



UNIVERZITET U NIŠU
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET
DEPARTMAN ZA HEMIJU

Milan B. Stojković

**ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST,
FENOLNI I MINERALNI SASTAV BILJNIH
VRSTA: *Geranium macrorrhizum* L., *Allium
ursinum* L., *Stachys germanica* L. I *Primula
veris* L.**

doktorska disertacija

Niš, 2014



UNIVERSITY OF NIŠ
FACULTY OF SCIENCE AND MATHEMATICS
DEPARTMENT OF CHEMISTRY

Milan B. Stojković

**ANTIOXIDANT ACTIVITY, PHENOLIC
AND MINERAL CONTENT OF PLANT
SPECIES: *Geranium macrorrhizum* L., *Allium
ursinum* L., *Stachys germanica* L. AND *Primula
veris* L.**

PhD thesis

Niš, 2014

Mentor:

dr Snežana Mitić, redovni profesor Prirodno-matematičkog fakulteta
Univerziteta u Nišu

Članovi komisije:

dr Danijela Kostić, redovni profesor Prirodno-matematičkog fakulteta
Univerziteta u Nišu,

dr Aleksandra Pavlović, vanredni profesor Prirodno-matematičkog fakulteta
Univerziteta u Nišu,

dr Biljana Kaličanin, vanredni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u
Nišu.

Ova doktorska disertacija je rađean u laboratorijama Departmana za hemiju Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Nišu. Radom je rukovodila dr Snežana Mitić, redovni profesor PMF-a u Nišu kojoj se ovim putem zahvaljujem na pomoći i sugestijama u toku izrade i pisanja rada.

Takođe se zahvaljujem svojim kolegama sa Katedre za analitičku i fizičku hemiju, Departmana za hemiju, na korisnim savetima, saradnji i razumevanju. Zahvalnost dugujem i Medicinskom fakultetu za eksperimentalni rad urađen u laboratorijama ovog fakulteta.

Zahvaljujem se svim kolegama, prijateljima a posebno porodici na strpljenju i podršci.

Autor



**ПРИРОДНО - МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ
НИШ**

КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАЦИЈА

Редни број, РБР:	
Идентификациони број, ИБР:	
Тип документације, ТД:	монографска
Тип записа, ТЗ:	текстуални / графички
Врста рада, ВР:	докторска дисертација
Аутор, АУ:	Милан Б. Стојковић
Ментор, МН:	Снежана Митић
Наслов рада, НР:	Антиоксидативна активност, фенолни и минерални састав биљних врста <i>Geranium macrorrhizum</i> L., <i>Allium ursinum</i> L., <i>Stachys germanica</i> L. и <i>Primula veris</i> L.
Језик публикације, ЈП:	српски
Језик извода, ЈИ:	енглески
Земља публиковања, ЗП:	Србија
Уже географско подручје, УГП:	Србија
Година, ГО:	2014.
Издавач, ИЗ:	авторски репринт
Место и адреса, МА:	Ниш, Вишеградска 33.
Физички опис рада, ФО:	205 стр., граф. прикази
Научна област, НО:	Хемија
Научна дисциплина, НД:	Аналитичка хемија
Предметна одредница/Кључне речи, ПО:	<i>Geranium macrorrhizum</i> , <i>Allium ursinum</i> , <i>Stachys germanica</i> , <i>Primula veris</i> , HPLC, UV-VIS, GC-MS, ICP, метали, антиоксиданти, анализа
УДК	542.943'78 : 633.88 [547.56 + 581.192] : 633.88
Чува се, ЧУ:	библиотека
Важна напомена, ВН:	
Извод, ИЗ:	Применом више инструменталних метода (UV-VIS спектрофотометрије, HPLC хроматографије, гасне хроматографије са масеном детекцијом, ICP емисионе спектрофотометрије) извршена је анализа антиоксидантне активности, фенолног и минералног састава биљних врста <i>Geranium macrorrhizum</i> L., <i>Allium ursinum</i> L., <i>Stachys germanica</i> L. и <i>Primula veris</i> L. Испитана је антимикробна и хепатопротективна способност екстраката. Изоловано је и анализирано етарско уље врсте <i>Allium ursinum</i> . Добијени резултати су дискутовани и статистички анализирани.
Датум прихватања теме, ДП:	4. 3. 2013.
Датум одбране, ДО:	
Чланови комисије, КО:	Председник: Члан: Члан, ментор:



**ПРИРОДНО - МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ
НИШ**

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:	Milan B. Stojković						
Mentor, MN:	Snežana Mitić						
Title, TI:	Antioxidant activity, phenolic and mineral content of plant species <i>Geranium macrorrhizum</i> L., <i>Allium ursinum</i> L., <i>Stachys germanica</i> L. and <i>Primula veris</i> L.						
Language of text, LT:	Serbian						
Language of abstract, LA:	English						
Country of publication, CP:	Serbia						
Locality of publication, LP:	Serbia						
Publication year, PY:	2014						
Publisher, PB:	author's reprint						
Publication place, PP:	Niš, Višegradska 33.						
Physical description, PD:	205 p.; graphic representations						
Scientific field, SF:	Chemistry						
Scientific discipline, SD:	Analytical chemistry						
Subject/Key words, S/KW:	Geranium macrorrhizum, Allium ursinum, Stachys germanica, Primula veris, HPLC, UV-VIS, GC-MS, ICP, metal, antioxidant, analysis						
UC	542.943'78 : 633.88 [547.56 + 581.192] : 633.88						
Holding data, HD:	library						
Note, N:							
Abstract, AB:	Antioxidant activity, phenolic and mineral content of plant species <i>Geranium macrorrhizum</i> L., <i>Allium ursinum</i> L., <i>Stachys germanica</i> L. and <i>Primula veris</i> L. were determined using a number of instrumental methods (UV-VIS spectrophotometry, HPLC chromatography, gas chromatography with mass detection, ICP emission spectrometry). Antimicrobial and hepatoprotective activity of the extracts were investigated. Essential oil of species <i>Allium ursinum</i> was acquired and analyzed. Obtained results were discussed and statistically analyzed.						
Accepted by the Scientific Board on, ASB:	4. 3. 2013.						
Defended on, DE:							
Defended Board, DB:	<table border="0"> <tr> <td>President:</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Member:</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Member, Mentor:</td> <td></td> </tr> </table>	President:		Member:		Member, Mentor:	
President:							
Member:							
Member, Mentor:							

Skraćenice

ABTS	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina)
ANOVA	Jednosmerna analiza varijanse
ATTC	Kontrolni laboratorijski sojevi mikroorganizama (american type culture collection)
CE	Katehin ekvivalent
DMSO	Dimetilsulfoksid
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal
GAE	Ekvivalent galne kiseline
GC	Gasna hromatografija (gas chromatography)
GC-MS	Gasna hromatografija-masena spektrometrija (gas chromatography-mass spectrometry)
HPLC	Tečna hromatografija sa visokim performansama (high performance liquid chromatography)
ICP	Induktivno spregnuta plazma (inductively coupled plasma)
ICP-OES	Induktivno spregnuta plazma sa optičkom detekcijom
LOD	Limit detekcije
LOQ	Limit kvantifikacije
MBC	Minimalna baktericidna koncentracija (minimum bactericidal concentration)
MFC	Minimalna fungicidna koncentracija (minimal fungicidal concentration)
MIC	Minimalna inhibitorna koncentracija (minimal inhibitory concentration)
RI	Retencioni indeks (retention index)
sbm	Suva biljna masa
TE	Troloks ekvivalent
TF	Totalni flavonoidi
TP	Totalni fenoli

Sadržaj

Skraćenice	7
Sadržaj.....	2
1 Uvod.....	6
2 Ciljevi rada.....	4
3 Opšti deo	7
3.1. Fenolna jedinjenja.....	8
3.1.1. Fenolne kiseline	8
3.1.2. Kumarini	12
3.1.3. Flavonoidi	12
3.1.4. Flavoni	13
3.1.5. Flavanoni.....	14
3.1.6. Antocijani.....	15
3.1.7. Flavonoli	17
3.1.8. Katehini.....	17
3.1.9. Tanini	18
3.2. Metali u biljkama	21
3.3. Morfološke i etnofarmakološke karakteristike odabranih biljnih vrsta	24
3.3.1. <i>Geranium macrorrhizum</i> L. (Geraniaceae).....	24
3.3.2. <i>Allium ursinum</i> L. (Amaryllidaceae)	27
3.3.3. <i>Primula veris</i> L. (Primulaceae).....	30
3.3.4. <i>Stachys germanica</i> L. (Lamiaceae).....	33
3.4. Antioksidanti.....	36
3.4.1 Slobodni radikali i oksidativni procesi u ćeliji	36
3.4.2 Biološki efekti slobodnih radikala	38
3.4.3 Antioksidanti i zaštita od oksidativnih oštećenja.....	41
3.4.4 Antioksidantni enzimi	42
3.4.5 Neenzimski antioksidanti.....	43
3.4.6 Hemijske metode za određivanje slobodnih radikala	45
3.5. UV-VIS spektrofotometrija	47
3.5.1 Nastajanje UV-VIS spektara.....	47
3.5.2 Instrument za UV-VIS određivanje (spektrofotometar)	50
3.6. HPLC hromatografija.....	55
3.6.1 <i>Normal phase</i> hromatografija	56

3.6.2 <i>Reversed phase</i> hromatografija.....	57
3.6.3 HPLC Instrument	58
3.7. Gasna hromatografija.....	61
3.7.1 Noseći gas	62
3.7.2. Gasna hromatografija sa masenom detekcijom (GC/MS)	64
3.8. ICP-OES	66
3.8.1 Pojam plazme i izvori plazme.....	66
3.8.2 Spektrometri.....	69
3.8.4. Smetnje u ICP spektrofotometriji	69
3.8.4 Tačnost i osetljivost metode.....	70
3.9. Kalibracija i greška kalibracije	72
4 Eksperimentalni deo.....	74
4.1. Materijal	75
4.2. Aparati.....	75
4.3 Hemikalije i reagensi	78
4.4. Priprema uzorka	78
4.4.1. Postupak ekstrakcije uzorka za HPLC i UV-VIS analizu	78
4.4.2. Postupak mineralizacije biljnog materijala	79
4.5. Spektrofotometrijske metode	80
4.5.1. Određivanje sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja (TP)	80
4.5.2. Određivanje sadržaja ukupnih flavonoida (TF)	82
4.5.3. Određivanje antioksidativne sposobnosti redukcijom DPPH [·] radikala.....	84
4.5.4. Određivanje antioksidativne sposobnosti redukcijom ABTS ⁺⁺ radikala	87
4.5.5. Određivanje sposobnosti redukcije jona Fe ³⁺ u Fe ²⁺	89
4.5.6. Određivanje sposobnosti redukcije jona Fe ³⁺ u Fe ²⁺	91
4.5.7. Određivanje sposobnosti redukcije jona Cu ²⁺ u Cu ⁺	93
4.6. HPLC	95
4.7. ICP metoda za određivanje mineralnog sastava	104
4.8. Izolovanje etarskih ulja	104
4.9. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti.....	105
4.10. Ispitivanje hepatoprotektivne aktivnosti	107
4.11. Statistička obrada podataka.....	108
5 Rezultati i diskusija.....	109

5.1. <i>Geranium macrorrhizum</i> L. (Geraniaceae).....	110
5.1.1 Sadržaj fenola i flavonoida i <i>in vitro</i> antioksidantna aktivnost.....	111
5.1.2 Hepatoprotективна активност	116
5.1.3 Antimikrobna aktivnost	120
5.1.4 HPLC fenolni profil	122
5.2 <i>Allium ursinum</i> L. (Amaryllidaceae)	129
5.2.1 Mineralni sastav	129
5.2.2 Mineralni sastav zemljišta.....	133
5.2.3 Antioksidantna aktivnost	137
5.2.4 Antimikrobna aktivnost	141
5.2.5 GC-MS profil etarskog ulja divljeg luka	142
5.3 <i>Stachys gemanica</i> L. (Lamiaceae)	160
5.3.1 Mineralni sastav	160
5.3.2 Sadržaj fenola i flavonoida i antioksidantna aktivnost	163
5.3.3 HPLC fenolni profil	166
5.4 <i>Primula veris</i> L. (Primulaceae).....	170
5.4.1 Mineralni sastav	170
5.4.2 Antioksidantna aktivnost	173
6 Izvod	180
7 Summary	183
8 Literatura.....	186
9 Biografija sa bibliografijom.....	201

1 Uvod

1 UVOD

Mnoge biljne vrste se od davnina koriste kao lekovite (za pripremanje čajeva, napitaka, krema...) kao i u ljudskoj ishrani. Čak i danas, 75% jedinjenja koja se koriste u medicinske svrhe biljnog je porekla, dok se četvrtina svih lekova dobija izolovanjem iz biljne mase (Newman, 2007; Brajson, 2005). Najprodavaniji lek svih vremena-aspirin (Vishweshwar, 2005), koji je po hemijskoj strukturi acetilsalicilna kiselina, najpre je dobijen izolovanjem salicilne kiseline iz bele vrbe (*Salix alba*) koju je potom Feliks Hofman (Felix Hoffmann) hemijski modifikovao kako bi manje dražila želudac (Čeković, 2012).

U prošlosti su ljudi na osnovu iskustva i opažanja uspevali da razlikuju jestive, korisne i lekovite biljne vrste od otrovnih i štetnih. Znanja o blagotvornim efektima biljnih ekstrakta prenosila su se generacijama i sve do XIX veka aktivne komponente, odnosno nosioci farmakoloških svojstava, nisu bile izolovane u čistom obliku. Sistematska istraživanja bioloških aktivnosti prirodnih proizvoda iz biljaka počela su tek krajem četrdesetih godina XX veka. Kao rezultat napornih i iscrpnih istraživanja nađen je veliki broj molekula biljnog porekla koji se danas uspešno koriste kao lekovi (kao originalne supstance ili hemijski izmenjene).

Danas, primenom najsavremenijih instrumentalnih metoda, moguća je detaljna kvalitativna i kvantitativna analiza, izolovanje i ispitivanje čak i tragova supstanci prisutnih u biljnim tkivima (Harvey, 2008). Zbog toga su analize hemijskog sastava biljaka i biljnih ekstrakata veoma značajne u pronalaženju novih lekova.

Upotreba začina aromatičnih i začinskih biljaka kao prirodnih konzervanasa datira još od antičkih vremena. Još su stari narodi zapazili da dodavanje začina ne samo da poboljšava ukus hrane nego i sprečava kvarenje. Nosioci fungicidnih, baktericidnih i antioksidantnih osobina začina mogu da budu različiti molekuli koji se nalaze u začinskom bilju. Najčešće korišćeni antioksidanti u prehrabbenim proizvodima su sintetskog porekla (butilovani hidroksianizol, butilovani hidroksitoluen, propilgalat, terc-butilhidrohinon). Zbog njihove potencijalne toksičnosti prekomerna upotreba sintetskih antioksidanata je dovedena u pitanje, a zahtevi potrošaca su usmereni ka korišćenju prirodnih antioksidanata. Jedinjenja biljnog porekla sa jednim ili više fenolnih prstenova pokazuju jako antioksidantno dejstvo i mogu biti dobra alternativa sintetskim antioksidantima.

Ispitivanje sadržaja metala u namirnicama biljnog porekla koje se koriste u ljudskoj ishrani ima za cilj kako praćenje i procenu njihove nutritivne vrednosti tako i ispitivanje potencijalne kontaminacije teškim metalima.

Rad je podeljen na: ***Opšti deo, Eksperimentalni deo, Rezultate i diskusiju, Izvod, Summary, Literaturu i Biografiju sa bibliografijom.***

U ***Opštem delu*** dat je kratak osvrt na fenolna jedinjenja, antioksidante, ulogu metala u biljkama i morfološke karakteristike ispitivanih biljnih vrsta. Takođe, obrađeni su osnovni principi instrumentalnih metoda korišćenih u radu: UV-VIS spektrofotometrije, ICP-OES, HPLC i gasne hormatografije. Jedno poglavlje posvećeno je kalibraciji i greškama pri kalibraciji.

1 UVOD

U **Eksperimentalnom delu** je dat program eksperimentalnog rada, opisan je način pripreme uzorka. Detaljno su opisane primenjene procedure za UV-VIS spektroskopiju, ICP-OES, HPLC i gasnu hromatografiju. Takođe, predstavljeno je ispitivanje antimikrobnе i hepatoprotektivne aktivnosti.

U delu **Rezultati i diskusija** izloženi su rezultati do kojih se došlo u istraživanju mineralnog sastava, antioksidantne sposobnosti i fenolnog sastava biljnih vrsta *Geranium macrorrhizum* L., *Allium ursinum* L., *Stachys germanica* L. i *Primula veris* L. Izvedene korelacije su proverene statističkom obradom dobijenih rezultata.

U delu **Izvod** dat je kratak pregled dobijenih rezultata.

2 Ciljevi rada

2 CILJEVI RADA

Uzorci biljnog porekla nekada sadrže malu količinu nepoznatih sekundarnih metabolita koji mogu posedovati jaku biološku aktivnost, a mogu da budu zanemareni ili nedovoljno ispitani. Primena savremenih instrumentalnih metoda u kvalitativnoj i kvantitativnoj hemijskoj analizi jedinjenja biljnog porekla omogućava brzo dobijanje pouzdanih rezultata.

Uzimajući u obzir sve napred navedene relevantne faktore u okviru ove doktorske disertacije postavljeni su sledeći ciljevi:

- Optimizacija, validacija i primena HPLC metode u ispitivanju biljnih ekstrakta;
- Ispitivanje antioksidantne aktivnosti različitih ekstrakta navedenih biljnih vrsta;
- Optimizacija, validacija i primena ICP-OES metode u određivanju sadržaja metala u biljnim uzorcima;
- Optimizacija, validacija i primena GC-MS metode u ispitivanju komponenti etarskih ulja.

U cilju istraživanja prisutnih bioaktivnih komponenti bile su ispitivane sledeće biljne vrste:

1. *Geranium macrorrhizum* L.,
2. *Allium ursinum* L.,
3. *Stachys germanica* L. i
4. *Primula veris* L.

Pri čemu su urađene sledeće analize:

1. *Geranium macrorrhizum* L.:

- Ekstrakcija aktivnih komponenti pomoću više rastvarača,
- Određivanje količine ukupnih fenola i ukupnih flavonoida,
- Ispitivanje antioksidantne aktivnosti (DPPH, ABTS, FRAP, IRA, CUPRAC),
- Određivanje fenolnog sastava metanolnog ekstrakta,
- Antimikrobnna aktivnost metanolnog ekstrakta,
- Hepatoprotективna aktivnost metanolnog ekstrakta.

2. *Allium ursinum* L.:

- Određivanje količine ukupnih fenola i ukupnih flavonoida,
- Ispitivanje antioksidantne aktivnosti (DPPH, ABTS, DMPD, IRA, CUPRAC),
- Određivanje sadržaja hlorofila,
- Izolovanje i detaljna analiza etarskog ulja,
- Antimikrobnna aktivnost etarskog ulja,
- Hemijska analiza mineralnog sastava biljne vrste i zemljjišta.

3. *Stachys germanica* L.:

- Određivanje količine ukupnih fenola i ukupnih flavonoida,

2 CILJEVI RADA

- Ispitivanje antioksidantne aktivnosti (DPPH, ABTS, IRA, FRAP),
- Određivanje fenolnog sastava metanolnih ekstrakata,
- Hemijska analiza mineralnog sastava biljne vrste.

4. *Primula veris* L.:

- Ekstrakcija aktivnih komponenti pomoću više rastvarača,
- Određivanje količine ukupnih fenola i ukupnih flavonoida,
- Ispitivanje antioksidantne aktivnosti (DPPH, ABTS, DMPD, IRA, CUPRAC),
- Hemijska analiza mineralnog sastava biljne vrste.

3 Opšti deo

3.1. Fenolna jedinjenja

Fenolna jedinjenja predstavljaju široko rasprostranjenu grupu biljnih metabolita koja mogu biti vrlo jednostavne strukture, kao što su fenolne kiseline ili vrlo složene strukture, odnosno polikondenzovana jedinjenja kao što su kondenzovani tanini. Zajednička karakteristika fenolnih jedinjenja je da sadrže aromatičan prsten sa jednom ili više hidroksilnih grupa (koje mogu biti metilovane ili esterifikovane). Do danas je identifikovano više od hiljadu različitih prirodnih fenola, u slobodnom obliku ili češće u obliku glikozida (Leucuta i sar., 2005). Monosaharidi koji najčešće ulaze u sastav glikozida su: glukoza, galaktoza, arabinoza, ramnoza, ksiloza, manoza, glukuronska i galakturonska kiselina, pored toga šećeri mogu biti prisutni u obliku: mono-, di-, tri-, ili tetra-saharida.

Postoje različite klasifikacije fenolnih jedinjenja i većina je zasnovana na hemiskoj strukturi mada su za svaku klasu poznati i putevi njihove biosinteze. Ova jedinjenja se mogu podeliti u sledeće grupe (Hurtado-Fernández i sar. 2010):

1. Prosti fenoli
 - Fenolne kiseline (derivati benzoeve i cimetne kiseline)
 - Kumarini
2. Polifenoli
 - Flavonoidi (flavanoni, flavoni, flavonoli, katehini, antocijani)
 - Tanini (hidrolizabilni i kondenzovani)

Međutim, najčešća klasifikacija se zasniva na broju ugljenikovih atoma vezanih za osnovni skelet fenola (Robards i sar., 1999), što je prikazano u tabeli 3.1.1.

Najzastupljenija fenolna jedinjenja su: fenolne kiseline (derivati benzoeve i cimetne kiseline), flavonoidi i dihidrohalkoni.

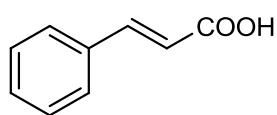
3.1.1. Fenolne kiseline

Fenolne kiseline su sekundarni metaboliti rasprostranjeni isključivo u bilnjom svetu. Ova jedinjenja su zaslužna za jedinstven ukus i aromu povrća i voća (Tomas-Barberan i Espin, 2001). Fenolne kiseline su jedinjenja koja obuhvataju veliku grupu široko rasprostranjenih hidroksi-derivata cimetne (slika 3.1.1) i benzoeve kiseline (slika 3.1.2). Hidroksicimetne kiseline se u biljkama mogu naći u slobodnom obliku ili u obliku mnogobrojnih estara, kao na primer sa hinskom kiselom (hlorogenska kiselina), vinskom kiselom (kaftarna kiselina), glukozom (1-O cinamoilglukoza), holinom (sinapin) i drugim. Galna kiselina ulazi u sastav mnogih tanina (galotanini, kao što je pentagaloilglukoza), jedinjenja nađenih u biljkama, a korišćenih od davnina za štavljenje kože (Dewick, 2002).

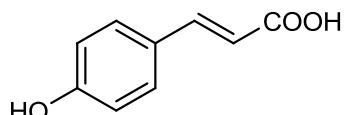
Tabela 3.1.1: Klasifikacija fenolnih jedinjenja

<i>osnovni skelet</i>	<i>klasa</i>	<i>primer jedinjenja</i>
C_6	prosti fenoli benzohinoni	katehol, hidrohinon, rezorcinol
C_6-C_1	fenolne kiseline	4-hidroksibenzoeva, salicilna
C_6-C_2	fenilsirćetne kiseline	4-hidroksifenilsirćetna kiselina
C_6-C_3	cimetne kiseline fenilpropeni kumarini hromoni	ferulna, kafena, kumarna eugenol, miristicin umbeliferon, eskuletin eugenin
C_6-C_4	naftohinoni	juglon
$C_6-C_1-C_6$	ksantoni	
$C_6-C_2-C_6$	stilbeni antrahinoni	resveratrol
$C_6-C_3-C_6$ flavonoidi	flavanoni flavoni flavonoli katehini antocijani halkoni	naringenin, hesperetin apigenin, luteolin kvercetin, kaempferol catehin, epikatehin galokatehin, epigalokatehin pelargonodin, cijanidin
$(C_6-C_3)_2$	lignini	pinoresinol
$(C_6-C_3.C_6)_2$	biflavonoidi	agatisflavon

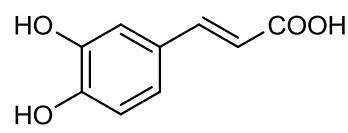
Fenolne kiseline su prisutne u žitaricama - pšenici, ražu, ječmu, kukuruzu, pirinču (Zielinski i sar., 2001; Irakli i sar., 2012). Ima ih u lekovitom bilju: kamilici - *Matricaria chamomilla* (Nováková i sar., 2010), nani - *Mentha piperita* (Dorman i sar., 2003), majčinoj dušici - *Thymus serpyllum* (Boros i sar., 2010), matičnjaku - *Melissa officinalis* (Marques i Farah, 2009; Barros i sar., 2013), žalfiji - *Salvia officinalis* (Santos-Gomes i sar., 2002) i drugim. U velikoj količini su nađene u voću i povrću: jabuci (Dragovic-Uzelac i sar., 2005), krušci (Escarpa i González, 1999), grožđu (Gómez-Alonso i sar., 2007), malini, kupini, jagodi (Häkkinen i sar., 1999), višnji (Usenik i sar., 2008), paradajzu (Sánchez-Rodríguez isar., 2012), crnom luku (Prakash i Singh, 2007), peršunu (Kaiser i sar., 2013), zelenoj salati (Romani i sar., 2002) i drugim.



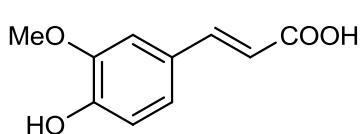
Cimetna kiselina



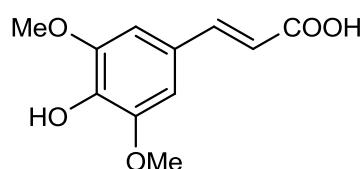
p-Kumarna kiselina



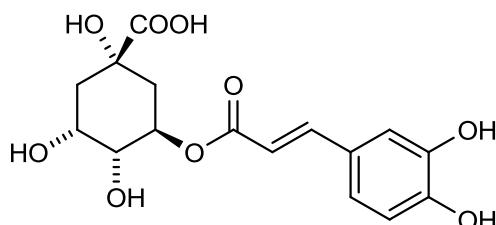
Kafena kiselina



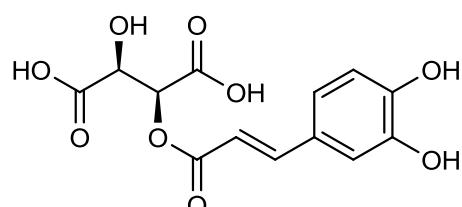
Ferulna kiselina



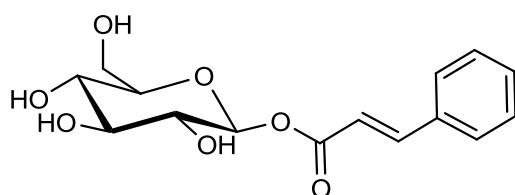
Sinapinska kiselina



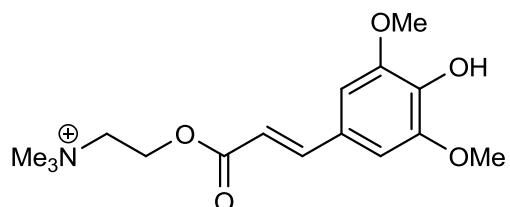
Hlorogenska kiselina



Kaftarna kiselina



1-*O*-Cinamoilglukoza

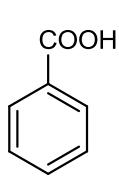


Sinapin

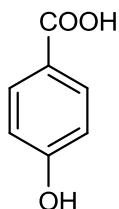
Slika 3.1.1: Cimetna kiselina i njeni derivati

4-hidroksibenzoeva kiselina je nađena u biljci *Cassia fistula* (drvo zlatne kiše) u tolikoj količini da je moguće njeno izolovanje (Duraipandiyan i Ignacimuthu, 2007). Velike količine rosmarinske, siringinske i sinapinske kiseline nađene su u biljci *Borago officinalis* (Mhamdi i sar., 2010). Najprodavaniji lek svih vremena – aspirin, koji je po hemijskoj strukturi acetilsalicilna kiselina, dobijen je najpre izolovanjem iz kore bele vrbe - *Salix alba* L. (Vishweshwar i sar., 2005).

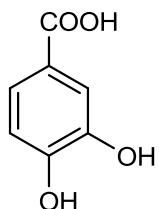
3 OPŠTI DEO



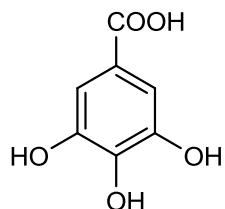
Benoeva kiselina



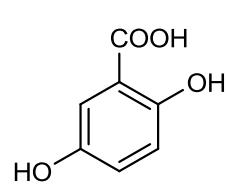
4-hidroksibenzoeva
kiselina



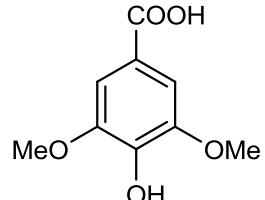
Protokatehinska
kiselina



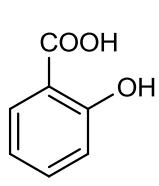
Galna kiselina



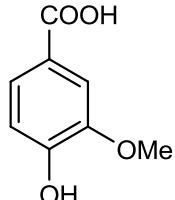
2,5-dihidroksibenzoeva
kiselina



Siringinska kiselina

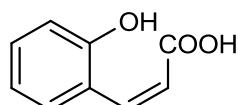


Salicilna kiselina

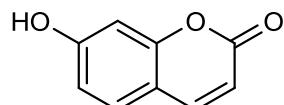


Vanilinska kiselina

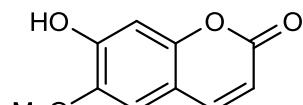
Slika 3.1.2: Benzoeva kiselina i njeni derivati



o-hidroksicimetna kiselina



umbeliferon



skopoletin

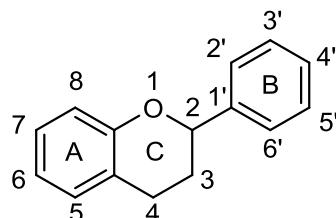
Slika 3.1.3: o-hidroksicimetna kiselina i njeni derivati

2.1.2. Kumarini

Kumarini su laktoni *o*-hidroksicimetne kiseline (slika 3.1.3). Većina prirodnih kumarina ima hidroksilnu ili alkoxi-grupu u položaju 7. Kumarini su veoma rasprostranjeni u prirodi, a naročito ih ima u biljkama iz roda trava, orhidejama, limunu i mahunastim biljkama. Neki od kumarina su inhibitori a neki stimulatori rasta biljaka. Poznati su kumarini koji imaju narkotičan i toksičan efekat (Lajšić i Grujić-Injac, 1998). Umbeliferon i skopoletin su prosti kumarini izolovani iz viših biljaka.

3.1.3. Flavonoidi

Flavonoidi su prirodna jedinjenja biljnog porekla. Preko 4000 različitih flavonoidnih jedinjenja je do sada identifikovano u biljnim tkivima i njihov sadržaj (kvalitativni i kvantitativni) varira u zavisnosti od starosti biljke i uslova sredine u kojoj je biljka rasla (Cook i Samman, 1996). Ime potiče od Kostaneckog koji je 1898. godine objavio prve radove o izolovanju hrizina, jedinjenja iz grupe flavona (lat. *flavus* = žut). Flavonoidi su najzastupljenija grupa fenolnih jedinjenja u biljkama sa 15 atoma ugljenika u osnovnoj C₆-C₃-C₆ strukturi, od kojih devet pripada benzopiranskom prstenu (benzenski prsten A kondenzovan sa piranskim prstenom C) a ostalih šest ugljenikovih atoma čine benzenski prsten B povezan sa benzopiranskim prstenom na poziciji dva. Osnovni skelet flavonoida sa obeležavanjem atoma dat je na slici 3.1.4.



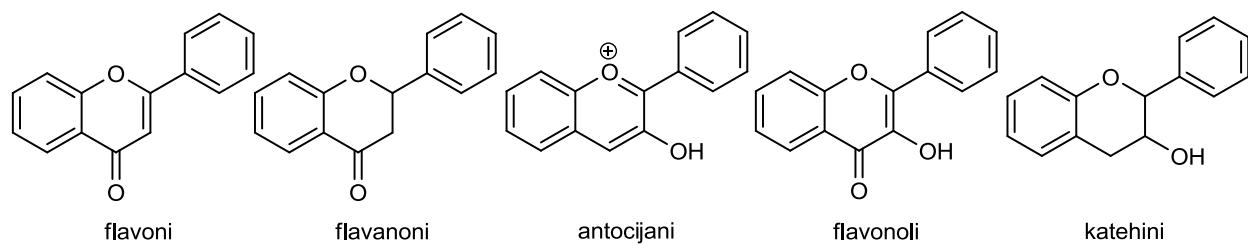
Slika 3.1.4: Osnovni skelet flavonoida

Funkcija flavonoida u biljnim tkivima je višestruka: to su biljni pigmenti, štite biljku od UV zračenja, insekata, temperaturnog i oksidativnog stresa a služe i kao hemijski signalni molekuli. Dokazano je da se sintetišu kao odgovor na povećanu koncentraciju nekih metala u zemljištu (na primer aluminijum). Ipak, uprkos povećanom istraživanju funkcije flavonoida u poslednjih nekoliko godina mnoge pojedinosti su i dalje nerazjašnjene (Andersen i Markham, 2006).

Zbog svoje specifične strukture flavonoidi su potencijalni prirodni antioksidanti. Prisustvo flavonoida dovodi do prekidanja slobodno-radikalnih reakcija, pri čemu oni predaju atom vodonika radikalima i sami prelaze u slobodne radikale. Ovako nastali slobodni radikali rezonantno su stabilizovani i nemaju dovoljno energije da pokrenu lančanu reakciju sa supstratom.

Kao snažni antioksidanti, fenolna jedinjenja različitim mehanizmima neutrališući slobodne radikale u ćelijama, umanjuju lipidnu peroksidaciju ćelijske membrane, mogu da spreče oksidativna oštećenja DNK i širenje tumora (Havsteen, 2002). Fenolna jedinjenja kao antioksidanti, mogu uticati i na primarni proces starenja, mogu biti efikasni inhibitori oksidacije LDL, a epidemiološka proučavanja pokazuju inverzni odnos između unosa hrane bogate flavonoidima i kardiovaskularnih oboljenja. Svi ovi podaci ukazuju na to da povećana konzumacija voća i povrća bogatog nutritivnim sastojcima koji ispoljavaju antioksidativna svojstva može doprineti poboljšanju kvaliteta života. Nutricionisti procenjuju da je dnevni unos flavonoida putem hrane oko 1-2 grama (Havsteen, 2002).

Flavonoidi se na osnovu oksidacionog stanja prstena C mogu podeliti u pet većih grupa: flavoni, flavanoni, antocijani, flavonoli i katehini (slika 3.1.5).



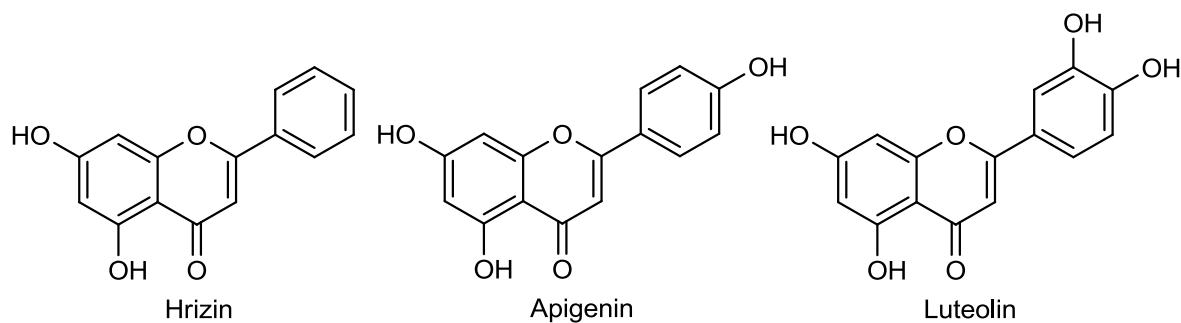
Slika 3.1.5: Podela flavonoida na osnovu oksidacionog stanja prstena C

3.1.4. Flavoni

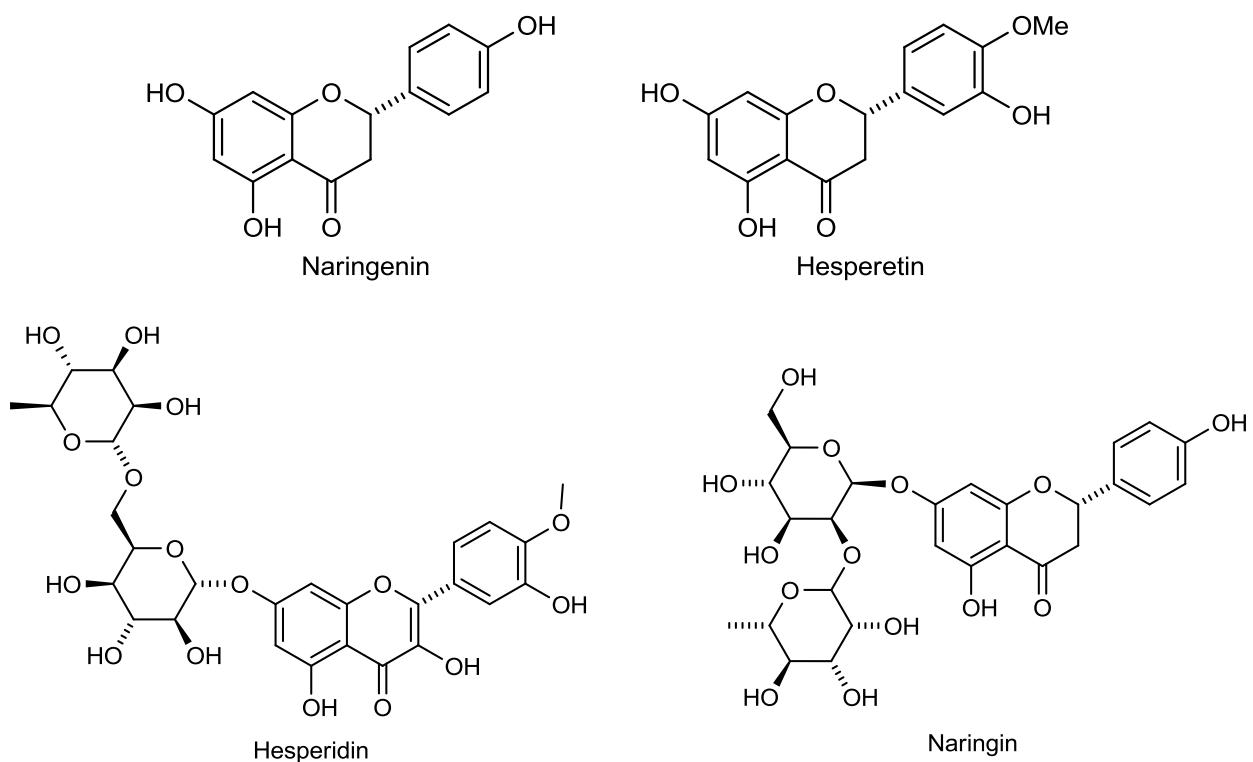
Flavoni su najrasprostranjeniji žuti biljni pigmenti (tamnije nijanse žute boje potiču od karotenoida). U biljkama se najčešće nalaze u obliku glikozida ili estara taninskih kiselina¹. Flavoni koji se najčešće sreću u biljnom svetu su apigenin, luteolin i hrizin (slika 3.1.6). Nađeni su u lekovitom bilju: kamilici (Nováková i sar., 2010), žalfiji (Santos-Gomes i sar., 2002; Kontogianni i sar., 2013), nani (Areias i sar., 2001) i drugim. Pored toga, nađeni su i u lišću masline (Škerget i sar., 2005), vinu (Fang i sar., 2007), spanaću (Dehkharghanian i sar., 2010), medu (Baltrušaitytė i sar., 2007; Karakaya i Nehir, 1999) i drugim biljkama i namirnicama biljnoig porekla.

Pored slobodnog oblika, često se mogu naći i u obliku glikozida gde su najčešće vezani za glukozu.

¹ Taninske kiseline su po hemijskoj strukturi estri glukoze ili hinske kiseline sa od 2 do 12 molekula galne kiseline, što zavisi od biljke u kojoj se taninske kiseline nalaze. Pripadaju grupi hidrolizabilnih tanina.



Slika 3.1.6: Najrašireniji flavoni



Slika 3.1.7: Najrašireniji flavanoni

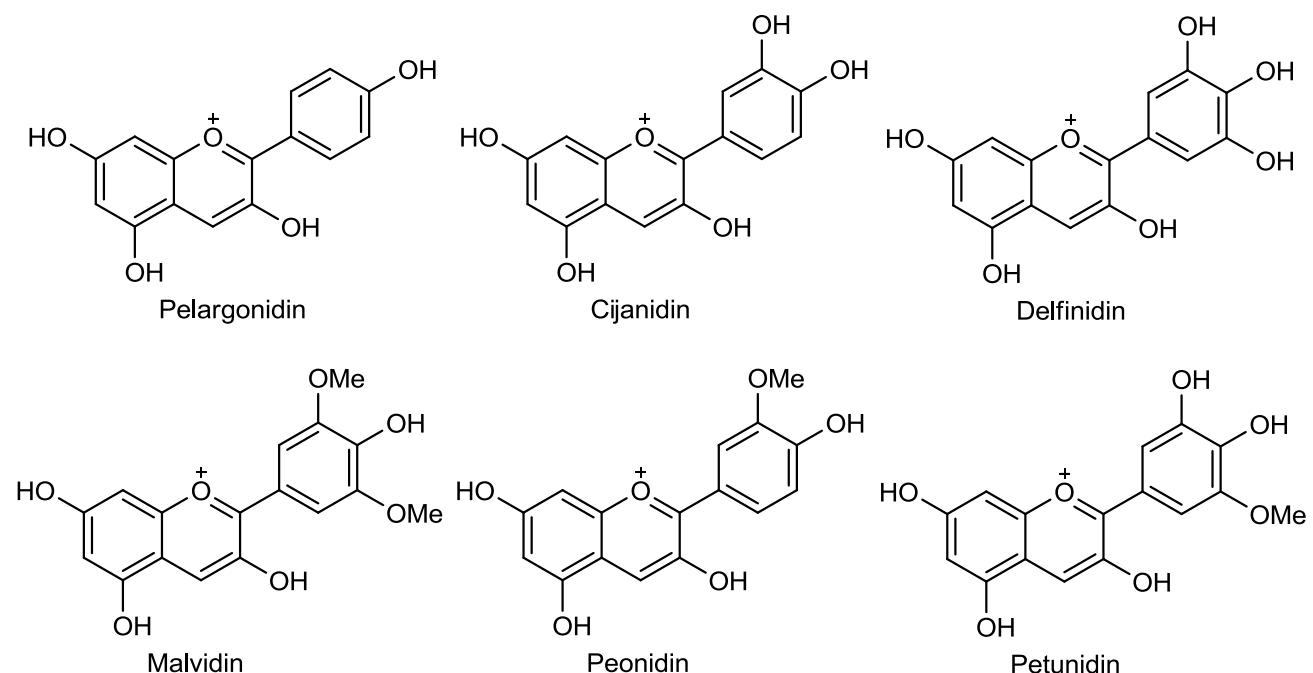
3.1.5. Flavanoni

Flavanoni su bezbojna ili slabo žuto obojena jedinjenja. Najpoznatiji su naringenin i hesperetin (slika 3.1.7). Oni se u prirodi retko nalaze u slobodnom obliku, mnogo češće su vezani sa šećernom komponentom u glikozide – naringin, neohesperidin i hesperidin.

Ovi glikozidi se u prirodi nalaze u velikoj količini u citrusnom voću: grejpfrutu (Ribeiro i Ribeiro, 2008), limunu, mandarini, limeti, (Ramful i sar., 2011) i narandži (He i sar., 2011) odakle su prvo i bili izolovani. Nađeni su i u drugim biljnim vrstama (Van der Watt i Pretorius, 2001; Kokotkiewicz i sar., 2012).

3.1.6. Antocijani

Antocijani (g. ἀνθός, antos=cvet, g. κιανός, kianos=plav) su klasa flavonoidnih jedinjenja koja predstavljaju prave biljne pigmente. Mogu se naći u svim delovima biljke, od cveta do korena. To su plavi i crveni biljni pigmenti koji su prvi put izolovani još 1835. godine. Osim što imaju ulogu biljnih pigmenata, štite biljku i od prekomerne UV svetlosti, od štetnog dejstva slobodnih radikala, a smatra se i da predstavljaju signalne molekule u odgovoru biljke na negativne spoljašnje uticaje (Gould i sar., 2009).



Slika 3.1.8: Najrasprostranjeniji antocijani

Antocijani se u biljkama nalaze isključivo u obliku glikozida nastalih vezivanjem flavonoidne komponente (antocijanidina) sa šećernom komponentom, najčešće glukozom. Pored glukoze kao šećerna komponenta glikozida mogu se naći i galaktoza i ramanoza. Vezivanjem za šećernu komponentu povećava se stabilnost antocijanidina i njegova rastvorljivost u vodi. Ukoliko antocijani sadrže samo jedan molekul šećera onda se on nalazi isključivo vezan u položaju 3, a ako sadrže dva, onda su ili diglikozid u položaju 3, ili se šećeri nalaze u položajima 3 i 5. Osnovna hemijska karakteristika antocijana je da svi sadrže 3,5,7-trihidroksiflavilijum jon (Lajšić i Grujić-Injac, 1998).

Najčešća jedinjenja iz ove grupe u biljnom svetu su pelargonidin, cijanidin, delfinidin, malvidin, peonidin i petunidin (slika 3.1.8).

3 OPŠTI DEO

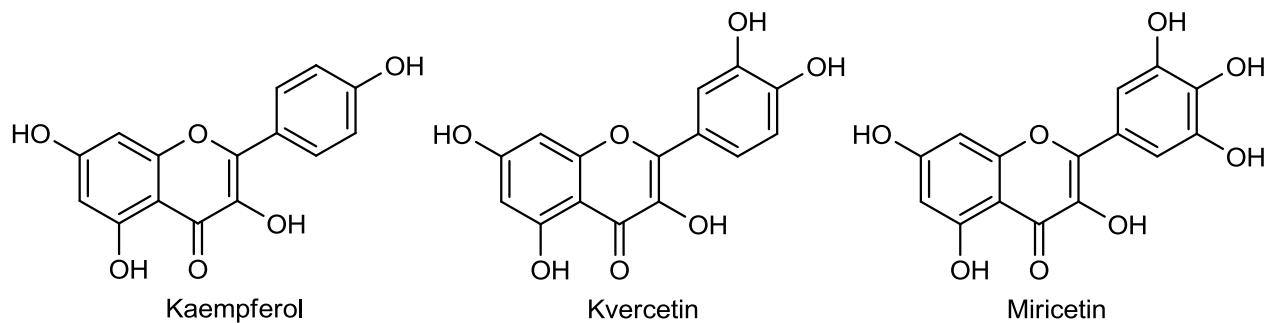
Antocijani su prisutni u obojenom voću: jabukama, grožđu (Arnous i Meyer, 2008), brusnicu (Lee, 2013), malini, kupini, ribizli (Pantelidis i sar., 2007), jagodi (Gil i sar., 1997), borovnici (Castrejón i sar., 2008) i drugom voću. Pošto daju crvenu i plavu boju laticama cveća, ima ih i u skoro svim cvetnicama.

Predstavljaju odlične antioksidante i konzumacija antocijana može imati važnu ulogu u prevenciji bolesti, povezanih sa stresnim i brzim načinom života, poput kancera, dijabetesa, kardiovaskularnih i neuroloških bolesti.

3.1.7. Flavonoli

Flavonoli se mogu naći u mnogim biljnim vrstama, kako u slobodnom obliku tako i u obliku glikozida. Kvercetin je jedan od najrasprostranjenijih flavonola i flavonoida uopšte (slika 3.1.9). Prvi put je izolovan iz američkog crnog hrasta (*Quercus velutina* Lamb.) u obliku glikozida sa ramnozom vezanom u položaju 3 (kvercitrin). Velike količine kvercetina i njegovih glikozida se nalaze u kantarionu - *Hypericum perforatum* (Škerget i sar., 2005; Bagdonaitė i sar., 2012). Kaempferol, miricetin, kvercetin i njihovi glikozidi su pronađeni u značajnoj količini u voću i povrću - spanaću, karfiolu, šargarepi, jagodama (Sultana i Anwar, 2008), brusnici (Chen i Zuo, 2007), crnom luku (Bonaccorsi i sar., 2008) i drugim.

Istraživanja su pokazala da flavonoli unešeni u organizam putem hrane pokazuju mnoge biološke efekte i aktivnosti kao što su antiinflamatorna, antialergijska, antimikrobnna, antioksidativna, antitrombotička, kardioprotektivna i vazodilatatorska (Manach i sar., 2005).



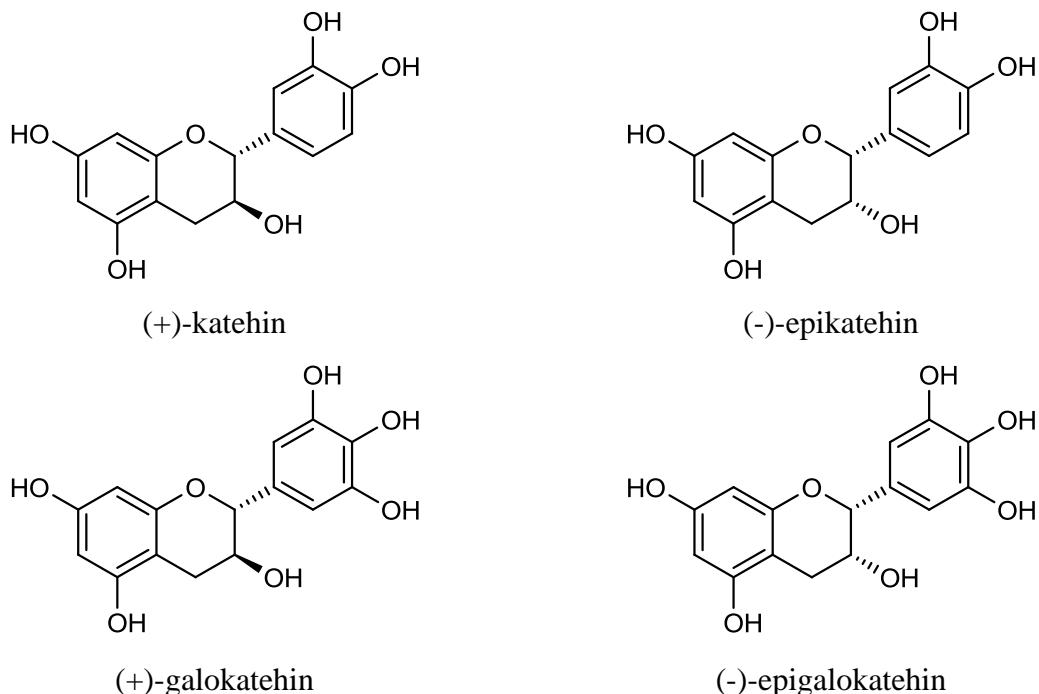
Slika 3.1.9: Najrasprostranjeniji flavonoli

3.1.8. Katehini

Katehini ili flavan-3-oli su bezbojna jedinjenja prisutna u mnogim biljnim vrstama. Ova jedinjenja se nalaze u slobodnom obliku, ali mogu biti i esterifikovana, najčešće galnom kiselinom. Velike količine katehina (slobodnih i esterifikovanih) se nalaze u zelenom čaju - *Camellia sinensis* L. (Peterson i sar. 2005; Hodgson i Croft, 2010). Njihov sadržaj može dostići i više od 20% suve mase zelenog čaja. Smatra se da je ovako visok sadržaj katehina jedan od razloga zašto zeleni čaj pozitivno utiče na ljudsko zdravlje. Najzastupljenija jedinjenja iz ove grupe u biljnom svetu data su na slici 3.1.10.

Katehini su osnovne gradivne jedinice nehidrosolubilnih (kondenzovanih) tanina, polimera koji se sastoje iz dve ili više različito vezane jedinice flavan-3-ola ili flavan-3,4-diola. Stereohemija supsticijenata na C2 i C3 atomu pojedinih jedinica, kao i stereohemija međusobno povezanih jedinica ima važnu ulogu u građenju kondenzovanih tanina. Najčešće

gradivne jedinice su: (-)-epikatehin sa 2,3 *cis* i (+)-catehin sa 2,3 *trans* položajem supsttuenata.



Slika 3.1.10: Najrasprostranjeniji katehini

3.1.9. Tanini

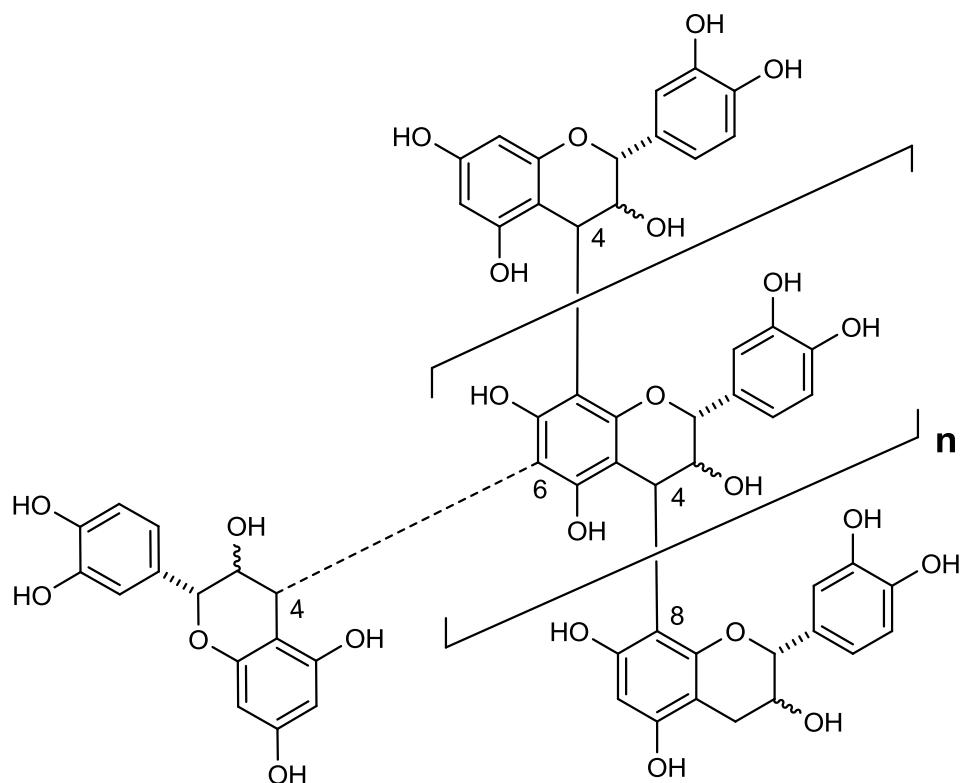
Sam termin *tanin* je uveo Seguin negde na kraju 17. veka da bi opisao biljne materije rastvorne u vodi, sposobne da štave kožu. Takođe je bio prvi koji je pokazao sposobnost tanina da talože želatin iz rastvora (Haslam, 1989).

Tanine možemo podeliti na hidrolizabilne i kondenzovane tanine (proantocijanidine). Hidrolizabilnim taninima nazivaju se sekundarni biljni metaboliti, koji su rastvorni u vodi i imaju molekulsku masu između 500 i 5000. Oni daju reakcije karakteristične za fenole i talože alkaloide i proteine iz rastvora. Hidrolizabilni tanini su mnogostruki estri galne kiseline sa glukozom i produkti njihovih oksidacionih reakcija (slika 3.1.12). Široko su rasprostranjeni u biljnom svetu (Arapitsas, 2012).

Kondenzovani tanini (proantocijanidini) obuhvataju grupu oligomera i polimera katehina (flavan-3-ola) koji su međusobno povezani ugljenik-ugljenik vezama. Njihove mnogobrojne hidroksilne grupe omogućavaju vezivanje sa proteinima (Hagerman i sar., 1998; Naczk i sar., 1996), metalnim jonima (Foo i sar., 1997; Scalbert, 1991) i sa ostalim makromolekulima kao što su polisaharidi (Mueller-Harvey i McAllan, 1992).

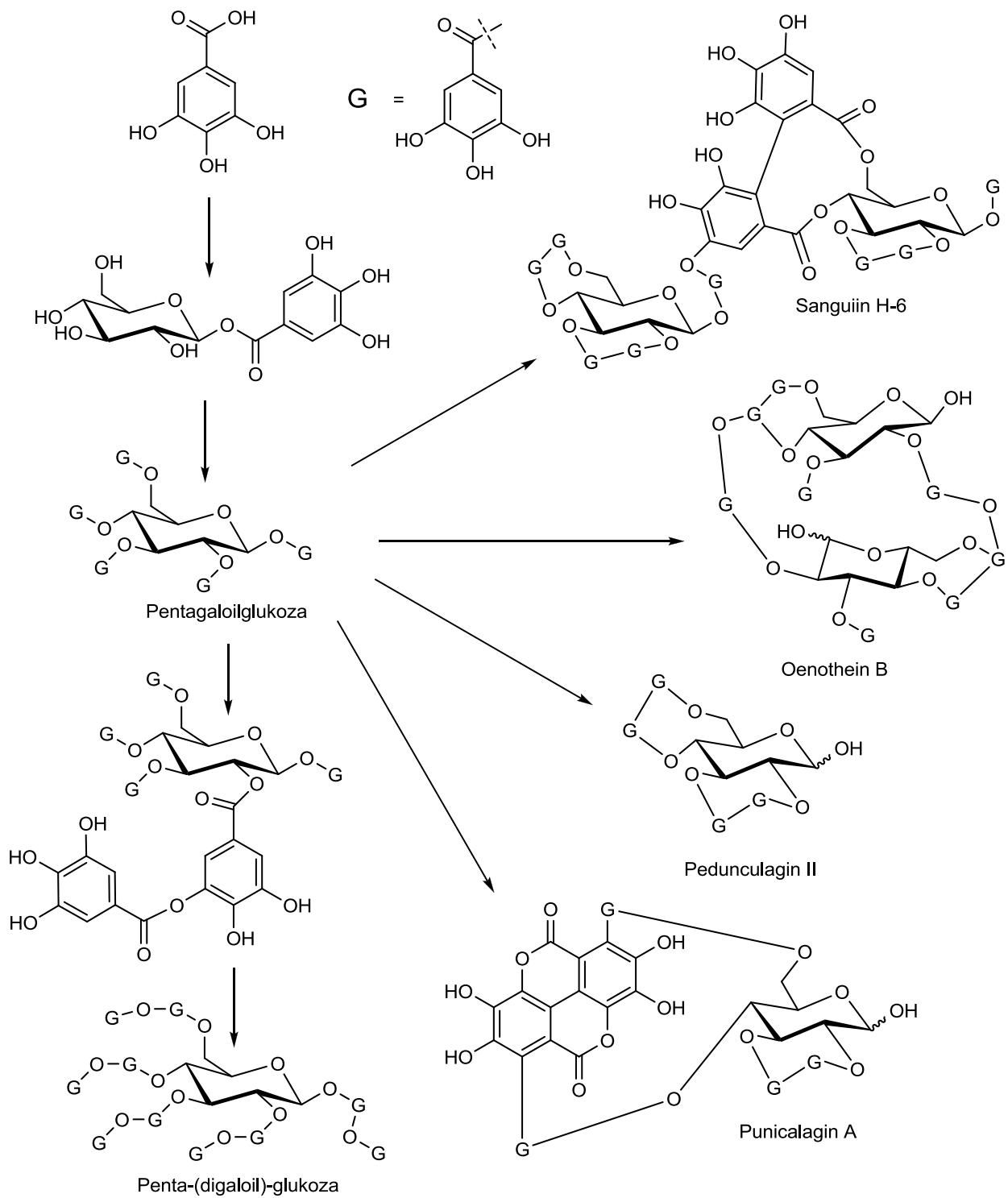
3 OPŠTI DEO

Oksidativno kuplovanje između katehinskih subjedinica se uglavnom dešava između ugljenika na položajima 4 i 8, ređe u položajima 4 i 6 (slika 3.1.11). Broj monomernih jedinica ovih tanina varira od 2 do 17 (Prieur i sar., 1994), mada može postojati i veći stepen polimerizacije, ali takvi tanini su nerastvorni i teški za proučavanje (Schofield i Mbugua, 2001).



Slika 3.1.11: Model strukture kondenzovanih tanina (u ovom slučaju procijanidin).
Vezivanje 4→6 vezom (isprekidana linija) ne mora nužno da postoji, n može da bude od 0 do 15

3 OPŠTI DEO



Slika 3.1.12: Strukture nekih hidrolizabilnih tanina

3.2. Metali u biljkama

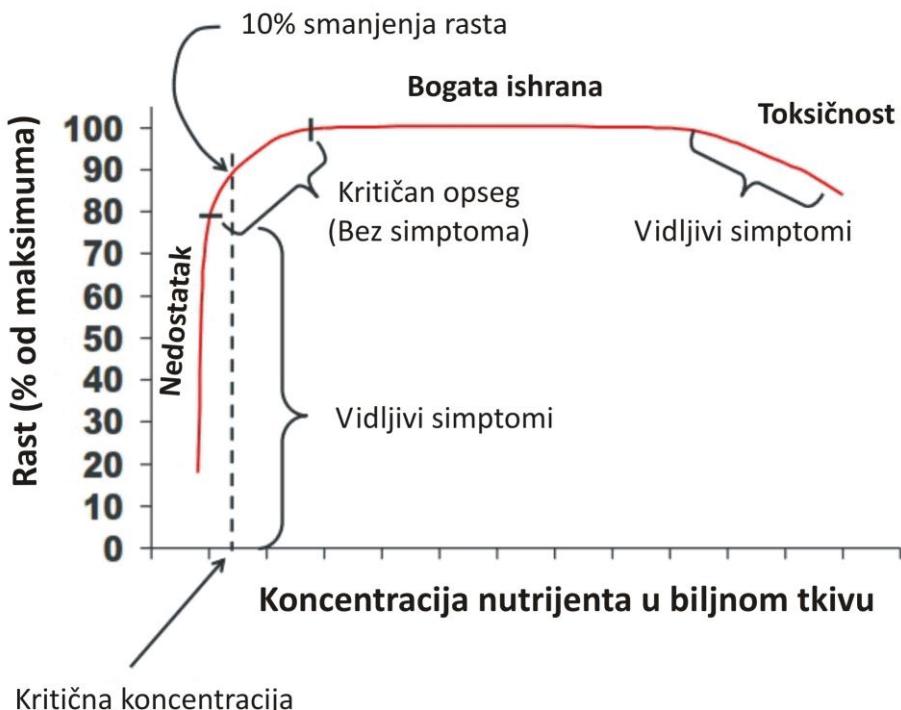
Na Zemlji postoji više od 240 hiljada vrsta viših biljaka i svakoj od njih je za rast i razmnožavanje potrebna različita količina mineralnih materija. Dok neke biljne vrste zahtevaju prisustvo pojedinih elemenata u zemljištu u višim koncentracijama, dotle su druge tolerantnije na veću koncentraciju esencijalnih elemenata, koje bi pak bile toksične za većinu drugih biljnih vrsta. Zbog velike raznovrsnosti, generalizovanje i definisanje esencijalnih minerala treba uzeti sa rezervom i dozom opreza. Dobar primer za to je natrijum, koji je esencijalan samo za one biljke koje koriste C4 fotosintezu, karakterističnu za biljne vrste koje žive u suvim i toplim uslovima.

Kriterijum koji definiše esencijalne elemente određuje da je to onaj element neophodan za kompletiranje životnog ciklusa biljke, ne može se zameniti drugim elementom i učestvuje direktno u metabolizmu biljke (Arnon i Stout, 1939).

Postoji mnogo esencijalnih nutrijenata koji su potrebni biljkama i oni su podeljeni u dve grupe po količinama neophodnim za neometan rast. Kalijum, azot, fosfor, sumpor, kalcijum i magnezijum su minerali koje većina biljaka zahteva u velikim količinama i zato su definisani kao **makronutrijenti (makroelementi)** (Wiedenhoeft, 2006). **Mikronutrijenti (mikroelementi)** su esencijalni elementi potrebni biljkama u relativno manjim količinama. U njih spada osam elemenata: gvožđe, natrijum, hlor, bor, mangan, cink, bakar i molibden (Wiedenhoeft, 2006). Neki autori (Barker i Pilbeam, 2007) smatraju i nikal mikronutrijentom. Isti autori tvrde da su aluminijum, kobalt, selen i vanadijum korisni elementi koji unapređuju rast biljaka. Ova podela na makronutrijente i mikronutrijente je korisna za praćenje važnosti pojedinih elemenata za ishranu biljaka, ali je ipak samo veštačko grupisanje elemenata od strane istraživača.

Kao što je već napomenuto, koncentracije pojedinih elemenata potrebnih biljnim vrstama za optimalan rast se jako razlikuju. Međutim, ako prikažemo relaciju između procenta maksimalnog prirasta biljke i sadržaja nutrijenata u biljnom tkivu dobijamo krivu koja ima nekoliko oblasti (slika 3.2.1). Vidimo da pri niskim koncentracijama nutrijenata (nedovoljna ishrana) biljka ne postiže optimalan rast. Za kritičnu koncentraciju smatramo onu pri kojoj biljka postiže 90% maksimalnog rasta. Ukoliko je sadržaj nutrijenata u biljnom tkivu (a samim tim i u zemljištu) iznad određene granice biljka pokazuje vidljive simptome i te koncentracije smatramo toksičnim. Oblast između kritične i toksičnih koncentracija je optimalna oblast i tada se postiže maksimum biljnog rasta.

Kao i kod drugih živih bića, od najvećeg značaja za rast biljaka su kiseonik, vodonik i ugljenik, ali njih ne uzimamo u razmatranje zato što ih biljke usvajaju iz vode i vazduha, a ne iz zemljišta.



Slika 3.2.1: Šematski prikaz relacije između procenta maksimalnog prirasta biljke i sadržaja nutrijenata u biljnom tkivu

Iako azota imaju u vazduhu biljke nisu sposobne da ga direktno apsorbiju već ga usvajaju iz zemljišta u obliku nitrata, nitrita ili amonijum jona. On je najčešći limitirajući element pri rastu biljaka i zato se zemljište namenjeno agrarnoj proizvodnji obogaćuje azotom dodavanjem veštačkih đubriva. Azot i fosfor u biljkama imaju istu biohemiju funkciju kao i kod ostalih živih bića. Azot izgrađuje aminokiseline i hlorofil, fosfor gradi fosfolipide ćelijskog zida, a zajedno ulaze u sastav nukleinskih kiselina. Fosfor biljke usvajaju iz zemljišta isključivo u obliku fosfatnog anjona (Wiedenhoeft, 2006).

Kalijum je fundamentalan za respiraciju i primarni je jon za regulisanje osmotskog pritiska. Takođe, učestvuje u aktiviranju nekih enzima. Iz zemljišta se usvaja u obliku katjona. Kalijum gradi uglavnom vrlo rastvorne soli pa je zbog toga jako podložan migraciji kada jednom dospe u zemljište. Gubitak kalijuma je često posledica šumskih požara, kada velike količine kalijuma iz sagorelih biljaka dospeju u zemljište. Međutim, tada nema drugih biljaka sposobnih da usvoje kalijum pa velike količine budu sprane kišnicom (Wiedenhoeft, 2006). Kalcijum je bitan za prenos signala, ulazi u sastav ćelijske membrane i kalmodulin enzima. Uglavnom je ekstracelularni katjon. Zbog velikog sadržaja kalcijuma u uobičajnim vrstama zemljišta, veoma se retko dešava da bude deficitaran biljkama. Magnezijum ulazi u sastav hlorofila i učestvuje u fiksaciji CO_2 iz vazduha i sintezi ugljenih hidrata kao kofaktor *rubisco* enzima (Nelson i Cox, 2004). Za razliku od kalcijuma, uglavnom je intracelularni ion. Rastvorljivost (a samim tim i pokretljivost) katjona magnezijuma u zemljištu se menja sa promenom pH.

3 OPŠTI DEO

Gvožđe je bitno za sintezu hlorofila, redoks procese u toku fotosinteze i čelijsko disanje (citohromi, Fe-S proteini, feredoksin) i može se naći u zemljištu najčešće u obliku oksida ili u asocijaciji sa nekim organskim molekulima. Cink je bitan kofaktor nekih enzima (peptidaze, proteinaze, fosforilaze, superoksid dismutaze, dehidrogenaze, karboksianhidraze). Mangan je, takođe, kofaktor enzima (piruvat karboksilaze, superoksid dismutaze i dr.). Bakar učestvije u transportu elektrona (plastocijanin), respiraciji (citohrom oksidaza) i ugrađuje se kao kofaktor u enzime (aminooksidaza) (Csuros i Csuros, 2002). Molibden je specifičan nutrijent za biljne vrste koje na svojim korenima imaju bakterije koje učestvuju u fiksaciji azota iz vazduha.

3.3. Morfološke i etnofarmakološke karakteristike odabranih biljnih vrsta

3.3.1. *Geranium macrorrhizum* L. (Geraniaceae)

(g. geranos, γερανος = ždral; g. macros, μακρος = krupan, veliki)

Geranium macrorrhizum, u našem narodu poznat kao **zdravac**, je višegodišnja zeljasta biljka iz porodice zdravaca (Geraniaceae). Poseduje jak rizom, 10 do 15 cm dug, pokriven ljuspastim zaliscima. Stablo mu je uspravno i dugačko do oko 40 cm sa velikim brojem listova u rozeti. Listovi su na dugim drškama, sa okruglom liskom do 10 cm širokom, podeljenom na sedam krupnih režnjeva. Cvetovi su uspravni, na cvetnoj stabljici i jasno su uočljivi. Krunični listići su crveni do tamno crveni, dok su čašični listići ušiljeni i jajasti. Plod je oko 2 cm dug, žutomrk. Cveta u julu i avgustu (Kojić i sar., 1998).



Slika 3.3.1: Izgled biljne vrste *Geranium macrorrhizum* L.



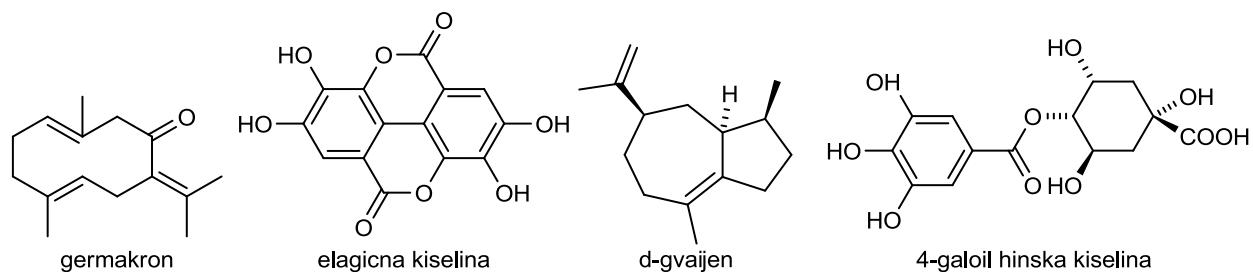
Slika 3.3.2: Izgled biljne vrste *Geranium macrorrhizum L.*

Zdravac raste na senovitim mestima najčešće na stenama. Rasprostranjen je širom Balkanskog poluostrva i naziva se još i *bugarski zdravac*. Često se gaji kao dekorativna biljka u baštama.

U narodnoj medicini se od davnina koriste kako rizom (*Geranii macrorrhizi rhizoma*) tako i nadzemni deo biljke (*G. herba*) u tretmanu dijareje, zaustavljanja krvarenja i zarastanju rana (Genova i Ivancheva, 1995). Rizom u prahu je snažan adstringens i koristi se u tretmanu otvorenih rana jer pomaže njihovom skupljanju i zarastanju. Droga se primenjuje u lečenju dizenterije, unutrašnjeg krvarenja i prekomernog gubitka krvi tokom menstruacije (Tucakov, 1990). Etnobotanička studija sprovedena u Crnoj Gori (Menković i sar., 2011) pokazala je da se čaj od zdravca koristi pri lečenju upala žučne kese i njenih kanala, bubrega i mokraćne bešike. Takođe, u Srbiji, u regionu planine Kopaonik, zdravac se koristi u tretmanu crevnih oboljenja kod životinja (Jarić i sar., 2007).

Rizom se prikuplja u jesen ili rano u proleće, očisti od zemlje i suši na suncu. Nadzemni deo se prikuplja odsecanjem cvetnih delova i suši u tankom sloju. Pri sušenju biljka brzo gubi etarsko ulje pa je bolje upotrebiti svežu drogu. Droga ima miris ruže i muskatne žalfije (Kojić i sar., 1998).

Zdravci sadrži visok procenat hidrosolubilnih i kondenzovanih tanina (Genova i Ivancheva, 1995). Fitohemijske studije sprovedene o zdravcu koncentrisane su uglavnom na dve vrste sekundarnih metabolita – isparljive konstituente (etarsko ulje) i polifenolna jedinjenja. Etarsko ulje se koristi u aromaterapiji i sastoji se uglavnom od seskviterpenoida, od kojih su najzastupljeniji germakron (49.7% u etarskom ulju nadzemnog dela biljke) i δ-gvajjen (49.2% u ulju rizoma) (Radulović i sar., 2010). Pokazano je da etarsko ulje poseduje jaku selektivnu antimikrobnu aktivnost prema bakterijskom soju *Bacillus subtilis* sa minimalnom inhibitornom koncentracijom (MIC) od 0.4–1.0 µg/ml (Radulović i sar., 2010). Fenolne kiseline kao što su galna, elaginska (ellagic) i 4-galoil hinska (4-galloyl quinic), flavonoid kvercetin i tri njegova glikozida su identifikovali u ekstraktima zdravca (Miliauskas i saradnici, 2004a). Čak su i predložili moguću upotrebu ekstrakta zdravca u sprečavanju kvarenja hrane (kobasica) (Miliauskas i sar., 2007).



