

UNIVERZITET U BEOGRADU

HEMIJSKI FAKULTET

Milica S. Jankov

**FITOHEMIJSKI PROFIL I BIOLOŠKA
AKTIVNOST LISTA ČUVARKUĆE
(*Sempervivum tectorum* L.)**

Doktorska disertacija

Beograd, 2024

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF CHEMISTRY

Milica S. Jankov

**PHYTOCHEMICAL PROFILE AND
BIOLOGICAL ACTIVITY OF HOUSELEEK
LEAF (*Sempervivum tectorum* L.)**

Doctoral dissertation

Belgrade, 2024.

Mentor:

dr Dušanka Milojković–Opsenica, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu – Hemijski fakultet

Članovi komisije:

dr Jelena Trifković, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu – Hemijski fakultet

dr Petar Ristivojević, docent

Univerzitet u Beogradu – Hemijski fakultet

dr Vukosava Živković–Radovanović, viši naučni saradnik

Univerzitet u Beogradu – Hemijski fakultet

dr Peđa Janačković, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu – Biološki fakultet

Datum odbrane:

U Beogradu, _____

ZAHVALNICA

Ova doktorska disertacija urađena je na Katedri za analitičku hemiju Univerziteta u Beogradu – Hemijskog fakulteta, pod mentorstvom dr Dušanke Milojković–Opsenice, redovnog profesora Univerziteta u Beogradu – Hemijskog fakulteta. Ovom prilikom joj se najiskrenije zahvaljujem na ukazanoj prilici, poverenju i podršci, kao i na svim savetima i pomoći u svim fazama izrade i pisanja ove doktorske disertacije.

Veliku zahvalnost dugujem dr Jeleni Trifković, redovnom profesoru Univerziteta u Beogradu – Hemijskog fakulteta, za nesebičnu pomoć tokom obrade i tumačenja rezultata proisteklih iz ove teze, kao i na korisnim sugestijama i smernicama pri završnoj izradi doktorske disertacije.

Veliku zahvalnost dugujem dr Petru Ristivojeviću, docentu Univerziteta u Beogradu – Hemijskog fakulteta, na korisnim savetima prilikom izrade ove doktorske disertacije kao i na pomoći tokom pisanja i koncipiranja publikacija.

Posebnu zahvalnost dugujem dr Vukosavi Živković–Radovanović, višem naučnom saradniku Univerziteta u Beogradu – Hemijskog fakulteta, na nesebičnoj pomoći tokom eksperimentalnog rada, kao i na sugestijama prilikom završne izrade ove doktorske disertacije.

Srdačno se zahvaljujem dr Peđi Janačkoviću, redovnom profesoru Univerziteta u Beogradu – Biološkog fakulteta, na stručnoj pomoći i korisnim sugestijama.

Veliku zahvalnost na pomoći u pojedinim fazama eksperimentalnog rada upućujem kolegama dr Iliji Cvijetiću i dr Urošu Gašiću.

Posebno zahvaljujem mojim prijateljima kao i kolegama sa Katedre za analitičku hemiju – Đurđi Ivković, Mili Lazović, Mirjani Mosić, Marku Joviću, Mihajlu Jakanovskom, Milošu Iliću i Igoru Kodranovu što su uvek bili tu i pružali podršku.

Veliku zahvalnost dugujem dr Katarini Karljiković–Rajić, profesorki u penziji, svojoj mentorki sa Univerziteta u Beogradu – Farmaceutskog fakulteta, koja me je podstakla na dalje usavršavanje i pružila nesebičnu podršku i ljubav.

Najveću zahvalnost dugujem svojim roditeljima, Stevanu i Slavni, i bratu Milošu, za njihovu bezgraničnu i nesebičnu podršku, razumevanje, strpljenje, veru i ljubav.

Ovu doktorsku disertaciju posvećujem mojim roditeljima. Hvala vam na svemu!

FITOHEMIJSKI PROFIL I BIOLOŠKA AKTIVNOST

LISTA ČUVARKUĆE (*Sempervivum tectorum* L.)

Predmet istraživanja ove doktorske disertacije jeste sistematsko ispitivanje fitohemijskog profila dvadeset uzoraka listova čuvarkeće (*Sempervivum tectorum* L.) u cilju razvijanja standardnih procedura za njeno ispitivanje s obzirom na to da ne postoji monografija ove biljke u Evropskoj farmakopeji. Pored toga, definisan je fenolni profil i profil šećera preparata čuvarkeće i meda, i određena je *in vitro* biološka aktivnost čuvarkeće i odgovarajućeg preparata sa medom.

Fenolni profil čuvarkeće određen je primenom naprednih tehnika ultraefikasne tečne hromatografije. Prvi put je optimizovana i primenjena metoda visokoefikasne tankoslojne hromatografije za utvrđivanje fenolnog profila u obliku „otiska prsta“ kao jedinstvene karakteristike čuvarkeće i njenih preparata sa medom. Metoda direktne bioautografije primenjena je za procenu *in vitro* antioksidativne, antidijabetske i antibakterijske aktivnosti čuvarkeće i njenih preparata sa medom. Analizom glavnih komponenata identifikovana su pojedinačna bioaktivna jedinjenja odgovorna za ispoljavanje biološke aktivnosti. Ukupan sadržaj fenola, antioksidativna i antidijabetska aktivnost određeni su spektrofotometrijskom metodom. Profil šećera određen je primenom visokoefikasne anjonsko–izmenjivačke hromatografije, dok je multielementalni sastav određen metodom indukovano spregnute plazme sa optičkom emisionom spektroskopijom.

Na osnovu dobijenih rezultata utvrđeno je da svih dvadeset uzoraka čuvarkeće pokazuju slične fitohemijske karakteristike i biološku aktivnost, dok se uzorci preparata čuvarkeće i meda razlikuju u zavisnosti od vrste meda od kojeg su pripremljeni. Dodatak čuvarkeće medu poboljšava biološka svojstva, što se ogleda u većem ukupnom sadržaju fenola i povećanoj antioksidativnoj aktivnosti preparata u odnosu na med.

Ključne reči: čuvarkeća; fitohemijski profil; multielementalni sastav; antioksidativna, antidijabetska i antibakterijska aktivnost; ultraefikasna tečna hromatografija; visokoefikasna tankoslojna hromatografija; bioautografija

Naučna oblast: Hemija

Uža naučna oblast: Analitička hemija

PHYTOCHEMICAL PROFILE AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF HOUSELEEK LEAF (*Sempervivum tectorum* L.)

This doctoral dissertation systematically investigates the phytochemical profile of twenty houseleek leaf samples (*Sempervivum tectorum* L.) in order to develop standardized examination procedures, as there is no monograph of this plant in the European Pharmacopoeia. Additionally, it defines the phenolic and sugar profiles of houseleek and its preparations with honey and determines the *in vitro* biological activity of houseleek and corresponding preparations with honey.

The phenolic profile of the houseleek was determined using advanced techniques of ultra-performance liquid chromatography. For the first time, high-performance thin-layer chromatography was optimized and applied to determine the phenolic profile in the form of a "fingerprint" as a unique characteristic of the houseleek and its preparations with honey. The direct bioautography was applied to evaluate the *in vitro* antioxidant, antidiabetic and antibacterial activity of houseleek and its preparations with honey. Principal component analysis identified bioactive compounds responsible for biological activity. Total phenolic content, antioxidant and antidiabetic activity were determined spectrophotometrically. The sugar profile was determined using high-efficiency anion-exchange chromatography, while the multielemental composition was determined using induced coupled plasma with optical emission spectroscopy.

Based on the obtained results, it was determined that all twenty houseleek samples show similar phytochemical characteristics and biological activity, while its preparations with honey differ depending on the type of honey used. The addition of houseleek to honey enhanced the biological properties, evidenced by a higher total phenolic content and increased antioxidant activity in the preparations compared to honey.

Keywords: houseleek; phytochemical profile; multielemental composition; antioxidant, antidiabetic and antibacterial activity; ultra performance liquid chromatography; high-performance thin-layer chromatography; bioautography

Scientific field: Chemistry

Scientific subfield: Analytical chemistry

SADRŽAJ

1.	UVOD	1
2.	OPŠTI DEO	2
2.1.	Tradicionalna primena lekovitih biljaka	2
2.2.	Sekundarni metaboliti biljaka	3
2.3.	Biološka aktivnost sekundarnih metabolita	8
2.4.	Čuvarkuća (<i>Sempervivum tectorum</i> L.)	11
2.4.1.	Taksonomska klasifikacija i morfologija	11
2.4.2.	Tradicionalna primena čuvarkuće	12
2.4.3.	Fitohemijski sastav čuvarkuće	13
2.4.4.	Biološka aktivnost čuvarkuće	13
2.5.	Med	14
2.5.1.	Med sa dodacima	15
2.6.	Metode za ispitivanje fitohemijskog profila	16
2.6.1.	Hromatografske metode	16
2.6.2.	Indukovano spregnuta plazma sa optičkom emisionom spektroskopijom.....	18
2.7.	Metode za određivanje biološke aktivnosti.....	19
2.7.1.	Ultraljubičasta/vidljiva spektrofotometrija	19
2.7.2.	Visokoeffikasna tankoslojna hromatografija – direktna bioautografija	20
2.7.3.	Priprema slika hromatograma za multivarijantu analizu	23
2.7.4.	Teorija funkcionala gustine.....	24
2.7.5.	Agar–difuzioni metod u bunarićima	25
2.8.	Analiza glavnih komponenata.....	25
3.	EKSPERIMENTALNI DEO	26
3.1.	Uzorci čuvarkuće i meda.....	26
3.2.	Hemikalije, reagensi i standardi.....	27
3.3.	Priprema ekstrakata.....	28
3.4.	Fitohemijska karakterizacija	30
3.4.1.	Spektrofotometrijsko određivanje ukupnog sadržaja fenola.....	30
3.4.2.	Identifikacija fenolnih jedinjenja primenom UPLC–LTQ OrbiTrap MS	30
3.4.3.	Kvantifikacija fenolnih jedinjenja primenom UPLC–DAD MS/MS.....	30
3.4.4.	Razvijanje HPTLC fenolnog profila	31
3.4.5.	Određivanje profila šećera jonskom hromatografijom	31
3.4.6.	Multielementalna analiza primenom ICP–OES.....	31
3.5.	Određivanje biološke aktivnosti.....	32
3.5.1.	Antioksidativna aktivnost	32

