



UNIVERZITET U NIŠU
PRIRODNO-MATEMATIČKI
FAKULTET
DEPARTMAN ZA HEMIJU



**HEMIJSKA ANALIZA I ANTOOKSIDATIVNA AKTIVNOST
EKSTRAKATA ODABRANIH BILJNIH VRSTA BOGATIH
FENOLNIM JEDINJENJIMA**

Doktorska disertacija

Mentor
Danijela Kostić, red. prof.

Kandidat
Jasmina M. Veličković

Niš, 2013.

Istraživanje prezentovano u ovoj doktorskoj disertaciji urađeno je u Laboratorijama Departmana za hemiju Prirodno-matematičkog fakulteta u Nišu.

Najiskrenije se zahvaljujem svom mentoru dr Danijeli Kostić, redovnom profesoru Prirodno-matematičkog fakulteta u Nišu, koja je predložila temu i rukovodila izradom ovog rada.

Takođe se zahvaljujem profesorki Snežani Mitić na korisnim sugestijama u toku rada i pisanja doktorske disertacije.

Izrada ove doktorske disertacije je realizovana u okviru projekta OI 142015 i OI 142047 finansiranog od strane Ministarstva za nauku Republike Srbije.

Прилог 5/1

	<p>ПРИРОДНО - МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ НИШ</p> <p>КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАЦИЈА</p>
---	---

Prilog 5/1

Редни број, РБР:	
Идентификациони број, ИБР:	
Тип документације, ТД:	Монографска
Тип записа, ТЗ:	текстуални / графички
Врста рада, ВР:	докторска дисертација
Аутор, АУ:	Јасмина М. Величковић
Ментор, МН:	Данијела А. Костић
Наслов рада, НР:	ХЕМИЈСКА АНАЛИЗА И АНТИОКСИДАТИВНА АКТИВНОСТ ЕКСТРАКАТА ОД АБРАНИХ БИЛНИХ ВРСТА BOGATИХ FENOLНИМ ЈЕДИНЈЕЊИМА
Језик публикације, ЈП:	Српски
Језик извода, ЈИ:	Енглески
Земља публиковања, ЗП:	Р. Србија
Уже географско подручје, УГП:	Р. Србија
Година, ГО:	2013.
Издавач, ИЗ:	авторски репринт
Место и адреса, МА:	Ниш, Вишеградска 33.
Физички опис рада, ФО:	175 страна, 53 слика, 19 табела и 252 референце
Научна област, НО:	Хемија
Научна дисциплина, НД:	Органска хемија и биохемија
Предметна одредница/Кључне речи, ПО:	билиjni екстракти, фенолна једињења,, садржај метала, антиоксидативна и антимикробна активност
УДК	581.192 + 542.943 : 635.04 + 547.56
Чува се, ЧУ:	Библиотека
Важна напомена, ВН:	Експериментални део је урађен у лабораторији ПМФ-а у Нишу

Извод, ИЗ:

Припремљени су екстракти изабраних биљних врста: булка (*Papaver rhoeas* L.) (цвет); глог (*Crataegus oxyacantha* L.) (плод); трњина (*Prunus spinosa* L.) (плод); враниловка (*Origanum vulgare* L.) (надземни део биљке); невен (*Calendula officinalis* L.) (цвет); жаворњак (*Delphinium consolida* L.) (цвет); цикорија (*Cichorium intybus* L.) (цвет); Садржај укупних фенола, флавоноида и антоцијана у припремљеним екстрактима одређени су спектрофотометријским методама. Испитана је антиоксидативна активност припремљених екстраката применом DPPH методе. Поред тога испитан је садржај тешких метала у биљном материјалу и екстрактима. Испитана је антимикробна активност етанолних екстраката на неке врсте бактерија и гливица. Извршена је упоредна PCA анализа добијених резултата

Датум прихватања теме, ДП:

Датум одbrane, ДО:

Чланови

Пред

Члан:

Члан,

Образац Q4.09.13 - Издање 1

	PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET NIŠ
	KEY WORDS DOCUMENTATION

Accession number, ANO:	
Identification number, INO:	
Document type, DT:	Monograph
Type of record, TR:	textual/graphic
Contents code, CC:	doctoral dissertation
Author, AU:	mr Jasmina M. Veličković
Mentor, MN:	dr Danijela Kostic
Title, TI:	CHEMICAL ANALYSIS AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF THE EXTRACTS OF SELECTED PLANTS RICH IN PHENOLIC COMPOUNDS
Language of text, LT:	Serbian
Language of abstract, LA:	English
Country of publication, CP:	Serbia
Locality of publication, LP:	Serbia
Publication year, PY:	2013
Publisher, PB:	Authors reprint
Publication place, PP:	Niš, Višegradska 33
Physical description, PD:	175 pages, 19 tables, 53 pictures
Scientific field, SF:	Chemistry
Scientific discipline, SD:	Organic chemistry and biochemistry
Subject/Key words, S/KW:	Phenolic compounds, plant extracts, antioxidant and antimicrobial activity
UDC	581.192 + 542.943 : 635.04 + 547.56
Holding data, HD:	Library
Note, N:	The experimental part of this work was performed in the research laboratory of the Faculty of Mathematics and Sciences.

Abstract, AB:	<p>Selected plant extracts were prepared: poppy (<i>Papaver rhoeas</i> L.) (flower); hawthorn (<i>Crataegus oxyacantha</i> L.) (fruit); sloe (<i>Prunus spinosa</i> L.) (fruit); oregano (<i>Origanum vulgare</i> L.) (flower); marigold (<i>Calendula officinalis</i> L.) (flower); larkspur (<i>Delphinium consolida</i> L.) (flower); chicory (<i>Cichorium intybus</i> L.) (flower).</p> <p>Total content of phenols, flavonoids and anthocyanins in prepared extracts was determined using spectrophotometric method. It was investigated antioxidant activity of the prepared extracts using DPPH method. Besides, it was investigated the content of toxic metals in plant material and extracts. Antimicrobial activity of ethanol extracts was determined against several bacterial strains and fungi. Comparative PCA analysis on the basis of obtained results was performed.</p>
Accepted by the Scientific Board on,	
Defended on, DE:	
Defended Board, President:	
Member:	
Member,	

Obrazac Q4.09.13 - Izdawe 1

SADRŽAJ

UVOD	1
1.	
TEORIJSKI DEO	5
1.1. Oksidativni stres i antioksidativna zaštita	6
1.2. Dejstvo slobodnih radikala u živim sistemima	7
1.3. Antioksidansi	9
1.3.1. Primarna antioksidativna zaštita	10
1.3.2. Sekundarna antioksidantna zaštita	10
1.4. Prirodna fenolna jedinjenja	12
1.4.1. Fenolne kiseline	18
1.4.2. Flavonoidi	20
1.4.3. Antocijani	24
1.4.4. Flavonoli, katehini i proantocijanidini	30
1.5. Biljke	33
1.5.1. Bulka (<i>Papaver rhoeas L.</i>)	33
1.5.2. Glog (<i>Crataegus oxyacantha L.</i>)	34
1.5.3. Trnjina (<i>Prunus spinosa L.</i>)	35
1.5.4. Cikorija (<i>Cichorium intybus L.</i>)	36
1.5.5. Neven (<i>Calendula officinalis L.</i>)	37
1.5.6. Vranilovka (<i>Origanum vulgare L.</i>)	38
1.5.7. Žavornjak (<i>Delphinium consolida L.</i>)	40
1.6. METODE ANALIZE	41
1.6.1. UV/VIS spektrofotometrija	41
1.6.1.1. Primena UV-VIS metode za određivanje ukupnih fenola Folin– Ciocalteu metodom	41
1.6.1.2. Primena UV-VIS metode u određivanje ukupnog sadržaja flavonoida	42
1.6.1.3. Primena UV-VIS metode u određivanje monomernih i polimernih antocijanina	43
1.6.1.4. Primena UV/VIS metode za određivanje antioksidativne aktivnosti	46
1.6.1.5. DPPH-metoda	46
1.6.2. HPLC-visokopritisna tečna hromatografija	48
1.6.3. AAS metoda	54
1.7. Antimikrobna svojstva biljnih ekstrakata	57
1.8. Statistička obrada podataka	64
2. EKSPERIMENTALNI DEO	67
2.1. Biljni materijal	68
2.2. Aparati i reagensi	68
2.2.1. Aparati	68
2.2.2. Reagensi	69
2.3. Eksperimentalni postupci	70
2.3.1. Postupak ekstrakcije	70
2.3.2. Postupak mineralizacije	71
2.4. UV/Vis spektrofotometrijske metode	71
2.4.1. Određivanje sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja	71
2.4.2. Određivanje sadržaja ukupnih flavonoida	72
2.4.3. Određivanje sadržaja antocijana	72
2.4.4. Određivanje procenta polimerne boje	73

2.4.5.	Odredivanje antioksidativne aktivnosti	74
2.5.	HPLC metoda	75
2.6.	Odredjivanje sadržaja metala AAS metodom	75
2.7.	Odredivanje antimikrobne aktivnosti	76
2.8.	Statistička obrada podataka	77
3.	REZULTATI I DISKUSIJA	79
3.1.	Hemisika analiza i antioksidativna aktivnost ekstrakata latica bulke (<i>Papavear rhoes L.</i>)	80
3.1.1.	Spektrofotometrijsko određivanje sadržaja fenolnih jedinjenja i antioksidativne aktivnosti ekstrakata latica bulke (<i>Papavear rhoes L.</i>)	80
3.1.2.	HPLC analiza ekstrakata latica bulke (<i>Papavear rhoes L.</i>)	88
3.1.3.	Antimikrobna aktivnost ekstrakata bulke	92
3.2.	Hemisika analiza i antioksidativna aktivnost ekstrakata ploda gloga (<i>Crateagus oxycanta L.</i>)	93
3.2.1.	Spektrofotometrijsko određivanje sadržaja fenolnih jedinjenja i antioksidativne aktivnosti ekstrakata ploda gloga (<i>Crateagus oxycanta L.</i>)	95
3.2.2.	Antimikrobna aktivnost ekstrakata ploda gloga	100
3.3.	Hemisika analiza i antioksidativna aktivnost ekstrakata ploda trnjine (<i>Prunus spinosa L.</i>)	102
3.3.1.	Spektrofotometrijsko određivanje sadržaja fenolnih jedinjenja i antioksidativne aktivnosti ekstrakata ploda trnjine (<i>Prunus spinosa L.</i>)	103
3.3.2.	HPLC analiza ekstrakata trnjine	108
3.3.3.	Antimikrobna aktivnost ekstrakata trnjine	110
3.4.	Hemisika analiza i antioksidativna aktivnost ekstrakata cveta cikorije (<i>Cichorium intybus L.</i>)	111
3.4.1.	Spektrofotometrijsko određivanje sadržaja fenolnih jedinjenja i antioksidativne aktivnosti ekstrakata cveta cikorije (<i>Cichorium intybus L.</i>)	112
3.5.	Hemisika analiza i antioksidativna aktivnost ekstrakata cveta nevena (<i>Calendula officinalis L.</i>)	116
3.5.1.	Spektrofotometrijsko određivanje sadržaja fenolnih jedinjenja i antioksidativne aktivnosti ekstrakata cveta nevena (<i>Calendula officinalis L.</i>)	117
3.6.	Hemisika analiza i antioksidativna aktivnost ekstrakata biljke vranilovka (<i>Origanum vulgare L.</i>)	120
3.6.1.	Spektrofotometrijsko određivanje sadržaja fenolnih jedinjenja i antioksidativne aktivnosti ekstrakata biljke vranilovke (<i>Origanum vulgare L.</i>)	122
3.7.	Hemisika analiza i antioksidativna aktivnost ekstrakata cveta žavornjaka (<i>Delphinium consolida L.</i>)	124
3.7.1.	Spektrofotometrijsko određivanje sadržaja fenolnih jedinjenja i antioksidativne aktivnosti ekstrakata cveta žavornjaka (<i>Delphinium consolida L.</i>)	125
3.8	Određivanje sadržaja metala u ekstraktima izabranih biljnih vrsta	127
3.9.	Uporedna i korelaciona analiza dobijenih rezultata	133

4.	ZAKLJUČAK	142
	SUMMARY	146
	REFERENCE	150
	PRILOG	170
	BIOGRAFIJA	172
	BIBLIOGRAFIJA	173

SKRAĆENICE

ACC- acetil-koenzim A karbon-dioksid ligaza,
Acetyl-CoA- acetilkoenzim A,
ANS- antocijanidin sintetaza,
AOAC- Association of Official Analytical Chemists,
BH - butilovani hidroksianizol,
BHT- butilovani hidroksitoluen,
CAT- katalaza,
C4H- cinamat 4-hidroksilaza,
CHS- čalkon sintaza,
4CL- 4-kumarat-koenzim A ligaza,
DFR- dihidroflavonol- 4-reduktaza,
DNK- dezoksiribonukleinska kiselina,
DPPH- (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil),
etanol- etanol-HCl (99:1),
etanol 50%- etanol-voda-HCl (50:49:1),
F3H- flavanon-3 β -hidroksilaza,
GAE- ekvivalent galne kiseline,
GS \cdot - glutationil radikal,
GSH- glutation,
GSHPx- glutation peroksidaza,
GSST- glutation-disulfid,
GST- glutation-S-transferaza,
HPLC (engl. *High Pressure liquid Chromatography*) - Visokopritisna tečna hromatografija,
QE- kvercetin ekvivalent,
malonil- CoA-malonil koenzim A,
metanol- metanol-HCl (99:1),
metanol 50 % - metanol-voda-HCl (50:49:1),
NADH- nikotinamidadenindinukleotid,
NADPH- redukovani oblik nikotinamidadenindinukleotida,
NADP- nikotinamidadenindinukleotid,
PAL- fenilalanin amonijum lijaza,
PCA- Principal Component Analysis,
PG- propilgalat,

ROS- Reactive Oxygen Species (Reaktivne vrste kiseonika),

RP (engl. *Reversed Phase*) - Obrnute faze,

RSC- Radical Scavenging Capacity,

SOD- Superoksid dismutaza,

TBHQ- 2-*terc*-butilhidroksihinon,

TE- troloks-ekvivalent,

voda- voda-HCl (99:1),

WHO- (engl. *World Health Organisation*) - Svetska zdravstvena organizacija.

UVOD

Cilj naučnih istraživanja iz oblasti hemije, biohemije i medicine oduvek je bio poboljšanje zdravlja ljudi. Ispitivanjem hemijskih, bioloških i farmakoloških osobina prirodnih proizvoda korišćenih u tradicionalnoj medicini širom sveta dobijeni su mnogi terapeutski agensi koji se danas koriste u savremenoj medicini: morfin iz opijuma (*Papaver somniferum*) se koristi kao analgetik, digitoksin i ostali glikozidi izolovani iz digitalisa (*Digitalis spp.*) koriste se za lečenje bolesti srca, taksol iz pacifičke tise (*Taxus brevifolia*) za lečenje kancera, kinin izolovan iz kore kininovog drveta (*Cinchona spp.*) za lečenje malarije, aspirin iz kore vrbe (*Salix spp.*) kao analgetik, antipiretik i antiinflamatorik, kofein iz kafe (*Coffea arabica*) kao stimulans (Heinrich i sar., 2004).

Povezanost čoveka i biljaka datira još od davnina. Čovek je biljke prvenstveno koristio u ishrani, a kasnije i u lečenju. Kroz istoriju biljke su dobijale sve veći značaj kao izvor biološki aktivnih supstanci. Neki farmakolozi kinesku knjigu o korenju i travama „Pen Tsao”, autora Shen Nunga (2900 godina p.n.e.) smatraju najstarijom farmakopejom na svetu. Ona obuhvata opis 365 biljnih droga, od kojih se mnoge i danas upotrebljavaju. Broj cvetnica koje su do danas hemijski ispitane čini samo 10 %, od ukupno 250.000 vrsta na planeti, zbog čega se može zaključiti da biljni svet i dalje predstavlja nepresušan i još nedovoljno istražen resurs biološki i farmakološki aktivnih jedinjenja. Tokom XX veka trend primene kombinatorne hemije u dizajniranju lekova, pogotovo HTS skrininga (*High Throughput Screening*), doveo je do pada interesovanja za prirodne proizvode. Kako su očekivanja ovih istraživanja precenjena, u poslednjih nekoliko godina svetska naučna javnost ponovo se usmerava ka istraživanju prirodnih proizvoda i primeni fitoterapije. Pored neospornog značaja za farmaceutsku industriju, prirodni proizvodi biljaka nalaze široku primenu u proizvodnji dijetetskih suplemenata i funkcionalne hrane, koja pored zadovoljavajućih nutritivnih svojstava ispoljava i određene farmakološke i fiziološke efekte na ljudsko zdravlje, što je od velikog značaja u prevenciji nastanka bolesti savremenog čoveka. Zbog toga je ispitivanje biološke aktivnosti i hemijska karakterizacija do sada neispitanih biljnih vrsta od izuzetnog naučnog i praktičnog interesa, jer vodi ka novim izvorima biološki aktivnih supstanci.

Poznato je da je upotreba lekovitog bilja značajan činilac koji poboljšava opšte zdravstveno stanje ljudi, te je izučavanje njenog pozitivnog uticaja sve više predmet aktuelnih istraživanja. To potvrđuju brojne istraživačke studije iz ove oblasti. Pomenuto svojstvo

objašnjava se, pre svega, prisustvom sekundarnih metabolita u biljkama, koje mogu ispoljavati različite biološke aktivnosti. U poređenju sa farmaceutskim lekovitim supstancama, fitohemikalije imaju niži bioaktivni potencijal, ali zbog činjenice da se svakodnevno kroz ishranu unose u malim količinama, dugoročno mogu izazvati primetan fiziološki efekat. Tretmani biljnim ekstraktima i jedinjenjima izolovanim iz prirodnih izvora su dugo predstavljali nezamenljivi i gotovo jedini vid lečenja (Chadwick i Marsh, 1990).

Smatra se da su slobodni radikali uzrok pojave mnogih patoloških stanja organizma. Utvrđeno je da je veliki broj različitih bolesti posledica poremećaja ćelijskih funkcija, odnosno oštećenja same ćelije koje je uzrokovano delovanjem slobodnih radikala kiseonika (Halliwell, 1994). Organizam se protiv slobodnih radikala, osim sopstvenim odbrambenim mehanizmom, brani i prirodnim antioksidansima koji se u organizam unose hranom. Blagotvorno dejstvo lekovitih biljaka na zdravlje pripisano je visokom sadržaju raznovrsnih fitohemijskih jedinjenja, od kojih su najzastupljenija fenolna jedinjenja (Henionen i sar., 1998). Fenolna jedinjenja imaju jako izraženu antioksidativnu i antiradikalnu aktivnost (Rice-Evans i sar., 1996), i zbog toga im se pripisuju mnoga terapijska delovanja: antibakterijsko, antiinflamatorno, antialergijsko, antimutageno, antiviralno i antikancerogeno (Harborne i Williams, 1992; Havsteen, 1983; Pathak i sar., 1991).

Fenolna jedinjenja su veoma rasprostranjeni proizvodi sekundarnog metabolizma biljaka i antioksidativno delovanje biljnih ekstrakata uglavnom se vezuje za njihovo prisustvo. Poznato je više od 8000 fenolnih jedinjenja, koja se po svojoj strukturi veoma razlikuju, od jednostavnih molekula, kao što su fenolne kiseline do visoko kondenzovanih jedinjenja kao što su tanini. U biljkama se ova jedinjenja pretežno nalaze u konjugovanom obliku, sa jednim ili više molekula šećera, te pokazuju aktivnost kako u hidrofobnim, tako i u liofilnim sistemima. Najzastupljenija fenolna jedinjenja su: fenolne kiseline (derivati benzoeve i cimetne kiseline), flavanoli, flavonoidi, dihidrohalkoni, izoflavoni, flavan-3-oli, antocijani, proantocijanidini, tanini, itd. Ova jedinjenja pored antioksidativnih poseduju i antimutagenu, antikancerogenu, anti-inflamatornu, antiulkusnu i antimikrobnu svojstva, a takođe smanjuju rizik od pojave kardiovaskularnih oboljenja.

Prisustvo antioksidanata u živim organizmima je od vitalnog značaja jer aerobni organizmi *in vivo* kontinualno stvaraju slobodne radikale i reaktivne kiseonične vrste. Slobodni radikali su najčešće vrlo reaktivni i u povećanim koncentracijama mogu da dovedu do oštećenja ćelija i tkiva što može biti uzrok velikog broja oboljenja (Nikolić i sar., 1998).

Istraživanja u oblasti hemije, biohemije i medicine potvrđuju da voće, povrće, začinsko

i lekovito bilje, žitarice i druge namirnice biljnog porekla, kao i njihovi ekstrakti, sadrže prirodne antioksidante: polifenolna jedinjenja, vitamine (vitamin E, vitamin C), terpene i dr. (Scalbert i Williamson, 2000). Zahvaljujući tome pokazuju antineoplastična, antiviralna, antiinflamatorna, antialergijska i antioksidativna svojstva (Capasso i sar., 2005).

Polifenolna jedinjenja poseduju mnoga biološka i farmakološka dejstva, što ukazuje da oni u značajnoj meri utiču na osnovne ćelijske funkcije kao što su rast, deoba i/ili smrt ćelije (apoptoza). Antioksidativno dejstvo polifenolnih jedinjenja različitog porekla dokazano je u raznim eksperimentalnim sistemima *in vitro* i to tokom: stabilizacije vitamina C, inhibicije lipidne peroksidacije u mikrozomima i mitohondrijama jetre, metabolizma arahidonske kiseline, autooksidacije metil linoleata, tokom inhibicije citotoksičnosti u primarnoj kulturi hepatocita (Bendich i sar., 1986; Ho i sar., 1992). Antioksidativna aktivnost polifenolnih jedinjenja zasniva se na njihovom redoks potencijalu, pa stoga oni mogu da deluju kao redukujući agensi, „skevendžeri“ singletnog kiseonika, da otpuštaju vodonik i helatizuju metale (Ivanova i sar., 2005).

Nekoliko hiljada prirodnih polifenolnih jedinjenja identifikovano je u jestivim biljkama. Poznato je da su divlje samonikle vrste biljaka daleko bogatije polifenolnim jedinjenjima od gajenih vrsta.

Detaljnim pregledom literature utvrdili smo da ima malo podataka o sistematskom fitohemijskom ispitivanju samoniklih biljaka sa područja Jugoistočne Srbije. Izabrali smo biljne vrste koje imaju veliki značaj u našoj tradicionalnoj medicini, a neke od njih imaju značaj i u ishrani (glog i trnjina). U doktorskoj disertaciji biće proučavane sledeće biljne vrste:

- bulka (*Papaver rhoeas L.*) (cvet);
- glog (*Crataegus oxyacantha L.*) (plod);
- trnjina (*Prunus spinosa L.*) (plod);
- vranilovka (*Origanum vulgare L.*) (nadzemni deo biljke);
- neven (*Calendula officinalis L.*) (cvet);
- žavornjak (*Delphinium consolida L.*) (cvet);
- cikorija (*Cichorium intybus L.*) (cvet).

U okviru izrade doktorske teze bilo je potrebno izvršiti:

- pripremu ekstrakata bulke, gloga, trnjine, žavornjaka, cikorije, vranilovke i nevena primenom rastvarača različite polarnosti i njihovih smeša;

- određivanje sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja primenom Folin-Ciocalteu reagensa, flavonoida primenom metode po Markamu, antocijana primenom pH diferencijalne metode u ekstraktima ispitivanih biljaka primenom spektrofotometrijskih metoda;
- ispitivanje antioksidativne aktivnosti primenom DPPH metode;
- na osnovu dobijenih rezultata korelacionu analizu između sadržaja polifenolnih jedinjenja u ekstraktima ispitivanih biljnih vrsta i njihove antioksidativne aktivnosti;
- HPLC analizu odabranih ekstrakata u cilju određivanja kvalitativnog i kvantitativnog sastava ekstrakata ispitivanih biljaka;
- ispitivanje antimikrobne aktivnosti pripremljenih etanolnih ekstrakata ispitivanih biljnih vrsta na izabrane mikroorganizme i plesni;
- odrediti sadržaj metala primenom AAS metode, kako u samim biljkama i njihovim delovima, tako i u pripremljenim ekstraktima;
- na osnovu dobijenih rezultata ćemo izvršiti korelacionu analizu između sadržaja polifenolnih jedinjenja i sadržaja teških metala (PCA- *Principal Component Analysis*).

1. TEORIJSKI DEO

1.1. OKSIDATIVNI STRES I ANTIOKSIDATIVNA ZAŠTITA

Opstanak aerobnih organizama na Zemlji uslovjen je prisustvom molekulskog kiseonika (O_2). U metaboličkim procesima u ćelijama ovih organizama najveći deo kiseonika potpuno se redukuje do vode u respiratornom lancu ili se transformiše enzimskim reakcijama (Kojić, 2009). Međutim, jedan mali deo (2-3 %) ukupnog kiseonika u ćeliji se transformiše u reaktivne kiseonične oblike (ROS-Reactive Oxygen Species), tabela 1.1., koji su u stanju da reaguju sa osnovnim ćelijskim biomolekulima i strukturama i da izazovu njihovu inaktivaciju (Halliwell i Gutteridge, 1985, Mimica-Dukić, 1997).

Tabela 1.1. Najvažniji reaktivni oblici kiseonika

SLOBODNI RADIKALI	NE-RADIKALSKI OBLICI
superoksid anjon radikal O_2^{\cdot} hidroperoksil radikal HOO^{\cdot} hidroksil radikal HO^{\cdot} alkil i alkoksil radikali R^{\cdot} , RO^{\cdot} peroksil radikal ROO^{\cdot}	singlet kiseonik 1O_2 organski peroksiidi $ROOH$ vodonik peroksid H_2O_2

Producija kiseoničnih radikala u organizmu odvija se u nizu kataboličkih i anaboličkih procesa: u respiratornom lancu, oksidacijom ćelijskih biomolekula (tiola, hidrochinona, kateholamina, oksihemoglobina), dejstvom enzima (ksantin oksidaze, lipooksigenaze, prostaglandin sintetaze i dr.), dejstvom dvovalentnih metalnih jona. (Sayre i sar., 1999; Cadens i Davies, 2000; Božin, 2009).

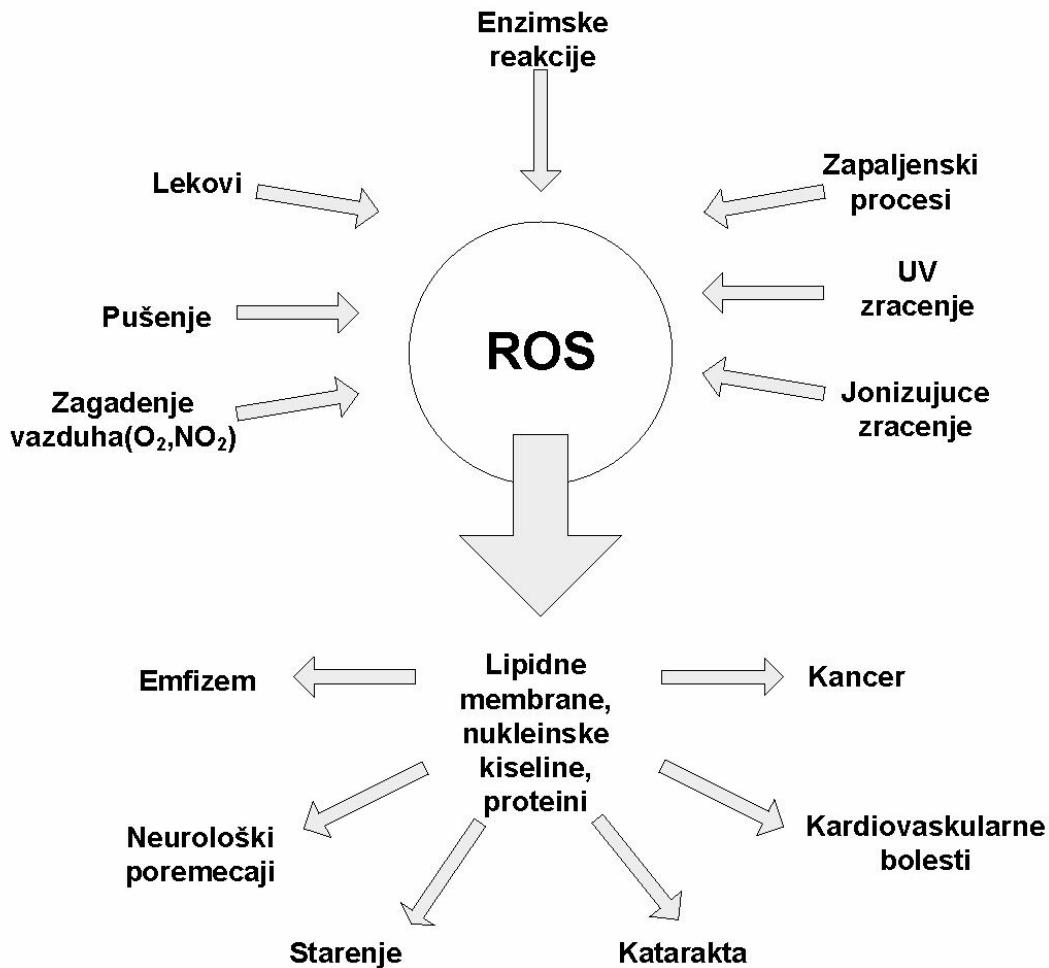
Hiperprodukcija reaktivnih kiseoničnih oblika može biti indukovana različitim endogenim (proces respiracije, aktivnost fagocita, autooksidacija biomolekula) i egzogenim (jonizujuće i UV-zračenje, kontaminirani vazduh, alkohol, ksenobiotici, pojedini lekovi, itd.) faktorima (Gutteridge i sar., 1985; Arai i sar., 1987).

Od svih kiseoničnih radikala, najveći oksidacioni potencijal poseduje hidroksil radikal koji je najčešće i odgovoran za inicijaciju lipidne peroksidacije. Navedene procese peroksidacije u biološkim sistemima katalizuju gvožđe i bakar (Halliwell, 1990).

Za H_2O_2 i $ONOO^-$ pokazano je da ćelijska membrana ne predstavlja barijeru za difuziju ovih vrsta unutar ćelije ili među ćelijama, te mogu indukovati oksidacioni stres praktično bilo gde u ćeliji (Groves, 1999). U normalnim uslovima, produkcija toksičnih oblika kiseonika je u ravnoteži sa antioksidativnim sistemom odbrane organizma. Disbalans ovog ravnotežnog stanja u organizmu, tj. stanje u kome je ravnoteža između prooksidanata i

antioksidanata u ćeliji pomerena na stranu prooksidanata, naziva se oksidativni stres (Sies, 1985).

Intenzivna ispitivanja uloge oksida azota kao neurotransmitera i glasnika u ćeliji, dovela su do saznanja o postojanju nitroznog stresa, kao još jednog oblika oksidativnog stresa u biološkim sistemima (Sayre i sar., 1999; Nizolek i sar., 2003).



Slika 1.1. Uzrok nastajanja ROS-a i njegovo dejstvo

1.2. DEJSTVO SLOBODNIH RADIKALA U ŽIVIM SISTEMIMA

Reaktivni oblici kiseonika (O_2^- , OH^\cdot , LOO^\cdot) i reaktivni oblici oksida azota (NO^\cdot i $ONOO^-$) spadaju u najvažnije slobodne radikale bioloških sistema (Dikalov i sar., 1997). Kao što je već istaknuto, sve ove reaktivne vrste mogu reagovati sa biomolekulima prisutnim u ćelijskim strukturama. Neke od ovih interakcija igraju važnu ulogu u prenosu signala ili

predstavljaju deo mehanizma imunog sistema, dok druge dovode do patoloških promena i čine osnovu mnogih oboljenja (Ganong, 1996; Groves, 1999).

Aktivno učešće nekih radikalnih vrsta u metaboličkim procesima predstavlja važan činilac mehanizma enzimske katalize, kao što je slučaj sa tiozil radikalom u enzimu ribonukleozid-difosfat-reduktazi i superoksid anjon radikalom u reakcionom mehanizmu indolamindioksigenaze (Braun i sar., 2005). Još jedan primer kontrolisanog radikalnog procesa je i mehanizam biosinteze prostaglandina (Basu, 2006). Reaktivne kiseonične vrste, a pre svega superoksid anjon (O_2^-) imaju nezamenljivu ulogu u procesu fagocitoze, pa samim tim i inflamatornog odgovora organizma na antigene iz spoljašnje sredine (Halliwell i Gutteridge, 1986).

U poslednjoj deceniji potvrđena je ključna uloga NO^- radikala u mnogim biološkim procesima. Na primer, aktivacijom enzima guanilat ciklaze, NO^- pospešuje produkciju vazorelaksanta cGMP, koji izaziva relaksaciju glatkih mišića krvnih sudova i dovodi do njihove dilatacije (Hippeli i Elstner, 1999). NO^- radikal generišu i ćelije imunog sistema, pri čemu se on uključuje u nespecifične odbrambene mehanizme, inhibirajući proliferaciju tumorskih ćelija i mikroorganizama. Baktericidna aktivnost se objašnjava kombinovanjem NO^- sa reaktivnim kiseoničnim oblicima (ROS). (Watanabe i sar., 2007).

Intenzivna proučavanja uloge slobodnih radikala u organizmu, daju mnoštvo podataka o njihovom štetnom delovanju. Naime, endogena oksidativna oštecenja proteina, lipida i DNK smatraju se važnim etiološkim faktorima u procesu starenja i nastanku hroničnih oboljenja kao što su kancer, arteroskleroza i neka neurodegenerativna oboljenja (Mordente i sar., 1998). Patologije vezane za ova oboljenja nastaju kada produkcija reaktivnih kiseoničnih vrsta i drugih slobodnih radikala prevaziđu kapacitet antioksidantnih mehanizama u ćelijama i tkivima živih organizama. (McCall i Frei, 1999).

Brojni literarni podaci potvrđuju da su slobodni radikali i lipidna peroksidacija glavni promotori neuroloških i neurodegenerativnih poremećaja tipa srčanog udara, reperfuzionih oštećenja, arteroskleroze i ishemične demencije. (Yen i Hsieh, 1998; Groves, 1999; Mimica-Dukić i Božin, 2008). Glavnim uzročnikom nastanka ovih oboljenja smatra se OH^- radikal, zbog veoma visokog afiniteta stupanja u interakciju sa većinom biomolekula (DNK, RNK, enzimi, lipidi), uz razvoj patoloških uslova u ćelijama i tkivima.

U poređenju sa ostalim tkivima, centralni nervni sistem pokazuje nešto veću osjetljivost na štetni uticaj ROS, pre svega zbog prisustva značajne količine nehemskih jona gvožđa za koje je potvrđeno da imaju katalitičku ulogu u produkciji reaktivnih radikalnih

oblika (Ciuffi i sar., 1991), ali i visoke koncentracije askorbinske kiseline koja u prisustvu jona gvožđa pokazuje proksidativno delovanje (Sadrzadeh i Eaton, 1988).

Poznato je i da u nervnom tkivu postoji relativno visoka koncentracija nezasićenih masnih kiselina koje lako podležu peroksidaciji (Strong i sar., 1991). Brojna patofiziološka istraživanja dovode u direktnu vezu reaktivne radikalske oblike i lipidnu peroksidaciju sa etiologijom značajnih neuroloških i neurodegenerativnih poremećaja kao što su moždani udar, Parkinsonova i Alzheimerova bolest (Yen i Hsieh, 1998; Groves, 1999; Božin i sar., 2007).

Pored opisanih bioloških oštećenja, lipidna peroksidacija predstavlja i osnovni uzrok kvarenja hrane i kozmetičkih proizvoda. Naime, nezasićene masne kiseline u lipidima hrane podležu oksidaciji delovanjem reaktivnih kiseoničnih oblika, čime se menjaju njene organoleptičke i hranljive karakteristike. Kao rezultat peroksidacije masnih kiselina nastaju razni produkti: aldehidi, ketoni i dr., koji utiču na zdravstvenu bezbednost, boju, ukus i konzistenciju hrane. (Jimenez i Garcia-Carmona, 1999; Mišan, 2009).

1.3. ANTIOKSIDANSI

Najšire prihvaćena definicija bioloških antioksidanata jeste ona koju je dao Halliwell (1990), a prema kojoj su antioksidansi “supstance koje prisutne u malim koncentracijama u odnosu na supstrat (biomolekul) koji se oksiduje, značajno usporavaju ili sprečavaju oksidaciju tog supstrata”.

Shi i sar. (2001) klasifikovali su antioksidante prema nivou i načinu delovanja u ljudskom organizmu na: preventivne antioksidante, “skevndžer” antioksidante i “reparacione” antioksidante. Preventivni antioksidanti sprečavaju nastanak slobodnih radikala. “Skevendžer” antioksidanti poseduju sposobnost da “hvataju” slobodne radikale. “Reparacioni” antioksidanti deluju posebnim mehanizmima, obnavljujući ili uklanjajući oštećene vitalne biomolekule koji nastaju u uslovima oksidativnog stresa. U “reparacione” antioksidante ubrajaju se fosfolipaze, proteaze, enzimi koji obnavljaju DNK, transferaze, itd.

Prema mestu nastajanja antioksidanti značajni za ljudski organizam dele se na: endogene i egzogene. Endogeni antioksidanti predstavljaju antioksidante koji nastaju u ljudskom organizmu, dok se egzogeni unose putem hrane ili lekova. Fenolna jedinjenja su jedna od najvažnijih grupa prirodnih egzogenih antioksidanata, čija je aktivnost uslovljena strukturnim karakteristikama.

1.3.1. Primarna antioksidativna zaštita

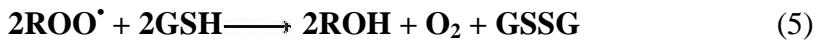
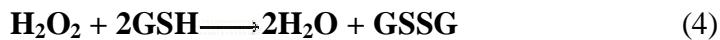
Enzimski sistemi koji učestvuju u primarnoj antioksidativnoj zaštiti su superoksid dismutaza, glutation peroksidaza i katalaza. *Superoksid dismutaza* (SOD) katalizuje dismutacije među superoksid anjon radikalima uz produkciju H₂O₂ i kiseonika. Neutralizaciju nastalog H₂O₂ vrše glutation peroksidaza ili katalaza.



Glutation peroksidaza (GSHPx) redukuje H₂O₂ i hidroperokside masnih kiselina. Ovaj enzim je prisutan u citosolu gde štiti fosfolipide i sfingolipide membrana od oksidativne destrukcije.



Katalaza (CAT), katalizuje razgradnju nastalog H₂O₂, dok peroksidaza katalizuje oksidaciju različitih supstrata pomoću H₂O.



Pored ovih enzima, postoji i niz drugih sa sličnom funkcijom kao što su selen nezavisna GSHPx, glutation reduktaza, redukovani glutation (GSH) i glukozo-6-fosfat dehidrogenaza.

U sistem primarne antioksidantne zaštite ubrajaju se i neenzimske supstance kao što su proteini transferin i ceruloplazmin koji imaju bitnu ulogu u transportu metalnih jona, zatim albumin, mokraćna kiselina i bilirubin. Svi navedeni primarni antioksidanti čine koordiniranu odbranu organizma od reaktivnih radikalnih oblika.

1.3.2. Sekundarna antioksidantna zaštita

Sistem sekundarne antioksidativne zaštite čine brojna niskomolekularna jedinjenja različitog porekla i karaktera, kao što su ubihinon, L-askorbinska kiselina, tokoferoli, karotenoidi, fenoli i njihove kiseline, flavonoidi, derivati hidroksicinamata i dr. Kako je struktura ovih jedinjenja veoma raznovrsna, tako su različiti i mehanizmi kojima ona ostvaruju svoju aktivnost u sistemu antioksidantne zaštite. Najčešće su to hvatači (“skevendžeri”) slobodnih radikala, donori protona, inhibitori enzimskih sistema, helatori jona prelaznih metala, itd. U sistem sekundarne antioksidantne zaštite mogu se ubrojiti i enzimi koji aktivno učestvuju u otklanjanju oksidativnih oštećenja nukleinskih kiselina, lipida i proteina, kao što su: endo i egzonukleaze, DNK polimeraze i ligaze, fosfolipaza A2, GSHPx i fosfolipid- zavisna GSHPx, glikozilaze, kao i brojni proteolitički enzimi. Ovi enzimi

“popravljaju” oštećene molekule DNK, uklanjaju oksidovane masne kiseline membranskih lipida i kroz procese resinteze obnavljaju oksidovane aminokiseline i proteine.

Iz stabljika, lišća, cvetova i plodova nekih biljaka, klica kukuruza, zobi, pirinčanog semena, kao i mnogih začinskih biljaka ekstrahovani su sirovi ekstrakti jakih antioksidacionih osobina. U ovim ekstraktima, instrumentalnim analitičkim metodama su ustanovljena različita organska jedinjenja, od kojih dominantnu ulogu pri oksidativnom delovanju imaju polifenolna jedinjenja.

Smatra se da se deo antioksidativnog potencijala mnogih vrsta biljaka može pripisati polifenolnim jedinjenjima. Biljni polifenoli se ne smatraju uvek pravim antioksidantima, ali je u mnogim *in vitro* istraživanjima dokazan antioksidativni potencijal fenolnih materija u vodenoj fazi, “skevendžing” radikala, kao i pojačanje rezistentnosti prema oksidaciji lipoproteina male gustine, koji ukazuju na patogenezu u slučaju koronarnih bolesti.

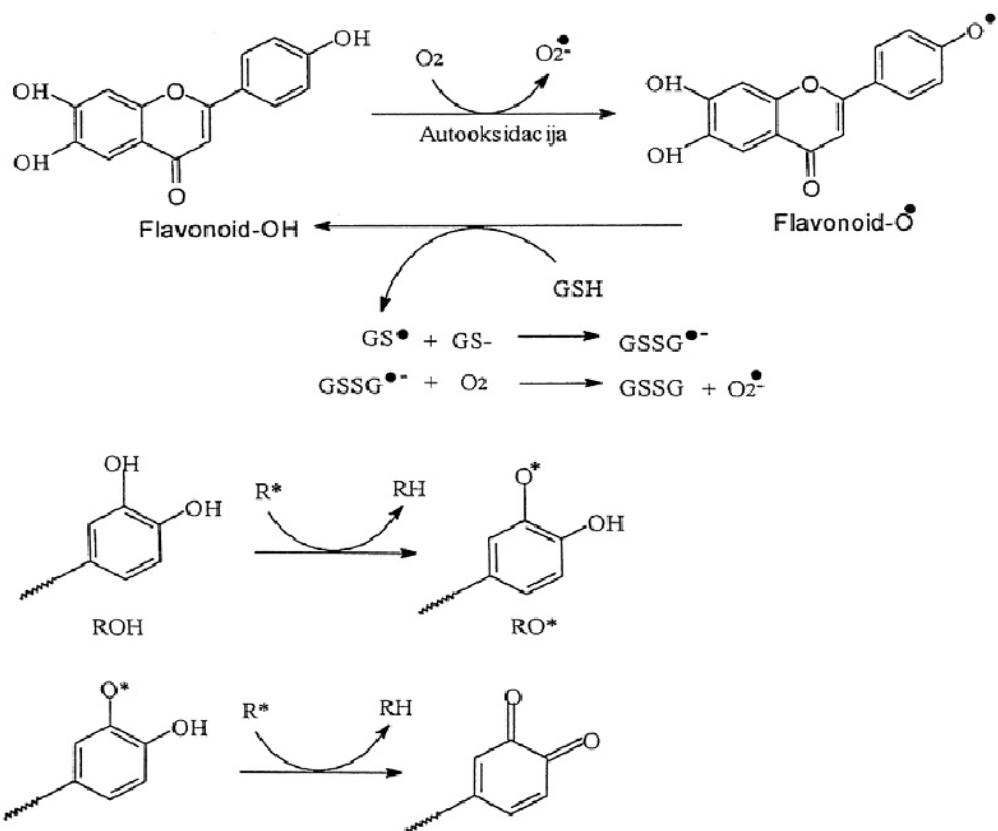
Polifenolna jedinjenja ispoljavaju antioksidativnu aktivnost u biološkim sistemima na više načine i to:

- predajom H– atoma, direktnim vezivanjem („hvatanjem“) slobodnih kiseonikovih i azotnih radikala;
- heliranjem prooksidativnih metalnih jona (Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} i Mg^{2+});
- aktiviranjem antioksidacijskih enzima;
- inhibicijom prooksidativnih enzima (lipoksiгенaza, NAD(P)H oksidaza, ksantin-oksidaza, oksidaza, enzimi citohroma P-450).

U poslednje vreme flavonoidi privlače posebnu pažnju naučne javnosti zbog izvanredne antioksidativne i antiradikalne aktivnosti. Istraživanja su pokazala da su flavonoidi dobri "hvatači" slobodnih radikala pa imaju značajnu ulogu u farmaceutskoj i prehrabrenoj industriji. Oni inhibiraju oksidaciju lipida, koja se u biološkim sistemima dovodi u vezu sa pojavom hroničnih oboljenja i starenjem ćelija. Flavonoidi inhibiraju neke enzimske sisteme, reaguju sa peroksil radikalom kao vitamin E i pri tome okončavaju autooksidaciju nezasićenih masnih kiselina. S porastom molekulske mase antioksidativna aktivnost polifenola se smanjuje.

Antioksidativno delovanje polifenola, a time i flavonoida, zavisi od njihove strukture. Flavonoidi inhibiraju enzime odgovorne za nastajanje superoksid anjon radikala kao što su ksantin-oksidaza i protein kinaza C, ali inhibiraju i cikloksigenazu, lipoksiгенazu, mikrozomalnu monoksiгенazu i glutation S-transferazu, mitohondrijalnu sukcin oksidazu, NADH oksidazu, čime sprečavaju nastajanje reaktivnih vrsta kiseonika. Flavonoidi pokazuju

antioksidativnu aktivnost kako u hidrofilnim, tako i u lipofilnim sistemima. Flavonoidi pod uslovima oksidativnog stresa mogu delovati prooksidativno, pa umesto "hvatanja", mogu formirati slobodne radikale. Mehanizam prooksidativnog delovanja flavonoida dat je na slici 1.2.



Slika 1.2. Mehanizam prooksidativnog delovanja flavonoida

1.4. PRIRODNA FENOLNA JEDINJENJA

Fenolna jedinjenja se mogu definisati kao supstance koje poseduju aromatični prsten za koji je vezana jedna ili više hidroksilnih grupa. U biljkama se mogu naći veoma raznovrsna fenolna jedinjenja uključujući proste fenole, fenilpropanoide, derivate benzoeve kiseline, flavonoide, stilbene, tanine, lignane i lignine (Butler, 1992). Veliki broj fitohemikalija ima antioksidativno delovanje, ali su prirodna fenolna jedinjenja privukla najveću pažnju istraživača.

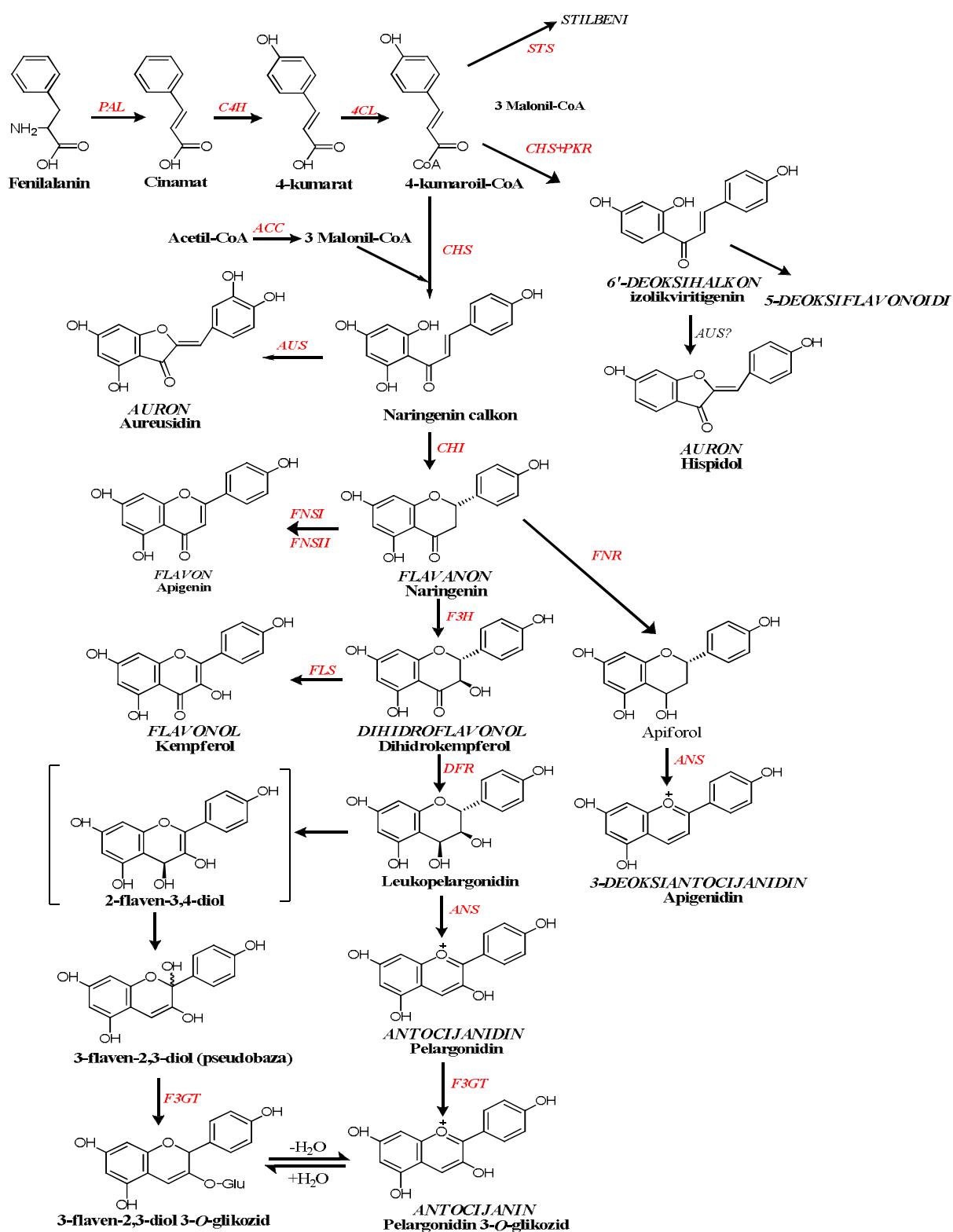
Prirodna aromatična jedinjenja nastaju tokom dva biosintetička puta: ciklusa šikimske kiseline i acetatno–malonatnog ciklusa, a u cilju formiranja osnovne strukturne jedinice flavonoida C₆–C₃–C₆. Flavonoidi se sintetišu iz aromatičnih amino kiselina (najčešće fenilalanina, ređe tirozina i triptofana), a prekursor u sintezi aromatičnih amino kiselina je šikimska kiselina. Metabolizmom ugljenih hidrata nastaju fosfoenolpiruvat (glikoliza) i

eritroza-4-fosfat (pentoza-fosfatni put), čijom kondenzacijom nastaje šikimska kiselina. Nizom reakcija iz šikimske kiseline formiraju se aromatične amino kiseline (fenilalanin, tirozin i triptofan), a ovaj biosintetički put naziva se ciklus šikimske kiseline. Ovim ciklусом nastaju jedinjenja C₆-C₃ tipa (fenilpropanoidi), odnosno B i C prsten flavonoida (Delgado-Vargas i sar., 2003). Takođe metabolizmom ugljenih hidrata i masnih kiselina nastaje sirćetna kiselina. Aktivirana sirćetna kiselina (acetil-CoA) se prevodi u malonil-CoA i ovaj biosintetički put predstavlja acetatno-malonatni ciklus. Ovim biosintetičkim putem nastaje prsten A flavonoida (Miletić i Miletić, 1996). Fenilalanin-amonijum liaza katalizuje reakciju otpuštanja amonijaka iz fenilalanina, što vodi nastajanju cimetne kiseline. Uvođenjem hidroksilne grupe u para položaj cimetne kiseline nastaje kumarinska kiselina. Dalja hidroksilacija kumarinske kiseline u položaju 3 vodi formiranju kafene, dok hidroksilacija u položaju 3 i 5 uz istovremeno metilovanje ovih položaja dovodi do formiranja ferulne i sinapinske kiseline. Kako ova jedinjenja sadrže fenil grupu i bočni lanac od tri C atoma jednim imenom se nazivaju fenilpropanoidi (C₆-C₃), i služe kao prekursori u sintezi lignina i mnogih drugih jedinjenja. Flavonoidi, uključujući flavone, izoflavone i antocijanidine nastaju kondenzacijom fenilpropanoida. Uz učešće tri molekula malonil-koenzima A, a zatim kondenzacijom novonastale jedinice sa *p*-kumarinskom kiselinom formira se čalkon, koji postepeno ciklizuje i dolazi do stvaranja naringenina (flavon). Ova tačka u biosintezi predstavlja “tačku grananja” i odavde dolazi do sinteze raznih strukturnih klasa flavonoida (Grotewold, 2006).

Na Slici 1.3. prikazan je uopšteni put sinteze fenilpropanoida i flavonoida. Neki od važnijih enzima koji učestvuju u biosintezi su:

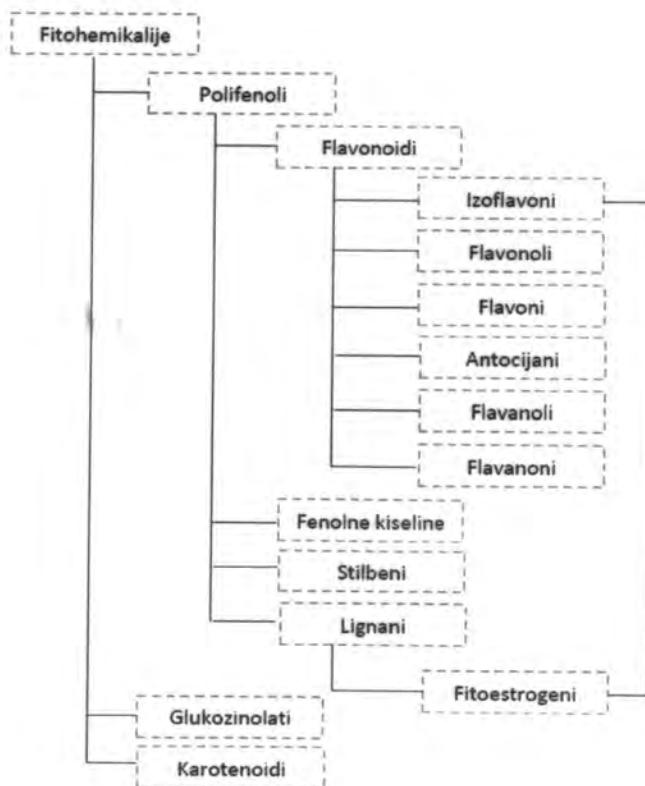
1. Acetil-CoA: karbon-dioksid ligaza (ACC) koja katalizuje ATP-zavisnu karboksilaciju acetil-CoA, sa Mg²⁺ kao kofaktorom, do malonil-CoA.
2. Fenilalanin-amonijum lijaza (PAL) konvertuje fenilalanin u *trans*-cinamat (*E*-cinamat), *trans*-eliminacijom amonijaka i pro-3*S* protona.
3. Cinamat-4-hidroksilaza (C4H) katalizuje hidroksilaciju *trans*-cinamata u *trans*-4-kumarat.
4. 4-kumarat-CoA ligaza (4CL) aktivira hidroksicimetne kiseline za ulazak u kasnije delove biosintetskog puta fenilpropanoida, formiranjem odgovarajućeg tiol estra CoA. 4-kumarat je glavni u sintezi flavonoida, ali 4CL prihvata i druge hidroksicimetne kiseline kao supstrate.

5. Čalkon sintaza (CHS) katalizuje niz sekvenčijalnih reakcija dekarboksilacije i kondenzacije, korišćenjem 4-kumaroil-CoA i tri molekula malonil-CoA, u cilju stvaranja poliketidnih intermedijera koji podležu reakcijama ciklizacije i aromatizacije, koji dovode do stvaranja A-prstena i rezultujuće strukture čalkona.
6. Čalkon izomeraza (CHI) katalizuje stereospecifičnu izomerizaciju čalkona do njegovog odgovarajućeg (2S)-flavanona.
7. Flavanon-3 β -hidroksilaza (F3H) katalizuje konverziju (2S)-flavanona u odgovarajuće (2R, 3R)-dihidroflavonole.
8. Dihidroflavonol-4-reduktaza (DFR) katalizuje stereospecifičnu konverziju (2R, 3R)-trans-dihidroflavonola do odgovarajućih (2R, 3S, 4S)-flavan-2,3-trans-3,4-cis-diol (leukoantocijanidina).
9. Antocijanidin sintaza (ANS) katalizuje redukciju leukoantocijanidina do odgovarajućih antocijanidina.



Slika 1.3. Šema biosinteze flavonoida

Lekovita svojstva biljaka poznata su od najranijih vremena ljudske civilizacije. Od tada pa sve do današnjih dana biljke su se upotrebljavale kao hrana, lekovi, konzervansi, u religiozne svrhe, za ukras, itd. Sve do pojave hemije, a naročito sinteze organskih molekula u XIX veku, izvor farmakološki aktivnih supstanci bile su isključivo biljke (Kujundžić, 2002). Veliki broj eksperimenata, radova i studija ističe pozitivnu ulogu voća, povrća, žitarica i drugih jestivih biljaka, u preventivi i lečenju mnogih oboljenja kod čoveka (Moyer i sar., 2002). Takođe, dobijeni rezultati ukazuju na visok sadržaj prirodnih antioksidansa u biljkama (Keli i sar., 1996; Croft, 1999; Lea i Leegod, 1999). Fitohemikalije su sekundarni metaboliti biljaka koji imaju potencijalan pozitivan efekat na zdravlje, a nisu esencijalni nutrijenti (Micronutrient Information Center, Linus Pauling Institute). Poslednjih decenija su dobile posebno mesto u mnogim ispitivanjima, a naročito u istraživanjima antioksidativnih supstanci sa visokim antiradikalским potencijalom. Na slici 1.4. su prikazane neke od podela fitohemikalija sa izraženim antioksidativnim delovanjem (Blasa i sar., 2010).



Slika 1.4. Različite grupe fitohemikalija sa izraženom antioksidativnom aktivnošću

Pored mnoštva fitonutrienata, biljke sadrže i polifenolna jedinjenja- veliku i heterogenu grupu biološki aktivnih nenutrienata. Veliki broj fitohemikalija ima antioksidativno delovanje, ali su polifenolna jedinjenja privukla najveću pažnju istraživača. Polifenolna jedinjenja su

sekundarni metaboliti biljaka različitih strukturalnih karakteristika, sa fenolnim jezgrom kao osnovnim konstituentom.

Fenolne kiseline i flavonoidi su od svih polifenola najčešće predmet naučnih istraživanja. U flavonoide se ubrajaju: flavoni, izoflavoni, flavanoni, flavonoli, flavanoli, flavani, katehini, antocijanidini, leukoantocijanidini, halkoni, dihidrohalkoni i auroni. Fenolne kiseline koje su zastupljene u biljnom svetu su hidroksi derivati benzoeve i cimetne kiseline.

U literaturi se najčešće kao prirodni izvori polifenolnih jedinjenja spominju začinsko i lekovito bilje. Biosinteza i akumulacija polifenolnih jedinjenja se kontroliše, endogeno, tokom rasta (Macheix i sar., 1990; Strack, 1997) ili se reguliše egzogenim faktorima kao što su svetlost, temperatura, oštećenja i drugi stresni faktori (Dixon i Paiva, 1995). Fenilalanin, koji nastaje biosintetskim putem šikimske kiseline, je prekursor većine polifenolnih jedinjenja u biljkama. Hidroksicimetne kiseline, naročito njihovi estri sa koenzimom A, su najčešće strukturalni elementi polifenolnih jedinjenja, kao što su estri i amidi cimetne kiseline, lignini, flavonoidi i kondenzovani tanini (Macheix i sar., 1990).

Polifenolna jedinjenja se akumuliraju uglavnom u ćelijskim zidovima (Guern i sar., 1987; Monties, 1989) i to najvećim delom na površini ploda (epidermalni i subepidermalni slojevi), jer biosinteza ovih jedinjenja zavisi od svetlosti (Wollenweber, 1994; Macheix i sar., 1990). Akumulacija polifenolnih jedinjenja varira i u zavisnosti od fiziološkog stanja biljke, kao rezultat ravnoteže između biosinteze i daljeg metabolizma (Macheix i sar., 1990; Harborne, 1994). Brojna istraživanja potvrđuju da je koncentracija polifenolnih jedinjenja manja u zrelog plodu, osim kod crvenih plodova kod kojih se flavonoidi i antocijani akumuliraju tokom sazrevanja (Britton, 1983; Macheix i sar., 1990).

Polifenolna jedinjenja su od velike važnosti za biljke jer grade integralni deo strukture ćelijskog zida, uglavnom kao polimeri (lignini). Ove strukture služe kao mehanička barijera u odbrani od mikroorganizama. Lignini su, posle celuloze, najzastupljenije organske strukture na Zemlji (Wallace i Fry, 1994; Strack, 1997).

