 до 50% (одвајање у LC-Gradient моду). Температура је била подешена на 30 °С, а рН водене фазе износио је 5,5. Сви експериментални подаци: ретенциона времена, површина пикова и ширина пикова једињења, температура колоне и подаци о колони и инструменту су коришћени за компјутерску симулацију у програму DryLab[®]. Да би се добила 2D мапа резолуције разматране су три комбинације параметара: t_G /удео органског растварача, t_G (градијентно време)/температура колоне и удео органског растварача/рН. Друге могуће комбинације нису разматране. Експериментални услови за градијентно извођење анализа и резултати дати су у Табели 39.

Табела 39. Експериментални услови за оптимизацију изократског извођења анализе

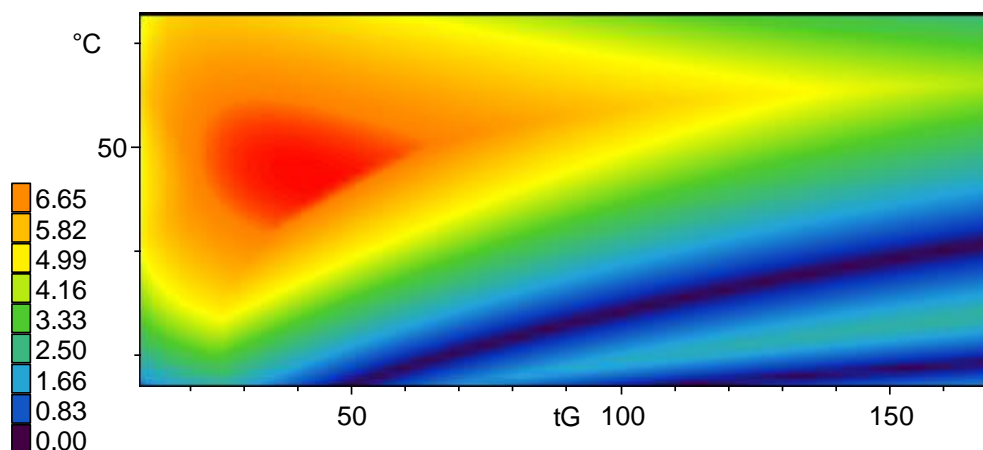
Градијент В (ацетнитрил)	рН	Т (К)	Критични пар	R _s (min)
0` - 0% В, 30` - 50% В	5,5	303	6,8DM, 6M8F	0,53
0` - 0% В, 60` - 50% В	5,5	303	6,8DM, 6M8F	0,94
	2,5	303	6,8DF, моx	0,97
0` - 5% В, 30` - 20% В	4,5	303	6,8DF, моx	0,87
	6,5	303	6,8DM, 6M8F	0,81
	2,5	303	6,8DF, моx	0,87
	2,5	333	6,8DM, 6M8F	0,54
	4,5	303	6,8DF, моx	0,86
0` - 5% В, 60` - 20% В	4,5	333	6,8DM, 6M8F	0,46
	6,5	303	6,8DM, 6M8F	0,76
	6,5	333	6,8DM, 6M8F	1,79
0` - 5% В, 30` - 30% В	2,5	303	6,8DM, 6M8F	0,92
0` - 5% В, 60` - 30% В	2,5	303	6,8DF, моx	0,95

Добијена 1D мапа резолуције приказана је на Слици 90.



Слика 90. 1D мапа резолуције добијена оптимизацијом tG/%ACN при pH= 5,5 и T = 30°C

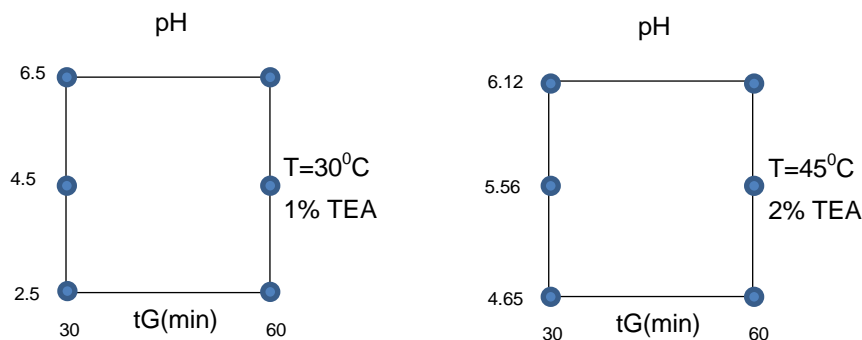
Оптimalан удео ацетонитрила за изократско раздвајање испитиваних једињења, како се може уочити са Слике 90, налази се у области од 10 до 13 % ACN. Након тога, приступило се оптимизацији температуре колоне при чему су изведене четири градијентне анализе у току tG = 30 min и 60 min, при чему је удео ацетонитрила мењан од 5 до 20 %, а температура износила 30 °C и 60 °C (начин одвајања LC-RP Gradient/Temperature). На основу добијених хроматограма при испитиваним условима добијена је 2D мапа резолуције приказана на Слици 91.



Слика 91. 2D мапа резолуције за оптимизацију tG/температуре при pH = 6,12

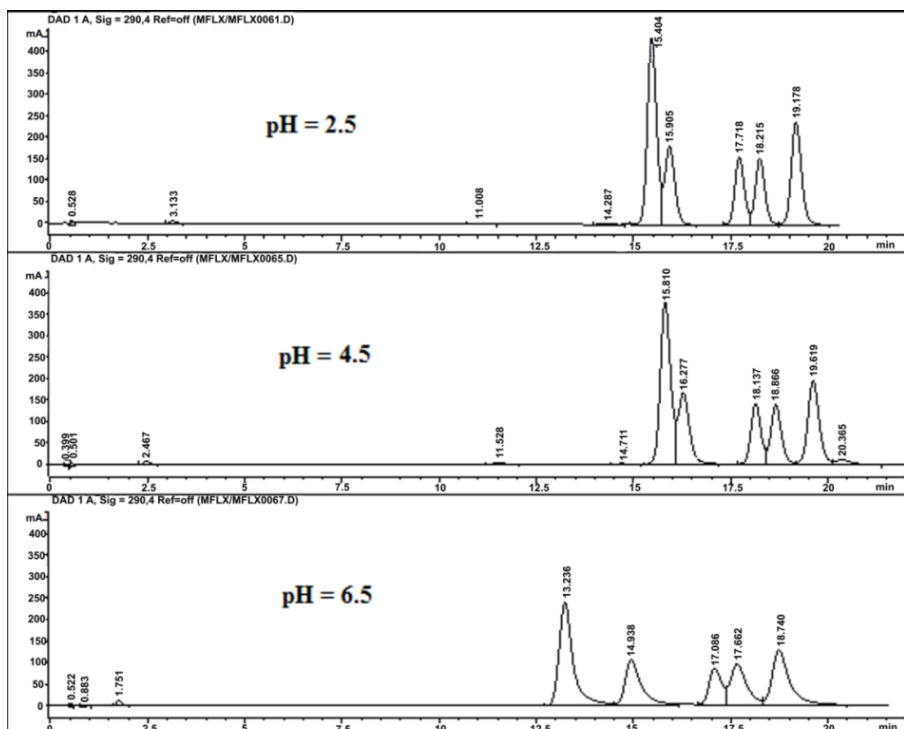
Са 2D мапе резолуције приказане на Слици 91 оптималан опсег температуре колоне налази се у интервалу од 45 °C до 47 °C.

Имајући у виду да су све испитиване супстанце амфотерне може се очекивати јак утицај рН вредности на одвајање. Експериментални дизајн за оптимизацију рН представљен је на Шеми 6.

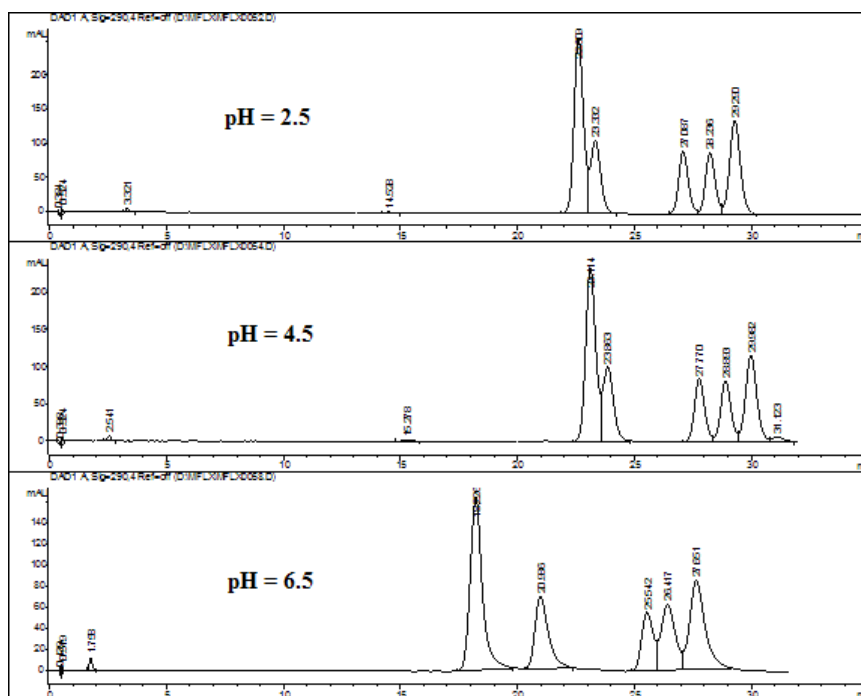


Шема 6. Експериментални дизајн за оптимизацију LC- tG/pH

Да би се нашло оптимално рН прво је урађено шест градијентних анализа за tG = 30 и 60 min, а удео ацетонитрила мењао се од 5 до 20 % и рН вредности су износиле 2,5, 4,5 и 6,5 (начин одвајања LC-RP Gradient/pH). Сет хроматограма урађених при овим условима представљен је на Сликама 92 и 93.



Слика 92. Сет хроматограма за оптимизацију у LC-RP Gradient/pH, T = 30 °C, tG = 30 min



Слика 93. Сет хроматограма за оптимизацију у LC-RP Gradient/pH, $T = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$, $t_G = 60\text{ min}$

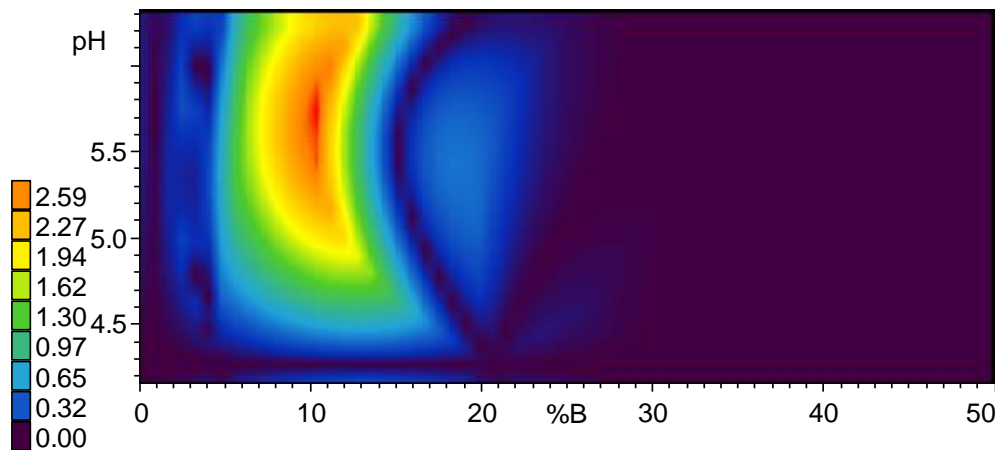
Испитивања промене рН мобилне фазе вршена су при вредности садржаја ацетонитрила који је близак оптималном. Са слика се види да приликом повећања рН вредности долази до смањења интензитета пикова и смањења резолуције. Избор оптималне рН вредности у овом случају диктирају техничке карактеристике колоне, јер се на XTerra колони не сме радити на рН вредностима мањим од 2,5, јер на нижим рН вредностима долази до растварања хидрофобног дела колоне. Имајући у виду квалитет раздвајања, оптимални опсег рН вредности је између 4 и 6.

Ове анализе показују да се оптимална област рН налази на вредностима већим од 4,0. Задовољавајуће вредности R_s могу се добити и на нижим рН вредностима (2,5) али при тим условима време анализе је дуго и услови за раздвајање нису робусни. На основу тога, додатних шест градијентних анализа је урађено при рН = 4,65, 5,56 и 6,12, под истим градијентним условима како је претходно наведено.

На овај начин препорука [300] да се не мења рН за више од једне јединице у близини pK_a је била испоштована. Константе дисоцијације моксифлоксацина су претходно одређене [263] и износе $pK_{a,1} = 6,16$ и $pK_{a,2} = 8,72$.

Изабран интервал рН се налази у близини прве константе дисоцијације. Температура колоне је подешена на $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ и проток мобилне фазе на $1,5\text{ mL/min}$. При

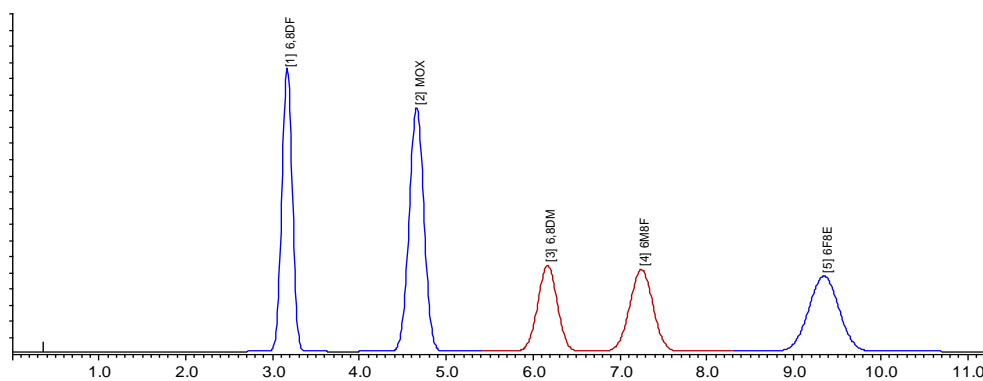
овим условима снимљени су хроматограми, а подаци добијени из њих искоришћени за истовремено одређивање оптималног рН мобилне фазе као и удела ацетонитрила. Добијена 2D мапа резолуције приказана је на Слици 94.



Слика 94. 2D робусна мапа резолуције добијена коришћењем програма DryLab

Мењањем услова у изократском начину елуирања, са 2D мапе резолуције нађени су оптимални услови: рН = 6,0 и удео ацетонитрила од 9,8 %.

Применом оптималних може се добити израчунати (симулирани) хроматограм раздвајања испитиваних компоненти (Слика 95).



Слика 95. Израчунати (симулирани) хроматограм добијен у програму DryLab

Критична мапа резолуције показује да ретенција расте да порастом рН вредности и са смањењем процента ацетонитрила. При нижим процентима ацетонитрила у мобилној фази ретенциона времена су неприхватљиво висока (са 20 % ацетонитрила и рН = 8, ретенционо време је 20 min). Оптимална ретенциона времена су добијена са 10

% ацетонитрила, али је резолуција између пикова 6,8DM и 6M8F смањена на рН вредностима вишим од 8,0 и нижим од 3,0. Зато су као оптимални услови за раздвајање ових једињења 10 % ацетонитрила и рН вредност 6,0. Симулирана изократска анализа је упоређена са експериментално добијеним хроматограмом под оптималним условима нађеним применом DryLab[®] програма, и добијени резултати су дати у Табели 40.

Табела 40. Поређење симулираних и експерименталних ретенционих података за оптимизовано одвајање модела једињења (10 % ацетонитрила; рН = 6,10)

Пик	Ретенционо време		Резолуција	
	DryLab	Експериментално	DryLab	Експериментално
6,8DF	3,16	3,20	5,55	5,50
МОХ	4,65	5,00	4,09	4,00
6,8DM	6,16	6,20	2,36	2,41
6M8F	7,24	7,14	3,66	3,00
6F8E	9,34	9,08	n/a	n/a
Просечна стандардна грешка	0,10		0,20	

Подаци у Табели 40 показују да програм DryLab[®] прецизно предвиђа ретенцију анализата. Оптимални услови одговарају левом делу критичне резолуционе мапе. Ова област је боља јер је робуснија и није осетљива на мале промене процента органског дела фазе и рН вредности. Хроматографски параметри се мењају за 1 – 3 %, при промени процента ацетонитрила од 8 – 12 % и при промени рН вредности од 4,0 – 8,0. Најосетљивија компонента је 6M8F, али су и њени хроматографски параметри у прихватљивим границама. Из DryLab симулације је евидентно да проценат ацетонитрила и рН јако утичу на ретенцију анализата. Да би се утврдио комбиновани ефекат процента органског модификатора и рН вредности мобилне фазе на истовремено одређивање моксифлоксацина и сродних једињења коришћена је методологија одговора површине. Ови фактори су варирани и то од 8 – 12 % ацетонитрила и рН од 4,0 – 8,0. Одговор који је мерен је релативна ретенција (α). Релативна ретенција је боља мера раздвајања него разлика у ретенционим временима јер не зависи од ефикасности колоне. Релативна ретенција се добија када се већи фактор капацитета подели са мањим фактором. Експериментални подаци коришћени за факторски дизајн приказани су у Табели 41. Израчунавања су вршена коришћењем програма Ststistica v. 6.0.

Табела 41. Експериментални подаци за факторски дизајн.

No. Exp	pH	%ACN	T (K)	%TEA	sum R	No. Exp	pH	%ACN	T (K)	%TEA	sum R
1	4	8	313	2	1,48	19	6	10	318	2	8,10
2	4	10	313	2	5,18	20	6	9	318	2	8,99
3	4	12	313	2	5,67	21	6	11	318	2	9,35
4	4,5	10	298	1	3,18	22	6	11	318	2	9,44
5	4,5	10	318	2	2,54	23	6,5	10	298	1	6,79
6	5	8	318	2	1,40	24	6,5	12	298	1	5,47
7	5	12	318	2	3,45	25	6,5	10	298	1	7,73
8	5,5	10	318	1	8,40	26	6,5	10	318	1	6,53
9	6	10	318	2	9,23	27	6,5	8	318	1	6,34
10	6	9	318	1	7,41	28	7	12	298	1	6,80
11	6	10	318	1	7,47	29	7	10	298	1	5,78
12	6	9	323	1	7,13	30	7	10	318	1	4,45
13	6	9	318	2	9,26	31	7,5	8	313	2	2,65
14	6	9	323	1	7,12	32	7,5	10	313	2	3,50
15	6	9	318	1	7,35	33	7,5	12	313	2	5,52
16	6	12	298	1	5,78	34	8	8	318	2	4,42
17	6	10	318	1	8,04	35	8	12	318	2	2,38
18	6	10	318	2	9,27						

Почетна ANOVA израчунавања показују 13 коефицијената у квадратном моделу од којих су четири линеарна, четири су квадратна и пет су интеракције и дат је изразом:

$$z = a_0 + a_1 pH + a_2 \%ACN - a_3 T(K) + a_4 \%TEA - a_5 pH^2 - a_6 \%ACN^2 - a_7 T(K)^2 - a_8 \%TEA^2 + a_9 pH T(K) + a_{10} pH \%TEA - a_{11} \%ACN T(K) + a_{12} \%ACN \%TEA + a_{13} T(K) \%TEA \quad (77)$$

Резултати израчунатих коефицијента приказани су у Табели 42.

Табела 42. ANOVA анализа израчунавања факторског дизајна.

Коефицијент	Вредност ± стандардна грешка	Значајност
a_0	8,33 ± 1,11	Не
a_1	0,52 ± 0,81	Да
a_2	0,62 ± 0,33	Да
a_3	-0,10 ± 1,62	Не
a_4	0,58 ± 1,19	Да
a_5	-4,24 ± 1,47	Да
a_6	-0,57 ± 0,25	Да
a_7	-0,12 ± 2,07	Не
a_8	-0,38 ± 0,37	Не
a_9	0,30 ± 1,94	Не
a_{10}	0,04 ± 1,14	Не
a_{11}	-0,18 ± 0,81	Не
a_{12}	0,50 ± 0,43	Не
a_{13}	0,10 ± 1,84	Не

Из DryLab[®] симулације евидентно је да удео ацетонитрила, рН и температура колоне, показују јак утицај на ретенцију и одвајање анализата. Приближно оптимални услови захтевају рН око 6, удео ацетонитрила око 10 % и температуру колоне већу од 40 °С. Мада је резолуција критичног пара под овим условима задовољавајућа, примећено је развлачење пикова за моксифлоксацин и 6F8E анализате. Због тога је АВЗ колона замењена ХТетга колоном којом се добијају симетрични пикови. Даља оптимизација је извођења на ХТетга колони коришћењем факторске анализе и методологије одговора површине са почетним вредностима фактора добијених DryLab[®] анализом. Није постојала значајна разлика у оптималним хроматографским параметрима после примене ове две колоне. Методологија одговора површине омогућава статистичко моделовање и квантификацију ефекта фактора у хроматографским процесима. Испитивани су следећи фактори: рН (X₁), %ACN (X₂), %ТЕА (X₃). Нивои ових фактора заједно са одговарајућим кодираним вредностима за изабрани централни композитни дизајн су сумирани у Табели 43.

Табела 43. Хроматографски фактори и њихове кодирани вредности.

рН (X ₁)	4	4,5	5	5,5	6	6,5	7	7,5	8
Кодирана вредност	-2	-1,5	-1	-0,5	0	0,5	1	1,5	2
%ACN (X ₂)			8	9	10	11	12		
Кодирана вредност			-2	-1	0	1	2		
%ТЕА (X ₃)				1	2	3			
Кодирана вредност				-1	0	1			

Кодирање фактора је урађено применом формуле:

$$X_{\text{кодирано}} = (X_{\text{стварна}} - X_{\text{просек}}) / (\text{опсег} / 2)$$

$$X_{\text{просек}} = (X_{\text{max}} + X_{\text{min}}) / 2$$

$$\text{Опсег} = X_{\text{max}} - X_{\text{min}}$$

У сваком експерименту укупна резолуција представља збир свих појединачних резолуција између парова пикова. Између два пика резолуција R_{S1,2} је израчуната коришћењем формуле [324]:

$$R_{S1,2} = \frac{1}{4} \left(\frac{k_2}{k_1} - 1 \right) \sqrt{N_p} \left(\frac{k_1}{k_1 + 1} \right) \quad (78)$$

где је N_p број теоретских подова анализата, k₁ ретенциони фактор пика 1, а k₂ за пик 2. Експеримент је дизајниран као подешен централни композитни дизајн са

понављањима. У циљу смањења броја експеримената температура је подешена на 45 °С, као оптимална вредност одређена DryLab® симулацијом. Потпуни кодирани дизајн дат је у Табели 44.

Табела 44. Експериментални дизајн. Одговор система, $R_x = \sum R_{i,j}$

No.	pH	%ACN	%TEA	R _x	No.	pH	%ACN	%TEA	R _x
1	0	0	0	9,27	20	1,5	2	0	5,52
2	0	0	0	9,23	21	1,5	-2	0	2,65
3	0	0	0	9,37	22	1	0	-1	4,45
4	0	0	1	8,1	23	1	0	-1	5,78
5	0	0	1	8,15	24	1	2	-1	6,8
6	0	0	-1	7,47	25	0,5	0	-1	6,53
7	0	0	-1	8,04	26	0,5	0	-1	7,73
8	0	1	0	8,35	27	0,5	0	-1	6,79
9	0	1	0	8,25	28	0,5	2	-1	5,47
10	0	-1	0	8,99	29	0,5	-2	-1	6,34
11	0	-1	0	9,26	30	-0,5	0	-1	8,4
12	0	-1	-1	7,35	31	-1	2	0	3,45
13	0	-1	-1	7,41	32	-1	-2	0	1,4
14	0	2	-1	5,78	33	-1,5	0	0	2,54
15	0	-1	-1	7,13	34	-1,5	0	-1	3,18
16	0	-1	-1	7,12	35	-2	0	0	5,18
17	2	2	0	2,38	36	-2	2	0	5,67
18	2	-2	0	4,42	37	-2	-2	0	1,48
19	1,5	0	0	3,5					

Дизајн се састоји од 37 анализа са неким фракционим фактроијелима и централним тачкама са три понављања и неким поновљеним тачкама, тако да се може проценити pure error. Анализом података наведених у Табели 44 добијају се резултати приказани у Табели 45.

Табела 45. ANOVA анализа квадратног хроматографског модела.

Коефицијенти	SS	df	MS	F	p
b_1	0,737	1	0,737	4,508	0,055211
b_{11}	58,553	1	58,553	357,772	0,000000
b_2	4,912	1	4,912	30,014	0,000141
b_{22}	10,207	1	10,207	62,369	0,000004
b_3	0,857	1	0,857	5,239	0,041011
b_{33}	0,852	1	0,852	5,205	0,041571
b_{12}	4,062	1	4,062	24,820	0,000319
b_{23}	0,812	1	0,812	4,961	0,045832
<i>Lack of Fit</i>	70,481	16	4,405	26,916	0,000001
<i>Pure Error</i>	1,964	12	0,164		
<i>Total SS</i>	198,330	36			

где је SS – сума квадрата, df – степен слободe, MS – средња вредност суме квадрата, F – Фишерава статистика, p – статистички параметар повезан за значајношћу коефицијената.

Како је израчуната вредност p статистичког параметра већа од 0,05 за X_1X_3 интеракциони коефицијент, у другом циклусу прорачуна овај коефицијент је изостављен и укључен у lack of fit. ANOVA анализа (Табела 45) даје средњу вредност lack of fit од 4,4 која показује примену квадратног модела.

За сва четири анализата F-тест између варијанси за „lack of fit“ (loss функција) и за „pure error“ (репликације) даје F вредности много веће од табеларних (критичних) вредности на нивоу поузданости од 0,05, $F_{\text{крит.}} = 4,07$. Према томе, анализом површина одговора могуће је утврдити поуздане оптималне услове за раздвајање моноксифлоксацина и сродних једињења. Састав мобилне фазе при коме је могуће добити прихватљиву резолуцију анализата ($R_s > 2$) и кратко трајање анализе (мање од 10 минута) је 10 % ацетонитрила и 90 % воде, уз додаток 2 % триетиламина и при рН вредности 6,0 (подешено фосфорном киселином).

Да би се установио појединачан утицај хроматографских фактора на резолуцију пикова коришћена је метода одговора површине. Укупна резолуција, R_x , се дефинише као збир свих појединачних резолуција између пикова и узета је као функција независних варијабли, % ацетонитрила, рН, температуре и % ТЕА. Стога укупна резолуција ће се повећавати како се побољшавају аналитичке перформансе. Област блиска максимуму на графику одговора површине се може описати користећи полином другог реда:

$$R_x = b_0 + \sum_{i=1}^f b_i x_i + \sum_{i=1, j>1}^f b_{i,j} x_i x_j + \sum_{i=1}^f b_{ii} x_i^2 + \varepsilon \quad (79)$$

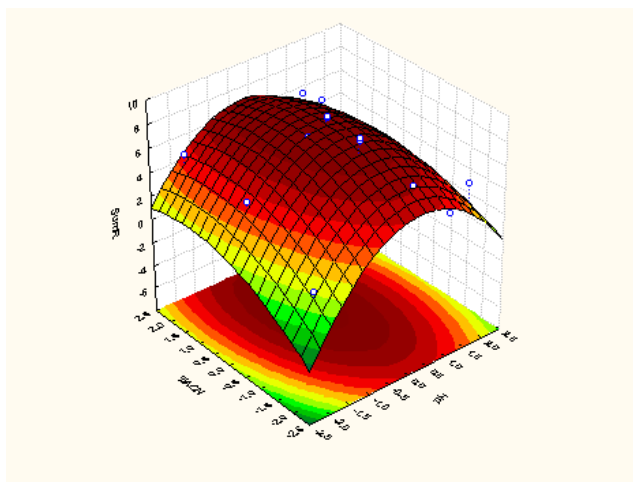
где је f димензија фактора и ε грешка које се односи на одговор R_x , и за коју се претпоставља да је нормално распоређена. У Табели 45 су коефицијенти за једначину 79 израчунати заједно са стандардним грешкама.

Табела 46. Израчунати коефицијенти за квадратни модел хроматографског раздвајања.

Коефицијенти	Ефекат	Стандардна грешка (Pure Err)	t(12)	p
b_0	8,23	0,144	56,9798	0,000000
b_1	0,58	0,272	2,1233	0,055211
b_{11}	-8,90	0,470	-18,9149	0,000000
b_2	1,48	0,270	5,4785	0,000141
b_{22}	-2,80	0,355	-7,8974	0,000004
b_3	0,70	0,306	2,2889	0,041011
b_{33}	-0,91	0,400	-2,2814	0,041571
b_{12}	-1,68	0,337	-4,9819	0,000319
b_{23}	1,03	0,465	2,2273	0,045832

Израчунати p статистички параметри показују да је осам коефицијената значајно, а најзначајнији је квадратни рН терм. Такође, интеракција између рН и % ацетонитрила је важна у моделу, мада промене рН и органског модификатора мобилне фазе појединачно утичу на резолуцију. Потребно је пажљиво подешавање оба параметра у циљу постизања квалитетног раздвајања. Количина ТЕА и његова интеракција са АСН је мање важна.

Израчуната површина одговора приказан је на Слици 96.



Слика 96. Површина одговора израчуната на основу дизајна

Како се може уочити са Сликe 96 површина одговора показује релативно широк максимум показујући робусност методе.

Резултати су показали да се ретенционо понашање моксифлоксацина може апроксимирати површином другог степена. Оптимизацијом резолуције добијена је површина одговора која има релативно широк максимум између 8 – 12 % ацетонитрила у опсегу рН вредности 4 – 8.

Оптималне вредности су нађене коришћењем методе нелинеарних најмањих квадрата. Оптимални услови експерименталним дизајном дати су у Табели 47.

Табела 47. Оптимални услови за раздвајање и одрђивање моксифлоксацина и сродних једињења у фармацеутским формулацијама утврђени експерименталним дизајном.

Параметар	Опимални услови
Колона	XTerra (50×4,6 mm, 5 μm)
Проток	1,5 mL/min
Температура	45 °C
Детекција	UV 290 nm
Запремина инјектовања	20 μL
% Ацетонитрила	10 %
pH вредности мобилне фазе	6,0
% Триетиламина	2 %

При експерименталним условима наведеним у Табели 47 добијена су прихватљива ретенциона времена, при максималном раздвајању моксифлоксацина, сродних једињења моксифлоксацина и офлоксацина и у блиској су сагласности са резултатима добијеним DryLab[®] симулацијом. Оптимизација релативне ретенције дала је врло сличне резултате. Такође, при овим условима су добијени и најбољи резултати за релативну стандардну девијацију површина пикова.

На различитим системама за HPLC (под истим хроматографским условима) не постоји значајна разлика у израчунатим концентрацијама, а нађени хроматографски параметри су приказани у Табели 48.

Табела 48. Основне хроматографске карактеристике раздвајања моксифлоксацина и четири сродне нечистоће раздвојене на XTerra колони при оптималним условима.

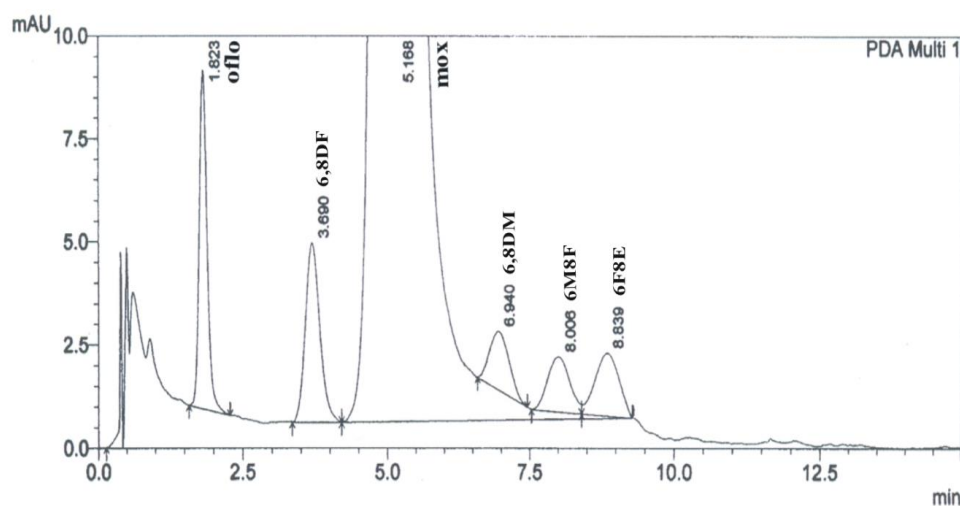
Параметар	Инструмент	6,8DF	MOX	6,8DM	6M8F	6F8E
Релативно ретенционо време	Shimadzu	0,714	1,00	1,434	1,549	1,710
	Agilent	0,758	1,00	1,540	1,600	1,674
Релативни фактор одговора	Shimadzu	0,991	1,00	0,415	0,404	0,529
	Agilent	1,190	1,00	0,430	0,460	0,589
Резолуција	Shimadzu	5,239	2,757	2,779	1,553	1,410
	Agilent	5,460	2,900	2,910	1,600	1,420
Tailing	Shimadzu	1,189	0,980	1,160	0,976	1,072
	Agilent	1,010	1,000	0,890	0,970	0,984

3.3.3. Одређивање сродних једињења моксифлоксацина

Циљ одређивања сродних једињења моксифлоксацина у воденој фази је провера погодности методе, хроматографског система, стабилности параматара за њихово одређивање у дозираним облицима.

У процесу оптимизације методе за одређивање сродних једињења моксифлоксацина (6F8E - 1-циклопропил-7-[(S,S)-2,8-диазабицикло[4.3.0]нон-8-ил]-8-етокси-6-флоро-1,4-дихидро-4-оксо-3-хинолон карбоксилна киселина, 6M8F - 1-циклопропил-7-[(S,S)-2,8-диазабицикло[4.3.0]нон-8-ил]-8-флуоро-6-метокси-1,4-дихидро-4-оксо-3-хинолон карбоксилна киселина), 6,8DM - 1-циклопропил-7-[(S,S)-2,8-диазабицикло[4.3.0]нон-8-ил]-6,8-диметокси-1,4-дихидро-4-оксо-3-хинолон карбоксилна киселина), 6,8DF - 1-циклопропил-7-[(S,S)-2,8-диазабицикло[4.3.0]нон-8-ил]-6,8-дифлуоро-1,4-дихидро-4-оксо-3-хинолон карбоксилна киселина) у воденој фази, утврђени оптимални услови приказани су у Табели 47.

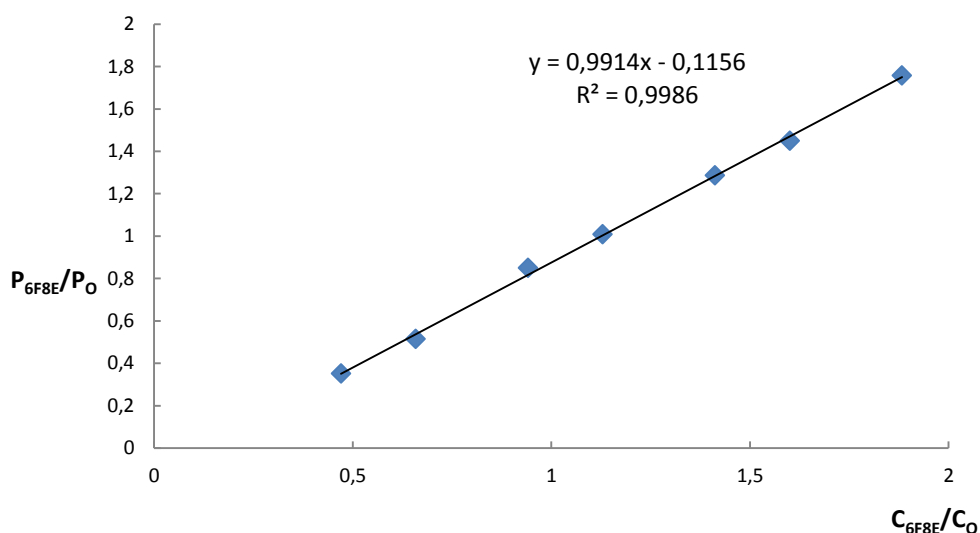
Под приказаним условима добијен је хроматограм смеше стандарда моксифлоксацина (200 $\mu\text{g/mL}$), сродних једињења (1 $\mu\text{g/mL}$), и офлоксацина (1 $\mu\text{g/mL}$), као интерног стандарда приказан је на Слици 97.



Слика 97. Хроматограм смеше стандарда моксифлоксацина (200 $\mu\text{g/mL}$), сродних једињења (1 $\mu\text{g/mL}$), и офлоксацина (1 $\mu\text{g/mL}$) при утврђеним експерименталним условима

За одређивање садржаја појединих једињења конструисане су радне калибрационе праве где је концентрација интерног стандарда (ИС) (офлоксацина) износила 1 $\mu\text{g/mL}$.

Радна калибрациона права за одређивање 6F8E (1-циклопропил-7-[(S,S)-2,8-диазабицикло[4.3.0]нон-8-ил]-8-етокси-6-флоро-1,4-дихидро-4-оксо-3-хинолон карбоксилна киселина) у воденој фази приказана је на Слици 98, а одговарајући валидациони параметри у Табели 49.

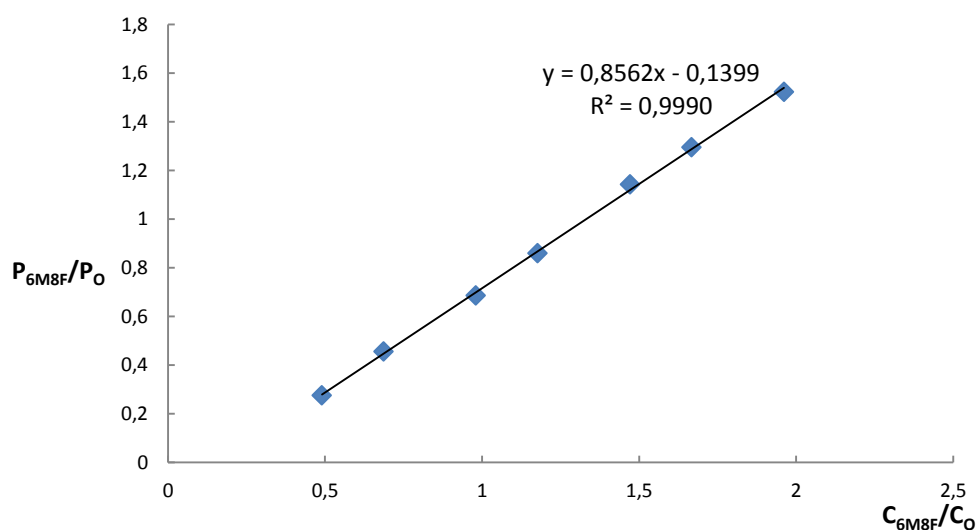


Слика 98. Радна калибрациона права за одређивање 6F8E у воденој фази. P_{6F8E}/P_0 – однос површина 6F8E и офлоксацина (ИС), C_{6F8E}/C_0 – однос концентрација 6F8E и офлоксацина (ИС)

Табела 49. Валидациони параметри за одређивање 6F8E у води

Валидациони параметар	Резултат
Линеарни опсег концентрација (N = 12, n = 3)	0,4857 – 1,9427 mg/L
Регресиона једначина за калибрациону праву	$Y = (0,99 \pm 0,02)X - (0,12 \pm 0,02)$
Коефицијент корелације	0,9986
Граница квантификације	0,21 mg/L
Граница детекције	0,061 mg/L

Радна калибрациона права за одређивање 6M8F (1-циклопропил-7-[(S,S)-2,8-диазабицикло[4.3.0]нон-8-ил]-8-флуоро-6-метокси-1,4-дихидро-4-оксо-3-хинолон карбоксилна киселина) у воденој фази приказана је на Слици 99, а одговарајући валидациони параметри у Табели 50.

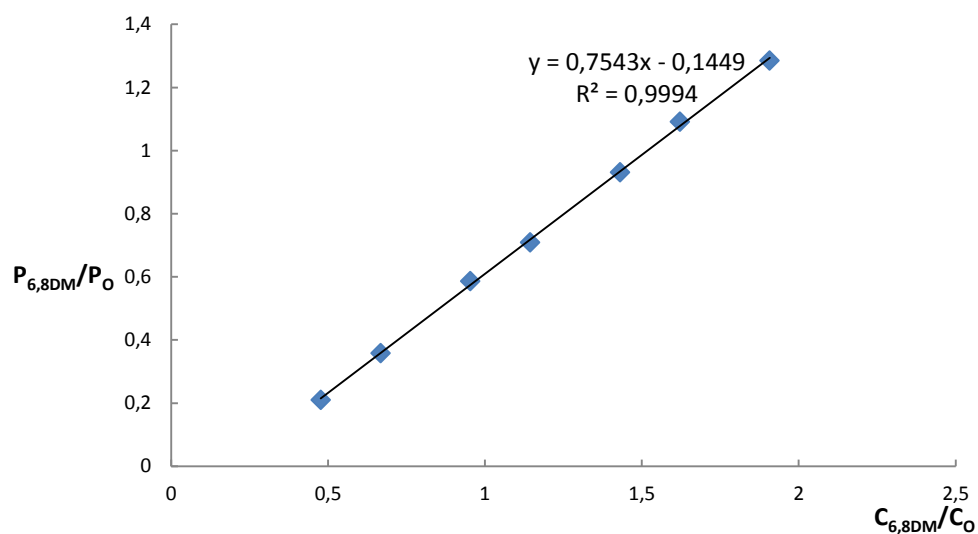


Слика 99. Радна калибрациона права за одређивање 6M8F у воденој фази. P_{6M8F}/P_O – однос површина моксифлоксацина и офлоксацина (ИС), C_{6M8F}/C_O – однос концентрација 6M8F и офлоксацина (ИС)

Табела 50. Валидациони параметри за одређивање 6M8F у води

Валидациони параметар	Резултат
Линеарни опсег концентрација (N = 12, n = 3)	0,506 – 2,024 mg/L
Регресиона једначина за калибрациону праву	$Y = (0,86 \pm 0,01)X - (0,14 \pm 0,02)$
Коефицијент корелације	0,9990
Граница квантификације	0,1824 mg/L
Граница детекције	0,0547 mg/L

Радна калибрациона права за одређивање 6,8DM (1-циклопропил-7-[(S,S)-2,8-диазабицикло[4.3.0]нон-8-ил]-6,8-диметокси-1,4-дихидро-4-оксо-3-хинолон карбоксилна киселина) у воденој фази приказана је на Слици 100, а одговарајући валидациони параметри у Табели 51.

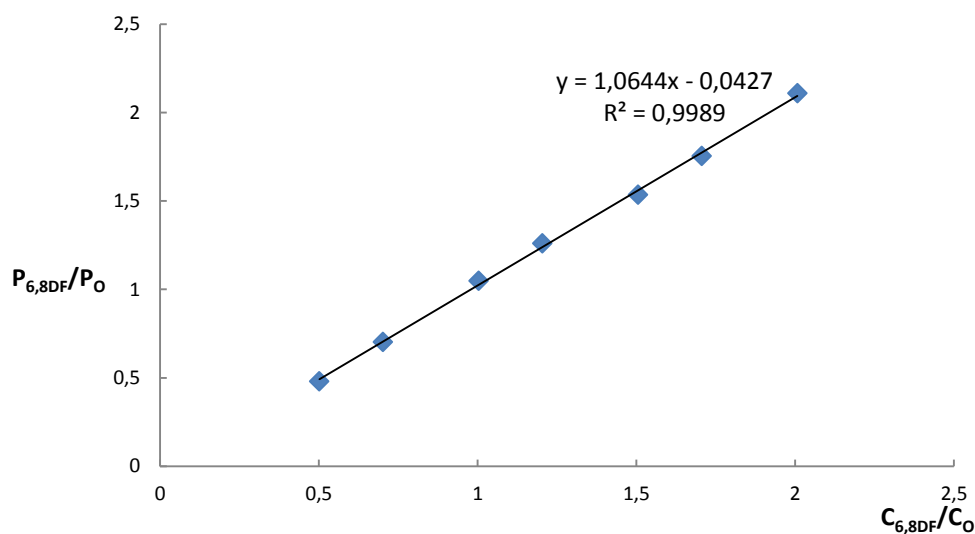


Слика 100. Радна калибрациона права за одређивање 6,8DM у воденој фази. $P_{6,8DM}/P_O$ – однос површина 6,8DM и офлоксацина (ИС), $C_{6,8DM}/C_O$ – однос концентрација 6,8DM и офлоксацина (ИС)

Табела 51. Валидациони параметри за одређивање 6,8DM у води

Валидациони параметар	Резултат
Линеарни опсег концентрација (N= 12, n = 3)	0,4922 – 1,9686 mg/L
Регресиона једначина за калибрациону праву	$Y = (0,75 \pm 0,01)X - (0,14 \pm 0,01)$
Коефицијент корелације	0,9994
Граница квантификације	0,14 mg/L
Граница детекције	0,041 mg/L

Радна калибрациона права за одређивање 6,8DF (1-циклопропил-7-[(S,S)-2,8-диазабицикло[4.3.0]нон-8-ил]-6,8-дифлуоро-1,4-дихидро-4-оксо-3-хинолон карбоксилна киселина) у воденој фази приказана је на Слици 101, а одговарајући валидациони параметри у Табели 52.



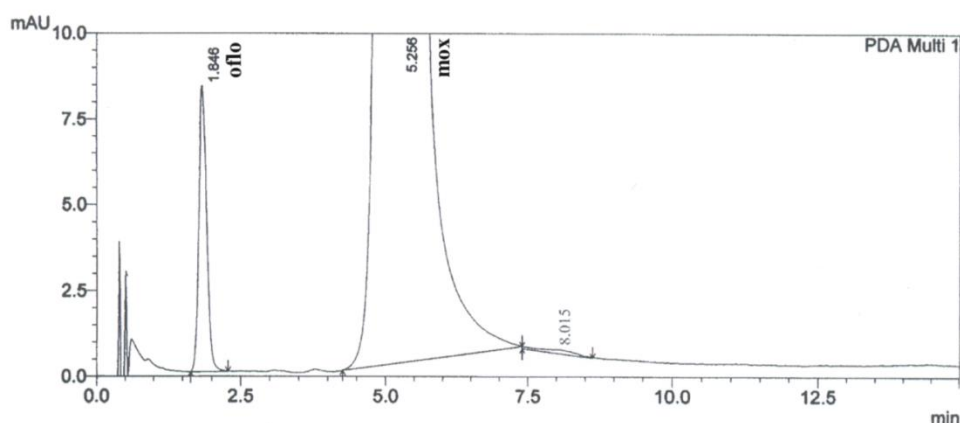
Слика 101. Радна калибрациона праваљ за одређивање 6,8DF у воденој фази. $P_{6,8DF}/P_O$ – однос површина 6,8DF и офлоксацина (ИС), $C_{6,8DF}/C_O$ – однос концентрација 6,8DF и офлоксацина (ИС)

Табела 52. Валидациони параметри за одређивање 6,8DF у води

Валидациони параметар	Резултат
Линеарни опсег концентрација (N = 12, n = 3)	0,5179 – 2,0717 mg/L
Регресиона једначина за калибрациону праву	$Y = (1,06 \pm 0,02)X - (0,04 \pm 0,02)$
Коефицијент корелације	0,9989
Граница квантификације	0,20 mg/L
Граница детекције	0,06 mg/L

3.3.4. Одређивање нечистоћа у фармацеутским формулацијама “Avelox-a”

Приликом испитивања присуства нечистоћа припремљен је раствор таблета и инфузије тако да концентрација моксифлоксацина износи 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ и додат интерни стандард офлоксацина тако да његова крајња концентрација износи 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Снимљен је хроматограм овако припремљених раствора за испитивање присуства нечистоћа који је приказан на Слици 102.



Слика 102. Хроматограм таблете “Avelox” (активна компонента моксифлоксацин) у присуству интерног стандарда офлоксацина (1 $\mu\text{g/mL}$)

Пик нечистоће на $t_R = 8,015$ min је забележен у растворима таблета и инфузије. Тај пик је веома добро раздвојен од стандарда моксифлоксацина (релативно ретенционо време, $RRT = 1,52$). Квантификација нечистоће у односу на референтни стандард моксифлоксацина даје удео од 0,11 %. Поређењем вредности RRT и DAD спектра познатих синтетичких нечистоћа показује да је нечистоћа вероватно 6-метокси-8-флуоро (6M8F) једињење.

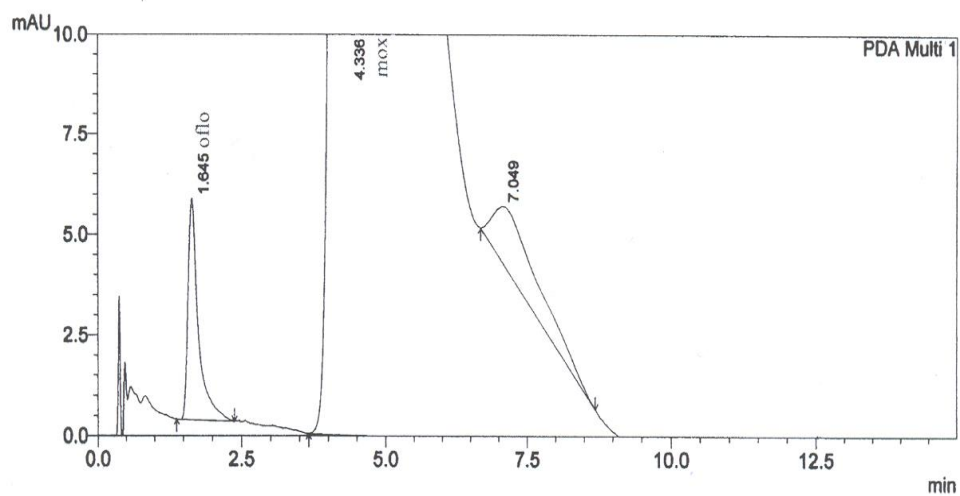
3.3.5. Одређивање производа присилне деградације моксифлоксацина

Деградација стандарда моксифлоксацина, као и његових дозираних облика (инфузије и таблета “Avelox”) изведена је при хидролитичким условима у киселој (0,1 mol/L HCl), неутралној (водена средина) и базној (0,1 mol/L NaOH) средини, при чему су раствори загревани на температури од 50 °C у трајању од 3 сата. Оксидациони стрес је изведен у присуству 3 % раствора H_2O_2 , при чему је раствор остављен 6 сати на собној температури пре анализе, док је фотолитички стрес изведен у светлосној комори са две UV лампе, где је коришћено укупно зрачење од 840 Wh/m² у трајању од 3 сата.

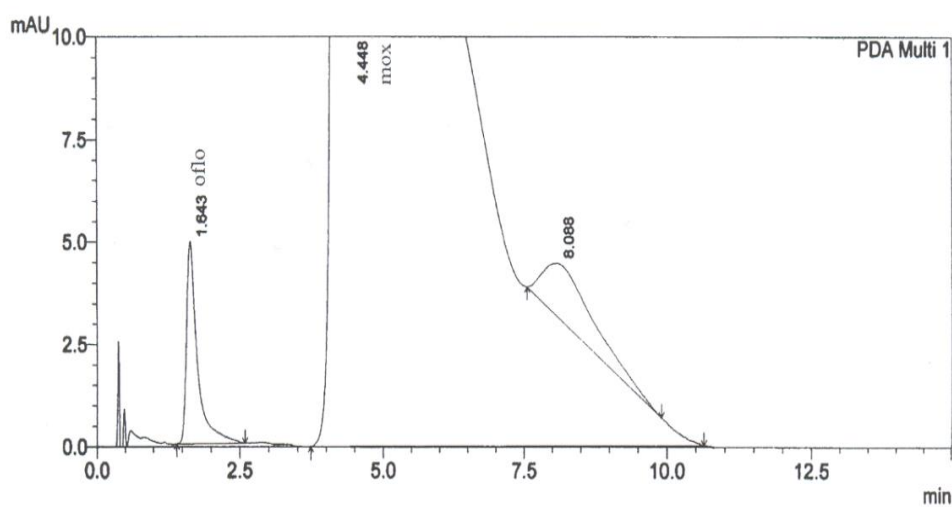
Пре анализе, у све растворе додата је иста количина интерног стандарда (офлоксацина) тако да његова крајња концентрација износи 1 $\mu\text{g/mL}$.

Приликом деградације таблета и инфузија уочено је да не постоји интеракција између моксифлоксацина и ексципијената. На Сликама 103 и 104 су представљени

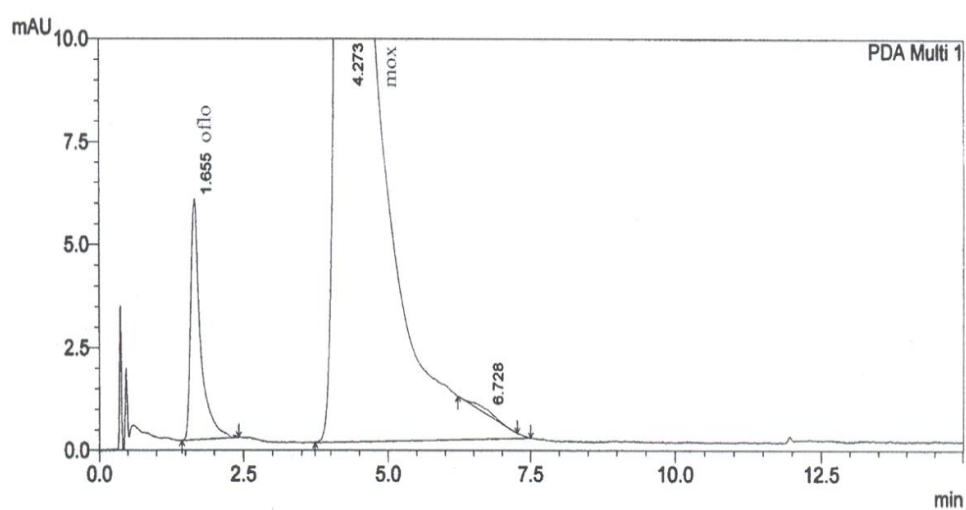
хроматограми производа деградације инфузије моксифлоксацина у киселој и базној средини, а на Сликама 105 и 106 деградација “Avelox” табелете.



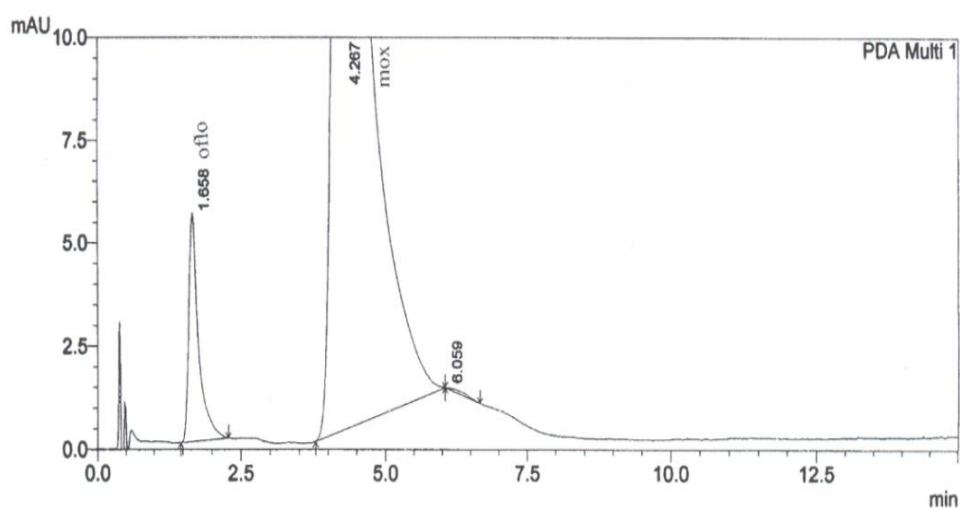
Слика 103. Хроматоргам производа деградације инфузије моксифлоксацина у киселој средини у присуству интерног стандарда офлоксацина



Слика 104. Хроматоргам производа деградације инфузије моксифлоксацина у базној средини у присуству интерног стандарда офлоксацина



Слика 105. Хроматоргам производа деградације таблете моксифлоксацина у киселој средини у присуству интерног стандарда офлоксацина



Слика 106. Хроматоргам производа деградације таблете моксифлоксацина у базној средини у присуству интерног стандарда офлоксацина

Приликом хидролитичке деградације инфузије и таблете “Avelox-a” примећена су два деградациона производа на $t_R = 7,049$ и $6,728$ min (кисела хидролиза) и $t_R = 8,088$ и $6,059$ min (базна хидролиза). Укупни хидролитички производи деградације су око 0,3 %.

Сумирани подаци присилне деградације стандарда, таблете и инфузије моксифлоксацина при различитим условима приказани су у Табели 53.

Табела 53. Услови и резултати присилне деградације стандарда, таблете и инфузије моксифлоксацина

Деградациони услови	Стандард		Таблета		Инфузија	
	% деградације	RRT	% деградације	RRT	% деградације	RRT
0,1 М НСl; 90 °С, 3 h	0,2	1,380	0,1	1,381	0,2	1,390
	0,28	1,570	0,24	1,575	0,31	1,580
0,1 М NaOH; 90 ° С, 3h	0,28	1,400	0,21	1,420	0,30	1,410
	0,20	1,570	0,17	1,562	0,21	1,575
H ₂ O ₂ (20% v/v) 3h	-	-	-	-	-	-
Загревање (120 ⁰ С); 24 h	< 0,1	1,60	< 0,1	1,58	-	-
Фотостабилност - дневна светлост, 72 h	-	-	-	-	-	-
UV (310 nm), 24 h	-	-	-	-	-	-

Приликом хидролитичке деградације стандарда моксифлоксацина као и његових дозираних облика јављају се два деградациона производа на ретенционим временима $t_R = 5,90$ и $6,73$ min (киселна хидролиза) и $t_R = 6,05$ и $6,67$ min (базна хидролиза). Укупни садржај деградационих производа приликом хидролитичке деградације је око 0,3 %. Приликом фотолитичких или оксидативних услова деградације нису нађени други пикови осим моксифлоксацина, на основу чега се може закључити да је лек стабилан приликом оксидативне и фото деградације.

3.4. Спектрофотометријско одређивање моксифлоксацина у серуму

Моксифлоксацин је одређиван у хуманом серуму спектрофотометријском методом. У циљу развоја спектрофотометријске методе извршена је оптимизација методе која је обухватала:

- Прелиминарна испитивања,
- Потенциометријска мерења,
- Оптимизацију спектрофотометријских услова,
- Конструкцију калибрационе праве за одређивање моксифлоксацина у серуму
- Валидацију развијене спектрофотометријске методе и
- Примену спектрофотометријске методе за одређивање моксифлоксацина на хуманим волонтерима.

3.4.1. Прелиминарна испитивања

Моксифлоксацин је слаба хетероциклична аминокиселина, која може постојати у раствору у катјонском, неутралном, диполарном и анјонском облику. Релативна концентрација ових облика веома зависи од рН вредности раствора. Стога је неопходна строга контрола рН приликом одређивања моксифлоксацина коришћењем спектрофотометријске методе.