3.5.2.	Antidijabetska aktivnost.....	34
3.5.3.	Antibakterijska aktivnost	35
3.6.	Obrada podataka	36
4.	REZULTATI I DISKUSIJA	37
4.1.	Fitohemijaska karakterizacija	37
4.1.1.	Sadržaj vlage u uzorcima listova čuvaruće	37
4.1.2.	Spektrofotometrijsko određivanje ukupnog sadržaja fenola.....	38
4.1.3.	Identifikacija fenolnih jedinjenja	40
4.1.4.	Kvantifikacija fenolnih jedinjenja.....	49
4.1.5.	HPTLC fenolni profil.....	51
4.1.6.	Profil šećera.....	56
4.1.7.	Elementalna analiza	59
4.2.	Biološka aktivnost.....	61
4.2.1.	Antioksidativna aktivnost	61
4.2.1.1.	Spektrofotometrijsko određivanje antioksidativne aktivnosti	61
4.2.1.2.	HPTLC–antioksidativni testovi	64
4.2.1.3.	Teorija funkcionala gustine (DFT).....	71
4.2.2.	Antidijabetska aktivnost.....	74
4.2.2.1.	Spektrofotometrijsko određivanje antidijabetske aktivnosti	74
4.2.2.2.	HPTLC–antidijabetski test	75
4.2.3.	Antibakterijska aktivnost	79
4.2.3.1.	Agar–difuzioni metod u bunarićima.....	79
4.2.3.2.	HPTLC–antibakterijski testovi	81
5.	ZAKLJUČAK	88
6.	LITERATURA.....	91
7.	PRILOG	102

1. UVOD

Primena lekovitih biljaka u tradicionalnoj medicini za prevenciju i kao dodatna terapija različitih stanja i bolesti zastupljena je širom sveta. Sa otkrivanjem novih fitojedinjenja i proučavanjem njihovih bioloških svojstava značaj tradicionalne medicine neprestano raste. Lekovite biljke su nepresušan izvor brojnih jedinjenja koja mogu ispoljavati različite oblike biološke aktivnosti, a koja mogu poslužiti za otkrivanje novih aktivnih struktura. Kontinuirano ispitivanje sastava i dejstva lekovitih biljaka može dovesti do otkrića novih lekova i terapija koje značajno mogu doprineti razvoju moderne medicine.

Čuvarkuća (*Sempervivum tectorum* L.) je biljka iz porodice sukulenata (Crassulaceae) sa sočnim, mesnatim listovima koji zadržavaju veliku količinu vode. Upotreba listova i soka iscedenog iz listova čuvarkuće široko je zastupljena u tradicionalnoj medicini za različita stanja. Spoljašnja primena uključuje tretiranje promena na koži kao što su čirevi, opekotine, ujed insekata i bradavice. Sok iz listova čuvarkuće se takođe koristi za direktno ukapavanje u uho zahvaćeno upalom. Pored spoljašnje primene, čuvarkuća se koristi i oralno (*per os*) za tretman različitih stanja kao što su čir na želucu, infekcija mokraćne bešike, loše varenje, snižavanje nivoa šećera u krvi, ublažavanje menstrualnih tegoba i jačanje imuniteta [1, 2]. Zbog svoje raznovrsne primene i bogatog sadržaja aktivnih fitojedinjenja, čuvarkuća predstavlja vredan resurs koji zahteva dalja naučna ispitivanja.

Međutim, bez obzira na široku tradicionalnu primenu ne samo na našim prostorima već i u celom Mediteranu gde ova biljka prirodno raste i uzgaja se, primena čuvarkuće nije uvedena u savremenu medicinsku praksu [3]. Čuvarkuća je nezvanična biljna droga jer njena monografija nije registrovana u Evropskoj farmakopeji (*European pharmacopoeia*) [4] i ne postoje standardne metode za fitohemijsku analizu.

Takođe, jedna od tradicionalnih primena čuvarkuće je njena kombinacija sa medom za različita stanja. U literaturi se navodi da se listovi čuvarkuće u kombinaciji sa medom koriste za podizanje imuniteta i tretman težih zdravstvenih stanja [5], kao i da se sok iz listova čuvarkuće pomešan sa medom koristi kod čira na dvanaestopalačnom crevu, žgaravice, gastritisa, intestinalne kandide i kancera debelog creva [6]. Do sada ne postoje informacije u naučnoj literaturi o ispitivanju mešavine čuvarkuće i meda.

U okviru ove doktorske disertacije urađena je analiza ekstrakata dvadeset uzoraka osušenih listova čuvarkuće u 70% etanolu, kao i ekstrakata preparata koji su pripremljeni mešanjem svežih listova čuvarkuće sa bagremovim i livadskim medom. Cilj naučnog istraživanja obuhvata sistematsku fitohemijsku karakterizaciju i *in vitro* određivanje biološke aktivnosti poput antioksidativne, antidijabetske i antibakterijske aktivnosti, kako za ekstrakte osušenih listova čuvarkuće, tako i za ekstrakte preparata čuvarkuće i meda. Planirano je ispitivanje većeg broja uzoraka listova čuvarkuće, međusobno poređenje dobijenih rezultata, kao i poređenje sa rezultatima ekstrakata preparata čuvarkuće i meda. Zbog tradicionalne primene listova čuvarkuće za snižavanje nivoa šećera u krvi, od velikog je značaja određivanje profila šećera u ekstraktima listova čuvarkuće, kao i određivanje antidijabetske aktivnosti ispitivanjem mogućnosti inhibicije enzima α -amilaze. Takođe, zbog mogućnosti oralne primene, važno je odrediti sadržaj makro- i mikro-elemenata. Uz to, detaljnom analizom ekstrakata preparata čuvarkuće i meda po prvi put je ispitan kompletan fenolni profil, profil šećera, kao i ispoljavanje određene biološke aktivnosti. U tom cilju planiran je razvoj i optimizacija hromatografskih metoda kao ključnih analitičkih postupaka za određivanje fitohemijskog profila ekstrakata ove biljke. Pored toga, predviđen je razvoj i primena metode direktne bioautografije za određivanje biološke aktivnosti ekstrakata kao i multivarijantna analiza i odgovarajući matematički modeli za identifikaciju pojedinačnih jedinjenja koja su odgovorna za ispoljavanje određene biološke aktivnosti čuvarkuće.

Ova istraživanja pružaju dublji uvid u fitohemijski sastav i biološku aktivnost čuvarkuće i preparata čuvarkuće i meda, što može doprineti njihovoj daljoj primeni u medicini i farmaciji.

2. OPŠTI DEO

2.1. Tradicionalna primena lekovitih biljaka

Praksa korišćenja lekovitih biljaka primenjivana je unazad hiljadama godina i zastupljena je u tradicionalnoj medicini mnogih naroda i kultura širom sveta. Biljke su korišćene ne samo za tretman različitih zdravstvenih stanja već i za očuvanje opšteg zdravlja i vitalnosti. Ova praksa zasniva se na sve većem razumevanju biljaka i njihovih svojstava koje su vremenom prepoznate i dokumentovane kao lekovite. Sa napretkom nauke i istraživanja moderna medicina počinje da otkriva i priznaje fitoterapijsku vrednost lekovitog bilja i njihovih preparata, što je dovelo do sve veće integracije tradicionalne i savremene medicine. Lekovite biljke se koriste samostalno ili kao dopuna konvencionalnim medicinskim tretmanima. Osim toga, mnoge studije bave se istraživanjem i potvrđivanjem potencijalne koristi i terapijskih efekata biljaka i njihovih preparata, što doprinosi široj implementaciji tradicionalne medicine.

Još su stari Sumeri pre oko 5000 godina imali zabeleženo na glinenim pločama oko 250 različitih biljaka. U Kini i Indiji, pre više od 2000 godina, nastali su zapisi o biljnim drogama. U Egiptu su mirisne biljke i etarska ulja korišćeni za pravljenje parfema i balsamovanje. Biblija takođe navodi korišćenje mirte i timijana tokom nekih rituala. Mnoge biljke, poput bibera, cimeta, korijandera i kardamoma korišćene su kao začini kroz istoriju, a i dalje imaju široku primenu. U staroj Grčkoj prve podatke o lekovitim biljkama zapisao je Hipokrat, a njegovo delo nastavio je Teofrast koji je osnovao prvu botaničku baštu u Atini. Dioskorid se smatra najvećim poznavaoцем lekovitih biljaka i lečenja biljem, a u svom delu *De Materia Medica* detaljno je opisao način branja, čuvanja i terapijske primene biljaka. Tokom srednjeg veka, nauka i proučavanje lekovitog bilja su bili potisnuti, gajenje i korišćenje biljaka je prebačeno u manastire, gde su sačuvani dragoceni spisi i znanja o lekovitim svojstvima biljaka [7].

Na našim prostorima primena biljaka ima dugu tradiciju kako u ishrani tako i u lekovite svrhe. Prva pisana dela o lekovitim biljkama nastala su u manastirima Hilandaru i Studenici (*Hilandarski medicinski kodeks*, 13–16. vek) [8]. Za vreme vladavine Turaka na ovim prostorima narodna medicina se dobro razvijala jer su biljke predstavljale najdostupniju sirovinu za izradu lekova. U ovom periodu, Zaharije Orfelin Stefanović objavljuje *Veliki srpski travnik* u kojem su opisane lekovite biljke i bolesti za čije lečenje su korišćene. Detaljne informacije o lekovitim biljkama, njihovi opisi, sastav, način upotrebe i stanja u kojima se koriste mogu se naći u knjizi *Lečenje biljem* Jovana Tucakova [9].

Prema Svetskoj zdravstvenoj organizaciji (SZO) biljni lekovi obuhvataju biljke, preparate od biljaka kao i gotove biljne proizvode [10]. Na globalnom nivou je porastao broj pravila i zakona kojima su regulisani biljni lekovi. U nekim državama biljni lekovi su regulisani istim ili sličnim propisima kao konvencionalni farmaceutski proizvodi, dok se u drugim državama primenjuju posebni propisi samo za biljne lekove. Najveći broj država koje imaju nacionalne propise za biljne lekove i sisteme za njihovu registraciju nalazi se u Evropi [10]. Glavni izazovi sa kojima se suočavaju zemlje članice SZO u vezi sa propisima koji se odnose na proizvode za primenu u tradicionalnoj i konvencionalnoj medicini (TCM) navode nedostatak istraživačkih podataka, nedostatak finansijske podrške za istraživanja, lošu organizaciju za praćenje bezbednosti TCM proizvoda, nedostatak edukacije i obučavanja kao i nedostatak stručnosti u nacionalnim zdravstvenim vlastima i kontrolnim agencijama [10].

Biljni lekovi (BL) i tradicionalni biljni lekovi (TBL) su u Republici Srbiji regulisani Zakonom [11]. Ovi lekovi sadrže biljne droge (cele biljke ili delove biljaka, osušene, ređe sveže) ili preparate biljnih droga (ekstrakti, tinkture, etarska ulja) kao aktivne komponente. Neophodno je da BL ispunjavaju standarde u pogledu kvaliteta, efikasnosti i bezbednosti kako bi bili korišćeni za lečenje, ublažavanje i prevenciju bolesti i zdravstvenih tegoba [12]. Upotreba TBL zasniva se na dugogodišnjoj tradicionalnoj primeni i iskustvu, te se mogu koristiti za prevenciju bolesti i tretman blažih zdravstvenih stanja [12]. U Srbiji se koristi Jugoslovenska farmakopeja V (*Pharmacopoeia Jugoslavica V*, 2000), a obavezne su i druge relevantne farmakopeje i njihove monografije poput

Evropske farmakopeje, Britanske farmakopeje i Farmakopeje Sjedinjenih Američkih Država. Podaci o efikasnosti i bezbednosti biljnih droga i preparata biljnih droga, kao i njihove karakteristike i procedure za identifikaciju mogu se naći u njihovim monografijama [12].