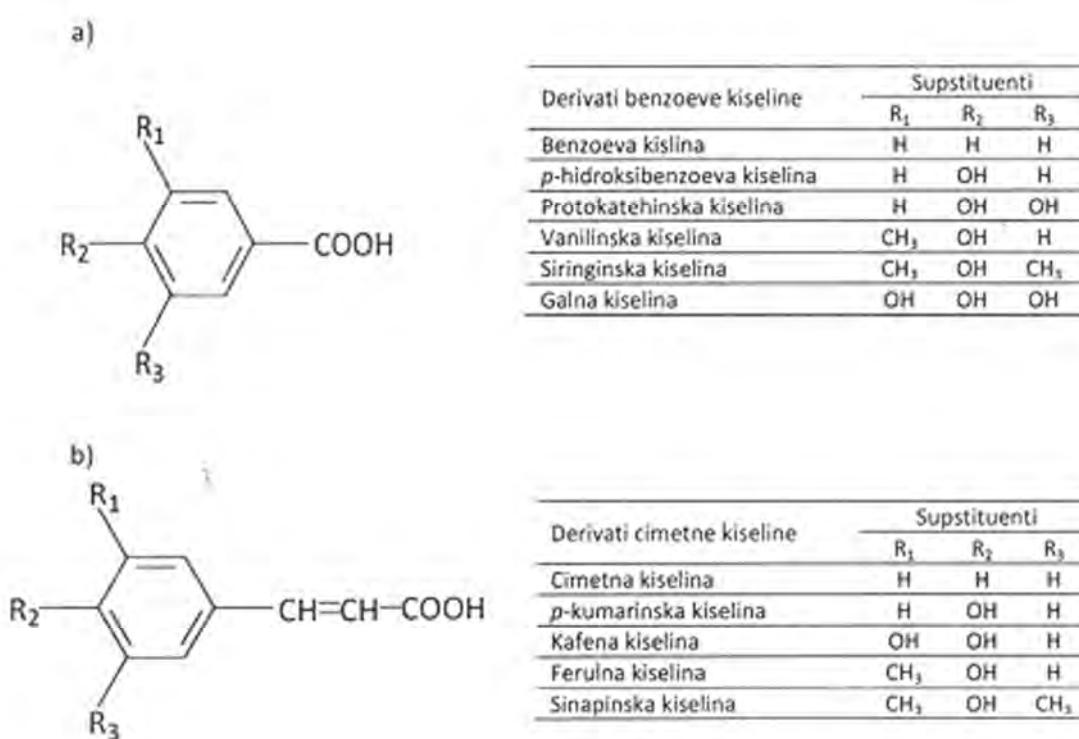
Polifenolna jedinjenja su veoma značajna kako za organoleptičke osobine hrane tako i za njene pozitivne zdravstvene efekte. Najvažnija dejstva polifenolnih jedinjenja su: antioksidativno, antibakterijsko i antivirusno (Lampe, 1999). Neka polifenolna jedinjenja imaju ulogu biljnih pigmenata.

Najvažnija uloga flavonoida, naročito antocijana, u kombinaciji sa flavonima i flavonolima kao kopigmentima, je u formiranju boje voća i cveća (Harborne, 1994; Strack, 1997). Boja cvetova i plodova je veoma bitna za privlačenje insekata i ptica u cilju opaši-

vanja i raznošenja semena. Pored dobro poznatih isparljivih terpena, polifenolna jedinjenja rastvorna u vodi, kao što su derivati benzoeve i cimetne kiseline, mogu poslužiti kao alelopatske supstance. Polifenolna jedinjenja mogu biti i signalni molekuli u interakcijama biljke i bakterija koje fiksiraju azot kod mahunarki (Strack, 1997). Značajna uloga flavonoida i fenolnih kiselina je njihovo učešće u odbrambenom mehanizmu biljke. Dokazano je da se u uslovima stresa (prekomerno UV zračenje, oštećenje tkiva, infekcija) u biljkama indukuje sinteza polifenolnih jedinjenja (Britton, 1983; Dixon i Paiva, 1995). Polifenolna jedinjenja se mogu akumulirati pre i posle napada mikroorganizama. Pre infekcije su u formi toksina, dok su postinfekcijska polifenolna jedinjenja u formi tzv. fitoaleksina. Među polifenolnim toksinima i fitoaleksinima najvažnije su hidroksikumarini, derivati hidroksicimetne kiseline i flavonoli (Strack, 1997).

1.4.1. Fenolne kiseline

Fenolne kiseline se sastoje od fenolnog jezgra i bočnog niza koji sadrži jedan (derivati benzoeve kiseline) ili tri (derivati cimetne kiseline) ugljenikova atoma. Fenolne kiseline obuhvataju hidroksi i druge funkcionalne derivate benzoeve i cimetne kiseline.



Slika 1.5. Struktura fenolnih kiselina: (a) derivati benzoeve i (b) derivati cimetne kiseline

Varijacije u strukturi derivata hidroksibenzoeve kiseline nastaju hidroksilovanjem ili metilovanjem aromatičnog jezgra. U biljnom svetu se najčešće javljaju *p*-hidroksibenzoeva, vanilinska, siringinska i protokatehinska kiselina. One mogu biti prisutne u rastvoru konjugovane šećerima ili organskim kiselinama, ili vezane za čelijski zid, npr. u ligninima. Galna kiselina učestvuje u stvaranju hirolizujućih galotanina, a njenom kondenzacijom nastaje dimer- elaginska kiselina. Elaginska kiselina takođe ulazi u sastav elagiotanina. Derivati hidroksicimetne kiseline imaju C₆-C₃ strukturu. Najzastupljeniji derivati hidroksicimetne kiseline su *p*-kumarinska, kafena, ferulna i sinapinska kiselina. Derivati hidroksicimetne kiseline su prisutni u različitim konjugovanim formama. Konjugovane forme su estri hidroksikiselina kao što su hinska kiselina, šikimska kiselina i vinska kiselina, kao i njihovi glikozidi. Slobodne forme ukazuju na enzimsku hidrolizu u biljnom tkivu tokom ekstrakcije (Macheix i sar., 1990; Shahidi i Naczk, 1995).

Monofenoli i fenolne kiseline učestvuju u reakciji otpuštanja vodonikovog atoma i reakcijama „hvatanja“ slobodnih radikala. (Cuvelier i sar. 1992) potvrđili su da su polifenoli efikasniji antioksidanti od monofenola, kao i da uvođenje druge hidroksilne grupe u orto i para položaj značajno povećava ovu aktivnost. Tako je antioksidativna aktivnost orto-difenolnih kiselina, protokatehinske i kafene, veća od odgovarajućih monofenolnih kiselina iste strukture, *p*-hidroksibenzoeve i *p*-kumarinske kiseline. Galna kiselina sa tri hidroksilne grupe je efikasniji antioksidant od protokatehinske kiseline. Ipak, (Pokorny i sar. 1987) su saopštili da prisustvo više od tri hidroksilne grupe na aromatičnom jezgru ne poboljšava antioksidativnu efikasnost molekula. Rezultati su pokazali i da prisustvo jedne ili dve metoksi grupe u orto položaju povećava antioksidativnu aktivnost monofenola: sinapinska kiselina je aktivnija od ferulne kiseline, a ferulna je aktivnija od *p*-kumarinske kiseline; siringinska kiselina je efikasnija od vanilinske i *p*-hidroksibenzoeve kiseline (Cuvelier i sar., 1992). Više autora je zaključilo da prisustvo elektronondonorne (hidroksi ili metoksi) grupe u orto položaju značajno doprinosi stabilnosti nastalih aroksil radikala. Ferulna i vanilinska kiselina su pokazale značajno slabije antioksidativno delovanje od kafene i protokatehinske kiseline (Cort, 1974; Chimi i sar., 1988; Pokorny, 1987).

Pratt i Birac (1979) su zaključili da metoksi grupa u orto položaju kod ferulne kiseline stabilizuje fenoksil radikal koji nastaje u reakciji sa slobodnim radikalima, i na taj način povećava njen antioksidativni potencijal u odnosu na *p*-kumarinsku kiselinu.

Derivati hidroksicimetne kiseline su generalno bolji antioksidanti od derivata hidrok-

sibenzoeve kiseline zbog prisustva dvostrukih veza koja učestvuje u stabilizaciji nastalog aroksil radikala rezonancijom. Slična antioksidativna aktivnost galne kiseline i propilgalata ukazuje na slab uticaj esterifikacije na antioksidativnu aktivnost fenolnih kiselina.

Pratt i Birac (1979) su saopštili da je aktivnost kafene kiseline veća od ferulne i *p*-kumarinske kiseline zbog prisustva druge hidroksilne grupe i stvaranja intramolekularnih vodoničnih veza. Proton iz karboksilne grupe ima mali uticaj na antioksidativnu aktivnost. Tako su aktivnosti hlorogenske kiseline i kafene kiseline tokom inhibicije lipidne peroksidacije slične. Proton karboksilne grupe kafene kiseline supstituisan je hinskom kiselinom u molekulu hlorogenske kiseline. Alilna grupa, koja je prisutna kod derivata cimetne kiseline, povećava antioksidativni potencijal u odnosu na derivate benzoeve kiseline.

Pratt i Hudson (1990) su saopštili da je zaštitni efekat kafene kiseline (3,4-dihidroksicimetna kiselina) tokom oksidacije masti veći od protokatehinske kiseline (3,4-dihidroksibenzoeva kiselina). Prihvatljivo je objašnjenje da rezonanca alilnog ostatka povećava stabilnost fenoksil radikala.

Sintetički antioksidanti koji se upotrebljavaju u prehrabrenoj industriji su po strukturnim karakteristikama takođe fenolna jedinjenja: BHA- butilovani hidroksianizol, BHT- butilovani hidroksitoluen, TBHQ- 2-*terc*-butilhidroksihinon i PG- propilgalat. Njihova antioksidativna aktivnost je u tesnoj vezi sa struktrom, naročito sa njihovom sposobnošću otpuštanja vodonikovog atoma i stabilizacije proizvoda delokalizacijom elektrona u aromatičnom jezgru.

1.4.2. Flavonoidi

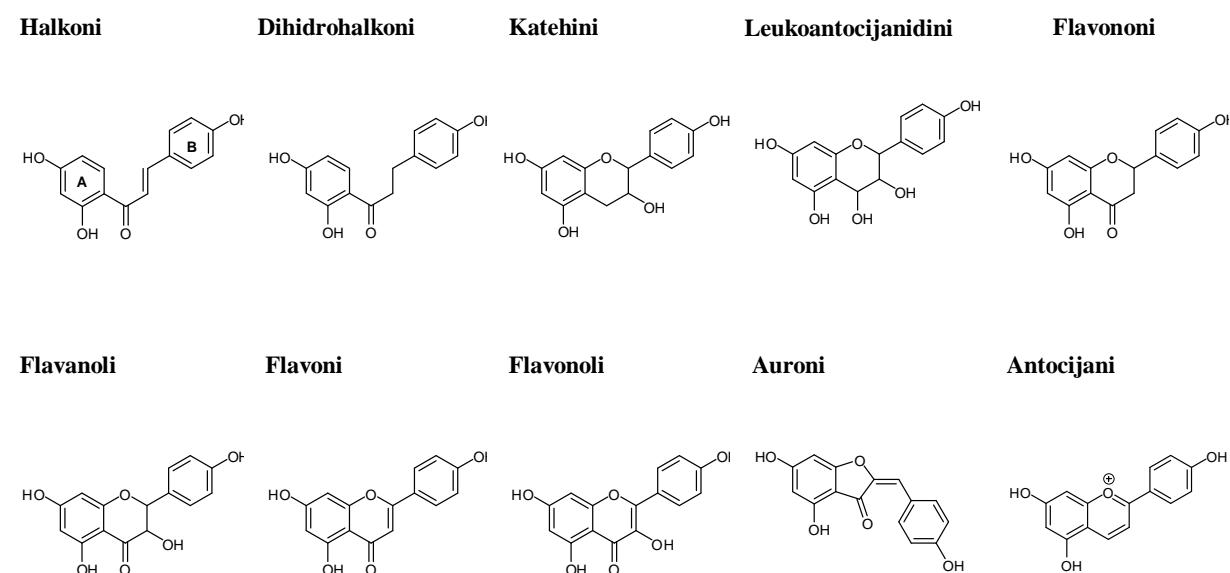
Termin „flavonoid“ predložili su Geisman i Hinseinner 1952. godine za označavanje svih biljnih pigmenata, koji imaju C₆-C₃-C₆ skelet, u kojima su dva benzenova prstena povezana preko C-3 jedinice (Janićijević i sar., 2008). To su u vodi rastvorni žuti, crveni ili ljubičasti pigmenti rasprostranjeni u svim biljnim organizma. Iz biljaka je izolovano i proučeno preko 3000 flavonoida koji su, s obzirom na stepen oksidacije centralnog piranskog prstena, podeljeni u dvanaest klase: flavoni, izoflavoni, flavanoni, flavonoli, flavanoli, flavani, katehini, antocijanidini, leukoantocijanidini, halkoni, dihidrohalkoni i auroni. Najzastupljeniji flavonoli su kvercetin, kampferol i miricetin, a od flavona najpoznatiji su luteolin i apigenin. Halkoni, auroni, flavanoni, dihidrohalkoni i izoflavoni se pojavljuju mestimično i u manjem broju biljnih vrsta. Flavanoni i izoflavoni su bezbojni, dok halkoni i auroni predstavljaju žute

pigmente.

Raznovrsnost i veliki broj struktura flavonoida rezultat su brojnih modifikacija njihovih osnovnih struktura kao što su: dodatne hidroksilacije, *O*-metilacije hidroksilnih grupa, dimerizacije, vezivanje neorganskog sulfata i najvažnije glikolizacija hidroksilnih grupa (nastajanje *O*-glikozida) ili flavonoidnog jezgra (nastajanje *C*-glikozida).

Flavonoidi su rasprostranjeni u svim zelenim biljkama, a nađeni su i u nižim organizmima. Najrasprostranjeniji su flavonoli i flavoni. Njihova glavna uloga u biljkama još uvek nije razjašnjena iako je utvrđeno da se ponašaju kao: antioksidansi, inhibitori enzima, fotosenzibilizatori i prenosioци energije, respiratori u biosintezama, a takođe imaju i estrogene i antikancerogene osobine (Laišić i Gruić-Injac, 1998).

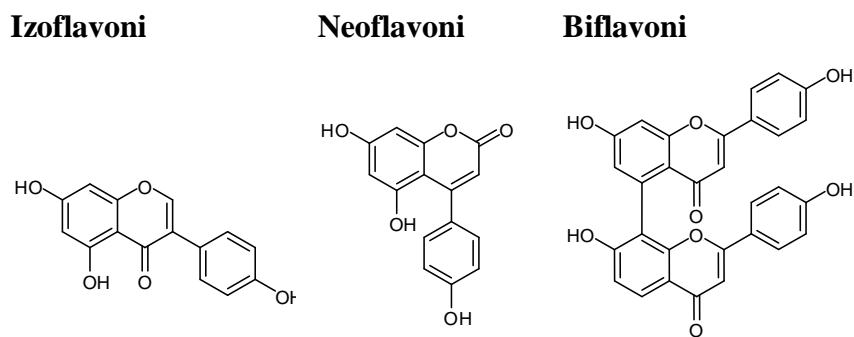
Osnovnu strukturu flavonoida čini difenilpropan ($C_6-C_3-C_6$), odnosno 2-fenil-hromen-4-on (osnovna struktura flavonoida); 3-fenil-hromen-4-on (osnovna struktura izoflavonoida) i 4-fenilkumarin (osnovna struktura neoflavonoida) (slika 1.4.). Svi flavonoidi mogu biti hidroksilovani, alkilovani i glikolizovani sa monosaharidima i oligosaharidima, a često imaju i acil grupe u različitim položajima na osnovnoj flavonoidnoj strukturi ili glikozidnom delu (Harborne i sar., 1999). Kod flavonoida postoji i velika sklonost ka umrežavanju i polimerizaciji, npr. tanini (Winkel-Shirley, 2001). Promenom oksidacionog stanja alifatičnog niza, odnosno heterocikličnog prstena, nastaju različite klase flavonoida (slika 1.6.).



Slika 1.6. Različite klase flavonoidnih jedinjenja

Vezivanjem prstena B za položaj 3 i 4 centralnog prstena nastaju i posebne klase

flavonoidnih jedinjenja izoflavoni i neoflavoni, dok povezivanjem dve flavonske jedinice nastaju biflavoni (slika 1.5).



Slika 1.7. Strukture nekih posebnih klasa flavonoidnih jedinjenja

Po fizičkim karakteristikama, flavonoidi spadaju u red čvrstih, bezbojno ili žuto obojenih supstanci sa izuzetkom anticijana čija boja može da varira od crvene do plave. Flavonoidi mogu egzistirati slobodni ili u polimernom obliku, zatim kao polimeri sa drugim flavonoidima, šećerima ili neflavonoidima (na primer, polimerizacijom katrehina i leukoantocijanidina nastaje klasa polimera koja se naziva proantocijanidinima). Estri flavonoida sa šećerima i neflavonoidima, prevashodno taninskim kiselinama, nazivaju se glikozidima. Za razliku od karotenoida koji su takođe žute boje, flavonoidi se iz prirodnog materijala ekstrahuju vodom ili još efikasnije 0,1 M hlorovodoničnom kiselinom. Iz dobijenog vodenog ekstrakta se pojedine grupe flavonoida mogu odvojiti particionom ekstrakcijom organskim rastvaračima. Tako se, na primer, etil-acetatom odvajaju catehini i leukoantocijanidini.

Osim što predstavljaju biljne pigmente, flavonoidi takođe doprinose ukusu, najčešće gorčini, i oporosti biljaka u kojima se nalaze. Ova klasa jedinjenja nesumnjivo učestvuje i u odbranbenom („defensive chemistry”) sistemu jer su oporost i gorčina koju daju biljkama neprijatni biljojedima, među koje spada i čovek, a takođe štite biljku i od štetnog dejstva UV zračenja.

Flavonoidi su jedni od najvažnijih biljnih pigmenata. U UV/Vis spektru flavonoida obično se uočavaju dva glavna apsorpciona maksimuma. Apsorpcioni maksimum koji se uočava u oblasti 240-285 nm obično se označava kao apsorpciona traka II, a apsorpcioni maksimum od 300-400 nm kao apsorpciona traka I. Apsorpciona traka II potiče od $\pi-\pi^*$

prelaza u A prstenu (benzenski sistem), a apsorpciona traka I od prelaza u B prstenu cinamoil sistema.

Za razliku od flavonoida koji apsorbuju u UV oblasti i koji se ne mogu smatrati pravim biljnim pigmentima (obično su kopigmenti), antocijani apsorbuju u vidljivoj oblasti spektra i predstavljaju prave biljne pigmente. Antocijanini pokazuju širok opseg boja od svetlo–roze preko crvene do plave.

U gotovo svakoj biljci pronađeni su flavonoli koji poseduju hidroksilnu grupu u položaju 3 pa se mogu nazvati i 3–hidroksiflavoni (Harborne i sar., 1999). Unutar svake klase, individualni flavonoli se razlikuju po broju i položaju hidroksilnih grupa, kao i po prirodi i stepenu alkilovanja i/ili glikozidacije. Najčešće se javljaju flavonoli sa hidroksilnim grupama u položajima 3' i 4' u prstenu B. Glikozidacija kod flavonola događa se najčešće u položaju 3. Šećer sa kojim najčešće grade glikozide je glukoza, a ređe sa galaktozom, ramanozom i ksilozom kao i sa disaharidima.

Pozitivni efekti flavonoida na zdravlje doprineli su naglom porastu upotrebe biljnih flavonoida kao konstituenata funkcionalne hrane. Međutim, povećan i nekontrolisan unos flavonoida može da ima prooksidativnu aktivnost, prouzrokuje mutagene procese i inhibira ključne enzime u metabolizmu hormona (Skibola i Smith, 2000).

Antioksidativni mehanizmi koji su karakteristični za flavonoide su otpuštanje vodonika, „hvatanje“ radikala i helatizacija metala. Kao i kod ostalih polifenolnih antioksidanata, broj i položaj hidroksilnih grupa utiče na antioksidativnu aktivnost. Miricetin sa tri hidroksilne grupe je aktivniji od kvercetina sa dve hidroksilne grupe i hesperitina sa jednom hidroksilnom grupom. Efektivno otpuštanje vodonika uslovljeno je prisustvom dve hidroksilne grupe u orto položaju u B prstenu. Hidroksilna grupa u položaju 5' B prstena i položaju 3 C prstena dodatno povećava sposobnost otpuštanja vodonikovog atoma. Na povećanje sposobnosti otpuštanja vodonikovog atoma takođe imaju uticaj hidroksilne grupe u položajima 5, 8 ili 7, 8, ali ne i 5, 7 u A prstenu. Karbonilna grupa u položaju 4 i dvostruka veza u C prstenu nemaju uticaja na ovaj mehanizam antioksidativne aktivnosti.

Na antioksidativnu aktivnost flavonoida utiču: prisustvo dve hidroksilne grupe u orto položaju u B prstenu, karbonilna grupa u položaju 4 C prstena. Hidroksilna grupa u položaju 3 C prstena nema uticaja na antioksidativnu aktivnost, dok je uticaj dvostrukе veze u C prstenu još uvek nejasan. Naime, Husain i sar. (1987) su saopštili da ova strukturalna karakteristika nema uticaja na antioksidativnu aktivnost flavonoida, dok Foti i sar. (1996) i Bors i sar. (1990) smatraju da je ova dvostruka veza u konjugaciji sa karbonilnom grupom u

položaju 4 C prstena i učestvuje u stabilizaciji radikala flavonoida delokalizacijom elektrona.

Za helatizaciju metala potrebno je da molekul flavonoida sadrži hidroksilne grupe u položajima 3' i 4' B prstena i, još važnije, karbonilnu grupu u položaju 4 C prstena i hidroksilnu grupu u položajima 3 ili 5 u C prstenu. Hidrogenovanjem dvostrukе veze u C prstenu rezultiralo je gubitkom sposobnosti helatizacije metala, verovatno zbog nemogućnosti delokalizacije elektrona koja se odigrava tokom stvaranja kompleksa flavonoida sa metalom.

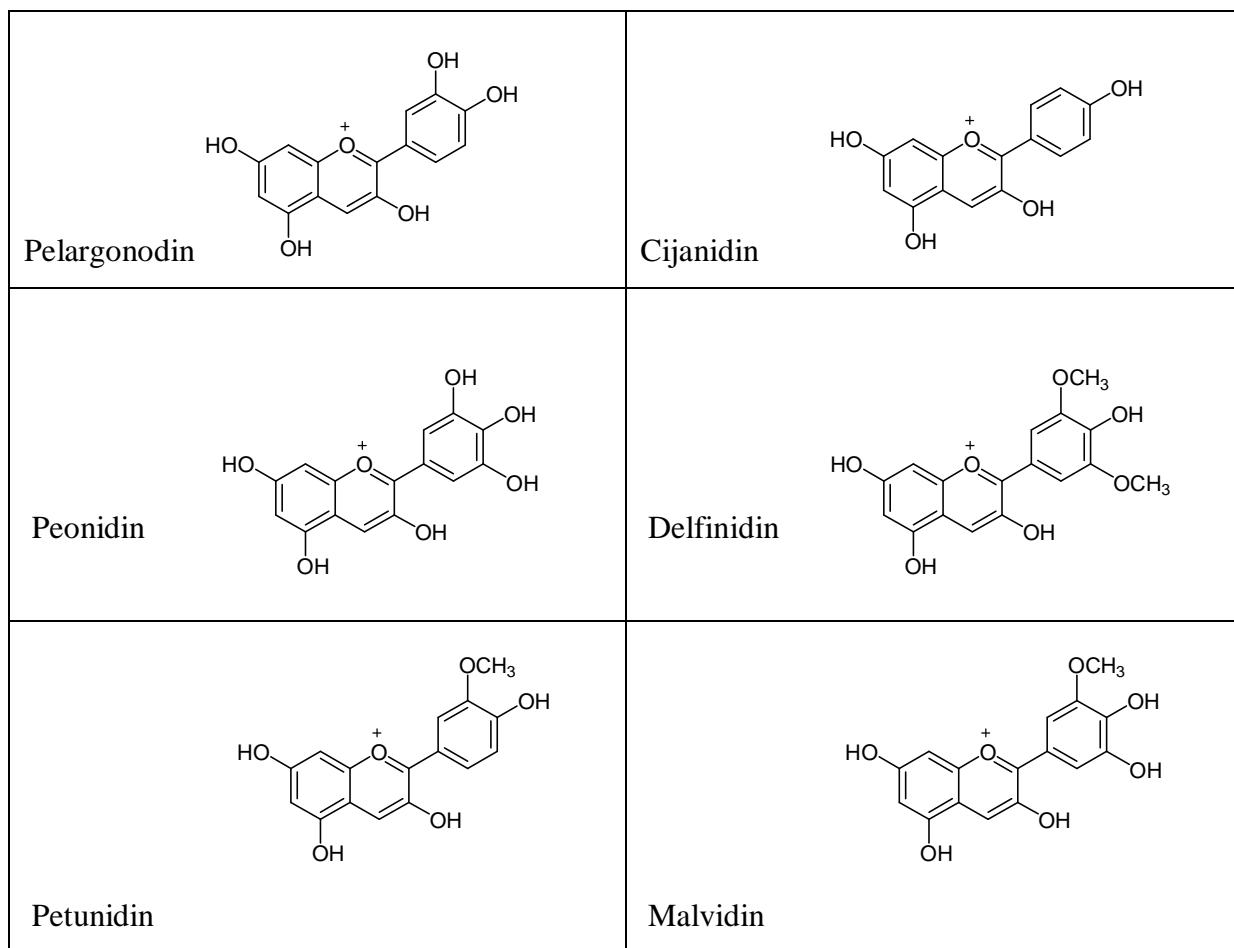
Izoflavoni su strukturno slični flavonoidima i zastupljeni su najčešće u biljkama iz Leguminosae familije. Wei i sar. (1995) su saopštili redosled reaktivnosti izoflavona: genistein > genistin > daidžein > formononetin > 4'-metilgenistein. Glikozidi izoflavona imaju vezan šećer u položaju 7 prstena A. Položaj 7 ima mali uticaj na antioksidativnu aktivnost izoflavona pa su stoga aktivnosti glikozida i njihovih aglikona slične. Najvažnija strukturna karakteristika za antioksidativnu aktivnost izoflavona je hidroksilna grupa u položaju 4' B prstena, naročito u kombinaciji sa hidroksilnom grupom u položaju 5 A prstena. Hu i sar. (1995) su zaključili da nedostatak 2, 3 dvostrukе veze i karbonilne grupe u položaju 4 ima mali uticaj na povećanje antioksidativne aktivnosti izoflavona.

1.4.3. Antocijani

Antocijanidini su metabolitički produkti flavanona. Antocijani su glikozidi antocijanidina, od kojih potiče plava, ljubičasta i crvena boja. Osnovna struktura antocijana je 2-fenilbenzopirilijum ili flavilijum katjon. Svi antocijanidini imaju hidroksilnu grupu u položaju 3 C prstena, a većina antocijana su penta ili heksa-supstituisani, pri čemu se supstituenti (hidroksilna ili metoksi grupa) nalaze u položajima 5 i 7 prstena A, i 3', 4' i 5' prstena B. Na osnovu broja i položaja hidroksilnih grupa u B prstenu razlikuju se tri osnovna jedinjenja antocijana: pelargonidin, cijanidin i delfnidin, a metilovanjem ovih hidroksilnih grupa nastaju: peonidin, petunidin i malvidin.

Antocijanini su glikozidno vezani antocijanidini koji se nalaze u obojenom voću i cveću. Dok su čalkoni i flavoni žuti, antocijanini su u vodi rastvorni pigmenti odgovorni za jarko crvenu, plavu i ljubičastu boju voća i druge hrane (Mazza i Miniati, 1993). Boja antocijanina zavisi od broja hidroksilnih i metoksi grupa. Sa povećanjem broja hidroksilnih grupa pojačava se plava boja, a sa povećanjem bromatne metoksi grupe pojačava se crvena boja antocijanina. Većina antocijanina javljaju se kao monoglikozidi i diglikozidi pelargonodina, cijanidina, peonidina, delfnidina, petunidina i malvidina (slika 1.7.). Antocijanini su znatno

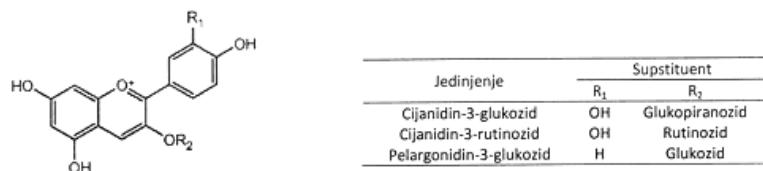
stabilniji i rastvorljiviji u vodi od antocijanidina, zahvaljujući glikozidaciji. Najčešće od monosaharida u glikozidaciji antocijanina učestvuju: glukoza, ramnoza, galaktoza, arabinosa i ksiloza. Od di- i tri-saharida najčešće u glikozidaciji učestvuju rutinoza, soforoza (De Ancos i sar., 1999 a,b; Kahkonen i sar., 2003). Osnovna struktura antocijana je 2-fenilbenzopirilijum ili flavilijum katjon. Aglikon antocijanina je veoma reaktivan. Povećana hidroksilacija aglikona stabilizuje antocijanidin. Na slici 1.8. prikazane su strukture najzastupljenijih antocijanidina.



Slika 1.8. Strukture najzastupljenijih antocijanidina

Iako priroda i način hidroksilacije, metilacije i glikozidacije utiču na boju i reakcije antocijanina, ove grupe same ne reaguju. Supstitucija grupa antocijanina utiče na reaktivnost i boju tako što dovodi do promene elektronske gustine u molekulu. Povećana hidroksilacija antocijanina dovodi do smanjenja stabilnosti, dok metilacija vodi ka povećanju stabilnosti, što je povezano sa blokiranjem reaktivnih hidroksilnih grupa. Boja antocijanina menja se od roze do plave sa porastom broja hidroksilnih grupa (Mazza i Brouillard, 1987 a,b).

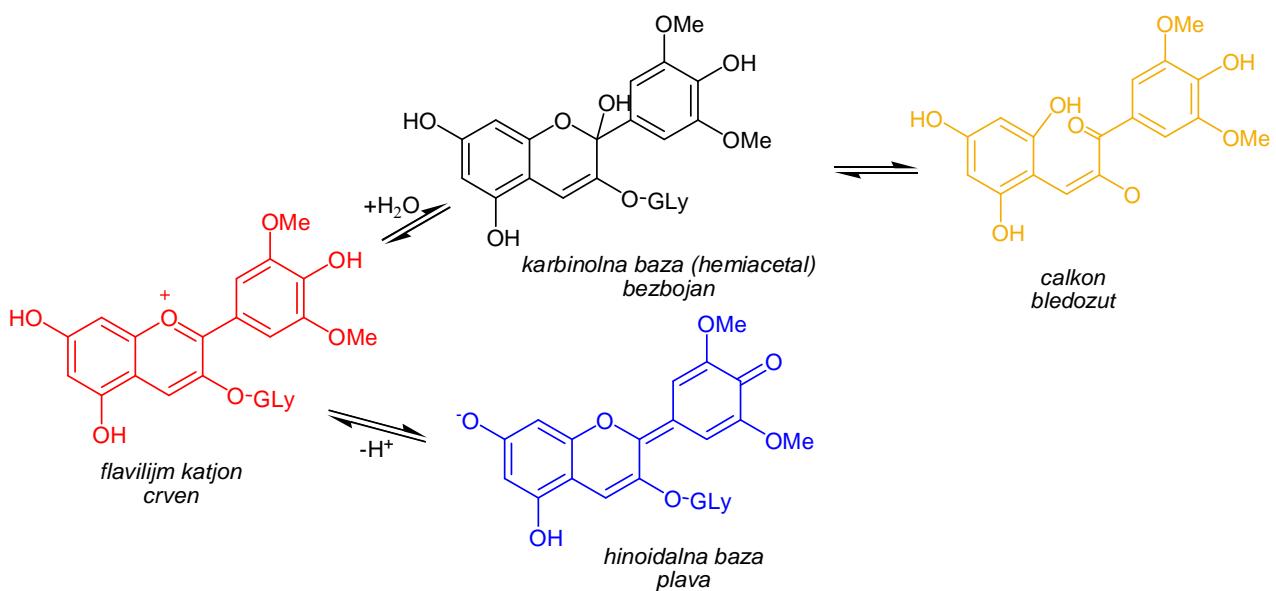
Veliki broj istraživanja je baziran i na ispitivanju faktora koji utiču na stabilnost antocijana i dokazano je da utiču: struktura, prisustvo šećera vezanih glikozidnim vezama i/ili kiseline koje aciluju šećer, pH vrednost, temperatura, svetlost, prisustvo metala, kiseonika, itd (Nielsen, 2003; Hojjatapanah, 2011; Wu, 2011).



Slika 1.9. Strukturna formula nekih antocijana

Pigmenti antocijanina su relativno nestabilni, a na njih najviše utiču pH i temperatura. Acilacija povećava stabilnost antocijanina (Bassa i Francis, 1987). Izuzetno stabilne i jake boje cveća posledica su acilacije antocijanina (Baublis i sar., 1994). Drugi faktori koji utiču na stabilnost antocijanina su enzimi, koncentracija kiseonika, askorbinska kiselina, SO₂, metalni joni i šećeri (Lee i Schwartz, 2006).

U vodenoj sredini antocijanini podležu strukturnim transformacijama koje određuju njihovu boju i stabilnost. U zavisnosti od pH antocijanini u rastvoru egzistiraju kao: plava hinoidalna baza, crveni flavilijum katjon, bezbojna karbinolna baza (hemiacetal) i bezbojni čalkon. Dva jedinjenja, crveni flavilijum katjon i bezbojni hemiacetal (karbinolna baza), važna su tokom promena pH od 1 do 6.



Slika 1.10. Boja antocijanina pri različitim pH vrednostima

Na niskom pH crveni flavilijum katjon je dominantan. Sa porastom pH povećava se

koncentracija karbinolne baze i dolazi do slabljenja boje, tako da je na pH od 4–6 dominantan bezbojni hemiacetal. Gubitak boje povezan je sa pH-zavisnom hidratacijom C2-položaja crvenog flavilijum katjona. U baznim rastvorima (pH=8–10) formira se jako obojena, jonizovana anhidrovana baza, dok je na pH=12 dominantan potpuno jonizovani čalkon (slika 1.10.).

Ovo je ujedno i jedno od glavnih ograničenja kod upotrebe antocijanina kao pigmenta u hrani: redukcija intenziteta boje, promena nijanse i nestabilnost boje na višim pH vrednostima (Timberlake i Bridle, 1980; Starr i Francis, 1968).

Metilovanje hidroksilnih grupa u prstenu B osnovnih antocijana ograničeno je na hidroksilne grupe u položaju 3' i 5', a slobodna hidroksilna grupa u 4' položaju ima značajnu ulogu u promeni boje antocijana. Većina antocijana ima jednu ili dve monosaharidne jedinice, najčešće vezane u položaju 3, ponekad u položajima 3 i 5, a ređe u položajima 3 i 7 prstena C i A. Od šećera antocijani najčešće sadrže glukozu, galaktozu, arabinuzu, ksiluzu i ramnozu, a kiseline koje najčešće aciluju šećere su kafena, kumarinska, sinapinska, *p*-hidroksibenzoeva, ferulna, malonska, sukcinjska i sirćetna.

Boja antocijana i antocijanidina je posledica pobuđivanja (ekscitacije) molekula vidljivom svetlošću. Lakoća kojom se molekul ekscituje zavisi od relativne pokretljivosti elektrona u strukturi. Dvostrukе veze, kojih u antocijanima ima mnogo, pobuđuju se veoma lako, i njihovo prisustvo je najvažnije za boju. Porast supstitucije molekula takođe ima značajan uticaj i ima za posledicu tamnjenje boje. Supstitucija metoksi grupom, koja ima veći elektron-donorni kapacitet od hidroksilnih grupa, izaziva jači batohromni efekat, odnosno pomeranje apsorpcionog maksimuma ka većim talasnim dužinama. I drugi faktori mogu biti uzrok promene boje antocijana, kao što su promena pH, stvaranje metalnih kompleksa i kopigmentacija. Tako su antocijani crveno obojeni u kiseloj, bezbojni pri pH 4, a plavi pri neutralnoj pH vrednosti. U kiseloj sredini antocijani se nalaze u formi flavilijum katjona, pri pH vrednostima 4-5 prelazi u hemiacetal, a na pH 6-7 su u obliku hinona koji u baznoj sredini disosuje u anjonski oblik.

Generalno, profil antocijana u bilnjom tkivu je karakterističan i koristi se u taksonomiji i određivanju stepena kvarenja sokova i vina. Sve je veći interes za izolovanje i upotrebu antocijana, ne samo zbog toga što su oni netoksični prirodni pigmenti, rastvorni u vodi i mogu zameniti sintetičke boje već i zbog njihovih bioaktivnih osobina. Antocijani su dodavani u hranu još od davnina. Bili su komponente tradicionalnih biljnih preparata koje su koristili Indijanci, Evropljani i Kinezi. Izolovani su iz lišća, voća, korenja ili semena. Ekstrakti bogati

antocijanima su se koristili za lečenje hipertenzije, pireksije, oboljenja jetre, dizenterije, dijareje, infekcija urinarnog trakta i kamena u bubregu. Zabeležen je njihov uticaj na poboljšanje vida i cirkulacije.

Iz biljaka je izolovano ukupno 539 različitih molekula antocijana (Brouillard i Delaporte, 1977). Ipak, u hrani je prisutan mnogo manji broj ovih jedinjenja. Standardizovani voćni koncentrat koji ima visok sadržaj antocijana deklarisan je kao prirodna prehrambena boja sa oznakom E163 i dozvoljen je za upotrebu u Evropskoj Uniji, SAD, Kanadi i Japanu (Fennema, 1996).

Faktori koji utiču na stabilnost antocijana su: struktura- prisustvo šećera vezanih glikozidnim vezama i/ili kiseline koji aciluju šećer, pH, temperatura, svetlost, prisustvo metala, kiseonika itd. Utvrđeno je da je najznačajniji faktor temperatura skladištenja i da prisustvo aromatične kiseline kao i dva molekula šećera povećavaju značajno stabilnost antocijana. Antocijani su najstabilniji u kiseloj sredini, u opsegu pH od 1 do 2 jer je flavilijum katjon njihova najstabilnija forma. Vrednosti pH iznad 4.5 su veoma nepovoljne za antocijane (Nielsen i sar., 2003). Nestabilnost antocijana može negativno da utiče na stabilnost boje proizvoda, njegove senzorne osobine i na njegove potencijalne zdravstvene efekte. Eiro i Heinonen (2002) su pokazali da fenolne kiseline imaju zaštitni i stabilizacioni efekat na antocijane. Kafena kiselina i rutin sprečavaju promenu boje soka od crvene narandže (Maccarone i sar., 1985), dok sinapinska kiselina doprinosi boji soka od jagode, a ferulna i sinapinska pojačavaju intenzitet boje soka od maline (Rein i Heinonen, 2004). Ovaj efekat je pripisan kopigmentaciji antocijana sa novim jedinjenjima koja se sintetišu u ovim smešama. Generalno, kopigmentacijom antocijana stvaraju se jedinjenja koja su intenzivnije boje i koja su stabilnija od samih antocijana. U literaturi se navode dve vrste reakcija kopigmentacije:

- Intramolekularne interakcije koje se ostvaruju putem kovalentnih veza između hromofoarnih grupa u molekulu antocijana i organskih kiselina, aromatičnih grupa ili flavonoida (ili kombinacija sve tri interakcije);
- Intramolekularne interakcije koje se ostvaruju putem slabih hidrofobnih veza između flavonoida i antocijana.

Antocijan-flavonoid interakcija stabilizuje boju i utiče na biološku aktivnost antocijana. Isti efekat pokazuju i fenolne kiseline, ali je taj efekat značajno slabiji (Gomez-Miguez i sar., 2006). Kopigmentacija može da se odrazi dvojako na apsorpcioni spektar antocijana i boju proizvoda i to kao:

- Hiperhromni efekat- povećanje intenziteta apsorbance molekula na talasnoj dužini apsorpcionog maksimuma (λ_{\max});
- Batochromni efekat- pomeranje apsorpcionog maksimuma (λ_{\max}) ka većim talasnim dužinama.

Usled kopigmentacije može doći do batochromnog pomeranja apsorpcionog maksimuma, kada se boja antocijanina menja od crvene ka plavoj ili do hipsochromnog efekta, kada dolazi do višestrukog povećanja intenziteta apsorpcionog maksimuma. Kod batochromnog efekta i flavilijum katjona i hinoidalna baza imaju uticaja, dok se hipsochromni efekat javlja usled stabilizacije hinoidalne baze (Asen i sar., 1972). Od flavonoida najefikasniji kopigmenti su rutin (dovodi do batochromnog pomeranja od 30 nm) i kvercetin (28 nm) (Bakowska i sar., 2003). Najefikasnije fenolne kiseline kao kopigmenti su sinapinska i ferulna kiselina (Marković i sar., 2000).

Drugi načini kopigmentacije su samoudruživanje i formiranje metalnih kompleksa. Metali koji najčešće formiraju komplekse sa antocijaninima su kalaj, gvožđe, aluminijum, magnezijum, kalijum. Samo antocijanini na bazi cijanidina, delfnidina i petunidina su u mogućnosti da grade helate.

Generalno, povećanje temperature negativno utiče na stabilnost svih prehrambenih boja, pa i antocijana. Antocijani podležu i fotohemijskoj razgradnji. Ispitivanja su ukazala na prisustvo 2,4,6-trihidroksibenzaldehida kod svih antocijana izloženih fotohemijskoj i termičkoj razgradnji, kao produkta razgradnje prstena A, dok razgradnjom prstena B nastaju različiti derivati hidroksibenzoeve kiseline, u zavisnosti od strukture molekula antocijana (Wybraniec i Mizrahi, 2002). Vezivanje šećera u položaju 3 C-prstena ubrzava fotohemisku degradaciju antocijana. Dodatak askorbinske kiseline značajno ubrzava razgradnju antocijana (Garcia-Viguera i Bridle, 1999). Prepostavljena su dva mehanizma ove interakcije: direktna kondenzacija askorbinske kiseline u položaju 4 C-prstena molekula antocijana (Jurd, 1972; Poei Langston i Wrolstad, 2000) ili oksidativna razgradnja pirilijumskog prstena antocijana slobodnoradikalским mehanizmom gde askorbinska kiselina deluje kao aktivator molekulskog kiseonika i stvaranja slobodnih radikala (Iacobucci i Sweeny, 1983). Utvrđeno je da se ove reakcije sprečavaju dodatkom flavonola koji se kondenzuju sa antocijanima i na taj način ih stabilizuju (Shrikhande i Francis, 1974). Dodatak šećera takođe utiče na stabilnost antocijana, u zavisnosti od strukture antocijana, tipa šećera i koncentracije. Iako je većina ekstrakata antocijana pokazala smanjenu stabilnost nakon dodatka šećera, nisu sprovedene statističke analize da bi se dokazala statistička značajnost ovih podataka (Mercadante i Bobbio, 2008).

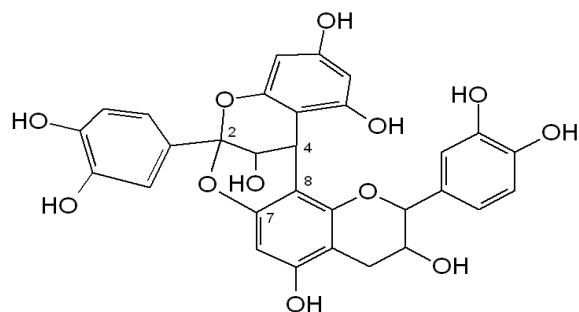
Zbog nedostatka karbonilne grupe u položaju 4 C-prstena, građenje kompleksa metala se odigrava samo u prisustvu orto hidroksilnih grupa u B prstenu, i to u pložajima 3' i 4'. Antocijanidini imaju manju antioksidativnu aktivnost od flavona, i to usled nedostatka 2, 3 dvostrukih veza i karbonilne grupe u položaju 4 C-prstena (Cao i sar., 1997; Wang i sar., 1997). Hidroksilne grupe u orto položaju i kod antocijanidina imaju veliki uticaj na aktivnost. Treća hidroksilna grupa u 5' položaju B prstena ne doprinosi povećanju aktivnosti kao kod ostalih flavonoida. Wang i sar. (1997) su utvrdili da je antioksidativna aktivnost antocijana veća od antocijanidina, ukazujući na pozitivan uticaj prisustva šećerne komponente na aktivnost. Glukoza je pokazala veći uticaj na povećanje aktivnosti od ramnoze i galaktoze. Razlike u strukturi šećera mogu povećati ili smanjiti mogućnost stvaranja stabilnih radikalnih formi.

Kondenzacijom antocijana sa drugim flavonoidima u položaju 4 C-prstena nastaju proantocijanidinski polimeri (kondenzovani tanini). Salah i sar. (1995) navode da je aktivnost kondenzovanih tanina koji se sastoje od galne kiseline i epikatehina velika i da se povećava sa brojem hidroksilnih grupa. Hidrolizujući tanini sastoje se od glukoze vezane estarskim vezama za nekoliko jedinica galne kiseline i heksahidroksidifenilne kiseline. Veliki broj hidroksilnih grupa u molekulima tanina presudno utiče na njihovu antioksidativnu aktivnost.

1.4.4. Flavonoli, katehini i proantocijanidini

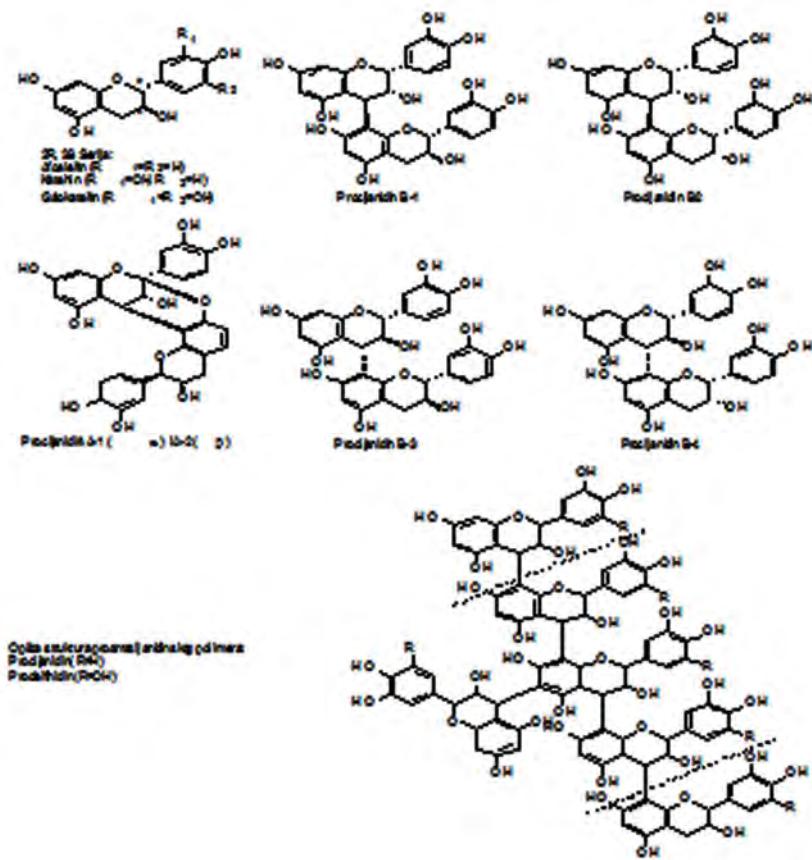
Flavonoli se u najvećoj meri, zajedno sa antocijanima, deponuju u vakuolama ćelija pokožice. Glikozidi flavonola, poput kvarcetin-glikozida, dobro apsorbuju UV zračenje i time pružaju biljci zaštitu od ovog štetnog zračenja. Katehini su najzastupljenija vrsta flavanola, čijom polimerizacijom, najčešće 2 do 8 monomernih jedinica, nastaju proantocijanidini. Najzastupljeniji tip proantocijanidina u trnjini je tzv. tip A, koji je redak, inače u ostalim biljkama znatno je zastupljeniji tip B. Nastaje neposrednim povezivanjem monomernih jedinica (slika 1.11.). Najveći sadržaj proantocijanidina, za koje je pokazano da imaju znatno bolja antioksidativna svojstva od vitamina A i C, je u semenkama. Ova klasa strukturno veoma različitih jedinjenja, osim antioksidativnog dejstva, karakteriše još čitav niz različitih bioloških aktivnosti: antimikrobna, antivirusna, antiinflamatorna, antialergijska i vazodilatatorna. Nađeno je i da sprečavaju lipidnu peroksidaciju i agregaciju trombocita, da

inhibiraju dejstvo nekih enzimskih sistema, poput cikooksigenaza i lipooksigenaza, a i da ublažavaju dejstvo hemoterapije na zdrave ćelije.



Slika 1.11. Struktura proantocijanidina (tip A)

Daljom polimerizacijom proantocijanidina nastaju kondenzovani tanini, koji imaju afinitet ka vezivanju za proteine usled velikog broja slobodnih hidroksilnih grupa. Kao nerastvorne, amorfne mase, tanini se nalaze u citoplazmi parenhimskih ćelija različitih organa.



Slika 1.12. Opšte strukture proantocijanidina

Prisutni su u tkivima koja odumiru (pluti, suvom listu), ali i u mladim tkivima koja rastu (popoljci lista čaja). Tanini se u biljnog tkivu sintetišu i akumuliraju posle infekcije

mikroorganizmima (fitoaleksinska funkcija). Odrvenela tkiva su dodatno "impregnirana" i zaštićena, ovim jedinjenjima. Tanini predstavljaju zaštitu od insekata i herbivora (ekološka funkcija). Smatra se da su medijatori starenja tkiva i da učestvuju u opadanju lišća u jesen (fiziološka funkcija). Hidrolizujući tanini su depo šećera. Prisutni u mladom voću oni ga štite, ali procesom zrenja, dolazi do njihovog razlaganja; oporost nezrelog voća se gubi, a oslobođeni šećer doprinosi ukupnoj slasti zrelog voća.

Svi efekti tanina na animalne i humane ćelije su povezani s njihovom osobinom da hemijski reaguju s belančevinama (vodoničnim ili kovalentnim vezama) i grade nerastvorne komplekse precipitacijom proteina u površinskim slojevima (adstringentni efekat). Reaktivniji su hidrolizujući tanini, a naročito veliki afinitet imaju prema proteinima koji sadrže molekule prolina. Proantocijanidini deluju na kapilare i pojačavaju osnovni tonus, smanjuju krtost i permeabilnost zida krvnih sudova.

Taninske droge se primenjuju sprašene, u obliku dekokta, tinktura ili fitopreparata za zaustavljanje manjih krvarenja, za zaštitu kože i sluzokože od infekcija i upalnih reakcija kao antidijaroici; kao antidoti kod trovanja teškim metalima i alkaloidima.

1.5. BILJKE

1.5.1. Bulka (*Papaver rhoeas L.*)

Bulka je jednogodišnja, ređe dvogodišnja zeljasta biljka iz porodice makova (fam. Papaveraceae). Familija makova (Papaveraceae) je relativno mala grupa skrivenosemenica



koja obuhvata oko 230 grupisanih u 23 roda. Naziv familije potiče od latinske reči za mak - *papaver*. Rasprostranjena je u umerenoj zoni severne hemisfere, ali veliki broj predstavnika se nalazi i u suptropskim oblastima. Na teritoriji Srbije raste sedam vrsta iz četiri roda. Većina predstavnika familije Papaveraceae spadaju u kategoriju zeljastih, jednogodišnjih i višegodišnjih biljaka. Stablje bulke su uspravne, jednostavne ili slabo razgranate i pokrivenе dlakama, a listovi jajasti, sivozeleni i pokriveni stršećim, oštrim dlakama. Cvetovi su krupni (prečnika do 10 cm), upadljivi na dugačkim drškama na dole nagnuti, tamnocrvene, svetlocrvene ili ređe bele boje. Kruničnih listića ima četiri i vrlo su nežni, tanki često pri dnu tamniji. Plod je čahura loptastog oblika ispunjena mnogobrojnim, sitnim, plavosivim, bubrežastim semenima.

Bulka u svežem stanju je otrovna, ali zato suvi cvetovi i zrela semena, kada se konzumiraju u normalnim količinama, ne mogu biti štetne (Gubruz, 2003). Sadrži bezopasne alkaloide derivate izohinola, za razliku od svog srodnika, maka (*Papaver somniferum*), koji je bogat morfinom i drugim alkaloidima (Bisset, 2001.). Pored alkaloida sadrži još i crvenu boju, organske kiseline, gorke supstance, tanine, skrob, a najlekovitija materija u bulki je sluz i nalazi se u cvetu. Pri sušenju kruničnih listića (samo se taj deo cveta koristi) ne treba ih previše dodirivati jer tada gube lekovita svojstva i menjaju boju, odnosno poplave. Od njih se pripremaju sirupi i čajevi, a koriste se i za bojenje vina, rakije i drugih napitaka.

Bulka se koristi uglavnom u narodnoj medicini za lečenje oboljenja disajnih organa, želuca i duševnih bolesti (Nicholsan, 1960). Čajevi i sirupi na bazi ove biljke smiruju kašalj, pomažu iskašljavanje, kod hroničnog bronhitisa i astme (Howard, 1987). Krunični listići poboljšavaju varenje, smiruju grčeve i bolove u želucu, a zajedno sa semenkama deluju smirujuće pa pomažu kod depresija, neuroze i nesanice.

1.5.2. Glog (*Crataegus oxyacantha L.*)



Glog pripada rodu Rosaceae. Porodica ruža, Rosaceae, predstavlja najrašireniju i najvažniju vrstu gajenog i divljeg voća, a obuhvata više od 3000 vrsta. Plodovi mogu biti veoma različite građe, oblika i veličine. Mnoge samonikle vrste (šumsko voće) su kultivisane, a neke se sakupljaju i cene zbog posebnog ukusa i visoke

vitaminske vrednosti. Plodovi divljih vrsta biljaka iz ove familije mogu se preraditi na različite načine: u voćne sokove, kompote, marmelade, žele, voćno vino, rakiju, likere, itd. Ti su proizvodi vitaminski daleko vredniji od prerađevina kultivisanog voća. Najviše vitamina C i provitamin A nalazi se u kori ili neposredno ispod nje. Osušeni plodovi mogu se upotrebiti za spremanje ukusnih čajnih napitaka. Listovi ovih biljaka mogu se koristiti za salate i variva, pripremu čaja i u medicini (Grlić, 1986).

Beli i crveni glog su trnoviti žbunovi ili nisko drveće. Više je rasprostranjen beli glog. Glog raste po suvlijim hrastovim i bukovim šumama, često u šikarama, kao i uz ograde i živice. Kao droga se koristi osušeni list, cvet i zreo plod. Cvet i list gloga sadrže, kao aktivne principe, komplekse flavonoidnih heterozida u količini od - 2 %. Kompozicija ovog kompleksa zavisi od biljne vrste i porekla. U cvetovima dominiraju hiperozid i viteksin. Pored toga, u drogama se može nalaziti i 3% oligomernih procijanidina (jedinjenja nastala međusobnom kondenzacijom 2- 8 molekula katehina i/ili epikatehina). Plodovi sadrže mnogo manje flavonoida (oko 0.1 %), ali u njima ima više šećera, organskih kiselina, karotenoida i vitamina C.

Glog se smatra jednom od najvrednijih i najdelotvornijih kardioprotectorskih biljaka za srce. Potvrđeno je da procijanidini i flavonoidi gloga imaju pozitivan inotropni, dromotropni, negativan batmotropni efekat, da pojačavaju koronarni i protok krvi kroz miokard i da smanjuju periferni otpor u krvnim sudovima. Izvanredan je regulator krvnog pritiska. Njegova upotreba daje dobre rezultate kod oštećenog srčanog mišića u starosti, kod upale srčanog mišića, kod zakrčenja krvnih sudova srca i angine pektoris. Svež sok, droga, jednostavni galenski preparati, alkoholno-vodeni ekstrakti i fitopreparati izrađeni od gloga, koriste se kao

dopunska terapija srčane insuficijencije. Preparati gloga deluju i kao blagi diuretici.

1.5.3. Trnjina (*Prunus spinosa L.*)



Trnjina je višegodišnja biljka iz porodice ruža (Rosaceae), rod *Prunus*, koja raste u obliku žbuna na obroncima širokih neobrađenih površina, stapajući se u gustu, bodljikavu celinu, ali je ima i kraj puteva, duž kanala i vetrozaštitnih pojaseva. Snažan razgranati listopadni grm s trnovitim granama, visok 1-3 m, listovi su nazubljeni i listaju

posle cvetanja. Cveta u aprilu i maju. Cvetovi su beli i vrlo brojni. Plodovi su plavi, male okrugle šljive, a posle prvog mraza omekšaju i mogu se koristiti u ishrani kao sveži. Ona raste u umereno kontinentalnoj klimi u severnoj hemisferi i na području Jugoistočne Srbije. Trnjina se u fitoterapiji koristi za lečenje različitih oblika kašlja. Deluje kao blago laksativno sredstvo, diuretik, spasmolitik i anti-inflamatorni agens, deluje antiseptično (zbog sadržaja tanina), pomaže kod dijareje i zapaljenja sluzokože organa za varenje. (List, 1971; Borkowski i sar., 1994).

Lekovita svojstva podjednako poseduju kora, koren, cvet, list i plod trnjine. Latice cveta trnjine sadrže lekovite cijanogene glikozide, koji imaju laksativna i diuretična svojstva. Pored toga one sadrže i flavonoide rutin i hiperozid.



1.5.4. Cikorija (*Cichorium intybus L.*)

Cikorija pripada istoimenom rodu, *Cichorium intybus*. (Familija glavočica) (Asteraceae, Compositae). Familija glavočika (Asteraceae, Compositae) predstavlja najbolimniju familiju klase dikotiledonih skrivenosemenica, a ujedno i jedina familija reda Asterales. Obuhvata preko 1500 rodova sa više od 23000 vrsta rasprostranjenih širom sveta. Predstavnici ove familije najčešće naseljavaju umerene oblasti i planinske regije tropa, a nalaze se na otvorenim i često suvim staništima. Na prostoru Srbije i Crne Gore nalazi se više od 80 rodova sa preko 400 vrsta. U koren

mnogih vrsta se kao rezervne materije nagomilavaju polisaharidi inulina. U nadzemnim delovima biljke često se akumuliraju poliacetilenske materije, etarska ulja (terpeni), kao i seskviterpenski laktoni. Mnogi predstavnici familije Asteraceae imaju primenu u medicini i farmaciji kao lekovite biljke.

Cikorija je višegodišnja zeljasta biljka, visoka 1,5 m. Ima trajni, valjkasto-vretenasti koren spolja žućkasto-bele boje dok je unutrašnjost bela. Stabljika je uspravna, kruta, uglasta, u gornjem delu razgranata. Stabljika i listovi su pokriveni kratkim dlačicama. Listovi su duguljasti do lancetasti, suženi u peteljci, duboko testerasto usečeni. Cela biljka, naročito mlađe imaju dosta mlečnog soka. Cvetovi su svetloplavi, vrlo lepi. Cikorija cveta preko celog leta. Razmnožava se semenom. Raste svuda kao korov, najviše pored staza i puteva, po pašnjacima i livadama, po obodima šuma i dr. Ponegde se gaji radi korena od koga se spravlja surrogat kafe (cigura). Koren (kopa se u jesen kad je najdeblji i ima najviše lekovitih sastojaka i inulina). Poznata je u narodu kao, vodopija, višnjev regrad, vodoplav, golica, gologuza, divlja ločika, želtenica, plavulja, radić, sunčeve cveće, itd. Koristi se i nadzemni deo biljke koji se bere u fazi cvetanja.

Lekoviti deo biljke je koren, a ređe nadzemni deo. Uglavnom se primenjuje u narodnoj medicini za lečenje oboljena jetre, kao sredstvo za jačanje i čišćenje organizma, pomaže varenju. Protiv malokrvnosti upotrebljava se sveže ceđen sok nadzemnog dela biljke. (Ahmed i sar., 2003; Zafar i sar., 1998.). U narodnoj medicini cikoriju koriste dijabetičari zato što sve biljke iz familije Glavočika– Compositae, umesto skroba kao rezervnu hranu imaju inulin. Zbog toga osobe obolele od dijabetesa mogu koristiti biljke iz ove porodice kao dijetalnu hranu. U korenju cikorije se nalaze: inulin, gorki glikozidi, saponini, alfa-amirin, tarakeron, baurenil acetat, beta- sitosterol, mineralne materije, organske kiseline, seskviterpenski laktoni, vitamini, masti, manitol, lateks i dr.