Спектар моксифлоксацина се састоји од две главне траке са максимумом на 290 nm за прву и 340 nm за другу траку. Високоенергетска трака потиче превасходно од $\pi \rightarrow \pi^*$ прелаза у ароматичном прстену. Нискоенергетска трака потиче од $n \rightarrow \pi^*$ прелаза у диазабицикло-супституенту на позицији 7 и садржи два подпика. Ови подпикови такође представљају утицај слободног електронског пара на атому азота на позицији 1 и изазван је интермолекулским водоничним везама између моксифлоксацина и воде као и интрамолекулских водоничних веза између 4-кето и 3-карбоксилне групе [325, 326]. Приликом повећања рН од 4 до 9, високоенергетска трака показује само мале промене таласне дужине и интензитета сигнала (хипохромно померање). Трака ниже енергије показује приметне разлике у облику, вредности таласне дужине (батохромно померање) и интензитету. При рН вредностима мањим од 7, ова трака је приближно симетрична са максимумом на 350 nm, али на рН вредностима већим од 7 на спектру се уочавају два одвојена максимума на 335 nm и 355 nm. Интензитет траке се повећава са повећањем

pH до 8, а након тога опада. На основу тога оптимална вредност pH за одређивање је 7,2.

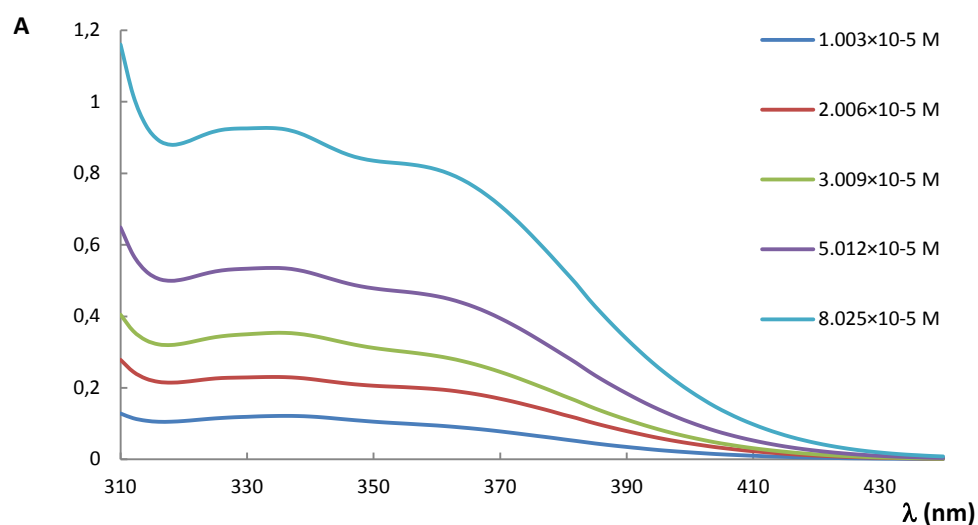
Испитивањем спектра моксифлоксацина у воденој фази, чије је pH подешавано додатком јаке киселине или базе и мерено потенциометријски, и њиховим поређењем са спектрима код којих је pH подешавано пуферима, уочава се занемарљив утицај пуфера на апсорпцију моксифлоксацина. Додатком SDS повећава се интензитет апсорпционих пикова за око 5% и апсорпционе траке постају симетричније. Присуство SDS такође утиче на померање изоелектричне тачке моксифлоксацина са 7,44 на 8,21, при чему се растворљивост задржава на прихватљивом нивоу.

Стога је пик са максимумом на таласној дужини од 340 nm изабран за анализу моксифлоксацина у узорку.

3.4.2. Оптимизација спектрофотометријских услова мерења

За спектрофотометријска мерења коришћен је радни раствор моксифлоксацина концентрације 2×10^{-4} mol/L. Мерења су вршена на собној температури ($298 \pm 0,1$ K) и у области таласних дужина од 310 до 440 nm. Због немогућности коришћења основног спектра који се углавном састоји од широких некарактеристичних трака, чији изглед пружа мало корисних информација, за конструкцију калибрационе криве потребно је урадити други извод апсорпционог спектра тј. тражи се промена апсорбанције са променом таласне дужине у зависности од таласне дужине.

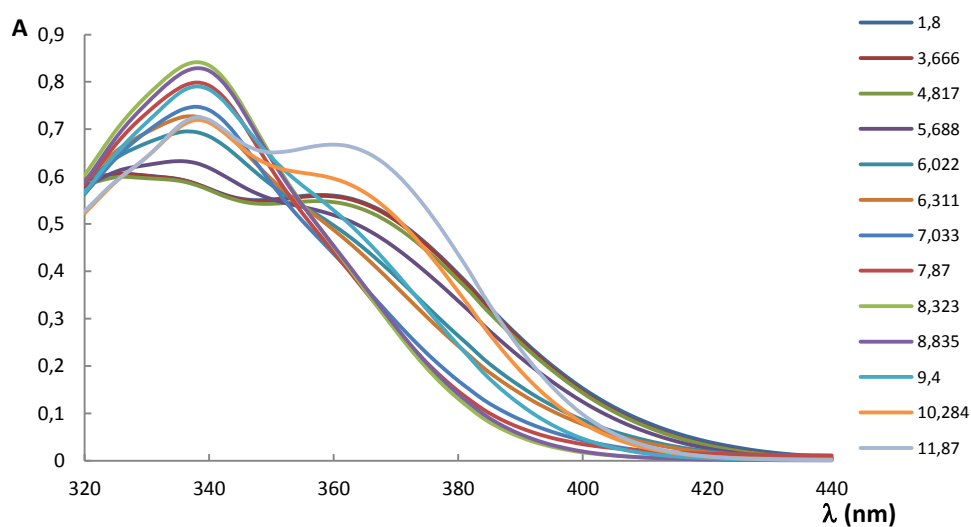
На Слици 107 приказани су спектри водених раствора моксифлоксацина различитих концентрација у присуству 0,1 mol/L LiCl у области таласних дужина од 310 до 440 nm. Као референтни раствор коришћена је само бидестилована вода. pH вредност испитиваног раствора кретала се између 5 и 6, што је одређено помоћу универзалног индикаторског папира.



Слика 107. Спектри моксифлоксацина различитих концентрација у присуству 0,1 mol/L LiCl, у рН опсегу од 5 – 6

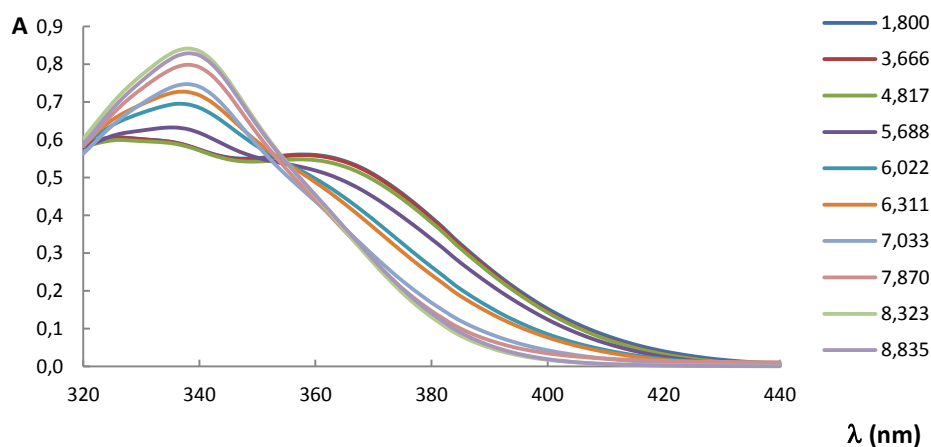
Моксифлоксацин показује максимум апсорпције на таласној дужини око 340 nm. Као што се очекује са повећањем концентрације моксифлоксацина долази до пораста апсорбанције.

На Слици 108 дати су UV/Vis спектри раствора моксифлоксацина чија концентрација износи $5,35 \times 10^{-5}$ mol/L у области рН вредности од 1,8 до 11,9. рН је подешено додатком јаке киселине и/или јаке базе. Као слепа проба коришћен је 0,1 mol/L раствор LiCl, а рН је мерено потенциометријски.



Слика 108. Апсорпциони спектри моксифлоксацина концентрације $5,35 \times 10^{-5}$ mol/L при различитим рН вредностима у 0,1 mol/L раствору LiCl

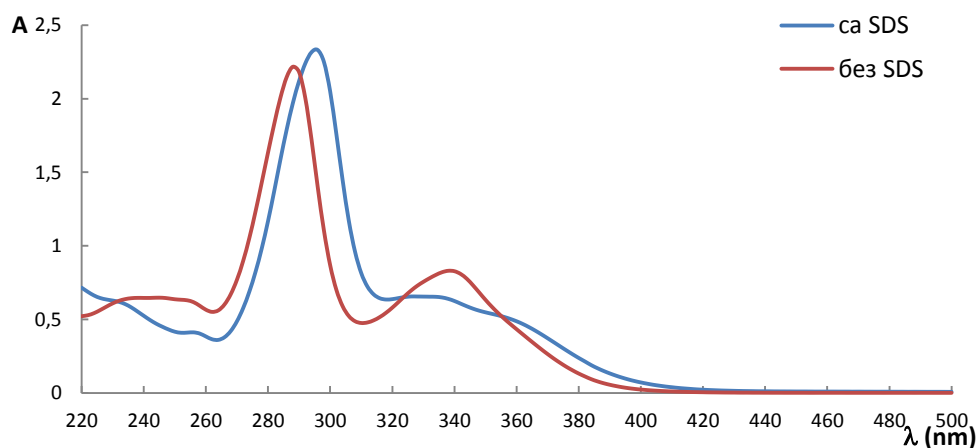
Види се да интензитет и положај апсорпционих трака зависи од рН.



Слика 109. Издвојени апсорпциони спектри моксифлоксацина концентрације $5,35 \times 10^{-5}$ mol/L у интервалу рН од 1,80 до 8,84 у 0,1 mol/L раствору LiCl

Слика 109 представља издвојене спектре раствора моксифлоксацина у којима се рН креће у границама од 1,80 до 8,84. Као што се може приметити апсорпциони максимуми расту са порастом рН вредности. Међутим, ово није случај и са спектром који је снимљен на рН = 8,84, чији се апсорпциони максимум налази на мањој вредности него што би се то могло претпоставити. Узрок томе је појава да се моксифлоксацин на високим вредностима рН хемијски модификује.

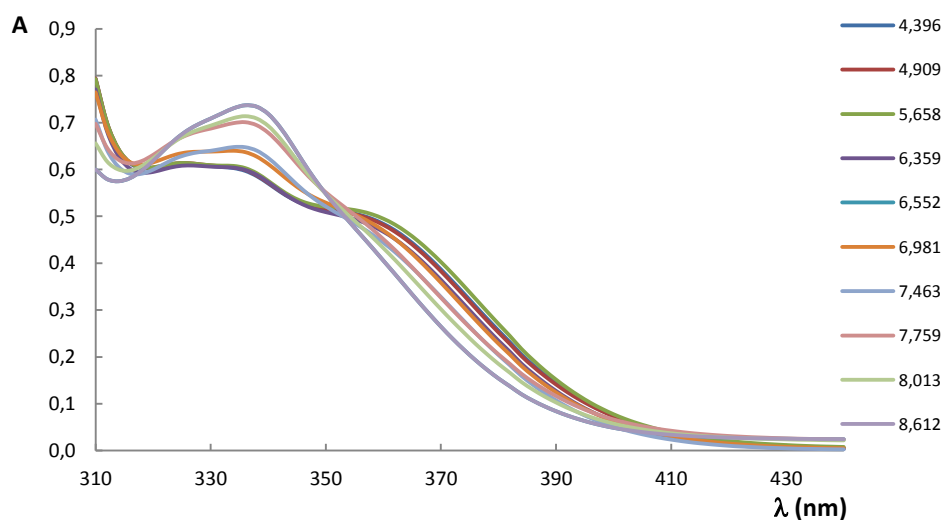
На Слици 110 је приказан утицај SDS на апсорпциони спектар моксифлоксацина.



Слика 110. Апсорпциони спектар моксифлоксацина концентрације $5,35 \times 10^{-5}$ mol/L у присуству 12 mmol/L SDS у 0,1 mol/L раствору LiCl

Као што се може видети са Сlike 110 приликом додатка SDS-а у водени раствор моксифлоксацина долази до смањења интензитета нискоенергетске траке као и до дељења тог максимума на два мања пика.

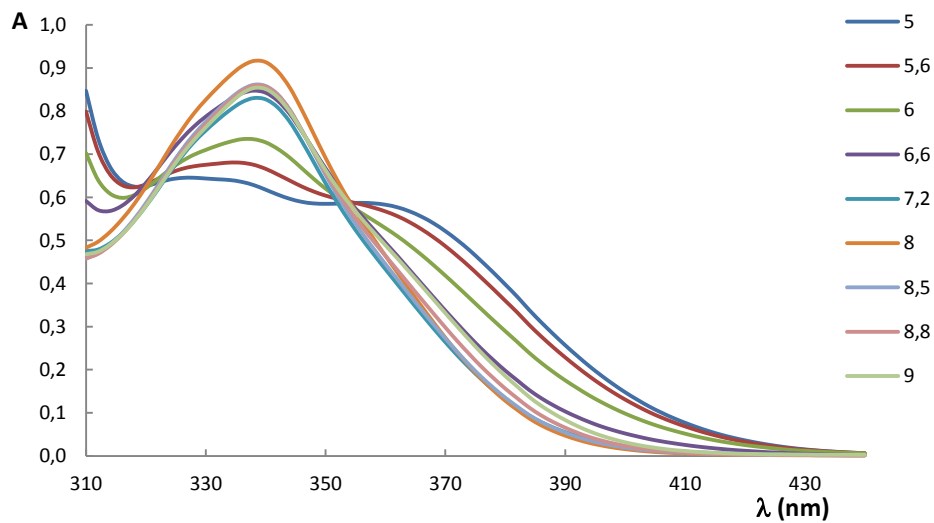
На Слици 111 приказани су спектри моксифлоксацина у присуству SDS-а где је рН подешавано додатком јаке базе и јаке киселине и мерено потенциометријски. Као растварач коришћена је бидестилована вода. За слепу пробу узет је раствор који садржи 12 mmol/L SDS у 0,1 mol/L раствору LiCl.



Слика 111. Апсорпциони спектри моксифлоксацина концентрације $5,35 \times 10^{-5}$ mol/L у присуству 12 mmol/L SDS у 0,1 mol/L раствору LiCl где је рН подешавано јаком киселином и/или јаком базом

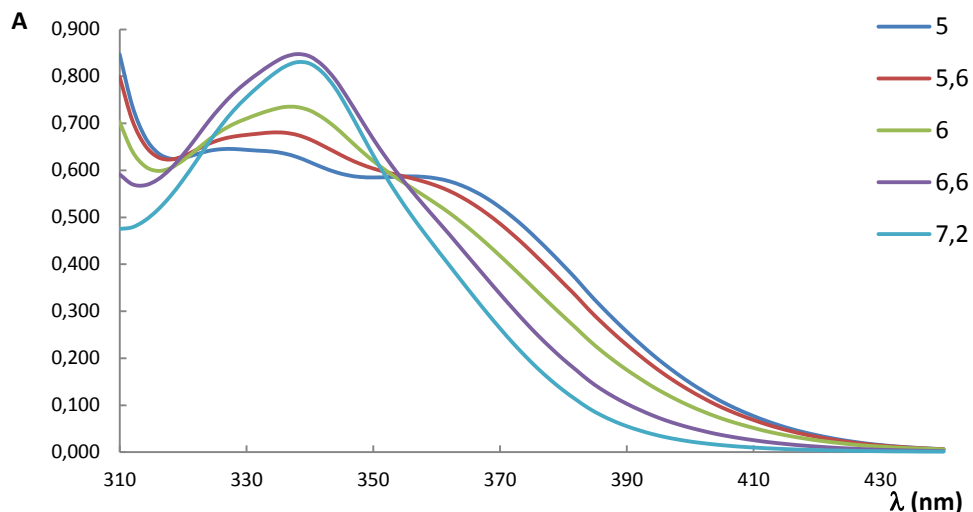
Са слике 111 види се утицај тензида SDS-а на спектре раствора моксифлоксацина. Његовим додавањем јавља се смањење у интензитету апсорбанције раствора. Спектри се ређају према порасту рН.

На Слици 112 су приказани спектри моксифлоксацина концентрације $5,35 \times 10^{-5}$ mol/L у присуству 12 mmol/L SDS у 0,1 mol/L раствору LiCl где је рН подешавано додатком пуфера.

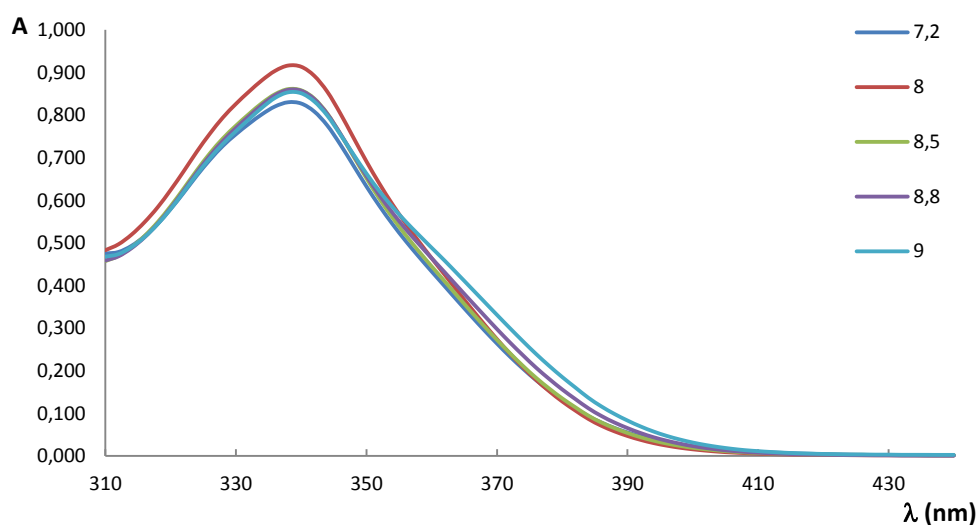


Слика 112. Апсорпциони спектри моксифлоксацина концентрације $5,35 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ у пуферима различитих рН вредности у $0,1 \text{ mol/L}$ раствору LiCl

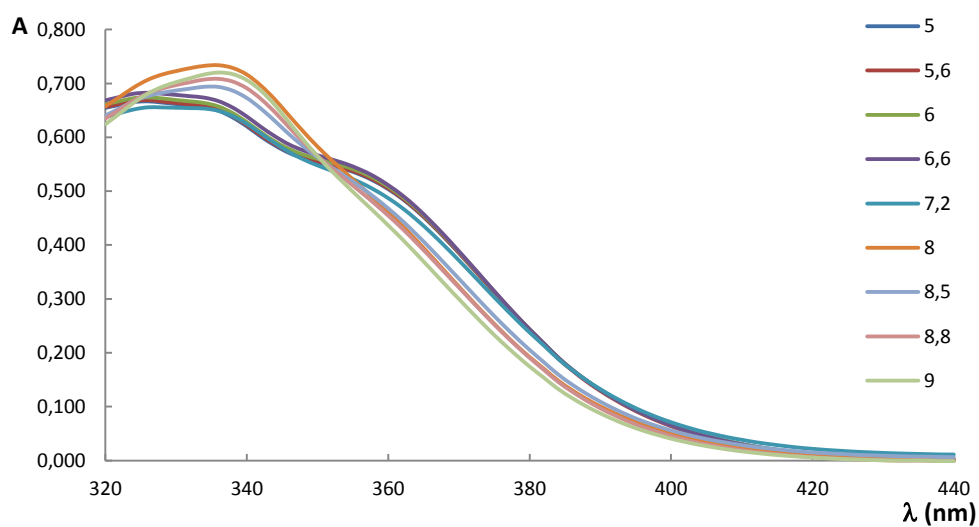
За рН вредности од 5 до 8 коришћен је цитратни пуфер, а за рН у области од 8,5 до 9,0, коришћен је боратни пуфер. Као референтни раствор коришћен је раствор пуфера чије је рН = 7,2. Као и на Слици 108 где је рН мерено потенциометријски и овде се уочава да у киселој и неутралној средини апсорпциони максимуми расту са порастом рН, али у слабо базној средини опет долази до опадања интензитета максимума апсорпције. Ово се боље уочава на Сликама 113, 114 и 115.



Слика 113. Издвојени апсорпциони спектри моксифлоксацина концентрације $5,35 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ у пуферима од рН 5 до 7,2 у $0,1 \text{ mol/L}$ раствору LiCl



Слика 114. Издвојени апсорпциони спектри мокифлоксацина концентрације $5,35 \times 10^{-5}$ mol/L у пуферима од рН 7,2 до 9,0 у 0,1 mol/L раствору LiCl

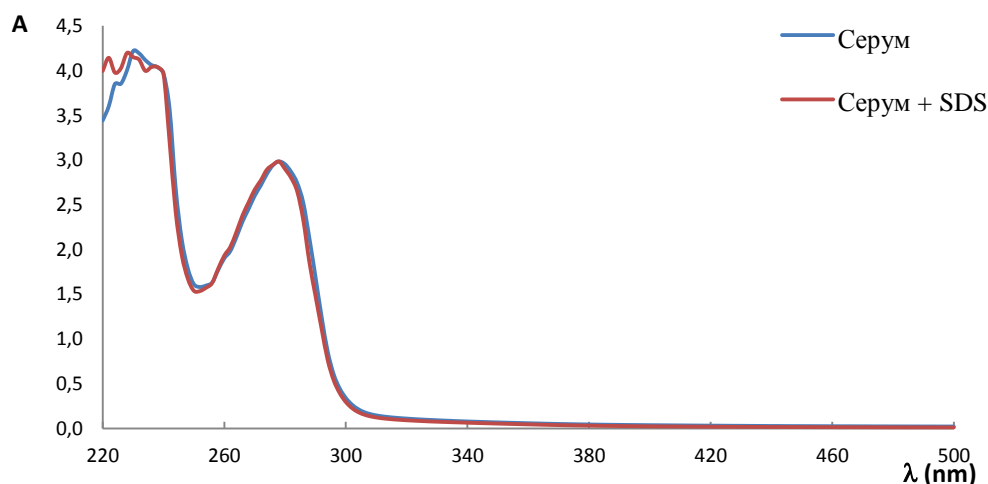


Слика 115. Апсорпциони спектри мокифлоксацина концентрације $5,35 \times 10^{-5}$ mol/L у присуству 12 mmol/L SDS пуферима у 0,1 mol/L раствору LiCl

Као што се примећује на Слици 115 максимум апсорбанције раствора код којег је рН = 7,2 је мањи од раствора код којег је рН = 6,6. Ово је последица разлагања мокифлоксацина са порастом рН раствора.

Макимум апсорбанције на свим рН вредностима је на блиским таласним дужинама.

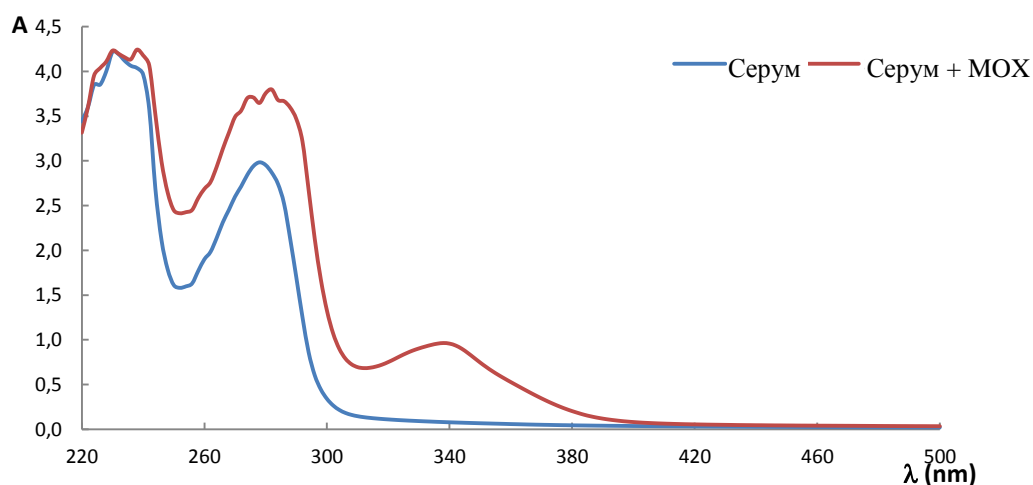
Ради одређивања моксифлоксацина у серуму у присуству SDS-а било је неопходно испитати утицај SDS-а на спектар серума. У ту сврху снимљени су спектри серума без и у присуства SDS-а. Протеини плазме апсорбују на таласној дужини од 280 nm (Слика 116)



Слика 116. Апсорпциони спектри серума без и у присуству SDS концентрације 12 mmol/L у 0,1 mol/L LiCl

Као што се може видети са Сlike 116 присуство SDS-а не утиче на апсорпциони спектар серума, односно не постоји никаква интеракција између серума и SDS-а.

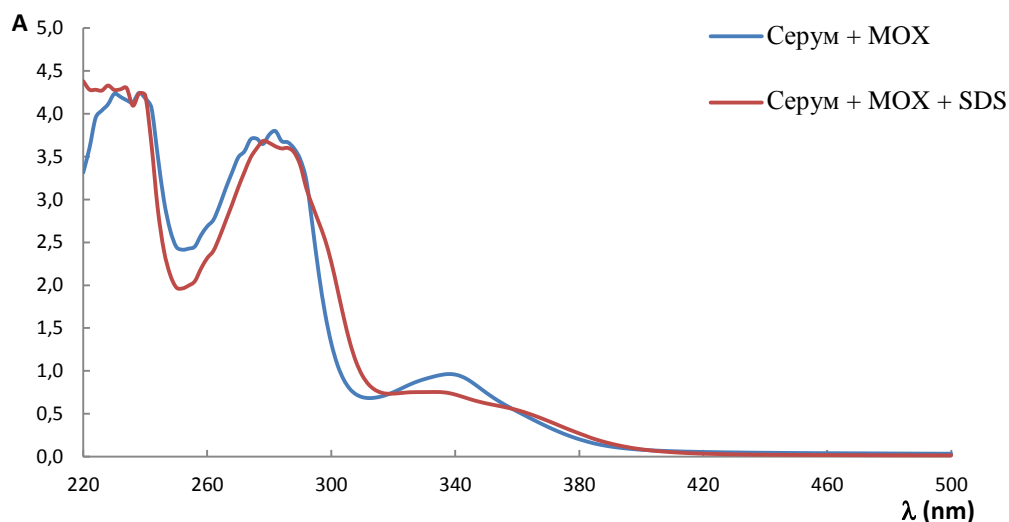
Следећи корак је био испитивање утицаја серума на апсорпциони спектар моксифлоксацина. Збор тога је снимљен апсорпциони спектар моксифлоксацина концентрације $5,35 \times 10^{-5}$ mol/L у присуству серума у 0,1 mol/L раствору LiCl (Слика 117).



Слика 117. Апсорпциони спектри серума без и у присуству моксифлоксацина концентрације $5,35 \times 10^{-5}$ mmol/L у 0,1 mol/L LiCl средини

Са Сликe 117 се може видети да присуство серума утиче на високоенергетски апсорпциони максимум моксифлоксацина јер се налази на приближно истој таласној дужини као апсорпциони максимум самог серума, док овај утицај изостаје код нискоенергетског максимума моксифлоксацина.

Да би могла да се искористи деривативна спектрофотометријска метода за одређивање моксифлоксацина било је неопходно снимити спектре моксифлоксацина у присуству серума са и без присуства SDS концентрације 12 mmol/L у 0,1 mol/L LiCl средини. Добијени спектри приказани су на Слици 118.



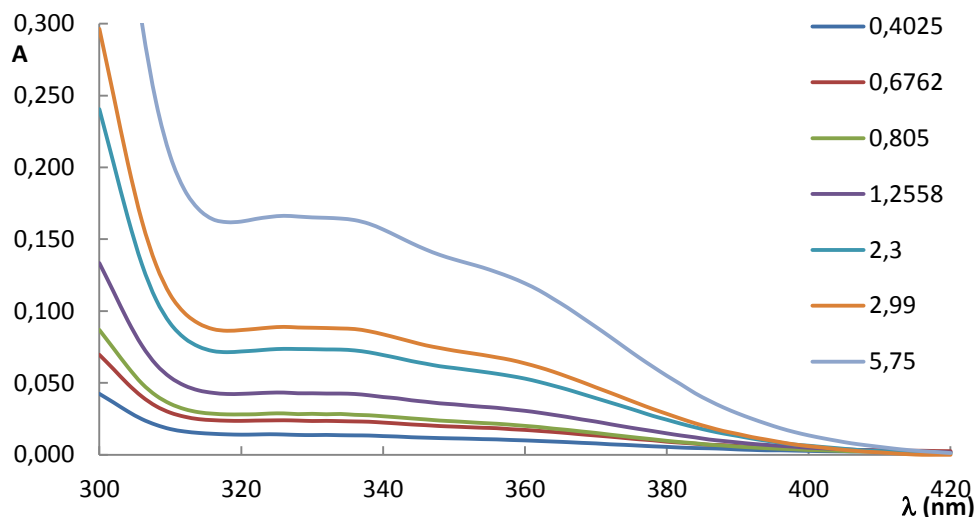
Слика 118. Апсорпциони спектри серума и моксифлоксацина концентрације $5,35 \times 10^{-5}$ mmol/L без и у присуству SDS концентрације 12 mmol/L у 0,1 mol/L LiCl средини

Како се може видети са Сликe 118, у присуству SDS-а, долази до смањења интензитета нискоенергетске траке моксифлоксацина у серуму и његове поделе на два мања пика, што је искоришћено за одређивање моксифлоксацина у серуму.

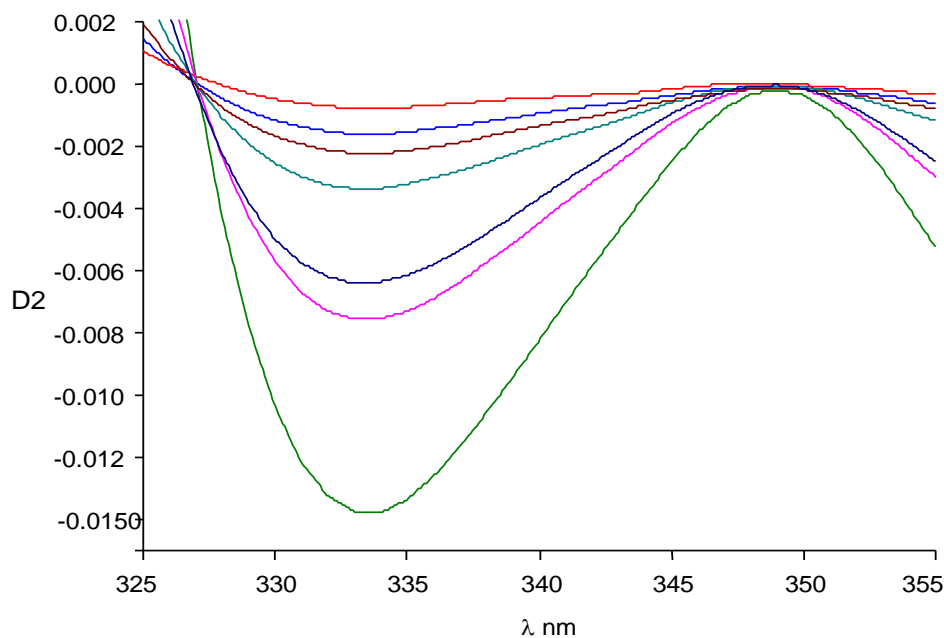
За одређивање концентрације моксифлоксацина у серуму снимљени су апсорпциони спектри стандардних раствора моксифлоксацина и нађени су њихови други изводи. На основу амплитуде између два суседна пика у другом изводу и концентрације коришћених раствора конструисана је калибрациона крива која је коришћена за одређивање непознате концентрације моксифлоксацина у серуму.

Оптимални услови за одређивање моксифлоксацина у плазми и дозираним облицима су: таласна дужина максималне апсорпције 340 nm и pH вредност од 7,2. На

Слици 119 представљен је спектар моксифлоксацина у присуству серума, а на Слици 120 његов други извод.



Слика 119. Апсорпциони спектри различитих концентрација моксифлоксацина у серуму за калибрациону криву у присуству SDS концентрације 12 mmol/L у 0,1 mol/L LiCl средини

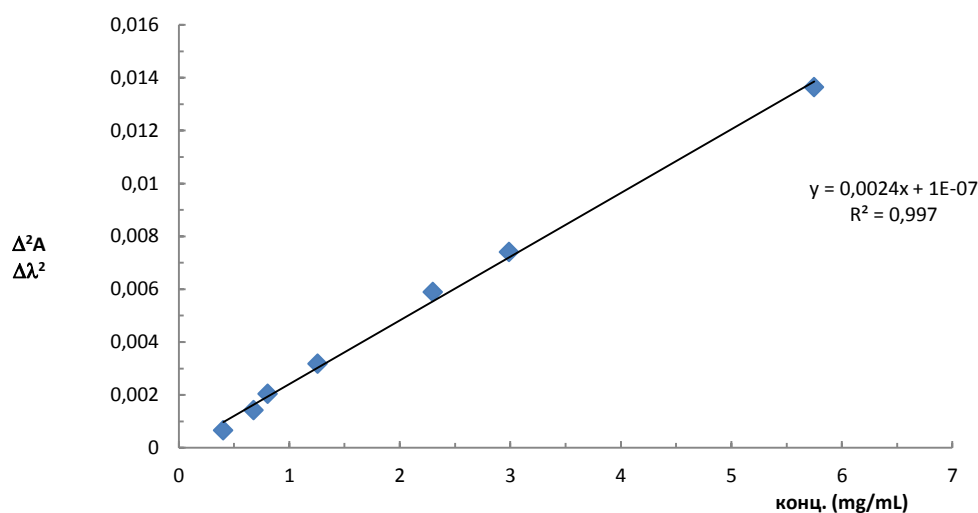


Слика 120. Други извод апсорпционих спектра различитих концентрација моксифлоксацина у серуму за калибрациону криву у присуству SDS концентрације 12 mmol/L у 0,1 mol/L LiCl средини

Калибрациони график за деривативно спектрофотометријско одређивање конструисан је наношењем зависности амплитуде пик – пик, из другог извода спектра, у функцији од концентрације моксифлоксацина. Амплитуде су мерене у интервалу таласних дужина од 334 – 348 nm. Подаци коришћени за калибрациону криву су представљени у Табели 54, а добијен калибрациони график за одређивање моксифлоксацина у плазми приказан је на Слици 121.

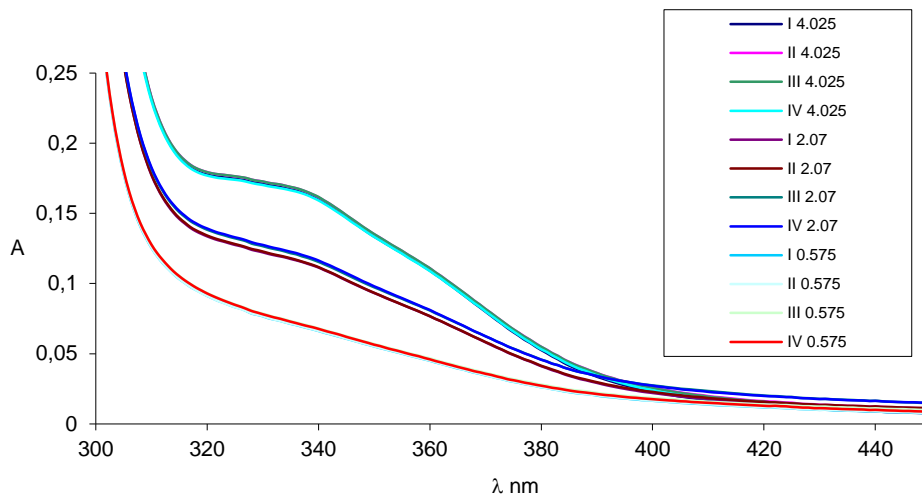
Табела 54. Вредности за конструкцију калибрационе криве за одређивање концентрације моксифлоксацина у серуму.

Конц. ($\mu\text{g/mL}$)	A	λ (nm)	$\Delta^2A/\Delta\lambda^2$
0,40	0,0136 – 0,0116	334 – 348	0,0006578
0,68	0,0234 – 0,0200	334 – 348	0,0014154
0,81	0,0284 – 0,0238	334 – 348	0,0020310
1,26	0,0426 – 0,0358	334 – 348	0,0031683
2,30	0,0732 – 0,0616	334 – 348	0,0058829
2,99	0,0879 – 0,0743	334 – 348	0,0073916
5,75	0,1644 – 0,1391	334 – 348	0,0136322



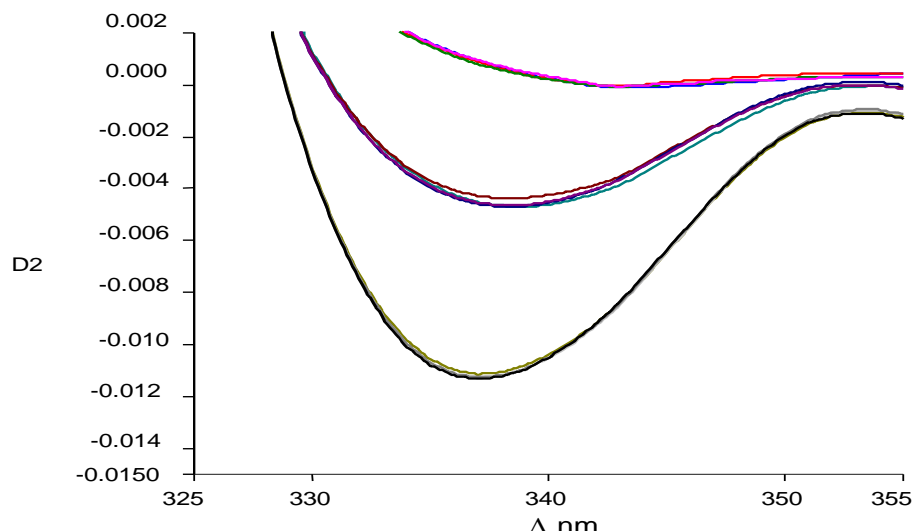
Слика 121. Калибрациона права за одређивање моксифлоксацина у хуманој серуму

Да би се испитала исправност методе у серум су додате три различите концентрације моксифлоксацина (0,575, 2,07 и 4,025 $\mu\text{g/mL}$) и снимељени су апсорпциони спектри тих раствора који су приказани на Слици 122.



Слика 122. Апсорпциони спектри различитих концентрација моксифлоксацина у серуму у присуству 12 mmol/L SDS на pH = 7,2

Како пик на таласној дужини 340 nm није добро раздвојен од пика на 355 nm коришћен је други извод спектра који су приказани на Слици 123. На овај начин апсорпција позадине серума је минимизована.



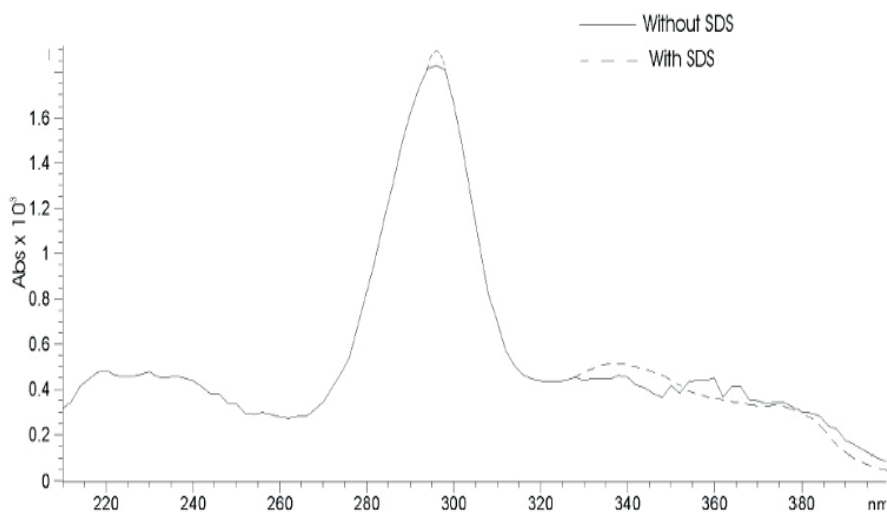
Слика 123. Други извод апсорпционих спектра различитих концентрација моксифлоксацина у серуму у присуству 12 mmol/L SDS на pH = 7,2

На основу другог извода апсорпционог спектра моксифлоксацина и калибрационе криве, одређене су концентрације моксифлоксацина у серуму и добијени подаци анализе приказани су у Табели 55.

Табела 55. Резултати погодности методе за одређивања моксифлоксацина у серуму

Узета концентрација ($\mu\text{g/mL}$)	0,575	2,070	4,025
	0,676	1,941	4,196
Нађена концентрација ($\mu\text{g/mL}$)	0,586	1,805	4,235
	0,575	1,985	4,211
	0,599	1,915	4,192
Средња концентрација ($\mu\text{g/mL}$)	0,609	1,912	4,209
Средња вредност квадрата	0,372	3,658	17,712
Дисперзија	0,002	0,004	0,000
Стандардна девијација	0,040	0,066	0,017
Релативна стандардна девијација	6,503	3,473	0,401
Процена грешке мерења	0,073	3,473	0,031
Апсолутна грешка	0,034	0,159	0,184
Релативна грешка	0,056	0,083	0,044

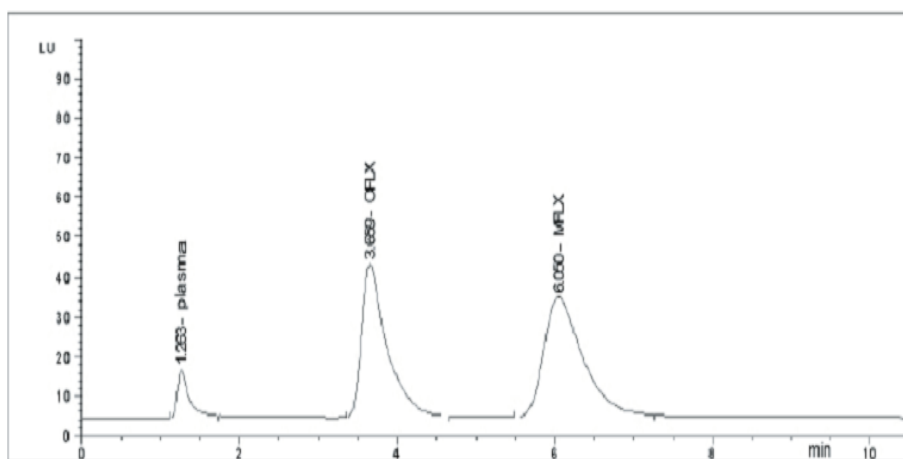
Метода је примењена за анализу моксифлоксацина у плазми код два здрава волонтера који су узели таблету „Avelox-a“. Узети су узорци крви (1 mL) из вене један сат након узимања лека. Крв је остављена да се згрушава на собној температури и након тога центрифугирана 30 минута при 1500 rpm. Одређивање садржаја моксифлоксацина у тако добијеном серуму извршено је по већ описаној методи. Основни UV спектар плазме једног од пацијената приказан је на Слици 124.



Слика 124. UV спектар плазме пацијента без и у присуству SDS-а

Резултати анализе након пет понављања су за први узорак: $3,56 \pm 0,15 \mu\text{g/mL}$ и за други узорак $3,89 \pm 0,10 \mu\text{g/mL}$ моксифлоксацина.

Како би се упоредила и валидовала спектрофотометријска метода примењена је модификована HPLC метода из литературе [263]. Приликом развоја методе тежило се да рН вредност буде неутрална као што је урађено код спектрофотометријске методе. На коришћеној колони није дозвољено да рН вредност буде већа од 7, стога је варирањем експерименталних параметара рН подешено на 6,5, док је у исто време проценат ацетонитрила повећан али тако да су задовољени хроматографски параметри. Оптерећени узорак плазме је директно инјектиран на колону. Добијени хроматограм узорка плазме пацијента приказан је на Слици 125.



Слика 125. Хроматограм плазме пацијента узет 1 сат након примене „Avelox“ таблете (400 mg)

Калибрациона права је конструисана на основу зависности односа површина пикова за моксифлоксацин и офлоксацин у зависности од односа концентрација моксифлоксацина и офлоксацина. Концентрација офлоксацина била је $0,5 \mu\text{g/mL}$. Метода је валидирана и добијени су следећи валидациони параметри: опсег линеарности 50 - 1500 ng/mL, коефицијент корелације 0,9983, „recovery“ 98,5%, лимит квантификације 12,0 ng/mL и лимит детекције 5,0 ng/mL.

Концентрација моксифлоксацина у серуму пацијента је одређена на основу калибрационе праве и износила је $4,05 \pm 0,08 \mu\text{g/mL}$. Релативна грешка у односу на спектрофотометријска мерења је 4,1 %, што значи да је тачност и прецизност предложене спектрофотометријске методе задовољавајућа.

4. Дискусија резултата

У циљу изналажења оптималних услова за раздвајање и одређивање флавоноида и њихових аналога у храни и фармацеутским формулацијама извршена је:

1. Екстракција биофлавоноида из узорака црвеног лука, коре поморанце и меда.
2. Течно-чврста екстракција биофлавоноида из екстраката црвеног лука, коре поморанце и меда.
3. Процена матричног ефекта приликом одређивања биофлавоноида у црвеном луку, кори поморанце и меду.
4. Оптимизација услова за одређивање биофлавоноида: хесперетина, хесперидина, кверцетина, рутина и каемпферола и њихово одређивање у узорцима црвеног лука, коре поморанце и меда применом LC-MS/MS методе.
5. Оптимизација RP-HPLC методе за одређивање биофлавоноида: кверцетина, каемпферола, апигенина, лутеолина, катехина и епикатехина у узорцима фамилије *Brassica*.
6. Мерење антиоксидативне активности екстраката узорака из фамилије *Brassica*.
7. Оптимизација услова и одређивање сродних и деградационих производа моноксифлоксацина (аналога флавоноида) применом RP-HPLC методе у фармацеутским формулацијама.
8. Оптимизација услова за одређивање моноксифлоксацина у узорцима хуманог серума применом спектрофотометријске методе.

4.1. Екстракција биофлавоноида из узорака хране

Постоје три главне врсте матрица у којима се одређују флавоноиди: биљке, храна и течни узорци као што су биолошке течности и пића. Све методе за одређивање биофлавоноида у овим узорцима заснивају се на претходној екстракцији анализата. До сада је развијено више метода за екстракцију биофлавоноида из узорака хране биљног порекла, при чему је главни циљ био постићи што већу селективност и ефикасност екстракције.

На основу литературних података за екстракцију биофлавоноида из узорака хране најчешће се користе методе екстракције по Сокслету, микроталасна екстракција, ултразвучна екстракција, екстракција мацерацијом, суперкритична флуид екстракција, екстракција кључалом водом и др.

Од поменутих метода у овој докторској дисертацији примењене су и упоређене следеће методе за екстракцију биофлавоноида из узорака хране:

- Екстракција по Сокслету
- Ултразвучна екстракција

Циљ овог упоређивања био је да се развије једноставна и брза метода екстракције биофлавоноида из различитих узорака хране, при чему је било потребно да се:

- а) постигне што већа специфичност екстракције за испитиване анализе,
- б) постигне што већа ефикасност екстракције испитиваних анализа,
- в) користе нетоксични растварачи,
- г) употребе мале количине растварача,
- д) екстракција врши у што краћем временском периоду,
- е) екстракција врши на што нижој температури.

У циљу развоја методе која испуњава горе наведене услове, израчуната је ефикасност екстракције поређењем количине анализа добијене применом ултразвучне екстракције са количином анализа добијене екстракцијом по Сокслету. За ефикасност екстракције по Сокслету узето је да износи 100%.

Ефикасност екстракције биофлавоноида из узорака хране (изражена у %) је добијена коришћењем формуле:

$$\text{Ефикасност екстракције (\%)} = \frac{\text{количина анализа добијена ултразвучном екстракцијом}}{\text{количина анализа добијена екстракцијом по Сокслету}} \times 100 \quad (80)$$

На ефикасност екстракције утиче природа растварача. Обично се растварачи бирају на основу њихове тачке кључања, диелектричне константе и фактора расипања. За екстракцију биофлавоноида као растварачи најчешће се користе: вода, ацетон, алкохоли (метанол, етанол и пропанол) као и њихове смеше. Физичко-хемијске особине одабраних растварача приказане су у Табели 56.

Табела 56. Физичко-хемијске карактеристике растварача који се најчешће користе за екстракцију биофлавоноида.

Растварач	Диелектрична константа (ϵ')	Фактор расипања ($\tan \delta$)	Тачка кључања ($^{\circ}\text{C}$)	Вискозност (сР)
Ацетон	20,7	5555	56	0,30
Ацетонитрил	37,5	620	82	
Етанол	24,3	2500	78	0,69
Хексан	1,89		69	0,30
Метанол	32,6	6400	65	0,54
2-Пропанол	19,9	6700	82	0,30
Вода	78,3	1570	100	0,89
Етил ацетат	6,02	5316	77	0,43

Током екстракције долази до преноса енергије на узорак конвекцијом, кондукцијом и радијацијом са површине растворене супстанце приликом загревања. Најзначајнија карактеристика растварача је диелектрична константа и фактор расипања који су дефинисани једначинама:

$$\epsilon = \epsilon' - \epsilon''\sqrt{-1} \quad (81)$$

и

$$\tan \delta = \frac{\epsilon''}{\epsilon'} \quad (82)$$

где ϵ' представља стварни део диелектричне константе, а ϵ'' имагинарни део, или “*loss factor*”. Диелектрична константа одређује колико ће случајне енергије деловати на површину ваздух-узорак и колико се пренети унутар узорка. Ефикасност адсорбоване енергије која се преводи у топлоту одређује вредност “*loss factor*”. Фактор расипања ($\tan \delta$) је важна карактеристика растварача који показује способност матрикса да адсорбује енергију и пренети енергију на околне молекуле и одговоран је за ефикасност екстракције.

Мање поларни флавоноиди (изофлавоноиди, флаванони, метиловани флавоноиди и флавоноли) се екстрахују хлороформом, дихлорометаном, диетил етром или етил ацетатом, док се гликозиди флавоноида и поларнији агликони екстрахују алкохолем или смешом алкохола и воде. Пошто гликозиди имају већу растворљивост у води, за њихову екстракцију се употребљава смеша неког алкохола и воде.

У сврху одабира најпогоднијег растварача испитани су различити растварачи (метанол, ацетон, и вода) као и њихове смеше. Ацетон и вода како појединачно тако и у смеси, екстрахују мале количине биофлавоноида из испитиваних узорака, док смеша

метанола и воде даје знатно већи принос биофлавоноида. Коришћење чистог метанола дало је највећи принос екстрахованих биофлавоноида, па је у даљем раду коришћен екстракцију.

Осим избора одговарајућег растварача на ефикасност екстракције биофлавоноида, из узорака хране, могу утицати температура и време трајања екстракције. Повишене температуре и дуже време екстракције, доводе до боље екстракције анализата. Утицај температуре на ефикасност екстракције испитан је у интервалу од 40 – 80 °С. Показало се да је бољи принос екстракције биофлавоноида добијен при температури од 40 °С, јер се биофлавоноиди у биљкама, при вишим температурама разлажу или подлежу нежељеним реакцијама, као што је ензимска оксидација. У циљу што потпуније екстракције биофлавоноида из узорака, процес екстракције је поновљан три пута са чистим растварачем.

На Слици 58 је приказана ефикасност екстракције биофлавоноида (кверцетин, рутин, хесперетин, хесперидин и каемпферол) из узорака црвеног лука и коре поморанце применом ултразвучне екстракције.

Мање вредности ефикасности екстракције биофлавоноида из узорака црвеног лука и коре поморанце добијају се применом ултразвучне екстракције у односу на екстракцију по Сокслету. То се објашњава нижом температуром на којој се изводи ултразвучна екстракција. При тим условима не долази до деградације гликозидних облика флавоноида и може се добити реалан увид у састав флавоноида у испитиваним узорцима.

Добијене вредности ефикасности екстракције применом ултразвучне екстракције за хесперетин налазе се у опсегу од 92 до 96 %, за хесперинин од 89 до 90 %, за кверцетин 90 – 95 %, рутин 87 % и каемпферол 90 % у зависности од испитиваног узорка. Према томе може се сматрати да је екстракција биофлавоноида применом ултразвучне екстракције задовољавајућа. Уочава се да постоји разлика у ефикасности екстракције одређених анализата (хесперетин, хесперидин и кверцетин) између узорака коре поморанце и црвеног лука. Ова разлика у ефикасности екстракције између различитих типова узорака може се објаснити просторном расподелом испитиваних једињења у биљном ткиву. Такође, већа ефикасност екстракције биофлавоноида из црвеног лука се може објаснити већим садржајем воде у ткиву лука, јер применом ултразвучних таласа долази до лакшег бубрења ткива и пуцања ћелијског зида и ослобађања биофлавоноида.

На основу наведених фактора који утичу на ефикасност екстракције може се закључити да се испитивани биофлавоноиди: хесперетин, хесперидин, кверцетин, рутин и каемпферол најбоље екстрахују из свежих узорака коришћењем метанола као поларног растварача. Температура која се користи за екстракцију не прелази 40 °C и при тој температури не долази до деградације гликозида флавоноида у току 30 min при чему је ефикасност екстракције за све испитиване биофлавоноиде већа од 87 %, што се може сматрати задовољавајућом екстракцијом анализата.

Оваквим начином екстракције не добијају се потпуно чисти екстракти јер се истовремено могу екстраховати нежељене супстанце као што су угљени хидрати и липофилне супстанце. Оне могу утицати на квантитативни састав флавоноида и њихових деривата у добијеном екстракту.

Да би се уклониле ометајуће супстанце, које могу утицати на садржај биофлавоноида, неопходно је развити методу за пречишћавање добијених екстраката. У ту сврху развијена је метода течно-чврсте (SPE) екстракције биофлавоноида из екстраката хране.

4.1.1. Течно-чврста екстракција биофлавоноида из екстраката хране

Додатно пречишћавање екстраката добијених из узорака коре поморанце и црвеног лука неопходно је због тога што се употребом поларних растварача ко-екстрахују и друге супстанце растворне у њима, а не само анализи. Додатно пречишћавање екстракта може се постићи различитим методама као што су:

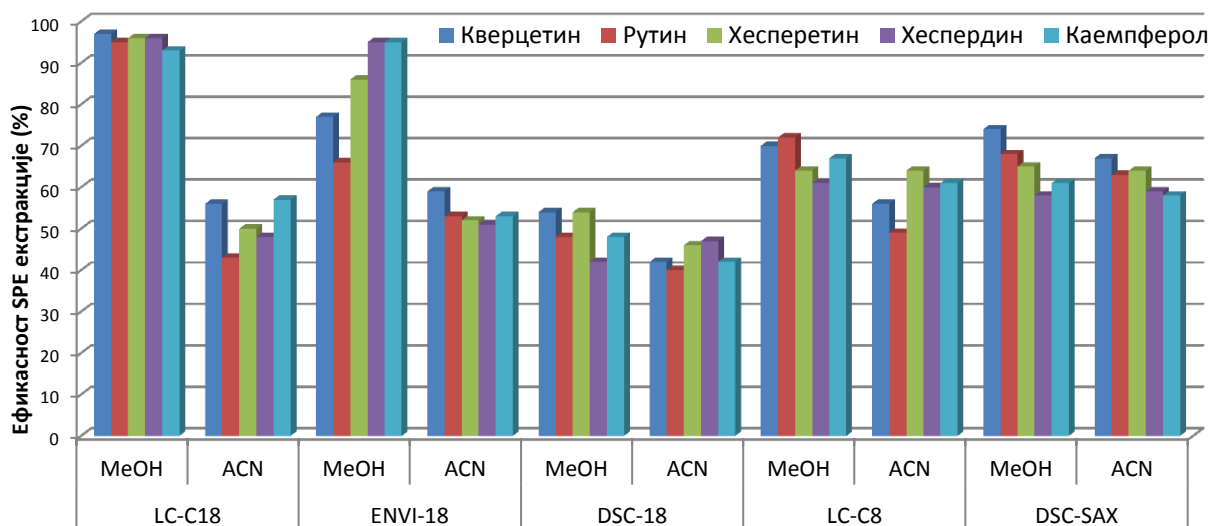
- Упаравање екстраката до сува, а затим његова реконституција у одговарајућем растварачу или мобилној фази,
- Течно-течна екстракција,
- Течно-чврста екстракција (SPE).

Одабрана је течно-чврста екстракција коришћењем SPE кертрица. Извршено је поређење више кертрица различитог типа пуњења и различитих елуената у циљу проналажења оптималних услова при којима би ефикасност SPE екстракције биофлавоноида била што већа. Ефикасност екстракције рачуната је према формули:

$$\text{Ефикасност SPE екстракције (\%)} = \frac{\text{површина пика анализата после SPE}}{\text{површина пика анализата пре SPE}} \times 100 \quad (83)$$

Испитано је пет врста кертрица и то: LC-18, ENVI-18, DSC-18, LC-8 и DSC-SAX и два растварача за елуирање, метанол и ацетонитрил. Природа чврсте фазе у овим кертрицима представљена је у Табели 26.

На Слици 126 и Табели 27 приказана је ефикасност SPE екстракције биофлавоноида на различитим врстама кертрица применом метанола и ацетонитрила за елуирање.



Слика 126. Ефикасност SPE екстракције биофлавоноида на различитим кертрицима

Оно што је карактеристично за све врсте кертрица је да се мање вредности ефикасности екстракције добијају применом ацетонитрила као елуента. Највеће вредности ефикасности SPE екстракције за све испитиване анализите се добијају употребом LC-18 кертрица и крећу се у опсегу од 93 – 97 %. Боље перформансе C18 кертрица могу се приписати адсорпцији биофлавоноида преко $\pi - \pi$ интеракција. Хидроксилне групе анализата доводе до грађења водоничне везе и нелокализованих електростатичких интеракција између хидроксилних група.

За елуирање адсорбованих анализата са кертрица коришћени су метанол, односно ацетонитрил. На основу добијених резултата представљених у Табели 27 може се уочити да се за све врсте кертрица, употребом метанола, добијају веће вредности ефикасности екстракције у односу на ацетонитрил. Добијене вредности за метанол

крећу се у опсегу од 42 до 97 %, док се вредности за ацетонитрил крећу у опсегу од 40 до 95 %. Већа ефикасност SPE екстракције биофлавоноида, употребом метанола, може се објаснити њиховом већом растворљивошћу у метанолу.