3.3.2. *Allium ursinum* L. (Amaryllidaceae)

(lat. *allium* = beli luk; lat. *ursinus* = medvedi)

Rod monokotiledonih cvetnica *Allium* sadrži oko 760 do 800 biljnih vrsta koje rastu širom Severne hemisfere (Stearn 1992, Ernst i sar., 1998). Skorašnja klasifikacija deli *Allium* rod na 15 podrobova i 72 sekcije (Hirschegger, 2010). Ekonomski i nutritivno najvažnije biljke ovog roda su lukovi: beli (*A. sativum*), crni (*A. cepa*) i praziluk (*A. ampeloprasum*) koji se koriste širom sveta u ishrani.



Slika 3.3.3: Izgled biljne vrste *Allium ursinum* L.

Allium ursinum L. (Amaryllidaceae) je u narodu poznatiji pod imenom divlji luk, medvedi luk ili sremuš. To je višegodišnja zeljasta biljka koja prirodno raste u bukovim šumama širom Evrope i Severne Azije (Schmitt i sar., 2005, Wu i sar., 2009, Kojic i sar., 1998). U Srbiji je rasprostranjena



Slika 3.3.4: Izgled biljne vrste *Allium ursinum L.*

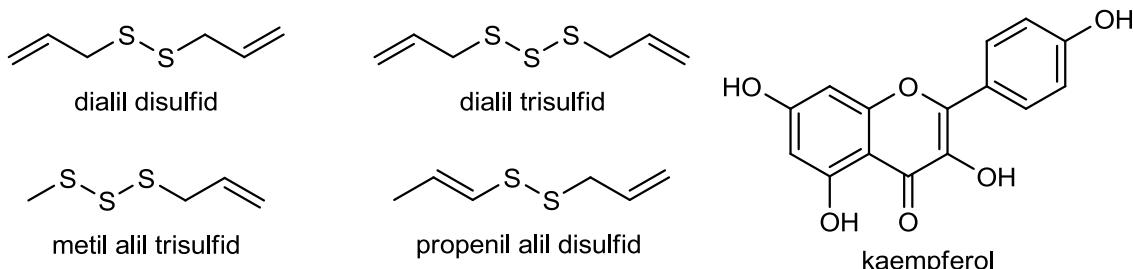
Biljna vrsta koja formira gусте populacije u šumama i platoima sa humusnim zemljиштем (Tomić, 1992). Poseduje jednu lukovicu, duguljastu, do 6 cm dugačku. Stablo je uspravno, trostrano, do 40 cm visoko. U osnovi stabla rastu dva eliptično-lancetasta lista na dugim drškama. Cvetovi su grupisani u višecvetne štitaste cvasti i bele su boje. Listovi peragona su složeni u dva kruga.

Seme je okruglo, crveno. Biljka cveta od aprila do jula (Kojić i sar., 1998). Divlji luk se javlja u gustim populacijama sa vrlo malo ili bez drugih biljnih vrsta u tom području, iskazujući visok alelopatski efekat (Djurdjević i sar., 2003).

Koristi se svež nadzemni deo biljke (*Allii ursini herba recens*) ili sveža lukovica (*A. u. bulbus recens*). Nadzemni deo se bere u proleće pre cvetanja biljke, a lukovica avgusta pre sazrevanja semena, jer biljna vrsta rano završava vegetativni razvoj. Ubrane lukovice mogu da se čuvaju nekoliko dana na prohladnom mestu (Kojić i sar., 1998). Najveći deo preparata od sremuša u narodnoj medicini sačinjen je od vodeno-alkoholnog ekstrakta. Ti preparati se koriste kod poremećaja želudačno-crevnog trakta (infekcijske upale sluzokože), kao profilaktička sredstva protiv gripa i prehlade, snižavaju visok krvni pritisak i povoljno deluju na kardiovaskularni sistem (Kojić i sar., 1998). Sremuš se najčešće koristi kao svež, kao izvrsna prolećna salata. Od osušenih lukovica se priprema čaj, a od svežih alkoholna tinktura. Postoje naučne studije o povoljnem dejstvu divljeg luka na organizam (Reuter, 1995). Dokazano je da sremuš snižava krvni pritisak, značajno snižava nivo ukupnog holesterola, a podiže nivo HDL holesterola (Preuss i sar., 2001). Takođe su pokazana i njegova kardioprotektivna (Rietz i sar., 1993), antiagregacijska (Hiyasat i sar., 2009), antimikrobna (Ivanova i sar., 2009, Bagiu i sar., 2012, Reuter, 1995) i antioksidativna (Stajner i sar., 2008) svojstva.

Postoji malo naučnih radova koji se bave hemijskim sastavom divljeg luka i uglavnom su koncentrisani na sastav etarskog ulja (Schmitt i sar., 2005, Gođevac i sar., 2008) ili sadržaj polifenola (Oszmiański i sar., 2013, Wu i sar., 2009, Carotenuto i sar., 1996, Parvu i sar., 2010).

U svim delovima sremuša nalazi se malo (oko 0.07%) etarskog ulja koje je teže od vode. Etarsko ulje sarži mnogo sumpornih jedinjenja, najviše dialil disulfida - 25%, dialil trisulfida - 16.5%, 1-propenil alil disulfid - 16.5% i metil alil trisulfida – 14% (Gođevac i sar., 2008). Sremuš sadrži i jedinjenja flavonoidne strukture od kojih u najvećoj količini glikozide kaempferola (Wu i sar., 2009; Carotenuto i sar., 1996).



3.3.3. *Primula veris* L. (Primulaceae)

(lat. *primus* = prvi; lat. *ver*, *veris* = proleće)

Primula veris je višegodišnja zeljasta biljka iz familije jagorčevina (Primulaceae). Ima više narodnih imena od kojih su najpoznatija jagorčevina, jaglika, igličica. Poseduje kratak koren, nerazgranat sa mnogo korenovih žilica. Listovi su u prizemnoj rozeti izduženi ili jajasti, na lisnoj dršci, dlakavi ili gusto maljavi. Iz lisne rozete izrasta jedno ili više cvetonosnih stabala, koje na vrhu nose više cvetova u štitu. Cvetovi su žuti sa narandžastom pegovom u osnovi venčića. Plod je mnogosemena čaura. Seme je loptasto, do 1.5 mm u prečniku. Biljka cveta tokom aprila i maja (Kojić i sar., 1998).

Jagorčevina raste na suvim, osunčanim livadama, u šipražju i listopadnim šumama, od brdskih do planinskih predela. Rasprostranjena je širom Evrope i Azije.



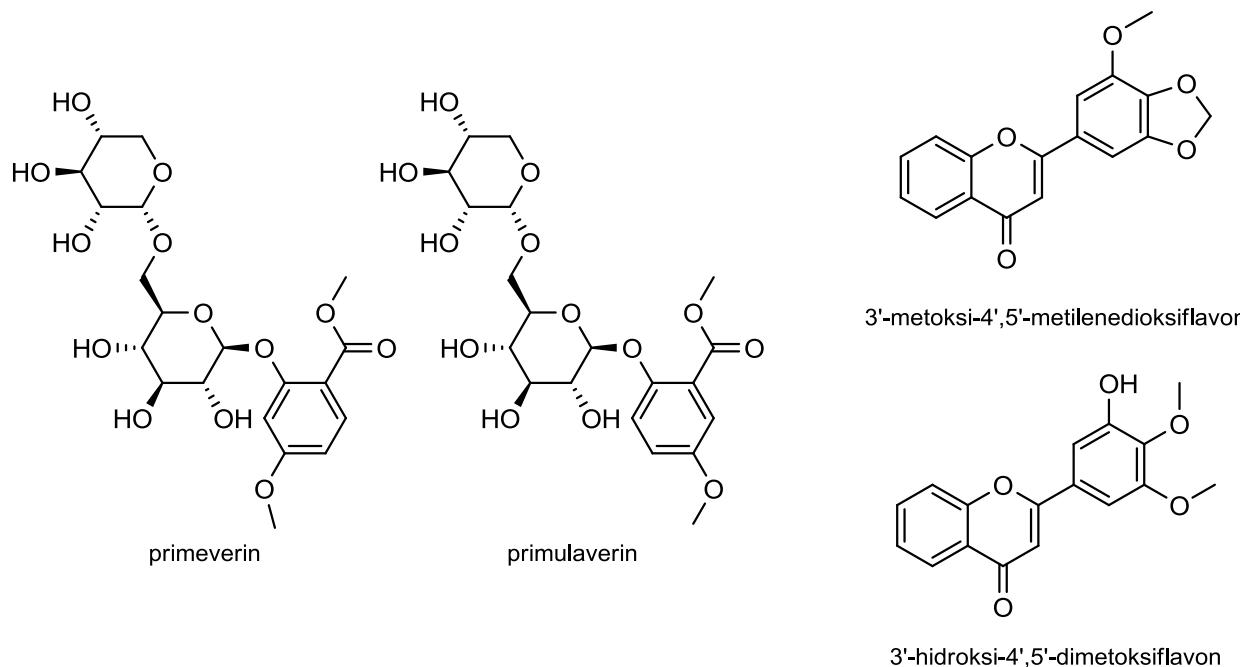
Slika 3.3.5: Izgled biljne vrste *Primula veris* L.



Slika 3.3.6: Izgled biljne vrste *Primula veris L.*

Prema našoj farmakopeji (Ph.Jug.IV) oficijalna droga je koren (*Primula radix*), a koristi se i cvet (*P. flos*) sa ili bez čašice. Koren starijih biljaka se vadi za vreme ili neposredno posle cvetanja, opere se, odstrane se nadzemni delovi i odmah se suši na suncu. Droga ima svojstven miris, neprijatnog je ukusa i grebe u grlu. Cvet se prikuplja kada je dobro razvijen i suši se u tankom sloju, na promajnom mestu u hladu. Jagorčevina je sekretolitik i ekspektorans, pa je glavna primena preparata u tretmanu oboljenja respiratornog trakta kao što su: kašalj, astma i bronhitis (Muller i sar., 2006; Kojić i sar., 1998). Takođe se koristi kod nesanice, nervoze, histerije i drugih neuroloških poremećaja (Kojić i sar., 1998). Upotrebljava se kao čaj od osušenog i isitnjene korena i/ili osušenih cvetova. Zbog sadržaja saponina, jagorčevina se ne sme predozirati niti koristiti duže od 6 sedmica jer se javljaju mučnina i dijareja.

Više autora je pokazalo da je hemijski sastav ekstrakata jagorčevine veoma složen. Jagorčevina sadrži triterpenske saponine – piverosaponin B-22-acetate, primulasaponin I i II koji su prisutni u velikoj koncentraciji, do 12% u suvom korenju (Muller i sar., 2006). Takođe, sadrži: flavonoide - kvercetin, luteolin, kaempferol, isoramnetin, apigenin, epikatehin, epigalokatehin i flavonske glikozide (Karl i sar., 1981), metoksiflavone - 3'-hidroksi-4',5'-dimetoksiflavone i 3'-metoksi-4',5'-metilenedioksiflavone (Huck i sar., 2000; Stecher i sar., 2003, Budzianowski i sar., 2005) i fenolne glikozide (u najvećoj količini primulaverin i primeverin) (Muller i sar., 2006).



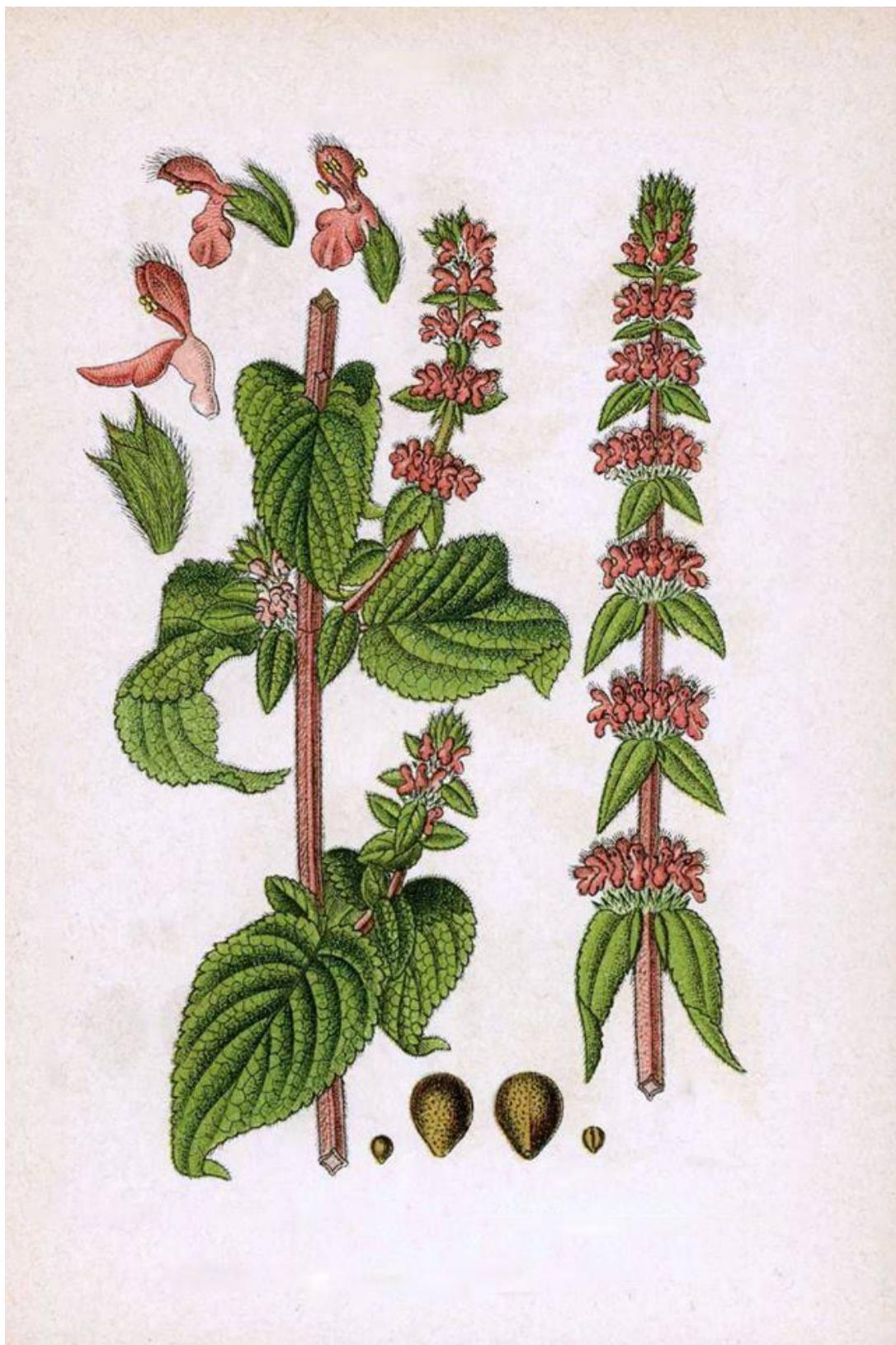
3.3.4. *Stachys germanica* L. (Lamiaceae)

(g. stachys, σταχυς = klas, zbog izgleda cvasti; lat. *germanica* = germanski, nemački)



Slika 3.3.7: Izgled biljne vrste *Stachys germanica* L.

Stachys germanica (vučji čistac, kudravac) je jednogodišnja zeljasta biljka rasprostranjena širom sredozemlja, a na sever dopire do podunavskih zemalja i Karpata. U narodnoj medicini se najčešće koristi gornji deo biljke u cvetu koji ima jako antiseptičko dejstvo. Iz debelih kratkih rizoma izbijaju više ili manje uspravne, jednostavne ili razgranate stabljike. Listovi su dugački 3 do 10 cm, a široki 1 do 5 cm na dužoj ili kraćoj peteljci. Bazalni i donji listovi stabljike su pri osnovi neznatno srčasto usečeni. Cvetovi skoro sedeći, formiraju zbijene prividne pršljenove.



Slika 3.3.8: Izgled biljne vrste *Stachys germanica L.*

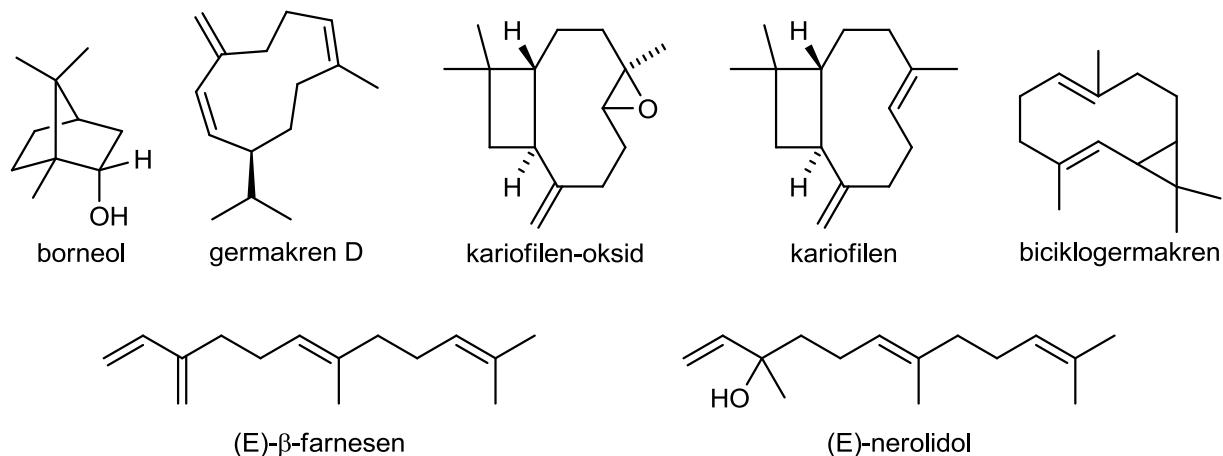
3 OPŠTI DEO

Krunica je spolja gusto pokrivena dugačkim, svilastim dlačicama. Plodovi su dugački 2 do 2.5 mm, glatki, crnkasti. Raste pored listopadnih šuma, na šumskim čistacima i šikarama.

Hemijske analize koje su do sada rađene na biljnoj vrsti *S. germanica* uglavnom su se odnosile na ispitivanje sadržaja etarskog ulja. Analizom etarskog ulja pronađena su jedinjenja terpenoidne

strukture od kojih su najzastupljeniji: borneol, biciklogermakren, (Grujić-Jovanović i sar., 2008), (E)- β -farnesen, germakren D, (Grujić-Jovanović i sar., 2004), kariofilen oksid, (E)-nerolidol, β -kariofilen (Radulović i sar., 2007).

Vučji čistac se koristi u narodnoj medicini u jugoistočnoj Srbiji za pripremanje čaja i za tretman nekih plućnih oboljenja. Nekoliko naučnih studija pokazalo je da etarsko ulje i liposolubilna jedinjenja iz *S. germanica*-e pokazuju antioksidantnu i antimikrobnu aktivnost (Lazarević i sar., 2010; Skaltsa i sar., 2003; Conforti i sar., 2009). Fitohemijske studije druge velike grupe sekundarnih metabolita – fenolnih jedinjenja su veoma retke.

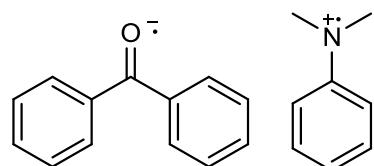


3.4. Antioksidanti

3.4.1 Slobodni radikali i oksidativni procesi u ćeliji

(Koračević i sar., 2003. Biohemija; Čeković, Hemiska čitanka, 1999; Basic Medical Biochemistry a Clinical Approach, Dawn B. Marks, Allan D. Marks, Colleen M. Smith, 2004)

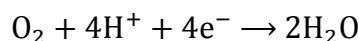
Slobodni radikali su hemijske vrste koje poseduju jedan (ili više) nesparenih elektrona. Zbog toga što imaju nesparene elektrone vrlo su reaktivni i neselektivni. Mogu biti elektroneutralni ali i pozitivno ili negativno nanelektrisani (radikal katjoni i radikal anjoni, slika 3.4.1). Slobodni radikali nastaju homolitičkim raskidanjem postojeće hemijske veze (termolizom, fotolizom, zračenjem visoke energije) ili oksidoredukcionim procesima.



Slika 3.4.1:radikal anjon (benzofenon anjon radikal) i radikal katjon (N,N-dimetilbenzen radikal katjon)

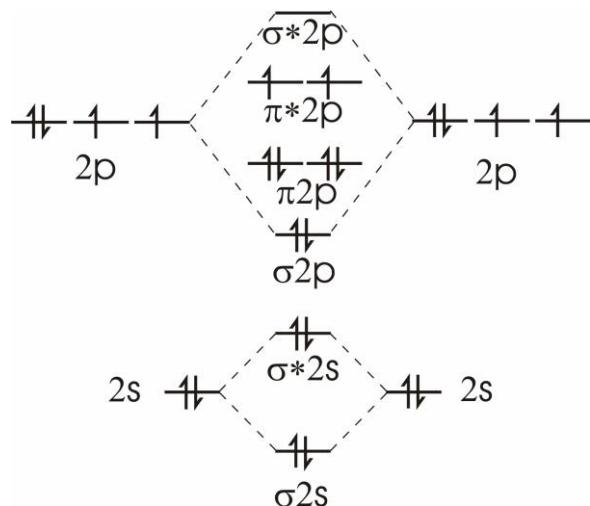
U živim ćelijama produkcija slobodnih radikala je vezana za različite procese u spoljašnjoj sredini (jonizujuće, ultraljubičasto i toplotno zračenje, biohemija azotovih oksida i dr.) i procese u samoj ćeliji. To su oksidativna fosforilacija (u mitohondrijama), oksidativna hidroksilacija (u mikrozomima), fagocitoza, katalitičke reakcije nekih enzima (oksidaza), procesi lipidne peroksidacije, reakcije oksidoredukcije u prisustvu metala sa promenljivom valencijom i dr. (Koračević i sar., 2003)

Molekul kiseonika ima dva nesparena elektrona, paralelnog spina, lokalizovana u odvojenim antivezivnim molekulskim orbitalama (Filipović i Lipanović, 1981; slika 3.4.2). Zbog toga je molekulski kiseonik, u svome osnovnom i istovremeno najstabilnijem stanju biradikal i predstavlja snažno oksidujuće sredstvo. U živim ćelijama sa aerobnim metabolizmom, u procesu oksidativne fosforilacije koja se odvija u mitohondrijama, molekulski kiseonik se potpuno redukuje uz učešće $4 e^-$ i $4 H^+$:



Međutim, ova redukcija se ne odvija u jednom stupnju već u više uzastopnih koraka. Ovakvom postupnom redukcijom, odnosno primanjem po jednog elektrona nastaju delimično redukovani oblici molekulskog kiseonika:

- Singletni kiseonik ($^1\text{O}_2$),
- Superoksid anjon-radikal ($\text{O}_2^{\cdot-}$),
- Hidroksil-radikal (OH^{\cdot}),
- Peroksidni anjon (O_2^{2-}).



Slika 3.4.2: MO dijagram molekula kiseonika (valentne orbitale)

Singletni kiseonik ($^1\text{O}_2$) nastaje dovođenjem energije molekularnom kiseoniku. Iako ovaj oblik kiseonika nije pravi radikal, jer ne sadrži nesparene elektrone, poseduje visok oksidacioni potencijal pa može da učestvuje u procesima oštećenja ćelije.

Superoksid anjon-radikal ($\text{O}_2^{\cdot-}$), odnosno **hidroperoksidni radikal** (HOO^{\cdot} u svojoj protonizovanoj formi) nastaje jednoelektronskom redukcijom molekula kiseonika u respiratornom lancu mitohondrija tokom oksidacione fosforilacije. U organizmu superoksid anjon-radikal nastaje i tokom transporta kiseonika hemoglobinom, a može nastati i kao produkt različitih enzimskih reakcija (ksantin-oksidaze, triptofan-oksidaze i aldehid-oksidaze). Nastaje takođe i autooksidacijom flavoproteina, adrenalina i drugih molekula.

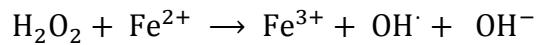
Hidroksil-radikal (OH^{\cdot}) nastaje kao produkt nepotpune redukcije molekula kiseonika primanjem tri elektrona. Hidroksil-radikal je snažno oksidaciono sredstvo i predstavlja najreaktivniji kiseonični radikal. Vreme njegovog poluživota iznosi oko $7 \cdot 10^{-10}$ sekundi, što je razlog da se njegovi toksični efekti ostvaruju upravo na mestu njegove produkcije. Visoka reaktivnost i mala selektivnost čine ga veoma opasnim po integritet i funkcionalnost ćelije).

U biološkoj sredini hidroksil radikal nastaje dvema reakcijama:

- Reakcijom Haber-Weiss-a:

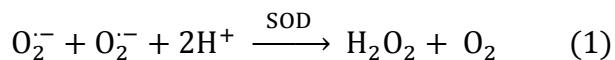


- *Fentonovom reakcijom:*



Da bi gvožđe (u manjoj meri i drugi metali promenljive valence) ostvarilo katalitičku ulogu u *Fentonovoj* reakciji produkcije hidroksil radikala ono mora biti slobodno, odnosno oslobođeno od proteina sa kojima se kompleksira u ćeliji ili krvnoj plazmi. Gvožđe u kompleksu sa proteinima (transferin, feritin, lakoferin, hemoglobin) nije reaktivno te ne može katalizovati nastajanje hidroksil-radikala u prisustvu vodonik-perosida i superoksid anjon-radikala.

Vodonik-peroksid (H_2O_2) je protonovana forma **peroksidnog anjona (O_2^{2-})** i predstavlja najstabilniji intermedijerni proizvod redukcije kiseonika do vode. Sa većinom organskih supstrata reaguje vrlo sporo. U biohemiskim sistemima najčešće nastaje superoksid dismutazom (SOD) katalizovanom dismutacijom superoksid anjon-radikala (reakcija 1), ali i pri katalitičkoj aktivnosti enzima glikolat-oksidaza, oksidaza D-amino kiselina i urat-oksidaza. S obzirom da je vodonik-peroksid nepolarni molekul on lako prolazi ćelijsku i unutarćelijske membrane, dok superoksidni anjon radikal prolazi kroz membrane posredstvom anjonskih kanala.



Činjenica da difuzabilni vodonik-peroksid i superoksidni anjon-radikal nemaju visoku oksidacionu sposobnost, a da se njihovom razgradnjom dobija hidroksilni radikal, daje se pravo zaključku da je neposredni oksidujući agens ćelijskih makromolekula upravo hidroksilni radikal, dok vodonik-peroksid i superoksidni radikal verovatno posreduju u transportu oksidacionih ekvivalenata. Tako da se neželjeni efekat oštećenja ćelije i tkiva slobodnim radikalima ostvaruje i van mesta njihove primarne produkcije.

3.4.2 Biološki efekti slobodnih radikala

Slobodni radikali kao izuzetno reaktivne hemijske vrste dovode do oksidativnog oštećenja ćelijskih struktura velikim brojem mehanizama:

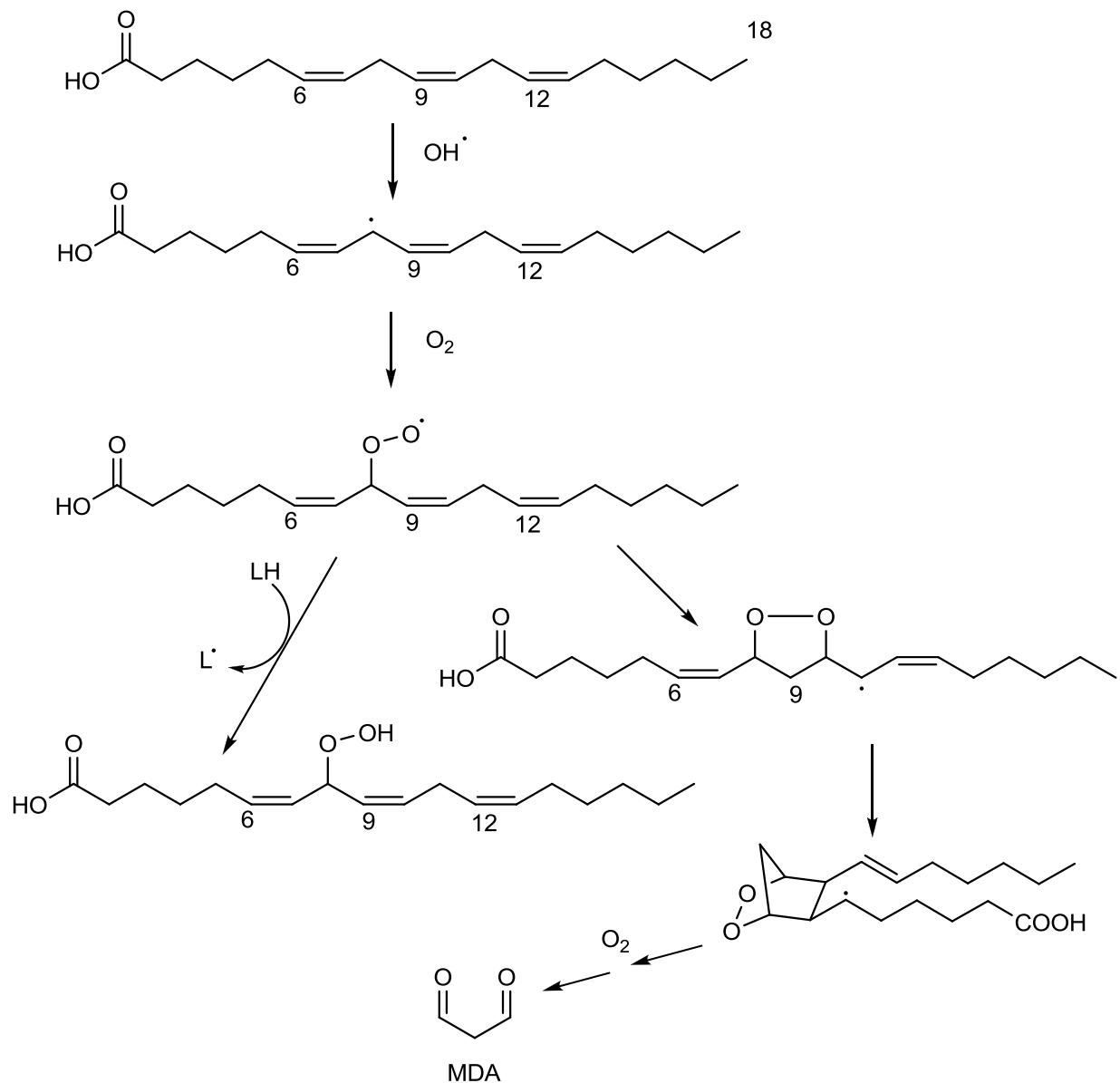
- Peroksidacija polinezasićenih masnih kiselina praćena je poremećajem propustljivosti i fluidnosti membrana;
- Oksidacija tiolnih grupa enzima dovodi do inaktivacije enzima;
- Obrazovanje unakrsnih veza između MDA i fosfolipida odnosno proteina u ćelijskoj membrani menja adaptivnu sposobnost biomembrana;

- Oksidativno cepanje molekula nukleinskih kiselina dovodi do mutacija i kancerogeneze.

U suštini, svaki tip molekula može biti oštećen ovim procesom što može imati mnoge negativne posledice. **Lipidna peroksidacija** je najizrazitiji negativni fenomen u delovanju slobodnih radikala i predstavlja autokatalitički i najčešće ireverzibilan proces. Peroksidacija polinezasićenih masnih kiselina prolazi kroz stadijum inicijacije, stadijum propagacije (stadijum dalje peroksidacije i grananja reakcija oksidacije) i stadijum terminacije (slika 3.4.3). Ovaj autokatalitički ciklus se može propagirati sve dok se lanac reakcija ne prekine sjedinjavanjem dva radikala u neradikalni proizvod. Međutim, najčešće dolazi do stacionarnog ali ne i do trajnog zaustavljanja procesa jer akumulirani produkti lipidne peroksidacije mogu biti sami po sebi reaktivni.

Inicijaciju lipidne peroksidacije može pokrenuti bilo koji oksidans sposoban da oduzme atom vodonika koji se nalazi u α -položaju od mesta dvostrukе veze u molekulu masne kiseline iz lipidne membrane. Od svih kiseoničnih radikala najveći oksidacioni potencijal ima hidroksil-radikal pa je on najčešće odgovoran za inicijaciju ovog procesa. U fazi inicijacije pored alkil radikala nastaju i drugi primarni produkti lipidne peroksidacije (konjugovani dieni, peroksidni radikali i lipidni hidroperoksidi). Druga faza ovog procesa predstavlja degradaciju nestabilnih primarnih produkata pri čemu se dobijaju brojni sekundarni produkti: kratkolančani ugljovodonici, aldehidi i ketoni, kao i krajnji produkt lipidne peroksidacije – malon dialdehid (MDA). Pored brojnih sekundarnih produkata stvaraju se i novi radikali koji dalje propagiraju slobodnoradikalnu reakciju i uslovljavaju da se lipidna peroksidacija lančano ponavlja. Vrlo reaktivni sekundarni produkti, posebno MDA, reaguju sa slobodnim SH i NH₂ grupama aminokiselina, peptida, proteina, nukleotida i fosfolipida dovodeći do kovalentne modifikacije ovih makromolekula što rezultuje gubitkom njihove funkcije.

3 OPŠTI DEO



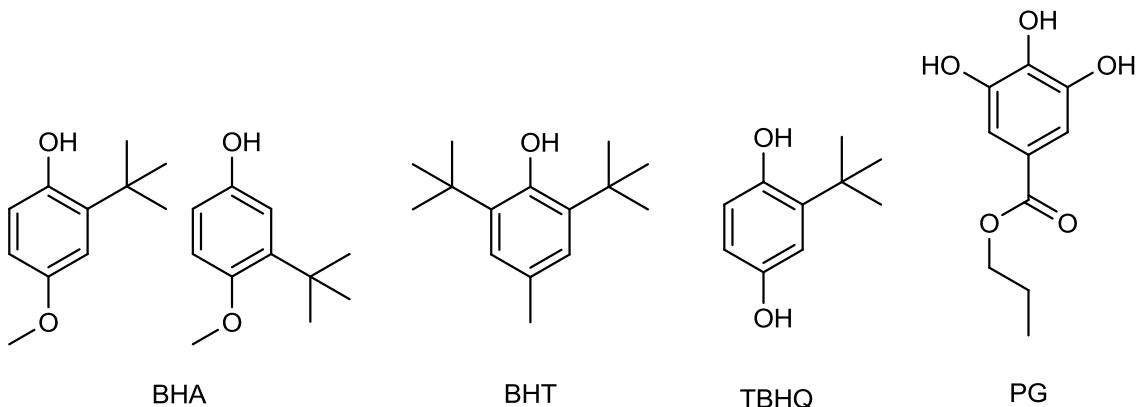
Slika 3.4.3: lipidna peroksidacija

3.4.3 Antioksidanti i zaštita od oksidativnih oštećenja

Antioksidanti su supstance koje, prisutne u malim količinama u odnosu na supstrat koji je podložan oksidaciji (lipidi, proteini, ugljeni hidrati, DNK), značajno inhibiraju ili potpuno sprečavaju njihovu oksidaciju. Delovanje antioksidanata zasniva se na njihovoj sposobnosti da (Aruoma, 1996):

- deluju kao "skevindžeri" slobodnih radikala, odnosno donori elektrona ili H-atoma;
- kompleksiraju jone metala, sprecavajući njihovu kataliticku funkciju u procesima;
- razgrađuju lipidne hidro-peroksida i daju slobodnih radikala;
- razgrađuju hidro-perokside lipida, transformišuci ih u neradikalске vrste;
- sprečavaju dejstvo singletnih oblika kiseonika;
- inhibiraju neke enzime;
- pokazuju sinergističke efekte;
- redukuju neka jedinjenja.

Skorija istraživanja pokazuju da što je ishrana bogatija prirodnim antioksidantima to je manja učestalost bolesti u ispitivanoj populaciji (Krishnaiah i sar. 2011). Takođe je pokazana veza između reaktivnih kiseoničnih vrsta i raznih degenerativnih bolesti uključujući: dijabetes, kancer, artritis, kardiovaskularne bolesti, Alchajmerove i Parkinsonove bolesti, Daunovog sindroma, starenja i dugih (Aruoma, 2003). Brojne studije su potvratile korisno dejstvo prirodnih antioksidanasa (Denisov i Afanasev, 2005).



Slika 3.4.4: Neki veštački antioksidanti

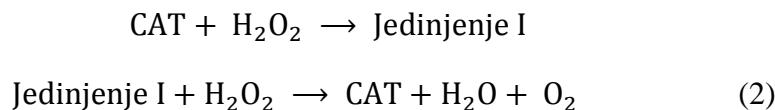
Najčešće korišćeni sintetički antioksidanti u prehrambenim proizvodima su butilovani hidroksianizol (BHA), butilovani hidroksitoluen (BHT), propilgalat (PG) i terc-butilhidrochinon (TBHQ) (slika 3.4.4). Zbog toksikoloških razloga prekomerna upotreba sintetskih antioksidanata je dovedena u pitanje, a zahtevi potrošača su usmereni ka korišćenju prirodnih antioksidanata (Moure i sar., 2001).

3.4.4 Antioksidantni enzimi

Život u sredini bogatoj kiseonikom i odvijanje aerobnog metabolizma ne bi bili mogući bez prisustva antioksidativnih sistema zaštite od reaktivnih kiseoničnih metabolita. Tokom evolucije došlo je do razvoja enzima, koji zajedno sa određenim jedinjenjima manje molekulske mase sačinjavaju sistem zaštite od oksidacionih oštećenja.

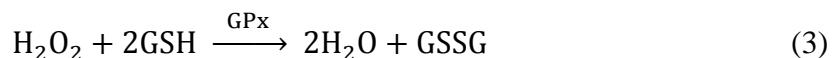
Superoksid-dismutaze (SOD) (EC 1.15.1.1.) predstavljaju grupu enzima prisutnih u svim aerobnim organizmima i katalizuju reakciju dismutacije superoksid anjon-radikala do vodonik peroksida i molekulskog kiseonika (reakcija 1). Iako obavljaju istu funkciju postoji više vrsta superoksid-dismutaza koje se razlikuju po metalu koji se nalazi u aktivnom centru (Cu, Mn, Zn, Fe).

Katalaza (CAT) (EC 1.11.1.6.) je enzim koji katalizuje razgradnju vodonik-peroksida do molekulskog kiseonika i vode. Reakcija je dvostepena i iziskuje vezivanje dva molekula vodonik-peroksida:

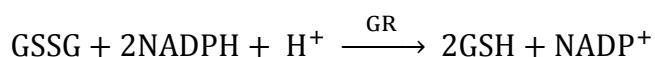


Katalaza je tetramer koji u svakoj subjedinici sadrži hem grupu kao deo aktivnog centra enzima.

Peroxisidaze su velika grupa enzima koje katalizuju reakciju razgradnje vodonik-peroksida i drugih organskih peroksida:



Glutation peroksidaza (GPx) (EC 1.11.1.9.) je tetramerni enzim sa selenom u aktivnom centru koji uklanja vodonik-peroksid i pri nižim koncentracijama (kada je mala verovatnoća za odigravanje reakcija 2). Da bi mogla kontinuirano da se odvija reakcija 3 neophodna je stalna regeneracija oksidovanog oblika glutationa (GSSG) što se postiže reakcijom koju katalizuje **glutation-reduktaza (GR)** (EC 1.6.4.2.):

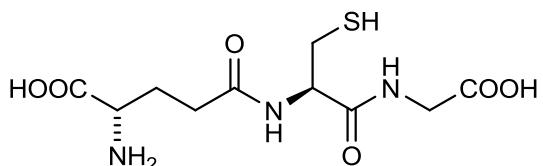


Glutation S-transferaza (EC 2.5.1.18) je enzim koji katalizuje vezivanje glutationa preko sulfhidrilnih grupa za elektrofilne centre hidrofobnih molekula. Na ovaj način molekuli postaju lakše rastvorljivi u vodi i lakše se transportuju do vakuole ili apoplasta. Među supstratima ovih enzima se nalaze neki sekundarni biomolekuli biljaka kao i veliki broj

ksenobiotika. Ovi enzimi su odgovorni za detoksifikaciju elektrofilnih i veoma citotoksičnih proizvoda lipidne peroksidacije izazvane oksidativnim stresom.

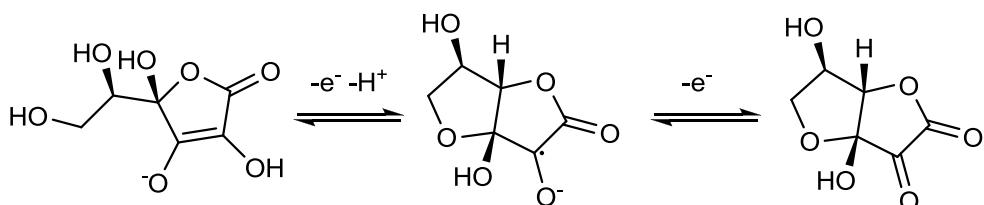
2.4.5 Neenzimski antioksidanti

Glutation (GSH) je po svojoj strukturi tripeptid (α -L-glutamil-L-cistein-glicin). Neophodan je u sintezi i degradaciji proteina, sintezi DNK, u redupcionim procesima i regulaciji enzima i učestvuje kao kofaktor u reakcijama nekih antioksidativnih enzima.



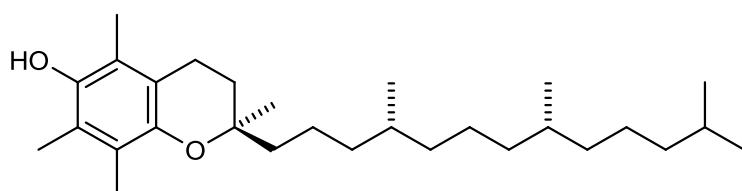
Slika 3.4.5: Glutation

Askorbinska kiselina (vitamin C) uklanja superoksid anjon-radikal i vodonik-peroksid pri čemu nastaje semidehidro-askorbat koji je radikal ali nije reaktivan. Reakcijom dva molekula dobija se askorbinska i dehidro-askorbinska kiselina.



Slika 3.4.6: oksidacija askorbinske kiseline

α -tokoferol (vitamin E) kao liposolubilna komponenta zaštite od oksidacionih oštećenja reaguje sa slobodnim radikalima u ćelijskoj membrani i pri tome nastaje radikal vitamina E. Usled delokalizacije nesparenog elektrona u aromatičnom jezgru ovaj radikal je slabo reaktiv. Vitamin C redukuje radikal vitamina E na prelazu iz lipidne u vodenu fazu.

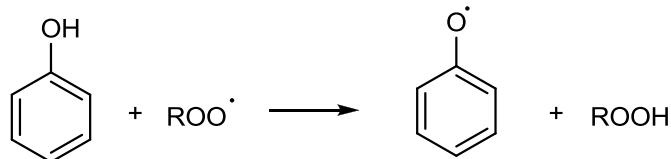


Slika 3.4.7: α -tokoferol

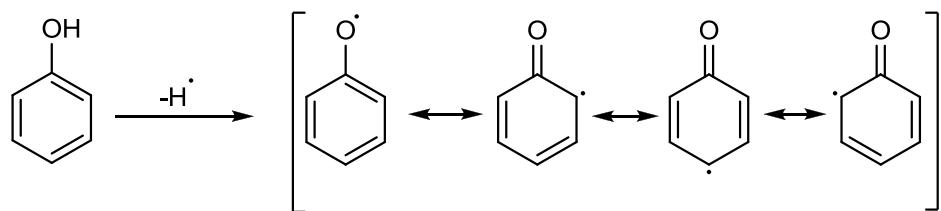
Fenolna jedinjenja ili polifenoli, u svojoj strukturi sadrže aromatični prsten sa jednom ili više hidroksilnih grupa. Smatra se da je antioksidantna aktivnost fenola prvenstveno rezultat

3 OPŠTI DEO

njihove sposobnosti da budu donori vodonikovih atoma i kao takvi uklanjuju slobodne radikale uz formiranje manje reaktivnih fenoksil radikala:



Povećana stabilnost fenoksil radikala pripisuje se prvenstveno delokalizaciji elektrona i postojanju više rezonantnih formi:

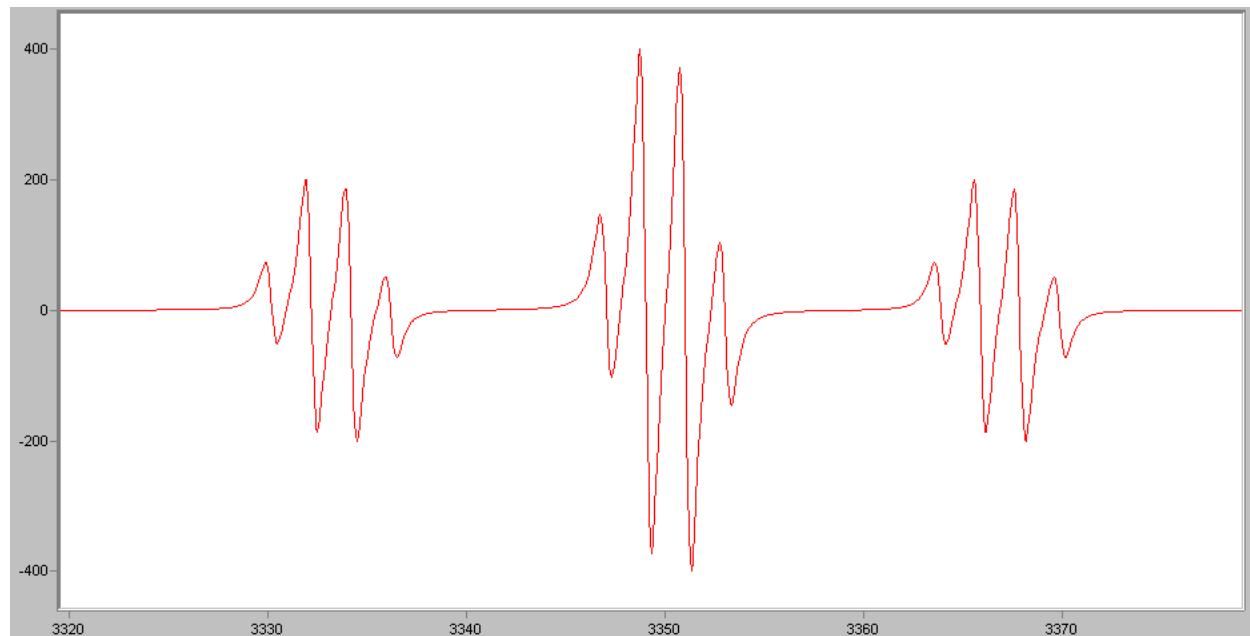


Sa povećanjem stabilnosti nastalog fenoksil radikala povećava se mogućnost nastajanja reakcija koje dovode do slobodno radikalinskih procesa kod flavonoida, kumarina i fenolnih kiselina. Dokazano je da su vicinalne diolne funkcije značajne za kapacitet hvatanja radikala kao i da metoksilacija ili glikolizacija *o*-hidroksi grupa kumarina i esterifikacija fenolnih kiselina smanjuju antioksidativnu aktivnost ovih jedinjenja.

Osim pomenutog mehanizma, biljni fenoli mogu i helatiranjem jona metala sprečiti njihovo katalitičko dejstvo u produkciji kiseoničnih i drugih radikala (Duh i sar., 1999).

3.4.6 Hemijske metode za određivanje slobodnih radikala

Većina spektrofotometrijskih metoda koja se koristi za određivanje (bolje reći procenu) antioksidantne sposobnosti nekog uzorka može se svrstati u dve grupe. U prvu grupu spadaju metode koje se baziraju na neutralisanju nekog obojenog slobodnog radikala koji služi kao standard. Smanjenje obojenosti rastvora nam kazuje o antioksidantnoj sposobnosti ispitivane supstance. U ove metode spadaju ABTS, DPPH, DMPD i druge (detaljnije će o njima biti reči u eksperimentalnom delu). Velika mana ovih metoda je ta što je za njihovu primenu potreban radikal dovoljno stabilan da postoji u rastvoru u dužem vremenskom periodu (da bi sama metoda bila ponovljiva). Što je radikal stabilniji to je selektivniji, a to najčešće nije slučaj sa radikalima koji se javljaju u biološkim sistemima. Tako da upotrebljeni model-radikali ne mogu biti dobra zamena za radikale iz bioloških sistema.



Slika 3.4.8: Izgled EPR spektra metoksimetil radikala

Druga grupa antioksidantnih spektrofotometrijskih testova zasniva se na sposobnosti ispitivanog uzorka da redukuje katjon nekog prelaznog metala vezanog u kompleks (najčešće Fe^{3+} ili Cu^{2+}). U ove metode spadaju FRAP, IRA, Cuprac i druge (i o njima će detaljnije biti reči u eksperimentalnom delu). Pogodnim izborom kompleksirajućih liganda može se podešavati oksido-redukcioni potencijal para $\text{M}^{\text{n}+}/\text{M}^{(\text{n}-1)+}$. Pošto se ove metode u osnovi baziraju na oksido-redukcionim reakcijama njihova mana je da mogu da detektuju neke vrste koje nemaju antioksidantna svojstava (na primer, jon Ce^{3+} je sposoban da redukuje Fe^{3+}). Sa druge strane, mogu da ne detektuju neka jedinjenja koja pokazuju antioksidantna svojstva (metoda FRAP slabo detektuje tiole).

3 OPŠTI DEO

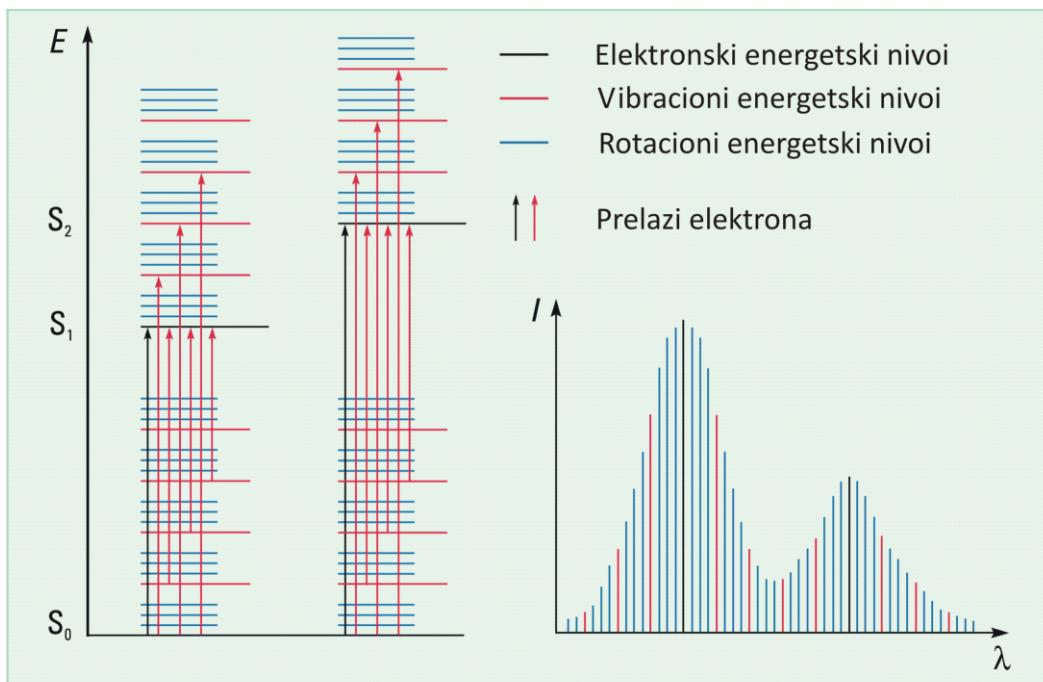
Jedina prava metoda za ispitivanje slobodnih radikala, sposobna da detektuje nesparene elektrone, je **elektron spin rezonanca** (ESR) ili **elektron paramagnetna rezonanca** (EPR)². To je spektroskopska metoda za ispitivanje hemijskih vrsta koje poseduju nesparene elektrone. Osnovni princip rada sličan je **nuklearnoj magnetnoj rezonanci** (NMR) sa tom razlikom što se pobuđuje elektronski spin umesto spina atomskog jezgra. Kako većina stabilnih molekula poseduje sparene elektrone oni su nevidljivi ovom tehnikom, pa je EPR visoko specifična za hemijske vrste sa nesparenim elektronima. Takođe, većina rastvarača koja se upotrebljava u hemiji ne smeta snimanju spektara. Na slici 3.4.8 dat je izgled EPR spektra metoksimetil radikala.

² EPR kao fenomen prvi put je zapazio sovjetski fizičar Jevgenij Zavojski (Евгений Завойский) 1944 sa Kazanskog državnog univerziteta. Nezavisno od njega Brebis Bleni (Brebis Bleaney) je na Univerzitetu Oksford došao do istog otkrića.

3.5. UV-VIS spektrofotometrija

3.5.1 Nastajanje UV-VIS spektara

Spektrofotometrija je apsorpciona metoda koja se zasniva na proučavanju zavisnosti apsorpcije svetlosti od talasne dužine zračenja pri prolasku kroz supstancu. Apsorpcija se može pratiti kako u ultraljubičastojo (UV) i vidljivoj (VIS) oblasti tako i u infracrvenoj (IC), mikrotalasnoj i radiofrekventnoj oblasti. U analitičkoj praksi od interesa je oblast od 200 do 1000 nm.



Slika 3.5.1: Elektronski prelazi i UV-VIS spektar molekula

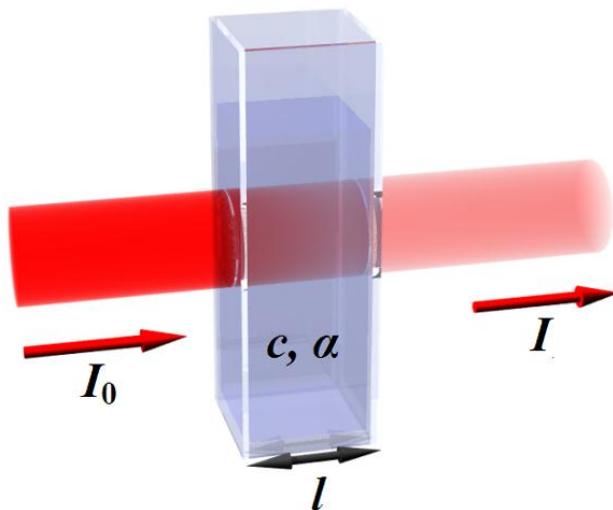
Prilikom interakcije elektromagnetskog zračenja sa materijom mogući su mnogi procesi (refleksija, rasipanje, apsorpcija, fluorescencija/fosforescencija, fotohemijske reakcije). Uopšteno, pri merenju UV-VIS spektara poželjno je da svi procesi osim apsorpcije budu zanemarljivi.

Pošto je svetlost jedan od oblika energije, apsorpcija svetlosti od strane materije dovodi do povećanja energetskog sadržaja atoma ili molekula. Ukupna potencijalna energija molekula može se uopšteno predstaviti kao suma elektronske (E_e) vibracione (E_v) i rotacione (E_r) energije:

$$E = E_e + E_v + E_r$$

pri čemu je $E_e > E_v > E_r$

Količina energije koju svaki molekul može da poseduje je serija diskretnih vrednosti. Energija kvanta apsorbovane svetlosti odgovara energiji potrebnoj za prelazak elektrona sa nižeg na viši energetski nivo. U slučaju molekula, vibracioni i rotacioni energetski nivoi se superponiraju sa elektronskim i zbog toga što postoji mnogo mogućih elektronskih prelaza u apsorpcionom spektru se pojavljuju trake (slika 3.5.1). Zbog interakcija sa rastvaračem apsorpционe trake su šire ako je supstanca rastvorena.



Slika 3.5.2: Prolazak zraka svetlosti kroz kivetu

Kada svetlost prolazi kroz kivetu (slika 3.5.2) u kojoj se nalazi uzorak za analizu, količina apsorbovane svetlosti predstavlja razliku između intenziteta upadne svetlosti (I_0) i propuštene svetlosti (I_p) i izražava se *transparencom* ili *apsorbancom*. Transparenca predstavlja odnos propuštene i upadne svetlosti:

$$T = I_p/I_0$$

Apsorbanca se definiše kao:

$$A = -\log T$$

Odnosno

$$A = -\log T = -\log(I_p/I_0) = abC \quad (3.5)$$

Gde je:

- a: molarna apsorptivnost;
- b: debljina sloja;
- C: koncentracija apsorbujuće supstance.

3 OPŠTI DEO

Iraz 3.5 predstavlja Lambert-Beer-ov zakon koji kaže da je apsorbanca rastvora direktno proporcionalna koncentraciji apsorbujuće vrste i debljini sloja kroz koje zračenje prolazi. Lambert-Beer-ov zakon je osnova kvantitativne spektrofotometrijske analize. Za kvantitativnu analizu je bitno da se merenja apsorbance vrše sa najvećom mogućom tačnošću i osetljivošću. Da bi se to postiglo bitan je izbor talasne dužine na kojoj se merenje vrši. Ona mora da ispunjava nekoliko uslova:

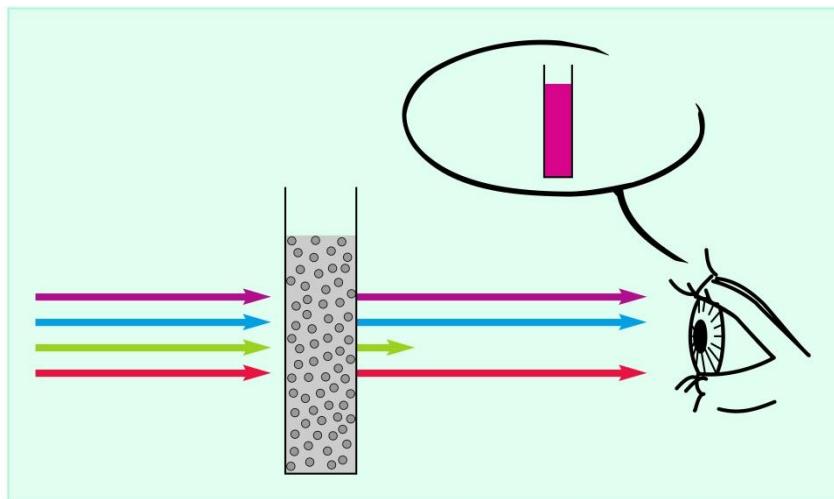
- Da se merenjem postiže maksimalna osetljivost;
- Da mala promena talasne dužine ne utiče na reproduktivnost;
- Da važi Lambert-Beer-ov zakon.

U rastvoru koji sadrži više komponenti koje apsorbuju elektromagnetno zračenje, a koje međusobno ne reaguju, apsorbanca rastvora jednaka je zbiru pojedinačnih apsorbanci svih komponenti:

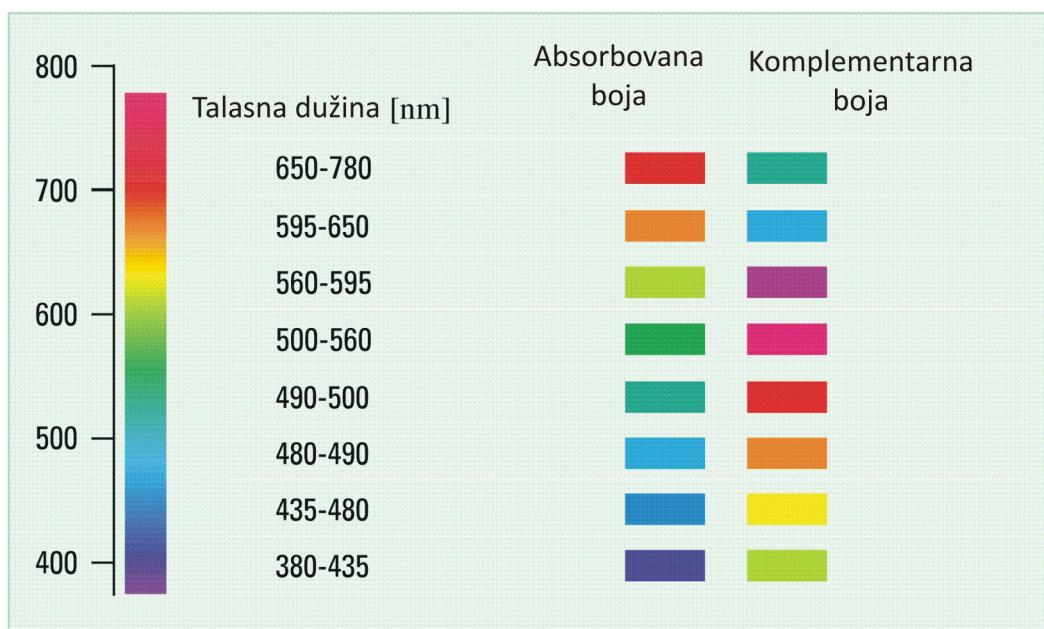
$$A = \sum A_i = A_1 + A_2 + A_3 + \dots + A_n$$

Molarna apsorptivnost (naziva se još i ekstinkcioni koefficijent) je karakteristika analizirajuće supstance i konstantna je vrednost za konstantne uslove snimanja (talasna dužina, temperatura i rastvarač). U praksi, vrednost molarne apsorptivnosti takođe zavisi i od karakteristika upotrebljenog aparata. Zbog toga se u kvantitativnoj analizi najčešće ne koristi već određena vrednost, nego se svaki put snima kalibraciona prava koristeći standardni rastvor ispitivane supstance.

Boja je važno svojstvo svake supstance. Boja materije je usko povezana sa apsorpcijom i refleksijom svetlosti. Ljudsko oko vidi komplementarnu boju onoj koja je apsorbovana (slike 3.5.3 i 3.5.4). U praksi, nastajanje i opažanje boja su veoma kompleksni procesi koji zavise takođe i od spektra upadne svetlosti i od površinske strukture posmatranog predmeta.



Slika 3.5.3: Apsorpcija i doživljaj boje



Slika 3.5.4: Absorbovane i komplementarne boje

3.5.2 Instrument za UV-VIS određivanje (spektrofotometar)

Spektrofotometar je instrument koji služi za merenje apsorbance (ili transparency) uzorka u funkciji od talasne dužine upotrebljenog elektromagnetskog zračenja. Ključne komponente spektrofotometra su:

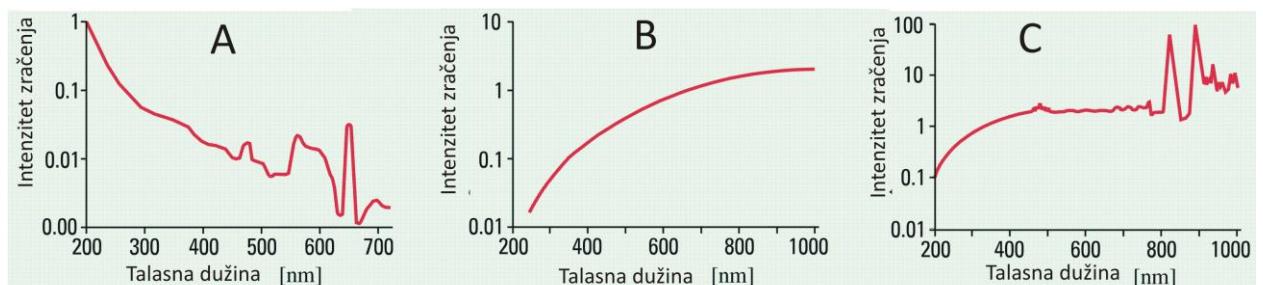
- Izvor koji generiše širok spektar elektromagnetskog zračenja;
- Disperzionalni element koji iz datog spektra izdvaja usku oblast talasnih dužina;
- Uzorak za analizu;
- Jedan ili više detektora koji mere intenzitet propuštenog zračenja;
- Optički delovi-prizme, sočiva i ogledala koji služe da usmere svetlosni snop.

Idealni izvor zračenja treba da daje svetlost konstantnog intenziteta u celom opsegu talasnih dužina, sa malim šumom i velikom stabilnosti. Na žalost, takav izvor ne postoji. Dva izvora zračenja se najčešće upotrebljavaju u UV-VIS spektrofotometriji.

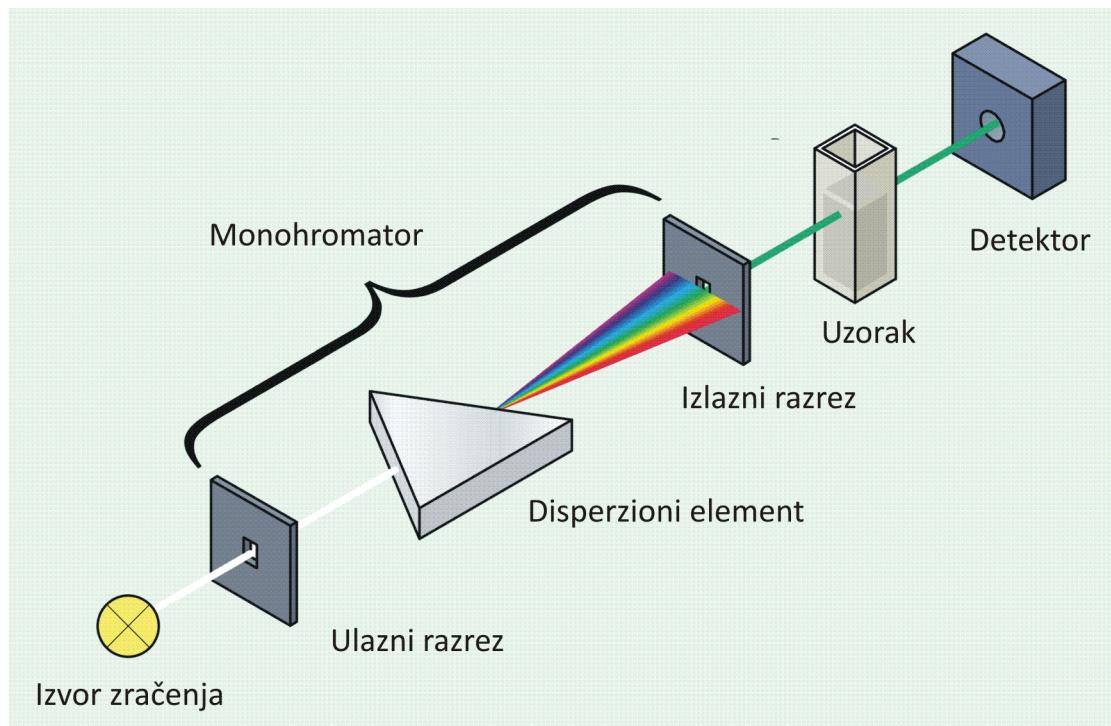
Prvi izvor, deuterijumova lučna lampa (slika 3.5.5A), daje kontinuum dobrog intenziteta u UV i u jednom delu VIS oblasti. Takođe, savremene deuterijumske lampe daju mali šum. Tokom vremena intenzitet zračenja koji daje ova lampa lagano opada. Drugi izvor zračenja je volframova lampa (slika 3.5.5B). Ona daje spektar dobrog intenziteta u delu UV i celoj VIS oblasti. Karakteristika ovih lampi je takođe mala količina šuma. Mnogi spektrofotometri koriste kombinaciju deuterijumske i volframove lampe pri čemu one pokrivaju kompletну

3 OPŠTI DEO

oblast talasnih dužina od 200 do 1000 nm. Alternativa ovim dvema lampama je ksenonska lampa (slika 3.5.5C) koja daje dobar kontinuum talasnih dužina u celoj oblasti UV-VIS spektra. Međutim, ona daje značajno više šuma od prethodne dve pa najčešće nije pogodna za kvantitativna određivanja.



Slika 3.5.5: Spektralni profil deuteriumske (A), volframove (B) i ksenonove (C) lampe



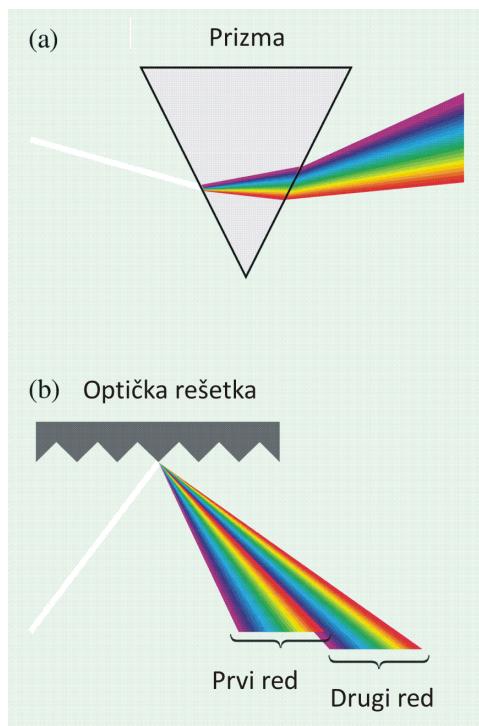
Slika 3.5.6: osnovni delovi UV-VIS spektrofotometra

Disperzionalni element ima funkciju da snop polihromatskog zračenja razloži na pojedine talasne dužine, odnosno uske oblasti talasnih dužina. U spektrofotometriji se najčešće koriste prizma i difrakciona rešetka (slika 3.5.7). Prizme su proste i jeftine, ali disperzija svetlosti je ugaono zavisna; takođe ugaona disperzija je temperaturno zavisna. Zbog toga se u modernim

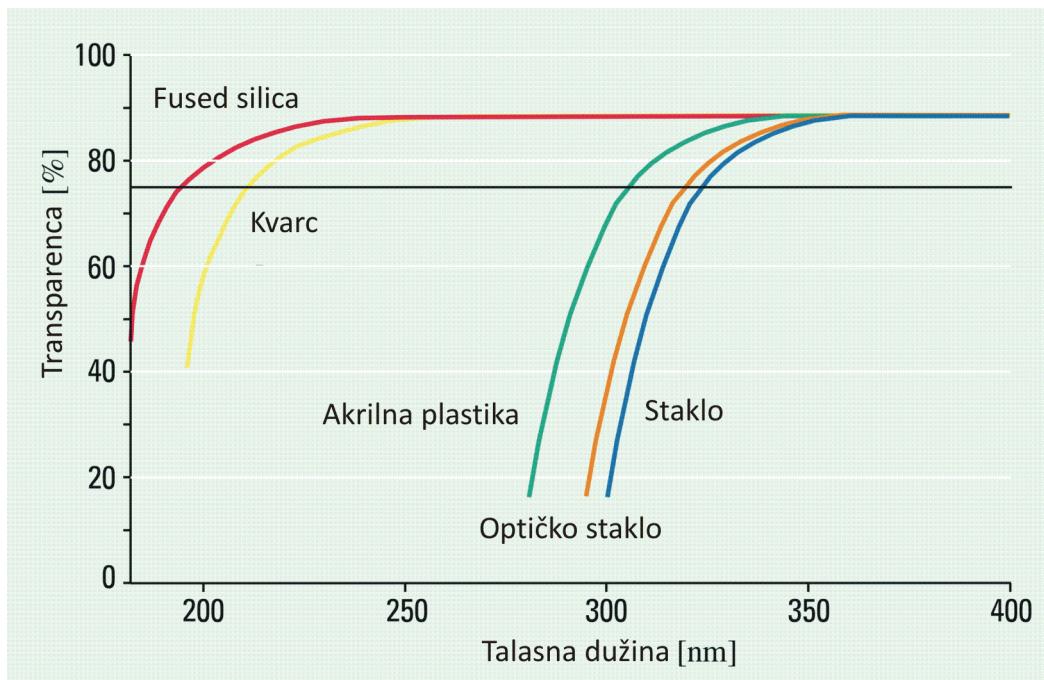
3 OPŠTI DEO

spektrofotometrima uglavnom koriste difrakcione rešetke umesto prizmi. One se prave tako što se na staklenoj pločici mehanički nanese niz veoma malih ureza. Dimenziije ureza su reda veličine talasne dužine svetlosti koja treba da se difrakтуje. U novije vreme, difrakcione rešetke se prave koristeći poseban hologramski proces koji podrazumeva iscrtavanje difrakcione mreže laserom, a zatim nanošenje sloja aluminijuma. Rešetke dobijene na ovaj način nazivaju hologramske difrakcione rešetke i njihova cena je znatno niža nego cena rešetki dobijenih tradicionalnim postupkom. Hologramske difrakcione rešetke imaju linearu ugaonu disperziju koja nije zavisna od talasne dužine i temperature.

Detektori pretvaraju svetlosni signal u električni signal. Idealni detektor poseduje linearu osetljivost u širokom rangu talasnih dužina i intenziteta svetlosti, sa malim šumom i velikom osetljivošću. Moderni spektrofotometri sadrže fotomultiplikator ili fotodiodni niz. Fotomultiplikator ima dobru osetljivost u celom UV-VIS regionu pri malom intenzitetu svetlosti. U kvantitativnoj analizi to znači da se sa većom sigurnošću mogu detektovati male razlike između slepe probe i uzorka za analizu. Samim tim, mogu se određivati male količine supstance. Fotodiodni niz kao detektor ima široki opseg detekcije talasnih dužina, što ga čini idealnim za snimanje celog UV-VIS spektra u kratkom vremenskom intervalu. Sastoji se od serije fotodioda poređanih jedna do druge na silikonskom kristalu. Svaka fotodiода se ponaša kao minijaturni kondenzator koji se razelektriše kad svetlost padne na nju. Količina nadelektrisanja potrebna da se kondenzator do kraja razelektriše, obrnuto je proporcionalna broju fotona detektovanih na svakoj fotodiidi, koji su pak proporcionalni intenzitetu svetlosti.