2.2. Sekundarni metaboliti biljaka

Metabolizam je skup biohemijskih procesa koji su katalizovani enzimima omogućavajući organizmima da rastu, razvijaju se i razmnožavaju, održavaju strukturu i reaguju na promene u okolini. Biljke koriste različite metaboličke procese kako bi sintetisale širok spektar jedinjenja koja se mogu klasifikovati kao primarni i sekundarni metaboliti.

Primarni metabolizam obuhvata sintezu osnovnih metabolita biljaka kao što su šećeri, masti, proteini, aminokiseline i nukleinske kiseline. Ovi primarni metaboliti igraju ključnu ulogu u osnovnim biološkim procesima koji omogućavaju preživljavanje biljke kao što su rast, razvoj i reprodukcija. Proizvode se u velikim količinama tokom faze rasta i isti su u svim biljkama [13].

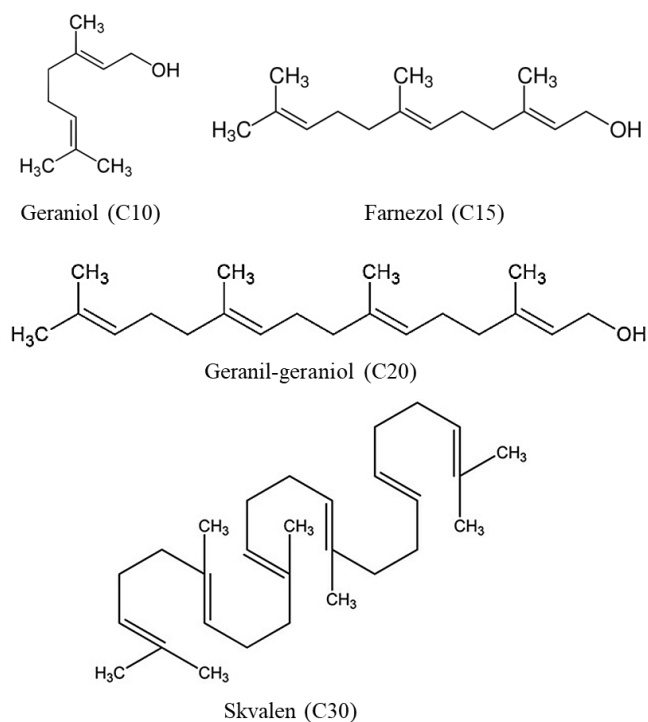
Sekundarni metabolizam obuhvata proizvodnju sekundarnih metabolita iz osnovnih, gradivnih jedinica primarnog metabolizma. Njihova glavna uloga je ekološka i zaštitna omogućavajući biljkama da se prilagode različitim uslovima životne sredine. Ovi metaboliti su specifični za svaku biljnu vrstu, raznolike su strukture i često pokazuju specifične biološke i farmakološke aktivnosti [13]. Biosinteza sekundarnih metabolita odvija se različitim metaboličkim putevima koristeći tri osnovna prekursora:

- **acetat:** acetat–malonatni put (masne kiseline, poliacetileni, prostaglandini, polifenoli, makrociklični antibiotici); acetat–mevalonatni put (terpenoidi, steroidi, karotenoidi),
- **šikiminska kiselina:** šikimatni put (aromatične aminokiseline, kumarini, flavonoidi),
- **aminokiseline:** divergentni putevi (alkaloidi i peptidni antibiotici).

Podela sekundarnih metabolita je složen proces koji omogućava klasifikaciju fitojedinjenja u grupe uzimajući u obzir više faktora. Sekundarni metaboliti su podeljeni u tri glavne grupe: terpeni, fenoli i alkaloidi [14].

Terpeni

Terpeni čine veliku i strukturno veoma raznovrsnu grupu prirodnih sekundarnih metabolita koji su uglavnom prisutni u biljkama čiji se skelet sastoji samo od atoma ugljenika. Nastaju acetat–mevalonatnim putem gde se acetat metaboličkim procesima prevodi u mevalonsku kiselinu sastavljenu od izoprenskih (C₅) strukturnih jedinica. Dekarboksilacijom mevalonske kiseline nastaje izopentenil–pirofosfat, aktivni ekvivalent izoprena, prekursor u sintezi izoprenoida. Kondenzacija izoprenoidnih jedinica se dešava po principu glava–rep, a ređe glava–glava, čime dolazi do sinteze linearnih prekursora geraniola (C₁₀), farnezola (C₁₅), geranil–geraniola (C₂₀) i skvalena (C₃₀) iz kojih se daljim enzimskim reakcijama sintetišu ostali terpeni (**Slika 1**) [14, 15].



Slika 1. Linearni prekursori terpena

U zavisnosti od broja C₅ izoprenskih jedinica koje učestvuju u sintezi, terpeni se mogu podeliti na: monoterpeni (C₁₀), seskviterpeni (C₁₅), diterpeni (C₂₀), triterpeni (C₃₀) i tetraterpeni (C₄₀) [15].

Monoterpeni se pretežno nalaze u biljkama, ali se neki od njih (poput iridoida) mogu naći i kod insekata, dok su kod životinja retki. Oni su glavni sastojci etarskih ulja biljaka, kojima daju karakteristične mirise i boju. Monoterpeni predstavljaju grupu biološki veoma aktivnih jedinjenja. Aciklični diterpeni su veoma retki, a najpoznatiji je alkohol fitol koji se ugrađuje u molekul hlorofila. Najpoznatiji tetraciklični diterpeni su biljni hormoni rasta – giberelini. Triterpeni su široko prisutni u biljnom i životinjskom svetu i od vitalne su važnosti za opstanak mnogih organizama, uključujući i ljude. S obzirom na važnu ulogu triterpena za mnoge organizme, ne mogu se smatrati sekundarnim metabolitima u pravom smislu, jer su ključni za brojne biološke procese. Triterpeni se grade od skvalena, čijom metaboličkom transformacijom nastaje sterol, a od njega veliki broj raznovrsnih jedinjenja. Kod životinja, skvalen se transformiše do lanosterola, a nakon toga do holesterola, dok se kod biljaka transformiše do fitosterola. U grupu triterpena spadaju jedinjenja koja su od vitalne važnosti za opstanak mnogih organizama, a naročito ljudi i životinja (holesterol, steroidi i steroidni hormoni, žučne kiseline, vitamin D). Daljim metabolizmom holesterola kod životinja nastaju steroidni hormoni (mineralokortikoidi, glukokortikoidi, androgeni i estrogeni hormoni), vitamin D₃ i žučne kiseline. Metabolizmom fitosterola u biljkama nastaju saponogenini (glikozidi saponina), steroidni alkaloidi i vitamin D₂. Karotenoidni pigmenti, metaboliti biljaka, spadaju u grupu tetraterpena čije je polazno jedinjenje za sintezu likopen – glavni crveni pigment paradajza. Najpoznatiji tetraterpen je narandžasti β–karoten, prekursor vitamina A, koji se nalazi u šargarepi. Kod ljudi i životinja najpoznatiji tetraterpenski metaboliti su vitamini A₁ i A₂ koji čine osnovu rodopsina i drugih fotopigmenata vida [14].

Terpeni ispoljavaju širok spektar različitih bioloških aktivnosti kao što su antioksidativna, antiinflamatorna, antitumorska, antibakterijska, antivirusna, antimalarijska. Usporavaju starenje, snižavaju nivo šećera u krvi, deluju preventivno na kardiovaskularni i nervni sistem [16–18].

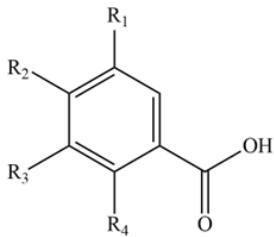
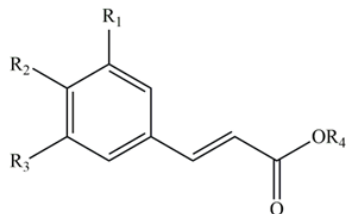
Fenoli

Fenoli su sekundarni metaboliti koji su veoma zastupljeni u prirodi. Sastoje se iz bar jednog benzenovog prstena koji je supstituisan fenolnim grupama, a mogu imati i bočni lanac različite dužine.

Acetat–malonatnim metaboličkim putem, kondenzacijom acetata sa više jedinica malonata, dobijaju se poliketidi, fenoli koji se mogu svrstati u grupe u zavisnosti od broja C_2 jedinica od kojih se sastoji njihov skelet. Tetraketidi ($4 \times C_2$) su veoma brojna jedinjenja među kojima je najpoznatija penicilinska kiselina. Naftohinoni su heksaketidnog porekla ($6 \times C_2$) i vrlo su retki. Ciklizacijom oktaketidnog lanca ($8 \times C_2$) nastaju antrahinoni, a raskidanjem antrahinonskog prstena nastaju ksantoni. Najpoznatiji nonaketidi ($9 \times C_2$) su tetraciklični antibiotici, dok su najpoznatiji deketetidi ($10 \times C_2$) aflatoksini. Makrociklični antibiotici su takođe grupa poliketida [19].