4.2. Процена матричног ефекта на LC-MS одређивање биофлавоноида у узорцима хране

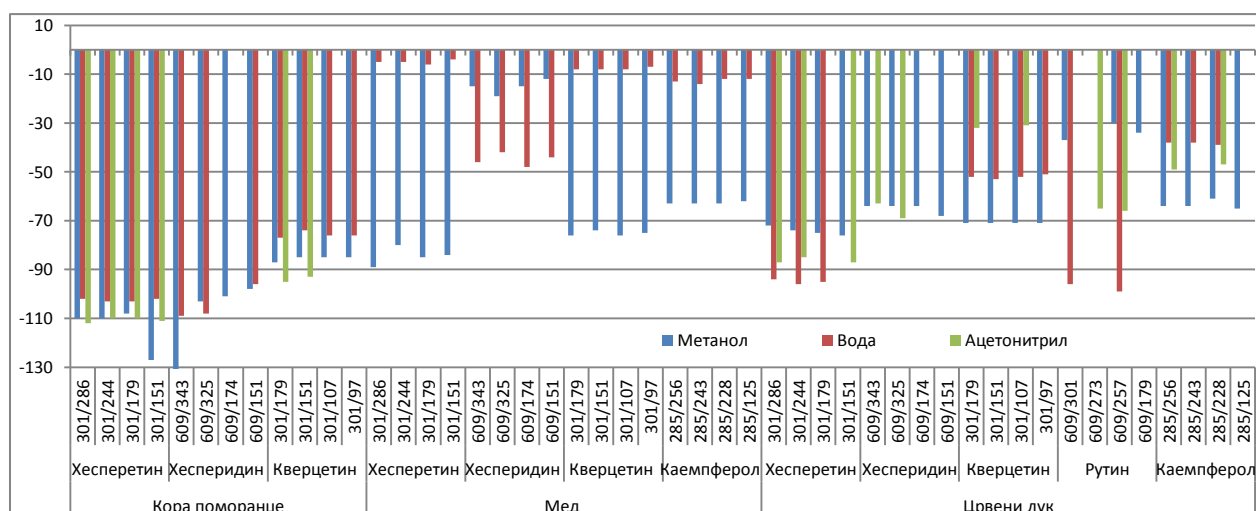
Матрични ефекат у MS се дефинише као утицај супстанци које се заједно елуирају са анализом на његову ефикасност јонизације. Стога је смањење или повећање интензитета сигнала који потиче од анализата праћено смањењем прецизности и тачности мерења. Утицај матрикса стога ограничава примену LC-MS технике за квантитативну анализу.

Већа тачност и прецизност одређивања постиже се применом SRM, односно MS/MS методе за одређивање анализата.

Имајући у виду валидацију методе као први корак током развоја LC-MS/MS методе мора се проценити утицај матрикса.

На основу литературних података до сада је процена матричног ефекта вршена при одређивању активних супстанци из фармацеутских формулација у серуму, плазми и урину. Веома мало радова се бави проценом матричног ефекта при одређивању биофлавоноида у узорцима хране што је и био један од циљева ове докторске дисертације. За процену утицаја матрикса у овом раду коришћене су методе постекстракционог додатка анализата као и метода стандардног додатка.

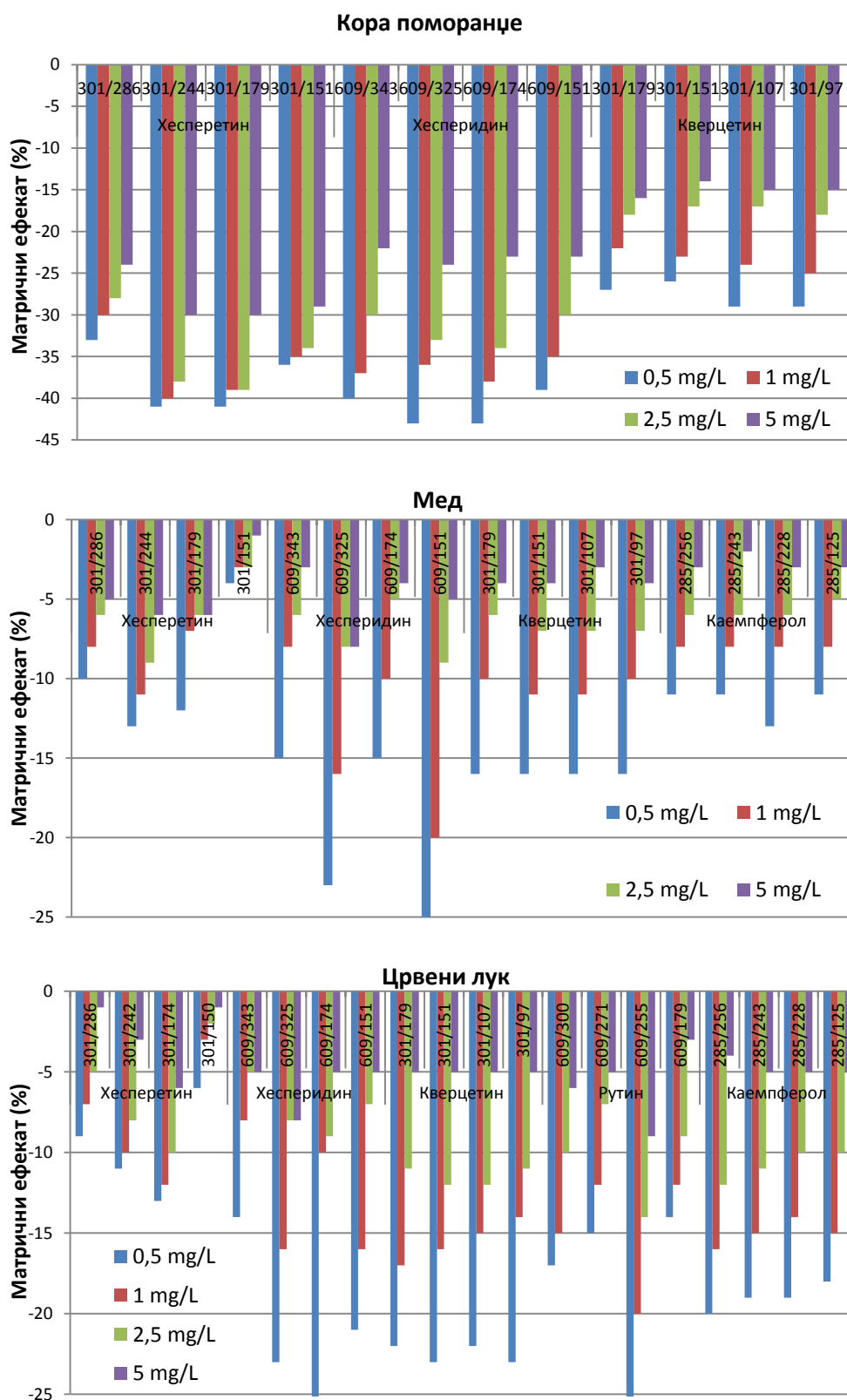
На основу података из Табеле 33, на Слици 127 су приказане вредности матричног ефекта на одређивање биофлавоноида екстрахованих из узорака црвеног лука, коре поморанџе и меда коришћењем различитих растварача (метанол, вода и ацетонитрил) применом методе стандардног додатка.



Слика 127. Процена матричног ефекта (%) приликом коришћења различитих растварача

Приликом употребе ацетонитрила као растварача (Слика 127), долази до губитка неких сигнала анализата код свих узорака што се може објаснити ступањем фенола у реакцију са ацетонитрилом при чему се граде ацетофенони (Hoesch-ова реакција). Може се уочити да се приликом коришћења метанола као растварача код већине узорака јавља константан негативан матрични ефекат при одређивању биофлавоноида применом калибрационе криве и креће се у опсегу од 60 до 80 % у односу на вредности добијене методом стандардног додатка.

За све испитиване анализате израчунат матрични ефекат постекстракционом методом дат је у Табели 32 и на Слици 128.



Слика 128. Процењен матрични ефекат (%) приликом одређивања биофлавоноида у узорцима хране

На основу података приказаних у Табели 32 и Слици 128 може се уочити да се код свих узорака јавља негативан матрични ефекат, што указује да се он мора узети у обзир приликом одређивања биофлавоноида. Негативан матрични ефекат је последица смањења ефикасности јонизације биофлавоноида. До смањења ефикасности јонизације долази због присутних фенолних киселина које ослобађају протон на нижим енергијама него биофлавоноиди, што води некомплетној дисоцијацији хидроксилних група биофлавоноида. Такође, формирање водоничне везе између карбоксилне групе фенолних киселина и хидроксилне групе флавоноида може допринети матричном ефекту. Други процес везан за смањење интензитета сигнала је повећање вискозности и површинског напона капљица које се добијају у електроспреј интерфејсу. То је последица хидрофилне природе фенолних киселина и присуства површински активних супстанци у реалним узорцима. Може се уочити да се добијају мање вредности матричног ефекта приликом повећања додате концентрације анализита јер долази до боље јонизације. Ово се може објаснити тиме да више молекула бива јонизовано, пре него што неке друге компоненте матрикса дођу до јонског извора. Такође уочава се и разлика у вредности матричног ефекта и између узорака на основу чега се може говорити о комплексности самих узорка. Највећи матрични ефекат на одређивање биофлавоноида се јавља код узорка коре поморанце због њеног сложеног састава.

Заједничко елуирање ендогених супстанци са супстанцама од интереса је главни извор матричног ефекта. Истовремено елуирање је неизбежно имајући у виду да је ретенција органских анализита (полифенолних киселина, биофлавоноида и биомакромолекула) из узорака на материјалу чврсте фазе одређена хидрофобним интеракцијама између неполарних група биомолекула који се налазе у екстракту и угловодоничног низа из ланца са површине силика гела. На основу тога, хидрофобност молекула присутних у екстракту, има важну улогу у њиховој ретенцији на чврстој фази пуњења кертрица. Како површина силика гела садржи слободне хидроксилне групе, водоничне везе између јонизованих хидроксилних група материјала чврсте фазе и карбоксилних група присутних у фенолним киселинама и вишим масним киселинама или другим киселинским групама из биомакромолекула такође доприносе ретенцији. Материјал чврсте фазе ће адсорбовати и задржати не само молекуле анализита већ и друге молекуле сличних карактеристика. Елуирање једињења са материјала чврсте фазе са поларним растварачима је слично као код RP-LC, хидрофилнија једињења (фенолне киселине) се елуирају прва, а затим супстанце веће хидрофобности.

У циљу уклањања интерференција и смањења матричног ефекта требало је:

1. Оптимизовати хроматографске параметре – што се постиже добрим одабиром колоне, градијентним начином елуирања погодном мобилном фазом, променом протока мобилне фазе, продужењем времена трајања анализе, коришћењем различитих растварача за реконструкцију узорка, променом протока и поларности мобилне фазе.
2. Променити начин јонизације уколико се постиже боља квантификација – ако постоји могућност одабира између ESI и APCI јонизације.
3. Одабрати методу за екстракцију – једноставно таложење протеина органским растварачима, течно-течна екстракција и екстракција на чврстој фази осигуравају да избор растварача који се користе за екстракцију буде у складу са природом анализата.

4.3. Одређивање биофлавоноида у узорцима коре поморанџе, црвеног лука и меда применом LC-MS/MS методе

Сепарација фенолних киселина и флавоноида се изводи на реверзно фазним HPLC колонама, у којима се налазе сферне честице силика-гела везане октадецил (C18) ланцима [23, 251]. HPLC колоне паковане монолитским носачима омогућавају релативно брзо извођење анализа. Градијентно елуирање се користи због сложености узорка који се анализира. Користи се велики број мобилних фаза и бинарних система који су састављени од воде и мање поларног органског растварача (ацетонитрил или метанол). Киселине (мравља, сирћетна и фосфорна) се најчешће користе како би се подесило одговарајуће рН током извођења анализе. Редослед излажења анализата је следећи: бензенске киселине, циметне киселине, гликозидни флаванони праћени флавонолима и гликозидним флавонолима и на крају слободним агликонима.

У циљу тестирања погодности хроматографске методе за одвајање биофлавоноида: рутина, хесперидина, кверцетина, каемпферола и хесперетина потребно је оптимизовати хроматографске параметре: фактор капацитета (k), фактор селективности (α), резолуцију (R), развлачење пика (T) и теоријски број подова колоне (N). Оптималне вредности ових фактора су: ретенциони фактор ($k > 2$), сепарациони фактор ($\alpha \geq 1$), резолуција између пикова ($R > 1,4$), развлачење пика ($T \leq 2$) и теоријски број подова ($N > 2000$). Тестирање погодности методе извршено је пропуштањем

синтетичке смеше биофлавоноида при оптималним хроматографским условима. Хроматограм добијен при оптималним условима за раздвајање испитиваних биофлавоноида представљен је на Слици 66. У Табели 57 дати су хроматографски параметри за методу.

Табела 57. Хроматографски параметри добијени на Phenomenex Gemini C18 колони под оптималним условима.

Једињење		Рутин	Хесперидин	Кверцетин	Каемпферол	Хесперетин
Хроматографски параметри	Ретенционо време (min)	12,6	13,9	16,3	17,5	18,6
	Резолуција	0,00	1,3 (1,2)	3,2 (2,3)	2,1 (3,4)	1,3 (4,5)
	Ретенциони фактор	20	22	26	28	30
	Сепарациони фактор		1,10	1,18	1,07	1,06
	Број теоретских подова	10161	15266	11808	14566	15376

На основу добијених хроматографских параметара датих у Табели 57 може се уочити да све вредности хроматографских параметара одговарају оптималним. Стога се предложена метода за раздвајање биофлавоноида: рутина, хесперидина, кверцетина, каемпферола и хесперетина може применити за њихово одређивање у реалним узорцима.

Оптимизована LC-MS/MS метода за одређивање биофлавоноида у узорцима коре поморанце, црвеног лука и меда је валидирана у односу на специфичност, линеарност, тачност, прецизност, робусност, границу детекције и границу квантификације. Добијени валидациони параметри дати су у Табели 31.

За развијену методу може су уочити веома широк опсег концентрације од 0,05 до 10 $\mu\text{g/mL}$, тако да се метода може применити за одређивање биофлавоноида у различитим узорцима, а постоји и добра корелација између концентрације и сигнала испитиваних анализата што закључујемо на основу вредности коефицијента детерминације који се креће у опсегу од 0,9937 – 0,9995. Вредности за LOD и LOQ које се крећу у опсегу од 0,039 до 0,076 $\mu\text{g/mL}$, односно 0,118 – 0,229 $\mu\text{g/mL}$ указују да је метода осетљива и могу се одредити мале количине биофлавоноида. Добијени резултати валидације приказани су у Табели 58.

Табела 58. Параметри валидације методе за LC-MS/MS анализу биофлавоноида у храни.

Додата конц. ($\mu\text{g/mL}$)	0,05	0,10	0,25	0,50	1,00	2,50	5,00	10,00	
Хесперетин	m/z 301/286	0,044	0,087	0,253	0,518	1,014	2,338	4,987	9,953
	Искоришћење (%)	88,0	87,0	101,2	103,6	101,4	93,5	99,7	99,5
	RSD (%) (n = 3)	4,76	3,02	2,11	2,54	1,23	1,45	1,31	0,87
	m/z 301/244	0,049	0,107	0,270	0,516	0,925	2,399	5,018	9,930
	Искоришћење (%)	98,0	107,0	108,0	103,2	92,5	95,96	100,4	99,3
	RSD (%) (n = 3)	5,04	3,64	2,35	2,78	1,67	1,34	1,55	0,93
Хесперидин	m/z 609/325	0,047	0,075	0,226	0,477	1,009	2,517	5,174	9,909
	Искоришћење (%)	94,0	95,0	90,4	95,4	100,9	100,7	103,5	99,1
	RSD (%) (n = 3)	4,56	4,59	2,23	2,28	0,14	1,72	5,05	0,29
	m/z 609/179	0,063	0,091	0,238	0,468	0,986	2,445	5,209	9,913
	Искоришћење (%)	112,0	91,0	95,2	93,6	98,6	97,8	104,2	99,1
	RSD (%) (n = 3)	4,98	3,59	0,88	2,74	0,81	1,19	0,98	0,74
Кверцетин	m/z 301/179	0,0505	0,101	0,2525	0,505	1,01	2,626	5,02	10,3
	Искоришћење (%)	101,0	101,3	98,6	97,3	102,6	103,3	100,2	103,2
	RSD (%) (n = 3)	3,87	4,62	4,03	2,69	3,98	4,67	2,36	2,47
	m/z 301/151	0,0491	0,102	0,2613	0,523	1,136	2,587	5,13	10,35
	Искоришћење (%)	98,2	102,0	104,5	104,6	113,6	103,5	102,6	103,5
	RSD (%) (n = 3)	3,64	4,25	3,81	3,97	5,79	2,38	4,67	2,64
Рутин	m/z 609/301	0,049	0,093	0,245	0,483	0,965	2,621	5,218	10,025
	Искоришћење (%)	98,0	93,0	98,0	96,6	96,5	104,8	104,4	100,3
	RSD (%) (n = 3)	4,61	2,57	0,98	3,07	1,49	1,14	1,12	0,46
	m/z 609/273	0,048	0,092	0,241	0,481	0,955	2,615	5,206	10,033
	Искоришћење (%)	96,0	92,0	96,4	96,2	95,5	104,6	104,1	100,3
	RSD (%) (n = 3)	8,24	3,71	0,88	1,94	1,03	0,39	0,38	1,23
Каемпферол	m/z 285/256	0,057	0,114	0,285	0,57	1,14	2,964	5,31	11,4
	Искоришћење (%)	114,0	112,4	111,2	110,9	109,8	108,6	109,6	106,2
	RSD (%) (n = 3)	3,56	4,67	4,59	4,37	3,28	3,67	2,89	2,57
	m/z 285/243	0,056	0,124	0,264	0,567	1,15	2,56	5,31	10,6
	Искоришћење (%)	112,0	106,3	102,6	103,4	105,6	107,3	108,3	101,3
	RSD (%) (n = 3)	4,57	4,69	4,78	3,85	3,67	2,94	2,68	2,47

Резултати валидације методе указују да се вредности за искоришћење (88 – 114 %) и релативне стандардне девијације (0,46 – 8,24 %) налазе у оптималном опсегу, а ниске вредности лимита детекције и лимита квантификације показују да су перформансе методе задовољавајуће за одређивање изабраних биофлавоноида у реалним узорцима хране. Такође, нема потребе за преконцентровањем или дериватизацијом анализата јер се обухвата велики опсег концентрација биофлавоноида.

4.4. Одређивање испитиваних биофлавоноида у узорцима коре поморанце, црвеног лука и меда применом LC-MS/MS методе

Оптимизирана и валидирана LC-MS/MS метода је примењена за одређивање биофлавоноида у реалним узорцима (црвени лук, мед и кора поморанце). Добијен садржај испитиваних биофлавоноида у реалним узорцима представљен је у Табели 34. Добијене вредности коефицијента варијације које се крећу у опсегу од 2,36 до 6,48 % и искоришћење од 87,65 до 108,7 % указују да је одређивање садржаја биофлавоноида поуздано.

4.5. Поређење наше методе за одређивање биофлавоноида у узорцима хране са литературним подацима

4.5.1. Одређивање биофлавоноида у узорцима коре поморанце

Justesen и сарадници [319] су развили HPLC методу за одређивање неких биофлавоноида у узорцима броколија, коре поморанце, коре јабуке, луку и чају. За раздвајање испитиваних анализата користили су Phenomenex RP C₁₈ колону (250×4,6 mm, 5 μm). Као мобилну фазу су користили смешу метанол-вода (30 : 70 v/v) у којој је садржај мравље киселине био 1 % , као фазу А и чист метанол као фазу В. Мобилна фаза је мешана у градијентном односу од 25 до 86 %, у току 50 min, при протоку од 1 mL/min. У кори поморанце одредили су да је садржај хесперетина износио 21 mg/100 g свеже масе.

Rouseff и сарадници [327] су користили Zorbax ODS (C-18) колону (250×4,6 mm, 5 μm) за раздвајање нарирутина, нарингенина, хесперидина и неохесперидина у кори поморанце. Као мобилну фазу су користили 79,5 % воде, 20 % ацетонитрила и 0,5 %

главијалне сирћетне киселине, при протоку од 1 mL/min. Они су нашли да се садржај хесперидина налазио у концентрационом опсегу од 122 до 254 ppm.

Mattila и сарадници [328] су развили HPLC методу за одређивање неких биофлавоноида, које су раздвојили на Inertsil ODS-3 колони (150×4,0 mm, 3 μm). За раздвајање анализата су користили градијентни начин елуирања мобилном фазом која се састојала од 50 mmol/L H₃PO₄ (pH 2,5) и ацетонитрила у односу 95 : 5 (v/v %), при чему је укупно време анализе износило 67 min, при протоку од 0,7 mL/min. Они су нашли да је садржај хесперетина у кори поморанце 41,5, а кверцетина у црвеном луку 30,7 mg/100 g свежје масе.

У нашем раду применом развијене LC-MS/MS нађено је да је садржај хесперетина 36,4, хесперидина 24,3 и кверцетина 0,65 mg/ 100 g свежје масе.

4.5.2. Одређивање биофлавоноида у узорцима црвеног лука

Franke и сарадници [329] су одређивали мирецетин, кверцетин, каемпферол, лутеолин и апигенин у различитим узорцима хране. У ту сврху развијена је HPLC метода за њихово раздвајање на NovaPak C18 (300×3,9 mm, 4 μm) колони. Елуирање је вршено при протоку од 0,6 mL/min, користећи линеарни градијент мобилне фазе састава 10 % воденог раствора сирћетне киселине (А) и метанола : ацетонитрила : дихлорометана (10 : 5 : 1 v/v/v) у току 60 min. Нађена вредност за кверцетин износила је 136, а за каемпферол 4 mg/kg.

Arabbi и сарадници [330] су развили HPLC методу за раздвајање кверцетина, каемпферола, лутеолина, апигенина и цианидина на Prodigy 5 ODS 3 (250×4,6 mm), користећи мобилну фазу састављену од воде/тетрахидрофурана/трифлуоросирћетне киселине (98 : 2 : 0,1) као једне фазе и ацетонитрила као друге фазе. Они су одређивали садржај наведених биофлавоноида у другој половини 2001. и првој половини 2002. У оба случаја нису детектовали каемпферол, а количина кверцетина се кретала од 38,3 до 93,6 mg/100 g свежјега узорка.

Crozier и сарадници [331] су одређивали каемпферол, кверцетин, мирицетин, апигенин, лутеолин и изорамнетин у воћу и поврћу које се свакодневно користи у Великој Британији. У ту сврху развили су реверзно фазну хроматографску методу за одвајање ових флавоноида користећи Symmetry C18 (150×3,9 mm, 5 μm) колону. Као мобилну фазу користили су воду закишељену са трифлуоросирћетном киселином чије

је рН било 2,5 и ацетонитрил у градијентном начину елуирања од 15 до 35 % у току 20 min, и протоку од 1 mL/min. Међутим, при овим условима није дошло до раздвајања лутеолина и кверцетина. Они су одредили да је садржај кверцетина у црвеном луку 201 µg/g свежег узорка.

Patil и сарадници [332] су у свом раду посматрали утицај температуре на садржај кверцетина у различитим узорцима лука. За та испитивања су развили хроматографску методу код које је раздвајање вршено на Bondapak C-18 (250×4,6 mm, 10 µm) колони. У градијентном начину елуирања мобилну фазу је чинила 0,5 % фосфорна киселина у води и 0,5 % фосфорна киселина у метанолу, при протоку од 1 mL/min. Садржај кверцетина у црвеном луку се кретао од 0,16 до 0,30 mg/kg свежје масе.

Marotti и сарадници [333] су развили методу за раздвајање и квантификацију кверцетина, кверцетин моногликозида, кверцетин дигликозида, рутина, изорамнетина, изорамнетин моногликозида на реверзно фазној Bondclone 10 C18 (300×3,9 mm, 10 µm) колони коришћењем мобилне фазе састављене од воде и мравље киселине (95 : 5, v/v) и метанола, користећи линеарни градијент у току 30 min, при протоку од 1,5 mL/min. Они су нашли да се садржај кверцетина креће у опсегу 57,5 – 557,8 mg/kg, а рутина 1,7 – 2,7 mg/kg свежје масе.

Price и сарадници [334] су у свом раду испитивали утицај времена складиштења на садржај кверцетина и његових гликозида. У ту сврху развили су хроматографску методу где се као мобилна фаза користила смеша воде/тетрахидрофурана/трифлуоросирћетне киселине у односу 98 : 2 : 0,1 и ацетонитрил у укупном времену трајања анализе 40 min. Коришћена је Dynamaх ODS (250×4,6 mm) колона. Нашли су да је садржај кверцетина у црвеном луку 17 µg/g свежје масе, и да његова количина опада након 84 дана.

У нашем раду применом развијене LC-MS/MS нађено је да је садржај хесперетина 0,0068, хесперидина 0,016, кверцетина 56,3, рутина 0,16 и каемпферола 1,63 mg/ 100 g свежје масе.

4.5.3. Одређивање биофлавоноида у узорцима меда

Gil и сарадници [335] су испитивали садржај флавоноида у узорцима меда од руже. Развили су хроматографску методу користећи Lichrochart RP-18 (120×4,0 mm, 5 µm) колону, а као мобилну фазу користили су водени раствор мравље киселине (19 : 1

v/v) и метанол у градијентном начину елуирања у току 60 min. Нашли су да се садржај кверцетина креће у опсегу од 0,11 до 0,28 µg/g, а каемпферола од 0,44 до 0,85 µg/g.

Bonvehí и сарадници [336] су развили HPLC за одређивање флавоноида и фенолних киселина у узорцима меда из различитих делова Шпаније. У ту сврху користили су Nucleosil C18 (250×4,6 mm, 10 µm) колону, а као мобилну фазу бидестиловану воду закишељену фосфорном киселином чија је рН 2,6 и метанол чији се однос мењао у линеарном градијенту од 0 – 100 % метанола у току 33 min. Утврдили су да се садржај рутина у 11 узорка креће од 18,35 до 44,45 mg/ 100 g узорка, кверцетина 4,69 – 9,75 mg/ 100 g узорка, а каемпферола 0,71 – 1,68 mg/ 100 g узорка.

У нашем раду применом развијене LC-MS/MS нађено је да је садржај хесперетина 0,072, хесперидина 14, кверцетина 0,67 и каемпферола 0,14 mg/ 100 g свежје масе.

Постоји слагање између наших резултата у поређењу са литературним подацима за садржај биофлавоноида у храни. Предност наше методе у односу на приказане из литературе је:

- краће време трајања анализе,
- мањи проток мобилне фазе,
- мања потрошња штетних растварача,
- једноставан састав мобилне фазе,
- једноставан линеарни градијент.

4.6. HPLC-DAD анализа биофлавоноида узорка фамилије *Brassica*

4.6.1. Оптимизација хроматографских услова коришћењем програма ACD/LC Simulator

Оптимизација хроматографске методе укључује избор експерименталних услова којима се могу одвојити аналити у прихватљивом времену са задовољавајућим факторима одвајања. Процес оптимизације може бити мануелан (метода пробе и грешке), статистички и рачунарски потпомогнут. За развој ефикасне методе за раздвајање анализита неопходно је коришћење специјализованих рачунарских програма.

Највећи изазов приликом развоја хроматографске методе је праћење померања пикова при промени хроматографских услова одвајања. Померање пикова се користи за

конструкцију математичког модела помоћу којег се смањује број потребних експеримената приликом оптимизације.

Коришћењем технике пик инкремента гради се математички модел којим се број експеримената у оптимизационом циклусу своди на минимум. Оптимизација методе за смеше непознатог састава је још комплокованија јер не постоје *a priori* подаци о особинама компонената и ретенционим временима. Другим речима директна асигнација сигнала није могућа. Да би се постигла успешна идентификација или квантификација мора се постићи максимално одвајање сигнала као најважнији фактор. У овом случају оптимизација метода се заснива на сигналу пикова исте компоненте при чему пикови потичу од различитих експеримената. Другим речима захтева се узајамно поклапање пикова између HPLC експеримената.

Нова метода за узајамно слагање пикова у серији HPLC анализа исте непознате смеше, при различитим условима одвајања, је примењена код рачунарске оптимизације коришћењем програма ACD LC Simulator.

Приступ који се назива аутоматско слагање пикова (MAP) не захтева предходно познавање састава смеше. Алгоритам се заснива на примени апстрактне факторске анализе (АФА) и итеративне факторске анализе (ИФА) на проширену матрицу хроматографских података. Математички алгоритам израчунава број компонената у смеси и ретенционо време сваке компоненте за сваки од улазних података.

У циљу проналажења оптималних хроматографских услова за одвајање биофлавоноида: кверцетина, каемпферола, катехина, лутеолина, апигенина и епикатехина извршена је рачунарска оптимизација услова за њихово одвајање. Услови који подлежу оптимизацији били су: састав мобилне фазе (% ACN) за изократско елуирање, њена јонска јачина и рН вредности. Како би се пронашао оптимални удео ацетонитрила за одвајање изабраних биофлавоноида снимљени су хроматограми појединачних стандарда биофлавоноида при градијентном начину елуирања и на температури колоне од 30 °C. Коришћењем добијених података помоћу ACD/LC Simulator-а добијена је 1D мапа резолуције представљена на Слици 76.

Уочава се само једна област са погодним условима за одвајање при максималној резолуцији. Област са оптималним уделом ацетонитрила за изократско извођење анализе налази се у концентрационом опсегу од 8,0 – 12,0 % ацетонитрила. При нижим вредностима ацетонитрила од 8 % долази до смањења резолуције између пикова и

дужег трајања анализе, док при вишим вредностима ацетонитрила од 12 % долази до прелкапања пикова.

У следећем кораку је било потребно установити оптимални садржај сирћетне киселине у мобилној фази. У ту сврху снимљени су хроматограми при условима датим у Табели 35, а подаци искоришћени за добијање 2D мапе резолуције приказане на Слици 77.

На 2D мапи резолуције уочава се неколико области са максималном резолуцијом. Највеће вредности резолуције се добијају при нижим концентрацијама сирћетне киселине (концентрација сирћетне киселине при максималној резолуцији не прелази 3 %) и малом уделу ацетонитрила. Међутим, при овим условима, време анализе је сувише дуго (22 min). Друга област високе резолуције је при уделу ацетонитрила од 20 % и ниској концентрацији сирћетне киселине. При овим условима време анализе се значајно скраћује (12 min) али се анализи елуирају сувише брзо и потрошња ацетонитрила је сувише висока, па стога при овим условима нису задовољени задати критеријуми. Трећа област високе резолуције која испуњава задате критеријуме налази се у централној области графика. Иако резолуција није максимална, она је још увек у прихватљивом опсегу. Оптимизовани хроматографски услови дати су Табели 36.

Развијена и оптимизована хроматографска метода је валидирана, а хроматографски параметри приказани су у Табели 59.

Табела 59. Хроматографски параметри добијени на Hypersil GOLD aQ колони под оптималним условима.

Једињење	Кверцетин	Каемпферол	Катехин	Лутеолин	Апигенин	Епикатехин
Ретенционо време (min)	3,05	3,73	4,51	5,55	7,24	10,03
Резолуција	0,00	2,60	3,56	4,67	6,80	8,00
Фактор капацитета	5,35	6,71	8,38	10,56	14,1	19,94
Фактор селективности	0,00	1,25	1,25	1,26	1,34	1,41
Број теоретских подова	1653	5476	5184	12321	9344	10100

Вредности свих хроматографских параметара (Табела 59) указују да задовољавају услове добре хроматографије.

Лимит детекције и лимит квантификације за кверцетин, каемпферол, катехин, апигенин, лутеолин и епикатехин у узорцима хране су одређени из калибрационих кривих за методу стандардног додатка.

Параметри валидације хроматографске методе за одређивање биофлавоноида у узорцима фамилије *Brassica* дати су у Табели 60.

Табела 60. Валидациони параметри HPLC методе за одређивање биофлавоноида у узорцима фамилије *Brassica*.

Једињење	Кверцетин	Каемпферол	Катехин	Лутеолин	Апигенин	Епикатехин
Опсег ($\mu\text{g/mL}$)	0,1 - 10	0,1 - 10	0,1 - 10	0,1 - 10	0,1 - 10	0,1 - 10
Број тачака (N)	8	8	8	8	8	8
Нагиб (a) ($\times 10^3$)	9,96 \pm 0,05	10,71 \pm 0,01	9,10 \pm 0,01	9,88 \pm 0,06	12,93 \pm 0,04	10,89 \pm 0,03
Одсечак (b) ($\times 10^2$)	2,9 \pm 0,4	1,0 \pm 0,5	2,7 \pm 0,6	3,3 \pm 0,3	5,8 \pm 0,7	2,7 \pm 0,2
Стандардна грешка ($\times 10^2$)	4,9	12,0	12,9	6,2	4,1	3,7
Коефицијент детерминације (r^2)	0,9998	0,9992	0,9988	0,9997	0,9938	0,9929
LOD ($\mu\text{g/mL}$)	0,055	0,032	0,025	0,020	0,030	0,04
LOQ ($\mu\text{g/mL}$)	0,167	0,096	0,075	0,060	0,090	0,120

Лимит детекције је у опсегу од 0,02 – 0,055 $\mu\text{g/mL}$ што показује да метода поседује задовољавајуће перформансе за одређивање изабраних биофлавоноида у узорцима хране фамилије *Brassica*. Различите врсте купуса су анализирани на садржај биофлавоноида у линеарном опсегу концентрација од 0,02 до 0,4 $\mu\text{g/mL}$ (пет нивоа концентрација). Линеарност је потврђена вредностима коефицијента регресије већим од 0,98 и Cochran-овим тестом хомосхедастичности ($G_{\text{max}} = s_{\text{max}}^2 / \sum s_i^2$ је поређена са табличном вредношћу, нулта хипотеза говори о једнакости појединачних стандардних девијација и прихватљива је ако је $G_{\text{max}} < G_{\text{table}}$) показујући хомогену расподелу стандардних девијација.

4.6.2. Одређивање биофлавоноида у узорцима фамилије *Brassica*

У циљу одређивања садржаја биофлавоноида кверцетина, каемпферола, катехина, лутеолина, апигенина и епикатехина у свежим и замрзнутим узорцима фамилије *Brassica* извршена је екстракција различитим методама. Методе које су коришћене за

екстракцију биофлавоноида биле су екстракција по Сокслету, ултразвучна екстракција, екстракција мацерацијом и екстракција кључалом водом.

Добијени резултати одређивања биофлавоноида кверцетина, каемпферола, катехина, лутеолина, апигенина и епикатехина приказани су у Табели 37. Садржај кверцетина се налази у опсегу од 0,10 до 2,78, каемпферола од 0,09 до 3,71, катехина од 0,12 до 0,88, лутеолина 0,03 до 0,81, апигенина 0,01 до 0,32 и епикатехина од 0,15 до 0,52 mg/ 100 g узорка. Како се може уочити постоји разлика у садржају биофлавоноида између свежих и замрзнутих узорака фамилије *Brassica*.

Разлика у садржају биофлавоноида између свежих и замрзнутих узорака купуса може се објаснити: хидролизом гликана, оксидацијом липида и денатурацијом протеина. Различити фактори, као што су температура замрзавања, степен замрзавања, вакуумско паковање или врста материјала у коме се пакује могу утицати на квалитет и садржај биофлавоноида у залеђеним узорцима. Стога вероватно долази до деградације анализата које се догађа приликом технолошке обраде и замрзавања узорака.

Такође, постоји и разлика у садржају биофлавоноида између различитих начина екстракције што се може објаснити применом различитих растварача и температура које се користе за екстракцију.

4.6.3. Поређење наше методе са литературним подацима одређивања биофлавоноида у узорцима фамилије *Brassica*

Неколико HPLC метода је описано за одређивање биофлавоноида у узорцима фамилије *Brassica*.

Hertog и сарадници [315] су одређивали садржај кверцетина и каемпферола у карфиолу, броколију и прокељу. Нашли су да је садржај ових биофлавоноида мањи од 1 mg/kg свежег јестивог дела у карфиолу и прокељу, док броколи садржи 30 mg/kg кверцетина и 70 mg/kg каемпферола.

Vallejo и сарадници [337] су изоловали и структурно окарактерисали флавоноиде из броколија користећи LC/UV-DAD/ESI-MS методу. Нашли су велики број естара хидроксициметне киселине, каемпферола и глукозида кверцетина. Структуре глукозида флавоноида су одређене након алкалне хидролизе и идентификовани су 3-софорозид/софоротриозид-7-глукозид/софорозид каемпферола, кверцетина и изорамнетина. Међутим, није извршена квантификација наведених флавоноида.

Price и сарадници [338] су нашли два главна гликозида флавонола у броколију и идентификовали су их као кверцетин-3-О-софорозид и каемпферол-3-О-софорозид. Детектовали су и три глукозида кверцетина и каемпферола и то, изокверцетин, каемпферол-3-О-глукозид и каемпферол-диглукозид. Софорозиди кверцетина и каемпферола су присутни у свежем узорку броколија у количини од 65 mg/kg односно 166 mg/kg. Укупне количине гликозида кверцетина и каемпферола изражене као слободни агликони износе 43 и 94 $\mu\text{g/g}$ свежег узорка.

Justesen и сарадници [319] су користили HPLC методу са PDA и MS начином детекције за одређивање и квантификацију флавонола, флавона и флаванона у воћу, поврћу и пићима. Квантификовали су кверцетин и каемпферол у количини од 3,7 mg/100g и 6,0 mg/100g броколија и 0,6 mg/100g и 0,9 mg/100g у прокељу.

Sikora и сарадници [320] су применили различите начине припреме кеља, броколија, прокеља, белог и зеленог карфиола. Идентификовали су деривате хидроксициметне киселине (кафеинску киселину, р-кумарну киселину, синапинску киселину) и флавоноле – каемпферол (у мањој количини) и кверцетин. Највећи садржај наведених једињења нашли су у кељу (укупно 94,4 mg/100 g свежег узорка), док је најмања колична нађена у белом и зеленом карфиолу (3,6 mg/100g и 3,03mg/100g).

Наше вредности садржаја испитиваних биофлавоноида у поређењу са литературним показују добро слагање.

4.7. Антиоксидативна активност екстраката фамилије *Brassica*

Антиоксидативна активност представља способност једињења да ступе у реакцију са слободним радикалима и на тај начин их неутралишу.

Разлика у антиоксидативној активности може варирати због присуства различитих компонената које се могу понашати као хватачи слободних радикала (у води растворан витамин С, фенолне киселине, као и витамин Е и каротеноиди) [339]. Оне могу бити у испитиваним узорцима пошто се заједно коелуирају са C18 кетрица приликом SPE екстракције.

Неколико студија показују да постоје битне и значајне разлике између фитохемијских антиоксиданаса, унутар саме врсте фамилије *Brassica* али и између њих.

Антиоксидативна активност екстраката фамилије *Brassica* испитана је спектрофотометријски коришћењем DPPH (2,2`-дифенил-1-пикрилхидразин) теста.

Као резултат реакције између DPPH и антиоксиданаса долази до смањења апсорбанције услед промене боје DPPH из љубичасте у жуту.

Графици представљени на Сликама 83, 84, 85, 86 и 87 добијени су коришћењем програма Microcal Origin (v. 8) и представљају зависност преостале концентрације DPPH у функцији од времена. Са протеклим временом долази до смањења концентрације DPPH услед његове реакције са антиоксидативним врстама из екстраката свежих и замрзнутих узорака фамилије *Brassica*.

Испитивани биофлавоноиди доприносе само 4 – 6 % од укупне антиоксидативне активности, што је одређено мерењем антиоксидативне активности смеше стандарда у концентрацији добијеној Сокслетовом екстракцијом за сваку врсту купуса.

Максимална разлика у преосталој количини (%) DPPH радикала у реакцији са екстрактима је уочена након 10 min од почетка реакције. Вредности преостале количине (%) DPPH након 10 min од почетка реакције износе: 29, 24, 34, 40 за свеж карфиол; 40, 37, 47, 55 за замрзнути карфиол; 34, 30, 40, 45 за свеж броколи; 48, 42, 58, 63 за замрзнути броколи и 30 за свеж прокељ, а 40 за замрзнути прокељ за различите начине екстракције.

Највећи проценат изреагованог DPPH радикала добијен је у реакцији са екстрактом добијеним ултразвучном екстракцијом за све врсте узорака, следећи је за екстракте добијене Сокслетовом екстракцијом, док је најмањи добијен за екстракте добијене екстракцијом са кључалом водом. Разлика у антиоксидативној активности између узорака може се објаснити употребом различитих растварача за екстракцију и присуством других антиоксидативних једињења у екстрактима.

Константе брзине реакције DPPH са екстрактима су одређене у циљу одређивања капацитета уклањања слободних радикала екстрактима фамилије *Brassica* добијених различитим методама екстракције.

Већина реакција флавоноида са DPPH код наших анализа је потпуна након 10 минута, а мерења након тог времена не показују значајну промену у садржају DPPH. Вредности брзине реакција DPPH радикала са екстрактима купуса су израчунати на основу зависности процента преосталог DPPH у функцији од времена за сваку врсту купуса као и начин чувања узорака.

На почетку реакција се одвија према кинетици другог реда, након тога према кинетици псеудо првог реда. Антиоксидативна активност екстраката фамилије *Brassica*

је одређена на основу реакције псеудо-првог реда, при чему је $[DPPH^*]_0 \gg [BE]_0$ на основу једначине:

$$\frac{d[BE]}{dt} = -k[BE] \quad (84)$$

$$[BE] = [BE]_0 \times \exp(-kt) \quad (85)$$

где је $[BE]$ концентрација екстракта фамилије *Brassica*, $[BE]_0$ почетна концентрација екстракта, k константа брзине псеудо-првог реда и t време. Израчунате константе брзине реакције DPPH са екстрактима поврћа из фамилије *Brassica*, добијеним на различите начине, приказане су у Табели 61.

Табела 61. Вредности константе брзине реакције \pm стандардна грешка ($\times 10^{-2}$) реакције DPPH радикала са екстрактима фамилије *Brassica*.

Начин екстракције		Карфиол	Броколи	Прокељ	Бутил хидроксил толуен	α -токоферол
Сокслетова екстракција	свеж	$13,8 \pm 0,2$	$16,4 \pm 0,3$			
	смрзнут	$9,7 \pm 0,3$	$10,7 \pm 0,4$			
Ултразвучна екстракција	свеж	$14,8 \pm 0,5$	$16,6 \pm 0,2$	$17,9 \pm 0,2$	$6,25 \pm 0,4$	$787 \pm 0,2$
	смрзнут	$10,5 \pm 0,3$	$11,5 \pm 0,3$	$13,0 \pm 0,3$		
Екстракција мацерацијом	свеж	$11,7 \pm 0,3$	$14,5 \pm 0,2$			
	смрзнут	$8,5 \pm 0,2$	$9,6 \pm 0,3$			
Екстракција кључалом водом	свеж	$11,8 \pm 0,5$	$13,4 \pm 0,2$			
	смрзнут	$7,1 \pm 0,5$	$8,9 \pm 0,4$			

Ове константе брзине су повезане са присуством антиоксиданата у екстрактима поврћа. Веће вредности константе брзине одговарају бољој антиоксидативној активности.

Антиоксидативни капацитет поврћа је поређен са синтетичким (бутил хидроксил толуен, ВНТ) и природним (α -токоферол) антиоксидантима. Сви екстракти имају веће вредности константе брзине у односу на синтетички антиоксиданс (ВНТ), али далеко мање у односу на природни, α -токоферол. Такође, се долази до закључка да су све константе брзине хемијске реакције између DPPH и екстракта фамилије *Brassica* веће код екстракта свежих узорака на основу чега се може закључити да је садржај антирадикалских супстанци далеко већи у свежим узорцима.

Различите кинетике указују на различите механизме уклањања радикала од стане полифенолних једињења; у реакционој смеси су присутни мали молекули активних флавоноида и велики полимерни производи. Кинетички параметри реакције између DPPH радикала и екстракта купуса дају додатне податке о антиоксидативној

активности. Реакција DPPH са флавоноидима је веома брза због присуства великог броја хидроксилних група које лако ступају у реакције. Спори део реакције може се објаснити присуством малих молекула антиоксидатаса (полифенолних киселине) или полимеризацијом као и стерним сметњама (неповољан положај између DPPH радикала и хидроксилена група малих молекула).

Особине растварача који се користе за екстракцију битно утичу на ефикасност екстракције биофлавоноида а самим тим и на антиоксидативну активност. Растварачи коришћени за екстракцију полифенола из узорака карфиола, броколија и прокеља имају значајан утицај на антиоксидативни капацитет екстраката. На основу изведених експеримената метанолски раствори екстраката купуса показују већу антиоксидативну активност јер су флавоноиди и полифенолне киселине главни антиоксиданти у овим врстама купуса и растворљивији су у метанолу него у води. На основу тога вода није погодан растварач за екстракцију биофлавоноида из купуса. Промена у поларности растварача доводи до промене у њиховој способности да растворе одабрану групу једињења и тако утичу на процену антиоксидативне активности самих једињења [340].

Свеже воће и поврће поготово карфиол садржи више витамина С неко они узорци који су замрзнути, стога замрзнути узорци показују постепено смањење садржаја аскорбинске киселине како се температура снижава а период чувања продужава. Губитак се повећава продужавањем времена чувања, повећањем температуре, ниске релативне влажности, физичким оштећењем [341]. Ови фактори могу утицати на варијабилност добијених резултата за антиоксидативну активност за свеже и замрзнуте узорке фамилије *Brassica*.

Већа антиоксидативна активност екстраката указује на присуство других активних једињења. Антиоксидативна активност биљака потиче од присуства многих активних фитохемикалија као што су витамини, флавоноиди, терпени, каротеноиди, кумарини, куркумарини, лигнини, сапонини, биљни стероли итд.

Разлике у антиоксидативној активности између врста фамилије *Brassica* условљава више фактора и то: сама врста купуса, време брања, услови узгајања, врста земљишта и услови обраде као и складиштења након брања.

Такође, индустријски начини обраде као што су бланширање, конзервирање, стерилизација, замрзавање као и само кување могу утицати на састав и садржај биофлавоноида, а самим тим и на антиоксидативну активност. Током обраде узорка долази до његове деградације која условљава убрзан контакт супстрата и ензима и на тај начин може се смањити антиоксидативна активност екстраката хране.

4.8. HPLC-DAD анализа сродних једињења и нечистоћа моксифлоксацина (аналога флавоноида)

У раду је развијена и HPLC-DAD метода за одређивање сродних једињења и нечистоћа моксифлоксацина, који је структурно сличан са флавоноидима.

4.8.1. Оптимизација хроматографских услова коришћењем DryLab® програма

Циљ је био да постигнемо изократско одређивање моксифлоксацина и сродних супстанци са резолуцијом (у односу на интерни стандард, офлоксацин) већом од 1,4 и вредностима за ретенциони фактор између 1 и 10. Да би се постигли ови услови, приликом избора органског модификатора мобилне фазе (ACN, MeOH, THF), показало се да у присуству MeOH и THF, наведени хроматографски захтеви не могу бити постигнути. Стога је у даљем раду мобилна фаза оптимизована у присуству ACN. Како су прелиминарна испитивања показала, резолуција и ретенција углавном зависе од процента ACN у мобилној фази, рН и температуре.

Рачунарски потпомогнутом оптимизацијом, употребом DryLab програма, добијена је 1D мапа резолуције приказана на Слици 90 за градијентно елуирање за раздвајање моксифлоксацина и његових сродних једињења. Најбоља резолуција се постиже приликом удела ацетонитрила од 10 – 13 %, при чему су сви пикови раздвојени на основној линији.

На Слици 91 приказана је 2D мапа резолуције која је коришћена за оптимизацију температуре за раздвајање моксифлоксацина и његових сродних једињења. Уочено је да се оптимална температура креће у опсегу 45 – 47 °C.

На Сликама 92 и 93 је приказан утицај рН на раздвајање моксифлоксацина и сродних једињења при градијентном начину елуирања. При нижим рН вредностима одвајање између 6,8DM (1-циклопропил-7-[(S,S)-2,8-диазабицикло[4.3.0]нон-8-ил]-6,8-диметокси-1,4-дихидро-4-оксо-3-хинолон карбоксилна киселина) и 6M8F (1-циклопропил-7-[(S,S)-2,8-диазабицикло[4.3.0]нон-8-ил]-8-флуоро-6-метокси-1,4-дихидро-4-оксо-3-хинолон карбоксилна киселина) је задовољавајуће, али резолуција између MOX (моксифлоксацина) и 6,8DF (1-циклопропил-7-[(S,S)-2,8-диазабицикло[4.3.0]нон-8-ил]-6,8-дифлуоро-1,4-дихидро-4-оксо-3-хинолон карбоксилна киселина) је неприхватљива. Повећањем рН вредности побољшава се резолуција и

раздвајање између MOX и 6,8DF. Зато је фино подешавање између удела ацетонитрила и рН неопходно како би се побољшала резолуција између критичног пара 6,8DM и 6M8F.

2D робусна мапа резолуције представљена на Слици 94 приказује зависност резолуције, у облику обојених површи, од рН (y-оса) и процента ACN (x-оса). Може се видети да је оптимална вредност рН у области од 5,8 до 6,1. На основу ове мапе такође се може видети да је Δt_R много мања од 25 % градијентног времена, тако да је изократски начин раздвајања потврђен.

Критична мапа резолуције показује да ретенција расте са порастом рН вредности и са смањењем процента ацетонитрила. При нижим процентима ацетонитрила у мобилној фази ретенциона времена су неприхватљиво висока (са 5 % ACN и рН = 2,5 ретенционо време 6F8E је око 20 минута). Оптимална ретенциона времена (вредност ретенционог фактора око 3) су добијена са 20 % ацетонитрила, али је резолуција између пикова 6,8DF мања од 1,5 на рН вредностима нижим од 4,5. Зато су, као оптимални услови за раздвајање моксифлоксацина и његових сродних једињења 10 % ацетонитрила, рН = 6,0 и температура од 45 °C.

Оптимални услови који су добијени повлачењем кончанице у леви део 2D критичне мапе резолуције су робустни, што се види из малих промена резолуције приликом промене рН и процента ACN. Хроматографски параметри се мењају за 1 – 3 % при промени процента ацетонитрила од 8 до 12 % и промени рН вредности од 5,0 до 7,0. Из DryLab симулације је евидентно да проценат ацетонитрила и рН јако утичу на ретенцију анализата.

Да би се утврдио комбиновани ефекат процента органског модификатора, рН вредности воденог дела мобилне фазе и температуре на истовремено одређивање моксифлоксацина и његових сродних једињења, коришћена је методологија површине одговора. Експериментално нађене вредности зависности резолуције пикова моксифлоксацина, сродних једињења моксифлоксацина и интерног стандарда од процента ацетонитрила, удела рН вредности мобилне фазе, температуре колоне и удела ТЕА су подвргнуте факторском дизајну (Табела 42). Израчунавања су вршена применом програма Statistica. Три врсте израчунавања су примењена:

- мултиваријантни линеарни модел без интеракција,
- мултиваријантни линеарни модел са интеракцијом фактора,
- квадратни модел.

Погодност модела и сигнификантност коефицијената тестирани су на основу вредности "lack of fit" и F-теста у ANOVA анализи (Табели 43). Поређењем вредности из ANOVA табеле, линеарни модели се могу одмах одбацити, јер је "lack of fit" вредност много висока.

За све анализе F-тест односа варијанси за "lack of fit" ("loss" функција) и за "pure error" (репликације) дају F вредност много веће од табеларних критичних вредности на нивоу поузданости од 0,05, $F_{\text{таб.}} = 4,07$. Према томе, анализом површина одговора могуће је утврдити поуздане оптималне услове за раздвајање моксифлоксацина и његових сродних једињења.

Тестирани квадратни модел обухвата шест коефицијената, од тога три линеарна и два квадратна и један интеракциони. Квадратни модел примењен је на моксифлоксацин и сродна једињења, при чему је укупна резолуција рачуната у односу на интерни стандард. За потпуни факторски дизајн, за три фактора на пет нивоа, изведено је 37 експеримената, а да би се извела анализа грешака експеримент под оптималним условима поновљен је три пута. Варијанса сваког регресионог коефицијента b , $s^2(b)$, је израчуната из дијагоналних елемената матрице варијанса-коваријанса. Значајност коефицијената је тестирана Студентовим тестом, $t = b/s^2(b)$. Коефицијент је значајан ако је t вредност већа од критичне табеларне вредности $t_{\text{крит}}(N-m,p)$ за $N-m$ степени слободе на датом нивоу поузданости ($p = 0,05$). У нашем случају $N = 37$ и $m = 6$, тако да је $t_{\text{крит}} = 2,306$. Израчунате вредности коефицијената из једначине 79 представљене су у Табели 44, а површина одговора је дата на Слици 96.

Израчуната површина одговора показује релативно широк максимум за сродна једињења моксифлоксацина при уделу ацетонитрила од 10 % и рН око 6,1 – 6,4. Мале промене ових фактора не доводе до значајне промене одговора.

Дефинисани оптимални услови за раздвајање моксифлоксацина и његових сродних једињења су 11 % ацетонитрила, рН = 6,0 (подешено фосфорном киселином), удео ТЕА 2 % и температура 45 °С.

Под експерименталним условима наведеним у Табели 47 добијена су прихватљива ретенциона времена, са максималним раздвајањем моксифлоксацина од његових сродних једињења и интерног стандарда. При овим условима су добијене и најбоље вредности за релативну стандардну девијацију површине пикова.

Програм DryLab се показао веома корисним приликом развоја и оптимизације изократских хроматографских услова раздвајања аналога моксифлоксацина и његових сродних једињења, као и деградационих производа. Резултати добијени након неколико

анализа су искоришћени за проналажење оптималних услова раздвајања анализата у што краћем времену.

Оптимизована HPLC-RP метода је валидирана. Валидација методе обухватила је одређивање специфичности, опсега концентрација, линеарности, прецизности, границе детекције и границе квантификације.

Одговор анализата био је линеаран у опсегу концентрација од 0,5 до 2,0 mg/L, а израчунати статистички параметри показују да калибрационе криве показују добро поклапање са моделом и да су линеарне упркос релативно великој концентрацији моксифлоксацина у испитиваном раствору (200 µg/mL). Одређене су и вредности LOD и LOQ за нечистоће које показују да се нечистоће могу поуздано идентификовати и квантификовати у фармацеутским формулацијама моксифлоксацина. Нађено је да је %RSD површине пика при концентрацији на LOQ мања од 5%, показујући задовољавајућу осетљивост квантификације компоненти.

Након конструкција калибрационих правих приступило се испитивању прецизности методе при чему су припремљени раствори стандарда сродних једињења и моксифлоксацина одређених концентрација у присуству офлоксацина као интерног стандарда. Добијени резултати анализе сродних једињења моксифлоксацина приказани су у Табели 62.

Табела 62. Подаци за испитивање прецизности методе за смешу стандарда сродних једињења моксифлоксацина.

Једињење	Додато (µg/mL)	Нађено ± S.D. (µg/mL)	Recovery (%)
6,8DF*	0,80	0,81 ± 0,02	101,25
	0,98	1,00 ± 0,10	102,0
	1,51	1,53 ± 0,05	101,3
6,8DM*	0,82	0,84 ± 0,03	102,4
	1,02	0,99 ± 0,03	97,1
	1,53	1,57 ± 0,08	102,6
6M8F*	0,77	0,78 ± 0,01	101,3
	0,96	0,97 ± 0,03	101,04
	1,44	1,48 ± 0,06	102,8
6F8E*	0,79	0,78 ± 0,02	98,7
	0,97	0,96 ± 0,02	99,0
	1,49	1,47 ± 0,02	97,3

*6,8DF-1-циклопропил-7-[(S,S)-2,8-диазабицикло[4.3.0]нон-8-ил]-6,8-диметокси-1,4-дихидро-4-оксо-3-хинолон карбоксилна киселина, 6M8F (1-циклопропил-7-[(S,S)-2,8-диазабицикло[4.3.0]нон-8-ил]-8-флуоро-6-метокси-1,4-дихидро-4-оксо-3-хинолон карбоксилна киселина, 6,8DF (1-циклопропил-7-[(S,S)-2,8-диазабицикло[4.3.0]нон-8-ил]-6,8-дифлуоро-1,4-дихидро-4-оксо-3-хинолон карбоксилна киселина, 6F8E 1-циклопропил-7-[(S,S)-2,8-диазабицикло[4.3.0]нон-8-ил]-8-етокси-6-флоро-1,4-дихидро-4-оксо-3-хинолон карбоксилна киселина.

Задовољавајуће вредности „recovery“ испитиваних супстанци (97,3 – 102,8 %) са % RSD мањом од 4 % су добијене претпостављајући да метода може прецизно квантификовати нечистоће у оба испитивана узорка, таблетама и инфузији. Мале промене различитих параметара (pH, % В, температуре итд.) не резултују у великој промени укупне резолуције, што показује да је метода робусна. Смањење pH вредности захтева знатно дуже време анализе како би се задовољила прихватљива резолуција између пикова. У свим експериментима изведеним под оптималним условима, критична резолуција није била мања од 1,4. Развлачење пикова неких нечистоћа одступа од идеалних, али хроматограми су репродуктивни (два инструмента) и поновљиви. Промене у концентрацији доводе до линеарног одговора у површини пикова и омогућавају прецизно одређивање.

Хроматографски пик офлоксацина, као интерног стандарда налази се на нижем ретенционом времену од пика моксифлоксацина и сродних једињења, па је погодан за употребу као интерни стандард у одређивању. Вишеструко поновљена мерења сродних супстанци у фармацеутским формулацијама показују да је релативна стандардна девијација мерења мања од 4 %. Осим тога, хроматографске карактеристике пикова сродних једињења као и моксифлоксацина (симетрија, полуширина итд.) налазе се у препорученим границама.

4.8.2. Одређивање сродних једињења и нечистоћа моксифлоксацина у Avelox® таблетама и инфузији

Декларисани ексципијенти Avelox таблета обухватају магнезијум стеарат, микрокристалну целулозу и натријум-скроб гликолат. Хроматограм смеше ексципијената не показује пикове у области ретенционих времена пикова интерног стандарда и активних компоненти Avelox таблета, што значи да ексципијенти не ометају одређивање активних компоненти. Овим се показује да је HPLC метода специфична за одвајање и одређивање нечистоћа које настају у процесу производње таблета које садрже моксифлоксацин.

Пик нечистоће на $t_r = 8,02 \text{ min}$ је примећен код анализе таблета и раствора инфузије. Он је добро одвојен од стандарда моксифлоксацина (релативно ретенционо време, 1,54 min). Квантификација у поређењу са референтним стандардом моксифлоксацина показује да је заступљено 0,11 % нечистоће. Поређењем вредности релативног ретенционог времена и спектра добијеног употребом DAD детектора са

познатим синтетичким нечистоћама дошло се до закључка да је присутна нечистоћа 6-метокси-8-флуоро једињење (6М8F).

Вишеструко поновљено хроматографско раздвајање активних компоненти указују на репродуктивност ретенционих времена, при чему је (средња) релативна стандардна девијација мерења мања од 5 %. Ово указује да је развијена HPLC метода погодна за анализу Avelox таблета и инфузија у складу са ИСН упутствима. Динамички опсег концентрација (0,5 – 2,0 mg/L) линеарног одговора указује на погодност примењене методе и при великим разблажењима узорака чиме се ефекат матрикса губи, а уједно повећава прецизност одређивања. LOD се креће у опсегу 0,041 – 0,061 $\mu\text{g/mL}$, а LOQ 0,14 – 0,21 $\mu\text{g/mL}$ и у прихватљивим су границама што указују да је одређивање могуће и при великим разблажењима, што поједностављује одржавање колоне. Добијене вредности за искоришћење које се налазе у опсегу од 97,3 до 102,8 %, указују да је метода тачна и прецизна.