Slika 3.5.7: Disperzionalni elementi (a) prizma i (b) optička rešetka



Slika 3.5.7: Transmisione karakteristike materijala za izradu kiveta

Tabela 3.5.1: Osobine nekih često korišćenih rastvarača

Rastvarač	Polarnost ¹	Cutt-off talasna dužina (nm) ²	Opasnost
Destilovana voda	78.5	<195	Nema
Heksan	1.9	199	Zapaljiv
Etanol (apsolutni)	24.3	207	Zapaljiv
Metanol	32.6	210	Zapaljiv, Toksičan
Cikloheksan	2.0	211	Zapaljiv
Hloroform	4.8	246	Zapaljiv, Toksičan
Dimetilsulfoksid	46.7	270	Zapaljiv, Iritirajući
Aceton	20.7	331	Zapaljiv

¹dielektrična konstanta na sobnoj temperaturi; ²talasna dužina na kojoj je transparenca rastvarača u kiveti od 10 mm manja od 10%

3 OPŠTI DEO

Pošto se UV-VIS sprektrofotometrom najčešće snimaju tečni uzorci potrebno je da kiveta u kojoj se oni nalaze bude transparentna za UV-VIS zračenje. Postoji više vrsta materijala od kojih se izrađuju kivete, a njihov apsorpcioni spektar je dat na slici (slika 3.5.8). Kivete od akrilne plastike i običnog stakla se ne mogu koristiti za snimanje spektara u UV oblasti jer jako apsorbuju UV zračenje. Takođe, mora se voditi računa o rastvaračima koji se upotrebljavaju, jer i oni mogu da apsorbuju u UV oblasti i za svaki rastvarač postoji granična talasna dužina ispod koje se ne može obavljati snimanje (tabela 3.5.1).

3.6. HPLC hromatografija

Tečna hromatografija je pronađena početkom XX veka radovima ruskog botaničara Mihaila Cveta (Михаил Семёнович Цвет). Njegovi pionirski radovi bili su fokusirani na razdvajanje biljnih pigmenata (ekstrakovanih pomoću rastvarača) pomoću kolone punjene kalcijum-karbonatom. Cvet je napunio uspravnu staklenu kolonu čvrstim kalcijum-karbonatom ili aluminijum-oksidom. Nakon toga, na vrh kolone naneo je ekstrakt homogenizovanih biljnih listova i dopustio je da rastvarač lagano (nošen gravitacijom) prolazi kroz kolonu. Kako se ekstrakt kretao niz kolonu različito obojene trake su se odvajale zato što su se neke komponente tog ekstrakta kretale brže od drugih. Cvet je zaključio da različito obojene trake su u stvari različita jedinjenja koja su prisutna u originalnom ekstraktu. Ovim je on pronašao analitičko razdvajanje komponenti smeše bazirano na njihovoj različitoj interakciji sa čvrstom nepokretnom fazom (kalcijum-karbonat). Jedinjenja koja se jače vezuju za čvrstu fazu sporije se kreću kroz kolonu i obratno. Kalcijum karbonat nazvan je stacionarnom fazom dok je rastvarač nazvan mobilnom fazom. Cvet je ovakav način razdvajanja nazvao hromatografija (od grčke reči chroma-boja i graf-pisati).

Akrоним HPLC, izведен kasnih 1970-ih od *High Pressure Liquid Chromatography* ukazuje da je potreban visok pritisak da bi se generisao protok tečne mobilne faze potreban za prolazak kroz gusto pakovanu kolonu. U početku pumpe su bile sposobne da proizvedu pritisak od oko 35 bara.

Noviji HPLC instrumenti mogu da proizvedu pritisak od oko 400 bara, imaju unapredjene injektore, detektore i kolone. HPLC je počeo masovno da se upotrebljava kasnih 1970-ih. Sa unapređivanjem performansi tokom vremena (manje čestice u koloni, viši primjenjeni pritisak...) akronom je ostao isti ali se P sada odnosi na *Performance*.

Tečna hromatografija visokih performansi (*High Performance Liquid Chromatography – HPLC*) je danas jedna od najmoćnijih metoda u analitičkoj hemiji. Ona je sposobna da razdvoji, identificuje i kvantifikuje jedinjenja prisutna u tečnom uzorku. Danas, čak i komponente prisutne u tragovima (ispod ppt) lako mogu biti identifikovane.

Dalji napredak u tehnologiji izrade samog instrumenta i kolone (oko 2004.) rezultirao je značajnjim povećanjem rezolucije, brzine i osetljivosti u tečnoj hromatografiji. Kolone sa manjim česticama (1.7 mikrona) i aparat sposoban da proizvede visoke pritiske (1000 bara) su bili potrebni da bi se postigle bolje performanse. Ovakva metoda nazvana je tečna hromatografija ultra performansi (*Ultra Performance Liquid Chromatography – UPLC*).

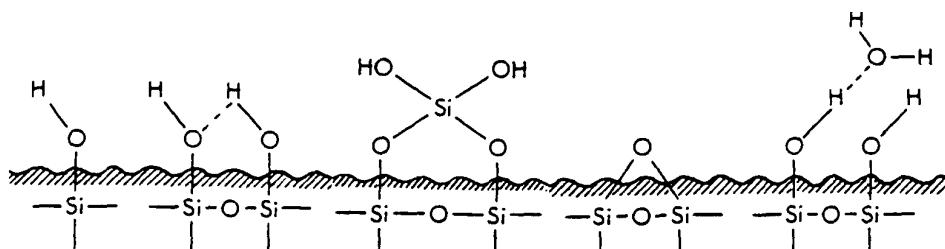
3.6.1 Normal phase hromatografija

Ovaj vid hromatografije koristi se za razdvajanje polarnih komponenti. Razdvajanje se zasniva na razlici u jačini polarnih interakcija između analita u smeši i stacionarne faze. Sam proces razdvajanja kod ove hromatografije je kompetitivni proces. Molekuli analita takmiče se sa molekulima mobilne faze za adsorpciona mesta na površini stacionarne.

Ovaj vid hromatografije se ponekad naziva i čvrsto-tečno ili adsorpciona hromatografija. Kao stacionarna faza (materijal za pakovanje kolone) koriste se polarne supstance, dok je eluent (mobilna faza) nepolaran. Kao materijal za pakovanje obično se koriste čestice poroznog oksida silicijuma ili aluminijuma koje na svojoj površini sadrže OH grupe (slobodne ili vodonično vezane), i kao takve omogućavaju površinske interakcije molekula analita sa stacionarnom fazom. Iako se kao materijali za pakovanje mogu koristiti i titanijum, cirkonijum i florisil, oksid silicijuma je još uvek najzastupljeniji materijal. Ovaj materijal je porozan i nekristalan sa opštom formulom:



Silanolne Si–OH grupe odgovorne su za polarni karakter pakovanja koje se koristi u normal phase hromatografiji. Na slici 3.6.1. prikazani su mogući tipovi površinskih silanola (Caude i Jardi, 1995).



Slika 3.6.1: Površinske grupe na silicijum oksidu

Često korišćeni rastvarači u normal phase hromatografiji su nepolarni rastvarači: heksan, dihlormetan, izopropil alkohol, etil-acetat, MTBE. Nepolarni karakter heksana i ostalih alkana, često ograničava njihovu sposobnost da rastvore polarna jedinjenja. Iz tog razloga, mobilnoj fazi dodaju se male količine polarnih supstanci, tzv. modifikatori mobilne faze (alkohol, etil acetat). Na ovaj način poboljšava se rastvaranje polarnih jedinjenja u mobilnoj fazi, vrši se kontrola retencije i potpomaže eluiranje. Površina adsorbensa je prekrivena slojem molekula rastvarača. Da bi došlo do retencije molekula analita, potrebno je da se molekuli rastvarača izmeste da bi se oslobođila adsorpciona mesta za molekule analita. Voda kao rastvarač se ne koristi kod ove hromatografije, jer u vodenim uslovima dolazi do deaktivacije silanolnih grupa koje se solvatišu molekulima vode.

3.6.2 *Reversed phase* hromatografija

Hromatografija obrnutih faza (*Reversed Phase*) je najčešće korišćeni vid hromatografije za analitičko i preparativno odvajanje. Njena široka upotreba delom potiče od činjenice da ona zahteva vodenu mobilnu fazu. Sam naziv *reversed phase* potiče od toga što je stacionarna faza kod ove hromatografije nepolarna dok je mobilna faza polarna. Najzastupljenije stacionarne faze koje se koriste kod ove hromatografije su nepolarne, hidrofobne vrste (npr. oktadecil, oktil ili fenil grupe) koje su vezane za površinu silika gela siloksanskim (sililetarskim) vezama. Na ovim stacionarnim fazama je moguće razdvajanje hidrofobnih jedinjenja kao i većine hidrofilnih jedinjenja. (Doyle i Dorsey, 1995).

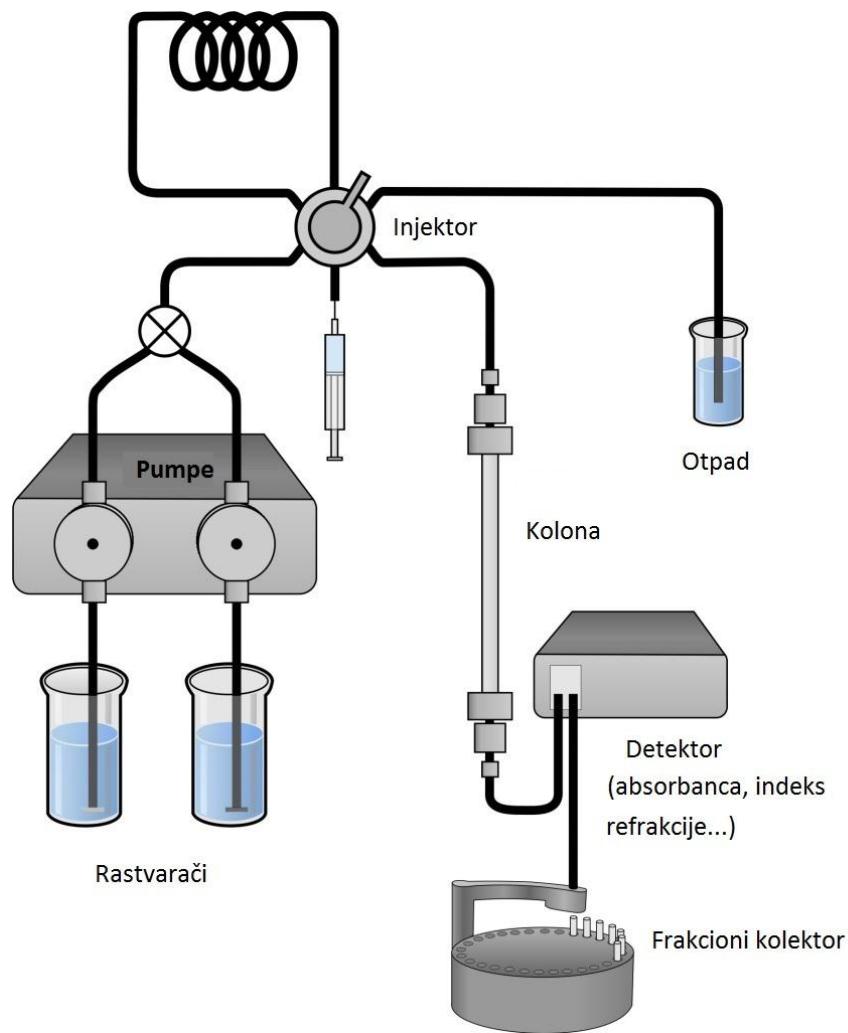
Najčešće korišćeni rastvarači u reversed phase hromatografiji su: voda, acetonitril, metanol i tetrahidrofuran (THF). Kod *reversed phase* hromatografije mobilnoj fazi se dodaju i modifikatori mobilne faze (prisutni su manje od 5% u mobilnoj fazi) i to: kiseline (sirćetna, trifluorosirćetna, fosforna); baze (trietilamin, trietanolamin, dietilamin) kao i puferski sistemi (fosfatni i acetatni ili kombinovani trifluoroacetatna kiselina/trietilamin), radi kontrole pH mobilne faze (Sadek, 2002) .

3.6.3 HPLC Instrument

Glavni delovi aparata za HPLC analizu su:

- Rezeorvari za mobilnu fazu
- Sistem za pumpanje rastvarača
- Oprema za gradijent eluaciju
- Sistem za injektiranje uzorka
- HPLC kolona
- HPLC Detektori
- Frakcioni kolektor (kod preparativne HPLC)

Prikaz glavnih delova dat je na slici 3.6.2.



Slika 3.6.2: Šema aparata za HPLC

Rezeorvari za mobilnu fazu i sistem za tretiranje uzorka

Moderni HPLC aparati opremljeni su sa jednim ili više staklenih rezervora od kojih svaki sadrži 200 do 1000 ml rastvarača (za analitičku hromatografiju rezeorvar treba da sadrži najmanje 500 ml rastvarača, dok je za preparativnu potrebno i više). Rezeorvari su često opremljeni sredstvima za uklanjanje rastvorenih gasova, obično kiseonika i azota, koji smetaju tako što stvaraju mehuriće u koloni i detektoru. Degasifikacija je znatno važnija kad se radi sa vodom i drugim polarnim rastvaračima (pogotovo u gradijent eluaciji) nego sa nepolarnim.

Sistem za pumpanje rastvarača

Funkcija ovog sistema je da obezbedi konstantan i reproduktivan protok mobilne faze do kolone. Kako su kolone pakovane veoma malim česticama, one pružaju otpor protoku kroz kolonu, pa su potrebne pumpe koje generišu visok pritisak (6000 psi). Idealna pumpa pored toga da generiše visoki pritisak treba da zadovolji i sledeće zahteve: 1) pumpe moraju da budu napravljene od hemijski otpornog materijala. 2) brzina protoka mora da bude tačna bez obzira na sistem u kojem se koristi pumpa.

Sistem za injektiranje uzorka

Da bi se postigla maksimalna hromatografska efikasnost, uzorak koji se analizira treba da se aplikuje na početak kolone kao izuzetno uzana traka da bi širenje trake bilo zanemarljivo. Visoki pritisak povezan sa *HPLC* zahteva specijalizovane mere za unošenje uzorka u hromatogram. Većina *HPLC* sistema koristi injektore na principu ventila. Postoji nekoliko oblika ovih injektori ali svi oni imaju iste zajedničke osobine. Svi koriste "petlju" koja može biti i spoljašnja i unutrašnja, radi kontrole zapremine uzorka koja se injektira i radi zadržavanja uzorka pre uvođenja u kolonu.

Oprema za gradijent eluaciju

Generalni problem u eluaciji, do kojeg dolazi kada moramo razdvojiti kompleksnu smešu jedinenja, rešava se gradijent eluacijom. Gradijent eluacija u *LC* ekvivalentna je progaramiranju temeprature u gasnoj hromatografiji. Kod gradijent eluacije separacija rano eluirajućih traka može se poboljšati, ako se jače zadržana jedinjenja eluiraju za kraće vreme. Dalje, pikovi traka koje se kasnije eluiraju su znatno oštiri kod gradijent eluacije nego kod izokratskog odvajanja, i samim tim detekciona osetljivost tih traka znatno poboljšana. Promene u sastavu rastvarača mogu se programirati na linearnoj osnovi. Kod sistema sa visokim pritiskom dva različita rastvarača iz rezeorvara prolaze kroz pumpe visokog pritiska koje su povezane sa komorom za mešanje. Rastvarači se u ovoj komori mešaju i kao takvi

ulaze u kolonu. Kako svaka pumpa može posebno da se kontroliše (elektronski), moguće je stvoriti bilo koju vrstu gradijenta, pa se ovaj sistem široko upotrebljava.

HPLC Kolona

Kolone za primenu u HPLC obično se prave od nerđajućeg čelika. Optimalna dužina kolone koja je potrebna za razdvajanje određena je brojem teorijskih podova potrebnih za postizanje željene rezolucije. Najzastupljenije dužine kolona koje se koriste prilikom analitičke HPLC su 10; 12.5; 15 i 25 cm. Većina analitičkih kolona ima unutrašnji prečnik oko 5 mm. Ovaj dijametar nije slučajnost. Kada se analit injektira u kolonu, širi se aksijalno u pakovanje kolone. Ako se raširi dovoljno daleko u ovom pravcu, doći će do unutrašnjeg zida kolone. U ovoj oblasti čak i najbolje pakovane kolone imaju nekih nepravilnosti, a to dovodi do širenja hromatografske trake, a kao posledica toga smanjuje se efikasnost. Veličina čestica pakovanja kolone je od 5–10 µm. Možda je najčešće korišćena kolona danas kolona dužine 25 cm, 4,6 mm unutrašnjeg prečnika i sa veličinom čestica pakovanja 5 µm. Kolone ovog tipa imaju oko 40 000 do 60 000 podova/metro.

HPLC Detektori

Uloga detektora u *HPLC* sistemu je identifikacija određenih jedinjenja u eluentu koji izlazi sa *HPLC* kolone. Unutar detektora analit podleže fizičko–hemiskim promenama, po čemu se i prepoznaje. Te interakcije su obično optičke prirode (merenje UV apsorbancije ili fluorescencije analita), mada postoje i druge mogućnosti kao što je elektrohemiska reakcija ili kuplovanje *HPLC* sa masenim detektorom. Detektor obezbeđuje izlazni signal koji je proporcionalan količini analita koji je prisutan u detektoru u momentu detekcije. Detektori mogu da se klasifikuju u dve granične kategorije: detektori sa osobinama rastvarača (opšti detektori) i dektori sa osobinama analita (selektivni detektori). Detektori sa osobinama rastvarača reaguju na bilo koju promenu u određenim fizickim osobinama *HPLC* eluenta. Primer ovakvog detektora je detektor indeksa prelamanja. Detektori sa osobinama analita reaguju na određene jedinstvene osobine analita kao što su fluorescencija i elektrohemiska aktivnost, sa veoma malo ili bez ikakvog doprinosa mobilne faze. U kombinaciji sa *HPLC* najčešće se koriste UV/Vis detektori, spektrofotometrijski, fluorescentni, elektrohemiski, detektori indeksa prelamanja, maseni detektori, i dr.

3.7. Gasna hromatografija

Uopšteno, pod hromatografijom se podrazumevaju analitičke metode kojima se razdvajaju hemijska jedinjenja na osnovu različitih raspodela između dve faze – pokretne i nepokretne. Kog gasne hromatografije nepokretna faza je čvrsta ili tečna dok je pokretna faza gasovita i nju čini inertan noseći gas i pare jedinjenja koja se razdvajaju. Do kontakta pokretne i nepokretne faze dolazi u gasnohromatografskoj koloni. U zavisnosti od vrste primenjene nepokretne faze, gasna hromatografija se deli na hromatografiju gas-čvrsto (Gas Solid Chromatography) i hromatografiju gas-tečnost (Gas Liquid Chromatography). U prvom slučaju kolona je napunjena adsorbensom ujednačene krupnoće. Kod hromatografije gas-tečnost nepokretna faza je kapilarni sloj tečnosti, ravnomerno raspoređen po inertnom nosaču (u pakovanim kolonama) ili po unutrašnjem zidu kolone (kapilarne kolone). U novije vreme su u upotrebi kapilarne kolone u kojima je tečna faza hemijski vezana za unutrašnji zid kolone (Chemically Bonded - CB).

Do razdvajanja dolazi usled različite rastvorljivosti para ispitivanih jedinjenja u dатoj tečnoj fazi. Postoji težnja za uspostavljanjem ravnotežnih raspodela koncentracija rastvoraka između dve faze koja je definisana koeficijentom raspodele (particionim koeficijentom):

$$K = \frac{C_t}{C_g}$$

Međutim, neprekidno proticanje para gasne faze koje dovodi do pomeranja molekula neapsorbovane pare, ne dozvoljava uspostavljanje ravnoteže. Kao posledica toga, u prednjem delu zone u kojoj je para, preovlađuje prelazak molekula u tečnu fazu, dok u zadnjem delu dolazi do desorpcije. Na taj način, jedinjenje se kreće kroz kolonu brzinom koja najviše zavisi od njegove rastvorljivosti u tečnoj fazi. Slabije rastvorna jedinjenja (sa manjim K) provode manje vremena na koloni od onih koja su bolje rastvorna. Po izlasku iz kolone, razdvojena jedinjenja prolaze zajedno sa nosećim gasom kroz detektor gde se registruju kao električni signal. Intenziteti signala su proporcionalni količinama uzoraka u nosećem gasu. Postoji više načina detekcije a samim tim i više vrsta detektora.

Budući da gasna hromatografija (GC) pruža podatke o broju komponenata smeše (na osnovu broja pikova u hromatogramu), njihovom kvanitativnom odnosu (odnos površina pikova), kao i njihovoj prirodi (retencione vreme, retencioni indeks ili MS spektar) ova metoda nalazi široku primenu u kvantitativnoj i kvalitativnoj hemijskoj analizi. Ovaj vid hromatografije se primenjuje za analizu svih jedinjenja koja se mogu bez degradacije prevesti u gasnu fazu.

3.7.1 Noseći gas

Najčešće se koriste H₂, He, N₂ ili Ar. Od vrste nosećeg gasa, koji je neophodno da bude visoke čistoće i hemijski inertan u odnosu na uzorak i tečnu fazu, zavisi i osetljivost detekcije. Brzina protoka gasa veoma utiče na efikasnost razdvajanja što je kvantitativno dato van Demteer-ovom jednačinom:

$$h = A + \frac{B}{u} + C \cdot u$$

h – visina teorijskog poda;

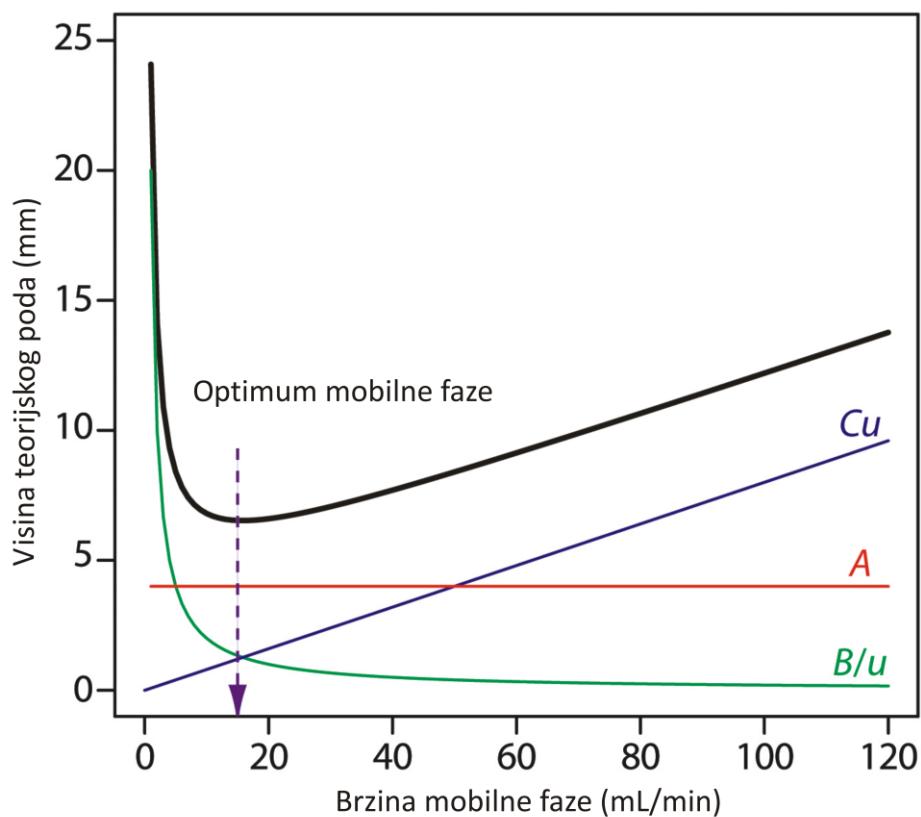
A – konstanta zavisna od vrtložne difuzije (u vezi je sa krupnoćom čvrste faze, oblikom čestica, načinom pakovanja i prečnikom kolone);

B – konstanta koja zavisi od molekulske difuzije, tj difuzije u nosećem gasu (zavisi od vrste gasa);

C – konstanta koja je merilo otporu prenosa mase u tečnoj fazi (zavisna od debljine tečnog filma i njegovog viskoziteta);

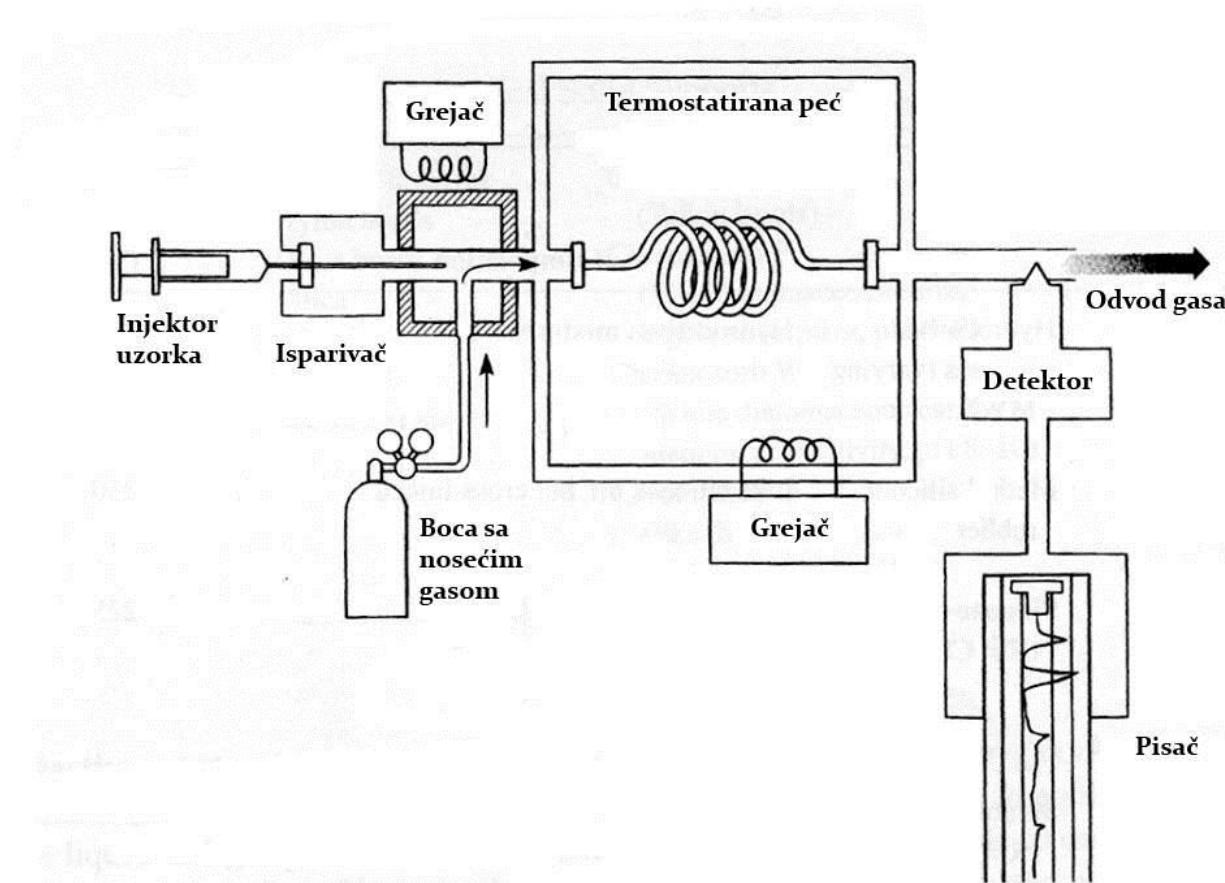
u – brzina protoka gasa.

Grafički prikaz van Demteer-ove jednačine dat je na slici 3.7.1:



Slika 3.7.1: Grafički prikaz van Demteer-ova jednačine

Razdvajanje je efikasnije ukoliko je visina teorijskog poda manja, pa je zbog toga potrebno podešiti protok tako da odgovara minimumu na prikazanoj krivoj. Da bi se ubrzala analiza protok se obično podešava da bude iznad optimalnog čime se, zbog blagog nagiba krive u toj oblasti, malo gubi na efikasnosti.



Slika 3.7.2: Šematski prikaz gasnog hromatografa sa osnovnim delovima

Glavni delovi gasnog hromatografa su (slika 3.7.2):

1. Injektor uzoraka;
2. Isparivač;
3. Boca sa nosećim gasom;
4. Termostatirana peć u kojoj se nalazi GC kolona;
5. Detektor.

Preko injektora uzorak se ubacuje u isparivač koji ima ulogu da uzorak trenutno prevede u gasovito stanje. Temperatura u isparivaču se podešava u zavisnosti od isparljivosti i termičke stabilnosti ispitivanih jedinjenja. Uzorak, koji je preveden u gasno stanje, nošen nosećim gasom dolazi na GC kolonu. Najčešće se upotrebljavaju, takozvane, kapilarne GC kolone,

čija dužina može da bude više desetina metara sa unutračnjim prečnikom manjim od milimetra. Kolona je smeštena u termostatiranu peć, a kontrola njene temperature može da bude izokratska ili gradijentna. Detektor je direktno povezan sa izlazom iz kolone, tako da sve što se sa nje eluira (noseći gas, pare ispitivanih jedinjenja) prolazi kroz njega. Uglavnom se primenjuju, takozvani, diferencijalni detektori čiji se princip rada zasniva na neprekidnom merenju nekog fizičkog svojstva nosećeg gasa, koje je u direktnoj vezi sa koncentracijom pare u njemu. Najviše se primenjuju termoprovodni i ionizacioni detektori, a u novije vreme i maseni detektori.

3.7.2. Gasna hromatografija sa masenom detekcijom (GC/MS)

Kombinacija gasne hromatografije i masene spektometrije (prvi put primenjena pre oko 40 godina.) postala je u zadnje vreme jedna od najmoćnijih metoda identifikacije sastojaka složenih smeša organskih jedinjenja. Velika osetljivost masenog spektrometra, kao i mogućnost brzog snimanja masenog spektra, omogućavaju povezivanje gasno-hromatografske kolone sa masenim spektrometrom i direktno snimanje masenih spektara svih eluiranih jedinjenja. Analizom ovih spektara, uz korišćenje i retecionih podataka, dolazi se do struktura jedinjenja sastojaka ispitivane smeše. Prema tome, kod ove kombinacije, uloga gasne hromatografije se svodi na razdvajanje, a uloga masene spektrometrije na identifikaciju komponenti smeše.

Dugo vremena najveći problem kod povezivanja ova dva instrumenta bila je velika razlika pritisaka. Dok je u masenom spektrometru visoki vakuum, na izlazu iz GC kolone pritisak je nešto iznad atmosferskog. Da bi se ova razlika kompenzovala i istovremeno povećala koncentracija jedinjenja koja dospevaju u jonski izvor, pakovane GC kolone se povezuju sa jonskim izvorom preko takozvanog separatora. Zadatak separatora je selektivno uklanjanje malih molekula (atoma) nosećeg gasa (najpogodniji je helijum) iz eluata i propuštanje znatno većih organskih molekula u jonski izvor.

Pored snimanja masenih spektara, maseni spektrometar ima i ulogu gasno-hromatografskog detektora. Neprekidnim merenjem ukupne jonske struje, to jest sume svih jona koji postoje u jonskom izvoru za vreme hromatografsanja, dobija se gasni hromatogram po izgledu isti kao i hromatogram zabeležen nekim standardnim GC detektorom (termoprovodni, ionizacioni...).

Maseni spektar se dobija merenjem struja koje potiču od jona razdvojenih prema m/z (masa/naelektrisanje) vrednostima. Uobičajeno je da se intenziteti jonskih struja (obilnost jona) u masenom spektru izražavaju u procentima u odnosu na intenzitet najobilnijeg jona – osnovnog jona – koji iznosi 100%.

Da bi se standardizovali retencioni podaci i time olakšala identifikacija organskih jedinjenja uveden je sistem retencionih indeksa. Retencioni indeks nekog jedinjenja je relativna veličina i predstavlja njegov $\log t_r$ izražen preko skale koja je izvedena iz vrednosti referentnih $\log t_r$ n-alkana koji su, zbog linearne zavisnosti od broja C-atoma, ravnomerno raspoređene. Ako se vrednostima $\log t_r$ n-alkana pripisu vrednosti 100n (n-broj C atoma) dobija se skala

3 OPŠTI DEO

retencionih indeksa u kojoj su, bez obzira na uslove hromatografisanja, dva uzastopna n-alkana razdvojena za 100 jedinica. Ovako izvedena skala može da se primeni samo na jedinjenja hromatografisana pod potpuno istim uslovima kao i referentni n-alkani. Najbolje je da se nepoznato jedinjenje hromatografiše zajedno sa dva ili tri alkana koji imaju sličnu tačku ključanja. Vrednost retencionog indeksa nekog jedinjenja na nekoj temperaturi najviše zavisi od njegove prirode (polarnosti i tačke ključanja) kao i od osobina kolone.

Na osnovu vrednosti retencionog indeksa i poznavanja masenog spektra moguća je kvalitativna identifikacija nepoznatog jedinjenja u uzorku.

Kod kvantitativne GC/MS analize maseni spektrometar se koristi isključivo kao GC detektor. Njegove prednosti nad konvencionalnim GC detektorom su u većoj univerzalnosti, kao i mogućnosti selektivne detekcije pojedinih jedinjenja ili klasa. Zbog toga, ova analitička metoda se mahom koristi za određivanje mikrokoličina organskih jedinjenja u složenim smešama. Mnogobrojni primeri primena ove metode su kvantitativna određivanja biološki aktivnih jedinjenja kao što su steroidi, prostaglandini, alkaloidi, ostaci pesticida i mnoga druga (Milosavljević, 1994).

3.8. ICP-OES

3.8.1 Pojam plazme i izvori plazme

Po definiciji, plazma³ je elektroprovodna smeša gasova koja sadrži značajnu koncentraciju jona i elektrona (ukupno makroskopsko nanelektrisanje plazme jednako je nuli). U slučaju argonske plazme (koja se najčešće koristi u emisionim analizama) joni argona i slobodni elektroni su nosioci nanelektrisanja i provodljivosti. Induktivno spregnuta plazma ICP (*eng. Inductively Coupled Plasma*) je bezelektrodna argonska (ređe azotna) plazma koja radi na atmosferskom pritisku, a održava se sprezanjem sa radiofrekventnim elektromagnetskim poljem (Todorović i sar., 1997, Antić-Jovanović, 1999). Služi kao izvor pobuđivanja kod optičke emisione spektrofotometrije (OES).

Razvoj metode počinje sredinom šezdesetih godina, kada su Grinfeld (S. Greenfield) u Engleskoj i Fasel (V. A. Fasel) u USA sa saradnicima, demonstrirali mogućnost primene radiofrekventne plazme u analitičke svrhe. Sredinom sedamdesetih godina pojavili su se prvi komercijalni uređaji, posle čega se ICP-spektrometrija brzo razvila u metodu neuobičajnih mogućnosti zahvaljujući pre svega, osobinama ICP kao izvora pobuđivanja.

Zbog visoke temperature plazme, metoda može da se koristi za određivanje svih elemenata periodnog sistema, osim za argon. Takođe, upotrebom hidridne tehnike mogu se odrediti niske koncentracije elemenata koji grade hidride (As, Bi, Ge, Sb, Se, Sn i Te). Međutim, primena ICP-OES metode je donekle ograničena u praksi pošto određivanje nekih elemenata zahteva posebne uslove (npr. radioaktivnih) ili posebnu optiku (kao što su Cl, Br, i F), ili se određuju sa manjom osetljivošću nego pomoću drugih metoda (kao N ili Rb).

Najznačajnija preimุćstva ICP-spektrometrije nad drugim metodama emisione spektrohemijske analize su:

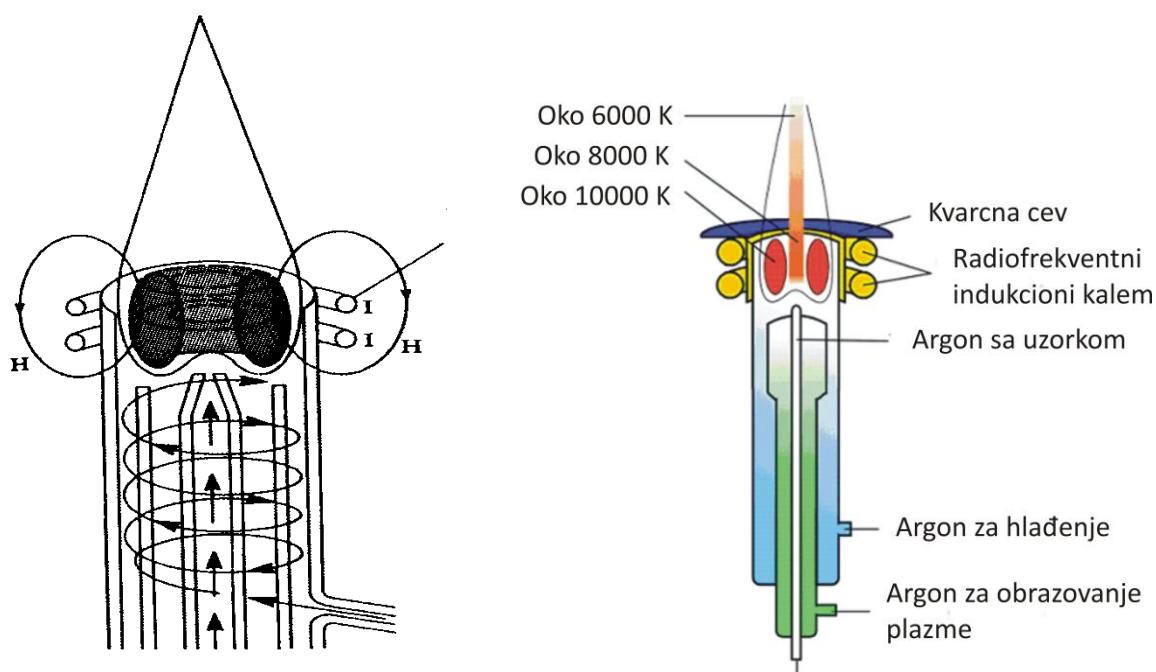
- **mogućnost izvođenja višeelementarne analize:** za manje od dva minuta može da se odredi 20-60 elemenata u probi, zavisno od tipa aparata, sa tačnošću koja je istog reda veličine ili veća nego u drugim instrumentalnim metodama;
- **široka dinamička oblast:** kao posledica malog efekta samoapsorpcije u posmatranoj zoni plamena, analitička kriva je linear u intervalu koncentracija od nekoliko redova veličine, tako da podjednako mogu da se određuju elementi, kako niskih koncentracija (ispod 1 µg), tako i na visokim, što je uslov za izvođenje višeelementne analize;
- **analiza uzorka u obliku rastvora:** prevodenje analita u rastvor znatno uprošćava analizu, posebno heterogenog materijala, pošto se pri rastvaranju, uz eventualno

³ g. πλάσμα, plasma = oblik, oblikovan; sam termin prvi je upotrebio Langmuir 1930. godine pri opisivanju električnih pražnjenja kroz gasove

prethodno topljenje, razaranje i slično, svi elementi prevode u isti hemijski oblik, čime se redukuju efekti osnove i olakšava priprema standarda;

- **mala količina rastvora** je dovoljna za analizu, što podrazumeva i malu količinu uzorka;
- **relativno dugo vreme boravka čestica u plazmi:** zadržavanje čestica u plazmi nekoliko milisekundi i njena inertna atmosfera doprinose efikasnosti atomizacije i pobuđivanja, a time i osetljivosti određivanja.

Izvor induktivno spregnute plazme (eng. torch) se sastoji od tri koncentrične kvarcne cevi. Kroz spoljašnju cev, prečnika 15 do 30 m, tangencijalno se uvodi argon koji hlađeće cev i termički izoluje plazmu od zida cevi, ograničavajući tako i njenu zapreminu. Kroz srednju cev ulazi argon koji služi kao noseći gas i obezbeđuje primarne elektrone i jone za formiranje plazme. Kroz centralnu cev u plazmu se uvodi aerosol rastvora strujom argona koji protiče znatno sporije od gasa koji služi za hlađenje (slika 3.8.1).

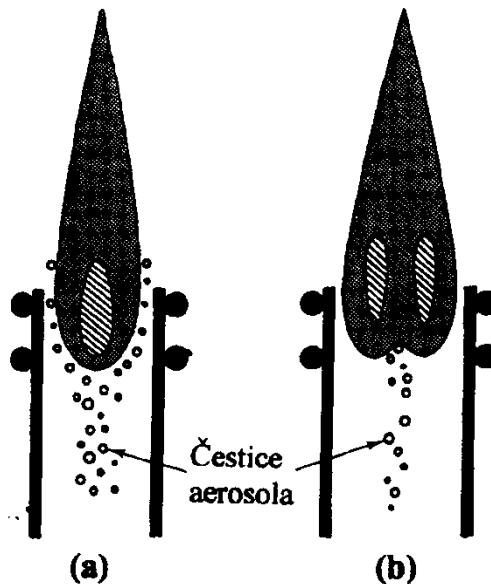


Slika 3.8.1: Izvor induktivno spregnute plazme

Oko spoljašnje kvarcne cevi obmotana su 3-4 navoja indupcionog kalema vezanog za radiofrekventni generator frekvencije od 5-50 MHz i izlazne snage 1-5 kW. Visokofrekventna struja koja protiče kroz indukcionu kalem stvara oscilatorno magnetno polje H , koje indukuje elektrone u gasu koji protiče unutar kvarcne cevi. Oni se ubrzavaju vremenski promenjivim električnim poljem, što dovodi do zagrevanja i dodatne ionizacije.

Kako u početku u argonu nema nanelektrisanih čestica plazma se uspostavlja kratkim uključivanjem Teslinog pražnjenja. Temperatura plazme varira od 6000 do 10000 K i opada sa

visinom iznad indukcionog kalema, tako da se za svako određivanje može odabrati pogodna visina na kojoj će se vršiti posmatranje.



Slika 3.8.2: Izgled IC plazme

Ako se koristi polje niže frekvencije, npr. od 5 MHz, plazma ima oblik kapi (Slika 3.8.2a). Pri uvođenju aerosola, kapljice zaobilaze ovaj deo zbog velikog otpora (prouzokovanog širenjem gasa), što ima za posledicu nedovoljno zagrevanje uzorka, odnosno neefikasno isparavanje.

Primenom generatora veće frekvencije (obično 27 MHz) najtoplji deo plazme dobija prstenast ili toroidni oblik (Slika 3.8.2b), pošto je vrtložna struja elektrona tada bliža kalemu, odnosno spoljašnjem sloju plazme. U ovom slučaju aerosol ulazi u središnji deo, tzv. kanal plazme, u kome je temperatura nešto niža (6000-8000 K), a otpor manji.

U kanalu plazme čestice se zadržavaju relativno dugo (2-3 ms), što u kombinaciji sa visokom temperaturom obezbeđuje efikasno isparavanje, atomizaciju i pobuđivanje

U plazmi mogu da se razlikuju tri oblasti različitih spektralnih osobina: visokotemperaturno jezgro u čijem centralnom delu (kanalu plazme) uzorak podleže efikasnom isparavanju i atomizaciji, analitička zona koja se nalazi 15-20 mm iznad indukcionog kalema, u kojoj se pobuđuje većina elemenata i niskotemperaturni deo – rep plazme, u kome se pobuđuju elementi sa niskim energijama pobuđivanja.

Spektar jezgra palzme sadrži atomske linije argona i intenzivan kontinuum prouzrokovani usporavanjem nanelektrisanih čestica pri kretanju. Zbog toga ova zona nije pogodna za analitičku primenu.

Druga zona je glavna analitička oblast. Pri dovoljno velikom protoku argona kroz spoljašnju cev, pozadinsku emisiju ove zone čine samo linije Ar i donekle trake radikala OH. Zbog znatnog temperaturskog gradijenta u ovoj oblasti, dobijeni spektar sadrži jonske i atomske linije elemenata sa veoma različitim energijama pobuđivanja koje leže u Vis i UV oblasti.

Treća zona – rep plazme, ima temperaturu blisku standardnim hemijskim plamenovima. Spektar ove zone sadrži uglavnom atomske linije elemenata sa niskim energijama pobuđivanja koje leže u Vis oblasti.



Slika 3.8.3: Izgled induktivno spregnute plazme

3.8.2 Spektrometri

Za izvođenje višeelementne analize koriste se tri tipa komercijalnih spektrometara: sekvencijski brzo skenirajući spektrometri sa monohromatorom, spektrometri sa polihromatorom i direktnim očitavanjem i spektrometri sa Furijeovom transformacijom.

Sekvencijski instrumenti kao disperzni element koriste standardnu konkavnu rešetku ili holografsku rešetku sa 2400 ili $3600 \text{ ureza } \text{mm}^{-1}$ kako bi se obezbedila što veća moć razlaganja.

Poslednjih godina dosta se koriste ešelne rešetke (franc. *échelle* – stepenik) kod kojih je radna, refleksiona površina pod nagibom prema osnovi rešetke za određeni ugao γ , tzv. ugao sjaja, koji ima značajnu ulogu u raspodeli intenziteta dobijenih spektara

3.8.4. Smetnje u ICP spektrofotometriji

Emisija analita u ICP manje je podložna smetnjama nego u bilo kom drugom izvoru pobuđivanja. Nespecifične smetnje prouzrokovane su problemima raspršivanja koji dovode

do promene količine raspršivanjem unetog rastvora u plazmu, a time i do promene intenziteta analitičkih linija.

Zbog visoke temperature plazme, dužeg vremena boravka čestica u plazmi i njene atmosfere, hemijskih interferencija u ICP-spektrometriji praktično nema. Na primer, poznata smetnja fosfatnog jona i aluminijuma pri određivanju kalcijuma u plamenu, u ICP spektrometriji se ne zapaža. Zbog visoke koncentracije elektrona u plazmi, jonizacione smetnje su takođe manje izražene nego u drugim izvorima, posebno u plamenovima.

Međutim, ni ove, ni hemijske smetnje ne mogu da se ignorišu u svim slučajevima, posebno u plazmama niže snage tako da, kada se efekti utvrde, treba težiti njihovoj redukciji.

Najznačajnije smetnje u ICP-spektrometriji su spektralne smetnje, kao posledica pojave spektara bogatog linijama u UV i Vis oblasti, koje se ne javljaju u drugim izvorima pobudivanja.

Ove smetnje su prouzrokovane preklapanjem linije analita sa linijom prisutnog elementa bliske talasne dužine (koji aparat nije u stanju da razloži), preklapanjem sa krilom proširene susedne linije ili preklapanjem sa kontinualnim zračenjem neke osnovne komponente ili rasutim zračenjem u aparatu.

Očigledno ovaj tip smetnji u tesnoj je vezi sa karakteristikama korišćenog spektrometra (disperzijom i moći razlaganja).

Kada se utvrdi, spektralna smetnja može da se otkloni primenom spektrometra veće moći razlaganja, oduzimanjem prethodno određene veličine signala-interferenta (pošto su spektralne smetnje aditivnog karaktera) ili izborom druge linije analita.

3.8.4 Tačnost i osetljivost metode

Tačnost metode je istog reda veličine kao i RSD i kreće se od 1-10% u zavisnosti od koncentracije određivanog elementa. U tabeli su date granice detekcije za veći broj elemenata (ISP spektrometrija) u vodenim rastvorima postignute primenom pneumatskih raspršivača, kao i za neke druge apsorpcione i emisione tehnike. U praksi, sa komercijalnim aparatima namenjenim analitičkim potrebama, LD mogu da budu veće za faktor 10 i više, pošto zavise u velikoj meri od kvaliteta (moći razlaganja i svetlosne jačine) spektrometra i tipa raspršivača.

Ako se uprede LD navedene u tabeli 3.8.1, lako se uočava da je ICP spektrometrija superiornija u detekciji elemenata sa većom energijom pobudivanja, dok su LOD za alkalne metale znatno niže u plamenoj spektrometriji. Zbog toga, kao i niže cene i jednostavnijeg rukovanja plamenom, alkalni metali se i danas u analitičkim laboratorijama određuju plamenom spektrometrijom.

3 OPŠTI DEO

Tabela 3.8.1: Granice detekcije (LOD, ng cm⁻³) za neke elemente postignute metodama atomske spektrometrije.

Element	FAAS	ETAAS	FAES	OES (ICP)	FAFS
Al	30	0.005	5	2	5
As	100	0.002	0,0005	40	100
Ca	1	0.002	0,1	0,02	0,001
Cd	1	0.0001	800	2	0,01
Cr	3	0.01	4	0,3	4
Cu	2	0.002	10	0,1	1
Fe	5	0.005	30	0,3	8
Hg	500	0.1	0,0004	1	20
Mg	0.1	0.0002	5	0,05	1
Mn	2	0.002	5	0,06	2
Mo	30	0.005	100	0,2	60
Na	2	0.0002	0,1	0,2	-
Ni	5	0.02	20	0,4	3
Pb	10	0.002	100	2	10
Sn	20	0.1	300	30	50
V	20	0.1	10	0,2	70
Zn	2	0.00005	0.0005	2	0.02

*FAAS - plamena atomska apsorpciona spektrometrija; ETAAS - elektrotermalna atomska apsorpciona spektrometrija; FAES - plamena atomska emisiona spektrometrija; FAFS - plamena atomska fluorescentna spektrometrija; AES - atomska emisiona spektrometrija; ICP - induktivno spregnuta (kuplovana) plazma

3.9. Kalibracija i greška kalibracije

Kalibracija je proces kojim se odgovor instrumenta (analitički signal) dovodi u vezu sa vrednostima merenja, što je u analitičkoj hemiji najčešće koncentracija analita. Bez dobro urađene kalibracije rezultati merenja su nepouzdani.

Postupak kalibracije se odvija u nekoliko koraka. Najpre, izvođač analize pripremi seriju rastvora poznate koncentracije (najmanje tri ili četiri a najčešće i više). Pripremljeni standardni rastvori se snimaju na analitičkom instrumentu pod istim uslovima kakvi se potom primenjuju prilikom snimanja uzorka nepoznate koncentracije. Dobijene vrednosti se, zatim, unose u koordinatni sistem tako da je na apscisi predstavljena koncentracija, a na ordinati analitički signal. Pod pretpostavkom da postoji linearan zavisnost analitičkog signala od koncentracije (što je opravdano ako se radi o uskom opsegu koncentracija), kalibraciona prava se dobija metodom **najmanjih kvadrata** (Miller i Miller, 2005); odnosno, povlačenjem u koordinatnom sistemu tako da zbir kvadrata udaljenosti tačaka od kalibracione prave bude najmanji. Koeficijent pravca (k) i odsečak na ordinati (n) kalibracione prave dobijaju se po jednačinama:

$$k = \frac{\sum_i [(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})]}{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}$$

$$n = \bar{y} - k\bar{x}$$

Gde \bar{x} i \bar{y} predstavljaju srednje vrednosti koncentracija i analitičkog signala.

Nakon konstruisanja kalibracione prave koncentracije nepoznatih uzoraka se određuju sa nje interpolacijom. Pošto je svaka tačka sa kalibracionog grafika opterećena slučajnom greškom, standardne devijacije za k (s_k) i n (s_n) se računaju prema:

$$s_{y/x} = \left[\frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - 2} \right]^{1/2}$$

$$s_k = \frac{s_{y/x}}{\left[\sum_i (x_i - \bar{x})^2 \right]^{1/2}}$$

$$s_n = s_{y/x} \left[\frac{\sum_i x_i^2}{n \sum_i (x_i - \bar{x})^2} \right]^{1/2}$$

Gde \hat{y} predstavlja projektovanu vrednost odgovarajućeg signala y na kalibracionoj pravoj.

Standardna devijacija prilikom određivanja nepoznate koncentracije korišćenjem kalibracione prave (S_{x0}) dobija se po jednačini:

$$S_{x0} = \frac{s_{y/x}}{k} \left[1 + \frac{1}{N} + \frac{(y_i - \bar{y})^2}{k^2 \sum_i (x_i - \bar{x})^2} \right]^{1/2}$$

3 OPŠTI DEO

Gde N predstavlja broj tačaka na kalibracionoj pravoj

Procena greške merenja koncentracije sa date kalibracione prave se računa:

$$\Delta C = t_{df,cl} S_{x0}$$

Pri čemu je $t_{df,cl}$ Studentov koeficijent za df stepeni slobode sa intervalom poverenja cl .

Limit detekcije (LOD) prestavlja najniži sadržaj ispitivnog analita koji može biti određen sa opravdanom statističkom sigurnošću, primjenom analitičkom metodom. LOD je brojčano jednak 3 puta standarnoj devijaciji od 20 reprezentativnih slepih proba. Alternativni način određivanja LOD (Miller i Miller, 2005; Hibbert i Gooding, 2006) je preko jednačine:

$$LOD = \frac{3s_{y/x}}{k}$$

Takođe, limit kvantifikacije (LOQ), koji predstavlja minimalni sadržaj analita u ispitivanom uzorku, koji kvantitativno može biti određen sa opravdanom statističkom sigurnošću (primjenom analitičkom metodom), može se izračunati kao:

$$LOQ = \frac{10s_{y/x}}{k}$$

4 Eksperimentalni deo

4.1. Materijal

U ispitivanjima su kao materijal korišćeni:

- Nadzemni i podzemni delovi biljne vrste *Geranium macrorrhizum* L. (Geraniaceae), ubrane 2011. sa područja Svrliških planina, vaučer br. 5529;
- Nadzemni delovi biljne vrste *Allium ursinum* L. (Alliaceae), ubran 2012. sa više različitih područja, vaučer br. MS001;
- Nadzemni delovi biljne vrste *Stachys germanica* L. (Lamiaceae), ubrane 2011. sa područja Svrliških planina, vaučer br. 5523;
- Nadzemni i podzemni delovi biljne vrste *Primula veris* L. (Primulaceae), ubrane 2012. sa područja Svrliških planina, vaučer br. 6580;

Sve biljne vrste su identifikovane od strane sturučnog lica na Departmanu za biologiju i ekologiju, Prirodno-matematičkog fakulteta u Nišu a odgovarajući vaučeri su deponovani u Herbarijumu pomenutog departmana.

4.2. Aparati

Prilikom ispitivanja mineralnog sastava, sadržaja fenolnih komponenti i antioksidativne sposobnosti određenih biljnih vrsta korišćena je sledeća oprema:

1. HPLC sistem Agilent Technologies 1200 Series (Agilent Technologies, USA) 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 (slika 5.1);
2. UV/Vis spektrofotometar Agilent 8453 (Agilent Technologies, USA) sa dužinom optičkog puta 1 cm za kvantitativnu analizu i ispitivanje antioksidativne aktivnosti (slika 3.2);
3. ICP-OES iCAP 6000 (Thermo Fisher Scientific Inc, Nemačka) za kvalitativno i kvantitativno određivanje metalnih jona (slika 3.3);
4. GC-MS (Agilent Technologies, USA) za određivanje sastava etarskog ulja (slika 3.4),
5. MicroMed high purity water system (Thermo Fisher Scientific Inc, Nemačka), TKA Wasseraufbereitungssystem GmbH za dobijanje demineralizovane vode,
6. Termostat Julabo MP 5A Open Bath Circulations (JULABO, USA) za termostatiranje rastvora;

4 EKSPERIMENTALNI DEO



Slika 5.1 Tečni hromatograf visokih performansi (HPLC) (laboratorija Katedre za analitičku i fizičku hemiju Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Nišu).

7. Analitička vaga AB-204-S (Mettler Toledo, Švajcerska) za odmeravanje čvrstih supstanci;
8. pH metar (Hanna Instruments, USA) za merenje pH vrednosti rastvora;
9. Varijabilne automatske pipete Lab Mate⁺ za pipetiranje rastvora;
10. Električni blender za homogenizovanje uzorka;
11. Električna peć za žarenje (VIMS, Srbija);
12. Ultrazvučno kupatilo Bandelin SONOREX® Digital 10 P (Sigma, USA).



Slika 5.2 UV-VIS spektrofotometar (laboratorija Katedre za analitičku i fizičku hemiju Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Nišu).

4 EKSPERIMENTALNI DEO



Slika 5.3 Optički emisioni spektrofotometar sa induktivno kuplovanom plazmom (laboratorija Katedre za analitičku i fizičku hemiju Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Nišu).



Slika 5.4 GC-MS (laboratorija Katedre organsku hemiju Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Nišu).

4.3 Hemikalije i reagensi

U radu su korišćeni sledeći reagensi: 1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil radikal (DPPH), 2,2'azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) (ABTS), kalijum-persulfat, katehin, ferulna i kafena kiselina kupljeni kod Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany), metanol, etanol, aceton, etil acetat, acetonitril, mravlja i sirčetna kiselina kupljeni su kod J. T. Baker (Deventer, Holland). Galna kiselina je kupljena od Carl Roth (Karlsruhe, Germany). Troloks (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilroman-2-karboksilna kiselina) i 2,4,6-tris-2-piridil-1,3,5-triazin (TPTZ) su kupljeni od Acros Organics (Geel, Belgium). Folin-Ciocalteu reagens (FC), dimetilsulfoksid (DMSO), 2,9-dimetill-1,10-fenantrolin (neokuproin), Na₂CO₃, NaNO₂, NaOH, FeSO₄·7H₂O, HCl, CCl₄, Na₂HPO₄, NaH₂PO₄, NaCl, K₃[Fe(CN)₆], trihlorsirčetna kiselina (TCA) i AlCl₃ kupljeni su kod Merck (Darmstadt, 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. Rastvori su pripremani sa dejonizovanom vodom specifične provodljivosti 0,05 μScm^{-1} .

4.4. Priprema uzorka

4.4.1. Postupak ekstrakcije uzorka za HPLC i UV-VIS analizu

Tačno odmerena, masa predhodno blenderom homogenizovanog suvog biljnog materijala (oko 0.25 g), prenešena je u erlenmajerovu bocu u koju je dodato 20 ml rastvarača (koji sadrži 0.1%-tni rastvor HCl - m/m). Nakon jednog časa stajanja u ultrazvučnom kupatilu (Bandelin SONOREX Digital 10 P, Sigma, USA) rastvarač je odekantovan, dodata je nova količina rastvarača od 20 ml i postupak je ponovljen. Nakon ponovnog dekantovanja, dodato je 10 ml rastvarača i sadržaj je ultrasonificiran jedan čas. Dobijeni filtrati su spojeni, filtrirani i u normalnom sudu dovedeni do ukupne zapremine od 50 ml. Ekstrati su čuvani na tamnom i hladnom mestu.

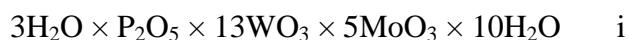
4.4.2. Postupak mineralizacije biljnog materijala

Uzorci tačno odmerene mase (oko 10 g), predhodno homogenizovanog suvog biljnog materijala, prebačeni su u porculanski lončić i zagrevani u električnoj peći. Peć je programirana da podiže temperaturu sa 50 °C na 450 u toku 8 sati a zatim da tu temperaturu održava konstantnom narednih 12 časova. Ohlađeni uzorak rastvoren je u 2.5 ml HNO₃ (1:1, v/v), filtriran kroz filter papir (plava traka) i dopunjen deionizovanim vodom do 50 ml (Radojević i Bashkin, 1999).

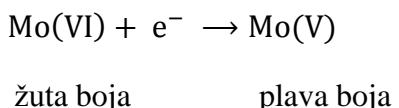
4.5. Spektrofotometrijske metode

4.5.1. Određivanje sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja (TP)

Sadržaj ukupnih fenola u uzorcima je određivan Folin-Ciocalteau-ovom metodom (Singleton i Rossi, 1965). Metoda je bazirana na oksidaciji prisutnih fenola Folin-Ciocalteau-vim reagensom. Sam reagens predstavlja smešu fosfomolibdenske i fosfovolframove kiseline i može se predstaviti formulama:



Pri tome se sam reagens redukuje a intenzitet dobijene plave boje srazmeran je količini fenola u rastvoru:



Boja je stabilna a njen intenzitet se meri spektrofotomerijski na talasnoj dužini $\lambda = 760 \text{ nm}$ (slika 4.5.1).

Rastvori i reagensi:

1. Na_2CO_3 , 20% (m/v)
2. Folin-Ciocalteu reagens
3. Standardni rastvor galne kiseline (100 $\mu\text{g/ml}$)

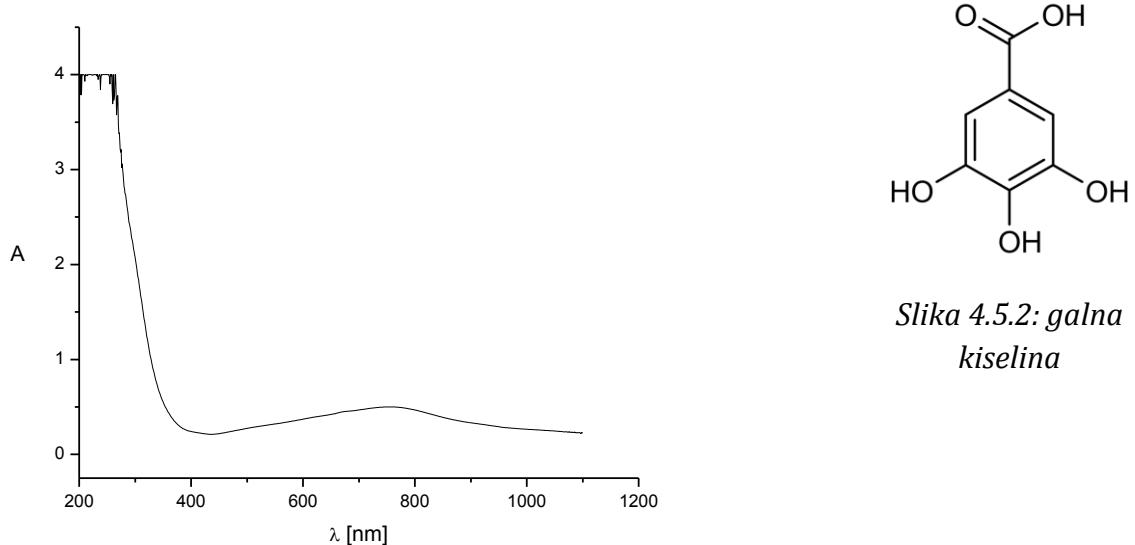
Postupak:

U normalni sud od 10 ml dodata je određena zapremina uzorka. Nakon toga, dodato je redom: 2.5 ml dejonizovane vode, 2 ml rastvora Na_2CO_3 , 0.5 ml Folin-Ciocalteu reagensa i dopunjeno dejonizovanom vodom do crte. Nakon 120 min izmerena je apsorbanca na 760 nm u odnosu na vodu kao slepu probu.

Odmeravanjem određene zapremine standardnog rastvora galne kiseline (slika 4.5.2) dobijena je kalibraciona prava (slika 4.5.3):

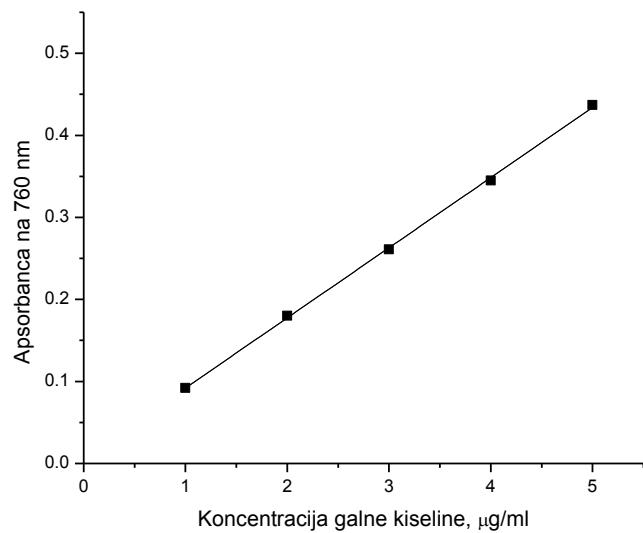
$$A = 0.0855 [\text{GA}] + 0.0065, n = 5, r^2 = 0.9998;$$

4 EKSPERIMENTALNI DEO



Slika 4.5.2: galna kiselina

Slika 4.5.1: UV-VIS spektar Mo(V) ($\lambda_{max}=760$ nm)

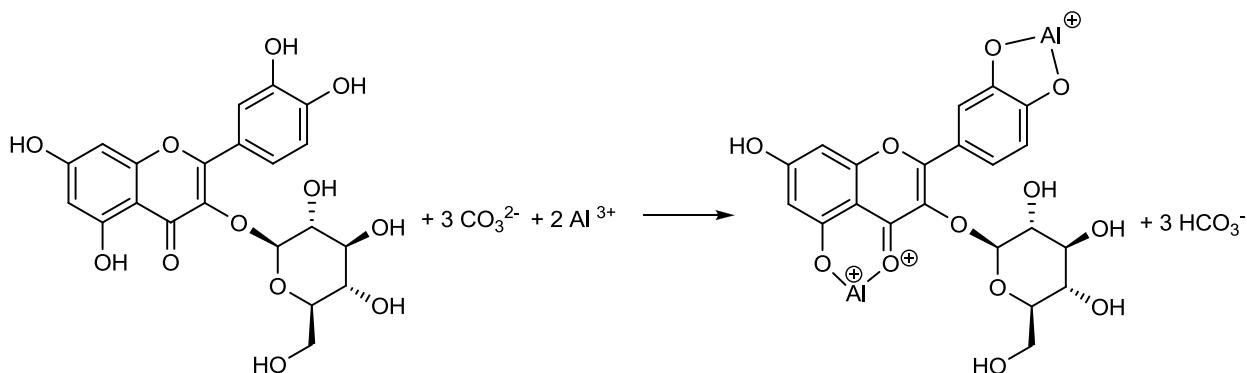


Slika 4.5.3: Kalibraciona prava za određivanje sadržaja ukupnih fenola

gde je $[GA]$ koncentracija galne kiseline u $\mu\text{g/ml}$. Na osnovu izmerenih apsorbanci uzoraka, sa kalibracione prave standardnog rastvora galne kiseline određuje se masena koncentracija ($\mu\text{g/ml}$) polifenolnih jedinjenja a sadržaj u polaznom uzorku se izražava kao ekvivalent galne kiseline po gramu suve biljke.

4.5.2. Određivanje sadržaja ukupnih flavonoida (TF)

Flavonoidi i glikozidi flavonoida imaju osobinu da sa prelaznim metalima grade odgovarajuće metalne komplekse. Opisani su kompleksi pojedinih flavonoida sa aluminijumom(III) (Cornard i Merlin, 2002), gvožđem(III) (Ren i sar., 2008), cinkom(II) (Nest i sar., 2002) i mnogim drugim. Sa analitičkog aspekta naročito je važan kompleks sa Al^{3+} . Koncentracija flavonoida određena je primenom AlCl_3 kao kompleksirajućeg reagensa spektrofotometrijskom metodom (Veljković i sar., 2013).



Slika 4.5.4: Reakcija Al^{3+} sa izokvercitrinom (molekuli vode u kompleksu sa Al^{3+} su izostavljeni)

Rastvori i reagensi:

1. NaNO_2 , 5% (m/v)
2. AlCl_3 , 1% (m/v)
3. NaOH , 1 M
4. Standardni rastvor katehina (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)

Postupak:

Reakciona smeša je pripremljena mešanjem određene zapremine uzorka, 4 ml dejonizovane vode i 0.3 ml 5% NaNO_2 . Nakon 5 min dodato je 3 ml 1% AlCl_3 , a zatim nakon 5 minuta, dodato je 2 ml 1 M NaOH i dejonizovanom vodom je dopunjeno normalni sud do 10 ml. Dobijena smeša je snažno promešana i odmah nakon toga, merena je apsorbanca na $\lambda = 510$ nm u odnosu na dejonizovanu vodu kao slepu probu.

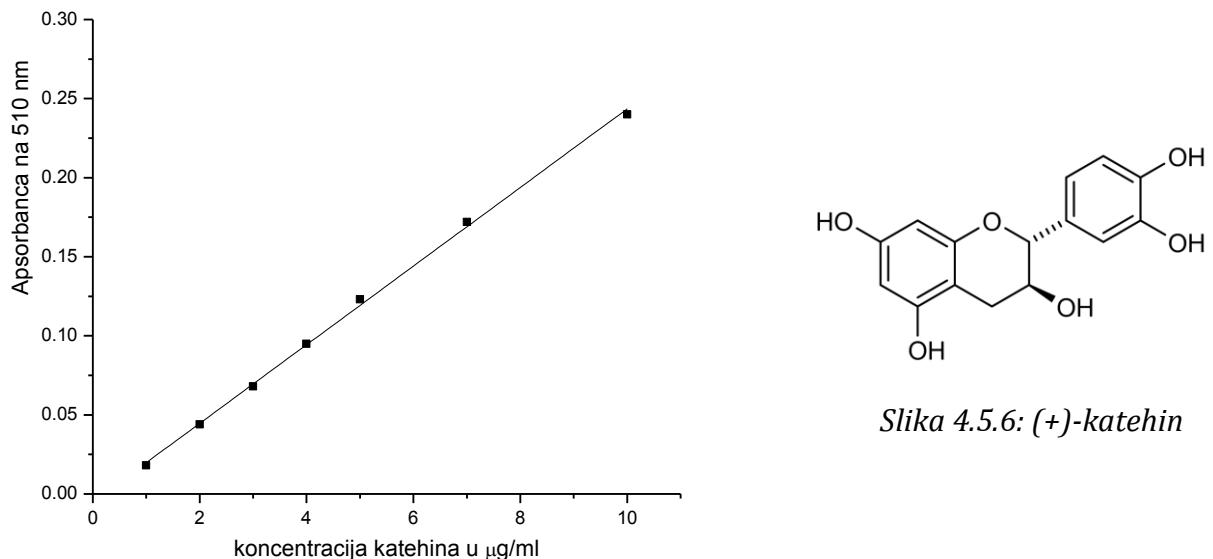
Odmeravanjem određene zapremine standardnog rastvora katehina dobijena je kalibraciona prava (slika 4.5.5):

$$A = 0.0249 [C] + 0.005, n = 7, r^2 = 0.9994;$$

gde je $[C]$ koncentracija katehina (slika 4.5.6) u $\mu\text{g}/\text{ml}$. Na osnovu izmerenih apsorbanci uzoraka, korišćenjem kalibracione prave određuje se masena koncentracija ($\mu\text{g}/\text{ml}$) flavonoida, a sadržaj u polaznom uzorku se izražava kao ekvivalent katehina po gramu suve

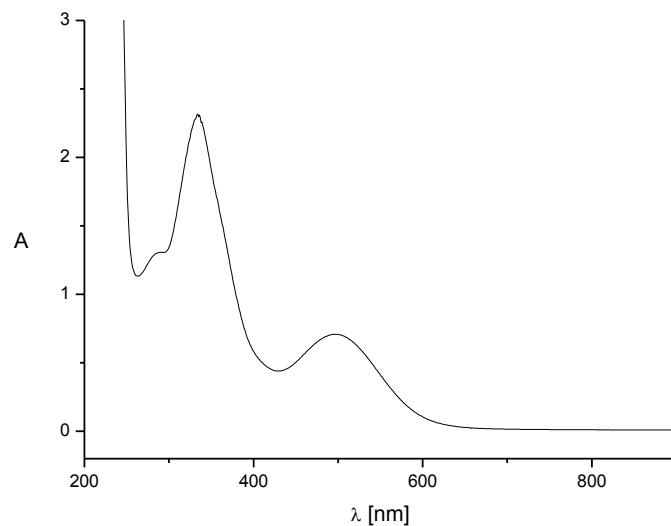
4 EKSPERIMENTALNI DEO

biljke. UV-VIS spektar kompleksa katehina sa Al^{3+} čiji je maksimum apsorpcije 510 nm (u vidljivoj oblasti) prikazan je na slici 5.4.7.



Slika 4.5.6: (+)-catehin

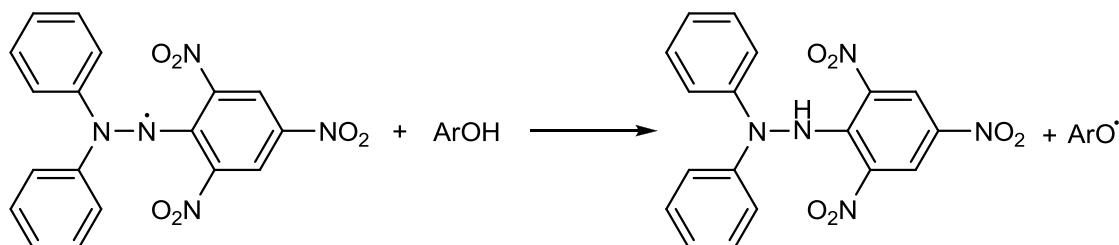
Slika 4.5.5: Kalibraciona prava za određivanje sadržaja ukupnih flavonoida



Slika 4.5.7: UV-VIS spektar kompleksa katehina sa Al^{3+} ($\lambda_{max}=510 \text{ nm}$)

4.5.3. Određivanje antioksidativne sposobnosti redukcijom DPPH[·] radikala

Kapacitet hvatanja slobodnih radikala ispitivanih uzoraka određivan je merenjem njihove sposobnosti da redukuju DPPH[·] radikale (DPPH test) (Brand-Williams i sar., 1995). 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikal (DPPH[·]) je stabilan radikal čiji rastvor u metanolu ima maksimum apsorpcije na 515 nm (slika 4.5.10). U reakciji antioksidanta (reduktora) sa DPPH[·] radikalima dolazi do smanjenja apsorbancije na 515 nm jer se DPPH[·] radikali redukuju do žuto obojenog difenilpikrilhidrazina, što se može predstaviti reakcijom datom na slici 4.5.8 (Foti i sar., 2008).