1.5.5. Neven (*Calendula officinalis L.*)

Neven (*Calendula officinalis L.*) pripada familiji glavočica (Asteraceae, Compositae). Stablo nevena je uspravno, granato i izbrazdano. Oblik listova se razlikuje u zavisnosti od



njihovog položaja: gornji su duguljasti ili kopljasti, srednji su obrnuto jajasti i obuhvataju stablo, a donji su sa krilatom drškom. Cvetovi su sakupljeni u glavičaste, narandžastožute, krupne cvasti. Omotač cvasti grade uzani, zeleni, lepljivi i dlakama pokriveni listići. Cvasti mirišu jako i otužno. U narodu je poznata kao

nevenovo cveće, žutelj, prstenčac, zimorod, ognjac, vrtelni neven. Cvetovi nevena sadrže etarsko ulje, tanine, šećere, proteine, pigmente karotenoide, minerale (kalijum, sumpor i dr.), gorke supstance i dr. Upotrebljava se u obliku čaja, kao dodatak salatama i drugim jelima, a spolja u obliku ulja, masti, obloga ili čajeva za ispiranje. Neven deluje antiseptično i antibakterijski, pa je vrlo efikasan protiv različitih zapaljenja, gljivičnih infekcija, a najnovija

istraživanja nagoveštavaju da je koristan u borbi protiv HIV-a. Koristan je za uklanjanje toksina (otrova) koji prate različite hronične infekcije, grozničava stanja, kožne bolesti kao što su ekskemi i akne. Dobar je kao sredstvo za umirenje grčeva, protiv astme, kašlja, lutanja srca i nesanice. Od davnina se u narodnoj medicini koristi za zaleđenje rana, uboja, ozeblina, čireva, bradavica, kurjih očiju i dr. (Slavkovska i sar., 2001). Hladan čaj od nevena se upotrebljava za ispiranje očiju kod konjuktivitisa ili desni posle vađenja zuba. Ima baktericidno dejstvo, stoga se koristi za lečenje rana, psorijaze, itd. Neven je poznat po svojim antiinflamatornim i antikancerogenim karakteristikama (Bilia, 2002.).

1.5.6. Vranilovka (*Origanum vulgare L.*)

Vranilovka (*Origanum vulgare L.*) pripada familiji Lamiaceae. Familija usnatica (Lamiaceae, Labiateae) obuhvata, prema različitim autorima, između 6900 i 7200 vrsta koje su



grupisane u 233 do 263 roda. Predstavnici ove familije su kosmopolitskog rasprostranjenja, ali najveći broj vrsta naseljava Mediteransku oblast i centralnu Aziju. U familiju Usnatica se nalaze uglavnom zeljaste jednogodišnje ili višegodišnje biljke, nešto ređe polužbunovi i žbunovi, a retko niske drvenaste vrste. Žlezde na epidermisu su najčešće dobro razvijene i sadrže etarska ulja (mešavinu terpenoidnih jedinjenja) ili ugljene hidrate. Zbog karakteristično raspoređenog kolenhima, stabljike su na poprečnom preseku

četvorouglaste. Listovi imaju dekuzatan, odnosno unakrsan lisni raspored što znači da su listovi naspramno postavljeni, a da su unakrsno raspoređeni. Kod najvećeg broja predstavnika familije Usnatica listovi su pokriveni dlakama, žlezdanim dlakama i žlezdanim ljuspama. Predstavnici familije Lamiaceae naseljavaju najčešće svetla, sunčana i otvorena staništa kao

što su livade, pašnjaci, kamenjari, pa čak i gornje šumske granice. Veći ekonomski značaj imaju aromatični predstavnici koji se koriste u industriji parfema, medicini, farmaciji, a koriste se i kao začinske biljke u ishrani.

Vranilovka je dugogodišnja zeljasta biljka sunčanih i suvih strana. Ima uspravne čvrste drške, visoke oko pola metra, obojene crvenkasto i obrasle dosta krupnim listovima. Cveta od jula do oktobra. Cvetovi su na vrhu stabljika udruženi u kompaktne okruglaste cvasti, prijatnog mirisa i izvanredno lepog izgleda. Ukusa je oporog i gorkog. Spada u grupu aromaticnih oporih, gorkih neotrovnih droga koje se kod nas mnogo cene. Hemijski sastav i farmakodinamsko dejstvo vranilovke je vrlo blisko i slično majčinoj dušici pa se na isti nacin može upotrebiti. Isto tako se bere, suši, čuva i pakuje kao i majčina dušica. Omiljena je u narodu kao čaj i lek za jačanje, za lečenje bolesti organa za varenje (osobito proliga) i disanje, a spolja se upotrebljava protiv raznih zapaljenja kože i sluznica. Etarsko ulje od vranilovke sadrži oko 50 % timola, zbog čega ima veoma izražena antibakterijska svojstva. Na taj način se može i objasniti vekovna upotreba i ogromno poverenje u lekovitu moć ove biljke u nekim našim krajevima (Ietswaart i sar., 1980, Lawrence i sar., 1984).

Nazivaju je vranilovkom zato što je do otkrića sintetskih boja upotrebljavana za crno bojenje vune. Glavni sastojci etarskog ulja: karvakrol, timol, cimen, kariofilen, pinen, bisabolen, linalol, borneol, geranil acetat, linalil acetat, terpinen. Sastojci veoma variraju u skladu sa izvorom, ali ulja klasifikovana kao oregano ili oreganum imaju timol i/ili karvakrol kao svoje većinske komponente. Koristi se kao mirisni sastojak za sapune, kolonjske vode i parfeme, a posebno kod muških mirisa. U proizvodnji mesa i pića se koristi kao začin.

1.5.7. Žavornjak (*Delphinium consolida* L.)



Žavornjak pripada familiji Ranunculaceae, rodu *Consolida*. Familija ljutića (Ranunculaceae) obuhvata oko 2450 vrsta koje su grupisane u 62 roda. Latinski naziv familije potiče od deminutiva latinske reči *rana* što znači žaba (deminutiv je *ranuncula* što znači žabica) zbog amfibijskog načina života mnogih vrsta iz ove familije. Kosmopolitski je rasprostranjena, ali većina predstavnika naseljava umerene

i severne predele severne Zemljine hemisfere. Na Balkanskom poluostrvu su zabeležene 22 endemične vrste iz ove familije. To su uglavnom kopnene biljke, mada ima i manji broj vodenih predstavnika. Veliki broj vrsta familije Ranunculaceae sadrže toksična jedinjenja koja štetno deluju na domaće životinje, te su nepoželjne na livadama i pašnjacima. Predstavnici familije Ljutića rastu kao livadske, korovske, ruderalne i šumske biljke, pretežno na vlažnijim zemljištima. Ekonomski značaj se ogleda u činjenici da se pojedine vrste koriste u hortikulturi. Takođe, zbog prisustva alkaloida pojedine vrste se koriste i u farmaciji. Ima dosta i otrovnih vrsta, a mnoge su korovske.

Žavornjak je jednogodišnja biljka. Stabljika uspravna, najčešće granata, ređe jednostavna. Prizemni listovi perasto deljeni, sa duguljastim režnjevima. Listovi stabljike sa linearnim režnjevima, tamnoplavi. Listići cvetnog omotača 10-14 mm dugi, sa gotovo dvostruko dužom ostrugom. Mešak je dlakov, malo sužen pri vrhu. Biljka je endemična za Balkansko poluostrvo; disjunktno i krajnje sporadično je rasprostranjena u Srbiji, Crnoj Gori, Albaniji i Grčkoj.

Vrsta je korovsko-ruderalnog karaktera. Uglavnom je konstatovana na oranicama i u ruderalnoj vegetaciji pored puteva, u okviru mediteransko-submediteranskog pojasa. S obzirom da je vrsta pretežno ruderalno-korovskog karaktera nije moguće utvrditi eventualne

uzroke iščezavanja. Do iščezavanja je najverovatnije došlo ili zbog primene agrotehničkih mera ili zbog pošumljavanja kao što je slučaj sa Grderličkom klisurom.

Naime, ova biljka je izuzetno retka, mada u većem delu njenog endemičnog balkanskog areala, ranija nalazišta nisu u novije vreme proveravana. Kao i druge jednogodišnje vrste roda *Consolida* veoma je dekorativna i može se lako gajiti.

1.6. METODE ANALIZE

1.6.1. UV/VIS spektrofotometrija

Ultraljubičasta/vidljiva (UV/Vis) spektrofotometrija je spektroskopska metoda koja obuhvata proučavanje apsorpcije elektromagnetsnog zračenja u oblasti između 200 i 800 nm. Kako veliki broj organskih jedinjenja ne apsorbuje u ovom delu spektra, to UV/Vis spektrofotometrija, u poređenju sa drugim strukturnim metodama (IC, NMR, MS), ima daleko manju primenu za strukturalna određivanja i uglavnom se koristi kao komplementarna metoda za identifikaciju delova molekula koji apsorbuju u navedenoj oblasti, takozvanih hromofora. UV/Vis spektri dobijeni na ovaj način, pružaju veoma korisne informacije o strukturi ispitivanog jedinjenja. Na primer, ona je nezamenljiva pomoćna (a često i glavna) metoda za identifikaciju prirodnih konjugovanih jedinjenja, kao što su: biljni pigmenti (karotenoidi), poliacetileni, porfirini, flavonoidi, itd. Pored primene za identifikaciju organskih jedinjenja, UV/Vis spektrofotometrija se danas dosta primenjuje u kvantitativnoj analizi. Njene prednosti nad ostalim metodama su u izuzetno velikoj osetljivosti i jednostavnom rukovanju instrumentom.

1.6.1.1. Primena UV-VIS metode za određivanje ukupnih fenola Folin– Ciocalteu metodom

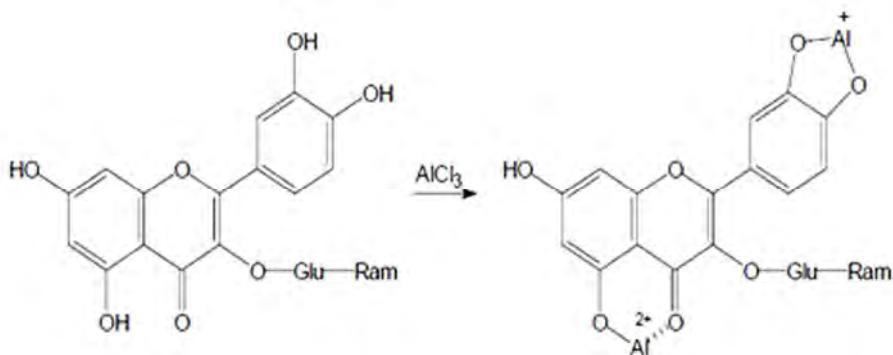
Rutinska metoda koja se koristi za određivanje ukupnog sadržaja fenolnih jedinjenja (fenoli, flavonoidi i neflavonoidi) je metoda Folin–Ciocalteu, uz korišćenje Folin–Ciocalteu reagensa (fenolni reagens) (Singleton i Rossi, 1965). Folin–Ciocalteu reagens se kupuje kao gotov (sadrži natrijum– volframat, natrijum– molibdat, brom, 85 % H₃PO₄, conc. HCl, Li₂SO₄). Folinov reagens predstavlja smešu kompleksa fosfomolibdenove i fosfovolframove kiseline sa sledećom formulom:



U reakciji sa fenolnim jedinjenjima dolazi do redukcije ovog kompleksa, a produkt redukcije ima plavu boju koja pokazuje maksimum apsorpcije na 765 nm. Ukupni fenoli kvantifikuju se na osnovu prethodno napravljene standardne krive, a rezultat se izražava kao mg ekvivalenta GA/100g biljnog materijala.

1.6.1.2. Primena UV-VIS metode u određivanje ukupnog sadržaja flavonoida

Flavoni i flavonoli sa aluminijum hloridom formiraju kompleks koji intenzivno apsorbuje na 415 nm, dok flavanoni imaju slabu apsorpciju na ovoj talasnoj dužini. Flavanoni (naringenin i hisperitin) sa 2,4-dinitrofenilhidrazinom, formiraju fenil hidrazone koji imaju jaku apsorpciju na 495 nm. Ove osobine flavonoida iskorišćene su za određivanje ukupnog sadržaja flavonoida pomoću dve komplementarne kolorimetrijske metode: aluminijum– hlorid kolorimetrijske metode (Woisky i Saltano, 1998; Pourmorad i sar., 2006) i 2, 4-dinitrofenilhidrazin kolorimetrijske metode (Nagy i Grancaj, 1996). Princip aluminijum– hlorid kolorimetrijske metode je da aluminijum– hlorid sa C4 keto grupom i C3 ili C5 hidroksilnom grupom flavona i flavonola, formira stabilan kiseli kompleks.



Slika 1.13. Kompleks flavonoida sa aluminijumom

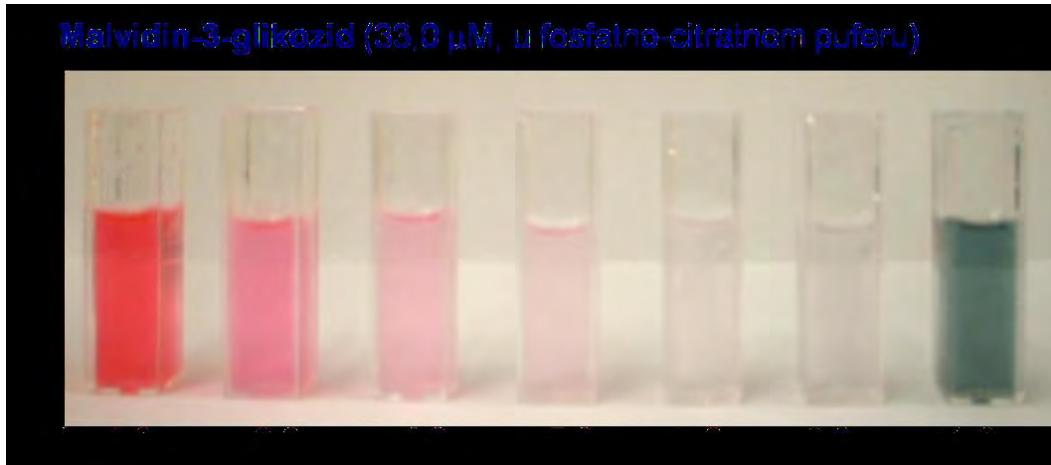
Chang i saradnici (2002), su merili apsorbancu kompleksa petnaest različitih flavonoida (flavoni: hrisin, apigenin i luteolin; flavonoli: rutin, morin, kvercetin, miricetin, kempferol, kvercitrin i galangin) sa aluminijum– hloridom i došli do zaključka da je, izuzev hrizina i apigenina, apsorbanca kompleksa koji su formirali flavoni i flavonoli znatno veća od apsorbance kompleksa koji su formirali flavanoni i izoflavoni. Sa druge strane, iako je prisustvo C5 hidroksilne grupe kod flavanona kao što su naringin, naringenin, hesperitin i genistein omogućilo kompleksiranje ovih jedinjenja sa aluminijum– hloridom, apsorbanca ovih jedinjenja na 415 nm je bila isuviše mala da bi doprinela značajnjem porastu ukupne apsorbance. Ukupan sadržaj

flavonoida se izražava kao mg CE (katehin ekvivalenta)/g ili QE (kvercetin ekvivalenta)/ g uzorka.

1.6.1.3. Primena UV-VIS metode u određivanje monomernih i polimernih antocijanina

Rečeno je da se antocijanini u biljkama nalaze u obliku glikozida, kao i to da imaju i izraženu sposobnost polimerizacije i kopigmentacije. Takođe antocijanini u rastvoru podležu reverzibilnim strukturnim promenama sa promenom pH, što se manifestuje u upadljivoj promeni apsorpcionih spektara. Ove osobine antocijanina iskorišćene su za spektrofotometrijsko kvantifikovanje monomernih antocijanina i određivanje stepena polimerizacije. Monomerni antocijanini kvantifikuju se pH diferencijalnom metodom. Na pH 1 predominantan je crveno obojeni flavilijum ion, a na pH 4.5 bezbojna hemiacetalna baza. Sama pH-diferencijalna metoda zasniva se na ovoj transformaciji i omogućava brzo i tačno merenje ukupnih antocijanina čak i u prisustvu polimerizovanih i degradiranih pigmenata, kao i u prisustvu drugih ometajućih komponenti. Nakon izolovanja antocijanina, metanolni ekstrakt antocijanina se razblaži KCl (pH 1) i acetatnim (pH 4.5) puferom.

Molekul antocijana ima elektropozitivan naboј; deficitaran je u elektronima pa podleže delovanju nukleofilnih jedinjenja (velika reaktivnost). Antocijani podležu elektrohemiskoj oksidaciji. Jedna od najvažnijih osobina antocijana je što kiseonik u heterocikličnom prstenu ima pozitivno nanelektrisanje. Zato se u kiseloj sredini antocijani ponašaju kao katjoni koji grade soli sa kiselinama, a u alkalnoj sredini su anjoni i grade soli sa bazama. Svi antocijanidini sadrže 3, 5, 7-trihidroksi-flavilijum – ion. Boja antocijana i antocijanidina je posledica ekscitacije molekula vidljivom svetlošću. Lakoća kojom se molekul pobuđuje zavisi od pokretljivosti elektrona u strukturi. Dvostrukе veze, kojih u antocijanima ima mnogo, pobuđuju se vrlo lako. Porast supstitucije molekula, takođe, ima značajan uticaj na promenu, odnosno tamnjenje boje. I drugi faktori mogu biti uzrok promene boje antocijana, kao što su promena pH, stvaranje metalnih kompleksa i kopigmentacija. Faktori koji utiču na stabilnost antocijana su: prisustvo šećera vezanih glikozidnim vezama i/ili kiseline koje aciluju šećer, pH, temperatura, svetlost, prisustvo metala, kiseonika, itd. Uticaj pH na boju antocijana prikazan je na slici 1.13. Antocijani su crvene boje u kiseloj sredini, a plave u baznoj, na pH 4.5, su bezbojni. Ta osobina antocijana je iskorišćena za razvoj pH diferencijalne metode za njihovo određivanje.



Slika 1.14. Uticaj pH na boju antocijana

Potrebno je napomenuti da se mora naći odgovarajući faktor razblaženja za uzorak i to tako što se uzorak razblaži KCl puferom sve dok apsorbanca uzorka na λ_{max} ne bude unutar linearнog opsega spektrofotometra. Zatim se konačna zapremina uzorka podeli sa početnom zapreminom da bi se dobio odgovarajući faktor razblaženja. Nakon 15 min od razblaženja uzorka meri se apsorbanca uzorka na dve talasne dužine, $\lambda_{\text{max}} = 520 \text{ nm}$ i na $\lambda = 700 \text{ nm}$ (radi korekcije) u odnosu na slepu probu (destilovana voda). Apsorbancija razblaženog uzorka se računa na sledeći način:

$$A = (A_{\lambda_{\text{vis}}} - A_{\lambda_{700}})_{\text{pH}_1} - (A_{\lambda_{\text{vis}}} - A_{\lambda_{700}})_{\text{pH}_{4,5}}$$

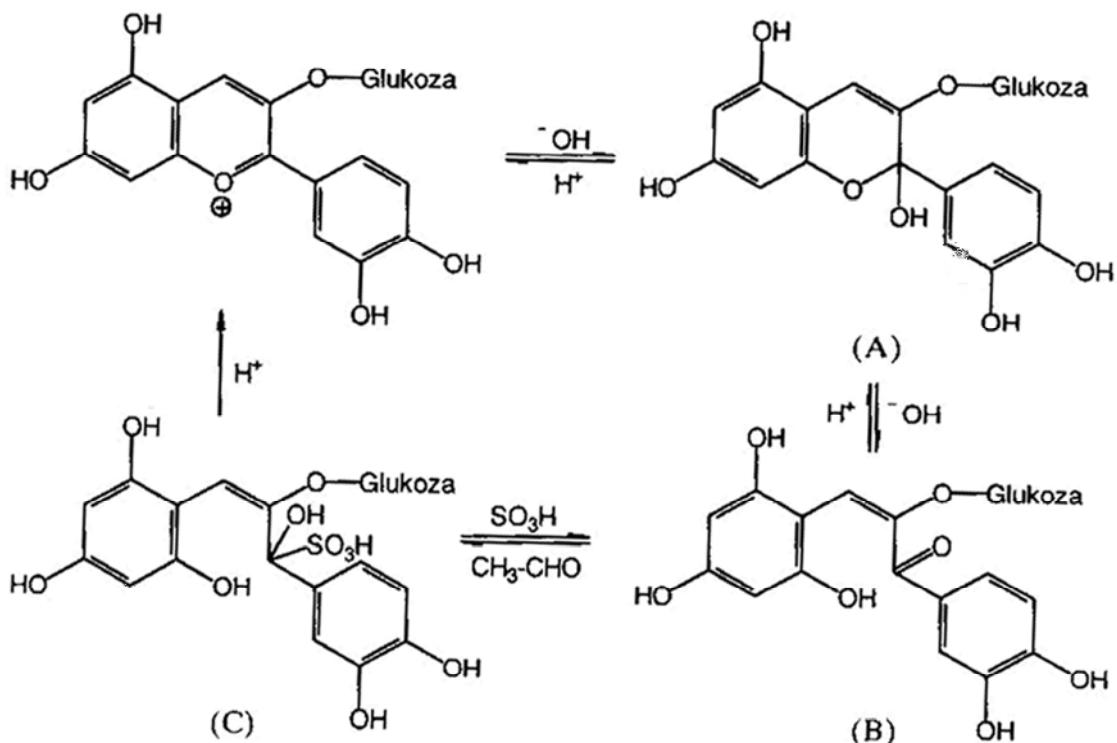
Iz dobijene vrednosti apsorbancije, računa se koncentracija monomernog pigmenta antocijanina po formuli:

$$c (\text{mg/l}) = \frac{A \times Mr \times Df \times 1000}{\varepsilon \times l},$$

gde je Mr– molekulska masa, Df– faktor razblaženja a ε – molarna apsorptivnost. Treba napomenuti da Mr i ε u formuli odgovaraju predominantnom antocijaninu u uzorku. U slučaju da ε predominantnog pigmenta nije dostupan ili se ne zna sastav uzorka, sadržaj pigmenta se računa kao sadržaj ekvivalenta cijanidin-3-glikozida na jedinicu mase uzorka.

Za određivanje stepena polimerizacije antocijanina koristi se bisulfitna metoda izbeljivanja (Giusti i Wrolstad, 2001). Polimerizovani antocijanini (antocijanin– tanin kompleksi) su otporni na dejstvo bisulfita, dok će reakcija monomernih antocijanina brzo ići do kraja sa bisulfitom (monomerni antocijanini sa bisulfitom grade bezbojni

adukt sulfonske kiseline). Na slici 1.15. prikazana je reakcija cijanidin-3-O-glukozida sa NaHSO_3 . Nastaje bezbojni proizvod.



Slika 1.15. Reakcija cijanidin-3-glikozida sa NaHSO_3

Ekstrakt antocijanina stavi se u dve kivete: u jednu se doda natrijum– bisulfit a u drugu H_2O (kontrolni uzorak). Nakon 15 min meri se apsorbanca oba uzorka na tri talasne dužine: $\lambda = 420 \text{ nm}$ (vrednost apsorbance na ovoj λ služi kao indeks tamnjenja), $\lambda_{\max} = 520 \text{ nm}$ i $\lambda = 700 \text{ nm}$. Na osnovu vrednosti apsorbancije računa se: intenzitet boje (gustina boje kontrolnog uzorka), polimerna boja i procenat polimerne boje, a na osnovu odnosa monomernih i ukupnih antocijanina može se izračunati indeks degradacije.

Intenzitet boje kontrolnog uzorka (uzorak tretiran vodom):

$$\text{Intenzitet boje} = [(A_{420} - A_{700}) + (A_{\max} - A_{700})] \times D_f$$

Polimerna boja izbeljenog uzorka tretiranog bisulfitom:

$$\text{Polimerna boja} = [(A_{420} - A_{700}) + (A_{\max} - A_{700})] \times D_f$$

Procenat polimerne boje:

$$\text{Procenat polimerne boje} = \frac{\text{polimernaboj}}{\text{intenzitetboje}} \times 100\%$$

1.6.1.4. Primena UV/VIS metode za određivanje antioksidativne aktivnosti

Elektron-transfer metode (ET) su veoma korišćene metode za određivanje antioksidativnog kapaciteta *in vitro*. Ove metode podrazumevaju prisustvo dve komponente u reakcionalnoj smeši: oksidans (proba) i antioksidans, kao i odvijanje elektron- transfer reakcije:



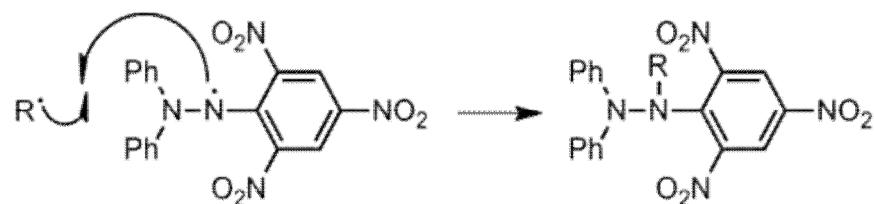
Proba, odnosno oksidans, uzima elektron iz antioksidansa i dovodi do promene boje rastvora. Promena intenziteta obojenosti rastvora je proporcionalna koncentraciji antioksidansa. Reakcija između antioksidansa i oksidansa je završena onda kada boja rastvora prestane da se menja. U svim metodama spektrofotometrijski se meriapsorbancija ispitivanog rastvora i prati njena zavisnost od molarne koncentracije. Zavisnost između promene absorbancije (ΔA) i koncentracije antioksidansa je linear. Nagib krive daje kapacitet antioksidansa koji se predstavlja kao Trolox ekvivalent (TE) ili kao ekvivalent galne kiseline (GAE).

Metode koje koriste elektron- transfer reakciju su:

- FCR- metoda (*Folin-Ciocalteu Reducing Capacity Assay*)
- TEAC- metoda (*Total Equivalent Capacity Assay*)
- FRAP- metoda (*Ferric Ion Reducing Antioxidant Power Assay*)
- DPPH- metoda (*Scavenging of 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil Radical Assay*)

1.6.1.5. DPPH-metoda

Određivanje „scavenging“ antioksidanskog slobodno-radikaliskog kapaciteta prema 2, 2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikalu zasniva se na redukciji ljubičastog 2, 2-difenilenil-1- pikrilhidrazil radikala (DPPH^\cdot) odgovarajućim antioksidansima do bledo- žutog hidrazina (Slika 1.16. i 1.17.).

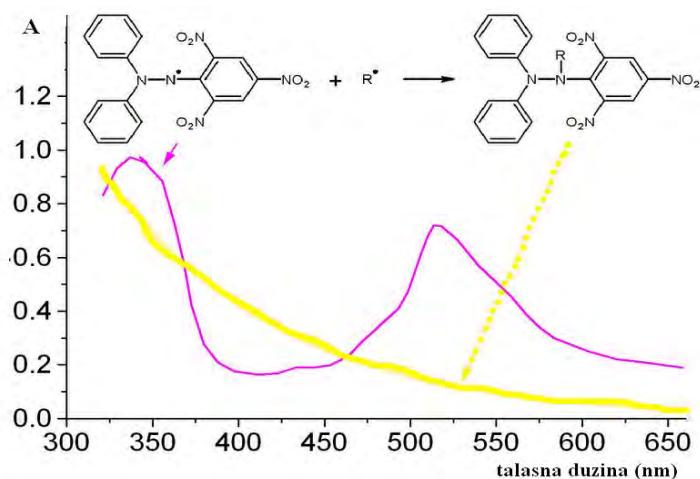


Slika 1.16. Mehanizam neutralisanja slobodnog radikala DPPH-om



Slika 1.17. Redukcija DPPH^{\bullet} do hidrazina

Antioksidativna aktivnost se određuje u organskom sistemu praćenjem promene apsorpcije na 515 do 528 nm, sve dok apsorpcija ne postane konstantna (Slika 1.18.); ili ESR-om (elektron-spin rezonanciom).



Slika 1.18. Promena apsorbancije u toku redukcije DPPH^{\bullet}

Određivanje antioksidativnog kapaciteta se zasnivalo na amperometrijskoj redukciji DPPH[•] na staklastoj ugljenikovoj elektrodi. Rezultujuća struja je proporcionalna koncentraciji DPPH[•] posle reakcije sa antioksidansom. Biampерometrijski metod koristi par DPPH/ DPPH[•] i dve identične staklaste ugljenikove elektrode u obliku diska. Reakcioni mehanizam se bazira na elektron- transfer reakciji (ET). Antioksidativni kapacitet u odnosu na DPPH[•] je pod jakim uticajem rastvarača i pH reakcije. Stask je zaključio da je smeša vode i etanola u odnosu 1:1 (50 %) dobar izbor za lipofilne i hidrofilne antioksidanse i brzina reakcije DPPH[•] i antioksidansa može značajno da raste sa povećanjem količine vode. Za

sadržaj vode veći od 60 % antioksidativni kapacitet opada, jer deo DPPH[•] koaguliše što otežava reakciju sa antioksidansima.

Rezultati su predstavljeni kao efikasna koncentracija (EC_{50}): količina antioksidansa koja je smanjuje koncentraciju DPPH za 50 %. Vreme potrebno da se postigne stabilno stanje sa efikasnom koncentracijom (EC_{50}) je izračunato iz kinetičke krive i definiše se kao TEC_{50} .

Antiradikalna efikasnost može biti određena izračunavanjem recipročne vrednosti od $EC_{50} \times TEC_{50}$, što znači da se efikasnost povećava sa smanjenjem $EC_{50} \times TEC_{50}$ vrednosti. Efikasnost hvatača (RSE) predstavlja odnos brzine reakcije (dobijene u prvom minutu) i efikasne koncentracije (EC_{50}). Ograničenje ove metode predstavlja određivanje EC_{50} vrednosti. Iz ovog razloga bolje je koristiti utrošenu koncentraciju DPPH[•].

Sterni prilaz DPPH[•] određuje reakciju, jer mali molekuli lakše prilaze ovom radikalu i imaju relativno veći antioksidativni kapacitet. Sa druge strane, veoma veliki antioksidansi, koji brzo reaguju sa peroksil radikalom, u ovom slučaju reaguju sporo ili ne reaguju.

Spektrofotometrijska merenja mogu biti pod uticajem jedinjenja, kao što su karotenoidi koji apsorbuju na talasnoj dužini određivanja, i pod uticajem zamućenosti uzorka.

DPPH test nije pogodan za merenje antioksidativnog kapaciteta plazme, jer se proteini precipituju u alkoholnom reakcionom medijumu. DPPH reakcija je „vremenska“ i može da traje od 20 min do 6 h.

1.6.2. HPLC-visokopritisna tečna hromatografija

HPLC (High Performance Liquid Chromatography ili High Pressure Liquid Chromatography) je visoko unapređena hromatografija u koloni ili tečna hromatografija pod visokim pritiskom. To je hromatografska tehnika koja se može primeniti i u preparativne i u analitičke svrhe. Preparativna HPLC omogućava razdvajanje komponenti radi dalje analize i smatra se metodom prečišćavanja, dok se analitička HPLC koristi za kvantitativno i kvalitativno određivanje prisustva analita u uzorku. HPLC metoda je brza (rastvarač se kreće pod dejstvom visokog pritiska oko 400 atm), efikasna (male čestice 3- 10 μm kojim se pakuje kolona imaju veliku specifičnu površinu ($100\text{-}800 \text{ m}^2/\text{g}$) za interakcije između stacionarne faze i molekula koji se razdvajaju) i vrlo osetljiva (detektuju se vrlo male koncentracije).

HPLC je metoda bazirana na tome da se analizirana smeša jedinjenja u pogodnom rastvaraču (mobilna faza) propušta kroz kolonu sa stacionanom fazom.

Raspodela komponenti uzoraka između faza je uzrokovana fizičko- hemijskim procesima: adsorpcijom, raspodelom između dve faze, jonskom izmenom, gel filtracijom, stvaranjem jonskih parova. Posledica toga je da se komponente smeše različito raspodeljuju između faza i pod uticajem mobilne faze kreću se kroz stacionarnu fazu različitim brzinama.

Mobilna faza je tečnog agregatnog stanja, obično je to voda ili neki organski rastvarač i mora zadovoljiti sledeće uslove:

- da ne menja karakter kolone,
- da nema primesa,
- da rastvara uzorak,
- da ima mali viskozitet.

Stacionarna faza može biti:

- granulovana čvrsta faza,
- tečnost nanesena na granule čvrstog nosača nerastvorna u tečnosti koja predstavlja mobilnu fazu.

U zavisnosti od polarnosti uzorka i rastvarača (mobilne faze) HPLC je podeljena na:

- 1) HPLC normalnih faza,
- 2) HPLC reverznih faza.

Kod *HPLC normalnih faza* uzorak je polaran, stacionarna faza polarna, a mobilna faza je nepolarni rastvarač. Najčešće upotrebljavana stacionarna faza za ovu svrhu je voda i trietilglikol vezani za SiO_2 ili Al_2O_3 . Mobilna faza je heksan ili izopropiletar. Kod analizirane smeše polarne komponente se duže zadržavaju na polarnoj stacionarnoj fazi (putuju duže) nego nepolarne. Ova metoda se koristi za razdvajanje polarnih jedinjenja.

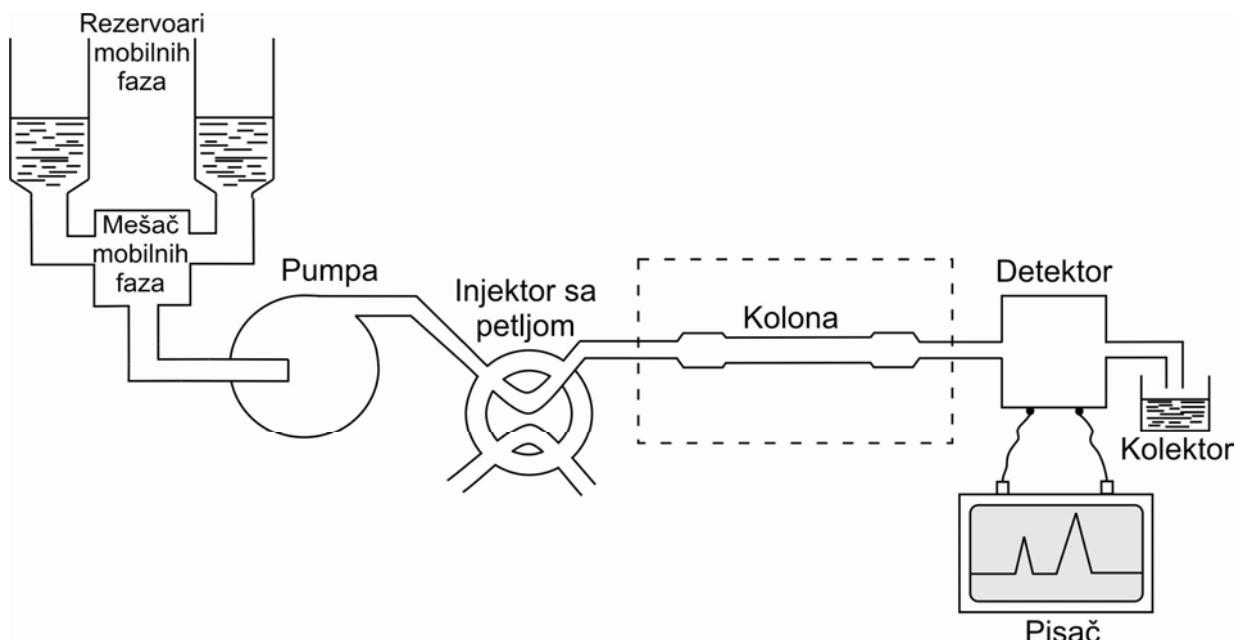
Kod *HPLC reverznih faza* uzorak je nepolaran, kolona takođe nepolarna, a mobilna faza je polarni rastvarač. Kolona je iste dužine i prečnika, samo je SiO_2 modifikovan (preveden u nepolarni). Stacionarna faza je C- 8 ili C- 18 ugljovodonik, mobilna faza je voda, metanol ili smeša vode i metanola, acetonitril. Komponente analizirane smeše koje su nepolarnog karaktera provode manje vremena u rastvaraču, a više u stacionarnoj fazi, polarne provode više vremena u mobilnoj fazi (putuju brže). Ova metoda se koristi za razdvajanje nepolarnih jedinjenja.

HPLC traje 5- 90 min; ovom metodom se polarna jedinjenja mogu hromatografisati bez prethodne derivacije, mogu se analizirati i visokopolimerne supstance. Takođe je priprema uzorka prilično jednostavna.

Osnovni delovi uređaja za HPLC su:

- 1) izvor protoka mobilne faze (rezervoar, pumpa),
- 2) deo za separaciju (injektor, kolona, termostat),
- 3) detektor ili sistem detektora.

Šematski prikaz uređaja prizan je na slici 1.19.



Slika 1.19. Šema uređaja za HPLC

Izvor protoka mobilne faze je rezervoar ili pumpa. Rezervoar se koristi za rastvarač (mobilna faza). Izvodi rezervoara se sastaju u mešaču koji ima funkciju da reguliše brzinu i sastav mobilne faze a takođe omogućava da se dva rastvarača dobro izmešaju na početku. Da bi se obezbedio odgovarajući protok tečne faze kroz kolonu, pumpe treba da proizvode pritisak od 1.5– 40 MPa, a u nekim slučajevima i do 70 MPa, zavisno od tipa kolone. Zbog osetljivosti detektora na protok, pumpe treba da obezbede konstantan protok bez pulsacija.

Kolone su cevi od stakla ili od nerđajućeg čelika ispunjene granulama stacionarne faze od čijeg hemijskog sastava zavisi namena kolone. Tipična dužina kolone je 100-300 mm, a unutrašnji prečnik cevi je 2- 5 mm. Temperatura kolone je

vrlo bitna; porast temperature kolone smanjuje viskoznost mobilne faze pa se skraćuje vreme analize. Porast temperature takođe omogućava dobijanje pika boljeg oblika što je važno za izračunavanje hromatografskih parametara. Punjenju kolone mora se posvetiti posebna pažnja. Kolone se pune mikročesticama (prečnika manjeg od 20 µm), obavezno se pune i suspenzije u pogodnom rastvaraču pod velikim pritiskom (približno 20 MPa).

Unošenje uzorka: Pogodnim sistemom uzorci se uvek unose u struju pokretne faze pri vrhu kolone koja ih potom uvodi u adsorpcioni sloj. Uglavnom se koristi nekoliko postupaka za unošenje uzorka: pomoću šprica; tehnikom „zaustavnog protoka“ pomoću šprica i pomoću petlje za probu s pogodnim sistemom slavina i u novije vreme automatski pomoću tzv. „autosemplera“. Količina supstance koja se može uneti u datu kolonu je ograničena širinom početne trake, obrazovane u trenutku sorpcije i količinom supstance, odnosno njenom raspodelom u toj traci. Da bi se dobilo dobro razlaganje, početna traka mora biti uža, a maksimalna koncentracija supstance mora da bude u granicama koje zadovoljavaju linearnost izoterme. Ako su uzorci koncentrovani pre unošenja u kolonu moraju se razblažiti. Zapremina unetog rastvora je ograničena na onu koja ne utiče na znatnije širenje krive eluiranja.

Izbor rastvarača se vrši na osnovu polarnosti rastvarača, polarnosti kolone, vrste detektora, polarnosti i rastvorljivosti supstanci koje se razdvajaju iz smeše. Čisti rastvarači za HPLC su samo *ultračiste* hemikalije.

Detektori su uređaji koji registruju promene koncentracije razdvojenih sastojaka smeše u eluentu, tj. izlaznom rastvoru iz kolone. Princip rada im je zasnovan na merenju fizičko- hemijskih osobina supstanci u rastvoru kao što su: apsorpcija u ultraljubičastom i vidljivom delu spektra, fluorescencija, refrakcija svetlosti, toplosta sorpcije, električna provodljivost, itd.

Kao detektori se koriste: UV-spektrofotometrijski, fluorescentni, elektrohemski, konduktometrijski detektori i detektori za merenje indeksa refrakcije.

Detektori koji se koriste u HPLC obično nisu instrumenti s kojima se direktno identificuju sastojci smeše. Oni daju odziv srazmeran koncentraciji razdvojenih supstanci u eluentu kolone. Supstance se mogu identifikovati na osnovu njihovih retencionih zapremina ili vremena. Kvantitativna analiza u HPLC vrši se na osnovu hromatograma, pošto odziv detektora koji se koristi u HPLC nije isti za sve supstance, pa je neophodno vršiti kalibraciju.

Fluorescentni detektori se koriste za analizu supstanci koje imaju slične fizičko-hemijske osobine i kada se nalaze u veoma malim koncentracijama. Osetljivost ovih detektora je 10^{-8} mg/mL.

IR detektori spadaju u apsorpcione spektroskopske detektore. Mana im je da se mora koristiti za mali broj rastvarača. Osetljivost im je veoma mala. Uglavnom se koriste za identifikaciju polimernih jedinjenja.

Refraktometrijski detektori se koriste u ispitivanju doziranih oblika kada supstance koje ih čine ne apsorbuju u UV spektralnoj oblasti i kada je koncentracija eluirane supstance u mobilnoj fazi velika. Osetljivost refrakcionog indeksa detektora iznosi 10^{-3} mg/mL. Uslov za njihovo korišćenje je konstantna temperatura, pritisak, protok mobilne faze i sastav mobilne faze. Koristi se za određivanje šećera.

Elektrohemijski detektor se koristi kao detektor u HPLC sistemima reversnih faza (jedan od rastvarača u mobilnoj fazi je voda). Eluat koji dolazi do detektora je voden rastvor ispitivane supstance. Princip određivanja je oksidacija ili redukcija supstanci na površini elektroda (živina, platinska, stakleno-grafitna ili grafitna elektroda). Osetljivost im je jako velika- 10^{-12} mg/mL, moguće je odrediti pikomolske koncentracije. Uglavnom se koriste u oksidacionoj varijanti jer se u redukcionoj mora uklanjati kiseonik iz mobilne faze i iz rastvora uzorka.

UV detektori- Apsorpciona spektrofotometrijska analiza zasniva se na sposobnosti atoma, jona i molekula da apsorbuju zračenje. Količina apsorbovanog zračenja je kvantitativna mera za koncentraciju apsorbirajuće supstance, a energija apsorbovanog zračenja, data je veličinom:

$$\Delta E = h\gamma,$$

I određuje prirodu apsorbirajuće supstance. Spektrofotometrijska analiza u užem smislu reči podrazumeva apsorpcionu spektrofotometrijsku analizu monohromatskim zračenjem u ultraljubičastoj i vidljivoj oblasti spektra, od 190– 1000 nm. Funkcijski odnos između veličine merene apsorpcijском metodom (A) i one koja se određuje (koncentracija c) poznat je kao *Lambert-Beer-ov zakon*:

$$A = A_0 l c$$

- A- apsorbancija ispitivanog rastvora;
- A_0 - molarna apsorbancija ispitivanog rastvora;
- l- dužina puta svetlosti;
- c- koncentracija ispitivanog rastvora.

Na ovom principu zasnovan je i rad UV detektora. UV detektori u novijim modelima HPLC aparata mogu da snimaju na jednoj talasnoj dužini; na dve talasne dužine ili celom spektru talasnih dužina, pa se s obzirom na to dele na:

1. Detektori sa fiksnom talasnom dužinom, obično 254 nm;
2. Detektori sa varijabilnom talasnom dužinom; oni mere na jednoj talasnoj dužini u vremenu. Talasnu dužinu je moguće odabrati u određenom opsegu (u zavisnosti od lampe ili lampi kojim je detektor opremljen);
3. Fotodiodni detektor koji meri simultano spektar talasnih dužina.

Cilj HPLC metode je da se izoluje metabolit nepoznate strukture u dovoljnim količinama i čistoći kako bi se omogućilo objašnjenje strukture i biološkog uzorka ili uvećanje broja izolata poznatih jedinjenja, kako bi se obezbedio materijal za dalja biološka ocenjivanja i hemijska proučavanja. HPLC se može izvoditi kao izokratska i gradijentna HPLC. *Izokratska HPLC* je metoda u kojoj se hromatografski eksperiment izvodi koristeći jedan nepromenljivi rastvarač, dok se kod *gradijentne HPLC* u toku procesa menja odnos rastvarača od polarnijeg ka nepolarnijem. Gradijentna HPLC može biti poželjnija kada se traži više od jedne komponente uzorka a one se međusobno razlikuju po retenciji.

Glavni cilj tečne hromatografije jeste da se dobije zadovoljavajuće razdvajanje komponenti analizirane smese u što kraćem vremenu. Vreme zadržavanja t_r je vremenski period od momenta iniciranja uzorka do momenta kada je signal ispitivane komponente uzorka dostigao maksimum.

Kvantitativna analiza u HPLC vrši se na osnovu hromatograma, pošto odziv detektora koji se koristi u HPLC nije isti za sve supstance, pa je neophodno vršiti kalibraciju.

Hromatogram predstavlja zapis hromatografskog razdvajanja; na apscisi se prati zapremina mobilne faze (vreme provedeno u koloni), a na ordinati jačina signala (koncentracija uzorka).

Na osnovu R_f vrednosti mogu se odrediti pojedine supstance. R_f je faktor zadržavanja i predstavlja odnos zapremine uzorka i zapremine mobilne faze. Faktor zadržavanja supstance koja se rastvara može se opisati pomoću tri parametra zadržavanja: vreme zadržavanja komponente u koloni (t_r), zapremina zadržavanja (V_r) i faktor kapaciteta (k_f).

1.6.3. AAS metoda

Atomi u energetski osnovnom stanju (Me) mogu da prime određen iznos energije ($h\nu$) i da pri tom pređu u određeno energetski više stanje, tzv. ekscitovano stanje (Me^*).



Količina energije koja može da izazove prelaz atoma u ekscitovano stanje zavisi od elektronske strukture atoma u osnovnom stanju, odnosno od vrste elementa. Ako se kroz paru atoma u osnovnom stanju nekog elementa propuštaju elektromagnetni zraci, koji imaju upravo onoliku energiju koja je potrebna za izazivanje ekscitacije atoma (elektromagnetni zraci rezonantne talasne dužine), doći će do apsorpcije ovih zraka. U ekscitovanom stanju atomi ostaju oko 8- 10 s, nakon čega se ponovo vraćaju u osnovno stanje, oslobađajući se viška energije delimično (preko sudara) kao topotne energije, a delimično u vidu elektromagnetskog zračenja u okolini prostora. Veličina apsorpcije, tj. smanjenje intenziteta propuštene svetlosti rezonantne talasne dužine, zavisiće od broja atoma u osnovnom stanju – “atomske pari” – što je i osnova za primenu atomske apsorpcije u analitičke svrhe. Između zakonitosti apsorpcije svetlosti molekula i atoma postoji velika sličnost, ali se za merenje atomske apsorpcije ne mogu primeniti uobičajeni spektrofotometri bez prethodnih izmena. Uzrok ovome je razlika između dva spektra. Širina molekularne apsorpcione linije je za nekoliko reda veličine veća od širine atomske apsorpcione linije. Zato se kod merenja molekularne apsorpcije postižu zadovoljavajući rezultati primenom spektrofotometara sa kontinualnim izvorom svetlosti čiji se svetlosni zraci razlažu pomoću monohromatora.

Da bi se mogla meriti atomska apsorpcija, spektrofotometri moraju imati izvor rezonantnog elektromagnetskog zračenja, čija je širina linije reda veličine kao što je širina apsorpcione linije atoma. Taj zahtev ispunjava jedino rezonantna linija iz emisionog spektra datog elementa. Rezonantne linije atomske emisionih spektara nisu geometrijske linije, već imaju oblik sličan Gauss- ovoj krivi raspodele sa određenim maksimumom intenziteta i polusalasnom širinom (širina linije merena na polovini maksimalnog intenziteta). Rezonantne linije imaju svoju prirodnu širinu, koja se predstavlja pomoću polusalasne širine ($\Delta\lambda_{1/2}$):

$$\Delta\lambda_{1/2 \text{ pri.}} = \frac{4 \pi e^2}{3 m c} \approx 1,19 \cdot 10^{-5} / \text{nm} \quad (7)$$

gde je: e – nanelektrisanje elektrona, m – masa elektrona, c – brzina svetlosti.

Ova prirodna širina linije se praktično proširuje usled različitih uticaja, kao što je termičko kretanje i sudari atoma. Proširenje linije koja se javlja usled termičkog kretanja atoma naziva se **Doppler- ov efekat** ($\Delta\lambda_{1/2D}$):

$$\Delta\lambda_{1/2D} = 0,716 \cdot 10^{-6} \lambda_0 \sqrt{\frac{T}{A}} \quad (8)$$

gde je: T – apsolutna temperatura, A – atomska težina, λ_0 – talasna dužina linije.

Doppler- ov efekat ne izaziva promenu maksimalnog intenziteta linije već izaziva samo njeno proširenje.

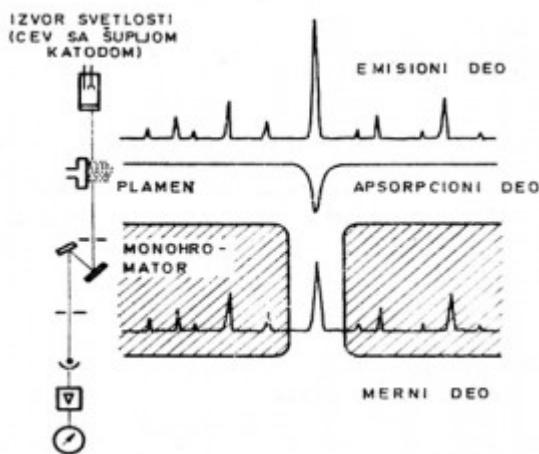
Proširenje usled međusobnih sudara atoma često izaziva i deformaciju oblika emitovane linije (takođe i apsorbovane linije) kao i njeno pomeranje ka većim talasnim dužinama. Usled međusobnog dejstva nanelektrisanih čestica nastaje tzv. **Stark- ov efekat**, dok pri međusobnom sudaru nenelektrisanih čestica nastaje **Van der Waals-ovo proširenje**. Usled sudara atoma iste vrste nastaje **Holtsmark- ovo proširenje**. Ova tri efekta je vrlo teško razlikovati i zato se oni svi zajedno obično nazivaju **Lorenz- ovo proširenje** ($\Delta\lambda_{1/2L}$):

$$\Delta\lambda_{1/2L} = \frac{n v d^2 \lambda_0^2}{c} \cdot 10^8 \quad (9)$$

gde je: n - broj atoma po jedinici zapremine, v – srednja brzina atoma, d - prečnik korisnog sudara.

Širina emisione rezonantne linije je oko 0.002 nm. Slično emisionim linijama i atomske apsorpcione linije imaju određene širine. Širina apsorpcionih linija atoma je obično nešto šira od emisionih linija. Da bi se mogla meriti atomska apsorpcija, potrebno je imati monohromatski izvor svetlosti stalnog intenziteta rezonantne talasne dužine za određeni element, čija je polutalasna širina manja od polutalasne širine atomske apsorpcione linije. Ove zahteve izvora svetlosti zadovoljava cev sa šupljom katodom. Pod ovakvim uslovima tačnost merenja ne određuje monohromator, u atomskom apsorpcionom spektrofotometru već kvalitet cevi sa šupljom katodom (ili drugi odgovarajući izvor svetlosti) i tačnost merenja intenziteta propuštene svetlosti nakon atomske apsorpcije. Monohromatori obično propuštaju traku monohromatskog zraka čija je polutalasna širina oko 0.5 nm, dok je polutalasna širina atomske apsorpcione linije oko 0.01 nm. Time je uloga monohromatora

svedena samo na izolovanje rezonantne linije iz "okoline", što je i šematski prikazano na Slici 1.20.



Slika 1.20. Šematski prikaz atomskog apsorpcionog spektrofotometra i principa merenja atomske apsorpcije

Atomski apsorpcioni spektrofotometar se sastoji iz četiri osnovna dela: emisionog, apsorpcionog, selekcionog i mernog dela. Uloga emisionog dela je da obezbedi izvor zračenja rezonantne talasne dužine. Apsorpcioni deo je najvažniji deo aparata i ima zadatku da stvara atome elementa u osnovnom stanju. U zavisnosti od načina atomizacije, ovi aparati se mogu podeliti u dve grupe: plamene i besplamene (Marjanović i Jankovitš, 1983). Kod besplamenih instrumenata atomizacija se može vršiti laserskim zracima, pomoću električnog luka u grafitnim kivetama ili katodnim isparavanjem. Selektivni deo, monohromator, ima ulogu da iz snopa svetlosnih zraka izdvoji uži snop zraka. Kod ovih instrumenata uloga monohromatora je svedena na minimum jer izvor zračenja obezbeđuje monohromatsko zračenje. Merni deo može biti fotoćelija ili fotomultiplikator.

Moderni aparati imaju mogućnost biranja talasne dužine preko prekidača ili tastature. Instrumentom se veoma jednostavno upravlja pomoću softvera integrisanog u instrument. Softver u sebi sadrži prozore i padajuće menije koji korisniku pokazuju sve mogućnosti aparature i omogućavaju da se na jednostavan način odaberu željeni uslovi analize. Ovakav način upravljanja instrumentom korisniku dozvoljava da prati napredak bilo koje automatske sekvene uključujući detalje metoda, signalnu grafiku, kalibraciju, izmerene parametre rastvora u momentu posmatranja, kako u toku analize tako i po njenom završetku, a moguće je i paralelno štampanje izveštaja.

1.7. ANTIMIKROBNA SVOJSTVA BILJNIH EKSTRAKATA

Jedinjenja sa antimikrobnim delovanjem pripadaju različitim klasama hemijskih jedinjenja, a tačan mehanizam interakcije često je izraz ove različitosti, iako konačna oštećenja mogu biti vrlo slična. Tako fenolni spojevi deluju na transmembranski pH gradijent i integritet membrane, te uzrokuju curenje unutar ćelijskog sadržaja, ometanje transporta i procesa stvaranja energije, te respiratornog lanca. U ekstraktima određenih biljnih vrsta prisutan je veliki broj različitih reaktivnih grupa, stoga se antimikrobni učinak ne može pripisati samo jednom, specifičnom mehanizmu već je uključeno nekoliko ciljnih mesta na ćeliji mikroorganizma (Skandamis i sar., 2006).

Kod vegetativnih bakterijskih ćelija, tri su mesta delovanja antimikrobnih supstanci: 1) ćelijski zid, 2) citoplazmina membrana; 3) citoplazma (Denyer i Stewart, 1998). Pristup antimikrobnih supstanci navedenim delovima ćelije određen je:

- 1) ekstracelularnim materijalom;
- 2) ćelijskom morfologijom,
- 3) hemijskim sastavom ćelije;
- 4) fenotipskim varijacijama u fiziologiji ćelije koje mogu dovesti do unutrašnje rezistencije (Brown i sar., 1990).

Oštećenja ćelije mikroorganizama usled delovanja antimikrobnih supstanci mogu se manifestovati na sledeće načine:

- 1) Poremećajem transmembranske protonске pokretačke sile što uzrokuje prekidanje oksidativne fosforilacije i inhibiciju aktivnog transporta kroz membranu;
- 2) Inhibicijom kataboličkih/ anaboličkih reakcija;
- 3) Poremećajem replikacije;
- 4) Gubitkom integriteta membrane što uzrokuje curenje esencijalnih unutarćelijskih sastojaka poput kalijumovih jona, neorganskog fosfata, pentoza, nukleotida, nukleozida i proteina;
- 5) Lizom ćelije;
- 6) Koagulacijom unutarćelijskog sadržaja (Denyer i Stewart, 1998).

Antimikrobna aktivnost fenolnih jedinjenja posledica je različitih i isprepletenih mehanizama delovanja, a vrsta mikroorganizma i njegova građa takođe imaju važnu ulogu (Shan i sar., 2007). Fenolna jedinjenja i mogu denaturisati enzime (Furneri i sar., 2002) ili se vezati na vitamine, minerale ili ugljene hidrate čineći tako nedostupnim

navedene supstrate koji su nužni za rast mikroorganizma (Stern i sar., 1996; Shahidi i Naczk, 2004). Polifenoli takođe mogu kroz ćelijski zid u mikroorganizam što rezultira narušavanjem strukture i funkcije ćelijske membrane (Hugo i Bloomfield, 1971).

Bakterije su jednoćelijski organizmi, štapičastog, okruglog ili spiralnog oblika, vidljivi samo pod mikroskopom. Među najranijim su oblicima života na Zemlji, te su se razvile tako da mogu živeti u različitim uslovima. Neke mogu preživeti i pri visokim temperaturama ili vrlo niskim temperaturama, a neke čak i pri nivou radijacije koja bi bila smrtonosna za čoveka. Ipak, mnogim bakterijama najviše pogoduju uslovi rasta koje pruža zdravi organizam. Hrana je zbog svog sastava nužna za funkcioniranje ljudskog organizma, ali hranjivi sastojci istovremeno predstavljaju idealnu podlogu za rast mikroorganizama (Duraković, 1991).

Antimikrobna aktivnost ekstrakata fenolnih jedinjenja u ovom radu ispitana je na bakterijskim patogenima koji su najčešće prisutni u hrani:

Salmonella sp. je Gram-negativna, štapičasta bakterija iz porodice *Enterobacteriaceae* (slika 1.21.).

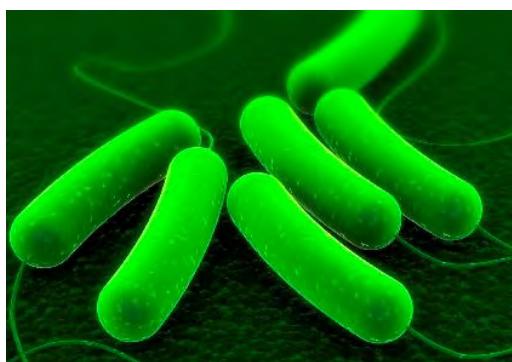


Slika 1.21. Bakterija *Salmonella* sp.

Rod *Salmonella* obuhvata oko 500 raznih tipova Gram-negativnih asporogenih štapića bez vidljive kapsule i najvećim delom sa peritrihijalnim flagelama. Neke od njih izazivaju opšte ciklične infekcije (trbušni tifus i paratifuse), a druge akutne gastroenteritise (Karakašević, 1982). Salmonele koje izazivaju tifus i paratifuse ulaze u organizam preko probavnog trakta. Odatle dospevaju u krv, odakle se raznose po celom organizmu i u pojedinim organima i tkivima gde se zadržavaju kraće ili duže vreme. Odatle se izlučuju izmetom ili mokraćom za

vreme trajanja bolesti i posle kliničkog ozdravljenja (rekovalescentno kliconoštvo) (Karakašević, 1982). Infekcije sluzokože creva klinički se manifestuju prolivima, dehidratacijom i drugim simptomima, karakterističnim za zarazne prolive.

Escherichia coli je Gram-negativna, štapićasta bakterija koja pripada porodici *Enterobacteriaceae* (slika 1.22.). Koristi se u svim temeljnim biološkim istraživanjima, a njezina je prisutnost u vodi i hrani pouzdan pokazatelj fekalnog onečišćenja (Duraković, 1996). *Escherichia coli* je nominalni deo mikroflore crevnog trakta toplokrvnih životinja. Naseljava crevni trakt čoveka gde sintetiše vitamine (B12), antibiotike (kolicin), učestvuje u transformaciji ugljenih hidrata i proteina. Kada oslabi imuni sistem, izaziva crevne poremećaje (enteritis). Takode je i glavni uzročnik infekcija urinarnog trakta, sepse i meningitisa, a izaziva i pneumonije.



Slika 1.22. Bakterija *Escherichia coli*

Staphylococcus aureus je Gram-pozitivna bakterija kuglastog oblika, koja pripada porodici *Micrococcaceae* (slika 1.22.). Ova bakterija je dobila ime po žuto-zelenoj boji svojih kolonija. Patogena je i izaziva mnoštvo različitih infekcija i intoksikacija. Bakterija loptastog oblika (koka) koja gradi grozdaste fondacije. Može rasti i preživeti u sekretima nosa i na koži te u različitim namirnicama pod uslovima kada je rast ostalih mikroorganizama inhibiran (Duraković, 1996). Sintetiše veliki broj toksina koji doprinose patogenosti. *Staphylococcus aureus* često naseljava kožu i sluzokožu (pogotovo sluzokožu nosa), naročito kod bolničkih pacijenata. Bolesti koje izaziva ovaj stafilokok mogu biti invazivne (nastaju prudorom bakterije u organizam), intoksikacijske (bakterije ne prodiru u organizam već izlučuju toksine koji su odgovomi za poremećaje, npr.

konzumiranjem pokvarenih namimica) i kombinacija ove dve grupe. *S. aureus*, treći je najčešći uzrok trovanja hranom u svetu (Zhang i sar., 1998).



Slika 1.2.3. Bakterija *Staphylococcus aureus*

Rod *Bacillus* u porodici *Bacillaceae* obuhvata oko 20 vrsta krupnih, pravih, sporogenih, Gram pozitivnih bakterija. *Bacillus subtilis* je Gram-pozitivna i katalaza-pozitivna bakterija. Vrlo je rasprostranjena i često se nalazi u senu, pa se lako može izolovati iz infuzuma sena. *Bacillus subtilis* nije humani patogen mada ponekad može kontaminirati hranu (njegove spore su jako otporne na kuhanje) i izazvati trovanje. Ako dospe u ozleđeno oko čoveka, na ozledenom mestu se može razmnožiti i izazvati težu infekciju, koja dovodi do slepila. Veoma je otporna na uslove spoljašnje sredine, jer formira debelozide endospore. Spore ove bakterije zbog svoje znatne termorezistencije koriste se za kontrolu ispravnosti autoklava. Bakterije ovog roda prikazane su na slici 1.24.