На основу свега изложеног може се закључити да је HPLC метода погодна за одређивање сродних једињења и деградационих производа у таблетама и инфузијама које као активну компоненту садрже моксифлоксацин и да задовољава препоруке ИСН.

4.8.3. Поређење наше методе за одређивање нечистоћа и деградационих производа са литературним подацима

Kumar и сарадници [266] су користећи препаративну HPLC анализу и градијентно елуирање одвојили четири сродне нечистоће из лека моксифлоксацина. Њихове структуре су потврђене и идентичне су са онима синтетисаним у лабораторији. Нечистоћа нађена у нашем раду се разликује од оних које су нашли Kumar и сарадници. Разлика се може објаснити узимајући у обзир чињеницу да су у оба случаја нечистоће везане за процес производње. У нашем раду коришћен је узорак од Bayer AG, док су Kumar и сарадници користили узорак из Dr. Reddy's Laboratories Ltd. Индија. Процес синтезе и пречишћавања код ова два произвођача се разликују, стога се јавља и разлика у нађеним нечистоћама.

Salem и сарадници [268] су користећи TLC методу у свом раду нашли декарбоксилувани моксифлоксацин (производ киселинске деградације), који су идентификовали користећи IR спектроскопију.

Motwani и сарадници [267] су идентификовали седам производа хидролитичке деградације користећи HPTLC методу. Разлика у деградацији моксифлоксацина у нашем раду и раду Motwani и сарадника може се приписати драстичнијим условима

деградације у њиховом раду (1 mol/L концентрација HCl или NaOH, 30 % H₂O₂, при рефлуку од 3 h).

4.9. Спектрофотометријско одређивање моксифлоксацина у хуманом серуму

Циљ развоја спектрофотометријске методе за одређивање моксифлоксацина у хуманом серуму био је проналажење оптималних услова за раздвајање моксифлоксацина и протеина из хуманог серума. Треба имати у виду да је моксифлоксацин хетероциклична аминокиселина са два места за протолизу: једно одговара везивању протона на 2'-N секундарној аминокиперазинил групи, а друго отпуштању протона са карбоксилне групе. Према томе, моксифлоксацин у раствору може постојати у облику катјона, ањона диполарног ("zwitter") јона и у неутралном облику. Релативна заступљеност ових облика зависи од рН вредности раствора. Како највећи интензитет апсорпције показује неутрални молекул, треба одредити рН вредност у које је неутрални облик највише заступљен. Такође, треба одредити изоелектричну тачку моксифлоксацина, што значи да је потребно одредити константе дисоцијације моксифлоксацина у раствору.

Валидација методе обухватила је одређивање погодности, линеарности, тачности, прецизности, границе детекције и границе квантификације. Валидациони параметри погодности методе за одређивање моксифлоксацина у плазми дати су у Табели 55. Параметри погодности методе указују да серумски протеини показују максималну апсорбанцију на истој таласној дужини на којој моксифлоксацин максимално апсорбује. Из тог разлога је за одређивање искоришћена друга трака на већој таласној дужини где компоненте серума не показују апсорбанцију. Према томе, утицај матрикса на сигнал анализата је занемарљив. Вишеструко поновљена мерења моксифлоксацина у плазми (у облику оптерећене плазме) показују да је релативна стандардна девијација мерења мања од 2 %. На основу изложеног може се закључити да је метода погодна, према ИСН смерницама, за одређивање моксифлоксацина у плазми.

Опсег линеарности одговора и одређене границе квантификације и границе детекције показују да је метода погодна, не само за једнократно одређивање моксифлоксацина, већ и за фармакокинетичка мерења, тј за одређивање моксифлоксацина у одређеном временском интервалу, на почетку дозирања, при максималној концентрацији у плазми, као и при почетку елиминације. При томе, нема

потребе за преконцентровањем, екстракцијом или дериватизацијом анализата, већ се мерењем може обухватити велики динамички опсег концентрација моксифлоксацина у плазми. Променом рН вредности мобилне фазе постиже се оптимално време за брзо извођење анализе и релативно мала потрошња супстанци. Ова чињеница је од значаја у клиничким анализама, када је потребно анализирати велики број узорача у кратком времену. Предност методе је и то што је једноставна за извођење.

Добијена "recovery" вредност од 92,5 % је у прихватљивим границама за ову врсту мерења и указује да је постигнута тачност методе у складу са смерницама за валидацију биоаналитичких метода.

Прецизност мерења изражена је преко релативне грешке и њена вредност је око 5 % и мања, што указује на занемарљив утицај протеина плазме. Клиничка испитивања су показала да се моксифлоксацин брзо и потпуно апсорбује након оралног начина узимања. Максимална концентрација моксифлоксацина у плазми (око 4,5 $\mu\text{g/mL}$) се постиже 1 до 3 сата након узимања једне дозе од 400 mg. Биорасположивост је приближно 90 % на основу чега се може закључити да је утицај ензима јетре занемарљив. Моксифлоксацин поседује дуго време полу живота у плазми (12 сати) и у већем делу се излучује било као непромењено једињење или као сулфат или глукозидни метаболит. Како се моксифлоксацин споро метаболише у плазми, могуће је његово тачно одређивање чак и након 10 сати после узимања лека. Резултати анализе након пет понављања су $3,56 \pm 0,15 \mu\text{g/mL}$ и $3,89 \pm 0,10 \mu\text{g/mL}$ моксифлоксацина. Стога, предложена спектрофотометријска метода за одређивање моксифлоксацина у плазми, која је једноставна и брза, може се применити за фармакокинетичка мерења и рутинске клиничке анализе.

4.9.1. Поређење наше методе одређивања моксифлоксацина са литературним подацима

За одређивање моксифлоксацина у биофлуидима најчешће се користи HPLC метода [342 – 345], затим флуориметрија [346], капиларна електрофореза [347], диференцијална пулсна поларографија [348], диференцијална пулсна волтаметрија [349] и спектрофотометрија [350].

HPLC метода је метода избора у анализи флуорохинолона у биолошким матрицама. Она нуди широк линеарни опсег од 5 ng/mL до 3 $\mu\text{g/mL}$ са лимитом

детекције од 2 ng/mL. Међутим, за извођење ове технике потребно је доста времена и захтева стручно лице. Стога, алтернативна метода за рутинске клиничке анализе може бити спектрофотометрија. До сада је само један рад објављен за одређивање моксифлоксацина користећи основне спектре.

У раду Motwani и сарадника [350] моксифлоксацин је одређиван на таласној дужини од 296 nm у 0,1 mol/L хлороводоничној киселини (pH = 1,2) и на 289 nm у фосфатном пуферу (pH = 7,4). За конструкцију калибрационе криве користили су опсег линеарности од 1 – 12 µg/mL ($r^2 = 0,9999$) у хлороводоничној киселини и 1 – 14 µg/mL ($r^2 = 0,9998$) у фосфатном пуферу. Вредности за лимит детекције и лимит квантификације износе 0,0402 и 0,1214 µg/mL у хлороводоничној киселини и 0,0384 и 0,1163 µg/mL у фосфатном пуферу. Релативна стандардна девијација за одређивање моксифлоксацина применом ове методе у фармацеутским формулацијама (таблетама, инфузији и капима за очи) износи мање од 2 %.

Tarkase и [351] су развили UV спектрофотометријску методу користећи први извод спектра за одређивање моксифлоксацина у фармацеутским формулацијама. Таласна дужина максималне апсорпције износи 293 nm, опсег концентрација 1 – 20 µg/mL. За одређивање моксифлоксацина коришћена је амплитуда између таласних дужина од 282 nm до 302 nm. Приликом одређивања моксифлоксацина у таблетама стандардна девијација је мања од 2, вредности „recovery“ се крећу у опсегу од 98 до 101 %.

Dhupal и сарадници [352] су користили основни и први извод спектра моксифлоксацина за његово одређивање у офтамолошком раствору. Линеарност је била у опсегу концентрација 1 – 12 µg/mL ($r^2 > 0,99$), а вредности искоришћења се крећу у опсегу од 99 до 100 %.

Резултати одређивања моксифлоксацина код пацијената који су узели таблете “Avelox” су у доброј сагласности са литературним подацима [353].

У поређењу са литературним подацима спектрофотометријског одређивања моксифлоксацина опсег концентрација код наше методе је знатно мањи, на основу чега се може закључити да је наша метода осетљивија и има нижу вредност лимита детекције. За разлику од осталих метода које се користе за одређивање моксифлоксацина у фармацеутским формулацијама једино наша метода се бави одређивањем моксифлоксацина у серуму.

5. Закључак

Свестраним разматрањем резултата приказаних у овој докторској дисертацији могу се извести следећи закључци:

1. Разрађене су нове HPLC методе за квантификацију биофлавоноида: кверцетина, рутина, хесперидина, хесеретина, хесперидина, апигенина, лутеолина, катехина и епикатехина у узорцима биљне хране (кора поморанце, црвени лук, мед, броколи, карфиол и прокељ).
2. Развијена је спектрофотометријска и HPLC метода за квантификацију структурно сличног једињења (аналога флавона) моксифлоксацина у различитим матрицама: фармацеутским облицима и хуманом крвном серуму.
3. Да би се обезбедила репродуктивности анализе потребно је да се комерцијални узорци хране хомогенизују до величине честица од 5 μm .
4. Оптимизацијом процеса екстракције биофлавоноида утврђено је да течност-чврста екстракција уз примену Supelco LC-18 кертрица са метанолом као елуентом даје најбољи принос екстракције који се налази у опсегу од 93 – 97 %.
5. Проучавање матричног ефекта на масене сигнале анализата показало је да матрикс узорка врши супресију сигнала свих испитиваних биофлавоноида. Могући узроци супресије су присуство фенолних киселина и неких липофилних супстанци у екстрактима.
6. Матрични ефекат који се јавља приликом одређивања биофлавоноида коришћењем методе пост-екстракције креће се у опсегу од - 44 до -0,5 %, док се применом методе стандардног додатка налази у опсегу од -151 до -7 %.
7. Сузбијање ефикасности јонизације која се јавља од присутних коелуираних супстанци које изазивају промене у одговору LC-ESI-MS система је превазиђено коришћењем методе стандардног додатка. Коришћење методе стандардног додатка за квантификацију биофлавоноида може послужити као обећавајући и практични приступ за превазилажење матричног ефекта и има велики потенцијал за примену на друге врсте матрица где се користи LC-ESI-MS/MS техника.

8. Добијени резултати указују да је садржај биофлавоноида одређен у овом раду у доброј сагласности са литературним подацима.
9. Параметри валидације методе за одређивање рутина, кверцетина, хесперидина, хесперетина и каемпферола у узорцима коре поморанце, црвеног лука и меда указују да се тачност налази у опсегу од 88 – 114 %, прецизност у опсегу од 0,46 – 8,24 %, LOD 0,039 – 0,076 $\mu\text{g/mL}$, а LOQ 0,118 – 0,229 $\mu\text{g/mL}$. За одређивање кверцетина, каемпферола, катехина, лутеолина, апигенина и епикатехина у узорцима фамилије *Brassica* добијени су следећи валидациони параметри: тачност: 85 – 109 %, прецизност: 1,23 – 4,58 %, LOD 0,02 – 0,055 $\mu\text{g/mL}$, а LOQ 0,06 – 0,17 $\mu\text{g/mL}$.
10. Испитана је антиоксидативна активност екстракта узорка фамилије *Brassica* и одређене су константе брзине реакције псеудо првог реда између DPPH и екстракта узорка фамилије *Brassica*. Вредности константи брзина реакције између DPPH и екстракта узорка фамилије *Brassica* крећу се у опсегу од $7,1 \times 10^{-2}$ – $16,4 \times 10^{-2}$ $\text{L mol}^{-1} \text{s}^{-1}$.
11. Развијена је RP-HPLC метода помоћу компјутерске симулације DryLab и статистичке методологије одговора површине за одвајање моксифлоксацина од синтетичких нечистоћа и деградационих производа моксифлоксацина (аналога биофлавоноида) хеометријским приступом у кратком временском периоду са прихватљивим хроматографским параметрима. Валидациони параметри развијене хроматографске методе дати су преко тачности која се креће у опсегу од 97,3 до 102,8 %, док је прецизност за све анализе мања од 4 %, LOD се креће у опсегу од 0,041 до 0,061 $\mu\text{g/mL}$, а LOQ од 0,14 до 0,21 $\mu\text{g/mL}$. Садржај производа деградације налази се у опсегу 0,1 – 0,3 % од укупне количине моксифлоксацина приликом киселе и базне деградације стандарда, узорка таблета и инфузије моксифлоксацина.
12. Развијена је једноставна спектрофотометријска метода за одређивање моксифлоксацина у серуму, без претходне припреме узорка. Тачност развијене спектрофотометријске методе креће се у опсегу од 95,1 до 102,1 %, а прецизност је мања од 5 %.

Научни допринос ове докторске дисертације огледа су у разради HPLC методе са MS/MS и UV/DAD детекцијом за квантификацију биофлавонида, у биљном материјалу (храни) као и структурно сличног једињења моксифлоксацина у фармацеутским облицима и хуманом крвном серуму. Разрада HPLC методе потпомогнута је рачунарском, статистичком и термодинамичком оптимизацијом процеса. Ефикасност оваквог приступа (претходне симулације HPLC процеса) огледа се у скраћењу времена анализе, смањењу потрошње растварача и могућношћу поуздане квантификације великог броја структурно сличних анализата. Развијене методе су унапређене у односу на литературне у погледу свеобухватности оптимизације сваког корака анализе: узорковања, хомогенизације узорка, екстракције, пречишћавања екстракта и саме инструменталне анализе. То је довело до високе поузданости и репродуктивности предложених метода и могућности њихове примене у анализи животних намирница и лабораторијама за контролу квалитета.

6. Литература

1. N.G. Bisset, “*Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals*”, Medpharm, Stuttgart, 1994.
2. J.B. Harborne, H. Baxter, “*The Handbook of Natural Flavonoids*”, John Wiley & Sons, Chichester, 1999.
3. J.B Harborne, B.L Turner, “*Plant Chemosystematics*”, Academic Press, London. 1984.
4. S. Asker, S. Frost, *Hereditas*, 66 (1970) 49.
5. R. Boyle, “*Experiments and Considerations Touching Colours*”, London, 1664.
6. F.S. Morot, *Ann. Sci. Nat.*, (1849) 160.
7. A. Glenard, *Ann. Chim. Phys.*, (1858) 366.
8. E. Filhol, *Acad. Sci.*, 39 (1854) 194.
9. A. Wigand, *Bot. Ztg.*, 20 (1862)121.
10. A.B. Rusznyak, A. Szent-Györgyi, *Nature*, 138 (1936) 798.
11. M.T. Murray, *Nutrition* 1998
12. H. Scarborough, A.L. Bacharach, *Vitam.Horm.*, 7 (1949) 1.
13. A. Hassig, W.X. Liang, H. Schwabl, K. Stampfli, *Med. Hypoth.*, 52 (1999) 479.
14. J.B. Harborne, *Phytochemistry*, 3 (1964) 151.
15. J.B. Harborne, “*Comparative Biochemistry of the Flavonoids*”. Academic Press, New York, 1967.
16. K.E. Heim, A.R. Tagliaferro, D.J. Bobliya, *J. Nutr. Biochem.*, 13 (2002) 572.
17. J. Peterson, M.S. Dwyer, *Nutr. Res.*, 18 (1998) 1995.
18. H Tsuchiya, *Food Chem.*, 120 (2010) 1089.
19. E.D. Rijke, P. Out, W.M. Niessen, F. Ariese, C. Goojer, U.A. Brinkman, *J. Chromatogr. A*, 1112 (2006) 31.
20. P.K. Stumpf, E. Conn, “*The Biochemistry of Plants: A Comprehensive Treatise*”, Vol. 7: Secondary plant products, Academic Press, New York, 1981.
21. P. K. Stumpf and E. Conn (Eds.), “*The Biochemistry of Plants: A Comprehensive Treatise*”, Vol. 8: Secondary plant products, Academic Press, New York, NY, USA, 1981
22. T.P.T. Cushnie, A.J. Lamb, *Int. J. Antimicrob. Ag.*, 26 (2005) 343.
23. N.C. Cook, S. Samman, *Nutr. Biochem.*, 7 (1996) 66.
24. S.C Sahu, G.C. Gray, *Cancer Lett.*, 104 (1996) 193.
25. J.O. Prey, J. Brown, J. Fleming, P.R. Harrison, *Biochem. Pharmacol.*, 66 (2003) 2075.
26. P.C.H. Hollman, M.B. Katan, *Food Chem. Toxicol.*, 37 (1999) 937.
27. W. Ren, Z. Qiao, H. Wang, L. Zhu, L. Zhang, *Med. Res. Rev.*, 23 (2003) 519.
28. B.S.J. Winkel, The Biosynthesis of Flavonoids, “*The Science of Flavonoids*” Edited by Erich Grotewold, Springer, 2006.
29. G. Thomas, “*Fundamentals of Medicinal Chemistry*”, J. Wiley & Sons, Chichester, UK, 2003.
30. D. Cairns, “*Essentials of Pharmaceutical Chemistry*”, 2nd edition, Pharmaceutical Press, London, UK, 2003.
31. V. Rastija, S. Nikolic, V.H. Masand, *Acta Chim. Slov.*, 60 (2013) 781.

32. I.D. Sadekov, V.I. Minkin, A.E. Lutsii, Usp. Khim., 39 (1970) 380.
33. A. Ciric, I. Jakovljevic, M. Cvijovic, M. Jelkic-Stankov, P. Djurdjevic, "Metal Complexes of Kaempferol and Their Speciation in Human Plasma", 187 – 202. у књизи „Kaempferol Chemistry, Natural Occurrences and Health Benefits“, Editors G. Villers and Y. Fougere, Nova Science Publishers, Inc, New York, 2013.
34. N.P. Slabbert, Tetrahedron Lett., 33 (1977) 821.
35. S.V. Jovanovic, S. Steenken, M. Tosic, B. Marjanovic, M.G. Simic, J. Am. Chem. Soc., 116 (1994) 4846.
36. J. Peinado, J. Florinda, Analyst, 113 (1988) 555.
37. D. Tsimogiannis, M. Samiotaki, G. Panayotou, V. Oreopoulou, Molecules, 12 (2007) 593.
38. G. Zgorka, J. AOAC Int., 94 (2011) 22.
39. A. Chourasiya, A. Upadhayay, R.N. Shukla., J. Pharm. Biomed. Sci. 25 (2012) 179.
40. M. Heneczkowski, M. Kopacz, D. Nowak, A. Kuzniar, Acta Pol. Pharm., 58 (2001) 415.
41. K.R. Markham, V.M. Chari, "Carbon-13 NMR Spectroscopy of Flavonoids", in "The Flavonoids: Advances in Research", Harborne, J.B. and Mabry, T.J., Eds., Chapman & Hall, London, 19,1982.
42. K.R. Markham, H. Geiger, "1H Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy of Flavonoids and Their Glycosides in Hexadeuterodimethylsulfoxide", in "The Flavonoids: Advances in Research" Harborne, J.B. and Mabry, T.J., Eds., Chapman & Hall, London, 19,1982.
43. J.B. Harborne, Chapman & Hall, London, 441, 1993.
44. P.K. Agrawal, "Carbon-13 NMR of Flavonoids", Elsevier, Amsterdam, 1989.
45. Y. Yuan, Y. Song, W. Jing, Y. Wang, X. Yang, D. Liu, Anal. Methods, 6 (2014) 907.
46. D.C. Albach, Phytochemistry, 64 (2003) 1295.
47. A. Stochmal, Phytochemistry, 57 (2001) 1223.
48. G.T. Maatooq, Phytochemistry, 44 (1997) 187.
49. C. Xie, Phytochemistry, 65 (2004) 3041.
50. T. Fossen, A.T. Pedersen, O.M. Andersen, Phytochemistry, 47 (1998) 281.
51. R. Slimestad, Phytochemistry, 40 (1995) 1537.
52. K.M. Davies, Plant J., 13 (1998) 259.
53. X.C. Li, L. Cai, C.D. Wu, Phytochemistry, 46 (1997) 97.
54. R.W.D. Welford, Chem. Commun., 1828 (2001).
55. P.C. Stevenson, N.C. Veitch, Phytochemistry, 43 (1996) 695.
56. H. Minami, Phytochemistry, 41 (1996) 1219.
57. V.P. Singh, B. Yadav, V.B. Pandey, Phytochemistry, 51 (1999) 587.
58. Y. Shimada, FEBS Lett., 461 (1999) 241.
59. R.M. Seabra, Phytochemistry, 40 (1995) 1579.
60. C. Rosati, Mol. Breed., 12 (2003) 197.
61. X.Q. Li, X.H. Sun, S. Cai, X.X. Ying, F.M. Li, Yao Xue Xue Bao, 44 (2009) 895.
62. F. Sanchez-Rabameda, J. Mass. Spectrom, 38 (2003) 35.

63. D.D. Perin, R.P. Agarwal, "Metal Ions in Biological Systems", H. Sigel, Marcel Dekker, New York, 1973.
64. G.H. Nancollas, M. B. Tomson, Pure & Appl.Chem. 54 (12) 2675.
65. D.D. Perrin, "Stability Constants of Metal-Ion Complexes Part B, Organic Ligands", IUPAC Chemical Data Series No. 22, Pergamon Press, Oxford, 1979.
66. P.K. Glasoe, F.A. Long, J. Phys. Chem., 64 (1960) 188.
67. J. Petit, V. Geertsen, C. Beaucair, M. Stamouli, J. Chromatogr. A, 1216 (2009) 4113.
68. R. Karadag, G. Erdogan, M. Bayar, E. Dolen, Rev. Anal. Chem., 26 (2007) 169.
69. R.M.S. Pereira, N.E.D. Andrades, N. Paulino, A.C.H.F. Sawaya, M.N. Eberlin, M.C. Marcucci, G.M. Favero, E.M. Novak, S.P. Bydlowski, Molecules, 12 (2007) 1352.
70. F.V. Rubens de Souza, W.F. de Giovani, Spectrochim. Acta Part A, 61 (2005) 1985.
71. Z. Radovic, D. Malešev, Pharmazie, 39 (1984) 870.
72. D. Malešev, Z. Radovic, Pharmazie, 40 (1985) 133.
73. Z. Radovic, D. Malešev, Mikrochim. Acta, 2 (1985) 247.
74. Z. Radovic, D. Malešev, Acta Pol. Pharm. XLIV, 5 (1987) 433.
75. D. Malešev, Z. Radovic, M. Jelikić–Stankov, M. Bogavac, Anal. Lett., 24 (1991) 1159.
76. D. Malešev, Z. Radovic, M. Jelikić–Stankov, Pharmazie, 46 (1991) 534.
77. D. Malešev, Z. Radovic, M. Jelikić–Stankov, Spectrosc. Lett., 26 (1993) 1985.
78. V.S. Kuntic, D.L. Malešev, Z.V. Radovic, M.M. Kosanic, U.B. Mioc, V.B. Vukojevic, J. Agric. Food Chem., 46 (1998) 5139.
79. V. Kuntic, M. Kosanic, D. Malešev, Z. Radovic, Pharmazie, 53 (1998) 724.
80. V. Kuntic, M. Kosanic, D. Malešev, Z. Radovic, U. Mioc, J. Serb. Chem. Soc., 63 (1998) 565.
81. V. Kuntic, D. Malešev, Z. Radovic, V. Vukojevic, Monats. Chem., 131 (2000) 769.
82. Z. Radovic, D. Malešev, Arch. Pharm., 320 (1987) 188.
83. D. Malešev, Z. Radovic, Pharmazie, 42 (1987) 59.
84. V. Kuntic, S. Blagojevic, D. Malešev, Z. Radovic, M. Bogavac, Monatsh. Chem., 129 (1998) 41.
85. N. Pejić, V. Kuntic, D. Malešev, Pharmazie, 57 (2002) 216.
86. Z. Radovic, D. Malešev, Arh. Farm., 5 (1983) 221.
87. D. Malešev, Z. Radovic, Bull. Soc. Chim., 48 (1983) 745.
88. D. Malešev, Z. Radovic, M. Jelikić–Stankov, J. Serb.Chem. Soc., 58 (1993) 557.
89. S. Blagojevic, D. Malešev, Z. Radovic, Arh. Farm. 5–6 (1999) 287.
90. S. Blagojevic, M. Aleksic, D. Malešev, Z. Radovic, Arh. Farm., 5 (2003) 17.
91. Z. Radovic, D. Malešev, Pharmazie, 43 (1988) 135.
92. Z. Radovic, D. Malešev, Arh. Farm., 4 (1983) 147.
93. D. Malešev, Z. Radovic, M. Jelikić–Stankov, Arh. Farm., 46 (1991) 223.
94. Z. Radovic, D. Malešev, Arh. Farm., 42 (1992) 27.
95. D. Malešev, Z. Radovic, Pharmazie, 44 (1989) 496.
96. D. Malešev, Z. Radovic, M. Jelikić–Stankov, Monatsh. Chem., 122 (1991) 429.
97. D. Malešev, Z. Radovic, M. Jelikić–Stankov, Spectrosc. Lett., 25 (1992) 1089.
98. D. Malešev, Z. Radovic, M. Jelikić–Stankov, Arh. Farm., 42 (1992) 163.

99. D. Malešev, Z. Radovic, M. Jelikić–Stankov, *Monatsh. Chem.*, 121 (1990) 455.
100. M. Aleksic, S. Blagojevic, D. Malešev, Z. Radovic, *J. Serb. Chem. Soc.*, 65 (2000) 631.
101. D. Malešev, Z. Radovic, M. Jelikić–Stankov, *Pharmazie*, 44 (1989) 863.
102. V. Kuntic, S. Blagojevic, D. Malešev, Z. Radovic, *Pharmazie*, 54 (1999) 548.
103. V. Kuntic, M. Kosanic, D. Malešev, Z. Radovic, U. Mioc, *J. Serb. Chem. Soc.*, 63 (1998) 565.
104. D. Malešev, Z. Radovic, V. Kuntic, M. Kosanic, *Anal. Lett.*, 30 (1997) 917.
105. Q.K. Panhwar, S.Memon, *Sci. World J.*, 55 (2014) 8.
106. G. Dehghan, Z. Khoshkam, „*Chelation of Toxic Tin(II) by Quercetin: A Spectroscopic Study*“, International Conference on Life Science and Technology, IPCBEE vol.3 (2011).
107. M. Medvidovic-Kosanovic, M. Samardžic, N. Malatesti, M. Sak-Bosnar, *Int. J. Electrochem. Sci.*, 6 (2011) 1075.
108. S. Ahmed Fahren, *Int. J. Chem. Sci.*, 11(3) (2013) 1247.
109. S. Selvaraj, S. Krishnaswamy, V. Devashya, S. Sethuraman, U.M. Krishnan, *RSC Adv.*, 2 (2012) 2797.
110. M.A. Rostagno, M. Palma, C.G. Barroso, *J. Chromatogr. A.*, 1012 (2003) 119.
111. M. Herrero, J.A. Mendiola, A. Cifuentes, E. Ibanez, *J. Chromatogr. A.*, 1217 (2010) 2495.
112. M. Naczek, F. Shahidi, *J. Chromatogr. A.*, 1054 (2004) 95.
113. C.D. Stalikas, *C.D. J. Sep. Sci.*, 30 (2007) 3268.
114. I. Ignat, I. Volf, V.I Popa, *Food Chem.*, 126 (2011) 1821.
115. R.J. Robbins, *J. Agric. Food Chem.*, 51 (2003) 2866.
116. K.M. Kalili, A. de Villiers, *J. Sep. Sci.*, 34 (2011) 854.
117. R. Flamini, *Mass Spectrom. Rev.*, 22 (2003) 218.
118. H.M. Merken, G.R. Beecher, *J. Agric. Food Chem.*, 48 (2000) 577.
119. A.S. Zarena, K.J. Udaya Sankar, *Food Biochem.*, 36 (2011) 627.
120. C. Qin, Y. Li, W. Niu, Y. Ding, R. Zhang, X. Shang, *Czech J. Food Sci.*, 28 (2010) 117.
121. K.V. Reichelt, R. Peter, S. Paetz, M. Roloff, J.P. Ley, G.E. Krammer, K.H. Engel, *J. Agric. Food Chem.*, 58 (2010) 458.
122. K.A. Cooper, E. Campos-Gimenez, D. Jimenez-Alvarez, K. Nagy, J.L. Donovan, G. Williamson, *J. Agric. Food Chem.*, 55 (2007) 2841.
123. Y. Takenaka, N. Morimoto, N. Hamada, T. Tanahashi, *Phytochemistry*, 72 (2011) 1431.
124. J. Lee, C. Rennaker, R.E. Wrolstad, *Food Chem.*, 110 (2008) 782.
125. C.A. Diagone, R. Colombo, F.M. Lancas, J.H. Yariwake, *Chromatogr. Res. Int.* 2012.
126. D. Lopes-Lutz, J. Dettmann, C. Nimalaratne, A. Schieber, *Molecules*, 15 (2010) 8543.
127. B. Klejdus, J. Vacek, L. Benesova, J. Kopecky, O. Lapcik, V. Kuban, *Anal. Bioanal. Chem.* 389 (2007) 2277.
128. M.I. Churchwell, N.C. Twaddle, L.R. Meeker, D.R. Doerge, *J. Chromatogr. B.*, 825 (2005) 134.
129. C. Cavaliere, P. Foglia, R. Gubbiotti, P. Sacchetti, R. Samperi, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 22 (2008) 3089.
130. J.P. Roggero, P. Archier, S. Coen, „*Chromatography of Phenolics in Wine. In Wine: Nutritional and Therapeutic Benefits*“; American Chemical Society: Washington, DC, USA, 1997.

131. A. de Villiers, K.M. Kalili, M. Malan, J. Roodman, *LCGC Eur.*, 23 (2010) 466.
132. E. Cicchetti, A. Chaintreau, *J. Sep. Sci.*, 32 (2009) 3043.
133. T. Kraushofer, G. Sontag, *Eur. Food Res. Technol.*, 215 (2002) 529.
134. M.A. Rostagno, M.D. Arrigo, J.A. Martínez, *TrAC-Trend. Anal. Chem.*, 29 (2010) 553.
135. Y.S Oh, J.H. Lee, S.H. Yoon, C.H. Oh, D.S. Choi, E. Choe, M.Y. Jung, *J. Food Sci.*, 73 (2008) 378.
136. S. Moze, T. Polak, L. Gasperlin, D. Koron, A. Vanzo, N. Poklar Ulrih, V. Abram, *J. Agric. Food Chem.*, 59 (2011) 6998.
137. F.P. do Amaral, A. Napolitano, M. Masullo, L.C. dos Santos, M. Festa, W. Vilegas, C. Pizza Piacente, *J. Nat. Prod.*, 75 (2012) 547.
138. L. Zhang, J. Chen, Y. Wang, D. Wu, M. Xu, *Molecules*, 15 (2010) 3567.
139. S.D Wei, H.C. Zhou, Y.M. Lin, M.M. Liao, W.M. Chai, *Molecules*, 15 (2010) 4369.
140. R. Edenharder, G. Keller, K.L Platt, K.K. Unger, *J. Agric. Food Chem.*, 49 (2001) 2767.
141. A. Bianco, F. Buiarclli, G. Cartoni, F. Coccioli, I. Muzzalupo, A. Polidor, N. Uccella, *Anal. Lett.*, 34 (2001) 1033.
142. F. Chinnici, N. Natall, U. Spinabelli, C. Riponi, *LWT-Food Sci. Technol.*, 40 (2007) 1587.
143. F.N. Muanda, R. Soulimani, A. Dicko, *J. Nat. Prod.*, 4 (2011) 100.
144. A.M. Pawlowska, W. Oleszek, A. Braca, *J. Agric. Food Chem.*, 56 (2008) 3377.
145. P. Jandera, *J. Sep Sci.*, 31 (2008) 1421.
146. J. Zeng, X. Zhang, Z. Guo, J. Feng, J. Zeng, X. Xue, X. Liang, *J. Chromatogr. A*, 1220 (2012) 50.
147. Z. Liang, K. Li, X. Wang, Y. Ke, Y. Jin, X. Liang, *J. Chromatogr. A*, 1224 (2012) 61.
148. J.G.P. Martin, E. Porto, C.B. Correa, S.M. De Alencar, E.M. Da Gloria, I.S.R. Cabral, L.M. De Aquino, *J. Nat. Prod.*, 5 (2012) 27.
149. F. Shadkami, S. Estevez, R. Helleur, *J. Anal. Appl. Pyrolysis.*, 85 (2009) 54.
150. C. Proestos, I.S. Boziaris, G.J.E. Nychas, M. Komaitis, *Food Chem.*, 95 (2006) 664.
151. J. Liggins, L.J.C. Bluck, A. Coward, S.A. Bingham, *Anal. Biochem.*, 264 (1998) 1.
152. M.H. Siess, A.M. Le Bon, M.C. Canivenc-Lavier, M.J. Amiot, S. Sabatier, S.Y. Aubert, M. Suschetet, *J. Agric. Food Chem.*, 44 (1996) 2297.
153. L.F. Wang, D.M. Kim, C.Y. Lee, *J. Agric. Food Chem.*, 48 (2000) 4227.
154. Q. Liu, W. Cai, X. Shao, *Talanta*, 77 (2008) 679.
155. R. Zadernowski, S. Czaplicki, M. Naczek, *Food Chem.*, 112 (2009) 685.
156. B. Lapornik, M. Prosek, W.A. Golc, *J. Food Eng.*, 71 (2005) 214.
157. M. Naczek, F. Shahidi, *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.*, 41 (2006) 1523.
158. J.D. Box, *Water Res.*, 17 (1983) 511.
159. W. Huang, A. Xue, H. Niu, Z. Jia, J. Wang, *Food Chem.*, 114 (2009) 1147.
160. A.J.D. Fernandes, M.R.A. Ferreira, K.P. Randau, T.P. De Souza, L.A.L. Soares, *Sci. World J.*, 2012 (2012) 1.
161. S.W. Abeynayake, S. Panter, A. Mouradov, G. Spangenberg, *Plant Method.*, 7 (2011) 1.
162. P.W. Hartzfeld, R. Forkner, M.D. Hunter, A.E. Hagerman, *J. Agric. Food Chem.*, 50 (2002) 1785.

163. L.J. Porter, L.N. Hrstich, B.G. Chan, *Phytochemistry*, 25 (1986) 223.
164. A.E. Hagerman, L.G. Butler, *J. Agric. Food Chem.*, 26 (1978) 809.
165. L.A. Marghtas, C.M. Mihai, F. Chirila, D.S. Dezmirean, N. Fit, *Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj.*, 38 (2010) 40.
166. E.A.H. Roberts, D.J. Wood, *Biochem. J.*, 49 (1951) 414.
167. X. Cao, C. Wang, H. Pei, B. Sun, *J. Chromatogr. A*, 1216 (2009) 4268.
168. Y. Yang, D. Gu, H. Wu, H. Aisa, T. Zhang, Y. Ito, *J. Liq. Chrom. Rel. Technol.*, 31 (2008) 3012.
169. Y. Ito, *J. Chromatogr. A*, 1065 (2005) 145.
170. H.T. Lu, Y. Jiang, F. Chen, *J. Chromatogr. A*, 1026 (2004) 185.
171. A. Yanagida, A. Shoji, Y. Shibusawa, H. Shindo, M. Tagashira, M. Ikeda, Y. Ito, *J. Chromatogr. A*, 1112 (2006) 195.
172. J. Wang, H. Gao, J. Zhao, Q. Wang, L. Zhou, J. Han, Z. Yu, F. Yang, *Molecules*, 15 (2010) 5998.
173. D. Caridi, V.C. Trenerry, S. Rochfort, S. Duong, D. Laughler, R. Jones, *Food Chem.*, 105 (2007) 691.
174. S.C. Wang, Z. Zhang, L.C. He, H. Li, *Anal. Lett.*, 43 (2010) 1534.
175. E.H. Liu, L.W. Qi, J. Cao, P. Li, C.Y. Li, Y.B. Peng, *Molecules*, 13 (2008) 2521.
176. F.N. Fonseca, M.F.M. Tavares, *J. Chromatogr. A*, 1154 (2007) 390.
177. X.J. Chen, H. Ji, Y.T. Wang, S.P. Li, *J. Sep. Sci.*, 31 (2008) 881.
178. R.H.F. Cheung, P.J. Marriott, D.M. Small, *Electrophoresis*, 28 (2007) 3390.
179. A. Rybarczyk, R.B. Pegg, R.Z. Amarowic, *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 58 (2008) 263.
180. T. Wu, Y.Q. Quan, J.N. Ye, *Food Chem.*, 100 (2007) 1573.
181. S. Zhang, S.Q. Dong, L.Z. Chi, *Talanta*, 76 (2008) 780.
182. R.L. Prior, G.J. Cao, *AOAC Int.*, 83 (2000) 950.
183. C.A. Rice-Evans, N.J. Miller, G. Paganga, *Trends Plant Sci.*, 2 (1997) 152.
184. C.A. Rice-Evans, N.J. Miller, "*Flavonoids in Health and Disease*"; Rice-Evans, C.A.; Packer, L., Eds.; Marcel Dekker: New York, 1998, pp 192-198.
185. K.E. Heim, A.R. Tagliaferro, D.J. Bobilya, *J. Nutr. Biochem.*, 13 (2002) 572.
186. S.A.B.E. van Acker, M.J. de Groot, D.J. van den Berg, M.N.J.L. Tromp, G.D. den Kelder, W.J.F. van der Vijgh, A. Bast, *Chem. Res. Toxicol.*, 9 (1996) 1305.
187. C.A. Rice-Evans, *Curr. Med. Chem.*, 8 (2001) 797.
188. S.A.B.E. van Acker, A. Bast, W.J.F. van der Vijgh, "*Flavonoids in Health and Disease*"; Rice-Evans, C.A.; Packer, L., Eds.; Marcel Dekker: New York, 1998, pp. 221-251.
189. M.M. Silva, M.R. Santos, G. Caroco, R. Rocha, G. Justino, L. Mira, *Free Radic. Res.*, 36 (2002) 1219.
190. G. Sichel, C. Corsaro, M. Scalia, A.J. Di Bilio, R.P. Bonomo, *Free Radic. Biol. Med.*, 11 (1991) 1.
191. Z.Y. Chen, P.T. Chan, K.Y. Ho, K.P Fung, *J. Chem. Phys. Lipids*, 79 (1996) 157.
192. C.A. Rice-Evans, N.J. Miller, G. Paganga, *Free Radic. Biol. Med.*, 20 (1996) 933.

193. 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, *Free Radic. Biol. Med.*, 20 (1996) 331.
194. G. Cao, E. Sofic, R.L. Prior, *Free Radic. Biol. Med.*, 22 (1997) 749.
195. M. Okawa, J. Kinjo, T. Nohara, M. Ono, *Biol. Pharm. Bull.*, 24 (2001) 1202.
196. T. Yokozawa, C.P. Chen, E. Dong, T. Tanaka, G.I. Nonaka, I. Nishioka, *Biochem. Pharmacol.*, 56 (1998) 213.
197. D.B. McPhail, R.C. Hartley, P.T. Gardner, G.G. Duthie, *J. Agric. Food Chem.*, 51 (2003) 1684.
198. O.L. Woodman, W.F. Meeker, M.J. Boujaoude, *Cardiovasc. Pharmacol.*, 46 (2005) 302.
199. G.R.M.M. Haenen, M.J.T.J Arts, A. Bast, M.D. Coleman, *Environ. Toxicol. Phar.*, 21 (2006) 191.
200. W. Bors, C. Michel, N.Y. Ann. Acad. Sci., 957 (2002) 57.
201. C.G.M. Heijnen, G.R.M.M. Haenen, F.A.A. van Acker, W.J.F. van der Vijgh, A. Bast, *Toxicol. In Vitro*, 15 (2001) 3.
202. M.A. Soobrattee, V.S. Neergheen, A. Luximon-Ramma, O.I. Arouma, T. Bahorun, *Mutat. Res.*, 579 (2005) 200.
203. A. Arora, M.G. Nair, G.M. Strasburg, *Free Radic. Biol. Med.*, 24 (1998) 1355.
204. M. Foti, M. Piattelli, M.T. Baratta, G. Ruberto, *J. Agric. Food. Chem.*, 44 (1996) 497.
205. K. Lemanska, H. Szymusiak, B. Tyrakowska, R. Zielinski, A.E.M.F. Soffers, I.M.C.M. Rietjens, *Free Radic. Biol. Med.*, 31 (2001) 869.
206. Y.Z. Cai, M. Sun, J. Xing, Q. Luo, H. Corke, *Life Sci.*, 78 (2006) 2872.
207. J.W. Chen, Z.Q. Zhu, T.X. Hu, D.Y. Zhu, *Acta Pharmacol. Sin.*, 23 (2002) 667.
208. V. Butkovic, L. Klasinc, W. Bors, *J. Agric. Food Chem.*, 52 (2004) 2816.
209. M. Furusawa, T. Tanaka, T. Ito, A. Nishikawa, N. Yamazaki, K.I. Nakaya, N. Matsuura, H. Tsuchiya, M. Nagayama, M. Iinuma, *J. Health Sci.*, 51 (2005) 376.
210. R.J. Nijveldt, E. van Nood, D.E.C. van Hoorn, P.G. Boelens, K. van Norren, P.A.M. van Leeuwen, *Am. J. Clin. Nutr.*, 74 (2001) 418.
211. Z.Z. Sroka, *Naturforsch.*, 60 (2005) 833.
212. P. Trouillas, P. Marsal, D. Siri, R. Lazzaroni, J.L. Duroux, *Food Chem.*, 97 (2006) 679.
213. W. Bors, W. Heller, C. Michel, M. Saran, "*Methods in Enzymology*"; Packer, L.; Glazer, A.N. Eds.; Academic Press: San Diego, CA, 1990; Vol. 186, pp. 343-355.
214. C.A. Rice-Evans, Why do we Expect Flavonoids to Function as Antioxidants in vivo? 2002
215. P.G. Pietta, *J. Nat. Prod.*, 63 (2000) 1035.
216. A. Seyoum, K. Asres, K. El-Fiky, *Phytochemistry*, 67 (2006) 2058.
217. V. Butkovic, L. Klasnic, W. Bors, *J. Agric. Food Chem.*, 52 (2004) 2816.
218. E.J. Lien, S.J. Ren, H.Y. Bui, R.B. Wang, *Free. Rad. Biol. Med.*, 26 (1999) 285.
219. D. Amić, D. Davidovic-Amić, D. Bešlo, N. Trinajstić, *Croat. Chem. Act.*, 76 (2003) 55.
220. O. Farkas, J. Jakus, K. Héberger, *Molecules*, 9 (2004) 1079.
221. R.J. Williams, J.P.E. Spencer, C. Rice-Evans, *C. Free Radi. Biol. Medic.*, 36 (2004) 838.

222. L. Chebil, C. Humeau, A. Falcimaigne, J. Engasser, M. Ghoul, *Process Biochem.*, 41 (2006) 2237.
223. E.J.R. Middleton, C. Kandaswami, T.C. Theoharides, *Pharmacol. Rev.*, 52 (2000) 673.
224. K.R. Narayana, S.R. Reddy, M.R. Chaluvadi, D.R. Krishna, *Indian J Pharmacol.*, 33 (2001) 2.
225. L. Farkas, M. Gabor, F. Kallay, “*Topics in Flavonoid Chemistry and Biochemistry*”, Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam, 1973, pp. 24.
226. J.D. Bullock, “*The Biosynthesis of Natural Products*”, McGraw-Hill Publishing Company Limited, New York, 1965, pp. 90.
227. M.J. Mphahlele, M.R.C. Mabusela, *S. Afr. J. Chem.*, 52 (1999) 157.
228. P.T. Kaye, M.J. Mphahlele, *S. Afr. J. Chem.*, 47 (1994) 21.
229. P.T. Kaye, M.J. Mphahlele, *Synth. Commun.*, 25 (1995) 1495.
230. Y. Noda, M. Watanabe, *Helv. Chem. Acta*, 85 (2002) 3473.
231. B.M. Choudary, K.V.S. Ranganath, J. Yavad, M.L. Kantam, *Tetrahedron Lett.*, 46 (2005) 1369.
232. H. Mohamed, M. Anne-Marie, B. Ahcene, *Chem. Pharm. Bull.*, 49 (2001) 1352.
233. R.S. Varma, D. Kumar, *Tetrahedron Lett.*, 39 (1998) 9114.
234. M.J. Mphahlele, F.K. Mogamisi, M. Tsanwani, S.M. Hlatshwayo, R.M. Mampa, *J. Chem. Res.*, (1999) 706.
235. M.J. Mphahlele, S.M. Hlatshwayo, S.M. Ndlovu, M.A. Fernandes, *S. Afr. J. Chem.*, 54 (2001) 60.
236. Y. Xia, Z.Y. Yang, P. Xia, T. Hackl, E. Hamel, A. Mauger, J.H. Wu, K.H. Lee, *J. Med. Chem.*, 44 (2001) 3932.
237. M. Majewski, N.M. Irvine, G.W. Bantle, *J. Org. Chem.*, 59 (1994) 6697.
238. G.M. Coppola, *J. Heterocyclic Chem.*, (1982) 727.
239. J.K. Oyama, I.T. Oyokumi, K.T. Agahara, *Chem. Pharm. Bull.*, 47 (1999) 1038.
240. J.P. Michael, *J. Nat. Prod. Rep.*, 14 (1997) 605.
241. F.M. Oliveira, A.E.G. Santana, L.M. Conserva, J.G.S. Maia, G.M.P. Guilhon, *Phytochem.*, 41 (1996) 647.
242. F. Sondheimer, A. Meisels, *J. Org. Chem.*, 23 (1958) 762.
243. S. Goodwin, A.F. Smith, A.A. Velasquez, E.C. Horning, *J. Am. Chem. Soc.*, 81 (1959) 6209.
244. R.H.F. Manske, R.G.A. Rodrigo, “*The Alkaloids, Chemistry and Physiology*”, Academic Press, London, 1979, pp. 188-189.
245. A. Brossi, “*The Alkaloids, Chemistry and Physiology*”, Academic Press, Ins., London, 1988, pp. 342.
246. V.I. Dene, G. Ciurdaru, *Chem. Commun.*, (1969) 621.
247. R.H. Prager, H.M. Thredgold, *Aust. J. Chem.*, 22 (1969) 2627.
248. B. Chantal, H. Mohamed, M. Anne-Marie, B. Ahcene, *Tetrahedron Lett.*, 41 (2000) 7037.
249. L.J. Huang, M.C. Hsieh, C.M. Teng, K.H. Lee, S.C. Kuo, *Bioorg. Med. Chem.*, 6 (1998) 1657.

250. M.J. Mphahlele, A.M. El-Nahas, J. Mol. Struct., 688 (2004) 129.
251. V. T. Andrile, "The Quinolones", 3rd edition, Academic Press, London, 2000
252. J. Turinidge, Drugs, Suppl. 2 (1999) 29.
253. U. Petersen, "Quinolone Antibiotics: The Development of Moxifloxacin", in J. Fischer and C. Robin Ganellin (Eds), "Analogue – based Drug Discovery", Wiley – VCH Verlag, Weinheim, 2006.
254. A. Kleemann, J. Engel, B. Kutscher, D. Reichert, "Pharmaceutical Substances, Synthesis, Patents, Applications", 4th Edition, Thieme Medical Publ., Stuttgart, 2001. pp. 1372-1374.,
255. Matrix Laboratories Ltd. India, PCT WO 2005/012285 A1; Cipla Ltd. India, WO 2008/059223.
256. Bayer AG, European patent office, EP 0350733 B1, EP 550903, EP 657448.
257. Bayer AG, Business Group Pharma, Data on file. Moxifloxacin HCl. Nov. 2000.
258. J. P. Boehlert, "Regulatory Aspects: ICH and Pharmacopoeial Perspectives", in S. Görög, "Identification and Determination of Impurities in Drugs, Series: Progress in Pharmaceutical and Biomedical Analysis", vol. 4, Elsevier, 2000.
259. S. Görög, "The Role of Impurity Profiling in Drug Research, Development and Production", in S. Görög, "Identification and Determination of Impurities in Drugs, Series: Progress in Pharmaceutical and Biomedical Analysis", vol. 4, Elsevier, 2000.
260. R. J. Smith and M. L. Webb, "Analysis of Drug Impurities", Blackwell Publishing, Oxford, 2007.
261. M.S. Reddy, S. Eswaraiah, V.V. Raju, R.R. Kumar, N. Srinivasreddy, V. Ravindra, Indian Patent Application No. 308/MAS/2003, Apr. 9, 2003.
262. Moxifloxacin Hydrochloride Summary Validation Report
263. A. Laban-Djurdjevic, M.J. Stankov, P. Djurdjevic, J. Chromatogr. B, 844 (2006) 104.
264. H. Stass, A. Dalhoff, J. Chromatogr. B, 702 (1997) 163.
265. S. Tatar Ulu, J. Pharm. Biomed. Anal., 43 (2007) 320.
266. Y. Ravindra-Kumar, V.V.N.K.V. Prasad Raju, R. Rajes Kumar, S. Eswaraiah, K. Mukkanti, M.V. Suryanarayana, M. Satyanarayana Reddy, J. Pharm. Biomed. Anal. 34 (2004) 1125.
267. S.K. Motwani, R.K. Khar, F.J. Ahmad, S. Chopra, K. Kohli, S. Talegaonkar, Anal. Chim. Acta, 582 (2007) 75.
268. M. Yacoub Salem, N.M. El-Guindi, H.K. Mikael, L. El-Sayed abd-el-Fattah, Chem. Pharm. Bull., 54 (2006) 1625.
269. L. Wei, H.C. Qin, H.T. Jun, West China J. Pharm. Sci., 2 (2006) 270.
270. M. Rhodes, "Introduction to Particle Technology", 2nd Ed., John Wiley and Son, Chichester, U.K., 2008.
271. B. Bhatt, S.S. Agramal, "Size Reduction and Size Separation, Pharmaceutical Engineering", NISCAIR National Science Digital Library, 2008.
272. M.C. Hennion, J. Chromatogr. A, 856 (1999) 3.
273. A. Zwir-Ferenc, M. Biziuk, Polish J. Environ. Stud., 15 (2006) 677.

274. Recommendations on Nomenclature for Chromatography, Pure Appl Chem. 65 (1993) 819.
275. D.H. Shewiy, E. Kale, P.G. Risha, B. Dejaegher, J.S.Verbeke, Y.V. Heyden, J. Pharmaceut. Biomed. Anal., 6 (2012) 1.
276. A.J. P. Martin and R. L. M. Synge, Biochem. J., 35 (1941) 1358.
277. J. J. van Deemter, F. J. Zuideweg and A. Klinkenberg, Chem. Eng. Sci., 5 (1956) 271.
278. L.R. Snyder, J.J. Kirkland, "Introduction to Modern Liquid Chromatography", 2nd edition, Wiley-Interscience, New York 1979.
279. A. Braithwaite, F.J. Smith, "Chromatographic Methods" Kluwer Academic Publication, Dordrecht, 1999.
280. S. Ahuja, H. Rasmussen, "HPLC Method Development for Pharmaceuticals", Elsevier, Academic Press, London, 2007.
281. R.A. Hites, K.A. Biemann, Mass Spectrometers. Anal. Chem., 39 (1967) 965.
282. P. Kebarle, L. Tang, Anal. Chem., 65 (1993) 972.
283. R. King, R. Bonfiglio, C. Fernandez-Metzler, C. Miller-Stein, T. Olah, J. Am. Soc. Mass Spectrom., 11 (2000) 942.
284. R. Bonfiglio, R. King, T. Olah, K. Merkle, Rapid Commun. Mass Spectrom., 13 (1999) 1175.
285. R.E. Majors, LCGC, 24 (2006) 118.
286. N. Lindegardh, A. Annerberg, N. White, N. Day, J. Chromatogr. B, 862 (2008) 227.
287. T.M. Annesley, Clin. Chem., 49 (2003) 1041.
288. B.K. Matuszewski, M.L. Constanzer, C.M. Chavez-Eng, Anal. Chem., 75 (2003) 3019.
289. B.K. Matuszewski, M.L. Constanzer, C.M. Chavez-Eng, Anal. Chem., 70 (1998) 882.
290. D. Buhrman, P. Price, P. Rudewicz, J. Am. Soc. Mass. Spectrom., 7 (1996) 1099.
291. I. Fu, E.J. Woolf, B.K. Matuszewski, J. Pharm. Biomed. Anal., 18 (1998) 347.
292. R. King, R. Bonfiglio, C. Fernandez-Metzler, C. Miller-Stein, T. Olah, J. Am. Soc. Mass. Spectrom., 11 (2000) 942.
293. F.M. Lagerwerf, W.D. van Dongen, R.J.J.M. Steenvoorden, M. Honing, J.H.G. Jonkman, TrAC, Trends Anal. Chem., 19 (2000) 418.
294. P.J. Taylor, A.G. Johnson, J Chromatogr. B, 718 (1998) 251.
295. D.C. Montgomery, "Design and Analysis of Experiments", 5th Edition, John Wiley & Sons, N.Y., 2001.
296. R.L. Plackett, J.P. Burman, Biometrika, 33 (1946) 305.
297. J. Antony, "Design of Experiment for Engineers and Scientists", Elsevier science and technology books, London, 2003.
298. S.L.C. Ferreira, R.E. Bruns, E.G.P. Silva, W.N.L. Santos, C.M. Quintella, J.M. David, J.B. Andrade, M.C. Breitreitz, I.C.S.F. Jardim, B.B. Neto, J. Chromatogr. A, 1158 (2007) 2.
299. R.A. Fisher, W.A. Mackenzie, J. Agr. Sci., 13 (3) (1923) 311.
300. DryLab User Manual, LC Resources Ltd., Walnut Creek, 2000.
301. DryLab Chromatographic Reference Guide, LC Resources Ltd., Walnut Creek, 2000.

302. Robust HPLC Methods, Course on CD, Molnar Institut fur angewandte chromatographie, Berlin, 2002.
303. A. Bogomolov, M. McBrien, *Anal. Chim. Acta*, 490 (2003) 41.
304. J. Vacek, B. Klejdus, L. Lojkov, V. Kub, *J. Sep. Sci.* 31 (2008) 2054.
305. A. Escarpa, M.C. Gonzalez, *J. Chromatogr.*, 51 (2000) 37.
306. L. Mira, M.T. Fernandez, M. Santos, R. Rocha, M.H. Florencio, K.R. Jennings, *Free Radical. Res.*, 36 (2002) 1199.
307. V.L. Singleton, J.A. Rossi, *Amer. J. Enol. Viticult.*, 16 (1965) 144.
308. F. Xu, Y. Liu, Z. Zhang, C. Yang, Y. Tian, *Chinese Med.*, 4 (2009) 15.
309. N. Fabre, I. Rustan, E. de Hoffmann, J. Quetin-Leclercq, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 12 (2001) 707.
310. G. Chunsriimyatav, I. Hoza, P. Valašek, S. Skrovanková, D. Banzragch, N. Eisevsuren, *Czech J. Food Sci.*, 27 (2009) 259.
311. Y. Jin, H. Liu, K. Yuan, *J. Medic. Plant Res.*, 5 (2003) 5630.
312. Y. Zu, C. Li, Y. Fu, C. Zhao, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 41 (2006) 714.
313. A. Michalkiewicz, M. Biesaga, and K. Pyrzynska, *J. Chromatogr. A*, 1187 (2008) 18.
314. A. Ciric, H. Prosen, M. Jelkic-Stankov, P. Djurdjevic, *Talanta*, 99 (2012) 780.
315. M.G.L. Hertog, P.C.H. Hollman, M.B. Katan, *J. Agric. Food Chem.* 40 (2002) 2379.
316. T. Bahrour, A. Luximon-Ramma, A. Crozier, O.J. Arouma, *J. Sci. Food Agr.* 84 (2004) 1553.
317. A. Lugasi, J. Hovari, *Acta Aliment. Hung.*, 29 (2000) 345.
318. R. Puupponen-Pimia, S.T. Häkkinen, M. Aarni, T. Suortti, A.M. Lampi, M. Euro, V. Hiironen, A.M. Nuutila, K.M. Oksman-Caldentey, *J. Sci. Food Agr.*, 83 (2003) 1389.
319. U. Justesen, P. Knuthsen, and T. Leth, *J. Chromatogr. A*, 799 (1998) 101.
320. E. Sikora, E. Cieslik, A.F. Florkiewicz, and T. Leszczyńska, *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.*, 11 (2012) 45.
321. V. Roginsky, E.A. Lissi, *Food Chem.*, 92 (2005) 235.
322. W. Brand-Williams, M.E. Cuvelier and C. Berset, *Lebensm. Wiss Technol.*, 28 (1995) 25.
323. C.J. Hong, H. Chi-Tang, *J. Agric. Food Chem.*, 45 (1997) 2357.
324. Y. Vander Heyden, C. Hartmann, D.L. Massart, L. Michel, P. Kiechle, F. Erni, *Anal. Chim. Acta*, 316 (1995) 15.
325. U. Neugebauer, A. Szeghalmi, M. Schmitt, W. Kiefer, J. Popp, U. Holzgrabe, *Spectrochim. Acta Part A*, 61 (2005) 1505.
326. R.H. Park, Y.K. Chung, C.K. Lee, K.J. Lee, M.K. Bark, *Bull. Kor. Chem. Soc.*, 21 (2000) 849.
327. R.L. Rouseff, S.F. Martin, C. Youtsey, *J. Agric. Food Chem.*, 35 (1987) 1027.
328. P. Mattila, J. Astola, J. Kumpulainen, *J. Agric. Food Chem.*, 48 (2000) 5834.
329. Adrian A. Franke, Laurie J. Custer, Christi Arakaki, Suzanne P. Murphy, *J. Food Compos. Anal.*, 17 (2004) 1.
330. P.R. Arabbi, M.I. Genovese, F.M. Lajolo, *J. Agric. Food Chem.*, 52 (2004) 1124.