Slika 4.5.8: Reakcija DPPH[·] radikala sa fenolima

Rastvori i reagensi:

1. Radni rastvor DPPH[·], (40 µg/ml)
2. Standardni rastvor troloksa (100 µg/ml)
3. Metanol, 100%

Postupak:

Određena zapremina uzorka dodata je u 2.5 ml radnog rastvora DPPH[·] radikala, a zatim se je u normalni sud dodat metanol do 5 ml. Dobijena smeša je dobro izmešana i nakon 30 minuta stajanja na 25°C merena je apsorbanca spektrofotometrijski na 515 nm, uz MeOH kao referentni rastvor. Sve probe su rađene u tri ponavljanja. Kontrolni rastvor je dobijen mešanjem 2.5 ml radnog rastvora DPPH[·] radikala sa 2.5 ml metanola.

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

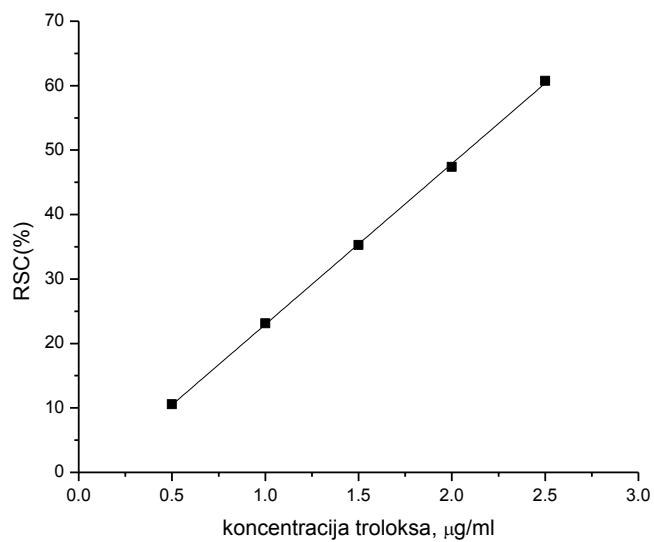
$$RSC(\%) = \left(1 - \frac{A_{uzorka}}{A_{kontrole}}\right) \cdot 100$$

Odmeravanjem određene zapremine standardnog rastvora troloksa dobijena je kalibraciona prava (slika 4.5.9):

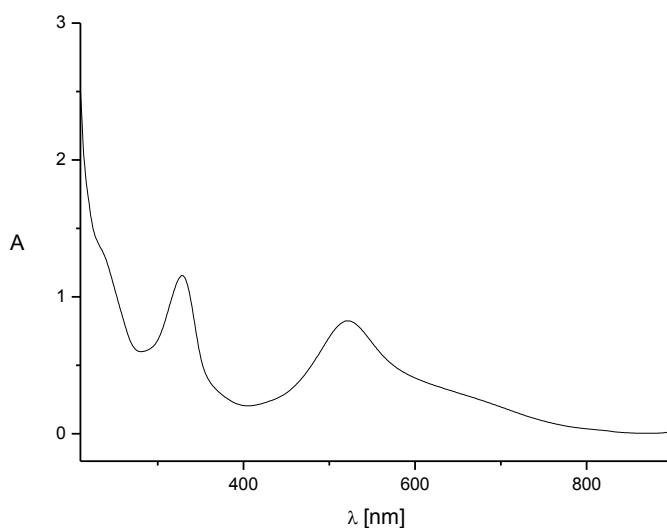
$$RSC(\%) = 24.94 [T] - 1.99, n = 5, r^2 = 0.9998;$$

Gde je [T] koncentracija troloksa u µg/ml.

4 EKSPERIMENTALNI DEO



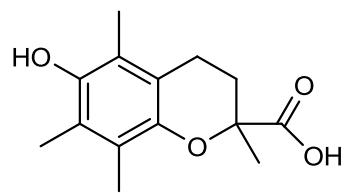
Slika 4.5.9: Kalibraciona prava za određivanje antioksidativne aktivnosti DPPH radikalom



Slika 4.5.10: UV-VIS spektar metanolnog rastvora DPPH radikala

Na osnovu određenih vrednosti RSC za svaki pojedinačni uzorak, sa kalibracione prave standardnog rastvora troloksa određena je antioksidativna aktivnost, a zatim je ukupna antioksidativna aktivnost u polaznom uzorku izražena kao ekvivalent troloksa po gramu uzorka. Trolok (slika 4.5.11) je komercijalni sintetički antioksidant firme Hoffmann-LaRoche, čiji je IUPAC naziv 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilhroman-2-karboksilna kiselina i predstavlja u vodi rastvoran analog vitamina E.

4 EKSPERIMENTALNI DEO



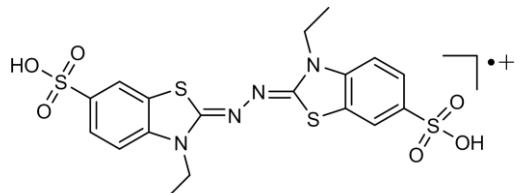
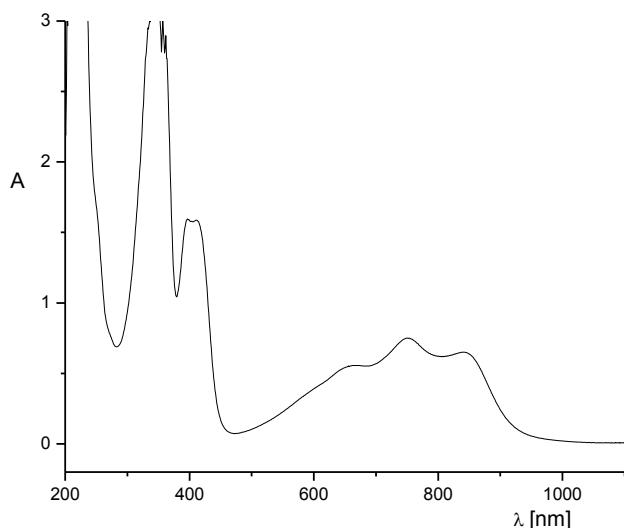
Slika 4.5.11: Troloks (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilhroman-2-karboksilna kiselina)

4.5.4. Određivanje antioksidativne sposobnosti redukcijom ABTS^{•+} radikala

Antioksidativna sposobnost ispitivanih uzoraka određivana je merenjem njihove efikasnosti redukcije ABTS^{•+} radikala po metodi koju su opisali Ozgen i saradnici (2006). 2,2'-azino-bis(3-etylbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) ili skraćeno ABTS je jedinjenje koje oksidacijom sa kalijum-peroksidisulfatom ($K_2S_2O_8$) daje modro-plavi katjon radikal (ABTS^{•+}, slika 4.5.13) sa maksimumom apsorpcije na 734 nm (slika 4.5.12). Ovako nastali ABTS^{•+} katjon radikal reaguje sa antioksidantima pri čemu se obezbojava, a smanjenje intenziteta boje srazmerno je količini prisutnih antioksidanasa.

Rastvori i reagensi:

1. Osnovni rastvor ABTS^{•+} radikala, (oko 1.8 mg/ml)
2. Radni rastvor ABTS^{•+} radikala; dobija se razblaživanjem osnovnog rastvora ABTS^{•+} radikala metanolom tako da se dobije rastvor kome na 734 nm apsorbanca iznosi $A = 0.700 \pm 0.020$
3. Standardni rastvor troloksa (100 µg/ml)
4. Metanol, 100%



Slika 4.5.13: Struktura ABTS^{•+}

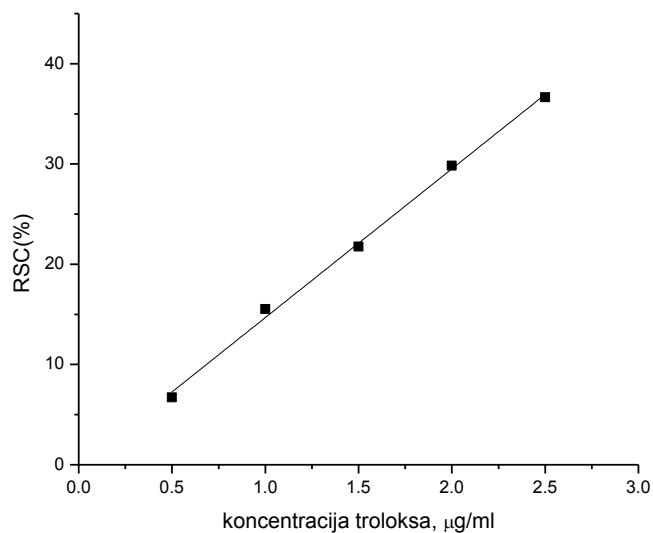
Slika 4.5.12: UV-VIS spektar ABTS^{•+} radikala ($\lambda_{max}=734\text{ nm}$)

Postupak:

Uzorak zapremine 0.1 ml je pomešan sa 3.9 ml radnog rastvora ABTS^{•+} radikala, smeša je dobro promešana i ostavljena da odstoji 6 minuta na tamnom mestu. Nakon toga, merena je

4 EKSPERIMENTALNI DEO

apsorbanca na 734 nm. Kontrolni rastvor je dobijen mešanjem 3.9 ml radnog rastvora ABTS^{·+} radikala sa 0.1 ml metanola.



Slika 4.5.14: Kalibraciona prava za određivanje antioksidativne aktivnosti ABTS^{·+} radikalom

Kapacitet hvatanja slobodnih radikala (RSC) računat je prema jednačini:

$$RSC(\%) = \left(1 - \frac{A_{uzorka}}{A_{kontrole}}\right) \cdot 100$$

Odmeravanjem odredene zapremine standardnog rastvora troloksa dobijena je kalibraciona prava (slika 4.5.14) čija je jednačina:

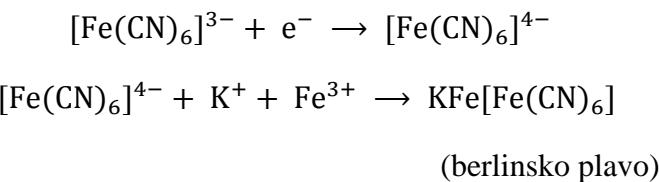
$$RSC(\%) = 15.52 [T] - 1.39, n = 5, r^2 = 0.9975$$

Gde je [T] koncentracija troloksa u µg/ml.

Na osnovu određenih vrednosti RSC za svaki pojedinačni uzorak, sa kalibracione krive standardnog rastvora troloksa određena je antioksidativna aktivnost, a zatim je ukupna antioksidativna aktivnost u polaznom uzorku izražena kao troloks ekvivalent po gramu uzorka.

4.5.5. Određivanje sposobnosti redukcije jona Fe^{3+} u Fe^{2+}

Moć redukcije Fe^{3+} u Fe^{2+} (Iron(III) to iron(II) reduction power - IRA) je još jedno merilo antioksidativne sposobnosti neke supstance. Kapacitet redukcije jona Fe^{3+} ispitivanih uzoraka određen je merenjem njihove sposobnosti da redukuju $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ jone do $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ jona. Nastali joni $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ reaguju sa viškom Fe^{3+} jona dajući berlinsko plavo, $\text{KFe}[\text{Fe}(\text{CN})_6]$. Merenjem apsorbance na 700 nm (slika 4.5.16) određuje se količina berlinskog plavog, a samim tim i moć redukcije određenog ekstrakta. Antioksidativna sposobnost uzoraka određena je po metodi koju su opisali Lim i Quah (2007), a prethodno predložio Oyaizu (1986).



Rastvori i reagensi:

1. Fosforni pufer, 0.2 M, pH=6.6;
2. $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, 1% (m/v);
3. CCl_3COOH , 10% (m/v);
4. FeCl_3 , 0.1% (m/v);
5. Standardni rastvor galne kiseline (100 $\mu\text{g/ml}$).

Postupak:

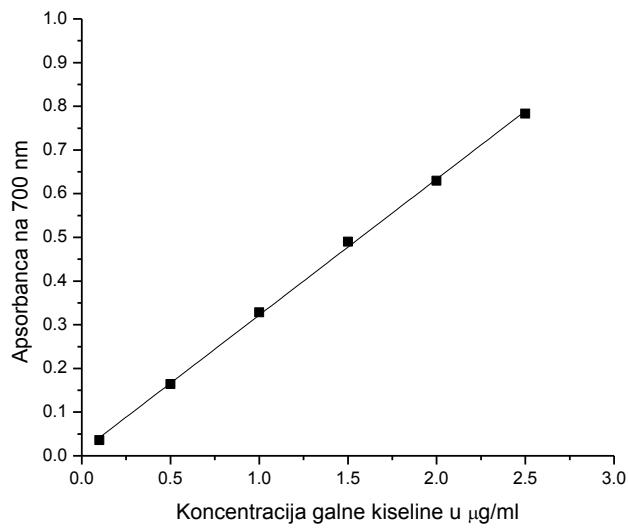
U 1.25 ml fosfatnog pufera i 1.25 ml kalijum-heksacijanoferata(III) dodato je 0.5 ml ekstrakta čija se moć redukcije ispituje. Smeša je inkubirana 20 minuta na 50°C. Nakon toga, dodato je 1.25 ml trihlorsiréetne kiseline, razblaženo sa 4.25 ml dejonizovane vode i dodato 0.85 ml rastvora gvožđe(III)-hlorida. Nakon 30 minuta merena je apsorbanca na 700 nm.

Odmeravanjem određene zapremine standardnog rastvora galne kiseline dobijena je kalibraciona prava (slika 4.5.15) čija je jednačina:

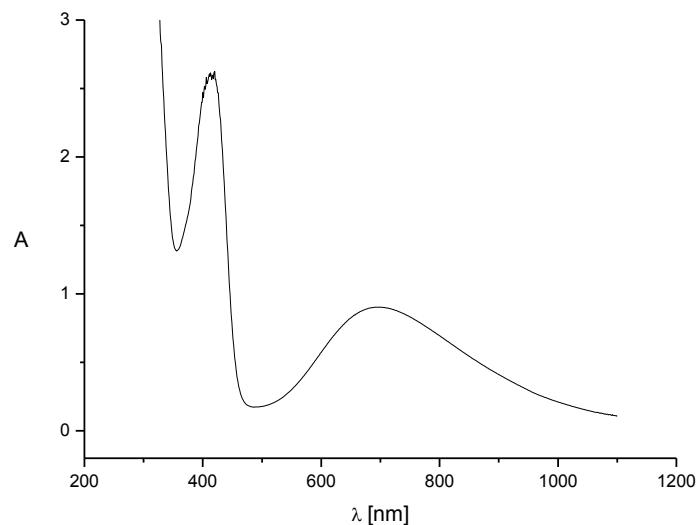
$$A = 0.3114 [\text{GA}] + 0.0106, n = 6, r^2 = 0.9991;$$

gde je $[\text{GA}]$ koncentracija galne kiseline u $\mu\text{g/ml}$. Na osnovu izmerenih apsorbanci uzoraka, sa kalibracione prave standardnog rastvora galne kiseline određena je sposobnost redukcije jona Fe^{3+} u Fe^{2+} a rezultat je izražen kao ekvivalent galne kiseline po gramu suvog bilja.

4 EKSPERIMENTALNI DEO



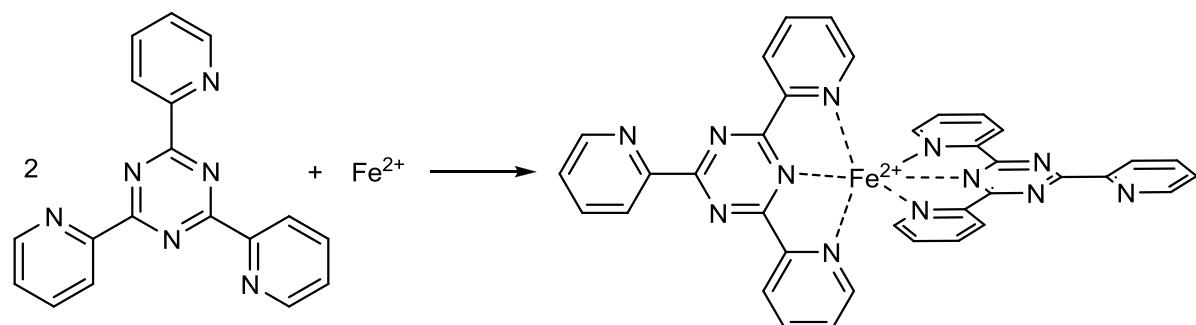
Slika 4.5.15: Kalibraciona prava za IRA test



Slika 4.5.16: UV-VIS spektar $\text{KFe}[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ u reakcionaloj smeši ($\lambda_{max}=700 \text{ nm}$)

4.5.6. Određivanje sposobnosti redukcije jona Fe^{3+} u Fe^{2+}

Određivanje sposobnosti redukcije jona Fe^{3+} u Fe^{2+} FRAP metodom (Ferric-reducing antioxidant power - FRAP) je još jedan način određivanja antioksidativne sposobnosti nekog uzorka. Metoda se zasniva (kao i prethodna) na sposobnosti antioksidanta da redukuje gvožđe(III) u gvožđe(II) koje gradi ljubičasto-plavi obojeni kompleks sa 2,4,6-tris-2-piridil-1,3,5-triazinom (TPTZ) (slika 4.5.17). Nastali kompleks, $\text{Fe}(\text{TPTZ})_2^{2+}$, intenzivno apsorbuje na 593 nm (slika 4.5.19) (Collins et al., 1959).



Slika 4.5.17: Građenje kompleksa gvožđa(II) sa 2,4,6-tris-2-piridil-1,3,5-triazinom (TPTZ)

Rastvori i reagensi:

1. Acetatni pufer, 0.3 M, pH=3.6;
2. HCl, 40 mM;
3. TPTZ, 10 mM rastvor u 40 mM HCl;
4. FeCl_3 , 20 mM;
5. Standardni rastvor Fe^{2+} (0.300 mM).

Postupak:

FRAP test je izведен po proceduri koju su opisali Benzie i Strain (1996). Određena zapremina ekstrakta pomešana je dejonizovanom vodom do 0.1 ml, a zatim je dodato 3 ml sveže pripremljenog FRAP reagensa (25 ml acetatnog pufera, 0.3 M, pH 3.6 + 2.5 ml 10 mM TPTZ u 40 mM HCl + 2.5 ml 20 mM FeCl_3). Nakon inkubacije od 4 min na 37°C merena je apsorbanca na 593 nm. FRAP reagens je termostatiran na 37°C pre upotrebe.

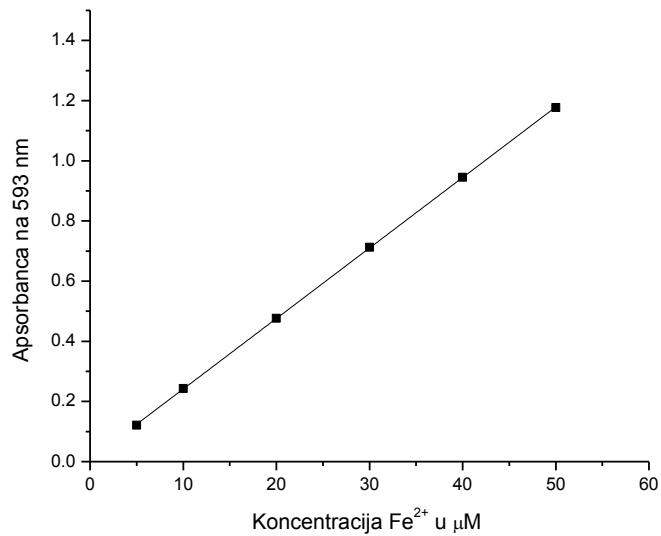
Odmeravanjem određene zapremine standardnog rastvora gvožđa(II) dobijena je kalibraciona prava (slika 4.5.18) čija je jednačina:

$$A = 0.02344 [\text{Fe}^{2+}] + 0.00702, n = 6, r^2 = 0.9999,$$

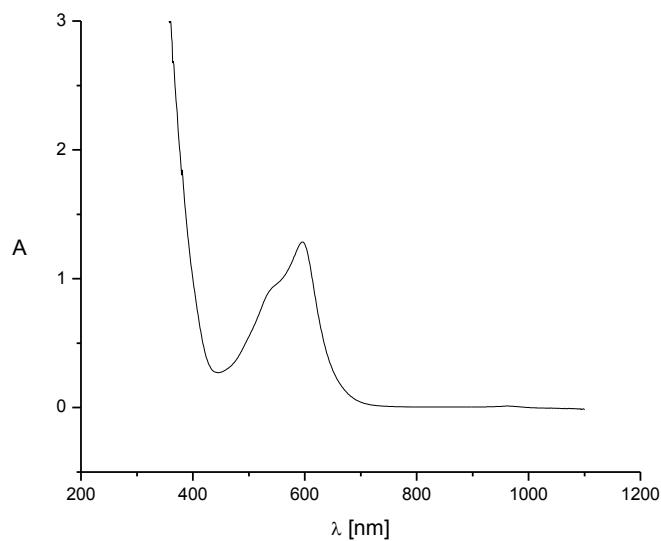
gde je $[\text{Fe}^{2+}]$ koncentracija gvožđe(II) u μM . Na osnovu izmerenih apsorbanci uzoraka, sa kalibracione prave standardnog rastvora gvožđa(II) određena je sposobnost redukcije jona

4 EKSPERIMENTALNI DEO

Fe³⁺ u Fe²⁺ FRAP metodom, a rezultat je izražen kao ekvivalent gvožđa(II) po gramu suvog bilja.



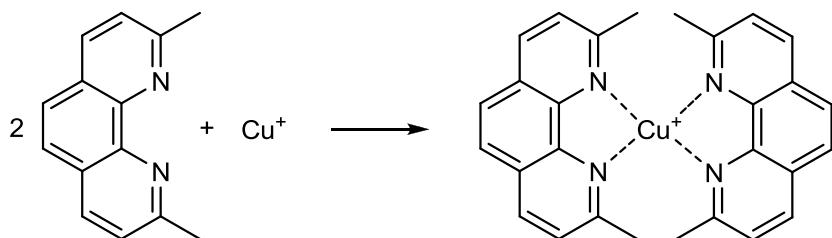
Slika 4.5.18: Kalibraciona prava za FRAP test



Slika 4.5.19: UV-VIS spektar $\text{Fe}(\text{TPTZ})_{2^{2+}}$ ($\lambda_{\max}=593 \text{ nm}$)

4.5.7. Određivanje sposobnosti redukcije jona Cu²⁺ u Cu⁺

Za određivanje sposobnosti redukcije jona Cu²⁺ u Cu⁺ (Cupric ion reducing antioxidant capacity assay - CUPRAC) korišćena je metoda koju su prvi opisali Apak i saradnici (Apak et al., 2004). Metoda se zasniva na redukciji jona Cu²⁺ antioksidantima do Cu⁺ jona koji sa neokuproinom (2,9-dimetil-1,10-fenantrolin - Neo) grade stabilan kompleks (u neutralnoj i slabo kiseloj sredini) čiji je maksimum apsorpcije na 450 nm (slike 4.5.20 i 4.5.22) (Fulton i Hastings, 1956).



Slika 4.5.20: Građenje kompleksa neokuproina sa bakar(I) jonom

Rastvori i reagensi:

1. Amonijum-acetatni pufer, 1 M, pH=7.0;
2. Neokuproin, 7.5 mM (u etanolu);
3. CuCl₂, 10 mM;
4. Standardni rastvor troloksa (50 µg/ml).

Postupak:

U smešu koja sadrži 1 ml uzorka i vode, 1 ml amonijum-acetatnog pufera i 1 ml rastvora neokuproina dodato je 1 ml rastvora Cu(II)-hlorida. Dobijena smeša je dobro promešana i ostavljena da stoji 30 minuta na tamnom mestu, na 25°C. Nakon toga, merena je apsorbanca na 450 nm, pri čemu je slepa proba smeša bez dodatog uzorka.

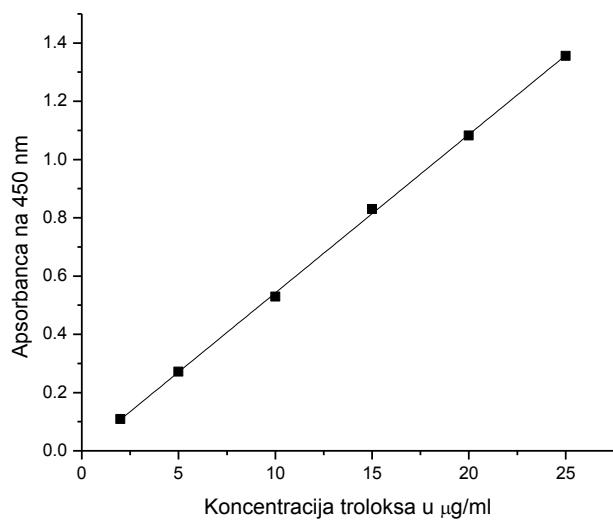
Odmeravanjem određene zapremine standardnog rastvora troloksa dobijena je kalibraciona prava (slika 4.5.21) čija je jednačina:

$$A = 0.0544 [T] - 0.0013, n = 6, r^2 = 0.9995;$$

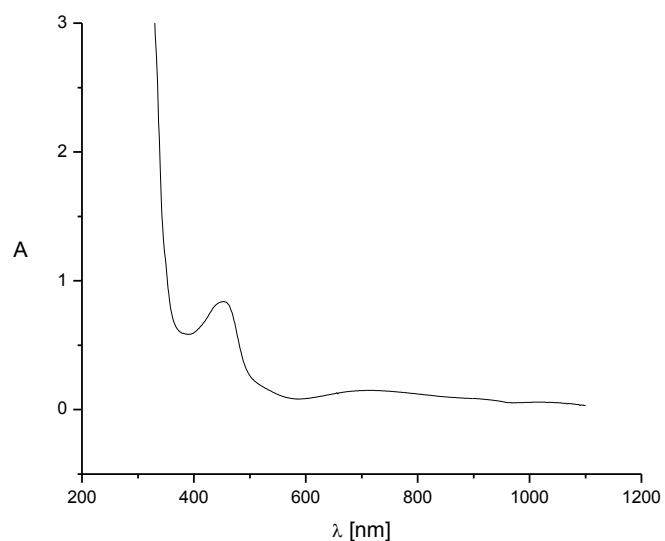
Gde je [T] koncentracija troloksa u µg/ml.

Na osnovu izmerenih apsorbanci za svaki pojedinačni uzorak, sa kalibracione prave standardnog rastvora troloksa određena je sposobnost redukcije jona Cu²⁺ do Cu⁺, a zatim je vrednost u polaznom uzorku izražena kao trolok ekvivalent po gramu uzorka.

4 EKSPERIMENTALNI DEO



Slika 4.5.21: Kalibraciona prava za određivanje sposobnosti redukcije jona Cu^{2+} u Cu^+



Slika 4.5.22: UV-VIS spektar NeozCu^+ ($\lambda_{max}=450 \text{ nm}$)

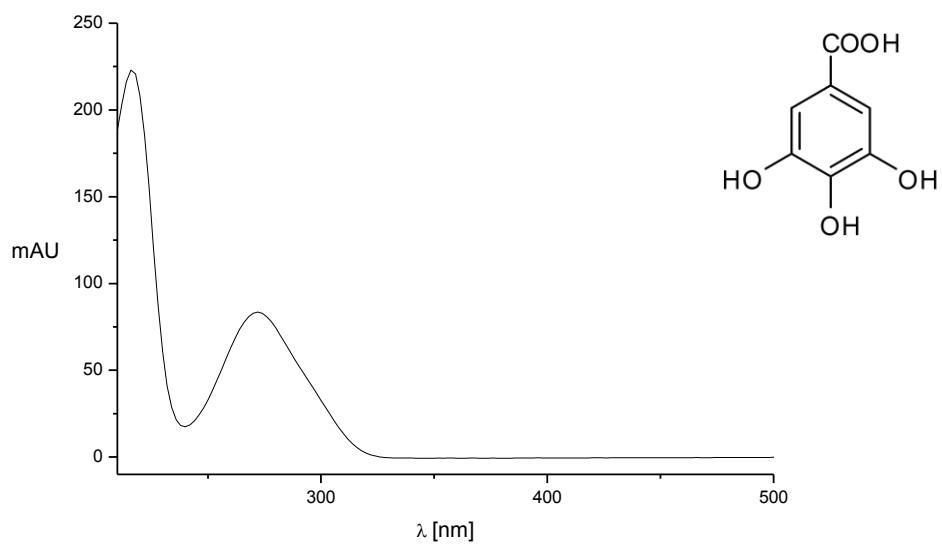
4.6. HPLC

Tečna hromatografija visokih performansi (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) sa UV/Vis i fluorescentnim detektorom visoke rezolucije 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 ZORBAX Eclipse XDB-C18 koloni (4.6 mm x 150 mm, sa veličinom čestica od 5- μm) uz sistem rastvarača: A – (acetonitril) i B - (dejonizovana voda sa 0.1% mravlje kiseline). Razdvajanje komponenti je izvedeno primenom sledećeg linearnog gradijenta: 0-25 min, 90% B; 25-35 min, 90% B - 80% B; 35 - 40 min 80% B -70% B, 40-50 min, 70% B. Protok mobilne faze je iznosio 0.8 ml/min. Injektovano je 20 μl rastvora uzorka, automatski, korišćenjem autosamplera. Kolona je termostatirana na temperaturi od 30°C.

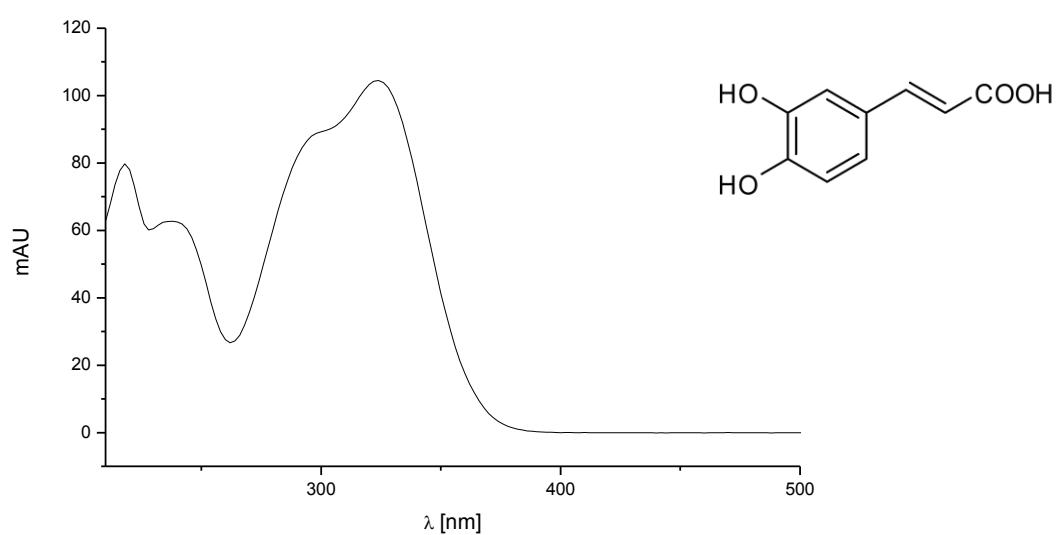
Fenolne komponente prisutne u uzorcima su identifikovane poređenjem njihovih retencionih vremena i spektara sa retencionim vremenom i spektrom standarda za svaku komponentu. Korišćeni su standardi kiselina (tabela 4.6.1): galne, protokatehinske, 4-hidroksibenzoeve, 2,5-dihidroksibenzoeve, vanilinske, kafene, siringinske, *p*-kumarne, ferulne, sinapinske i salicilne. Takođe su korišćeni standardi flavonoida: katehina, epikatehina, rutina, naringina, naringerina, morina, kvercetina, hesperidina i hesperetina. Kvantitativno određvanje komponenata je izvršena metodom spoljašnjeg standarda. Za svaki pojedinačni standard pripremljen je osnovni rastvor masene koncentracije 1.0 mg/ml, rastvaranjem u 96% (v/v) rastvoru etanola. 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.

Sve analize su ponavljene tri puta.

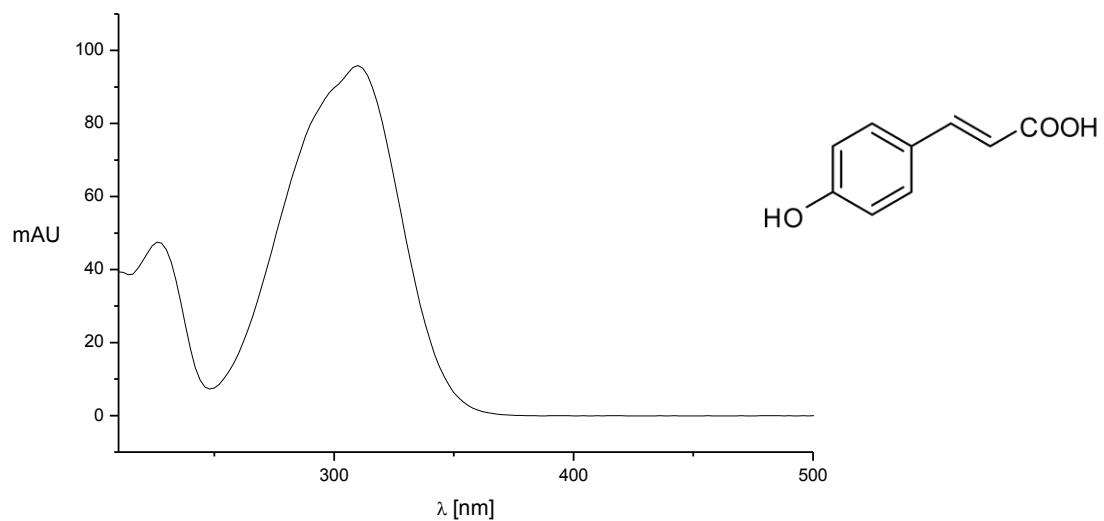
4 EKSPERIMENTALNI DEO



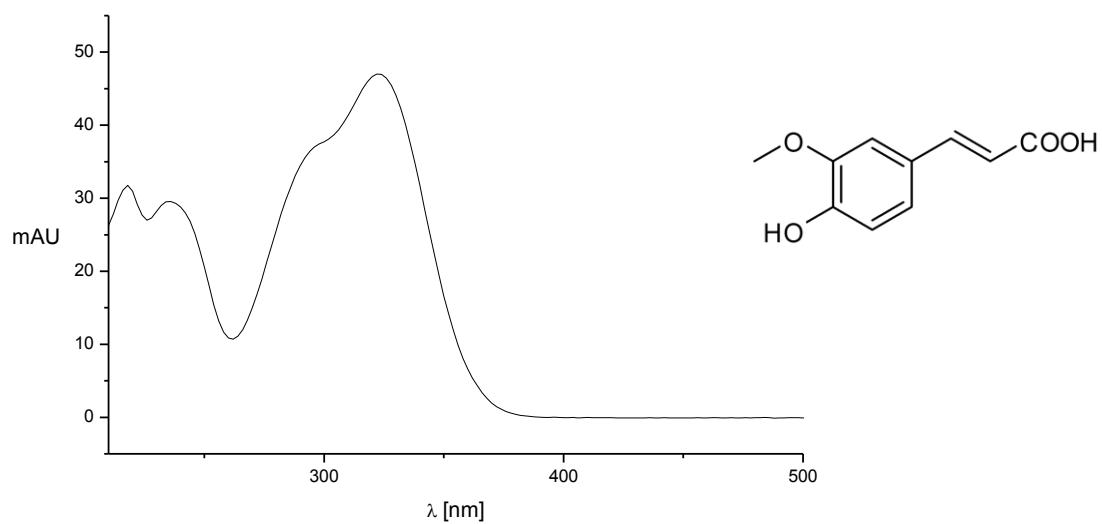
Slika 4.6.1: UV-VIS spektar i struktura galne kiseline



Slika 4.6.2: UV-VIS spektar i struktura kafeinske kiseline

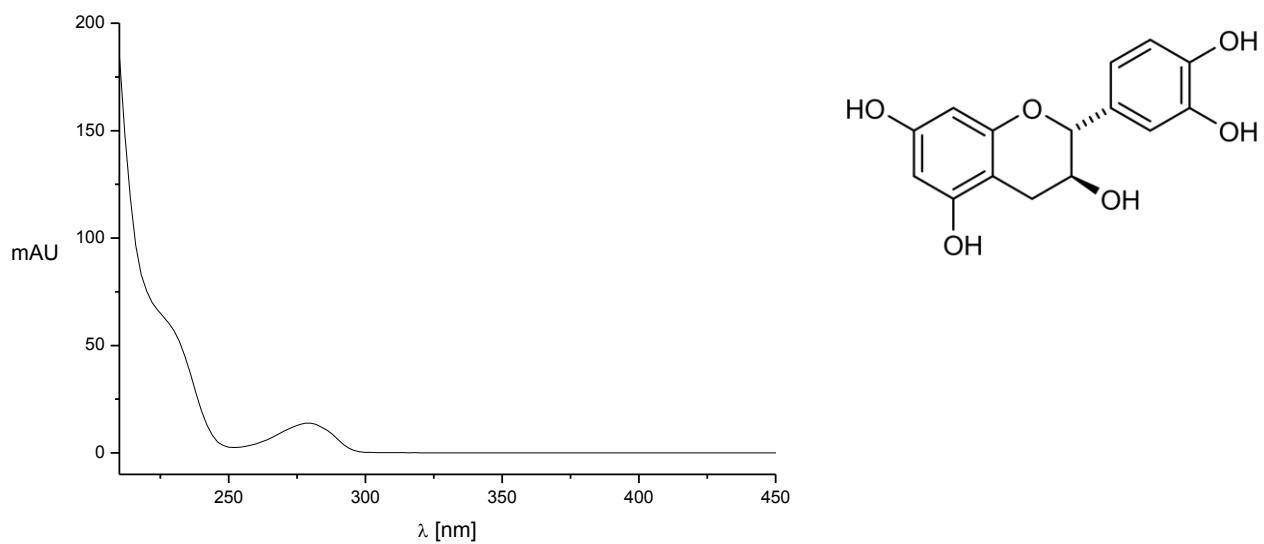


Slika 4.6.3: UV-VIS spektar i struktura p-kumarne kiseline

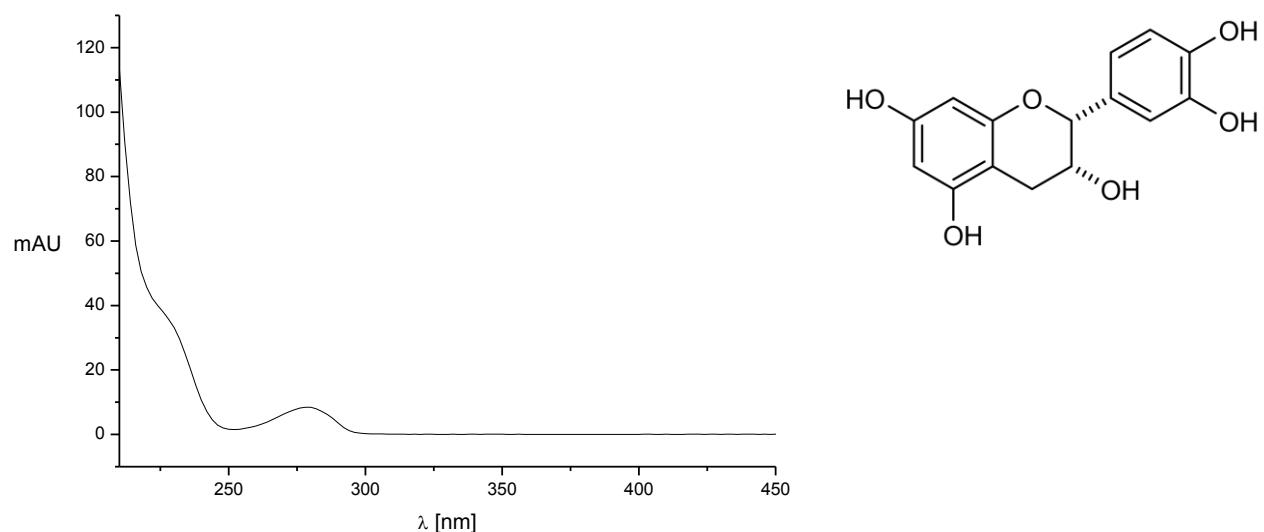


Slika 4.6.4: UV-VIS spektar i struktura ferulne kiseline

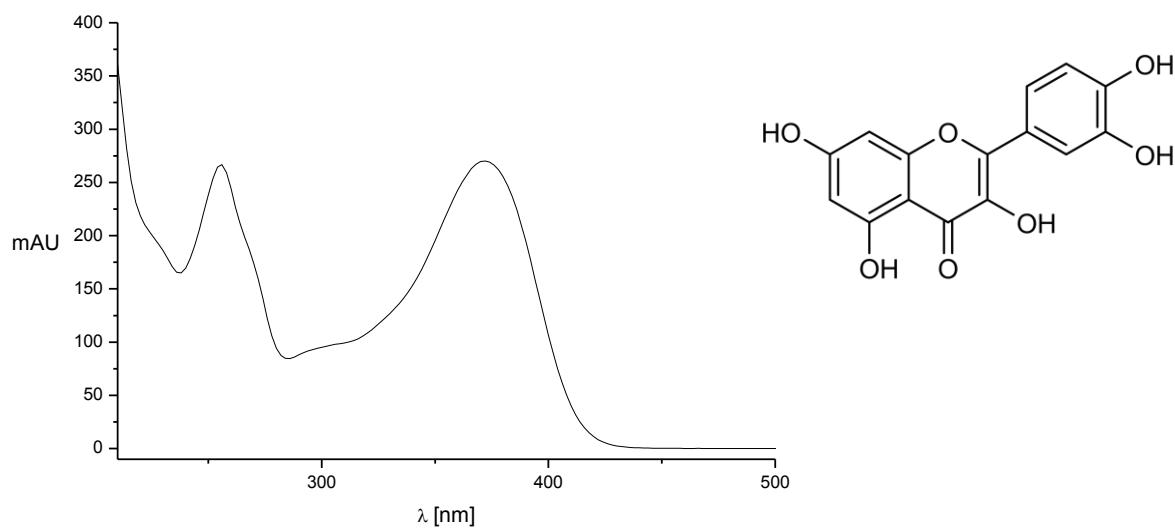
4 EKSPERIMENTALNI DEO



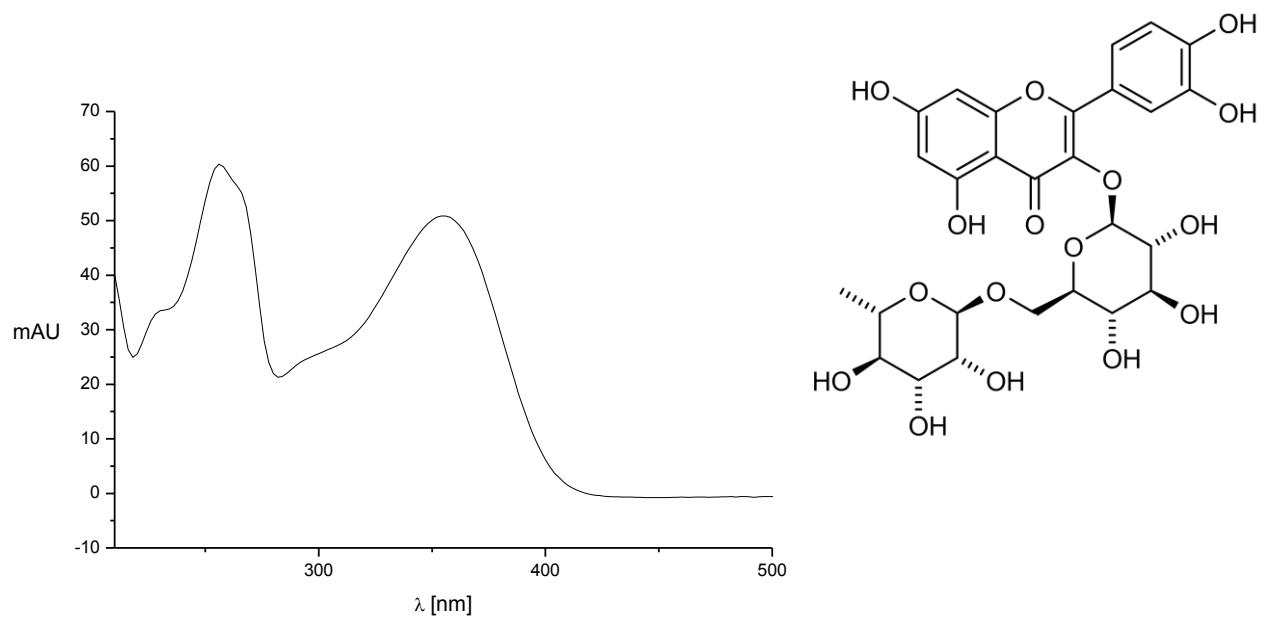
Slika 4.6.5: UV-VIS spektar i struktura katehina



Slika 4.6.6: UV-VIS spektar i struktura epikatehina

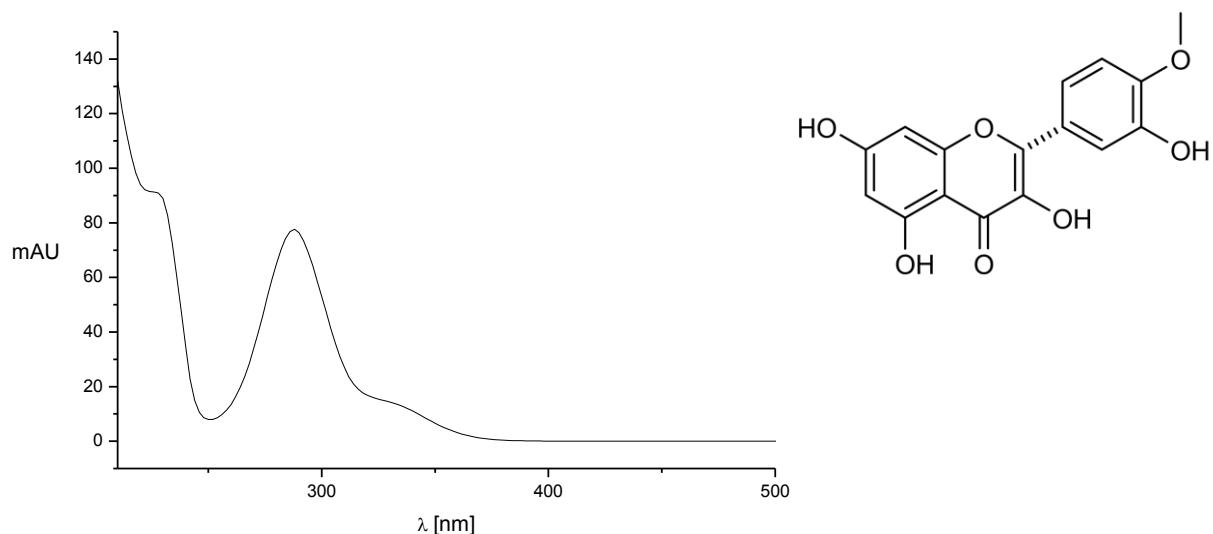


Slika 4.6.7: UV-VIS spektar i struktura kvercetina

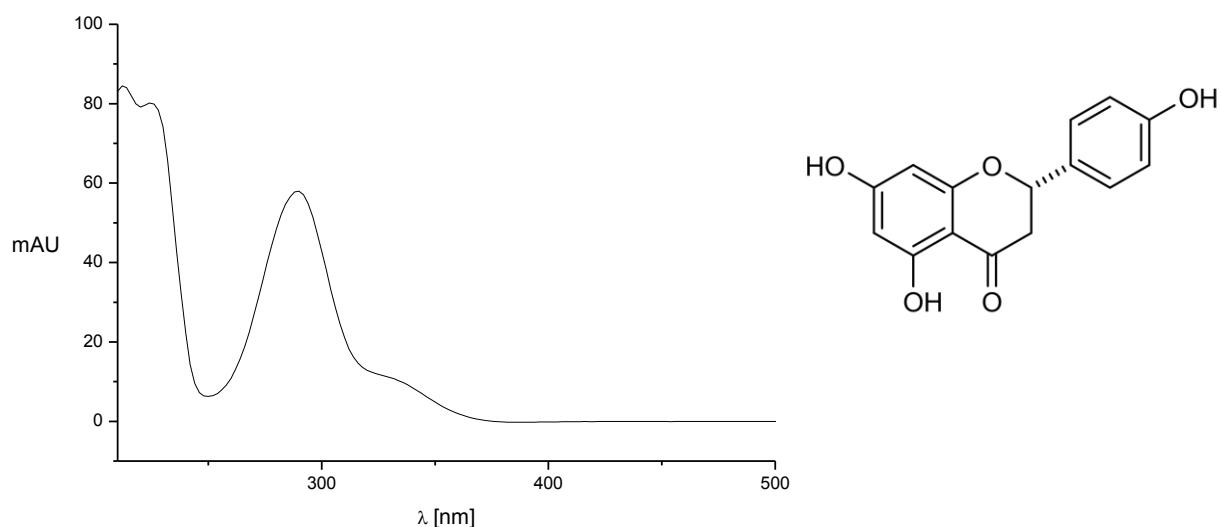


Slika 4.6.8: UV-VIS spektar i struktura rutina

4 EKSPERIMENTALNI DEO

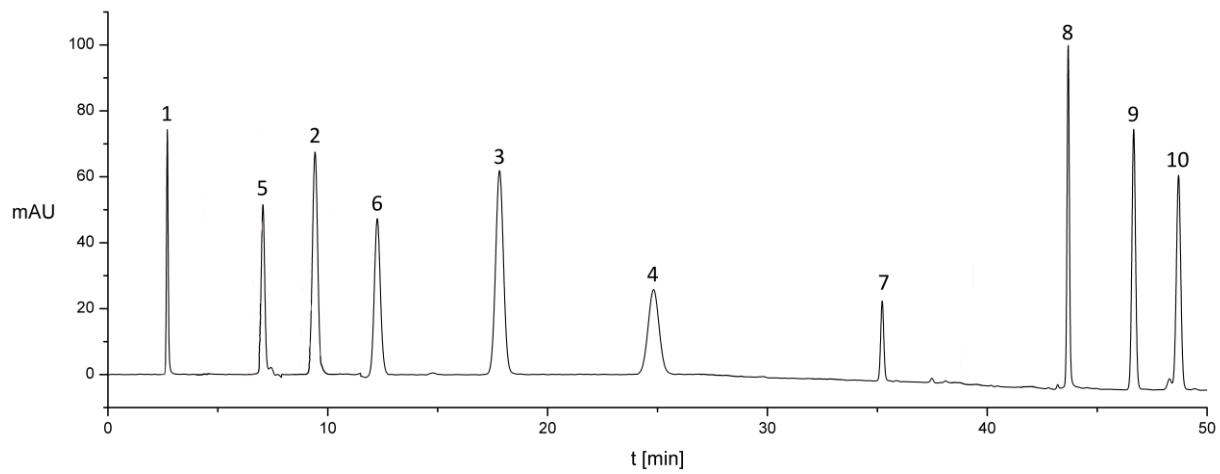


Slika 4.6.9: UV-VIS spektar i struktura hesperetina

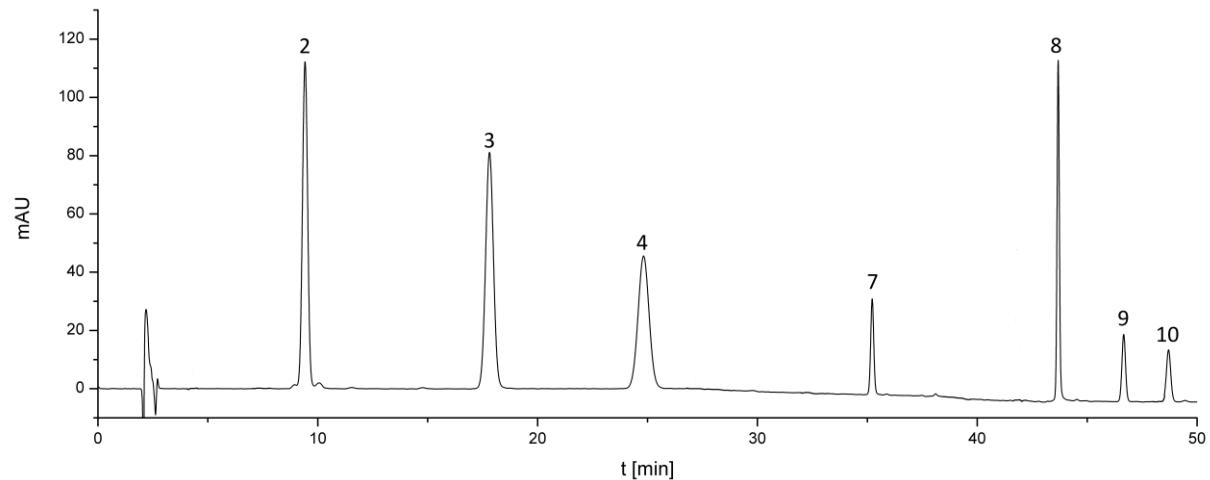


Slika 4.6.10: UV-VIS spektar i struktura naringenina

4 EKSPERIMENTALNI DEO

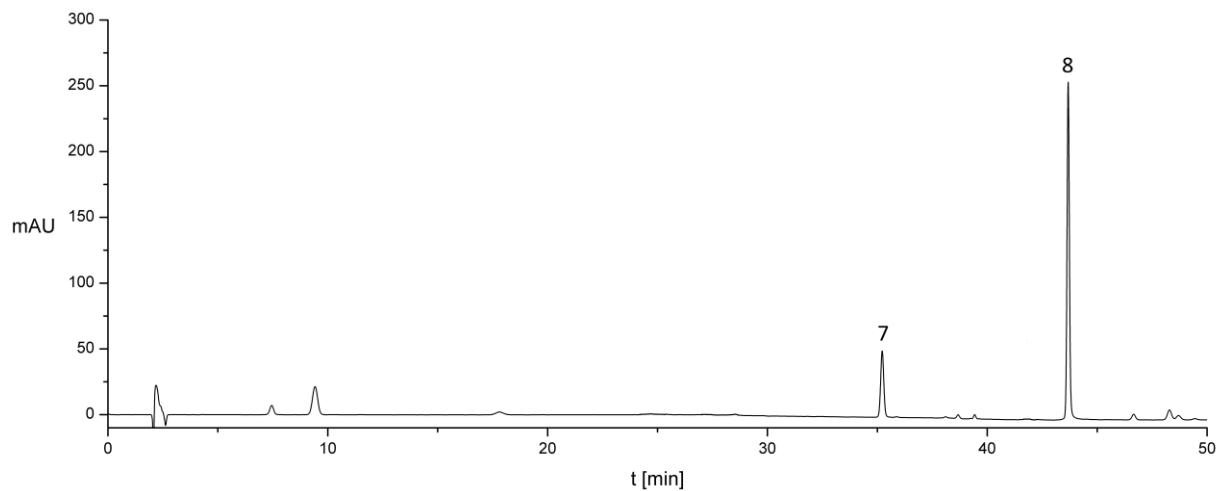


Slika 4.6.11: HPLC spektar standarda snimljen na 280 nm (1-galna kiselina, 2-kafena kiselina, 3-p-kumarna kiselina, 4-ferulna kiselina, 5-katehin, 6-epikatehin, 7-rutin, 8-kvercetin, 9-naringenin, 10-hesperetin)

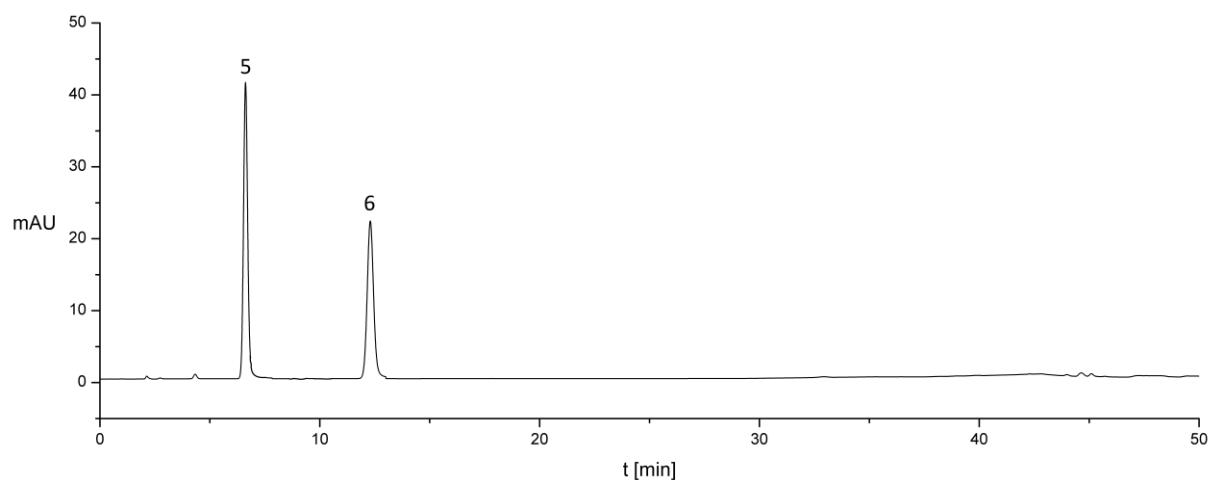


Slika 4.6.12: HPLC spektar standarda snimljen na 320 nm (2-kafena kiselina, 3-p-kumarna kiselina, 4-ferulna kiselina, 7-rutin, 8-kvercetin, 9-naringenin, 10-hesperetin)

4 EKSPERIMENTALNI DEO



Slika 4.6.13: HPLC spektar standarda snimljen na 360 nm (7-rutin, 8-kvercetin)



Slika 4.6.14: HPLC spektar standarda snimljen fluorescentnim detektorom sa talasnom dužinom ekscitacije od 275 nm i talasnom dužinom detekcije od 322 nm (5-katehin, 6-epikatehin)

4 EKSPERIMENTALNI DEO

Tabela 4.6.1: HPLC karakteristike za fenolne kiseline i flavonoide

jedinjenje		t _R (min)	λ (nm)	nagib	odsečak	r ²	LOD (µg/ml)	LOQ (µg/ml)	Opseg (µg/ml)
kiselina									
1	Galna	2.70	280	63.88	-0.31	0.99999	0.047	0.157	0.22 - 54
2	Kafena	9.42	320	130.99	0.38	0.99998	0.023	0.076	0.22 - 55
3	p-Kumarna	17.81	320	152.49	5.76	0.99997	0.020	0.066	0.34 - 84
4	Ferulna	24.82	320	127.40	2.73	0.99998	0.024	0.078	0.21 - 53
flavonoid									
5	Katehin	6.86	FLD ¹	21.37	-1.25	0.99999	0.070	0.234	0.31 - 63
6	Epikatehin	12.30	FLD ¹	17.94	2.45	0.99998	0.084	0.279	0.36 - 76
7	Rutin	35.22	360	44.65	0.22	0.99998	0.034	0.112	0.23 - 58
8	Kvercetin	43.68	360	89.93	1.05	0.99999	0.017	0.056	0.22 - 54
9	Naringenin	46.66	280	66.24	3.18	0.99998	0.023	0.075	0.22 - 54
10	Hesperetin	48.70	280	75.58	2.14	0.99996	0.020	0.066	0.24 - 74

¹Kod određivanja katehina i epikatehina korišćen je fluorescentni detektor (FLD), sa talasnom dužinom ekscitacije od 275 nm i talasnom dužinom detekcije od 322 nm

4.7. ICP metoda za određivanje mineralnog sastava

ICP-OES metoda je korišćena za kvalitativnu i kvantitativnu analizu uzoraka biljnih vrsta i čajeva na sadržaj metalnih jona.

Rastvori i reagensi:

1. Multi standard – Ultra scientific analytical solution USA
2. HNO_3 (1:1)
3. Argon 5.0 (99,999% čistoće)

Parametri metode:

- Snaga RF generator – 1150 W
- Brzina pumpe – 50 rpm
- Protok gasa za hlađenje – 12 L/min
- Protok raspršivača gasa – 0.7 L/min
- Pravac posmatranja plazme – aksijalni
- Vreme ispiranja – 30 s
- Tri probe za svaki uzorak
- Prikaz rezultata u ppm sa četiri značajne cifre.

Za svaki element čiji sadržaj je bilo potrebno odrediti, formirana je metoda tako što je izvršen izbor odgovarajućih parametara metode i odabir 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 različitih koncentracija dobijenih razblaživanjem osnovnog, referentnog standarda. Za svako merenje rađene su po tri probe.

4.8. Izolovanje etarskih ulja

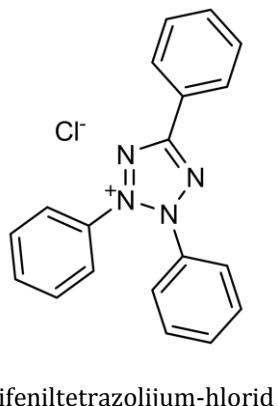
Egarska ulja su izolovana iz svežeg biljnog materijala, koji je nakon usitnjavanja i tačnog odmeravanja mase hidrodestilovan u originalnom aparatu po Clevenger-u u toku 2.5 h. Dobijena etarska ulja su ekstrahovana dietil-etrom, a zatim su dobijeni ekstrakti sušeni anhidrovanim magnezijum-sulfatom. Nakon odvajanja sredstva za sušenje filtriranjem i rastvarača destilacijom na rotacionom vakuum uparivaču na sobnoj temperaturi, određen je prinos ulja. Sva etarska ulja su analizirana neposredno nakon izolovanja korišćenjem metode GC-MS.

4.9. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti

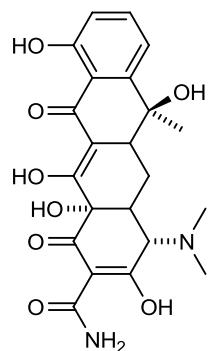
Za određivanje antimikrobne aktivnosti etarskih ulja i ekstrakta, korišćeno je: pet Gram-pozitivnih, šest Gram-negativnih sojeva bakterija i dvoje fungalnih mikroorganizma (tabela 4.9.1).

Tabela 4.9.1 Mikroorganizmi korišćeni za ispitivanje antimikrobne aktivnosti

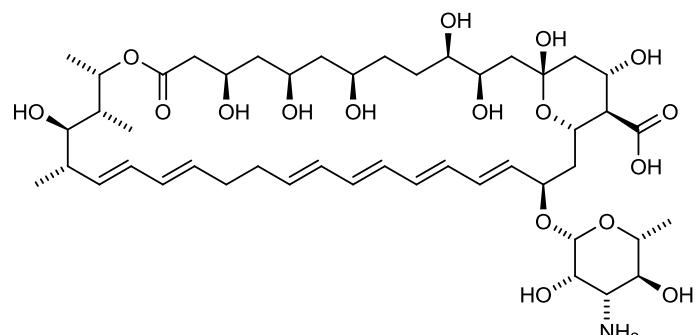
Gram-pozitivne bakterije	
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633
<i>Clostridium perfringens</i>	ATCC 19404
<i>Listeria innocua</i>	ATCC 51742
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 19433
Gram-negativne bakterije	
<i>Proteus vulgaris</i>	ATCC 8427
<i>Enterobacter aerogenes</i>	ATCC 13048
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 8739
<i>Proteus mirabilis</i>	ATCC 12453
<i>Salmonella enteritidis</i>	ATCC 13076
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 10031
Gljivice	
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231
<i>Aspergillus niger</i>	ATCC 16404



trifeniltetrazolijum-hlorid



tetraciklin (antibiotik)



nistatin (fungicid)

Ispitivanje antimikrobne aktivnosti vršeno je i mikrodilucionom metodom (National Committee for Clinical Laboratory Standards - NCCLS, 2007). Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) vršeno je metodom serije razblaženja na mikrotitarskim pločama sa 96 bunarića (well). Bakterije su kultivisane na Mueller Hinton agaru (37°C), a gljivice na Sabouraud dekstroznom agaru (30°C). Posle 18 časova kultivisanja, napravljena je bakterijska suspenzija u Mueller Hinton bujonu, pri čemu je turbidimetrijskom metodom broj mikroorganizama standardizovan na 0.5 jedinica na McFarland-ovoj skali. Konačna

4 EKSPERIMENTALNI DEO

koncentracija bakterijskog inokuluma iznosila je $5 \cdot 10^5$ CFU/ml. Apsorbancija svake od suspenzija merena je spektrofotometrijski (UV/VIS 1610, Shimadzu, Japan). Suspenzije gljivica su napravljene u Sabouraud dekstroznom agaru. Broj živih mikroorganizama utvrđen je korišćenjem hemocitometra (za bakterije) i "Thoma chamber" (za gljivice). Fungalni inokulum je iznosio $1 \cdot 10^4$ CFU/ml.

Uzorci za testiranje su pripremljeni rastvaranjem u 100% dimetil-sulfoksidu (DMSO). Najveća koncentracija DMSO-a u bunarićima je bila 10% (v/v), što je prethodno potvrđeno kao koncentracija koja ne utiče na rast testiranih sojeva mikroorganizama. Mikrotitarske ploče su, nakon dodavanja inokuluma u bunariće ploče, inkubirane na 37 °C u toku 24 časa (bakterije) ili 30 °C u toku 48 časa (gljivice).

Bakterijski rast je vizualizovan dodavanjem 20 µl 0.5%-tnog vodenog rastvora trifeniltetrazolijum-hlorida (TTC) (Sartoratto i sar, 2004). Tetraciklin i nistatin su korišćeni kao pozitivna, a rastvarač (10% rastvor DMSO-a u vodi) kao negativna kontrola. Minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) je definisana kao najniža koncentracija ispitivanog uzorka koja sprečava vidljiv rast mikroorganizma (crveno obojenje na dnu čašica nakon dodavanja TTC-a), dok minimalna baktericidalna/fungicidalna koncentracija (MBC/MFC) označava najnižu koncentraciju koja ubija 99.9% mikroorganizama. Prilikom određivanja MBC/MFC, bujon je uzet iz svih čašica bez vidljivog rasta, inokuliran i inkubiran 24 časa na 37 °C za bakterije ili u toku 48 časa na 30 °C za gljivice čiji je rast praćen. Testovi su ponavljeni četiri puta.

4.10. Ispitivanje hepatoprotektivne aktivnosti

Svi eksperimenti su izvođeni na laboratorijskim pacovima (200–250 g; Wistar rats¹, uzgajeni u vivarijumu Instituta za biomedicinska istraživanja, Medicinskog fakulteta u Nišu) muškog pola, čuvanim na sobnoj temperaturi (27 ± 2 °C) u laboratoriji, sa dnevno-noćnim režimom svetla od 12 sati i slobodnim pristupom hrani i vodi. Dvanaest sati pre svakog eksperimenta, životinje su dobijale samo vodu, da bi se izbegao uticaja hrane na aktivnost ispitivane supstance.



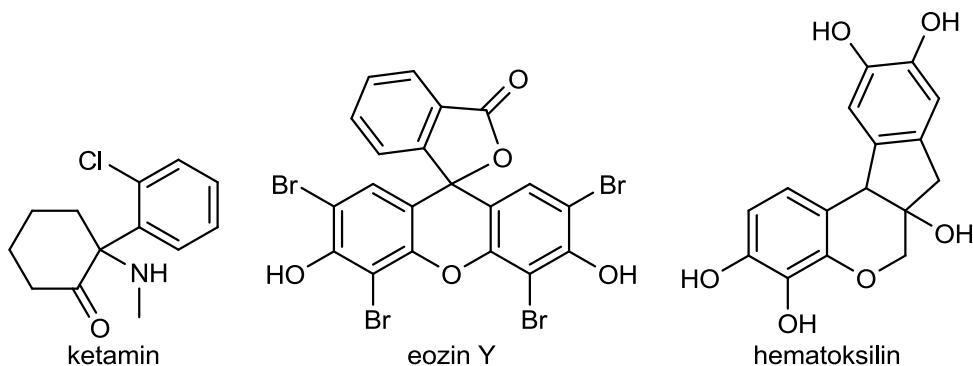
*Slika 4.1.1: beli laboratorijski Wistar pacov (*Rattus norvegicus*)*

Na dan eksperimenta životinje su podeljene u osam eksperimentalnih grupa od po šest životinja. Dve grupe su služile kao pozitivna i negativna kontrola i primile su CCl₄ (2.5 ml/kg 50% (v/v) CCl₄ u maslinovom ulju) i maslinovo ulje intraperitonealnom injekcijom (i.p.). Test grupe pacova, tri grupe po ekstraktu, tretirane su i.p. ekstraktima *G. macrorrhizum*-a (list i rizom) pripremljenim u dozama 120, 240 i 480 mg/kg (telesne mase). Nakon sat vremena od dobijanja ekstrakata životnjama je injektirano i.p. po 2.5 ml CCl₄ 50% rastvora u maslinovom ulju (v/v). Dvadeset četiri časa nakon toga životnjama je uzeta krv i one su žrtvovane predoziranjem ketaminom (Ketamidor 10%, Richter Pharma AG, Wels, Austria). Jetra svakog pacova je propisno uklonjena i uzorci su uzeti za histološku analizu.

Istraživanja su bila u skladu sa usvojenim načelima i direktivama Evropskog Saveta od 24. novembra 1986. - The European Council Directive of November 24th, 1986 (86/609/EEC) i odobrena Lokalnim Etičkim komitetom (dozvola broj 01-2857-3, izdata 27. aprila 2012. Svi napori su učinjeni da se smanji broj životinja uzetih za eksperiment i njihova patnja tokom eksperimenta.

Biohemijska merenja su izvršena tako što je uzeta krv centrifugirana na 1500 rpm na 4 °C u toku 15 minuta da bi se dobio serum u kome su određivani enzimi. Aspatrat transferaza (AST), alanin transaminaza (ALT), serum alkalna fosfataza (ALP), γ -glutamat transpeptidaza (γ -GT), pseudoholin esteraza (PCES) i totalni bilirubini (TB) su određeni pomoću Olympus AU680® Chemistry-Immuno Analyzer (Olympus America INC, USA).

¹ Wistar rats – veštački odgajan soj albino pacova koji pripadaju vrsti *Rattus norvegicus*. Razvijen je u laboratorijama Wistar Instituta (Filadelfija, USA) 1906. Prvi je soj pacova koji veštački razvijen da služi kao model životinja namenjena laboratorijskim ispitivanjima.



Uzorci jetre namenjene histopatološkom posmatranju su fiksirani u puferovanom formaldehidnom rastvoru (10%, m/m). Fiksirano tkivo je zatim dehidrovano serijom rastvora etanola u vodi (od 50% do 100%, v/v), ugrađeno u parafin, isećeno na 4–5 µm tanke parчиће, obojeno hematoksilinom i eozinom i ispitivano na optičkom mikroskopu Olympus BH2 (Olympus America INC, USA).

4.11. Statistička obrada podataka

Rezultati su izraženi u obliku: srednja vrednost ± standardna devijacija. Statistički značajna razlika je određivana jednosmernom analizom varijanse (ANOVA) za kojom je sledio (u slučaju potrebe) post hoc test (Tukey). U svim statističkim analizama interval poverenja je bio 95% ($p = 0.05$). Za statističku analizu korišćen je odgovarajući računarski program (Graph pad Prism version 5.03, San Diego, CA, USA).

5 Rezultati i diskusija

5.1. *Geranium macrorrhizum* L. (Geraniaceae)

Rizom i nadzemni delovi biljne vrste *Geranium macrorrhizum* L. (Geraniaceae) sakupljeni su sa područja Svrliških planina (područje sela Varoš) u Jugoistočnoj Srbiji u julu 2011 godine. Identitet biljne vrste je potvrđen od strane ovlašćenog biologa sa Departmana za Biologiju i Ekologiju, Prirodno-matematičkog fakulteta, Univerziteta u Nišu. Vaučer sa primerkom biljne vrste je deponovan u herbarijim pomenutog departmana pod brojem 5529.

Biljne vrste iz roda *Geranium* se koriste širom sveta u narodnoj medicini (Radulović i sar., 2010). Veruje se da je visok sadržaj hidrolizabilnih i kondenzovanih tanina odgovoran za diuretsko, antidijurejno i hemostatsko dejstvo koje pokazuju mnoge biljne vrsta iz ovog roda (Genova i Ivacheva, 1995). U skorije vreme, za mnoge *Geranium* vrste pokazana su antiinfektivna (Serkedjieva i Hay, 1998; Radulović i sar., 2010) i antioksidantna (Lamaison i sar., 1993; Miliauskas i sar., 2004a). dejstva.

Hepatoprotektivno dejstvo slične biljne vrste, *G. thunbergii* Sieb et Zucc., koja se tradicionalno koristi u Japanu kao lek za bolesti jetre, je dobro poznato i potvrđeno u brojnim studijama na pacovima kao eksperimentalnim modelima (Nakanishi i sar., 1998). Rađena su istraživanja sa geraniinom, taninom izolovanim iz ove i drugih *Geranium* vrsta za koga se veruje da je glavni nosilac ovih hepatoprotektivnih efekata (Nakanishi i sar., 1998; 1999).