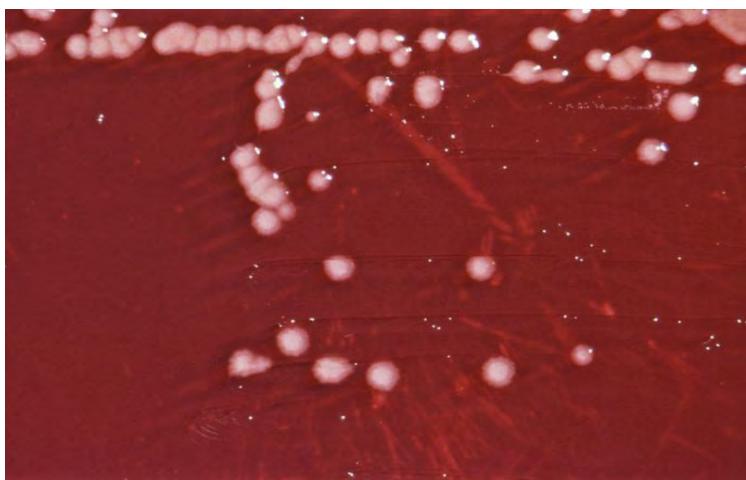


Slika 1. 24. Bakterije *Bacillus subtilis* obojene po Gramu

Pseudomonas- Ova bakterija je -veoma široko rasprostranjena (zemlja, voda, namirnice). To je asporogena, štapičasta, Gram-negativna bakterija sa unipolarnom pokretljivošću. Gram-negativni pokretni bacili često uzrokuju hospitalne infekcije. Kod ljudi je najčešća vrsta *P. aeruginosa*. Druge vrste, koje

ponekad uzrokuju infekcije kod ljudi su *P. paucimobilis*, *P. putida*, *P. fluorescens* i *P. acidovorans*.

Kod ljudi izaziva apscese, infekcije rana, emfizem, meningitis, endokarditis i infekcije pluća, urinamog i gastrointestinalnog trakta, kože (dermatitis) i infekcije oka i uha. Luče endotoksine, egzotoksine, enzime i druge biološki aktivne materije koje povećavaju njihovu toksičnost. Na slici 1.24. prikazane su bakterije ovog roda.



Slika 1.24. Bakterije roda ***Pseudomonas***

Kako se patogeni mikroorganizmi mogu naći u različitim vrstama hrane, korišćenje prirodnih antimikrobnih supstanci, kao što su biljni ekstrakti, mogu biti važni u očuvanju kvaliteta različitih namirnica. Zbog antioksidacijske i antimikrobne aktivnosti, nar svoju primjenu nalazi i u prehrambenoj industriji, kao konzervans prirodnog porekla.

U današnje vreme kada je upotreba sintetskih konzervansa u prehrambenoj industriji vrlo raširena, potrošači su izuzetno zabrinuti za sigurnost hrane. Takođe zbog sve veće raširenosti bakterijskih patogena rezistentnih na antibiotike poput meticilin-rezistentnog *Staphylococcus aureus* (MRSA), sve je više istraživanja usmereno pronalaženju antimikrobnih komponenti biljnog porekla.

Od davnina se različite biljne vrste koriste u medicini te upotrebljavaju kao prirodni konzervansi (Shan i sar., 2007). U današnje vrijeme u hranu se dodaju različiti konzervansi izolovani iz biljnog materijala poput fenolnih jedinjenja koji imaju antioksidativna ili antimikrobna svojstva (Shahidi i Naczk, 2004) i istražuju se mogućnosti primene biljnih ekstrakata za kontrolu rasta mikroorganizama u hrani.

Gljive

Gljive su eukariotski organizmi, koji nemaju hlorofila. Carstvu nižih eukariota- *Mycota* pripadaju mikromicete tj., mikroskopske gljive (npr. kvasci, penicilijumi, aspergilusi, dr.) i makromicete, koje u toku svog rasta i razvoja formiraju vizuelno saglediva plodonosna tela— trudove, agrikusne gljive i dr. Razmnožavaju se vegetativno, polno i bespolno. Među njima se nalaze kako saprofiti, tako i paraziti.

Gljive sa jednoćelijskim talusom (kvasci)

Kvasci predstavljaju grupu gljiva, koje se razlikuju po mnogim osobinama od ostalih gljiva, koje se često nazivaju budi ili plesni. Oni pokazuju veoma veliku raznoobraznost oblika i veličine u zavisnosti od vrste i od uslova gajenja. Kvasci su pre svega saprofitski mikroorganizmi, koji kao izvor ugljenika koriste šećere, organske kiseline i alkohole. Mnogi kvasci vode parazitski način života. Pripadaju grupi fakultativnih anaeroba jer mogu da se razvijaju i u aerobnim i u anaerobnim uslovima. Kvasci su veoma široko rasprostranjeni u prirodi. Sreću se u vazduhu, zemljištu, vodi, u zrelim plodovima voća i povrća, u nektaru cvetova i dr. Tipični rodovi u okviru grupe kvasaca su: *Saccharomyces*, *Schyzosaccharomyces*, *Hansenula*, *Candida*, *Torula* i dr. (Karakašević, 1982).

Rod Candida

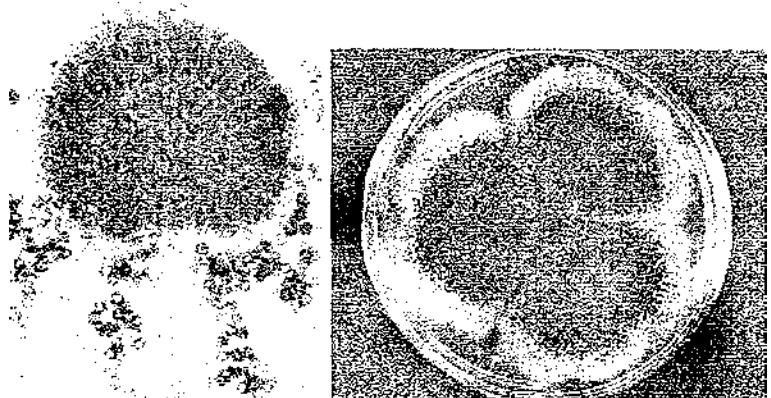
Rod *Candida* je vrstama brojan i vrlo heterogen rod, obuhvata nesavršene forme kvasca. Vrste koje pripadaju ovom rodu razmnožavaju se vegetativno-pupljenjem. Usled neodvajanja pupoljaka, obrazuju pseudomiceliju sa različitom stepenom prelaska ka pravoj miceliji. U procesu analognom pupljenju, mogu da formiraju blastospore.

Candida albicans

Ova vrsta je veorna raširena u prirodi. *Candida albicans* se najčešće nalazi u vidu blastospora, koje često pupe (slika 1.25). Blastospore su ovalne, ređe okrugle i tankih zidova. Obično su skupljene u nepravilne gomile, ređe se nalaze pojedinačno. Zajedno sa ostalim vrstama ovoga roda nalazi se u koži, ustima, vagini i crevima kao normalna telesna flora. Infekcije nastaju onda kada ostala bakterijska kompetitorska flora biva limitirana upotrebom antibiotika koji nemaju fungicidno delovanje. Najčešći je uzročnik kandidijke. Postoje oralne, vaginalne i sistemske kandidijke koje imaju veoma različite rnanifestacije. Kod oralnih kandidaza javljaju se kao bele mrlje na mukozi usne duplje, jeziku ili desnima, koje kasnije postaju konfluentne i ulcerozne. Većina HIV-

pozitivnih osoba ima oralnu kandidijazu koja se širi i na ezofagus. Vaginalna kandidijaza se javlja kao svrab, pečenje i bol vaginalne vulve sa gustim ili retkim belim sekretom. Sistemska kandidijaza je potencijalno opasna za život i javlja se pre svega kod oslabljenih individua, osoba sa kancerom (sa sekundarnom neutropenijom kao posledicom hemioterapije), i nakon tretmana kortikosteroidima ili antibioticima širokog spektra delovanja. Sistemska kandidijaza zahvata gastrointestinalni trakt, pluća, jetru, slezinu. (Karakašević i sar., 1989).

Aspergilus niger ima dugačke konidiofore, čija dužina iznosi po nekoliko milimetara. Na njima se nalaze loptaste vezikule (slika 1.25). *Aspergilus niger* je vrlo rasprostranjena vrsta ovoga roda, lako se identificuje na osnovu beložutih konidija koje kasnije postaju crne. To je po učestalosti treća vrsta koja je odgovorna za invazivnu plućnu aspergiliozu. Osim toga, *A. niger* često izaziva aspergilome i otomikoze. On je uzročnik kontaminacije u laboratorijama.



(a)

(b)

Slika 1.25. *Aspergillus niger*: (a) - izgled mladog vrha konidiofora;
(b) izgled kulture *Aspergillus niger*

Difuzioni metod

Ova metoda koristi se za određivanje antimikrobne aktivnosti supstanci još od četrdesetih godina prošlog veka. Sastoji se u tome da se na površini odabrane podloge koja je zasejana odgovarajućim test-mikroorganizmom nanosi ispitivani uzorak koji sa tog mesta difunduje, radijalno u svim pravcima, sprečavajući rast mikroorganizma, ukoliko je on osetljiv na dejstvo ispitivanih uzoraka. Širina zone inhibicije prečnik) srazmerna je stepenu osetljivosti mikroorganizma na ispitivani uzorak, odnosno antimikrobnom učinku ispitivanog uzorka. Hranljiva podloga po dodatku inokuluma

homogenizuje se i razlije u Petrijeve šolje. Na odredena mesta, posredstvom celuloznih diskova- *disk-difuzioni* metod, dozira se ispitivani uzorak i inkubira u termostatu na temperaturi od 37 °C za vreme od 24-48 h. Rezultati se vrednuju merenjem prečnika zone inhibicije rasta mikroorganizma u mm ili cm (Eur. Ph. 1997; Gudžić, 2003: Ph. Jug. IV, 1984). Ukoliko nema zone inhibicije, znači da je mikroorganizam otporan na dejstvo ispitivane supstance. Ako su uslovi potpuno standardizovani (sastav i debljina podloge, veličina inokuluma, pH podloge, vreme inkubiranja, itd.), prečnik zone inhibicije je proporcionalan logaritmu koncentracije ispitivane supstance. Eksperiment je neophodno izvoditi u replikatu. Osim toga, neophodno je koristiti dve vrste kontrole: pozitivnu i negativnu. Negativna kontrola podrazumeva da se na disk umesto ispitivanog uzorka nanosi rastvarač (u kojem je uzorak rastvoren), dok pozitivna kontrola uključuje primenu standardnih antibiotika.



Slika 1.26. Različiti tipovi rezervoara koji se koriste u difuzionoj metodi (a) – celulozni disk, (b) - rupa u hranljivoj podlozi).

Ova metoda se smatra nepodesnom pošto lako isparljive komponente etarskih ulja, tokom perioda inkubacije, isparavaju zajedno sa rastvaračem u kome je ulje razblaženo, dok slabo rastvorne komponente ne difunduju kroz medijum. Neki autori ističu da ova metoda daje samo kvalitativne i ne uvek reproduktivne rezultate, zbog čega se uglavnom koristi za preliminarni skrining antibakterijske aktivnosti. Međutim, faktori kao što su: zapremina ekstrakta koja se nanosi na celulozni disk, sastav hranljive podloge i korišćeni rastvarači se veoma mnogo razlikuju u različitim radovima, što otežava komparaciju dobijenih rezultata (Dorđević, 2010).

1.8. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Svi eksperimenti su izvršeni u najmanje tri ponavljanja, a rezultati predstavljeni kao srednja vrednost. Određena je standardna devijacija. Za pojedine parametre je urađena analiza varianse (ANOVA), Duncan-ov test višestrukih intervala, kao i koeficijent korelacije između parametara (Miler i Miler, 2005).

Analiza glavnih komponenti (Principal Components Analysis)

Ovu tehniku je prvi put opisao Karl Pearson 1901. godine. Iako je vršio izračunavanja sa samo dve ili tri varijable, Pearson je verovao da se analiza glavnih komponenti može upotrebiti i za rešavanje problema sa puno više promenljivih. Opis izračunavanja je dat mnogo kasnije od strane Hotelling-a, 1933. godine. Međutim, i dalje su izračunavanja bila previše komplikovana i zamorna kada bi trebalo napraviti analizu sa većim brojem varijabli. Široka upotreba analize glavnih komponenti je usledila zapravo tek sa pojavom računara.

Analiza glavnih komponenti predstavlja jednu od najjednostavnijih multivarijantnih tehnika. (Cattell, 1996). Ona se primenjuje kada je veliki broj varijabli u skupu redundantan, odnosno kada se više varijabli odnosi na istu dimenziju i kada ne pružaju nikakvu dodatnu informaciju koja već nije obuhvaćena nekom drugom varijablom. Geometrijski gledano, to znači da na prostoru od k dimenzija imamo p varijabli pri čemu je $k < p$. Očekuje se da će k najvećih glavnih komponenti biti dovoljno da objasni variabilitet podataka u skupu. Cilj analize je da se uzme p varijabli (X_1, X_2, \dots, X_p) i da se pronađe kombinacija istih da bi se izračunale nove varijable (Z_1, Z_2, \dots, Z_p) koje međusobno nisu u korelaciji i koje će opisivati varijacije podataka. Nepostojanje korelacije znači da nove varijable mere međusobno različite „dimenzije“ podataka. i njihove varijanse su poređane u opadajući niz ($\text{Var}(Z_1) \geq \text{Var}(Z_2) \geq \dots \geq \text{Var}(Z_p)$). Promenljive Z predstavljaju zapravo glavne komponente. Kada se radi analiza glavnih komponenti, želja je da varijanse većine promenljivih Z budu toliko male da su zanemarljive. U tom slučaju, veći deo varijacija originalnih podataka se može adekvatno opisati sa svega nekoliko glavnih komponenti, čime se postiže određeni stepen uštede. Analiza glavnih komponenti ne uspeva uvek u tome da veliki broj originalnih varijabli X smanji na mali broj izvedenih varijabli Z . Ako originalne varijable nisu u korelaciji, analiza neće postići nikakav rezultat. Najbolji rezultati se postižu kada su originalne varijable u visokoj korelaciji, bilo pozitivnoj ili negativnoj. Ako postoji takav slučaj, onda se može očekivati da će se skup od 20 originalnih varijabli redukovati na svega dve ili tri glavne komponente. Pored toga, korisna će biti i činjenica da je otkriven visok stepen redundantnosti kod originalnih varijabli. Izvedena promenljiva Z predstavlja zapravo prosek standardizovanih vrednosti obeležja originalnih promenljivih i može se posmatrati kao indeks.

Korišćeni statistički alat je bila PCA. PCA omogućuje određivanje grupe podataka, smanjujući njenu veličinu, i čuvajući većinu korisnih statističkih informacija koje su prisutne u polaznim podacima. PCA se koristi za utvrđivanje zavisnosti između promenljivih veličina.

Analiza je izvođena koristeći statistički paket na desktop kompjuteru (Statistica 8.0, StatSoft, Inc, Tulsa, OK, USA).

2. EKSPERIMENTALNI DEO

2.1. BILJNI MATERIJAL

Biljni materijal korišćen za analizu je sakupljen na teritoriji Jugoistočne Srbije. Biljke su uzorkovane u skladu sa metodama koje se koriste u Evropskim monitoring projektima (the European moss monitoring project). Minimalno rastojanje od glavnih puteva je bilo 300 m, a od lokalnih puteva 100 m, a 5 m od šumskih puteva (Zechmeister i sar., 2003).

Detaljne informacije o uzorcima (lokaliteti, staništa, vremena uzorkovanja) date su u Tabeli 2. 1. 1. Uzorci bulke, gloga i trnjine ispitivani su u svežem stanju . Ostali ispitivani uzorci su bili ubrani u vreme cvetanja i osušeni na provetrenom mestu. Tako osušen materijal je homogenizovan, samleven i ekstrahovan.

Tabela 2.1.1.Ispitivane biljne vrste

Biljka	Vrsta	Deo biljke	Lokalitet i vreme branja
Bulka	<i>Papaver rhoeas</i> L.	Cvet	Jugoistočna Srbija, maj 2009
Glog	<i>Crataegus oxyacantha</i> L.	Plod	Jugoistočna Srbija, septembar 2009
Trnjina	<i>Prunus spinosa</i> L.	Plod	Jugoistočna Srbija, septembar 2009
Cikorija	<i>Cichorium intybus</i> L.	Cvet	Jugoistočna Srbija, jun 2009
Neven	<i>Calendula officinalis</i> L.	Cvet	Jugoistočna Srbija, jun 2009
Vranilovka	<i>Origanum vulgare</i> L.	Nadzemni deo biljke	Jugoistočna Srbija, jun 2009
Žavornjak	<i>Delphinium consolida</i> L.	Cvet	Jugoistočna Srbija, avgust 2009

2.2. APARATI I REAGENSI

Prilikom ispitivanja sadržaja fenolnih jedinjenja kao i antioksidativne i antimikrobne aktivnosti i metalnih jona u ispitivanim biljnim vrstama korišćena je sledeća oprema:

2.2.1. Aparati

1. Blender za homogenizovanje biljaka;
2. Analitička vaga Mettler Toledo AB-204-S za odmeravanje uzoraka i čvrstih supstanci;
3. Ultrazvučna kada;
4. MicroMed high purity water system, TKA WasseraufbereitungsszsteGmbH za dobijanje demineralizovane vode;
5. Termostat Julabo MP 5A Open Bath Circulations za termostatiranje rastvora;
6. pH metar Hanna Instruments za merenje pH vrednosti rastvora;

7. Varijabilne automatske pipette Lab Mate⁺ za pipetiranje rastvora;
8. Hronometar za merenje vremena;
9. UV/Vis spektrofotometar Agilent 8453 sa kivetom dužine optičkog puta 1 cm za određivanje sadržaja i ispitivanje kinetike fenolnih jedinjenja;
10. HPLC sistem Agilent Technologies 1200 Series koji se sastoji od kvaternarne pumpe G1354A, automatskog injektora G1329A, termostatiranog kolonskog dela G1316A, UV/Vis detektora G1315D, fluorescentnog detektora G1321A kontrolisanog sa HP Chemstation softverom za određivanje sadržaja fenolnih jedinjenja
11. Varian SpectraAA 10 sa pozadinskom korekcijom i šupljom katodnom lampom.

2.2.2. Reagensi

U radu su korišćeni sledeći reagensi:

- *Rastvor Folin-Ciocalteu reagensa* sadrži smešu fosfovolframove ($H_3PW_{12}O_{40}$) i fosfomolibdenove kiseline ($H_3PMo_{12}O_{40}$) (komercijalni proizvod).
- *Rastvor Na-karbonata (20 %)* - pripremljen rastvaranjem 200 g anhidrovanog Na_2CO_3 u 800 ml vode. Rastvor se zagreva dok se celokupna količina soli ne rastvari. Nakon hlađenja doda se par kristala Na_2CO_3 . Nakon 24 h rastvor se filtrira i dopuni deionizovanom vodom do 1000 ml.
- *Standardni rastvor galne kiseline*- pripremljen je na sledeći način: 50 mg galne kiseline se rastvari u 10 ml metanola, prenese u normalni sud od 100 ml i dopuni deionizovanom vodom do crte. Dobijena koncentracija iznosi 5 mg/ml. Da bi se dobila koncentracija od 0.05 mg/ml, 1 ml prethodno pripremljenog rastvora prenese se u normalni sud od 100 ml i dopuni deionizovanom vodom do crte.
- *Radni rastvor $NaNO_2$ (5 %)*- pripremljen je odmeravanjem određene mase $NaNO_2$ i rastvaranjem u deionizovanoj vodi.
- *Radni rastvor $AlCl_3$ (2 %)*- pripremljen je odmeravanjem određene mase $AlCl_3$ i rastvaranjem u deionizovanoj vodi.
- *Standardni rastvor kvercetina*: 5 mg kvercetina rastvoreno je u 5 ml etanola, preneto u odmerni sud od 10 ml koji je dopunjen do crte deionizovanom vodom. Rastvor je koncentracije 0.5 mg/ml. 1 ml ovog rastvora je prenet u normalni sud od 10 ml i dopunjen vodom do crte, tako da je dobijen rastvor koncentracije 0.05 mg/ml. Iz ovog rastvora je pripremljena serija razblaženja pomoću koga je konstruisana kalibraciona

kriva.

- Radni rastvor Na-hidroksida ($c = 1 \text{ mol/L}$) pripremljen je odmeravanjem određene mase NaOH i rastvaranjem u dejonizovanoj vodi.
- Osnovni rastvor DPPH($c = 1.0 \cdot 10^{-3} \text{ mol/L}$) pripremljen je odmeravanjem 0,0394 g DPPH i rastvaranjem u metanolu u normalnom sudu od 100 ml. Radni rastvor, $c = 1.0 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L}$, pravljen je pre početka rada razblaživanjem osnovnog rastvora.
- Osnovni rastvor troloksa ($c = 1.0 \cdot 10^{-3} \text{ mol/L}$), pripremljen je odmeravanjem određene mase troloksa i rastvaranjem u metanolu.
- Rastvor kalijum-hloridnog pufera $\text{pH} = 1,0$ pripremljen je rastvaranjem 1,86 g KCl u 980 ml dejonizovane vode podešavanjem do $\text{pH} = 1,0$ conc. HCl i zapremine do 1L dejonizovanom vodom.
- Rastvor natrijum-acetatnog pufera $\text{pH} = 4,5$ pripremljen je rastvaranjem 54,43 g $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ u 980 ml dejonizovane vode podešavanjem do $\text{pH} = 4,5$ conc. HCl i zapremine do 1L dejonizovanom vodom.
- Radni rastvor bisulfita pripremljen je odmeravanjem 1 g $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$ i rastvaranjem u 5 ml dejonizovane vode.

Korišćeni su sertifikovani standardi za HPLC analizu.

Sve hemikalije i rastvarači koji su korišćeni bili su p.a. i HPLC čistoće nabavljeni od Merck (Darmstadt, Germany) i Sigma-Aldrich (GmbH, Sterbeim, Germany).

Svi rastvori, koji se nisu mogli pripremiti kao primarni standardni rastvori, standardizovani su poznatim metodama u cilju određivanja tačne koncentracije.

Sudovi koji su korišćeni prani su etanolnim rastvorom KOH, zatim rastvorom HCl (1:1), isprani česmenskom, destilovanom i dejonizovanom vodom. Vodeni rastvori su pripremani sa dejonizovanom vodom specifične provodljivosti $0,05 \mu\text{Scm}^{-1}$.

2.3. EKSPERIMENTALNI POSTUPCI

Uzorci za analizu predhodno su pripremani postupkom ekstrakcije ili postupkom mineralizacije u zavisnosti da li se u njima određuje sadržaj fenolnih komponenti ili sadržaj metalnih jona.

2.3.1. Postupak ekstrakcije

Bijjni materijal je samleven u blenderu. Od samlevenog i homogenizovanog uzorka izmerene su probe od po 2 g i ekstrahovane su rastvaračima koji su navedeni u

tabeli. Ekstrakcija je vršena tri puta po 15 min sa po 30, 20 i 20 ml rastvarača respektivno. Izabrani rastvarači su: etanol- HCl (99:1), etanol- voda- HCl (50:49:1), metanol- HCl (99:1), metanol- voda -HCl (50:49:1). Ekstrakcija je urađena u ultrazvučnom kupatilu. Ekstrakti su pročišćeni kroz Bihnerov levak i filter papir (plava traka) i preneseni u normalni sud od 100 ml i dopunjeni istim rastvaračem do crte. Dobijeni ekstrakt je čuvan na tamnom i hladnom mestu (Iacopini i sar., 2008; Borowska i sar., 2009; Katalinić i sar., 2010).

2.3.2. Postupak mineralizacije

Standardna procedura za pripremu uzorka za određivanje metala opisana je od strane Association of Official Analytical Chemists (AOAC) (2000). Tačno odmerena količina uzorka (2 g) je žarena 3h na temperature od 450 °C u porcelanskom lončiću. Onda je dodato 5 ml HCl (6 M). Lončić je ispran 0,1 M rastvorom HNO₃ i rastvor je prenet u normalni sud od 50 ml i dopunjeno je do crte. Radni rastvori su pripremljeni razblaživanjem osnovnog rastvora sa 0,1 M HNO₃.

2.4. UV/VIS SPEKTROFOTOMETRIJA

UV/Vis spektrofotometrija je primenjena za određivanje ukupnih fenola, ukupnih flavonoida, ukupnih antocijana, monomernih antocijana, procenta polimerne boje, radikal “skevendžer” kapaciteta i ukupne antioksidativne aktivnosti u ispitivanim uzorcima.

2.4.1. Određivanje sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja

Za određivanje sadržaja ukupnih fenola u pripremljenim uzorcima korišćena je metoda po Folin-Ciocalteu (Singleton i Rossi, 1965). Metoda se zasniva na oksidaciji fenolnih jedinjenja pomoću reagensa, odnosno rastvora Folin- Ciocalteu. Rastvor Folin-Ciocalteu sadrži smešu fosfovolframove i fosfomolibdenske kiseline. Ovaj reagens oksiduje fenolna jedinjenja, a sam se redukuje u smešu volfram-oksida i molibden-oksida.



Rastvor postaje intenzivno plave boje, čiji je intenzitet srazmeran količini fenolnih jedinjenja. Plava boja oksida je stabilna. Intenzitet boje se meri spektrofotometrijski, na talasnoj dužini $\lambda = 760$ nm.

Postupak:

U odmerni sud od 10 ml unosi se određena zapremina uzorka. Nakon toga se u odmerni sud dodaje 2.5 ml dejonizovane vode, 0.25 ml rastvora Folin-Ciocalteu i 1 ml rastvora natrijum karbonata (20 %). Sud se dopuni do crte vodom i nakon 30 min se meri apsorbanca na talasnoj dužini $\lambda = 760$ nm, u odnosu na vodu kao slepu probu. Na osnovu izmerenih apsorbanci, sa kalibracione krive standardnog rastvora galne kiseline određuje se masena koncentracija ($\mu\text{g}/\text{ml}$) polifenolnih jedinjenja korišćenjem jednačine prave:

$$A = (0,0297 \pm 0,0012) \cdot c + 0,008 \pm 0,0006, n=5, R^2 = 0,998 \quad 2.3.$$

Sadržaj polifenolnih jedinjenja u polaznom uzorku izražen kao ekvivalent galne kiseline.

2.4.2. Određivanje sadržaja ukupnih flavonoida

Flavonoidi i njihovi glikozidi imaju osobinu da sa metalima grade odgovarajuće metalne komplekse (Jia i sar., 1999). Naročito je važan kompleks sa Al^{3+} .

Koncentracija flavonoida određena je primenom AlCl_3 kao reagensa spektrofotometrijskom metodom.

Postupak:

Reakcionala smeša je pripremljena mešanjem određene zapreme uzorka, 4 ml dejonizovane vode i 0.3 ml NaNO_2 (5 %). Nakon 5 min dodat je 1.5 ml AlCl_3 (2 %), nakon 5 min još 2 ml NaOH (1 mol/L) i dejonizovana voda do 10 ml. Apsorbanca je merena na $\lambda = 510$ nm, u odnosu na dejonizovanu vodu kao slepu probu. Na osnovu izmerenih apsorbanci, sa kalibracione krive standardnog rastvora kvercetina određuje se masena koncentracija ($\mu\text{g}/\text{ml}$) flavonoida korišćenjem jednačine prave:

$$A = (0,0233 \pm 0,0008) \cdot c + 0,009 \pm 0,0002, n=5, R^2 = 0,997 \quad 2.4.$$

Sadržaj ukupnih flavonoida u polaznom uzorku izražava kao ekvivalent kvercetina.

2.4.3. Određivanje sadržaja antocijana

Sa vremenom, kao i pod uticajem različitih faktora (temperatura, kiseonik i dr.) dolazi do degradacije monomernih antocijana, ili se povezuju međusobno ili sa drugim prisutnim jedinjenjima, formirajući na taj način proizvode razgradnje. Iako količina monomernih antocijana opada, intenzitet boje se ne menja, jer u reakcijama kondenzacije nastaju obojeni kondenzovani proizvodi koji su čak i stabilniji nego monomeri (slobodni) antocijani. Zbog toga se kvantitativno određivanje ukupnih

antocijana (nedegradiranih monomera i proizvoda njihove degradacije) zasniva na osobini antocijana, da pri promeni pH sredine, reverzibilno menjaju svoju strukturu, pri čemu dolazi do promena apsorpcionog spektra. Sadržaj ukupnih antocijana određuje se "singl" metodom, po kojoj je izmerena apsorbancija rastvora antocijana pri pH 1.0, proporcionalna sadržaju ukupnih antocijana. Određivanje sadržaja monomernih antocijana izvodi se pH diferencijalnom metodom, kja se zasniva na osobini monomernih antocijana da su pri pH 1.0 u obliku oksonijum jona (crveno obojeni), dok su pri pH 4.5 antocijani u poluketalnom obliku (bezbojni) (Guisti i Wrolstad, 2003; Mitić, 2011).

Postupak:

Odmeri se određena zapremina uzorka i prenese u dva odmerna suda od 10 ml, koja su zatim dopunjena puferom pH 1.0, odnosno pH 4.5. Nakon 15 min izmeri se apsorbancija na 520 nm i 700 nm (zbog korekcije zamučenja).

Koncentracija ukupnih antocijana u uzorku (c_{uk}) izračunava se kao ekvivalent cijanidin-3-glukozida prema formuli:

$$(c_{uk}) (\mu\text{gdm}^{-3}) = (A_{uk} \times MW \times DF \times 1000) / (\epsilon \times l) \quad 2.5.$$

gde je: $A_{uk} = (A_{520} - A_{700})_{pH=1.0}$

M- 449,2 gmol^{-1} molekulska masa cijanidin-3-glukozida

DF- faktor razblaženja

ϵ - 26900 $\text{Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ molarni koeficijent apsorpcije cijanidin-3-glukozida

l- 1 cm (debljina kivete)

Koncentracija nedegradiranih- monomernih antocijana (c_{mon}) u ekstraktima izračunata je kao ekvivalent cijanidin-3-glukozida prema formuli:

$$c_{mon} (\mu\text{gdm}^{-3}) = (A_{mon} \times MW \times DF \times 1000) / (\epsilon \times l) \quad 2.6$$

gde je: A_{mon} - apsorbanca uzorka, koja je izračunata prema formuli:

$$A_{mon} = (A_{520} - A_{700})_{pH\ 1.0} - (A_{520} - A_{700})_{pH\ 4.5} \quad 2.7$$

2.4.4. Određivanje procента polimerne boje

Polimerna boja u ekstraktima određuje se primenom metode izbeljivanja bisulfitnim rastvorom kome podležu samo monomerni antocijani, koja je opisana od strane Guisti i Wrolstada (2003).

Postupak:

Neophodno je pripremiti dva rastvora.

Rastvor I: Određena zapremina uzorka prenese se u odmerni sud od 10 ml i

dopuni puferom pH 1,0 do crte. Apsorbanca ne treba da bude veća od 0.8- 1.0. Nakon 15 min meri se apsorbanca na 420 nm, 520 nm i 700 nm. Intenzitet boje izračunava se na osnovu podataka dobijenih za rastvor I:

$$\text{Intenzitet boje} = (A_{420} - A_{700}) + (A_{520} - A_{700}) \quad 2.8.$$

Rastvor II: Od rastvora I pipetom se odmeri 4.665 ml u drugi odmerni sud i dopuni sa 0.335 ml rastvora bisulfita. Nakon 15 minia meri se apsorbanca na 420 nm, 520 nm i 700 nm.

Polimerna boja izračunava se na osnovu podataka dobijenih za rastvor II:

$$\text{Polimerna boja} = (A_{420} - A_{700}) + (A_{520} - A_{700}) \quad 2.9.$$

Procenat polimerne boje dobija se deljenjem jednačine (2. 8.) sa jednačinom (2. 9.) i množenjem sa 100:

$$\text{Procenat polimerne boje (\%)} = (\text{polimerna boja} / \text{intenzitet boje}) \cdot 100 \quad 2.10.$$

2.4.5. Određivanje antioksidativne aktivnosti

Kapacitet hvatanja slobodnih radikala ispitivanih uzoraka određen je merenjem njihove sposobnosti da neutrališe DPPH[·] radikale (DPPH test) (Brand- Williams i sar., 1995). Metoda se zasniva na praćenju transformacije ljubičasto obojenog, stabilnog, azotcentriranog DPPH[·] radikala (2, 2-difenil-1-pikrilhidrazil) u redukovano žuto obojenu formu DPPH-H (Hayder i sar., 2004).

Postupak:

Radna proba je pripremljena mešanjem određenih zapremina ekstrakta, metanola i rastvora DPPH[·]. Reakcionala smeša je ostavljena na tamnom mestu, na sobnoj temperaturi, 30 min. Apsorbanca je očitana na 515 nm, a kao referentni rastvor je korišćen metanol. Sve probe su rađene u tri ponavljanja.

Kapacitet hvatanja slobodnih radikala (Radical Scavenging Capacity- RSC) računat je na osnovu sledeće jednačine:

$$\% \text{RSC} = (1 - A_{\text{uzorka}} / A_{\text{slepa proba}}) \cdot 100 \quad 2.11.$$

Na osnovu izmerenih razlika apsorbanci $\Delta A = A_{\text{slepe probe}} - A_{\text{uzorka}}$, sa kalibracione krive standardnog rastvora kvercetina određena je ukupna antioksidativna aktivnost u ekvivalentima kvercetina ($\mu\text{g}/\text{ml}$) korišćenjem jednačine prave:

$$A = 3.6189 \gamma_Q + 3.3174, R = 0.9848 \quad 2.12.$$

Ukupna antioksidativna aktivnost u polaznom uzorku izražena kao ekvivalent kvercetina (QE).

2.5. HPLC METODA

Tečna hromatografija sa UV/Vis i fluorescentnim detektorom visoke rezolucije (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) primenjena je za razdvajanje i kvantifikaciju fenolnih jedinjenja u pripremljenim uzorcima. Izvršen je razvoj HPLC metode pri čemu su sledeći parametri pokazali najbolje rezultate. Hromatografsko razdvajanje izvršeno je na Eclipse XDB-C18 koloni (4.6 mm x 150 mm) uz sistem rastvarača: A- ($\text{H}_2\text{O}+5\% \text{ HCOOH}$) i B- (80 % ACN+ 5 % HCOOH+ H_2O). Razdvajanje komponenti je izvedeno primenom sledećeg linearног gradijenta: 0- 10 min, 0 % B; 10- 28 min, 0- 25 % B; 28- 30 min, 25 % B; 30- 35 min, 25-50 % B, 35- 40 min, 50- 80 % B. Protok mobilne faze je iznosio 0.8 ml/ min. Injektovano je 5 μl rastvora uzorka, automatski, korišćenjem autosamplera-a. Kolona je termostatirana na temperaturi od 30 °C (Mitić i sar., 2012).

Fenolne komponente prisutne u uzorcima su identifikovane poređenjem njihovih retencionih vremena i spektara sa retencionim vremenom i spektrom standarda za svaku komponentu. Kvantitativno određivanje komponenata je izvršeno metodom spoljašnjeg standarda. Korišćeni su standardi: delfnidin-3-*O*-glukozida, cijanidin-3-*O*-glukozida, cijanidin-3-*O*-rutinozida, peonidin-3-*O*-glukozida, petunidin-3-*O*-glukozida, petunidin-3-*O*-glukozida acilovanog, delfnidin-3-*O*-glukozid-*p*-kumaroil, hlorogenske, kafene kiseline, kvercetina, miricetina. Za svaki pojedinačni standard je pripremljen osnovni rastvor standarda masene koncentracije 1.0 mg/ ml, rastvaranjem u 10 % rastvoru metanola. Konstruisana je kalibraciona kriva, za svaki standard, na osnovu dobijenih površina u zavisnosti od masene koncentracije standarda. Iz dobijene jednačine linearne zavisnosti izračunate su masene koncentracije komponenti u uzorcima. Za komponente u uzorcima za koje nije bio dostupan standard, kvantifikacija je izvršena na osnovu kalibracione krive, po strukturi odgovarajućeg standarda. Sve analize su izvršene u tri ponavljanja.

2.6. ODREĐIVANJE SADRŽAJA METALA AAS METODOM

AAS metoda je korišćena za kvalitativno i kvantitativno određivanje sadržaja metala u biljnem materijalu i ekstraktima ispitivanih biljaka. Korišćen je aparat Varian SpectraAA 10 sa šupljom katodnom lampom i pozadinskom korekcijom. Smeša

vazduha i acetilena korišćena je za određivanje svih elemenata. Kalibracioni interval, talasna dužina, detekcioni limit dati su u tabeli 2.6.1.

Tabela 2.6.1. Analitičke karakteristike određivanja metala AAS metodom

Element	Opseg linearnosti (mg/l)	LOD (mg/l)	Talasna dužina (nm)	Slit	Korelacioni koeficijent
Fe	0.00-10.00	0.015	248.3	0.2	0.9987
Cu	0.00-1.00	0.007	213.9	1.0	0.9999
Zn	0.00-5.00	0.021	324.8	0.5	0.9990
Pb	0.00-1.00	0.002	217.0	1.0	0.9993
Cd	0.00-1.00	0.003	228.8	0.5	0.9991
Mn	0.00-2.00	0.005	279.5	0.2	0.9987
Ni	0.00-1.00	0.002	232.0	0.2	0.9994

Rastvori i reagensi:

- Multi standard– ACCUSTANDARD ultra pure
- acetilen (99.999 % čistoće)
- Protok gasa za hlađenje– 0,2 L/min
- Protok raspršivača gasa– 0,4 L/min

Za svaki element čiji sadržaj je bilo potrebno odrediti, formirana je metoda tako što je izvršen izbor odgovarajućih parametara metode i odabirom više talasnih dužina. U cilju konstruisanja kalibracione prave koja daje zavisnost relativnog intenziteta signala na odgovarajućoj talasnoj dužini u funkciji od koncentracije analita, snimana je slepa proba (dejonizovana voda) i dva rastvora standarda različitim koncentracijama dobijenih razblaživanjem osnovnog, referentnog standarda. Za svako merenje rađene su po tri probe. Izbor najbolje, pa samim tim i radne talasne dužine vršen je na osnovu relativnog intenziteta signala kao mere osetljivosti metode, grešaka na odzivu standarda kao i na osnovu veličine interferiranja prisutnih elemenata u ovakvom realnom uzorku.

2.7. ODREĐIVANJE ANTIMIKROBNE AKTIVNOSTI

In vitro antimikrobna aktivnost etanolnog ekstrakta je ispitana na panelu laboratorijskih kontrolnih sojeva koji pripadaju kolekciji American Type Culture Collection Maryland, USA (osim jednog, koji pripada kulturama National Collection Type Cultures, vidi dole). Antibakterijska aktivnost je ocenjena u odnosu na dve

Gram-pozitivne i tri Gram- negativne bakterije. Gram-pozitivne bakterije koje su korišćene bile su: *Bacillus subtilis* ATCC 6633 i *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. Gram-negativne bakterije korišćene u eksperimentu bile su: *Escherichia coli* ATCC 8739, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 i *Salmonella abony* NCTC 6017. Antigljivična aktivnost je ispitana u odnosu na dva organizma *Aspergillus niger* ATCC 16404 i *Candida albicans* ATCC 10231.

Za određivanje antimikrobne aktivnosti ekstrakata korišćena je disk- difuziona metoda, prema NCCLS, 1997. Inokulirani bakterijski i gljivični sojevi pripremljeni su od bujona kulture koja je stajala preko noći i suspenzije su podešene na standardu (zamućenost od 0.5 McFarland). 100 µl suspenzije koja sadrži $1,0 \times 10^8$ CFU/ml bakterija i $1,0 \times 10^4$ CFU/ml gljivičnih spora zasejane su na Mueller-Hinton agaru (MHA, Torlak) i Sabouraud dekstroznom agaru (SDA, Torlak), respektivno, u sterilizovanim Petri šoljama (prečnika 90 mm). Diskovi (prečnika 9 mm, Macherey-Nagel, Düren) (Nemačka) impregnirani su sa 20 µl i 50 µl ekstrakata (konc. 30 mg/ml) i stavljeni na inokulirani agar. Negativni kontrolni uzorci su pripremljeni korišćenjem istog rastvarača (etanol). Tetraciklin (30 µg, Torlak) i nistatin (30 µg, Torlak) korišćeni su kao pozitivni referentni standardi za određivanje osetljivosti sojeva svake isprtitivane vrste mikroorganizma. Inokulirane ploče čuvane su 2 h na 4 °C i inkubirane na 37 °C (24 h) za bakterijske sojeve i na 28 °C (48 h) za gljivične sojeve. Antimikrobna aktivnost je ocenjena merenjem zone inhibicije za isprtitivane mikroorganizme. Svaka proba ovog eksperimenta ponovljena je tri puta (Dorđević, 2011).

2.8. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Svi eksperimenti su izvršeni u najmanje tri ponavljanja, a rezultati predstavljeni kao srednja vrednost. Određena je standardna devijacija. Za pojedine parametre je urađena analiza varijanse (ANOVA), Duncan-ov test višestrukih intervala, kao i koeficijent korelacije između parametara.

Analyze korelacija među određivanim parametrima. Korišćeni statistički alat je bila PCA. PCA omogućuje određivanje grupe podataka, smanjujući njenu veličinu, i čuvajući većinu korisnih statističkih informacija koje su prisutne u polaznim podacima. Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost± standardna devijacija (SD) za trostruka

određivanja. PCA se koristi za utvrđivanje zavisnosti između promenljivih veličina. Analiza je izvođena koristeći statistički paket na desktop kompjuteru (Statistica 8.0, StatSoft, Inc, Tulsa, OK, USA).

PCA analiza je vršena takođe i primenom programa za statističku analizu Microsoft Excel® (XLSTAT 2013.4.07, Addinsoft SARL, Paris, France).

3. REZULTATI I DISKUSIJA

3.1. HEMIJSKA ANALIZA I ANTOOKSIDATIVNA AKTIVNOST EKSTRAKATA LATICA BULKE (*Papaver rhoeas L.*)

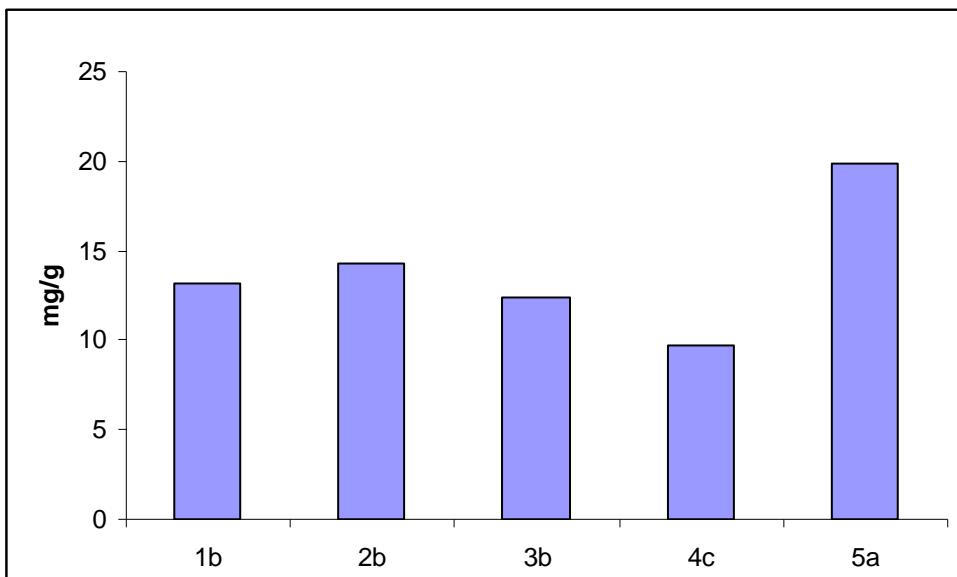
Ekstrakti bulke, nekada veoma često, korišćeni su za lečenje velikog broja bolesti, uključujući zapaljenja, diureju, poremećaje sna, kašlja, za smanjenje bola, kao i za smanjenje znakova apstinencijalne krize kod opijumske zavisnosti. Takođe je poznato da bulka (*Papaver rhoeas L.*) pokazuje sedativno, narkotično i analgetsko dejstvo (Zargari, 1994). Hemijskim ispitivanjima dobijeni su podaci o fitohemijskom sastavu koji pokazuju da su glavni sastojci rodanin i rodaninska kiselina. Pregledom literature dosli smo do saznanja da su detaljno ispitivani alkaloidi ove biljke, a da nema podataka o ispitivanju fenolnog sastava. Jedino su Middleton i saradnici ispitivali antioksidativnu aktivnosti metanolnog, heksanskog i dihlormetanskog ekstrakta *Papaver rhoeas L.* i utvrdili su da oni ne pokazuju pozitivnu reakciju sa DPPH radikalima (Middleton i sar., 2005). Ispitivanja hemijskog sastava ove biljke sa područja Jugoistočne Srbije do sada nisu rađena.

3.1.1. SPEKTROFOTOMETRIJSKO ODREĐIVANJE SADRŽAJA FENOLNIH JEDINJENJA I ANTOOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI EKSTRAKATA LATICA BULKE (*Papaver rhoeas L.*)

Za određivanje sadržaja polifenolnih jedinjenja i antioksidativne aktivnosti latice bulke korišćene su sveže latice cveta bulke prikupljane na područjima u okolini Niša. Ekstrakcija je vršena prema proceduri 2. 3. 1.

Kako količina polifenola u ekstraktu, kao i sastav ekstrakata u velikoj meri zavisi od tipa i polarnosti rastvarača (Moller i sar., 1999), to su za ekstrakciju uzeti rastvarači voda, etanol, metanol kako apsolutni, tako i u smeši, 50 % etanol, 50 % metanol.

Za kvantitativno određivanje ukupnih fenola u ekstraktima bulke primenjena je Folinova metoda, a kao standard primenjena je galna kiselina (Sungleton i Roos, 1965). Na osnovu linearne zavisnosti između apsorbance rastvora i koncentracije ukupnih fenola određen je sadržaj ukupnih fenola u pripremljenim ekstraktima latica bulke, a dobijeni rezultati izraženi su u mg ekvivalenta galne kiseline (GAE) po gramu svežih latica i prikazani na Histogramu 3.1.1 i u Tabeli 3.1.1.



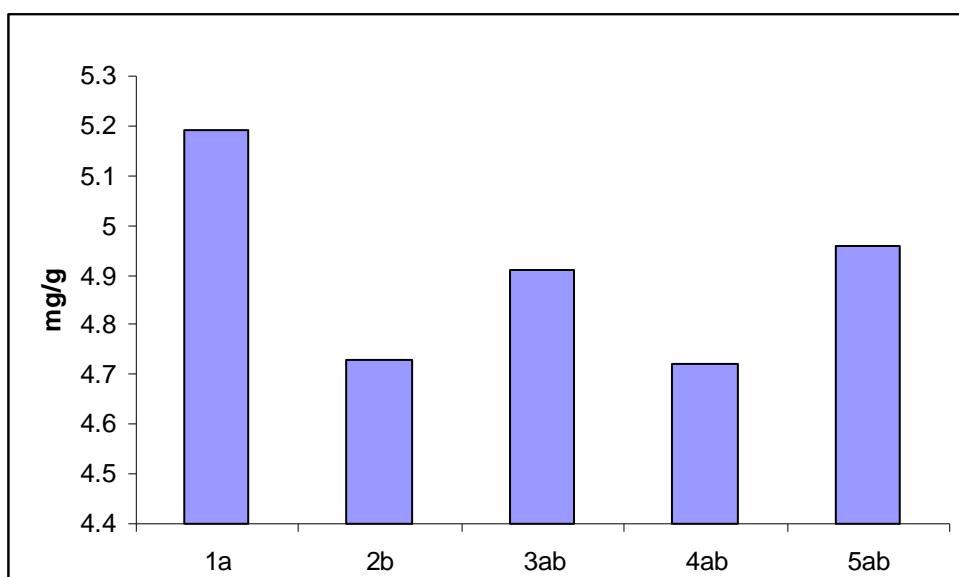
Histogram 3.1.1. Sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima latica bulke u različitim rastvaračima: 1. etanol; 2. etanol 50%; 3. metanol; 4. metanol 50%; 5. voda. Ekstrakti označeni različitim slovima se signifikantno razlikuju kada se koristi Duncan-ov test višestrukih intervala ($p<0,05$).

Sadržaj ukupnih fenola u ispitivanim ekstraktima se kreće od 9.73 do 19.91 GAE mg/g svežeg uzorka. Na osnovu prikazanih rezultata može se zaključiti da najveći sadržaj fenolnih jedinjenja ima vodeni ekstrakt bulke, a najmanji ima ekstrakt metanola 50 %. Ostali ekstrakti imaju približno isti sadržaj ukupnih fenola. Razlika u pogledu ukupnog sadržaja fenolnih jedinjenja u zavisnosti od ekstrakcionog sredstva je posledica različite polarnosti korišćenih rastvarača i njihovih smeša, koji selektivno ekstrahuju pojedina fenolna jedinjenja.

Sadržaj fenola određuje farmakološko svojstvo biljke i kod lekovitog bilja koncentracija fenola je od 0.23 do 2.85 mg GAE/g svežeg uzorka, dok je koncentracija fenola kod kulinarskih biljki od 0.26 do 17.51 mg GAE/g svežeg uzorka (Zheng, 2001). Na osnovu literaturnih podataka najveći sadržaj fenolnih jedinjenja ima kulinarska biljka iz roda *Origanum*, oko 20 mg GAE/g svežeg uzorka (Lagouri i Boskou, 1996). Na osnovu toga možemo da zaključimo da bulka pripada grupi biljaka sa relativno visokim sadržajem fenolnih jedinjenja. Sadržaj ukupnih polifenolnih jedinjenja izmeren metodom po Folin-Ciocalteu ne pruža kompletну sliku o kvantitetu i kvalitetu polifenolnih jedinjenja u ekstraktima, zbog mogućeg prisustva

interferirajućih jedinjenja (šećeri, aromatični amini, sumpor-dioksid, vitamin C, organske kiseline, Fe (II) i ostale supstance koje nisu polifenolnog porekla) koja utiču na nerealno povećanje rezultata (Singelton i sar., 1999). Zbog toga je neophodna kompletna kvalitativna i kvantitativna identifikacija polifenolnih jedinjenja primenom HPLC metode.

S obzirom da su latice bulke intenzivno crveno obojene, to je ukazivalo na visok sadržaj antocijana. Za određivanje sadržaja monomernih antocijana primenjena je pH- diferencijalna metoda (Guisti i Wrolstad, 2001). Rezultati su izraženi u mg cijanidin-3-glukozida kao ekvivalenta na gram svežeg uzorka i prikazani su na Histogramu 3.1.2. i u Tabeli 3.1.1.

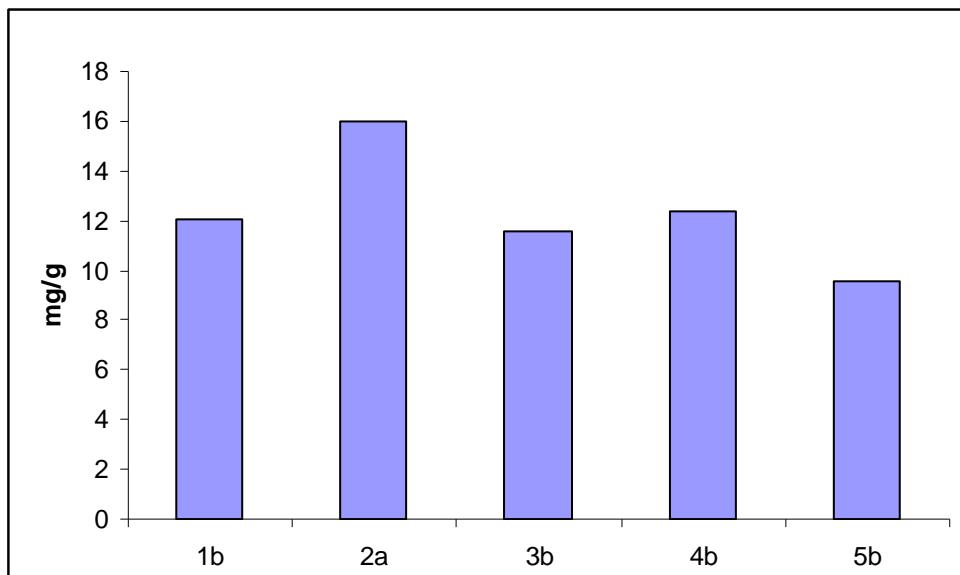


Histogram 3.1.2. Sadržaj monomernih antocijana u ekstraktima latica bulke u rastvaračima različite polarnosti: 1.ethanol; 2.ethanol 50%; 3.metanol; 4.metanol 50%; 5.voda. Ekstrakti označeni različitim slovima se signifikantno razlikuju kada se koristi Duncan-ov test višestrukih intervala ($p<0,05$).

Sadržaj monomernih antocijana u ispitivanim ekstraktima kreće se od 4.73 do 5.19 mg/g svežeg uzorka.

Sadržaj antocijana u pojedinim vrstama svežeg voća je: jabuka 0.12 mg/g, trešnja 1.22 mg/g, kupina 2.45 mg/g, borovnica 3.65 mg/g, crna ribizla 4.76 mg/g i aronija 14.80 mg/g (Wu i Gu, 2004), (Wu i Beecher, 2006). Ekstrakti bulke imaju veći sadržaj antocijana u odnosu prikazane vrste voća, a manji od aronije.

Takođe je određen sadržaj polimernih antocijana na osnovu njihove osobine da pri tretiranju kalijum bisulfitom ne podležu obezbojavanju. Rezultati su prikazani u obliku procenta polimerne boje na Histogramu 3.1.3 i u Tabeli 3.1.1.

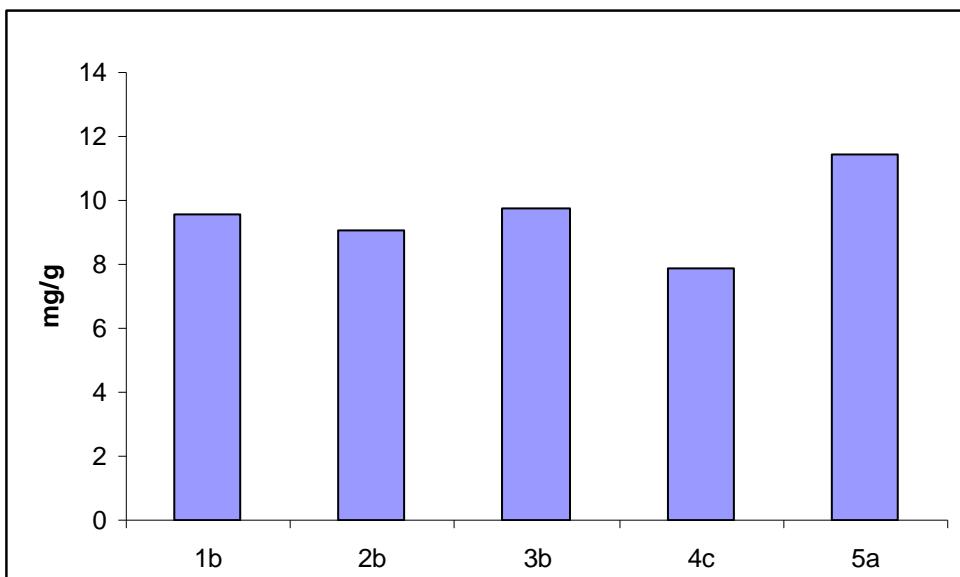


Histogram 3.1.3. Sadržaj polimernih antocijana u ekstraktima laticama bulke u različitim rastvaračima: 1. etanol; 2. etanol 50 %; 3. metanol; 4. metanol 50 %; 5. voda. Ekstrakti označeni različitim slovima se signifikantno razlikuju kada se koristi Duncan-ov test višestrukih intervala ($p < 0.05$).

Sadržaj polimernih antocijana u ispitivanim ekstraktima je relativno nizak i kreće se od 9.54 do 16.02% što je u skladu sa činjenicom da je određivanje vršeno u sveže pripremljenim ekstraktima i da se procenat polimerne boje povećava tokom vremena. Sadržaj polimernih antocijana je najveći u ekstraktu etanola 50 %, a najmanji u vodenom ekstraktu, što je verovatno posledica njihove različite rastvorljivosti u ovim rastvaračima, s obzirom na činjenicu da su ekstrakti pripremani na identičan način. Sadržaj polimernih antocijana je signifikantno sličan, sa izuzetkom ekstrakata etanola 50 %. Sadržaj antocijana u laticama bulke analizirali su Matysik i Benesz u različitim fazama razvoja cveta. Rastvorljivost antocijana u etanolu, etilacetatu, izopropanol-voda-sirćetna kiselina(65:32:3) je pokazala različite Rf vrednosti na 465 nm. Selektivno razdvajanje antocijana je postignuto razdvajanjem na tankoslojnoj hromatografiji sa adsorbensom od silicijuma Si 60 (Matysik i Benesz, 1991).

Za određivanje ukupnih flavonoida u ispitivanim ekstraktima primenjena je osobina flavonoida da sa aluminijum hloridom gradi kompleks koji ima maksimum

apsorbancije na karakterističnoj talasnoj dužini, koja neznatno varira u zavisnosti od rastvarača (Jia i sar., 1999). Sadržaj ukupnih flavonoida po ovoj metodi izražava se u obliku kvercetin ekvivalenta (QE) na gram sveže biljke. Rezultati određivanja ukupnih flavonoida navedenom metodom prikazani su na Histogramu 3.1.4 i u Tabeli 3.1.1.



Histogram 3.1.4. Sadržaj ukupnih flavonoida u ekstraktima latica bulke u različitim rastvaračima: 1. etanol; 2. etanol 50 %; 3. metanol; 4. metanol 50 %; 5. voda. Ekstrakti označeni različitim slovima se signifikantno razlikuju kada se koristi Duncan-ov test višestrukih intervala ($p < 0.05$).

Sadržaj ukupnih flavonoida u ispitivanim ekstraktima je veoma značajan. Kreće se od 7.90 do 11.45 mg/g svežeg uzorka. Uočeno je da voden rastvor sadrži nešto veće količine ukupnih flavonoida u odnosu na ostale ekstrakte. Sadržaj flavonoida je signifikantno različit u ekstraktima metanola i metanol 50 % u odnosu na ostale rastvore koji su signifikantno slični. Na osnovu brojnih studija poznato je da na sadržaj polifenolnih jedinjenja utiču genotip, mesto i tehnika gajenja, kao i razlike u zrelosti biljke (Orhan i sar., 2007). Takođe, spoljašnji faktori poput svetlosti, temperature, prisustva hranljivih materija u zemljištu i nadmorska visina, mogu uticati na fenilpropanoidni metabolizam biljke (Dixon i Paiva, 1995).

Prisustvo značajnih količina ukupnih fenola, flavonoida i antocijana bitno doprinosi ukupnom farmakološkom i antioksidativnom delovanju bulke i njenih ekstrakata.

Antioksidativna aktivnost ekstrakata latica bulke određena je primenom DPPH metode (Yen i Duh, 2001).

Zbog nesparenog elektrona DPPH• apsorbuje svetlost u vidljivom delu spektra, na talasnoj dužini od 517 nm (jarko ljubičasta boja). Kada se ovaj elektron spari u prisustvu antioksidanata, apsorbanca na ovoj talasnoj dužini opada. Ova promena se može pratiti i spektrofotometrijski, direktnim praćenjem promene koncentracije DPPH•. Transformacija boje iz ljubičaste u žutu, i sniženje signala je stehiometrijski proporcionalna broju elektrona koji su predati.

U Tabeli 3.1.1. dat je uporedni pregled rezultata dobijenih analizom ekstrakata latica bulke i njihove antioksidativne aktivnosti. Antioksidativna aktivnost je izražena u procentima i u mg kvercetin-ekvivalenta (QE) po gramu svežih latica.

Tabela 3.1.1. Uporedni pregled rezultata dobijenih analizom sadržaja fenolnih jedinjenja i antioksidativne aktivnosti u ekstraktima latice bulke.

Ekstrakti bulke	Ukupni fenoli ^a	Sadržaj monomernih antocijana ^b	Polimerni antocijani %	Ukupni flavonoidi ^c	RSC%	RSC ^d
Etanol	13.13±1.55 ^{b2}	5.19±0.08 ^a	12.05±3.0 ^b	9.53±0.02 ^b	84.91±0.94 ^{bc}	2.54±0.74
Etanol 50%	14.31±0.26 ^b	4.73±0.19 ^b	16.02±2.25 ^a	9.07±0.07 ^b	86.1±1.58 ^{ba}	22.87±0.55
Metanol	12.40±0.91 ^b	4.91±0.26 ^{ab}	11.60±1.62 ^b	9.72±0.07 ^b	83.11±1.16 ^c	2.04±0.37
Metanol 50 %	9.73±0.44 ^c	4.72±0.18 ^{ab}	12.35±0.53 ^b	7.90±0.02 ^c	81.47±1.22 ^c	1.59±0.81
Voda	19.91±0.44 ^a	4.96±0.17 ^{ab}	9.54±2.53 ^b	11.45±0.0 ^a	89.71±0.85 ^a	23.86±0.06

^aIzraženo u mg GAE/ g svežeg uzorka

^bIzraženo u mg cijanidin-3-O-glukozid/g svežeg uzorka

^{c,d}Izraženo u mg QE/g svežeg uzorka

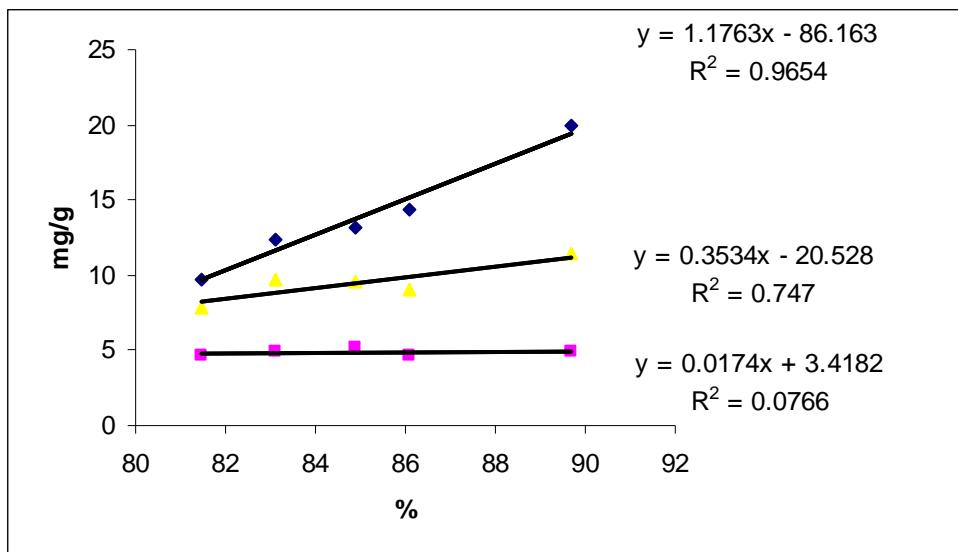
¹srednja vrednost ± SD (n=3); ²brojevi označeni različitim slovima u koloni se značajno razlikuju kada se koristi Duncan-ov test višestrukih intervala, (p<0,05).