331. A. Crozier, M.E.J. Lean, M.S. McDonald, C. Black, *J. Agric. Food Chem.*, 45 (1997) 590.
332. B.S. Patil, L.M. Pike, K.S. Yoo, *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 120 (1995) 909.
333. M. Marotti, R. Piccaglia, *J. Food Science*, 67 (2002) 1229.
334. K.R. Price, J.R. Bacon, M.J.C. Rhodes, *J. Agric. Food Chem.*, 45 (1997) 938.
335. M.I. Gil, F. Ferreres, A. Ortiz, E. Subra, F.A. Tomas-Barberhn, *J. Agric. Food Chem.*, 43 (1995) 2833.
336. J.S. Bonvehi, M.S. Torrento, E.C. Lorente, *J. Agric. Food Chem.*, 49 (2001) 1848.
337. F. Vallejo, F.A. Tomás-Barberán, F. Ferreres, *J. Chromatogr. A*, 1054 (2004) 181.
338. K.R. Price, F. Casuscelli, I.J. Colquhoun, M.J.C. Rhodes, *J. Sci. Food Agr.* 77, 468 (1998).
339. A. Podsedek, *Food Sci. Technol.*, 40 (2007) 1.
340. K. Zhou, L. Yu, *Lebensm. Wiss. Technol.*, 37 (2004) 717.
341. S.K. Lee, A.A. Kader, *Postharvest Biol. Tec.*, 20, (2000) 207.
342. A. Dalhoff, H. Stass, *Drugs*, 58 (1999) 239.
343. T. Radhakrishna, D.S. Rao, K. Vyas, G.O. Reddy, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 22 (2000) 691.
344. T. Lemoine, D. Breilh, D. Ducint, J. Dubrez, J. Jougon, J.F. Velly, M.C. Saux, *J. Chromatogr. B*, 742 (2000) 247.
345. K. Vishwanathan, M.G. Bartlett, J.T. Stewart, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 30 (2002) 961.
346. J.A. Ocana Gonzales, F.J. Barragan, C. Manuel, *Analyst*, 125 (2000) 2322.
347. J.G. Möller, H. Stass, R. Heinig, G. Blaschke, *J. Chromatogr. B*, 716 (1998) 325.
348. R. Inam R, H. Mercan, E. Ylmaz, B. Uslu, *Anal. Lett.*, 40 (2007) 529.
349. N. Erk, *Anal. Bioanal. Chem.*, 378 (2004) 1351.
350. S.K. Motwani, S. Chopra, F.J. Ahmed, R.K. Khar, *Spectrochim. Acta A*, 68 (2007) 250.
351. K.N. Tarkase, S.S. Admane, N.G. Sonkhede, S.R. Shejwal, *Der Pharma Chem.*, 4 (2012) 1180.
352. D.M. Dhumal, A.A. Shirkhedkar, S.J. Surana, *Der Pharmacia Lettr.*, 3 (2011) 453.
353. A. Speciale, R. Musumeci, G. Blandino G, I. Milazzo, F. Caccamo, G. Nicoletti, *Int. J. Antimicrob. Ag.*, 19 (2002) 111.

7. Биографија

Андреја Тирић је рођен у Краљеву, 20. јула 1981. године. Основну школу и Гимназију завршио је у Краљеву. На Природно-математичком факултету, група хемија, смер истраживање и развој, Универзитета у Крагујевцу, дипломирао је 2006. године.

По завршетку основних студија уписао је докторске студије на Природно-математичком факултету у Крагујевцу на групи Хемија, смер Аналитичка хемија, 2006/2007. године и положио све испите предвиђене наставним планом и програмом.

Након завршетка основних студија био је ангажован као истраживач-приправник, у Институту за хемију, Природно-математичког факултета у Крагујевцу. Боравио је на стручном усавршавању од 01.10.2009 – 31.08.2010. године на Факултету за хемију и хемијску технологију Универзитета у Љубљани, Словенија код проф. др Хелене Просен. За асистента на Природно-математичком факултету у Крагујевцу, у Институту за хемију изабран је јуна 2013. године.

Био је ангажован на вежбама из предмета: Квалитативна хемијска анализа, Квантитативна хемијска анализа, Аналитичка хемија 1, Аналитичка хемија 2, Аналитичка хемија 3, Аналитичка хемија за екологе, Инструментална аналитичка хемија 1, Инструментална аналитичка хемија 2 и Равнотеже у аналитичкој хемији.

Ангажован је на домаћем пројекту „Синтеза, моделовање, физичко-хемијске и биолошке особине органских једињења и одговарајућих комплекса“ број 172016 код Министарства просвете, науке и технолошког развоја под руководством проф. др Срећка Трифуновића. Такође, био је ангажован и на два међународна пројекта „ТЕМПУС – Modernisation of Post-Graduate Studies in Chemistry and Chemistry Related Programmes“ финансиран од стране Европске уније и „Билатерална сарадња са Словенијом“ финансиран од стране Министарства на просвету, науку и технолошки развој Републике Србије и Министарства за науку Републике Словеније.

Курсеви, усавршавања и семинари:

1. Летња школа течне хроматографије, 15 – 19. септембр 2008, Београд, Србија.
2. Друга летња школа масене спектрометрије, 6 – 10. јул 2009, Ниш, Србија.

3. 6th Slovenian-Croatian Waters Users Meeting, 11 – 13. новембар 2009, Мокрице, Словенија.
4. Triki in nasveti – povečajte učinkovitost LC analiz, 30. март 2010, Љубљана, Словенија.
5. Школа течне хроматографије-масене спектрометрије, 7 – 8. октобар 2010, Београд, Србија.
6. Седма школа масене спектрометрије, 30. мај – 1. јун 2011, Ниш, Србија.
7. Ремедијација, 26 – 27. септембар 2012, Крагујевац, Србија.

8. Научни радови

Научни радови:

1. Andrija Ćirić, Ratomir Jelić, Ljubinka Joksović, Milena Jelikić-Stankov, Predrag Djurdjević, "Determination of moxifloxacin in human plasma by derivative UV spectrophotometry in a micellar medium", *Can. J. Anal. Sci. Spec.*, 52 (6) (2007) 344–352.
ISSN: 1205-6685, IF = 0,422, M23.
2. Predrag Djurdjevic, Andrija Ćiric, Aleksandra Djurdjevic, Milena Jelikić-Stankov, "Optimization of separation and determination of synthesis-related impurities of moxifloxacin by RP-HPLC", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 50 (2) (2009) 117–126.
ISSN: 0731-7085, IF = 2,524, doi:10.1019/j.jpba.2009.03.029, M22.
3. Lepasava Pavun, Daniela Đikanović, Predrag Đurđević, Milena Jelikić Stankov, Dušan Malešev and Andrija Ćirić, "Spectrofluorimetric and HPLC Determination of Morin in Human Serum", *Acta Chim. Slov.*, 56 (2009) 967-972.
ISSN: 1318-0207, IF = 1,066, M23.
4. Andrija Ćirić, Helena Prosen, Milena Jelikić-Stankov, Predrag Đurđević, "Evaluation of matrix effect in determination of some bioflavonoids in food samples by LC-MS/MS method", *Talanta*, 99 (2012) 780–790.
ISSN: 0039-9140, IF = 3,733, <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2012.07.025>, M21.
5. Pavun Lepasava A., Dimitrić-Marković Jasmina M., Đurđević Predrag T., Jelikić-Stankov Milena D., Đikanović Daniela B., Ćirić Andrija R., Malešev Dušan L., "Development and validation of spectrofluorimetric and LC-MS/MS method for the determination of hesperidin in human plasma and pharmaceutical forms" *J. Serb. Chem. Soc.*, 77 (11), (2012) 1625–1640.
ISSN 0352-5139, IF = 0,879, doi: 10.2298/JSC111005060P, M23.
6. Jelena Zirojevic, Zarko Jovic, Aleksandra Djurdjevic, Andrija Ćiric, Predrag Djurdjevic, "Chemometric assisted determination of some bisphosphonates and their related substances in pharmaceutical forms by ion chromatography with inverse UV detection", *Acta Chromatographia*, *in press*.
ISSN: 1233-2356, IF = 0,485, DOI: 10.1556/AChrom.27.2015.2.2, M22.

7. Andrija R. Ciric, Nevena Ivanovic, Milica S. Cvijovic, Milena Jelikic-Stankov, Ljubinka Joksovic, Predrag T. Djurdjevic, "Chemometric assisted optimization of RP-HPLC method for determination of some bioflavonoids in *Brassica oleracea* species and their antioxidative activity", *Food Anal. Method*, 7 (2014) 1387-1399.
ISSN: 1936-9751, IF = 1,893, DOI: 10.1007/s12161-013-9761-y, M22.
8. Lepasava Pavun, Predrag Djurdjevic, Milena Jelikic-Stankov, Daniela Djikanovic, Andrija Ciric and Snezana Uskokovic-Markovic, „Spectrofluorimetric determination of quercetin in pharmaceutical dosage forms“ *Maced. J. Chem. Chem. En. in press.*
ISSN: 1857-5552, IF = 0,318, M23.

Поглавље у монографији:

1. Andrija Ciric, Ivan Jakovljevic, Milica Cvijovic, Milena Jelikic-Stankov, Predrag Djurdjevic, "Metal Complexes of Kaempferol and Their Speciation in Human Plasma", 187 – 202. у књизи „Kaempferol Chemistry, Natural Occurrences and Health Benefits“, Editors G. Villers and Y. Fougere, Nova Science Publishers, Inc, New York, 2013.
ISBN: 978-1-62618-516-6, M14.

Научна саопштења:

1. Andrija Ciric, Aleksandra Djurdjevic, Milena Jelikic-Stankov, Predrag Djurdjevic, "Optimization of hplc determination of degradation products of moxifloxacin in its pharmaceutical formulations", 19th International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 8 – 12. јун 2008., Гдањск, Пољска.
2. Andrija Ćirić, Ivan Lazarević, Ratimir Jelić, Milena Jelikić-Stankov, Predrag Đurđević, „Speciation on aluminium(III)-fluoroquinolone family members solutions“, XV Congress of Analytical Chemistry, P015-B2, 6 – 10. септембар 2009., Инсбрук, Аустрија.
3. Andrija Ciric, Predrag Djurdjevic, Helena Prosen, "Matrix effect on determination some flavonoids in real samples by LC-MS/MS method", 17th Young Investigators Seminar on Analytical Chemistry, 29. јун – 2. јул 2010., Венеција, Италија.
4. И. Ж. Јаковљевић, И. Лазаревић, Ј. Јоксовић, А. Ћирић, Р. Јелић, П. Ђурђевић, "Равнотеже комплексирања Gd(III)-јона са неким флуорохинолонима", 49. Саветовање Српског хемијског друштва, АН04-О, 29-32, 13-14. мај 2011., Крагујевац, Србија.

5. И. Т. Лазаревић, И. Јаковљевић, А. Тирић, М. Јеликић-Станков, Р. Јелић П. Ђурђевић, “Рачунарско моделирање хумане плазме“, 49. Саветовање Српског хемијског друштва, АН10-Р, 46-49, 13-14. мај 2011., Крагујевац, Србија,
6. Andrija Ćirić, Helena Prosen, Milena Jelikić-Stankov, Predrag Đurđević, “Determination of bioflavanons u food samples using liquid-chromatography methods”, XI Euroanalysis, 11 – 15. септембар 2011., Београд, Србија.
7. Nevena Ivanovic, Milica Cvijovic, Andrija Ciric, Predrag Djurdjevic, “Computer assisted optimization of ultrasound extraction of total phenolics from citrus peel”, 7th Central European Congress on Food – CEFood, 21 – 24. мај 2014., Охрид, Македонија,

Научни радови проистекли из докторске дисертације

1. Andrija Ćirić, Ratomir Jelić, Ljubinka Joksović, Milena Jelikić-Stankov, Predrag Djurdjević, ”Determination of moxifloxacin in human plasma by derivative UV spectrophotometry in a micellar medium”, Can. J. Anal. Sci. Spec., 52 (6) (2007) 344–352.
ISSN: 1205-6685, IF = 0,422, M23.
2. Predrag Djurdjevic, Andrija Ciric, Aleksandra Djurdjevic, Milena Jelikić-Stankov, ”Optimization of separation and determination of synthesis-related impurities of moxifloxacin by RP-HPLC”, J. Pharm. Biomed. Anal., 50 (2) (2009) 117–126.
ISSN: 0731-7085, IF = 2,524, doi:10.1019/j.jpba.2009.03.029, M22.
3. Andrija Ćirić, Helena Prosen, Milena Jelikić-Stankov, Predrag Đurđević, “Evaluation of matrix effect in determination of some bioflavonoids in food samples by LC–MS/MS method”, Talanta, 99 (2012) 780–790.
ISSN: 0039-9140, IF = 3,733, <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2012.07.025>, M21.
4. Andrija R. Ciric, Nevena Ivanovic, Milica S. Cvijovic, Milena Jelikić-Stankov, Ljubinka Joksovic, Predrag T. Djurdjevic, “Chemometric assisted optimization of RP-HPLC method for determination of some bioflavonoids in *Brassica oleracea* species and their antioxidative activity”, Food Anal. Method, 7 (2014) 1387-1399.
ISSN: 1936-9751, IF = , DOI: 10.1007/s12161-013-9761-y, M22.

Научна саопштења проистекла из докторске дисертације:

1. Andrija Ciric, Aleksandra Djurdjevic, Milena Jelikić-Stankov, Predrag Djurdjevic, ”Optimization of hplc determination of degradation products of moxifloxacin in its

- pharmaceutical formulations”, 19th International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 8 – 12. јун 2008., Гдањск, Пољска.
2. Andrija Ćirić, Ivan Lazarević, Ratomir Jelić, Milena Jelikić-Stankov, Predrag Đurđević, „Speciation on aluminium(III)-fluoroquinolone family members solutions”, XV Congress of Analytical Chemistry, P015-B2, 6 – 10. септембар 2009., Инсбрук, Аустрија.
 3. Andrija Ćirić, Predrag Djurdjević, Helena Prosen, “Matrix effect on determination some flavonoids in real samples by LC-MS/MS method”, 17th Young Investigators Seminar on Analytical Chemistry, 29. јун – 2. јул 2010., Венеција, Италија.
 4. Andrija Ćirić, Helena Prosen, Milena Jelikić-Stankov, Predrag Đurđević, “Determination of bioflavonoids in food samples using liquid-chromatography methods”, XI Euroanalysis, 11 – 15. септембар 2011., Београд, Србија.
 5. Nevena Ivanovic, Milica Cvijovic, Andrija Ćirić, Predrag Djurdjević, “Computer assisted optimization of ultrasound extraction of total phenolics from citrus peel”, 7th Central European Congress on Food – CEFood, 21 – 24. мај 2014., Охрид, Македонија,

Determination of moxifloxacin in human plasma by derivative UV spectrophotometry in a micellar medium

Andrija Cirić^a, Ratomir Jelić^a, Ljubinka Joksović^a, Milena Jelikić-Stankov^b, Predrag Djurdjević^{a,*}

^a Faculty of Science, Chemistry Department, P.O. Box 60, 34000 Kragujevac, Serbia

^b Faculty of Pharmacy, Institute of Analytical Chemistry, Vojvode Stepe 450, 11000 Belgrade, Serbia

Received: May 7, 2007

Accepted (in revised form): September 19, 2007

Abstract

The simple yet rapid and accurate spectrophotometric method for the determination of fluoroquinolone family member, moxifloxacin in human plasma was developed. The determination was carried out in a citrate – phosphate buffer (pH = 7.2) in the presence of sodium dodecylsulfate (12.0 mmol L⁻¹). Second order derivative spectra were employed for the quantitation of moxifloxacin by measuring peak – to – peak amplitude in a wavelength range 335 – 345 nm. Linear dynamic range was 0.25 – 10 µg mL⁻¹ with a limit of detection 0.03 µg mL⁻¹. Recovery was between 95 – 102%. Addition of surface active substance improved the sensitivity of the method. The method was successfully applied for the analysis of plasma of healthy volunteers. A HPLC method was also developed as a reference method, to validate and confirm spectrophotometric results.

Keywords: Moxifloxacin; Antibiotic; Plasma; Derivative spectrophotometry; Sodium dodecylsulfate (SDS)

Résumé

Nous avons développé une méthode spectrophotométrique simple mais rapide et exacte pour la détermination d'un membre de la famille fluoroquinolone, la moxifloxacine, dans le plasma humain. La détermination a été effectuée dans un tampon citrate – phosphate (pH = 7.2), en présence de

dodécylsulfate de sodium (12.0 mmol L⁻¹). Les spectres dérivés du second ordre ont servi à la quantification de la moxifloxacine en mesurant l'amplitude de pic à pic dans la gamme de longueur d'onde 335 – 345 nm. La gamme de linéarité dynamique était de 0.25 à 10 µg mL⁻¹, avec une limite de détection de 0.03 µg mL⁻¹. Les recouvrements se situaient entre 95 et 102%. L'addition d'une substance à surface active a amélioré la sensibilité de la méthode. La méthode a été appliquée avec succès à l'analyse du plasma de volontaires en santé. Une méthode HPLC a aussi été développée à titre de référence, afin de valider et de confirmer les résultats spectrophotométriques.

Introduction

Moxifloxacin (1-cyclopropyl-7-(S,S)-2,8-diazabicyclo(4.3.0)-non-8-yl-6-fluoro-8-methoxy-1,4-dihydro-4-oxo-3-quinoline carboxylic acid hydrochloride), Fig. 1, is a new fourth generation 8-methoxy fluoroquinolone developed primarily for the treatment of community acquired pneumonia and upper respiratory tract infections. It is active against Gram negative pathogens, Gram positive cocci, aerobic intracellular bacteria, atypical organisms and anaerobic bacteria [1, 2].

Widespread use of moxifloxacin requires development of number of analytical methods for its determination in various matrices. However, not many methods have been developed for moxifloxacin determination in biological fluids and dosage forms.

Moxifloxacin has been determined in biofluids by HPLC methods [3 – 11], fluorometry [12], capillary electrophoresis [13], differential pulse polarography [14], dif-

*Author to whom correspondence should be addressed: e-mail: preki@kg.ac.yu (Predrag Djurdjevic)

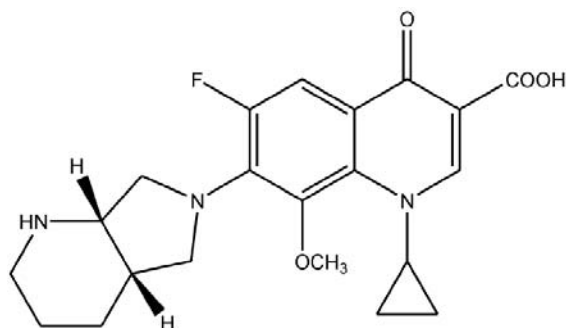


Fig. 1. Chemical structure of moxifloxacin (neutral form).

ferential pulse voltammetry [15] and spectrophotometry [16]. The HPLC based procedures are methods of choice in the analysis of fluoroquinolones in biological matrices. They offer wide dynamic linear range of determination from about 5 ng/mL up to 3 $\mu\text{g/mL}$ with a limit of detection as low as 2 ng/mL. These techniques however, are time consuming and require expertise. Therefore, alternative methods for routine clinical analysis are desirable. Very suitable may be spectrophotometric methods. So far only two papers dealt with spectrophotometric determination of moxifloxacin [14,16] using zero order UV spectra.

No methods have been reported which use derivative spectrophotometric determination of moxifloxacin in human plasma.

In clinical practice frequent determination of moxifloxacin levels in plasma is often required to follow success in therapy or to evaluate the efficacy of moxifloxacin and possible emergence of resistance. Such determinations are time consuming because of the need to examine a large number of samples. Therefore, rapid analytical methods are required for labor saving. So, the aim of the present investigation was to develop a fast, sensitive, accurate and simple procedure for determination of moxifloxacin in biofluids, without prior, tedious, extraction procedures.

In continuation of our previous determination of fluoroquinolones [17] in the present paper, second-order derivative UV spectrophotometry in a micellar medium was used for the direct assay of moxifloxacin in human plasma.

Experimental

Reagents and standard solution

Moxifloxacin hydrochloride standard (declared purity > 99%), yellow powder, $M_r = 437.9$, was obtained from BayerPharma AG (Germany). Tablets "Avelox" (400 mg) were products BayerPharma AG. Standard solutions of

NaOH and HCl (0.1 mol L^{-1}) were prepared by diluting from concentrated ampoule solution Merck (Darmstadt, Germany). Citrate buffers ($\text{pH} = 4 - 8$) were prepared by mixing appropriate volumes of 0.1 mol L^{-1} citric acid and 0.2 mol L^{-1} sodium-monohydrogenphosphate. Borate buffers ($\text{pH} = 8.5 - 9$) were prepared by mixing appropriate volumes of 0.025 mol L^{-1} sodium borate and 0.1 mol L^{-1} HCl. All buffer solutions were prepared according to Perrin and Dempsey [18]. Solution of sodium dodecylsulfate, SDS, (0.1 mol L^{-1}) was prepared from purified sodium dodecylsulphate (Merck) by direct weighing and subsequent dissolution in doubly distilled water. Human plasma samples were separated from human pool whole – blood obtained from the Department of transfusion of clinical hospital "Dr Dragisa Misovic", Belgrade.

Apparatus

Spectrophotometric measurements were performed on a Perkin-Elmer (USA), Model Lambda 35, and GBC (Australia) Cintra Model 40, UV-Vis, double-beam spectrophotometers, interfaced to an IBM PC computer. Derivative spectra were obtained with the software supplied by the manufacturer. Quartz cuvettes of 1 cm pathlength were used. Optimized working settings were: slit width 0.5 nm, scan speed 120 nm min^{-1} , time response 0.1 ms and $\Delta\lambda = 1$ or 2 nm [19]. HPLC measurements were performed on an Agilent (Waldbronn, FRG) Series 1100 chromatograph equipped with binary pump and fluorescence detector. The analysis was carried out on Supelco (USA) direct injection shielded hydrophobic phase column, $150 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm i.d.}$, $5.0 \mu\text{m}$ particle size, with a mobile phase consisted of acetonitrile and $0.25 \text{ mol dm}^{-3} \text{ Na}_3\text{PO}_4$ ($\text{pH} = 6.5$, adjusted with phosphoric acid) mixed in a volume ratio 15:85, respectively. Isocratic elution with flow rate $1.0 \mu\text{L min}^{-1}$ and fluorescence detection with $\lambda_{\text{ex}} = 290 \text{ nm}$ and $\lambda_{\text{em}} = 500 \text{ nm}$ was used. Structural analog of moxifloxacin, ofloxacin, was used as an internal standard. The data were processed with HP ChemStation software.

Optimization procedure

Stock solution of moxifloxacin hydrochloride ($50.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ of moxifloxacin) was prepared by dissolving moxifloxacin standard in doubly distilled water. For the purpose of preliminary optimization of measurement conditions, different volumes, 0.02 – 2.00 mL, of the stock solution were transferred to 5 mL volumetric flasks using Eppendorf pipettes, and diluted with either water, water + SDS, buffer or buffer + SDS to the mark and shaken well. The concentration of SDS in solu-

tions was 12 mmol L⁻¹. In water solutions the pH was adjusted by the addition of either HCl or NaOH and measured potentiometrically (pH from 3.0 to 9.0). The concentration range of moxifloxacin thus covered, was 0.2 – 20.0 µg mL⁻¹. The zero order spectra were recorded in a wavelength interval 200 – 450 nm while second-order derivative spectra were recorded in 320 – 400 nm wavelength range against appropriate reagent blank. For the construction of the calibration graph the standard solutions of moxifloxacin prepared in citrate buffer (pH = 7.2) with the addition of SDS (12 mmol L⁻¹) were used. Peak to peak amplitude was measured in second order derivative spectra in the wavelength range 335 – 345 nm and plotted against concentration.

Calibration graph and procedure for plasma samples

A human pool plasma (1.0 mL) was mixed with different volumes of standard solution of moxifloxacin to give the final drug concentration of 0.25 – 10.0 µg mL⁻¹. According to literature data moxifloxacin in plasma is bound to plasma proteins (43%). To coagulate proteins and prevent moxifloxacin binding to proteins (mainly albumin) sodium-dodecylsulphate was added so that its final concentration was 12 mmol L⁻¹. SDS also creates hydrophobic environment which enhances the solubility of moxifloxacin. The plasma samples were then centrifuged at 6000 rpm for 15 min. Supernatant was separated and after filtration through a Minisart plus syringe filter (0.2 µm pore size, Supelco, USA) was transferred into a volumetric flask. The flask was filled with citrate buffer (pH = 7.2) to the mark. Zero and second order UV derivative spectra of the prepared solutions were taken in the 200 – 450 and 320 – 400 nm wavelength range, respectively, against the plasma blank, prepared as described above but without the addition of the drug. Peak – to – peak amplitude in second order derivative spectra were measured in the wavelength range 335 – 345 nm. The same procedure for sample preparation was used for chromatographic measurements with the difference that the concentration range of moxifloxacin was 0.05 to 1.5 µg/mL and supernatant was filled in a volumetric flask with phosphate buffer (0.25 mol/L Na₃PO₄ + H₃PO₄, pH = 6.5) to the mark.

Analytical recovery

Five different concentration of moxifloxacin were added to human plasma in order to get concentrations 0.25 – 5.0 µg mL⁻¹. These plasma samples were treated in the same way as for the calibration graph [20].

Results and Discussion

Moxifloxacin is a weak heterocyclic amino acid which may exist in solution in cationic, neutral, dipolar and anionic forms. Relative concentrations of these forms strongly depend on pH of the solution. Thus, the strict control of the pH of the solution is necessary for the determination of moxifloxacin by spectrophotometric method.

Examination of the spectra of moxifloxacin in aqueous phase, which was pH adjusted with the addition of strong acid or strong base, were measured potentiometrically, and their comparison with the spectra where the pH was adjusted by buffer shows only negligible influence of buffers on moxifloxacin absorption. Addition of SDS enhances the intensity of absorption peaks for about *ca.* 5% and affects the shape of absorption bands which become more symmetrical (Fig. 2). SDS also shifts isoelectric point of moxifloxacin from 7.44 to 8.21 [17] thus keeping the solubility at the acceptable level.

The UV spectrum of moxifloxacin consists of two major bands with the maximum at 290 nm for the first band and 340 nm for the second band. The high energy band is mainly due to the $\pi \rightarrow \pi^*$ transition in the aromatic ring. The low energy band is due to $n \rightarrow \pi^*$ transition in diazabicyclo substituent at position 7, and consists of two subpeaks. These subpeaks also reflect the participation of non-bonding electron pair on nitrogen at position 1 and are caused by an intermolecular hydrogen bond equilibrium between moxifloxacin and water as well as intramolecular hydrogen bond between 4-keto and 3-carboxylic groups [21,22]. Upon increasing the pH from *ca.* 4 to 9 higher energy band shows only small changes in position and maximum intensity (hypochromic shift). The lower energy band exhibits however, significant changes in a shape, position and intensity (bathochromic shift). At pH values lower than 7, this band is fairly symmetrical with a shoulder at 350 nm, but at pH values higher than 7, two separated absorption maxima at 335 and 355 nm are obtained. Intensity of the band increases upon increasing the pH up to *ca.* 8 and then decreases. Thus, the optimal pH value for analysis was set to 7.2. The absorption of plasma proteins interferes with the band at 290 nm but becomes negligible at 300 nm. (Fig. 3).

Therefore, the peak centered at 340 nm was chosen for analysis. Since this peak is not well separated from the peak at 355nm the second-order derivative spectrum was used. In this way the background absorption of the plasma was also minimized.

Thus the optimal conditions for the determination

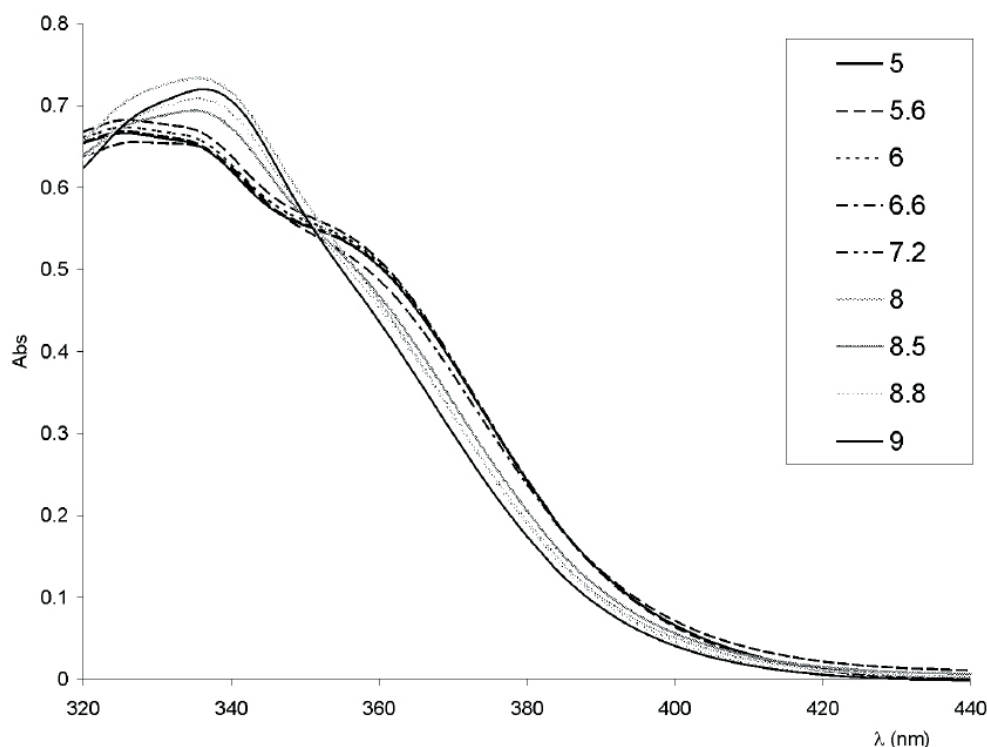


Fig. 2. The effect of sodium dodecylsulfate (SDS) on moxifloxacin spectra. Concentration of SDS is 12 mmol/L and that of moxifloxacin 10 mg/mL. Varying pH of solutions are given in the legend.

of moxifloxacin in plasma and in dosage forms were: wavelength at maximum absorption, 340 nm and pH of solution, 7.2. In Fig. 4, the zero (a) and second-order derivative spectra (b), for the different concentration of moxifloxacin in plasma at pH = 7.2 are shown.

The calibration graph for the derivative spectrophotometry was constructed by plotting the peak-to-peak amplitude, in the second derivative spectrum, versus drug concentration. The amplitude was measured in 335 - 345 nm wavelength interval. The equation obtained through regression analysis of the data for standard solution of plasma was:

$$Y = (2.41 \pm 0.06)10^{-3} X + (3.0 \pm 0.2)10^{-4}$$

(n = 7, r = 0.997, $S_x = 2.7 \times 10^{-5}$)

where Y is the peak-to-peak amplitude in second order derivative spectra, in absorbance units, X is the concentration of moxifloxacin in $\mu\text{g mL}^{-1}$ and S_x is the standard error of estimation. The limit of detection, DL, defined as [20]:

$$DL = 3.3 \times \frac{s_b}{a}$$

where s_b is standard deviation of intercept and a is a slope of the calibration curve was found to be $0.030 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Table 1 shows the results obtained in the analysis of

plasma samples.

The accuracy of measurements, expressed in terms of relative error (R.E.) was about 5% or even less, thus indicating negligible influence of plasma proteins. Clinical investigations have shown that moxifloxacin is rapidly and completely absorbed after oral administration. Peak plasma concentration (approximately $4.5 \mu\text{g mL}^{-1}$) is reached about 1 to 3 hours after administration of single dose of 400 mg. The bioavailability is approximately 90% and together with large AUC area indicate that effect of the first liver pass is negligible. Moxifloxacin has a long plasma half-life (12 h) and is predominantly excreted as either unchanged drug or sulfate and glucuronide metabolites. In this way moxifloxacin metabolizes very slowly in plasma, allowing accurate determination even more than 10 h after administration. Thus, the proposed method for the assay of moxifloxacin in plasma, being simple and rapid, can be applied for the purpose of pharmacokinetic measurements and routine clinical analysis.

The method was applied to the analysis of moxifloxacin in plasma of two healthy volunteers to whom an "Avelox" tablet (400 mg) was administered after overnight fasting. The blood samples (1 mL) were taken by cubital vein puncture at 1 h after administration. The blood was allowed to clot at room temperature and after-

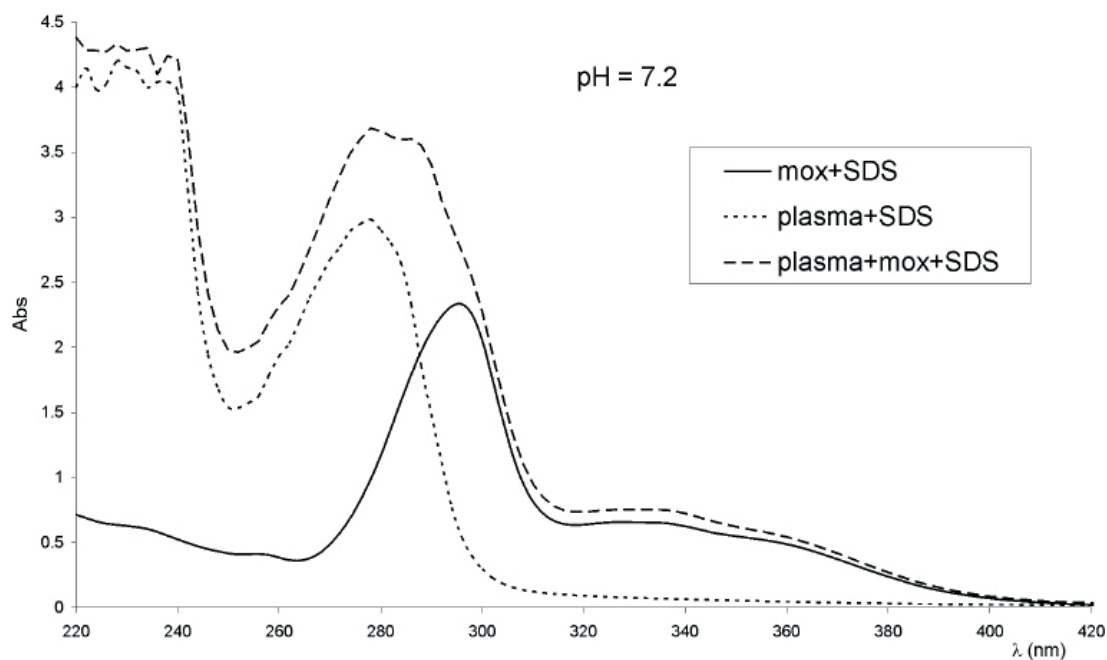


Fig. 3. The UV spectra of blank plasma, plasma with the addition of moxifloxacin and plasma with the addition of moxifloxacin and sodium dodecylsulfate.

Table 1. Results obtained in determination of moxifloxacin in plasma samples^a

Sample	Added ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Found ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	R.E. (%)	Recovery (%) \pm R.S.D.
1	0.250	0.238 \pm 0.01	4.8	95.2 \pm 4.3
2	0.575	0.547 \pm 0.02	4.9	95.1 \pm 3.7
3	2.070	2.001 \pm 0.03	3.3	96.7 \pm 1.5
4	4.025	4.109 \pm 0.07	2.1	102.1 \pm 1.7
5	5.010	4.987 \pm 0.02	0.5	99.5 \pm 0.4

^a Mean, standard deviation, relative error (R.E.) and relative standard deviation (R.S.D.) in five determination

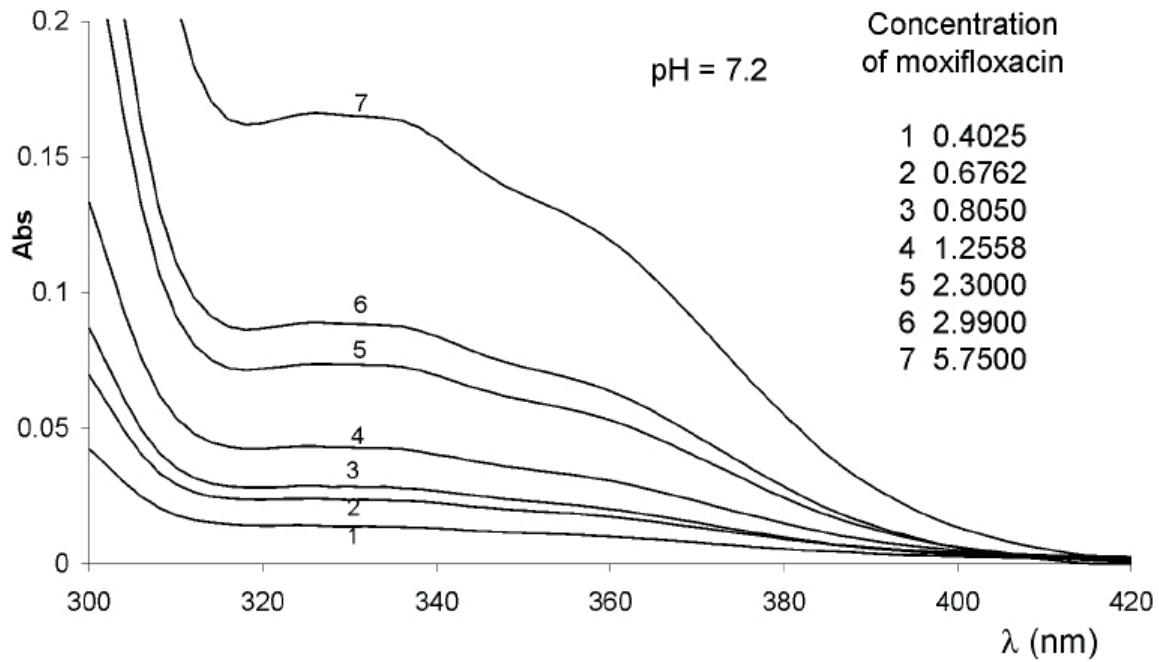


Fig. 4a. Zeroth spectra for moxifloxacin determination in plasma. Concentrations of moxifloxacin are in $\mu\text{g/mL}$.

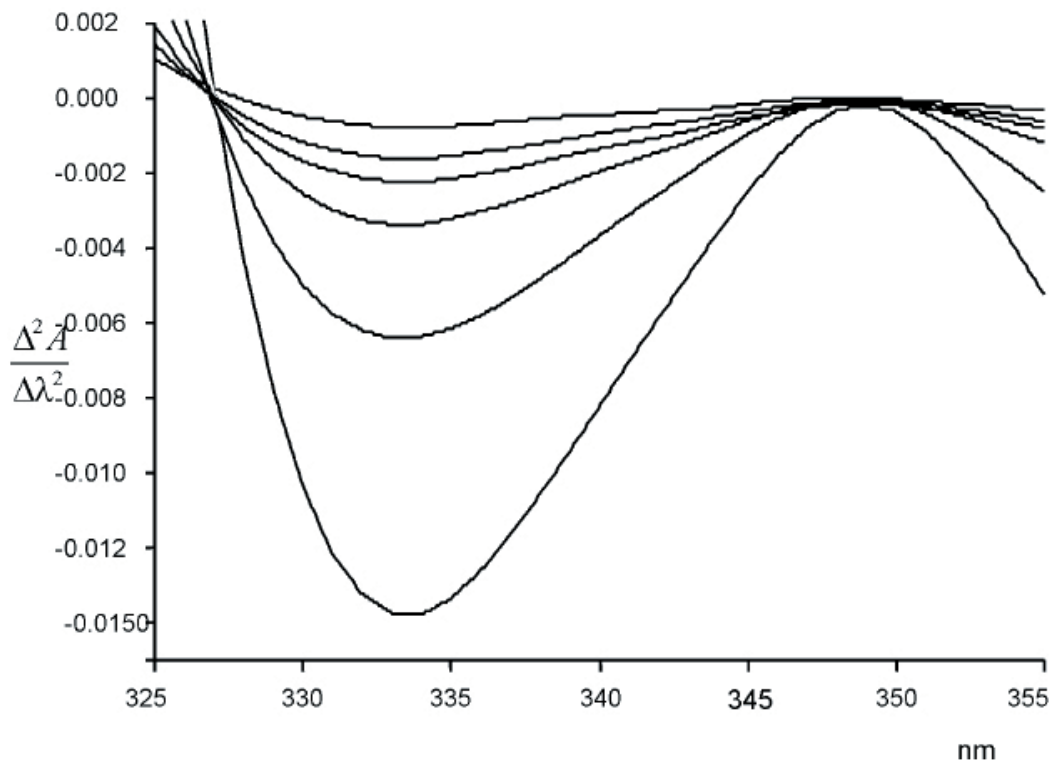


Fig. 4b. Second order derivative spectra for moxifloxacin determination in plasma.

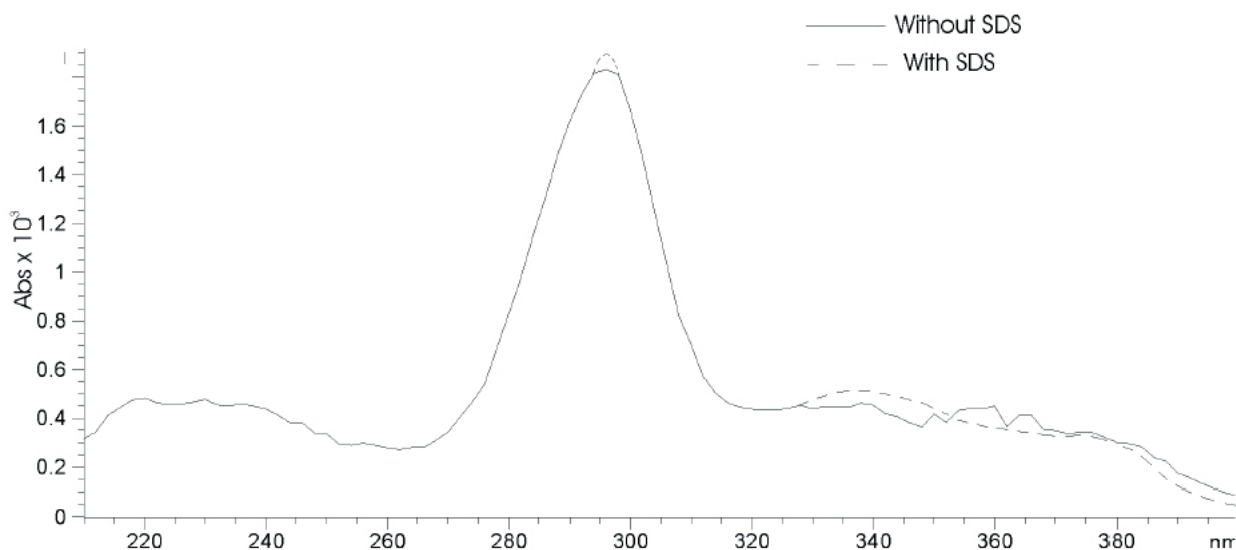


Fig. 5. UV spectra of patient plasma specimen in the presence and without SDS.

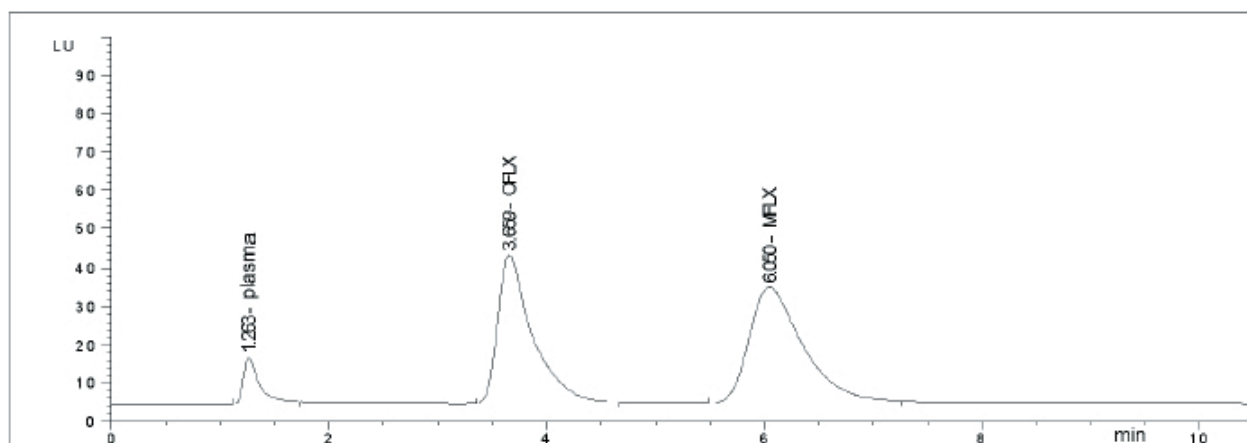


Fig. 6. Chromatogram of patient plasma specimen taken 1 hr after administration of an Avelox tablet (400 mg).

wards centrifuged at 1500 rpm for 30 min. The supernatant (0.5 mL) was subjected to the same procedure as for plasma calibration graph. The zero order UV spectrum of one patient plasma specimen is shown in Fig. 5.

The results of analysis after five repeated measurements were: for sample 1; $3.56 \pm 0.15 \mu\text{g mL}^{-1}$ and for sample 2; $3.89 \pm 0.10 \mu\text{g mL}^{-1}$. These results are in good agreement with the literature data [23].

An HPLC method was developed to compare the validity of the spectrophotometric method. In the development of the method we aimed to achieve the pH values near to neutral as this proved to be optimal for spectrophotometry. However, the column used does not allow higher pH values than 7 so we varied experimental parameters in such a way that pH was set to 6.5 while at the same time the percentage of acetonitrile was raised

in comparison with that used in our previous work [17] so that chromatographic parameters were acceptable. Spiked plasma samples were directly injected onto the column. The calibration line was constructed by plotting the peak areas ratio of moxifloxacin to ofloxacin versus moxifloxacin concentration. The concentration of ofloxacin was $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$. The method was fully validated and validation parameters were: linearity range 50 – 1500 ng mL^{-1} , correlation coefficient, 0.9983, mean recovery, 98.5%, limit of quantification, 12.0 ng mL^{-1} and limit of detection, 5.0 ng mL^{-1} . The chromatogram of patient plasma sample is shown in Fig. 6.

The concentration of moxifloxacin in patient plasma read from the calibration curve was $4.05 \pm 0.08 \mu\text{g mL}^{-1}$ for sample 2. Relative error related to spectrophotometric result is 4.1%, which means that the accuracy and precis-

sion of the proposed method is satisfactory.

Conclusions

The proposed method is fast and accurate with minimal sample pre-treatment. Plasma proteins do not interfere and addition of sodium dodecylsulfate enhances sensitivity of determination. The method could be reliably used in the analysis of the large number of samples in a short time e.g. in clinical and pharmacological analysis.

Acknowledgements

The authors thank the Ministry of Science of Serbia for the financial support through the project 142013.

References

1. J.A. Barman Balfour, L.R. Wiseman, *Drugs*, **57**, 363 (1999).
2. H. Stass, A. Dalhoff, D. Kubitza, U. Schühly, *Antimicrob. Agents Ch.* **42**, 2060 (1998).
3. A. Dalhoff, H. Stass, *Drugs*, **58**, 239 (1999)
4. T. Radhakrishna, D.S. Rao, K. Vyas, G.O. Reddy, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **22**, 691 (2000)
5. T. Lemoine, D. Breilh, D. Ducint, J. Dubrez, J. Jougon, J.F. Velly, M.C. Saux, *J. Chromatogr. B*, **742**, 247 (2000).
6. K. Vishwanathan, M.G. Bartlett, J.T. Stewart, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **30**, 961 (2002).
7. B.B. Ba, R. Etienne, D. Ducint, C. Quentin, M.C. Saux, *J. Chromatogr. B*, **754**, 107 (2001).
8. H. Stass, A. Dalhoff, *J. Chromatogr. B*, **702**, 163 (1997).
9. J.A. Ocaña Gonzáles, M. Callejón Mochón, F.J. Barragán de la Rosa, *Microchim. Acta*, **151**, 39 (2005).
10. T.S. Ulu, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **43**, 320 (2007).
11. S. Schulte, T. Ackermann, N. Bertram N, T. Sauerbruch, D.W. Paar, *J. Chromatogr. Sci.*, **44**, 205 (2006).
12. J.A. Ocaña Gonzáles, F.J. Barragán, C. Manuel, *Analyst*, **125**, 2322 (2000).
13. J.G. Möller, H. Stass, R. Heinig, G. Blaschke, *J. Chromatogr. B*, **716**, 325 (1998).
14. R. Inam R, H. Mercan, E. Ylmaz, B. Uslu, *Anal. Lett.*, **40**, 529 (2007).
15. N. Erk, *Anal. Bioanal. Chem.*, **378**, 1351 (2004).
16. S.K. Motwani, S. Chopra, F.J. Ahmed, R.K. Khar, *Spectrochim. Acta A*, **68**, 250 (2007).
17. A.L. Djurdjevic, M.S. Jelkic, P. Djurdjevic, *J. Chromatogr. B*, **844**, 104 (2006).
18. D.D. Perrin, B. Dempsey (1974) Buffer for pH and Metal Ion Control. Chapman and Hall, London, pp. 148, 153.
19. M.A. Gillespie (1994) Manual of spectrofluorometric and spectrophotometric derivative experiments. CRC Press, Boca Raton, pp. 29 – 33.
20. M. Thompson, S.L.R. Ellison, R. Wood, *Pure Appl. Chem.*, **74**, 835 (2002).
21. U. Neugebauer, A. Szeghalmi, M. Schmitt, W. Kiefer, J. Popp, U. Holzgrabe, *Spectrochim. Acta Part A*, **61**, 1505 (2005).
22. R.H. Park, Y.K. Chung, C.K. Lee, K.J. Lee, M.K. Bark, *Bull. Korean Chem. Soc.*, **21**, 849 (2000).
23. A. Speciale, R. Musumeci, G. Blandino G, I. Milazzo, F. Caccamo, G. Nicoletti, *Int. J. Antimicrob. Ag.*, **19**, 111 (2002).



Optimization of separation and determination of moxifloxacin and its related substances by RP-HPLC[☆]

Predrag Djurdjevic^{a,*}, Andrija Ciric^a, Aleksandra Djurdjevic^b, Milena Jelick Stankov^c

^a Chemistry Department, Faculty of Science, 34000 Kragujevac, P.O. Box 60, Serbia

^b Medicines and Medical Devices Agency of Serbia, 11000 Belgrade, Serbia

^c Analytical Chemistry Department, Faculty of Pharmacy, 11000 Belgrade, Serbia

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 December 2008

Received in revised form 20 March 2009

Accepted 25 March 2009

Available online 5 April 2009

Keywords:

Moxifloxacin

Impurities

Degradation

RP-HPLC

Chemometry

ABSTRACT

A RP-HPLC method for the separation and determination of impurities of moxifloxacin, in its pharmaceutical forms as well as moxifloxacin degradation products, was developed with the aid of DryLab[®] software and chemometric (response surface) approach. The separation of four synthesis-related impurities was achieved on a Waters C₁₈ XTerra column using a mobile phase of (water + triethylamine (2%, v/v)): acetonitrile = 90:10 (v/v%); the pH of water phase being adjusted with phosphoric acid to 6.0. Flow rate of the mobile phase was 1.5 ml/min and UV detection at 290 nm was employed. The column was thermostated at 45 °C. The resolution between the two least resolved impurity peaks was in average, $R_{s,min} > 1.5$. Method validation parameters indicate linear dynamic range 0.2–2.0 µg/ml with LOQ ca. 0.20 µg/ml and LOD ca. 0.05 µg/ml for all analytes.

The method was applied for the impurities determination in drug tablets and infusion (Avelox[®], Bayer AG) and for degradation products determination in a stability study of moxifloxacin. The impurity content in the tablets and infusion was quantified as 0.1% of total drug. Two degradation products were noted under hydrolytic conditions. The method can also be used for rapid and accurate quantification of moxifloxacin hydrochloride in its tablets during stability testing.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Moxifloxacin, [1-cyclopropyl-7-[(S,S)-2,8-diazabicyclo[4.3.0]non-8-yl]-6-fluoro-8-methoxy-1,4-dihydro-4-oxo-3-quinolone carboxylic acid hydrochloride] (MOX) is a synthetic antibacterial agent active against Gram-negative and some Gram-positive bacteria. Its pharmaceutical formulations involve tablets and infusions (Avelox[®], Avalox[®], Tovan[®], Bayer AG). It is synthesized by various procedures which commonly involve two main phases: (a) synthesis of quinolone nucleus and (b) introduction of various substituents [1,2]. Bayer AG (Leverkusen, Germany) has patented several synthetic processes [3], the main one being outlined in Scheme 1 [3,4].

During the synthesis developed by Bayer AG, not only un-reacted difluoro compound but also its related analogues: (i) 1-cyclopropyl-7-[(S,S)-2,8-diazabicyclo[4.3.0]non-8-yl]-6,8-difluoro-1,4-dihydro-4-oxo-3-quinolone carboxylic acid [6,8DF], (ii) 1-cyclopropyl-7-[(S,S)-2,8-diazabicyclo[4.3.0]non-8-yl]-6,8-dimethoxy-1,4-

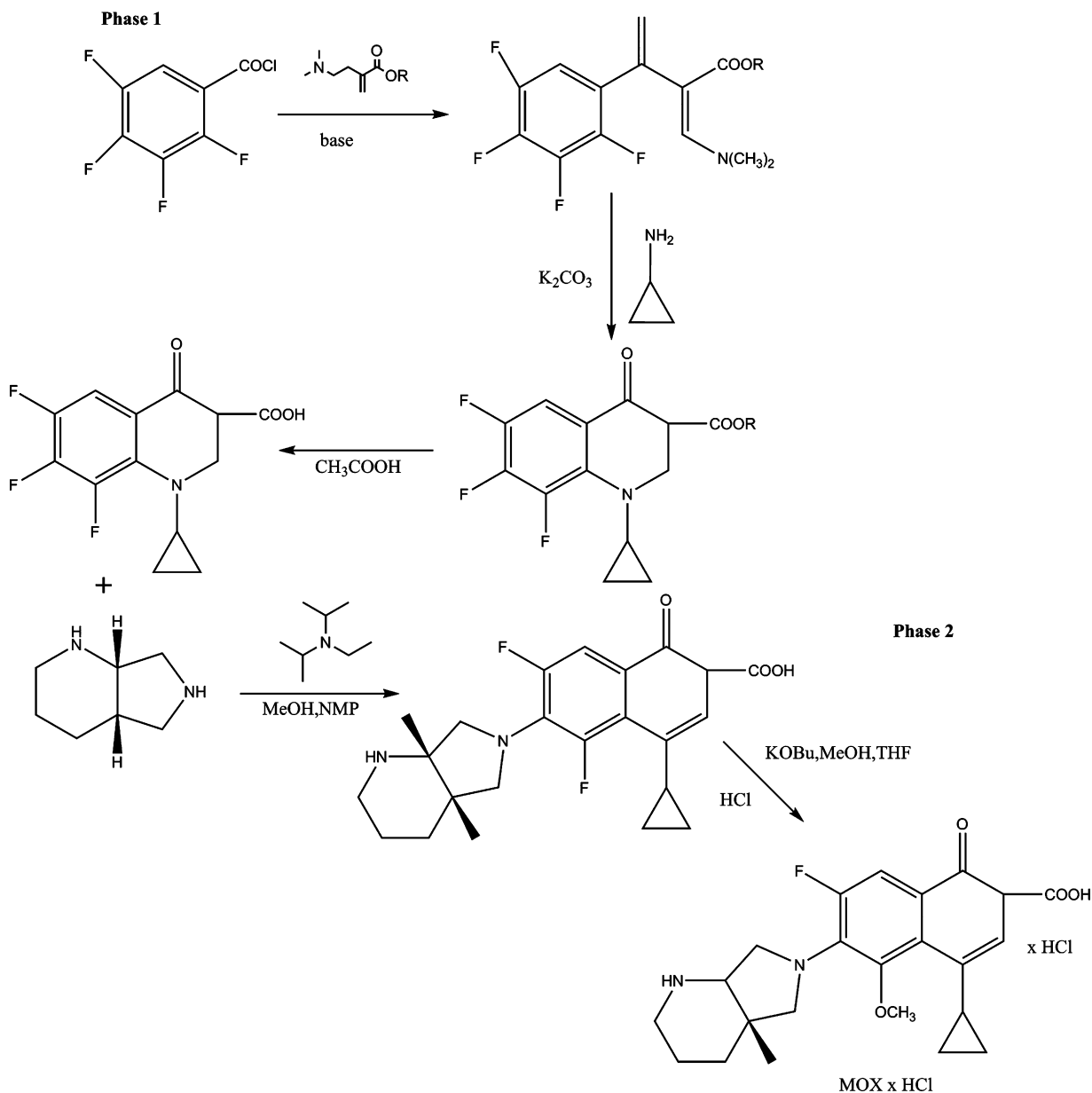
dihydro-4-oxo-3-quinolone carboxylic acid [6,8DM], (iii) 1-cyclopropyl-7-[(S,S)-2,8-diazabicyclo[4.3.0]non-8-yl]-8-fluoro-6-methoxy-1,4-dihydro-4-oxo-3-quinolone carboxylic acid [6M8F], and (iv) 1-cyclopropyl-7-[(S,S)-2,8-diazabicyclo[4.3.0]non-8-yl]-8-ethoxy-6-fluoro-1,4-dihydro-4-oxo-3-quinolone carboxylic acid [6F8E] (Scheme 2) are usually carried over in small quantities into bulk MOX [4,5]. Hence, the drug may contain impurities or to degrade during formulation process and stability testing under accelerated and long term storage conditions. Identification limits must be established for each impurity in accordance to ICH guidelines [6] and if the limit level is exceeded the impurity must be identified and quantified [7,8].

Several HPLC methods have been reported for moxifloxacin determination in its pharmaceutical forms and biological matrices [9–11]; no one was stability indicating. Isolation and identification of synthesis-related impurities was dealt with in some papers. Kumar et al. [12], isolated and structurally characterized four impurities in bulk moxifloxacin: 1-cyclopropyl-6-fluoro-1,4-dihydro-8-methoxy-7-[(S,S)-N-methyl-2,8-diazabicyclo(4,3,0)non-8-yl]-4-oxo-3-quinoline carboxylic acid, methyl-1-cyclopropyl-6-fluoro-1,4-dihydro-8-methoxy-7-[(S,S)-2,8-diazabicyclo(4,3,0)non-8-yl]-4-oxo-3-quinoline carboxylate, 1-cyclopropyl-6-fluoro-1,4-dihydro-8-hydroxy-7-[(S,S)-2,8-diazabicyclo(4,3,0)non-8-yl]-4-oxo-3-quinoline carboxylic acid, and 1-cyclopropyl-6,7-difluoro-

[☆] Presented in part in XIX International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Analysis, Gdansk (Poland), 2008.

* Corresponding author. Fax: +381 34 335 040.