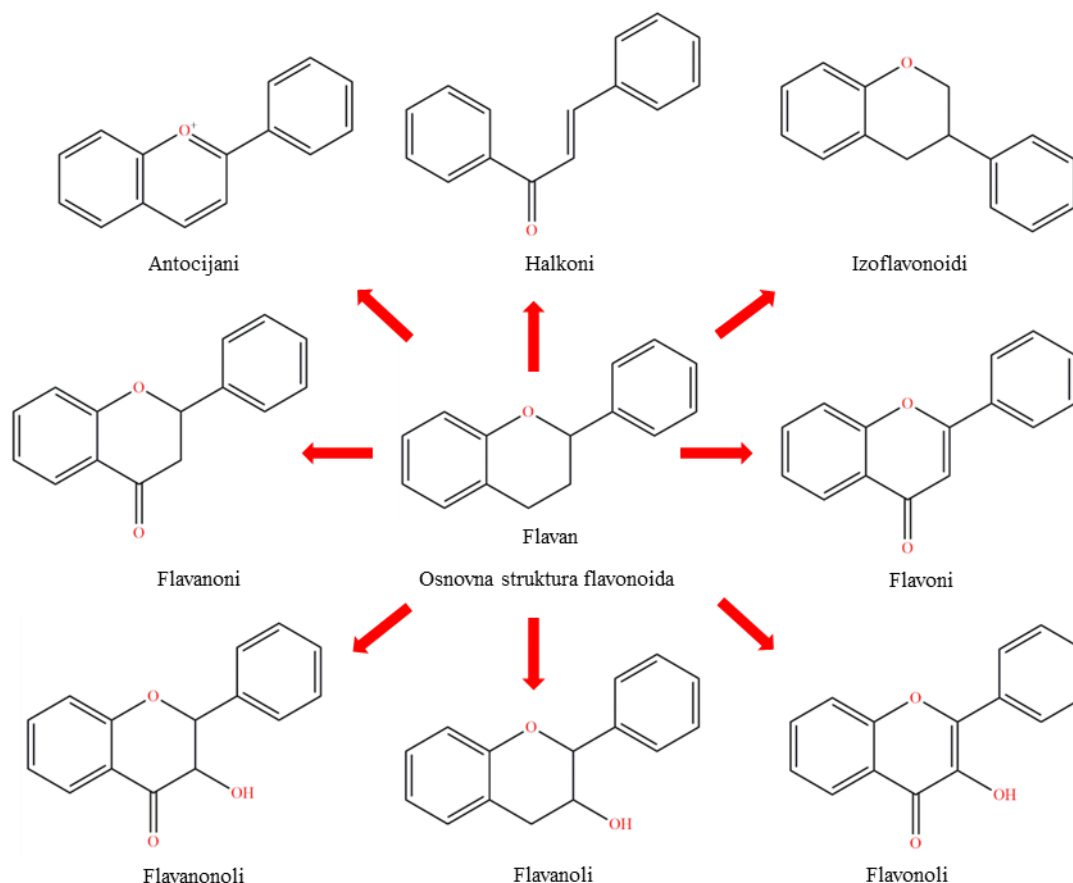
Drugi put metabolizma fenolnih jedinjenja je iz šikiminske kiseline (šikimatni put). Iz šikiminske kiseline nastaju aromatične aminokiseline L–fenilalanin, L–tirozin i L–triptofan. Procesom deaminovanja fenilalanina i tirozina nastaju cimetna kiselina i *p*–kumarinska kiselina, koje ulaze u fenilpropanoidni put biosinteze. Fenilpropanoidnim putem nastaje veliki broj fenilpropanoidnih, šikimatskih metabolita (C_6-C_1 , C_6-C_2 , C_6-C_3 i $C_6-C_3-C_6$ molekulske strukture). Kod svih ovih metabolita česte su reakcije monooksigenacije čime se uvode fenolne grupe u skelet molekula, koje mogu biti slobodne ili vezane estarskim ili glikozidnim vezama. Najvažnija fenolna jedinjenja prisutna u biljkama iz grupe fenilpropanoida su fenolne kiseline, flavonoidi i tanini [19].

Fenolne kiseline koje su derivati benzoeve kiseline imaju C_6-C_1 skelet. Benzenov prsten može biti supstituisan različitim brojem slobodnih ili metilovanih fenolnih grupa. Fenolne kiseline derivati cimetne kiseline poseduju C_6-C_3 skelet. U bočnom nizu ovih kiselina nalazi se dvostruka veza, a karboksilna grupa može biti slobodna ili esterifikovana. Neke od fenolnih kiselina prikazane su na **Slici 2**.

Osnovna struktura molekula	Naziv	Funkcionalna grupa			
		R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Derivati benzoeve kiseline					
	Salicilna kiselina	H	H	H	OH
	<i>p</i> -Hidroksibenzoeva kiselina	H	OH	H	H
	Gentizinska kiselina	OH	H	H	OH
	Protokatehuinska kiselina	H	OH	OH	H
	Galna kiselina	OH	OH	OH	H
	Vanilinska kiselina	H	OH	OCH ₃	H
	Siringinska kiselina	OCH ₃	OH	OCH ₃	H
Derivati cimetne kiseline					
	<i>p</i> -Kumarinska kiselina	H	OH	H	H
	Kofeinska kiselina	H	OH	OH	H
	Ferulinska kiselina	OCH ₃	OH	H	H
	Sinapinska kiselina	OCH ₃	OH	OCH ₃	H
	Hlorogena kiselina	H	OH	OH	C ₇ H ₉ O ₅

Slika 2. Fenolne kiseline, derivati benzoeve i cimetne kiseline

Flavonoidi su prirodna jedinjenja koja su prisutna u voću, povrću, žitaricama, kao i u različitim delovima biljaka poput kore, korena, stabljika i cvetova. Takođe se nalaze u nekim napicima poput čaja i vina. Naziv su dobili od latinske reči *flavus* što znači žut, mada ova jedinjenja mogu biti i crvene, ljubičaste, plave i narandžaste boje. Formula osnovne strukture flavonoida je $C_6-C_3-C_6$. U zavisnosti od modifikacija koje se javljaju u osnovnoj strukturi flavonoidi su podeljeni na više klasa koje se razlikuju prema stepenu zasićenosti osnovne strukture, broju i poziciji fenolnih grupa kao i prema poziciji sekundarnog aromatičnog prstena. Flavonoidi se mogu klasifikovati na derivate halkona, izoflavonoida, flavona, flavanola, flavanonola, flavanona i antocijana (Slika 3) [20].



Slika 3. Klasifikacija flavonoida

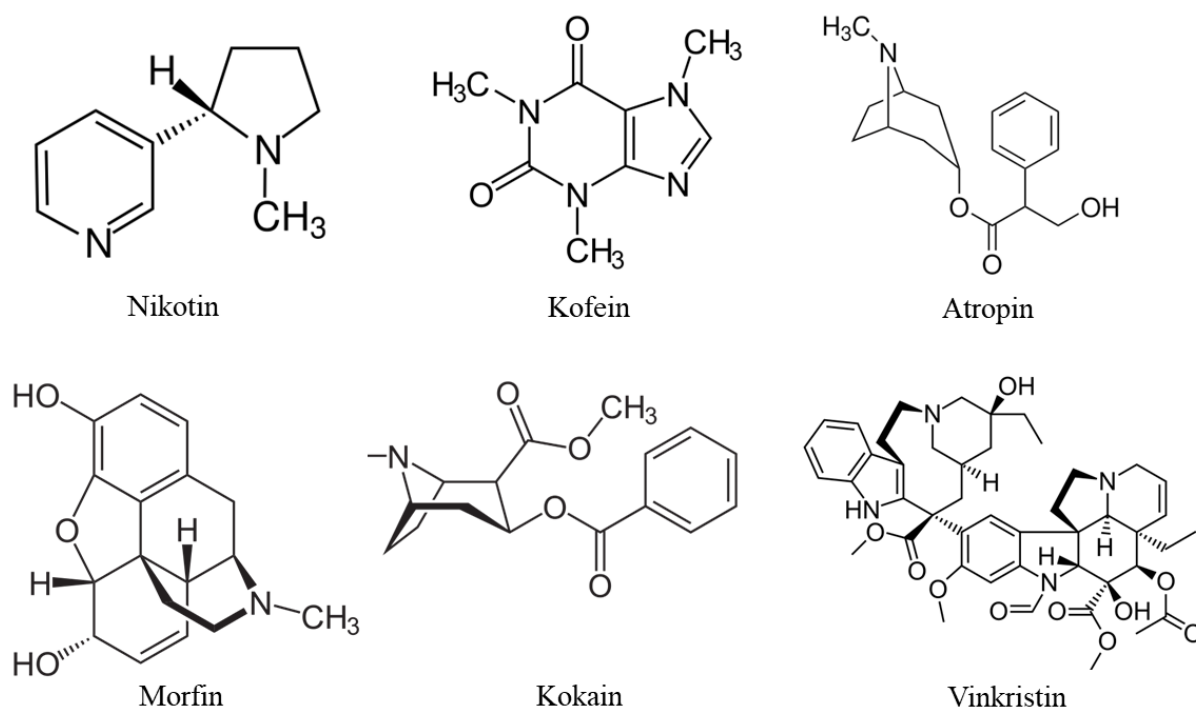
Flavonoidi i fenolne kiseline su biološki veoma aktivna jedinjenja. Najbolje je ispitana njihova antioksidativna aktivnost koja je potvrđena brojnim studijama. Antitumorski efekat zasniva se na sposobnosti flavonoida da smanjuju proliferaciju ćelija i usporavaju angiogenezu. Antiinflamatorna aktivnost flavonoida ogleda se kroz potencijal da inhibiraju ciklooksigenazni i lipooksigenazni put sinteze inflamatornih medijatora, kao i da inhibiraju sintezu eikozanoida – prostaglandina, koji su uključeni u inflamatorni odgovor. Utiču preventivno na kardiovaskularne bolesti, pokazuju antitrombogenu aktivnost i smanjuju nivo holesterola [21]. Neki flavonoidi ispoljavaju i antidijabetsku, vazorelaksantnu, imunomodulatornu, antimutagenu i antiestrogenu aktivnost [22].

Kumarini (C_6-C_3 -laktone) su, takođe, dosta prisutni u biljkama, nastaju metabolizmom iz cimetne kiseline i *p*-kumarinske kiseline. Kumarini su poznati po tome što ispoljavaju antikoagulantnu aktivnost, a takođe i antimikrobno, antiinflamatorno i antitumorsko dejstvo [23].

Alkaloidi

Alkaloidi čine veliku i raznovrsnu grupu farmakološki aktivnih jedinjenja koji su proizvodi sekundarnog metabolizma biljaka, ali ih mogu sintetisati i neke životinje i mikroorganizmi. Mogu se naći u korenu, kori i listovima zeljastih i drvenastih biljaka najčešće u obliku soli organskih kiselina, a ređe u obliku amida, estara, glikozida ili slobodni. Iako su široko zastupljeni u biljkama ne ispoljavaju značajne fiziološke funkcije u biljnom organizmu. Gorkog su ukusa te ispoljavaju zaštitnu ulogu, tako što štite biljke od insekata i herbivora, a pokazuju i antimikrobnu aktivnost. Pored toga, neki alkaloidi imaju ulogu u klijanju semena [22].

Ovi sekundarni metaboliti se sintetišu iz aminokiselina ornitina, lizina, fenilalanina, tirozina i triptofana. Karakteristična osobina alkaloida je pristupnost jednog ili više atoma azota koji je najčešće ugrađen u heterociklični prsten molekula [22]. Odabrani biljni alkaloidi prikazani su na **Slici 4**.



Slika 4. Strukturne formule alkaloida

Alkaloidi pokazuju veoma širok opseg farmakoloških delovanja uključujući analgeziju, lokalnu anesteziju, hipotenziju, citotoksičnost, vazokonstrikciju, srčanu i respiratornu stimulaciju, opuštanje mišićne muskulature. Pored toga, ispoljavaju i antibakterijsku, antivirusnu, antigljivičnu, antioksidativnu, antiinflamatornu i antitumorsku aktivnost [16].