Da bi se minimizirao broj životinja uzetih za *in vivo* testove odlučeno je da se najpre izvede veći broj *in vitro* antioksidativnih testova kako bi se među ekstraktima izabrao jedan sa najverovatnije najjačim hepatoprotektivnim dejstvom. Određen je sadržaj ukupnih fenola (TP) i flavonoida (TF) i doveden u korelaciju sa *in vitro* testovima kako bi se potvrdila (ili odbacila) pretpostavka da su fenolna jedinjenja odgovorna kako za antioksidativnu tako i za hepatoprotektivnu aktivnost. Takođe, ispitana je moguća antimikrobna aktivnost ekstrakta *G. macrorrhizum*-a kako bi se videlo da li upotreba zdravca kao adstringentnog sredstva kod zarastanja rana u narodnoj medicini ima osnova.

5. REZULTATI I DISKUSIJA

5.1.1 Sadržaj fenola i flavonoida i *in vitro* antioksidantna aktivnost

Od četiri upotrebljena rastvarača za ultrazvučnu ekstrakciju (metanol, etanol, aceton i etil-acetat) kao najefikasniji, u smislu dobijenog ekstrakcionog prinosa, pokazao se metanol, za kojim sledi etanol (tabela 5.1.1). Aceton i etil-acetat su pokazali vrlo malu sposobnost ekstrakcije. Ekstrakciona efikasnost metanola u kombinaciji sa ultrazvukom je bila izuzetna, 45.8 i 51.2% (m/m) za rizom i nadzemni deo (uglavnom list).

Tabela 5.1.1: Prinos ekstrakcije, sadržaj fenola (TP) i flavonoida (TF) u ekstraktima

	Rastvarač	% ekstrakcije	TP ^a	TF ^b
List	metanol	51.2 ± 0.3a	160 ± 3a	45 ± 1a
	etanol	42.7 ± 0.3b	109 ± 4b	30 ± 1b
	aceton	9.9 ± 0.2c	13.8 ± 0.5c	9.0 ± 0.1c
	etil acetat	7.9 ± 0.2d	6.3 ± 0.4d	4.1 ± 0.1d
Rizom	metanol	45.8 ± 0.2e	86 ± 2e	27.5 ± 0.7e
	etanol	21.3 ± 0.2f	51 ± 2f	14.9 ± 0.3f
	aceton	6.0 ± 0.1g	22.4 ± 0.8g	5.8 ± 0.2g
	etil acetat	4.8 ± 0.1h	5.5 ± 0.1d	2.5 ± 0.1d

^amg ekvivalenta galne kiseline po g suve mase (mg GAE/g sbm); ^bmg ekvivalenta katehina po g suve mase (mg CE/g sbm); vrednosti sa različitim slovima u istoj koloni su statistički značajno različite za p<0.05 kada se koristi ANOVA Tukey *post hoc* test.

Količina totalnih fenola (TP) u metanolnom ekstraktu *G. macrorrhizum*-a (tabela 5.1.1) od 160 ± 3 i 86 ± 2 mg ekvivalenta galne kiseline po gramu suvog biljnog materijala (za list i rizom), čini ovu biljnu vrstu veoma bogatim izvorom prirodnih fenola. Slični rezultati za *G. macrorrhizum*, mada ne tako dobri kao dobijeni ovde, su publikovali Miliauskas i sar. (2004b). Etanolni ekstakt sadrži nižu vrednost TP od metanolnog ali i dalje značajnu. Slično TP, sadržaj ukupnih flavonoida (TF) je najviši u metanolnom ekstraktu – 45 ± 1 i 27.5 ± 0.7 mg ekvivalenta katehina po gramu suvog biljnog materijala (za list i rizom). Aceton i etil-acetat nisu pokazali značajnu sposobnost ekstrakcije kako TP tako i TF. Generalno govoreći, ekstrakti lista pokazuju više vrednosti TP i TF od odgovarajućih ekstrakta rizoma. Postoji velika korelacija između sadržaja TP i TF u ekstraktima ($r^2=0.992$, tabela 5.1.3).

Metanolni ekstrakt pokazuje najveće radikal-hvatačke sposobnosti prema relativno stabilnom DPPH radikalu (u odnosu na ABTS) u poređenju sa ostalim rastvaračima (tabela 5.1.2). Reduktivna sposobnost metanolnog ekstrakta upoređena sa troloksom prikazana je na slici 5.1.1. Ekstrakt lista pokazuje bolju DPPH hvatačku sposobnost od odgovarajućeg ekstrakta rizoma (osim u slučaju acetonskog ekstrakta).

5. REZULTATI I DISKUSIJA

Još jednom, metanolni ekstrakt je pokazao najjaču sposobnost hvatanja reaktivnijeg ABTS radikala: 323 ± 2 (list) i 170 ± 2 (rizom) mg TE po gramu suve mase (tabela 5.1.2). Metanolni ekstrakti rizoma i lista pokazuju izuzetno jaku aktivnost što je prikazano na slici 5.1.2. Kao što je i očekivano, vrednosti troloks ekvivalenta dobijenih u ovoj metodi po gramu biljnog materijala su više u odnosu na odgovarajuće vrednosti dobijene DPPH metodom zbog manje stabilnosti ABTS katjon radikala. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa rezultatima koje su saopštili Miliauskas i sar. (2004b).

Tabela 5.1.2: In vitro antioksidantna aktivnost, DPPH i ABTS radikal

	Rastvarač	DPPH ^a	ABTS ^a	IRA ^b	FRAP ^c	CUPRAC ^a
List	metanol	179 ± 2 a	323 ± 2 a	84.2 ± 0.3 a	1350 ± 50 a	466 ± 4 a
	etanol	71 ± 1 b	206 ± 2 b	17.8 ± 0.3 b	940 ± 30 b	355 ± 6 b
	aceton	9.5 ± 0.1 c	11.3 ± 0.1 c	4.0 ± 0.3 c	79 ± 4 cd	30.5 ± 0.4 c
	etil acetat	4.2 ± 0.1 d	5.7 ± 0.1 d	2.2 ± 0.1 d	30 ± 1 d	21.1 ± 0.3 d
Rizom	metanol	106 ± 2 e	170 ± 2 e	42.4 ± 0.4 e	630 ± 10 e	269 ± 2 e
	etanol	50 ± 1 f	72 ± 1 f	11.6 ± 0.3 f	355 ± 4 f	207 ± 3 f
	aceton	20.4 ± 0.7 g	20.3 ± 0.2 g	8.5 ± 0.4 g	108 ± 6 c	50.0 ± 0.6 g
	etil acetat	4.2 ± 0.2 d	4.4 ± 0.1 d	2.1 ± 0.1 d	24.6 ± 0.8 d	14.8 ± 0.1 d

^amg Trolox ekvivalenta po g suve mase (mg TE/g sbm); ^bmg ekvivalenta galne kiseline po g suve mase (mg GAE/g sbm); ^cμmol Fe²⁺ ekvivalenta po g suve mase (μmol Fe²⁺/g sbm); vrednosti sa različitim slovima u istoj koloni su statistički značajno različite za p<0.05 kada se koristi ANOVA Tukey *post hoc* test.

Moć redukcije Fe³⁺ u Fe²⁺ (Iron(III) to iron(II) reduction power - IRA) je još jedno merilo reduktivnog kapaciteta uzorka i može biti značajan indikator njihove antioksidativne sposobnosti (Sacan i Yanardag, 2010). Kapacitet redukcije jona Fe³⁺ svih ekstrakta je upoređen sa galnom kiselinom kao standardom (na slici 5.1.3. dat je izgled grafika u slučaju metanolnih ekstrakta). Još jednom, metanolni ekstrakti su pokazali navišu antioksidativnu sposobnost pri čemu ona opada u nizu: metanol > etanol > aceton > etil acetat (tabela 5.1.2). I ova metoda je potvrdila da je metanol najbolji medijum za ekstrakciju komponenti odgovornih za antioksidativnu sposobnost.

FRAP (Ferric-reducing antioxidant power) metoda je slična prethodnoj i njome merena antioksidativna sposobnost za metanolni ekstrakt zdravca iznosi 1347.91 ± 46.71 (za list) i 632.08 ± 9.04 (za rizom) mmol Fe²⁺ po gramu suve biljne matrije (tabela 5.1.2). Poređenje sa standardnim rastvorom Fe²⁺ jona prikazano je na slici 5.1.4.

Kao i u slučaju celog spektra prethodno primenjenih antioksidativnih metoda, tako i u slučaju CUPRAC metode, metanolni ekstrakt je pokazao najjaču redukcionu sposobnost (466.00 ± 4.09 i 268.88 ± 2.17 mg TE po gramu suve biljne mase, za list i rizom). Antioksidativna sposobnost ekstrakta opada u nizu metanol > etanol > aceton > etil acetat (tabela 5.1.2).

5. REZULTATI I DISKUSIJA

Tabela 5.1.3: Koeficijenti korelaciјe između totalnih fenola, totalnih flavonoida i primenjenih in vitro antioksidantnih testova

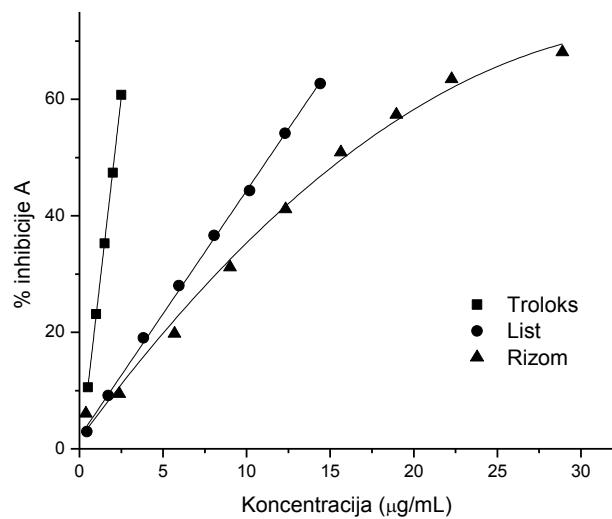
	TP	TF	DPPH	ABTS	IRA	FRAP	CUPRAC
TP	1.000	0.992	0.957	0.997	0.893	0.997	0.991
TF		1.000	0.964	0.993	0.904	0.988	0.981
DPPH			1.000	0.963	0.976	0.942	0.940
ABTS				1.000	0.909	0.996	0.981
IRA					1.000	0.880	0.853
FRAP						1.000	0.986
CUPRAC							1.000

Ako se posmatra zavisnost između sadržaja fenola i individualnih antioksidativnih testova primećuje se izuzetno visoka korelacija. Najveća vrednost korelaciјe ukupnih fenola je sa metodom FRAP ($r^2=0.9973$) za kojom slede ABTS ($r^2=0.9966$), CUPRAC ($r^2=0.9906$), DPPH ($r^2=0.9572$) dok je najniža vrednost korelaciјe (ali i dalje značajna) između TP i IRA ($r^2=0.8928$). Ovo pokazuje da je visok sadržaj fenolnih jedinjenja direktno povezan sa *in vitro* a verovatno i sa *in vivo* antioksidantnim aktivnostima.

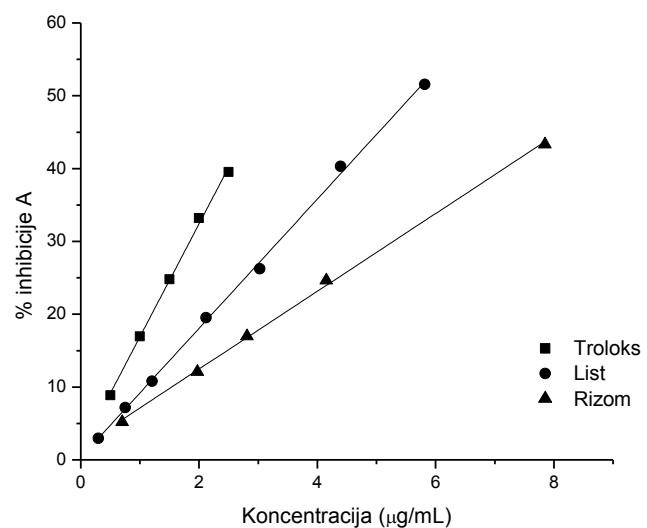
Pošto postoje visoke vrednosti r^2 (tabela 5.1.3) svih primenjenih antioksidativnih testova koji pokrivaju veliki raspon radikal-hvatačkih sposobnosti (stabilnih i reaktivnih radikala) i redoks potencijala (fero/feri i kupro/kupri, fino podešenih kompleksiranjem) kao i sadržaja fenola (TP) i flavonoida (TF), možemo zaključiti da su fenoli i flavonoidi glavni nosioci izuzetno visoke antioksidantne sposobnosti ispitivanih ekstrakta lista i rizoma *G. macrorrhizum*-a.

Više primenjenih antioksidantnih *in vitro* testova na ekstraktima lista i rizoma *G. macrorrhizum*-a (različitim rastvaračima), vodilo je ka izboru najboljeg rastvarača za dobijanje ekstrakta koji bi se koristili u *in vivo* testovima. Metanolni ekstrakt se pokazao ne samo kao najbolji u antioksidativnim testovima, sadržaju fenola i flavonoida, nego i u prinosu ekstrakovane mase po gramu suve biljne materije. Iz navedenih razloga, odlučeno je da se detaljnije analizira sastav kao i da se ispita hepatoprotективна и antimikrobna sposobnost metanolnog ekstrakta lista i rizoma *G. macrorrhizum*-a

5. REZULTATI I DISKUSIJA

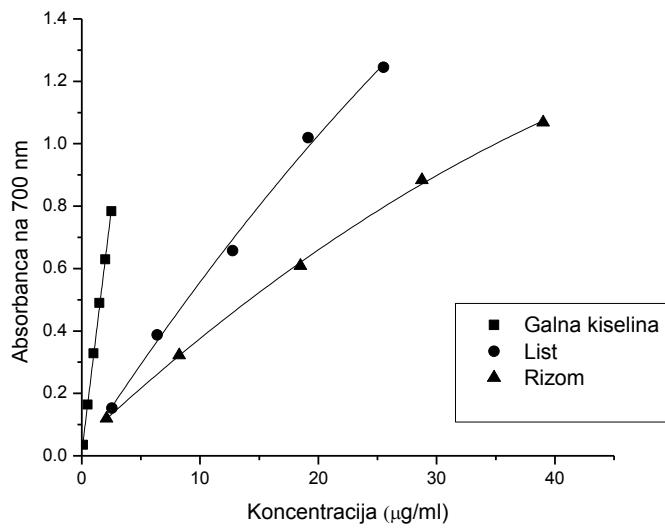


Slika 5.1.1: DPPH test metanolnog ekstrakta

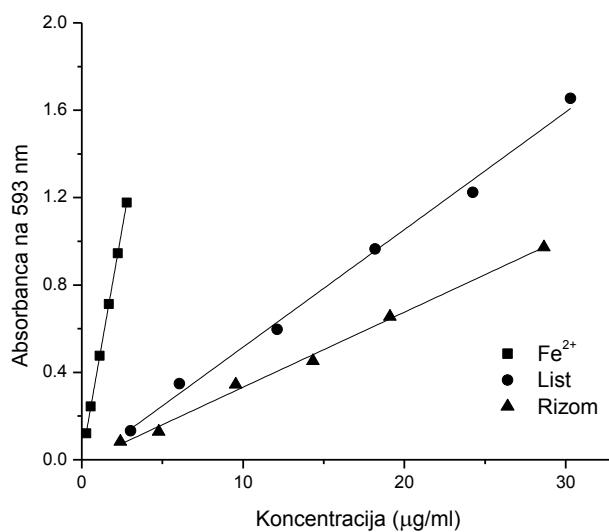


Slika 5.1.2: ABTS test metanolnog ekstrakta

5. REZULTATI I DISKUSIJA

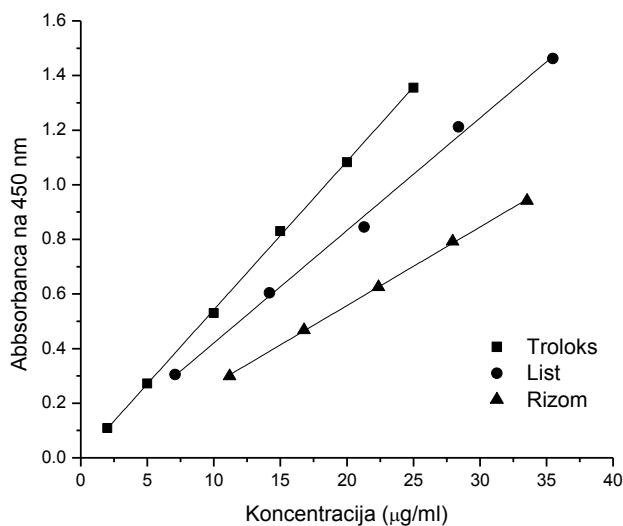


Slika 5.1.3: IRP test metanolnog ekstrakta



Slika 5.1.4: FRAP test metanolnog ekstrakta

5. REZULTATI I DISKUSIJA



Slika. 5.1.5: CUPRAC test metanolnog ekstrakta

5.1.2 Hepatoprotektivna aktivnost

Hepatoprotektivna aktivnost ekstrakta lista i rizoma *G. macrorrhizum*-a je ispitivana CCl_4 indukovanim hepatotoksičnošću na wistar pacovima kao model životinja (Rao, 2003). Unošenje CCl_4 u organizam životinje izaziva akutno oštećenje jetre slobodnim radikalima pri čemu ćelije jetre (hepatociti) stradaju a njihov sadržaj dospeva u krvotok. Praćenjem nivoa enzima aspartat transaminaze (AST), alanin transaminaze (ALT), γ -glutamil transpeptidaze (γ -GT), alkalne fosfataze (ALP), plazma holinesteraze (PCHE) i totalnih bilirubina (TB) u serumu životinje u odnosu na kontrolnu grupu kojoj nije dat CCl_4 određujemo stepen oštećenja jetre. Povećanje koncentracije ovih enzima (odnosno, njihove aktivnosti), naročito povećanje ALT, je indikacija oštećenja jetre (Lin, 1986).

Nivoi ovih enzima i ukupnih bilirubina (TB) u grupi životinja koja je tretirana zajedno CCl_4 -om i ekstraktom *G. macrorrhizum*-a (rastvorenim u maslinovom ulju) značajno je povišen u odnosu na kontrolnu grupu. Međutim, ovi parametri su značajno niži kada ih poređimo sa parametrima grupe koja je dobila samo CCl_4 (tabela 5.1.4; slika 5.1.6). Povećanje nivoa ukupnih bilirubina u krvnoj plazmi nakon davanja CCl_4 eksperimentalnim životinjama je povezano sa nemogućnošću da ih oštećena jetra normalno resorbuje, konjuguje i izluči u žuč. Ovo predstavlja vrlo osetljiv test kojim se određuje ozbiljnost nekroze ćelija jetre (Rajesh i Latha, 2004, Klaassen i Watkins, 1984).

5. REZULTATI I DISKUSIJA

*Tabela 5.1.4: Efekat ekstrakta biljne vrste *G. macrorrhizum* na nivo ALP, γ - GT, PCHE i TB u krvnoj plazmi ispitivanih životinja*

Grupe	Doza (mg/kg)	ALP (U/L)	γ - GT (U/dL)	PCHE (KU/dL)	TB (μmol/L)
(10 ml/kg)	-	101.0 ± 8.4	90.1 ± 4.2	24.3 ± 2.8	2.3 ± 0.4
CCl ₄ ^a	-	446.4 ± 12.5 ^b	215.3 ± 10.7 ^b	72.1 ± 5.8 ^b	23.2 ± 1.2 ^b
ekstrakt rizoma	120	305.3 ± 9.9 ^{b,c}	182.5 ± 9.3 ^{b,c}	54.0 ± 2.7 ^{b,c}	13.1 ± 0.9 ^{b,c}
	240	256.7 ± 10.6 ^{b,c}	156.8 ± 7.4 ^{b,c}	39.5 ± 3.3 ^{b,c}	8.3 ± 0.7 ^{b,c}
	480	201.2 ± 9.5 ^{b,c}	122.7 ± 8.6 ^{b,c}	35.5 ± 1.4 ^{b,c}	7.9 ± 0.6 ^{b,c}
ekstrakt lista	120	246.6 ± 10.2 ^{b,c}	148.4 ± 8.5 ^{b,c}	49.6 ± 3.7 ^{b,c}	10.5 ± 0.8 ^{b,c}
	240	189.8 ± 5.6 ^{b,c}	131.7 ± 9.7 ^{b,c}	33.5 ± 4.1 ^{b,c}	8.1 ± 0.7 ^{b,c}
	480	123.4 ± 8.1 ^{b,c}	102.5 ± 7.3 ^c	25.8 ± 2.1 ^c	6.2 ± 0.5 ^{b,c}

^a 2.5 ml/kg rastvora 50% CCl₄ u maslinovom ulju (v/v); ^bp<0.001 vs. kontrolna grupa; ^cp<0.001 vs. CCl₄

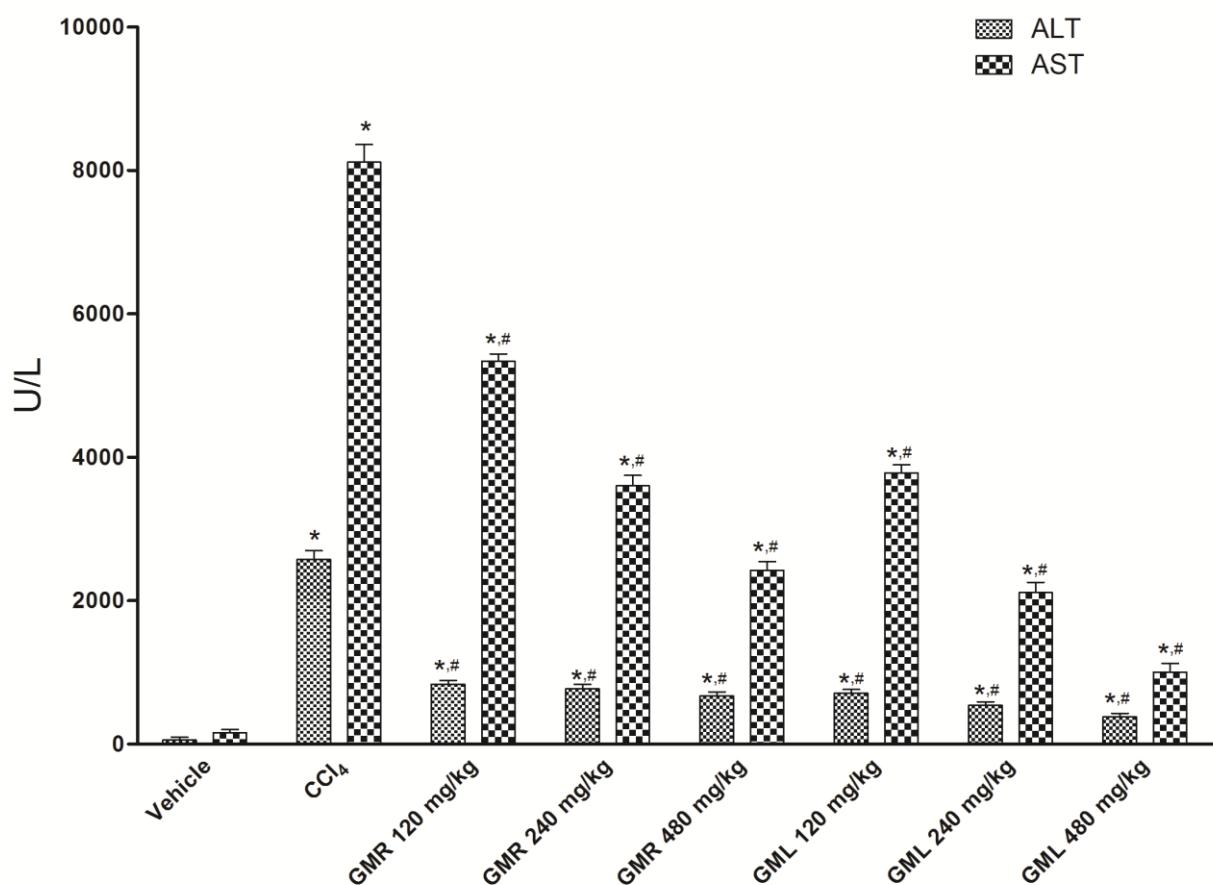
Potvrđena je zavisnost količine datog ekstrakta i stepena normalizacije nivoa bilirubina u grupi koja je tretirana ekstraktima *G. macrorrhizum*-a, što ukazuje na njihovu sposobnost da povrate narušenu sintetičku funkciju jetre (tabela 5.1.4). Rezultati navedenih biohemijskih analiza ukazuju na veliku sposobnost ekstrakta, kako lista tako i rizoma *G. macrorrhizum*-a, da smanje oštećenje jetre.

Dobijeni histološki rezultati su u slaganju sa rezultatima dobijenim merenjem aktivnosti enzima u serumu. Histološki preparati jetre dobijeni od kontrolne grupe (slika 5.1.7A) pod mikroskopom pokazuju normalnu morfologiju sa centralnom venom u centru režnjića (lobulusa). Ćelije jetre su radijalno poređane u formi lamela. Venski sinusi konvergiraju ka centralnoj venci. Davanje CCl₄ indukuje nekoliko morfoloških i histopatoloških deformacija jetre. Normalna arhitektura jetre se u celosti gubi i javljaju se centrilobularne nekroze sa sitnim vakuolama. Takođe se uočava infiltracija limfocitima u periportalnoj oblasti i oko centralne vene, kao i masna degenaracija hepatocita. Histopatološka ispitivanja pokazala su da postoji veliki broj oštećenja hepatocita koji postaju mnogo veće zapremine, a povremeno dolazi do njihovog slivanja u veće aggregate. Histološka građa jetre životinja tretirane sa CCl₄-om i ekstraktom rizoma ili lista *G. macrorrhizum*-a pokazuje znake regeneracije hepatocita, centralne vene i portalne trijade (Slika 5.1.7C i 5.1.7D). Tretman ekstraktima smanjuje fokalnu nekrozu, vakularnu degeneraciju, kao i infiltraciju limfocitima, što sve zajedno predstavlja efekte regeneracije. Ovi ekstrakti smanjuju dalju degeneraciju, dok sa druge strane pospešuju regeneraciju hepatocita, što se zajedno pozitivno odražava na funkcije ovih ćelija.

Trihlorometil radikal (CCl₃[·]), koji se generiše u prisustvu CCl₄, vezuje se za makromolekule u tkivu, indukuje peroksidnu degeneraciju membranskih lipida i narušava homeostazu jona Ca²⁺ što vodi do hepatocelularnih oštećenja i/ili iscrpljuje antioksidantnu odbranu. Zbog toga, antioksidantna aktivnost ili inhibicija formiranja slobodnih radikala mora biti važan faktor u odbrani od CCl₄ indukovane hepatotoksičnosti (Castro, 1974). Smanjenje nivoa navedenih enzima u serumu primenom ekstrakta zdravca, može značiti da ovi ekstrakti stabilizuju

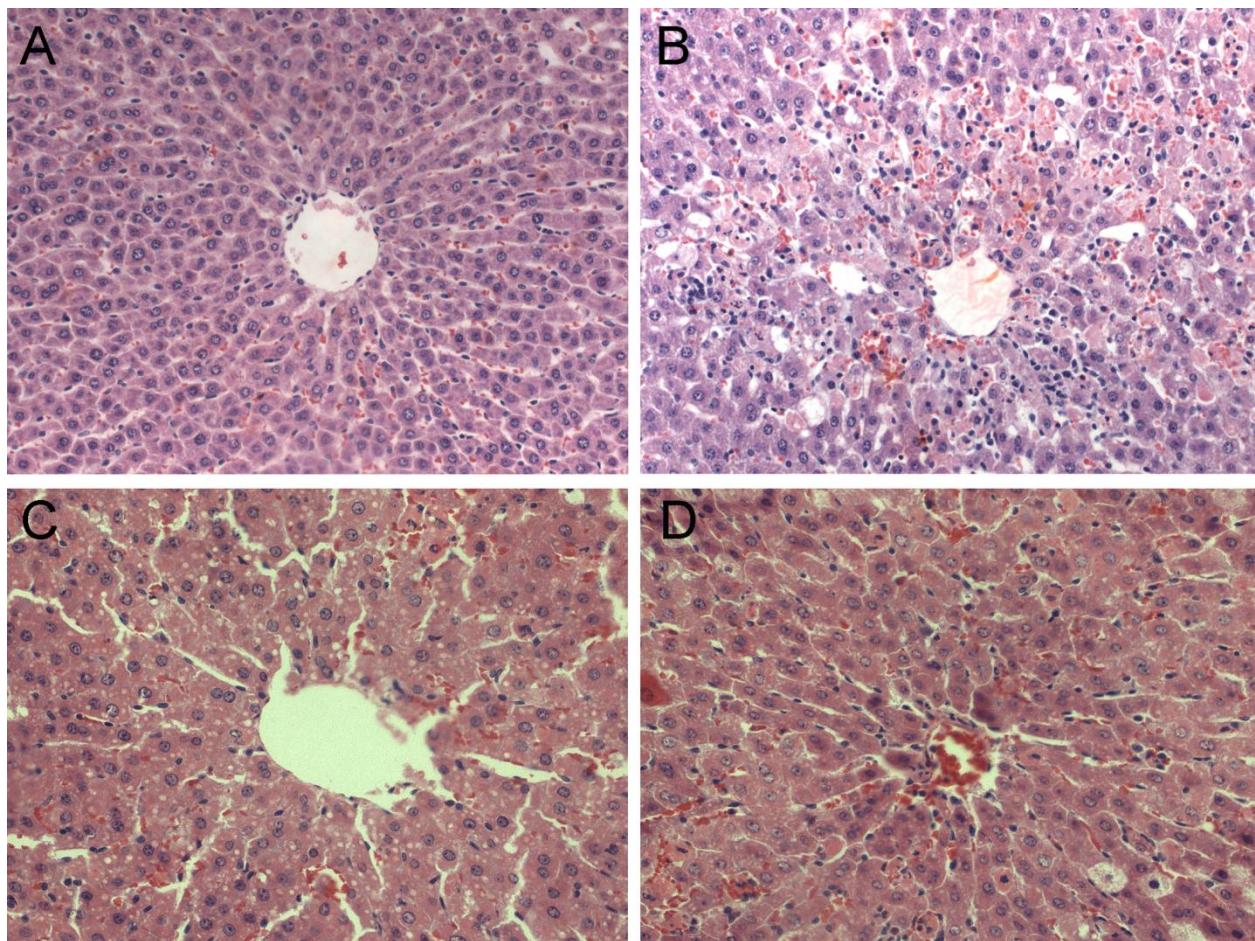
5. REZULTATI I DISKUSIJA

ćelijske membrane hepatocita i tako sprečavaju curenje sadržaja ćelije u ekstraćelijski prostor. Ovo je u slaganju sa opšteprihvaćenim mišljenjem da se nivo serumske transaminaze vraća na normalu sa oporavljanjem hepatocita (Thabrew, 1987). Efikasnost nekog hepatoprotektivnog leka zavisi od njegove sposobnosti kako da smanji štetni uticaj toksina tako i da vrati na normalu fiziološku funkciju hepatocita (Raghavendran, 2003). Ima sve više dokaza da je poželjno povećanje antioksidantnog potencijala ćelije kako bi se umanjio inflamatorni odgovor organizma kod mnogih bolesti, uključujući i CCl₄ indukovani hepatotoksičnost (Campو i sar., 2008). Hepatotoksini, kao CCl₄ ili endotoksini, veoma brzo indukuju proinflamatorne citokine (kao na primer TNF- α i IL-1 β od Kupffer-ovih ćelija) što za posledicu ima zapaljenjsku reakciju.



*Slika 5.1.6: Efekat ekstrakta rizoma (GMR) i lista (GML) na nivoje ALT i AST enzima u plazmi. *p<0.001 vs. kontrolna grupa; #p<0.001 vs. CCl₄.*

5. REZULTATI I DISKUSIJA



Slika 5.1.7: Efekat ekstrakta rizoma i lista *G. macrorrhizum*-a na histološke promene jetre kod CCl_4 tretiranih pacova (uvećanje 200 puta). A) Kontrolna grupa-normalna lobularna arhitektura i ćelijska struktura; B) CCl_4 tretirana grupa: hepatocelularno oštećenje sa portalnom inflamacijom, centrizonalna nekroza i hiperplazija Kupffer-ovih ćelija; C) Sekcija jetre pacova tretiranih sa CCl_4 i 480 mg/kg ekstrakta lista *G. macrorrhizum*-a: skoro normalna arhitektura jetre. Regeneracija hepatocita oko centralne vene; D) Sekcija jetre pacova tretiranih sa CCl_4 i 480 mg/kg ekstrakta rizoma *G. macrorrhizum*-a: minimalna inflamacija

5. REZULTATI I DISKUSIJA

5.1.3 Antimikrobnna aktivnost

Antimikrobnna aktivnost dva metanolna *G. macrorrhizum* ekstrakta (lista i rizoma) je određena prema sedam bakterijskih i dva gljivična soja. Rezultati dobijeni mikrodilucionom metodom (tabela 5.1.5) pokazuju veoma značajnu inhibitornu aktivnost ekstrakta, pri čemu MIC vrednosti iznose od 15.6 do 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (list) i od 15.6 do 5000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (rizom).

Uzorci za testiranje su pripremljeni rastvaranjem u 100% dimetil-sulfoksidu (DMSO). Napravljena je serija osnovnih rastvora razblaživanjem sa krajnjim koncentracijama u opsegu 2.00-5000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ za ekstrakt rizoma i 0.200-500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ za ekstrakt lista *G. macrorrhizum*-a.

Ekstrakt izolovan iz lista zdravca pokazuje inhibitornu aktivnost prema šest bakterijskih i jednom soju gljivica. Najrezistentniji bakterijski soj, čiji rast nije inhibirala ni jedna ispitivana koncentracija, je Gram negativna *Escherichia coli*. Ovo su, u neku ruku, i očekivani rezultati i posledica su prisustva spoljašnjeg sloja na ćelijskoj membrani. Takođe, ovaj soj je pokazao i najveću rezistentnost prema tetraciklinu koji je uzet kao pozitivna kontrola.

Svi testirani Gram negativni sojevi bakterija (osim *Salmonella enteritidis*) pokazali su određenu rezistentnost prema ekstraktima jer njihov rast inhibira samo najviša primenjena koncentracija - 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

*Tabela 5.1.5: Antimikrobnna aktivnost ekstrakta lista i rizoma biljne vrste *G. macrorrhizum* ($\mu\text{g}/\text{mL}$)*

Bakterija/Gljivica	ATCC broj	Ekstrakt lista		Ekstrakt rizoma		Pozitivna kontrola
		MIC	MBC	MIC	MBC	
<i>Staphylococcus aureus</i>	25923	15.6	62.5	620.5	1250	0.09 ^a
<i>G⁺</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	250	>500	150.6	2500	0.39 ^a
	<i>Listeria innocua</i>	500	>500	5000	5000	0.39 ^a
	<i>Proteus vulgaris</i>	500	>500	620.5	5000	0.19 ^a
<i>G⁻</i>	<i>Esherichia coli</i>	>500	>500	5000	>5000	1.56 ^a
	<i>Salmonella enteritidis</i>	125	>500	310.2	>5000	0.19 ^a
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	500	>500	620.5	>5000	0.39 ^a
<i>Gljivica</i>	<i>Candida albicans</i>	>500	>500	310.2	1250	0.78 ^b
	<i>Aspergillus niger</i>	500	>500	2500	>5000	6.25 ^b

^atetraciklin; ^bnistatin

Gram pozitivni sojevi bakterija pokazali su visoku osetljivost; rast soja *Staphylococcus aureus* je inhibiran koncentracijom od samo 15.60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ekstrakta lista (tabela 5.1.5). Iako ekstrakti pokazuju dobar inhibitorni, baktericidni efekat je uočen samo kod najviše primenjene koncentracije, osum u slučaju najosetljivijeg soja *S. Aureus*, sa minimalnom baktericidnom koncentracijom od 62.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

5. REZULTATI I DISKUSIJA

Antifungalna aktivnost ekstrakta lista *G. macrorrhizum* je uočena prema jednom ispitivanom soju, *Aspergillus niger* sa inhibitornom koncentracijom 500 µg/mL. Soj *Candida albicans* nije bio osetljiv prema ovom ekstraktu u testiranom opsegu koncentracija (tabela 5.1.5).

Ekstrakt rizoma zdravca, sa deset puta većom aktivnom koncentracijom (MIC), pokazuje nižu aktivnost od ekstrakta lista. U skladu sa rezultatima dobijenim sa ekstraktom lista, rezistentnijim su se pokazali Gram-negativni sojevi. Takođe, najosetljivi je bio soj Gram-pozitivne *B. subtilis*, dok je najrezistentniji soj bio opet *E. coli*. Ekstrakt rizoma pokazao je antifungalnu aktivnost prema oba testirana sojeva, pri čemu je soj *C. albicans* ovoga puta pokazao mnogo veću osetljivost u odnosu na soj *A. niger*.

Generalno govoreći, antimikrobnu aktivnost ekstrakta lista i rizoma zdravca je visoka, imajući na umu da su u mnogim slučajevima glavni nosioci antimikrobine aktivnosti biljaka njihova etarska ulja, dok ekstrakti pokazuju nižu aktivnost. Rezultati jedine prethodne studije koja je ispitivala antimikrobnu aktivnost sekundarnih metabolita ove biljne vrste (Radulović et al., 2010), pokazuju da etarsko ulje iz nadzemnih i podzemnih delova *G. macrorrhizum*-a pokazuje aktivnost u širokom opsegu od 0.4-10000 µg/mL. Pošto su i u pomenutoj studiji (Radulović et al., 2010) ispitivana četiri soja sa istim ATCC brojem (*S. aureus*, *E. coli*, *B. subtilis* i *C. albicans*), moguće je upoređivanje dobijenih rezultata. Ispitivani ekstrakt lista i etarsko ulje dobijeno iz nadzemnih delova imaju slične aktivne koncentracije, osim u slučaju soja *B. subtilis*. Ekstrakti pokazuju veću aktivnost prema *C. albicans* (ekstrakt rizoma u odnosu na etarsko ulje rizoma) i *S. aureus* (oba ekstrakta u odnosu na odgovarajuće ulje). Aktivnost etarskog ulja je nešto malo viša u slučaju *E. coli* i mnogo viša u slučaju *B. subtilis*, kao što je već napomenuto. Generalno govoreći, primećuje se veoma sličan opseg koncentracija ekstrakta u poređenju sa etarskim uljem izolovanim iz istog dela biljne vrste *G. macrorrhizum*.

Nakon svega, može se izvesti zaključak da upotreba zdravca u narodnoj medicini, kao leka koji se primenjuje u zaceljavanju rana ima opravdanja, jer sekundarni metaboliti iz etarskog ulja i ekstrakta pokazuju antimikrobnu aktivnost prema Gram-pozitivnim i Gram-negativnim bakterijama, kao i prema gljivicama.

5. REZULTATI I DISKUSIJA

5.1.4 HPLC fenolni profil

HPLC metodom su analizirani samo metanolni ekstrakti rizoma i lista zato što su oni pokazali najizraženije antioksidantno dejstvo. HPLC analiza je pokazala da se osim slobodne galne i kafene kiseline, u ovim ekstraktima nalaze i derivati galne i ferulne kiseline, kao i derivat kvercetina, verovatno glikozidi ili polimeri. Identifikacija čistih jedinjenja (galne i kafene kiseline) je izvršena poređenjem njihovih UV-VIS spektara i retencionih vremena sa standardima.

Da su prisutni derivati kvercetina, galne i ferulne kiselie zaključeno je upoređivanjem njihovih UV-VIS spektara sa standardima. Preklapanjem UV-VIS spektara čistog jedinjenja i odgovarajućeg nađenog derivata, uočava se velika sličnost koja je za slučaj derivata nađenih u ekstraktu lista data na slikama 5.1.8, 5.1.9 i 5.1.10. Poređenje spektara galne kiseline i njenih derivata nađenih u ekstraktu rizoma dato je na slici 5.1.11. Sa ovih slika vidi se velika sličnost spektara kao i preklapanje odgovarajućih maksimuma apsorpcije.

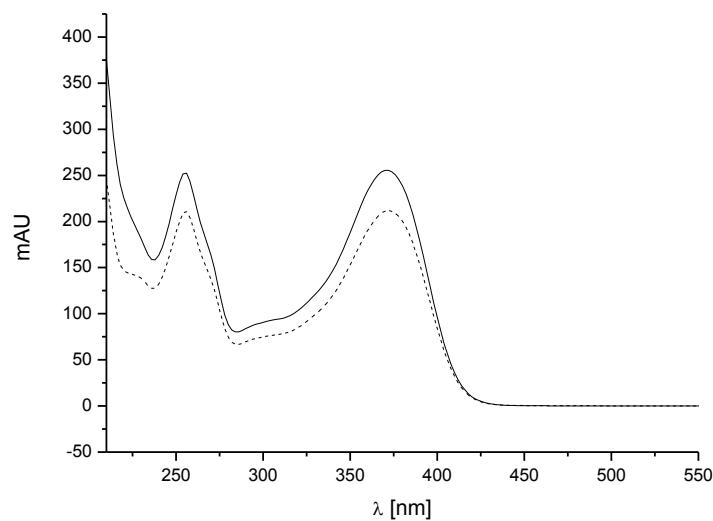
Kvantifikacija galne i kafene kiseline je izvršena na osnovu kalibracione prave standardnih rastvora ovih kiselina, dok je kvantifikacija derivata kvercetina, galne i ferulne kiseline izvršena na osnovu površine njihovih pikova i kalibracione prave, dobijene snimanjem serije standardnih rastvora odgovarajućih jedinjenja (jednačine kalibracionih pravih su date na strani 103). Količine nađenih jedinjenja u ekstraktima lista i rizoma *G. macrorrhizum*-a date su u tabeli 5.1.6.

*Tabela 5.1.6: Sadržaj fenolnih kiselina i njihovih derivata u metanolnim ekstraktima biljne vrste *G. macrorrhizum**

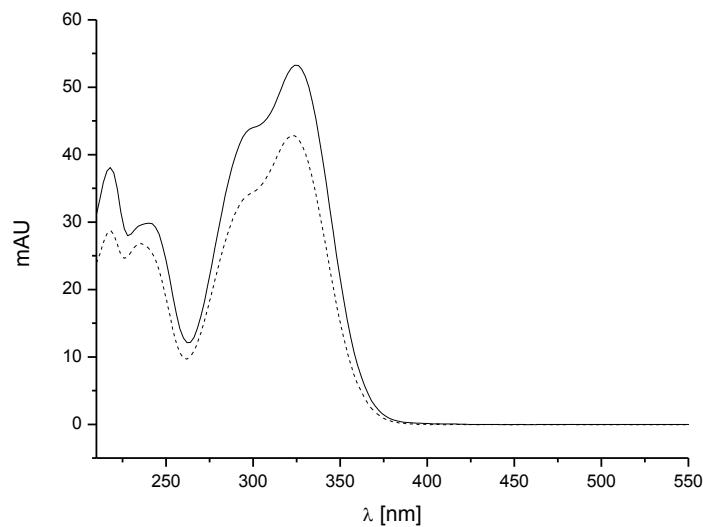
		Nađene komponente	Sadržaj (mg/g sbm)
List	1	Derivat galne kiseline	11.26 ± 0.10
	2	Kafena kiselina	0.88 ± 0.03
	3	Derivat elaginske kiseline	10.15 ± 0.10
	4	Derivat ferulne kiseline	0.87 ± 0.05
	5	Derivat kvercetina	4.82 ± 0.05
Rizom	1	Galna kiselina	2.92 ± 0.05
	2	Galna kiselina (derivat)	0.38 ± 0.03
	3	Galna kiselina (derivat)	5.28 ± 0.05
	4	Derivat elaginske kiseline	6.02 ± 0.05

Prisustvo galne kiseline i njenih derivata u rizomu i listu zdravca ne iznenađuje jer je rod *Geranium* poznat po visokom sadržaju hidrolizabilnih tanina (Genova i Ivancheva, 1995) u čiju građu ulazi galna kiselina (strana 18).

5. REZULTATI I DISKUSIJA

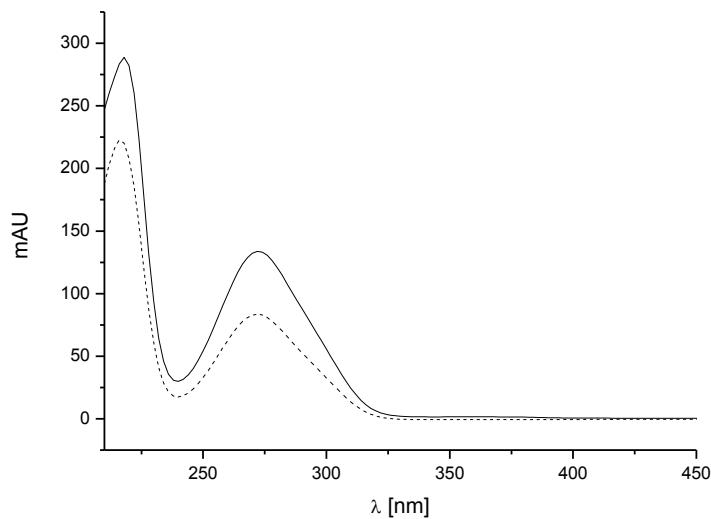


Slika 5.1.8: UV-VIS spektar kvercetina (puna linija) i nađenog derivata kvercetina u ekstraktu lista (isprekidana linija), $\lambda_{max1}=256$ nm, $\lambda_{max2}=372$ nm

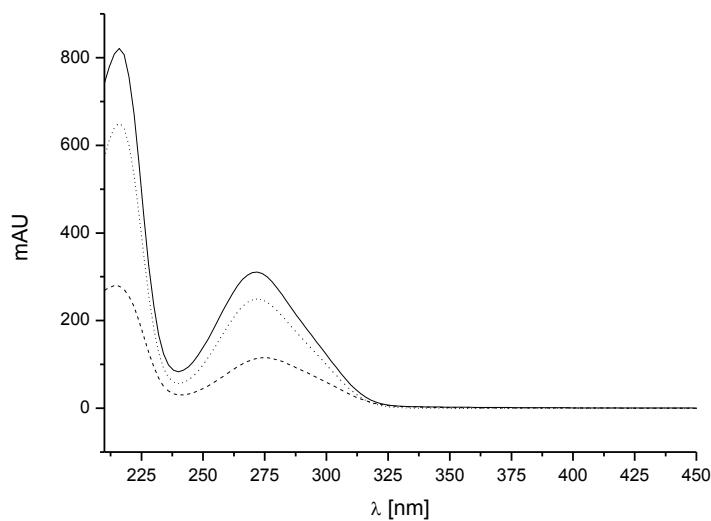


Slika 5.1.9: UV-VIS spektar ferulne kiseline (puna linija) i nađenog derivata ferulne kiseline u ekstraktu (isprekidana linija), $\lambda_{max1}=218$ nm, $\lambda_{max2}=322$ nm

5. REZULTATI I DISKUSIJA



Slika 5.1.10: UV-VIS spektar galne kiseline (puna linija) i nađenog derivata galne kiseline u ekstraktu lista (isprekidana linija), $\lambda_{max1}=216$ nm, $\lambda_{max2}=372$ nm



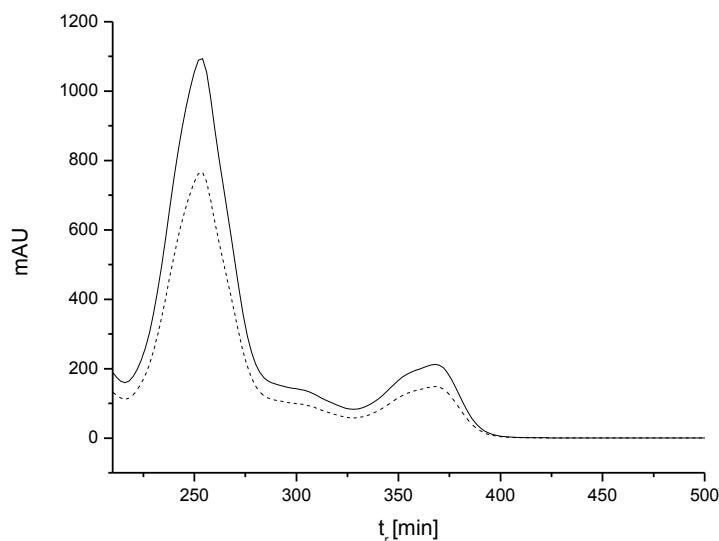
Slika 5.1.11: UV-VIS spektar galne kiseline (1-puna linija) i nađenih derivata galne kiseline u ekstraktu rizoma (2-tačkasta linija, 3-isprekidana linija), $\lambda_{max1}=216$ nm, $\lambda_{max2}=272$ nm

HPLC hromatogrami za ekstrakt lista *G. macrorrhizum*-a snimani su na 280 nm (slika 5.1.13:), 320 nm (slika 5.1.14:) i 360 nm (slika 5.1.15:). Takođe, na istim talasnim dužinama snimljeni su i HPLC spektri ekstrakta rizoma, 280 nm (slika 5.1.16:), 320 nm (slika 5.1.17:) i

5. REZULTATI I DISKUSIJA

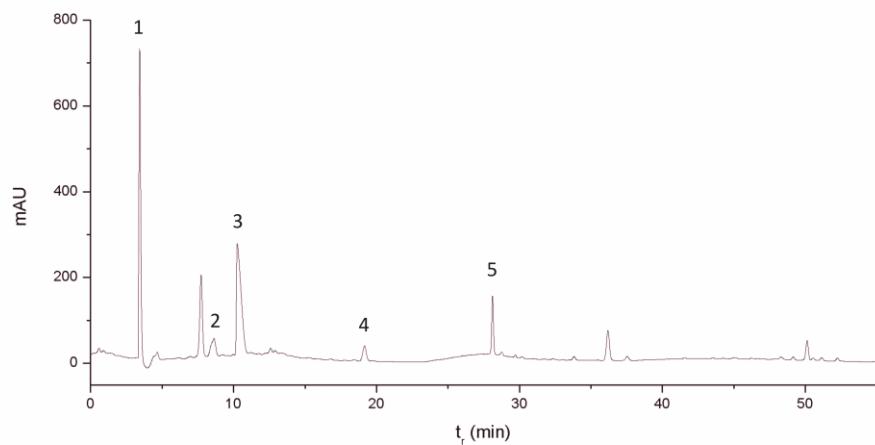
360 nm (slika 5.1.18:). Identifikovani pikovi su obeleženi brojevima (od 1 do 6 za ekstrakt lista, od 1 do 3 za ekstrakt rizoma) dok postoji jedan deo pikova koji nije identifikovan.

Spektar jedinjenja 3 iz ekstrakta lista identičan je spektru jedinjenja 4 iz ekstrakta rizoma (slika 5.1.12) sa maksimumima apsorpcije $\lambda_{\text{max}1}=254 \text{ nm}$ i $\lambda_{\text{max}2}=368 \text{ nm}$ ali pošto se eluiraju na različitim retencionim vremenima može se zaključiti da se radi o derivatima jednog istog jedinjenja, najverovatnije elaginske kiseline. Spektar elaginske kiseline ima karakteristične maksimume apsorpcije u UV oblasti na talasnim dužinama $\lambda_{\text{max}1}=254 \text{ nm}$ i $\lambda_{\text{max}2}=368 \text{ nm}$ a sam spektar je veoma sličan spektrima na slici 5.2.18 (spektar elaginske kiseline se može naći u studiji: Arapitsas, 2012). Miliauskas i saradnici (2004a) su u ekstraktu zdravca identifikovali galnu, 4-galoil hinsku i elaginsku kiselinsku, kao i flavonoid kvercetin i tri njegova glikozida. Na osnovu svega ovoga može se smatrati da pikovi (3-ekstrakt lista, 4-ekstrakt rizoma) zaista potiču od derivata elaginske kiseline. Nažalost, pošto nam nije bio dostupan standard elaginske kiseline nije bila moguća kvantifikacija ovih pikova.

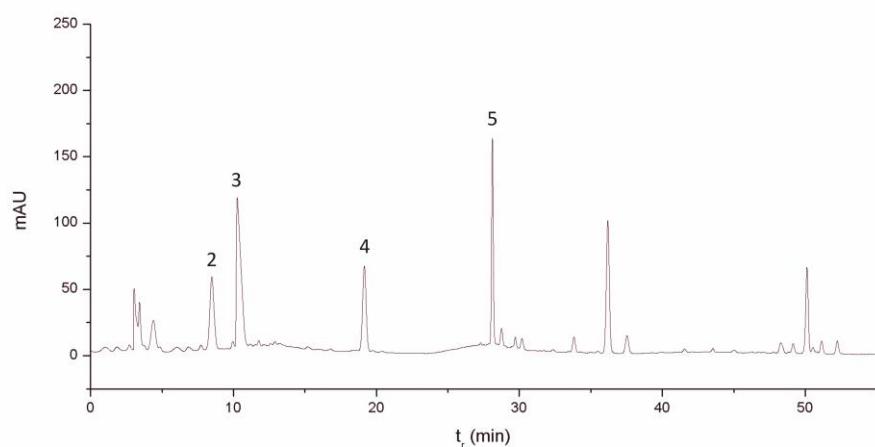


Slika 5.1.12: UV-VIS spektar derivata elaginske kiseline (nađenog u ekstraktu lista-isprekidana linija i rizoma-puna linija), $\lambda_{\text{max}1}=254 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{max}2}=368 \text{ nm}$

5. REZULTATI I DISKUSIJA

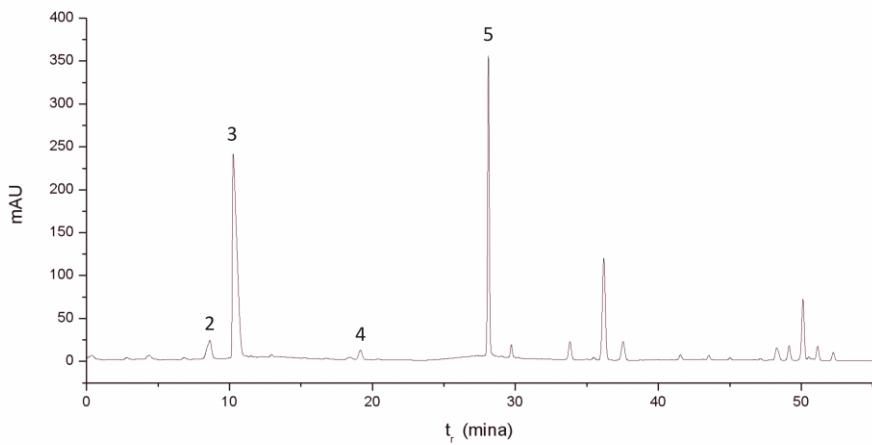


Slika 5.1.13: HPLC profil metanolnog ekstrakta lista *G. macrorrhizum*-a snimljen na 280 nm (1-derivat galne kiselina, 2-kafena kiselina, 3-derivat elaginske kiselina 4-derivat ferulne kiselina, 5-derivat kvercetina)

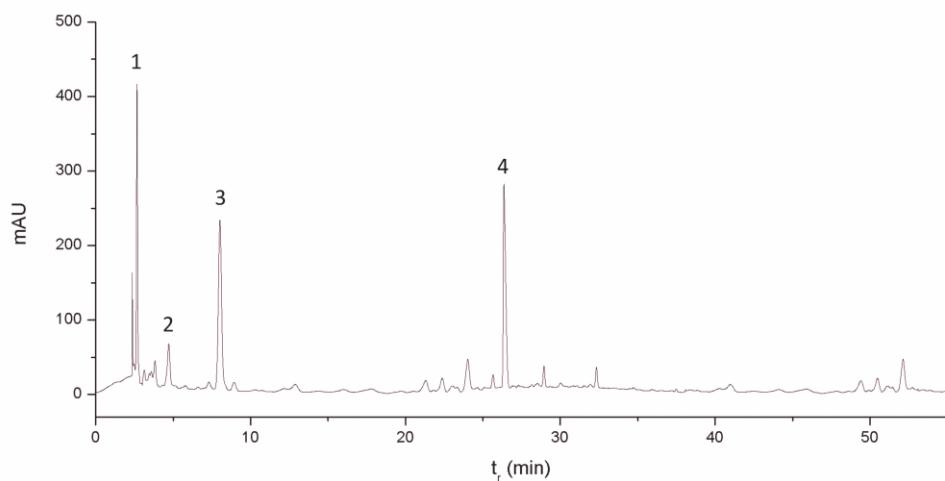


Slika 5.1.14: HPLC profil metanolnog ekstrakta lista *G. macrorrhizum*-a snimljen na 320 nm (2-kafena kiselina, 3-derivat elaginske kiselina 4-derivat ferulne kiselina, 5-derivat kvercetina)

5. REZULTATI I DISKUSIJA

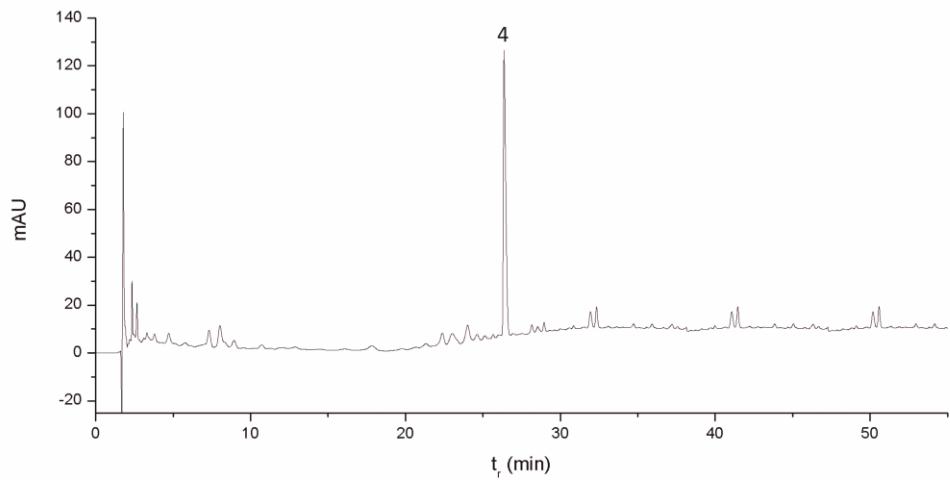


Slika 5.1.15: HPLC profil metanolnog ekstrakta lista *G. macrorrhizum*-a snimljen na 360 nm (2-kafena kiselina, 3-derivat elaginske kiseline 4-derivat ferulne kiseline, 5-derivat kvercetina)

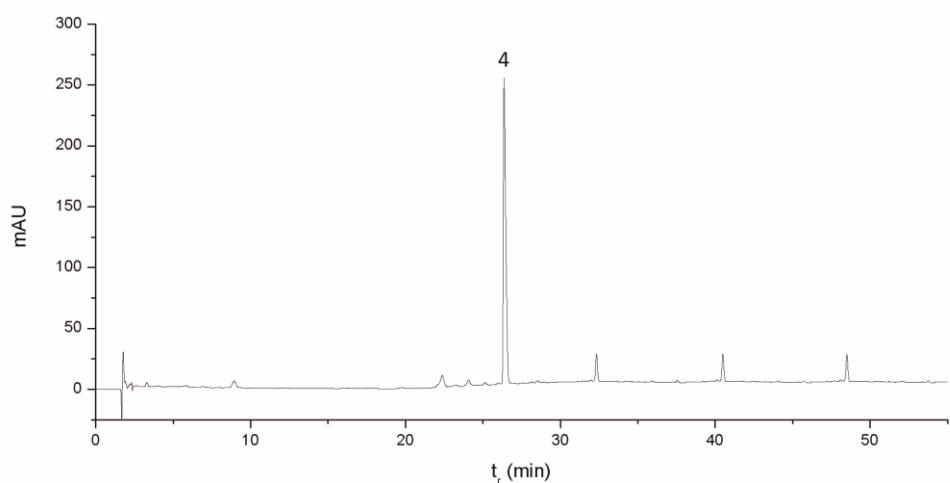


Slika 5.1.16: HPLC profil metanolnog ekstrakta rizoma *G. macrorrhizum*-a snimljen na 280 nm (1-galna kiselina, 2-derivat galne kiseline, 3-derivat galne kiseline, 4-derivat elaginske kiseline)

5. REZULTATI I DISKUSIJA



Slika 5.1.17: HPLC profil metanolnog ekstrakta rizoma *G. macrorrhizum*-a snimljen na 320 nm (4-derivat elaginske kiseline)



Slika 5.1.18: HPLC profil metanolnog ekstrakta rizoma *G. macrorrhizum*-a snimljen na 360 nm (4-derivat elaginske kiseline)

5.2 *Allium ursinum* L. (Amaryllidaceae)

Nadzemni delovi biljne vrste divlji luk (*Allium ursinum*) i uzorci odgovarajućeg zemljišta na kome je luk rastao sakupljeni su u maju 2012. sa pet različitih međusobno udaljenih lokacija u Jugoistočnoj Srbiji: Jalovik Izvor ($43^{\circ}23'16''$ N; $22^{\circ}24'2''$ E), Kamenički vis ($43^{\circ}24'38''$ N; $21^{\circ}57'1''$ E), Jastrebac ($43^{\circ}23'42''$ N; $21^{\circ}30'57''$ E), Bojanine vode ($43^{\circ}13'3''$ N; $22^{\circ}7'7''$ E) i Seličevica ($43^{\circ}14'20''$ N; $21^{\circ}58'20''$ E).

5.2.1 Mineralni sastav

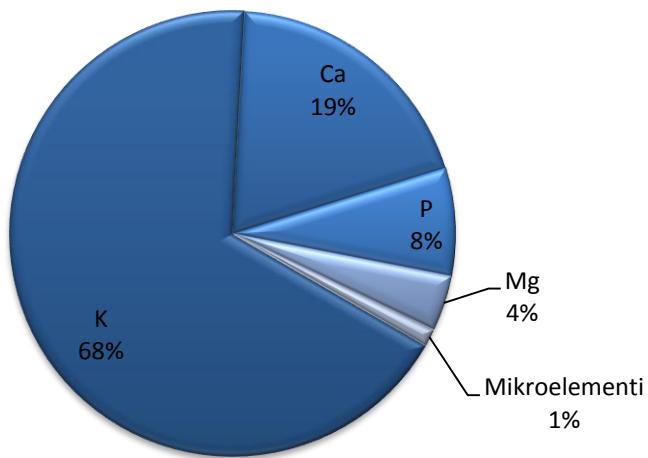
Da bi se odredio sadržaj vode, uzorak biljnog materijala je sušen u sušnici na 105°C do konstantne mase i nakon toga je meren. Dobijene vrednosti su prikazane u tabeli 5.2.1. Mineralni sastav uzorka divljeg luka određen je ICP-OES metodom. Dobijen je sadržaj elemenata: Al, As, B, Ba, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, K, Mn, Mo, Na, Ni, P, Pb, Se, Sr, V i Zn za uzorce sa svake lokacije pojedinačno. Svaki dobijeni rezultat predstavlja srednju vrednost dobijenu iz tri zasebna i nezavisna merenja i predstavljen je u tabeli 5.2.1 kao srednja vrednost \pm standardna devijacija. Srednje vrednosti i standardne devijacije su zaokruživane vodeći računa o pouzdanim ciframa.

Fosfor, kalijum, kalcijum i magnezijum (takođe, sumpor i azot) su mineralni nutrijenti koje većina biljaka zahteva u velikim količinama i zbog toga se nazivaju **makronutrijentima** (Wiedenhoeft, 2006). Zato, ne iznenađuje činjenica da su upravo oni nađeni u najvećim koncentracijama u ispitivanim uzorcima: kalijum - 37981 ppm, kalcijum - 10892 ppm, magnezijum 2275 ppm i fosfor - 4382 ppm (srednje vrednosti, tabela 5.2.1).

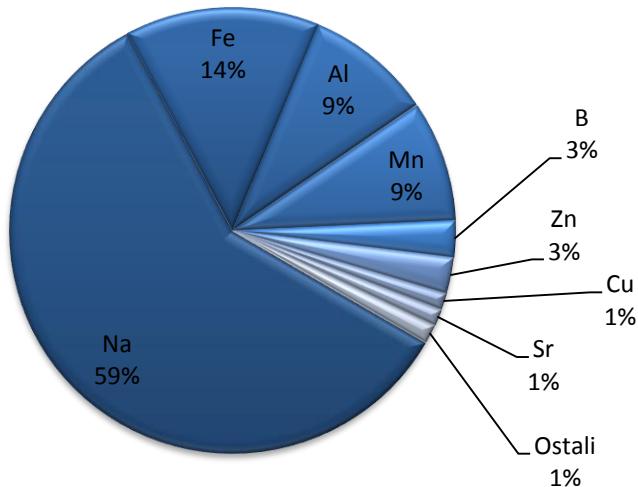
Mikronutrijenti su esencijalni elementi koje biljke zahtevaju u relativno malim količinama (u odnosu na makronutrijente) i tu spadaju: gvožđe, natrijum, hlor, mangan, cink, bakar i molibden (Wiedenhoeft, 2006). Nađene količine mikronutrijenata (bez hlora) u ovoj studiji izražene u obliku srednjih vrednosti su: natrijum – 410, gvožđe – 98, mangan – 19, bor – 19, cink – 18, bakar – 8.5 i molibden – 0.2 (izražene u ppm, računato na suvu biljku, tabela 5.2.1). Neki autori (Barker i Pilbeam, 2007) smatraju i nikal mikronutrijentom i njegova koncentracija nađena u *A. ursinum*-u iznosi 2.4 ppm. Isti autori tvrde da su aluminijum, kobalt, selen i vanadijum korisni elementi koji pospešuju biljni rast, i njihove srednje vrednosti nađene u ovoj biljci su 64 (Al), 0.073 (Co), 0.046 (Se) i 0.137 ppm (V).

Ako se mineralni sastav izrazi u procentima prisutnih elemenata zapaža se da kalijuma ima 68%, kalcijuma - 19%, fosfora - 8%, magnezijuma - 4%, dok svih mikroelemenata ima ukupno oko 1% (slika 5.1.2). Procenat zastupljenosti pojedinačnih mikroelemenata (računat na ukupnu masu svih mikroelemenata) dat je na slici 5.2.2.

5. REZULTATI I DISKUSIJA



Slika 5.2.1: Najzastupljeniji elementi u *A. ursinum*-u



Slika 5.2.2: Mikroelementi u *A. ursinum*-u

5. REZULTATI I DISKUSIJA

Tabela 5.2.1: Sadržaj vode i mineralni sastav uzorka divljeg luka sa više lokacija. Rezultati su dati kao srednja vrednost tri merenja ± standardna devijacija i izraženi su u mikrogramima po gramu suvog biljnog materijala ($\mu\text{g/g}$)

	I (Seličevica)	II (Bojanine vode)	III (Jalovik Izvor)	IV (Kamenički vis)	V (Jastrebac)	Srednja vrednost
Sadržaj vlage (%)	92.1 ± 0.2	91.3 ± 0.2	92.0 ± 0.2	92.1 ± 0.2	91.3 ± 0.2	91.8
Al	66 ± 1a	70 ± 1b	80 ± 1c	67 ± 1a	38 ± 1d	64.13
As	0.051 ± 0.001a	0.030 ± 0.001b	0.054 ± 0.001a	0.089 ± 0.001c	0.101 ± 0.002d	0.065
B	19.6 ± 0.5a	10.7 ± 0.3b	20.4 ± 0.4a	24.3 ± 0.4c	17.5 ± 0.4d	18.49
Ba	0.19 ± 0.01a	2.14 ± 0.02b	4.1 ± 0.1c	7.8 ± 0.2d	5.9 ± 0.1e	4.029
Ca	10200 ± 200a	10600 ± 200a	9900 ± 100b	12500 ± 200c	11200 ± 200d	10892
Cd	0.027 ± 0.001a	0.014 ± 0.001b	0.016 ± 0.001b	0.059 ± 0.001c	0.079 ± 0.001d	0.039
Co	0.161 ± 0.003a	0.144 ± 0.002b	0.085 ± 0.003c	0.045 ± 0.001d	0.013 ± 0.001e	0.091
Cr	0.46 ± 0.01a	0.37 ± 0.01b	0.32 ± 0.01c	0.41 ± 0.01d	0.31 ± 0.01c	0.373
Cu	10.1 ± 0.2a	5.1 ± 0.2b	8.2 ± 0.2c	9.9 ± 0.1a	9.2 ± 0.2d	8.49
Fe	92 ± 2a	100 ± 2b	100 ± 2b	112 ± 2c	87 ± 1d	97.89
Hg ¹	<0.0165	<0.0165	<0.0165	<0.0165	<0.0165	<0.0165
K	32100 ± 700a	30700 ± 600a	46200 ± 700b	42300 ± 700c	38500 ± 700d	37981
Mg	2110 ± 20a	3020 ± 50b	2240 ± 30c	1800 ± 40d	2200 ± 20ac	2275
Mn	91 ± 2a	35 ± 1b	59 ± 1c	73 ± 1d	47 ± 1e	61.12
Mo	0.110 ± 0.002a	0.325 ± 0.003b	0.122 ± 0.001c	0.216 ± 0.001d	0.219 ± 0.002d	0.198
Na	201 ± 5a	353 ± 6b	626 ± 6c	492 ± 6d	380 ± 5e	410.6
Ni	2.57 ± 0.05a	1.21 ± 0.03b	1.58 ± 0.01c	2.44 ± 0.02d	4.02 ± 0.03e	2.364
P	3180 ± 70a	3980 ± 60b	3990 ± 40b	5500 ± 100c	5290 ± 80d	4382
Pb	2.35 ± 0.07ac	2.67 ± 0.06b	2.21 ± 0.05a	2.48 ± 0.07c	2.01 ± 0.05d	2.34
Se	0.035 ± 0.001a	0.023 ± 0.001b	0.068 ± 0.001c	0.044 ± 0.001d	0.060 ± 0.001e	0.046
Sr	15.2 ± 0.3a	2.2 ± 0.2b	8.2 ± 0.1c	12.4 ± 0.2d	4.2 ± 0.1e	8.42
V	0.147 ± 0.002a	0.179 ± 0.003b	0.140 ± 0.002c	0.130 ± 0.001d	0.087 ± 0.001e	0.137
Zn	15.1 ± 0.4a	13.3 ± 0.3b	10.5 ± 0.3c	33.6 ± 0.3d	18.7 ± 0.7e	18.25

¹manje od granice detekcije metode; vrednosti sa različitim slovima u istom redu su statistički značajno različite za $p < 0.05$ kada se koristi ANOVA Tukey *post hoc* test.

Neke elemente svrstavamo u neesencijalne i toksične sa štetnim uticajem na ekosistem i ljudsko zdravlje (As, Cd, Pb, Hg). Njihovo prisustvo u biljnem tkivu može značiti zagađenje zemljišta. Srednje vrednosti nađenih koncentracija ovih elemenata u divljem luku su 0.065 (As), 0.039 ppm (Cd) i 2.34 ppm (Pb) dok je koncentracija žive ispod odgovarajućeg limita kvantifikacije (ispod 0.0165 ppm). Maksimalna dozvoljena koncentracija ovih kontaminanata u svežem povrću po preporuci Svetske zdravstvene organizacije (WHO) i Evropske unije mora biti 0.3, 0.2, 0.3 i 0.02 μg po gramu sveže biljke (ppm) za As, Cd, Pb i Hg (Mirić i

5. REZULTATI I DISKUSIJA

Šobajic, 2002; COMM. REG. 2006). Koncentracije ova četiri toksična elementa su ispod propisane gornje granice u svim analiziranim uzorcima divljeg luka.

Tabela 5.2.2: Mineralni sastav različitih *Allium* vrsta, izražen u ppm (μg po g suve biljne materije)

	Divlji luk ¹ (<i>A. ursinum</i> L.)	Beli luk ² (<i>A. sativum</i> L.)	Crni luk ³ (<i>A. cepa</i> L.)	Praziluk ⁴ (<i>A. ampeloprasum</i> L.)
Al	64.13	25.15	31.37	2.9
As	0.065	-	-	0.014
B	18.49	17.63	136.53	12
Ba	4.029	21.68	3.56	7
Ca	10892	363.61	340.03	-
Cd	0.039	0.08	-	0.4
Co	0.073	0.28	0.31	0.04
Cr	0.373	18.35	4.78	0.2
Cu	8.492	9.12	3.04	8
Fe	97.89	52.91	22.27	27
K	37981	21378.8	16357.6	-
Mg	2275	1056.15	964.77	-
Mn	61.12	12.41	-	34
Mo	0.198	-	-	1.2
Na	410.6	532.78	1895.43	-
Ni	2.364	1.41	0.82	0.8
P	4382	6009.37	3149.15	-
Pb		0.153	-	-
Se	0.046	0.25 ⁵	-	0.02
Sr	8.42	4.85	9.55	49
V	0.137	-	0.07	0.02
Zn	18.25	27.42	12.78	14

¹Srednje vrednosti dobijene u istraživanju; ²Haciseferoğulları i sar., 2005; ³Arslan i Özcan, 2010 – uzorci sušeni u sušnici na 70°C; ⁴Prilagođeno iz Ward i Savage, 1994 (preračunato na suvu masu, sadržaj vode u praziluku 91%); ⁵ Morris i Levander, 1970;

Pošto ne postoje druge studije koje se bave mineralnim sastavom divljeg luka, dobijeni rezultati su poređeni sa mineralnim sastavom drugih, često korišćenih, *Allium* vrsta: belim lukom (*A. sativum*), crnim lukom (*A. cepa*) i prazilukom (*A. ampeloprasum*). U tabeli 5.2.2 dato je poređenje mineralnih sastava. Koncentracije makronutrijenata (sem fosfora) su više u divljem luku nego u drugim *Allium* biljnim vrstama uzetim za poređenje. Sadržaji fosfora, cinka, nikla i aluminijuma su istog reda veličine i među ovim vrstama nema velike razlike. Morris i Levander (1970) su odredili sadržaj selena u belom i crnom luku i on je iznosio 0.25 i 0.015 ppm. Sadržaj selena u divljem luku određen u ovoj studiji iznosi 0.046 ppm, što je značajno manje nego u belom luku. Takođe, sadržaj kobalta i hroma je niži u divljem luku. Gvođe i mangan su dva bitna elementa, esencijalna za ljude i životinje, i njihov sadržaj nađen u divljem luku je viši od sadržaja u poređenim vrstama. Mangan je neophodan za rast,

5. REZULTATI I DISKUSIJA

oksidativnu fosforilaciju, ulazi u sastav mnogih enzima i učestvuje u metabolizmu holesterola (Bishop i sar., 2005). Visoka koncentracija mangana nađena u nadzemnim delovima *A. ursinum*-a i njegova uloga u metabolizmu holesterola može objasniti činjenicu da konzumacija divljeg luka može značajno sniziti ukupni holesterol u krvi i povećeti nivo HDL (Preuss i sar., 2001). Uopšteno govoreći, mineralni sadržaj divljeg luka sličan je mineralnom sadržaju belog i crnog luka, sa malim razlikama (tabela 5.2.2).