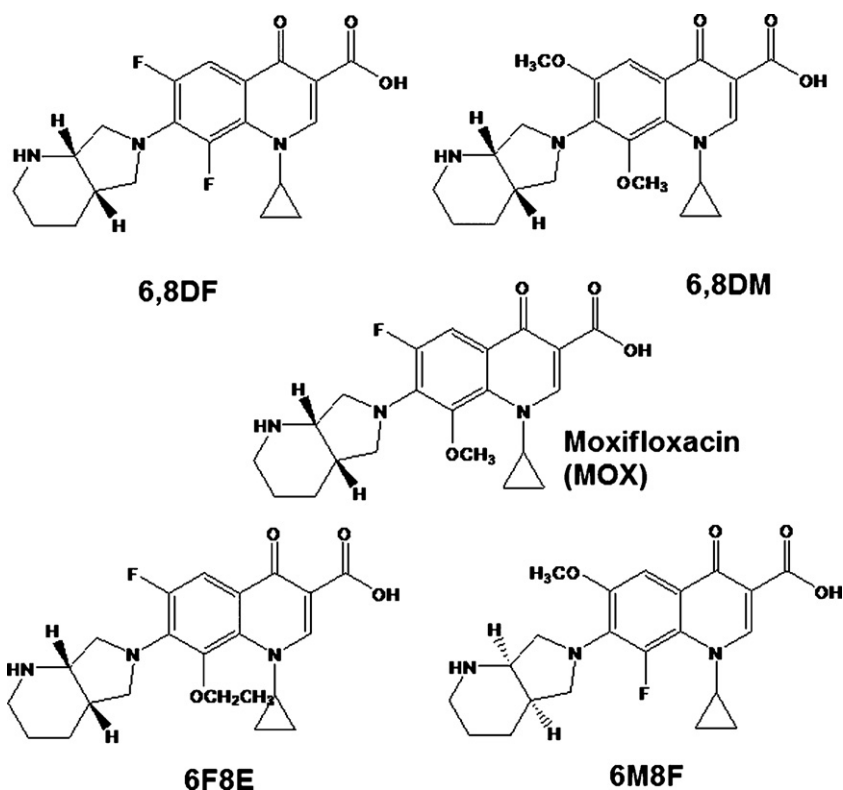
E-mail address: preki@kg.ac.yu (P. Djurdjevic).



Scheme 1. Synthetic route of moxifloxacin HCl [3].

8-hydroxy-4-oxo-1,4-dihydro-3-quinoline carboxylic acid. The different structures of impurities found by Kumar et al. and those stated by Bayer AG could be attributed to different synthetic routes [2,3]. Motwani et al. [13], found three synthesis-related impurities by HPTLC method. The drug was also subjected to acid and alkali hydrolysis, oxidation, dry and wet heat treatment and photo degradation. Significant degradation was observed under hydrolytic conditions (seven products) while under other conditions degradation was milder (three products). Salem et al. [14] applied two stability-indicating methods, densitometric TLC and derivative spectrophotometry for the determination of lomefloxacin, moxifloxacin, and sparfloxacin in the presence of their acid degradates. The main degradant, a decarboxylated product was separated by TLC. Wei et al. [15] characterized some moxifloxacin impurities by spectrophotometric method. To our knowledge, no method for separation and determination of synthetic impurities of moxifloxacin based on chemometric approach was described in literature.

The main goal of the present investigation was to obtain optimal separation of components in a reasonable analysis time by adjusting acceptable chromatographic factors. The methods achieving this goal are based on the optimization of the mobile phase composition, pH, additive concentration, flow rate, type of chromatographic column, temperature and buffer selection. Simultaneous optimization of that many parameters requires computer oriented chemometric approach in order to simplify and accelerate the optimization process. In the present study a computer simulation software DryLab[®] was used in developing and optimizing a reverse-phase HPLC separation of moxifloxacin and its related impurities and degradation products of moxifloxacin [16–18]. Scouting analytical runs are required for DryLab[®] calculations since they train (“calibrate”) the software. With the input data of training runs the software evaluates the resolution, R_s as a function of one or two chromatographic parameters for each peak pair. A “critical resolution map” is produced by plotting smallest value of resolution of any two critical peaks as a function of one or two varied experimental param-



Scheme 2. Structure of moxifloxacin and related impurities with abbreviations.

ters revealing not only the optimum chromatographic conditions but also the robust regions of an HPLC method [16]. The predictive power of DryLab[®] software is based on Eq. (1) derived from the thermodynamic considerations of chromatographic process [19]:

$$\ln k = A + B \cdot D + C \cdot \Delta A + D(K^e - 1)V^{2/3}\gamma + E + \ln(RT/P_0V) \quad (1)$$

This equation involves six energetic contributions—electrostatic forces, van der Waals forces, cavity term, correction term for non-planar surfaces, dielectric constant term and entropy of condensation term. The meaning of individual terms in Eq. (1) is:

k : capacity factor

A : experimental accessible constant

$\Delta A = (A_S + A_L - A_{SL})$ solvophobic contact surface area in solute (S)–ligand (L) complex

BD : electrostatic term (D approx. = 1)

V : molar volume of the solvent

K^e : molecular parameter of the solute

P_0 : atmospheric pressure

γ : surface tension

T : temperature

R : gas constant

$C \Delta A (=N\gamma \Delta A/RT)$: cavity reduction term

N : Avogadro's number

E : van der Waals term

Eq. (1) describes the influence of the composition of eluent on retention based on the surface tension, γ , which is proportional to $(100 - \%B = \%A)$, the amount of water in the mobile phase, the temperature T , molecular properties of sample and chemically bonded ligand, the contact surface area between ligand and solute ΔA and electrostatic properties such as buffer concentration. The DryLab[®] software allows for simultaneous optimization of one or two variables with input parameters, retention time, peak area and peak-width under chosen chromatographic conditions (col-

umn, temperature, gradient or isocratic elution) and is visualizing peak movements, which are essential to understand robustness of an HPLC method. The resolution map of one-dimensional optimization (1D) is two-dimensional graph whereas the resolution map of a two-dimensional optimization (2D) is a three-dimensional contour plot in which the critical resolution as a third dimension is color coded. Sliding a cross-hair marker to the region of maximum critical resolution one is able to optimize values of parameters and simulated chromatogram can be obtained, so that best experimental conditions can be easily identified.

To study the individual contribution of chromatographic factors to resolution of the peaks the response surface method was used [20]. The overall experimental response, R_x , is taken as a function of independent variables, $\%B$, pH, T and $\%TEA$ (factors). The response, overall resolution, R_x is defined as a sum of individual resolutions between pairs of critical peaks [21]. Hence, the R_x will increase as analytical performance improves. Plot of R_x on factor space is the response surface. The region close to the extremum, a “nearly stationary region” can be suitably described by using second order polynomial:

$$R_x = b_0 + \sum_{i=1}^f b_i x_i + \sum_{i=1, j>1}^f b_{i,j} x_i x_j + \sum_{i=1}^f b_{ii} x_i^2 + \varepsilon \quad (2)$$

where f is the dimension of the factor space and ε is the error associated to the R_x , which is assumed to be normally distributed. We determined the factors corresponding to optimum response (nearly stationary space) employing the software StatSoft Statistica v.6 [22].

2. Materials and methods

2.1. Reagents

All reagents were HPLC reagent grade purity unless stated otherwise. Moxifloxacin hydrochloride and its synthetic impurities and

ofloxacin as internal standard (IS) were used as certified reference compounds (Bayer AG, Germany) for quantitative analysis. Avelox[®] tablets (400 mg) and infusion (400 mg/250 ml) were products of Bayer Health Care, Leverkusen, Germany.

Acetonitrile was obtained from J.T. Baker (Deventer, The Netherlands) while ortho-phosphoric acid, sodium hydroxide and hydrochloric acid were products of Merck (Darmstadt, Germany). Triethylamine (99.5%, v/v) was obtained from Fluka (Buchs, Switzerland). HPLC grade water was produced by using Milli-Q water purification system (Millipore, Milford, USA) and was used for preparation of all solutions and reagents.

2.2. Apparatus

A HPLC system (Shimadzu, Kyoto, Japan) consisted of degasser DGU-20A₃, analytical pumps LC-20AT, 7125 injector and SPD-M20A diode array detector and CBM-20A system controller as well as Agilent 1100 series HPLC system (Agilent, CA, USA) comprising quaternary pump, injector, degasser and diode array UV detector were used for analysis. A reversed-phase Supelco (Bellefonte, PA, United States) ABZ C18 (50 mm × 4.6 mm, particle size 5 μm) and XTerra C18 (Waters, Milford, USA) column (50 mm × 4.6 mm, particle size 5 μm) were used for separation. The chromatographic data were processed using LC Solution computer software (Shimadzu) and ChemStation software (Agilent).

For the disintegration of the Avelox tablets and acceleration of dissolution, an ultrasonic bath (Bandelin Sonorex Super, Model RK 512H) was used.

2.3. Chromatographic conditions

The chromatographic separations were performed using either Supelco ABZ or Waters XTerra column using a mobile phase, water (+2% triethylamine): acetonitrile 90:10 (v/v%), the pH of the aqueous phase being adjusted to 6.0 with phosphoric acid, with the flow rate of mobile phase of 1.5 ml/min at 45 °C. The samples were monitored at 290 nm. 20 μl volume of sample was injected into HPLC system.

2.4. Analytical procedure

2.4.1. Stock solutions

For the preparation of stock solutions of moxifloxacin, ofloxacin and five impurities 0.1% phosphoric acid was used as solvent and diluent. The concentration of moxifloxacin was 10.01 mg/ml, ofloxacin was 0.206 mg/ml, 6M8F was 55.0 μg/ml, 6F8E was 51.0 μg/ml, 6,8DM was 51.0 μg/ml, 6,8DF was 52.0 μg/ml.

2.4.2. Standard solutions

Working standard solutions were prepared by dilution of appropriate volumes of stock solutions to 10 ml. For DryLab[®] simulations the mix solution contained moxifloxacin and its related impurities at the same concentration level, 10 μg/ml. The working solutions for optimization study contained 200 μg/ml of moxifloxacin, 1.0 μg/ml of ofloxacin as internal standard (IS) and 1.0 μg/ml of all impurities.

2.4.3. Sample preparation

Three tablets were accurately weighed (to obtain the average mass of one tablet) then finely powdered and 273.2 mg of homogenized powder was transferred to 25 ml volumetric flask. Approximately 20 ml of the diluent was added and the mixture was sonicated for 15 min. The mixture was then diluted to volume with the diluent. The solution was filtered through a 0.22 mm nylon filter. Exactly 175 μl of filtrate, equivalent to 200 μg/ml of moxifloxacin, was pipetted using an Eppendorf pipette into a 5 ml volumetric

flask. Solutions in two flasks were diluted to the mark with diluent and one flask was used for analysis of the impurities while the other was used for degradation studies. Degradation was carried out under hydrolytic conditions in acid (0.1 M HCl), neutral (water medium) and base (0.1 M NaOH) medium. Solutions were left at 50 °C for 3 h. Oxidation stress was performed in 3% H₂O₂ solution; the solution was left for 6 h at room temperature, while photolytic stress was done in light chamber equipped with lamp bank with two Osram UV lamps. Total 840 Wh/m² of irradiation for 3 h, was used.

0.625 ml of infusion was transferred to a 5 ml volumetric flask and diluted with the diluent to mark. This solution was used for impurity determination.

The degradation of bulk moxifloxacin was carried out in parallel, in the same way as described above.

Before analysis to all solutions the same quantity of internal standard (ofloxacin) was added so that its final concentration was 1 μg/ml.

2.5. Method development

The method development started with ABZ column and buffered (pH 6.0 adjusted with H₃PO₄ + 2%TEA in water phase) water (A)-tetrahydrofuran, THF (B) and water (A)-methanol, MeOH (B) mixture as the mobile phases with linear gradient from 0 to 50% B in 20 and 40 min. No separation of peaks was noted with THF, while with MeOH no better resolution than $R_s = 1.1$ between critical pairs of peaks could be achieved. In further set of experiments the mobile phases were exchanged to water (A)-acetonitrile, ACN (B) mixture. All experimental data: retention times, peak areas and widths, temperature, column information and instrumental data, were entered into DryLab[®] software. To obtain 2D resolution map three combinations of parameters were considered: tG vs. eluent composition (ACN:H₂O), tG (gradient time) vs. column temperature; and eluent composition vs. pH. Other possible combinations were not considered. Optimization was started with gradient runs. Then, retention data from gradient runs were used to predict isocratic separation. Before starting analytical runs the dwell volume of HPLC systems was determined. The dwell volume must be determined to be able to make method transfer from one to another HPLC system. First, HPLC column was removed and injector and detector were short connected by piece of tube. Gradient run was made with acetonitrile as solvent A and 0.1% acetone solution in acetonitrile as solvent B. Linear 10 min gradient with 0–100%B was used with flow rate of 2 ml/min. A plot of %B vs. tG was made and from the retention time at midpoint of the gradient the dwell volume was calculated [18]. For Agilent system the dwell volume was 1.7 ml and for Shimadzu system, 2.7 ml. These data were entered into a program to relate sample retention to gradient composition at the column. The optimization of analytes separation was started with two linear gradient runs: tG = 30 min and tG = 60 min; %B run from 5 to 50% in the DryLab[®] mode LC-Gradient. Temperature was 30 °C and pH of water phase was 5.5. Along with retention times and peak areas the baseline peak-widths were also entered into the program. The resulting 1D resolution map is shown in Fig. 1.

Identification of peaks (peak tracking) was ensured by co-injecting the standards. From Fig. 1 the optimal %B for isocratic work can be easily identified to be in the range 10–13% ACN. Further, the column temperature was optimized by four linear gradient runs with tG = 30 and 60 min, %B from 5 to 20% and temperatures 30 and 60 °C (DryLab[®] mode LC-RP Gradient/Temperature). From 2D resolution map presented in Fig. 2 the optimal temperature range was identified at 45–47 °C.

Bearing in mind that all analytes are ionizable amphoteric substances one may expect the strong influence of pH on separation. Experimental design for pH optimization is presented in Scheme 3.

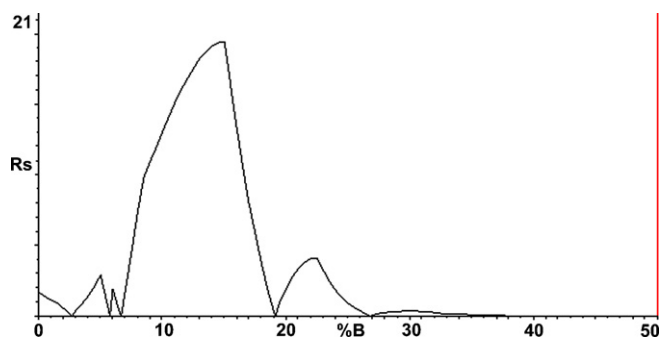


Fig. 1. 1D resolution map obtained in tG/%B optimization at pH 5.5 and $T=30^{\circ}\text{C}$.

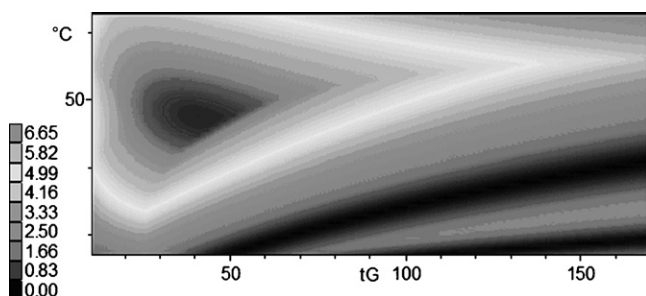
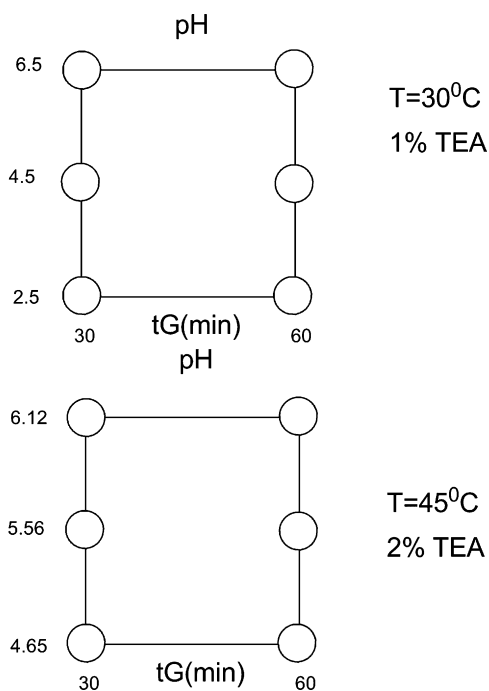


Fig. 2. 2D resolution map in tG/temperature optimization at pH 6.12.



Scheme 3. Experimental design for LC-tG/pH optimization.

To find optimal pH first, six screening gradient runs were carried out with tG = 30 and 60 min, %B varying from 5 to 20% and pH values at 2.5, 4.5 and 6.5 (DryLab[®] mode LC-RP Gradient/pH). The training (scouting) set of screening chromatograms is presented in Fig. 3. These runs indicated that the optimal area of pH is above 4.0.

Table 1

A comparison of predicted and experimental retention data for the optimized separation of model compounds (11% B; pH 6.10).

Peak I.D.	Retention time (min)		Resolution	
	DryLab	Experimental	DryLab	Experimental
6,8DF	3.16	3.20	5.55	5.50
MOX	4.65	5.00	4.09	4.00
6,8DM	6.16	6.20	2.36	2.41
6M8F	7.24	7.14	3.66	3.00
6F8E	9.34	9.08	n/a	n/a
Average standard error	0.10		0.20	

Though satisfactory values of R_s can be obtained at lower pH values (2.5), analysis time is too long and conditions are not robust. Thus, additional six gradient runs were made at pH 4.65, 5.56 and 6.12 under the same gradient conditions.

In this way the recommendation [18] not to change the pH for more than one unit near $pK_{a,1}$ was followed. The dissociation constants of moxifloxacin are $pK_{a,1}=6.25$ and $pK_{a,2}=9.29$ [23]. Thus, the chosen pH interval adequately brackets the area near the first dissociation of moxifloxacin. The temperature was set at 45°C and flow rate at 1.5 ml/min.

Inspecting the chromatograms one may see that at lower pH values the separation between 6,8DM and 6M8F is adequate but resolution between MOX and 6,8DF is unacceptable. Increasing the pH generally improves the resolution and MOX and 6,8DF adequately separate, but fine tuning between %B and pH is needed to improve resolution between critical pair 6,8DM and 6M8F.

From 2D robust resolution map it can be seen that optimal pH is in the range 5.8–6.1. From this map it can also be seen that Δt_R is much lower than 25% of tG so that isocratic mode might be possible. Changing DryLab[®] conditions from 2D resolution map to isocratic mode, from 2D resolution map optimal conditions are identified at pH 6.0 and %B = 9.8%. The isocratic resolution map and calculated (simulated) chromatogram are shown in Fig. 4.

A simulated isocratic run is compared with experimentally obtained isocratic chromatogram under optimal conditions found in DryLab[®] simulations, and results are presented in Table 1.

Data in Table 1 show that DryLab[®] accurately predicts retention of analytes. The calculated number of plates for moxifloxacin was 9654.

From DryLab[®] simulations it is evident that %B, pH and temperature show strong influence on retention and separation of the analytes. Nearly optimum condition required pH around 6, %B about 10%, and temperature higher than 40°C . Though the resolutions of critical pairs under these conditions are satisfactory, significant tailing was obtained for moxifloxacin and 6-fluoro-8-ethoxy analytes. Therefore we exchanged ABZ column for XTerra which provides more symmetrical peaks. There was no significant difference in optimal chromatographic parameters between these two columns. DryLab[®] simulation is based on thermodynamic consideration of chromatographic process and it is desirable to see how phenomenological, i.e. statistical approach compares with thermodynamical. Further optimization was performed on XTerra column using factor analysis and response surface methodology with initial values of factors taken from DryLab[®] analysis. Response surface methodology would enable statistical modeling and quantification of factor effects on the chromatographic process. The following factors were examined: pH (X_1), %B (X_2), temperature, %TEA (X_3). Levels of these factors together with their coded values for customized central composite design are summarized in Table 2.

Coding of factors was performed according to formulae:

$$X_{\text{coded}} = \frac{(X_{\text{real}} - X_{\text{average}})}{(\text{range}/2)}$$

Table 2
Chromatographic factors and their coded values.

pH (X_1)	4	4.5	5	5.5	6	6.5	7	7.5	8
Coded values	-2	-1.5	-1	-0.5	0	0.5	1	1.5	2
%ACN (X_2)			8	9	10	11	12		
Coded values			-2	-1	0	1	2		
%TEA (X_3)				1	2	3			
Coded values				-1	0	1			

$$X_{\text{average}} = \frac{(X_{\text{max}} + X_{\text{min}})}{2}$$

$$\text{range} = X_{\text{max}} - X_{\text{min}}$$

In each experiment overall resolution, i.e. the sum of all resolution of individual resolutions between pairs of peaks was used as response. Between two peak resolution $R_{s1,2}$ was calculated using the formula [24]:

$$R_{s1,2} = \frac{1}{4} \left(\frac{k'_2}{k'_1} - 1 \right) \sqrt{N_p} \left(\frac{k'_1}{k'_1 + 1} \right) \quad (3)$$

where N_p is number of theoretical plates for the drug, k_1 is a capacity factor for peak 1 and k_2 for peak 2. The experiment was designed as customized central composite face centered design with replications. In order to reduce the number of experiments the temperature was set to 45 °C, as optimal value determined from

DryLab® simulation. The complete coded design is given in Table 3. The factors are designated as $X_1 = \text{pH}$, $X_2 = \% \text{ACN}$, $X_3 = \% \text{TEA}$.

The design consists of 37 runs with some fractional factorial and star points with three replicates at central point and some other replicate points, so that pure error can be estimated. The calculations were performed by using a program Statistica v. 6.

Initial ANOVA calculation indicated 11 coefficients in a quadratic model of which four are linear, three are quadratic and three are interactions. Since, calculated p -statistics was higher than 0.05 for $X_1 X_3$ interaction coefficient, in a second calculation cycle this coefficient was omitted and included in the lack-of-fit. ANOVA analysis (Table 4) gave mean lack of fit of 4.4 which suggest applicability of quadratic model.

In Table 5 coefficients from Eq. (2) are presented together with standard error.

The calculated p -statistics indicate that eight coefficients are important, the most important being quadratic pH term. Also, pH and %ACN interaction is important in the model, thus, changes in both pH and organic modifier of mobile phase simultaneously exert effect on resolution. Careful regulation of both is needed in order to achieve good separation. Quantity of TEA and its interaction with ACN is less important.

Calculated response surface is shown in Fig. 5. It has relatively broad maximum indicating favorable robustness of the method.

The optimal values were searched using non-linear least square method. The optimal calculated values were: pH 6.0, %ACN = 10%,

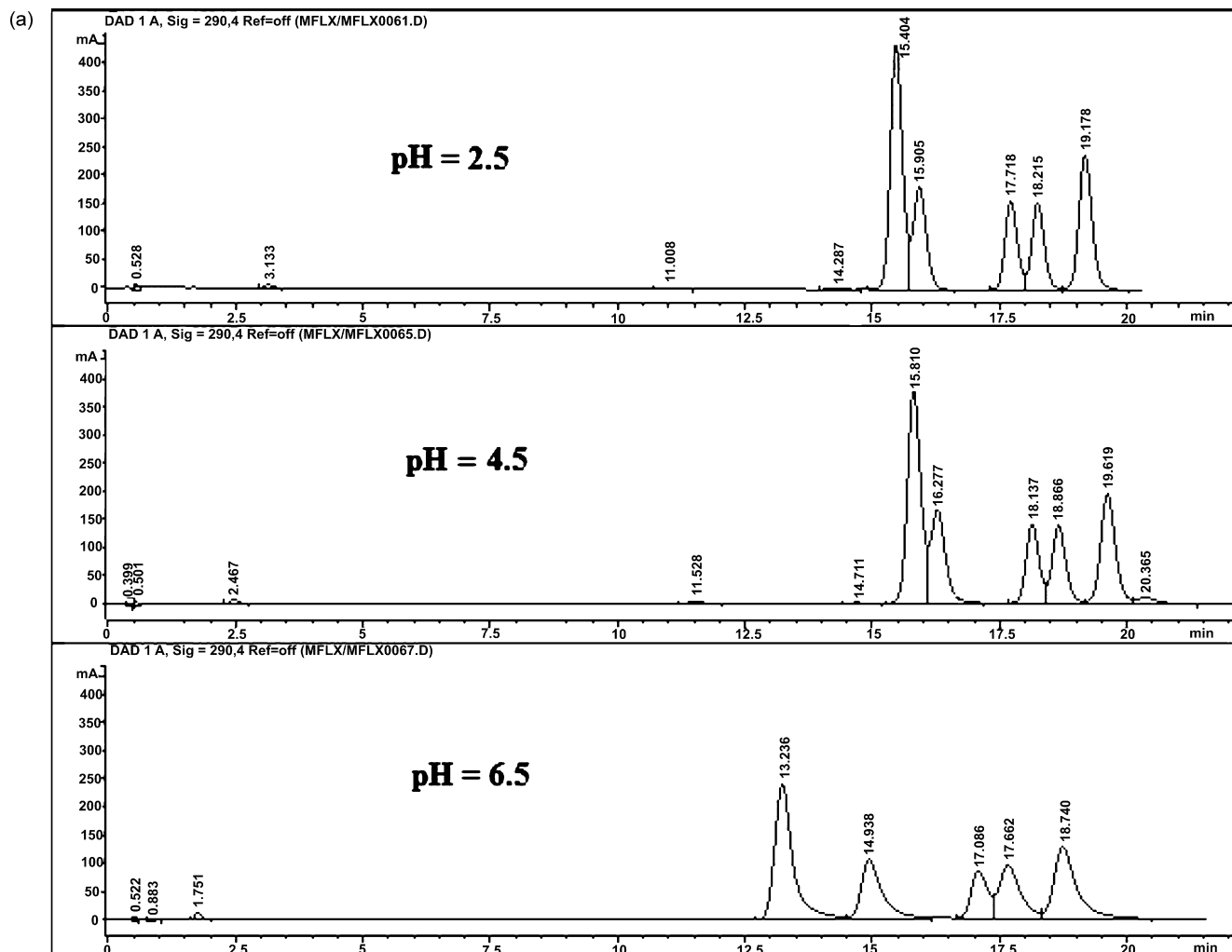


Fig. 3. Training set of chromatograms for screening LC-gradient tG/pH optimization. $T = 30^\circ \text{C}$. (a) tG = 30 min; (b) tG = 60 min.

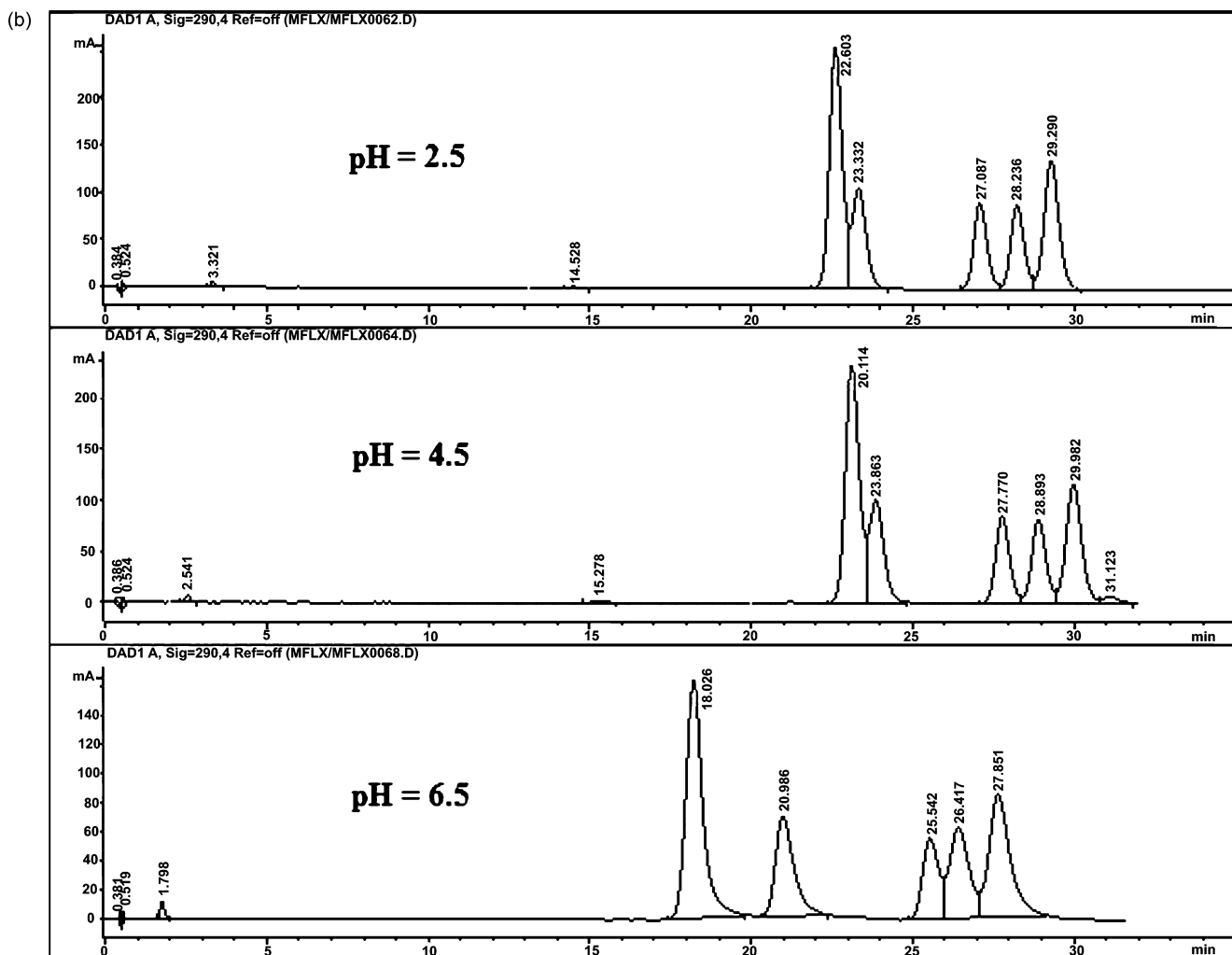


Fig. 3. (Continued.)

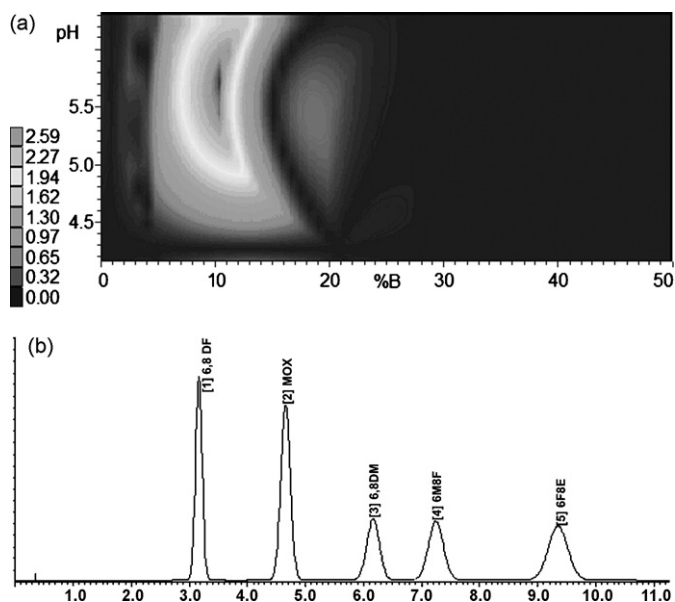


Fig. 4. Isocratic 2D resolution map (a) obtained from gradient data for pH optimization and corresponding chromatogram (b).

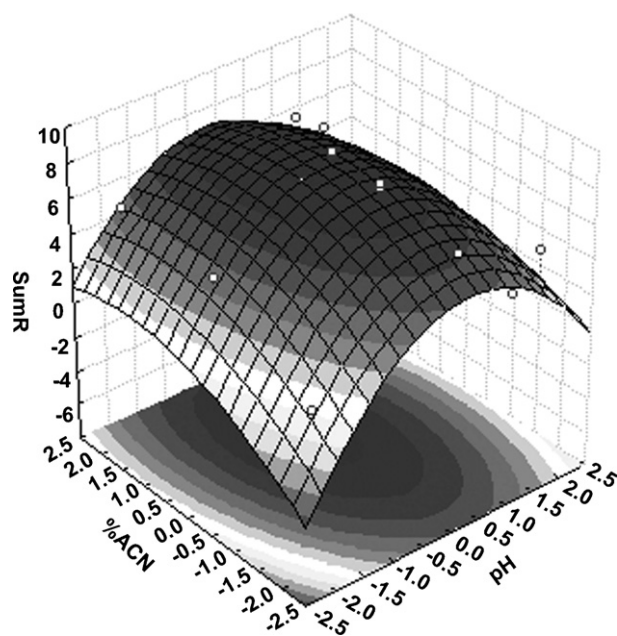


Fig. 5. Response surface calculated from the design data given in Table 3.

Table 3

Experimental design. The overall response factor, R_x was measured by summing the individual resolutions between pairs of peaks.

No.	pH	%ACN	%TEA	R_x
1	0	0	0	9.27
2	0	0	0	9.23
3	0	0	0	9.37
4	0	0	1	8.1
5	0	0	1	8.15
6	0	0	-1	7.47
7	0	0	-1	8.04
8	0	1	0	8.35
9	0	1	0	8.25
10	0	-1	0	8.99
11	0	-1	0	9.26
12	0	-1	-1	7.35
13	0	-1	-1	7.41
14	0	2	-1	5.78
15	0	-1	-1	7.13
16	0	-1	-1	7.12
17	2	2	0	2.38
18	2	-2	0	4.42
19	1.5	0	0	3.5
20	1.5	2	0	5.52
21	1.5	-2	0	2.65
22	1	0	-1	4.45
23	1	0	-1	5.78
24	1	2	-1	6.8
25	0.5	0	-1	6.53
26	0.5	0	-1	7.73
27	0.5	0	-1	6.79
28	0.5	2	-1	5.47
29	0.5	-2	-1	6.34
30	-0.5	0	-1	8.4
31	-1	2	0	3.45
32	-1	-2	0	1.4
33	-1.5	0	0	2.54
34	-1.5	0	-1	3.18
35	-2	0	0	5.18
36	-2	2	0	5.67
37	-2	-2	0	1.48

Table 4

ANOVA analysis of quadratic chromatographic model.

Coefficients	SS	df	MS	F	p
b_1	0.737	1	0.737	4.508	0.055211
b_{11}	58.553	1	58.553	357.772	0.000000
b_2	4.912	1	4.912	30.014	0.000141
b_{22}	10.207	1	10.207	62.369	0.000004
b_3	0.857	1	0.857	5.239	0.041011
b_{33}	0.852	1	0.852	5.205	0.041571
b_{12}	4.062	1	4.062	24.820	0.000319
b_{23}	0.812	1	0.812	4.961	0.045832
Lack of fit	70.481	16	4.405	26.916	0.000001
Pure error	1.964	12	0.164		
Total SS	198.330	36			

SS: sum of squares, df: degree of freedom, MS: mean sum of squares, F: Fisher statistics, p: statistical parameter related to significance of coefficients.

Table 5

Calculated coefficients in a quadratic model of chromatographic separation.

Coefficients	Effect	Std. err. pure err.	t(12)	p
b_0	8.23	0.144	56.9798	0.000000
b_1	0.58	0.272	2.1233	0.055211
b_{11}	-8.90	0.470	-18.9149	0.000000
b_2	1.48	0.270	5.4785	0.000141
b_{22}	-2.80	0.355	-7.8974	0.000004
b_3	0.70	0.306	2.2889	0.041011
b_{33}	-0.91	0.400	-2.2814	0.041571
b_{12}	-1.68	0.337	-4.9819	0.000319
b_{23}	1.03	0.465	2.2273	0.045832

$T = 45^\circ\text{C}$, %TEA = 2% in close agreement obtained by DryLab® simulation.

2.6. Method validation [25,26]

The optimized chromatographic conditions were validated by evaluating specificity, linearity, precision, accuracy, limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ), robustness and system suitability in accordance with ICH guidelines Q2A.

2.6.1. Linearity

Standard stock solution of the drug and impurities were diluted to prepare linearity standard solutions of impurities in the concentration range 0.2–2.0 $\mu\text{g/ml}$. Each test solution contained moxifloxacin (200 $\mu\text{g/ml}$), ofloxacin (1 (g/ml) and one particular impurity standard. Different volumes of stock solutions were transferred into 5 ml volumetric flasks and diluted to mark with the diluent to yield 0.2–2.0 $\mu\text{g/ml}$ concentration range for each impurity. Seven solutions were prepared. The calibration line was obtained by plotting the analyte to IS peak area ratio against corresponding concentration ratio. Three sets of such solutions were prepared and each set was analyzed to plot a calibration curves. The linear coefficients, standard deviation of slope and intercept, correlation coefficient, standard error of the fit, residual sum and standard error in residuals were calculated using the program Statistica v. 6 [22].

2.6.2. Precision, limit of detection, and limit of quantitation

The precision of the HPLC procedure was assessed by analyzing 10 solutions containing known quantities of analytes. The precision was calculated as:

$$\%RSD = \frac{SD \times 100}{\bar{x}}$$

The detection limit was determined from calibration curves plotted by using sufficiently low concentrations (0.10, 0.25, 0.35, 0.45, 0.5 and 0.60 $\mu\text{g/ml}$) of analytes. The limit of detection (LOD) was calculated using the formula:

$$LOD = 3.3 \frac{s_b}{a}$$

where s_b is the standard deviation of y-intercept of the calibration line and a is the slope of the calibration line. Limit of quantitation (LOQ) was calculated using the equation:

$$LOQ = 10 \frac{s_b}{a}$$

The test solutions at LOD and LOQ concentrations were injected six times and %RSD of peak area of replicate injections was calculated.

2.6.3. Accuracy

Standard mixtures containing MOX, OFLO and four impurities were prepared and analyzed by HPLC using optimal separation conditions. The accuracy of the method was checked for three different impurity concentration levels (relating to nominal one): 80%, 100% and 150%, by standard addition technique. A known amount of impurities was added to the sample containing all components: moxifloxacin, 200.0 $\mu\text{g/ml}$ and ofloxacin as internal standard, 1.0 $\mu\text{g/ml}$ and ratio of peak area (analyte to internal standard) was recorded against added quantity of analyte. All analyses were repeated six times and standard deviations (SD), recoveries and %RSD, were calculated.

2.6.4. Specificity

To demonstrate the specificity of the method the solution of moxifloxacin standard was spiked with known quantities of potential impurities. All the impurities were clearly separated and are

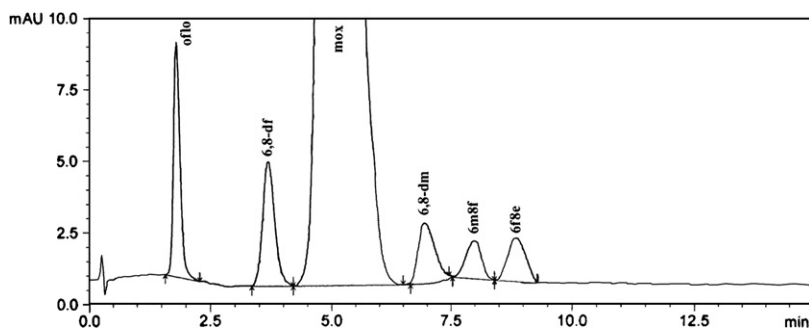


Fig. 6. Chromatogram of ofloxacin (1 $\mu\text{g/ml}$), moxifloxacin (200 $\mu\text{g/ml}$) and four synthesis-related impurities (ca. 1 $\mu\text{g/ml}$) under optimal conditions: pH 6.0; $T = 313\text{ K}$; mobile phase composition (water + 2% triethylamine):acetonitrile = 90:10 (v/v%); flow rate: 1.5 ml/min; $\lambda = 290\text{ nm}$.

Table 6

Linear regression data for moxifloxacin related impurities.

Compound	Linear regression $Y = aX + b^a$	Correlation coefficient (R^2)	LOD ($\mu\text{g/ml}$)	LOQ ($\mu\text{g/ml}$)	Standard error	Sum of residuals
6,8DF	$Y = (1.06 \pm 0.02)X - (0.04 \pm 0.02)$	0.9988	0.060	0.20	0.02	2×10^{-15}
6,8DM	$Y = (0.75 \pm 0.01)X - (0.14 \pm 0.01)$	0.9994	0.041	0.14	0.01	-7×10^{-16}
6M8F	$Y = (0.86 \pm 0.01)X - (0.14 \pm 0.02)$	0.9990	0.054	0.18	0.02	-6×10^{-16}
6F8E	$Y = (0.99 \pm 0.02)X - (0.12 \pm 0.02)$	0.9986	0.061	0.21	0.02	4×10^{-16}

Concentration range 0.200–2.000 $\mu\text{g/ml}$. No. of experimental points 7. Internal standard ofloxacin, 1.0 $\mu\text{g/ml}$.

^a Y = peak area ratio between analyte and internal standard; X = concentration ratio of analyte and internal standard.

not interfering with the retention times of either moxifloxacin or ofloxacin. A stock solution of placebo was made by dissolving excipients mix (microcrystalline cellulose 136 mg, croscarmellose sodium 32 mg, lactose monohydrate 68 mg, magnesium stearate 6 mg, hypermelosa 10 mg, makrogol 4000 3 mg) in diluent in a 100 ml volumetric flask with sonication and ultrafiltration. Test solutions were made from reference standards and placebo solution.

2.6.5. Robustness

To demonstrate the robustness of the method deliberate small changes of pH and acetonitrile content were made around the optimal values. The pH was varied between 5.8 and 6.2 while acetonitrile content was varied between 9.8 and 11%. No significant changes (relative error less than 5%) of relative retention time (relative to internal standard, ofloxacin) was seen.

2.6.6. System suitability

The system suitability parameters were defined with respect to theoretical plates, tailing factor, repeatability and resolution of the moxifloxacin peak using reference and test solutions.

3. Results and discussion

3.1. Method validation

It was found that the excipients do not interfere with either moxifloxacin or any impurity component. This indicates that the method is specific for the separation and determination of process impurities in moxifloxacin tablets.

A typical chromatogram of a synthetic mixture containing MOX and four impurities: 6,8DF, 6,8DM, 6M8F and 6F8E is shown in Fig. 6. Reproducible peak shapes were obtained under the optimum conditions.

The validation data for calibration lines of four impurities are summarized in Table 6. The response of analytes was linear in the concentration range 0.2–2.0 $\mu\text{g/ml}$. Calculated statistical parameters indicate that the calibration lines are fitting well into the model and that are significantly linear despite relatively large concentration of moxifloxacin in the test solutions (200 $\mu\text{g/ml}$). The

determined LOD and LOQ values for the impurities indicate their reliable identification and quantification in moxifloxacin pharmaceutical forms. The %RSD of peak area at LOQ concentration was found to be less than 5% indicating satisfactory sensitivity of components quantification.

Using a different HPLC instrument (under the same chromatographic conditions) no significant variation in calculated concentrations, and chromatographic parameters were found (Table 7).

Satisfactory recoveries of the test substances (97.3–102.8%) with %RSD less than 4% were obtained suggesting that method can accurately quantify impurities in both tablets and infusion. Small variations of different parameters (pH, %B) do not result in large change of overall resolution as seen from response surface (Fig. 5) indicating the robustness of the method. To develop a method capable to resolve the drug and its four synthetic impurities in one isocratic run it was necessary to set a minimal base resolution of critical peak pair which should be achieved. We set this value at $R_s = 1.4$. From DryLab[®] simulations it was evident that this value can be met in a relatively broad range of ACN percentage in eluent (9–12, v/v%) but a pH range is narrower, between 5.8 and 6.2. Lowering a pH requires much longer analysis time to keep acceptable resolution. In all experiments conducted under optimal conditions, critical reso-

Table 7

Chromatographic characteristics of moxifloxacin and four impurities resolved on a XTerra column under optimal conditions.

Parameter	Compound					
	Instrument	6,8DF	MOX	6,8DM	6M8F	6F8E
RRT	S	0.714	1.00	1.434	1.549	1.710
	A	0.758	1.00	1.540	1.600	1.674
RRF	S	0.991	1.00	0.415	0.404	0.529
	A	1.190	1.00	0.430	0.460	0.589
R_s	S	5.239	2.757	2.779	1.553	1.410
	A	5.460	2.900	2.910	1.600	1.420
Tailing	S	1.189	0.980	1.160	0.976	1.072
	A	1.010	1.000	0.890	0.970	0.984

RRT: relative retention time, RRF: relative response factor, R_s : resolution, calculated relative to ofloxacin as an internal standard, S: Shimadzu, A: Agilent apparatus.

lution was not less than 1.4. Thus, two regions of %B and pH overlap at R_s values ranging from minimal 1.4 to as high as 5.5 indicating favorable robustness and suitability of the method. However, tailing of some peaks of impurities deviates from ideal, but nonetheless, chromatograms are reproducible (two instruments) and repeatable. Change in concentration leads to a linear response in peak areas and allows for precise determination. Thus, the experimental tailing is acceptable.

3.2. Impurity determination

An impurity peak at $t_R = 8.02$ min was noted in tablets and infusion solution. It was well resolved from the standard moxifloxacin (RRT = 1.54). Quantification against moxifloxacin reference standard gives 0.11% of the drug. Comparison of RRT values and DAD spectra with known synthetic impurities indicate that the impurity is 6-methoxy-8-fluoro (6M8F) product. Kumar et al. [12] using preparative gradient HPLC elution separated four process-related impurities from bulk moxifloxacin. The impurity found in our work is different from those found by Kumar et al. The difference can be explained taking into account the fact that in both cases impurities are process related, and we used the samples from Bayer AG while Kumar et al., used the samples from Dr. Reddy's Laboratories Ltd., India. The synthesis and purification procedures employed by these two manufacturers are different, thus, different process-related impurities result.

3.3. Forced degradation products determination

The similar degradation behavior of the drug in bulk, tablets and infusion indicated that there was no interaction between moxifloxacin and excipients. Under hydrolytic conditions two degradation products at $t_R = 5.90$ and 6.73 min (acid hydrolysis) and $t_R = 6.05$ and 6.67 min (base hydrolysis) are seen. Total hydrolytic degradation is ca. 0.3%. No peaks of degradants were seen under photolytic or oxidative conditions. Salem et al. [14] found one acid degradant of moxifloxacin by densitometric TLC which was identified by IR spectroscopy as decarboxylated moxifloxacin. Motwani et al. [13] identified by densitometric HPTLC method seven hydrolytic degradates. The difference in degradation behavior of moxifloxacin in our work and that of Motwani et al., can be attributed to much more drastic conditions used for degradation in their work (1 M concentration of HCl or NaOH, 30% H_2O_2 , with reflux for 3 h).

4. Conclusion

In the present work a RP-HPLC method for the separation of moxifloxacin impurities was developed with the aid of chemometric approach, validated and used for their determination in tablets and infusion. Optimization based on DryLab[®] computer simulations and on statistical response surface methodology led to the

practically same optimal conditions for separation. The proposed method separates the drug from its process-related impurities and degradants formed during stability testing in a reasonable analysis time and with acceptable chromatographic parameters.

Acknowledgement

Authors gratefully acknowledge financial support from the Ministry of Science and Technology, Serbia, under the project 142013.

References

- [1] A. Kleemann, J. Engel, B. Kutscher, D. Reichert, *Pharmaceutical Substances, Synthesis, Patents, Applications*, 4th Edition, Thieme Medical Publ., Stuttgart, 2001, pp. 1372–1374.
- [2] Matrix Laboratories Ltd., India, PCT WO 2005/012285 A1; Cipla Ltd. India, WO 2008/059223.
- [3] Bayer AG, European Patent Office, EP 0350733 B1, EP 550903, EP 657448.
- [4] Bayer AG, Business Group Pharma, Data on file, Moxifloxacin HCl, November 2000.
- [5] Uwe Petersen, Quinolone antibiotics: the development of moxifloxacin, in: J. Fischer, C. Robin Ganellin (Eds.), *Analogue-based Drug Discovery*, Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 2006.
- [6] J.P. Boehlert, Regulatory aspects: ICH and pharmacopoeial perspectives, in: S. Görög (Ed.), *Identification and Determination of Impurities in Drugs, Series: Progress in Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 4, Elsevier, 2000.
- [7] S. Görög, The role of impurity profiling in drug research, development and production, in: S. Görög (Ed.), *Identification and Determination of Impurities in Drugs*, Elsevier, Amsterdam, 2000.
- [8] R.J. Smith, M.L. Webb (Eds.), *Analysis of Drug Impurities*, Blackwell Publishing, Oxford, 2007.
- [9] A. Laban-Djurdjević, M.J. Stankov, P. Djurdjević, *J. Chromatogr. B* 844 (2006) 104–111.
- [10] H. Stass, A. Dalhoff, *J. Chromatogr. B* 702 (1997) 163–174.
- [11] S. Tatar Ulu, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 43 (2007) 320–324.
- [12] Y. Ravindra-Kumar, V.V.N.K.V. Prasad Raju, R. Rajes Kumar, S. Eswaraiah, K. Mukkanti, M.V. Suryanarayana, M. Satyanarayana Reddy, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 34 (2004) 1125–1129.
- [13] S.K. Motwani, R.K. Khar, F.J. Ahmad, S. Chopra, K. Kohli, S. Talegaonkar, *Anal. Chim. Acta* 582 (2007) 75–82.
- [14] M. Yacoub Salem, N.M. El-Guindi, H.K. Mikael, L. El-Sayed abd-el-Fattah, *Chem. Pharm. Bull.* 54 (2006) 1625–1632.
- [15] L. Wei, H.C. Qin, H.T. Jun, *West China J. Pharm. Sci.* 2 (2006) 270–272.
- [16] I. Molnár, *J. Chromatogr. A* 965 (2002) 175–194.
- [17] L.R. Snyder, L. Wrisley, Computer facilitated HPLC method development using DryLab[®] Software, in: S. Kromidas (Ed.), *HPLC Made to Measure: A Practical Handbook for Optimization*, Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 2006.
- [18] *DryLab Users Manual*, LC Resources, Walnut Creek, CA, USA, 2000.
- [19] C. Horváth, W. Melander, I. Molnár, *J. Chromatogr. A* 125 (1976) 129–156.
- [20] D.C. Montgomery, *Design and Analysis of Experiments*, 5th Edition, John Wiley & Sons, N.Y., 2001.
- [21] C. Burgess, *Valid Analytical Methods and Procedures*, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2000, pp. 27–39.
- [22] *Statistica v. 6*, StatSoft, Tulsa, USA, 2001.
- [23] M.-H. Langlois, M. Montagut, J.-P. Dubost, J. Grellet, M.C. Saux, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 37 (2005) 389–393.
- [24] Y. Vander Heyden, C. Hartmann, D.L. Massart, L. Michel, P. Kiechle, F. Erni, *Anal. Chim. Acta* 316 (1995) 15–26.
- [25] D.M. Bliesner, *Validating Chromatographic Methods. A Practical Guide*, John Wiley & Sons, Hoboken, NJ, 2006.
- [26] J. Ermer, J.H. McB, Miller, *Method Validation in Pharmaceutical Analysis A Guide to Best Practice*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2005.



ELSEVIER

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Talanta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/talanta

Evaluation of matrix effect in determination of some bioflavonoids in food samples by LC–MS/MS method

Andrija Ćirić^a, Helena Prosen^b, Milena Jelikić-Stankov^c, Predrag Đurđević^{a,*}

^a University of Kragujevac, Faculty of Science, P.O. Box 60, 34000 Kragujevac, Serbia

^b University of Ljubljana, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, Aškerčeva 5, SI-1000 Ljubljana, Slovenia

^c University of Belgrade, Faculty of Pharmacy, V. Stepe 450, 11000 Belgrade, Serbia

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 February 2012

Received in revised form

5 July 2012

Accepted 8 July 2012

Available online 20 July 2012

Keywords:

Bioflavonoid

Food

LC–MS/MS determination

Matrix effect

Standard addition

ABSTRACT

In the present work the LC–MS/MS method with solid phase extraction for simultaneous determination of bioflavonoids rutin, quercetin, hesperidin, hesperetin and kaempferol in some food samples (red onion, orange peel and honey) was developed and the matrix effect accompanying this determination was quantified.

The matrix effect evaluated using a postextraction addition method was found to be negative in the range –44 to –0.5%, indicating ionization suppression and strongly depended on bioflavonoid concentration. The observed matrix effect was explained taking into account the co-elution of phenolic acids, in terms of their acid–base and hydrophilic properties. The efficacy of extraction expressed as the absolute recoveries of flavonoids were 88–96%, indicating very good efficiency of extraction.

The extracts of food samples obtained either by Soxhlet or ultrasonic extraction were analyzed for bioflavonoid content by the LC–MS/MS method in selected reaction monitoring mode using a triple quadrupole detector and standard addition method, which was found to be the most suitable calibration approach for these samples. The optimized separation was achieved on a Phenomenex Gemini C18 column with gradient elution and mobile phase composition A: 2% acetic acid in water and B: acetonitrile. R_s values were in the range from 1.3 to 3.1, indicating good selectivity of the method. The obtained results (mg/100 g fresh weight) for different bioflavonoids were for rutin 0.16, for quercetin in the range 0.65–56, for hesperidin 0.016–24, for hesperetin 0.0068–36.4 and for kaempferol 0.14–1.63 and generally show good agreement with published data. Low detection limits (0.014–0.063 µg/mL) were obtained with acceptable recoveries (86–114%). Total time of analysis was less than 40 min, therefore the proposed method represents significant improvement over existing methods.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Flavonoids are a large class of phenolic compounds which are subclassified as flavones, flavonols, isoflavones, flavanones and catechins, chalcones and anthocyanidins depending on phenyl substituent in the C₂ or C₃ position in benzo-γ-pyrone nucleus. Interest in the bioflavonoids is related to their diversity, biological significance as secondary plant metabolites and ecological role [1], use as chemotaxonomic markers [2], impact on fruit quality [3], physiological effects [4–6] and industrial applications [7].

The flavonoids are potent antioxidants, free radical scavengers [8] and metal chelators; they inhibit lipid peroxidation [9] and exhibit various physiological activities [10–15], including anti-inflammatory [16], anti-allergic, anti-carcinogenic, antihypertensive and anti-arthritis activities [17].

Various methods have been developed for the determination of bioflavonoids and reviewed: capillary electrophoresis [18], thin-layer chromatography [19], gas-chromatography [20], high-performance liquid chromatography with UV/visible, fluorescence detection [21,22], and electrochemical detection modes [23].

HPLC techniques are now the most widely used both for separation and quantitation of phenolic compounds [24]. LC–MS and in particular LC–MS/MS methods have been recognized [25] as the best tool to analyze samples of biological origin due to their selectivity, sensitivity and speed of analysis.

Red onion and honey are food samples which are rich with bioflavonoids and constitute common part of the everyday diet [26,27]. Orange peel is not used for food but it is recommended as a flavoring agent to improve taste because it is rich in bioflavonoids [28].

Bioflavonoids narirutin, hesperidin, didymin, diosmin, sinensetin, nobiletin, tangeretin, quercetin, kaempferol, myricetin, luteolin, apigenin quercetin 3-glucoside, quercetin 7,4'-diglucoside, quercetin 3,7,4'-triglucoside, isorhamnetin 4'-glucoside and isorhamnetin

* Corresponding author. Tel.: +381 34 300261; fax: +381 34 335040.
E-mail address: preki@kg.ac.rs (P. Đurđević).

3,4'-diglucoside were analyzed in orange peel [29–32], red onion [33–44] and honey [45–50] employing HPLC–MS/MS techniques. The content of bioflavonoids (in mg/100 g fresh weight) in orange peel for hesperetin, hesperidin and quercetin were in the range 2.2–67 with LOD 0.03–0.4 µg/mL [28–32], for hesperetin, hesperidin, quercetin, rutin and kaempferol were in the range 0.001–192 with LOD 0.0004–5 µg/mL in red onion [26,33–44] and finally, for hesperetin, hesperidin, quercetin and kaempferol in honey were in the range 0.02–26 with LOD 0.01–3 µg/mL [27,45–50]. Main problems encountered in the analysis of these samples are ionization suppression or enhancement depending on “visible” and “invisible” matrix interferences. It was supposed that the matrix effect was eliminated by sample extraction and clean-up using SPE. The matrix effect can be a serious problem as it could severely compromise quantitative analysis of the compounds at trace levels as well as method reproducibility [51]. Little is known about the matrix effect due to co-eluting substances in red onion, orange peel and honey sample extracts. The matrix effect in determination of bioflavonoids in food samples was not studied to the best of our knowledge. Knowing the source and level of the matrix effect possibly false results in determination of bioflavonoids content in food samples could be eliminated.

Matrix effects in LC–MS analysis occur when molecules co-eluting with the compound/s of interest (analytes) alter the ionization efficiency of the electrospray interface. A matrix effect is defined as a change in the analytical signal caused by anything else in the sample other than analyte. The influence of matrix effect on the reliability of LC–ESI–MS/MS method was investigated in terms of trueness and precision of determination and it has been shown that when ionization suppression occurs, the sensitivity and limit of quantification of the method may be adversely affected [52].

The most effective way to eliminate matrix effect affecting trueness and precision of the analytical method is to use the standard addition technique [53]. Standard addition is especially appropriate when the sample composition is unknown or complex and affects the analytical signal. If small volume of concentrated standard is added to the unknown the concentration of the matrix will not be significantly changed. The assumption in standard addition method is that the matrix has the same effect on added analyte as it has on the original analyte in the unknown.

The aim of this study was to develop an optimized HPLC method in terms of resolution ($R_s \geq 1.5$), analysis time and selectivity which could be used in food quality control laboratories and nutritional and pharmaceutical research. As a part of the method development, the matrix effect was studied to establish the dependence of MS/MS response on type of sample and solvent used for extraction. In addition the purpose of this work was to evaluate the degree of the signal suppression by co-eluting substances in food samples extracts to correct matrix effect by appropriate adjustment of LC–MS/MS parameters. The data presented in this paper clearly demonstrate that the study of matrix effect should constitute an integral and important part of quantitative determination of bioflavonoids in food samples.

First the matrix effect on LC–ESI–MS/MS determination of bioflavonoids (rutin, hesperidin, hesperetin, quercetin and kaempferol) in some food samples (red onion, orange peel and honey) was recorded. Since the main source of matrix effect arises from extraction procedure we paid special attention to the extraction of analytes [54].

The extraction methodology for flavonoids generally includes extraction by solvents such as methanol, ethanol, acetone or mixture of solvent with water, cleaning-up and further fractionation by liquid–liquid extraction, column chromatography and solid-phase extraction. According to the literature [55–57], an ultrasonic bath at room temperature is a suitable extraction

method for flavonoids. The ultrasonic and Soxhlet extraction were compared since it is widely accepted that Soxhlet extraction of flavonoids yields 100% recovery [55,56]. For evaluation of the extent of matrix effect the postextraction addition method was used. In an attempt to optimize a method for a simultaneous determination of five flavonoids, we developed a clean-up of analytes from food sample matrix prior to LC–MS/MS analysis. Bearing in mind the polar nature of the analytes a commercially available Supelco LC-18 end-capped SPE cartridge was used for clean-up of bioflavonoids from the food matrix. The use of reversed-phase cartridge effectively eliminated the interfering material with efficient extraction of flavonoids. Analytes from the extract were separated by HPLC using C18 column and gradient elution with ESI–MS/MS detection. Quantification was performed using the standard addition method.

Bearing in mind important beneficial effects of bioflavonoids on human health, the results obtained in the present study may be of interest not only to analytical chemists but also to food chemists and nutritionists.

2. Experimental

2.1. Materials and solutions

Rutin hydrate (>95%), hesperidin (>85%), hesperetin (>80%), quercetin (>99%), kaempferol (>95%) and caffeine (>99%) were from Sigma-Aldrich (Vienna, Austria), acetic acid, acetonitrile and methanol (HPLC grade purity) were from JT Baker (Deventer, Holland). Water was obtained from a Millipore Milli-Q system (Watford, UK).