Farmakološki efekti alkaloida su još od davnina poznati čoveku. Morfijum je prvi alkaloid koji je izolovan 1804. godine iz droge opijuma dobijene zasecanjem čaura opijumskog maka (*Papaver somniferum* var. *album*) za koji se od davnina znalo da ispoljava analgetska svojstva. I danas je primena ovog alkaloida indikovana u terapiji ublaživanja akutnog i hroničnog bola [22, 24]. Kofein se koristi za povećanje budnosti stimulišući respiratorni, kardiovaskularni i nervni sistem, a takođe ima i diuretička svojstva. Nikotin ima umirujuća svojstva ali izaziva i zavisnost. Neki alkaloidi poput kokaina i dietilamida lizerginske kiseline (LSD) imaju psihoaktivna svojstva. Meskalin iz kaktusa ima halucinogena svojstva. Alkaloidi imaju široku medicinsku upotrebu, poput atropina koji je antagonist acetilholina i koristi se za širenje zenica. Ergometrin ispoljava vazokonstriktornu aktivnost i daje se u cilju kontrole krvarenja, a simulira i efekte oksitocina. Kinin pokazuje antimalarijsku aktivnost [25]. Vinka alkaloidi poput vinblastina i vinkristina se nalaze u kliničkoj upotrebi Evrope i SAD u terapiji kancera [26].

2.3. Biološka aktivnost sekundarnih metabolita

Antioksidativna aktivnost

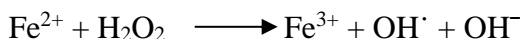
Reaktivne vrste kiseonika (eng. *reactive oxygen species*, ROS) poput superoksidnog anjona ($O_2^{\cdot-}$), hidroksil (OH^{\cdot}), peroksil (ROO^{\cdot}) i alkoksil (RO^{\cdot}) radikala, vodonik–peroksida (H_2O_2) i singletnog kiseonika su nusproizvodi ćelijskog metabolizma i imaju važnu ulogu u prenošenju signala, ekspresiji gena, transportu jona i apoptozi. Pored endogenih faktora, na povećanje nivoa ROS u organizmu utiču i faktori okoline kao što su stres, zagađenje, pesticidi, hemijski agensi i slično. Ćelije se od viška ROS brane prirodnim enzimskim i neenzimskim antioksidansima (glutation, bilirubin, vitamin C, selen). Međutim, kada dođe do prekomerne produkcije ROS usled nekih patoloških stanja što prevazilazi kapacitete antioksidativne odbrane ćelija, dolazi do oštećenja proteina, lipida, RNK i DNK i dalje do razvijanja hroničnih bolesti koje su povezane sa oksidativnim stresom [27, 28].

Veliki broj jedinjenja koja nastaju sekundarnim metabolizmom u biljkama pokazuje antioksidativnu aktivnost. Prirodne izvore antioksidanasa predstavljaju voće i povrće, začini, biljna ulja, različiti delovi biljaka kao što su koren, listovi i seme, orašasti plodovi, kao i pića čaj, kafa i vino. Antioksidansi imaju sposobnost da štite organizam od ROS i reaktivnih vrsta azota (eng. *reactive nitrogen species*, RNS) [28, 29].

Antioksidansi mogu biti klasifikovani kao primarni ili sekundarni antioksidansi. Primarni antioksidansi direktno inhibiraju reakcije oksidacije ostvarujući efekat preko dva moguća mehanizma: prenos jednog elektrona (eng. *single electron transfer*, SET) ili prenos atoma vodonika (eng. *hydrogen atom transfer*, HAT) [28–30].



Sekundarni antioksidansi indirektno ostvaruju antioksidativnu aktivnost helirajući jone prelaznih metala kao što su gvožđe, cink ili bakar u čijem prisustvu nastaju slobodni radikali Fentonovom reakcijom [28–30]:

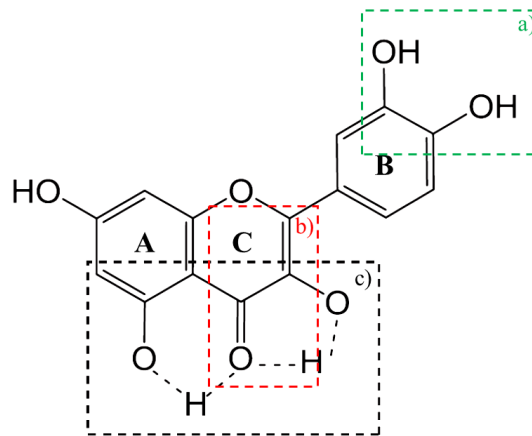


Tri glavne grupe antioksidanasa poreklom iz biljaka su flavonoidi, vitamini i karotenoidi.

Antioksidativna aktivnost flavonoida je dobro ispitana. Za ispoljavanje antioksidativne aktivnosti flavonoida neophodno je prisustvo slobodnih hidroksilnih grupa: njihov broj, pozicija i supstitucija, kao i sistem dvostrukih veza koji omogućava rezonantnu stabilizaciju molekula. Flavonoidi ispoljavaju antioksidativnu aktivnost tako što direktno hvataju ROS, heliraju prelazne metale, aktiviraju antioksidativne enzime, inhibiraju enzime koji su uključeni u puteve stvaranja slobodnih radikala, redukuju radikale α -tokoferola, povećavaju antioksidativnu aktivnost drugih antioksidanasa [31]. U ekstraktima biljaka je uvek prisutan veliki broj flavonoida koji ispoljavaju sinergistički antioksidativni efekat tako što se antioksidansi međusobno štite, imaju različite mehanizme antioksidativne aktivnosti kao i to da jedni druge mogu da regenerišu [32].

Hvatanje radikala i ispoljavanje visoke antioksidativne aktivnosti uslovljeno je prisustvom tri karakteristične strukture u molekulu flavonoida (**Slika 5**) [31]:

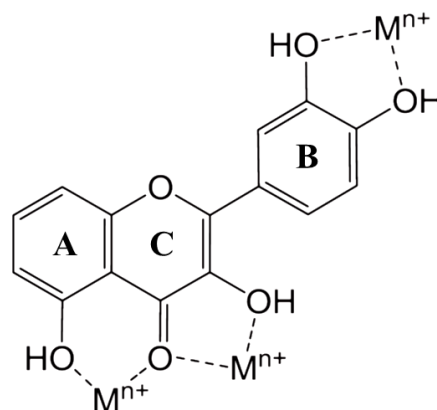
- kateholna (*orto*-dihidroksi) struktura u B prstenu
- 2,3-dvostruka veza u konjugaciji sa 4-okso funkcionalnom grupom u C prstenu
- hidroksilne grupe na položajima 3 i 5



Slika 5. Strukturne karakteristike flavonoida koje uslovljavaju visoku antioksidativnu aktivnost

Eksperimentalno je dokazano da glikozilovana hidroksilna grupa na položaju 3 u prstenu C jako smanjuje antioksidativnu aktivnost jedinjenja te tako kvercetin 3-*O*-glikozid ispoljava nižu antioksidativnu aktivnost od aglikona kvercetina [31, 33].

Poznato je da neki flavonoidi heliraju prelazne metale i tako indirektnim mehanizmom inhibiraju stvaranje slobodnih radikala. Neophodno je da na skeletu molekula postoje mesta za vezivanje jona metala kao što su kateholna grupa u prstenu C i hidroksilne grupe u položajima 3 i 5 (**Slika 6**). Kvercetin je poznat po svojoj sposobnosti da helira i stabilizuje gvožđe [31].



Slika 6. Mesta za vezivanje prelaznih metala [34]

Pored flavonoida, veliki broj terpena ispoljava antioksidativnu aktivnost tako što deluju kardioprotektivno, neuroprotektivno, hepatoprotektivno, gastroprotektivno, nefroprotektivno, štite vid, a imaju i antidijabetsku i antikancersku aktivnost [35]. Karotenoidi kao što su β -karoten, likopen i lutein ispoljavaju antioksidativnu aktivnost prema singletnom kiseoniku vraćajući ga u nepobuđeno stanje [36]. Likopen je karotenoid koji ima široku primenu u prehrambenoj industriji kao boja za hranu, dok se lutein primenjuje u kozmetičkoj industriji jer sprečava lipidnu oksidaciju u ćelijama kože. Međutim, primena karotenoida kao antioksidanasa je ograničena jer su fotosenzitivni i brzo dolazi do njihove oksidacije u kontaktu sa svetlom [36].

Antidijabetska aktivnost

Glavne izvore glukoze u ljudskoj ishrani predstavljaju složeni ugljeni hidrati škrob i glikogen. Pod dejstvom digestivnih enzima kao što su α -amilaza, α -glukozidaza i β -glukozidaza dolazi do razgradnje složenih ugljenih hidrata do polisaharida i monosaharida. Inhibicijom ovih enzima smanjuje se nastanak monosaharida koji se lako apsorbuju i podižu nivo šećera u krvi. Ispoljavanjem antidijabetske aktivnosti aktivnih jedinjenja biljnog porekla postiže se smanjenje glikemijskog indeksa namirnica [37].

Lekovite biljke se mogu koristiti kao dodatna terapija konvencionalnim lekovima za lečenje ili za prevenciju nastanka i razvoja dijabetesa. Ova praksa je prisutna u tradicionalnoj medicini naroda širom sveta, a obuhvata korišćenje lekovitih biljaka ili njihovih preparata radi regulacije nivoa glukoze u organizmu. Mnoga fitojedinjenja (flavonoidi, terpeni, saponini i alkaloidi) ispoljavaju antidijabetsku aktivnost tako što ostvaruju različite efekte kao što su: inhibiranje enzima α -amilaze, β -glukozidaze i β -galaktozidaze, inhibiranje razgradnje skroba, stimulacija glukogeneze i hepatične glikolize, regeneracija β -ćelija pankreasa, povećanje broja i veličine ćelija Langerhansovih ostrvaca, stimulacija sekrecije insulina, povećanje osetljivosti na insulin ili ispoljavanje efekata sličnih onima koje insulin ispoljava. Pored toga, fitojedinjenja svojim antioksidativnim efektom deluju protektivno na antioksidativni stres koji je odgovoran za disfunkciju β -ćelija pankreasa. Svi ovi efekti rezultuju smanjenjem nivoa glukoze u krvi i povećanjem nivoa insulina koji je ključan za transport glukoze u mišićne ćelije i adipocite [38].

Antibakterijska aktivnost

Biljke predstavljaju bogat izvor prirodnih jedinjenja koja ispoljavaju antimikrobnu aktivnost prema bakterijama, gljivicama i virusima. S obzirom na lošu praksu upotrebe konvencionalnih antibiotika i na sve veće razvijanje rezistencije mikroorganizama, istraživanje novih potencijalnih antibiotika i analiza njihove hemijske strukture ima veoma značajnu ulogu. Prednosti korišćenja fitojedinjenja kao antimikrobnih agenasa su njihova laka dostupnost, niska cena i bezbedniji su za upotrebu sa zanemarljivim neželjenim efektima. Neki zajednički mehanizmi kojima fitojedinjenja ostvaruju antimikrobnu aktivnost su poremećaj strukture ćelijskog zida, povećanje propustljivosti ćelijske membrane, interakcija sa vitalnim enzimima, inhibicija sinteze proteina, inhibicija efluks pumpe, oštećenje DNK, poremećaj pH vrednosti u ćeliji bakterije i slično. Na osnovu hemijske strukture i svojstava, fitojedinjenja mogu da ispoljavaju antimikrobnu aktivnost preko jednog ili više mehanizama. Potvrđeno je da antimikrobnu aktivnost ispoljava veliki broj jedinjenja među kojima su polifenoli, alkaloidi, tanini, terpeni, saponini i kumarini [39, 40].