5.2.2 Mineralni sastav zemljišta

Metali u zemljištu mogu biti vezani kako za organske komponente, tako i za neorganske i pre izvođenja analize potrebno ih je oslobođiti i prevesti u rastvoran oblik. Postoje mnoge metode za pripremu uzorka zemljišta za ICP-OES analizu. Kisela digestija sa dodatkom vodonik-peroksida uspešno prevodi metale iz nerastvornog u rastvorni oblik koji je pogodan za analizu navedenom metodom (EPA 3050B). Ovakav tretman kao rezultat daje sadržaj pseudototalnih katjona pri čemu se izbegava upotreba veoma toksične fluorovodonične kiseline koja je inače potrebna za razaranje silikata. Razlika u sadržaju pseudototalnih katjona i totalnih katjona najčešće nije toliko bitna za analizu životne sredine zato što metali koji su vezani u obliku silikata nisu dostupni biljkama pri normalnim uslovima.

Rezultati analize pseudototalnog sadržaja metala u uzorcima zemljišta sa pet različitih lokacija su predstavljeni u tabeli 5.2.3. Svaki dobijeni rezultat predstavlja srednju vrednost dobijenu iz tri zasebna merenja i predstavljen kao srednja vrednost \pm standardna devijacija. U najvećoj koncentraciji su nađeni elementi: kalijum, kalcijum, aluminijum, magnezijum, fosfor i mangan i oni se nalaze u miligramskim količinama (po gramu analizirane zemlje). Silicijum, kao element, se nalazi na drugom mestu po zastupljenosti u Zemljinoj kori, ali su njegova jedinjenja uglavnom u vodi nerastvorna (čak i nakon primenjene kisele digestije). Zbog toga, količina silicijuma nađena u uzorcima zemlje (oko 1 mg/g) je značajno niža od očekivane vrednosti za tipična zemljišta (oko 5-10%, Radojević i Bashkin, 1999).

Ostali analizirani elementi (B, Ba, Co, Cr, Cu, Mo, Ni, Zn, V i Sr) su prisutni u mikrogramskim količinama (po gramu analiziranog zemljišta). Kada se porede koncentracije individualnih elemenata između različitih lokacija, uočava se da su date koncentracije istih redova veličine, sem u slučaju stroncijuma, koji je u uzorku zemljišta sa lokacije Kamenički vis nađen u značajno većoj količini. Dobijeni rezultati pseudototalnog sadržaja metala u analiziranom zemljištu su upoređeni sa hemijskim sastavom tipičnog zemljišta datog od strane autora Radojević i Bashkin (1999) i Aloway (1995) (Tabela 5.2.4) i oni su u međusobnom skladu.

5. REZULTATI I DISKUSIJA

Tabela 5.2.3: Pseudototalni mineralni sastav zemljišta sa pet lokacija, izražen u ppm (μg po g suve zemlje)

	I (Seličevica)	II (Bojanine vode)	III (Jalovik Izvor)	IV (Kamenički vis)	V (Jastrebac)
Al	17800 ± 200a	32100 ± 200b	26200 ± 200c	33900 ± 200d	28200 ± 200e
As	3.13 ± 0.05a	9.41 ± 0.06b	4.50 ± 0.05c	8.37 ± 0.06d	5.24 ± 0.06e
B	47.4 ± 0.3a	54.9 ± 0.5b	50.0 ± 0.4c	112.1 ± 0.9d	61.9 ± 0.6e
Ba	354 ± 2a	175 ± 2b	135 ± 2c	199 ± 2d	155 ± 2e
Ca	65200 ± 200a	71300 ± 200b	62200 ± 200c	88500 ± 200d	75300 ± 200e
Cd	1.45 ± 0.03a	2.54 ± 0.03b	1.30 ± 0.01c	2.17 ± 0.02d	1.78 ± 0.03e
Co	26.6 ± 0.3a	24.9 ± 0.2b	24.7 ± 0.2b	22.0 ± 0.2c	21.2 ± 0.2d
Cr	25.2 ± 0.2a	53.1 ± 0.3b	35.5 ± 0.3c	42.7 ± 0.3d	39.8 ± 0.3e
Cu	39.6 ± 0.3a	41.5 ± 0.3b	39.6 ± 0.3a	64.9 ± 0.4c	45.2 ± 0.3d
Fe	20300 ± 200a	28600 ± 200b	25700 ± 200c	28500 ± 200d	23600 ± 200e
Hg ¹	<0.165	<0.165	<0.165	<0.165	<0.165
K	85300 ± 200a	97200 ± 300b	78500 ± 300c	98600 ± 300d	95300 ± 300e
Mg	6480 ± 30a	9330 ± 40b	4680 ± 30c	5930 ± 30d	7280 ± 30e
Mn	2390 ± 30a	1370 ± 20b	1170 ± 20c	1270 ± 20d	1550 ± 20e
Mo	0.48 ± 0.02a	1.06 ± 0.05b	0.63 ± 0.02c	2.77 ± 0.05d	0.87 ± 0.02e
Na	2090 ± 20a	1900 ± 20bc	1870 ± 20b	2040 ± 20a	1950 ± 20c
Ni	34.6 ± 0.2a	60.0 ± 0.2b	43.1 ± 0.2c	42.7 ± 0.2c	45.2 ± 0.2d
P	2400 ± 20a	1840 ± 20b	645 ± 8c	2840 ± 30d	1950 ± 20e
Pb	44.8 ± 0.8a	26.0 ± 0.6b	16.5 ± 0.4c	31.6 ± 0.4d	20.6 ± 0.6e
Se	1.17 ± 0.02a	0.50 ± 0.01b	0.84 ± 0.01c	0.88 ± 0.01d	0.78 ± 0.01e
Si	860 ± 90ac	670 ± 70a	860 ± 90ac	1100 ± 100b	960 ± 80bc
Sr	21.7 ± 0.03a	16.2 ± 0.2b	22.7 ± 0.03c	100.40 ± 0.05d	20.69 ± 0.02e
V	33.65 ± 0.03a	76.25 ± 0.06b	51.60 ± 0.04c	78.90 ± 0.06d	60.58 ± 0.05e
Zn	125 ± 2a	113 ± 2b	91 ± 1c	142 ± 2d	110 ± 2b

¹manje od granice detekcije metode; vrednosti sa različitim slovima u istom redu su statistički značajno različite za $p<0.05$ kada se koristi ANOVA Tukey *post hoc* test.

Koncentracije toksičnih elemenata, arsena, kadmijuma i žive su u opsegu 3.1-9.4, 1.3-2.5 i 16.51-44.85 ppm (po redu javljanja), dok je koncentracija žive ispod odgovarajućeg limita detekcije (manje od 0.050 ppm). Američka agencija za zaštitu životne sredine (The Environmental Protection Agency - EPA) i mnoge agencije za javno zdravlje propisuju takozvanu "sigurnu koncentraciju" pojedinih elemenata u zemljištu, najčešće baziranu na njihovim sopstvenim istraživanjima. Međutim, vrednosti "sigurnih koncentracija" koje daju ove organizacije se često međusobno razlikuju i po nekoliko redova veličina naročito za zemljišta namenjena uzgoju hrane. Dozvoljen nivo arsena, kadmijuma, olova i žive za poljoprivredna zemljišta koje propisuje Američka agencija za zaštitu životne sredine (EPA Clean Water Act, Title 40, Section 503.13) iznose 41, 39, 300 i 17 ppm (po redu javljanja). Sva analizirana zemljišta sadržala su manje vrednosti polutanata od propisanih. Takođe, poređenja sa nekim nezagadenim poljoprivrednim zemljištima u Evropi i Severnoj Americi

5. REZULTATI I DISKUSIJA

(Tabela 5.2.4) pokazala su da su koncentracije ovih zagađivača značajno niže u analiziranom zemljištu.

Table 5.2.4: Normalni opseg različitih elemenata u zemljištu i biljkama, izražen u ppm ($\mu\text{g po g suve materije}$)

ppm	Tipično zemljište ¹	Normalni nivo u zemljištu ²	Normalni nivo u biljkama ²	Nezagađeno poljoprivredno zemljište ³
As	1-20	0.1-40	0.02-7	5-12
Al	5000-50000	-	-	-
Cd	<0.01-8	0.01-2.0	0.1-2.4	0.27
Co	-	0.5-65	0.02-1	-
Cr	0.9-1500	5-1500	0.03-14	-
Cu	<1-390	2-250	5-20	-
Hg	<0.01-5	0.01-0.5	0.005-0.17	0.06-0.2
Mn	<1-18300	20-10000	20-1000	-
Mo	0.1-28	0.1-40	0.03-5	-
Ni	0.1-1520	2-750	0.02-5	-
Pb	<1-890	2-300	0.2-20	0.1-5
Se	-	0.1-5	0.001-2	-
Si	50000-100000	-	-	-
Sn	-	1-200	0.2-6.8	-
V	0.8-1000	3-500	0.001-1.5	-
Zn	1.5-2000	1-900	1-400	-

¹Radojević i Bashkin, 1999 ; ²Adaptirano iz Alovay, 1995; ³Wiersma, 1986; Holmgren et al., 1993

Nađeni rezultati ne iznenađuju zato što divlji luk raste najčešće u bukovim šumama, na većoj nadmorskoj visini, obično daleko od gradskih naselja i industrijskih centara, a samim tim i od najčešćih izvora zagađenja.

Korelacija između sadržaja metala u biljci i sadražaja metala u odgovarajućem zemljištu je izračunata i data u tabeli 5.2.5. Korelacioni koeficijenti se kreću od vrednosti 0.00 do 0.97. Značajna korelacija⁵ je nađena samo za kalcijum (0.97) i kobalt (0.96).

Biljke imaju osobinu da akumuliraju elemente bitne za njihov fiziološki razvoj i utvrđeno je (Moodley i sar., 2012) da ako je sadržaj ovih elemenata u biljci ispod određenih vrednosti biljka ih akumulira iz zemljišta, odnosno smanjuje njihov unos ukoliko ih sadrži previše. Bioakumulacioni faktor se koristi da se kvantitativno prikaže tendencija biljke za akumulacijom pojedinih elemenata iz zemljišta. Bioakumulacioni faktor predstavlja odnos koncentracije elementa u biljci i koncentracije istog elementa u zemljištu:

$$\text{Bioakumulacioni faktor} = \frac{[M]_{\text{biljka}}}{[M]_{\text{zemlja}}}$$

⁵ Značajna korelacija za 5 parova, za p=0.05, iznosi 0.878

5. REZULTATI I DISKUSIJA

Tabela 5.2.5: Bioakumulacioni faktori analiziranih elemenata i korelacioni koeficijenti sadržaja metala u biljnom tkivu i zemljištu

	Bioakumulacioni faktor					korelacioni	
Seličevica	Bojanine vode	Jalovik Izvor	Kamenički vis	Jastrebac	Srednja vrednost	koeficijent r^2	
Al	0.00366	0.00530	0.00684	0.00490	0.00489	0.00512	0.70
As	0.01629	0.00319	0.01200	0.01063	0.01928	0.01228	0.01
B	0.41236	0.19554	0.40796	0.21650	0.28301	0.30308	0.33
Ba	0.00053	0.01225	0.03007	0.03941	0.03816	0.02408	0.36
Ca	0.15672	0.14877	0.15951	0.14170	0.15502	0.15234	0.97
Cd	0.01862	0.00552	0.01231	0.02719	0.04494	0.02172	0.00
Co	0.00605	0.00579	0.00344	0.00203	0.00063	0.00362	0.96
Cr	0.01817	0.00691	0.00904	0.00952	0.00780	0.01029	0.16
Cu	0.25477	0.12320	0.20599	0.15241	0.20383	0.18804	0.14
Fe	0.00451	0.00348	0.00387	0.00392	0.00371	0.00390	0.59
Hg							
K	0.37729	0.31639	0.59269	0.43214	0.40558	0.42482	0.14
Mg	0.32547	0.32362	0.47979	0.30425	0.30556	0.34774	0.59
Mn	0.03824	0.02545	0.05068	0.05743	0.03043	0.04044	0.40
Mo	0.23158	0.3066	0.19365	0.07798	0.25172	0.21231	0.12
Na	0.09583	0.18628	0.33422	0.24141	0.19508	0.21057	0.36
Ni	0.07428	0.02017	0.03661	0.05710	0.08897	0.05542	0.19
P	1.32390	2.16422	6.25392	1.92945	2.71282	2.87686	0.09
Pb	0.05240	0.10277	0.13386	0.07836	0.09767	0.09301	0.19
Se	0.03004	0.04647	0.08095	0.05000	0.07692	0.05688	0.04
Sr	0.70092	0.13395	0.35991	0.12321	0.20300	0.30420	0.20
V	0.00437	0.00235	0.00271	0.00165	0.00144	0.00250	0.01
Zn	0.12070	0.11736	0.11492	0.23648	0.16987	0.15187	0.70

Kao što je ranije navedeno od strane Sipter i sar. (2009), bioakumulacioni faktori za teške metale, veoma su važne ulazne vrednosti za procenu rizika razmatrane ishrane po ljudsko zdravlje. Bioakumulacioni faktori za analizirane elemente, za različite uzorce zemljišta, dati su u tabeli 5.2.5. Dobijene vrednosti za teške metale iznose: 0.005 (As), 0.022 (Cd), 0.010 (Cr), 0.188 (Cu), 0.004 (Fe), 0.093 (Pb) i 0.152 (Zn). Dobijeni rezultati su u slaganju sa rezultatima datim od strane Sipter-a i saradnika (2009) koji su ispitivali bioakumulaciju nekih teških metala (As, Pb, Cu, Hg, Zn, Hg i Cd) u biljnim vrstama *Allium schoenoprasum* (kineski luk) i *Rumex acetosa* (kiseljak, livadsko zelje). Ove dve biljne vrste su uzete za poređenje zato što prva pripada rodu lukova (*Allium*) dok je druga samonikla, raste u prirodi i koristi se u ishrani baš kao i divlji luk.

5. REZULTATI I DISKUSIJA

5.2.3 Antioksidantna aktivnost

Etarska ulja divljeg luka koja su korišćena u analizama dobijena su hidrodestilacijom svežeg biljnog materijala. Jedan uzorak, sa područja planine Jastrebac, najpre je sušen u industrijskoj sušari (na 50 °C u toku 5 sati), a zatim hidrodestilovan. Komercijalno dostupan divlji luk koji se koristi kao začin nalazi se isključivo u suvom obliku pa je zbog toga i on uzet za analizu.

Pošto je etarsko ulje divljeg luka nerastvorno u vodenoj sredini, jedino je bilo moguće odrediti njegovu antioksidantnu aktivnost redukcijom DPPH[·] i ABTS^{·+} radikala. Dobijene vrednosti prikazane su u tabeli 5.2.6, a rezultati su izraženi kako u troloks ekvivalentima (TE), tako i u koncentraciji etarskog ulja potrebnog da se apsorbacija rastvora radikala smanji za polovinu (EC₅₀). Od svih analiziranih etarskih ulja najveću antioksidantnu aktivnost pokazalo je etarsko ulje dobijeno iz industrijski sušenog biljnog materijala sa područja planine Jastrebac, 5.04 ± 0.09 i 2.20 ± 0.08 mg/g TE (za ABTS i DPPH test). Etarska ulja dobijena iz sirovog materijala pokazuju nešto niže vrednosti TE. Najnižu antioksidantnu sposobnost pokazuje etarsko ulje dobijeno iz divljeg luka sa lokacije Bojanine vode (Tabela 5.2.6). Kada se izračuna prosečna vrednost za divlji luk dobijaju se vrednosti 4.21 i 1.86 mg/g TE (za ABTS i DPPH test).

Ako se uporede antioksidativne aktivnosti etarskih ulja divljeg luka i belog luka (*Allium sativum*) vidi se da etarsko ulje belog luka pokazuje znatno slabiju aktivnost i to nekoliko puta.

Antioksidantne aktivnosti etanolnih ekstrakta dobijene su merenjem njihove sposobnosti redukcije DPPH[·], ABTS^{·+} i DMPD^{·+} radikala kao i metodama CUPRAC i IRA. Dobijene vrednosti prikazane su u tabeli 5.2.7 (izražene po gramu suve biljne materije) i tabeli 5.2.8 (izražene po gramu sirove biljne materije).

DPPH, ABTS i IRA su veoma često upotrebljavane metode za *in vitro* određivanje antioksidantnog kapaciteta. Kada se antioksidant nađe u kompleksnom okruženju on reaguje u zavisnosti od svoje hemijske prirode što kao rezultat ima drugačije brojne vrednosti rezultata za svaku od navedenih metoda. Dobijene vrednosti često mogu da budu u slaboj korelaciji i zato je potrebno izvesti više ovih testova, da bi se sa sigurnošću mogla proceniti antioksidantna sposobnost ispitivane supstance odnosno ekstrakta (Bernaert i sar., 2012).

DPPH metoda je jednostavna za korišćenje ali poseduje i neke nedostatke. Mnogi antioksidanti, koji inače reaguju brzo sa peroksi radikalima, mogu vrlo sporo da reaguju sa DPPH[·] radikalom ili čak da budu inertni prema njemu (Huang i sar., 2005). Redukcija ABTS^{·+} može da bude pouzdaniji test, zbog manje stabilnosti ovog radikala i zbog sličnosti njegovog oksidacionog potencijala biološkim *in vivo* uslovima (Gu i sar., 2006). Dok se dve pomenute metode baziraju na merenju inhibicije reaktivnih vrsta (radikala) generisanih u samom rastvoru IRA metodom se direktno određuju antioksidanti u uzorku. To je velika prednost ove metode zbog toga što rezultati ne zavise od uspešnosti generisanja reaktivne vrste. Glavni hendikep IRA metode je taj što ne detektuje tirole, zato što je redoks potencijal tiola generalno niži od redoks potencijala Fe³⁺/Fe²⁺. Biljne vrste roda *Allium* sadrže dosta

5. REZULTATI I DISKUSIJA

sumpornih jedinjenja (Bernaert i sar., 2012) pa određivanje antioksidantne aktivnosti samo ovom metodom ne bi dalo pravu sliku reduktivnog potencijala ispitivanih ekstrakta. CUPRAC metoda je slična IRA metodi sa tom razlikom što se umesto redoks para $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ koristi $\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^+$. Kod DMPD metode, koja je slična metodama ABTS i DPPH, najpre se generiše crveni $\text{DMPD}^{\cdot+}$ katjon radikal, zatim se dodaje reduktor i na osnovu smanjenja intenziteta boja se zaključuje o antioksidantnom potencijalu ispitivanog reduktora.

*Tabela 5.2.6: Antioksidantna aktivnost etarskog ulja biljne vrste *A. ursinum**

	ABTS		DPPH	
	TE mg/g ¹	EC ₅₀ mg/ml ²	TE mg/g ¹	EC ₅₀ mg/ml ²
Jalovik Izvor	4.35 ± 0.07a	0.78 ± 0.01a	1.61 ± 0.02a	6.26 ± 0.06a
Jastrebac	4.21 ± 0.07a	0.80 ± 0.03a	2.21 ± 0.08b	4.57 ± 0.05b
Kamenički vis	4.19 ± 0.08a	0.81 ± 0.03a	1.53 ± 0.03a	6.62 ± 0.04a
Bojanine vode	3.65 ± 0.06b	0.93 ± 0.04b	1.88 ± 0.04c	5.36 ± 0.09c
Seličevica	4.86 ± 0.06c	0.70 ± 0.02c	2.12 ± 0.09bd	4.77 ± 0.09bd
Cvet	3.19 ± 0.09d	1.06 ± 0.03d	1.48 ± 0.03a	6.84 ± 0.05a
Jastrebac (suv)	5.04 ± 0.09c	0.67 ± 0.02c	2.20 ± 0.08d	4.60 ± 0.06d
Prosečno	4.21	0.82	1.86	5.58
<i>Allium sativum</i>	1.34 ± 0.08e	2.5 ± 0.1e	0.40 ± 0.08e	25.5 ± 0.9e

¹mg troloks ekvivalenta (TE) po g etarskog ulja; ²mg etarskog ulja po ml etanola; vrednosti sa različitim slovima u istoj koloni su statistički značajno različite za p<0.05 kada se koristi ANOVA Tukey *post hoc* test.

*Tabela 5.2.7: Antioksidantna aktivnost etanolnih ekstrakta biljne vrste *A. ursinum* izraženih u mg odgovarajućeg ekvivalenta po gramu suve biljne materije*

	DPPH TE ¹	ABTS TE ¹	CUPRAC TE ¹	IRA GAE ²	DMPD TE ¹
Jalovik Izvor	1.38 ± 0.05a	3.14 ± 0.08a	12.8 ± 0.1a	2.54 ± 0.08a	21.7 ± 0.1a
Jastrebac	1.11 ± 0.08b	2.89 ± 0.05a	11.7 ± 0.4b	2.56 ± 0.08a	20.0 ± 0.1b
Kamenički vis	1.34 ± 0.07a	1.73 ± 0.06b	11.9 ± 0.3b	2.43 ± 0.05a	15.4 ± 0.1c
Bojanine vode	1.23 ± 0.09ab	2.03 ± 0.02bc	12.8 ± 0.4a	2.81 ± 0.06b	14.6 ± 0.1d
Seličevica	1.66 ± 0.09c	2.13 ± 0.08c	15.1 ± 0.1c	2.88 ± 0.08b	9.0 ± 0.1e
Sušen industrijski	1.71 ± 0.06d	5.50 ± 0.20d	15.6 ± 0.5c	5.78 ± 0.09c	13.5 ± 0.1f
Sušen na vazduhu	1.22 ± 0.02ab	5.40 ± 0.20d	17.7 ± 0.1d	3.37 ± 0.06d	10.3 ± 0.1g
Prosečno	1.35	3.26	13.9	3.20	14.9

¹mg troloks ekvivalenta po g suve biljne materije; ²mg ekvivalenta galne kiseline po g suve biljne materije; vrednosti sa različitim slovima u istoj koloni su statistički značajno različite za p<0.05 kada se koristi ANOVA Tukey *post hoc* test.

5. REZULTATI I DISKUSIJA

Tabela 5.2.8: Antioksidantna aktivnost etanolnih ekstrakta biljne vrste A. ursinum izraženih u µg odgovarajućeg ekvivalenta po gramu sveže biljne materije

	DPPH TE ¹	ABTS TE ¹	CUPRAC TE ¹	IRA GAE ²	DMPD TE ¹
Jalovik Izvor	110 ± 10a	250 ± 10a	1030 ± 50a	210 ± 10a	1750 ± 50a
Jastrebac	96 ± 7b	250 ± 10a	1010 ± 50b	220 ± 10a	1730 ± 50b
Kamenički vis	106 ± 8a	137 ± 5b	950 ± 50b	190 ± 10a	1220 ± 50c
Bojanine vode	107 ± 9b	176 ± 2bc	1110 ± 50a	240 ± 10b	1270 ± 50d
Seličevica	131 ± 7c	170 ± 10c	1200 ± 50c	230 ± 10b	710 ± 30e
Prosečno	110	197	1060	220	1340

¹mg troloks ekvivalenta po g sveže biljne materije; ²mg ekvivalenata galne kiseline po g sveže biljne materije; vrednosti sa različitim slovima u istoj koloni su statistički značajno različite za p<0.05 kada se koristi ANOVA Tukey post hoc test.

Dobijeni rezultati analize su predstavljeni u tabelama 5.2.7 i 5.2.8. Najvišu hvatačku sposobnost DPPH radikala pokazao je ekstrakt industrijski sušenog divljeg luka (1.71 ± 0.06 mg TE/g sbm). Takođe, isti ekstrakt poseduje najvišu antioksidantnu aktivnost prema reaktivnijem ABTS radikalu (5.50 ± 0.20 mg TE/g sbm). Iznenađujuće, u trećem radikal hvatačkom testu, DMPD, najbolje se pokazao ekstrakt divljeg luka sa Jastrebcem (20.0 ± 0.1 mg TE/g sbm) dok je vrednost za ekstrakt industrijski sušenog skoro upola niža. To govori u prilog pomenutoj tvrdnji da reaktivnost, kako upotrebljenih radikala tako i reduktora iz uzoraka, itekako zavisi od uslova u reakcionoj smeši. U slučaju direktnih antioksidantnih metoda, CUPRAC i IRA, najvišu aktivnost je pokazao ekstrakt na vazduhu sušenog (CUPRAC, 17.7 ± 0.1 mg TE/g sbm) odnosno ekstrakt industrijski sušenog divljeg luka (IRA, 5.78 ± 0.09 mg GAE/g sbm).

Tabela 5.2.9: Sadržaj vode, totalnih fenola (TP) i totalnih flavonoida (TF) etanolnih ekstrakta biljne vrste A. ursinum,

Sadržaj vode	%	TP		TF	
		mg/g ¹	µg/g ²	mg/g ³	µg/g ⁴
Jalovik Izvor	92.0 ± 0.2a	12.1 ± 0.3a	970 ± 20a	5.4 ± 0.1a	433 ± 6a
Jastrebac	91.3 ± 0.2b	10.8 ± 0.4a	940 ± 30a	4.9 ± 0.1b	400 ± 10b
Kamenički vis	92.1 ± 0.2a	11.3 ± 0.4a	890 ± 30a	4.7 ± 0.1b	380 ± 10b
Bojanine vode	91.3 ± 0.2b	14.3 ± 0.7b	1240 ± 60b	5.8 ± 0.1c	500 ± 40c
Seličevica	92.1 ± 0.2a	12.0 ± 0.3a	950 ± 20a	5.9 ± 0.1c	510 ± 20c
Sušen industrijski	-	11.5 ± 0.6a	-	4.1 ± 0.1d	-
Sušen na vazduhu	-	13.6 ± 0.6b	-	4.9 ± 0.1b	-
Prosečno	91.8	12.2	998	5.1	445

¹mg ekvivalenta galne kiseline po g suve biljne mase; ²µg ekvivalenta galne kiseline po g sveže biljne mase; ³mg ekvivalenta katehina po g suve biljne mase; ⁴µg ekvivalenta katehina po g sveže biljne mase; vrednosti sa različitim slovima u istoj koloni su statistički značajno različite za p<0.05 kada se koristi ANOVA Tukey post hoc test.

5. REZULTATI I DISKUSIJA

Sadržaj totalnih fenola kreće se u opsegu od 10.8 do 14.3 mg GAE/g *sbm* (Tabela 5.2.9) i najviši je u uzorku sa Bojaninim voda. Najviše flavonoida je nađeno u uzorku koji potiče sa Seličevice, a generalno, količina flavonoida u svim uzorcima je od 4.1 do 5.9 mg CE/g *sbm*.

Gorinstein i saradnici (2009) su u belom luku određivali ukupne fenole i flavonoide (tabela 5.2.10) i našli 19.4 mg GAE/g *sbm* i 3.37 mg CE/g *sbm* (TP i TF) što je vrlo slično sadržaju u sremušu. Više različitih autora je određivalo TF i TP u crnom luku (tabela 5.1.10) i dobijeni rezultati se nalaze u opsegu 2.5 do 25 mg GAE/g *sbm*, odnosno 3.79 do 6.99 mg CE/g *sbm* (TP i TF). Bernaert i saradnici (2012) su ispitivali 30 sorti praziluka i našli u njima fenole u opsegu 5 do 15 mg GAE/g *sbm*. Odavde se vidi da je sadržaj TP i TF u navedenim *Allium* vrstama (sremuš, beli, crni i praziluk) istog reda veličine.

Uopšteno govoreći, divlji luk sadrži prosečno fenola 12.2 mg GAE/g *sbm*, a od toga flavonoida ima 5.1 mg CE/g *sbm*. Takođe, pokazuje antioksidativnu aktivnost od 1.35 mg TE/g *sbm* (DPPH), 3.26 mg TE/g *sbm* (ABTS), 13.9 mg TE/g *sbm* (CUPRAC), 14.9 mg TE/g *sbm* (DMPD) i 3.20 mg GAE/g *sbm* (IRA).

Ako se uporede dobijene vrednosti za antioksidativnu aktivnost za *A. ursinum* sa literaturnim vrednostima za druge *Allium* vrste: beli, crni i praziluk (tabela 5.2.10) zapaža se da su vrednosti ABTS i DPPH testa za divlji luk nešto niže od odgovarajućih vrednosti za druge lukove. CUPRAC vrednost sremuša je slična crnom luku i nešto viša od odgovarajuće vrednosti za beli luk. Ipak, navedene razlike nisu od nekog većeg značaja jer su sve vrednosti isog reda veličine.

Tabela 5.2.10: Ukupni fenoli (TP), flavonoidi (TF) i vrednosti antioksidativnih testova ABTS, DPPH i CUPRAC za beli, crni i praziluk.

	Divlji luk (<i>A. ursinum</i> L.)	Beli luk (<i>A. sativum</i> L.)	Crni luk (<i>A. cepa</i> L.)	Praziluk (<i>A. ampeloprasum</i> L.)
% vode	-	-	-	86 ¹
TP ⁵	12.2	19.4 ²	2.5 – 3.0 ³ 20.49 – 25.19 ²	5 – 15 ¹
TP ⁸	-	-	0.05 – 0.98 ⁴	-
TF ⁶	5.1	3.37 ²	3.79 – 3.84 ² 4.16 – 6.99	-
ABTS ⁷	3.26	9.3 ²	14.7 ²	6.75 – 33.75 ¹
DPPH ⁷	1.35	8.7 ²	6.2 – 10.3 ²	0.5 – 3.5 ¹
CUPRAC ⁷	13.9	6.8 ²	14.8 ²	-

¹Bernaert i sar., 2012; ²Gorinstein i sar. 2009; ³Kahkonen i sar 1999, ⁴Božin i sar., 2008; ⁵izraženo u mg GAE po g suve mase; ⁶izraženo u mg CE po g suve mase; ⁷izraženo u mg TE po g suve mase; ⁸izraženo u mg GAE po g sveže mase

Oszmiański i sar. (2013) tvrde da hlorofil i njegovi derivati u toku varenja vezuju pojedina azotna jedinjenja koja daju neprijatan miris lukovima. Tako, zbog većeg sadržaja hlorofila u

5. REZULTATI I DISKUSIJA

divljem luku u odnosu na beli luk, osobe koje konzumiraju divlji luk imaju manje problema sa karakterističnim zadahom. Zbog svega ovoga, bilo je interesantno odrediti sadržaj hlorofila u divljem luku i on je dat u tabeli 5.1.11. Prosečni sadržaj hlorofila a (Chl a), hlorofila b (Chl b) i zbira ksantofila i karotena (Xa&Ca) je 9.6, 3.6 i 2.8 mg/g *sbm*. Poređenja radi, Stajner i Varga (2003) su u belom luku našli 1.64, 0.58 i 2.57 mg/g *sbm* (za Chl a, Chl b i Xa&Ca, po redu javljanja) a u sremušu 2.87, 1.35 i 9.99 mg/g *sbm* (za Chl a, Chl b i Xa&Ca, po redu javljanja) tako da pretpostavka Oszmiańskog i saradnika (2013) ima osnova.

Tabela 5.2.11: Sadržaj hlorofila a (Chl a), hlorofila b (Chl b) i zbira ksantofila i karotena (Xa & Ca) u uzorcima biljne vrste A. ursinum

	Chl a		Chl b		Xa & Ca	
	mg/g ¹	mg/g ²	mg/g ¹	mg/g ²	mg/g ¹	mg/g ²
Jalovik Izvor	8.5 ± 0.1a	0.69 ± 0.01a	3.2 ± 0.1a	0.26 ± 0.01a	2.6 ± 0.1a	0.21 ± 0.01a
Jastrebac	7.1 ± 0.1b	0.61 ± 0.01b	2.6 ± 0.1b	0.23 ± 0.01b	2.2 ± 0.1b	0.19 ± 0.01b
Kamenički vis	8.0 ± 0.1c	0.63 ± 0.01c	3.0 ± 0.1a	0.24 ± 0.01a	2.5 ± 0.1a	0.19 ± 0.01a
Bojanine vode	8.6 ± 0.1a	0.75 ± 0.01a	3.0 ± 0.1a	0.26 ± 0.01a	2.5 ± 0.1a	0.22 ± 0.01a
Seličevica	15.8 ± 0.1d	1.25 ± 0.01d	6.3 ± 0.1c	0.50 ± 0.01c	4.2 ± 0.1c	0.34 ± 0.01c
Prosečno	9.6	0.79	3.6	0.30	2.8	0.23

¹suve biljne materije; ²sveže biljne materije; vrednosti sa različitim slovima u istoj koloni su statistički značajno različite za p<0.05 kada se koristi ANOVA Tukey *post hoc* test.

5.2.4 Antimikrobna aktivnost

Antimikrobna aktivnost sedam etarskih ulja *A. ursinum*-a i jednog *A. sativum*-a je određena prema četiri bakterijska i jednom gljivičnom soju. Rezultati dobijeni mikrodilucionom metodom (tabela 5.2.12) pokazuju značajnu inhibitornu aktivnost etarskih ulja, pri čemu vrednosti minimalnih inhibitornih koncentracija (MIC) iznose od 0.37 do 3 mg/mL.

Eatarska ulja sa svih lokacija pokazuju inhibitornu aktivnost kako prema bakterijskim, tako i prema gljivičnom soju. Kao rezistentniji bakterijski sojevi pokazali su se Gram-negativni *Proteus mirabilis* i *Enterobacter aerogenes* za čije inhibicije rasta je bila potrebna veća koncentracija etarskog ulja, prosečno 1.71 i 1.50 mg/mL (za *P. mirabilis* i *E. aerogenes*). Gram pozitivni sojevi, *Enterococcus faecalis* i *Clostridium perfringens* su se pokazali osetljivijim na etarsko ulje i minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) za ova dva soja je prosečno 0.70 i 0.53 mg/mL (za *E. faecalis* i *C. perfringens*). F aktivnost etarskih ulja je ispitivana prema jednom soju (*Candida albicans*) i određena je MIC od 0.70 mg/mL.

Kada se uporede antimikrobne aktivnosti etarskih ulja sremuša i belog luka vidi se da su njihove MIC istog reda veličine, ali i da je etarsko ulje divljeg luka aktivnije prema Gram-negativnim ispitivanim sojevima bakterija.

5. REZULTATI I DISKUSIJA

Tabela 5.1.12: Antimikrobnna aktivnost ekstrakta A. ursinum-a (mg mL⁻¹)

Soj mikroba	ATCC broj	MIC etarskog ulja								Kontrola	
		Jalovik Izvor	Jastrebac	Kamenički Vis	Bojanine vode	Seličevica	Cvet	Jastrebac (sušen)	Allium sativum	Tetraciklin	Nistatin
<i>Proteus mirabilis</i>	12453	3	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	3	0.016	-
<i>Enterobacter aerogenes</i>	13048	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	3	0.001	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	19433	0.37	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.004	-
<i>Clostridium perfringens</i>	19404	0.75	0.75	0.37	0.37	0.37	0.75	0.37	0.37	0.001	-
<i>Candida albicans</i>	10231	0.75	0.75	0.75	0.37	0.75	0.75	0.75	0.75	-	0.016

5.2.5 GC-MS profil etarskog ulja divljeg luka

Do sada postoje samo dve studije koje se bave hemijskim sastavom etarskog ulja *A. ursinum-a*, Schmitt i sar., 2005 i Gođevac i sar., 2007. Neočekivano, u ovim dvema studijama uspešno je identifikovano samo oko dvadesetak jedinjenja (po studiji). Podstaknuti ovim, odlučili smo da preispitamo sastav hidrodestilovanog etarskog ulja nadzemnih delova divljeg luka (onih koji se koriste u ishrani) sa više lokacija. Takođe, uzet je za analizu i industrijski sušen biljni materijal sremuša zbog njegove sve veće upotrebe u kulinarstvu kao začina i lakše dostupnosti na tržištu u odnosu na svež.

Hemijska analiza (GC i GC-MS) osam uzoraka etarskog ulja dobijenog hidrodestilacijom nadzemnih delova divljeg luka (*A. ursinum*) sa pet različitih lokacija u Jugoistočnoj Srbiji omogućila je identifikaciju 210 različitih komponenti, koje predstavljaju od 93.2 do 98.7% ukupne mase ulja. Rezultati GC i GC/MS analize (identifikacija sastojaka etarskog ulja, njihov procentni sastav, RI vrednosti i metode identifikacije) su sumirani u tabeli 5.2.13.

Hemijski sastav svih ispitivanih ulja je vrlo sličan. Najzastupljenija su sumporna jedinjenja (od 69.7 do 97.1%, Tabela 5.1.13), među kojima ima 0.1-1.0% sulfida, 21.0-60.3% disulfida, 28.2-57.0% trisulfida, 2.1-12.2% tetrasulfida, 0.0-0.4% pentasulfida i 0.2-0.6% ostalih, neklasifikovanih sumpornih jedinjenja.

U uzorcima koji su dobijeni hidrodestilacijom svežeg biljnog materijala od sumpornih jedinjenja najviše ima disulfida (61.6-66.0%, računato na masu svih sumpornih jedinjenja) među kojima su najdominantniji dialil disulfid i metil alil disulfid. U etarskom ulju cveta *A. ursinum-a* ima 54.6% disulfida, dok u etarskom ulju dobijenom iz biljnog materijala sušenog u sušnici i na vazduhu ima samo 30.1% i 29.0% disulfida (računato na masu svih sumpornih jedinjenja). U njima preovlađuju trisulfidi (49.7 i 60.4%), a nađeno je najviše dialil trisulfida i

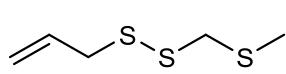
5. REZULTATI I DISKUSIJA

metil alil trisulfida. Takođe, ulja dobijena iz sušenih uzoraka su bogatija i tetrasulfidima (17.5% na vazduhu sušen, 9.1% u sušnici sušen) u odnosu na ulja dobijena iz svežeg materijala (2.3-3.8%) i ulja dobijenog iz cveta (5.0%).

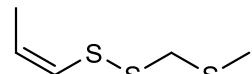
Druga najzastupljenija grupa jedinjenja nađena u etarskom ulju svežeg biljnog materijala su, takozvana, "green leaf" jedinjenja (5.9-8.5% računato na ukupnu masu ulja). U uzorcima sušenim na vazduhu i u sušnici njihov procenat je manji 4.7 i 0.9%. "Green leaf" jedinjenja nastaju kada biljni materijal trpi mehanička oštećenja. Manji sadržaj ovih jedinjenja u etarskom ulju divljeg luka sušenog u sušnici se može objasniti time da u toku sušenja (5h na 50°C) nije dolazilo do mehaničkog oštećenja, da je sadržaj vode relativno brzo ispario i da su nakon toga uslovi za njihovo nastajanje bili nepovoljni.

U etarskim uljima su u maloj količini nađeni alkani, masne kiseline i njihovi derivati. Proizvodi Maillard-ove reakcije (uglavnom razni pirazini i piridini) karakteristični su za etarska ulja sušenih uzoraka, dok su u ostalima nađeni u tragovima. Poznato je da ova jedinjenja, koja nastaju u reakcijama između jedinjenja sa azotom (nastalih degradacijom amino kiseline, peptida i proteina) i produkata degradacije ugljenih hidrata, doprinose karakterističnom ukusu kuvane, grilovane, pržene i pečene hrane (Chyaua i Maub, 2001). Uopšteno, proizvodi Maillard-ove reakcije nastaju pri termičkoj obradi hrane.

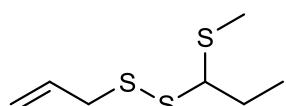
Jedinjenjima, koja su u tabeli 5.2.13 označena kao *Ostala*, pripadaju hemi-/mono-/di-/seskviterpenoidi, karotenoidi i druga neklasifikovana jedinjenja. Ova jedinjenja su prisutna u količini većoj od 0.05% jedino u etarskom ulju sušenih uzoraka.



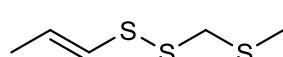
alil metiltiometil disulfid



(*Z*)-metiltiometil 1-propenil disulfid



alil 1-(methylthio)propyl disulfid

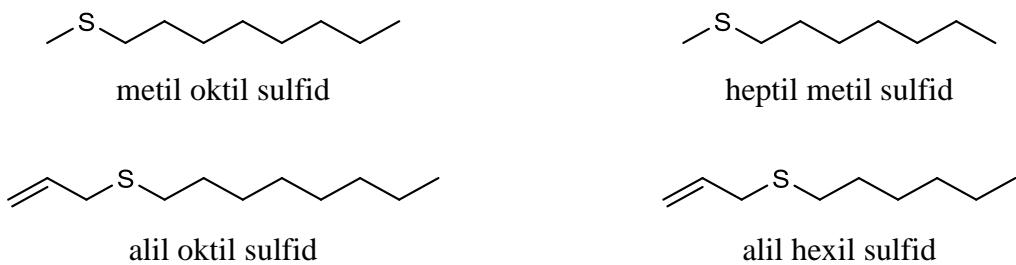


(*E*)-metiltiometil 1-propenil disulfid

Slika 5.2.3: Nova disulfidna jedinjenja nađena u A. ursinum-u

Analiza (GC i GC/MS) je otkrila prisustvo četiri kompletno nova disulfidna jedinjenja: alil metiltiometil disulfid, (*Z*)-metiltiometil 1-propenil disulfid, (*E*)-metiltiometil 1-propenil disulfid i alil 1-(methylthio)propyl disulfid (slika 5.2.3). Takođe, nađena su i četiri sulfida: heptil metil sulfid, metil oktil sulfid, alil hexil sulfid i alil oktil sulfid (slika 5.1.4) koja nisu pre toga detektovana u uzorcima prirodnog porekla. Identifikacija svih ovih novih jedinjenja je bazirana na tumačenju njihove fragmentacije u masenim spektrima kao i na proceni retencionog indeksa.

5. REZULTATI I DISKUSIJA



Slika 5.2.4: Disulfidna jedinjenja nađena u biljnoj vrsti A. ursinum koja nisu ranije detektovana u prirodnim proizvodima

Tabela 5.2.13: Hemijski sastav etarskih ulja biljne vrste *A. ursinum*

Komponenta	t _r /min	RI	Uzorak ¹								Klasa ²	Metod identifikacije ³	
			A	B	C	D	E	F	G	H			
1 Alil tiol	2.107	595	-	-	-	-	-	tr	tr	-	OS	RI, MS, CoI	
2 Heksan	2.111	600	-	tr	tr	tr	tr	-	-	tr	A	RI, MS, CoI	
3 3-Metilbutanal	2.212	620	-	-	-	-	-	-	tr	-	HT	RI, MS	
4 Metil hidrogen disulfid	2.3	637	-	-	-	-	-	tr	0.1	-	OS	RI, MS	
5 2-Metilheksan	2.393	656	-	tr	tr	tr	-	-	-	tr	A	RI, MS	
6 1-Penten-3-ol	2.4	657	0.1	tr	-	tr	tr	-	tr	-	GL	RI, MS	
7 3-Metilheksan	2.449	667	tr	tr	-	tr	-	-	-	tr	A	RI, MS	
8 Alil metil sulfid	2.512	679	-	-	-	-	0.1	-	-	-	OS	RI, MS, CoI	
9 Heptan	2.618	700	-	0.1	0.1	-	-	-	-	0.1	A	RI, MS, CoI	
10 Piridin	2.823	719	-	-	-	tr	-	-	-	tr	MP	RI, MS, CoI	
11 Dimetil disulfid	2.882	725	2.3	0.7	0.7	0.7	2	tr	0.8	0.8	OS	RI, MS, CoI	
12 1-Pentanol	3.116	746	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	GL	RI, MS, CoI	
13 (Z)-3-Heksenal	3.393	772	-	-	-	tr	-	-	0.1	-	GL	RI, MS	
14 Heksanal	3.422	775	0.1	-	0.1	-	0.1	tr	tr	-	GL	RI, MS, CoI	
15 Metilpirazin	3.665	797	-	-	-	-	-	-	tr	-	MP	RI, MS	
16 Oktan	3.692	800	tr	-	-	-	-	-	-	-	GL	RI, MS, CoI	
17 2-Furancarboksialdehid	3.763	804	-	-	tr	tr	-	-	-	0.1	tr	GL	RI, MS
18 (E)-2-Metil-2-pentenal	3.889	812	tr	tr	tr	tr	tr	-	tr	tr	O	RI, MS	
19 2-Metil-1H-pirol	3.92	814	-	-	tr	tr	tr	-	tr	tr	MP	RI, MS	
20 Metil propil sulfoksid	4.048	821	tr	-	tr	-	tr	0.2	0.2	0.2	-	OS	RI, MS
21 (E)-2-Heksenal	4.119	825	0.8	0.2	0.3	0.7	0.2	tr	tr	tr	GL	RI, MS	
22 (E)-3-Heksen-1-ol	4.251	833	0.1	0.1	-	-	0.1	-	-	tr	GL	RI, MS	
23 3-Metilpiridin	4.276	834	-	tr	-	tr	-	-	tr	tr	MP	RI, MS, CoI	
24 (Z)-3-Heksen-1-ol	4.306	836	5.3	6.4	3.2	4.2	6	0.1	-	0.5	GL	RI, MS	
25 Dialil sulfid	4.392	841	0.1	0.3	0.2	0.1	0.2	tr	0.1	0.1	OS	RI, MS, CoI	
26 (E)-2-Heksen-1-ol	4.494	846	0.4	0.3	0.2	0.3	0.1	tr	-	0.1	GL	RI, MS	
27 1-Heksanol	4.549	850	0.3	0.3	0.2	0.2	0.2	tr	tr	0.1	GL	RI, MS, CoI	
28 Alil propil sulfid	4.659	856	tr	tr	tr	tr	tr	-	-	tr	OS	RI, MS	
29 2,4-Dimetiltiofene	4.739	861	-	tr	-	tr	-	-	-	-	OS	RI, MS	
30 3-(Metiltio)propanal (<i>sin.</i> metional)	4.82	865	0.2	0.1	0.2	0.2	0.1	0.3	0.1	0.3	OS	RI, MS	

Tabela 5.2.13: Nastavak

Komponenta	t_r /min	RI	Uzorak ¹								Klasa ²	Metod identifikacije ³
			A	B	C	D	E	F	G	H		
31 Alil propenil sulfid/	4.928	872	tr	tr	tr	tr	tr	-	-	tr	OS	RI, MS
32 Heptanal	5.066	880	tr	tr	tr	-	tr	tr	tr	tr	GL	RI, MS, CoI
33 2,6-Dimetilpirazin	5.135	884	-	-	-	-	-	tr	tr	-	MP	RI, MS
34 3,4-Dimetiltiofen	5.214	888	tr	-	tr	-	-	tr	tr	tr	OS	RI, MS
35 1-Propenil propil sulfid*	5.223	888	-	-	-	-	-	tr	0.2	-	OS	RI, MS
36 Etilpirazin	5.232	889	-	-	-	-	-	-	tr	-	MP	RI, MS
37 Alil metil disulfid	5.353	896	17	15	13	13	19	1.1	8.6	13	OS	RI, MS, CoI
38 Vinilpirazin	5.494	903	-	-	-	-	-	-	tr	-	MP	RI, MS
39 Metil fenil sulfid	5.514	904	tr	tr	tr	-	tr	-	tr	tr	OS	RI, MS
40 2,4-Dimetilpiridin	5.569	906	-	-	-	-	-	-	tr	-	MP	RI, MS
41 (Z)-Metil -1-propenil disulfid	5.722	913	2.5	1.5	1.9	2.1	2.3	0.1	0.5	1.8	OS	RI, MS
42 3-(Metiltio)butanal	5.753	914	-	-	tr	-	-	tr	0.1	-	OS	RI, MS
43 2,5-Dimetilpiridin	5.829	917	-	-	-	-	-	-	0.2	-	MP	RI, MS
44 (E)-Metil -1-propenil disulfid	5.883	920	5.8	3.4	4.4	5.7	6.2	0.3	0.9	2.4	OS	RI, MS
45 Benzaldehid	6.119	930	-	-	-	tr	-	0.1	tr	tr	FP	RI, MS, CoI
46 Dimetil trisulfid	6.452	944	7.5	4.3	3.5	4.2	6	1.1	7	5.5	OS	RI, MS, CoI
47 3-Tiofenethiol	6.564	949	-	-	-	-	-	tr	tr	-	OS	RI, MS
48 3-Tiofenkarboksi aldehid	6.603	950	-	-	-	-	-	-	tr	-	OS	RI, MS
49 2- Tiofenkarboksi aldehid	6.851	961	-	-	-	-	-	-	tr	-	OS	RI, MS
50 2,4,6-Trimetilpiridin	6.947	965	-	-	-	-	-	tr	-	-	MP	RI, MS, CoI
51 1-Octen-3-ol	6.913	964	tr	-	tr	tr	-	0.2	-	tr	GL	RI, MS
52 2-Etil-5-metilpirazin	7.06	970	-	-	-	-	-	tr	0.1	-	MP	RI, MS
53 2-Etil-6-metilpirazin	7.17	975	-	-	-	-	-	-	0.1	-	MP	RI, MS
54 1-(2-Furanil)-1-propanon	7.257	979	-	-	-	-	-	tr	tr	-	O	RI, MS
55 (E,E)-2,4-Heptadienal	7.264	979	-	-	-	-	-	0.2	-	-	GL	RI, MS
56 2-Pentilfuran	7.27	979	tr	tr	tr	tr	tr	tr	-	tr	GL	RI, MS
57 Oktanal	7.329	982	tr	tr	tr	0.1	tr	-	0.1	-	GL	RI, MS, CoI
58 (Z)-3-Heksenil acetat	7.475	988	0.2	0.8	0.9	0.2	0.3	-	-	-	GL	RI, MS
59 Heksil acetat	7.689	997	tr	0.1	0.1	tr	tr	-	-	-	GL	RI, MS, CoI
60 Heksil metil sulfid	7.884	1005	tr	-	-	-	-	-	tr	-	OS	RI, MS, CoI

Tabela 5.2.13: Nastavak

Komponenta	t_r /min	RI	Uzorak ¹								Klasa ²	Metod identifikacije ³
			A	B	C	D	E	F	G	H		
61 Fenilacetaldehid	8.044	1011	-	-	tr	tr	tr	0.6	0.1	tr	MP	RI, MS, CoI
62 2,6,6-Trimetilcikloheksanon	8.138	1015	-	-	-	-	tr	-	tr	-	CR	RI, MS
63 1,8-Cineol (sin. Eucaliptol)	8.214	1017	-	-	-	-	-	tr	-	-	M	RI, MS, CoI
64 Metill butanditioat	8.318	1021	-	tr	tr	-	-	-	tr	tr	OS	RI, MS
65 (E)-2-Oktenal	8.563	1030	-	-	-	-	-	tr	-	-	GL	RI, MS
66 Acetofenon	8.607	1032	-	-	-	-	-	tr	-	-	O	RI, MS, CoI
67 2,6,6-Trimetil-2-cikloheksenon	8.682	1035	-	-	-	-	-	tr	-	-	CR	RI, MS, CoI
68 (Z,E)-3,5-Oktadien-2-one	8.876	1042	-	-	-	-	-	tr	-	-	GL	RI, MS
69 (E)-2-Okten-1-ol	9.104	1051	-	-	-	-	-	0.3	-	-	GL	RI, MS
70 Dialil disulfid	9.292	1058	16	21	20	18	17	9.9	10	21	OS	RI, MS, CoI
71 Tetrametilpirazin	9.357	1061	-	-	-	-	-	tr	-	-	MP	RI, MS
72 2,3-Dimetil-5-etilpirazin	9.381	1061	-	-	-	-	-	-	0.2	-	MP	RI, MS
73 (E,E)-3,5-Oktadien-2-one	9.462	1064	-	-	-	-	-	tr	-	-	GL	RI, MS
74 2,3-Dietilpirazin	9.478	1065	-	-	-	-	-	-	tr	-	MP	RI, MS
75 (E)-2-(Metil tiometil)but-2-enal	9.633	1071	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	OS	RI, MS
76 2-Etil-6-vinilpirazin	9.64	1071	-	-	-	-	-	-	tr	-	MP	RI, MS
77 Alil propil disulfid i (Z)-alil- 1-propenil disulfid	9.661	1072	3.9	4.1	5.7	4.9	3.8	3.1	1.4	5.5	OS	RI, MS
78 (E)-Alil -1-propenil disulfid	9.86	1079	7.9	7.5	9.6	10	8.2	4.4	3.4	6.2	OS	RI, MS
79 Nonanal	9.962	1083	0.6	0.3	0.9	0.6	0.2	3.6	0.6	0.2	GL	RI, MS, CoI
80 Linalool	9.974	1084	-	-	-	-	-	tr	-	-	M	RI, MS, CoI
81 Dipropil disulfid i (Z)-1-propenil propil disulfide	10.131	1090	0.2	0.1	0.3	0.2	0.1	0.3	tr	0.2	OS	RI, MS
82 Metil metiltiometyl disulfid and (E)-1-propenil propil disulfid	10.298	1096	0.8	0.7	1.1	0.7	0.8	0.8	0.5	1.1	OS	RI, MS
83 (Z,Z)-Bis(1-propenil) disulfide	10.439	1101	tr	tr	tr	tr	tr	tr	0.2	tr	OS	RI, MS
84 Heptil methyl sulfid	10.454	1102	tr	0.2	0.2	0.1	0.2	tr	0.1	tr	OS	RI, MS
85 (E,E)-Bis(1-propenil) disulfid	10.529	1105	0.2	0.1	0.4	0.3	0.3	0.1	-	0.1	OS	RI, MS
86 Alil metil trisulfid	10.736	1112	15	14	13	13	14	11	27	17	OS	RI, MS, CoI

Tabela 5.2.13: Nastavak

Komponenta	t_r /min	RI	Uzorak ¹								Klasa ²	Metod identifikacije ³
			A	B	C	D	E	F	G	H		
87 Metil propil trisulfid	11.12	1126	0.7	0.7	0.8	0.5	0.6	0.9	0.6	1	OS	RI, MS
88 (Z)-Metil-1-propenil trisulfid	11.372	1135	0.6	0.3	0.6	0.7	0.6	0.8	0.5	0.4	OS	RI, MS
89 (E)-Metil-1-propenil trisulfid	11.477	1139	0.9	0.5	0.8	1	0.9	0.9	0.7	0.6	OS	RI, MS
90 Metil-1-(metiltio)etil disulfid	11.558	1142	-	tr	tr	tr	0.1	-	0.1	-	OS	RI, MS
91 2,4-Dimetilbenzaldehid	11.579	1143	-	-	-	-	-	tr	tr	-	O	RI, MS
92 2-Merkapto-3,4-dimetil-2,3-dihidrotiofen	11.634	1145	tr	tr	tr	0.1	tr	-	-	tr	OS	RI, MS
93 3-Metilacetofenone	11.803	1151	-	-	-	-	-	tr	-	-	O	RI, MS
94 Alil heksil sulfid	11.953	1157	-	-	-	-	-	tr	-	-	OS	RI, MS, CoI
95 1-Nonanol	11.968	1157	-	tr	tr	tr	tr	0.1	-	tr	GL	RI, MS, CoI
96 Safranal	12.364	1172	-	-	-	-	-	0.1	tr	-	CR	RI, MS, CoI
97 3-Vinil-1,2-ditiacikloheks-5-en	12.522	1177	tr	-	-	tr	-	tr	0.1	tr	OS	RI, MS
98 Dimetil tetrasulfid	12.681	1183	1.1	0.4	0.6	0.7	0.8	1.7	1.9	1.4	OS	RI, MS, CoI
99 Dekanal	12.738	1186	tr	-	tr	tr	-	tr	-	tr	GL	RI, MS, CoI
100 (E,E)-2,4-Nonadienal	12.694	1184	-	-	-	-	-	tr	-	-	GL	RI, MS, CoI
101 4-Metilen-isoforon	12.795	1188	-	-	-	-	-	tr	-	-	CR	RI, MS
102 β -Ciklocitral	13.024	1196	-	-	tr	tr	-	0.5	tr	-	CR	RI, MS, CoI
103 2,6-Dietil-3,5-dimetilpirazin	13.313	1206	-	-	-	-	-	-	0.1	-	MP	RI, MS
104 3-Metil-5-etil-1,2,4-tritiolan*	13.337	1208	-	0.1	tr	tr	tr	-	-	tr	OS	RI, MS
105 2,5-Dietil-3,6-dimetilpirazin	13.421	1211	-	-	-	-	-	-	tr	-	MP	RI, MS
106 Metil octil sulfid	13.425	1211	0.1	-	0.1	tr	0.1	0.3	0.1	tr	OS	RI, MS, CoI
107 Heksil metil disulfid	13.554	1215	-	tr	tr	tr	-	tr	-	-	OS	RI, MS, CoI
108 Metil 1-(metiltio)propil disulfid	13.959	1231	tr	0.1	0.2	0.1	0.2	tr	tr	0.1	OS	RI, MS
109 2,6,6-Trimetil-1-cikloheksen-1-acetaldehid	14.017	1233	-	-	-	-	-	tr	-	-	CR	RI, MS
110 2-Fenil-2-butenal	14.045	1234	-	-	-	-	-	0.3	-	-	O	RI, MS
111 (E)-2-Decenal	14.086	1236	-	-	-	-	-	tr	-	-	GL	RI, MS
112 2-Heksiltiofen	14.398	1247	-	-	-	-	-	tr	tr	tr	OS	RI, MS

Tabela 5.2.13: Nastavak

Komponenta	t_r /min	RI	Uzorak ¹								Klasa ²	Metod identifikacije ³
			A	B	C	D	E	F	G	H		
113 1-Dekanol	14.656	1257	-	-	-	-	-	tr	-	-	GL	RI, MS, CoI
114 Etil -1-(metiltio)propil disulfid	14.607	1255	-	tr	tr	tr	tr	-	0.2	-	OS	RI, MS
115 Alil metiltiometyl disulfid	14.747	1260	0.1	0.4	0.4	0.1	0.1	0.8	0.6	1	OS	RI, MS
116 Dialil trisulfid	15.074	1272	5.2	8.6	7.7	8.7	4.9	13	20	11	OS	RI, MS, CoI
117 Metiltiometyl propil disulfid	15.122	1274	tr	tr	tr	tr	tr	tr	-	tr	OS	RI, MS
118 (Z)-Metiltiometyl-1-propenil disulfid	15.277	1280	-	tr	tr	-	-	tr	tr	tr	OS	RI, MS
119 2-Methoksi-4-vinilfenol	15.335	1282	-	-	-	-	-	0.6	-	-	O	RI, MS
120 (E)-metiltiometyl-1-propenil disulfid	15.361	1283	tr	0.1	0.1	tr	tr	tr	0.1	0.1	OS	RI, MS
121 Alil propil trisulfid	15.463	1287	0.5	0.9	1	0.7	0.5	2.7	0.8	1.3	OS	RI, MS
122 (E,E)-2,4-Dekadienal	15.519	1289	-	-	tr	-	-	tr	-	tr	GL	RI, MS
123 (Z)-Alil -1-propenil trisulfid	15.692	1295	0.3	0.3	0.5	0.7	0.3	1.2	0.5	0.4	OS	RI, MS
124 (E)-Alil -1-propenil trisulfid	15.780	1299	0.6	0.6	1.2	1.1	0.6	2	0.8	0.7	OS	RI, MS
125 Tridekan	15.820	1300	-	-	tr	-	-	-	-	-	A	RI, MS, CoI
126 Dipropil trisulfid	15.862	1302	tr	tr	tr	tr	-	tr	tr	tr	OS	RI, MS
127 Alil -1-(metiltio)ethyl disulfid	15.883	1303	-	-	-	-	tr	-	-	-	OS	RI, MS
128 (E)-1-Propenil propil trisulfid	15.947	1305	-	tr	tr	-	-	-	-	tr	OS	RI, MS
129 Metil dekanoat	15.959	1306	-	-	-	-	-	tr	-	-	FA	RI, MS, CoI
130 (Z)-1-Propenil propil trisulfid i (Z,Z)-Bis(1-propenil) trisulfid	16.174	1314	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	tr	0.1	OS	RI, MS
131 (E,E)-Bis(1-propenil) trisulfid	16.377	1322	tr	0.1	0.1	0.1	tr	0.3	-	0.2	OS	RI, MS
132 5,6-Dimetil-2,3,7-triabiciklo[2.2.1]heptan	16.688	1334	-	-	-	tr	-	-	-	-	OS	RI, MS
133 Eugenol	16.526	1328	-	-	-	-	-	tr	-	-	O	RI, MS, CoI
134 (E)-2-Undecenal	16.798	1338	-	-	-	-	-	0.2	-	-	GL	RI, MS
135 Alil methyl tetrasulfid	17.014	1347	1.1	1.1	1.2	1.4	0.9	4.8	4	2	OS	RI, MS, CoI
136 Dekanska kiselina	17.177	1353	-	-	-	-	-	tr	-	-	FA	RI, MS, CoI
137 Metil propil tetrasulfid	17.415	1363	tr	-	tr	-	tr	0.5	0.1	0.1	OS	RI, MS
138 Alil octil sulfid	17.466	1365	tr	-	0.1	tr	tr	0.6	tr	tr	OS	RI, MS, CoI
139 (E)-Metil 1-propenil tetrasulfid	17.570	1368	tr	tr	0.1	0.1	0.1	0.6	0.2	0.1	OS	RI, MS

Tabela 5.2.13: Nastavak

Komponenta	t_r /min	RI	Uzorak ¹								Klasa ²	Metod identifikacije ³
			A	B	C	D	E	F	G	H		
140 Oktil propil sulfid	17.830	1379	-	-	-	-	-	tr	-	-	OS	RI, MS
141 Alil 1-(Metiltio) propil disulfid	18.040	1387	tr	-	0.2	0.1	0.1	tr	tr	0.1	OS	RI, MS
142 1-Tetradecen	18.107	1389	-	-	-	-	-	-	tr	-	GL	RI, MS
143 Metil dekanoot	18.261	1395	tr	tr	tr	tr	-	0.1	-	-	FA	RI, MS, CoI
144 1-(Metiltio)propil propil disulfid	18.303	1397	-	-	tr	tr	-	-	-	tr	OS	RI, MS
145 1-(1-Propeniltio) propil methyl disulfid	18.433	1402	tr	-	-	-	tr	tr	tr	tr	OS	RI, MS
146 1-(Metiltio)propil -1-propenil disulfid	18.453	1403	tr	tr	0.1	0.1	-	-	-	tr	OS	RI, MS
2,3-Dimetil-5,6-ditiabaciclo[2.1.1]heksan- 5,5-dioksid	18.679	1412	tr	tr	0.1	0.1	0.1	0.1	tr	tr	OS	RI, MS
148 Bis(1-metiltio)propil disulfid	18.701	1413	-	tr	tr	tr	-	-	-	-	OS	RI, MS
149 Dimetil pentasulfid	18.826	1418	tr	tr	tr	-	tr	0.3	0.4	0.1	OS	RI, MS, CoI
150 Bis(1-metiltio)propil disulfid	19.393	1441	tr	tr	0.1	-	tr	tr	tr	0.1	OS	RI, MS
151 Metil- 3,4-dimetil-2-tienil disulfid	19.875	1461	tr	tr	tr	tr	tr	0.1	tr	tr	OS	RI, MS
152 (<i>E</i>)- β -Ionon	19.918	1463	tr	tr	tr	tr	tr	1.3	0.1	-	CR	RI, MS, CoI
153 (<i>E,E</i>)- α -Farnesen	20.737	1497	-	-	-	-	-	tr	-	tr	S	RI, MS, CoI
154 Dialil tetrasulfid	20.959	1506	0.3	0.7	0.7	1	0.3	3.3	2.2	1.1	OS	RI, MS, CoI
155 Dipropil tetrasulfid	21.300	1521	tr	-	0.1	0.1	tr	0.6	0.1	0.1	OS	RI, MS
156 Dipropenil tetrasulfid*	21.377	1524	tr	tr	0.1	0.1	tr	0.5	0.1	0.1	OS	RI, MS
157 (<i>Z</i>)-1-Propenil propil tetrasulfid	21.654	1536	-	-	tr	tr	-	tr	-	tr	OS	RI, MS
158 (<i>E</i>)-1-Propenil propil tetrasulfid	21.970	1550	tr	tr	tr	0.1	tr	0.2	-	-	OS	RI, MS
159 Dodekanska kiselina (Laurinska kiselina)	21.940	1548	-	-	-	-	-	tr	-	-	FA	RI, MS, CoI
160 2,4-Dimetil-5,6-ditia-2,7-nonadienal	22.126	1556	tr	tr	tr	-	tr	-	-	tr	OS	RI, MS
161 Tetradekanal (Miristil aldehid)	22.975	1593	tr	-	0.1	0.1	-	0.7	tr	-	FA	RI, MS, CoI
162 Heksakozan	23.078	1600	-	-	-	-	-	-	-	-	A	RI, MS, CoI
163 1-Tetradekanol	24.434	1659	-	-	-	-	-	0.1	-	-	FA	RI, MS, CoI
164 2-Pentadekanon	24.836	1677	-	-	-	-	-	0.1	-	-	FA	RI, MS

Tabela 5.2.13: Nastavak

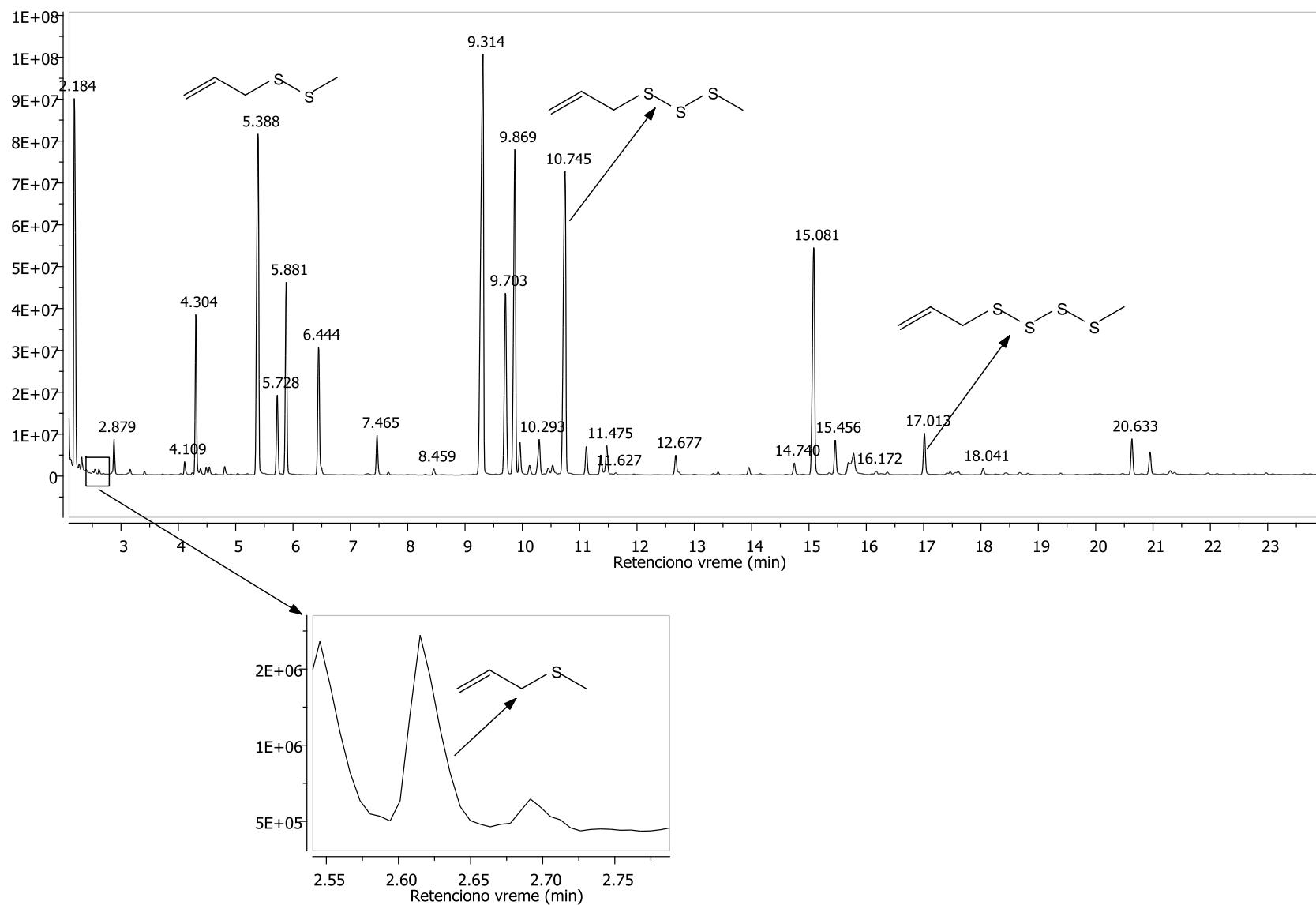
Komponenta	t_r /min	RI	Uzorak ¹						Klasa ²	Metod identifikacije ³	
			A	B	C	D	E	F	G	H	
165 Pentadekanal	25.165	1692	-	-	-	-	-	0.3	-	-	FA RI, MS, CoI
166 Heptakozan	25.279	1700	-	-	-	-	-	0.1	-	-	A RI, MS, CoI
167 Fenantren	26.047	1734	-	-	-	-	-	tr	tr	-	O RI, MS, CoI
168 Oktadekan	27.442	1800	-	-	-	-	-	0.1	-	tr	A RI, MS, CoI
169 Heksahidrofarnezil aceton	28.034	1830	-	-	tr	tr	-	2	tr	tr	CR RI, MS, CoI
170 1-Heksadekanol	28.658	1861	-	-	-	-	-	0.1	-	-	FA RI, MS, CoI
171 Farnezil aceton	29.226	1890	-	-	-	-	-	0.2	-	-	CR RI, MS, CoI
172 Nonadekan	29.432	1900	-	-	-	-	-	0.2	-	tr	A RI, MS, CoI
173 Metil palmitat	29.627	1911	-	-	0.1	tr	-	0.1	-	tr	FA RI, MS, CoI
174 Izofitol	30.184	1939	-	-	-	tr	-	0.2	-	tr	D RI, MS, CoI
175 Sulfur, mol. (S8)	30.445	1953	-	-	-	-	-	0.5	tr	-	O RI, MS
176 Etil palmitat	30.939	1979	-	-	tr	tr	-	tr	-	tr	FA RI, MS, CoI
177 Eicosan	31.348	2000	-	-	-	-	-	0.2	tr	tr	A RI, MS, CoI
178 Geranil linalool	31.455	2007	-	-	-	-	-	tr	-	-	O RI, MS, CoI
179 1-Oktadekanol	32.509	2065	-	-	-	-	-	tr	-	-	FA RI, MS, CoI
180 Metil linolenat	32.723	2076	-	-	tr	tr	-	0.2	tr	tr	FA RI, MS, CoI
181 Fitol	33.111	2098	-	-	-	-	-	5.4	0.1	-	D RI, MS, CoI
182 Heneikozan	33.17	2100	tr	tr	0.4	0.2	0.1	-	-	0.1	A RI, MS, CoI
183 Metil stearat	33.361	2112	-	-	tr	tr	-	-	-	-	FA RI, MS, CoI
184 Etil stearat	34.547	2180	-	-	tr	tr	-	-	-	-	FA RI, MS, CoI
185 Dokozan	34.906	2200	-	-	tr	tr	-	0.3	-	tr	A RI, MS, CoI
186 1-Eicosanol	36.031	2268	-	-	-	-	-	tr	-	-	FA RI, MS, CoI
187 Trikozan	36.570	2300	tr	tr	0.4	0.1	tr	1.9	tr	0.3	A RI, MS, CoI
188 Metil eicosanoate	36.776	2313	-	-	tr	tr	-	tr	-	-	FA RI, MS, CoI
189 Etil eicosanoate	37.852	2380	-	-	tr	tr	-	tr	-	-	FA RI, MS, CoI
190 1-Dokozanol	39.270	2471	-	-	-	-	-	tr	-	-	FA RI, MS, CoI
191 Pentakozan	39.730	2500	tr	tr	0.1	0.1	tr	1	tr	0.1	A RI, MS, CoI
192 Heksakozan	41.134	2600	-	-	-	-	-	tr	-	-	A RI, MS, CoI
193 2-Metilheksakozan	42.057	2661	-	-	-	-	-	0.1	-	-	A RI, MS
194 1-Tetrakozanol	42.265	2674	-	-	-	-	-	0.2	tr	-	FA RI, MS, CoI
195 Heptakozan	42.648	2700	-	-	tr	-	-	0.5	tr	-	A RI, MS, CoI
196 Metil lignocerate	42.775	2711	-	-	-	-	-	tr	-	-	FA RI, MS, CoI

Tabela 5.2.13: Nastavak

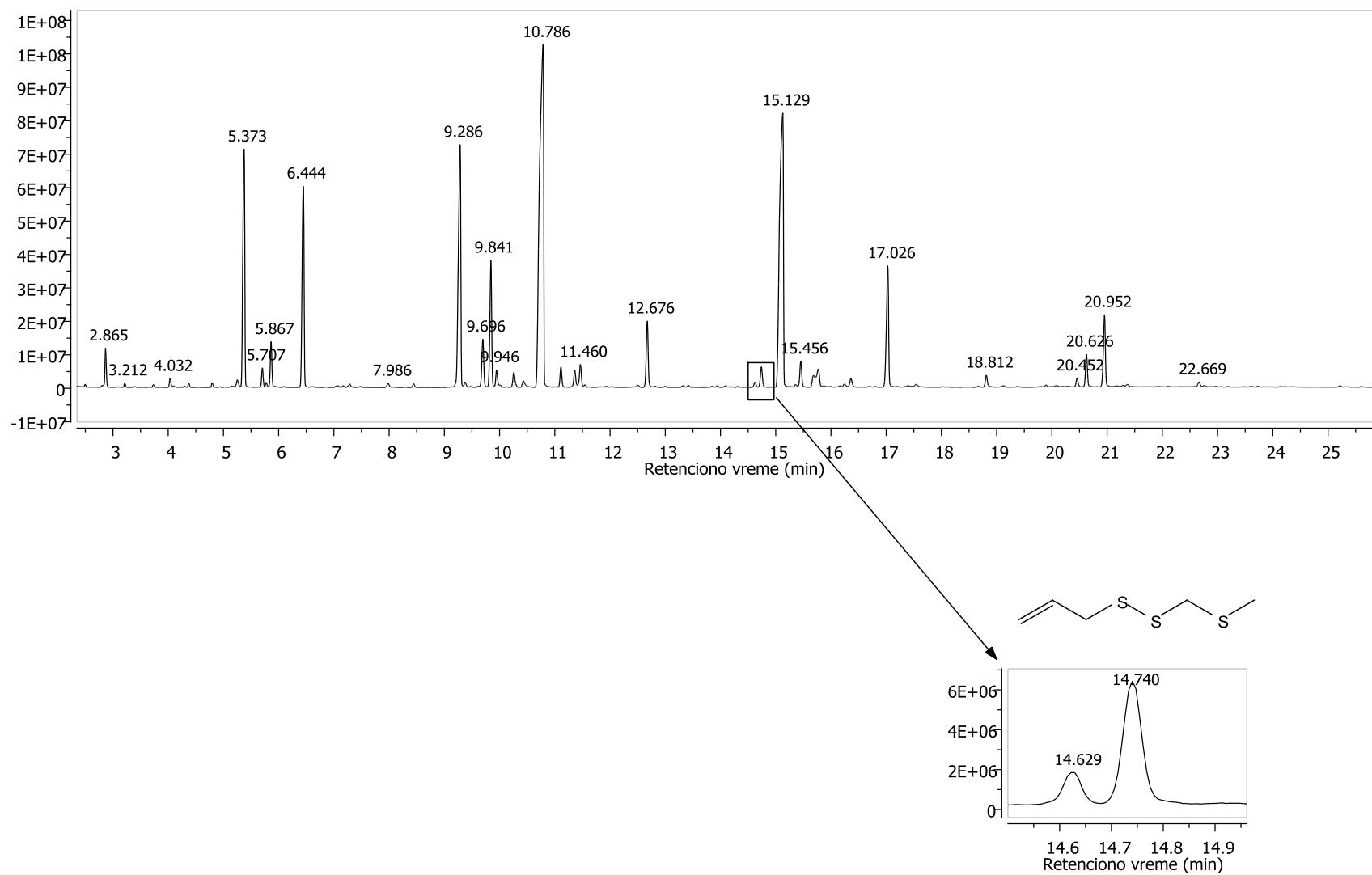
Komponenta	t_r /min	RI	Uzorak ¹						Klasa ²	Metod identifikacije ³	
			A	B	C	D	E	F	G		
197 Oktakozan	43.948	2800	-	-	-	-	-	tr	-	-	A RI, MS, CoI
198 Skvalen	44.110	2808	-	-	-	-	-	tr	-	-	O RI, MS, CoI
199 2-Metiloktakozan	44.805	2859	-	-	-	-	-	tr	-	-	A RI, MS
200 1-Heksakozanol	45.054	2878	-	-	-	-	-	-	tr	-	FA RI, MS, CoI
201 Nonakozan	45.366	2900	-	-	-	tr	-	0.4	-	0.1	A RI, MS, CoI
202 Triakontan	46.572	3000	-	-	-	-	-	tr	-	-	A RI, MS, CoI
203 1-Oktakozanol	47.649	3082	-	-	-	-	-	tr	-	-	FA RI, MS, CoI
204 Hentriakontan	47.819	3100	-	-	-	-	-	tr	0.3	-	A RI, MS, CoI
205 Dotriakontan	49.089	3200	-	-	-	-	-	-	0.1	-	A RI, MS, CoI
206 Palmiton	49.861	3266	-	-	-	-	-	0.2	-	-	O RI, MS, CoI
207 Tritriakontan	50.220	3300	-	-	-	-	-	tr	0.9	-	A RI, MS, CoI
208 2-Metiltetrakontan	52.437	3462	-	-	-	-	-	tr	-	-	A RI, MS
Ukupno identifikovano (%)			99	96	98	98	99	93	98	99	
Organosumporna jedinjenja (OS) (%)			91	88	91	91	91	70	94	97	
Sulfidi			0	1	1	0	1	1	1	0.1	
Disulfidi			57	55	58	56	60	21	27	53	
Trisulfidi			31	30	29	31	28	35	57	39	
Tetrasulfidi			3	2	3	4	2	12	9	4.9	
Pentasulfidi			tr	tr	tr	-	tr	0	0	0.1	
Neklasifikovana organosumporna jedinjenja			0	0	0	0	0	1	1	0.3	
“Green leaf” jedinjenja (GL) (%)			8	9	6	6	7	5	1	0.9	
Alkani (A)			tr	0	1	0	0	5	1	0.7	
Masne kiseline i derivati (FA)			tr	tr	0	0	-	2	tr	tr	
Produkti Maillard-ovih reakcija (MP)			-	tr	tr	tr	tr	1	1	tr	
Ostalo (O)			tr	tr	tr	tr	tr	11	0	tr	

¹Uzorak – etarska ulja *A. ursinum*-a sa lokacije: A - Kamenički vis; B - Jalovik Izvor; C - Bojanine vode; D - Seličevica; E - Jastrebac; F – etarsko ulje na vazduhu sušenog *A. ursinum*-a sa lokacije Jastrebac; G - etarsko ulje u sušnici sušenog *A. ursinum*-a sa lokacije Jastrebac; H - etarsko ulje cvetova *A. ursinum*-a.