2.2. Preparation of stock and sample solutions

1.00 mg/mL rutin, hesperidin, hesperetin, quercetin and kaempferol standards in methanol were prepared. Working calibrators (0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0 and 10.0) µg/mL were prepared by appropriate dilution of these standard stock solutions with methanol. For standard addition method five solutions containing (10.0, 20.0, 40.0, 100.0 or 200.0) µg/mL of each flavonoid in methanol were prepared. Extracted samples were spiked with each of these solutions. Three food matrices were selected for the bioflavonoids analysis—red onion, orange peel and honey. Samples were purchased from an organic firm grocery. For sample treatment, the procedure of Vacek et al. [57] was followed. Samples were cut into small pieces and chopped. Water, methanol and acetonitrile extracts were prepared by extracting 10 g of the material with corresponding pure solvents. Honey was thoroughly mixed until a homogeneous sample was obtained. 10 g of sample was quantitatively transferred to beaker with water. Extraction with acetonitrile could not be performed due to formation of insoluble viscous material.

2.3. Soxhlet extraction

The ground powder of sample (5 g) and 50 mL of methanol were placed into the capsule. The extraction was performed for 120 min at 60 °C. After 120 min the extract was separated from the remaining material to which a new portion of 50 mL of methanol was added and extraction was continued for 60 min until completeness. The combined extract was evaporated in rotary vacuum evaporator to the volume of 5 mL and passed through a 0.45 µm microporous membrane filter; the filtrate was diluted with methanol in 10 mL normal flask to the mark and used for HPLC analysis. All extraction procedures were performed in triplicates for statistical analysis.

2.4. Ultrasonic extraction

The ground powder of sample (2.5 g) and 50 mL of methanol as solvent was first loaded into a 250 ml beaker and sealed by plastic film to avoid loss of solvent. The sample beakers were immersed into the ultrasonic cleaning bath for ultrasonication. After 30 min of extraction the extract was separated from the rest of the solid material on which was added a new portion of 50 mL of methanol and extraction was continued for 15 min. The combined extract was evaporated in rotary vacuum evaporator to the volume of 5 mL and passed through a 0.45 μm microporous membrane filter; the filtrate was diluted with methanol in 10 mL normal flask to the mark and used for HPLC analysis. All extraction procedures were performed in triplicates for statistical analysis.

The results shown in Fig. 1 indicate that no significant difference is found in extraction efficiency between Soxhlet and ultrasonic bath extraction method. Owing to its simplicity and rapidity, the ultrasonic bath extraction was chosen as the preferred method.

2.5. Development of the solid phase extraction procedure

The solid phase extraction was optimized in terms of cartridge and eluting solvent. To develop the most efficient SPE method five different cartridges (LC-C8, LC-SAX, LC-18, LC-NH₂ and DSC-NH₂) of different loading polarity, from the same manufacturer (Supelco, USA) were tested. The cartridges were pre-conditioned with 5 mL of tested solvent (methanol, acetonitrile or water) followed by 5 mL of deionized water. The standard solution of analyte mixture (0.1–0.3 mL) was diluted with water to 10 mL and this solution was forced through the cartridge at a flow rate of 1 mL/min. After loading, the SPE cartridge was washed with 5 mL of water and subsequently dried by vacuum drying at room temperature for 10 min. In this way excessive and residual water was removed from the cartridge. Finally, the analytes were eluted with 5 mL of tested solvents. The optimal extraction conditions in terms of efficacy and elution time was obtained with methanol as eluting solvent. The extracts obtained in this way were chromatographed and the efficiency of the method was calculated as ratio between peak areas of the standard solution before and after solid phase extraction multiplied by 100. The obtained recoveries (\pm standard deviation, SD) for extraction of flavonoids with different types of cartridges are presented in Table 1.

It may be seen from Table 1 that the best recoveries were obtained with Supelco LC-18 cartridge, so for further SPE we used this cartridge.

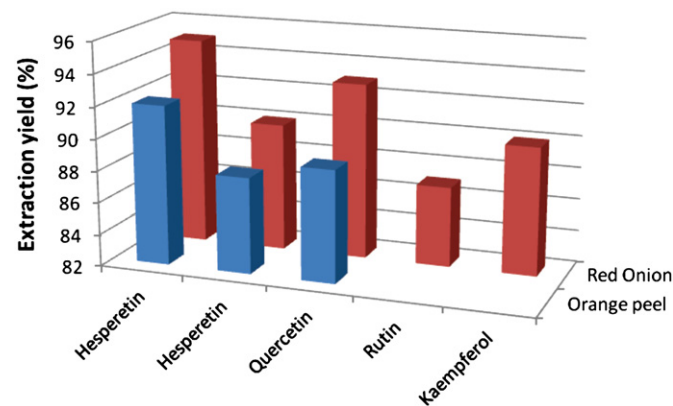


Fig. 1. Extraction yield of bioflavonoids from orange peel and red onion compared (normalized) to Soxhlet extraction.

Table 1

Recoveries \pm SD (%) of flavonoids obtained with different SPE cartridges.

Bioflavonoids	Supelco cartridges				
	LC-18	ENVI-18	DSC-18	SepPak Plus C18	DSC-SAX
Quercetin	97 \pm 2	77 \pm 2	54 \pm 1	70 \pm 2	74 \pm 1
Rutin	95 \pm 1	66 \pm 2	48 \pm 2	72 \pm 2	68 \pm 2
Hesperetin	96 \pm 2	86 \pm 2	54 \pm 2	64 \pm 2	65 \pm 1
Hesperidin	96 \pm 1	95 \pm 1	42 \pm 1	61 \pm 2	58 \pm 2
Kaempferol	93 \pm 4	95 \pm 1	48 \pm 2	67 \pm 2	61 \pm 2

2.6. Instruments

The separation was carried out using an HPLC system Perkin Elmer PE200 (Norwalk, CT, USA), composed of binary pump, autosampler and UV/VIS DAD detector. The mass spectrometer was 3200 QTRAP MS/MS (Applied Biosystems/MDS Sciex, USA) with electrospray ionization (ESI). The data were processed using an Analyst (PE Sciex) software. HPLC column was Phenomenex Gemini C18 (150 \times 4.6 mm, 3 μm particle size), Phenomenex, Torrance, USA. Solid phase extraction (SPE) was carried out with a Supelco (Bellefonte, PA, USA) vacuum tank on Supelco LC-18 cartridges.

Ultrasonic extraction experiments were carried out in ultrasonic cleaning baths produced by Elma Hans Schmidbaner GmGH and Co. KG Singen, Germany, which can work at 20 kHz, 60 kHz, and 100 kHz frequencies with a variable power output, and have a digital timer to set up time and a temperature controller.

2.7. LC-MS/MS conditions

All MS and MS/MS data were collected in negative ion ESI mode. Both quadrupoles (Q1 and Q3) were operated at unit resolution. To establish the optimum ESI conditions infusion of individual rutin, quercetin, hesperidin, hesperetin and kaempferol standard solutions was performed. Potentials were chosen to obtain the maximum resolution and intensity of the signals, clean spectral area as well as minimal background emission. The measurements were made at a 500 $^{\circ}\text{C}$ source temperature, -4500 V ion spray voltage, 300 V focusing potential. The assay is based on monitoring the $[\text{M}-\text{H}]^{-}$ ions for the analytes in the first quadrupole and their corresponding product ions in the third quadrupole with a dwell time of 50 ms. Selected reaction monitoring data were collected using a Sciex Analyst software. Working parameters and other instrumental parameters were manually adjusted to get the best performance from the instrument. Identification of precursor and product ions and MS/MS optimization were established by direct infusion of 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ solutions of single analyte in methanol. Infusion was made by a syringe pump. Typically, flow rate was 10 $\mu\text{L}/\text{min}$. The manual tuning of the instrument comprised the optimization of resolution, sensitivity and calibrating mass scale. Mass scale calibration was accomplished by 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of caffeine solution as calibration standard. Optimal experimental conditions are listed in Table 2.

For the LC separation the mobile phase composed of A: 2 wt% of acetic acid in water and B: acetonitrile was used. The solvents were mixed in a linear gradient: 0 min–85% A and 15% B, 5 min–85% A and 15% B, 25 min–10% A and 90% B, 30 min–10% A and 90% B, 35 min–85% A and 15% B, 40 min–85% A and 15% B; flow rate of the mobile phase was 0.7 mL/min, injected volume 20 μL .

3. Results and discussion

For quantitative LC-ESI-MS/MS the negative ionization mode was selected because of improved sensitivity due to the presence

Table 2
Optimal instrumental conditions for the analytes in ESI–MS/MS.

	Hesperetin	Hesperidin	Rutin	Quercetin	Kaempferol
GS1 (gas 1) the nebulizer gas (mL/min)			20		
GS2 (gas 2) the auxiliary gas (mL/min)			60		
TEM (temperature) (°C)			500		
CUR (curtain gas)			10		
Ion spray voltage (V)			–4500		
DP (declustering potential) (V)	–40	–57	–86	–21	–22
EP (entrance potential) (V)	–5	–5	–8	–8	–3
CE (collision energy) (eV)	–25	–34	–56	–31	–45
CXP (collision cell exit potential) (V)	–6	–9	–4	–12	–6

of hydroxyl groups which are easily deprotonated. Representative total ion chromatograms of methanol solution containing mixture of analytes and that of orange peel, red onion and honey extracts are shown in Fig. 2.

From Fig. 2a it can be seen that the investigated flavonoids are separated with resolutions $R_{s1,2}=1.3$ for the rutin and hesperidin, $R_{s2,3}=3.2$ for hesperidin and quercetin, $R_{s3,4}=2.1$ for quercetin and kaempferol and $R_{s4,5}=1.3$ for kaempferol and hesperetin. Peaks are resolved at a baseline so that conditions for good chromatography are fulfilled. The assignment of peaks in chromatograms of food samples was done on the basis of retention times and mass spectra corresponding to peak maxima by comparison with corresponding standards.

The matrix effect on simultaneous determination of quercetin, rutin, hesperetin, hesperidin, and kaempferol in food samples extracts (orange peel, red onion and honey) by the LC–ESI–MS/MS method was quantified. The efficient clean-up of analytes from the samples extracts was achieved by Supelco LC18 cartridges yielding the extracts free of particulate matter and endogenous interfering material.

3.1. Mass spectra and total ion chromatograms

In all analytes the precursor ion $[M-H]^-$ where M is the molecular mass of the respective analyte, is formed as a result of the loss of a proton to form a negatively charged molecular ion. The base peak and relative abundance in percents is for quercetin m/z 301 (100%), rutin m/z 609 (100%), hesperetin m/z 301 (100%), hesperidin m/z 609 (100%), and kaempferol m/z 285 (100%). Since the values of m/z are the same for rutin and hesperidin and for hesperetin and quercetin, further fragmentation (i.e. MS/MS mode) were employed for their identification and quantitation. The precursor and major product ions and relative abundance in percents of the analytes were monitored in selected reaction mode (SRM) as follows: quercetin 301→179 (63%), 301→151 (95%), 301→107 (31%), 301→97 (36%), rutin: 609→301 (12%), 609→273 (44%), 609→257 (24%), 609→179 (31%), hesperetin: 301→286 (37%), 301→244 (25%), 301→179 (34%), 301→151 (63%), hesperidin: 609→343 (45%), 609→325 (30%), 609→174 (37%), 609→151 (24%) and kaempferol: 285→256 (43%), 285→243 (29%), 285→228 (86%), 285→125 (61%). These MS/MS fragments were chosen because they the most intensive peaks in the product ion MS spectra. Possible fragmentation scheme for some analytes is given in Fig. 3.

3.2. Matrix effect evaluation

The matrix effect during the development of the analytical method may be examined by comparing MS/MS response (peak areas and heights) of an analyte in spiked sample extract with the MS/MS response of the same analyte present in the “neat” mobile phase, at several concentration levels. The relative matrix effect,

ME%, is defined as the difference between the MS/MS response of an analyte present in the real sample extract and response from the same analyte present in the “neat” mobile phase or a solvent, but without the compounds extracted from a real sample

$$ME(\%) = \frac{\text{peak area of post extraction} - \text{peak area of pure solution}}{\text{peak area of pure solution}} \times 100 \quad (1)$$

To investigate the influence of matrix effect on the determination of some bioflavonoids by post-extraction method, spiking of matrix with suitable concentrations (0.5 to 5.0 µg/mL) of analytes was employed (four concentration levels). First, water extract of food sample was prepared, then extracts were passed over the SPE cartridge, resulting in almost complete adsorption of bioflavonoids. Remaining isolated matrix was then spiked with known concentrations of bioflavonoids and resulting matrix effect, calculated using Eq. (1). The obtained results are given in Table 3.

The negative matrix effect represents a loss of the analytical signal (ion suppression) due to alterations in ionization efficiency. By inspecting the Table 3 it may be concluded that process efficiency is sufficiently high so that trueness and LOD may be obtained with satisfactory degree. The matrix effect decreases with increasing concentration of hesperetin and increases with increasing concentration of hesperidin. The matrix effect was generally much lower in honey than in other food samples. It is also less pronounced for the most intensive peaks in MS/MS spectra for all bioflavonoids. We tried to increase collision energy to optimize the formation of product ions. However, only a large number of fragments was obtained without improvement in the sensitivity of the assay.

To investigate the influence of solvents on the amount of co-eluting substances originating from the real sample extracts and on the MS responses, the standard solution of flavonoids was spiked into the extract of samples obtained with different solvents (methanol, acetonitrile and water). Matrix effect was calculated from Eq. (2)

$$ME(\%) = \frac{\text{peak area from standard addition} - \text{peak area from calibration curve}}{\text{peak area from calibration curve}} \quad (2)$$

The results are given in Table 4.

Increased ionization suppression was seen with methanol as compared to water for honey samples while in orange and onion the matrix effect was almost the same for different solvents. The ionization suppression was much less pronounced in the post-extraction addition than in the standard addition method (compare with Table 3). Postextraction addition as a calibration approach, however, is feasible only with closely matrix-matched extract without the analytes, which could be difficult to obtain. It was therefore decided to rely on standard addition procedure as a calibration method, which, although time-consuming, is

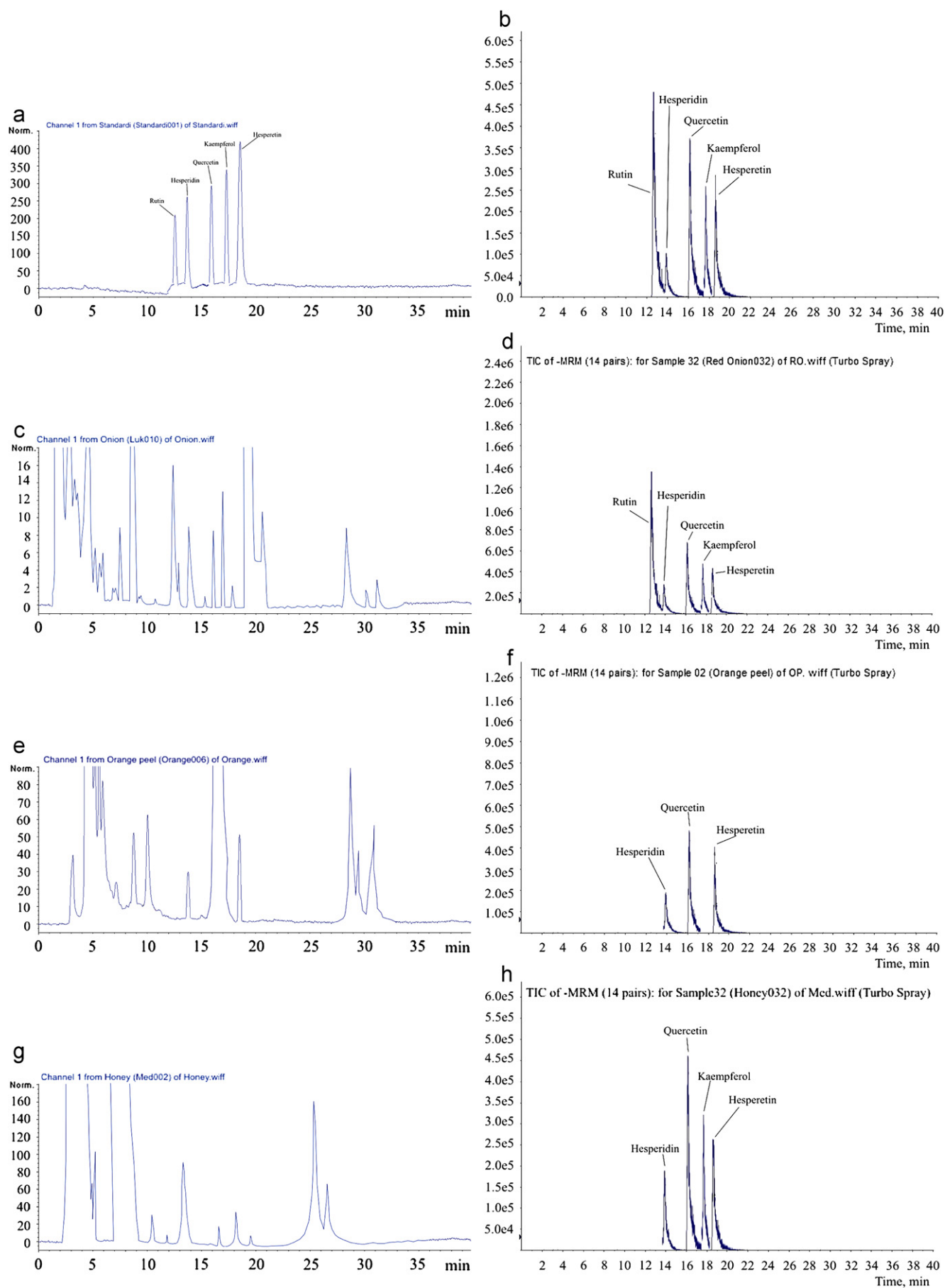


Fig. 2. (a) HPLC/UV chromatograms for bioflavonoid standards, (b) TIC (total ion chromatogram) of standards, (c) HPLC/UV chromatogram of red onion extract, (d) TIC red onion extract, (e) HPLC/UV chromatogram of orange peel extract, (f) TIC of orange peel extract and (g) HPLC/UV chromatogram of honey extract and (h) TIC of honey extract.

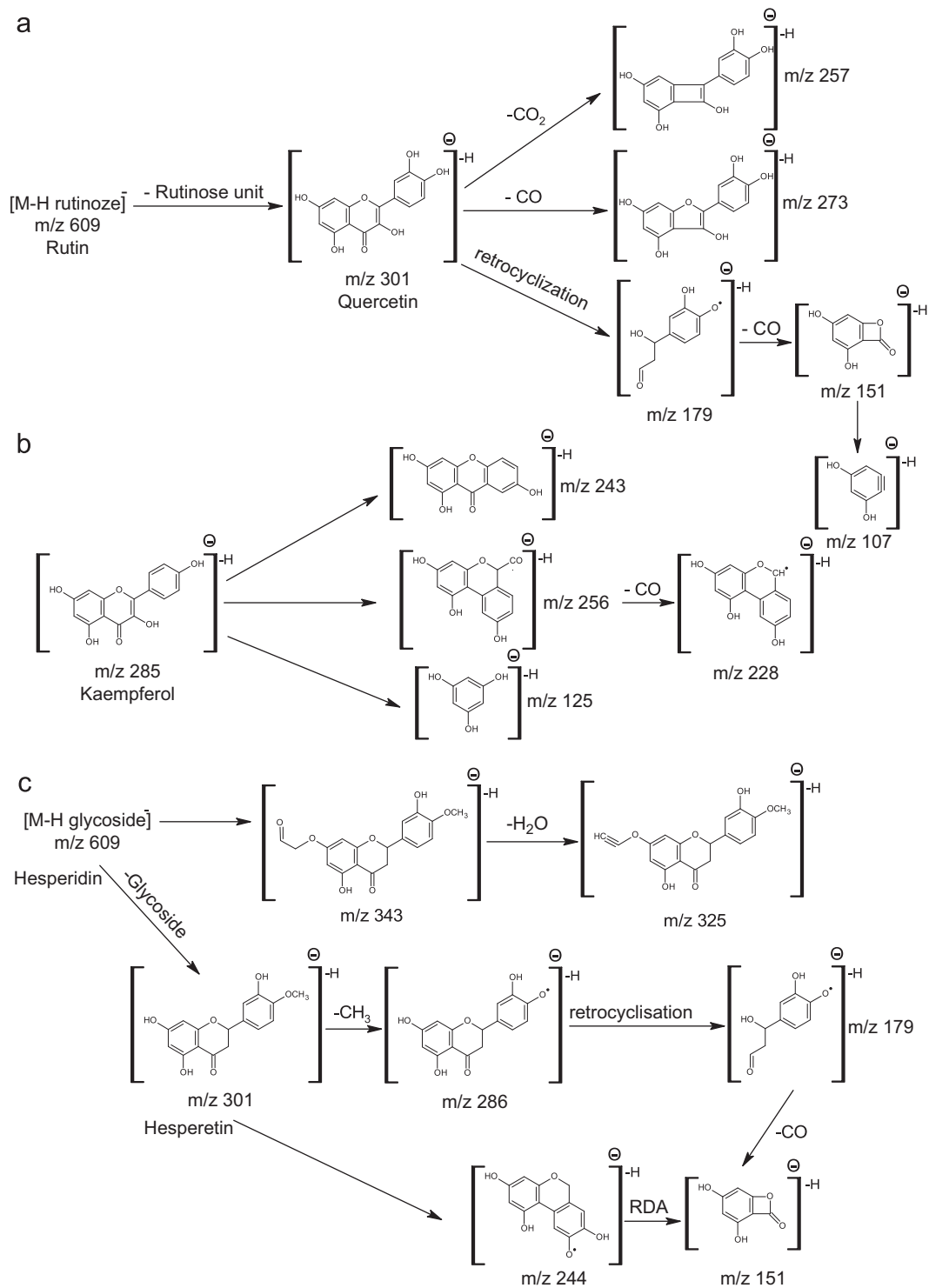


Fig. 3. Proposed fragmentation pathway for (a) rutin and quercetin (b) kaempferol and (c) hesperidin and hesperetin.

recommended as the most reliable in the analysis of samples with many interfering compounds [53].

Our method for preparation and clean-up of samples, did not result in a scrupulously clean extract. The method failed to sufficiently remove endogenous compounds such as polyphenolic acids and phospholipids from analytes. It is a result of the effort to achieve a compromise between high recovery of the analytes and low co-extraction of endogenous substances. Coelution of these compounds with the compounds of interest is the main source of matrix effect.

Coelution is unavoidable bearing in mind that retention of organic analytes (polyphenolic acids, bioflavonoids and biomacromolecules) from samples onto the SP material is determined primarily by hydrophobic interactions between nonpolar parts of biomolecules contained in extracts and hydrocarbon C18 chain from silica surface. Thus, hydrophobicity of molecules present in extract will play dominant role in their retention onto the SP cartridge material. Since, silica surface of C18 sorbent also contains some remaining OH groups, hydrogen bonding between ionized hydroxyl groups of SP material and carboxyl groups

Table 3
Matrix effect on determination of bioflavonoids extracted in H₂O by postextraction method in food samples.

	Conc. (µg/mL)	SRM transition	0.5 (ME ± SD) (%)	1.0 (ME ± SD) (%)	2.5 (ME ± SD) (%)	5.0 (ME ± SD) (%)	
Orange peel	Hesperetin	301/286	-33 ± 8	-30 ± 2	-28 ± 1	-24.45 ± 0.03	
		301/244	-41 ± 2	-40 ± 2	-38 ± 1	-30.8 ± 0.7	
		301/179	-41 ± 6	-39 ± 2	-39 ± 2	-30.2 ± 0.9	
		301/151	-36 ± 3	-35 ± 3	-34 ± 1	-29 ± 2	
	Hesperidin	609/343	-40.3 ± 0.2	-36.84 ± 0.06	-30.1 ± 0.5	-21.9 ± 0.4	
		609/325	-43.4 ± 0.2	-36.00 ± 0.09	-32.8 ± 0.1	-23.9 ± 0.1	
		609/174	-43 ± 1	-38.3 ± 0.7	-34 ± 1	-23.5 ± 0.5	
		609/151	-39.4 ± 0.2	-35.4 ± 0.2	-29.9 ± 0.6	-23 ± 2	
	Quercetin	301/179	-27 ± 2	-22 ± 5	-18 ± 3	-16 ± 2	
		301/151	-26 ± 2	-23 ± 4	-17 ± 2	-14 ± 1	
		301/107	-29 ± 3	-24 ± 3	-17 ± 2	-15 ± 2	
		301/97	-29 ± 3	-25 ± 4	-18 ± 3	-15 ± 2	
Honey	Hesperetin	301/286	-10 ± 1	-8 ± 1	-6 ± 2	-5 ± 2	
		301/244	-13 ± 2	-11 ± 3	-9 ± 1	-6 ± 4	
		301/179	-12 ± 3	-7 ± 2	-6 ± 2	-6 ± 1	
		301/151	-4 ± 3	-3 ± 2	-3 ± 2	-0.6 ± 0.3	
	Hesperidin	609/343	-15 ± 5	-8 ± 3	-6 ± 2	-3 ± 1	
		609/325	-23 ± 2	-16 ± 2	-8 ± 3	-8 ± 2	
		609/174	-15 ± 2	-10 ± 5	-5 ± 2	-4 ± 2	
		609/151	-25 ± 2	-20 ± 2	-9 ± 4	-5 ± 3	
	Quercetin	301/179	-16 ± 4	-10 ± 2	-6 ± 3	-4 ± 1	
		301/151	-16 ± 3	-11 ± 2	-7 ± 2	-4 ± 2	
		301/107	-16 ± 2	-11 ± 2	-7 ± 3	-3 ± 1	
		301/97	-16 ± 3	-10 ± 2	-7 ± 3	-4 ± 2	
	Kaempferol	285/256	-11 ± 2	-8 ± 3	-6 ± 1	-3 ± 2	
		285/243	-11 ± 2	-8 ± 3	-6 ± 1	-2 ± 2	
		285/228	-13 ± 2	-8 ± 3	-6 ± 2	-3 ± 3	
		285/125	-11 ± 2	-8 ± 4	-5 ± 1	-3 ± 3	
	Red onion	Hesperetin	301/286	-9.3 ± 0.4	-7.4 ± 0.7	-5 ± 2	-1 ± 5
			301/242	-11 ± 1	-10 ± 1	-8 ± 1	-3.0 ± 0.4
301/174			-13 ± 4	-12.2 ± 0.6	-10 ± 1	-6 ± 6	
301/150			-6 ± 2	-3 ± 2	-2 ± 2	-1.0 ± 0.8	
Hesperidin		609/343	-14 ± 2	-8 ± 4	-5.66 ± 0.05	-5 ± 3	
		609/325	-23 ± 7	-16.10 ± 0.03	-8.1 ± 0.9	-7.8 ± 0.2	
		609/174	-48 ± 7	-10 ± 2	-9 ± 2	-5 ± 1	
		609/151	-21 ± 5	-16 ± 7	-7 ± 3	-5 ± 1	
Quercetin		301/179	-22 ± 2	-17 ± 2	-11 ± 3	-5 ± 4	
		301/151	-23 ± 5	-16 ± 5	-12 ± 4	-5 ± 3	
		301/107	-22 ± 6	-15 ± 4	-12 ± 4	-5 ± 4	
		301/97	-23 ± 4	-14 ± 4	-11 ± 2	-5 ± 2	
Rutin		609/300	-17.2 ± 0.6	-15 ± 4	-10 ± 3	-6.4 ± 0.3	
		609/271	-15 ± 2	-12.6 ± 0.5	-6.8 ± 0.2	-5 ± 1	
		609/255	-48 ± 1	-20 ± 7	-14 ± 1	-9 ± 5	
		609/179	-14 ± 4	-12 ± 4	-9 ± 1	-3 ± 2	
Kaempferol		285/256	-20 ± 4	-16 ± 3	-12 ± 2	-4 ± 2	
		285/243	-19 ± 5	-15 ± 7	-11 ± 4	-5 ± 2	
		285/228	-19 ± 5	-14 ± 3	-10 ± 4	-5 ± 1	
		285/125	-18 ± 3	-15 ± 4	-10 ± 3	-5 ± 2	

present in phenolic acids and higher fatty acids or other acidic groups from biomacromolecules also contributes to retention. Thus, SP material will adsorb and retain not only analyte molecules but also other nonpolar molecules. Compound elution from SP material with polar solvent is similar to that of RP-LC i.e. more hydrophilic compounds (e.g. phenolic acid) elute first followed by those with increasing hydrophobicity. In our case elution order is phenolic acids before flavonoids.

Other biomacromolecules (lipids, fatty acids) are retained by SPE. From the above discussion it may be concluded that the main interferences for ES ionization and chromatographic separation of bioflavonoids would arise from polyphenolic acids, so the development of the LC method should involve separation of phenolic acids from analytes.

The result presented in Fig. 4 shows that co-eluting substances cause equal suppression because of the degradation of ionization efficiency. Degradation of ionization efficiency may be linked to the pronounced tendency of phenolic acids to release proton at lower energies than bioflavonoids leading to incomplete

dissociation of phenolic OH group of bioflavonoids. Also, hydrogen bond formation between carboxyl group from phenolic acids and OH from flavonoids may contribute to the effect.

A second process is linked to the increased viscosity and surface tension of the droplets produced in electrospray interface due to hydrophilic nature of phenolic acids. This could reduce capability of the analytes to be emitted in the ionized form from droplets (ion evaporation model of small ion formation in ESI) and to enrich gas phase.

3.3. Determination of bioflavonoids in food samples

The method to improve accuracy of the quantitation methods and eliminate interferences should be considered in the quantitation of bioflavonoids in food matrices. Complete removal of co-eluting substances by sample clean-up could not be achieved since in the case of our samples, the matrices are complex and different in composition from sample to sample. Consequently, even if the same extraction procedure is used for each sample, the

Table 4
Matrix effect (%) on bioflavonoids in food samples by standard addition method in different solvents.

Food sample	Compound	SRM transition	MeOH Mean ME (%) ± SD (%)	H ₂ O Mean ME (%) ± SD (%)	ACN Mean ME (%) ± SD (%)	
Orange peel	Hesperetin	301/286	-110 ± 1	-102 ± 1	-112 ± 1	
		301/244	-110 ± 1	-103 ± 1	-110 ± 1	
		301/179	-108 ± 1	-103 ± 1	-110 ± 1	
	Hesperidin	301/151	-127 ± 1	-102 ± 1	-111 ± 1	
		609/343	-151 ± 2	-109 ± 7		
		609/325	-103 ± 3	-108 ± 1		
	Quercetin	609/174	-101 ± 3			
		609/151	-98 ± 4	-96 ± 2		
		301/179	-87 ± 2	-77 ± 3	-95 ± 3	
		301/151	-85 ± 3	-74 ± 4	-93 ± 3	
		301/107	-85 ± 3	-76 ± 5		
	Honey	Hesperetin	301/286	-89 ± 2	-5 ± 6	
			301/244	-80 ± 2	-5 ± 7	
			301/179	-85 ± 1	-6 ± 5	
		Hesperidin	301/151	-84 ± 2	-4 ± 5	
609/343			-15 ± 4	-46 ± 8		
609/325			-19 ± 4	-42 ± 5		
Quercetin		609/174	-15 ± 3	-48 ± 4		
		609/151	-12 ± 3	-44 ± 2		
		301/179	-76 ± 5	-8 ± 4		
Kaempferol		301/151	-74 ± 4	-8 ± 4		
		301/107	-76 ± 5	-8 ± 4		
		301/97	-75 ± 5	-7 ± 4		
		285/256	-63 ± 3	-13 ± 6		
		285/243	-63 ± 2	-14 ± 7		
		285/228	-63 ± 4	-12 ± 7		
Red onion	Hesperetin	285/125	-62 ± 4	-12 ± 8		
		301/286	-72 ± 2	-94 ± 1	-87 ± 1	
		301/244	-74 ± 1	-96 ± 1	-85 ± 1	
	Hesperidin	301/179	-75 ± 1	-95 ± 2		
		301/151	-76 ± 2		-87 ± 1	
		609/343	-64 ± 3		-63 ± 4	
	Quercetin	609/325	-64 ± 2		-69 ± 1	
		609/174	-64 ± 5			
		609/151	-68 ± 6			
	Rutin	301/179	-71 ± 3	-52 ± 5	-32 ± 3	
		301/151	-71 ± 4	-53 ± 4		
		301/107	-71 ± 3	-52 ± 5	-31 ± 3	
		301/97	-71 ± 4	-51 ± 5		
	Kaempferol	609/301	-37 ± 1	-96 ± 4	-63 ± 2	
		609/273			-65 ± 2	
609/257		-30 ± 6	-99 ± 5	-66 ± 9		
609/179		-34 ± 6				
285/256		-64 ± 4	-38 ± 6	-49 ± 2		
	285/243	-64 ± 5	-38 ± 6			
	285/228	-61 ± 4	-39 ± 6	-47 ± 1		
	285/125	-65 ± 4				

extract solution may vary between samples. This means that the degree of signal suppressions by coeluting substances also varies from sample to sample. It is concluded that it will be difficult and impractical to remove co-eluting substances completely for the reduction of the signal suppression. Thus, as the method of choice in our case is standard addition method, that is, analyzing extract solution with added known quantity of standard solution; the calculation procedure is as follows:

$$X_i = \frac{I_x}{I_{s+x}}(S_f + X_f)$$

where X_i is the amount of bioflavonoids in the extract solution; S_f is the amount of bioflavonoids spiked into the extract solution; I_x is the signal intensity of bioflavonoids in the extract solution and I_{s+x} is the signal intensity of bioflavonoids in the spiked solution.

This method requires at least two LC–MS runs per analysis—the run of the extract sample and the run of the extract samples spiked with a known quantity of bioflavonoids.

3.3.1. Method performance and validation

After having developed a purification procedure for a given compound, a specific mass spectrometric measurement for a standard solution submitted to the procedure is expected to produce a satisfying signal, indicating a good recovery of the analyte. An identification and quantification processes based only on the target analyte signal can be very critical in case of ion suppression, but a systematic use of spiked extracted samples for calibration curves instead of standard solutions is clearly preferable.

The food samples were analyzed for bioflavonoids content by applying the method of standard addition. Prior to analysis, the performance of the method was checked by analyzing standard solutions of analytes prepared in methanol as solvent. Calibration curves for each analyte were constructed by plotting the peak area of the analyte against corresponding concentration. The curves were linear in the concentration range 0.05–10 µg/mL with regression parameters given in Table 5.

The trueness expressed as recovery ($=C_{\text{found}}/C_{\text{added}} \times 100$) and precision, expressed as relative standard deviation ($=SD \times 100/\bar{x}$) were calculated by analyzing 8 solutions with known concentration of analytes. Limit of detection (LOD) and limit of quantitation (LOQ) were estimated from the calibration curves for sufficiently low concentration of analytes (0.05–1.00 µg/mL) using the formula $k \times (S_b/a)$ where k is 3.3 for LOD and 10 for LOQ. S_b is the calculated standard deviation in intercept of calibration curve and a is its gradient. The obtained results are given in Table 6.

The standard addition method was performed by adding the unknown solution to 125 µL of standard solution, in a 5 mL volumetric flask, to the mark. Thus, no dilution with solvent was employed. The unknown concentration was assayed by plotting the corrected signal against the added concentration of the analytes. The unknown concentration was read as the x -intercept of the graph. The uncertainty of the intercept was calculated as

$$SD_x = \frac{s_y}{|a|} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{\bar{y}^2}{a^2 \times \sum (x_i - \bar{x})^2}} \quad (3)$$

where s_y is standard deviation in y —readings, a is the slope of least-squares line, n is a number of data points, x is concentration and y chromatographic response. The confidence interval was calculated as $t \times SD_x$ where t is a Student t for $n-2$ degrees of freedom.

The detection limits of rutin, hesperetin, hesperidin, quercetin and kaempferol in food samples were determined from the standard addition curves based on the definition of the concentration of analyte yielding a signal equivalent to three times the standard deviation of the non-spiked sample ($n=5$). The limit of detection was in the range 0.014–0.063 µg/mL indicating that the method has satisfactory performance for the determination of chosen bioflavonoids in real food samples.

The orange peel, red onion and honey samples were analyzed for quercetin, rutin, hesperetin, hesperidin and kaempferol content by using the standard addition method to the sample extracts. In Fig. 5, standard addition curve was plotted together with calibration curve obtained in methanol for hesperetin determination in orange peel. Large difference indicates a strong matrix effect. The linear standard addition curves were obtained in the concentration range of the added standard solutions of bioflavonoids 0.5–5.0 µg/mL (four concentration levels). Linearity

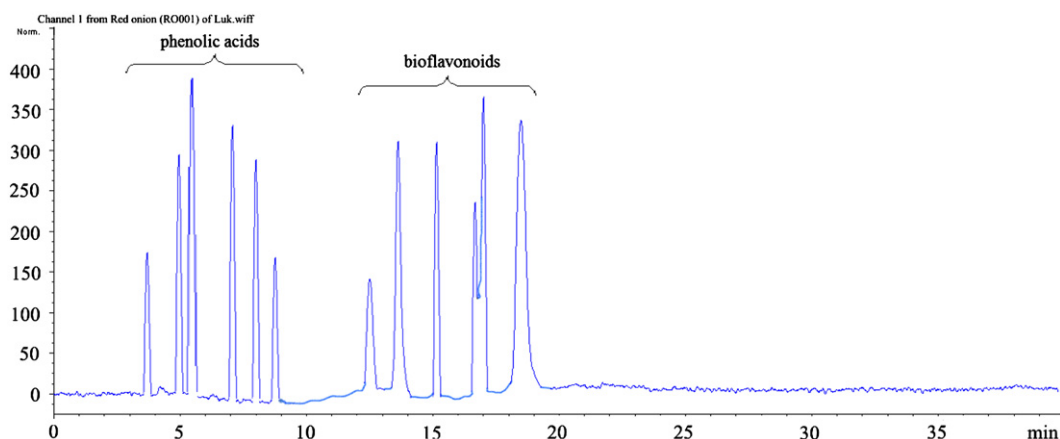


Fig. 4. HPLC/UV chromatograms of red onion extract after SPE.

Table 5

Regression equation ($Y=a+bX$; Y =area of the signal, X =concentration of analyte, $\mu\text{g/mL}$) for calibration curves at most intensive SRM transition.

Compound	SRM transition	Number of points, (N)	Slope (b) ($\times 10^5$)	Intercept (a) ($\times 10^4$)	Standard error ($\times 10^4$)	Correlation coefficient (r^2)
Hesperetin	301/286	8	3.07 ± 0.08	4.4 ± 0.3	7.9	0.9948
	301/244	8	1.82 ± 0.05	2.6 ± 0.2	4.8	0.9945
Hesperidin	609/325	8	4.83 ± 0.04	0.24 ± 0.02	0.4	0.9995
	609/174	8	9.64 ± 0.09	1.3 ± 0.3	8.6	0.9994
Quercetin	301/179	8	2.96 ± 0.09	1.93 ± 0.08	2.6	0.9987
	301/151	8	1.84 ± 0.06	1.64 ± 0.09	4.8	0.9931
Rutin	609/301	8	4.61 ± 0.07	3.1 ± 0.3	6.7	0.9984
	609/273	8	1.37 ± 0.02	0.73 ± 0.08	1.9	0.9986
Kaempferol	285/256	8	7.64 ± 0.08	3.65 ± 0.05	5.6	0.9941
	285/243	8	3.64 ± 0.09	2.31 ± 0.02	3.7	0.9976

Table 6

Statistical parameters of method validation for the LC-MS/MS analysis of bioflavonoids in food.

Conc added ($\mu\text{g/mL}$)		0.05	0.10	0.25	0.50	1.00	2.50	5.00	10.00	LOD	LOQ
Hesperetin	301/286	0.044	0.087	0.253	0.518	1.014	2.338	4.987	9.953	0.055	0.167
	Recovery (%)	88.0	87.0	101.2	103.6	101.4	93.5	99.7	99.5		
	RSD (%)	4.76	3.02	2.11	2.54	1.23	1.45	1.31	0.87		
	301/244	0.049	0.107	0.270	0.516	0.925	2.399	5.018	9.930	0.046	0.139
Hesperidin	609/325	0.047	0.075	0.226	0.477	1.009	2.517	5.174	9.909	0.045	0.136
	Recovery (%)	94.0	95.0	90.4	95.4	100.9	100.7	103.5	99.1		
	RSD (%)	4.56	4.59	2.23	2.28	0.14	1.72	5.05	0.29		
	609/179	0.063	0.091	0.238	0.468	0.986	2.445	5.209	9.913	0.049	0.148
Quercetin	301/179	0.0505	0.101	0.2525	0.505	1.01	2.626	5.02	10.3	0.043	0.130
	Recovery (%)	101.0	101.3	98.6	97.3	102.6	103.3	100.2	103.2		
	RSD (%)	3.87	4.62	4.03	2.69	3.98	4.67	2.36	2.47		
	301/151	0.0491	0.102	0.2613	0.523	1.136	2.587	5.13	10.35	0.041	0.124
Rutin	609/301	0.049	0.093	0.245	0.483	0.965	2.621	5.218	10.025	0.076	0.229
	Recovery (%)	98.0	93.0	98.0	96.6	96.5	104.8	104.4	100.3		
	RSD (%)	4.61	2.57	0.98	3.07	1.49	1.14	1.12	0.46		
	609/273	0.048	0.092	0.241	0.481	0.955	2.615	5.206	10.033	0.062	0.189
Kaempferol	285/256	0.057	0.114	0.285	0.57	1.14	2.964	5.31	11.4	0.039	0.118
	Recovery (%)	114.0	112.4	111.2	110.9	109.8	108.6	109.6	106.2		
	RSD (%)	3.56	4.67	4.59	4.37	3.28	3.67	2.89	2.57		
	285/243	0.056	0.124	0.264	0.567	1.15	2.56	5.31	10.6	0.04	0.121
Kaempferol	Recovery (%)	112.0	106.3	102.6	103.4	105.6	107.3	108.3	101.3		
	RSD (%)	4.57	4.69	4.78	3.85	3.67	2.94	2.68	2.47		

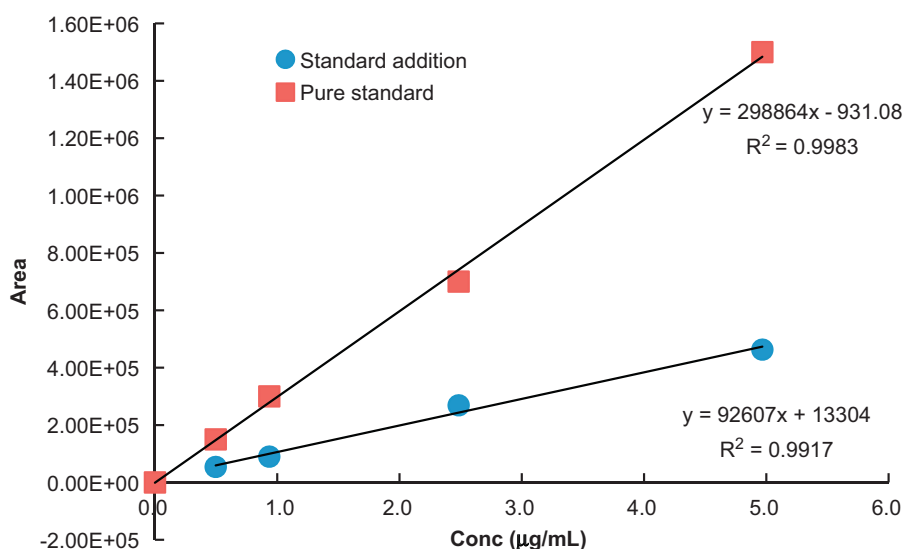


Fig. 5. Calibration curve for hesperetin in methanol and standard addition curve for hesperetin in orange peel extract.

Table 7
Flavonoid content in food samples, compared to other studies.

Food	Compound	Contents (mg/100 g fw) this study	CV (%)	Recovery (%)	x-intercept \pm SD _x	t-test	Contents (mg/100 g fw) other study
Orange peel	Hesperetin	36.4	5.87	91.5	0.14 \pm 0.08	0.2535	31–41.4 [29,30]
	Hesperidin	24.3	3.42	103.5	0.06 \pm 0.01	0.1205	18–66.5 [29,30]
	Quercetin	0.65	2.56	93.47	0.10 \pm 0.11	0.1758	0.00–2.20 [31,32]
Red onion	Hesperetin	0.0068	2.36	108.7	0.19 \pm 0.01	0.2402	0.0064–0.0076 [33–35]
	Hesperidin	0.016	3.59	87.6	0.04 \pm 0.04	0.0932	0.001–0.03 [33–35]
	Quercetin	56.3	3.68	99.37	0.24 \pm 0.02	0.2873	0.00–191.7 [35–41]
	Rutin	0.16	4.73	93.4	0.62 \pm 0.11	0.2663	0.17–0.27 [41]
	Kaempferol	1.63	5.61	92.4	0.41 \pm 0.11	0.1873	0.00–4.5 [42–44]
Honey	Hesperetin	0.072	3.38	105.6	0.63 \pm 0.23	0.2617	0.028–0.084 [45,46]
	Hesperidin	14	6.48	106.4	0.13 \pm 0.02	0.2822	12–26 [46]
	Quercetin	0.67	3.56	91.4	0.19 \pm 0.02	0.3014	0.02–1.3 [45–50]
	Kaempferol	0.14	4.1	87.65	0.38 \pm 0.06	0.1489	0.05–0.17 [45–50]

Fw-fresh weight, CV-coefficient of variation, SD_x-standard deviation of intercept.

was confirmed by the values of the regression coefficient higher than 0.98 and Cochran's test for homoscedasticity ($G_{\max} = s_{\max}^2 / \sum s_i^2$) was compared with tabulated value, null hypothesis about equality of individual point standard deviation, accepted if $G_{\max} < G_{\text{table}}$) indicated homogenous distribution of standard deviations.

The results of bioflavonoids determination in the chosen samples are given in Table 7.

Our values were compared with literature data for the bioflavonoid contents in food (see Table 7). Reasonably good agreement was obtained with published data using other detection modes.

4. Conclusion

A new LC–MS/MS procedure for the determination of bioflavonoids in food samples using the ultrasonic extraction method was developed to avoid hydrolysis of their glycosides and to have an insight into the real composition of the food. Excellent selectivity and sensitivity in determination of bioflavonoids were achieved by ESI ionization technique in SRM detection mode. During the method development the matrix effect accompanying the determination was evaluated. SPE and LC–ESI–MS/MS provide a novel method to determine levels of bioflavonoids in food. The advantage of the described method is quantitative extraction without the need for excessive sample clean-up steps. LC–ESI–MS/MS in addition to

being fast and specific provides sensitivity in the low $\mu\text{g/mL}$ range. Thus, the main advantage of the method is the rapid separation and specific detection. The standard addition method to quantify the bioflavonoids by calibration with the standard bioflavonoids solution added in the extract solution can serve as a very promising and practical approach to overcome matrix effects and has a great potential to be applicable to other matrices where the LC–ESI–MS/MS technique is used. Thus, the suppression of the ionization efficiency which occurs due to co-eluting substances and causes variation in LC–MS responses was overcome by the successful use of standard addition method.

Acknowledgment

Financial support from the Ministry of Education and Science of Republic of Serbia under the project 172016 is gratefully acknowledged. A.Ć. is grateful for scholarship from BASILEUS program (European Union under the auspices of University of Ghent). H.P. would like to acknowledge the financial support from the Slovenian Research Agency through P1-0153 research program.

References

- [1] J.B. Harborne, Acta Hort. 381 (1994) 36–43.
- [2] S. Kamiya, S. Esaki, G. Konishi, Agric. Biol. Chem. 43 (1979) 1529–1536.

- [3] R.L. Rouseff, ACS Symp. Ser. 143 (1980) 83–86.
- [4] G. Forkmann, The 16th International Conference of Groupe Polyphenols, Lisbon, 1992, vol. 16, pp. 19–27.
- [5] K. Herrmann, Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensmittel 12 (1970) 161–167.
- [6] V. Cody, E. Middleton, J.B. Harborne, A. Beretz, Plant Flavonoids in Biology and Medicine II: Biochemical, Cellular and Medicinal Properties, Alan R. Liss, New York, 1988, pp. 107–121.
- [7] A. Ortuno, D. Garcia-Puig, M.D. Fuster, M.L. Perez, F. Sabater, I. Porras, A. Garcia-Lidon, J.A. Del Rio, J. Agric. Food Chem. 43 (1995) 1–5.
- [8] M. Sato, N. Ramarathnam, Y. Suzuki, T. Ohkubo, M. Takeuchi, H. Ochi, J. Agric. Food Chem. 44 (1996) 37–41.
- [9] N.C. Cook, S. Samman, J. Nutr. Biochem. 7 (1996) 66–76.
- [10] E. Middleton, Chem. Abstr. 84 (1976) 426–435.
- [11] B.E. Leibovitz, J.A. Mueller, J. Opt. Nutr. 2 (1993) 17–35.
- [12] F.D. Dakora, Aust. J. Plant Physiol. 22 (1995) 87–99.
- [13] K. Raghavan, J.K. Buolamwini, M.R. Fesen, Y. Pommier, K.W. Kohn, J.N. Weinstein, J. Med. Chem. 38 (1995) 890–897.
- [14] A. Das, J.H. Wang, E.J. Lien, Prog. Drug Res. 42 (1994) 133–166.
- [15] L.U. Thompson, Food Res. Int. 26 (1993) 131–149.
- [16] M.A. Read, Am. J. Pathol. 147 (1995) 235–237.
- [17] R. Ficarra, P. Ficarra, S. Tommasini, M.L. Calabro, S. Ragusa, R. Barbera, A. Rapisarda, Farmaco 50 (1995) 245–256.
- [18] L. Suntornsuk, J. Pharm. Biomed. Anal. 27 (2002) 679–698.
- [19] E. Ragazzi, G. Veronese, J. Chromatogr. 77 (1973) 369–375.
- [20] P. Stremple, J. High Resolution Chromatogr. 19 (1996) 581–584.
- [21] M.A. Rodriguez-Delgado, S. Malovana, J.P. Perez, T. Borges, F.J. Garcia Montelongo, J. Chromatogr. A 912 (2001) 249–257.
- [22] P.C.H. Hollman, J.M.P. van Trijpp, M.N.C.P. Buysman, Anal. Chem. 68 (1996) 3511–3515.
- [23] P. Jandera, V. Skerikova, L. Rehova, T. Hajek, L. Baldrianova, G. Skopova, V. Kellner, A. Horna, J. Sep. Sci. 28 (2005) 1005–1022.
- [24] H.M. Merken, G.R. Beecher, J. Chromatogr. 897 (2000) 177–184.
- [25] R.A. Weintraub, B. Ameer, J.V. Johnson, R.A. Yost, J. Agric. Food Chem. 43 (1995) 1966–1968.
- [26] M. Soltoft, J.H. Christensen, J. Nielsen, P. Knuthsen, Talanta 80 (2009) 269–278.
- [27] K. Pyrzynski, M. Biesaga, Trends Anal. Chem. 28 (2009) 893–902.
- [28] M.S. Sawalha, D.E. Arráez-Román, A. Segura-Carretero, A. Fernández-Gutiérrez, Food Chem. 116 (2009) 567–574.
- [29] U. Justesen, P. Knuthsen, T. Leth, J. Chromatogr. A 799 (1998) 101–110.
- [30] P. Mattila, J. Astola, J. Kumpulainen, J. Agric. Food Chem. 48 (2000) 5834–5841.
- [31] R.L. Rouseff, S.F. Martin, C.O. Youtsey, J. Agric. Food Chem. 35 (1987) 1027–1030.
- [32] A. Lugasi, J. Hovari, Acta Aliment. 31 (2002) 63–71.
- [33] A.A. Franke, L.J. Custer, C. Arakaki, S.P. Murphy, J. Food Compos. Anal. 17 (2004) 1–35.
- [34] P.R. Arabbi, M.I. Genovese, F.M. Lajolo, J. Agric. Food Chem. 52 (2004) 1124–1131.
- [35] M. Marotti, R. Piccaglia, J. Food Sci. 67 (2002) 1229–1232.
- [36] B.S. Patil, L.M. Pike, J. Hortic. Sci. Biotechnol. 70 (1995) 643–650.
- [37] B.S. Patil, L.M. Pike, S.Y. Kil, J. Am. Soc. Hortic. Sci. 120 (1995) 909–913.
- [38] A. Crozier, M.E.J. Lean, M.S. McDonald, C. Black, J. Agric. Food Chem. 45 (1997) 590–595.
- [39] K.R. Price, J.R. Bacon, M.J.C. Rhodes, J. Agric. Food Chem. 45 (1997) 938–942.
- [40] K.R. Price, M.J.C. Rhodes, J. Sci. Food Agric. 74 (1997) 331–339.
- [41] J. Kiviranta, K. Huovinen, R. Hiltunen, Acta Pharm. Fenn. 97 (1988) 67–72.
- [42] T. Bahroun, A. Luximon-Ramma, A. Crozier, O. Arouma, J. Sci. Food Agric. 84 (2004) 1553–1561.
- [43] A. Bilyk, P.L. Cooper, G.M. Sapers, J. Agric. Food Chem. 32 (1984) 274–276.
- [44] A. Lugasi, J. Hovari, Acta Aliment. 29 (2000) 345–352.
- [45] L. Yao, Y. Jiang, B. D'Arcy, R. Singanusong, N. Datta, N. Caffin, K. Raymont, J. Agric. Food Chem. 52 (2004) 210–214.
- [46] L. Yao, Y. Jiang, R. Singanusong, B. D'Arcy, N. Datta, N. Caffin, K. Raymont, Food Res. Int. 37 (2004) 166–174.
- [47] M.I. Gil, F. Ferreres, A. Ortiz, E. Subra, F.A. Tomás-Barberán, J. Agric. Food Chem. 43 (1995) 2833–2838.
- [48] F. Ferreres, J.M. Giner, F.A. Tomás-Barberán, J. Sci. Food Agric. 65 (1994) 371–372.
- [49] P. Truchado, F. Ferreres, F.A. Tomás-Barberán, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 7241–7248.
- [50] J.S. Bonvehí, M.S. Torrento, E.C. Lorente, J. Agric. Food Chem. 49 (2001) 1848–1853.
- [51] I. Erlund, Nutr. Res. 24 (2004) 851–874.
- [52] B.K. Matuszewski, M.L. Constanzer, C.M. Chavez-Eng, Anal. Chem. 70 (1998) 882–889.
- [53] M. Stuber, T. Reemtsma, J. Anal. Bioanal. Chem. 378 (2004) 910–916.
- [54] H. Merken, G.R. Beecher, J. Agric. Food Chem. 48 (2000) 577–599.
- [55] M. Ye, Y. Li, Y.N. Yan, H.W. Liu, X.H. Ji, J. Pharm. Biomed. Anal. 28 (2002) 621–628.
- [56] A. Escarpa, M.C. Gonzalez, Chromatography 51 (2000) 37–44.
- [57] J. Vacek, B. Klejdus, L. Lojtkov, V. Kub, J. Sep. Sci. 31 (2008) 2054–2067.

Chemometric-Assisted Optimization of RP-HPLC Method for Determination of Some Bioflavonoids in *Brassica oleracea* Species and Their Antioxidative Activity

Andrija R. Ciric · Nevena Ivanovic · Milica S. Cvijovic ·
Milena Jelikic-Stankov · Ljubinka Joksovic ·
Predrag T. Djurdjevic

Received: 25 May 2013 / Accepted: 14 November 2013 / Published online: 28 November 2013
© Springer Science+Business Media New York 2013

Abstract In the present work, the rapid RP-HPLC method with UV (DAD) detection for simultaneous quantification of bioflavonoids: quercetin, apigenin, catechin, epicatechin, kaempferol, and luteolin in *Brassica oleracea* species samples (cauliflower, broccoli, and Brussels sprouts) was developed with the aid of LC-Simulator (ACD Labs® suite) software. A series of extracts obtained with different extraction method were evaluated for antioxidant activity. The optimal conditions for separation and quantification were established after nine scouting runs entered to LC-Simulator software. The optimized separation was achieved on Hypersil GOLD aQ column with isocratic elution and mobile phase composition A:2 % acetic acid in water and B:acetonitrile in 91:9 (v/v %) ratio. The R_s values were in the range from 2.6 to 8.00, indicating good selectivity of the method. The obtained results generally show good agreement with published data. Low detection limits (0.02–0.055 $\mu\text{g/mL}$) were obtained with acceptable recoveries (90–109 %). Total time of analysis was less than 11 min; therefore, the proposed method represents significant improvement over existing methods. Extracts from *Brassica* vegetables, obtained using different extraction procedures, were studied for their radical scavenging effects. Scavenging of DPPH showed different kinetics at the

beginning of the assay period and after 15 min from the initialization of reaction. Different kinetics suggested the presence of polymerized and/or less active antioxidants with different scavenging mechanisms for particular polyphenolic compounds.

Keywords Computer optimization · Bioflavonoid · *Brassica* vegetables · Standard addition · Antioxidative activity

Introduction

Flavonoids are a large class of phenolic compounds which are subclassified as flavones, flavonols, isoflavones, flavanones and catechins, chalcones, and anthocyanidins depending on phenyl substituent in the C_2 or C_3 position in benzo- γ -pyrone nucleus. Interest in the bioflavonoids is related to their diversity, biological significance as secondary plant metabolites and ecological role (Harborne 1994), use as chemotaxonomic markers (Kamiya et al. 1979), impact on fruit quality (Rouseff 1980), physiological effects (Forkmann et al. 1992; Herrmann 1970; Cody et al. 1988), and industrial applications (Ortuno et al. 1995).

The flavonoids are potent antioxidants, free radical scavengers (Sato et al. 1996), and metal chelators; they inhibit lipid peroxidation (Cook and Samman 1996) and exhibit various physiological activities (Middleton 1976; Leibovitz and Mueller 1993; Dakora 1995; Raghavan et al. 1995; Das et al. 1994), including anti-inflammatory (Thompson 1993), anti-allergic, anticarcinogenic, antihypertensive, and antiarthritic activities (Read 1995). Structures of investigated bioflavonoids are presented in Fig. 1.