Smatra se da fenolna jedinjenja imaju najveću ulogu u biološkoj aktivnosti ekstrakata i njihovo prisustvo doprinosi antioksidativnu aktivnost biljke. Od fenolnih jedinjenja veliki broj studija ukazuje da je uloga flavonoida od posebnog značaja.

Od strukturalnih elemenata koji su značajni za antiradikalnu aktivnost flavonoida, hidroksilne grupe imaju najveći značaj (Cotelle, 2001; Yang i sar., 2001; Heim i sar., 2002; Amić i sar., 2003). Utvrđeno je da položaj hidroksilnih grupa ima mnogo veći uticaj na aktivnost nego njihov broj. Hidroksilne grupe utiču na antioksidativnu aktivnost kinetičkim ili termodinamičkim svojstvima: kao izvori vodonikovih atoma potrebnih za neutralizaciju slobodnih radikala i mogućnošću povećanja stabilnosti radikala flavonoida otpuštanjem još jednog vodonikovog atoma

iz druge hidroksilne grupe. Različita fenolna jedinjenja imaju različite odgovore u antiradikalnim testovima. Razlike u antioksidativnoj aktivnosti polifenola mogu biti posledica: različitog sadržaja i različite reaktivnosti prisutnih jedinjenja (Espinoza i sar., 2009). Pored toga, efikasnost antioksidanata u značajnoj meri zavisi od oksidacionih uslova sistema u kojem se ispituje antiradikalna aktivnost. Različiti antiradikalni testovi pružaju različite mogućnosti antioksidantima da ispolje svoju aktivnost. Najznačajniji elementi za antioksidativno delovanje flavonoida su: broj hidroksilnih grupa u B prstenu, *o*-dihidroksilne grupe B prstena, 2, 3-dvostruka veza piranskog prstena u konjugaciji sa keto-grupom na C4-atomu (zbog delokalizacije) i hidroksilne grupe na položajima C3 i C5 kao „hvatači“ slobodnih radikala, i njihova sposobnost stvaranja vodoničnih veza sa keto grupom.

Analizirana je korelacija sadržaja pojedinih fenolnih jedinjenja i antioksidativne aktivnosti ispitivanih ekstrakata. Na Slici 3.1.1. prikazana je korelacija sadržaja ukupnih fenola, antocijana i flavonoida i antioksidativne aktivnosti ispitivanih ekstrakata. Visok stepen korelacije između sadržaja ukupnih fenola i antioksidativne aktivnosti ($R^2= 0.965$) ukazuje da antioksidativna svojstva ispitivanih ekstrakata potiču od prisustva fenolnih jedinjenja u ekstraktima. Visok stepen korelacije utvrđen je i između sadržaja flavonoida i antioksidativne aktivnosti ($R^2= 0.747$). S obzirom na ujednačen sadržaj antocijana u ispitivanim ekstraktima nije utvrđena korelacija sa antioksidativnom aktivnošću. Rezultati korelace analize ukazuju na to da antiradikalna aktivnost nije obavezno u korelaciji sa sadržajem fenolnih jedinjenja pa je zbog toga prilikom razmatranja antioksidativnog potencijala uzorka neophodno analiziranje rezultata i sadržaja svih prisutnih aktivnih komponenata i antiradikalne aktivnosti.



Slika 3.1.1. Korelacija sadržaja ukupnih (♦)fenola, (■)antocijana, (●)ukupnih flavonoida i antioksidativne aktivnosti u ekstraktima latice bulke.

Sadržaji vitamina C, fenolnih kiselina i flavonoida u odgovarajućim frakcijama ekstrakata borovnice pokazali su visoku linearnu korelaciju sa antioksidativnom aktivnošću na superoksid anjon radikale. Sadržaj vitamina C bio je u najboljoj korelaciji sa antioksidativnom aktivnošću ($r^2 = 0.810$), dok je koeficijent korelacije za flavonoide iznosio 0.707, a za fenolne kiseline 0.608 (Tumbas i sar, 2010). Takođe, utvrđena je i visoka korelacija sadržaja vitamina C, fenolnih kiselina i flavonoida u odgovarajućim frakcijama ekstrakata šipka sa antioksidativnom aktivnošću na superoksid anjon i hidroksil radikale.

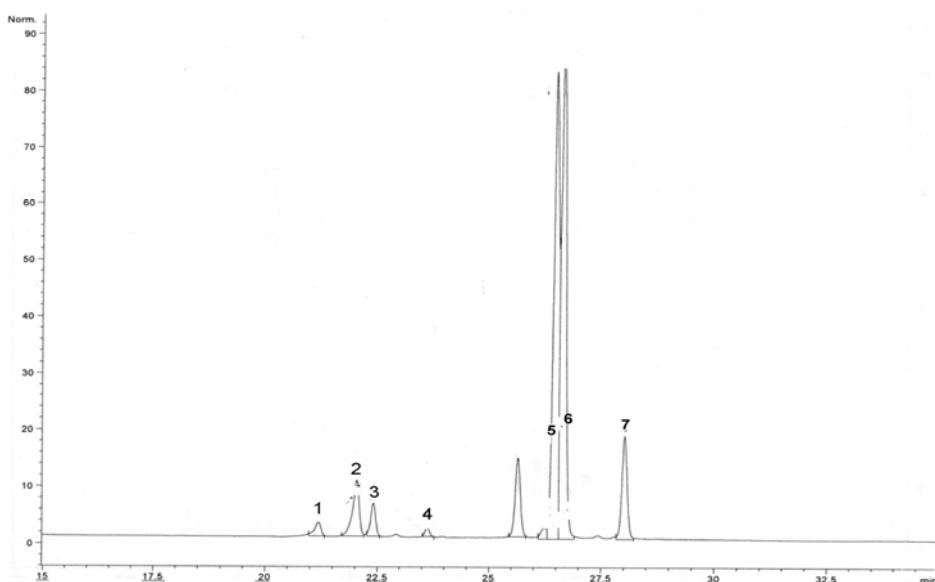
Najveći koeficijenti korelacija određeni su između sadržaja vitamina C i antioksidativne aktivnosti na hidroksil radikale (0.998) i superoksid anjon radikale (0.745). Antiradikalna aktivnost acetonskih i metanolnih ekstrakata čaja od brusnice i mešavine čaja od brusnice na stabilne DPPH radikale u najvećoj je korelaciji sa sadržajem vitamina C ($r^2 = 0.89$) i antocijana ($r^2 = 0.71$) u ekstraktima ispitanih čajeva (Tumbas i sar, 2006).

U literaturi nema puno podataka o sadržaju polifenolnih jedinjenja u ekstraktima bulke. Uglavnom je ispitivan sadržaj alkaloida s obzirom na njena narkotična svojstva. Middleton i saradnici ispitivali su antioksidativnu aktivnost metanolnog, heksanskog i dihlormetanskog ekstrakata *Alnus glutinosa*, *Fraxinus excelsior* i *Papaver rhoeas* L. Utvrdili su da svi ekstrakti *Papaver rhoeas* L. ne pokazuju antioksidativnu aktivnost sa DPPH radikalima. Metanolni i dihlormetanski

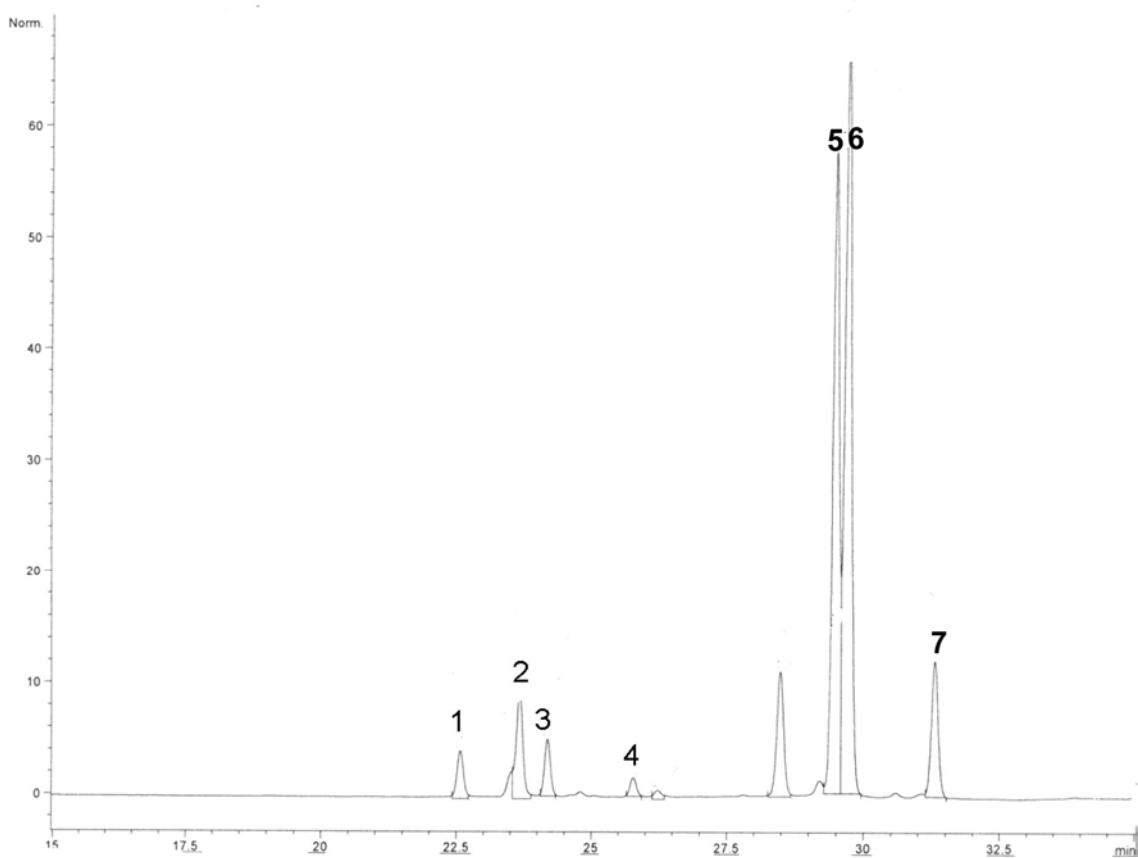
ekstrakti *Papaver rhoes L.* pokazuju najveću toksičnost od svih ispitanih biljaka (Middleton i sar. 2005).

3.1.2. HPLC analiza ekstrakata latica bulke (*Papavear rhoes L.*)

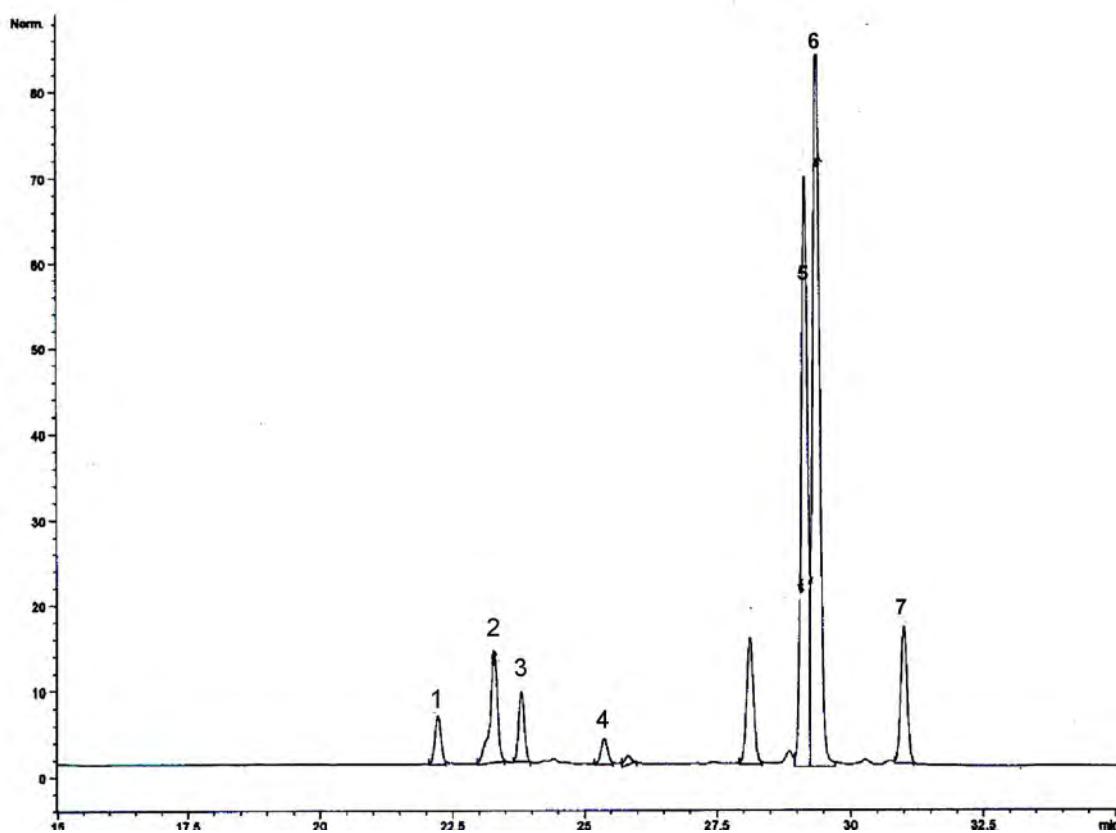
Sadržaj ukupnih polifenolnih jedinjenja izmeren metodom po Folin-Ciocalteu ne pruža kompletну sliku o kvantitetu i kvalitetu polifenolnih jedinjenja u ekstraktima ispitivanih biljnih vrsta, zbog mogućeg prisustva interferirajućih jedinjenja (šećeri, aromatični amini, sumpor- dioksid, vitamin C, organske kiseline, Fe (II) i ostale supstance koje nisu polifenolnog porekla), a koje reaguju sa Folin-ovim reagensom i utiču na nerealno povećanje rezultata (Singelton i sar., 1999). Zbog toga se kompletna kvalitativna i kvantitativna identifikacija polifenolnih jedinjenja, u ekstraktima ispitivanih biljnih vrsta, može dobiti primenom HPLC metode. Polifenoli apsorbuju u vidljivom i ultraljubičastom delu spektra, pa se detekcija ovih jedinjenja u analizi HPLC- om temelji na merenju na merenju apsorpcije ultraljubičastog i vidljivog zračenja, pomoću UV/Vis detektora. Dokazivanje ovih grupa jedinjenja moguće je samo jednoj talasnoj dužini. Antocijani imaju tipičnu apsorpcionu traku na $\lambda = 520$ nm. Na slikama 3.1.1. do 3.1.4 prikazani su hromatogrami ekstrakata latica bulke.



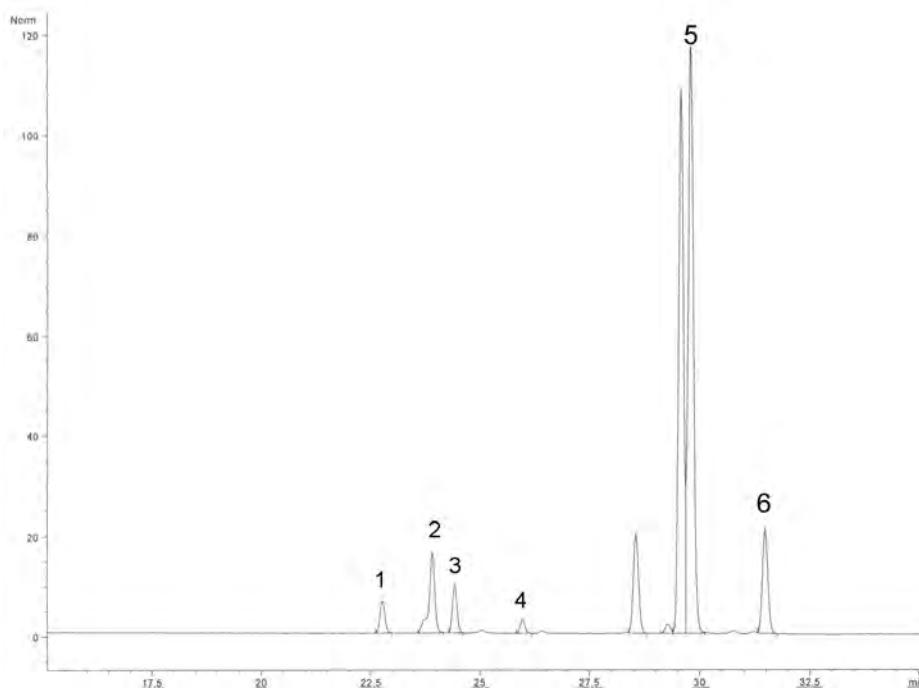
Slika 3.1.1. HPLC analiza ekstrakta bulke (*Papaver rhoes L.*) u rastvoru etanola:
delfnidin-3-O-glukozid (1), cijanidin-3-O-glukozid (2), cijanidin-3-O-rutinozid (3),
peonidin-3-O-glukozid (4), petunidin-3-O-glukozid (5), petunidin-3-O-glukozid
acilovani (6), delfnidin-3-O-glukozid-p-kumaroil (7).



Slika 3.1.2. HPLC analiza ekstrakta bulke (*Papaver rhoeas L.*) u rastvoru etanola 50 %: delfnidin-3-O-glukozid (1), cijanidin-3-O-glukozid (2), cijanidin-3-O-rutinozid (3), peonidin-3-O-glukozid (4), petunidin-3-O-glukozid (5), petunidin-3-O-glukozid acilovani (6), delfnidin-3-O-glukozid-p-kumaroil (7).



Slika 3.1.3. HPLC analiza metanolnog ekstrakta bulke (*Papaver rhoeas L.*):
delfinidin-3-O-glukozid (1), cijanidin-3-O-glukozid (2), cijanidin-3-O-rutinozid (3),
peonidin-3-O-glukozid (4), petunidin-3-O-glukozid (5), petunidin-3-O-glukozid
acilovani (6), delfinidin-3-O-glukozid-p-kumarooil (7).



Slika 3.1.4. HPLC analiza metanolnog ekstrakta bulke (*Papaver rhoes L.*):

delfinidin-3-O-glukozid (1), *cijanidin-3-O-glukozid* (2), *cijanidin-3-O-rutinozid* (3), *peonidin-3-O-glukozid* (4), *petunidin-3-O-glukozid acilovani* (5), *delfinidin-3-O-glukozid-p-kumarooil* (6).

U tabeli 3.1.2. prikazan je sadržaj antocijana u ispitivanim ekstraktima koji je određen HPLC metodom.

Tabela 3.1.2. HPLC analiza sadržaja antocijana u ekstraktima latice bulke

Antocijani	Metanol 100 %	Metanol 50%	Etanol 100 %	Etanol 50%	Voda
<i>delfinidin glukozid</i>	1.66±0.02	1.42±0.02	1.39±0.07	1.14±0.03	1.20±0.02
<i>cijanidin glukozid</i>	4.15±0.4	4.04±0.04	0.33±0.01	2.67±0.30	0.57±0.01
<i>petunidin glukozid</i>	2.26±0.03	/	/	1.21±0.04	0.34±0.01
<i>peonidin glukozid</i>	0.65±0.05	0.81±0.02	3.53±0.06	0.42±0.01	/
<i>cijanidin glukozid acilovani</i>	5.55±0.35	4.07±0.60	4.59±0.32	3.11±0.09	0.25±0.01
<i>petunidin-glukozid acilovani</i>	26.90±0.95	18.45	/	15.08±0.70	0.38±0.01
<i>delfinidin glukozid-p-kumarooil</i>	5.56±0.06	4.194	/	3.22±0.05	/

U ispitivanim ekstraktima latica bulke identifikovani su i kvantifikovani glukozidi četri antocijana: delfnidina, cijanidina, petunidina, peonidina i delfnidina i njihovi derivati.

Najveći sadržaj antocijana je prisutan u metanolnom ekstraktu. Potom slede ekstrakti metanola 50 %, etanola 50 % i etanola. Najmanji sadržaj antocijana prisutan je u vodenom ekstraktu.

Na osnovu literaturnog pretraživanja ne postoje podaci o HPLC analizi ekstrakata roda *Papaveraceae*.

3.1.3. Antimikrobnna aktivnost ekstrakata bulke

Dokazano je da se u uslovima stresa (prekomerno UV zračenje, oštećenje tkiva, infekcija) u biljkama indukuje sinteza polifenolnih jedinjenja (Dixon i Paiva, 1995). Polifenolna jedinjenja se mogu akumulirati pre i posle napada mikroorganizama. Pre infekcije su u formi toksina, dok su postinfekcijska polifenolna jedinjenja u formi tzv. fitoaleksina. Njihovo antioksidativno i antimikrobnno delovanje u biljkama pokazuje sličnost sa njihovom potencijalnom ulogom u namirnicama i čovekovom organizmu (Viskelis i sar., 2009).

Polifenolna jedinjenja su intenzivno proučavana sa aspekta upotrebe u prehrabenoj industriji i medicini kao antimikrobnii agensi. Oni su pokazali veoma efikasno inhibitorno dejstvo na rast patogenih bakterija *Salmonella* i *Staphylococcus* (Rao i Snyder, 2010).

Antimikrobnna aktivnost etanolnog ekstrakta bulke je data u Tabeli 3.1.3.

Tabela 3.1.3. Antimikrobnna aktivnost etanolnog ekstrakata bulke (*Papaver rhoeas L.*)

Test mikroorganizmi	Ekstrakt (10 mg/ml)		Referentni antibiotik	Referentni antimikotik	Kontrolna proba
	20 µl	50 µl	Tetraciklin (30 µg)	Nistatin (30 µg)	Etanol 96 %
<i>Salmonella abony</i> NCTC 6017	/	/	/	/	/
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	17±0.2	24±0.15	30±0.25	/	/
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	11±0.2	20±0.2	19±0.2	/	/
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	/	/	36±0.3	/	/
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	12±0.15	18±0.1	34±0.3	/	/
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	13±0.1	26±0.25	/	20±0.2	/
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404	/	/	/	19±0.2	/

Kao što se i očekivalo kontrolna proba (etanol) nije imala inhibitorni efekat na bilo koji testiranu bakteriju i gljivicu. Za određivanje antimikrobne aktivnosti ekstrakata korišćena je disk-difuziona metoda (NCCLS, 1997). Tetraciklin (30 µg, Torlak) i nistatin (30 µg, Torlak) korišćeni su kao pozitivni referentni standardi za određivanje osetljivosti sojeva svake ispitivane vrste mikroorganizama. Antimikrobna aktivnost je ocenjena merenjem zone inhibicije za ispitivane mikroorganizme.

Rezultati mikrobioloških ispitivanja pokazuju da etanolni ekstrakt bulke pokazuje antibakterijsko dejstvo na sve ispitivane bakterije sa izuzetkom bakterija *Salmonella abony* i *Bacillus subtilis*. Takođe pokazuje i fungicidno dejstvo na gljivicu *Candida albicans*. Middleton i saradnici ispitivali su antimikrobnu aktivnost metanolnog, heksanskog i dihlormetanskog ekstrakata biljki, *Alnus glutinosa*, *Fraxinus excelsior* i *Papaver rhoes L.* Utvrđili su da svi ekstrakti *Papaver rhoes* ne pokazuju antimikrobno delovanje na ispitivane mikroorganizme (Middleton i sar., 2005).

3.2. HEMIJSKA ANALIZA I ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST EKSTRAKATA PLODA GLOGA (*Crataegus oxyacantha L.*)

Poznato je da se glog (*Crataegus oxyacantha L.*) u fitoterapiji koristi za lečenje mnogih oboljenja vezanih za srce i krvne sudove: reguliše krvni pritisak, povećava snagu srčanog mišića, protiv arterioskleroze i angine pektoris. Osim toga, glog utiče na smirivanje nervnog sistema, a koristi se i kao blagi diuretik (Zargari, 1994). Preporučena dnevna doza gloga je 160- 900 mg standardizovanog ekstrakta, što odgovara količini od 3.5-19.8 mg flavonoida.

Primarni nosioci srčano aktivnog dejstva su bioflavonoidi gloga. Najvažniji flavonoidi nađeni u glogu su: kvercetin, hiperozid, viteksin, viteksin-4'-L-ramnozid, viteksin-4'-L-ramno-D-glukozid, viteksin-7-di-D-glukozid, rutin, kvercetin-3-ramno-galaktozid. Glog sadrži još i oligomer procianidin, triterpenske kiseline i aromatične amine (Leung i Foster 2003.).

Opsežna klinička ispitivanja preparata na bazi ekstrakata gloga pokazala su delovanje njihovih sastojaka u slučajevima ranog stadijuma hroničnog popuštanja srca.

Ekstrakt gloga poboljšava prokrvljenost srčanog mišića, povećava njegovu snagu i provodljivost, a deluje i kao antioksidans (Bahorun i sar., 1994).

Kardiotonično delovanje ekstrakta gloga potiče u najvećoj meri od flavonoida u prvom redu hiperozida i viteksina (Ammon i sar., 1994). Zbog toga određivanje sadržaja hiperozida i drugih flavonoida u ekstraktima, ima veliki značaj za ocenu kvaliteta ekstrakta i preparata.

U literaturi ima podataka o metodama identifikacije tankoslojnom hromatografijom i UV-spektrofotometrijom, kao i određivanju sadržaja flavonoida u lišću i cvetu gloga. (*C. oxyacantha*) (Deutsches, 1994). Literaturni podaci pokazuju da lišće i cvetovi gloga sadrže flavonoide (rutin, hiperozid, viteksin, viteksin-2"-O-ramnozid i acetilviteksin-2"-O-ramnozid) od 0.1 do 2 %, oligomerne proantocijanidine (1- 3 %), fenolne kiseline (hlorogenska i kafena kiselina), triterpenske kiseline (oleanolne i ursolne kiseline), organske kiseline i sterole (WHO, 2002).

Uopšte, flavonoidi, predstavljeni procijanidinima i flavonom i flavonolskim tipom flavonoida smatraju se glavnom grupom aktivnih sastojaka u ekstraktima gloga i u mnogim nacionalnim i internacionalnim farmakopejama ove grupe jedinjenja se koriste za standardizaciju i kontrolu kvaliteta ekstrakata (Chang, 2002; Kim, 2000).

Literaturnim pregledom smo utvrdili da su mnogi autori proučavali bioaktivne komponente gloga sa različitih aspekata.

Tadić i saradnici su utvrdili da ekstrakti osušenih koštica gloga (*Crataegus monogyna* Jacq., *Crataegus oxyacantha* L.; *Crataegus laevigata* (Poiret)) imaju značajno anti-inflamatorno, gastroprotektičko i antimikrobno delovanje (Tadić i sar. 2008). Sadržaj ukupnih fenola u etanolnom ekstraktu osušenog ploda gloga (*Crataegus oxyacantha* L.) je 35.4 ± 2.48 mg GAE/g suve mase (Tadić, 2008).

Tumbas i saradnici su utvrdili da acetonski ekstrakti osušenih koštica gloga (*Crataegus oxyacantha* L.) pokazuju antiradikalnu i antiproliferativnu aktivnost. Sadržaj polifenola u plodu gloga (*Crataegus oxyacantha* L.) je 306 ± 12.65 mg ekvivalenta hlorogenske kiseline/g suvog ostatka koji je dobijen ekstrakcijom sa 80 % rastvorom acetona (aceton- voda: 80/20,v/v (%)) (Tumbas i sar., 2010).

Mihajlović i saradnici su u ekstraktima cveta i lista gloga, primenom tankoslojne hromatografije identifikovali flavonoide viteksin i hiperozid (Mihajlović i sar., 2006).

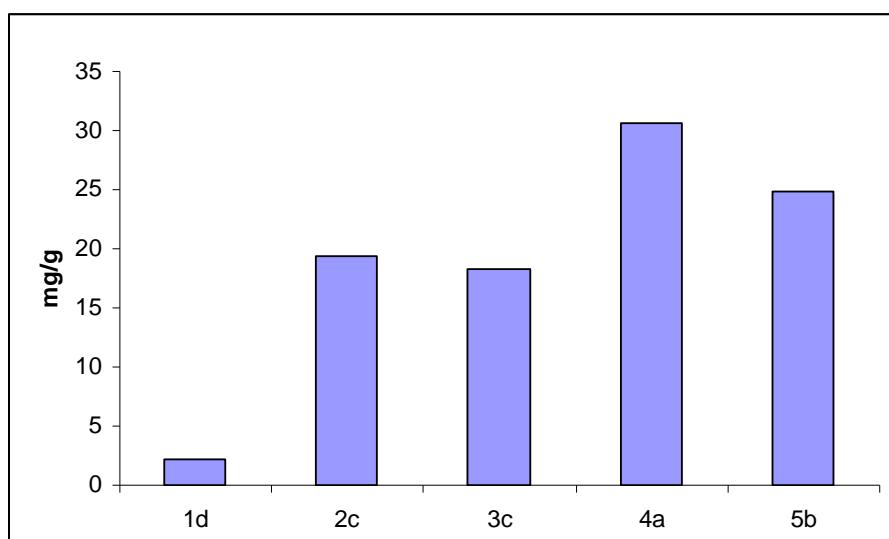
Gudžić i saradnici su analizom ekstrakata cvetova belog gloga (*Crateagus monogyna* Jacq.) koji su pripremljeni sa 0,1 M HCl, utvrdili da sadrži kvercetin (Gudžić i sar., 2000).

Bernatoniene i saradnici su analizirali sadržaj ukupnih fenola i flavonoida u vodenim i etanolnim ((v/v), 1:4) ekstraktima suvih plodova *C. monogyna*, i dobili vrednost za ukupne fenole 24.4 ± 0.9 g GAE/ 100 g odnosno za flavonoide 1.29 ± 0.07 g QE/100 g za etanolne ekstrakte što je vrlo slično našim rezultatima (Bernatoniene i sar., 2008). Oni su analizirali antioksidativnu aktivnost DPPH i ABTS metodom, vodenih i etanolnih ekstrakata plodova gloga.

3.2.1. SPEKTROFOTOMETRIJSKO ODREĐIVANJE SADRŽAJA FENOLNIH JEDINJENJA I ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI EKSTRAKATA PLODA GLOGA (*Crateagus oxyacantha* L.)

Za određivanje sadržaja polifenolnih jedinjenja i antioksidativne aktivnosti gloga korišćeni su sveži plodovi gloga. Ekstrakcija je vršena prema proceduri 2.3.1. u različitim rastvaračima: voda, etanol, metanol, etanol 50 % i metanol 50 %.

Na histogramima 3.2.1., 3.2.2 i 3.2.3 prikazani su rezultati spektrofotometrijskog određivanja ukupnih fenola, antocijana i flavonoida i antioksidativne aktivnosti ekstrakata svežeg ploda gloga.



Histogram 3.2.1. Sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima ploda gloga u različitim rastvaračima: 1. etanol; 2. etanol 50 %; 3. metanol; 4. metanol 50 %; 5. voda. Ekstrakti označeni različitim slovima se signifikantno razlikuju kada se koristi Duncan-ov test višestrukih intervala ($p < 0.05$).

Analizom dobijenih rezultata može se uočiti da se sadržaj ukupnih fenola u analiziranim ekstraktima ploda gloga kreće od 2.21 do 30.63 mg GAE/g svežeg uzorka. Tadić i saradnici (2008) su odredili da etanolni ekstrakt suvog ploda gloga sadrži 35.4 ± 2.48 mg GAE/g suvog uzorka. Taj rezultat je sličan rezultatu koji smo mi dobili za etanolni rastvor, a razlika je posledica činjenice da je u našem radu sadržaj izražen na g svežeg ploda. Međutim, naši rezultati su znatno manji od rezultata koje su dobili Tumbas i saradnici (2010). Ovako visoke vrednosti za sadržaj ukupnih fenola je iz razloga što je ekstrakcija vršena 80 % acetonom i rezultat je izražen na gram suvog ostatka nakon ekstrakcije i izražen je u ekvivalentima hlorogenske kiseline.

Ercisli je ispitivao sadržaj polifenolnih jedinjenja u bobicama iz familije Rosaceae i saopštio da najveći sadržaj polifenola (96 mg/g) ima šipak. Ova vrednost je mnogo veća od ostalih vrednosti objavljenih za drugo bobičasto voće bogato vitaminom C, kao što su ribizle (3- 4 mg/g), američka borovnica (2.7– 3.5 mg/g), jagoda (1.6– 2.9 mg/g) i malina (2.7 – 3.0 mg/g). Naši rezultati pokazuju da glog ima veći sadržaj ukupnih fenola u odnosu na prikazane vrste voća, a manje od šipka.

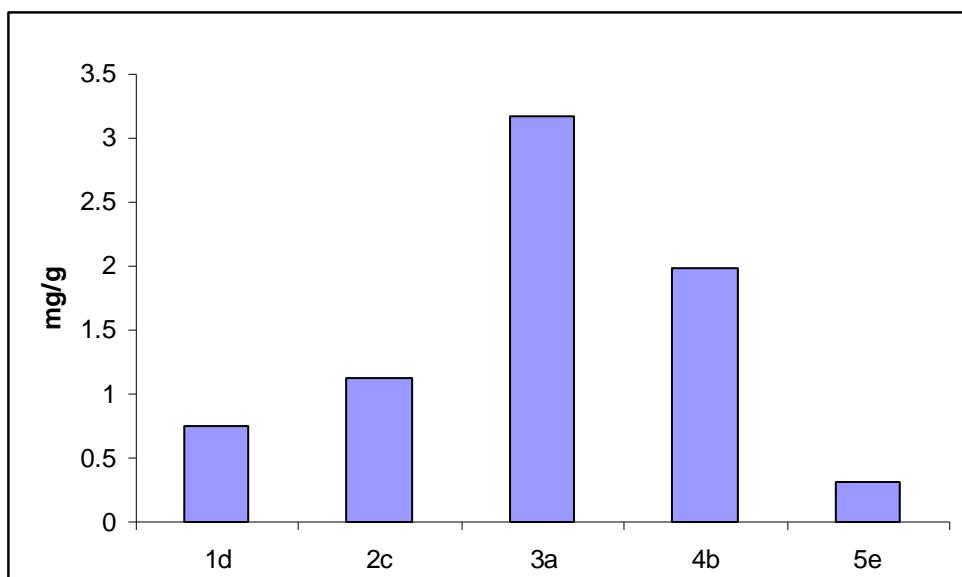
Bernatoniene i saradnici su analizirali sadržaj ukupnih fenola u vodenometanolnim ((v/v)(1:4)) ekstraktima suvih plodova (*C. monogyna*) i dobili vrednost 24.4 ± 0.9 g GAE/100 g ekstrakta što je vrlo slično našim rezultatima (Bernatoniene i sar., 2008).

Sadržaj ukupnih polifenolnih jedinjenja izmeren metodom po Folin- Ciocalteu ne pruža kompletну sliku o kvantitetu i kvalitetu polifenolnih jedinjenja u ekstraktima, zbog mogućeg prisustva interferirajućih jedinjenja (šećeri, aromatični amini, sumpor-dioksid, vitamin C, organske kiseline, Fe (II) i ostale supstance koje nisu polifenolnog porekla) koja utiču na nerealno povećanje rezultata (Singelton i sar., 1999). Zbog toga je kompletna kvalitativna i kvantitativna identifikacija polifenolnih jedinjenja, kao i vitamina C u frakcijama ekstrakata bobica izvršena primenom HPLC metode.

U novije vreme su izvedene studije koje su pokazale antioksidativno, antiinflamatorno, gastroprotективno i antimikrobnog dejstvo ekstrakata gloga. U ekstraktima cvetova, lišća i ploda gloga identifikovani su flavonoidi, oligomerni procijanidini, triterpenske kiseline, organske kiseline, steroli i kardioaktivni amini. Međutim, flavonoidi i oligomerni procijanidi od svih organskih jedinjenja prisutnih u glogu, imaju najveću ulogu u biološkoj aktivnosti preparata gloga. Shodno tome,

ekstrakti gloga se standardizuju prema prisustvu ovih jedinjenja (2.2 % flavonoida i 18.75 % oligomernih procijanida) ((Chang i sar., 2002; Svedström i sar., 2002)).

S obzirom da su zreli plodovi gloga intenzivno crveno obojeni, to smo u daljem radu pristupili određivanju sadržaja antocijana. Za određivanje sadržaja monomernih antocijana primenjena je pH-diferencijalna metoda (Guisti i Wrolstad, 2001). Rezultati su izraženi u mg cijanidin-3-glukozida kao ekvivalenta na gram svežeg uzorka i prikazani su na Histogramu 3.2.2. i u Tabeli 3.2.1.

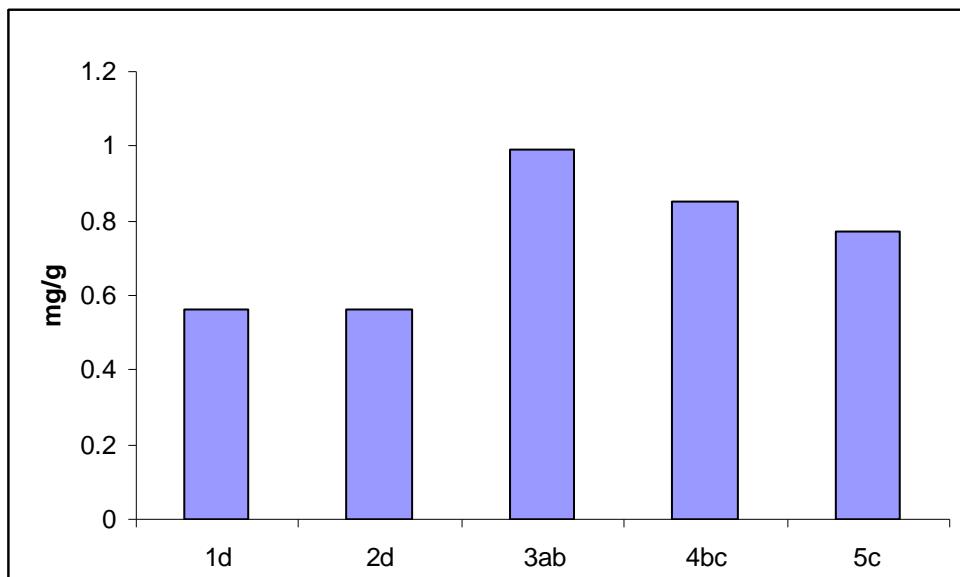


Histogram 3.2.2. Sadržaj monomernih antocijana u ekstraktima ploda gloga u različitim rastvaračima: 1. etanol; 2. etanol 50 %; 3. metanol; 4. metanol 50 %; 5. voda. Ekstrakti označeni različitim slovima se signifikantno razlikuju kada se koristi Duncan-ov test višestrukih intervala ($p<0.05$).

Sadržaj monomernih antocijana u ispitivanim ekstraktima kreće se od 0.32 do 3.17 mg/g svežeg uzorka, pri čemu se može uočiti pravilnost da metanolni ekstrakti sadrže nešto veće količine monomernih antocijana u odnosu na ostale ekstrakte.

U poređenju sa drugim voćem, bobičasto voće je poznato po visokom sadržaju antocijana, glikozida antocijanidina (pelargonidina, cijanidina, delfinidina, peonidina, petunidina i malvidina), antocijana od kojih potiče plava, ljubičasta i crvena boja voća i cveća (Beattiie i Crozier, 2005).

Sadržaj ukupnih flavonoida je određena po metodi Jia i izražava se u obliku kvercetin ekvivalenta. Rezultati određivanja ukupnih flavonoida navedenom metodom prikazani su na Histogramu 3.2.3. i u Tabeli 3.2.1.



Histogram 3.2.3. Sadržaj ukupnih flavonoida u ekstraktima ploda gloga u različitim rastvaračima: 1. etanol; 2. etanol 50 %; 3. metanol; 4. metanol 50 %; 5. voda. Ekstrakti označeni različitim slovima se signifikantno razlikuju kada se koristi Duncanov test višestrukih intervala ($p<0.05$).

Sadržaj ukupnih flavonoida u ispitivanim ekstraktima gloga je veoma nizak i znatno je niži od sadržaja antocijana. Kreće se od 0.56 do 0.99 mg QE/g svežeg uzorka. Uočeno je da metanolni i vodenii ekstrakti sadrže nešto veće količine ukupnih flavonoida u odnosu na etanolne ekstrakte.

Etanolni ekstrakti imali su sadržaj ukupnih flavonoida od 0.14 do 0.18 mg rutin ekvivalenta/g suvog ostatka (Tadić, 2008.). Ove vrednosti za ukupne flavonoide su niže u odnosu na naše rezultate. To može biti posledica uticaja spoljašnjih faktora na sintezu flavonoida, različitim postupkom ekstrakcije i različitim ekvivalentom koji prikazuje sadržaj flavonoida u uzorku.

Najzastupljeniji aglikoni flavonola u bobičastom voću su miricetin, kvercetin i kampferol. Pored toga, jestive bobice mogu da sadrže i znatnu količinu monomera flavan-3-ola, (+)-catehina i (-)-epikatehina, kao i dimere, trimere i polimere proantocijanidina. Koncentracija polimera je uglavnom veća od monomera i dimera (Beattie i Crozier, 2005).

Antioksidativna aktivnost je izražena u procentima i u mg kvercetin-ekvivalenta, tj. rastvora kvercetina koji pokazuje identičnu aktivnost kao ispitivani ekstrakt. Rezultati

uporedne analize ekstrakata gloga i njihove antioksidativne aktivnosti prikazani su u Tabeli 3.2.1.

Tabela 3.2.1. Uporedni pregled rezultata dobijenih analizom sadržaja fenolnih jedinjenja i antioksidativne aktivnosti u ekstraktima ploda gloga.

Ekstrakti gloga	Ukupni fenoli ^a	Sadržaj monomernih antocijana ^b	Ukupni flavonoidi ^c	RSC%	RSC ^d
Etanol	2.12±0.12 ^{1d2}	0.75±0.01 ^d	0.56±0.02 ^d	60.61±0.02 ^c	3.53±0.74
Etanol 50%	19.32±0.49 ^c	1.12±0.01 ^c	0.55±0.02 ^d	88.60±0.58 ^a	5.22±0.55
Metanol	18.21±0.51 ^c	3.17±0.03 ^a	0.99±0.04 ^{ab}	89.56±0.16 ^a	5.28±0.30
Metanol 50%	30.63±2.56 ^a	1.98±0.03 ^b	0.85±0.03 ^{bc}	89.89±0.22 ^a	5.30±0.81
Voda	24.89±0.67 ^b	0.32±0.06 ^e	0.76±0.05 ^c	75.95±0.85 ^b	4.46±0.64

^aIzraženo u mg GAE/g svežeg uzorka,

^bIzraženo u mg cijanidin-3-O-glukozid/g svežeg uzorka,

^{c,d}Izraženo u mg QE/g svežeg uzorka,

¹Srednja vrednost± SD (n= 3); ²brojevi označeni različitim slovima u koloni se značajno razlikuju kada se koristi Duncan-ov test višestrukih intervala, (p< 0.05).

Ispitivani ekstrakti pokazuju veliku antioksidativnu aktivnost koja se kreće od 60.61 % u vodenom ekstraktu do 89.54 % u metanolnom ekstraktu.

Nakon određivanja antioksidativne aktivnosti 4 vrste bobičastog voća metodama FRAP, Folin-Ciocalteu, TEAC, DPPH, ORAC, merenjem hemiluminescencije (TRSC metoda) i fotohemiluminescencije (ACW i ACL metode) proizvoda oksidacije, Balogh i sar. (2010) utvrdili su da je ukupna ocena redosleda aktivnosti sledeća: jagode< crvene ribizle< maline< crne ribizle.

3.2.2. Antimikrobnna aktivnost ekstrakata ploda gloga

Antimikrobnna aktivnost etanolnih ekstrakata gloga je data u Tabeli 3.2.2 Kao što se i očekivalo kontrolna proba (etanol) nije imala inhibitorni efekat na bilo koju testiranu bakteriju i gljivicu.

Tabela 3.2.2. Antimikrobnna aktivnost etanolnih ekstrakata gloga

Test mikroorganizam	Ekstrakt (10 mg/ ml)		Referentni antibiotik	Referentni antimikotik	Kontrolna proba
	20 µl	50 µl			
<i>Salmonella abony</i> NCTC 6017	12.0±0.2	21.0±0.15	28.0±0.25	/	/
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	12.0±0.2	22.0±0.15	30.0±0.25	/	/
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	14.0±0.2	27.0±0.2	19.0±0.2	/	/
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	/	/	36.0±0.3	/	/
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	/	/	34.0±0.3	/	/
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	13.0±0.1	20.0±0.25	/	20.0±0.2	/
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404	/	/	/	19.0±0.2	/

Etanolni ekstrakti gloga pokazuju antimikrobnu aktivnost na sve testirane mikroorganizme izuzev *Bacillus subtilis* i *Staphylococcus aureus* i gljivice *Aspergillus niger*.

Tumbas i saradnici su testirali antimikrobnu aktivnost etanolnog ekstrakta bobica gloga. Pokazano je da u odnosu na standardni antibiotik streptomycin, ekstrakt proizvodi umereno baktericidno dejstvo, posebno protiv Gram- pozitivnih bakterija *M. flavus*, *B. subtilis* i *L. monocitogenes* (80.0, 62.2 i 60.7 %, respektivno).

Polifenolna jedinjenja, zbog delimične hidrofobnosti, vezuju se za površinu ćelijske membrane mikroorganizama izazivajući na taj način promenu njene propustljivosti. Tako se omogućava penetracija manjih molekula polifenolnih jedinjenja u ćeliju i dalji poremećaj metabolizma ćelije. Joni gvožđa su limitirajući nutrijent za bakterijsku infekciju. Kvercetin, najzastupljenije polifenolno jedinjenje u brusnici, pokazuje izraženiju sposobnost vezivanja Fe^{2+} jona pri pH vrednostima od 5 do 7.4 od poznatih helatora kao što je ferizon. Sposobnost kvercetina da vezuje jone

gvožđa pri pH vrednosti 7.4 ukazuje na mehanizam kojim flavonoidi, kao što su antocijani, ispoljavaju antimikrobnو delovanje i pri neutralnim pH vrednostima (Lacombe i sar, 2010).

3.3. HEMIJSKA ANALIZA I ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST EKSTRAKATA PLODA TRNJINE (*Prunus spinosa L.*)

Trnjina se u fitoterapiji koristi za lečenje različitih oblika kašla. Deluje kao blago laksativno sredstvo, diuretik, spasmolitik i antiinflamatorni agens, deluje antiseptično (zbog sadržaja tanina), pomaže kod dijareje i zapaljenja sluzokože organa za varenje.

Hemijski sastav cveta trnjine je ispitana u pogledu polifenolnih jedinjenja. Neki od flavonoida izolovanih iz cveta trnjine su: kempferol, kvercetin, kaempferol-3-O- α -L-arabinofuranozid, kvercetin 3-O- α -L-arabinofuranozid, kvercetin-3-O- α -D-ksilopiranozid, kempferol-3-O- α -L-arabinofuranozid-7-O- α -L-ramnopiranozid, tanin, 2 % organske kiseline i voda (Panizo, 1956; Sakar i sar., 1992, 1993).

Koštice trnjine su otrovne jer sadrže toksični glikozid amigdalin koji sadrži cijanovodonik.

Kvantitativna ispitivanja su pokazala da je sadržaj flavonoida u cvetovima populacije trnjine u Poljskoj značajan- oko 2.7% u obliku aglikona i 3.8% u obliku glikozida (Olszewska i sar., 2001).

Ispitivanja u populaciji ove biljke u Rumuniji pokazala su da ima 1.2 % flavonoida u obliku aglikona (Tamas, 1985).

Osim flavonoida, potvrđeno je da cvetovi trnjine sadrže protoantocijanidine tipa A (Kolodzie i sar., 1991) i fenolne kiseline (Olszewska, 2000).

Ispitivanja sprovedena u Odeljenju za farmakognosiju Medicinskog fakulteta u Lođu, potvrdila su prisustvo kempferola, kvercetina i njihovih heterozida u cvetovima i lišću trnjine.

U cvetovima, flavonoidi su većinom prisutni u obliku monoglikozida, uglavnom kempferol i kvercetin 3-O-arabinozid. U lišću ima mnogo glikozida, uglavnom kempferola 3,7-O-diramnozida (Olszewska, 2000). Struktura ovih jedinjenja potvrđena je hemijskim i instrumentalnim metodama (UV, IR, H- NMR, C- NMR, MS).

Ispitivanjem sadržaja flavonoida u cvetovima populacije trnjine u Rumuniji utvrđeno je da 1.16 % od ukupnih flavonoidnih aglikona predstavlja kvercetin. Prema literaturi, cvetovi i lišće trnjine sadrže kompleks flavonoida, derivata flavonola:

kempferola, kvercetina i njihovih glikozida sa arabinozom, ramnozom i ksilozom (Horhammer i sar., 1957).

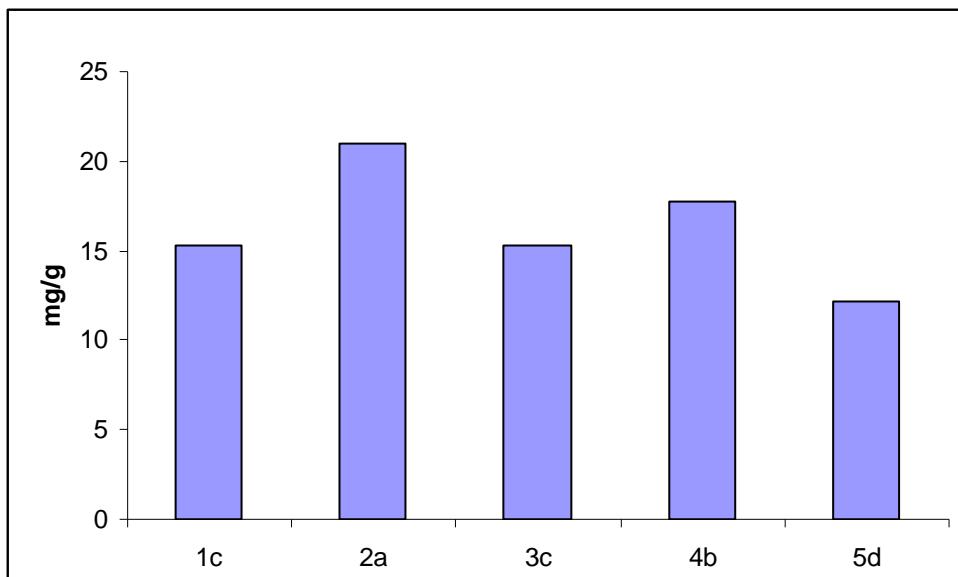
U ekstraktima trnjine (*Prunus spinosa* L.) određen je sadržaj polifenolnih jedinjenja i ukupni antioksidacioni kapacitet. Sadržaj polifenola u plodu trnjine (*Prunus spinosa* L.) kreće se od 546.56 do 858.75 GAE/kg suvog ostatka koji je dobijen ekstrakcijom sa 80 % rastvora etanola (etanol-voda: 80/20,v/v(%)). V.D.(Uzelac i sar., 2007).

Fraternale i saradnici su odredili sadržaj antocijana i antioksidativnu aktivnost ploda trnjine. Rezultati ove studije ukazuju da tri najzastupljenija antocijanina u voćnom soku *P. spinosa*: cijanidin-3-rutinozid, peonidin-3-rutinozid i cijanidin-3-glukozid verovatno imaju važnu ulogu u njegovim antioksidacionim karakteristikama. Pored toga, su odredili da je sadržaj polifenola 83.5 ± 2.5 mg GAE/g suvog ostatka (Fraternale i sar., 2009).

3.3.1. SPEKTROFOTOMETRIJSKO ODREĐIVANJE SADRŽAJA FENOLNIH JEDINJENJA I ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI EKSTRAKATA PLODA TRNJINE (*Prunus spinosa* L.)

Izolovanje polifenolnih jedinjenja iz svežeg ploda trnjine izvršeno je ekstrakcijom. Analizirani su ekstrakti svežeg ploda trnjine: etanolni, etanolni 50 %, metanolni, metanol 50 % i vodeni sa ciljem da se odredi uticaj polarnosti rastvarača na količinu ekstrahovanih fenolnih jedinjenja. Ekstrakcija je vršena prema proceduri 2.3.1

Kvantitativno određen sadržaj ukupnih fenola u pripremljenim ekstraktima trnjine prikazan je na Histogramu 3.3.1. i u Tabeli 3.3.1.



Histogram 3.3.1. Sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima ploda trnjine različitim rastvaračima: 1. etanol; 2. etanol 50 %; 3. metanol; 4. metanol 50 %; 5. voda. Ekstrakti označeni različitim slovima se signifikantno razlikuju kada se koristi Duncanov test višestrukih intervala ($p < 0.05$).

Sadržaj ukupnih fenola kreće se od 12.17 do 20.94 mg GAE/g svežeg uzorka. Na osnovu prikazanih rezultata može se zaključiti da najveći sadržaj fenolnih jedinjenja ima ekstrakt etanola 50 %, a najmanji sadržaj ima vodeni ekstrakt. Ostali ekstrakti imaju približno iste sadržaje ukupnih fenola koji su izraženi u mg GAE na gram svežeg uzorka.

Uzelac i saradnici su odredili da je sadržaj polifenola u plodu trnjine (*Prunus spinosa* L.) od 0.55 do 0.858 mg GAE/g svežeg ploda (Uzelac i sar., 2007). Ovo su znatno manje vrednosti od sadržaja ukupnih fenola u našem ispitivanju iz razloga što je korišćen kao rastvarač 80 % etanol i zato što je primenjen drugačiji postupak ekstrakcije.

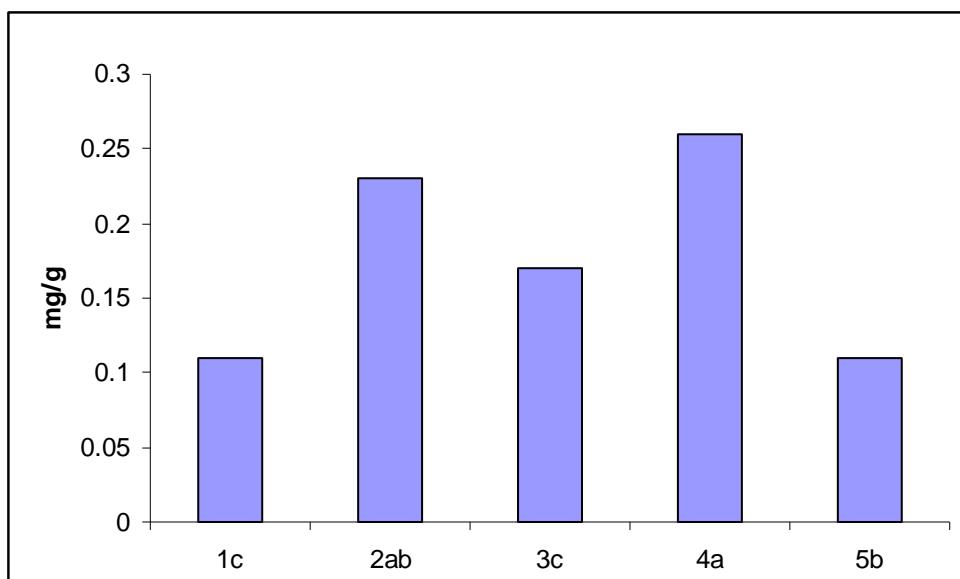
Fraternale i saradnici su odredili u svojoj studiji da je sadržaj ukupnih fenola u trnjini (*Prunus spinosa* L.) 83.5 ± 2.5 mg GAE/g suve materije (Fraternale i sar., 2009), što je znatno više od naših vrednosti. U ovoj studiji je analiziran osušeni materijal trnjine, a u našoj su ekstrahovani sveži plodovi.

Razlika u pogledu ukupnog sadržaja fenolnih jedinjenja u različitim ekstraktima je posledica različite polarnosti korišćenih organskih rastvarača i njihovih smeša koji

selektivno ekstrahuju pojedina fenolna jedinjenja, dužine procesa ekstrakcije i primenjene metode.

Ispitivani su voden i metanolni ekstrakti (50 %) šest bugarskih divljih jestivih plodova u pogledu sadržaja polifenolnih jedinjenja i antioksidativne aktivnosti. Najveći sadržaj polifenolnih jedinjenja ima voće *S. ebulus* 73.73 QE/g u vodenim ekstraktima i 68.27 mg QE/g u vodeno-metanolnim ((v/v) 1:1) ekstraktima. *Prunus spinosa* L. ima najmanji sadržaj polifenolnih jedinjenja 9.44 i 9.15 mg QE g⁻¹, respektivno (Kiselova i sar., 2005). Pravilan izbor smeše rastvarača u pogledu polarnosti, postiže se povećanjem prinosa ekstrahovanih polifenolnih komponenti. Veći sadržaj polifenolnih komponenti nesumnjivo utiče i na povećanu antioksidativnu aktivnost.

U prethodno pripremljenim ekstraktima određen je sadržaj monomernih antocijana. Rezultati su izraženi kao sadržaj ukupnih monomernih antocijana u mg/g svežeg uzorka u obliku cijanidin-3-glukozida kao ekvivalenta. Rezultati su prikazani na Histogramu 3.3.2.



Histogram 3.3.2. Sadržaj monomernih antocijana u ekstraktima ploda trnjine u različitim rastvaračima: 1. etanol; 2. etanol 50 %; 3. metanol; 4. metanol 50 %; 5. voda. Ekstrakti označeni različitim slovima se signifikantno razlikuju kada se koristi Duncan-ov test višestrukih intervala ($p<0.05$).

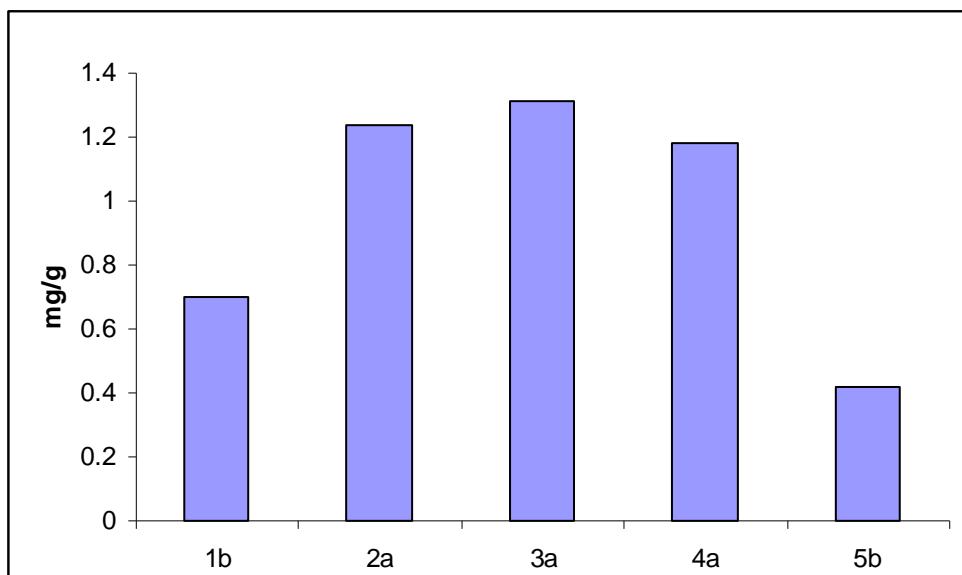
Sadržaj monomernih antocijana u ispitivanim ekstraktima je veoma mali i kreće se od 0.112 do 0.265 mg/g svežeg uzorka, pri čemu se može uočiti pravilnost da

etanolni (50 %) i metanolni ekstrakti (50 %) sadrže nešto veće količine antocijana u odnosu na ostale ekstrakte.

Od važnosti je i podatak da je sadržaj antocijana u plodu trnjine (*Prunus spinosa L.*) od 0.3 do 0.49 mg/g suvog ostatka koji je dobijen ekstrakcijom pomoću 80 % rastvora etanola, koji su u saglasnosti sa našim rezultatima (Uzelac i sar., 2007).

Ekstrakti ploda trnjine su veoma bogati antocijanima što je i očekivano jer je u pitanju bobičasti plod crveno- ljubičaste boje, koja potiče od ovih jedinjenja.