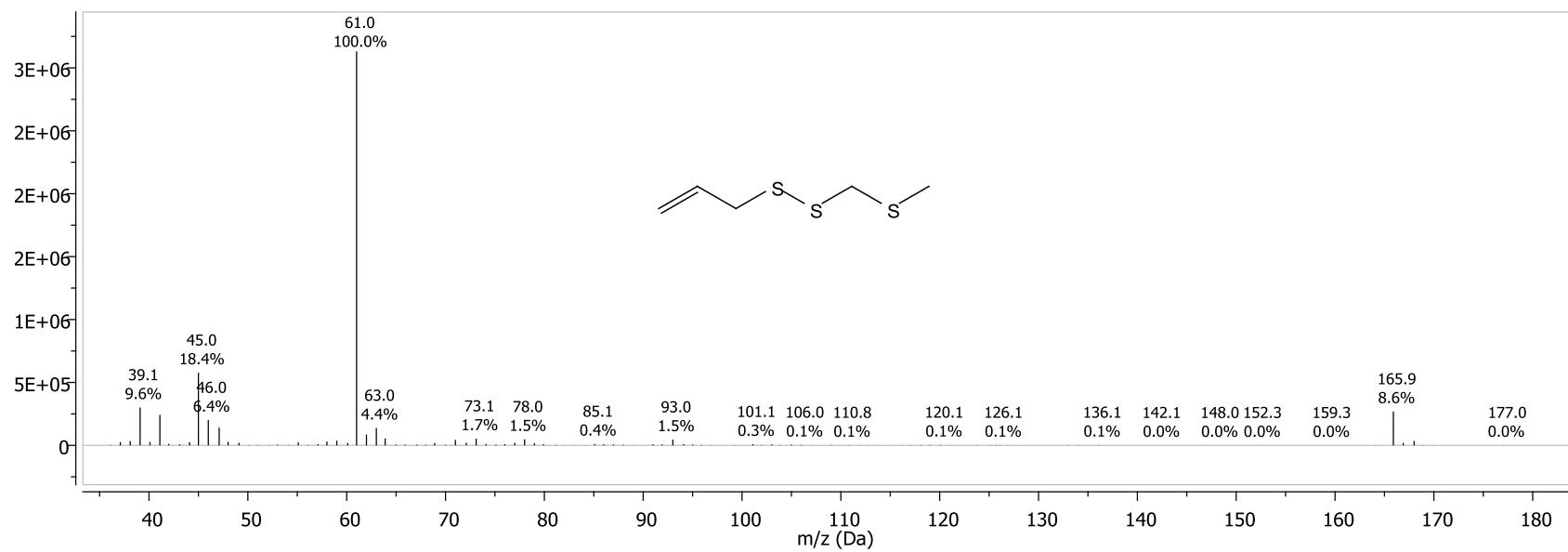
²Metod identifikacije: RI-retencioni indeks, MS-maseni spektar, CoI-koinjektiranje; ³Klasa jedinjenja: OS-organosumporna jedinjenja, GL-“Green leaf” jedinjenja, A-alkani, FA-masne kiseline i derivati, MP-produkti Maillard-ovih reakcija, O-ostalo.



Slika 5.2.5: Gasni hromatogram etarskog ulja vrste A. ursinim sa područja Jastrepca sa homolognom serijom alil metil polisulfida



Slika 5.2.6: Gasni hromatogram etarskog ulja vrste *A. ursinum* i pik jedinjenja alil metiltiometil disulfida



Slika 5.2.7: Maseni spektar alil metiltiometyl disulfida

5. REZULTATI I DISKUSIJA

Hemijska analiza etarskih ulja *A. ursinum*-a dokazala je prisustvo nekoliko homolognih serija polisulfida: metil alil polisulfidi, dialil polisulfidi, dimetil polisulfidi, alil propil polisulfidi, alil propenil polisulfidi. Analizom ovih homolognih serija nađeno je da retencioni indeks inkrement za svaki sumporov atom iznosi 222 ± 5 RI jedinica, što je u saglasnosti sa literaturom (Golovnya i sar. 1979).

Autori Golovnia, Mišarina i Garbuzov proučavali su retencione intekse različitih sulfida (Golovnya i sar. 1976, 1978, 1979) i ponudili su jednačinu za predviđanje retencionih indeksa za različite homologne serije. Ove jednačine su date u obliku:

$$I = A + Bn + \frac{C}{n}$$

gde su A, B i C konstante koje zavise od tipa hromatografske kolone i vrste homologne serije, a n je broj ugljenikovih atoma u sulfidu.

Vođeni ovim, pokušali smo da nađemo jednačinu koja dobro opisuje i predviđa retencione indekse za sulfide nađene u ovim analizama.

Tabela 5.2.14: Jednačine za predviđanje RI homolognih serija polisulfida

	$R_1 < R_2$	Jednačina	s^1
1	Mono, di, tri, tetra-sulfidi	$RI = 103.6 + 96.2 [C]^2 + 215.8 [S]^3 - 26.2 [pi]^4 + 17.2 [Z]^5 + 24.0 [E]^6$	12
2	Monosulfidi	$R_1-S-R_2;$ $RI = 305.7 + 86.4 [C_1]^7 + 101.9 [C_2]^8 - 16.1 [pi]$	2.75
3	Disulfidi	R_1-SS-R_2 $RI = 533.1 + 85.8 [C_1] + 99.3 [C_2] - 14.7 [pi] + 17.6 [Z] + 21.6 [E]$	4.69
4	Trisulfidi	$R_1-SSS-R_2$ $RI = 765.5 + 87.8 [C_1] + 91.5 [C_2] - 14.1 [pi] + 20.7 [Z] + 25.4 [E]$	1.26
5	Tetrasulfidi	$R_1-SSSS-R_2$ $RI = 1011.5 + 86.0 [C_1] + 85.5 [C_2] - 11.6 [pi] + 21.6 [Z] + 27.4 [E]$	5.85
6	Mono, di, tri-sulfidi,	$R_1-S_x-R_2$ $RI = 97.2 + 86.5 [C_1] + 100.7 [C_2] + 215.7 [S] - 16.9 [pi] + 19.8 [Z] + 24.1 [E]$	4.42
7	Mono, di, tri, tetra-sulfidi	$R_1-S_x-R_2$ $RI = 89.3 + 86.1 [C_1] + 101.0 [C_2] + 220.0 [S] - 16.5 [pi] + 17.6 [Z] + 23.1 [E]$	7.08

¹standardna devijacija (u jedinicama RI); ²broj C atoma; ³broj S atoma; ⁴broj dvostrukih (pi) veza; ⁵broj Z dvostrukih veza; ⁶broj E dvostrukih veza; ⁷broj C atoma u kraćem (R_1) nizu; ⁸broj C atoma u dužem (R_2) nizu.

Standardna devijacija (s), data u tabeli 5.2.14, računata je po formuli:

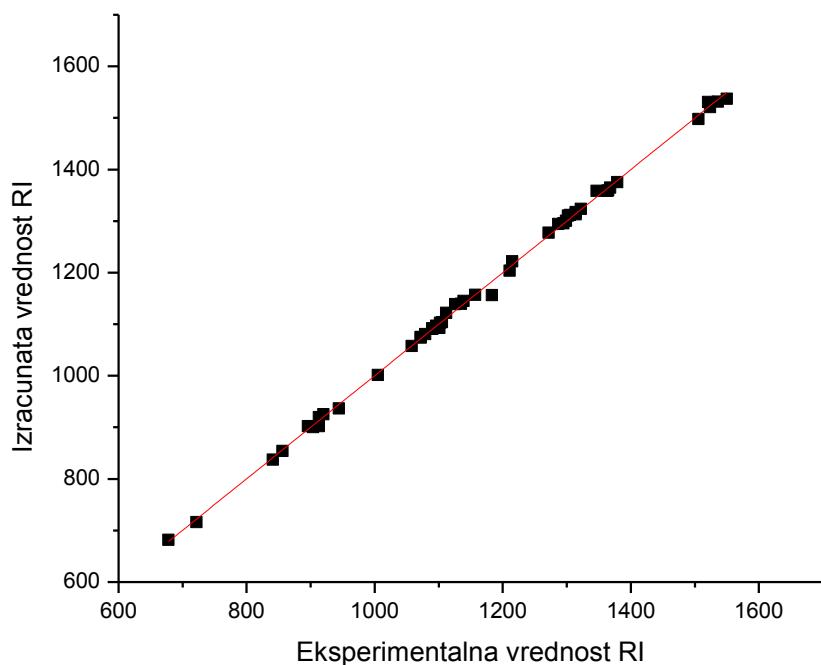
$$s = \sqrt{\frac{\sum(RI_e - RI_c)^2}{N - 1}}$$

gde su: RI_e – retencioni indeks, eksperimentalna vrednost
 RI_c – retencioni indeks, izračunata vrednost
 N – broj jedinjenja u homolognoj seriji

5. REZULTATI I DISKUSIJA

Jednačine (od 1 do 7, tabela 5.2.14) konstruisane su na osnovu retencionih indeksa 48 jedinjenja (polisulfida sa opštom formulom $R_1-S_x-R_2$).

Ako se grafički predstavi zavisnost izračunatih RI vrednosti po jednačini 7 iz tabele 5.2.14 u zavisnosti od eksperimentalno dobijenih vrednosti RI dobija se prava prikazana na slici 5.2.5 čiji je $r^2 = 0.9989$.



Slika 5.2.5: Grafik izračunate vrednosti RI u zavisnosti od eksperimentalnih vrednosti RI

Najpre, data je jednačina 1 (tabela 5.2.14) ali vrednosti retencionih indeksa predviđenih ovom jednačinom su opterećene standardnom devijacijom od oko 12 RI jedinica. Nakon toga, podelili smo ugljenikove atome u dva lanca (R_1 i R_2 u jednačinama od 2 do 7, tabela) i dobili smo bolja predviđanja sa manjom standardnom devijacijom.

Iz jednačine 7 (tabela 5.2.14) može se zaključiti:

1. Doprinos sumpora retencionom indeksu je 220 RI jedinica po atomu;
2. Doprinos ugljenika retencionom indeksu je 94 RI jedinica po atomu (prosečno);
3. Prisustvo terminalne dvostrukе veze smanjuje retencioni indeks za 16.5 (u poređenju sa zasićenim homologom);
4. Prisustvo Z dvostrukе veze neznatno povećava retencioni indeks u poređenju sa zasićenim homologom);
5. Prisustvo E dvostrukе veze povećava retencioni indeks za 6.6 (u poređenju sa zasićenim homologom) ali ova tvrdnja nema statističku težinu zato što standardna devijacija iznosi 7;

5. REZULTATI I DISKUSIJA

6. Na osnovu statističke analize, ako se predviđeni indeks razlikuje od eksperimentalne vrednosti za više od 15 RI jedinica postoji 95% šanse da je to jedinjenje pogrešno identifikovano (2s pravilo)⁶;
7. Postoji rezidualni indeks od oko 90 RI jedinica u svim analiziranim jedinjenjima. Jednačina 7 (tabela 5.2.14) ne uzima kvantitativno u obzir C-S i S-S interakcije, čija je prosečna vrednost oko 90 RI jedinica.

Jednačina 7 (tabela 5.2.14) daje najlošije predviđanje za dimetil tetrasulfid (predviđeni RI ima nižu vrednost za 27 jedinica od eksperimentalne vrednosti). Međutim, sigurni smo da je dimetil tetrasulfid tačno identifikovan zato što je njegovo prisutstvo potvrđeno koinjektiranjem. Ova iregularnost se može objasniti visokim doprinosom mase S u molekulu dimetil tetrasulfida (a samim tim i povećanim S-S interakcijama).

U toku analiza esencijalnih ulja nađene su dve homologne serije polisulfida sa metilenskom grupom između dva sumporova atoma: $R_1\text{-SS-CH}_2\text{-S-CH}_3$ i $R_1\text{-SS-CH}(R_2)\text{-S-CH}_3$. Njihov retencioni indeks ne može se sa zadovoljavajućom sigurnošću predvideti datim jednačinama (tabela 5.2.14). Golovnya i saradnici (1979) primetili su da se princip aditivnosti grupe može primeniti na izračunavanje retencionog indeksa kod polisulfida. Jednačina koju su oni dali odnosi se samo na metil polisulfide. Naši eksperimentalni podaci su u saglasnosti sa njihovom jednačinom. Međutim, primećeno je da se ovaj princip može proširiti na ostale alkil-/alkenil-supstituente:

$$RI(R_1\text{-SS-CH}_2\text{-S-CH}_3) = RI(R_1\text{-SS-CH}_3) + \frac{1}{2} RI(CH_3\text{-S-S-CH}_3)$$

Takođe, primećeno je da druga, gore pomenuta, homologna serija ($R_1\text{-SS-CH}(R_2)\text{-S-CH}_3$) prati jednačinu:

$$RI(R_1\text{-SS-CH}(R_2)\text{-S-CH}_3) = RI(R_1\text{-SS-CH}_2R_2) + \frac{1}{2} RI(CH_3\text{-S-S-CH}_3) - 50$$

Ova jednačina se slaže sa dobro poznatim pravilom da grananje u molekulu snižava njegov retencioni indeks za oko 50 jedinica.

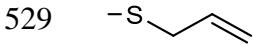
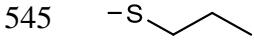
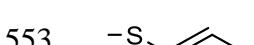
Analizirajući zavisnost RI od strukture moguće je pripisati određenu RI vrednost pojedinim grupama molekula (tabela 5.2.15). Računanje RI želenog jedinjenja se svodi na prosto sabiranje odgovarajućih vrednosti. Retencioni indeksi dobijeni računanjem na osnovu tabele 5.2.15 dobro se slažu ne samo sa polisulfidima opšte formule $R_1\text{-S}_x\text{-R}_2$, nego i sa polisulfidima sa opštim formulama $R_1\text{-SS-CH}_2\text{-S-CH}_3$ i $R_1\text{-SS-CH}(R_2)\text{-S-CH}_3$.

Prethodno pomenute jednačine (tabela 5.2.14) i podaci dati u tabeli 5.2.15 mogu biti vrlo korisni u brzoj, jednostavnoj i relativno preciznoj proceni retencionih indeksa velikog broja polisulfidnih jedinjenja.

⁶ 95.45% vrednosti leži u opsegu $srednja\ vrednost \pm 2 \cdot standardna\ devijacija$

5. REZULTATI I DISKUSIJA

Tabela 5.2.15: Srednje vrednosti RI nekih funkcionalnih grupa

RI	Grupa	RI	Grupa
220	-S-	-50	grananje
362	-S-Me	142	metil-
529		309	alil-
545		325	propil-
550		330	(Z)-propenil
553		333	(E)-propenil

Postoje određene teškoće u razlikovanju alil, propil i (E)- ili (Z)- homologa (alill-S_x-R, propil-S_x-R, (Z)-propenil-S_x-R i (E)-propenil-S_x-R). Analizirajući homologne serije polisulfida uočeno je da alil homolog ima najniži retencioni iznos (u poređenju sa ostala tri). Propil homolog ima od 10 do 17 jedinica višu vrednost od alil homologa i koristeći maseni spektar vrlo je lako razlikovati ih. Najteže je razlikovati (Z)-propenil od (E)-propenil homologa i literarni podaci (Golovnya i sar. 1979) uvek ukazuju na nešto viši retencioni indeks za (E)- izomer u odnosu na (Z)- izomer (1 do 7 RI jedinica, u ovoj studiji), pa smo se i mi time vodili prilikom identifikacije. U slučaju da je samo jedan propenil izomer prisutan u homolognoj seriji veoma je teško odrediti njegovu stereohemiju (nemoguće koristeći MS ili/i RI).

5. REZULTATI I DISKUSIJA

5.3 *Stachys germanica* L. (Lamiaceae)

Nadzemni delovi biljne vrste *Stachys germanica* L. (Lamiaceae) sakupljeni su u avgustu 2010. godine sa područja Svrliških planina u Jugoistočnoj Srbiji. Identitet biljne vrste je potvrđen od strane ovlašćenog biologa sa Departmana za Biologiju i Ekologiju, Prirodno-matematičkog fakulteta, Univerziteta u Nišu. Vaučer sa primerkom biljne vrste je deponovan u herbarijim pomenutog departmana pod brojem 5523.

Tabela 5.3.1 Analitički parametri metode kvantitativnog određivanja ispitivanih elemenata

Element	Talasna dužina detekcije ¹	LOD ²	LOQ ³	Koeficijent korelacije
B	208.959	0.339	1.13	0.9991
Ba	493.409	0.485	1.616	0.9981
Ca	317.933	1.046	3.488	0.9914
Cd	214.438	0.0015	0.005	1.0000
Cr	357.869	0.233	0.778	0.9996
Cu	324.754	0.101	0.336	0.9999
Fe	238.204	0.559	1.863	0.9975
Hg	184.950	0.005	0.0165	0.9967
K	404.721	0.272	0.906	0.9999
Mg	280.27	0.65	2.166	0.9967
Mn	260.569	0.523	1.745	0.9978
Na	588.995	0.056	0.185	0.9999
Ni	341.476	0.08	0.267	0.9999
Pb	220.353	0.0225	0.0751	1.0000
Zn	213.856	0.389	1.297	0.9988

¹Dato u nm; ²Limit detekcije, µg po g suve biljne mase; ³Limit kvantifikacije, µg po g suve biljne mase

5.3.1 Mineralni sastav

Niska granica detekcije i široki radni opseg za mnoge elemente čine ICP-OES metodu idealnom za analizu uzoraka biljnog porekla. U cilju određivanja sadržaja minerala u ispitivanim uzorcima, izvršena je priprema uzoraka po proceduri prikazanoj u delu 4.4.2. Zatim su određeni analitički parametri za ispitivane elemente i u tabeli 5.3.1 prikazane su odabране talasne dužine za svaki element, koeficijent korelacije i granice detekcije (LOD) i kvantifikacije (LOQ). Mineralni sastav različitih delova biljne vrste *S. germanica* (lista, cvetova, semena i stabljike) je određen ICP-OES metodom standardnog dodatka i dobijene vrednosti za K, Na, Ca, Mg, Cu, Fe, Zn, Ni, Cr, Mn, Ba i B su prikazane u tabelama 5.3.2 i

5. REZULTATI I DISKUSIJA

5.3.3. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm standardna devijacija tri uzastopna merenja. Vrednosti za Hg, Pb i Cd su ispod odgovarajućih limita detekcije i zbog toga su izostavljene iz tabele 5.3.3.

Tabela 5.3.2: Sadržaj najzastupljenijih elemenata po delovima biljne vrste S. Germanica (srednja vrednost \pm standardna devijacija, za 3 nezavisna merenja)

	Deo	Količina ¹	Dodato ¹	Nađeno ¹	Recovery (%)
Na	C	6.18 ± 0.05	5.00	11.06 ± 0.05	98
	L	5.60 ± 0.05	5.00	10.54 ± 0.05	99
	St	3.72 ± 0.05	5.00	8.53 ± 0.05	95
	Se	8.48 ± 0.05	5.00	13.65 ± 0.05	102
K	C	38.67 ± 0.06	10.00	50.22 ± 0.06	104
	L	34.36 ± 0.05	10.00	46.08 ± 0.05	105
	St	26.88 ± 0.08	10.00	37.96 ± 0.06	104
	Se	40.58 ± 0.08	10.00	51.39 ± 0.08	102
Ca	C	4.24 ± 0.03	5.00	9.37 ± 0.03	103
	L	6.68 ± 0.06	5.00	11.55 ± 0.06	98
	St	4.69 ± 0.05	5.00	9.46 ± 0.05	95
	Se	7.66 ± 0.06	5.00	12.35 ± 0.06	96
Mg	C	0.41 ± 0.01	0.50	0.89 ± 0.01	96
	L	0.51 ± 0.01	0.50	0.98 ± 0.01	95
	St	0.29 ± 0.01	0.50	0.81 ± 0.01	106
	Se	0.76 ± 0.01	0.50	1.29 ± 0.01	104

¹mg po g suvog biljnog materijala; C-cvast; L-list; St-stabljika; Se-seme;

U analiziranim uzorcima najzastupljeniji su alkalni (Na, K) i zemnoalkalni (Ca, Mg) metali, dok su biološki važni elementi (Fe, Cu, Zn, Mn) u sledećoj grupi po zastupljenosti. Makroelement kalijum je prisutan u najvećoj količini u svim analiziranim biljnim delovima, a najveća koncentracija je nađena u semenu (40.58 ± 0.08 mg/g sbm, tabela 5.3.2). Najzastupljeniji mikroelement je gvožđe (199.2 ± 0.8 µg/g sbm. u listovima), za kojim slede cink (45.5 ± 0.3 µg/g sbm u semenu) i bakar (32.2 ± 0.1 µg/g sbm u semenu). Iako barijum ne spada u esencijalne elemente on je nađen u uzorcima u količini od 15.4 do 30.6 µg/g sbm, što je relativno mnogo u poređenju sa količinama mikroelemenata. To je, verovatno, posledica njegove velike hemijske sličnosti sa kalcijumom pa ih biljke zajedno usvajaju iz zemlje. Najveća količina bora nađena je u cvetovima (10.2 ± 0.1 µg/g sbm.)

5. REZULTATI I DISKUSIJA

*Tabela 5.3.3: Sadržaj mikroelemenata po delovima biljne vrste *S. Germanica* (srednja vrednost ± standardna devijacija, za 3 nezavisna merenja)*

	Deo	Količina ¹	Dodato ¹	Nađeno ¹	Recovery (%)
Fe	C	96.7 ± 0.7	50.0	149.62 ± 0.7	102
	L	199.2 ± 0.8	50.0	261.6 ± 0.8	105
	St	45.8 ± 0.5	50.0	101.6 ± 0.5	106
	Se	102.7 ± 0.8	50.0	146.6 ± 0.8	96
Cu	C	13.4 ± 0.1	10.0	22.2 ± 0.1	95
	L	13.5 ± 0.1	10.0	24.5 ± 0.1	104
	St	13.3 ± 0.1	10.0	25.0 ± 0.1	107
	Se	32.3 ± 0.1	10.0	41.0 ± 0.1	97
Zn	C	23.7 ± 0.2	10.0	35.7 ± 0.2	106
	L	24.9 ± 0.3	10.0	36.0 ± 0.3	103
	St	28.2 ± 0.2	10.0	40.1 ± 0.2	105
	Se	45.5 ± 0.3	10.0	54.4 ± 0.3	98
Mn	C	6.94 ± 0.06	10.0	18.0 ± 0.1	106
	L	11.8 ± 0.1	10.0	22.7 ± 0.1	104
	St	3.04 ± 0.05	10.0	12.8 ± 0.1	98
	Se	9.68 ± 0.07	10.0	19.3 ± 0.1	98
Cr	C	0.80 ± 0.01	5.00	5.74 ± 0.01	99
	L	3.28 ± 0.03	5.00	7.95 ± 0.03	96
	St	1.45 ± 0.02	5.00	6.84 ± 0.02	106
	Se	2.78 ± 0.02	5.00	8.17 ± 0.02	105
Ba	C	15.4 ± 0.6	10.0	26.2 ± 0.6	103
	L	30.6 ± 0.5	10.0	41.0 ± 0.5	101
	St	28.1 ± 0.3	10.0	39.6 ± 0.3	104
	Se	30.0 ± 0.5	10.0	39.6 ± 0.5	99
B	C	10.2 ± 0.1	10.0	19.0 ± 0.1	94
	L	9.3 ± 0.1	10.0	18.2 ± 0.1	94
	St	9.3 ± 0.1	10.0	19.7 ± 0.1	102
	Se	6.1 ± 0.1	10.0	16.8 ± 0.1	104
Ni	C	1.93 ± 0.05	5.00	6.93 ± 0.05	100
	L	4.70 ± 0.08	5.00	9.80 ± 0.08	101
	St	1.58 ± 0.06	5.00	6.19 ± 0.06	94
	Se	4.71 ± 0.06	5.00	10.29 ± 0.06	106

¹µg po g suvog biljnog materijala; C-cvast; L-list; St-stabljika; Se-seme;

5. REZULTATI I DISKUSIJA

5.3.2 Sadržaj fenola i flavonoida i antioksidantna aktivnost

Fenolna jedinjenja (fenolne kiseline i flavonoidi) su prirodni konstituenti biljaka i to su sekundarni metaboliti čija funkcija nije do kraja razjašnjena (Ghasemzadeh i Ghasemzadeh, 2011). Ekstrakcionala efikasnost metanola u kombinaciji sa ultrazvučnom ekstrakcijom je bila 25.1 i 36.6 % (m/m) za cvet i list. Sadržaj totalnih fenola (TP) u metanolnom ekstraktu *S. germanicae* je 75.0 ± 2.0 and 43.0 ± 1.0 mg of GAE/g sbm, za cvet i list. Dobijeni rezultati su slični rezultatima Kukića i saradnika (2006) koji su određivali TP u metanolnim ekstraktima četiri vrste iz roda *Stachys* i našli sadržaj fenola od 66 do 190 mg CE/g sbm. Sadržaj ukupnih flavonoida u cvetovima i listovima je 54.0 ± 1.0 i 33.0 ± 1.0 CE/g sbm.

Značaj antioksidanasa iz biljnog materijala u unapređenju zdravlja i zaštiti od srčanih oboljenja i raznih oblika raka je predmet istraživanja naučnika u poslednjih nekoliko dekada. Takođe, aktuelan je trend među proizvođačima i potrošačima da se dobije funkcionalna hrana koja osim nutritivne vrednosti može da bude i promoter zdravlja. Za fenolna jedinjenja se zna da ispoljavaju više bioloških efekata, između ostalih poseduju vrlo izraženu antioksidativnu aktivnost. Prisustvo različitih antioksidantnih komponenti u tkivu biljaka, čini vrlo teškim merenje svake antioksidantne komponente posebno. Zbog toga su u poslednjih nekoliko godina razvijene mnoge metode za merenje antioksidantne aktivnosti bioloških uzoraka (Kahonen i sar., 1999).

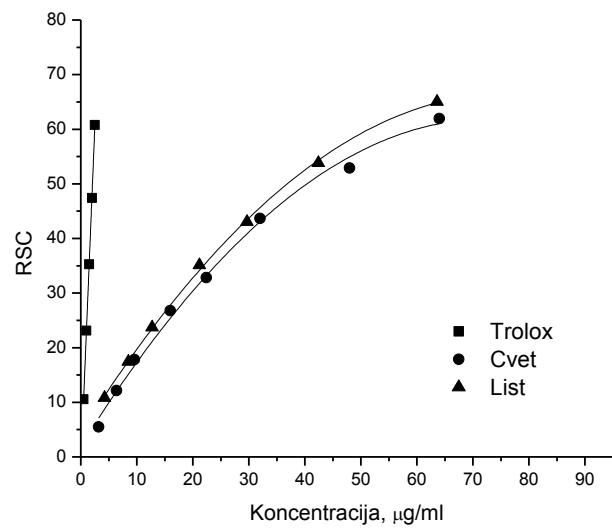
Antioksidantni kapacitet metanolnih ekstrakta lista i cveta *S. germanicae* je ispitivan kroz četiri *in vitro* antioksidanta testa (DPPH, ABTS, FRAP i IRA).

1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil radikal (DPPH) je stabilan azotni radikal koji menja boju od ljubičaste u žutu kada se redukuje. Zavisnost sposobnosti hvatanja DPPH radikala metanolnih ekstrakta lista i cveta od koncentracije suvog ostatka prikazana je na slici 5.3.1. ABTS metoda je bazirana na sposobnosti antioksidanta da redukuje ABTS katjon radikal, pri čemu etanolni rastvor gubi karakterističnu modrozelenu boju i prelazi u bezbojan. Sposobnost hvatanja ABTS radikala ispitivanih ekstrakta prikazana je na slici 5.3.2.

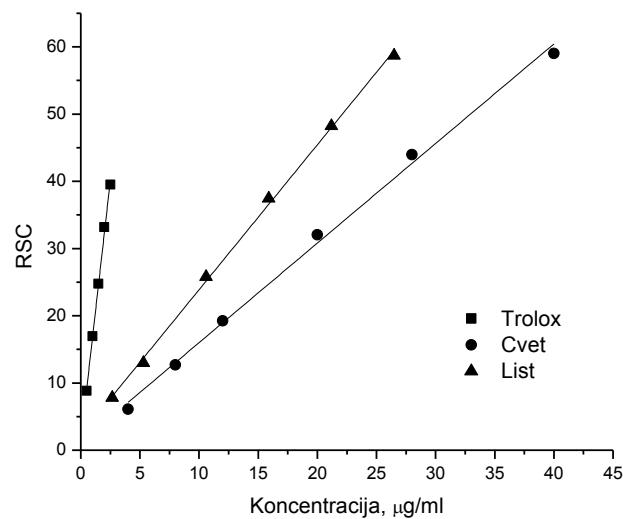
Ekstrakt lista pokazuje bolju radikal hvatačku sposobnost (RSC) kako stabilnijeg DPPH tako i manje stabilnog ABTS radikala (34 ± 3 i 60 ± 2 mg TE/g sbm) u poređenju sa ekstraktom cveta (27 ± 2 i 29 ± 1 mg TE/g sbm).

FRAP i IRA pružaju drugačiji pogled na reduktivnu sposobnost ispitivanih uzoraka. Ove metode se baziraju na redukciji Fe^{3+} do Fe^{2+} . Kod IRA metode, redukuje se ferocijanidni do ferocijanidnog kompleksa dok se kod FRAP metode redukuje fero-TPTZ do fери-TPTZ kompleksa. Ekstrakt lista je pokazao i u ovim metodama bolji antioksidantni kapacitet (117 ± 3 $\mu\text{mol Fe}^{2+}$ eq /g sbm i 35.0 ± 0.9 mg GAE/g sbm, za FRAP i IRA) u odnosu na ekstrakt cveta (56 ± 2 $\mu\text{mol Fe}^{2+}$ eq /g sbm. i 19.1 ± 0.4 mg GAE/g sbm, za FRAP i IRA). Povećanje reduktivne sposobnosti u FRAP i IRA metodi sa povećanjem koncentracije ekstrahovane materije prikazano je na slikama 5.3.3 i 5.3.4.

5. REZULTATI I DISKUSIJA

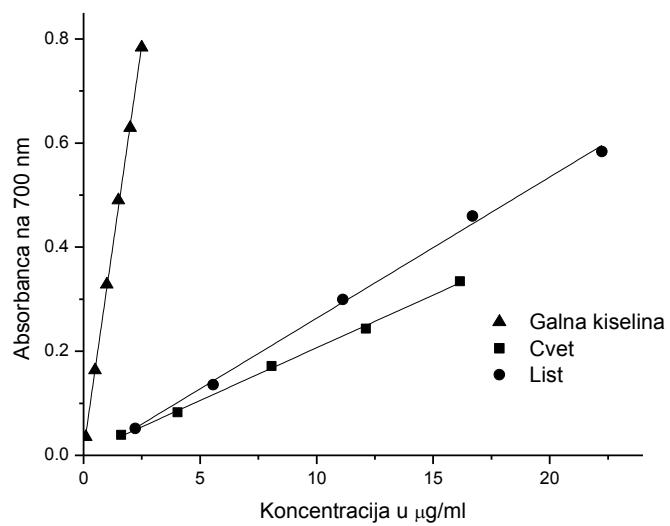


Slika 5.3.1 Zavisnost DPPH hvatačke sposobnosti metanolnih ekstrakta od koncentracije

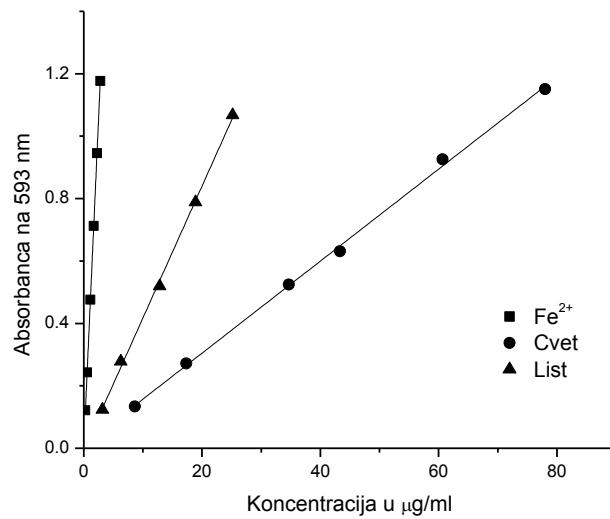


Slika 5.3.2 Zavisnost ABTS hvatačke sposobnosti metanolnih ekstrakta od koncentracije

5. REZULTATI I DISKUSIJA



Slika 5.3.3 Zavisnost reduktivne sposobnosti metanolnih ekstrakta od koncentracije (IRA metoda)



Slika 5.3.4 Zavisnost reduktivne sposobnosti metanolnih ekstrakta od koncentracije (FRAP metoda)

5. REZULTATI I DISKUSIJA

5.3.3 HPLC fenolni profil

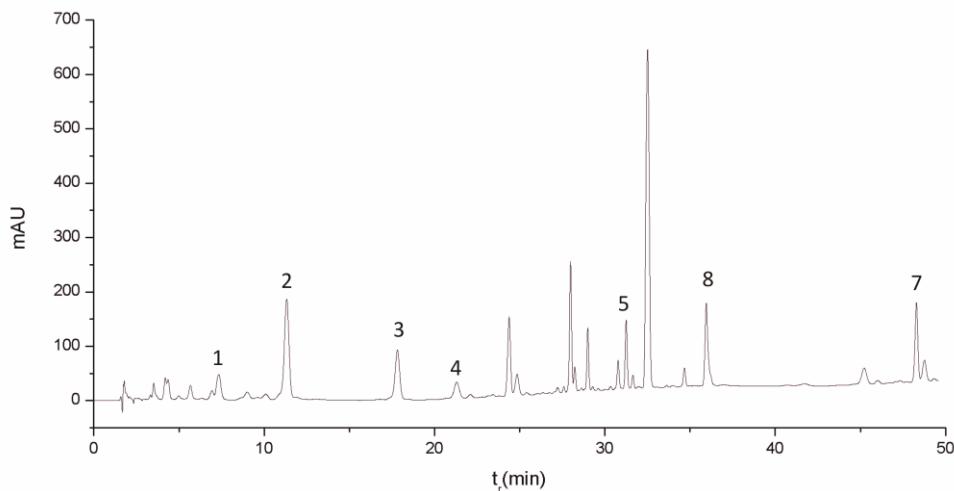
HPLC analiza metanolnih ekstrakta cveta i lista *S. germanica*-e pokazuju da su iste fenolne kiseline prisutne i u oba ekstrakta: ferulna, *p*-kumarna i kafena kiselina (tabela 5.3.4). Ove kiseline su identifikovane i kvantifikovane poređenjem retencionog vremena i UV-VIS spektra analizirane kiseline i standarda. Derivati ferulne, *p*-kumarne i kafene kiseline imaju UV-VIS spektar podudaran sa odgovarajućom kiselinom, ali drugačije retenciono vreme. Sadržaj slobodnih kiselina u metanolnom ekstraktu cveta je nešto viši u odnosu na sadržaj u ekstraktu lista (3.65 u poređenju sa 3.47 mg/g sbm). Značajno manji sadržaj fenolnih jedinjenja, koji nađen HPLC analizom (*c.a.* 13.1 i 8.8 mg za ekstrakt lista i cveta), u odnosu na UV-VIS spektrofotometrijsku analizu (75 i 43 mg za list i cvet) se može objasniti time, da je dobar deo fenolnih jedinjenja vezan glikozidnom vezom sa ugljenim hidratima ili se nalazi u obliku polimera i nije ih lako detektovati i kvantifikovati u HPLC hromatogramu. HPLC analiza je pokazala da su i slobodni flavonoidi prisutni u analizitanim ekstraktima. Nađeni su katehin, hesperetin i rutin (tabela 5.3.4).

*Tabela 5.3.4: Fenolni sadržaj metanolnih ekstrakta lista i cveta biljne vrste *Stachys germanica* L.*

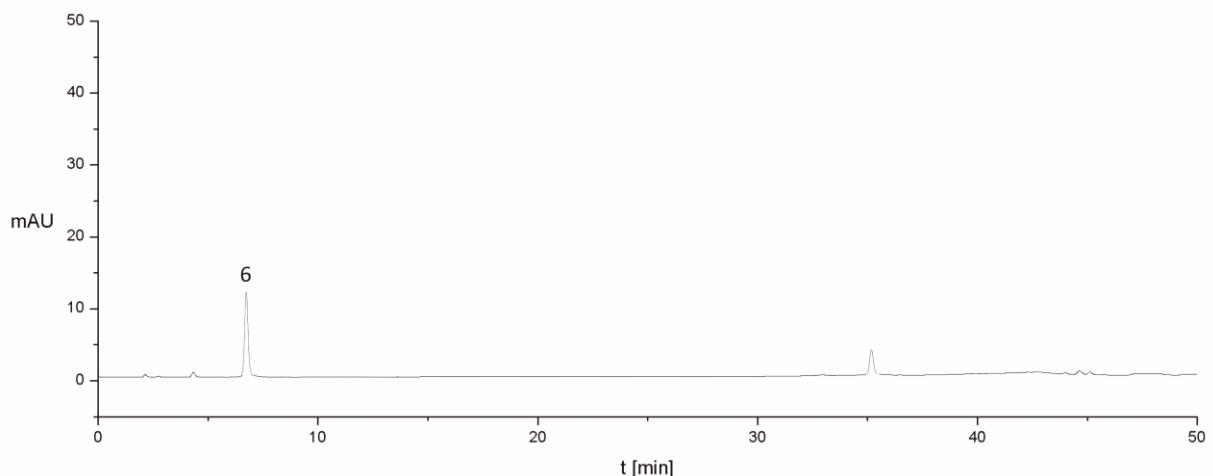
Retenciono vreme (min)		Sadržaj ¹ mg/g sbm.
<i>Stachys germanica</i> L. (cvet)		
1	Kafena kiselina (derivat)	0.49 ± 0.01
2	Kafena kiselina	1.71 ± 0.01
3	<i>p</i> -kumarna kiselina	0.44 ± 0.01
4	Ferulna kiselina	1.50 ± 0.01
5	Ferulna kiselina (derivat)	3.25 ± 0.01
6	Katehin	0.10 ± 0.01
7	Hesperetin	0.09 ± 0.01
8	Rutin	1.17 ± 0.01
<i>Stachys germanica</i> L. (list)		
1	Kafena kiselina (derivat)	0.65 ± 0.01
2	Kafena kiselina	2.82 ± 0.01
3	<i>p</i> -kumarna kiselina	0.50 ± 0.01
4	Ferulna kiselina	0.15 ± 0.01
5	Ferulna kiselina (derivat)	7.46 ± 0.01
6	Katehin	0.12 ± 0.01
7	Hesperetin	0.11 ± 0.01
8	Rutin	1.28 ± 0.01

¹Srednja vrednost ± standardna devijacija

5. REZULTATI I DISKUSIJA

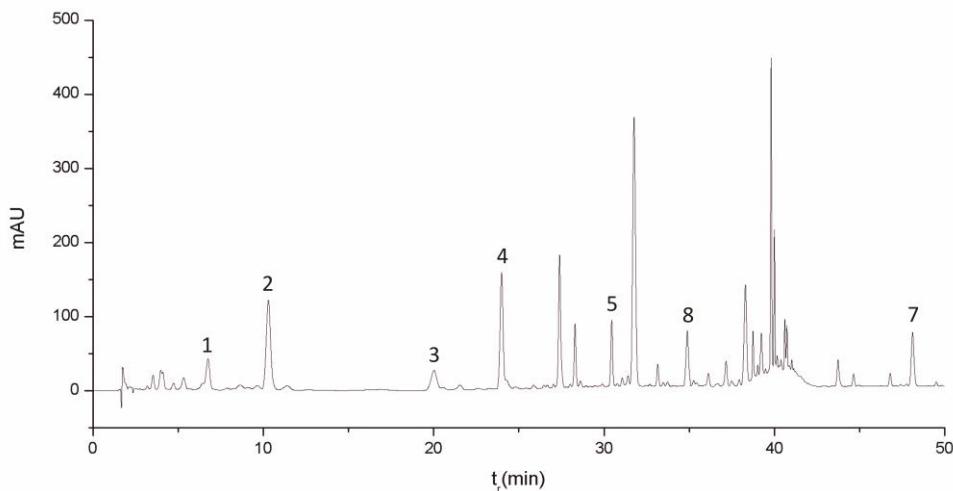


Slika 5.3.5: HPLC hromatogram metanolnog ekstrakta lista *S. germanica*-e sniman na 320 nm (1-derivat kafene kiselina, 2-kafena kiselina, 3-p-kumarna kiselina, 4-ferulna kiselina, 5-derivat ferulne kiselina, 7-hesperetin, 8-rutin)

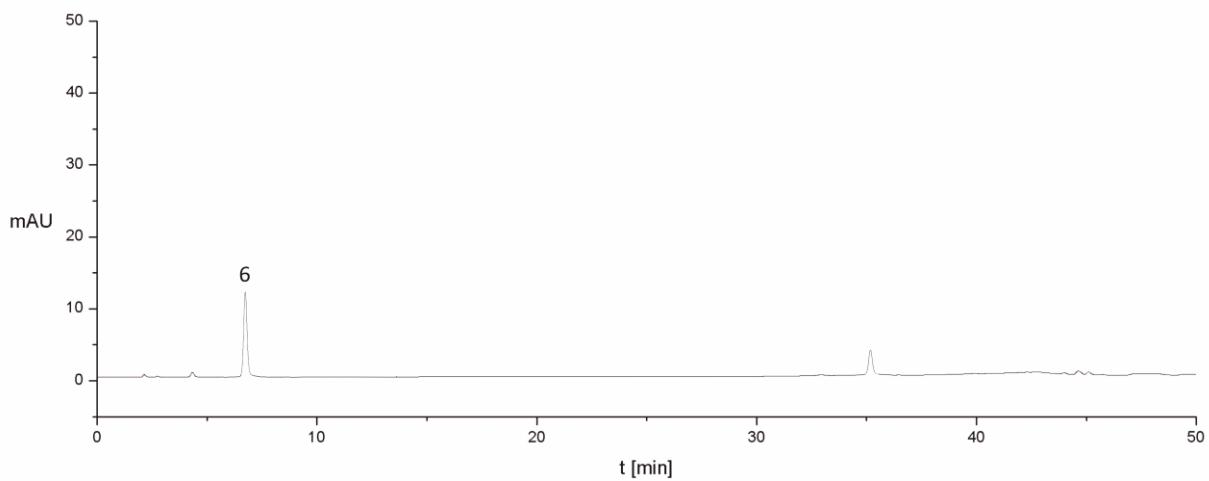


Slika 5.3.6: HPLC hromatogram metanolnog ekstrakta lista *S. germanica*-e sniman na fluorescentnom detektoru sa talasnom dužinom ekscitacije od 275 nm i talasnom dužinom detekcije od 322 nm (6-katehin)

5. REZULTATI I DISKUSIJA



Slika 5.3.7: HPLC hromatogram metanolnog ekstrakta cveta *S. germanica*-e sniman na 320 nm (1-derivat kafene kiseline, 2-kafena kiselina, 3-p-kumarna kiselina, 4-ferulna kiselina, 5-derivat ferulne kiseline, 7-hesperetin, 8-rutin)



Slika 5.3.8: HPLC hromatogram metanolnog ekstrakta cveta *S. germanica*-e sniman na fluorescentnom detektoru sa talasnom dužinom ekscitacije od 275 nm i talasnom dužinom detekcije od 322 nm (6-katehin)

Na slikama 5.3.5, 5.3.6, 5.3.7 i 5.3.8 dati su HPLC hromatogrami metanolnih ekstrakta lista i cveta *S. germanica*-e snimljeni na 320 nm i fluorometrijskim detektorom. Identifikovani pikovi su obeleženi sa brojevima od 1 do 8 (u skladu sa tabelom 5.3.4) dok su neki pikovi

5. REZULTATI I DISKUSIJA

ostali neidentifikovani. Na hromatogramu snimanom fluorometrijskom detekcijom sa talasnom dužinom ekscitacije od 275 nm i talasnom dužinom detekcije od 322 nm postoji samo jedan pik koji potiče od katehina.

5.4 *Primula veris* L. (Primulaceae)

Nadzemni i podzemni delovi biljne vrste *Primula veris* L. (Primulaceae) prikupljeni su u maju 2012 sa područja Svrliških planina ($43^{\circ}24'36''$ N; $22^{\circ}11'6''$ E) u Jugoistočnoj Srbiji. Identitet biljne vrste je potvrđen od strane ovlašćenog biologa sa Departmana za Biologiju i Ekologiju, Prirodno-matematičkog fakulteta, Univerziteta u Nišu. Vaučer sa primerkom biljne vrste je deponovan u herbarijim pomenutog departmana pod brojem 6580.

5.4.1 Mineralni sastav

Mineralni sastav pojedinih delova (cvet, list i koren) biljne vrste *P. veris* kao i dobijenog čaja određen je ICP-OES metodom i predstavljen u tabeli 5.4.5. Dobijen je sadržaj elemenata: Al, B, Ba, Ca, Cr, Cu, Fe, K, Li, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, P, Pb, Sb, Si, Sr, V i Zn. Svaki dobijeni rezultat predstavlja srednju vrednost dobijenu iz tri zasebna nezavisna merenja i dat je kao srednja vrednost \pm standardna devijacija. Srednje vrednosti i standardne devijacije su zaokružene vodeći računa o pouzdanim ciframa.

Koncentracije toksičnih elemenata: arsena, kadmijuma, žive i olova bile su ispod odgovarajućih limita detekcije i zbog toga su izostavljeni iz tabele 5.4.5.

U analiziranim uzorcima najzastupljeniji su alkalni (Na, K) i zemnoalkalni (Ca, Mg) metali za kojima slede mikroelementi. Nađen je veoma veliki sadržaj aluminijuma i silicijuma (2220 ± 80 i 1720 ± 40 ppm) u korenu. Ova dva metala su jako zastupljena u zemljištu a kako je koren jagorčevine jako razgranat može se lako desiti da čestice zemlje zaostanu na korenu nakon pranja. Time se može objasniti visoki sadržaj aluminijuma i silicijuma koji je naden prilikom analize korena.

Među elementima prisutnim u pripremljenim čajevima od delova jagorčevine (koren, cvet, list) najzastupljeniji su kalijum, kalcijum, magnezijum, fosfor i natrijum (tabela 5.4.5), koji se ekstrahuju u miligramskim količinama po gramu suve biljne mase. Nakon njih, najviše ima silicijuma i gvožđa. Hrom i molibden se već i u suvom biljnom materijalu nalaze u količinama manjim od mikrograma (računato na g sbm) tako da se u čajevima nalaze u koncentracijama koje su ispod odgovarajućeg limita detekcije.

Ako se količina metala koji se nalazi u čaju (računato po g sbm) podeli količinom metala u biljnoj materiji od koje je spravljen čaj (takođe, računato po g sbm) dobija se stepen ekstrakcije, odnosno ekstrakciona efikasnost datog metala (tabela 5.4.6) (Szymczyscha-Madeja i sar., 2012). Tako se, ovi metali, mogu podeliti na (Szymczyscha-Madeja i sar., 2012):

- 1) Visoko ekstraktibilne (stepen ekstrakcije je veći od 55%): Cu, P, Na, Mn, Ni.

5. REZULTATI I DISKUSIJA

- 2) Srednje ekstraktibilne (stepen ekstrakcije između 20 i 55%): B, Ba, Ca, K, Mg, Sr, V, Zn.
- 3) Slabo ekstraktibilne (stepen ekstrakcije je manji od 20%): Al, Fe, Li, Sb, Si.

Tabela 5.4.5: Mineralni sastav delova biljne vrste P. veris i čaja pripremljenog od istih

	Koren	Cvet	List	Čaj		
				Koren	Cvet	List
Al ²	2220 ± 80	75.6 ± 1	82.3 ± 2.4	39.8 ± 1.3	2.48 ± 0.1	3.07 ± 0.07
B ²	19.7 ± 0.6	27.7 ± 0.8	19.6 ± 0.4	7.86 ± 0.1	17.9 ± 0.7	8.1 ± 0.3
Ba ²	12.4 ± 0.1	2.15 ± 0.05	2.64 ± 0.05	1.54 ± 0.05	0.78 ± 0.03	0.85 ± 0.03
Ca ¹	11.0 ± 0.6	6.9 ± 0.1	13.1 ± 0.5	2.24 ± 0.08	2.18 ± 0.09	1.84 ± 0.06
Cr ²	1.85 ± 0.06	0.177 ± 0.005	0.162 ± 0.005	ild	ild	ild
Cu ²	7.23 ± 0.05	5.00 ± 0.08	5.08 ± 0.08	3.92 ± 0.04	2.85 ± 0.08	3.02 ± 0.06
Fe ²	690 ± 40	40.4 ± 0.5	41.9 ± 0.5	20.8 ± 0.3	6.86 ± 0.08	5.68 ± 0.08
K ¹	16.8 ± 0.7	27.6 ± 0.4	41.4 ± 0.9	5.05 ± 0.04	8.05 ± 0.04	9.52 ± 0.04
Li ²	11.9 ± 0.3	18.6 ± 0.5	16.3 ± 0.3	0.150 ± 0.005	0.090 ± 0.004	0.090 ± 0.003
Mg ¹	2.57 ± 0.05	2.18 ± 0.05	1.65 ± 0.08	0.93 ± 0.02	0.69 ± 0.02	0.85 ± 0.02
Mn ²	13.5 ± 0.3	17.6 ± 0.6	14.1 ± 0.4	8.50 ± 0.08	8.30 ± 0.05	7.40 ± 0.06
Mo ²	0.177 ± 0.006	0.068 ± 0.002	0.065 ± 0.001	ild	ild	ild
Na ²	228 ± 8	379 ± 5	358 ± 8	139 ± 2	225 ± 5	241 ± 4
Ni ²	2.32 ± 0.03	1.37 ± 0.02	1.52 ± 0.01	1.02 ± 0.09	0.96 ± 0.02	0.82 ± 0.08
P ¹	2.10 ± 0.06	3.06 ± 0.09	3.02 ± 0.09	1.75 ± 0.02	2.18 ± 0.08	2.01 ± 0.08
Sb ²	340 ± 10	20.1 ± 0.3	23.7 ± 0.8	18.0 ± 0.2	5.5 ± 0.1	4.85 ± 0.05
Si ²	1720 ± 40	112 ± 5	132 ± 3	98.4 ± 4.5	28.8 ± 0.6	25.6 ± 0.6
Sr ²	3.35 ± 0.05	1.85 ± 0.08	4.03 ± 0.05	0.84 ± 0.02	0.67 ± 0.02	0.96 ± 0.03
V ²	3.35 ± 0.08	0.63 ± 0.01	0.78 ± 0.01	1.82 ± 0.12	0.22 ± 0.04	0.37 ± 0.08
Zn ²	12.0 ± 0.6	16.0 ± 0.4	12.7 ± 0.6	6.20 ± 0.08	8.61 ± 0.08	3.25 ± 0.05

¹dato u mg/g sbm; ²dato u µg/g sbm; ild-ispod limita detekcije.

Oslobađanje metala u čaj zavisi od jačine veze kojom je on vezan za organski matriks kao i od rastvorljivosti datog metala u vodi. To jako zavisi od vrste čaja i koncentracije samog metala u biljnoj masi. Mnogi elementi, naročito metali, u biljnem tkivu su kompleksirani sa flavonolima, kateholima, taninima i polifenolima. Utvrđeno je da tanini jako vezuju aluminijum, hrom, bakar i gvožđe (Costa i sar., 2002). Tako, aluminijum i bakar spadaju u grupu elemenata koji se slabo ekstrakuju.

5. REZULTATI I DISKUSIJA

Tabela 5.4.6: Procenat ekstrakcije pojedinih metala u čaju P. veris

	% ekstrakcije		
	Koren	Cvet	List
Al	1.8	3.3	3.7
B	39.9	64.6	41.3
Ba	12.4	36.3	32.2
Ca	20.4	31.6	14.0
Cu	54.2	57.0	59.4
Fe	3.0	17.0	13.6
K	30.1	29.2	23.0
Li	1.3	0.5	0.6
Mg	36.2	31.7	51.5
Mn	63.0	47.2	52.5
Na	61.0	59.4	67.3
Ni	44.0	70.1	53.9
P	83.3	71.2	66.6
Sb	5.3	27.4	20.5
Si	5.7	25.7	19.4
Sr	25.1	36.2	23.8
V	54.3	34.9	47.4
Zn	51.7	53.8	25.6

Temperatura vode, njena pH vrednost kao i vreme pripreme čaja imaju veliki uticaj na stepen ekstrakcije metala iz čaja. Smanjenje pH upotrebljene vode povećava ekstrakciju elemenata iz biljne sirovine zahvaljujući rastvorljivijim katjonskim vrstama (na primer, za aluminijum pri pH<5) (Mossion i sar., 2008).

5.4.2 Antioksidantna aktivnost

Osušeni uzorci biljne vrste *P. veris* ekstrakovani su rastvaračima: metanol, etanol, aceton, voda i voda-metanol (1:1, v/v) i to svaki deo biljne vrste posebno (rizom, list i cvet). Takođe, paralelno sa ekstraktima analiziran je i čaj spremlijen od svakog dela ponaosob.

Antioksidantna aktivnost svakog ekstrakta (i čaja) određena je kroz četiri *in vitro* antioksidativna testa (ABTS, DPPH, FRAP i CUPRAC), određen je ukupan sadržaj fenola i flavonoida (TP i TF) i nađena je njihova međusobna korelacija.

*Tabela 5.4.1 Sadržaj ukupnih fenola (TP) i flavonoida (TF) u ekstraktima biljne vrste *P. veris**

	Rastvarač	TP ¹	TF ²
Cvet	Metanol	152 ± 4a	55.4 ± 0.1a
	Etanol	131 ± 4b	45.1 ± 0.13b
	Aceton	71.6 ± 0.2c	22.4 ± 0.23c
	Voda	108 ± 2d	34.6 ± 0.23d
	Voda/metanol	118 ± 1e	40.7 ± 0.23e
	Čaj	96.1 ± 0.5f	27.1 ± 0.43f
List	Metanol	75.0 ± 0.6g	30.2 ± 0.1g
	Etanol	65.3 ± 0.5h	23.1 ± 0.2h
	Aceton	41.7 ± 0.4i	15.6 ± 0.2i
	Voda	56.6 ± 0.4j	13.8 ± 0.2j
	Voda/metanol	54.50 ± 0.5k	13.1 ± 0.2j
	Čaj	51.6 ± 0.5l	11.4 ± 0.2k
Koren	Metanol	27.3 ± 0.3m	10.1 ± 0.3l
	Etanol	19.3 ± 0.6n	7.4 ± 0.1m
	Aceton	15.0 ± 0.5o	6.3 ± 0.1n
	Voda	15.7 ± 0.5o	4.2 ± 0.1o
	Voda/metanol	17.9 ± 0.5p	5.5 ± 0.1p
	Čaj	10.1 ± 0.2q	2.5 ± 0.1q

¹izraženo u mg GAE/g sbm; ²izraženo u mg CE/g sbm; vrednosti sa različitim slovima u istoj koloni su statistički značajno različite za $p<0.05$ kada se koristi ANOVA Tukey *post hoc* test.;

Količina totalnih fenola (TP) u ekstraktima jagorčevine se nalazi u opsegu od 10.1 do 152 mg GAE/g sbm, a najviša je u metanolnom ekstraktu cveta (Tabela 5.4.1). Sadržaj flavonoida (TF) takođe je najviši u metanolnom ekstraktu cveta, 55.4 mg CE/g sbm, a najniži u čaju korena, 2.5 mg CE/g sbm. Ako se rastvarači poređaju po efikasnosti vidi se da metanol najbolje ekstrahuje fenolna jedinjenja iz biljnog materijala, zatim slede etanol, smeša voda/metanol, voda i na kraju aceton. Postupkom kakav se primenjuje pri pripremi čaja iz biljne droge se ekstrahuje najmanje fenola, a pošto se u narodnoj medicini upotrebljava

isključivo čaj jagorčevine može se zaključiti da oko jedne trećine fenola ostane neekstrahovano, a samim tim i neiskorišćeno.

Kada se posmatra sadržaj fenola i flavonoida u istom ekstrakcionom sredstvu može se primetiti da je najviši sadržaj u cvetovima, zatim lišću dok je u korenju najniži. Ovo važi za svaki rastvarač. Visok sadržaj fenola i flavonoida u cvetu ne iznenađuje, zato što su flavonoidi biljni pigmenti pa je samim tim prirodno da se nalaze u cvetovima.

Sadržaj fenola i flavonoida u čajevima (Veljković i sar., 2013) varira od 26 do 241 mg GAE/g sbm (TF), odnosno od 12 do 85 mg CE/g sbm (TF). Poređenjem ovih vrednosti sa odgovarajućim vrednostima za jagorčevinu može se reći da su cvetovi i listovi jagorčevine bogat izvor prirodnih fenola, odnosno flavonoida.

Svi testirani ekstrakti pokazali su određenu antioksidativnu aktivnost, a dobijene vrednosti sumirane su u tabeli 5.4.2. Rezultati su predstavljeni u obliku srednje vrednosti tri nezavisna merenja ± standardna devijacija. Antioksidantne sposobnosti se veoma razlikuju i zavise od rastvarača koji je upotrebljen za ekstrakciju.

Najbolju hvatačku sposobnost ABTS⁺ radikala pokazao je metanolni ekstrakt (145 ± 3 mg TE/g sbm) za kojim sledi etanolni (114 ± 2 mg TE/g sbm). DPPH[·] radikal je nešto stabilniji od ABTS⁺ radikala pa su i vrednosti dobijene ovom metodom niže od odgovarajućih vrednosti u prethodnoj. Slično kao i u prethodnoj metodi, najbolju hvatačku sposobnost DPPH[·] radikala je pokazao metanolni ekstrakt (52.2 ± 0.1 mg TE/g sbm). FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) je metoda koja se bazira na sposobnosti ispitivane vrste (u ovom slučaju ekstrakta) da redukuje gvožđe(III) do gvožđa(II). Rezultati dobijeni ovom metodom se nalaze u opsegu od 0.053 do 1.22 mmol Fe²⁺/g sbm pri čemu je najveću vrednost pokazao metanolni ekstrakt. CUPRAC metoda se, kao i prethodna, bazira na reakciji oksidoredukcije ali u ovom slučaju na redukciji bakra(II) do bakra(I) a aktivnost koju su pokazali ekstrakti se nalazi u opsegu od 14.2 do 245 mg TE/g sbm.

Antioksidantna sposobnost više vrsta čajeva (Veljković i sar., 2013) ispitivana FRAP metodom se kreće od 0.127 do 1.800 mmol Fe²⁺/g sbm, odnosno nalazi se u opsegu od 15.5 do 45.0 mg TE/g sbm kada se ispituje DPPH metodom. Ako se antioksidantni kapacitet čajeva *P. veris* uporedi sa datim rezultatima uočava se: da je on istog reda veličine; da se FRAP vrednosti čaja cveta i korena nalaze unutar opsega dok su DPPH vrednosti nešto niže od navedenog opsega

Mnogi prirodni antioksidanti su multifunkcionalni (Veljković i sar., 2013), odnosno mogu na više načina ispoljiti svoje antioksidantno dejstvo. Tako, oni mogu direktno vezivati slobodne radikale u manje reaktivnu formu. Drugi način dejstva je transfer vodonikovog atoma radikalu koji se tom prilikom neutrališe, a sam antioksidant postaje slobodni radikal koji je mnogo stabilniji od neutralisanog. Takođe, moguć je i elektron transfer sa antioksidanta na slobodni radikal. Osim navedenih načina, prirodni antioksidanti mogu helatirati prelazne metale i tako sprečavati njihovu ulogu u katalizi oksidativnih reakcija, a kao posledica toga date reakcije postaju sporije.

Tabela 5.4.2 Antioksidantna aktivnost ekstrakta biljne vrste *P. veris*

	Rastvarač	CUPRAC ¹	FRAP ²	DPPH ¹	ABTS ¹
Cvet	Metanol	245 ± 2a	1.22 ± 0.03a	52.2 ± 0.1a	145 ± 3a
	Etanol	205 ± 2b	0.95 ± 0.02b	45.8 ± 0.2b	114 ± 2b
	Aceton	95 ± 2c	0.41 ± 0.01c	29.8 ± 0.2c	68 ± 1c
	Voda	167 ± 2d	0.70 ± 0.02d	37.5 ± 0.3d	84 ± 1d
	Voda/metanol	190 ± 1e	0.75 ± 0.01e	39.9 ± 0.2e	109 ± 2e
	Čaj	140 ± 1f	0.59 ± 0.01f	31.4 ± 0.2f	61 ± 1f
List	Metanol	110 ± 1g	0.404 ± 0.008c	24.5 ± 0.3g	51 ± 1g
	Etanol	87 ± 1h	0.292 ± 0.001g	24.5 ± 0.2g	34.5 ± 0.2h
	Aceton	47 ± 1i	0.130 ± 0.006h	15.8 ± 0.3h	16.2 ± 0.1ik
	Voda	67 ± 1j	0.209 ± 0.001i	16.5 ± 0.3i	23.6 ± 0.1j
	Voda/metanol	65 ± 1j	0.204 ± 0.004i	13.7 ± 0.2j	25.5 ± 0.1j
	Čaj	64 ± 1j	0.183 ± 0.002i	15.6 ± 0.2h	18.4 ± 0.1k
Koren	Metanol	39.4 ± 0.3k	0.178 ± 0.003i	18.7 ± 0.1k	23.4 ± 0.1j
	Etanol	28.4 ± 0.3l	0.114 ± 0.003h	19.0 ± 0.1k	15.2 ± 0.1kl
	Aceton	15.8 ± 0.2m	0.065 ± 0.003j	11.6 ± 0.1l	13.6 ± 0.1il
	Voda	21.1 ± 0.2n	0.109 ± 0.002h	8.8 ± 0.1m	14.6 ± 0.1il
	Voda/metanol	28.6 ± 0.3o	0.126 ± 0.004h	8.4 ± 0.1m	18.0 ± 0.3k
	Čaj	14.2 ± 0.1m	0.053 ± 0.001j	7.0 ± 0.1n	5.6 ± 0.1m

¹izraženo u mg TE/g sbm; ²izraženo u mmol Fe²⁺/g sbm; vrednosti sa različitim slovima u istoj koloni su statistički značajno različite za p<0.05 kada se koristi ANOVA Tukey *post hoc* test.

Zbog ovoga je poželjno antioksidantnu sposobnost nekog uzorka procenjivati na osnovu više nezavisnih *in vitro* testova, a kao mera te sposobnosti uvodi se **antioksidantni kompozitni indeks (ACI)**. On se dobija tako što se najpre svakom uzorku u okviru antioksidantnog testa dodeljuje brojna vrednost (BV), tako da uzorak sa najvišim antioksidativnim potencijalom (AOP) dobija vrednost 100, a ostali proporcionalno njemu. To bi se moglo matematički predstaviti jednačinom:

$$BV = \frac{AOP \text{ uzorka}}{\text{Najviša vrednost AOP}} \cdot 100$$

Kada se izračunaju BV u okviru svakog antioksidantnog testa nađe se njihova srednja vrednost koja predstavlja **antioksidantni kompozitni indeks (ACI)** (Tabela 5.4.3) (Seeram i sar., 2008). Ovakvim računanjem se svakom testu dodeljuje podjednaka važnost i dobijena vrednost je manje podložna uticaju mehanizma reakcije kojom se ispituje antioksidantna sposobnost. Sam antioksidantni kompozitni indeks predstavlja srednju vrednost svih primenjenih antioksidantnih testova.

Tabela 5.4.3 Antioksidantni kompozitni indeksi ispitivanih ekstrakta biljne vrste *P. veris*

	Rastvarač	CUPRAC	FRAP	ABTS	DPPH	ACI ¹
Cvet	Metanol	100	100	100	100	100
	Etanol	83	78	78	88	81.8
	Aceton	39	34	47	57	44.3
	Voda	68	57	58	72	63.8
	Voda/metanol	77	62	75	76	72.5
	Čaj	57	49	42	60	52
List	Metanol	45	33	35	47	40
	Etanol	36	24	24	47	32.8
	Aceton	19	11	11	30	17.8
	Voda	27	17	16	32	23
	Voda/metanol	26	17	18	26	21.8
	Čaj	26	15	13	30	21
Koren	Metanol	16	15	16	36	20.8
	Etanol	12	9	10	36	16.8
	Aceton	6	5	9	22	10.5
	Voda	9	9	10	17	11.3
	Voda/metanol	12	10	12	16	12.5
	Čaj	7	4	4	13	7

¹antioksidantni kompozitni indeks (ACI)

Tabela 5.4.4 Koeficijenti korelacije sadržaja totalnih fenola (TF), flavonoida (TF) i in vitro antioksidantrih testova (CUPRAC, FRAP, DPPH i ABTS)

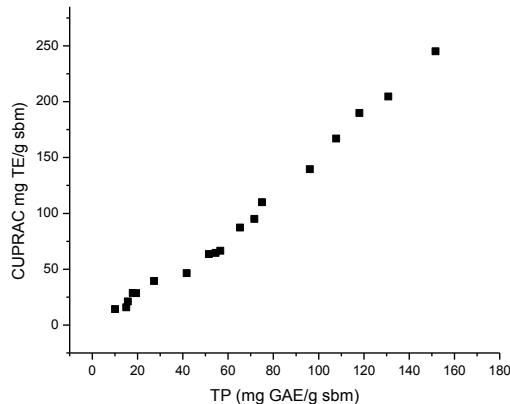
	TP	TF	CUPRAC	FRAP	DPPH	ABTS
TP	1	0.9793	0.9924	0.9659	0.9581	0.9533
TF		1	0.9857	0.9716	0.9699	0.9676
CUPRAC			1	0.9857	0.9698	0.9754
FRAP				1	0.9702	0.9867
DPPH					1	0.9703
ABTS						1

Metanolni ekstrakt cveta biljne vrste *P. veris* pokazao je u svim testovima najvišu vrednost pa je njegov ACI jednak 100. Primenom ovakve metode računanja vrlo lako se uočava da je antioksidantna sposobnost (AS) čaja dobijenog od cveta *P. veris* upola niža od metanolnog ekstrakta. Takođe, uočava se da je kod metanolnih ekstrakta AS cveta dva i po puta veća od AS lista, a pet puta veća od AS korena. Slično posmatranje može da se napravi i kod čajeva: AS čaja od cveta je dva i po puta veća od AS čaja od lista, a 7.5 puta veća od AS čaja od

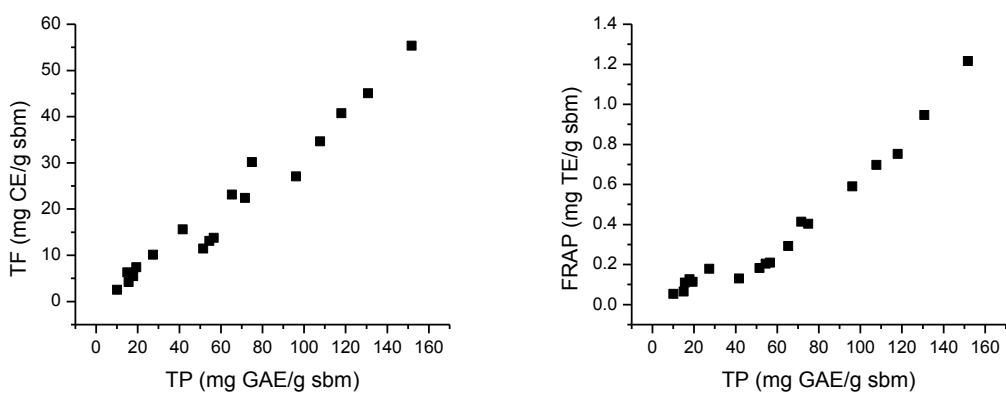
korena. Kako se u narodnoj medicini koristi uglavnom čaj korena može se zaključiti da većina antioksidantnog potencijala ove biljne vrste ostane neiskorišćena.