Polifenoli inhibiraju bakterijske faktore virulencije, enzime i toksine, narušavaju integritet ćelijske membrane, povećavaju kiselost u ćeliji smanjujući pH vrednost, sprečavaju formiranje biofilma i ispoljavaju sinergističke efekte sa konvencionalnim antibioticima [41]. Eksperimentalno je potvrđeno da postoji sinergizam između kvercetina i amoksicilina za inhibiranje enzima β -laktamaze kod bakterija koje su razvile rezistenciju na amoksicilin. Resveratrol pokazuje aktivnost na multirezistentne Gram-negativne bakterije inhibirajući aktivnost efluks pumpe [41]. Fenolne kiseline poput galne, *p*-kumarinske, kofeinske i ferulinske narušavaju integritet ćelijske membrane bakterija. Kvercetin, naringenin, apigenin, luteolin, miricetin i hlorogena kiselina interaguju sa krucijalnim enzimima bakterija i time sprečavaju njihov rast i razmnožavanje. Kumarini pored antikoagulantnog efekta ispoljavaju i antibakterijski efekat inhibiranjem DNK žiraze, sprečavajući supernamotavanje DNK lanca [40].

Alkaloidi su strukturno veoma raznovrsna grupa jedinjenja koja pokazuje antimikrobnu aktivnost. Antimikrobni efekti alkaloida ogledaju se kroz uticaj na ćelijsku deobu inhibirajući sintezu nukleinskih kiselina, dovode do disrupcije bakterijske membrane, inhibiraju virulentne faktore bakterija i mogu da inhibiraju formiranje biofilma [41]. Berberin može da inhibira sintezu i ekspresiju bakterijskih enzima, piperin i rezerpin inhibiraju efluks pumpe, a kofein inhibira proteine kojima bakterije međusobno komuniciraju (eng. *quorum sensing proteins*) kao i formiranje biofilma bakterija [40].

Poznato je da jednostavniji terpeni i terpenoidi koji ulaze u sastav etarskih ulja ispoljavaju jaku antimikrobnu aktivnost. Mehanizam dejstva povezan je sa njihovom lipofilnom strukturom koju čini benzenov prsten, veliki broj izoprenoidnih jedinica sa dvostrukim vezama kao i poneka hidroksilna grupa. Terpeni pre svega narušavaju integritet ćelijske membrane povećavajući njenu fluidnost i permeabilitet [40].

Etnofarmakologija sve više dobija na značaju jer lekovite biljke predstavljaju bogat i nepresušan izvor prirodnih jedinjenja koja ispoljavaju širok spektar biološke aktivnosti. Ova oblast kombinuje principe farmakologije, etnobotanike, etnofarmakologije i hemijske analize kako bi istražila tradicionalno znanje o lekovitim svojstvima biljaka i prilagodila ga savremenim naučnim metodama.

2.4. Čuvarkuća (*Sempervivum tectorum* L.)

2.4.1. Taksonomska klasifikacija i morfologija

Čuvarkuća (*Sempervivum tectorum* L.) je višegodišnja zeljasta biljka koja pripada porodici sukulentnih biljaka – Crassulaceae. Naziv biljke potiče od latinskih reči *sempervivum* (uvek živa) i *tectorum* (krov) što ukazuje na njenu dugovečnost i otpornost. Rod *Sempervivum* broji oko 60 vrsta koje su samonikle u oblasti Mediterana, rastu u južnim delovima Evrope, od Španije do Balkanskog poluostrva, u oblasti Male Azije i na severu Afrike, ali se i uzgajaju kao baštenske biljke [42].

Familija Crassulaceae je velika porodica sukulentnih dikotiledonih skrivenosemenica koje imaju sočne i mesnate listove sa jedinstvenim oblikom fotosinteze. Rodovi koji spadaju u ovu porodicu biljaka su *Sedum* spp. (350 – 500 vrsta), *Crassula* spp. (150 vrsta), *Kalanchoe* spp. (144 vrste), *Echeveria* spp. (139 vrsta), *Sempervivum* spp. (63 vrste), *Rhodiola* spp. (58 vrsta), *Dudleya* spp. (47 vrsta), *Tylecodon* spp. (46 vrsta) i *Aeonium* spp. (40 vrsta) [43, 44]. Debeli sloj parenhima u listovima služi za čuvanje i skladištenje vode što omogućava preživljavanje u suvim klimatskim uslovima (stepe, polupustinje i pustinje, Mediteran), odnosno na suvim staništima (stene, krovovi, zidovi, dimnjaci) na kojima ove biljke žive i opstaju. Shodno tome, u biljkama se razvio specifičan oblik fotosinteze koji je po ovoj porodici dobio naziv *Crassulacean acid metabolism* (CAM) [45]. Da bi se smanjio gubitak vode, biljke su razvile određene anatomske i morfološke karakteristike kao što su debele kutikule, velike ćelije i vakuole koje imaju sposobnost skladištenja vode, dok je s druge strane smanjena zastupljenost i veličina stoma. CAM je regulisan smenom dana i noći. Glavna promena je u otvorenosti stoma. Stome se otvaraju preko noći, omogućavajući ulazak ugljen-dioksida. Ugljen-dioksid se u citosolu ćelija pod dejstvom enzima fosfoenolpiruvat–karboksilaze metaboliše do organske kiseline, najčešće jabučne kiseline, koja se čuva u vakuolama i predstavlja izvor ugljen-dioksida. Tokom dana stome se zatvaraju da bi se sprečilo isparavanje vode. Da bi se mogao izvršiti proces fotosinteze, dekarboksilacijom jabučne kiseline oslobađa se ugljen-dioksid koji u stromi hloroplasta ulazi u Kalvinov ciklus i postaje supstrat za ključni enzim ovog procesa ribuloza–1,5–bisfosfat–karboksilazu–oksigenazu pri čemu nastaju šećeri, skrob i druge građivne jedinice [46].

Čuvarkuća je zimzelena biljka sa sočnim listovima raspoređenim u višegodišnje bazalne rozete prečnika 8 – 15 cm koja raste na suvim staništima od 200 – 2800 m nadmorske visine (**Slika 7**) [47, 48]. Bazalni listovi su zelene boje, obrnuto jajoliki, lancetasti, sa zašiljenim crvenkastim vrhom. *S. tectorum* se razmnožava samostalno preko stolona (vreža) tako što iz bazalne rozete proizvodi izdanke koji rastu na površini zemlje gde formiraju adventivno korenje u čvorovima i novu biljku od pupoljka. Biljka cveta od jula do avgusta formirajući stabljiku visine 20 – 40 cm sa hermafroditnim cvetovima na vrhu raspoređenih u metlicu koju sačinjava više od 30 cvetova. Plod se razvija u obliku folikula koji su sterilni. Nakon cvetanja listovi stare, suše se i biljka odumire [48].



Slika 7. Čuvarkuća (*Sempervivum tectorum* L.)

2.4.2. Tradicionalna primena čuvarkuće

Od davnina je poznata tradicionalna primena svežih i osušenih listova čuvarkuće kao i soka iscedenog iz listova za spoljašnju ili unutrašnju upotrebu [9]. U Srbiji se najčešće koristi sveže isceden sok iz listova čuvarkuće kod upalnih procesa uva [5, 49]. Sok se koristi i za promene na koži kao što su bradavice, čirevi, keratoze, opekotine, nakon ujeda insekata, ali i na bolnim regijama zahvaćenim gihtom kao rashladno sredstvo i adstringent [47]. Preporučuje se da se kod upale bešike pije čaj od osušenih listova čuvarkuće [50]. Kod čira na želucu treba sažvakati jedan list dnevno. Uzdužno zasečenim listom premazuje se mesto na koži zahvaćeno virusom *Herpes zoster* [51]. Ispitanici iz okoline Vranja navode da, kada se pojedju, sveži listovi čuvarkuće smanjuju nivo šećera u krvi [5]. Za teže bolesti koristi se kombinacija listova čuvarkuće sa medom i limunovim sokom [5]. Mešavina meda sa sokom iz listova čuvarkuće i sokom od drugih biljaka koristi se kod čira na dvanaestopalačnom crevu, žgaravice, gastritisa, intestinalne kandidate i kancera debelog creva [6]. Za poboljšanje sporog varenja preporučuje se da se nekoliko svežih listova sažvaće ujutru [49]. Isceden sok iz listova primenjuje se kod dijareje [52]. Na Kosovu se sveži listovi primenjuju kod anemije [53]. Takođe, u južnom delu Kosova zabeleženo je da se listovi čuvarkuće primenjuju u formi čaja kod ginekoloških problema, sveže sažvakani za bolove u stomaku ili se zgnječeni listovi direktno stavljaju na regiju edema na nogama, a sok isceden iz listova primenjuje se topikalno kod upale uva i poremećaja oka [54].

U Bosni i Hercegovini pored spoljašnje, zabeležena je i unutrašnja upotreba kod različitih stanja kao što su upala grla, nervoza i anksioznost kod dece, nesаница, epilepsija, čir na želucu, menstrualne tegobe i obilne menstruacije. Spolja se primenjuje za osipe na koži, čireve, kurje oko i pege [1, 2]. U Sloveniji se pored korišćenja soka iscedenog iz listova kod upale uva, listovi čuvarkuće koriste kod gljivične infekcije na stopalu i noktima [55]. Navodi se da je infuz listova čuvarkuće u hladnoj vodi dobar za osveženje kod groznice, a listovi i klice koriste se i kao salata [32]. U Rumuniji se nadzemni delovi biljke tradicionalno koriste za impetigo (gnojna upala epidermisa), tineu (gljivična infekcija), erizipel (akutna bakterijska infekcija kože), akne, opekotine, ujede insekata, kurje oko, bradavice, afte u ustima i pege ispoljavajući antiinfektivnu, antiinflamatornu, adstringentnu i hemostatsku aktivnost [56]. U Italiji se sok iz listova čuvarkuće koristi kod ujeda insekata, dok se zgnječeni listovi stavljaju na čelo kod glavobolje [45, 57]. Takođe, u alpskom regionu Italije poznata je i veterinarska upotreba kod goveda i ovaca koji se hrane listovima čuvarkuće da bi eliminisali gastrointestinalne tegobe koje nastaju kao posledica unosa lucerke i drugih svežih biljaka koje dovode do akutne nadutosti [58]. Primena čuvarkuće u etnoveterinarskoj medicini za tretman nadutosti takođe je zabeležena i u Rumuniji, a pored toga, koristi se i kod mastitisa [59].