Sadržaj ukupnih flavonoida po ovoj metodi izražava se u obliku kvercetin ekvivalenta. Rezultati određivanja ukupnih flavonoida navedenom metodom prikazani su na Histogramu 3.3.3.



Histogram 3.3.3. Sadržaj ukupnih flavonoida u ekstraktima ploda trnjine u različitim rastvaračima: 1. etanol; 2. etanol 50 %; 3. metanol; 4. metanol 50 %; 5. voda. Ekstrakti označeni različitim slovima se signifikantno razlikuju kada se koristi Duncanov test višestrukih intervala ($p<0.05$).

Sadržaj ukupnih flavonoida u ispitivanim ekstraktima je veoma nizak ali je znatno veći od sadržaja antocijana. Kreće se od 0.419 do 1.31 mg QE/g svežeg uzorka. Uočeno je da etanolni (50 %), metanolni i metanolni (50 %) ekstrakti sadrže nešto veće količine ukupnih flavonoida u odnosu na ostale ekstrakte i signifikantno su različiti od ostalih ekstrakata.

Uzelac i saradnici su odredili da se sadržaj flavonoida u plodu trnjine kreće od 0.436 do 0.656 mg GAE/kg svežeg ploda. Ekstrakciju su vršili 80 % etanolom (Uzelac i sar., 2007) što je u saglasnosti sa našim rezultatima.

Fenolna jedinjenja deluju kao redukujući agensi, donori vodonika, imaju osobine heliranja metala i utiču na antioksidativno delovanje ekstrakata u kojima se nalaze. Antioksidativno delovanje ovih komponenata posledica je njihove hemijske strukture. Flavonoidi, zahvaljujući svojoj hemijskoj strukturi imaju izraženo antioksidativno delovanje.

Na osnovu ovih rezultata o sadržaju ukupnih fenola, flavonoida i antocijana u ekstraktima gloga može se pretpostaviti da određeni ekstrakti mogu pokazati značajno antioksidativno delovanje koje je u korelaciji sa tim sadržajem.

Na osnovu DPPH metode je određena antioksidativna aktivnost ispitivanih ekstrakata koje su izražene procentima i u mg QE/g svežeg ploda i date u Tabeli 3.3.1.

Tabela 3.3.1. Uporedni pregled rezultata dobijenih analizom sadržaja fenolnih jedinjenja i antioksidativne aktivnosti u ekstraktima ploda trnjine.

Ekstrakti trnjine	Ukupni fenoli ^a	Sadržaj monomernih antocijana ^b	Ukupni flavonoidi ^c	RSC%	RSC ^d
Etanol	15.33±0.19 ^{1c} ₂	0.11±0.01 ^c	0.70±0.11 ^b	47.38±0.00 ^c	2.76±0.36
Etanol 50 %	20.94±0.74 ^a	0.24±0.03 ^{ab}	1.24±0.09 ^a	72.12±0.00 ^b	4.25±0.06
Metanol	15.33±0.98 ^c	0.17±0.01 ^c	1.31±0.18 ^a	89.10±0.00 ^a	5.24±0.83
Metanol 50 %	17.69±0.41 ^b	0.26±0.01 ^a	1.18±0.18 ^a	75.69±0.22 ^b	4.45±0.45
Voda	12.17±0.19 ^d	0.12±0.01 ^c	0.42±0.01 ^b	32.05±0.85 ^d	1.86±0.08

^aIzraženo u mg GAE/g svežeg uzorka

^bIzraženo u mg cijanidin-3-O-glukozid/g svežeg uzorka

^{c,d}Izraženo u mg QE/g svežeg uzorka

¹srednja vrednost ± SD (n=3); ²brojevi označeni različitim slovima u koloni se značajno razlikuju kada se koristi Duncan-ov test višestrukih intervala, (p< 0.05).

Na osnovu rezulata prikazanih u Tabeli 3.3.1. može se zaključiti da ispitivani ekstrakti trnjine pokazuju veliku antioksidativnu aktivnost koja se kreće od 32.05 % u vodenom ekstraktu do 89.10 % u metanolnom ekstraktu.

Jablonska i saradnici su analizirali antioksidativnu aktivnost svežih plodova trnjine primenom FRAP i ABTS metode.

Sveži plodovi trnjine pokazuju značajnu antioksidativnu aktivnost 14.17 ± 3.06 mM Fe \cdot 100g $^{-1}$ sveže materije mereno FRAP metodom, i 5.33 ± 0.22 $\mu\text{M TE}\cdot\text{g}^{-1}$ sveže materije po ABTS metodi. Dobijeni rezultati ukazuju na visoku antioksidativnu aktivnost analiziranih divljih vrsta voća (Jabłońska i Ryśetal, 2009).

Biljni ekstrakti su kompleksne smeše prirodnih jedinjenja i njihova antiradikalna aktivnost nije rezultat aktivnosti samo jedne komponente. Vrlo često prisutna jedinjenja pokazuju sinergističke efekte. Sinergizam je definisao Uri (1961) kao „fenomen kod koga veći broj komponenata prisutnih u istom sistemu ima veći efekat (izražajnije dejstvo) nego zbir efekata pojedinačnih komponenata“. Ovo ukazuje na činjenicu da ukupan profil fitohemikalija određuje funkcionalnost hrane kao rezultat sinergističkog dejstva pojedinačnih konstituenata (Vattem i sar., 2005).

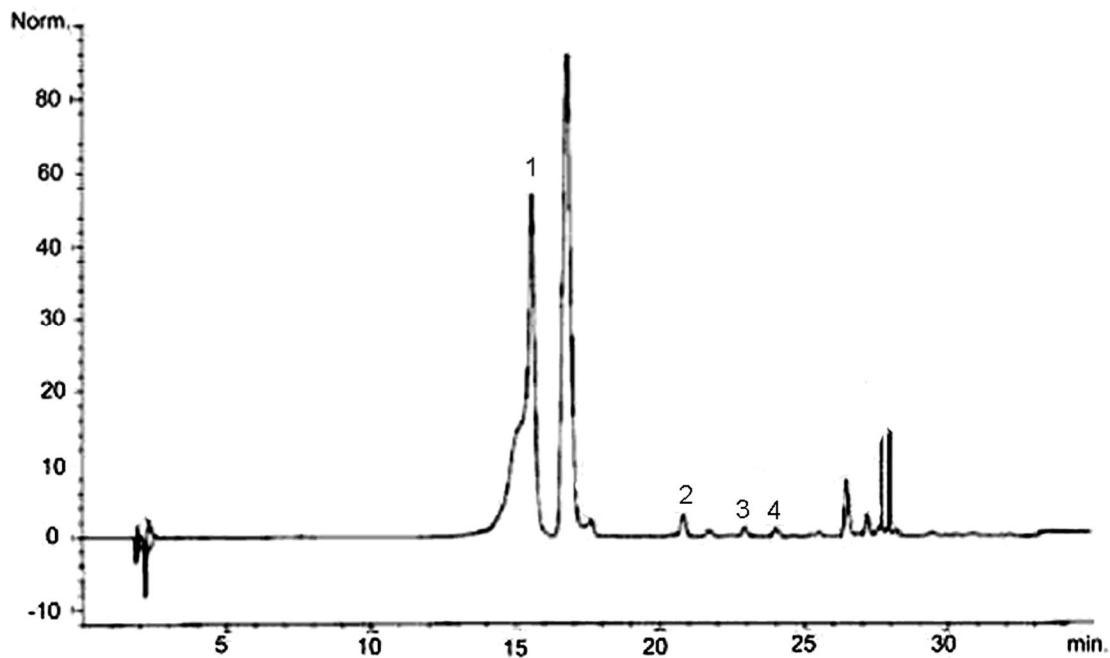
Zbog toga je neophodno izvršiti HPLC analizu ekstrakata.

3.3.2. HPLC analiza ekstrakata trnjine

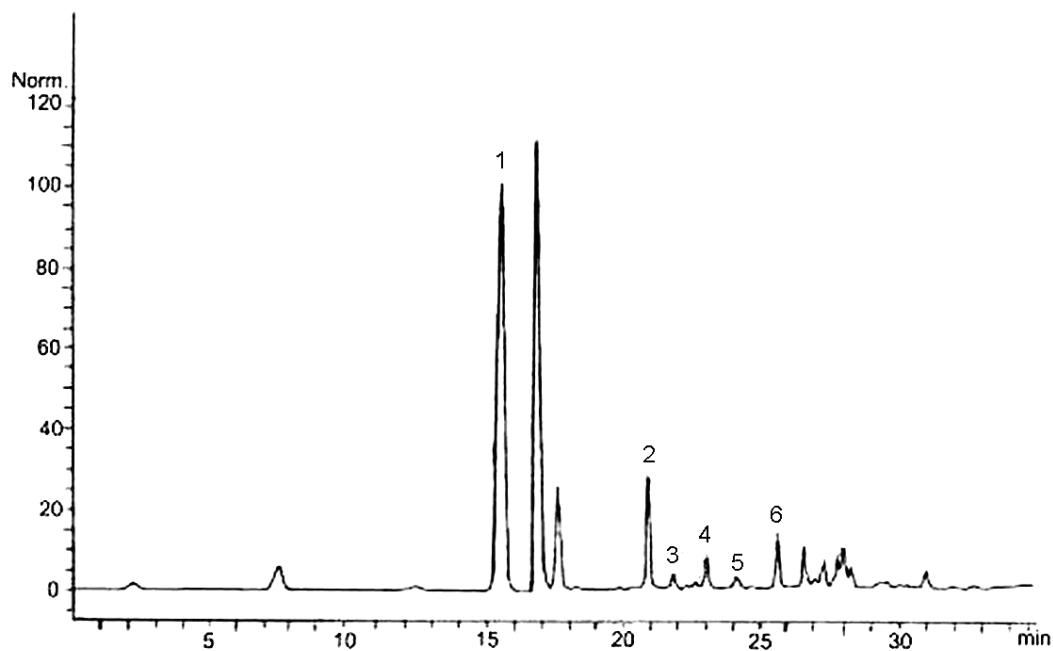
U cilju identifikacije i kvantifikacije pojedinih grupa jedinjenja, u ekstraktima trnjine, urađeni su hromatogrami na odgovarajućim talasnim dužinama. U Tabeli 3.3.2. su prikazani rezultati kvalitativnog i kvantitativnog određivanja polifenolnih jedinjenja u etanolnim, etanolnim 50 % i vodenim ekstraktima trnjine.

Tabela 3.3.2. HPLC analiza ekstrakata svežeg ploda trnjine(*Prunus spinosa L.*)

Jedinjenja	Etanol (mg/l)	Etanol 50 % (mg/l)	Voda (mg/l)
Neohlorogenska kiselina	12.26 ± 0.2	16.95 ± 0.3	/
Kafena kiselina	2.12 ± 0.1	9.73 ± 0.2	/
Miricetin	/	8.86 ± 0.2	/
Cijanidin-3- <i>O</i> -glukozid	1.1 ± 0.1	0.9 ± 0.1	1.1 ± 0.1
Cijanidin-3- <i>O</i> -rutinozid	1.1 ± 0.1	3.1 ± 0.2	1.5 ± 0.1
Peonidin-3- <i>O</i> -glukozid	/	1.2 ± 0.1	2.2 ± 0.1
Kvercetin	4.02 ± 0.2	3.83 ± 0.2	/



Slika 3.3.1. HPLC analiza etanolnog ekstrakta trnjine (*Prunus spinosa L.*) na 280 nm: neohlorogenska kiselina (1), kafena kiselina (2), cijanidin- 3-O-glukozid (3), cijanidin-3-O rutinozid (4).



Slika 3.3.2. HPLC analiza etanolanog (50 %) ekstrakta trnjine (*Prunus spinosa L.*) na 280 nm: neohlorogenska kiselina (1), kafena kiselina (2), miricetin (3), cijanidin-3-O-glukozid (4), cijanidin-3-O-rutinozid (5), peonidin-3-O-glukozid (6).

Identifikacija polifenolnih jedinjenja u ekstraktima trnjine vršena je na osnovu poređenja retencionih vremena i spektara, na 520 nm, 360 nm i 320 nm sa odgovarajućim vrednostima dobijenim za standard. Iz tabele 3.3.1. se može uočiti da je u vodenom ekstraktu najveći sadržaj peonidin-3-O-glukozida (3) 2.2 mg/l. Voden ekstrakt sadrži samo antocijane. U ekstraktu etanola 50 % najzastupljenija je neohlorogenska kiselina u količini od 16.95 mg/l. U etanolnom ekstraktu trnjine neohlorogenska kiselina je zastupljena sa 12.26 mg/l. Pored hlorogenske u etanolnim rastvorima zastupljena su kafena kiselina i kvercetin.

Olszewska i saradnici su analizirali metanolne ekstrakte lista *Prunus spinosa* L. Urađena je spektrofotometrijska i HPLC analiza sadržaja flavonoida. U ovoj studiji je utvrđeno da je sadržaj aglikona u cvetu 1.82- 2.63 %, glikozida 2.57- 3.72 %, a u listu trnjine aglikona 1.06- 1.65 %, odnosno glikozida 2.06- 4.27 %. U cvetu su kemferol i kvercetin podjednako zastupljeni, a u listu ima 2.4 puta više kemferola (Olszewska i sar., 2001).

Fraternale i saradnici odredili su da je sadržaj glikozida u *Prunus spinosa* L. sledeći: cijanidin-3-O-glukozid- 6.28 mg/g suve mase, cijanidin-3-O-rutinozid hlorida 29.49 mg/g suve mase, peonidin-3-O-rutinosid hlorida 17.86 mg/g suve mase (Fraternale i sar., 2009).

3.3.3. Antimikrobna aktivnost ekstrakata trnjine

Antimikrobna aktivnost etanolnog ekstrakta trnjine je data u Tabeli 3.3.3.

Tabela 3.3.3. Antimikrobna aktivnost etanolnog ekstrakta trnjine

Test mikroorganizam	Ekstrakt (10 mg ml ⁻¹)		Referentni antibiotik	Referentni antimikotik	Kontrolna proba
	20 µl	50 µl	Tetraciklin (30 µg)	Nistatin (30µg)	Etanol 96 %
<i>Salmonella abony</i> NCTC6017	/	19.0±0.2	28.0±0.3	/	/
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	11.0±0.1	24.0±0.3	30.0±0.3	/	/
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	13.0±0.15	23.0±0.3	19.0±0.2	/	/
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	/	/	36.0±0.4	/	/
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	13.0±0.2	18.0±0.2	34.0±0.3	/	/
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	14.0±0.2	23.0±0.3	/	20.0±0.3	/
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404	/	/	/	19.0±0.3	/

Kao što se i očekivalo kontrolna proba (etanol) nije imala inhibitorni efekat na

testirane bakterije i gljivice. Etanolni ekstrakti trnjine pokazuju antimikrobnu aktivnost na sve testirane mikroorganizme izuzev na bakterije *Bacillus subtilis* i gljivice *Aspergillus niger*.

Slično ispitivanje antimikrobne aktivnosti ekstrakata trnjine, drenjine i divlje kupine sproveli su Radovanovic i saradnici (2012). Ispitivani ekstrakti divljeg voća pokazali su antimikrobnu aktivnost na većinu ispitivanih Gram pozitivnih i Gram negativnih bakterija.

3.4. HEMIJSKA ANALIZA I ANTOOKSIDATIVNA AKTIVNOST EKSTRAKATA CVETA CIKORIJE (*Cichorium intybus L.*)

Mnogi predstavnici familije Asteraceae imaju primenu u medicini i farmaciji kao lekovite biljke. Lekoviti deo biljke je koren, a ređe nadzemni deo. Uglavnom se primenjuje u narodnoj medicini za lečenje oboljenja jetre, kao sredstvo za jačanje i čišćenje organizma, pomaže varenju. Protiv malokrvnosti upotrebljava se sveže ceđen sok nadzemnog dela biljke (Ahmed i sar., 2003; Zafar i sar., 1998). U narodnoj medicini cikoriju koriste dijabetičari zato što sve biljke iz familije Glavočika–Compositae, umesto skroba kao rezervnu hranu imaju inulin. Zbog toga osobe obolele od dijabetesa mogu koristiti biljke iz ove porodice kao dijetalnu hranu. U korenju cikorije se nalaze: inulin, gorki glikozidi, saponini, alfa- amirin, tarakeron, baurenil acetat, beta- sitosterol, mineralne materije, organske kiseline, seskviterpenski laktoni, vitamini, masti, manitol, lateks i dr. Literaturnim pregledom smo utvrdili da su mnogi autori proučavali bioaktivne komponente cikorije sa različitim aspekata.

Filipiak i saradnici su u svom radu analizirali različite delove ove biljke u pogledu sadržaja fenolnih jedinjenja, flavonoida i fenolnih kiselina. Oni su uradili HPLC analizu etanolnih ekstrakata *Cichorium intybus L.* Prosečne vrednosti sadržaja ispitivanih flavonoida i fenolnih kiselina su bile 0.98- 4.12 mg/g, odnosno 2.13-14.78 mg / g respektivno, za različite ekstrakte. Sadržaj fenolnih jedinjenja u etanolnim ekstraktima *Cichorium intybus L.* se kretao od 7.64 do 32.78 %. Sadržaj rutina se nakon hidrolize etanolnog ekstrakta povećava od 0.23- 0.56 mg/ g na 0.47- 1.27 mg/ g (Filipiak i sar., 2010).

Makky i saradnici su ispitivali pored više lekovitih biljaka i *Cichorium intybus L.* u pogledu sadržaja etarskih ulja i antimikrobne aktivnosti ekstrakata. Rezultati su pokazali da vodeni, etanolni, metanolni, etilacetatni i hloroformski ekstrakt ne

pokazuju antimikrobnu aktivnost prema nekim testiranim bakterijama (*Alcaligenes xylosoxidans*, *Staphylococcus xylosus*; *Staphylococcus aureus*) (Makky i sar., 2012).

Heimler i saradnici su određivali sadržaj polifenola primenom Folin- Ciocalteu metode u cikoriji koja je gajena u konvencionalnim i biodimaničkim uslovima. U *Cichorium intybus L.* rezultati su pokazali da je sadržaj polifenolnih jedinjenja od 420 mg GAE/100g do 650 mg GAE/100g svežeg uzorka, što je slično našim rezultatima (Heimler i sar., 2009).

HPLC/DAD/MS analizom identifikovano je pet hidroksicimetnih kiselina i osam flavonoida: kvercetin, kempferol, luteolin i glikozidi apigenina.

Mehmood i saradnici su ispitivali ekstrakte cikorije sa metanolom, hloroformom, etilacetatom, n-butanolom i n-heksanom. Rezultati su pokazali da je sadržaj ukupnih fenola najveći u metanolnom ekstraktu 285 ± 4.92 mg GAE /100g suvog biljnog materijala, što je znatno manje od naših rezultata (Mehmood i sar., 2009).

Innocenti i saradnici su određivali sadržaj fenolnih jedinjenja i HPCL metodom sadržaj flavonoida u cikoriji sa područja Belgije. Rezultati su pokazali da ekstrakti *cikorije* sadrže fenolne kiseline (hlorogensku kiselinu, cikormu kiselinu) od fenolnih jedinjenja, cijanidin 3-*O*- glukozid, delfinidin-3-*O*-(6"-malonil)-glukozid i cijanidin-3-*O*-(6"-malonil)-glukozid. Kvercetin 3-*O*-glukuronid i luteolin 7-*O*-glukuronid nisu dokazani (Innocenti i sar., 2005).

Milala i saradnici su analizom etanolnih ekstrakata cikorije sa područja Poljske odredili sadržaj ukupnih polifenolnih jedinjenja. Rezultati su pokazali da je sadržaj ukupnih fenola 13.6 ± 0.1 mg GAE/g suvog biljnog materijala (Milala i sar., 2010).

3.4.1. SPEKTROFOTOMETRIJSKO ODREĐIVANJE SADRŽAJA FENOLNIH JEDINJENJA I ANTOOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI EKSTRAKATA CVETA CIKORIJE (*Cichorium intybus L.*)

Za određivanje sadržaja polifenolnih jedinjenja i antioksidativne aktivnosti cikorije korišćeni su suvi cvetovi cikorije. Ekstrakcija je vršena prema proceduri 2.3.1. sledećim rastvaračima: voda, etanol i etanol 50 %.

Na histogramu 3.4.1. i u Tabeli 3.4.1. prikazani su rezultati spektrofotometrijskog određivanja ukupnih fenola, antocijana i flavonoida i antioksidativne aktivnosti ekstrakata suvih cvetova cikorije.

Tabela 3.4.1. Uporedni pregled rezultata dobijenih analizom sadržaja fenolnih jedinjenja i antioksidativne aktivnosti u ekstraktima cveta cikorije.

Ekstrakti cikorije	Ukupni fenoli ^a	Sadržaj monomernih antocijana ^b	Polimerni antocijani %	Ukupni flavonoidi ^c	RSC %	RSC ^d
Etanol	5.31±0.81 ^{1b2}	/	/	0.2±0.0 ^c	92.07±0.75 ^a	1.28±0.01
Etanol 50%	4.77±0.05 ^b	0.25±0.02	62.45±9.50	0.32±0.01 ^b	86.58±0.22 ^a	2.79±0.03
Voda	8.60±0.17 ^a	/	/	0.59±0.01 ^a	66.97±5.08 ^b	8.21±0.01

^aIzraženo u mg GAE/g suve mase

^bIzraženo u mg cijanidin-3-O-glukozid/g suve mase

^{c,d}Izraženo u mg QE/g suve mase.

¹srednja vrednost ± SD (n=3); ²brojevi označeni različitim slovima u koloni se značajno razlikuju kada se koristi Duncan-ov test višestrukih intervala, (p< 0.05).

Sadržaj ukupnih fenola kreće se od 4.77 do 8.60 mg/g suve mase. Na osnovu prikazanih rezultata, najveći sadržaj fenolnih jedinjenja ima vodeni ekstrakt. Literaturni podaci pokazuju da je sadržaj ukupnih fenola u *Cichorium intybus* L. od 4.20 do 6.50 mg GAE/g suve mase, respektivno (Heimler i sar., 2009), što je saglasno našim rezultatima.

Mehmood i saradnici su analizirali ekstrakte cikorije sa metanolom, hloroformom, etilacetatom, n-butanolom i n-heksanom. Najveći sadržaj ukupnih fenola je nađen u metanolnom ekstraktu 2.85 mg GAE/g suvog biljnog materijala, što je manje od sadržaja fenola u našim ekstraktima. To je posledica primene rastvarača različite polarnosti i drugačije metode ekstrakcije. (Mehmood i sar., 2009).

Innocenti i saradnici su određivali sadržaj fenolnih jedinjenja i HPLC metodom sadržaj flavonoida u cikoriji sa podneblja Belgije. Rezultati su pokazali da ekstrakti cikorije sadrže fenolne kiseline- hlorogensku kiselinu i cikornu kiselinu, a od fenolnih jedinjenja cijanidin-3-O-glukozid, delfnidin-3-O-(6"-malonil)-glukozid i cijanidin-3-O-(6"-malonil)-glukozid. Kvercetin 3-O-glukuronid i luteolin-7-O-glukuronid nisu dokazani (Innocenti i sar., 2005).

Filiapiak i saradnici su u svom radu analizirali različite delove ove biljke u pogledu sadržaja fenolnih jedinjenja, flavonoida i fenolnih kiselina. Oni su uradili HPLC analizu etanolnih ekstrakata *Cichorium intibus* L. Prosečne vrednosti sadržaja ispitivanih flavonoida i fenolnih kiselina su bile 0.98- 4.12 mg/g, odnosno 2.13- 14.78 mg / g respektivno, za različite ekstrakte. Sadržaj fenolnih jedinjenja u etanolnim ekstraktima *Cichorium intibus* L. se kretao od 7.64 do 32.78 %. Sadržaj rutina se nakon

hidrolize etanolnog ekstrakta povećava od 0,23- 0,56 mg/ g na 0,47-1,27 mg/ g (Filipiak i sar., 2010). Rezultati iz ove studije su takođe u saglasnosti sa našim rezultatima za ukupne fenole.

Joanna i saradnici su analizom etanolnih ekstrakata cikorije sa područja Poljske dobili sadržaj ukupnih fenola 13.6 ± 0.1 mg/g suvog biljnog materijala. Ovi rezultati su nešto viši od vrednosti koje smo mi dobili za etanolni ekstrakt, što se može objasniti drugačijim postupkom i različitom dužinom ekstrakcije (Joanna i sar., 2010).

Monomerni antocijani su određeni samo u ekstraktu etanola 50 % i iznosi 0,2582 mg cijanidin-3-O-glikozida/g suve mase. U ostalim ekstraktima antocijani nisu detektovani spektrofotometrijskom metodom.

Takođe je određen sadržaj polimernih antocijana na osnovu njihove osobine da pri tretiranju kalijumdisulfitom ne podležu obezbojavanju. U ekstraktu etanola 50 % ima preko 60 % polimernih antocijana.

Antocijani daju raznim plodovima, lišću i cveću crvenu, ljubičastu i modru boju sa mnogo nijansi. Na intenzitet i vrstu antocijana utiče sunčeva svetlost, temperatura kao i kiseonik, mada je obojenost voća i povrća koja potiče od antocijana do danas nepotpuno razjašnjena.

U hemijskom pogledu antocijani su glukozidi, kiselom hidrolizom daju aglukon-antocijanidin i jedan ili više šećera. Najznačajniji antocijanidini za voće i povrće su: pelargonidin, cijanidin, delfnidin, peonidin, petunidin i malvidin. Na degradacione promene antocijana utiču: pH sredine, temperatura, kiseonik, vitamin C.

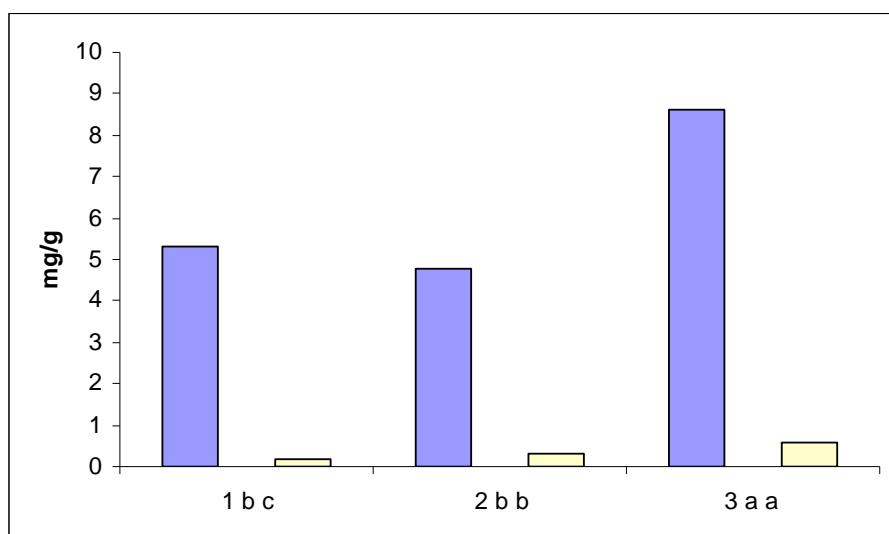
Antocijani imaju antioksidativno, antikancerogeno i antiupalno dejstvo, a mogu i poboljšati nutritivnu vrednost hrane sprečavanjem oksidacije lipida i proteina. Prema literaturnim podacima, u crnom luku 95 % ukupnih antocijana čine cijanidin 3-(6“-malonilglukozid), cijanidin-3-(6“-malonil-3“-glukozilglukozid) i cijanidin-3-glukozid. Prema literaturnim podacima količina antocijana u ovojnim listovima lukovice crnog luka se kreće u opsegu od 109 mg/100g do 219 mg/100g (Donner i sar., 1997).

Sadržaj ukupnih flavonoida u ispitivanim ekstraktima je veoma nizak i kreće se od 0,23 do 0,59 mg QE /g suve mase. Mehmood i saradnici su analizirali ekstrakte cikorije sa metanolom, hloroformom, etilacetatom, n-butanolom i n-heksanom. Najveći sadržaj ukupnih flavonoida je u metanolnom ekstraktu 1,50 mg CE/g suvog biljnog materijala (Mehmood i sar., 2009), što je nešto više od naših rezultata.

Na osnovu rezultata prikazanih u Tabeli 3.4.1. može se zaključiti da ispitivani ekstrakti pokazuju veliku antioksidativnu aktivnost koja se kreće od 66.97% u vodenom ekstraktu do 92.07 % u ekstraktu etanola.

Prisustvo značajnih količina flavonoida i antocijana bitno doprinosi ukupnom farmakološkom delovanju cikorije i njenih ekstrakata. Smatra se da flavonoidi i oligomerni procijanidini imaju najveću ulogu u biološkoj aktivnosti ekstrakata i njihovo prisustvo doprinosi antioksidativnoj aktivnosti biljke. Mehmood i saradnici ispitivanjem ekstrakata cikorije sa metanolom, hloroformom, etilacetatom, n-butanolom i n-heksanom. Odredili da najveću antioksidativnu aktivnost ima ekstrakt n-heksana (Mehmood i sar., 2009).

Na histogramu 3.3.1. dat je uporedni prikaz sadržaja fenola, antocijana i flavonoida u ekstraktima cikorije.



Histogram 3.4.1. Uporedni pregled sadržaja ukupnih fenola(♦), i flavonoida(●) u ekstraktima cveta cikorije u različitim rastvaračima: 1. etanol; 2. etanol 50%; 3. voda, ekstrakti označeni različitim slovima se signifikantno razlikuju kada se koristi Duncan-ov test višestrukih intervala ($p < 0.05$)

Na osnovu uporednog pregleda možemo zaključiti da je sadržaj ukupnih fenola najveći u vodenom ekstraktu, dok je u ostalim ekstraktima sadržaj ukupnih fenola približno jednak. Sadržaj fenola je signifikantno različit u vodenom ekstraktu u odnosu na sadržaje fenola u ekstraktu etanola i etanola 50 % koji su signifikantno slični, što je posledica značajne razlike u polarnosti rastvarača. Antocijana ima samo u 50 % ekstraktu etanola, a sadržaj flavonoida je najveći u vodenom ekstraktu. Sadržaj flavonoida je signifikantno različit u svim rastvaračima.

3.5. HEMIJSKA ANALIZA I ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST EKSTRAKATA CVETA NEVENA (*Calendula officinalis L.*)

Cvetovi nevena sadrže etarsko ulje, tanine, šećere, proteine, pigmente karotenoide, minerale (kalijum, sumpor i dr.), gorke supstance i dr. Upotrebljava se u obliku čaja, kao dodatak salatama i drugim jelima, a spolja u obliku ulja, masti, obloga ili čajeva za ispiranje. Neven deluje antiseptično i antibakterijski pa je vrlo efikasan protiv različitih zapaljenja, gljivičnih infekcija, a najnovija istraživanja nagoveštavaju da je koristan u borbi protiv HIV-a. Koristan je za uklanjanje toksina (otrova) koji prate različite hronične infekcije, grozničava stanja, kožne bolesti kao što su ekskemi i akne. Dobar je kao sredstvo za umirenje grčeva, protiv astme, kašla, lutanja srca i nesanice. Od davnina se u narodnoj medicini koristi za zalečenje rana, uboja, ozeblina, čireva, bradavica, kurjih očiju i dr. (Slavkovska i sar., 2001). Hladan čaj od nevena se upotrebljava za ispiranje očiju kod konjuktivitisa ili desni posle vađenja zuba. Ima baktericidno dejstvo, stoga se koristi za lečenje rana, psorijaze, itd. Neven je poznat po svojim anti-inflamatornim i antikancerogenim karakteristikama (Bilia, 2002.).

Literaturnim pretraživanjem pronašli smo nekoliko studija koje su proučavale sadržaj polifenolnih jedinjenja, antioksidativnu aktivnost, sadržaj teških metala u nevenu.

Ćetković i saradnici su ispitivali sadržaj ukupnih fenola u cvetu *Calendula officinalis L.* spektrofotometrijskom metodom. Rezultati pokazuju da je sadržaj ukupnih fenola 15.12 mg GAE/g uzorka i sadržaj ukupnih flavonoida je 5.13 mg QE/g uzorka (Ćetković i sar., 2003).

Butnariu i Coradini su spektrofotometrijskom metodom odredili sadržaj fenolnih jedinjenja u ekstraktima nevena koji su pripremljeni sa metanolom (80 %), etanolom (96 % i 60 %), izopropanolom (99 %). Najveći sadržaj polifenolnih jedinjenja je određen u metanolnom ekstraktu i iznosio je 153 mg GAE/100 ml ekstrakta (Butnariu i Coradini, 2012).

Kleinubing i saradnici su analizirali sadržaj teških metala i fenolnih kiselina u vodenim i etanolnim ekstraktima nevena. Rezultati su pokazali da je sadržaj fenolnih kiselina 3.35- 9.00 mg/ g u etanolnom ekstraktu (Kleinubing i sar., 2011).

Kaškonienė i saradnici su analizirali metanolne ekstrakte hibridne vrste nevena. Spektrofotometrijskom metodom određen je sadržaj polifenolnih jedinjenja, flavonoida i antioksidativna aktivnost DPPH metodom. Urađena je i HPLC analiza ekstrakata.

Potvrđeno je da je sadržaj polifenolnih jedinjenja 2.5 puta veći u hibridnim vrstama nevena, a antioksidativna aktivnost je čak 25 puta (Kaškonienė i sar., 2011).

Crnobarac i saradnici su u svom radu analizirali spoljašnje uticaje klimatskih faktora na bioaktivne komponente nevena (Crnobarac i sar., 2011).

3.5.1. SPEKTROFOTOMETRIJSKO ODREĐIVANJE SADRŽAJA FENOLNIH JEDINJENJA I ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI EKSTRAKATA CVETA NEVENA (*Calendula officinalis L.*)

Za određivanje sadržaja polifenolnih jedinjenja i antioksidativne aktivnosti nevena korišćeni su suvi cvetovi nevena. Ekstrakcija je vršena prema proceduri 2.3.1. u sledećim rastvaračima: voda, etanol i etanol 50 %.

U Tabeli 3.5.1. prikazani su rezultati spektrofotometrijskog određivanja ukupnih fenola, antocijana i flavonoida i antioksidativne aktivnosti ekstrakata suvih cvetova nevena.

Tabela 3.5.1. Uporedni pregled rezultata dobijenih analizom sadržaja fenolnih jedinjenja i antioksidativne aktivnosti u ekstraktima cveta nevena.

Ekstrakt nevena	Ukupni fenoli ^a	Sadržaj monomernih antocijana ^b	Polimerni antocijani %	Ukupni flavonoidi ^c	RSC %	RSC ^d
Etanol	31.85±1.18 ^{1b1}	2.47±0.03 ^a	9.07±0.04 ^c	0.09±0.01 ^c	27.31±1.21 ^c	19.17±0.04
Etanol 50 %	29.79±0.7 ^b	1.50±0.00 ^b	43.26±2.0 ^a	0.17±0.01 ^a	96.85±0.26 ^a	0.03±0.01
Voda	45.13±0.00 ^a	1.08±0.00 ^c	28.61±0.67 ^b	0.12±0.01 ^b	85.22±0.34 ^b	3.17±0.01

^aIzraženo u mg GAE/g suve mase

^bIzraženo u mg cijanidin-3-O-glukozida/g suve mase

^{c,d}Izraženo u mg QE/ g suve mase.

¹srednja vrednost ± SD (n=3); ²brojevi označeni različitim slovima u koloni se značajno razlikuju kada se koristi Duncan-ov test višestrukih intervala, (p<0,05).

Sadržaj ukupnih fenola kreće se od 29.79 do 45.13 mg/g suve mase. Približno isti sadržaj fenolnih jedinjenja imaju etanolni i ekstrakt etanola 50 %, dok znatno veći sadržaj fenola ima vodeni ekstrakt.

Ćetković i saradnici su ispitivali sadržaj fenolnih jedinjenja u cvetu nevena (*Calendula officinalis L.*). Rezultati pokazuju da je sadržaj ukupnih fenola u metanolnom rastvoru nevena 15.12 mg ekvivalenta hlorogenske kiseline/g uzorka, dok je sadržaj ukupnih flavonoida 5.13 mg rutin ekvivalenta/g uzorka (Ćetković i sar., 2003). Sadržaj je izražen u različitim ekvivalentima i ekstrakcija je vršena maceracijom sa metanolom 24 h u odnosu suva materija/rastvarač 1:50, pa je suvi

ostatak ekstrahovan naknadno rastvaračima različite polarnosti, a ekstrakti su analizirani tankoslojnom hromatografijom.

Butnariu i Coradini su spektrofotometrijskom metodom odredili sadržaj fenolnih jedinjenja u ekstraktima nevena sa 80 % metanolom, 96 % etanolom, 99 % izopropanolom i 60 % etanolom. Najveći sadržaj polifenolnih jedinjenja određen je u metanolnom ekstraktu (153 mg GAE/100 ml ekstrakta, odnosno 15.3 mg/g suvog materijala) (Butnariu i Coradini, 2012). Odnos rastvarača i suvog materijala je bio 1:10 isto kao i u našem eksperimentu, ali je proces ekstrakcije vršen dva puta po 14 h, ekstrakti su spojeni, profiltrirani i korišćeni za dalju analizu. Uzorci nevena bili su sa područja Rumunije.

<i>C. officinalis</i> ekstrakti cveta, v/v	Ukupni flavonoidi (QE mg/100 mL)		Ukupni fenoli (GAE mg /100 mL)		(FRAP) (mmol Fe ²⁺ /g)		DPPH radikal (mmol Trolox/g)	
	P ₁	P ₂	P ₁	P ₂	P ₁	P ₂	P ₁	P ₂
80 % metanol	96.17	90.37	134	153.23	0.29	1.55	2.64	2.97
96 % etanol	94.17	88.74	128	149.07	1.92	1.36	2.13	2.74
99% izopropanol	38.7	47.3	124	132.04	1.45	1.24	1.80	1.99
60 % etanol	34.8	44.1	112	123.25	1.20	1.13	1.57	1.81

Ovo su znatno manje vrednosti za sadržaj polifenolnih jedinjenja u odnosu na naše rezultate. Na osnovu brojnih studija poznato je da na sadržaj polifenolnih jedinjenja utiču genotip, mesto i tehnika gajenja, kao i razlike u zrelosti biljke (Orhan i sar., 2007). Takođe, spoljašnji faktori poput svetlosti, temperature, prisustva hranljivih materija u zemljištu i nadmorska visina, mogu uticati na fenilpropanoidni metabolizam biljke (Dixon i Paiva, 1995). Crnobarac i saradnici su u svom radu utvrdili da klimatski faktori bitno utiču na sadržaj bioaktivnih komponenti nevena (Crnobarac i sar., 2011).

Kleinubing i saradnici su analizirali sadržaj teških metala i fenolnih kiselina u vodenim i etanolnim ekstraktima nevena. Sadržaj fenolnih kiselina je 3.35-9.00 mg GAE/g u etanolnom ekstraktu (Kleinubing i sar., 2011).

Kaškonienė i saradnici su takođe analizirali metanolne ekstrakte hibridnih vrsta nevena. Potvrđeno je da je sadržaj polifenolnih jedinjenja 2.5 puta veći u hibridnim vrstama nevena, a antioksidativna aktivnost čak 25 puta (Kaškonienė i sar., 2011).

U prethodno pripremljenim ekstraktima određen je sadržaj monomernih antocijana po postupku koji je opisan u Eksperimentalnom delu. Sadržaj monomernih antocijana u ispitivanim ekstraktima kreće se od 1.08 do 2.47 mg cijanidin-3-*O*-

glukozida/g suve mase, pri čemu se može uočiti da etanolni ekstrakti sadrže nešto veće količine antocijana u odnosu na ostale ekstrakte.

Takođe je određen sadržaj polimernih antocijana. Sadržaj polimernih antocijana u ispitivanim ekstraktima je veoma neujednačen i kreće se od 28.61 do 99.07 %. Sadržaj polimernih antocijana je najveći u ekstraktu etanola.

Sadržaj ukupnih flavonoida u ispitivanim ekstraktima je veoma nizak i znatno je niži od sadržaja antocijana. Kreće se od 0.097 do 0.17 mg QE/g suve mase.

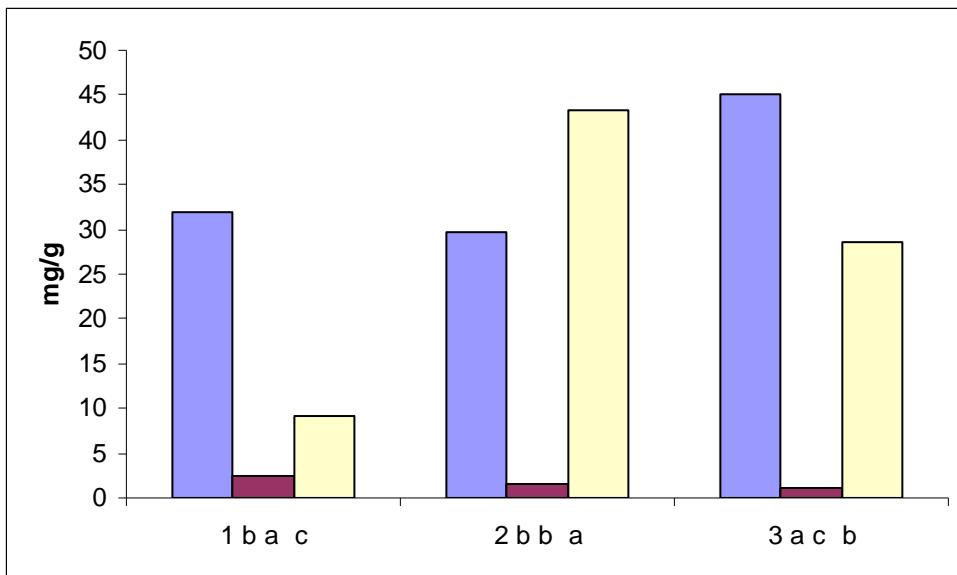
Sadržaj ukupnih flavonoida u metanolnom ekstraktu nevena je 5.13 mg rutin ekvivalenta/g uzorka (Ćetković i sar., 2003). Ovo su znatno veće vrednosti za sadržaj flavonoida u odnosu na naše rezultate, sadržaj je izražen u različitim ekvivalentima, a proces ekstrakcije je vršen maceracijom 24 h.

Kleinubing i saradnici su analizirali sadržaj teških metala i flavonoida u vodenim i etanolnim ekstraktima. Sadržaj flavonoida je 0.66- 2.33 mg QE/g u etanolnom ekstraktu (Kleinubing i sar., 2011). Dobijene vrednosti su saglasne sa našim rezultatima.

Eksperimentalno određene vrednosti za antioksidativnu aktivnost ispitivanih ekstrakata prikazane su u Tabeli 3.5.1 i izražene su u procentima i mg QE/g suvog uzorka. Ispitivani ekstrakti pokazuju antioksidativnu aktivnost koja se kreće od 27.31 % u ekstraktu etanola do 96.85 % u ekstraktu etanola 50 %.

Butnariu i Coradinisu su odredili antioksidativnu aktivnost ekstrakta nevena u metanolu 80 %, etanolu 96 %, izopropanolu 99 % i etanolu 60 %, DPPH metodom. Najveću antioksidativnu aktivnost je pokazao metanolni ekstrakt (2.64- 2.97 mmol Troloxa/g) (Butnariu i Coradini, 2012). Ovi su rezultati veoma slični našim vrednostima za antioksidativnu aktivnost.

Na histogramu 3.5.1. je prikazan uporedni pregled sadržaja ukupnih fenola, antocijana i flavonoida.



Histogram 3.5.1. Uporedni pregled sadržaja ukupnih fenola(♦), antocijana(■) i flavonoida(●) u ekstraktima cveta nevena u različitim rastvaračima:1. etanol; 2. etanol 50 %; 3. voda. Ekstrakti označeni različitim slovima se signifikantno razlikuju kada se koristi Duncan-ov test višestrukih intervala ($p < 0.05$).

Na osnovu uporednog pregleda možemo zaključiti da je sadržaj ukupnih fenola najveći u vodenom ekstraktu, dok je u ostalim ekstraktima skoro sličan. Sadržaj ukupnih fenola je značajno statistički različit u vodenom rastvoru. Sadržaj antocijana je najveći u etanolnom rastvoru, a sadržaj flavonoida je veoma nizak u svim ekstraktima. Vrednosti sadržaja antocijana i flavonoida u ispitivanim ekstraktima su značajno statistički različiti. Najveću antioksidativnu aktivnost pokazuje ekstrakt etanola 50 %.

3.6. HEMIJSKA ANALIZA I ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST EKSTRAKATA BILJKE VRANILOVKA (*Origanum vulgare L.*)

Vranilovka je omiljena u narodu kao čaj i lek za jačanje, za lečenje bolesti organa za varenje (osobito proliva) i disanje, a spolja se upotrebljava protiv raznih zapaljenja kože i sluznica. Etarsko ulje od vranilovke sadrži oko 50 % timola, zbog čega ima veoma izražena antibakterijska svojstva. Na taj način se može i objasniti vekovna upotreba i ogromno poverenje u lekovitu moć ove biljke u nekim našim krajevima (Ietswaart i sar., 1980; Lawrence i sar., 1984).

Nazivaju je vranilovkom zato što je do otkrića sintetskih boja upotrebljavana za crno bojenje vune. Glavni sastojci etarskog ulja: karvakrol, timol, cimen, kariofilen,

pinen, bisabolen, linalol, borneol, geranil acetat, linalil acetat, terpinen. Sastojci veoma variraju u skladu sa izvorom, ali ulja klasifikovana kao oregano ili oreganum imaju timol i/ili karvakrol kao svoje većinske komponente. Koristi se kao mirisni sastojak sapuna, kolonjskih voda i parfema. U proizvodnji mesa i pića se koristi kao začin.

Ispitivanja začinskih biljaka su pokazala da je ORAC (kapacitet absorpcije radikala kiseonika) vrednost i ukupni sadržaj fenola vrlo značajan i iznosi od 2.35 do 92.18 $\mu\text{mol TE/g}$ svežeg uzorka i od 0.26 do 17.51 mg GAE/g svežeg uzorka, respektivno (Zheng i Wang, 2001).

Kaurinovic i saradnici su analizirali ekstrakte vranilovke u etru, hloroformu, etilacetatu, n-butanolu i vodi. Rezultati su pokazali da se sadržaj ukupnih fenola kreće od 4.72 do 14.13 mg GAE/g materijala. Najveći sadržaj ukupnih fenola je u ekstraktima etilacetata. Dobijene vrednosti su znatno manje vrednosti od naših (Kaurinovic i sar. 2011).

Chrpova i saradnici su u vodenom ekstraktu vranilovke određivali ukupne fenole. Rezultati su pokazali da je u vodenom ekstraktu origana sadržaj ukupnih fenola 91.4 mg GAE/g. (Chrpova i sar., 2010).

Velasco i saradnici pripremali su metanolne ekstrakte vranilovke sa podrčja Poljske i analizirali sadržaj ukupnih fenola. Sadržaj ukupnih fenola je bio 0.15 ± 0.01 mg GAE/100 g suvog materijala (Velasco i sar., 2011). Antioksidativna aktivnost određena je DPPH metodom i iznosila je $79.6 \pm 2.04 \mu\text{M TE} / 100 \text{ g suve materije}$ (Velasco i sar., 2011).

Wojdyło i saradnici su u ekstraktima začinskih biljki odredili antioksidativnu aktivnost i to od 1.76 do 346 $\mu\text{M TE} / 100 \text{ g}$, i da je sadržaj ukupnih fenola od 0.07 do 15.2 mg GAE/g materijala (Wojdyło i sar., 2007).

U Italiji su u različitim eksperimentalnim uslovima analizirani etanolni i vodeni ekstrakti suvog lišća. Različite vrednosti za antioksidativnu aktivnost DPPH metodom i skoro slične količine polifenolnih jedinjenja, pokazuju da je moguće sprečiti peroksidne procese (Cervato i sar., 2000).

3.6.1. SPEKTROFOTOMETRIJSKO ODREĐIVANJE SADRŽAJA FENOLNIH JEDINJENJA I ANTOOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI EKSTRAKATA BILJKE VRANILOVKE (*Origanum vulgare L.*)

Za određivanje sadržaja polifenolnih jedinjenja i antioksidativne aktivnosti vranilovke korišćeni su suvi delovi biljke vranilovke. Ekstrakcija je vršena prema proceduri 2.3.1. u sledećim rastvaračima: voda, etanol i etanol 50 %.

U tabeli 3.6.1. prikazani su rezultati spektrofotometrijskog određivanja ukupnih fenola, antocijana i flavonoida i antioksidativne aktivnosti ekstrakata suvih delova biljke vranilovke.

Tabela 3.6.1. Uporedni pregled rezultata dobijenih analizom sadržaja fenolnih jedinjenja i antioksidativne aktivnosti u ekstraktima biljke vranilovke.

Ekstrakti vranilovke	Ukupni fenoli ^a	Sadržaj monomer. antocijana ^b	Polimerni antocijani (%)	Ukupni flavonoidi ^c	RSC%	RSC ^d
Etanol	23.59±0.39 ^{1b2}	/	/	0.97±0.01 ^b	93.77±0.41 ^a	0.81±0.12
Etanol 50 %	75.22±0.59 ^a	0.45±0.10	18.3±1.6	1.97±0.02 ^a	87.19±1.09 ^b	2.62±0.02
Voda	74.33±1.17 ^a	/	/	2.06±0.04 ^a	75.13±0.41 ^c	5.96±0.14

^aIzraženo u mg GAE/g suve mase

^bIzraženo u mg cijanidin-3-O-glukozid/g suve mase

^{c,d}Izraženo u mg QE/ g suve mase.

¹srednja vrednost ± SD (n=3); ²brojevi označeni različitim slovima u koloni se značajno razlikuju kada se koristi Duncan-ov test višestrukih intervala, (p< 0.05).

Sadržaj ukupnih fenola kreće se od 23.59 do 75.22 mg/g suve mase uzorka. Na osnovu prikazanih rezultata može se zaključiti da je sadržaj fenolnih jedinjenja najmanji u etanolnom ekstraktu. Literaturni podaci za začinske biljke kojima pripada i *Origanum vulgare L.* pokazali su da sadrže ukupne fenole od 0.26 do 17.51 mg GAE/g suve mase (Zheng i Wang, 2001). Kaurinovic i saradnici su analizirali ekstrakte vranilovke u etru, hloroformu, etilacetatu, n butanolu i vodi. Sadržaj ukupnih fenola se kreće od 4.72 do 14.13 mg GAE/g materijala. (Kaurinovic i sar., 2011). Najveći sadržaj ukupnih fenola je u ekstraktima etilacetata. Ekstrakt je pripremljen ekstrakcijom sa metanolom 24 h, pa je onda ekstrakt uparen do suva, a onda je vršena ekstrakcija drugim rastvaračima i u njima je određen sadržaj ukupnih fenola i flavonoida. Dobijene vrednosti razlikuju se od naših kao posledica različitog postupka ekstrakcije i primene rastvarača različite polarnosti.

Chrpova i saradnici su u vodenom ekstraktu vranilovke odredili ukupne fenole u količini od 91.4 mg GAE/g što je malo više od sadržaja u našem vodenom ekstraktu (Chrpova i sar., 2010).

Takve razlike mogu se pripisati klimatskim faktorima koji deluju na biljke, sezonskim periodima uzorkovanja, deo biljke koji se koristi za ekstrakciju, metode ekstrakcije, vrsta rastvarača, dužina ekstrakcije.

Sadržaj monomernih antocijana određen je u ekstraktu sa 50 % etanolom i iznosio je 0.4564 mg/g suve mase. U ostalim ekstraktima antocijani nisu detektovani spektrofotometrijskom metodom. Takođe je određen sadržaj polimernih antocijana na osnovu njihove osobine da pri tretiranju kalijumbisulfitom ne podležu obezbojavanju.

Sadržaj ukupnih flavonoida u ispitivanim ekstraktima je veoma nizak, ali je znatno veći od sadržaja antocijana. Kreće se od 0.97 do 2.11 mg/g suve mase uzorka. Sadržaj ukupnih flavonoida u ispitivanom vodenom i vodeno-etanolnom ekstraktu je sličan, dok je u ekstraktu etanola znatno manji.

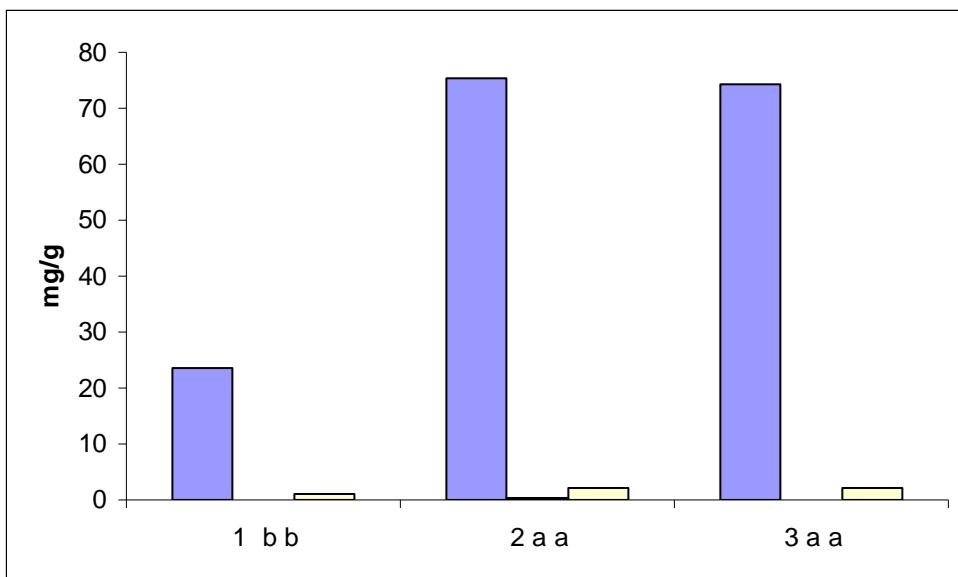
Kaurinovic i saradnici su analizirali ekstrakte vranilovke u etru, hloroformu, etilacetatu, n-butanolu i vodi. Sadržaj ukupnih flavonoida se kreće od 9.37 do 28.54 mg rutin ekvivalenta/g suvog materijala (Kaurinovic i sar., 2011). Najveći sadržaj flavonoida je u ekstraktu etilacetata.

Eksperimentalno određene vrednosti pri određivanju antioksidativne aktivnosti ispitivanih ekstrakata prikazane su u Tabeli 3.6.1. Na osnovu rezulata može se zaključiti da ispitivani ekstrakti pokazuju veliku antioksidativnu aktivnost koja se kreće od 75.13% u vodenom ekstraktu do 93.76 % u ekstraktu etanola.

Kaurinovic i grupa autora su analizirali ekstrakte vranilovke u etru, hloroformu, etilacetatu, n-butanolu i vodi. Najveću antioksidativnu aktivnost pokazao je etarski ekstrakt (Kaurinovic i sar., 2011).

Chrpova i saradnici su vodenom ekstraktu vranilovke odredili antioksidativnu aktivnost DPPH metodom koja je iznosila 209.1 mg AAE/g. Oni su odredili koeficijent korelacije fenolnih jedinjenja i antioksidativne aktivnosti $R= 0.9582$ (Chrpova i sar., 2010). Velasco i Williams su u ekstraktima (*Origanum vulgare L.*) dobili 79.6 ± 2.04 $\mu\text{mol TE/g}$ materijala (Velasco i Williams., 2011).

Na histogramu 3.6.1. je prikazan uporedni pregled sadržaja ukupnih fenola, antocijana i flavonoida.



Histogram 3.6.1. Uporedni pregled sadržaja ukupnih fenola(♦) i flavonoida(●) u ekstraktima vranilovke u različitim rastvaračima: 1. etanol; 2. etanol 50 %; 3. voda. Ekstrakti označeni različitim slovima se signifikantno razlikuju kada se koristi Duncan-ov test višestrukih intervala ($p < 0.05$).

Najmanji sadržaj ukupnih fenola je nađen u etanolnom ekstraktu, a sadržaj ukupnih fenola u vodenom i ekstraktu etanola 50 % je približno isti i statistički signifikantno sličan.

Sadržaj flavonoida je nizak i najmanji je u etanolnom rastvoru, a sadržaj u vodenom i ekstraktu etanola 50 % i sličan je u pogledu količine i statističke signifikantnosti.

3.7. HEMIJSKA ANALIZA I ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST EKSTRAKATA CVETA ŽAVORNJAKA (*Delphinum consolida L.*)

Naime, ova biljka je izuzetno retka, mada u većem delu njenog endemičnog balkanskog areala, ranija nalazišta nisu u novije vreme proveravana. Kao i druge jednogodišnje vrste roda *Consolida* veoma je dekorativna i može se lako gajiti. Ekonomski značaj se ogleda u činjenici da se pojedine vrste koriste u hortikulturi. Takođe, zbog prisustva alkaloida pojedine vrste se koriste i u farmaciji. Ima dosta i otrovnih vrsta, a mnoge su korovske.

Vrste roda *Consolida* su otrovne i sadrže alkaloide delfinin i delfinoidin koji su po dejstvu slični akonitinu i veratrinu (Olsen i sar., 1990).

3.7.1. SPEKTROFOTOMETRIJSKO ODREĐIVANJE SADRŽAJA FENOLNIH JEDINJENJA I ANTOOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI EKSTRAKATA CVETA ŽAVORNJAKA (*Delphinum consolida L.*)

Za određivanje sadržaja polifenolnih jedinjenja i antioksidativne aktivnosti žavornjaka korišćeni su suvi cvetovi žavornjaka. Ekstrakcija je vršena prema proceduri 2.3.1. u sledećim rastvaračima : voda, etanol i etanol 50 %.

U Tabeli 3.7.1. prikazani su rezultati spektrofotometrijskog određivanja ukupnih fenola, antocijana i flavonoida i antioksidativne aktivnosti ekstrakata suvih cvetova žavornjaka.

Tabela 3.6.1. Uporedni pregled rezultata dobijenih analizom sadržaja fenolnih jedinjenja i antioksidativne aktivnosti u ekstraktima cvetova žavornjaka.

Ekstrakti žavornjaka	Ukupni fenoli ^a	Sadržaj monomernih antocijana ^b	Polimerni antocijani%	Ukupni flavonoidi ^c	RSC %	RSC ^d
Etanol	23.89±1.76 ^{a1,2}			1.08±0.01 ^c	32.55±3.13 ^c	17.72±0.0
Etanol 50%	18.28±0.39 ^b	0.41±0.03	0.11±0.01	1.32±0.02 ^b	94.42±0.10 ^a	0.63±0.06
Voda	24.18±0.39 ^a			1.69±0.02 ^a	82.74±1.69 ^b	3.85±0.05

^aIzraženo u mg GAE/g suve mase

^bIzraženo u mg cijanidin-3-O-glukozida/g suve mase

^{c,d} Izraženo u mg QE/g suve mase

¹srednja vrednost ± SD (n=3); ²brojevi označeni različitim slovima u koloni se značajno razlikuju kada se koristi Duncan-ov test višestrukih intervala, (p< 0.05).

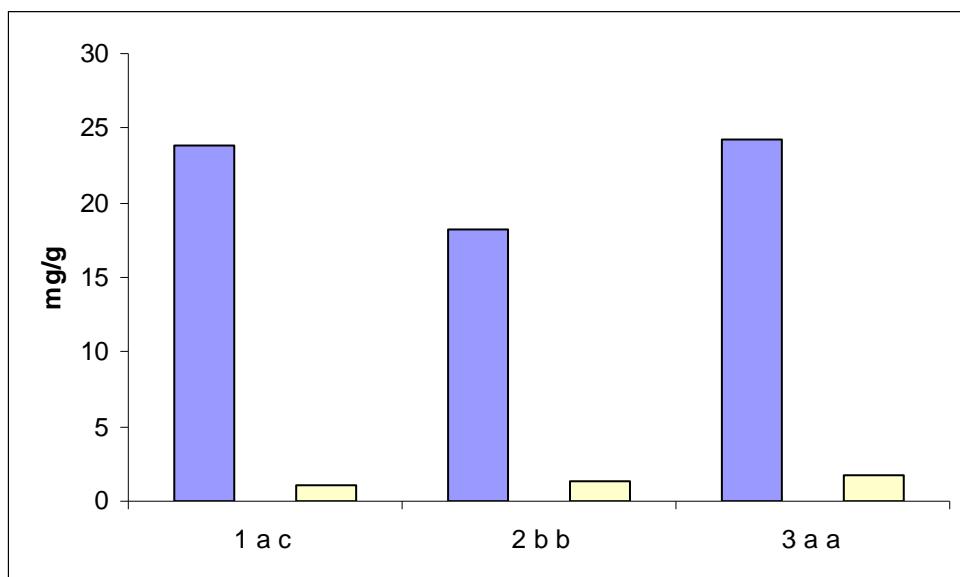
Sadržaj ukupnih fenola kreće se od 18.28 do 24.18 mg/g suvog uzorka. Na osnovu prikazanih rezultata može se zaključiti da približno isti sadržaj fenolnih jedinjenja ima voden i etanolni ekstrakt, dok nesto manji ima ekstrakt etanola 50 %.

Sadržaj monomernih antocijana je određen samo u ekstraktu etanola 50 % i iznosi 0.3896 mg/g ekstrakta. U ostalim ekstraktima antocijani nisu detektovani spektrofotometrijskom metodom. Takođe je određen sadržaj polimernih antocijana na osnovu njihove osobine da pri tretiranju kalijumbisulfitom ne podležu obezbojavanju.