Velika mana antioksidantnog kompozitnog indeksa je da može da se koristi samo u okviru date studije, odnosno potrebno je dosta dodatnog računanja da bi se uzorak iz jedne studije uporedio sa uzorkom iz druge.

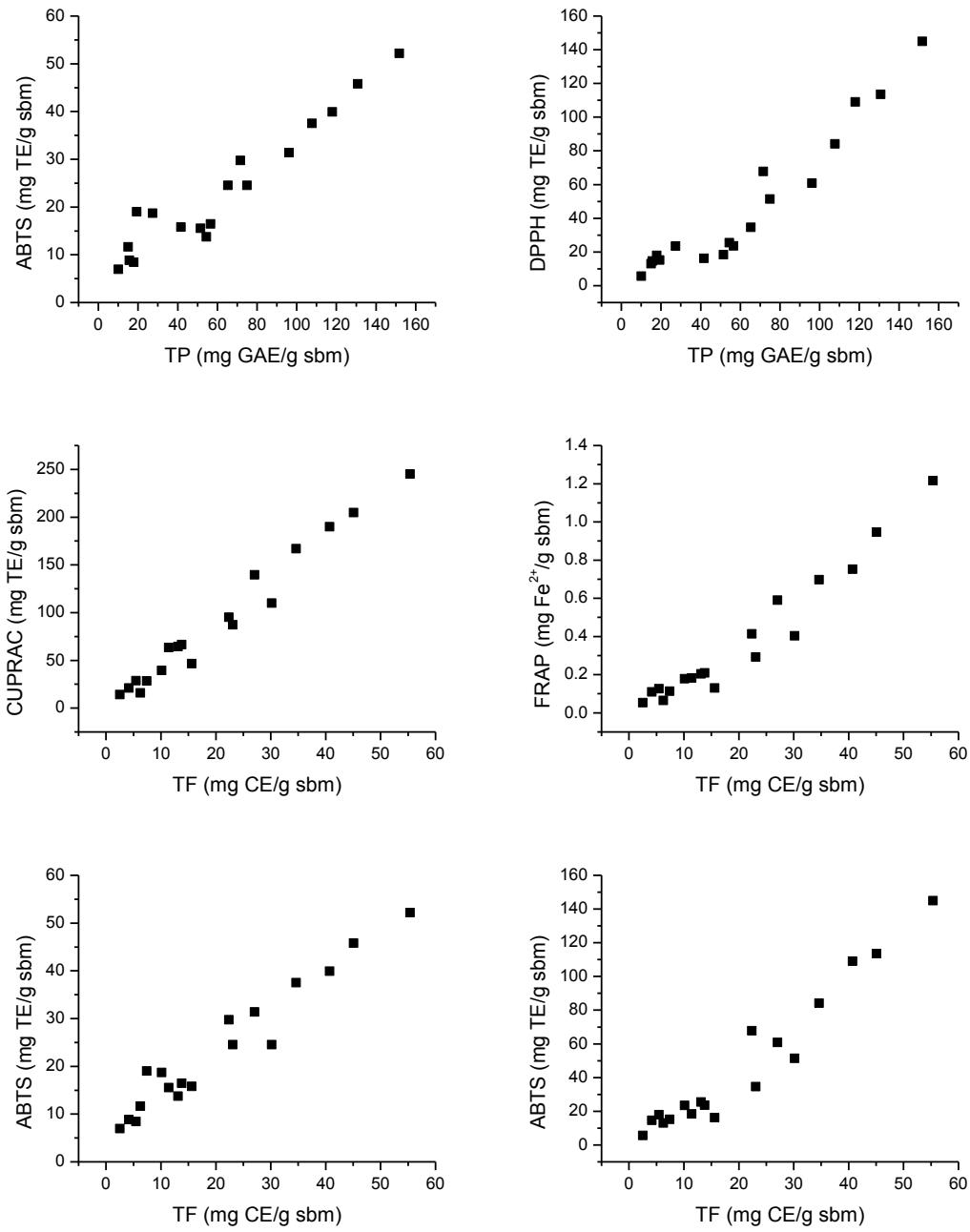
Postoji velika korelacija sadržaja ukupnih fenola (TP) odnosno flavonoida (TF) i pojedinačnih antioksidantnih testova ($r^2 > 0.95$, tabela 5.4.4.). Najveća korelacija je zapažena između sadržaja fenola (TF) i CUPRAC testa ($r^2 = 0.9924$, slika xxx). Takođe, postoji i velika međusobna korelacija između samih antioksidantnih testova ($r^2 > 0.95$). Na osnovu toga se može zaključiti da su fenolna jedinjenja (među kojima i flavonoidi) zaslužna za antioksidantnu aktivnost ispitivanih uzoraka i da osim njih nema drugih jedinjenja odgovornih za opaženu aktivnost.



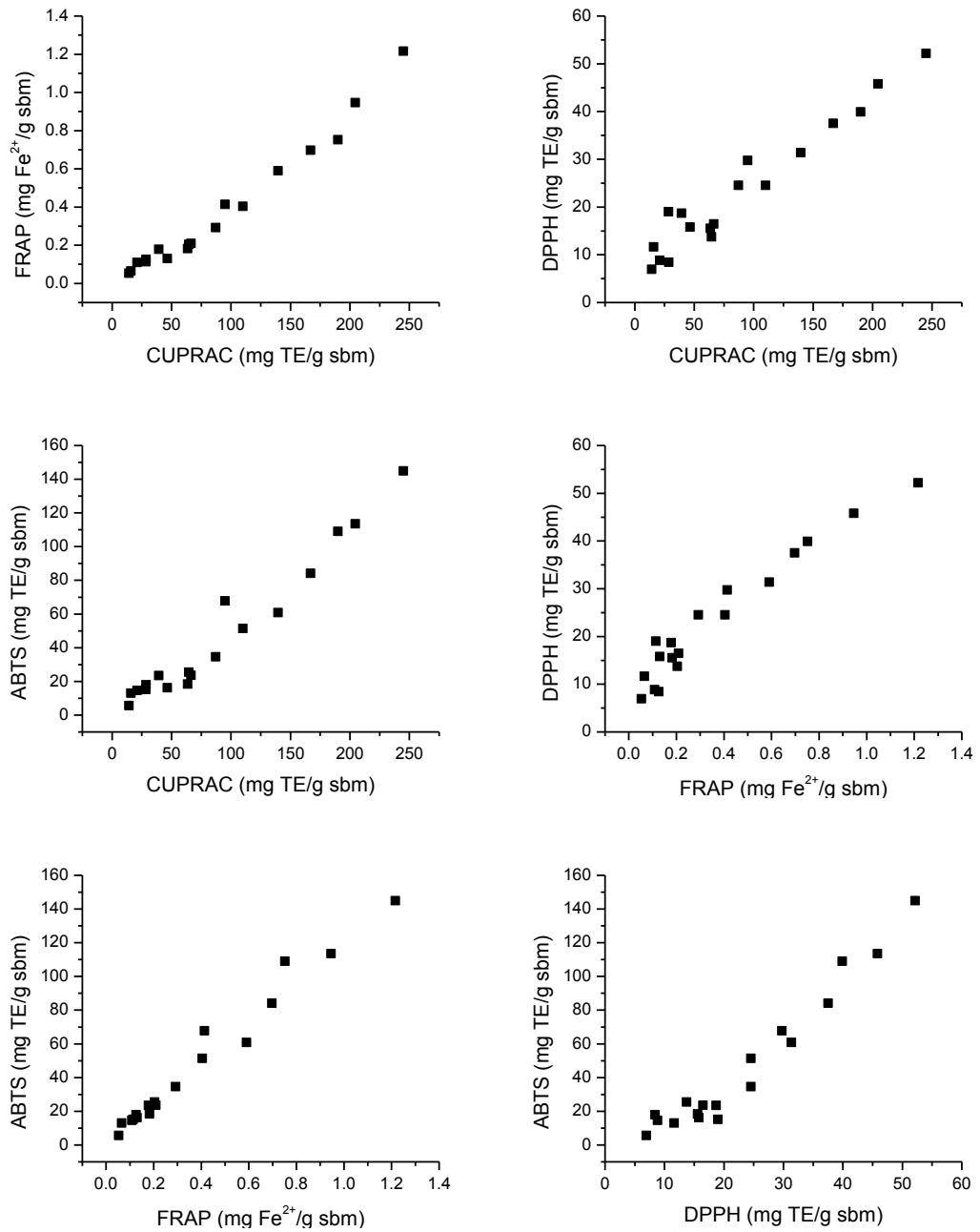
Slika 5.4.1: Korelacija sadržaja totalnih fenola (TP) i CUPRAC antioksidantne metode



Slika 5.4.2: Korelacija pojedinih antioksidantnih metoda



Slika 5.4.3: Korelacija pojedinih antioksidantnih metoda



Slika 5.4.4: Korelacija pojedinih antioksidantnih metoda

6 Izvod

6 IZVOD

U doktorskoj disertaciji pod nazivom „Antioksidativna aktivnost, fenolni i mineralni sastav biljnih vrsta *Geranium macrorrhizum* L, *Allium ursinum* L., *Stachys germanica* L. i *Primula veris* L.“, prikayani su rezultati izvršenih fitohemijskih ispitivanja navedenih biljnih vrsta primenom više instrumentalnih analitičkih metoda (UV-VIS spektrofotometrija, HPLC hromatografija, gasna hromatografija, ICP analiza).

Na osnovu prikazanih rezultata proučavanja fitohemijskog sastava gore pomenutih biljnih vrsta mogu se izvesti sledeći zaključci:

- Sudija je pokazala da prilikom ekstrakcije suvog materijala biljne vrste *G. macrorrhizum* između rastvarača različite polarnosti (metanola, etanola, acetona i etil-acetata) kao najbolje ekstrakciono sredstvo se pokazao metanol. Takođe, metanolni ekstrakt pokazao je najjače antioksidantno dejstvo u svim primenjenim *in vitro* testovima (TP, TF, DPPH, ABTS, IRA, FRAP i CUPRAC). Uočena je veoma jaka antioksidantna aktivnost ovog ekstrakta u poređenju sa ekstraktima drugih biljnih vrsta (eksperimentalnim radom i/ili pretraživanjem literature).
- U *in vivo* uslovima (ispitivanjem hepatoprotektivne aktivnosti na eksperimentalnim životinjama) suvi ostatak dobijen isparavanjem metanolnog ekstrakta biljnog materijala vrste *G. macrorrhizum* pokazao je visoko izraženo hepatoprotektivno dejstvo. Predložena su tri moguća zaštitna mehanizma dejstva fenolnih jedinjenja na oštećenje jetre: 1) radikal-hvatački efekat (nagrađeni CCl_3^{\cdot} radikali hvatani su polifenolima iz ekstrakta); 2) Inhibitorni efekat jedinjenja iz ekstrakta na enzime koji produkuju CCl_3^{\cdot} radikale iz hloroform-a; i 3) Jačanje ćelijske membrane hepatocita i prevencija curenja njihove citoplazme u međućelijski prostor (što vodi daljem oštećenju jetre).
- Pokazana je antimikrobna aktivnost ekstrakta vrste *G. macrorrhizum* prema Gram-pozitivnim i Gram-negativnim bakterijama, kao i prema gljivicama tako da upotreba zdravca u narodnoj medicini, kao leka koji se primenjuje u zaceljavanju rana ima opravdanja.
- U etarskom ulju vrste *A. ursinum* (sa pet različitih lokacija) identifikovano je 210 različitih komponenti koje čine 93.2 do 98.7% ukupne mase ulja. Heminski sastav svih ispitivanih ulja je vrlo sličan. Najzastupljenija su sumporna jedinjenja (od 69.7 do 97.1%), među kojima ima 0.1-1.0% sulfida, 21.0-60.3% disulfida, 28.2-57.0% trisulfida, 2.1-12.2% tetrasulfida, 0.0-0.4% pentasulfida i 0.2-0.6% ostalih, neklasifikovanih sumpornih jedinjenja.
- Analiza etarskog ulja vrste *A. ursinum* (GC i GC/MS) otkrila je prisustvo četiri kompletno nova disulfidna jedinjenja: alil metiltiometil disulfid, (Z)-metiltiometil 1-propenil disulfid, (E)-metiltiometil 1-propenil disulfid i alil 1-(metiltio)propil disulfid. Takođe, nađena su i četiri sulfida: heptil metil sulfid, metil oktil sulfid, alil hexil sulfid i alil oktil sulfid koja nisu pre toga detektovana u uzorcima prirodnog porekla.

- Hemiska analiza etarskih ulja vrste *A. ursinum* pokazala je prisustvo nekoliko homolognih serija polisulfida: metil alil polisulfidi, dialil polisulfidi, dimetil polisulfidi, alil propil polisulfidi, alil propenil polisulfidi. Analizom retencionih indeksa 48 jedinjenja iz ovih homolognih serija konstruisana je jednačina koja predviđa retencioni indeks polisulfida: $RI = 103.6 + 96.2 [C] + 215.8 [S] - 26.2 [\text{pi}] + 17.2 [\text{Z}] + 24.0 [\text{E}]$. Data jednačina može biti jako korisna prilikom identifikacije nepoznatih polisulfida.
- Mineralni sastav vrste *A. ursinum* sličan je mineralnom sastavu drugih biljaka roda *Allium* - belog luka (*A. sativum*), crnog luka (*A. cepa*) i praziluka (*A. ampeloprasum*). Divlji luk sadrži više mangana i gvožđa dok beli luk sadrži više selena. Analizom mineralnoga sastava vrste *A. ursinum* i odgovarajućeg zemljišta nije utvrđeno zagadenje teškim metalima. Korelacija između sadržaja metala u biljci i sadražaja metala u odgovarajućem zemljištu je značajna samo za kalcijum (0.97) i kobalt (0.96).
- HPLC analiza metanolnih ekstrakta cveta i lista *S. germanica-e* pokazuje da su iste fenolne kiseline prisutne i u oba ekstrakta (ferulna, p-kumarna i kafena kiselina). Značajno manji sadržaj fenolnih jedinjenja nađen HPLC analizom (*c.a.* 13.1 i 8.8 mg za ekstrakt lista i cveta) u odnosu na UV-VIS spektrofotometrijsku analizu (75 i 43 mg za list i cvet) može se objasniti time, da je dobar deo fenolnih jedinjenja vezan glikozidnom vezom sa ugljenim hidratima ili se nalazi u obliku polimera i nije ih lako detektovati i kvantifikovati u HPLC hromatogramu. HPLC analiza je pokazala da su i slobodni flavonoidi prisutni u analizitanim ekstraktima. Nađeni su katehin, hesperetin i rutin.
- Poređenjem vrednosti TP i TF koje su nađene u listovima i cvetovima jagorčevine (*P. veris*) sa odgovarajućim vrednostima raznih biljnih čajeva može se reći da su cvetovi i listovi jagorčevine bogat izvor prirodnih fenola, odnosno flavonoida.
- Ako se rastvarači upotrebljeni za ekstrakciju biljnog materijala *P. veris* poređaju po efikasnosti vidi se da metanol najbolje ekstrahuje fenolna jedinjenja, zatim slede etanol, smeša voda/metanol, voda i na kraju aceton. Postupkom kakav se primenjuje pri pripremi čaja iz biljne droge se ekstrahuje najmanje fenola, a pošto se u narodnoj medicini upotrebljava isključivo čaj jagorčevine može se zaključiti da oko jedne trećine fenola ostane neekstrahovano, a samim tim i neiskorišćeno.
- Dobijeni rezultati su diskutovani i upoređivani sa dostupnim literurnim podacima dok je jedan deo analiza odraden po prvi put (hepatoprotективna aktivnost ekstrakta *G. macrorrhizum-a*, antimikrobna aktivnost ekstrakta *G. macrorrhizum-a* i *A. ursinum-a*, antioksidantna aktivnost ekstrakta *S. germanica-e* i *P. veris*, fenolni sastav *S. germanica-e*).

7 Summary

7 SUMMARY

PhD thesis entitled „Antioxidant activity, phenolic and mineral content of plant species *Geranium macrorrhizum* L., *Allium ursinum* L., *Stachys germanica* L. and *Primula veris* L.“ presents the results of phytochemical investigations of four mentioned plant species using the several instrumental analytical methods (UV-VIS spectrophotometry, HPLC chromatography, gas chromatography with mass detection, ICP emission spectrometry).

Based on the presented results and discussions, the following statements can be concluded:

- Our research showed that methanol was the best extraction solvent (among the used solvents with different polarities: methanol, ethanol, acetone, ethyl acetate). Methanol extracts were showed the strongest antioxidant effects in all *in vitro* antioxidant tests used. Compared to other plant species extracts (the values were found within literature data or obtained experimentally) *G. macrorrhizum*'s extracts showed very high antioxidant activity.
- Dry matter obtained with methanol extraction of *G. macrorrhizum* was showed very high hepatoprotective effect in the *in vivo* test (hepatoprotective activity investigation on experimental animals). There are at least three possible mechanisms of action that can be envisaged: 1) the radical scavenging effect (the formed $\text{CCl}_3\cdot$ radicals are quenched by the phenolic groups of *G. macrorrhizum* constituents), 2) inhibitory action of the extract constituents on the enzymes producing the before mentioned radical from CCl_4 , and 3) cell membrane strengthening effect and the prevention of cell lysis and leakage of cellular content that can induce further liver damage.
- Antimicrobial activity of *G. macrorrhizum*'s extracts against a number of bacterial (both Gram positive and Gram negative) and fungal strains was shown. This gives another argument for uses of this plant species in folk medicine.
- Chemical analyses of *A. ursinum*'s essential oils obtained by hydrodistillation of the aerial parts of wild-growing *A. ursinum* from five localities in South-Eastern Serbia enabled the identification of 208 different components, representing 92.6-98.7% of the total oils. The chemical compositions of all investigated samples of *A. ursinum* essential oils were quite similar. The organosulfur compounds were the most abounded ones (from 69.1 to 97.0%, Table X), including 0.1-1.0% sulfides, 21.0-60.3% disulfides, 28.2-57.0% trisulfides, 2.1-12.2% tetrasulfides, 0.0-0.4% pentasulfides and 0.2-0.6% other unclassified sulfur compounds.
- *A. ursinum*'s essential oils analysis (GC and GC/MS) revealed presence of four disulfides compounds completely new for chemistry: allyl (methylthio)methyl disulfide, (methylthio)methyl (*Z*)-1-propenyl disulfide, (methylthio)methyl (*E*)-propenyl disulfide, allyl 1-(methylthio)propyl disulfide, as well as presence of four sulfides: heptyl methyl sulfide, methyl octyl sulfide, allyl hexyl sulfide, allyl octyl sulfide and propyl (propylthio)methyl sulfide that have never been previously detected in a sample of natural origin.

7 SUMMARY

- Chemical analysis of *A. ursinum*'s essential oils revealed several polysulfide homologous series: methyl allyl polysulfides, diallyl polysulfides, dimethyl polysulfides, allyl propyl polysulfides, allyl propenyl polysulfides. The equation based on retention indexes analysis of 48 compounds from this homologous series was constructed: $RI = 103.6 + 96.2 [C] + 215.8 [S] - 26.2 [pi] + 17.2 [Z] + 24.0 [E]$. This equation can predict retention index of any linear polysulfide and may be very useful in unknown polysulfide identification.
- Nutritive value of *Allium ursinum*, considering only mineral content, is little different from other compared Allium species (garlic, onion and leek). While garlic contains more selenium, wild garlic contains more iron and manganese (per units of dry mass). Mineral content analysis of the *A. ursinum* samples and correspondent soil samples revealed no heavy metal contaminations. Correlation between mineral content in the plant tissue and the soil was significant only for calcium (0.97) and cobalt (0.96).
- HPLC analysis of *S. germanica* methanol extracts (leaves and blossom) revealed that the same free phenolic acids were presented in both extracts: ferulic, *p*-coumaric and caffeic acid. Significantly less founded phenolics (c.a. 13.1 and 8.8 mg for leaves and blossom, respectively) by HPLC analysis in comparison to spectrophotometric analysis (75 and 43 mg for leaves and blossom, respectively) can be explained in the way that most of the phenolic compounds were bounded forming glycosides and esters which can not be easily observed in HPLC chromatogram. HPLC analysis of *S. germanica* extracts revealed that the free flavonoids also exist in the extracts. The ones found were catechin, hesperetin and rutin.
- Comparing TP and TF values for lives and flowers of cowslip (*P. veris*) to corresponding values of different herbal teas can be concluded that cowslip lives and flowers are rich natural sources of phenols and flavonoids.
- Methanol had the best extraction efficiency among the solvents used for dry *P. veris* extraction of phenols (methanol, ethanol, water, water/methanol, acetone). Treatment which used for herbal tea preparing can extract only two third of phenols present in the herbal drug. Folk medicine uses cowslip herbal tea prepared only on this method and one third of phenols were unextracted and unexploited.
- Obtained results were discussed and compared to available literature data while some analyses were done for the first time (hepatoprotective activity of *G. macrorrhizum*'s extracts, antimicrobial activity of *G. macrorrhizum*'s and *A. ursinum*'s extracts, antioxidant activity of *S. germanica*'s and *P. veris*'s extracts, phenolic composition of *S. germanica*).

8 Literatura

8 LITERATURA

- Alloway BJ, Chemical analysis of ecological materials, Blackwell, Oxford, 1989.
- Andersen ØM., Markham KR., FLAVONOIDS-Chemistry, Biochemistry and Applications, CRC Press Taylor & Francis Group, 2006.
- Antić-Jovanović A, Atomska spektroskopija, Fakultet za fizičku hemiju, Beograd, 1999.
- Apak R, Güçlü K, Özyürek M, Karademir SE, Novel Total Antioxidant Capacity Index for Dietary Polyphenols and Vitamins C and E, Using Their Cupric Ion Reducing Capability in the Presence of Neocuproine: CUPRAC Method, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004, 52, 7970–7981.
- Arapitsas P, Hydrolyzable tannin analysis in food, Food Chemistry, 2012, 3, 1708-1717.
- Areias FM, Valentão P, Andrade PB, Ferreres F, Seabr RM, Phenolic fingerprint of peppermint leaves, Food Chemistry, 2001, 3, 307-311.
- Arnon DI, Stout PR, The essentiality of certain elements in minute quantity for plants with special reference to copper, Plant Physiology, 1939, 14, 371–375.
- Arnous A, Meyer AS, Comparison of methods for compositional characterization of grape (*Vitis vinifera* L.) and apple (*Malus domestica*) skins, Food and Bioproducts Processing, 2008, 2, 79-86.
- Arslan D, Özcan MM, Study the effect of sun, oven and microwave drying on quality of onion slices, LWT - Food Science and Technology, 2010, 7, 1121-1127.
- Aruoma OI, Assessment of potential prooxidant and antioxidant actions, Journal of the American Oil Chemists' Society, 1996, 73, 1617-1625.
- Aruoma OI, Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods, Mutation Research, 2003, 9-20, 523–524.
- Bagiu R, Vlaicu B, Butnariu M, Chemical Composition and in Vitro Antifungal Activity Screening of the *Allium ursinum* L. (Liliaceae). International Journal of Molecular Sciences, 2012, 13, 1426-1436.
- Baltrušaitytė V, Venskutonis PR, Čekstertytė V, Radical scavenging activity of different floral origin honey and bee bread phenolic extracts, Food Chemistry, 2007, 2, 502-514.
- Barker A, Pilbeam D, Handbook of plant nutrition, Handbook of Plant Nutrition, Taylor & Francis, New York, 2007.
- Barros L, Dueñas M, Dias MI, Sousa MJ, Santos-Buelga C, Ferreira I, Phenolic profiles of cultivated, in vitro cultured and commercial samples of *Melissa officinalis* L. infusions, Food Chemistry, 136, 2013, 1-8.
- Benzie I, Strain J, The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay, Analytical Biochemistry, 1996, 239, 70–76.

8 LITERATURA

- Bernaert N, Paepe D, Bouten C, Clercq H, Stewart D, Bockstaele E, Loose M, Droogenbroeck B, Antioxidant capacity, total phenolic and ascorbate content as a function of the genetic diversity of leek (*Allium ampeloprasum* var. *porrum*) Food Chemistry, 2012, 2, 669-677.
- Bil Brajson, Kratka istorija bezmalo svačega, Laguna, Beograd, Srbija, 2005.
- Bishop M, Fody E, Schoeff L, Clinical Chemistry, Lippincott Williams & Wilkins, USA, 2005.
- Bonaccorsi P, Caristi C, Gargiulli C, Leuzzi U, Flavonol glucosides in Allium species: A comparative study by means of HPLC–DAD–ESI-MS–MS, Food Chemistry, 2008, 4, 1668-1673.
- Boros B, Jakabová S, Dörnyei A, Horváth G, Pluhár Z, Kilára F, Felinger A, Determination of polyphenolic compounds by liquid chromatography–mass spectrometry in *Thymus* species, Journal of Chromatography A, 51, 2010, 7972-7980.
- Božin B, Mimica-Đukić, N, Samojlik I, Anackov G, Igić R, Phenolics as antioxidants in garlic (*Allium sativum* L., Alliaceae), Food Chemistry, 2008, 4, 925-929.
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C, Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, LWT - Food Science and Technology, 1995, 28, 25-30.
- Budzianowski J, Morozowska M, Wesołowska M, Lipophilic flavones of *Primula veris* L. from field cultivation and in vitro cultures, Phytochemistry, 2005, 66, 1033–1039.
- Budzianowski J, Morozowska M, Wesołowska M, Lipophilic flavones of *Primula veris* L. from field cultivation and in vitro cultures, Phytochemistry, 2005, 66 1033–1039.
- Campo G, Avenoso A, Campo S, Nastasi G, Traina P, D'Ascola A, Rugolo C, Calatroni A, The antioxidant activity of chondroitin-4-sulphate, in carbon tetrachloride-induced acute hepatitis in mice, involves NF-kappaB and caspase activation, British Journal of Pharmacology, 2008, 155, 945–956.
- Carotenuto A, De Feo V, Fattorusso E, Lanzotti V, Magno S, Cicala C, The flavonoids of *Allium ursinum*, Phytochemistry, 1996, 2, 531-536.
- Castrejón, AR, Eichholz I, Rohn, S, Kroh LW, Huyskens-Keil S, Phenolic profile and antioxidant activity of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) during fruit maturation and ripening, Food Chemistry, 2008, 3, 564–572.
- Castro J, Ferrya G, Castro C, Sasame H, Fenos O, Gillete J, Prevention of carbon tetrachloride induced necrosis by inhibitors of drug metabolism. Further studies on the mechanism of their action, Biochemical Pharmacology, 1974, 23, 295–302.
- Caude M, Jardy A, Normal-Phase Liquid Chromatography, In: Handbook of HPLC, Katz E. Eksteen R, Schoenmakers P; Miler N, New York, USA, 1998.

8 LITERATURA

- Chen H, Zuo Y, Identification of flavonol glycosides in American cranberry fruit, *Food Chemistry*, 2007, 4, 1357-1364.
- Christian W, Christian G, Ongania H, Bonn G, Isolation and characterization of methoxylated flavones in the flowers of *Primula veris* by liquid chromatography and mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 2000, 870, 453–462.
- Chyaua CC, Maub JL, Effects of various oils on volatile compounds of deep-fried shallot flavouring, *Food Chemistry*, 2001, 74, 41–46.
- Collins PF, Harvey D, Smith GF, 2,4,6-Tripyridyl-s-triazine as Reagent for Iron. Determination of Iron in Limestone, Silicates, and Refractories, *Analytical Chemistry*, 1959, 31, 1862–1867.
- COMMISSION REGULATION (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs
- Conforti F, Menichini F, Formisano C, Rigano D, Senatore F, Arnold NA, Piozzi F, Comparative chemical composition, free radical-scavenging and cytotoxic properties of essential oils of six *Stachys* species from different regions of the Mediterranean Area, *Food Chemistry*, 2009, 4, 898-905.
- Cook NC, Samman S, Flavonoids-Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources, *Nutritional Biochemistry*, 1996, 7, 66-76.
- Cornard JP, Merlin JC, Complexes of aluminium(III) with isoquercitrin: spectroscopic characterization and quantum chemical calculations, *Polyhedron*, 2002, 27–28, 2801–2810.
- Costa LM, Gouveia ST, Nóbrega JA, Comparison of heating extraction procedures for Al, Ca, Mg, and Mn in tea samples, *Analytical Sciences*, 2002, 18, 313-318.
- Csuros M, Csuros C, Environmental Sampling and Analysis for Metals, Lewis Publishers, 2002.
- Čeković Ž, Hemijačka čitanka, Zavod za udžbenike i nastavna sredstva, Beograd, Srbija, 1999.
- Čeković Ž, Upotreba molekula, Zavod za udžbenike i nastavna sredstva, Beograd, Srbija, 2012.
- Dawn B. Marks, Allan D. Marks, Colleen M. Smith, Basic Medical Biochemistry a Clinical Approach, Lippincott Williams & Wilkins, 2005.
- Dehkharghanian M, Adenier H, Vijayalakshmi MA, Study of flavonoids in aqueous spinach extract using positive electrospray ionisation tandem quadrupole mass spectrometry, *Food Chemistry*, 2010, 3, 863-870.
- Denisov ET, Afanasev IB, Oxidation and Antioxidants in Organic Chemistry and Biology, CRC Press Taylor & Francis Group, USA, 2005.

8 LITERATURA

- Dewick PM, Medicinal Natural Products-A Biosynthetic Approach, Second Edition, John Wiley & Sons, 2002, England.
- Djurdjevic L, Dinic A, Pavlovic P, Mitrovic M, Karadzic B, Tesevic V, Allelopathic potential of Allium ursinum L. Biochemical Systematics and Ecology, 2004, 32, 533-544.
- Dorman HJD, Kosar M, Kahlos K, Holm Y, Hiltunen R, Antioxidant Properties and Composition of Aqueous Extracts from *Mentha* Species, Hybrids, Varieties, and Cultivars, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003, 15, 4563-4569.
- Doyle CA, Dorsey JG, Reversed-Phase HPLC: Preparation and Characterisation of Reversed-Phase Stationary Phase, In: Handbook of HPLC, Katz E. Eksteen R, Schoenmakers P; Miler N, New York, USA, 1998.
- Dragovic-Uzelac V, Pospišil J, Levaj B, Delonga K, The study of phenolic profiles of raw apricots and apples and their purees by HPLC for the evaluation of apricot nectars and jams authenticity, Food Chemistry, 2005, 91, 373-383.
- Duh PD, Tu YY, Yen GC, Antioxidant Activity of Water Extract of Harsing Jyur (*Chrysanthemum morifolium* Ramat), LWT - Food Science and Technology, 1999, 5, 269-277.
- Duraipandiyan V, Ignacimuthu S, Antibacterial and antifungal activity of *Cassia fistula* L.: An ethnomedicinal plant, Journal of Ethnopharmacology, 112, 2007, 590-594.
- EPA method 3050B <http://www.epa.gov/wastes/hazard/testmethods/sw846/pdfs/3050b.pdf>
- Ernst M, Chatterton J, Harrison P, Gudrun M, Characterization of Fructan Oligomers from Species of the Genus Allium L., Journal of Plant Physiology, 1998, 153, 53–60.
- Escarpa A, González MC, Fast separation of (poly)phenolic compounds from apples and pears by high-performance liquid chromatography with diode-array detection, Journal of Chromatography A, 1999, 2, 301-309.
- Fang F, Li JM, Pan QH, Huang WD, Determination of red wine flavonoids by HPLC and effect of aging, Food Chemistry, 2007, 1, 428-433.
- Filipović I, Lipanović S, Opća i anorganska kemija, Školska knjiga, Zagreb, Hrvatska, 1981.
- Foo LY, Lu Y, McNabb WC, Waghorn GC, Ulyatt MJ, Proanthocyanidins from *Lotus pedunculatus*, Phytochemistry, 1997, 45, 1689-1696.
- Foti MC, Daquino C, Mackie ID, DiLabio G, Ingold KU, Reaction of Phenols with the 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl Radical. Kinetics and DFT Calculations Applied To Determine ArO-H Bond Dissociation Enthalpies and Reaction Mechanism, Journal of Organic Chemistry, 2008, 73, 9270-9282.
- Fulton JW , Hastings J, Photometric Determination of Copper in Aluminum and Lead-Tin Solder with Neocuproine, Analytical Chemistry, 1956, 28, 174–175.

8 LITERATURA

- Genova E, Ivancheva S., Quantitative analysis of tannin content in *Geranium macrorrhizum* L. (Geraniaceae) growing in Bulgaria. *Phytologia Balcanica*, 1995, 1, 93-99.
- Ghas Emzad Eh A, Ghas Emzad Eh N, Flavonoids and Phenolic Acids: Role and Biochemical Activity in Plants and Human, *Journal of Medicinal Plants Research*, 2011, 5, 6697.
- Gil MI, Holcroft DM, Kader AA, Changes in strawberry anthocyanins and other phenoles in response to carbon dioxide treatment, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 1997, 5, 1662-1667.
- Goddevac D, Vujisic Lj, Mojovic M, Ignjatovic A, Spasojevic I, Vajs V, Evaluation of antioxidant capacity of *Allium ursinum* L. volatile oil and its effect on membrane fluidity, *Food Chemistry*, 2008, 107, 1692-1700.
- Golovnya RV, Garbuzov VG, Misharina TA, Gas chromatographic characteristics of sulfur compounds 2. Normal sulfides, *Russian Chemical Bulletin*, 1976, 25, 2114-2117.
- Golovnya RV, Misharina TA, Garbuzov VG, Gas chromatographic characterization of sulfur-containing compounds 4. The effect of unsaturated radicals on the retention indices of the vinyl, allyl, and propargyl alkyl sulfides, *Russian Chemical Bulletin*, 1978, 27, 2266-2270.
- Golovnya RV, Misharina TA, Garbuzov VG, Gas-chromatographic characterization of sulfur-containing compounds 8. Di-, tri-, and tetrasulfides with S-S bonds, *Russian Chemical Bulletin*, 1979, 28, 1881-1886.
- Gómez-Alonso S, García-Romeroa E, Hermosín-Gutiérrez I, HPLC analysis of diverse grape and wine phenolics using direct injection and multidetection by DAD and fluorescence, *Journal of Food Composition and Analysis*, 2007, 7, 618-626.
- Gorinstein S, Park Y, Heo B, Namiesnik J, Leontowicz H, Leontowicz M, Ham KS, Cho J, Kang S, A comparative study of phenolic compounds and antioxidant and antiproliferative activities in frequently consumed raw vegetables, *European Food Research and Technology*, 2009, 228, 903–911.
- Gould K, Davies K, Winefield C, Anthocyanins: how should you do it and what do the results mean?, *British Journal of Pharmacology*, 2009, 142, 231-255.
- Grujic Jovanovic S, Marin PD, Dzamic A, Ristic M, Composition of the essential oil of *Stachys germanica* from Serbia, *Chemistry of Natural Compounds*, 2008, 5, 670-672.
- Grujic-Jovanovic S, Skaltsa HD, Marin P, Sokovic M, Composition and antibacterial activity of the essential oil of six *Stachys* species from Serbia, *Flavour and Fragrance Journal*, 2004, 19, 139-144.

8 LITERATURA

- Gu LW, House SE, Wu XL, Ou BX, Prior RL, Procyanidin and catechin contents and antioxidant capacity of cocoa and chocolate products, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, 54, 4057–4061.
- Hacıseferogulları H, Özcan M, Demir F, Çalışır S, Some nutritional and technological properties of garlic (*Allium sativum* L.), *Journal of Food Engineering*, 2005, 4, 463-469.
- Hagerman AE, Rice ME, Ritchard NT, Mechanisms of protein precipitation for two tannins, pentagalloyl glucose and epicatechin16 (4->8) catechin (procyanidin), *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1998, 46, 2590-2595.
- Häkkinen S, Heinonen M, Kärenlampi S, Mykkänen H, Ruuskanen J, Törrönen R, Screening of selected flavonoids and phenolic acids in 19 berries, *Food Research International*, June 1999, 5, 345-353.
- Harvey AL, Natural products in drug discovery ,*Drug Discovery Today*, 2008, 13, 894-901.
- Haslam E, Plant Polyphenols: Vegetable tannins revisited, (2nd ed.)Cambridge University Press, Cambridge University Press, 1989.
- Havsteen BH, The biochemistry and medical significance of the flavonoids, *Pharmacology & Therapeutics*, 2002, 96, 67-202.
- He D, Shan Y, Wu Y, Liu G, Chen B, Yao S, Simultaneous determination of flavanones, hydroxycinnamic acids and alkaloids in citrus fruits by HPLC-DAD-ESI/MS, *Food Chemistry* 2011, 127, 880-885.
- Hibbert B, Gooding J, Data analysis for Chemistry, Oxford university press, 2006.
- Hirschegger P, Jakse J, Trontelj P, Bohanec B, Origins of *Allium ampeloprasum* horticultural groups and a molecular phylogeny of the section *Allium* (*Allium*: Alliaceae), *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2010, 54, 488-497.
- Hiyasat B, Sabha D, Grötzinger K, Kempfert J, Rauwald J, Mohr F, Dhein S, Antiplatelet Activity of *Allium ursinum* and *Allium sativum*, *Pharmacology*, 2009, 83, 197–204.
- Hodgson JM, Croft KD, Tea flavonoids and cardiovascular health, *Molecular Aspects of Medicine* 2010, 31, 495-502.
- Holmgren GGS, Meyer MW, Chaney RL, Daniels RB, Cadmium, Lead, Zinc, Copper, and Nickel in Agricultural Soils of theUnited States of America, *Journal of Environmental Quality*, 1993, 6, 335-348.
- <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2006:364:0005:0024:EN:PDF>
- Huang DJ, Ou BX, Prior RL, The chemistry behind antioxidant capacity assays, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, 53, 1841–1856.

8 LITERATURA

- Huck CW, Huber CG, Ongania CH, Bonn GK, Isolation and characterization of methoxylated flavones in the flowers of *Primula veris* by liquid chromatography and mass spectrometry, Journal of Chromatography A, 2000, 870, 453-462.
- Hurtado-Fernández E, Gómez-Romero M, Carrasco-Pancorbo A, Fernández-Gutiérrez A, Application and potential of capillary electroseparation methods to determine antioxidant phenolic compounds from plant food material, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2010, 53, 1130-1160.
- Irakli MN, Samanidou VF, Biliaderis CG, Papadoyannis IN, Development and validation of an HPLC-method for determination of free and bound phenolic acids in cereals after solid-phase extraction, Food Chemistry, 2012, 134, 1624–1632
- Ivanova A, Mikhova B, Najdenski H, Tsvetkova I, Kostova I, Chemical composition and antimicrobial activity of wild garlic *Allium ursinum* of Bulgarian origin, Natural Product Communications, 2009, 4, 1059–1062.
- Jarić S, Popović Z, Mačukanović-Jocić M, Djurdjević L, Mijatović M, Karadžić B, Mitrović M, Pavlović P, An ethnobotanical study on the usage of wild medicinal herbs from Kopaonik Mountain (Central Serbia), Journal of Ethnopharmacology. 2007, 111, 160-175.
- Kahkonen M, Hopia A, Vuorela H, Rauha J, Pihlaja K, Kujala T, Heinonen M, Antioxidant Activity of Plant Extracts Containing Phenolic Compounds, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1999, 47, 3954-3962.
- Kahonen MP, Hopia AI, Vuorela HJ, Rauh JP, Pihlaja K, Kujala TS, Antioxidant Activity of Plant Extracts Containing Phenolic Compounds, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1999, 47, 3959.
- Kaiser A, Carle R, Kammerer DR, Effects of blanching on polyphenol stability of innovative paste-like parsley (*Petroselinum crispum* (Mill.) Nym ex A. W. Hill) and marjoram (*Origanum majorana* L.) products, Food Chemistry, 2013, 2-3, 1648-1656.
- Karakaya S, Nehir S, Quercetin, luteolin, apigenin and kaempferol contents of some foods, Food Chemistry, 1999, 3, 289-292.
- Karl C, Müller G, Pedersen PA, Die Flavonoide in den Blüten von *Primula officinalis*, Planta Medica, 1981, 41, 96–99.
- Karl C, Müller G, Pedersen PA, Die Flavonoide in den Blüten von *Primula officinalis*, Planta Medica, 1981, 41, 96–99.
- Klaassen C, Watkins J, Mechanisms of bile formation, hepatic uptake, and biliary excretion. Pharmacological Reviews, 1984, 36, 1–67.
- Kojić M, Stamenković V, Jovanović D, Lekovite biljke jugoistočne Srbije, Zavod za udžbenike i nastavna sredstva, Beograd, Srbija, 1998.

8 LITERATURA

- Kokotkiewicz A, Luczkiewicz M, Sowinski P, Glod D, Gorynski K, Bucinski A, Isolation and structure elucidation of phenolic compounds from *Cyclopia subternata* Vogel (honeybush) intact plant and in vitro cultures, Food Chemistry, 2012, 4, 1373-1382.
- Kontogianni VG, Tomic G, Nikolic I, Nerantzaki AA, Sayyad N, Stosic-Grujicic S, Stojanovic I, Gerothanassis IP, Tzakos AP, Phytochemical profile of Rosmarinus officinalis and Salvia officinalis extracts and correlation to their antioxidant and anti-proliferative activity, Food Chemistry, 2013, 136, 120-129.
- Koraćević D, Bjelaković G, Đorđević VB, Nikolić J, Pavlović DD, Kocić G, Biohemija, Savremena administracija, Beograd, Srbija, 2003.
- Krishnaiah D, Sarbatly S, Nithyanandam R, A review of the antioxidant potential of medicinal plant species, Food and Bioproducts Processing, 2011, 3, 217–233.
- Kukic J, Petrovic S, Niketic M, Antioxidant Activity of Four Endemic *Stachys* Taxa, Biological & Pharmaceutical Bulletin, 2006, 29, 725.
- Lajšić S, Grujić-Injac B, Hemija prirodnih proizvoda, 1998, Novi Sad, Srbija.
- Lamaison JL, Petitjean-Freytet C, Carnat A, Teneurs en polyphenols et activités antioxydantes chez les Geraniaceae françaises, Plantes, Medicinales et Phytotherapie, 1993, 26, 130–134.
- Lazarević JS, Palić RM, Radulović NS, Ristić N, Stojanović GS, Chemical composition and screening of the antimicrobial and antioxidative activity of extracts of *Stachys* species, Journal of Serbian Chemical Society, 2010, 10, 1347-1359.
- Lee J, Proanthocyanidin A2 purification and quantification of American cranberry (*Vaccinium macrocarpon* Ait.) products, Journal of Functional Foods, 2013, 1, 144-153.
- Leucuta S, Vlase L, Gocan S, Radu L, Fodorea C, Determination of phenolic compounds from *Geranium sanguineum* by HPLC, Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies, 2005, 28, 3109-3117.
- Lim YY, Quah EPL, Antioxidant properties of different cultivars of *Portulaca oleracea*, Food chemistry, 2007, 103, 734-40.
- Lin J, Wang C, Protection of crocin dyes in the acute hepatic damage induced by aflatoxin B and dimethylnitrosamine in rats, Carcinogenis, 1986, 7, 595–599.
- Manach C, Mazur A, Scalbert A, Polyphenols and prevention of cardiovascular diseases, Current Opinion in Lipidology, 2005, 16, 77-84.
- Marques V, Farah A, Chlorogenic acids and related compounds in medicinal plants and infusions, Food Chemistry, 113, 2009, 1370-1376.

8 LITERATURA

- Menković N, Savikin K, Tasić S, Zdunić G, Stesević D, Milosavljević S, Vincek D, Ethnobotanical study on traditional uses of wild medicinal plants in Prokletije Mountains (Montenegro), Journal of Ethnopharmacology, 2011, 133, 97-107.
- Mhamdi B, Wannes W, Sriti J, Jellali I, Ksouri R, Marzouk B, Effect of harvesting time on phenolic compounds and antiradical scavenging activity of *Borago officinalis* seed extracts, Industrial Crops and Products, 2010, 31, e1-e4.
- Miliauskas G, Mulder E, Linssen J, Houben J, Van Beek T, Venskutonis P, Evaluation of antioxidative properties of Geranium macrorrhizum and Potentilla fruticosa extracts in Dutch style fermented sausages, Meat Science, 2007, 77, 703–708.
- Miliauskas G, Van Beek T, Venskutonis P, Linssen J, Waard P, Antioxidative activity of Geranium macrorrhizum, European Food Research and Technology, 2004a, 218, 253-261.
- Miliauskas G, Venskutonis P, Van Beek T, Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts, Food Chemistry, 2004b 85, 231–237.
- Miller J, Miller J, Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry, Prentice Hall, 2005.
- Milosavljević SM, Strukturne instrumentalne metode, Hemijski fakultet, Beograd, 1994.
- Mirić M, Šobajić S, Zdravstvena ispravnost namirnica, Zavod za udžbenike i nastavna sredstava, Beograd, 2002.
- Moodley R, Koornanally N, Jonnalagadda S, Elemental composition and fatty acid profile of the edible fruits of Amatungula (*Carissa macrocarpa*) and impact of soil quality on chemical characteristics, Analytica Chimica Acta, 2012, 730, 33–41.
- Morris, C, Levander O, Selenium content of foods, Journal of Nutrition, 1970, 100, 1383-1388.
- Mossion A, Potin-Gautier P, Delerue S, Le Hécho I, Behra P, Effect of water composition on aluminium, calcium and organic carbon extraction in tea infusions, 2008, 106, 1467–1475.
- Moure A, Cruz JM, Franco D, Domínguez JM, Sineiro J, Domínguez H, Núñez MJ, Parajó JC, Natural antioxidants from residual sources, Food Chemistry, 2001, 72, 145-171.
- Mueller-Harvey I, McAllan AB, Tannins: their biochemistry and nutritional properties, Advances in Plant Cell Biochemistry and Biotechnology, 1992, 1, 151-217.
- Muller A, Ganzena M, Stuppner H, Analysis of phenolic glycosides and saponins in *Primula elatior* and *Primula veris* (primula root) by liquid chromatography, evaporative light scattering detection and mass spectrometry, Journal of Chromatography A, 2006, 1-2, 218-223.
- Muller A, Ganzena M, Stuppner H, Analysis of phenolic glycosides and saponins in *Primula elatior* and *Primula veris* (primula root) by liquid chromatography, evaporative light

8 LITERATURA

- scattering detection and mass spectrometry, Journal of Chromatography A, 2006, 1112, 218–223
- Naczk M, Oickle D, Pink D, Shahidi F, Protein precipitating capacity of crude canola tannins: effect of pH, tannin and protein concentrations, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1996, 44, 2144-2148.
- Nakanishi Y, Okuda T, Abe H, Effects of geraniin on the liver in rats III - correlation between lipid accumulations and liver damage in CCl₄-treated rats, Natural Medicines, 1999, 53, 22–26.
- Nakanishi Y, Orita M, Okuda T, Abe H, Effects of geraniin on the liver in rats I - effects of geraniin compared to ellagic acid, and gallic acid on hepatic injuries induced by CCl₄, D-galactosamine, and thioacetamide, Natural Medicines, 1998, 52, 396–403.
- Nelson D, Cox M, Lehninger PRINCIPLES OF BIOCHEMISTRY, Fourth Edition, 2004.
- Nest GL, Caille O, Woudstra M, Roche S, Guerlesquin F, Lexa D, Zn–polyphenol chelation: complexes with quercetin, (+)-catechin, and derivatives: I optical and NMR studies, Inorganica Chimica Acta, 2004, 3, 775–784.
- Newman DJ, Cragg, GM, Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years, Journal of Natural Products, 2007, 70, 461-477.
- Nováková L, Spáčil Z, Seifrtová M, Opletal L, Solich P, Rapid qualitative and quantitative ultra high performance liquid chromatography method for simultaneous analysis of twenty nine common phenolic compounds of various structures, Talanta, 2010, 80, 1970-1979
- Oszmiański J, Kolniak-Ostek J, Wojdylo A, Characterization and content of flavonol derivatives of *Allium ursinum* L. plant, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, 61, 176–184.
- Oyaizu M, Studies on products of browning reaction: antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine, Japan Journal of Nutrition, 1986, 44, 307–315.
- Ozgen M, Reese RN, Tulio AZ, Scheerens JC, Miller AR, Modified 2, 2-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) method to measure antioxidant capacity of selected small fruits and comparison to ferric reducing antioxidant power (FRAP) and 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) methods, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006, 54, 1151–1157.
- Pantelidis GE, Vasilakakis M, Manganaris GA, Diamantidis G, Antioxidant capacity, phenol, anthocyanin and ascorbic acid content in raspberries, blackberries, red currants, gooseberries and Cornelian cherries, Food Chemistry, 2007, 3, 777-783.

8 LITERATURA

- Parvu M, Toiu A, Vlase L, Parvu EA, Determination of some polyphenolic compounds from *Allium* species by HPLC-UV-MS, Natural Product Research, 2010, 24, 1318-1324.
- Peterson G, Review of the folin phenol protein quantitation method of lowry, rosebrough, farr and randall, Analytical Biochemistry, 1979, 2, 201–220.
- Peterson J, Dwyer J, Bhagwat S, Haytowitz D, Holden J, Eldridge AL, Beecher G, Aladesanmi J, Major flavonoids in dry tea, Journal of Food Composition and Analysis, 2005, 18, 487-501.
- Prakash D, Singh BN, Upadhyay G, Antioxidant and free radical scavenging activities of phenols from onion (*Allium cepa*), Food Chemistry, 2007, 4, 1389-1393.
- Preuss HG, Clouatre D, Mohamadi A, Jarrell T, Wild garlic has a greater effect than regular garlic on blood pressure and blood chemistries of rats, International Urology and Nephrology, 2001, 32, 525-530.
- Prieur C, Rigaud J, Cheynier V, Moutounet M, Oligomeric and polymeric procyanidins from grape seeds, Phytochemistry, 1994, 36, 781-784.
- Radojevic M, Bashkin V, Practical Environmental Analysis, The Royal Society of Chemistry, Cambrige, UK, 1999.
- Radulović N, Dekić M, Stojanović-Radić Z, Zoranić S, *Geranium macrorrhizum* L. (Geraniaceae) essential oil: a potent agent against *Bacillus subtilis*, Chemistry & Biodiversity, 2010, 7, 2783-2800.
- Radulović N, Lazarević J, Ristić N, Palić R, Chemotaxonomic significance of the volatiles in the genus *Stachys* (Lamiaceae): Essential oil composition of four Balkan *Stachys* species, Biochemical Systematics and Ecology, 2007, 4, 196-208.
- Raghavendran B, Sathivel A, Devaki T, Hepatoprotective nature of seaweed alcoholic extract on acetaminophen induced oxidative stress, Journal of Health Science, 2003, 50, 42–46.
- Rajesh M, Latha M, Hepatoprotection by *Elephantopus scaber* Linn. in CCl₄-induced liver injury, Indian Journal of Physiology and Pharmacology, 2001, 45, 481–486.
- Ramful D, Tarnus E, Aruoma OI, Bourdon E, Bahorun T, Polyphenol composition, vitamin C content and antioxidant capacity of Mauritian citrus fruit pulps, Food Research International, 2011, 7, 2088-2099.
- Rao M, Rao C, Pushpangadan P, Shirwaikar A, Hepatoprotective effects of rubiadin, a major constituent of *Rubia cordifolia* Linn, Journal of Ethnopharmacology, 2006, 103, 484–490.
- Reuter HD, *Allium sativum* and *Allium ursinum*: Part 2 Pharmacology and Medicinal Application, Phytomedicine Vol. 2 (1), 1995, 73-91.

8 LITERATURA

- Ribeiro IA, Ribeiro MH, Naringin and naringenin determination and control in grapefruit juice by a validated HPLC method, *Food Control*, 2008, 4, 432-438.
- Rietz B, Isensee H, Strobach H, Makdessi S, Jacob R, Cardioprotective actions of wild garlic (*Allium ursinum*) in ischemia and reperfusion, *Molecular and Cellular Biochemistry*, 1993, 1-2, 143-150.
- Robards K, Prenzer PD, Tucker G, Swatsitang P, Glover W, Phenolic compounds and their role in oxidative process in fruits, *Food Chemistry*, 1999, 66, 401-436.
- Romani A, Pinelli P, Galardi C, Sani G, Cimato A, Heimler D, Polyphenols in greenhouse and open-air-grown lettuce, *Food Chemistry*, 2002, 3, 337-342.
- Sacan O, Yanardag R, Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of chard (*Beta vulgaris* L. var. cicla), *Food and Chemical Toxicology*, 2010, 48, 1275–1280.
- Sadek PC, The HPLC Solvent Guide, 2nd ed., John Wiley & Sons, Inc., New York, USA, 2002.
- Sánchez-Rodríguez E, Ruiz JM, Ferreres F, Moreno DA, Phenolic profiles of cherry tomatoes as influenced by hydric stress and rootstock technique, *Food Chemistry*, 2012, 2, 775-782.
- Santos-Gomes PC, Seabra RM, Andrade PB, Fernandes-Ferreira M, Phenolic antioxidant compounds produced by in vitro shoots of sage (*Salvia officinalis* L.), *Plant Science*, 2002, 162, 981-987.
- Sartoratto A, Machado ALM, Delarmelina C, Figueira GM, Duarte MCT and Rehder VLG. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil, *Brazilian Journal of Microbiology* 2004, 35, 275.
- Scalbert A, Antimicrobial properties of tannins, *Phytochemistry*, 1991, 30, 3875-3883.
- Schmitt B, Schulz H, Storsberg J, Keusgen M, Chemical characterization of *Allium ursinum* L. depending on harvesting time. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, 53, 7288–7294.
- Schofield P, Mbugua DM, Pell AN, Analysis of condensed tannins: a review, *Animal Feed Science and Technology*, 2001, 1-2, 21-40.
- Seeram NP, Aviram M, Zhang Y, Henning SM, Feng L, Dreher M, Heber D, Comparison of Antioxidant Potency of Commonly Consumed Polyphenol-Rich Beverages in the United States, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008, 56, 1415–1422.
- Serkedjieva J, Hay AJ, In vitro antiinfluenza virus activity of a plant preparation from *Geranium sanguineum* L. *Antiviral Research*, 1998, 37, 221–230.

8 LITERATURA

- Singleton VL, Rossi J, Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdc-Phosphotungstic Acid Reagents, American Journal of Enology and Viticulture, 1965, 16, 144-158.
- Sipter E, Auerbach R, Gruiz K, Mathe-Gaspar G, Change of Bioaccumulation of Toxic Metals in Vegetables, Communications in Soil Science and Plant Analysis, 2009, 40, 285–293.
- Skaltsa HD, Demetzos C, Lazari D, Sokovic M, Essential oil analysis and antimicrobial activity of eight *Stachys* species from Greece, Phytochemistry, 2003, 3, 743-752.
- Stajner D, Popovic BM, Canadanovic-Brunet J, Stajner M, Antioxidant and scavenger activities of *Allium ursinum*, Fitoterapia, 2008, 79, 303–305.
- Stajner D, Varga I, An evaluation of the antioxidant abilities of Allium species, Acta Biologica Szegediensis, 2003, 47, 103-106.
- Stearn WT, How many species of Allium are known? Curtis's Botanical Magazine, 1992, 9, 180–182.
- Stecher G, Huck CW, Stoggl WM, Bonn GK, Phytoanalysis: a challenge in phytomics, Trends in Analytical Chemistry, 2003, 22, 1-14.
- Stecher G, Huck CW, Stoggl WM, Bonn GK, Phytoanalysis: a challenge in phytomics. Trends in Analytical Chemistry, 2003, 22, 1–14.
- Sultana B, Anwar F, Flavonols (kaempferol, quercetin, myricetin) contents of selected fruits, vegetables and medicinal plants, Food Chemistry, 2008, 3, 879-884.
- Szymczynska-Madeja A, Welna M, Pohl P, Elemental analysis of teas and their infusions by spectrometric methods, Trends in Analytical Chemistry, 2012, 35, 165-181.
- Škerget M, Kotnik P, Hadolin M, Hraš AR, Simonič M, Knez Ž, Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities, Food Chemistry, 2005, 2, 191-198.
- Thabrew M, Joice P, A comparative study of the efficacy of *Pavetta indica* and *Osbeckia octanda* in the treatment of liver dysfunction, Planta Medica, 1987, 53, 239–241.
- Todorović M, Đurđević P, Antonijević V, Optičke metode instrumentalne analize, Hemijski fakultet, Beograd, 1997.
- Tomas-Barberan F, Espin JC, Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality of fruits and vegetables, Journal of the Science of Food and Agriculture, 2001, 81, 853-876.
- Tomić Z, Sumske biljne zajednice u Srbiji, Beograd, Srbija, 1992.
- Tucakov J, Fitoterapija, Rad, Belgrade, Srbija, 1990.

8 LITERATURA

- Usenik V, Fabčič J, Štampar F, Sugars, organic acids, phenolic composition and antioxidant activity of sweet cherry (*Prunus avium* L.), Food Chemistry, 1, 2008, 185-192.
- Van der Watt E, Pretorius JC, Purification and identification of active antibacterial components in *Carpobrotus edulis* L., Journal of Ethnopharmacology, 2001, 1, 87-9.
- Veljković J, Pavlović A, Mitić S, Tošić S, Stojanović G, Kaličanin B, Stanković D, Stojković M, Mitić M, Brčanović J, Evaluation of individual phenolic compounds and antioxidant properties of black, green, herbal and fruit tea infusions consumed in Serbia: spectrophotometrical and electrochemical approaches, Journal of Food and Nutrition Research, 2013, 52, 12–24.
- Vishweshwar P, McMahon JA, Oliveira M, Peterson ML, Zawortko MJ, The Predictably Elusive Form II of Aspirin, Journal of the American Chemical Society, 2005, 127, 16802-16803.
- Ward NI, Savage JM, Metal dispersion and transportational activities using food crops as biomonitoring, Science of The Total Environment, 1994, 146–147, 309-319.
- Wiedenhoeft AC, Plant Nutrition, Chelsea House Pub, New York, 1 edition, 2006.
- Wiersma D, van Goor B, van der Veen N, Cadmium, Lead, Mercury, and Arsenic Concentrations in Crops and Corresponding Soils in The Netherlands, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1986, 6, 1067-1074.
- Wu H, Dushenkov S, Ho CT, Sang S, Novel acetylated flavonoid glycosides from the leaves of *Allium ursinum*, Food Chemistry, 2009, 115, 592-595.
- Zielinski H, Kozłowska H, Lewczuk B, Bioactive compounds in the cereal grains before and after hydrothermal processing, Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2001, 2, 159–169

9 Biografija sa bibliografijom

9 BIOGRAFIJA SA BIBLIOGRAFIJOM

Milan Stojković je rođen 1. januara 1982. godine u Nišu. Osnovnu školu „Dobrila Stambolić“ završio je u Svrlijigu a Vojnu gimnaziju u Beogradu. Studije hemije je upisao 2002. godine na Odseku za hemiju Prirodno-matematičkog fakulteta u Nišu. Studije je završio 2007. godine sa prosečnom ocenom 9,64 i odbranjениm diplomskim radom „Određivanje ibuprofena kinetičkom metodom“ sa ocenom 10. Proglašen je za studenta generacije 2006/2007. Školske 2008/2009. godine upisao je doktorske studije na Odseku za hemiju Prirodno-matematičkog fakulteta u Nišu. Sada je student završne godine doktorskih studija. Položio je sve ispite i odbranio sve Studijske istraživačke radeve sa prosečnom ocenom 9.75.

Septembra 2009. godine Milan Stojković je zasnovao radni odnos na Prirodno-matematičkom fakultetu u Nišu, kao asistent za naučnu oblast Analitička hemija. U toku rada na Prirodno-matematičkom fakultetu izvodio je vežbe iz predmeta Analitička hemija I, Instrumentalna analitička hemija, Instrumentalna analitička hemija I, Instrumentalna analitička hemija II, Analitička hemija životne sredine i Fizičko-hemijska svojstva voda. U periodu 2008-2010. godine bio je angažovan kao istraživač na projektu „Razvoj i primena metoda za praćenje kvaliteta industrijskih proizvoda i životne sredine“, a od 2011. godine na projektu „Kombinatorne biblioteke heterogenih katalizatora, prirodnih proizvoda, modifikovanih prirodnih proizvoda i njihovih analoga: put ka novim biološkim agensima“.

Učešće na projektima

- „Kombinatorne biblioteke heterogenih katalizatora, prirodnih proizvoda, modifikovanih prirodnih proizvoda i njihovih analoga: put ka novim biološkim agensima“ (evidencijski broj projekta – 172061), finansiran od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, 2011-2014.
- „Razvoj i primena metoda za praćenje kvaliteta industrijskih proizvoda i životne sredine“ (evidencijski broj projekta - 142015), finansiran od strane Ministarstva za nauku i tehnološkog razvoja Republike Srbije, 2008-2010.

Objavljeni radovi:

M21 - Rad u vrhunskom međunarodnom časopisu (8 bodova)

- Snežana S. Mitić, Mirjana V. Obradović, Milan N. Mitić, Danijela A. Kostić, Aleksandra N. Pavlović, Snežana B. Tošić, **Milan B. Stojković**, Elemental Composition of Various Sour Cherry and Table Grape Cultivars Using Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry Method (ICP-OES), *Food Analytical Methods*, 5, 279-286, 2012. (IF=1.932)

M22 - Rad u istaknutom međunarodnom časopisu (5 bodova)

2. Niko S. Radulović, **Milan B. Stojković**, Snežana S. Mitić, Pavle J. Randjelović, Ivan R. Ilić, Nikola M. Stojanović and Zorica Z. Stojanović-Radić, Exploitation of the Antioxidant Potential of *Geranium macrorrhizum* (Geraniaceae): Hepatoprotective and Antimicrobial Activities, *Natural Product Communications*, 7 (12), 1609-1614, 2012, (IF=1.242).

M23 - Rad u međunarodnom časopisu (3 boda)

3. Snežana S. Mitić, Aleksandra N. Pavlović, Snežana B. Tošić, Emilija T. Pecev, Milan N. Mitić, **Milan B. Stojković**, Development and application of method for clonazepam determination based on ligand-exchange reaction, *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 11 (1), 91-98, 2012, (IF=0.528).
4. Snežana S. Mitić, Dušan Đ. Paunović, Aleksandra N. Pavlović, Snežana B. Tošić, **Milan B. Stojković**, Milan N. Mitić, Phenolic Profiles and Total Antioxidant Capacity of Beers Consumed in Serbia Assessed by Three in Vitro Evaluation assays, *International journal of food properties*, 2014, 17 (4), 908-922. (IF=0.877).
5. Dragan S. Velimirovic, Snežana S. Mitic, Snežana B. Tasic, Aleksandra N. Pavlovic, **Milan B. Stojkovic**, Determination of the some trace elements in particulsr samples of grains, flours and breads by ICP-OES, *Oxidation Comunications*, 2012, 35 (1), 160-171. (IF=0.250)
6. Snežana S. Mitić, **Milan B. Stojković**, Aleksandra N. Pavlović, Snežana B. Tošić, Milan N. Mitić, Heavy Metal Content in Different Types of Smoked meat in Serbia, *Food Additives and Contaminants – Part B*, 2012, 5 (4), 241-245, (IF=0.891).
7. Snežana S. Mitic, **Milan B. Stojkovic**, Jovana LJ. Pavlovic, Milan N. Mitic, Branka T. Stojanovic, Antioxidant activity, phenolic and mineral content of *Stachysgermanica* L. (Lamiaceae), *Oxidation Comunications*, 2012, 35 (4), 1011-1020, (IF=0.123).
8. Jovana N. Veljković, Aleksandra N. Pavlović, Snežana S. Mitić, Snežana B. Tošić, Gordana S. Stojanović, Biljana M. Kaličanin, Dalibor M. Stanković, **Milan B. Stojković**, Milan N. Mitić, Jelena M. Brcanović, Evaluation of individual phenolic compounds and antioxidant properties of black, green, herbal and fruit tea infusions consumed in Serbia: spectrophotometrical and electrochemical approaches, *Journal of Food and Nutrition Research*, 2013, 52 (1), 12–24, (IF=0.600).
9. Snezana S. Mitic, Aleksandra N. Pavlovic, Snezana B. Tošić, Branka T. Stojanovic, Milan N. Mitic, **Milan B. Stojkovic**, Elemental Composition of Various Apple Cultivars Grown in Serbia: *Asian Journal of Chemistry*, 2013, 25 (11), 6027-6032, (IF=0.253).

10. Snezana S. Mitic, Branka T. Stojanovic, **Milan B. Stojkovic**, Milan N. Mitic, Jovana Lj. Pavlović, Total phenolics, flavonoids and antioxidant activity of different apple cultivars, *Bulgarian Chemical Communications*, 2013, 45 (3), 326–331. (IF=0.320)

Radovi saopšteni na naučnim skupovima:

M33 - Radovi saopšteni na naučnim skupovima međunarodnog značaja štampani u celini (1 bod)

1. Snežana S. Mitić, Snežana B. Tošić, Aleksandra A. Pavlović, **Milan B. Stojković**, Milan N. Mitić, Branka Stojanović, Alkali and Alkaline Earth Metal Content of Early Season Vegetables of Souther Serbian Regions, 10th International Multidisciplinary Scientific Geoconferences:SGEM, 2010, Vol II, 665-667.
2. Snežana S. Mitić, Valentina V. Živanović, Milan N. Mitić, **Milan B. Stojković**, Determination of Herbicide 2,4-D in Soil Samples by Kinetic-spectrophotometric Method, 10th International Multidisciplinary Scientific Geoconferences:SGEM, 2010, Vol II, 471-472.

M34 - Radovi saopšteni na skupovima međunarodnog značaja štampani u izvodu (0,5 bodova)

3. Snezana Mitic, Branka Stojanovic, **Milan Stojkovic**, Determination of total phenolic content in apple juices, 1st International Congres: Engineering, materials and management in the processing industry, Jahorina, Republic of Srpska, Book of Abstracts, 168, 2009.
4. B.T. Stojanović, S.S. Mitić, **M.B. Stojković**, M.N. Mitić, J.LJ. Pavlović, I.D. Rašić Mišić, Heavy metal content determination in domestic peaches, Thirteenth Annual Conference, YUCOMAT 2011, Herceg Novi, Book of Abstracts, 157, 2011
5. D. Paunović, S. S. Mitić, A. N. Pavlović, S. B. Tošić, M. N. Mitić, **M. B. Stojković**, R. J. Micić, Antioxidative capacity of commercial beers from Serbia, Thirteenth Annual Conference, YUCOMAT 2011, Herceg Novi, Book of Abstracts, 135, 2011
6. Jelena M. Brcanović, Aleksandra N. Pavlović, Snežana S. Mitić, **Milan B. Stojković**, Milan N. Mitić, Jovana N. Veljković, Fenolni profil i međusobni odnos sadržaja pojedinačnih fenola u kakaou XA ПО6, Prva konferencija mladih hemičara Srbije, Program i kratki izvodi radova, Beograd, 19. i 20. oktobar 2012;
7. **Milan B. Stojković**, Jovana Lj. Pavlović, Branka T. Stojanović, Dušan Đ. Paunović, Aleksandra N. Pavlović, Antioksidativna sposobnost ekstrakata Geranium macrorrhizum L., XA П26, Prva konferencija mladih hemičara Srbije, Program i kratki izvodi radova, Beograd, 19. i 20. oktobar 2012;

9 BIOGRAFIJA SA BIBLIOGRAFIJOM

8. Jovana N. Veljković, Aleksandra N. Pavlović, Snežana S. Mitić, Snežana B. Tošić, **Milan B. Stojković**, Jelena M. Brčanović, Korelacija između različitih in vitro antioksidativnih testova i sadržaj pojedinačnih fenola, ukupnih fenola i flavonoida voćnih infuz čajeva, XA П28, Prva konferencija mladih hemičara srbije, Program i kratki izvodi radova, Beograd, 19. i 20. oktobar 2012;
9. Snežana Mitić, Milan Mitić, Branka Stojanović, **Milan Stojković**, Dušan Paunović, Jovana Pavlović, Antioxidant activity of six apple cultivars in Serbia, BFP-31, 22nd Congress with international participation, Book of Abstracts, sept. 05 – 09 2012, Ohrid
10. Jovana Pavlović, Snežana Mitić, Milan Mitić, Branka Stojanović, **Milan Stojković**, Dušan Paunović, Evaluation of DPPH, FRAP, FRP antioxidant activity of thirteen different strawberry cultivars, BFP-29, 22nd Congress with international participation, Book of Abstracts, sept. 05 – 09 2012, Ohrid
11. Dušan Paunović, Milan Mitić, **Milan Stojković**, Branka Stojanović, Danica Dimitrijević, Jovana Pavlović, Phenolic profiles of commercial dark beers from Serbia, BFP-30, 22nd Congress with international participation, Book of Abstracts, sept. 05 – 09 2012, Ohrid
12. Milan N. Mitić, Snežana S. Mitić, Aleksandra N. Pavlović, Mirjana V. Obradović, Zora M. Grahovac, **Milan B. Stojković**, Natural pigments in Serbian table grapes, XXI congress of chemists and technologists of Macedonia, Ohrid, September 23-26, 2010, Book of Abstracts
13. Milan N. Mitić, Snežana S. Mitić, Aleksandra N. Pavlović, Mirjana V. Obradović, Zora M. Grahovac, **Milan B. Stojković**, Phenolic composition of Serbian fruit wines, XXI congress of chemists and technologists of Macedonia, Ohrid, September 23-26, 2010, BFT-19 Book of Abstracts
14. Milan N. Mitić, Snežana S. Mitić, Aleksandra N. Pavlović, Snežana B. Tošić, **Milan B. Stojković**, Determination of clonazepam based on “Ligand-exchange” reaction, XXI congress of chemists and technologists of Macedonia, Ohrid, September 23-26, 2010, OCBP-12 Book of Abstracts

M64 - Radovi saopšteni na skupovima nacionalnog značaja štampani u izvodu (0,2 boda)

15. **Milan B. Stojković**, Snežana S. Mitić, Branka T. Stojanović, Milan N. Mitić, Hidroksicimetne kiseline u vinogradarskim breskvama, XLVIII Savetovanje Srpskog hemijskog društva, Novi Sad, AH15, 2010.

9 BIOGRAFIJA SA BIBLIOGRAFIJOM

16. Milan N. Mitić, Mirjana V. Obradović, **Milan B. Stojković**, Aleksandra N. Pavlović, Fenolni sastav soka crne ribizle, XLVIII Savetovanje Srpskog hemijskog društva, Novi Sad, AH07, 2010.



Прилог 1.**ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ**

Изјављујем да је докторска дисертација, под насловом

Antioksidativna aktivnost fenolni i mineralni sastav biljnih vrsta: Geranium macrorrhizum L., Allium ursinum L., Stachys germanica L. i Primula veris L.

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

У Нишу, 21. maj 2014.

Аутор дисертације:

Milan Stojković

Потпис докторанда:

Milan Stojković



Прилог 2.

**ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНЕ И ЕЛЕКТРОНСКЕ ВЕРЗИЈЕ ДОКТОРСКЕ
ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Име и презиме аутора:

Milan Stojković

Студијски програм:

Hemija

Наслов рада: Antioksidativna aktivnost, fenolni i mineralni sastav biljnih vrsta: Geranium macrorrhizum L., Allium ursinum L., Stachys germanica L. i Primula veris L.

Ментор:

dr Snežana Mitić

Изјављујем да је штампана верзија моје докторске дисертације истоветна електронској верзији, коју сам предао/ла за уношење у **Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу**.

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

У Нишу, 21. мај 2014.

Аутор дисертације:

Milan Stojković

Потпис докторанда:

Milan Stojković



Прилог 3.**ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ**

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Никола Тесла“ да, у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, унесе моју докторску дисертацију, под насловом:
Antioksidativna aktivnost, fenolni i mineralni sastav biljnih vrsta: Geranium macrorrhizum L., Allium ursinum L., Stachys germanica L. i Primula veris L.

која је моје ауторско дело.

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

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

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

(Молимо да подвучете само једну од шест понуђених лиценци; кратак опис лиценци је у наставку текста).

У Нишу, 21. мај 2014.

Аутор дисертације:

Milan Stojković

Потпис докторанда:

Milan Stojković