2.4.3. Fitohemijski sastav čuvarkuće

Prisustvo jednostavnih organskih kiselina koje nastaju kao proizvod CAM je karakteristično za biljke iz porodice Crassulaceae [60]. Fitohemijskim ispitivanjima zaključeno je da je jabučna kiselina najzastupljenija organska kiselina, a zatim limunska i ćilibarna kiselina [5, 45]. U mnogo nižim koncentracijama prisutne su i oksalna, askorbinska i fumarna kiselina [5]. Zbog fizioloških karakteristika CAM u kojem se ugljen–dioksid skladišti u formi jabučne kiseline, sasvim je očekivana njena najveća zastupljenost u ekstraktima čuvarkuće. Koncentracija jabučne kiseline varira u cirkadijalnom ritmu. Tokom noći koncentracija je veća jer se ugljen–dioksid transformiše u jabučnu kiselinu kao formu koja omogućava njegovo skladištenje, dok tokom dana dolazi do dekarboksilacije jabučne kiseline, formira se ugljen–dioksid, a koncentracija jabučne kiseline se smanjuje.

Fenolna jedinjenja su tri puta više zastupljena u listovima nego u soku iscedenom iz listova čuvarkuće [47]. Flavonoidi koji su identifikovani nakon kisele hidrolize u ekstraktu čuvarkuće su derivati flavonola: kempferol, herbacetin, kvercetin i miricetin [61]. Analizom je utvrđeno da su najviše zastupljeni glikozidi kempferola, dok su glikozidi kvercetina prisutni u manjoj meri [60]. Aglikoni flavonola su najčešće supstituisani na pozicijama 3–O i 7–O, u formi mono– di– i triglikozida, a kao šećerne komponente prevladavaju glukoza i ramnoza [60]. Glavni flavonoid je identifikovan kao kempferol–3–O–ramnozil–glukozid–7–O–ramnozil sa molekulskim jonom $[M-H]^-$ na m/z 739 [5, 45, 62]. Prisustvo ovog jedinjenja u čuvarkući je interesantno jer se triglikozidi flavonoida retko javljaju kod biljaka iz porodice Crassulaceae [62].

Takođe, u ekstraktu čuvarkuće identifikovano je i prisustvo šećera sedoheptuloze, polialkohola 2–C–metil–D–eritritola kao i procijanidina B2 [45, 47].

Navodi se da je fruktoza najzastupljeniji slobodan šećer, a pored nje, zastupljeni su i glukoza, saharoza i trehaloza [45]. Nakon jako kisele hidrolize identifikovani su monosaharidi ramnoza, arabinoza, ksiloza, manoza, galaktoza i uronska kiselina [63]. Međutim, do sada nije urađena kompletna identifikacija i kvantifikacija pojedinačnih šećera u uzorcima čuvarkuće, što predstavlja značajan nedostatak u naučnoj literaturi. Detaljan profil šećera može pružiti dragocene informacije o nutritivnim i terapijskim vrednostima ove biljke, stoga je neophodno sprovesti istraživanja kako bi se omogućila sveobuhvatna procena zdravstvenog potencijala čuvarkuće.

2.4.4. Biološka aktivnost čuvarkuće

Zahvaljujući bogatom fitohemijskom profilu i velikom broju različitih fitojedinjenja, čuvarkuća predstavlja potencijalnu biljnu drogu sa širokim mogućnostima primene. Biološka aktivnost soka i listova čuvarkuće ispitana je *in vitro* i *in vivo* u brojnim eksperimentima.

Antioksidativna aktivnost ekstrakata čuvarkuće ispitana je primenom elektron–paramagnetne rezonantne (EPR) spektroskopije kao i spektrofotometrijskim testovima DPPH, ABTS, FRAP, ORAC [32, 33, 42, 64, 65]. Antimikrobna i antibakterijska aktivnost čuvarkuće ispitana je i potvrđena na velikom broju mikroorganizama koji se dovode u vezu sa brojnim patološkim stanjima kod ljudi i životinja [5, 47, 50, 66, 67].

Antinociceptivna aktivnost soka iz listova čuvarkuće ispitana je testom grčenja kod miševa koje je prouzrokovano intraperitonealnim ubrizgavanjem sirćetne kiseline. Potvrđeno je da je sok iz listova čuvarkuće značajno smanjio broj grčenja i osećaj bola [60]. Takođe, za ispitivanje antinociceptivne aktivnosti ekstrakata čuvarkuće koji su primenjeni intratekalno i intraperitonealno, korišćena su dva testa na pacovima: test povlačenja repa (eng. *tail–flick test*) nakon uranjanja u toplu vodu i test povlačenja šape (eng. *paw withdrawal test*) nakon toplotne stimulacije [63]. Potvrđen je značajni antinociceptivni efekat na šape zahvaćene inflamacijom nakon intraperitonealne primene ekstrakta. Intratekalna primena ekstrakta proizvela je blag antinociceptivni efekat.

Hepatoprotektivni efekat ekstrakta čuvarkuće kod hiperlipidemičnih pacova potvrđen je mikroskopskim pregledom morfoloških promena. U grupi životinja u kojoj je indukovana hiperlipidemija ishranom i primenom alkohola povećava se koncentracija Al, Ba, Ni i Ti u poređenju

sa kontrolnom grupom. Primena ekstrakta čuvaruće dovodi do eliminacije ovih metala i time ostvaruje efekat detoksikacije [68]. Hepatoprotektivni efekat ostvaren je i time što primena ekstrakta čuvaruće dovodi do stabilizacije ćelijske membrane [69]. Ispitan je i efekat ekstrakta čuvaruće na smanjivanje nivoa lipida kod pacova sa steatozom jetre. Primenom ekstrakta modifikovan je metabolizam lipida kod hiperlipidemičnih pacova. Došlo je do smanjenja nivoa ukupnog holesterola i triglicerida u serumu kao i do povećanja koncentracije HDL holesterola [70].

Efekat čuvaruće na zarastanje rana ispitan je na ćelijama humanog epitelnog kolorektalnog karcinoma (HCT 116) tako što je dokazano da su frakcije čuvaruće uticale na migraciju i proliferaciju ćelija [45]. Rezultati ispitivanja navode i inhibitornu sposobnost ekstrakta čuvaruće na metaboličku aktivnost humanih ćelija melanoma WM-266-4, što ukazuje na mogućnost antikancerske primene [65].

2.5. Med

Med je prirodna, slatka supstanca, složenog sastava, koju proizvode medonosne pčele (*Apis mellifera*) iz nektara cvetova biljaka, ili iz sokova sa živih delova biljaka, ili od ekskreta insekata koji se hrane biljnim sokovima. Ove sakupljene materijale pčele prerađuju, dodaju im sopstvene specifične supstance, dehidriraju ih i odlažu u ćelije saća. Med se prema poreklu klasifikuje kao cvetni ili nektarni med i medljikovac ili šumski med. Cvetni med može biti monofloralni ukoliko je proizveden od nektara koji je sakupljen sa cvetova dominantno jedne određene biljne vrste (bagremov, kestenov, lipov med, itd.) ili polifloralni koji nastaje prikupljanjem nektara sa cvetova različitih biljnih vrsta (cvetni ili livadski med). S druge strane, medljikovac se dobija sakupljanjem i prerađivanjem medljike – slatke tečnosti koju izlučuju insekti (*Hemiptera*) ili medne rose – sladunjavog soka kojeg luče listovi nekih četinarskih i listopadnih vrsta drveća [71, 72].

Glavni sastojak meda su šećeri (80 – 85%), prevashodno monosaharidi glukoza i fruktoza, dok je druga najzastupljenija komponenta voda (15 – 17%) te prema tome med predstavlja viskozni rastvor šećera u vodi. Pored vode i ugljenih hidrata u tragovima su prisutni proteini, aminokiseline, enzimi, vitamini, minerali, fenolna jedinjenja i druge supstance [73].

Med sadrži fenolne kiseline i flavonoide čiji sastav i zastupljenost mogu da se razlikuju u zavisnosti od biljaka sa čijih cvetova su pčele sakupljale nektar. Ova fenolna jedinjenja predstavljaju sekundarne metabolite biljaka i u medu potiču iz biljnog nektara ili propolisa. Fenolne kiseline identifikovane u medu su: kofeinska, sinapinska, *p*-kumarinska, galna, elaginska i *p*-hidroksibenzoeva kiselina. Najzastupljeniji flavonoidi u medu su kempferol, kvercetin, pinocembrin, galangin, apigenin, luteolin i izoramnetin. Prisustvo fenolnih jedinjenja u medu odgovorno je za ispoljavanje terapijskih efekata meda [74].

Med se smatra prirodnom (dubokom) eutektičkom smešom (eng. *Natural Deep Eutectic Solvent*, NADES) zbog visokog sadržaja šećera, uključujući monosaharide i disaharide, među kojima se formiraju vodonične veze. Ove karakteristike medu daju sposobnost da deluje kao efikasan rastvarač, jer može rastvoriti i polarna i nepolarna jedinjenja. Kao takav, med ima potencijal da se koristi za ekstrakciju fitojedinjenja, što ga čini korisnim u pripremi različitih preparata. Pored svojstva rastvarača, med može značajno uticati na apsorpciju, farmakološku aktivnost i biodostupnost fitokomponentata. Zbog interakcija koje med ostvaruje sa bioaktivnim molekulima, može povećati njihovu stabilnost, efikasnost i biodostupnost [75].

Med je od davnina imao primenu u tradicionalnoj medicini za zarastanje rana, a koristio se i kao prirodni zaslađivač. Pre svega, med ispoljava antioksidativnu aktivnost zbog prisustva fenolnih jedinjenja. Med pokazuje i brojne biološke aktivnosti kao što su antiinflamatorna, antitrombotska, antibakterijska, antivirusna, antialergijska i vazodilatatorna. Takođe, koristi se kod dijareje, čira na želucu, artritisa, dijabetesa, kašlja, gljivičnih infekcija, zarastanja rana i kancerskih oboljenja. Antioksidativni efekat meda doprinosi ispoljavanju zaštitnog efekta na jetru i srce. Takođe, navodi se i protektivni efekat meda kod gastrointestinalnih tegoba. Sam ili u kombinaciji sa limunovim sokom med se primenjuje za jačanje imunog sistema [74, 76].

2.5.1. Med sa dodacima

U mnogim kulturama i tradicijama praksa mešanja meda sa različitim svežim i osušenim delovima biljaka, začinima ili voćem ima dugu istoriju i široku primenu. Biljke, zahvaljujući sekundarnim metabolitima, poseduju brojna lekovita svojstva i imaju mnoge povoljne efekte na zdravlje. Dodavanjem ovih biljaka u med, osim produženja veka trajanja biljnog materijala zbog prirodnih konzervativnih svojstava meda, postiže se i obogaćivanje ukusa i mirisa meda. Takođe, povećavaju se i potencijalne zdravstvene prednosti primene preparata meda u kombinaciji sa biljkama [73].