Sadržaj ukupnih flavonoida u ispitivanim ekstraktima je veoma nizak, ali znatno je veći od sadržaja antocijana. Kreće se od 1.085 do 1.69 mg QE/g suvog uzorka.

Na osnovu rezultata prikazanih u Tabeli 3.7.1 može se zaključiti da ispitivani ekstrakti pokazuju antioksidativnu aktivnost koja se kreće od 32.55 % u ekstraktu etanola do 94.42 % u ekstraktu etanola 50 %.

Na histogramu 3.7.1. je prikazan uporedni pregled sadržaja ukupnih fenola, antocijana i flavonoida u ekstraktima cveta žavornjaka



Histogram 3.7.1. Uporedni pregled sadržaja ukupnih fenola (◆) i flavonoida (●) u ekstraktima vranilovke: 1. etanol; 2. etanol 50 %; 3. voda. Ekstrakti označeni različitim slovima se signifikantno razlikuju kada se koristi Duncan-ov test višestrukih intervala ($p < 0.05$).

Na osnovu uporednog pregleda možemo zaključiti da je sadržaj ukupnih fenola najveći u vodenom ekstraktu. Najmanji sadržaj ukupnih fenola u ekstraktu etanola 50 %. Sadržaj flavonoida je znatno manji i statistički signifikantno različit u ispitivanim ekstraktima. Na osnovu literaturnog pretraživanja nismo pronašli podatke o ispitivanju sadržaja polifenolnih jedinjenja u cvetu ove biljke. Zato je veoma interesantno nastaviti fitohemijsko, mikrobiološko i antioksidativno ispitivanje ekstrakata ove biljke.

3.8. ODREĐIVANJE SADRŽAJA METALA U EKSTRAKTIMA IZABRANIH BILJNIH VRSTA

Lekovite biljke i njihovi ekstrakti zaslužuju posebnu pažnju zbog značajnog uticaja koje imaju na ljudsko zdravlje. Za većinu svetske populacije, lekovito bilje predstavlja primarni izvor zdravstvene zaštite. Prema izveštaju Svetske zdravstvene organizacije, skoro 80 % ljudi u manje civilizovanim zajednicama koriste samo lekovito bilje za lečenje raznih bolesti (Pirzada i sar., 2009; Sahito i sar., 2003). Potvrđeno je da dugotrajno konzumiranje istih izaziva zdravstvene probleme zbog mogućeg prisustva teških metala (Jabeen i sar., 2010). Biljke mogu biti lako zagađene teškim metalima u toku gajenja i obrade. S obzirom na mogućnost akumulacije teških metala u biljkama, povećava se relevantnost i svrsishodnost određivanja njihovog sadržaja. Čovekov organizam zahteva unošenje mikro i makro elemenata u određenim količinama koje su neophodne za razvoj i dobro zdravlje. Sadržaj teških metala je jedan od kriterijuma za korišćenje biljnog materjala u pripremanju tradicionalnih biljnih preparata (Nookabkaew i sar., 2006).

Poznavanje mineralnih materija i mikroelemenata u proizvodima biljnog porekla je od bitne važnosti sa aspekta hranljive i fiziološke vrednosti, zdravstvene ispravnosti i primjenjenog procesa proizvodnje, odnosno prerade.

Manji sadržaj korisnih metala može da ukaže na nedovoljno učešće sirovine u nekim proizvodima, ili neadekvatno primjenjen i izведен tehnološki postupak, a sadržaj teških toksičnih metala na nedozvoljenu kontaminaciju u toku proizvodnje, prerade i pakovanja proizvoda.

Mikroelementi su oni hemijski elementi koji se nalaze u ljudskom organizmu u koncentraciji od 0.1 do 0.0001 % (Jaredić i sar., 1982). U grupu mikroelemenata spadaju Fe, Cu, Zn i Mn. Biljke su direktni ili indirektni izvor ovih mikroelemenata u ljudskoj ishrani. Veća koncentracija Cu, Fe i Zn iznad dozvoljene, svodi ove metale na toksične. Fe dolazi u organizam preko crevnog trakta hrana u kojoj se nalazi u obliku organskih i neorganskih jedinjenja. U normalnim uslovima hrana sadrži od 5 do 20 puta više Fe nego što se apsorbuje. Dnevno se obično apsorbuje oko 1 mg tog mikronutrijenta. Preporučeni dnevni unos za muškarce je 15 mg/dan, a za žene 32 mg/dan.

Bakar je esencijalni element za čoveka i široko je rasprostranjen u zemljji, vodi i u svim namirnicama. Sa hranom čovek unosi dnevno 2 do 5 mg Cu (Jaredić i sar., 1982).

Dnevne potrebe odraslog čoveka za bakrom su od 2 do 3 mg. Soli bakra su u većim koncentracijama toksične. Količina od 1 do 2 g bakra izaziva simptome teškog trovanja, nekad sa smrtnim ishodom. Pri tome nastaje hemoliza, destruktivne promene u mozgu i jetri.

Cink je esencijalni element prisutan u biljnim i animalnim organizmima i čini sastavni deo niza njegovih enzimatskih sistema. Preporučeni dnevni unos za odrasle oba pola je 12 mg/dan.

U biljkama i njihovim ekstraktima nalaze se određene količine metala. U tabeli 3.8.1. prikazani su sadržaji metala u biljnom materijalu i ekstraktima ispitivanih biljaka.

Tabela 3.8.1. Uporedni pregled sadržaja metala u ispitivanim biljnim vrstama

Vrsta	Ekstrakt	Fe ($\mu\text{g/g}$)	Zn ($\mu\text{g/g}$)	Cu ($\mu\text{g/g}$)	Mn ($\mu\text{g/g}$)
<i>Papaver rhoeas L.</i>	Biljka	423.32 \pm 8.47	31.80 \pm 0.64	35.50 \pm 0.71	20.61 \pm 0.41
	Voda	-	2.20 \pm 0.04	-	-
	Etanol	78 \pm 1.56	3.50 \pm 0.07	22.10 \pm 0.44	16.4 \pm 0.33
	etanol 50 %	-	7.60 \pm 0.52	5.30 \pm 0.10	-
<i>Crataegus oxyacantha L.</i>	Biljka	172.16 \pm 3.44	50.80 \pm 1.02	9.97 \pm 0.19	16.02 \pm 0.30
	Voda	29 \pm 0.58	5.60 \pm 0.11	3.26 \pm 0.06	2.70 \pm 0.05
	Etanol	118 \pm 2.36	20.10 \pm 0.40	2.85 \pm 0.06	7.20 \pm 0.14
	etanol 50 %	-	35.70 \pm 0.71	0.52 \pm 0.01	-
<i>Prunus spinosa L.</i>	Biljka	261.60 \pm 5.23	62.20 \pm 1.24	8.91 \pm 0.18	9.15 \pm 0.18
	Voda	-	12.70 \pm 0.25	-	-
	Etanol	91 \pm 1.82	7.10 \pm 0.14	2.33 \pm 0.05	2.14 \pm 0.04
	etanol 50 %	-	5.20 \pm 0.10	-	-
<i>Cichorium intybus L.</i>	Biljka	402.14 \pm 8.04	32.40 \pm 0.65	20.50 \pm 0.41	49.39 \pm 0.98
	Voda	-	-	1.10 \pm 0.02	-
	Etanol	68 \pm 0.58	28.77 \pm 0.57	8.50 \pm 0.17	7.21 \pm 0.14
	etanol 50 %	29 \pm 0.58	3.70 \pm 0.07	3.20 \pm 0.06	4.80 \pm 0.09
<i>Origanum vulgare L.</i>	Biljka	152 \pm 3.04	49.65 \pm 0.99	23.95 \pm 0.48	21.80 \pm 0.44
	Voda	-	29.10 \pm 0.58	4.53 \pm 0.09	-
	Etanol	112.69 \pm 2.25	22.30 \pm 0.45	3.85 \pm 0.08	16.3 \pm 0.33
	etanol 50 %	-	22.00 \pm 0.45	0.40 \pm 0.08	-
<i>Calendula officinalis L.</i>	Biljka	137.53 \pm 2.75	18.15 \pm 0.36	12.82 \pm 0.26	24.38 \pm 0.48
	Voda	16 \pm 0.32	4.46 \pm 0.09	1.50 \pm 0.03	5.40 \pm 0.11
	Etanol	76 \pm 1.57	5.28 \pm 0.10	2.40 \pm 0.05	13.71 \pm 0.27
	etanol 50 %	17 \pm 0.34	4.42 \pm 0.09	1.10 \pm 0.02	3.60 \pm 0.07
<i>Delphinidium consolida L.</i>	Biljka	286.50 \pm 5.73	39.84 \pm 0.79	23.06 \pm 0.46	13.84 \pm 0.28
	Voda	14 \pm 0.28	11.00 \pm 0.22	1.60 \pm 0.03	-
	Etanol	176 \pm 3.52	14.00 \pm 0.28	18.80 \pm 0.37	3.32 \pm 0.07
	etanol 50 %	-	12.20 \pm 0.24	3.60 \pm 0.07	-

Mangan utiče na aktivnost mnogih vitalnih enzima i hormona (kofaktor je arginaze i drugih enzima). Učestvuje u formiranju skeleta, u reakcijama imuniteta, pomaze sintezu hemoglobina. Nedostatak Mn dovodi do abnormalnosti trombocita, dermatitisa, anoreksije, poremećaja koagulacije i hipohesterolemije. Dnevne potrebe organizma za manganom su od 2.5 do 5.0 mg/dan (Vucetic i sar., 1997).

Za identifikaciju i kvantifikaciju metala u uzorcima biljaka sa područja Jugoistočne Srbije korišćena je AAS metoda.

Sadržaj gvožđa je bio najveći u odnosu na sve ispitivane metale i varirao je u opsegu od 137.53 do 42.32 mg/kg biljne mase. Najveći sadržaj Fe ima bulka, a najmanji neven. Sadržaj Fe u ispitivanim ekstraktima je znatno manji od sadržaja Fe u biljnem materijalu. Sadržaj gvožđa u etanolnim ekstraktima biljaka se kreće od 76.0 do 176.0 µg/g, u ekstraktima etanola 50 % je od 0.0 do 29.0 µg/g i u vodenom ekstraktu od 0.0 do 29.0 µg/g ispitivanog uzorka. Sadržaj gvožđa je najveći u etanolnim ekstraktima i redosled biljaka po opadajućim vrednostima gvožđa je sledeći: *Delphinidum consolida* L.> *Crataegus oxyacantha* L.> *Origanum vulgare* L.> *Prunus spinosa* L.> *Papavear rhoes* L.> *Calendula officinalis* L.> *Cichorium intybus* L.

Sadržaji Cu, Zn i Mn u biljnem materijalu su znatno niži i kreću se u intervalu od 8.91 do 62.20 µg/g.

Sadržaj Zn je najveći u bobicama trnjine 62.20 µg/g, a najmanja u nevenu 18.15 µg/g. Sadržaj cinka u ekstraktima je znatno niži. Sadržaj cinka u etanolnom ekstraktu se kreće od 3.5 do 28.8 µg/g, u ekstraktu etanola 50 % od 3.7 do 35.7 µg/g i u vodenom ekstraktu je od 0.0 do 29.1 µg/g ispitivanog uzorka. Najveći sadržaj cinka imaju etanolni 50 % ekstrakti, a redosled biljaka po opadajućim vrednostima cinka je sledeći: *Crataegus oxyacantha* L.> *Origanum vulgare* L.> *Cichorium intybus* L.> *Delphinidum consolida* L.> *Prunus spinosa* L.> *Papavear rhoes* L.> *Calendula officinalis* L.> *Cichorium intybus* L.

Najveći sadržaj bakra je detektovan u suvom materijalu bulke 35.50 µg/g, a najmanji u trnjini 8.91 µg/g. Sadržaj bakra u etanolnim ekstraktima se kreće od 2.3 do 22.1 µg/g, u ekstraktima etanola 50 % je od 0 do 5.3 µg/g, a u vodenim ekstraktima od 0.0 do 4.5 µg/g ispitivanog uzorka. Redosled biljaka po opadajućim vrednostima bakra je u etanolnom ekstraktu sledeći: *Papavear rhoes* L.> *Delphinidum consolida* L.> *Cichorium intybus* L.> *Origanum vulgare* L > *Crataegus oxyacantha* L.> *Calendula officinalis* L.> *Prunus spinosa* L.

Sadržaj mangana je najveći u suvom materijalu cikorije $49.39 \mu\text{g/g}$, a najmanji u trnjini $9.15 \mu\text{g/g}$. Sadržaj mangana je najveći u etanolnim ekstraktima biljaka i kreće se od 2.1 do $16.4 \mu\text{g/g}$ ispitivanog uzorka. U vodenim ekstraktima etanola 50 % sadržaj mangana se kreće od 0.0 do $5.4 \mu\text{g/g}$ ispitivanog uzorka. Redosled biljaka po opadajućim vrednostima mangana u etanolnim ekstraktima je sledeći: *Papaver rhoeas* L.> *Origanum vulgare* L. > *Calendula officinalis* L.> *Crataegus oxyacantha* L.> *Cichorium intybus* L.>*Delphinidium consolida* L.> *Prunus spinosa* L.

Utvđeno je da biljke najviše sadrže Fe, dok je sadržaj Zn, Cu i Mn znatno niži. Određene koncentracije teških metala u ispitivanim biljkama su ispod granice koja je dozvoljena za lekovito bilje. Teški metali Ni, Cd i Pb nisu detektovani u biljnem materijalu i ekstraktima ispitivanih biljaka. To je verovatno zato što su to samonikle biljke koje rastu u nezagadenom delu Jugoistočne Srbije .

U tabeli 3.8.2. prikazan je sadržaj metala u lekovitom bilju sa različitim područja.

Tabela 3.8.2. Sadržaj teških metala u uzorcima lekovitog bilja sa različitim područja

Oblast	Koncentracija metala u uzorcima lekovitog bilja ($\mu\text{g/g}$)							Ref.
	Zn	Mn	Fe	Pb	Ni	Cu	Cd	
Srbija	11.75-32.25	6.00-46.61	65.25-490.62	7.75-20.07	1.97-3.95	13.0-46.5	0.62-1.75	ovaj rad
Pakistan	55.3-70	24.6-28.9	125.2-157.1			12.2-14.3		Pirzada i sar., 2009
Srbija	31-34	106-111		4.5-5.5	27-58	19-22	0.5-0.75	Radanović i sar., 2007
Pakistan	17.38-65.85	34.14-105.56	181.63-6796.88	3.15-10.63	2.6-15.8	7.06-19.19	0.59-1.66	Jabeen i sar., 2010
Indija				0.48-1.03	1.1-5.3	15.9-32.2	0.05-0.38	Seenivasan i sar., 2008
Iran				2.08-2.59		17.59-32.8		Karimi i sar., 2008
Saudijska Arabija	26.69-56.78	60-900	123.9-1755.6	0.03-14.48	2.46-8.9	9.04-40.66	0.01-0.37	Gebretsadik i Chandravanshi, 2010
Egipat	8-68.8	9.8-289	26.96-1046	0.5-14.4	0.61-2.85	1.8-11.4	1.06-2.44	Abou- Arab i Abou Donia, 2000
Turska	21.9-48.4	23-244	224.8-810	0.26-4.80	0.90-5.4	3.92-35.8	0.004-0.44	Basgel i Erdemoglu, 2006
Etiopija	20.2-21.6	1242-1421	319-467			9.1-11.5		Saud i Oud, 2003

Upoređujući naše rezultate za sadržaj teških metala u ispitivanim biljkama sa rezultatima drugih autora iz regiona jugoistočne Srbije, zapažamo da su vrlo slični. Radanović i saradnici su dobili koncentraciju Cu u biljci *Gentiana lutea* L. od 19 do 22 mg/kg i koncentraciju Zn od 31 do 34 mg/kg. (Radanović i sar., 2008). Sadržaj metala u biljkama sa geografski različitim podneblja je različit, a najviše zavisi od karakteristika zemljišta na kome se gaji.

Analiza biljnih ekstrakata je pokazala da postoji značajan transfer teških metala tokom procesa ekstrakcije, tako da odgovarajući ekstraktionski koeficijenti variraju u opsegu od 0 do 88.8 %. Oni su posebno visoki u etanolnom ekstraktu. Utvrđeno je da ekstraktionski koeficijenti najviše zavise od vrste rastvarača i tretirane biljne vrste. Na osnovu dobijenih rezultata, analizirane biljke mogu se svrstati u tri grupe: biljke sa niskim koeficijentom ekstrakcije (manje od 10 %); biljke sa srednjim koeficijentom ekstrakcije (10- 30 %), i biljke sa visokim koeficijentom ekstrakcije (više od 30 %). Ekstraktionski koeficijenti zavisi od ekstraktionskog sredstva. Najmanji transverzalni teški metali imaju voden ekstrakti, a najviši etanolni ekstrakti. Ekstraktionski koeficijenti zavisi i od biljne vrste koja se ekstrahuje. Voda i vodeno etanolni ekstrakti imaju nisku efikasnost ekstrakcije Fe; srednju efikasnost Mn i Cu ekstrakcije, i visoku efikasnost ekstrakcije Zn. Etanolni ekstrakti svih biljaka imaju srednje i visoke efikasnosti ekstrakcije ispitivanih biljaka. Na osnovu ovih rezultata, voden ekstrakti imaju najmanji sadržaj teških metala. To je veoma korisno kada se zna da se ove biljne vrste najčešće konzumiraju u obliku čajeva. Dobijeni rezultati ukazuju da lekovito bilje sa područja Jugoistočne Srbije može biti korišćeno za pripremu čajeva i lekovitih ekstrakata, zbog niskog sadržaja teških metala.

3.9. UPOREDNA I KORELACIONA ANALIZA DOBIJENIH REZULTATA

U tabeli 3.9.1. prikazan je sadržaj ukupnih fenola, flavonoida, antioksidativne aktivnosti i sadržaja metala u biljkama i njihovim ekstraktima. (Prilog 1).

Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u etanolnim ekstraktima se kreće od 2.1 do 31.9 mg GAE/g, u ekstraktima etanola 50 % od 4.8 do 75.2 mg GAE/g ispitivanog uzorka i u vodenom ekstraktu od 8,6 do 74 mg GAE/g ispitivanog uzorka.

Najveći sadržaj ukupnih fenola imaju etanolni 50 % ekstrakti vranilovke 75.2 mg GAE/g ispitivanog uzorka, a najmanji etanolni ekstrakti gloga 2.1 mg GAE/g ispitivanog uzorka.

Vodeni ekstrakti imaju veći sadržaj ukupnih fenola u odnosu na ekstrakte etanola 50 % i etanola, sa izuzetkom trnjine. Redosled biljaka po opadajućem sadržaju ukupnih fenola u vodenom ekstraktu je sledeći:

Origanum vulgare L.> *Calendula officinalis* L.>*Crataegus oxyacantha* L.>
Delphinidium consolida L > *Prunus spinosa* L.> *Papavear rhoes* L.> *Cichorium intybus* L.

Sadržaj antocijana u ispitivanim ekstraktima je znatno manji od sadržaja ukupnih fenola.

Sadržaj antocijana u etanolnom ekstraktu je od 0.11 do 5.19 mg cijanidin-3-*O*-glukozid/g ispitivanog uzorka. U ekstraktu etanola 50 % sadržaj antocijana se kreće od 0.23 do 4.73 mg cijanidin-3-*O*-glukozid/g ispitivanog uzorka i u vodenom ekstraktu sadržaj antocijana je od 0.11 do 4.96 mg cijanidin-3-*O*-glukozid/g ispitivanog uzorka.

Najveći sadržaj antocijana imaju ekstrakti bulke, a absolutno najveći sadržaj ima etanolni ekstrakt 5.19 mg cijanidin-3-*O*-glukozid/g ispitivanog uzorka. Zatim po sadržaju antocijana slede ekstrakti nevena, gloga i trnjine. Najefikasnije ekstrakciono sredstvo za antocijane je ekstrakt etanola 50 %. Redosled biljaka po opadajućim sadržajima antocijana u ekstraktu etanola 50 % je sledeći: *Papavear rhoes* L.>
Calendula officinalis L.> *Crataegus oxyacantha* L.> *Origanum vulgare* L.>
Delphinidium consolida L.> *Cichorium intybus* L.>*Prunus spinosa* L.

Vodeni i etanolni ekstrakti *Origanum vulgare* L., *Delphinidium consolida* L. i *Cichorium intybus* L. ne poseduju količine antocijana koje se mogu kvantitativno odrediti datom metodom.

Sadržaj flavonoida u ispitivanim ekstraktima je znatno manji od sadržaja ukupnih fenola. Sadržaj flavonoida u etanolnom ekstraktu se kreće od 0.1 do 9.5 mg QE/g ispitivanog uzorka, u ekstraktu etanola 50 % od 0.2 do 9.0 mg QE/g ispitivanog uzorka, a u vodenom ekstraktu sadržaj flavonoida se kreće od 0.1 do 11.4 mg QE/g ispitivanog uzorka.

Redosled biljaka po opadajućem sadržaju flavonoida u ekstraktima etanola 50 % je sledeći: *Papaver rhoes* L.> *Origanum vulgare* L.> *Delphinidium consolida* L.> *Prunus spinosa* L.> *Crataegus oxyacantha* L.> *Cichorium intybus* L.> *Calendula officinalis* L.

Sličan redosled biljaka po sadržaju flavonoida je i u etanolnom i u vodenom ekstraktu.

Antioksidativna aktivnost ispitivanih biljaka je od 27.3 do 93.8 % u etanolnom, od 72.1 do 96.8 % u ekstraktu etanola 50 % i od 32.0 do 89.7 % u vodenom ekstraktu.

Najveću antioksidativnu aktivnost imaju etanolni 50 % ekstrakti nevena 96.8 %, a najmanji etanolni ekstrakti nevena 27.3 %. Od svih ekstrakata najveće vrednosti antioksidativne aktivnosti imaju ekstrakti etanola 50 %. Redosled biljaka po opadajućim vrednostima antioksidativne aktivnosti ekstrakta etanola 50 % je sledeći: *Calendula officinalis* L.> *Delphinidium consolida* L.> *Origanum vulgare* L.> *Cichorium intybus* L.> *Papaver rhoes* L.> *Crataegus oxyacantha* L.> *Prunus spinosa* L.

Generalno svi ispitani ekstrakti imaju visoku antioksidativnu aktivnost.

Pored ostalih ispitivanja, u ekstraktima izabranih biljnih vrsta sa područja Jugoistočne Srbije određena je korelacija između sadržaja polifenolnih jedinjenja i sadržaja metala. U tabeli 3.9.2. prikazani su koreacioni koeficijenti ukupnih fenola, flavonoida, sadržaja teških metala i antioksidativne aktivnosti u ekstraktima ispitivanih biljnih vrsta.

Postoji vrlo značajan koeficijent korelacije između ukupnih fenola, flavonoida, sadržaja teških metala i antioksidativne aktivnosti u ekstraktima ispitivanih biljnih vrsta, posebno za *Origanum vulgare* L. i *Delphinidium consolida* L.

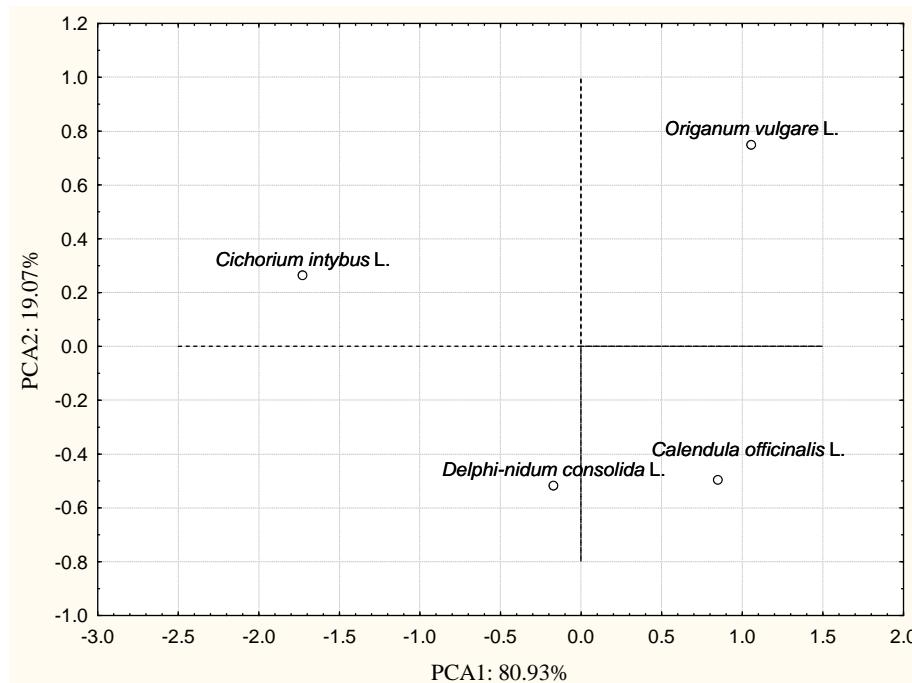
Tabela 3.9.2. Korelacioni koeficijenti ukupnih fenola, flavonoida, sadržaja teških metala i antioksidativne aktivnosti u ekstraktima ispitivanih biljnih vrsta.

Biljke	-	Ukupni fenoli	Ukupni flavonoidi	(RSC)	Fe	Zn	Cu	Mn
<i>Papaver rhoeas L.</i>	Ukupni fenoli	1.0	0.85	0.64	0.40	0.31	0.63	0.40
	Ukupni flavonoidi		1.0	0.13	0.11	0.65	0.29	0.11
	(RSC)			1.0	0.99	0.06	0.96	0.99
	Fe				1.0	0.08	0.94	1.0
	Zn					1.0	0.00	0.08
	Cu						1.0	0.94
	Mn							1.0
<i>Crataegus oxyacantha L.</i>	Ukupni fenoli	1.0	0.43	0.58	0.79	0.04	0.02	0.66
	Ukupni flavonoidi		1.0	0.00	0.05	0.76	0.41	0.01
	(RSC)			1.0	0.94	0.21	0.56	0.99
	Fe				1.0	0.06	0.34	0.97
	Zn					1.0	0.87	0.15
	Cu						1.0	0.47
	Mn							1.0
<i>Prunus spinosa L.</i>	Ukupni fenoli	1.0	0.99	0.99	0.02	0.82	0.02	0.02
	Ukupni flavonoidi		1.0	0.99	0.02	0.01	0.02	0.02
	(RSC)			1.0	0.01	0.83	0.01	0.01
	Fe				1.0	0.07	1.0	1.0
	Zn					1.0	0.07	0.07
	Cu						1.0	1.0
	Mn							1.0
<i>Cichorium intybus L.</i>	Ukupni fenoli	1.0	0.8	0.9	0.5	0.2	0.40	0.8
	Ukupni flavonoidi		1.0	1.0	0.1	0.6	0.8	1.0
	(RSC)			1.0	0.8	0.6	0.7	1.0
	Fe				1.0	0.9	1.0	0.9
	Zn					1.0	1.0	0.7
	Cu						1.0	0.8
	Mn							1.0
<i>Calendula officinalis L.</i>	Ukupni fenoli	1.0	0.1	0.6	0.2	0.1	0.0	0.1
	Ukupni flavonoidi		1	0.7	0.5	0.6	0.8	0.7
	(RSC)			1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
	Fe				1.0	1.0	0.9	1.0
	Zn					1.0	0.9	1.0
	Cu						1.0	1.0
	Mn							1.0
<i>Origanum vulgare L.</i>	Ukupni fenoli	1.0	1.0	0.6	1.0	0.2	0.1	1.0
	Ukupni flavonoidi		1.0	0.7	1.0	0.3	0.1	1.0
	(RSC)			1.0	0.6	0.9	0.1	0.6
	Fe				1.0	0.2	0.1	1.0
	Zn					1.0	0.4	0.2
	Cu						1.0	0.1
	Mn							1.0
<i>Desmodium consolida L.</i>	Ukupni fenoli	1.0	0.2	0.4	0.3	0.0	0.1	0.2
	Ukupni flavonoidi ^b		1.0	0.5	0.6	0.9	1.0	0.1
	(RSC)			1.0	1.0	0.7	0.9	1.0
	Fe				1.0	0.8	1.0	1.0
	Zn					1.0	0.9	0.8
	Cu						1.0	1.0
	Mn							1.0

Radi bolje ilustracije, koristili smo PCA analizu, kojom smo predstavili zavisnost sadržaja polifenolnih jedinjenja i koncentracije metala, odabralih biljnih uzoraka.

Prva PCA analiza urađena je za četiri biljke: *Origanum vulgare L.*, *Calendula officinalis L.*, *Delphinidium consolida L.* i *Cichorium intybus L.*

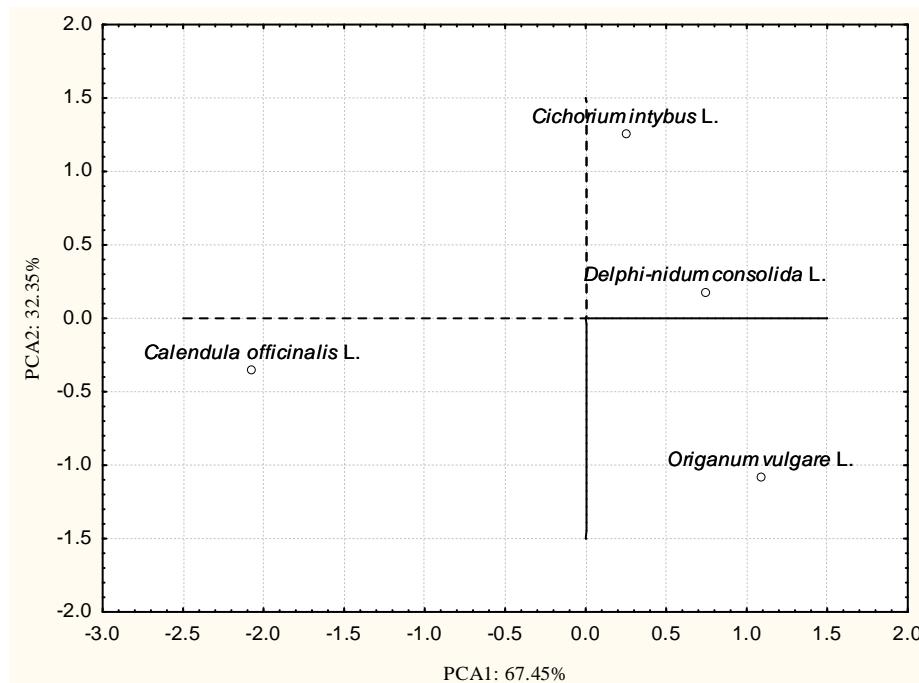
PCA je korišćena da se pronađe koje vidljive promenljive veličine (metali i ukupni fenoli ekstrahovani pomoću različitih rastvarača) su povezane sa specifičnom glavnom komponentom (latentnom promenljivom veličinom), a koja je povezana sa osnovnom promenljivom veličinom (uzorci biljke). Svaka glavna komponenta (PC) povezana je sa sopstvenom vrednošću (karakterističnom vrednošću, eigenvalue), PC1 ima najveću karakterističnu vrednost i nosi najveću varijansu izvornih podataka, a sledeće PC-i (glavne komponente) nose varijansu po opadajućem redosledu. Skrining test koga je predložio (Cattell, 1996) pokazuje da su samo prve dve glavne komponente (PC-i) sadržale značajne informacije. Rezultati PCA prikazuju grafički dijagram. Grafik rezultata pokazuje zavisnost između uzoraka (uzorci biljke). Svaka tačka čije su koordinate rezultati glavnih komponenti (ose na grafiku) odgovara jednom uzorku. Kada uzorak ima visoko faktorsko opterećenje (termin iz Faktorske analize– prim. prev.) na specifičnoj komponenti, to znači da uzorak ima visoku vrednost promenljive veličine. Relacija između PC1 koja je objasnila 80.9% ukupne varijanse, i PC2 koja je objasnila ostalih 19.1 % na bazi sadržaja ukupnog fenola prikazana je na Slici 3.9.1.



Slika 3.9.1. Grafik rezultata glavne komponente (PC1 i PC2) ispitivanih uzoraka biljke na bazi sadržaja ukupnog fenola

Sa slike 3.9.1 može se zapaziti da *Origanum vulgare* L. i *Calendula officinalis* L. imaju pozitivna opterećenja na PC1. Drugim rečima, ove dve biljke imaju viši sadržaj ukupnih fenola nego one na levoj strani. Isto tako, rezultati pokazuju da sadržaj ukupnih fenola opada u nizu *Origanum vulgare* L. > *Calendula officinalis* L. > *Delphinidium consolida* L. > *Cichorium intybus* L.

Grafik rezultata glavne komponente (PC1 i PC2) ispitivanih uzoraka biljaka na bazi sadržaja metala prikazan je na slici 3.9.2.

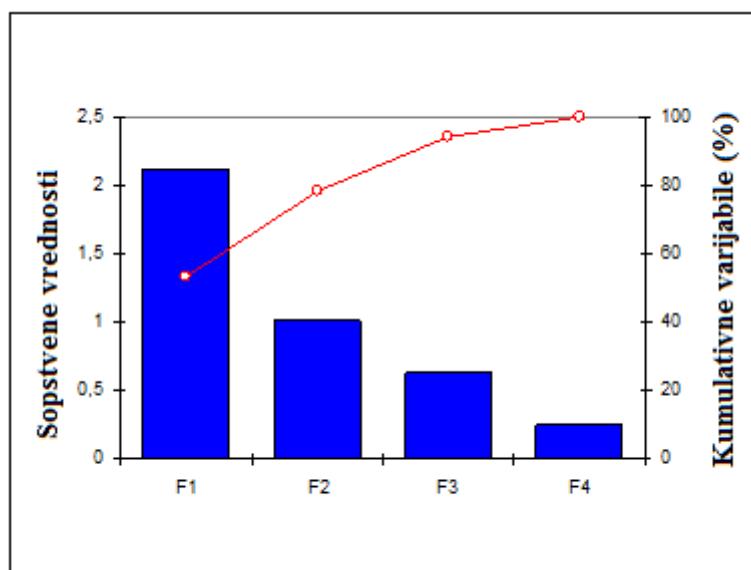


Slika 3.9.2. Grafik rezultata glavne komponente (PC1 i PC2) ispitivanih uzorka biljaka na bazi sadržaja metala.

U slučaju sadržaja metala u uzorcima odabralih biljaka na Slici 3.8.2. PC1 obuhvata 67.4% a druga PC (glavna komponenta) obuhvata 32.3% ukupne varijanse u grupi podataka i ima visoka pozitivna opterećenja za *Cichorium intybus* L., *Delphinidum consolida* L., a *Origanum vulgare* L, *Calendula officinalis* L. imaju negativan rezultat za PC2.

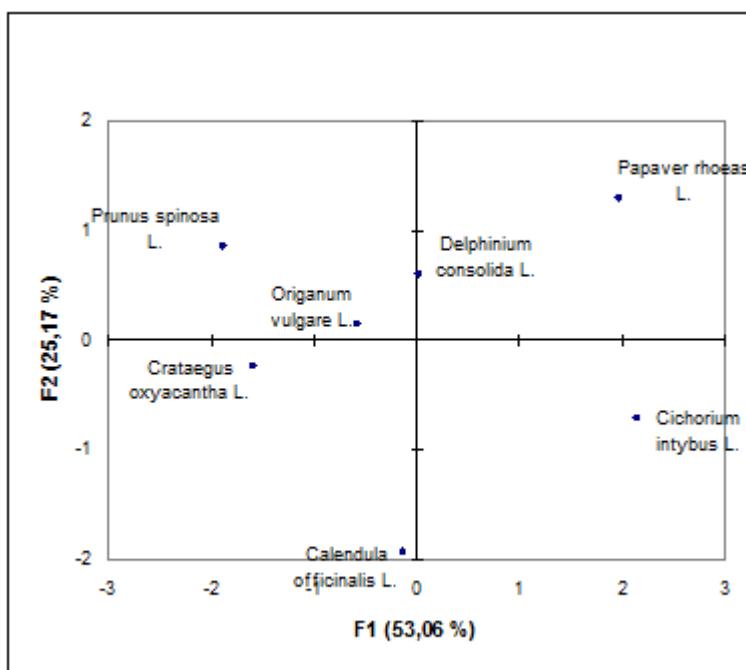
Urađena je PCA analiza dobijenih rezultata za sve ispitivane biljke i njihove ekstrakte .

Izvedene statistike sa Pearsonove korelacione matrice na biljnim uzorcima na osnovu sadržaja metala pokazuje da postoji umerena korelacija između količine gvožđa i bakra (0.606), i niske korelacije između gvožđa i mangana (0.401) i bakar i mangan (0.206). Broj faktora predstavlja ukupan broj promenljivih korišćenih podataka. Sopstvene vrednosti za prvi i drugi faktor su veće (2.122 i 1.007, respektivno) u odnosu na vrednosti za treći i četvrti faktor (0.628 i 0.243, respektivno), tako da se nijedan od faktora ne može izostaviti u objašnjenju podataka. Dakle, svi faktori moraju da se koristi za objašnjenje dobijenih varijabli (53.06 %, 25.17 %, 15.69 % i 6.08 %) (Histogram 3.9.1.). Najbolje objašnjenje varijabli postiže se pomoću prva dva faktora.



Histogram 3.9.3. Histogram značaja faktora i vrednosti kumulativnih varijabli

Rezultati PCA analize na bazi sadržaja metala prikazani su na slici 3.9.3. u zavisnosti od faktora F1 i F2.



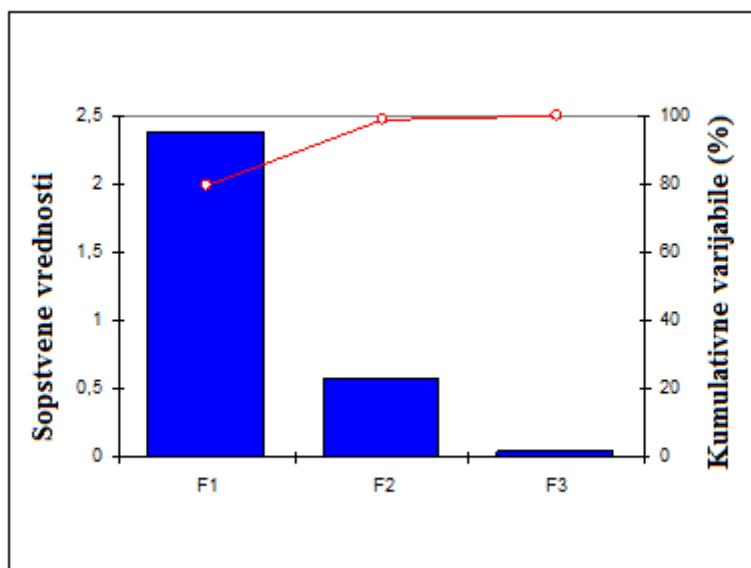
Slika 3.9.4. PCA analiza ispitivanih biljaka na bazi sadržaja metala (F1 i F2)

Na slici 3.9.4., vidljivo je da je najveći sadržaj gvožđa u biljkama *Cichorium intibus* L. i *Papaver rhoeas* L. Takođe se vidi da je sadržaj cinka najveći u biljci *Prunus spinosa* L.

Rezultati PCA analize na bazi kombinacije faktora (F2 i F3), kao i F3 i F4 daju manje informacija jer njihov zbir pokriva manji broj varijabli.

Izvedene statistike sa Pearsonove korelacione matrice na biljnim uzorcima na osnovu ukupnog sadržaja fenola pokazuju da postoji snažna korelacija između količine ukupnih fenola u vodenim i ekstraktima etanola 50 % (0.948), a umerena korelacija između količine ukupnih fenola u vodenim i etanolnim ekstraktima (0.596) i niska korelacija između količine ukupnih fenola u etanolnim i ekstraktima etanola 50 % (0.496).

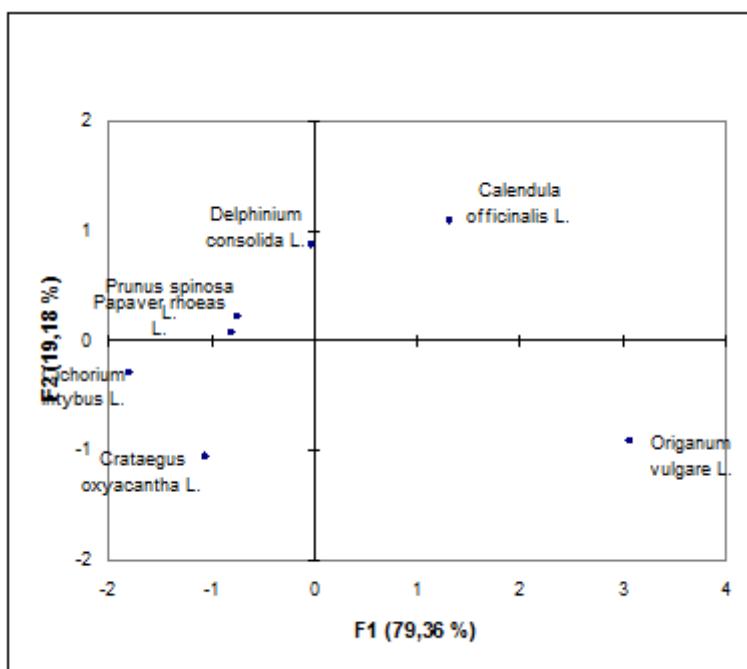
Sopstvene vrednosti za prvi i drugi faktor su veće (2.381 i 0.575, respektivno) u odnosu na vrednosti za treći faktor (0.044), što znači da prvi i drugi faktor mogu objasniti dobijene varijable (79.36 % i 19.18 %, respektivno) (Histogram 3.9.2.).



Histogram 3.9.5. Histogram značaja faktora i vrednosti kumulativnih varijabli

U ovom slučaju, vrednosti faktora F1 i F2 su najveće i pokrivaju preko 98 % varijabli.

Rezultati PCA analize na osnovu sadržaja ukupnih fenola predstavljen je na slici 3.9.4.



Slika 3.9.6. PCA analiza ispitivanih biljaka na bazi sadržaja ukupnih fenola (F1 i F2)

Sa slike 3.9.6. može se zaključiti da je najveća količina ukupnih fenola među ispitivanim biljkama prisutna u vodenim ekstraktima u *Origanum vulgare* L.

4. ZAKLJUČAK

U ovom radu je izvršeno ispitivanje sadržaja ukupnih fenola, antocijana, flavonoida, teških metala u ekstraktima samoniklih biljaka sa područja Jugoistočne Srbije (bulke, gloga, trnjine, cikorije, nevena, vranilovke i žavornjaka). Ispitana je antioksidativna i mikrobiološka aktivnost određenih ekstrakata.

Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u etanolnim ekstraktima se kreće od 2.1 do 31.9 mg GAE/g, u ekstraktima etanola 50 % od 4.8 do 75.2 mg GAE/g ispitivanog uzorka i u vodenom ekstraktu od 8.6 do 74.3 mg GAE/g ispitivanog uzorka.

Najveći sadržaj ukupnih fenola imaju etanolni 50 % ekstrakti vranilovke 75.2 mg GAE/g ispitivanog uzorka, a najmanji etanolni ekstrakti gloga 2.1 mg GAE/g ispitivanog uzorka.

Vodeni ekstrakti imaju veći sadržaj ukupnih fenola u odnosu na ekstrakte etanola 50 % i etanola, sa izuzetkom trnjine. Redosled biljaka po opadajućem sadržaju ukupnih fenola u vodenom ekstraktu je sledeći:

Origanum vulgare L.> *Calendula officinalis* L.> *Crataegus oxyacantha* L.> *Delphinidium consolida* L.> *Prunus spinosa* L.> *Papaver rhoes* L.> *Cichorium intybus* L.

Sadržaj antocijana u ispitivanim ekstraktima je znatno manji od sadržaja ukupnih fenola.

Sadržaj antocijana u etanolnom ekstraktu je od 0.11 do 5.19 mg cijanidin-3-*O*-glukozid/g ispitivanog uzorka. U ekstraktu etanola 50 % sadržaj antocijana se kreće od 0.23 do 4.73 mg cijanidin-3-*O*-glukozid/g ispitivanog uzorka i u vodenom ekstraktu sadržaj antocijana je od 0.11 do 4.96 mg cijanidin-3-*O*-glukozid/g ispitivanog uzorka.

Najveći sadržaj antocijana imaju ekstrakti bulke, a absolutno najveći sadržaj ima etanolni ekstrakt 5.19 mg cijanidin-3-*O*-glukozid/g ispitivanog uzorka. Zatim po sadržaju antocijana slede ekstrakti nevena, gloga i trnjine. Najefikasnije ekstrakcione sredstvo za antocijane je ekstrakt etanola 50 %. Redosled biljaka po opadajućim sadržajima antocijana u ekstraktu etanola 50 % je sledeći: *Papaver rhoes* L.> *Calendula officinalis* L.> *Crataegus oxyacantha* L.> *Origanum vulgare* L.> *Delphinidium consolida* L.> *Cichorium intybus* L.>*Prunus spinosa* L.

Voden i etanolni ekstrakti *Origanum vulgare* L., *Delphinidum consolida* L. i *Cichorium intybus* L. ne poseduju količine antocijana koje se mogu kvantitativno odrediti datom metodom.

Sadržaj flavonoida u ispitivanim ekstraktima je znatno manji od sadržaja ukupnih fenola. Sadržaj flavonoida u etanolnom ekstraktu se kreće od 0.1 do 9.5 mg QE/g ispitivanog uzorka, u ekstraktu etanola 50 % od 0.2 do 9.0 mg QE/g ispitivanog uzorka, a u vodenom ekstraktu sadržaj flavonoida se kreće od 0.1 do 11.4 mg QE/g ispitivanog uzorka.

Redosled biljaka po opadajućem sadržaju flavonoida u ekstraktima etanola 50 % je sledeći: *Papavear rhoes* L.> *Origanum vulgare* L.> *Delphinidum consolida* L.> *Prunus spinosa* L.> *Crataegus oxyacantha* L.> *Cichorium intybus* L.> *Calendula officinalis* L.

Sličan redosled biljaka po sadržaju flavonoida je i u etanolnom i u vodenom ekstraktu.

Antioksidativna aktivnost ispitivanih biljaka je od 27.3 do 93.8 % u etanolnom, od 72.1 do 96.8 % u ekstraktu etanola 50 % i od 32.0 do 89.7 % u vodenom ekstraktu.

Najveću antioksidativnu aktivnost imaju etanolni 50 % ekstrakti nevena 96,8 %, a najmanji etanolni ekstrakti nevena 27,3 %. Od svih ekstrakata najveće vrednosti antioksidativne aktivnosti imaju ekstrakti etanola 50 %. Redosled biljaka po opadajućim vrednostima antioksidativne aktivnosti ekstrakta etanola 50 % je sledeći: *Calendula officinalis* L.> *Delphinidum consolida* L.> *Origanum vulgare* L.> *Cichorium intybus* L.> *Papavear rhoes* L.> *Crataegus oxyacantha* L.> *Prunus spinosa* L.

Generalno svi ispitani ekstrakti imaju visoku antioksidativnu aktivnost.

HPLC analizom utvrđeno je da ekstrakti sveže latice bulke sadrže sledeće antocijane: delfinidin glukozid, cijanidin glukozid, petunidin glukozid, peonidin glukozid, cijanidin glukozid acilovani, petunidin- glukozid acilovani, delfinidin glukozid-p-kumarool.

HPLC analizom utvrđeno je da ekstrakti svežeg ploda gloga sadrže sledeća polifenolna jedinjenja: hlorogensku kiselINU, kafenu kiselINU, miricetin, cijanidin-3-O-glukozid, cijanidin-3-O-rutinozid, peonidin-3-O-glukozid i kvercetin.

Ispitano je mikrobiološko delovanje etanolnih ekstrakata bulke, gloga i trnjine na sledeće Gram-pozitivne bakterije *Bacillus subtilis* ATCC 6633 i *Staphylococcus*

aureus ATCC 6538 i Gram-negativne bakterije *Escherichia coli* ATCC 8739, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 i *Salmonella abony* NCTC 6017. Antigljivična aktivnost je ispitana u odnosu na dva organizma *Aspergillus niger* ATCC 16404 i *Candida albicans* ATCC 10231.

Etanolni ekstrakt bulke deluje antimikrobnog na sve ispitivane bakterije sa izuzetkom *Salmonella abony* i *Bacillus subtilis*, a pokazuje i fungicidno dejstvo na gljivicu *Candida albicans*.

Etanolni ekstrakt svežeg ploda gloga pokazuje antimikrobnu aktivnost na sve ispitivane bakterije sem na *Bacillus subtilis* i *Staphylococcus aureus*, a deluje fungicidno na gljivicu *Aspergillus niger*.

Etanolni ekstrakti svežeg ploda trnjine pokazuju antimikrobnu aktivnost na sve ispitivane bakterije sa izuzetkom *Bacillus subtilis* i deluju fungicidno na gljivice *Aspergillus niger*.

U ispitivanim biljkama iz regionala Jugoistočne Srbije određen je sadržaj metala. Utvrđeno je da biljke najviše sadrže Fe, dok je sadržaj Zn, Cu i Mn znatno niži.

Sadržaj gvožđa je bio najveći u odnosu na sve ispitivane metale i varirao je u opsegu od 137.53 do 423.32 µg/g biljne mase. Najveći sadržaj Fe ima bulka, a najmanji neven. Sadržaj Fe u ispitivanim ekstraktima je znatno manji od sadržaja Fe u biljnom materijalu. Sadržaj gvožđa u etanolnim ekstraktima biljaka se kreće od 76.0 do 176 µg/g, u ekstraktima etanola 50 % je od 0.0 do 29.0 µg/g i u vodenom ekstraktu od 0.0 do 29.0 µg/g ispitivanog uzorka. Sadržaj gvožđa je najveći u etanolnim ekstraktima i redosled biljaka po opadajućim vrednostima gvožđa je sledeći: *Delphinidum consolida* L.> *Crataegus oxyacantha* L.> *Origanum vulgare* L.> *Prunus spinosa* L.> *Papaver rhoeas* L.> *Calendula officinalis* L.> *Cichorium intybus* L.

Sadržaj Zn je najveći u bobicama trnjine 62.20 µg/g, a najmanja u nevenu 18.15 µg/g. Sadržaj cinka u ekstraktima je znatno niži. Sadržaj cinka u etanolnom ekstraktu se kreće od 3.5 do 28.8 µg/g, u ekstraktu etanola 50 % od 3.7 do 35.7 µg/g i u vodenom ekstraktu je od 0.0 do 29.1 µg/g ispitivanog uzorka. Najveći sadržaj cinka imaju etanolni 50 % ekstrakti, a redosled biljaka po opadajućim vrednostima cinka je sledeći: *Crataegus oxyacantha* L.> *Origanum vulgare* L.> *Cichorium intybus* L.> *Delphinidum consolida* L.> *Prunus spinosa* L.> *Papaver rhoeas* L.> *Calendula officinalis* L.> *Cichorium intybus* L.

Najveći sadržaj Cu je detektovan u suvom materijalu bulke 35.50 µg/g, a najmanji u trnjini 8.91 µg/g. Sadržaj bakra u etanolnim ekstraktima se kreće od 2.3 do 22.1 µg/g, u ekstraktima etanola 50 % je od 0 do 5.3 µg/g, a u vodenim ekstraktima od 0.0 do 4.5 µg/g ispitivanog uzorka. Redosled biljaka po opadajućim vrednostima bakra je u etanolnom ekstraktu sledeći: *Papavear rhoes* L.> *Delphinidum consolida* L.> *Cichorium intybus* L.> *Origanum vulgare* L.> *Crataegus oxyacantha* L.> *Calendula officinalis* L.> *Prunus spinosa* L.

Sadržaj Mn je najveći u suvom materijalu cikorije 49.39 µg/g, a najmanji u trnjini 9.15 µg/g. Sadržaj mangana je najveći u etanolnim ekstraktima biljaka i se kreće od 2.1 do 16.4 µg/g ispitivanog uzorka. U vodenim ekstraktima etanola 50 % sadržaj mangana se kreće od 0.0 do 5.4 µg/g ispitivanog uzorka. Redosled biljaka po opadajućim vrednostima mangana u etanolnim ekstraktima je sledeći: *Papavear rhoes* L.> *Origanum vulgare* L.> *Calendula officinalis* L.> *Crataegus oxyacantha* L.> *Cichorium intybus* L.> *Delphinidum consolida* L.> *Prunus spinosa* L.

Najmanji transver teških metala imaju vodeni ekstrakti, a najviši etanolni ekstrakti. Ekstrakcioni koeficijenti zavise i od biljne vrste koja se ekstrahuje. Voda i vodeno etanolni ekstrakti imaju nisku efikasnost ekstrakcije Fe; srednju efikasnost Mn i Cu ekstrakcije, i visoku efikasnost ekstrakcije Zn. Etanolni ekstrakti svih biljaka imaju srednje i visoke efikasnosti ekstrakcije ispitivanih biljaka. Na osnovu ovih rezultata, vodeni ekstrakti imaju najmanji sadržaj teških metala. To je veoma korisno kada se zna da se ove biljne vrste najčešće konzumiraju u obliku čajeva.

Pored ostalih ispitivanja, u ekstraktima izabranih biljnih vrsta sa područja Jugoistočne Srbije određena je korelacija između sadržaja polifenolnih jedinjenja i sadržaja metala. Postoji vrlo značajan koeficijent korelacije između ukupnih fenola, flavonoida, sadržaja teških metala i antioksidativne aktivnosti u ekstraktima ispitivanih biljnih vrsta, posebno za *Origanum vulgare* L. i *Delphinidum consolida* L.

Radi bolje ilustracije, koristili smo PCA analizu, kojom smo predstavili zavisnost sadržaj fenolnih jedinjenja i koncentracije metala u ekstraktima odabralih biljnih uzoraka.

SUMMARY

In this work, it was investigated the content of total phenols, anthocyanins, flavonoids, toxic metals in extracts of wild plants from Southeast Serbia (poppy, hawtorn, sloe, chicory, marigold, oregano and larkspur). It was investigated antioxidative and microbiological activity of particular extracts.

The total phenol content in ethanol extracts varies from 2,1 to 31,9 mg GAE/g , in 50 % ethanol extracts from 4,8 to 75,2 mg GAE/g of the investigated sample and in aqueous extracts from 8,6 to 74,3 mg GAE/g of the investigated sample.

The highest content of total phenols was shown in 50 % ethanol extracts of oregano, and the lowest in the ethanol extract of hawthorn (2.1 mg GAE/g of the investigated sample).

Aqueous extracts have higher content of total phenols comparing to 50 % ethanol extracts and ethanol, with the exception of sloe. The plant order in decreasing content of total phenols in aqueous extract was as following: *Origanum vulgare* L>
Calendula officinalis L. > *Crataegus oxyacantha* L. > *Delphinidium consolida* L. >
Prunus spinosa L. > *Papaver rhoes* L. > *Cichorium intybus* L.

The anthocyanins content in investigated samples is considerably lower than the content of total phenols. The anthocyanins content in ethanol extract is from 0,11 to 5,19 mg cyanidin-3-O-glucoside/g of the investigated sample. In 50% ethanol extract the anthocyanins content varies from 0,23 to 4,73 mg cyanidin-3-O-glucoside/g of the investigated sample and in aqueous extract the anthocyanins content is from 0,11 to 4,96 mg cyanidin-3-O-glucoside/g of the investigated sample.

The highest anthocyanins content has poppy extracts, and absolutely the highest content has ethanol extract-5,19 mg cyanidin-3-O-glucoside/g of the investigated sample. Then, anthocyanins content was found in lower extent in marigold, hawthorn and sloe. The most efficient combination for the extraction of anthocyanins is with 50 % ethanol. The plant order in decreased anthocyanins content in 50 % ethanol extract was as following: *Papaver rhoes* L. > *Calendula officinalis* L. > *Crataegus oxyacantha* L. > *Origanum vulgare* L. > *Delphinidium consolida* L. > *Cichorium intybus* L. > *Prunus spinosa* L. Aqueous and ethanol extracts *Origanum vulgare* L., *Delphinidium consolida* L. and *Cichorium intybus* L. do not possess anthocyanins quantities that can be quantitatively determined using described method.

Flavonoid content in investigated extracts is considerably lower than the content of total phenols. Flavonoid content in ethanol extract varies from 0,1 to 9,5 mg QE/g of the investigated sample, in 50 % ethanol extract from 0,2 to 9,0 mg QE/g of the investigated sample, and in aqueous extract the flavonoid content varies from 0,1 to 11,4 mg QE/g of the investigated sample.

The order of plants in descended content of flavonoids in 50 % ethanol extracts was as following: *Papaver rhoes* L. > *Origanum vulgare* L. > *Delphinidium consolida* L. > *Prunus spinosa* L. > *Crataegus oxyacantha* L. > *Cichorium intybus* L. > *Calendula officinalis* L.

Similar plants order in flavonoids content is in ethanol and aqueous extracts.

Antioxidative activity of the investigated plants is from 27,3 to 93,8 % in ethanol, from 72,1 to 96,8 % in 50 % ethanol extract and from 32,0 to 89,7 % in aqueous extract.

The highest antioxidative activity possesses 50 % ethanol extract of marigold- 96,8 %, and the lowest ethanol extract of marigold- 27,3 %. Among all extracts the highest values of antioxidative activity was found in 50 % ethanol extracts. The order of plants in descending values of antioxidative activities of 50 % ethanol extracts is following: *Calendula officinalis* L. > *Delphinidium consolida* L. > *Origanum vulgare* L. > *Cichorium intybus* L. > *Papaver rhoes* L. > *Crataegus oxyacantha* L. > *Prunus spinosa* L. Generally, all investigated extracts possess high antioxidative activity.

HPLC analysis was performed and it was found that extracts of fresh poppy petals contain the following anthocyanins: delphinidin glucoside, cyanidin glucoside, petunidine-3-*O*-glucoside, acylated cyaniding-3-*O*-glucoside, acylated petunidin-glucoside, delphinidin glucoside-*p*-cumaroil.

HPLC analysis also revealed that the fresh hawthorn fruit contain the following polyphenol compounds: chlorgenic acid, caffeic acid, myricetin, cyanidin-3-*O*-glucoside, cyanidin-3-*O*-rutinoside, peonidin-3-*O*-glucoside and quercetin.

It was checked microbial influence of ethanol extract of poppy, hawthorn and sloe on the following Gramm-positive bacteria *Bacillus subtilis* ATCC 6633 and *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 and Gramm negative bacteria *Escherichia coli* ATCC 8739, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 and *Salmonella abony* NCTC 6017. Antifungal activity was determined related to two organisms *Aspergillus niger* ATCC 16404 and *Candida albicans* ATCC 10231.

Ethanol extract of poppy has an effect as antimicrobial against all investigated bacteria with the exception of *Salmonella abony* and *Bacillus subtilis*, and also showed an antifungal activity against *Candida albicans*.

Ethanol extract of fresh fruit of hawthorn shown an antimicrobial activity against all investigated bacteria except *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*, and it is a fungicide against *Aspergillus niger*.

Ethanol extracts of fresh fruit of sloe show an antimicrobial activity against all investigated bacteria with the exception of *Bacillus subtilis* and it is a fungicide against *Aspergillus niger*.

In investigated plants from the region of Southeast of Serbia it was determined metals content. It was determined that plants contain in the highest quantity iron; meanwhile, the content of zinc, copper and manganese were considerably lower.

The iron content was the highest among all investigated metals and varied from 137,53 to 423,32 µg/g of plant mass. The highest content of iron was shown in poppy, and the lowest in marigold. The iron content in investigated extract was considerably lower than iron content in plant material. The iron content in plants ethanol extracts varies from 76,0 to 176 µg/g, and in 50 % ethanol extracts from 0,0 to 29,0 µg/g and in aqueous extracts from 0,0 to 29,0 µg/g of the investigated sample. The iron content was the highest in ethanol extracts and the plants order in decreasing values of iron is as following: *Delphinidum consolida* L. > *Crataegus oxyacantha* L. > *Origanum vulgare* L. > *Prunus spinosa* L. > *Papaver rhoes* L. > *Calendula officinalis* L. > *Cichorium intybus* L.

Zinc content was the highest in berries of sloe- 62,20 µg/g, and the lowest in marigold 18,15 µg/g. The zinc content in extracts was considerably lower. Zinc content in ethanol extract varies from 3,5 to 2,8 µg/g, in 50 % ethanol extract from 3,7 to 35,7 µg/g and in aqueous extract from 0,0 to 29,1 µg/g of the investigated sample. The highest content of zinc possesses 50 % ethanol extracts, and the plants order in descending zinc values is following: *Crataegus oxyacantha* L. > *Origanum vulgare* L. > *Cichorium intybus* L. > *Delphinidum consolida* L. > *Prunus spinosa* L. > *Papaver rhoes* L. > *Calendula officinalis* L. > *Cichorium intybus* L.

The highest copper content was detected in dry poppy material-35,5 µg/g, and the lowest in sloe – 8,91 µg/g. Copper content in ethanol extracts varies from 2,3 to

22,1 µg/g, in 50 % ethanolic extracts from 0 to 5,3 µg/g, and in aqueous extracts from 0,0 to 4,5 µg/g of the investigated sample. Plant order in descending values of copper in ethanol extracts is following: *Papaver rhoes* L. > *Delphinidium consolida* L. > *Cichorium intybus* L. > *Origanum vulgare* L. > *Crataegus oxyacantha* L. > *Calendula officinalis* L. > *Prunus spinosa* L.