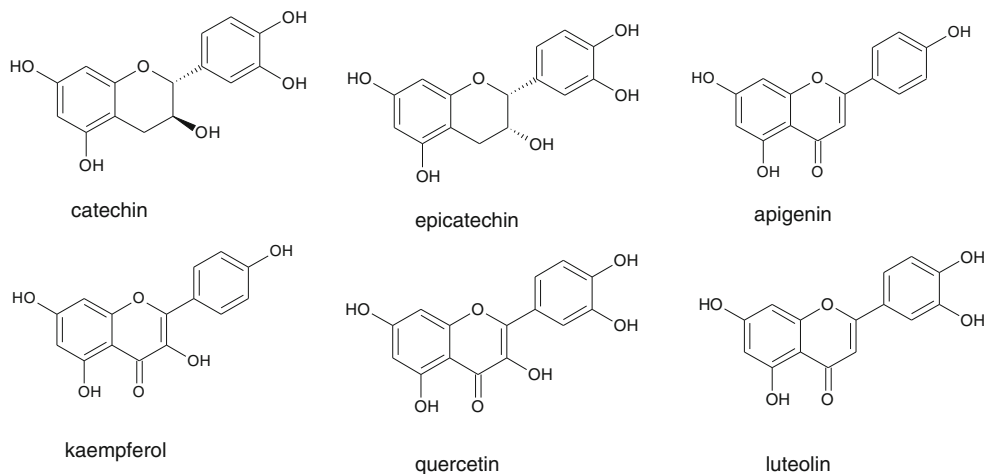
In the present paper, we aimed to develop the method for simultaneous determination of several bioflavonoids in species *Cruciferae brassica*. *Brassica* vegetables have been found to be a significant host of antioxidant phytochemicals

A. R. Ciric · N. Ivanovic · L. Joksovic · P. T. Djurdjevic (✉)
Faculty of Science, University of Kragujevac, P.O. Box 60,
34000 Kragujevac, Serbia
e-mail: preki@kg.ac.rs

M. S. Cvijovic
Faculty of Agronomy, University of Kragujevac,
32000 Čačak, Serbia

M. Jelikic-Stankov
Faculty of Pharmacy, University of Belgrade,
Vojvode Stepe 452, 11000 Belgrade, Serbia

Fig. 1 Structure of investigated bioflavonoids



(polyphenols, flavonoids, flavanols, and anthocyanins), glucosinolates, and plant proteins (Weintraub et al. 1995). The major contributor to *Brassica* vegetables antioxidant activity are their polyphenolic compounds content. Thus, food samples were assayed for their antioxidative activity.

Various methods have been developed for the determination of bioflavonoids in plants and reviewed capillary electrophoresis (Ficarra et al. 1995), thin-layer chromatography (Suntornsuk 2002), gas chromatography (Ragazzi and Veronese 1973), high-performance liquid chromatography with UV/visible, fluorescence detection (Stremple 1996; Rodriguez-Delgado et al. 2001), and electrochemical detection modes (Hollman et al. 1996).

HPLC techniques are now the most widely used both for separation and quantitation of phenolic compounds (Jandera et al. 2005). LC-MS and in particular LC-MS/MS methods have been recognized (Merken and Beecher 2000) as the best tool to analyze samples of biological origin due to their selectivity, sensitivity, and speed of analysis.

Several HPLC methods have been reported for bioflavonoids determination in *Brassica* vegetables. Hertog et al. (1992) determined quercetin and kaempferol in *Brassica* vegetables. Content of quercetin and kaempferol in cauliflower and Brussels sprout was less than 1 mg/kg fresh edible parts, while in broccoli was 30 mg/kg of quercetin and 70 mg/kg kaempferol. Vallejo et al. (2004) isolated and structurally characterized the flavonoids from broccoli inflorescences by LC/UV-DAD/ESI-MS method. A large number of hydroxycinnamic acid esters of kaempferol and quercetin glucosides have been characterized. The structures of the flavonoid glycosides were analyzed after alkaline hydrolysis and were identified as 3-sophoroside/sophorotrioxide-7-glucoside/sophoroside of kaempferol, quercetin, and isorhamnetin, but their quantification was not performed. Price et al. (1998a) found two main flavonol glycosides in broccoli florets identified as quercetin 3-*O*-sophoroside and kaempferol 3-*O*-sophoroside. Three minor glucosides of

quercetin and kaempferol were also detected, namely isoquercitrin, kaempferol 3-*O*-glucoside, and a kaempferol diglucoside. The sophorosides of quercetin and kaempferol were present in raw florets at a level of 65 and 166 mg/kg fresh weight, respectively. The total content of quercetin and kaempferol glycosides expressed as aglycone was 43 and 94 $\mu\text{g/g}$ fresh weights, respectively. Justesen et al. (1998) used high-performance liquid chromatographic (HPLC) separation method with photo-diode array and mass spectrometric (MS) detection for determination and quantification flavanols, flavones, and flavanones in fruits, vegetables, and beverages. They quantified quercetin and kaempferol in amount of 3.7 mg/100 g and 6.0 mg/100 g in broccoli and 0.6 mg/100 g and 0.9 mg/100 g in Brussels sprout, respectively. Sikora et al. (2012) applied different preparation method on kale, broccoli, Brussels sprouts, and white and green cauliflower. They identified derivatives of hydroxycinnamic acid (caffeic acid, *p*-coumaric acid, and sinapic acid) and flavonols—kaempferol and in smaller amounts, quercetin. The high content of above components was found in kale (total 94.4 mg/100 g of fresh matter), whereas the smallest amounts were found in white and green cauliflower, 3.6 mg/100 g and 3.03 mg/100 g, respectively.

Main problems encountered in the analysis of these samples are “visible” and “invisible” matrix interferences. The matrix effect can be a serious problem as it could severely compromise quantitative analysis of the compounds at trace levels as well as method reproducibility (Erlund 2004). The most effective way to eliminate matrix effect affecting trueness and precision of the analytical method is to use the standard addition technique (Stuber and Reemtsma 2004). Standard addition is especially appropriate when the sample composition is unknown or complex and affects the analytical signal.

By reviewing the above literature data, it can be concluded that separation and quantification of a large number of flavonoids potentially present in *Brassica* species were not performed.

The main goal of the present investigation was to develop and validate precise, accurate, rugged, and reliable method for separation of bioflavonoids in food samples in a reasonable analysis time by adjusting acceptable chromatographic factors. This method would be suitable for routine use in food quality control with regards to the wide range of flavonoid concentration in food samples and large number of samples needed to be analyzed in a short time. To achieve this goal, optimization of chromatographic parameters, the mobile phase composition, pH, flow rate, type of chromatographic column, and temperature is required. Simultaneous optimization of that many parameters requires computer oriented chemometric approach in order to simplify and accelerate the optimization process. In the present study, a computer simulation software LC-Simulator (ACD Labs, Toronto, Ontario, Canada) was used in developing and optimizing a reverse-phase HPLC separation of bioflavonoids.

There are three varieties of *Brassica* and each has its own use. Information on the antioxidative capacities of phenolics and flavonoids in all varieties of *Brassica* species are very controversial. Therefore, the other part of the present research was aimed to evaluate the antioxidant activities in different extracts of three varieties of *Brassica* species.

Materials and Solutions

Catechin, (2*R*,3*S*)-2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,4-dihydro-2*H*-chromene-3,5,7-triol (C₁₅H₁₄O₆) (>98 %); epicatechin, (2*R*,3*R*)-2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,4-dihydro-1(2*H*)-benzopyran-3,5,7-triol (C₁₅H₁₄O₆) (>90 %); apigenin, 5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-4*H*-1-benzopyran-4-one (C₁₅H₁₀O₅) (>95 %); kaempferol, 3,5,7-trihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-4*H*-chromen-4-one (C₁₅H₁₀O₆) (>98 %); quercetin, 2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,5,7-trihydroxy-4*H*-chromen-4-one (C₁₅H₁₀O₇) (>99 %); and luteolin, 2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy-4-chromenone (C₁₅H₁₀O₆) (>94 %) were all from Sigma-Aldrich (Vienna, Austria); acetic acid was from HEMO (Serbia), Folin-Ciocalteu phenol reagent from Merck (Darmstadt, Germany), acetonitrile was from J.T. Baker (Deventer, Holland), and methanol (HPLC grade purity) was from Sigma-Aldrich (Vienna, Austria); DPPH (di(phenyl)-(2,4,6-trinitrophenyl)iminoazanium) was from Sigma-Aldrich (Vienna, Austria). Water was obtained from a Millipore Milli-Q system (Watford, UK). Fresh and frozen samples of cauliflower, broccoli, and Brussels sprout were purchased from a local store.

Sample Preparation

Three food matrices were selected for the bioflavonoid analysis—cauliflower, broccoli, and Brussels sprouts. Samples were cut into small pieces and chopped. Frozen sample were

first thawed and air-dried. Comminution and homogenization of samples were performed using food processor (Hamilton Beach/Proctor-Silex Inc., Southern Pines, NC, USA) and homogenizer (Silent Crusher, Heidolph, Schwabach, Germany), respectively. Homogenization was carried out for 5 min until particle size was uniform and less than 5 µm.

Preparation of Stock and Sample Solutions

Stock solutions of catechin, epicatechin, apigenin, kaempferol, quercetin, and luteolin standards concentration of 1.00 mg/mL in methanol were prepared. For standard addition method, five solutions containing 0.1 µg/mL quercetin, 0.1 µg/mL kaempferol, 0.05 µg/mL apigenin, 0.03 µg/mL catechin, 0.03 µg/mL epicatechin, and 0.02 µg/mL luteolin in methanol were prepared. Extracted samples were spiked with each of these solutions. Water and methanol extracts were prepared by extracting 2 g of the material with corresponding pure solvents.

Methods of Extraction

According to the literature data (Ye et al. 2002a; Escarpa and Gonzalez 2000a; Olsen et al. 2009; Brusotti et al. 2010; Price et al. 1998b), several extraction methods were investigated in the present paper: Soxhlet, ultrasonic, boiling with water, and extraction by maceration.

The solvent, extraction time, and temperature were chosen on the basis of the literature data (Ye et al. 2002a; Escarpa and Gonzalez 2000a; Olsen et al. 2009; Brusotti et al. 2010; Price et al. 1998b). To find the most effective method, various ways of extraction were tested.

Soxhlet Extraction

The ground powder of sample (2 g) and 50 mL of methanol were placed into the capsule. The extraction was performed for 120 min at 60 °C (Escarpa and Gonzalez 2000a). After 120 min, the extract was separated from the remaining material to which a new portion of 50 mL of methanol was added and extraction was continued for 60 min until completeness. The combined extract was evaporated in rotary vacuum evaporator to the volume of 5 mL and passed through a membrane filter; the filtrate was diluted with methanol in 25 mL normal flask to the mark and used for HPLC analysis.

To ascertain that the remaining sample does not contain bioflavonoids, qualitative tests on bioflavonoids were made. Reaction with Fe(III) (Mira et al. 2002) and Folin-Ciocalteu phenol reagent (Singleton and Rossi 1965) was performed. The reactions were negative and did not show presence of bioflavonoids, so the extraction of bioflavonoids was complete with 100 % efficiency.

Ultrasonic Extraction

The ground powder of sample (2 g) and 50 mL of methanol as solvent was first loaded into a 250-mL beaker and sealed by plastic film to avoid loss of solvent. The beakers were immersed into the ultrasonic bath for ultrasonication at 35 kHz frequency and 150 W power. After 30 min of extraction at 40 °C, the extract was separated from the rest of the solid material on which was added a new portion of 50 mL of methanol and extraction was continued for 15 min. Further procedure is the same as in the case of Soxhlet extraction.

Extraction by Maceration

The ground powder of sample (2 g) is measured, and extraction was performed with 25 mL of 70 % methanol as solvent in the mortar. Further procedure is the same as in the case of Soxhlet extraction.

Water Extraction

The ground powder of sample (2 g) is measured, and extraction was performed with 100 mL of boiled water. Further procedure is the same as in the case of Soxhlet extraction.

Instruments

A HPLC system (Shimadzu, Kyoto, Japan) consisted of degasser DGU-20A3, analytical pumps LC-20AT, manual injector 7125 and SPD-M20A diode array detector, and CBM-20A system controller. A reversed-phase Hypersil GOLD aQ (150×4.6 mm, particle size 5 µm) column (Bellefonte, PA, USA) was used for separation. The chromatographic data were processed using LC Solution computer software (Shimadzu). UV spectrophotometer was Lambda 45 (Perkin-Elmer, USA) with operating software WinLab. Ultrasonic extraction experiments were carried out in ultrasonic bath (Bandelin Sonorex Super) Model RK 512H.

Free Radical Scavenging Activity

Free radical scavenging capacity of the *Brassica* species was determined according to the previously reported procedure using the stable 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH) (Ali et al. 2001; Marina et al. 1998). Freshly prepared DPPH solution 0.2 mL (1 mg/mL) in methanol was added to 3 ml of diluted each *Brassica* extracts to start the radical antioxidant reaction. The decrease in absorbance was measured at different time intervals, i.e., 0, 5.0, 10.0, 15.0, 20.0, 25.0, and 30.0 min at 517 nm. The remaining concentration of DPPH in the reaction mixture was calculated using equation:

$$\% \text{ of DPPH remaining} = \frac{[\text{DPPH}]_t}{[\text{DPPH}]_{t=0}} \times 100$$

where t is the current time.

The absorbance measured at 10 min of the antioxidant–DPPH radical reaction was used to compare the DPPH radical scavenging capacity of each *Brassica* vegetable extract.

Results and Discussion

Method Development

Bearing in mind that all analytes are ionizable substances, one may expect the strong influence of pH on separation. Developing of a chromatographic assay for this class of compound is challenging owing to the similar structure and physicochemical properties. The aim of the method was the direct measurement of the bioflavonoids in food samples based on the use of single column chromatography with UV detection. The conditions for method development were chosen on the basis of polarity of analytes and polarity of the mobile phase.

Method development started with Hypersil GOLD aQ column (150×4.6 mm, 5 µm particle size) with hybrid organic/inorganic packing material. Different mobile phase compositions were evaluated to obtain chromatograms with good resolution of the eluting species within an acceptable time of analysis. The mobile phase was chosen after several trials with methanol, acetonitrile, and water in various proportions at different pH values under different gradient elution schemes. To improve the peak shape, acetic acid (Chunsiimyataev et al. 2009; Li et al. 2007; Jin et al. 2003; Zu et al. 2006; Irakli et al. 2012) was added as a mobile phase modifier to inhibit dissociation of the phenolic hydroxyl group of phenolic compounds (Lui et al. 2008). Changes in the pH value of the mobile phase also had a significant effect on the resolution of compounds. According to Michalkiewicz et al. (2008), the increase in pH of the mobile phase dramatically reduces the retention of bioflavonoids. When the gradient elution system starts with acidified water followed by gradient increase of methanol, separation of bioflavonoids can be achieved under a long run time due to low resolution. Starting the elution with acidified water and acetonitrile, separation of bioflavonoids was improved and the analysis run time decreased. Wavelengths at 260 and 280 nm were chosen as monitoring wavelengths according to absorption maxima of the analytes.

Optimization RP-HPLC Conditions

Because of similar structure and properties of bioflavonoids, it is very difficult to separate them in short run time, low mobile phase consumption, and low content of organic modifier in the mobile phase. Bioflavonoids are weak heterocyclic acid (Perron and Brumaghim 2009) with three to five dissociation sites: first corresponding to proton loss from hydroxyl group

in position 7 (pKa~8), second corresponding to proton loss from position 4'-OH group (pKa~9.5), and other two constants are due to the 3-OH (pKa~8 10.5) and 5-OH (pKa~12.5) groups. Thus, bioflavonoids may exist in solution in neutral, and three to five anionic forms (-1 to -5 charge). Relative percentages of these forms in solution depend upon the pH of the solution. Since the stationary phase best retains the neutral or low charged anionic forms of bioflavonoids, the pH interval for their maximum formation should be known and fixed. Hence, their separation on reverse-phase column is difficult. The problems involve broad tailing peaks (Zhang and Xiang 2002), too early elution (acetonitrile >15 %) with low efficiency of separation. So, to achieve quality separation of bioflavonoids, a RP-C18 Hypersil GOLD aQ column was used. According to the manufacturer's recommendations, the column can be used over a pH range 2–10 and content of organic modifier in mobile phase should be less than 15 %. In order to keep capacity factors to be neither too low (bad resolution) nor too high (lack of sensitivity and long analysis time), the mobile phase composition and the pH must be optimized. The composition of mobile phase used for chromatography may have a strong UV absorbance gradient chromatography may have a sloping baseline, which could obscure analyte peaks. Optimization usually involves simultaneous adjustment of both the composition and pH of the mobile phase. Thus, the optimization of mobile phase composition for isocratic elution was conducted using LC-Simulator software.

The computer-assisted chromatographic method development is the necessity for tracking the movement of the peaks as separation conditions are changed. Peak increments are than used to build a mathematical model capable of minimizing the number of experiments in an optimization runs. LC-Simulator software can perform optimization analysis of experimental chromatograms and build prediction models which relate the experimental variables (%B, buffer concentration,

temperature, etc.) with retention factor (Bogomolov and McBrien 2003). Results are displayed as resolution maps illustrating resolution of critical pair. Resolution maps show how changes in the method affect the separation. Concentration profiles are obtained by means of least-square multivariate curve analysis.

The software allows simultaneous optimization of one or two variables with input parameters, such as retention time, peak area, and peak-width under chosen chromatographic conditions (column, temperature, and gradient or isocratic elution) and its visualizing peak movements, which are essential to understand robustness of an HPLC method. The resolution map of one-dimensional optimization (1D) is two-dimensional graph whereas the resolution map of a two-dimensional optimization (2D) is a three-dimensional contour plot in which the critical resolutions as a third dimension is color coded. Sliding a diamond-shaped cursor to the region of maximum critical resolution, one is able to optimize values of parameters and simulated chromatogram can be obtained so that best experimental conditions can be easily identified.

From our previous work (Ciric et al. 2012), the column temperature at 30 °C was found to be optimal. The optimization of analytes separation was started with two linear gradient runs: tG=30 min and tG=60 min; %B run from 5 to 90 % in the LC-Simulator mode gradient and with 2 % acetic acid in order to find optimal percent of acetonitrile and to find minimal number of runs for isocratic analysis. These two chromatograms were manually input into the LC-Simulator software, i.e., retention times, peak areas, and the baseline peak-widths were entered into the program. The resulting 1D resolution map is shown in Fig. 2.

Identification of peaks was ensured by coinjecting the standards. The suitability bar along the X-axis displayed the degree to which the optimized conditions match those specified as suitable options. The suitability is expressed through colors: red for outside the admissible interval and green inside

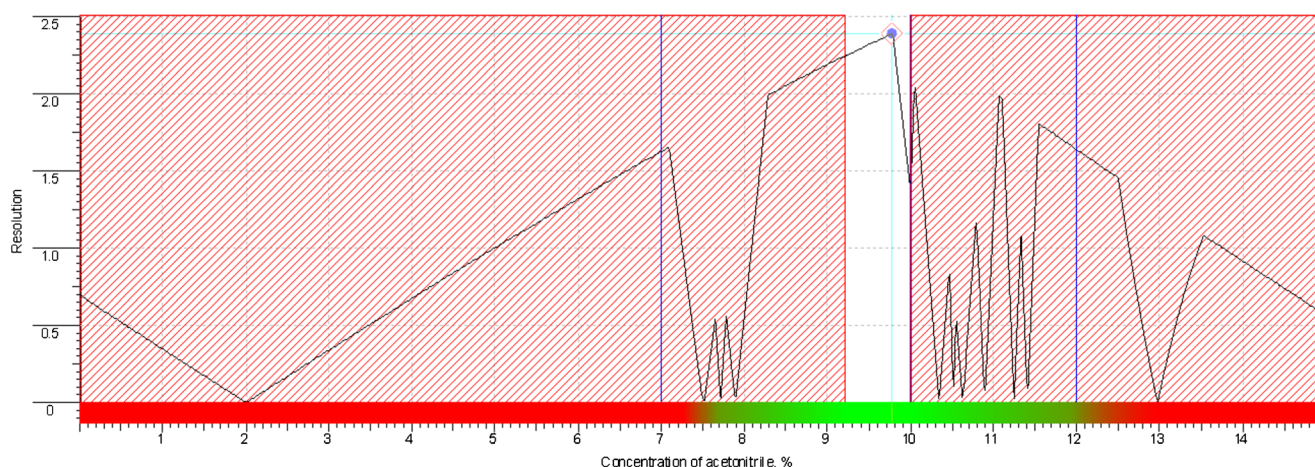


Fig. 2 1D resolution map obtained in tI/%B optimization at 2 % acetic acid and T=30 °C

Table 1 Experimental conditions and corresponding data obtained from chromatograms used for method optimization

Column Hypersil GOLD aQ (150×4,6 mm, 5 μm), wavelength 260 nm, temperature 30 °C, flow rate 1 mL/min

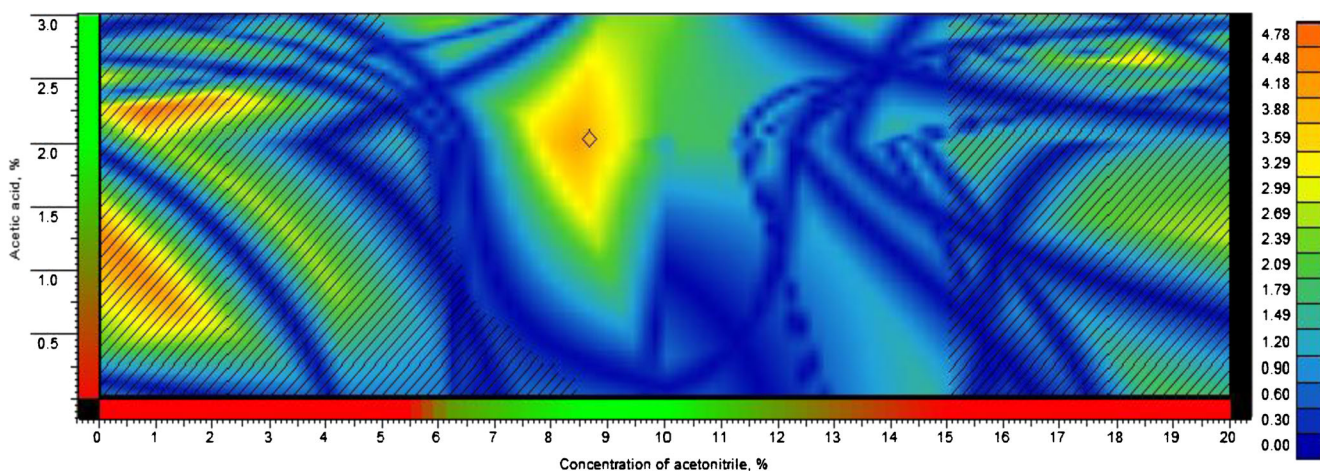
Conditions	95:5; 1 % acetic acid/acetonitrile			90:10; 1 % acetic acid/acetonitrile			85:15; 1 % acetic acid/acetonitrile		
Substance	t_r	Area	Width	t_r	Area	Width	t_r	Area	Width
Quercetin	3.149	78,324	0.284	3.564	32,648	0.193	3.077	10,452	0.204
Kaempferol	9.865	53,837	0.357	3.568	12,364	0.387	3.659	14,756	0.208
Catechin	8.756	57,658	0.272	5.359	18,651	0.268	3.454	14,698	0.256
Luteolin	18.074	73,159	0.348	6.385	13,684	0.268	8.696	10,479	0.326
Apigenin	16.522	76,825	0.239	7.326	23,265	0.365	6.879	17,856	0.172
Epicatechin	14.489	47,689	0.342	11.326	10,946	0.462	3.785	10,752	0.136
Conditions	95:5; 2 % acetic acid/acetonitrile			90:10; 2 % acetic acid/acetonitrile			85:15; 2 % acetic acid/acetonitrile		
Substance	t_r	Area	Width	t_r	Area	Width	t_r	Area	Width
Quercetin	2.146	54,492	0.200	2.074	37,282	0.090	2.077	10,092	0.204
Kaempferol	5.949	28,749	0.308	2.525	15,740	0.260	2.458	10,088	0.208
Catechin	6.670	15,524	0.292	4.163	17,251	0.230	1.454	15,566	0.182
Luteolin	16.064	10,398	0.348	4.482	12,994	0.190	7.696	10,059	0.326
Apigenin	13.626	20,808	0.332	6.448	21,418	0.320	4.879	18,448	0.172
Epicatechin	12.520	20,846	0.310	9.613	10,157	0.320	1.785	10,702	0.136
Conditions	95:5; 3 % acetic acid/acetonitrile			90:5; 3 % acetic acid/acetonitrile			85:15; 3 % acetic acid/acetonitrile		
Substance	t_r	Area	Width	t_r	Area	Width	t_r	Area	Width
Quercetin	2.949	28,749	0.308	0.895	15,740	0.260	1.358	40,088	0.208
Kaempferol	3.470	15,524	0.292	1.163	17,251	0.230	0.875	35,566	0.182
Luteolin	1.146	33,544	0.200	2.074	37,282	0.090	1.237	10,092	0.204
Apigenin	10.426	40,846	0.310	4.613	10,157	0.320	1.255	10,702	0.136
Catechin	11.236	20,808	0.332	6.448	21,418	0.320	2.879	18,448	0.172
Epicatechin	14.048	10,398	0.348	7.482	12,994	0.190	5.496	10,059	0.326

desired interval. So, the critical zone covers only the completely unsuitable resolution map regions. From Fig. 2, only one area with maximum resolution could be identified. That area for the optimal %B for isocratic work can be easily identified to be in the range 8.0–12.0 % B.

In the next stage, concentration of acetic acid and percent quantity of acetonitrile for isocratic elution were optimized

simultaneously. Based on the experimental design, nine isocratic runs with $t_I=20$ min were performed. The experimental data and the obtained data set for computer optimization of the experimental conditions pertaining to these runs are given in Table 1.

The chromatographic parameters (retention time, peak area, and width) were input manually into the software at all the given conditions.

**Fig. 3** 3D resolution map obtained by simulation for maximal resolution

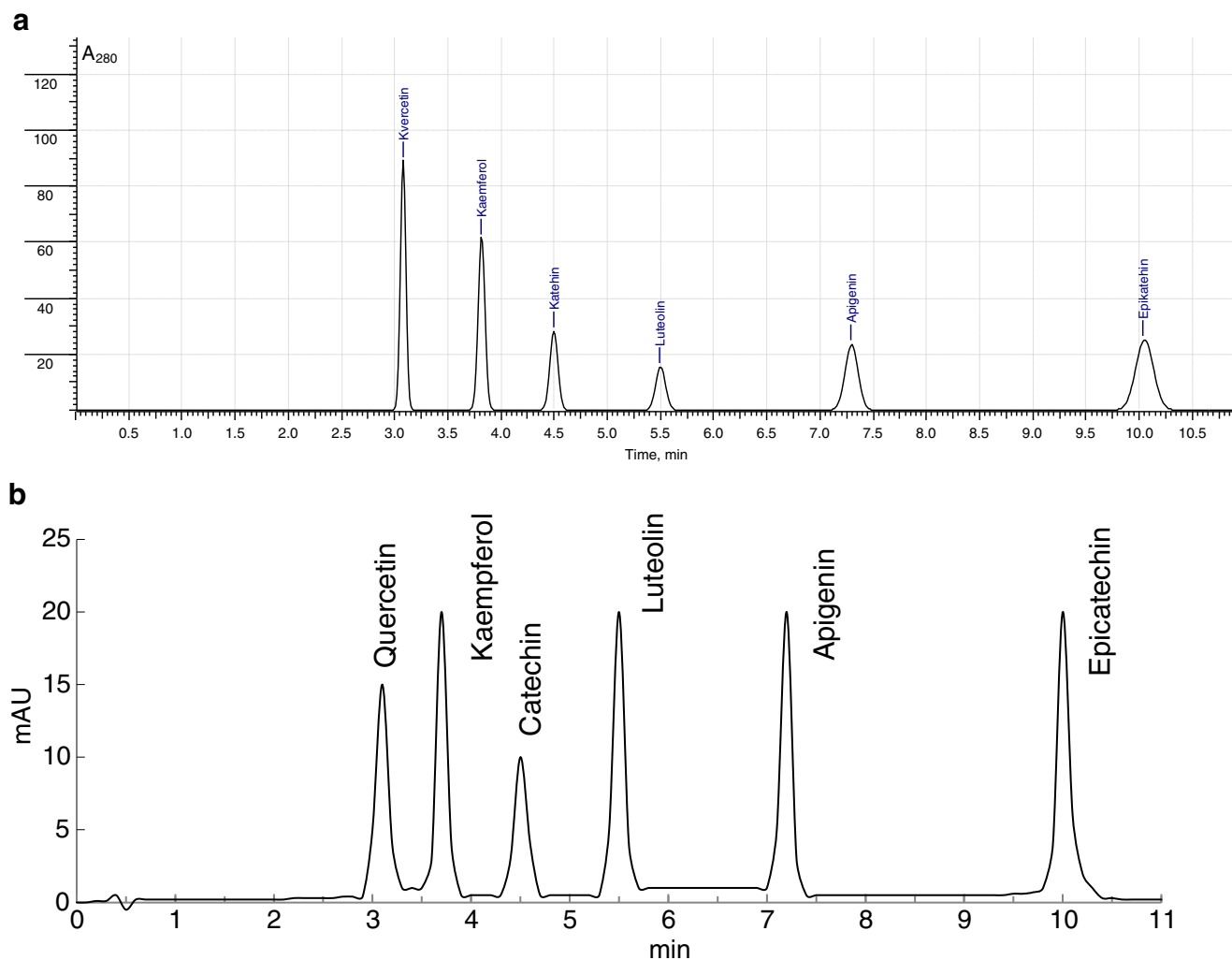


Fig. 4 **a** Chromatogram obtained computer simulation using program LC-Simulation. **b** Chromatogram of standard bioflavonoids under optimal conditions

LC-Simulator produces map of resolutions which is presented at Fig. 3. The resolution map is displayed as a color bar under map resolution is presented as a palette of colors as a function two experimental parameters which are simultaneous changed.

From 2D resolution map presented in Fig. 3, few areas with maximum resolution could be found. As it could be seen from Fig. 3, concentration of acetic acid at maximal resolution does not exceed 3 %. The highest value of resolution is obtained at low concentrations of acetic acid and a small proportion of acetonitrile. However, at these conditions, run time is too long (22 min) and does not meet the above criteria. The second area with high resolution is at 20 % acetonitrile and low concentration of acetic acid. At these conditions, time of analysis is significantly reduced (12 min), but analytes elute too quickly and acetonitrile consumption is high; therefore, these conditions do not comply with suitability criteria. The third area is in the central part of the graph and adequately fulfills suitability criteria. Although the resolution is not maximal, it is still

within the acceptable range, so it was decided to take these conditions as the optimal ones.

Thus, the optimal conditions for separation of bioflavonoids were Hypersil GOLD aQ column, 2 % concentration of acetic acid with acetonitrile in ratio 91:9 (v/v %), temperature of 30 °C with detection at 260 nm, and flow rate 1 mL/min. The chromatogram obtained by computer simulation is presented in Fig. 4a.

In the next step, the chromatogram of analyte mixture was taken. The chromatogram obtained under optimal conditions is presented in Fig. 4b.

From Fig. 4a, b, it could be seen that a very good agreement between simulated and experimental chromatogram obtained under optimal conditions with average errors from 1 to 5 % for retention time and resolution, respectively. In Table 2, chromatographic parameters obtained from chromatograms recorded under optimal conditions are presented.

The trueness expressed as recovery ($=C_{\text{found}}/C_{\text{added}} \times 100$) and precision and expressed as relative standard deviation

Table 2 Chromatographic parameters obtained on Hypersil GOLD aQ column under 2 % concentration of acetic acid with acetonitrile in ration 91:9 (v/v %), temperature of 30 °C at 260 nm, and flow rate 1 mL/min

Substances	Retention time (min)	Resolution	Capacity factor	Selectivity factor	Number of theoretical plates	LOD (µg/mL)	LOQ (µg/mL)
Quercetin	3.05	0.00	5.35	0.00	1,653	0.055	0.167
Kaempferol	3.73	2.60	6.71	1.25	5,476	0.032	0.096
Catechin	4.51	3.56	8.38	1.25	5,184	0.025	0.075
Luteolin	5.55	4.67	10.56	1.26	12,321	0.02	0.06
Apigenin	7.24	6.80	14.1	1.34	9,344	0.030	0.090
Epicatechin	10.03	8.00	19.94	1.41	10,100	0.04	0.12

(= $SD \times 100/\bar{x}$) were calculated by analyzing five solutions with known concentration of analytes. Limit of detection (LOD) and limit of quantitation (LOQ) were estimated from the calibration curves for sufficiently low concentration of analytes (0.1–1.0 µg/mL) using the formula $k \times (S_b/a)$ where k is 3.3 for LOD and 10 for LOQ. S_b is the calculated standard deviation in intercept of calibration curve and a is its gradient.

Extraction efficiency

Several parameters may influence the yield of phenolics, including extraction time, temperature, matrix type, particle size, solvent-to-sample ration, the number of repeat extraction of the sample, as well as the solvent type. All types of extraction were compared with Soxhlet extraction since it is widely accepted that Soxhlet extraction of flavonoids yields 100 % recovery (Ye et al. 2002b; Escarpa and Gonzalez 2000b). Extraction efficiency was determined using analyte standards. The data are presented in Table 3. It can be seen that there is no significant difference in efficiency between Soxhlet and ultrasonic bath extraction method. The extraction efficacy was slightly lower for the frozen samples. It could be attributed to matrix effects and possible hydrolysis. Owing to its

simplicity and rapidity, the ultrasonic bath extraction was chosen as the preferred method.

Determination of Bioflavonoids in Food Samples

The method to improve accuracy of the quantitation methods and eliminate interferences should be considered in the quantitation of bioflavonoids in food matrices. Complete removal of co-eluting substances by sample cleanup could not be achieved since in the case of our samples, the matrices are complex and different in composition from sample to sample. Thus, as the method of choice in our case is standard addition method, that is analyzing extract solution with added known quantity of standard solution; the calculation procedure is as follows:

$$X_i = \frac{I_x}{I_{s+x}(S_f + X_f)}$$

Where X_i is the amount of bioflavonoids in the extract solution, S_f is the amount of bioflavonoids spiked into the extract solution, I_x is the signal intensity of bioflavonoids in the extract solution, and I_{s+x} is the signal intensity of bioflavonoids in the spiked solution. This method requires at least two HPLC runs per analysis—the run of the extract

Table 3 Extraction yield (%±SD) of bioflavonoids from fresh *Brassica oleracea* species compared (normalized) to Soxhlet extraction

	Quercetin	Kaempferol	Catechin	Luteolin	Apigenin	Epicatechin
Cauliflower						
Extraction with water	68±8	74±8	60±9	55±8	50±5	48±4
Maceration	80±6	86±6	81±5	74±5	83±7	58±3
Ultrasound extraction	94±5	93±5	92±7	91±5	94±6	92±8
Broccoli						
Extraction with water	69±7	73±7	72±7	51±6	63±3	69±4
Maceration	83±4	77±4	81±5	69±7	79±7	75±6
Ultrasound extraction	91±7	89±8	97±6	90±9	93±5	92±5
Brussels sprouts						
Extraction with water	73±6	80±2	73±4	71±5	69±8	70±6
Maceration	84±3	85±8	79±7	79±7	78±6	79±4
Ultrasound extraction	92±5	92±5	93±6	87±7	91±7	93±7

sample and the run of the extract samples spiked with a known quantity of bioflavonoids.

Method Performance and Validation

Prior to analysis, the performance of the method was checked by analyzing standard solutions of analytes prepared in methanol as solvent. Calibration curves for each analyte were constructed by plotting the peak area of the analyte against corresponding concentration.

The standard addition method was performed by adding the unknown solution to 100, 200, 300, and 400 μL of standard solution in a 5-mL volumetric flask to the mark. Thus, no dilution with solvent was employed. The unknown concentration was assayed by plotting the corrected signal against the added concentration of the analytes. The unknown concentration was read as the x -intercept of the graph. The uncertainty of the intercept was calculated as:

$$SD = \frac{s_y}{|a|} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{\bar{y}^2}{a^2 \times (x_i - \bar{x})^2}}$$

Where s_y is standard deviation in y -readings, a is the slope of least-squares line, n is a number of data points, x is the concentration, and y chromatographic response. The confidence interval was calculated as $t \times SD_x$ where t is a Student t for $n-2^\circ$ of freedom.

The detection limits of quercetin, kaempferol, catechin, apigenin, luteolin, and epicatechin in food samples were determined from the standard addition curves based on the definition of the concentration of analyte yielding a signal equivalent to three times the standard deviation of the non-spiked sample. The limit of detection was in the range 0.02–0.055 $\mu\text{g}/\text{mL}$ indicating that the method has satisfactory performance for the determination of chosen bioflavonoids in real food samples. The *Brassica* vegetable samples were

analyzed for quercetin, kaempferol, catechin, apigenin, luteolin, and epicatechin content by using the standard addition method to the sample extracts. The linear standard addition curves were obtained in the concentration range of the added standard solutions of bioflavonoids 0.02–0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (five concentration levels). Linearity was confirmed by the values of the regression coefficient higher than 0.98 and Cochran's test for homoscedasticity ($G_{\max} = s_{\max}^2 / \sum s_i^2$ was compared with tabulated value, null hypothesis about equality of individual point standard deviation, accepted if $G_{\max} < G_{\text{table}}$) indicated homogenous distribution of standard deviations. The chromatogram of cauliflower extract is given in Fig. 5, and the results of bioflavonoids determination in the chosen samples are given in Table 4. Our values were compared with literature data for the bioflavonoid contents in food (see Table 4). Reasonably, good agreement was obtained with published data using other detection modes.

There are three main problems associated with storage of frozen vegetables: hydrolysis of glycans, oxidation of lipids, and protein denaturation (Ali 2011). Various factors, such as the freezing temperature, the rate of freezing, vacuum packaging, or packaging materials, can affect frozen vegetables' quality and bioflavonoid content. Probably, some degradation of analytes may occur during the technological presses of frozen samples preparation.

Antioxidant Activity

The antioxidant capacity of the *Brassica* vegetable extracts were analyzed by using the free radical scavenging (DPPH) method. The DPPH test is the oldest indirect method for determining the antioxidant activity, which is based on the ability of the stable free radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl to react with hydrogen donors including phenols (Roginsky and Lissi 2005; Brand-Williams et al. 1995). Radical scavengers may directly react and quench with peroxide radicals to terminate the peroxidation chain reaction and improve the

Fig. 5 Chromatogram of fresh broccoli extracts

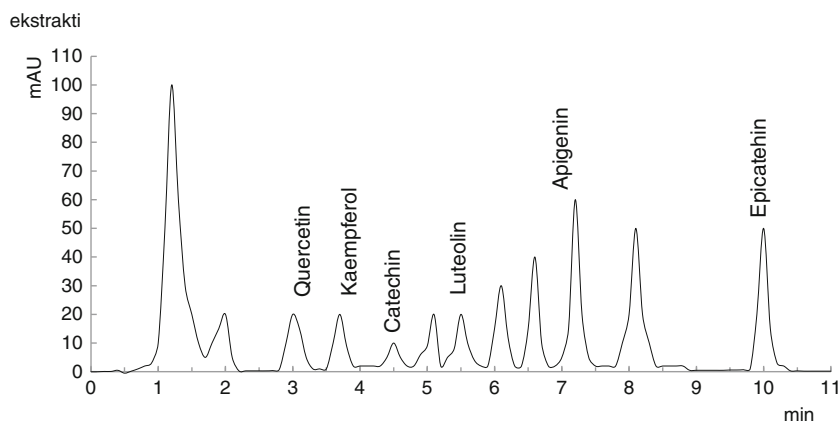


Table 4 Bioflavonoids content (milligrams per 100 g fresh weight) for different species *Brassica* vegetables

	Substance	Soxhlet extraction	Ultrasonic extraction	Maceration extraction	Water boiling	Literature value	Reference
Cauliflower							
Fresh	Quercetin	0.94±0.05	0.9±0.1	0.75±0.09	0.64±0.10	0.83	(Hertog et al. 1992)
	Kaempferol	0.14±0.08	0.11±0.09	0.09±0.08	0.1±0.05	0.25	(Hertog et al. 1992)
	Catechin	0.52±0.07	0.48±0.06	0.42±0.08	0.31±0.03		
	Luteolin	0.07±0.04	0.06±0.07	0.05±0.05	0.03±0.09	0.07	(Hertog et al. 1992; Bahroun et al. 2004; Lugasi and Hovari 2000)
	Apigenin	0.025±0.05	0.022±0.08	0.015±0.1	0.01±0.07	0.03	(Hertog et al. 1992; Bahroun et al. 2004; Lugasi and Hovari 2000)
Frozen	Epicatechin	0.52±0.06	0.41±0.09	0.30±0.06	0.25±0.06		
	Quercetin	0.73±0.04	0.75±0.09	0.61±0.09	0.56±0.08		
	Kaempferol	0.22±0.06	0.21±0.08	0.19±0.08	0.12±0.05	0.25	(Puupponen-Pimia et al. 2003)
	Catechin	0.88±0.08	0.87±0.08	0.77±0.08	0.54±0.03	0.83	(Puupponen-Pimia et al. 2003)
	Luteolin	0.32±0.09	0.35±0.04	0.28±0.05	0.18±0.08		
	Apigenin	0.12±0.06	0.12±0.1	0.09±0.1	0.03±0.09		
	Epicatechin	0.26±0.05	0.29±0.08	0.24±0.06	0.18±0.06		
Broccoli							
Fresh	Quercetin	2.78±0.05	2.71±0.1	2.65±0.09	2.54±0.10	2.51	(Justesen et al. 1998; Sikora et al. 2012; Bahroun et al. 2004)
	Kaempferol	3.71±0.08	3.60±0.09	3.52±0.08	3.52±0.05	4.01	(Justesen et al. 1998; Sikora et al. 2012; Bahroun et al. 2004)
	Catechin	0.60±0.07	0.58±0.06	0.32±0.08	0.28±0.03		
	Luteolin	0.81±0.04	0.77±0.07	0.55±0.05	0.36±0.09	0.86	(Justesen et al. 1998; Bahroun et al. 2004; Lugasi and Hovari 2000)
	Apigenin	0.32±0.05	0.27±0.08	0.12±0.1	0.11±0.07		
Frozen	Epicatechin	0.38±0.06	0.31±0.09	0.40±0.06	0.15±0.06		
	Quercetin	2.33±0.04	2.25±0.09	2.11±0.09	1.46±0.08	2.40	(Puupponen-Pimia et al. 2003)
	Kaempferol	2.32±0.06	2.28±0.08	1.78±0.08	1.41±0.05	2.49	(Puupponen-Pimia et al. 2003)
	Catechin	0.47±0.08	0.35±0.08	0.36±0.08	0.34±0.03		
	Luteolin	0.36±0.09	0.32±0.04	0.26±0.05	0.19±0.08		
	Apigenin	0.22±0.06	0.15±0.1	0.19±0.1	0.13±0.09		
	Epicatechin	0.27±0.05	0.23±0.08	0.22±0.06	0.16±0.06		
Brussels sprouts							
Fresh	Quercetin	0.34±0.05	0.29±0.1	0.15±0.09	0.10±0.10	0.3	(Hertog et al. 1992; Lugasi and Hovari 2000)
	Kaempferol	0.65±0.08	0.50±0.09	0.62±0.08	0.52±0.05	0.95	(Hertog et al. 1992; Lugasi and Hovari 2000)
	Catechin	0.42±0.07	0.41±0.06	0.52±0.08	0.35±0.03		
	Luteolin	0.28±0.04	0.23±0.07	0.15±0.05	0.11±0.09	0.34	(Hertog et al. 1992; Lugasi and Hovari 2000)
	Apigenin	0.32±0.05	0.27±0.08	0.25±0.1	0.08±0.07		
Frozen	Epicatechin	0.35±0.06	0.31±0.09	0.20±0.06	0.15±0.06		
	Quercetin	0.23±0.04	0.21±0.09	0.21±0.09	0.16±0.08		
	Kaempferol	0.52±0.06	0.52±0.08	0.47±0.08	0.39±0.05		
	Catechin	0.48±0.08	0.37±0.08	0.37±0.08	0.24±0.03		
	Luteolin	0.22±0.09	0.20±0.04	0.18±0.05	0.11±0.08		
	Apigenin	0.12±0.06	0.12±0.1	0.09±0.02	0.03±0.01		
	Epicatechin	0.26±0.05	0.29±0.08	0.24±0.06	0.18±0.06		

quality and stability of food product. The stable DPPH radical has been used to evaluate antioxidants for their radical quenching capacity (Hong and Chi-Tang 1997; Bahroun et al. 2004), and to better understand their antioxidant mechanism(s), each *Brassica* vegetable extract was evaluated for radical scavenging activity against DPPH (Table 5).

The decrease in absorbance of DPPH radical is caused by antioxidant through the reaction between antioxidant molecule and radical results in the scavenging of the radical by hydrogen donation. Table 5 illustrates a significant ($p < 0.05$) decrease in the concentration of DPPH due to scavenging activity of *Brassica* vegetable extracts. Kinetic studies of DPPH-extract reaction were carried out to estimate scavenging activity as a function of time. At the beginning, the reaction proceeds according to the second order kinetics and is very fast. This may be due to the reaction of effective, low molecular weight antioxidants (phenolic acids). The obtained results show significant difference in antioxidant activity between various species *Brassica* vegetables and between fresh and frozen samples as well.

The antioxidant capacities of the plant extracts largely depend upon the compositions of the extracts and method

used for the estimation of antioxidant activity. The antioxidant capacities are influenced by many factors that cannot be fully described with one single method. Several studies have demonstrated that there is a substantial and significant variation for the antioxidant phytochemicals into *Brassica* species both within and among species.

The difference in antioxidative activity may vary because of the presence of different components which may act as free radical scavenging (water-soluble vitamin C and phenolic acids, as well as lipid-soluble vitamin E and carotenoids) (Podsedek 2007). These substances may be present in tested extracts since they may co-elute from C18 cartridge in SPE. The investigated compounds contribute only 4–6 % of the total antioxidant activity as determined by measuring antioxidative activity of standards mixture in concentration obtained by Soxhlet extraction for every *Brassica* species.

Maximum difference among the extracts was observed after 10 min from the beginning of the reaction and the remaining amount (percent) of DPPH radical 10 min after initiation of reaction. It is seen that %DPPH is 29, 24, 34, and 40 for fresh cauliflower extract; 40, 37, 47, and 55 for

Table 5 Kinetic behavior of radical scavenging activity (% DPPH remaining \pm SD) of *Brassica* vegetables extracts as assayed by DPPH method

Sample	Time (min)	Soxhlet		Ultrasound		Maceration		Water boiling	
		Fresh	Frozen	Fresh	Frozen	Fresh	Frozen	Fresh	Frozen
Cauliflower	0	100 \pm 2	100 \pm 7	100 \pm 5	100 \pm 3	100 \pm 5	100 \pm 1	100 \pm 4	100 \pm 9
	5	61 \pm 5	73 \pm 3	58 \pm 6	70 \pm 5	65 \pm 3	77 \pm 2	68 \pm 6	80 \pm 7
	10	29 \pm 6	40 \pm 4	24 \pm 4	37 \pm 7	34 \pm 2	47 \pm 3	40 \pm 7	55 \pm 6
	15	17 \pm 4	28 \pm 6	14 \pm 2	24 \pm 9	21 \pm 3	34 \pm 2	25 \pm 5	40 \pm 4
	20	13 \pm 3	18 \pm 5	11 \pm 1	14 \pm 2	18 \pm 4	20 \pm 4	20 \pm 3	27 \pm 8
	25	13 \pm 4	18 \pm 4	11 \pm 1	14 \pm 6	18 \pm 5	20 \pm 5	20 \pm 4	27 \pm 2
	30	13 \pm 6	18 \pm 6	11 \pm 1	14 \pm 7	18 \pm 6	20 \pm 8	20 \pm 2	27 \pm 5
Broccoli	0	100 \pm 4	100 \pm 4	100 \pm 5	100 \pm 3	100 \pm 2	100 \pm 5	100 \pm 4	100 \pm 5
	5	47 \pm 7	64 \pm 7	45 \pm 6	60 \pm 4	55 \pm 5	68 \pm 2	60 \pm 6	72 \pm 6
	10	34 \pm 6	48 \pm 6	30 \pm 7	42 \pm 6	40 \pm 8	58 \pm 2	45 \pm 5	63 \pm 8
	15	25 \pm 5	35 \pm 7	20 \pm 2	30 \pm 7	30 \pm 3	40 \pm 2	35 \pm 7	45 \pm 4
	20	15 \pm 4	24 \pm 5	11 \pm 7	17 \pm 2	22 \pm 5	29 \pm 2	26 \pm 5	33 \pm 6
	25	14 \pm 3	23 \pm 3	10 \pm 6	17 \pm 6	20 \pm 2	26 \pm 2	25 \pm 7	30 \pm 5
	30	14 \pm 9	22 \pm 4	10 \pm 7	17 \pm 5	20 \pm 5	24 \pm 8	25 \pm 4	29 \pm 3
Brussels sprouts	0			100 \pm 5	100 \pm 6				
	5			45 \pm 7	60 \pm 3				
	10			30 \pm 6	40 \pm 5				
	15			20 \pm 4	30 \pm 7				
	20			15 \pm 3	20 \pm 4				
	25			12 \pm 7	20 \pm 5				
	30			12 \pm 4	20 \pm 4				

frozen cauliflower extract; 34, 30, 40, and 45 for fresh broccoli; 48, 42, 58, and 63 for frozen broccoli; and 30 for fresh Brussels sprouts and 40 for frozen Brussels sprouts for different types of extraction.

Different kinetics suggested the presence of different radical scavenging mechanisms by polyphenolic compounds; in the reaction mixture, small, active flavonoids and larger polymeric products are probably present.

The highest percent DPPH scavenging activity was shown by the ultrasound extract for all samples, and the second highest activity was determined in the Soxhlet extract for all samples while lowest in sample boiled with water. Variability of antioxidative activity between samples can be explained taking into account the type of solvents used for extraction and the presence of other than flavonoids antioxidative components in extracts.

Solvents used for polyphenol extraction had significant effects on DPPH scavenging capacity determination for cauliflower, broccoli, and Brussels sprout extracts. Antioxidant or active compounds of different polarity could be present in *Brassica* species. Change in solvents polarity alters their ability to dissolve a selected group of antioxidant compounds, and thus, influences the antioxidant activity estimation of these compounds (Zhou and Yu 2004).

In general, freshly harvested fruits and vegetables especially cauliflower contain more vitamin C than those held in storage, and they show a gradual decrease in ascorbic acid content as the storage temperature or duration increases. Losses are enhanced by extended storage, higher temperatures, low relative humidity, physical damage, and chilling injuries (Lee and Kadir 2000). These factors may account for variability of the obtained results for fresh and frozen samples.

Conclusion

In the present work, a RP-HPLC method for the separation of bioflavonoids was developed with the aid of chemometric approach, validated, and used for their determination in food samples. Optimization based on LC-Simulation computer simulations led to the optimal conditions for separation. The proposed method separates the bioflavonoids in a reasonable analysis time and with acceptable chromatographic parameters.

The advantage of the described method is quantitative extraction without the need for excessive sample cleanup steps. The merit of the method is the rapid separation and specific detection. The standard addition method to quantify the bioflavonoids by calibration with the standard bioflavonoids solution added in the extract solution can serve as a very promising and practical approach to overcome matrix effects.

Extraction procedure plays a vital role in the efficacy of extraction, and ultrasound extraction procedure is the most convenient. The antioxidative activity of extracts could be correlated with the bioflavonoid contents in the extract.

Acknowledgments The authors gratefully acknowledge the financial support from the Ministry of Science and Technology of Serbia under the project 172016.

Conflict of Interest Andrija Ciric declares that he has no conflict of interest. Nevena Ivanovic declares that she has no conflict of interest. Milica Cvijovic declares that she has no conflict of interest. Milena Jelkic-Stankov declares that she has no conflict of interest. Ljubinka Joksovic declares that she has no conflict of interest. Predrag T. Djurdjevic declares that he has no conflict of interest. This article does not contain any studies with human or animal subjects.

References

- Ali FHM (2011) *Adv J Food Sci Technol* 3:83
- Ali Y, Ahmet M, Ayse AK (2001) *J Agric Food Chem* 49:4083
- Bahroun T, Luximon-Ramma A, Crozier A, Arouma OJ (2004) *J Sci Food Agric* 84:1553
- Bogomolov A, McBrien M (2003) *Anal Chim Acta* 490:41
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C (1995) *Lebensm Wiss Technol* 28:25
- Brusotti G, Nguemey TA, Biesuz R, Caccialanza G (2010) *J Sep Sci* 33:1692
- Chunsiimyayav G, Hoza I, Valašek P, Skrovanková S, Banzragch D, Esevegsuren N (2009) *Czech J Food Sci* 27:259
- Ciric A, Prosen H, Jelikić-Stankov M, Djurdjevic P (2012) *Talanta* 99: 780
- Cody V, Middleton E, Harborne JB, Beretz A (1988) *Plant flavonoids in biology and medicine II: Biochemical, cellular and medicinal properties*. Alan R. Liss, New York, pp 107–121
- Cook NC, Samman S (1996) *J Nutr Biochem* 7:66
- Dakora FD (1995) *Aust J Plant Physiol* 22:87
- Das A, Wang JH, Lien EJ (1994) *Prog Drug Res* 42:133
- Erlund I (2004) *Nutr Res* 24:851
- Escarpa A, Gonzalez MC (2000) *J Chromatogr* 51:37
- Ficarra R, Ficarra P, Tommasini S, Calabro ML, Ragusa S, Barbera R, Rapisarda A (1995) *Farmaco* 50:245
- Forkmann G, The 16th International Conference of Groupe Polyphenols, Lisbon, 1992, vol. 16, pp. 19–27
- Harborne JB (1994) *Acta Horticult* 381:36
- Herrmann K (1970) *Chem Mikrobiol Technol Lebensm* 12:161
- Hertog MGL, Hollman PCH, Katan MB (1992) *J Agric Food Chem* 40: 2379
- Hollman PCH, van Trijp JMP, Buysman MNCP (1996) *Anal Chem* 68:3511
- Hong CJ, Chi-Tang H (1997) *J Agric Food Chem* 45:2357
- Irakli MN, Samanidou VF, Biliaderis CG, Papadoyannis IN (2012) *J Sep Sci* 32:1603
- Jandera P, Skerikova V, Rehova L, Hajek T, Baldrianova L, Skopova G, Kellner V, Horna A (2005) *J Sep Sci* 28:1005
- Jin Y, Liu H, Yuan K (2003) *J Med Plant Res* 5:5630
- Justesen U, Knuthsen P, Leth T (1998) *J Chromatogr A* 799:101
- Kamiya S, Esaki S, Konishi G (1979) *Agric Biol Chem* 43:1529
- Lee SK, Kadir AA (2000) *Postharvest Biol Technol* 20:207
- Leibovitz BE, Mueller JA (1993) *J Opt Nutr* 2:17
- Li J, Jiang B, Liu X, Zhang J, Chen X, Bi K (2007) *Asian J Tradit Med* 2:75
- Lugasi A, Hovari J (2000) *Acta Aliment* 29:345
- Lui X, Yang AM, Shi YP (2008) *Anal Chem* 63:472
- Marina H, Lehtonen PJ, Hopia AI (1998) *J Agric Food Chem* 46:25

- Merken HM, Beecher GR (2000) *J Chromatogr* 897:177
- Michalkiewicz A, Biesaga M, Pyrzynska K (2008) *J Chromatogr A* 1187:18
- Middleton E (1976) *Chem Abstr* 84:426
- Mira L, Fernandez MT, Santos M, Rocha R, Florencio MH, Jennings KR (2002) *Free Radical Res* 36:1199
- Olsen H, Aaby K, Borge G (2009) *J Agric Food Chem* 57:2816
- Ortuno A, Garcia-Puig D, Fuster MD, Perez ML, Sabater F, Porras I, Garcia-Lidon A, Del Rio JA (1995) *J Agric Food Chem* 43:1
- Perron NR, Brumaghim JL (2009) *Cell Biochem Biophys* 53:75
- Podsedek A (2007) *Food Sci Technol* 40:1
- Price KR, Casuscelli F, Colquhoun IJ, Rhodes MJC (1998) *J Sci Food Agric* 77:468
- Puupponen-Pimia R, Häkkinen ST, Aarni M, Suortti T, Lampi AM, Eurola M, Hiiroinen V, Nuutila AM, Oksman-Caldentey KM (2003) *J Sci Food Agric* 83:1389
- Ragazzi E, Veronese G (1973) *J Chromatogr* 77:369
- Raghavan K, Buolamwini JK, Fesen MR, Pommier Y, Kohn KW, Weinstein JN (1995) *J Med Chem* 38:890
- Read MA (1995) *Am J Pathol* 147:235
- Rodriguez-Delgado MA, Malovana S, Perez JP, Borges T, Garcia Montelongo FJ (2001) *J Chromatogr A* 912:249
- Roginsky V, Lissi EA (2005) *Food Chem* 92:235
- Rouseff RL (1980) *ACS Symp Ser* 143:83
- Sato M, Ramarathnam N, Suzuki Y, Ohkubo T, Takeuchi M, Ochi H (1996) *J Agric Food Chem* 44:37
- Sikora E, Cieslik E, Florkiewicz AF, Leszczyńska T (2012) *Acta Sci Pol Technol Aliment* 11:45
- Singleton VL, Rossi JA (1965) *Am J Enol Vitic* 16:144
- Stremple P (1996) *J High Resolut Chromatogr* 19:581
- Stuber M, Reemtsma T (2004) *Anal Bioanal Chem* 378:910
- Suntornsuk L (2002) *J Pharm Biomed Anal* 27:679
- Thompson LU (1993) *Food Res Int* 26:131
- Vallejo F, Tomás-Barberán FA, Ferreres F (2004) *J Chromatogr A* 1054:181
- Weintraub RA, Ameer B, Johnson JV, Yost RA (1995) *J Agric Food Chem* 43:1966
- Ye M, Li Y, Yan YN, Liu HW, Ji XH (2002) *J Pharm Biomed Anal* 28:621
- Zhang L, Xiang ZM (2002) *Chin Chem Lett* 13:968
- Zhou K, Yu L (2004) *Lebensm Wiss Technol* 37:717
- Zu Y, Li C, Fu Y, Zhao C (2006) *J Pharm Biomed Anal* 41:714

ОБРАЗАЦ 1.

Изјава о ауторству

Потписани **Андрија Ћирић**
Број уписа **27/06**

Изјављујем

да је докторска дисертација под називом

„Оптимизација и валидација течно-хроматографске методе за одређивање флаванона и њихових деривата у фармацеутским формулацијама и храни“

- 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

у Крагујевцу, **22.08.2014**

Потпис аутора

ОБРАЗАЦ 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора: **Андрија Ћирић**

Број уписа: **27/06**

Студијски програм: **Докторске академске студије**

Наслов рада: **„Оптимизација и валидација течно-хроматографске методе за одређивање флаванона и њихових деривата у фармацеутским формулацијама и храни“**

Ментор: **Проф. др Предраг Ћурђевић**

Потписани **Андрија Ћирић**

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предала за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Крагујевцу**.

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 Крагујевцу.

Потпис аутора

У Крагујевцу, 22.08.2014

ОБРАЗАЦ 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку да у Дигиталном репозиторијум Универзитета у Крагујевцу унесе моју докторску дисертацију под насловом:

„Оптимизација и валидација течно-хроматографске методе за одређивање флаванона и њихових деривата у фармацеутским формулацијама и храни“

која је моје ауторско дело

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

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Крагујевцу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју са 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 заокужите само једну од шест понуђених лиценци, чији је кратак опис дат је на обрасцу број 4.).

Потпис аутора

У Крагујевцу, **22.08.2014.**

ОБРАЗАЦ 4.

1. Ауторство

Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела и прераде, ако се наведе име утора 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 утора 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 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 прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.