The content of manganese is the highest in dry material of chicory -49,39 µg/g, and the lowest in hawthorn – 9,15 µg/g. Manganese content is the highest in ethanol plant extracts and varies from 2,1 to 16,4 µg/g of the investigated sample. In aqueous extracts of 50 % ethanol the manganese content varies from 0,0 to 5,4 µg/g of the investigated sample. The plants order in descending manganese values in ethanol extracts is as following: *Papaver rhoes* L. > *Origanum vulgare* L. > *Calendula officinalis* L. > *Crataegus oxyacantha* L. > *Cichorium intybus* L. > *Delphinidium consolida* L. > *Prunus spinosa* L.

The lowest transfer of toxic metals possesses aqueous extracts, and the highest ethanolic extracts. Extraction coefficients depend on plant species which are getting extracted. Aqueous and water-ethanol extracts possess low efficacy of iron extraction; the medium efficacy of manganese and copper extractions, and high efficacy of zinc extraction. Ethanol extracts of all plants have medium and high efficiencies of extraction of investigated plants. On the basis of these results, aqueous extracts possess the lowest content of toxic metals. It is very useful if we know the above mentioned facts because these plant species are consumed in the form of teas.

Beside other investigations, in the extracts of the selected plant species from the area of Southeast Serbia, it was determined the correlation between the content of polyphenol compounds and metal contents. There is a very important coefficient of correlation between total phenols, flavonoids, the content of toxic metals and antioxidative activity of extracts of the investigated plant species, particularly *Origanum vulgare* L. and *Delphinidium consolida* L.

To illustrate better, we used PCA analysis, which represents the dependence of the content of phenol compounds and metals concentration in the extracts of the selected plant samples.

REFERENCE

- Abou-Arab A. K., Abou Donia M. A., Heavy metals in Egyptian spicies and medicinal plants and the effect of processing on their levels, *J. Agric. Food Chem.*, 48, **2000**, 2300-2304.
- Acworth I. N., The handbook of redox biochemistry, Eds. ESA, Inc., Chelmsford, USA, **2003**.
- Ahmed B., Al- Howiriny T A., Siddiqui A B., Antihepatotoxic activity of seeds of *Cichorium intybus* L., *J. Ethnopharmacol.*, 87, **2003**, 237-400.
- Ammon H. R. T, Kaul R., *Crataegus*, herz-kreislauf wirkun-genvon, *Crataegus* extrakten, flavonoiden und orocyani-dinen, teil 3: wirkungen auf den kreislauf, Deutsche. Apotheker. Zeitung, 134, **1994**, 2631-2636.
- AOAC, Official methods of analysis, Association of Official Analytical Chemists, Washington, D.C. 17th Edition, **2000**.
- Arai S., Mori T., Miki W., Yamaguchi K., Konosu S., Satake M., Fujita T., Pigmentation of juvenile coho salmon with carotenoid oil extracted from Antarctic krill, *Aquaculture*, 66, **1987**, 255-264.
- Asen S., Stewart R. N., Norris K. H., Copigmentation of anthocyanins in plant tissues and its effect on color, *Phytochemistry*, 11, **1972**, 1139-1144.
- Amić D., Davidović- Amić D., Bešlo D., Trinajstić N., Structure- radical scavenging activity relationships of flavonoids, *Croat. Chem. Acta*, 76, **2003**, 55-61.
- Bahorun T., Trotin F., Vasseur J., Pinkas M., Antioxidant activities of *Crataegus monogyna* extracts. *Planta Med*, 60, **1994**, 323-328.
- Bakowska A., Kucharska A. Z., Oszmianski J., The effects of heating, UV irradiation, and storage on stability of the anthocyanin- polyphenol copigment complex, *Food Chem.*, 81, **2003**, 349-355.
- Balogh E. A., Hegedűs E., Stefanovits-Banyai E., Application of and correlation among antioxidant and antiradical assays for characterizing antioxidant capacity of berries, *Sci. Hortic. Amsterdam*, 125, **2010**, 332–336.
- Bassa I. A., Francis F. J., Stability of anthocyanins from sweet potatoes in a model beverage, *J. Food Sci.*, 52, **1987**, 1753-1754.

- Basgel S., Erdemoglu S.B., Determination of mineral and trace elements in some medicinal herbs and their infusions consumed in Turkey, Sci. Total Envirom., 359, **2006**, 82–89.
- Basu S., F2-isoprostane induced prostaglandin formation in the rabbit. Free Radical Res., 40(3), **2006**, 273-277.
- Baublis A., Spomer A., Berber- Jimenez M. D., Anthocyanin pigments: comparison of extract stability, J. Food Sci. 59, **1994**, 1219-1221, 1233.
- Beattie J., Crozier A., Duthie G. G., Potential health benefits of berries, Curr. Nutr. Food Sci., 1, **2005**, 71-86.
- Bendich A., Machlin L. J., Scandurra O., Burton G. W., Wayne D. D. M., The antioxidant role of vitamin C, Adv. Free Radic. Biol. Med., 2, **1986**, 419-444.
- Bernatoniene J., Masteikova R., Majiene D., Savickas A., Kevelaitis E., Bernatoniene R., Dvorackova K., Civinskiene G., Lekas R., Vitkevicius K., Peciura, R., Free radical-scavenging activities of *Crataegus monogyna* extracts, Med. Lith., 44(9), **2008**, 706–712.
- Bilia A. R., Bergonzi M. C., Gallor, S., Mazzi G., Stability of the constituents of *Calendula* milk-thistle and passionflower tinctures by HPLC-DAD and HPLC-MS, J Pharm. Biomed. Anal., 15, **2002**, 613–624.
- Bisset G. B., Witchl M., Herbal drugs and phytopharmaceutics, A handbook of practice on a scientific basis with reference to German Commission E Monograph. 2nd edition, Medpharm. Scientific., Stuttgart , **2001**, 23-35.
- Blasa M., Gennari L., Angelino D., Ninfali P., Fruit and vegetables antioxidants in health, in bioactive foods in promoting health (fruits and vegetables), Watson, R. R. Preedy, V. R. (Ed.), Elsevier Inc., New York, **2010**. 37-58.
- Borkowski B., Lutomski J., Skrzydlewska E., Zygmunt B., Rosliny leczniczew fitoterapii IRiPZ Poznan, **1994**, 470-471.
- Borowska E. J., Mazur B., Kopciuch R. G., Buszewski B., Polyphenol, anthocyanin and resveratrol mass fraction and antioxidant properties of cranberry cultivars, Food Technol. Biotechnol., 47, **2009**, 56-61.
- Bors W., Heller W., Michel C., Saran M., Flavonoids as antioxidants: determination of radical- scavenging efficiencies, Methods Enzymol., 186, **1990**, 343-355.

- Božin B., Mimica-Dukic N., Smojlik I., Jovin E., Antimicrobial and antioxidant properties of rosemary and sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L., Lamiaceae) essential oils. *J. Agric. Food Chem.*, 55, **2007**, 7879-7885.
- Božin, B. Biohemija i farmakološka ispitivanja vrsta roda *Allium* L. (Sect. *Allium*). Doktorska disertacija. Univerzitet u Novom Sadu, Prirodno-matematički fakultet, Novi Sad. **2009**.
- Brand- Williams W., Cuvelier M. E., Berset C., Use of the radical method to evaluate antioxidant activity, *Lebensm. Wiss. Technol.*, 28, **1995**, 25-30.
- Braun D., Longman R. S., Albert M. L., A two-step induction of indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO) activity during dendritic-cell maturation. *Blood*, 106(7), **2005**, 2375-2381.
- Britton G., The biochemistry of natural pigments, Cambridge University Press, Cambridge, UK, **1983**.
- Brown M. R. W., Collier P. J., Gilbert P., Influence of growth rate susceptibility to antimicrobial agents: modification of the cell envelope and batch and continuous culture studies. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 34, **1990**, 1623-1628.
- Brouillard R., Delaporte B., Chemistry of anthocyanin pigments. 2. Kinetic and thermo-dynamic study of proton-transfer, hydration, and tautomeric reactions of malvidin-3-glucoside, *J. Am. Chem. Soc.*, 99, **1977**, 8461-8468.
- Brouillard R., Mazza G., Saad Z., Albrecht-Gary A. M., Cheminat A., The copigmentation reaction of anthocyanins: a microprobe for the structural study of aqueous solutions, *J. Am. Chem. Soc.*, 111, **1989**, 2604-2610.
- Brand- Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, *LWT*, 28, **1995**, 25-30.
- Butler L.G., Protein- polyphenol interactions: nutritional aspects, in Proc. 16th Int. Conf. Group Polyphen., 16, Part II, **1992**. 11–18.
- Butnariu M., Coradini Z. C., Evaluation of biologically active compounds from *Calendula officinalis* flowers using spectrophotometry, *Butnariu and Coradini Chem. Cen. J.*, 6, **2012**, 35-41.
- Cadenas E., Davies, J. A. K., Mitochondrial free radical generation, oxidative stress and aging, *Free Rad. Biol. Med.*, 29, **2000**, 222-230.

- Cai Y., Lilley T. H., Haslam E., Polyphenol-anthocyanin copigmentation, J. Chem. Soc. Chem. Commun., **1990**, 380-383.
- Caldwell C. R., Britz S. J., Mirecki R. M., Effect of temperature, elevated carbon dioxide, and drought during seed development on the isoflavone content of dwarf soybean (*Glycine max L.*) Merrill) grown in controlled environments, J. Agric. Food Chem., 53, **2005**, 1125-1129.
- Cao G., Sofic E., Prior R., Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships, Free Radic. Biol. Med., 22(5), **1997**, 749-760.
- Capasso F., Gaginella T. S., Grandolini G., Izzo A. A. Fitoterapija- Priručnik biljne medicine, Prometej, Novi Sad, **2005**.
- Cattell R. B., The scree test for the number of factors, Multivar. Behav. Res., 1, **1996**, 245-276.
- Cervato' G., Carabelli M., Gervasio S., Cittera A. R., Cazzola R., Cestaro B., Antioxidant properties of oregano (*Origanum vulgare*) leaf extracts, J. Food Biochem., 24, **2000**, 453-465.
- Chadwick D. J., Marsh J. (Eds). Bioactive compounds from plants (CIBA foundation symposium 154), John Wiley & Sons Ltd., Chichester, **1990**.
- Chang Q., Zuo Y., Harrison F., Chow M. S., Hawthorns M. S., An overview of chemical, pharmacological and clinical studies, J. Clin. Pharmacol., 42, **2002**, 605-612.
- Chen H., Zuo Y., Deng Y., Separation and determination of flavonoids and other phenolic compounds in cranberry juice by high-performance liquid chromatography, J. Chrom., 913, **2001**, 387-395.
- Chimi H., Sadik A., Le Tutour B., Rahmani M., Contribution à l'étude comparative des pouvoirs antioxydants dans l'huile d'olive du tyrosol, de l'hydroxytyrosol, de l'acide caféïque, de l'oleoeuropeïne et du BHT, Rev. Fr. Corps Gras., 35, **1988**, 339-344.
- Chrpoval D., Kouřimská L., Gordon M. H., Heřmanová V., Roubíčková I., Panek J., Antioxidant activity of selected phenols and herbs used in diets for medical conditions, Czech J. Food Sci., 28, **2010**, 317–325.
- Chang Q., Zuo Z., Harrison F., Chow M. S., Hawthorn, The J. Clin. Pharmacol., 42, **2002**, 605-612.

- Ciuffi M., Gentillini G., Franchi-Micheli S., Zilletti L., Lipid peroxidation induced “*in vivo*” by iron carbohydrate complex in the rat brain cortex, *Neurochem. Res.*, 16, **1991**, 43-49.
- Cort W., Haemoglobin peroxidation test screens antioxidants, *Food Technol.*, 28, **1974**, 60-66.
- Crnobarac J., Jaćimović G., Marinković B., Latković D., Balijagić J., The effect of cultivar and row distance on yield and quality of potmarigold, *Acta Hort. (ISHS)* 9, 25, **2011**, 141-146.
- Cotelle, N., Role of flavonoids in oxidative stress, *Curr. Top. Med. Chem.*, 1, **2001**, 569-590.
- Croft K.D., Antioxidant effects of plant phenolic compounds, in: *Antioxidants in human health*, Basu, T. K., Temple, N.J., Garg, M. L. (Eds.), CAB International, **1999**.
- Cuvelier M. E., Richard H., Berse C., Comparison of the antioxidative activity of some acid- phenols: structure-activity relationship, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 56, **1992**, 324-325.
- Ćetković G. S., Đilas S. M., Čanadanović- Brunet J. M, Tumbas V. A. T. Thin- layer chromatography analysis and scavenging activity of marigold (*Calendula officinalis* L.) extracts, *BIBLID*, 93–102, **2003**, 1450–7188.
- De Ancos B., Cano M. P., Hernandez A., Monreal M., Effects of microwave heating on pigment composition and color of fruit purees, *J. Sci. Food Agric.*, 79, **1999a**, 663-670.
- De Ancos B., Gonzalez E., Cano M. P., Differentiation of raspberry varieties according to anthocyanin composition, *Food Res. Technol.*, 208, **1999b**, 33-38.
- Delgado-Vargas F., Paredes-López O., Natural colorants for food and nutraceutical uses, CRC Press, Boca Raton, Florida, 27–32, 93–99, **2003**, 167–172.
- Denyer S. P., Stewart G. S. A. B., Mechanisms of action of disinfectants, *Int. Biodeter. Biodegr.*, 41, **1998**, 261-268.
- Deutsches A., Ausgabe Deutsche A., Stuttgart V., Govi-Verlag GmbH/Eschborn, **1994**.
- Dixon R. A., Paiva N. L., Stress- induced phenylpropanoid metabolism, *Plant. Cell.*, 7, **1995**, 1085-1097.

- Dikalov S., Skatchkov M., Bassenge E., Quantification of peroxy nitrite, superoxide, and peroxy radicals by a new spin trap hydroxylamine 1-hydroxy-2,2,6,6-tetramethyl-4-oxopiperidine, Biochem. Bioph. Res. Co., 230, **1997**, 54-57.
- Ducat G., Reyes Torres Y., Stutz Dalla Santa H., Kaminski Caetano I., Adriana Kleinubing S., Tussolini L., Hobold Justo T., Percio Quinaia S., Correlation of metal ions and phenolic compounds in tea infusions of medicinal plants, J. Food Technol., 9, 4, **2011**, 112-118.
- Duraković S., Prehrambena mikrobiologija, Medicinska naklada, **1991**, 233-235.
- Duraković S., Opća mikrobiologija, Prehrambeno-tehnološki inženjering, Zagreb, **1996**.
- Ebrahimzadeh M. A., Bahramian F., Antioxidant activity of *Crataegus pentaegyna* subsp. *elburensis* fruits extracts used in traditional medicine in Iran, Pakistan J. Biol. Sci., 12, 5, **2009**, 413-419.
- Eiro M. J., Heinonen M., Anthocyanin color behavior and stability during storage: effect on intermolecular copigmentation, J. Agric. Food Chem., 50, **2002**, 7461-7466.
- Ercisli S., Chemical composition of fruits in some rose (*Rosa* spp.) species. Food Chem. 104, **2007**, 1379-1384.
- Espinosa M., Olea- Azar C., Speisky H., Rodríguez J., Determination of reactions between free radicals and selected Chilean wines and transition metals by ESR and UV-vis technique, Spectrochim. Acta A, 71, 5, **2009**, 1638-1643.
- Fennema O. R., Food Chemistry. 3rd ed. Marcel Dekker, Inc. New York, Basel, **1996**.
- Filipliak A., Kurzawa M. E., Szlik E., Application of chromatographic method in phenolic compounds analysis in different part from *Cichorium intybus* L., XXV ARS Separatoria-Torun, Poland, **2010**.
- Foti M., Piatelli M., Baratta M. T., Ruberto G., Flavonoids, coumarins and cinnamic acids as antioxidants in a micellar system. Structure-activity relationship, J. Agric. Food Chem. 44, **1996**, 497-501.
- Foti M. C., Johnson E. R., Vinqvist M. R., Wright J. S., Barclay L. R., Ingold K. U., Naphtalene diols: a new class of antioxidants intramolecular hydrogen bonding in catechols, naphthalene diols, and their aryloxyl radicals, J. Org. Chem., 67(15), **2002**, 5190-5196.
- Fraternalea D., Giamperia L., Bucchinia A., Sestilib P., Paolillo M., Antioxidant activity of *Prunus spinosa* L. fruit juice, Ital. J. Food Sci., 12, **2009**, 1665-1670.

- Furneri P. M., Marino A., Saija A., Uccella N., Bisignano G., *In vitro* antimycoplasmal activity of oleuropein. Int. J. Antimicrob. Ag., 20, 4, **2002**, 293-296.
- Ganong W. F., Pregled medicinske fiziologije, Savremena administracija, Beograd, **1993**.
- Garcia- Viguera C., Bridle P., Influence of structure on colour stability of anthocyanins and flavylium salts with ascorbic acid, Food Chem., 64, **1999**, 21-26.
- Gebretsadik W., Chandravanshi B. S., Levels of metals in commercially available Ethiopian black teas and their infusion, Bull. Chem. Soc. Ethiop., 24, 3, **2010**, 339-349.
- Gomez- Miguez M., Susana González- Manzano S., Escribano- Bailón M. T., Heredia F. J., Santos-Buelga C., Influence of different phenolic copigments on the color of malvidin 3-glucoside, J. Agric. Food Chem., 54, 15, **2006**, 5422–5429.
- Grlić Lj., Enciklopedija samoniklog jestivog bilja, August Cesarec, Zagreb, **1986**.
- Groves T. J., Peroxinitrite: reactive, invasive and enigmatic, Curr. Opinon Chem. Biol., 3, **1999**, 226-235.
- Goupy P., Dufour C., Loonis M., Dangles O., Quantitative kinetic analysis of hydrogen transfer reactions from dietary polyphenols to the DPPH radical, J. Agric. Food Chem., 51, **2003**, 615-622.
- Gubruz I., Ustun O., Yesilada E., Sezik E., Kutsal O., Antiulcerogenic activity of some plants used as folk remedy in Turkey, J. Ethnopharmacol., 88, **2003**, 93-97.
- Gudžić B., Milenković M., Sibinović P., Đorđević S., Structural characterization of quercetin, Faculty of Technology, Leskovac, Zbornik radova, 13, **2000**, 151-164.
- Guern J., Renaudin J.P., Brown S.C., The compartmentation of secondary metabolites in plant cell cultures, in: Cell culture in phytochemistry, Constabel, F., Vasil, I. K., (Eds.), Academic Press, London, UK, **1987**, 43-76.
- Guisti M. M., Wrolstad R. E., Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy. Current protocols in food analytical chemistry. New York: John Wiley and Sons, **2003**.
- Halliwell B., Gutteridge J. M. C., Free radicals in biology and medicine, Clarendon, Press, Oxford, **1985**.
- Halliwell B., Gutteridge J. M. C., Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview, Meth Enzym., 186, **1990**, 1-85.

- Hallliwell B., Free radicals and antioxidants: a personal view, Nutr. Rev., 52, **1994**, 253-264.
- Harborne J. B., Williams C. A., Advances in flavonoid research since 1992, Phytochemistry, 55, **2000**, 481–504.
- Harborne J. B., The Flavonoids: advances in research since 1986. Chapman & Hall, Cambridge, UK, **1994**.
- Harborne J. B., Baxter H., eds., Handbook of natural flavonoids, Wiley & Sons, Chichester, UK, 2, **1999**.
- Havsteen B., Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency, Biochem. Pharmacol., 32, **1983**, 1141–1148,
- Heinrich M., Barnes J., Gibbons S., Williamson E. M., Fundamentals of pharmacognosy and phytotherapy, Elsev. Sci. Ltd., Spain, **2004**.
- Heinonen I. M., Meyer A. S., Frankel E. N., Antioxidant activity of berry phenolics on human low-density lipoprotein and liposome oxidation, J. Agric. Food Chem., 46, **1998**, 4107-4112.
- Hippeli S., Elstner F. E., Transition metal ion catalyzed oxygen activation during pathogenic processes, FEBS Letters, 443, **1999**, 1-7.
- Hillenbrand M., Zapp J., Becker H., Depsides from the petals of *Papaver rhoeas*, Planta Med., 70 (4), **2004**, 380-382.
- Ho C. T., Lee C. Y., Huang M. T., Phenolic compounds in food and their effects on Health, ACS symposium series. Developed from a Symposium sponsored by the Division of Agric. and Food Chem. of the Americ. Chem. Soc. at the Fourth Chem. Congress of North America, Washington D. C., ACS Press, **1992**. 506-507.
- Heimler D., Isolani L., Vignolini P., Romani A., Polyphenol content and antiradical activity of *Cichorium intybus* L. from biodynamic and conventional farming. Food Chem., 114, **2009**, 765-770.
- Horhammer L., Endres L., Wagner H., Richthammer F., Isolation and identification of a flavones dipentoside from the leaves of *Prunus spinosa*., Arch. Pharmaz. Der. Dtsch. Pharm., 290, **1957**, 342-348.
- Howard M., Traditional folk remedies, a comprehensive herbal. Century Hutchinson, London, **1987**.

- Hu J. P., Calomme M., Jasure A., De Bruyne T., Pieters L., Vlietinck A., Vanden Berghe D. A. Structure- activity relationships of flavonoids with superoxide scavenging ability, Biol. Trace. Elem. Res., 47, **1995**, 327-331.
- Hugo W. B., Bloomfield S. F., Studies on the mode of action of the phenolic antibacterial agent fentichlor against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. 3. The effect of fentichlor on the metabolic activities of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, J. Appl. Bacteriol. 34, 3, **1971**, 579-591.
- Husain S. R., Cillard J., Cillard P., Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids, Phytochemistry, 26, **1987**, 2489-2491.
- Iacobucci G. A., Sweeny J. G., The chemistry of anthocyanins, anthocyanidins and related flavylium salts, Tetrahedron, 39, **1983**, 3005-3038.
- Iacopini P., Baldi M., Starchi P., Sebastiani L., Catechin, epicatechin, quercetin, rurin and resveratrol in red grape: Content, *in vitro* antioxidant activity and interactions, J. Food Compos. Anal., 21, **2008**, 589-598.
- Ietswaart J. H. A., Taxonomic Revision of the Genus *Origanum (Labiatae)*, Leiden University Press, The Hague, **1980**.
- Innocenti M., Gallori S., Giaccherini C., Ieri F., Vincieri F. F., Mulinacci N., Evaluation of the phenolic content in the aerial parts of different varieties of *Cichorium intybus* L., J. Agric. Food Chem., 53, 16, **2005**, 6497-6502.
- Ivanova D., Gerova D., Chervenkov T., Yankova T., Polyphenols and antioxidant capacity of Bulgarian medicinal plants, J. Ethnopharm., 96, **2005**, 145-150.
- Jabeen S., Tahir Shah M., Khan S., and Qasim Hayat M., Determination of major and trace elements in ten important folk therapeutic plants of Haripur basin, Pakistan, J. Med. Plants Res., 4, 7, **2010**, 559-566.
- Jabłońska-Ryś E., Zalewska-Korona M., Kalbarczyk J., Antioxidant capacity, ascorbic acid and phenolics content in wild edible fruits, J. Fruit Ornam. Plant Res. 17, **2009**, 115-120.
- Janićijević H. S., Kenić J., Arsić- Komljenović G., Antioksidantni potencijal biljke matočina (*Mellitis melisophyllum*), Praxis. Medica, 36, 3-4, **2008**, 083-087.
- Jaredić M., Vučetić J., Mikroelementi u biološkom materijalu. Beograd: DP Studentski trg, **1997**.
- Jia Z., Tang M., Wu J., The determination of flavonoids content in mulberry and scavenging effect on superoxide radicals, Food Chem., 64, **1999**, 555-559.

- Jimenez M., Garcia-Carmona F., Myrcetin, an antioxidant flavonol, is a substrate of polyphenol oxidase, *J. Sci. Food Agric.*, 79, **1999**, 1993-2000.
- Jurd L., Some advances in the chemistry of anthocyanins-type plant plant pigments, in: *The Chemistry of Plant Pigments*, Chichester, C. O. (Ed.), Academic Press, New York, **1972**, 123.
- Kähkönen M. P., Heinämäki J., Ollilainen V., Heinonen M., Berry anthocyanins: isolation, identification and antioxidant activities, *J. Sci. Food Agric.*, 83, **2003**, 1403-1411.
- Karakašević B., Agolli B., Banič S., Berger- Jekić O., Brudnjak Z., Derkoš- Mikulić V., Vuković B., Mikrobiologija i parazitologija. Medicinska knjiga, **1989**.
- Karimi G., Hasanzadeh M. K., Nili A., Khashayarmanesh Z., Samiei Z., Nazari F., Teimuri M., Concentrations and health risk of heavy metals in tea samples marketed in Iran, *Pharmacol. online*, 3, **2008**, 164-174.
- Kaškonienė V., Bimbiraitė- Survilienė K., Ratautaitė V., Stankevičius M., Kornyšova O., Ragažinskienė O., Prosccevičius J., Maruška A., Investigation of phytochemical composition of biotechnology modified medicinal plants, *Sodininkyste ir darzininkyste*, 30 (1), **2011**, 23-33.
- Katalinić V., Moćina S. S., Sktroza D., Generalić I., et. al., Polyphenolic profile antioxidant properties and antimicrobial activity of grape skin extract of 14 *Vitis vinifera* varieties grown in Dalmatia (Croatia), *Food Chem.*, 119, **2010**, 715-723.
- Kaurinovic B., Popovic M., Vlaisavljevic S., Trivic S., Antioxidant Capacity of *Ocimum basilicum* L. and *Origanum vulgare* L. extracts, *Molecul.*, 16, **2011**, 7401-7414.
- Keli S. O., Hertog M. G., Feskens E. J., Kromhout D., Dietary flavonoids, antioxidant vitamins, and incidence of stroke: the Zutphen study, *Arch. Intern. Med.*, 156, **1996**. 637-642.
- Kim S. H., Kang K. W., Kim K. W., Kim N. D., Procyanidins in *Crataegus* extract evoke endothelium- dependent vasorelaxation in rat aorta, *Life Sci.*, 67, **2000**, 121-131.
- Kiselova Y., Marinova S., Ivanova D., Gerova D., Galunska B., Chervenkov T., Yankova T., Antioxidative potential of edible wild Bulgarian fruits, *Proceedings Balkan Sci. Confer. Biol. in Plovdiv (Bulgaria)*, **2005**, 233–239.

- Kojic D., Otpornost na niske temperature i dehidrataciju kukuruznog plamenca (*Ostrinia nubilalis* Hb)- celijski i molekularni odgovor. Doktorska disertacija. Univerzitet u Novom Sadu, Prirodno-matematički fakultet, Novi Sad, **2009**.
- Kujundžić S., Biohemijačka ispitivanja biljnih vrsta familije Apiaceae, Magistarska teza, Prirodno-matematički fakultet, Institut za hemiju, Novi Sad, **2002**.
- Kumarasamy Y., Cox P. J., Jaspars M., Nahar L., Sarker S. D., Comparative studies on biological activities of *Prunus padus* and *P. spinosa*, Fitoter., 75, 1, **2004**, 77-80.
- Lacombe A., Wu V. C. H., Tyler S., Edwards K., Antimicrobial action of the American cranberry constituents; phenolics, anthocyanins, and organic acids, against *Escherichia coli* O157:H7. Int. J. Food Microbiol. 139, **2010**, 102–107.
- Lajšić S., Grujić-Injac B., Hemija prirodnih proizvoda, Tehnološki fakultet, Novi Sad, **1998**.
- Lampe J. W., Health effects of vegetables and fruit: assessing mechanisms of action in human experimental studies, Am. J. Clin. Nutr., 70, **1999**, 475-490.
- Lasheen Y. F., Awwad N. S., El-khalafawy A., Abdel-Rassoul A. A., Annual effective dose and concentration levels of heavy metals in different types of tea in Egypt, J. Physical. Sci., 3, **2008**, 112-119.
- Lawrence B. M., The botanical and chemical aspects of oregano, Perfum. Flavor., 9, **1984**, 41-52.
- Lea P. J., Leegod R. C., Plant biochemistry and molecular biology, 2nd edition, John Wiley & Sons, Chichester, **1999**.
- Lee J. H., Schwartz S. J., Pigments in plant foods, In: Handbook of food science, technology and engineering, Hui, Y. H., ed., CRC Press, Boca Raton, Florida, **2006**, 5–10.
- Leung A. Y., Foster S., Encyclopedia of common natural ingredients used in food, drugs and cosmetics, second edition, Wiley Interscience, A John Wiley&Sons, Inc., Publication, **2003**.
- List P. H., Horhammer L., Hagers handbuch der pharmazeutischen praxis, Bd.6, Springer, Berlin-Heidelberg-New York, **1971**.
- Macheix J. J., Fleuriet A., Billot J., Fruit phenolics, CRC Press, Boca Raton, FL, **1990**.
- Maccarone E., Maccarrone A., Rapisarda P., Stabilization of anthocyanins of blood orange fruit juice, J. Food Sci., 50, **1985**, 901-904.

- Makarova A., Himicheskoe i farmakologicheskoe issledovanie flavonoidov *Prunus spinosa* L. Rast. Resur, 8, **1972**, 42-49.
- Makky E. A., Mashitah M., Y., Ibrahim M. M., Impact of medicinal plants phytocomponents against antibiotic resistant bacteria, J. Chem. Pharm. Res., 4, 1, **2012**, 881-893.
- Marković J. M. D., Petranović N. A., Baranac J. M., A spectrophotometric study of the copigmentation of malvin with caffeic and ferulic acids, J. Agric. Food Chem., 48, **2000**, 5530-5536.
- Masterova I., Grančaiova Z., Uhrinova S., Suchy V., Ubik K., Nagy M., Flavonoids in flowers of *Calendula officinalis* L., Chem. Papers, 45, 1, **1991**, 105-108.
- Mazza G., Miniati E., Anthocyanins in fruits, vegetables and grains, CRC Press Inc., Boca Raton, FL, **1993**.
- McCall R. M., Frei B., Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage in humans? , Free Rad. Biol. Med., 26, **1999**, 1034-1053.
- Matysik G., Benesz M., Thin-layer chromatography and densitometry of anthocyanins in the petals of red poppy during development of the flowers, Chromatographia, 32, **1991**, 19-22.
- Mehmood N., Zubair M., Rizwan K., Rasool N., Shahid M., Ahmad V., Antioxidant, antimicrobial and phytochemical analysis of *Cichorium intybus* seeds extract and various organic fractions, IJPR, 11, 4, **2012**, 1145-1155.
- Mercadante A. Z., Bobbio F. O., Anthocyanins in foods: occurrence and physicochemical properties, in: Food colorants: chemical and functional properties, Socaciu, C. (Ed.), CRC Press, New York, **2008**, 241.
- Middleton P., Stewart F., Al- Qahtani S., Egan P., Rourke C., Abdulrahman A., Byres M., Middleton M., Nahar L., Shoeb M., Delazar A., Kumarasamy Y., Sarker S. D., Antioxidant, antibacterial activity and general toxicity of *Alnus glutinosa*, *Fraxinus excelsior* and *Papaver rhoeas*, Iranian J. Pharmac. Res., 2, **2005**, 81-86.
- Mihajlovic D., Novkovic V., Bankovic V., Determination of hyperoside in flowers and leaves of hawthorn (*Crataegus oxyacantha* L.and *Crataegus monogyna* Jacq.) by spectrophotometric method, Hem. Ind., 60, **2006**, 87-91.

Milala J., Grzelak K., Kró B., Juśkiewicz J., Zduńczyk Z., Composition and properties of chicory extracts rich in fructans and polyphenols, Pol. J. Food Nutr. Sci, 59, 1, **2009**, 35-43.

Miletić S., Miletić G., Hemija biljnih pigmenata, monografija, Niš, Univerzitet u Nišu, **1996**. 27–32.

Miller J. N., Miller J. C., “Statistics and chemometrics for analytical chemistry,” Pearson Education Limited, London, **2005**.

Mišan A., Antioksidantna svojstva lekovitog bilja u hrani. Doktorska disertacija. Univerzitet u Novom Sadu, Prirodno-matematički fakultet, Novi Sad, **2009**.

Mitić M., Kinetika degradacije fenolnih jedinjenja hidroksil radikalima. Doktorska disertacija. Univerzitet u Nišu, Prirodno-matematički fakultet, Niš, **2011**.

Moller J. K. S., Madsen H. L., Altonen T., Skibsted L. H., Dittany (*Origanum dictamnus*) as a source of water-extractable antioxidants. Food Chem., 64, **1999**, 215-219.

Monties B., Lignins, in: Methods in plant biochemistry, Dey P. M., Harborne J. B., (Eds.) Acad. Press, London, UK, **1989**. 113-157.

Mordente A., Martorana G. E., Minotti G., Giardina B. Antioxidant properties of 2,3-dimethoxy-5-methyl-6-(10-hydroxydecyl)-1,4-benzoquinone (idebenone). Chem. Res. Toxicol., 11, **1998**, 54-63.

Moyer R. A., Hummer K. E., Finn C. E., Frei B., Wrolstad R. E. Anthocyanins, phenolics, and antioxidant capacity in diverse small fruits: *Vaccinium*, *Rubus* and *Ribes*, J. Agric. Food Chem., 50, **2002**, 519-525.

Nagy M., Grancai D., Colorimetric determination of flavanones in propolis, Pharmazie, 51, **1996**, 100-101.

Hashizume H., Hoque A. N., Abiko Y., Protective effect of *Crataegus* extract on the cardiac mechanical dysfunction in isolated perfused working rat heart. Arzneim. forsch., 43, **1993**, 945-949.

NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards), Performance standards for antimicrobial disk susceptibility testing; 6th International Supplement, Wayne Pa. M2-A6, **1997**.

Nicholsan B. E., Ary S., Gregory M., The Oxford book of wild flowers. Oxford University Press, London, **1960**.

- Nielsen I. L. F., Haren G. R., Magnussen E. L., Dragsted L. O., Rasmussen S. E., Quantification of anthocyanins in commercial black currant juices by simple high-performance liquid chromatography: investigation of their pH stability and antioxidative potency, *J. Agric. Food Chem.*, 51, **2003**, 5861-5866.
- Nikolić G., Nikolić S., Milić B., Čanadanović- Brunet J., Primena metode elektronske spinske rezonance za proučavanje antioksidantnih svojstava prirodnih fenolnih jedinjenja, *Acta Fac. Med. Naiss.*, 15(4), **1998**, 183-188.
- Niziolek M., Korytowski W., Girotti, A.W., Nitric oxide inhibition of free radical mediated lipid peroxidation in photodynamically treated membranes and cells. *Free Radic. Biol. Med.*, 34, 8, **2003**, 997-1005.
- Nookabkaew S., Rangkadilok N., Satayavivad J., Determination of trace elements in herbal tea products and their infusions consumed in Thailand, *J. Agr. Food Chem.* 54, **2006**, 6939–6944.
- Olsen J. D., Manners G. D., Pelletier S. W., *Collectanea Bot.* (Barcelona), 19, **1990**, 141-151.
- Olszewska M., Wolbis M., Flavonoids from the flowers of *Prunus spinosa* L., *Acta Pol. Pharm.*, 58(5), **2001**, 367-372.
- Olszewska M., Glowacki R., Wolbis M., Bald E., Quantitative determination of flavonoids in the flowers and leaves of *Prunus spinosa* L., *Acta Pol. Pharm.*, 58, **2001**, 199-203.
- Orhan D. D., Hartevioğlu A., Küpeli E., Yesilada E., *In vivo* anti-inflammatory and antinociceptive activity of the crude extract and fractions from *Rosa canina* L. fruits, *J. Ethnopharmacol.*, 112, **2007**, 394-400.
- Ozgen M., Serce S., Kaya C. Phytochemical and antioxidant properties of anthocyanin-rich *Morus nigra* and *Morus rubra* fruits, *Sci. Horticul.*, 119, **2009**, 275-279.
- Panizo F. M., Acebal B., *Annales Real. Soc. Espan.* **1955**; 51B; 623; 1956; CA 50; 7231.
- Pathak D., Pathak K., Singla A.K., Flavonoids as medicinal agents—Recent advances, *Fitoter.*, 62, **1991**, 371–389.
- Piletić M. V., Milić B. Lj., Đilas S. M., Organska hemija II deo, Prometej, Novi Sad, **1993**.

- Pirzada J., Shaikh W., Ghani K. U., Laghari K. A., Study of anti fungal activity and some basic elements of medicinal plant *CRESSA RETICA* linn against fungi causing skin diseases, Sindh Univ. Res. Jour. (Sci. Ser.) 41, (2), **2009**, 15-20.
- Poei- Langston M. S., Wrolstad R. E., Color degradation in an ascorbic acid-anthocyanin-flavonol model system, J. Food Sci., 46, **1981**, 1218-1236.
- Pokorny J., Autoxidation of unsaturated lipids, Chan, H. (Ed.) Academic Press, London, **1987**, 141-206.
- Pourmorad F., Hosseiniimehr S., Shahabimajd N., Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants, African J. Biotechnol., 5, **2006**, 1142-1145.
- Pratt D. E., Birac P. M., Source of antioxidant activity of soybeans and soy products, J. Food Sci., 44, **1979**, 1720-1722.
- Pratt D. E., Hudson B. J. F., Natural antioxidants not exploited commercially. in: Food antioxidants, Hudson, B.J.F. (Ed.) Sci. Publish. Ltd, Essex, **1990**, 171-192.
- Ljubunčić P., Portanaja P., Cogan U., Ayaizeih H., Bomzon A., Antioxidant activity of *Crataegus aronia* aqueous extract used in traditional Arab medicine in Israel. J. Ethnopharmacol., 101, **2005**, 153-161.
- Radanović D., Antić Mladenović S., Jakovljević M., Kresović M., Content of heavy metals in *Gentiana lutea* L. roots and galenic forms, J. Serb. Chem. Soc., 72, 2, **2007**, 133–138.
- Radovanović B. C., Milenković Andelković A. S., Radovanović A. B., Andelković M. Z., Antioxidant and antimicrobial activity of polyphenol extracts from wild berry fruits grown in Southeast Serbia, Trop. J. Pharm. Res., 12, 5, **2013**, 814-819.
- Rao A.V., Snyder D. M., Raspberries and human health: A review, J. Agric. Food Chem. **58**, **2010**, 3871–3883.
- Rein M. J., Heinonen M., Stability and enhancement of berry juice color, J. Agric. Food Chem., 52, **2004**, 3106-3114.
- Rice-Evans C. A., Miller N. J., Paganga G., Structure-antioxidant activity relationship of flavonoids and phenolic Acids, Free Radic. Biol. Med., 20, 7, **1996**, 933-956.
- Sadrzadeh S. M. H., Eaton J. W., Hemoglobin- mediated oxidant damage to the central nervous system requires endogenous ascorbate, J. Clin. Invest., 82, **1988**, 1510-1515.

- Sahito S. R., Memon M. A., Kazi T. G., Kazi G. H., Evaluation of mineral contents in medicinal plant *Azadirachta indica* (neem), J. Chem. Soc. Pakistan, 25, **2003**, 139-143.
- Sakar M. K., Engelshowe R., Tamer A. U. Isolation and antimicrobial activity of flavonoids from *Prunus spinosa* L. flowers. Hacettepe Universitesi Eczacilik Fakultesi Dergisi 1992;12: 59–63.
- Sakar M. K., Kolodziej H., Flavonoid glycosides from the flowers of *Prunus spinosa*, Fitoter., 64, **1993**, 180-181.
- Salah N., Miller N. J., Paganga G., Tijburg L., Bolwell G. P., Riceevans C., Polyphenolic flavanols as scavengers of aqueous phase radicals and as chain-breaking antioxidants, Arch. Biochem. Biophys., 322, 2, **1995**, 339-346.
- Sayre M. L., Perry G., Smith A. M., Redox metals and neurodegenerative disease, Curr. Opin. Chem. Biol., 3, **1999**, 220-225.
- Saud S., Al-Oud, Heavy metal content in tea and herb leaves, Pakistan J. Biol. Sci., 6, 3, **2003**, 208-212.
- Scalbert A., Williamson G., Dietary intake and bioavailability of polyphenols in chocolate: modern science investigates an ancient medicine, Am. Soc. Nutr. Sci., 2073, S-2085S, **2000**.
- Seenivasan S., Manikandan N., Muraleedharan N. N., Selvasundaram R., Heavy metal content of black teas from south India, Food control, 19, **2008**, 746-749.
- Shahidi F., Naczk M., Food phenolics: an overview, Food phenolics sources, chemistry, effects and applications, Technomic Publishing Co, Pennsylvania, USA, **1995**, 1-4.
- Shahidi F., Naczk M. Phenolics in food and nutraceuticals. CRC Press, Boca Raton, FL., **2004**, 352-355.
- Shan B., Cai Y-Z., Brooks J., Corke H., The *in vitro* antibacterial activity of dietary species and medicinal herb extracts. Int. J. Food Microbiol. 117, **2007**, 112–119.
- Shahidi F., Naczk M., Phenolics in food and nutraceuticals. CRC Press, Boca Raton, FL., **2004**, 352-355.
- Shi H., Noguchi N., Niki E., Introducing natural antioxidants, In: Antioxidants in food, Practical applications, Pokorny J., Yanishlieva N., Gordon M., Woodhead Publishing Limited, EDS., Cambridge, England, **2001**, 22-70.

- Skandamis P., Koutsoumanis K., Fasseas K., Nychas G. J. E. Inhibition of oregano essential oil and EDTA on *Escherichia coli* O157:H7. Ital. J. Food. Sci. 13, **2006**, 65-75.
- Shan B., Cai Y-Z., Brooks J., Corke H., The *in vitro* antibacterial activity of dietary species and medicinal herb extracts. Int. J. Food Microbiol. 117, **2007**, 112–119.
- Shrikhande A. J., Francis F. J., Effect of flavonols on ascorbic and anthocyanin stability in model systems, J. Food Sci., 39, **1974**, 904-906.
- Sies H., Oxidative stress: introductory remarks. In: Sies, H. (Editor) Oxidative stress, Academic Press, London, UK, **1985**.
- Singleton V. L., Rossi J. A., Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. Am. J. Enol. Viticult., 16, **1965**, 144–158.
- Singleton V. L., Orthofer R., Lamuela- Raventos R. M., Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent, Methods in Enzymol., 299, **1999**, 152-178.
- Skibola C. F., Smith M. T., Potential health impacts of excessive flavonoid intake, Free Radic. Biol. Med., 29, 3-4, **2000**, 375-383.
- Slavkovska V., Jancic R., Bojovics S., Milosavljevic S., Djokovic D., Variability of essential oils of *Satureja montana* L. and *Satureja kitaibelii* wierzb. Ex Heuff. from the central part of the Balkan peninsula, Phytochemistry, 57, **2001**, 71-76.
- Starr M. S., Francis F. J., Oxygen and ascorbic acid effect on the relative stability of four anthocyanin pigments in cranberry juice, Food Technol., 22, **1968**, 1293-1295.
- Stern J. L., Hagerman, A. E., Steinberg P. D., Mason P. K., Phlorotannin protein interactions. J. Chem. Ecol., 22, 10, **1996**, 1887-1899.
- Strack D., Phenolic metabolism, in: Plant Biochemistry, Dey, P. M., Harborne, J. B. (Eds.), Academic Press, New York, **1997**, 387-437.
- Strong R., Wood W. G., Samorajski T., Neurochemistry of aging. In: Pathy, M. S. J. (ur.): Principles and practice of geriatric medicine, 2nd ed.; 69, Wiley & Sons, New York, **1991**.
- Svedström U., Vuorela H., Kostiainen R., Huovinen K., Laakso I., Hiltunen R., High-performance liquid chromatographic determination of oligomeric procyandins from dimers up to the hexamer in hawthorn. J. Chromatogr. A, 968, **2002**, 53-60.

- Tadic M. V., Dobric S., Markovic M. G., Đordjevic M. S., Arsic A. I., Anti-inflammatory, gastroprotective, free-radical-scavenging, and antimicrobial activities of hawthorn berries ethanol extract, *J. Agric. Food Chem.*, 56, **2008**, 7700-7709.
- Tamas M., Study of flavones *Prunus spinosa L.* flowers, *Farmacia, Farm.*, 33, **1985**, 181-186.
- Kolodziej H., Sakar M. K., Burger J. F. W., Engelshowe R., Ferreira D., Ferreira A., Type Proanthocyanidins from *Prunus-Spinosa*. *Phytochem. (Oxford)*, 30, **1991**, 2041-2047.
- Thabti I., Elfalleh W., Hannachi H., Ferchichi A., Da Graça Campos M., Identification and quantification of phenolics acids and flavonol glycosides in Tunisian *Morus* species by HPLC-DAD and HPLC-MS, *Journal of Functional Foods*, 4, **2012**, 367-374.
- Timberlake C. F., Bridle P., Anthocyanins, In: Developments in food colours-1, Walford, J., ed., Appl. Sci. Publ. LTD, London, **1980**, 115–149.
- Tumbas V. T., Antiradical and anti-proliferative activity of extracts from selected plants of Rosaceae and Eridaceae families, Doctorate dissertation, Faculty of Technol., Novi Sad, **2010**.
- Tumbas V. J., Čanadanović- Brunet L., Gille S., Dilas G., Ćetković G., Superoxide anion radical scavenging activity of bilberry (*Vaccinium myrtillus L.*), *J. Berry Res.* 1, **2010**, 13–23.
- Tumbas V. J., Čanadanović- Brunet L., Gille S., Dilas G., Ćetković G., Characterization of the free radical scavenging activity of rose hip (*Rosa canina L.*) extract, *Int. J. Food Prop.*, 15(1), **2012**, 188-201.
- Tumbas V. S., Savatović S., Đilas J., Čanadanović- Brunet G., Ćetković G., Cranberry— a good source of natural antioxidants, *Acta Periodica Technol.* 37, **2006**, 171-178.
- Uzelac V., Levaj B., Bursać D., Pedisić S., Radojčić I., Biško A., Total phenolics and antioxidant capacity assays of selected fruits, *Agric.Conspec. Sci.*, 72, **2007**, 279-284.
- Uri N., Mechanism of antioxidation. Autoxidation and antioxidants, Lundberg, W.O. (Ed.), Wiley, New York, 1961, 133-169.
- Tadić V. M., Dobrić S., Marković G. M., Dordević S. M., Arsić I. A., Menković N. R., Stević T., Anti-inflammatory, gastroprotective, free-radical-scavenging, and

antimicrobial activities of hawthorn berries ethanol extract, J.Agric. Food Chem. 56, **2008**, 7700–7709.

Vattem D. A., Ghaedian R., Shetty K., Enhancing health benefits of berries through phenolic antioxidant enrichment: focus on cranberry, Asia Pac. J. Clin. Nutr., 14, 2, **2005**, 120-130.

Velasco V., Williams P., Improving meat quality through natural antioxidant, Chilean J. Agricult. Res., 2, **2011**, 313-322.

Viskelis P. M., Rubinskienė I., Jasutienė A., Šarkinas R., Daubaras L., Česonienė L., Anthocyanins, antioxidative, and antimicrobial properties of American cranberry (*Vaccinium macrocarpon* Ait.) and their press cakes, J. Food Sci. **74**, 2, **2009**, C157–C161.

Woisky R., Salatino A., Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control, J. Apic. Res, 37, **1998**, 99-105.

Wallace G., Fry S. C., Phenolic components of the plant cell wall, Int. Rev. Cytol., 151, **1994**, 229-267.

Wang H., Cao G., Prior R., Oxygen absorbing capacity of anthocyanins, J. Agric. Food Chem., 45, **1997**, 304-309.

Watanabe S., Hashimoto K., Tazaki H., Iwamoto I., Shinohara N., Satoh K., Sakagami H., Radical scavenging activity and inhibition of macrophage NO production by fuhinolic acid, a main phenolic constituent in Japanese butterbur (*Petasites japonicus*), Food Sci. Technol. Res., 13, 4, **2007**, 366-371.

Wei H., Bowen R., Cai Q., Barnes S., Wang Y., Antioxidant and antipromotional effects of soybean isoflavone genistein, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 208, **1995**, 124-130.

WHO monographs on selected medicinal plants. Folium cum Flore Crataegi; World Health Organization (WHO): Geneva, Switzerland, 2, **2002**, 66.

Winkel B. S. J., The biosynthesis of flavonoids, In: The science of flavonoids, Grotewold, E., ed., Springer, USA, **2006**.

Winkel-Shirley B., Flavonoid biosynthesis: a colorful model for genetics, biochemistry, cell biology and biotechnology, Plant Physiol., 126, **2001**, 485–493.

Wojdyło A., Oszmian'ski J., Czemerys R., Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs, Food Chem., 105, **2007**, 940–949.

Wollenweber E. Flavones and flavonols, U: The Flavonoids: Advances in research since 1986, Harborne, J. B. (Ed.), Chapman & Hall, Cambridge, UK, pp. **1994**, 259–336.

Wybraniec S., Mizrahi Y., Fruit flesh betacyanin pigments in *Hylocereus cacti*, J. Agric. Food Chem., 50, **2002**, 6086-6089.

Wu, X., Gu, L., Prior, R. L., McKay, S., Characterization of anthocyanins and proanthocyanidins in some cultivars of *Ribes*, *Aronia* and *Sambucus* and their antioxidant capacity. J Agric Food Chem., 52, **2004**, 26, 7846-7856.

<http://ddr.nal.usda.gov/dspace/bitstream/10113/8312/1/IND43664561.pdf>

Wu, X., Beecher, G. R., Holden, J. M., Haytowitz, D. B., Gebhardt, S. E., Prior, R. L. Concentrations of anthocyanins in common foods in the United States and estimation of normal consumption. J. Agric. Food Chem., 54, **2006**, 1, 4069–4075.

http://www.ars.usda.gov/SP2UserFiles/Place/12354500/Articles/JAFC54_4069-4075.pdf

Yang, B., Kotani, A., Arai, K., Kusu, F., Estimation of the antioxidant activities of flavonoids from their oxidation potentials, Anal. Sci., 17, **2001**, 599-604.

Zafar R., Ali S M., Anti-hepatotoxic effects of root and root callus extracts of *Cichorium intybus* L., J. Ethnopharmacol., 63, **1998**, 227-231.

Zargari A., Medical Plants, Tehran University, Tehran, 1, **1994**, 91–102.

Zhang S., Iandolo J. J., Stewart G. C., The enterotoxin D plasmid of *Staphylococcus aureus* encodes a second enterotoxin determinant (sej). FEMS Microbiol. Lett., 168, **1998**, 227–233.

Zheng W., Wang S. Y., Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs, J. Agric. Food Chem. 49, 11, **2001**, 5165–5170.

Zechmeister H. G., Hohenwallner D., Riss A., Hanus-Illnar A., Variations in heavy metal concentrations in the moss species *Abietinella abietina* (Hedw.) Fleisch. according to sampling time, within site variability and increase in biomass, Sci. Total. Environ., **2003**, 301, 55-65.

PRILOG

Tabela 3.9.1. Sadržaj ukupnih fenola, flavonoida, antioksidativne aktivnosti i sadržaja metala.

Biljka	Ekstrakt	Ukupni fenoli mg GAE/g	Flavonoidi mg QE/g	Antioksidativna aktivnost		Fe µg/g	Zn µg/g	Cu µg/g	Mn µg/g
				(RSC) in (%)	(RSC) mg QE/g				
<i>Papaver rhoeas L.</i>	Biljka				423.32±8.4	31.80±0.6	35.50±0.7	20.61±0.4	
	Voda	19.9±0.4	11.4±0.0	89.7±0.8	23.8±0.0	-	2.20±0.0	-	-
	Etanol	13.1±1.5	9.5±0.02	84.9±0.9	2.5±0.7	78±1.56	3.50±0.0	22.10±0.4	16.4±0.3
	Etanol 50 %	14.3±0.2	9.0±0.0	86.1±1.5	22.8±0.5	/	7.60±0.5	5.30±0.1	
	Biljka				172.16±3.4	50.80±1.0	9.97±0.1	16.02±0.3	
	Voda	24.8±0.6	0.76±0.0	75.9±0.8	4.4±0.6	29±0.5	5.60±0.1	3.26±0.0	2.70±0.0
	Etanol	2.1±0.1	0.56±0.0	60.6±0.0	3.5±0.7	118±2.3	20.10±0.4	2.85±0.0	7.20±0.1
	Etanol 50 %	19.3±0.4	0.55±0.0	88.6±0.5	5.2±0.5	-	35.70±0.7	0.52±0.0	-
<i>Crataegus oxyacantha L.</i>	Biljka				261.6±5.2	62.2±1.2	8.9±0.1	9.1±0.1	
	Voda	12.1±0.1	0.41±0.0	32.0±0.8	1.8±0.0	-	12.7±0.2	-	-
	Etanol	15.3±0.1	0.70±0.1	47.3±0.0	2.7±0.3	91±1.8	7.1±0.1	2.3±0.0	2.1±0.0
	Etanol 50 %	20.9±0.7	1.24±0.0	72.1±0.0	4.2±0.0	-	5.2±0.1	-	-
	Biljka				402±8	32.4±0.6	20.5±0.4	49.4±1.0	
	Voda	8.6±0.2	0.6±0.0	67.0±5.1	8.2±0.0	-	1.1±0.0	-	-
	Etanol	5.3±0.8	0.2±0.0	92.1±0.7	1.3±0.0	68.0±0.6	28.8±0.6	8.5±0.2	7.2±0.1
	Etanol 50%	4.8±0.0	0.3±0.0	86.6±0.2	2.8±0.0	29.0±0.6	3.7±0.1	3.2±0.1	4.8±0.1
<i>Calendula officinalis L.</i>	Biljka				137±3	18.1±0.4	12.8±0.3	24.4±0.5	
	Voda	45.1±0.0	0.1±0.00	85.2±0.3	3.2±0.2	16.0±0.3	4.5±0.1	1.5±0.0	5.4±0.1
	Etanol	31.9±1.1	0.1±0.0	27.3±1.2	19.2±0.0	76.0±1.6	5.3±0.1	2.4±0.0	13.7±0.3
	Etanol 50 %	29.8±0.7	0.2±0.0	96.8±0.3	0.0±0.0	17.0±0.3	4.4±0.1	1.1±0.0	3.6±0.1
<i>Origanum vulgare L.</i>	Biljka				152±3	49.6±1.0	23.9±0.5	21.8±0.4	
	Voda	74.3±1.2	2.1±0.0	75.1±0.4	6.0±0.1	-	29.1±0.6	4.5±0.1	-
	Etanol	23.6±0.4	1.0±0.0	93.8±0.4	0.8±0.1	113±2	22.3±0.4	3.8±0.1	16.3±0.3

<i>Delphinidium consolida</i> L.		Etanol 50 %	75.2±0.6	2.0±0.0	87.2±1.1	2.6±0.0	-	22.0±0.4	0.4±0.1	-
	Biljka					286±6	39.8±0.8	23.1±0.5	13.8±0.3	
	Voda	24.2±0.4	1.7±0.0	82.7±1.7	3.8±0.0	14.0±0.3	11.0±0.2	1.6±0.0	-	
	Etanol	23.9±1.8	1.1±0.0	32.5±3.1	17.7±0.0	176±4	14.0±0.3	18.8±0.4	3.3±0.1	
	Etanol 50%	18.3±0.4	1.3±0.0	94.4±0.1	0.6±0.1	-	12.2±0.2	3.6±0.1	-	

BIOGRAFIJA

Jasmina Miroljuba Veličković, rođena je 07.09.1965. godine u Gornjem Krupcu, Aleksinac. Gimnaziju "Drakče Milovanović" u Aleksincu završila je 1984. godine. Na Grupi za hemiju, Filozofskog fakulteta u Nišu, diplomirala je oktobra 1988. godine sa ocenom 10 na diplomskom ispitu. Magistarske studije iz hemije, na organsko- biohemijском smeru, na Filozofskom fakultetu u Nišu, upisala je 1994/95. godine. Magistarski rad "Masne kiseline i alkani iz *ACHILLEA LINGULATA* L., *ACHILLEA CHRITHMIFOLIA* L. i *ACHILLEA NOBILIS* L." odbranila je 23.decembra 1999. godine, na istom fakultetu. Prosečna ocena u toku poslediplomske studije 8.4.

Doktorske studije iz hemije, na Odseku za hemiju Prirodno- matematičkog fakulteta u Nišu, upisala je 2008/09.godine

Profesionalna karijera

Od 1992. godine radi u fabrici filtera "Frad" Aleksinac kao tehnolog hemijskih procesa i rukovodilac laboratorije. Tokom višegodišnjeg rada bila je angažovana na više projekata, na osvajanju novih proizvoda i novih tehnoloških operacija koji su primjenjeni u fabrici "Frad" u Aleksinacu i u drugim firmama kroz međulaboratorijsku saradnju. Bila je angažovana na:

- na projektu za izradu namenskog postrojenja za preradu galvanskih otpadnih voda u fabrici "Frad" u Aleksinacu;
- izradi dokumentacije za uvođenje standarda za kvalitet ISO 9000 i ISO 14000. u fabrici "Frad" u Aleksinacu;
- uporednim ispitivanjima proizvoda (homologacija i rehomologacija proizvoda) na zahtev inostranih instituta, akreditovanih za ovu vrstu ispitivanja (Nemačka, Italija, Slovačka, Ukrajina, Rumunija).

Školske 2000/2001. godine bila je angažovana kao naučni saradnik na Višoj Hemijsko- tehnološkoj školi u Kruševcu za predmet organska hemija.

BIBLIOGRAFIJA

Radovi objavljeni u naučnim časopisima međunarodnog značaja M23:

1. D. A. Kostić, S. S. Mitić, M. N. Mitić, A. R. Zarubica, J. M. Veličković, A. S. Dordević and S.S. Randelović, **Phenolic contents, antioxidant and antimicrobial activity of *Papaver rhoeas* L. extracts from Southeast Serbia**, Journal of Medicinal Plants Research Vol. 4(3), pp. 1727-1732 (2010) (IF: 0.879).

Rad je citiran 7 puta.

2. D. A. Kostic, J. M. Velickovic, S. S. Mitic, M. N. Mitic, and S. S. Randelovic, **Content of phenolic compounds, antioxidant and antimicrobial activity of the extracts of *Crataegus oxyacantha* L.(Rosaceae) fruit from Southeast Serbia**, Tropical Journal of Pharmaceutical Research 11(1), pp. 117-124 (2012) (IF: 0.50).

Rad je citiran 3 puta.

3. D. A. Kostic, J. M. Velickovic, S. S. Mitic, M. N. Mitic, S. S. Randelovic, B. B.Arsic, and N. A. Pavlovic, **Correlation among phenolic , heavy metals content and antioxidant activity of the extracts of plant species from Southeast Serbia**, Bull. Chem. Soc. Ethiop. 27(2), pp. 1-10 (2013) (IF: 0.277).

4. J. M. Velickovic, D. A. Kostić, G. S. Stojanović, S. S. Mitić, M. N. Mitić, S. S. Randelović, and A. S. Đorđević, **Phenolic composition, antioxidant and antimicrobial activity of the extracts from *Prunus spinosa* L. fruit**, Hemijska industrija, DOI:10.2298/HEMIND130312054V (2013).

Radovi od 1 do 4 su direktno iz doktorske disertacije. Bila sam koautor u sledećim radovima:

5. D. Kostić, S. Mitić, A. Zarubica, M. Mitić, J. Veličković, and S. Randjelović, **Content of trace metals in medicinal plants and their extracts**, Hemijska industrija 65(2), pp. 165–170 (2011) (IF: 0.117).

6. S. Randjelovic, D Kostic, S. Mitic, A. Zarubica, M. Mitic, and J. Velickovic, **The correlation of metal content in medicinal plants and water their extract**, Hemijska Industrija DOI:10.2298/HEMIND120703098R.

Iz magistarske teze sam objavila dva rada u **časopisima nacionalnog značaja**:

1.R. Palić, T. I. Eglinton, B. C. Benitez- Nelson, G.Eglinton, J. M. Veličković, and G. S. Stojanović, **Alkanes from plants of the genus Achillea**, J. Serb. Chem. Soc. 64 (7-8), pp. 443-446 (1999).

2. R. Palić, G. Stojanović, N. Randjelović, V. Randjelović, and J. M. Veličković, **The fatty acids from plants of the genus Achillea**, Facta Universitatis: Physics, Chemistry and Tehnology 2(2), pp. 101-104 (2000).

Radovi objavljeni u izvodu u zbornicima naučnih skupova:

1. D. A. Kostic, S. S. Mitic, J. B. Velickovic, and S. S. Randjelovic, Phenolic contents and antioxidant activity of *Origanum vulgare* L. sa prostora Jugoistočne Srbije, XLVII Savetovanje SHD, Book of abstracts, 122, Novi Sad, Srbija, 2010.

2. Danica S. Dimitrijević, Danijela A. Kostić, Gordana S. Stojanović, Novica R Ristic, and Jasmina M. Veličković, Phenolic composition and antioxidant activity of acetone extracts of mulberries from Serbia, Belgrade Food International Conference, Food, health and well being, P 1.30, 69, Belgrade, 2012

- 3.** Jasmina M. Veličković, Danica S. Dimitrijević , Danijela A. Kostić, Gordana S. Stojanovic, and Novica R. Ristic, Phenolic composition, antioxidant and antimicrobial activity of the extracts from *Prunus spinosa* L. fruit, Belgrade Food International Conference, Food, health and well being, P 1.30, 70, Belgrade, 2012