Prema Pravilniku o kvalitetu meda i drugih proizvoda od pčela, med koji sadrži dodatke poput lekovitog bilja, orašastih plodova, ekstrakata, sušenog voća i povrća kategorizuje se kao med sa dodacima [71]. Nakon pripreme, med sa dodacima se obično konzumira nakon nekoliko dana ili nedelja, tokom kojih dolazi do procesa maceracije. Ovaj proces omogućava postepeno oslobađanje fitojedinjenja, aroma, biljnih ulja i biljnih masti u med. Različita istraživanja su potvrdila da dodavanje listova i plodova biljaka u med obogaćuje njegov fenolni profil i poboljšava antioksidativna svojstva [77–80].

Brojni preparati meda sa dodacima zastupljeni su na tržištu i imaju dugu i raznovrsnu primenu. Međutim, sprovedeno je samo nekoliko studija u kojima su ispitane potencijalne koristi i terapijski efekti preparata meda sa dodatim biljkama.

Vodeni ekstrakt belog luka (*Allium sativum*) i hladno ceđeno ulje semena crnog kima (*Nigella sativa*) kombinovani sa medom pokazali su antibakterijske efekte i ubrzali proces zarastanja rana kod pacova [81, 82]. Ulje susama (*Sesamum indicum*) zajedno sa medom i uljem kamfora značajno je doprinelo zaceljivanju rana od opekotina drugog stepena kod pacova [83]. Aktivnost sirupa od meda obogaćenog ekstraktom biljke *Alpinia galanga* i dodatno cimetom, šafranom, kardamomom i đumbirom ispitana je kod pedijatrijskih pacijenata sa blagom do umerenom astmom. Primena ovog preparata smanjuje simptome povezane sa astmom kao što su otežano disanje, zviždanje u grudima i ograničena fizička aktivnost [84]. Takođe, efikasnost sirupa od meda sa istim biljkama ispitana je kod pacijenata sa blagom do teškom hroničnom opstruktivnom bolešću pluća (HOBP). Primena ovog sirupa ublažava simptome HOBP i dovodi do poboljšanja kvaliteta života [85]. Kombinacija meda obogaćenog osušenim listovima biljke *Capparis spinosa* pokazala je smanjenje toksičnih efekata indukovanih trihlorosirćetnom kiselinom kod miševa, uključujući poboljšanje biohemijskih parametara i smanjenje smrtnosti [86]. Studije na pacovima su pokazale da kombinacija *Curcuma xanthorrhiza* i meda ispoljava antikancerogene i imunomodulatorne aktivnosti [87]. Pozitivan efekat primene kombinacije meda sa ekstraktom *Euphorbia hirta*, kao i meda sa *Phyllanthus embilica*, potvrđen je kod gastrointestinalnih tegoba poput čira i gastroezofagealnog refluksa kod pacova [88, 89]. Primena soka od listova spanaća (*Spinacia oleracea*) i paradajza (*Solanum lycopersicum*) sa dodatkom meda pokazuje povećanje nivoa hemoglobina kod trudnica sa anemijom [90]. U jednoj studiji na pacovima, dijabetes je bio bolje kontrolisan kada je primenjena kombinacija meda sa suvim ekstraktom biljke *Tinospora cordifolia* [91].

Na tržištu Srbije dostupan je veliki broj raznovrsnih preparata meda sa dodacima. Med sa dodacima se koristi u različite svrhe uključujući poboljšanje opšteg zdravlja, jačanje imunološkog sistema i olakšavanje simptoma različitih zdravstvenih stanja, stoga je neophodno sprovesti naučna istraživanja kako bi se procenila efikasnost ovih preparata.

2.6. Metode za ispitivanje fitohemijskog profila

2.6.1. Hromatografske metode

Hromatografija obuhvata fizičko–hemijske metode koje se koriste za razdvajanje, identifikaciju i kvantifikaciju komponenata smeše. Hromatografsko razdvajanje komponenata smeše zasniva se na njihovoj raspodeli između dve faze – mobilne i stacionarne. Stacionarna faza može biti čvrsta u obliku sitnih čestica ili tečna u vidu tankog sloja tečnosti koji se nalazi na inertnom nosaču. Mobilna faza može biti tečna ili gasovita i u odnosu na nju razlikuju se tečna hromatografija (eng. *Liquid Chromatography*, LC) i gasna hromatografija (eng. *Gas Chromatography*, GC). Kada se uzme u obzir stacionarna faza koja se koristi, dobija se detaljnija podela hromatografskih metoda na tečno–tečnu (eng. *Liquid–Liquid Chromatography*, LLC), tečno–čvrstu (eng. *Liquid–Solid Chromatography*, LSC), gasno–tečnu (eng. *Gas–Liquid Chromatography*, GLC) i gasno–čvrstu (eng. *Gas–Solid Chromatography*, GSC) hromatografiju. U zavisnosti od načina pakovanja stacionarne faze, tečna hromatografija može biti hromatografija u koloni (LLC, visokoeфикасна tečna hromatografija (HPLC), ultraefikasna tečna hromatografija (UPLC), visokoeфикасна anjonsko–izmenjivačka hromatografija (HPAEC)) ili hromatografija na ravnoj površini (tankoslojna hromatografija (TLC) i visokoeфикасна tankoslojna hromatografija (HPTLC)).

Hromatografski sistemi mogu biti normalno–fazni i reverzno–fazni. Normalno–fazni sistemi se koriste za razdvajanje polarnih jedinjenja, a sastoje od polarnije stacionarne faze koju čini silika–gel ili neki sorbent modifikovan polarnim grupama i manje polarne mobilne faze. Za razdvajanje nepolarnih jedinjenja koriste se reverzno–fazni sistemi koji imaju polarniju mobilnu fazu u odnosu na manje polarnu stacionarnu fazu koju najčešće čini silika–gel modifikovan nepolarnim grupama (oktil – C8, dodecil – C12, oktadecil – C18). Od interakcija koje analit ostvaruje sa mobilnom i stacionarnom fazom zavisi i brzina njegovog eluiranja sa kolone, odnosno zadržavanje na tankom sloju. Interakcije koje analiti mogu ostvarivati (vodonične veze, jon – dipol, dipol – dipol, elektrostatičke i hidrofobne interakcije) uslovljavaju fizičko–hemijske procese adsorpcije, particije, jonske izmene ili ekskluzije zahvaljujući kojima dolazi do hromatografskog razdvajanja analita. Efikasno razdvajanje komponenata smeše kao i direktna identifikacija i određivanje sadržaja analita omogućili su široku primenu hromatografskih metoda.

Ultraefikasna tečna hromatografija

Najčešće korišćena metoda za razdvajanje, identifikaciju i kvantifikaciju analita iz smeše je ultraefikasna tečna hromatografija (eng. *Ultra Performance Liquid Chromatography*, UPLC) koja ima široku primenu u nauci, medicini, industriji, farmaciji, zaštiti životne sredine, kliničkim ispitivanjima i dr. Ova metoda je razvijena unapređivanjem performansi visokoeфикасне tečne hromatografije (eng. *High–Performance Liquid Chromatography*, HPLC) koje za cilj imaju bolje hromatografsko razdvajanje komponenata smeše, skraćeno vreme trajanja analize kao i smanjenje troškova analize. Brzina, efikasnost i osetljivost metode povećane su smanjenjem čestica stacionarne faze, skraćivanjem dužine kolone, poboljšanjem sistema pumpi, autosamplera i ventila koji rade pod veoma visokim pritiskom. Sama UPLC metoda ima ograničene mogućnosti za identifikaciju s obzirom da pruža informaciju samo o retencionom vremenu analita, a kako postoji veliki broj poznatih i nepoznatih jedinjenja ovakvom analizom se ne dobijaju podaci kojima se jednoznačno mogu identifikovati detektovani pikovi na hromatogramu. Sprezanjem UPLC sistema sa različitim detektorima omogućava se preciznija karakterizacija složenih matriksa, a kao detektori koriste se UV/Vis, fluorescentni, elektrohemijski, infracrveni i maseno–spektrometrijski kao i detektori indeksa prelamanja.

U cilju kvantitativne analize polifenola obično se koristi UPLC spregnut sa UV/Vis detektorom sa nizom dioda (eng. *Diode Array Detector*, DAD) i masenim detektorom sa tri analizatora – trostruki kvadrupol (*triple quadrupol*, QqQ, UPLC–DAD MS/MS). Identifikacija i kvantifikacija jedinjenja primenom UPLC–DAD odvija se na osnovu poređenja retencionih vremena razdvojenih jedinjenja sa retencionim vremenima standarda, kao i metodom internog standarda. Kako se ovom metodom

vrši analiza samo na osnovu unapred definisanih standarda, ograničena je identifikacija velikog broja jedinjenja prisutnih u složenim biljnim matriksima. Pored toga, spektrofotometrijskom detekcijom se ne dobijaju informacije o strukturnim karakteristikama jedinjenja, te se ovakvi sistemi povezuju sa masenim detektorima čime se postiže veća selektivnost i osetljivost metode kao i pouzdanija identifikacija jedinjenja. UPLC–DAD MS/MS se koristi za ciljanu kvantitativnu analizu malog broja određenih jedinjenja.

Za identifikaciju jedinjenja u složenim biljnim ekstraktima koristi se UPLC povezan sa hibridnim masenim spektrometrom visoke rezolucije koji kombinuje linearnu jonsku zamku (eng. *Linear Trap Quadrupole*, LTQ) i orbitrap maseni analizator (*OrbiTrap MS*). Prilikom analize masenom spektrometrijom (MS) prvo dolazi do jonizacije molekula čime nastaju fragmenti najveće molekulske mase (molekulski joni), a zatim dolazi do formiranja sve manjih jona i fragmenata. Delovanjem elektromagnetnog polja u analizatoru dolazi do razdvajanja nastalih jona i fragmenata prema odnosu mase i naelektrisanja (m/z) koji dalje odlaze na detektor i dobija se maseni spektar. UPLC–LTQ OrbiTrap je pogodna tehnika za kvalitativnu analizu zbog velike rezolucije, tačnosti i preciznosti. Ultraefikasnom tečnom hromatografijom postiže se dobro razdvajanje, dok se masenim analizatorima postiže precizna detekcija različitih fenolnih jedinjenja. Detekcija analita zasniva se na retencionom vremenu, MS spektrima, merenju tačne mase fragmentacionih jona, poređenju sa dostupnim standardima ili sa podacima iz literature.

Visokoefikasna anjonsko–izmenjivačka hromatografija

Visokoefikasna anjonsko–izmenjivačka hromatografija (eng. *High–Performance Anion–Exchange Chromatography*, HPAEC) se koristi za razdvajanje neorganskih jona, organskih kiselina, proteina, aminokiselina, šećera, šećernih alkohola (poliola) i drugih naelektrisanih molekula. Razdvajanje komponenata analita vrši se na osnovu različitog afiniteta prema izmeni jona sa stacionarnom fazom što zavisi od veličine i naelektrisanja jona. Veći i više naelektrisani joni će imati najveći afinitet prema stacionarnoj fazi i obrnuto. Kolone koje se koriste kod HPAEC su ispunjene jonoizmenjivačkim smolama koje se sastoje od inertnog nosača za kojeg su kovalentno vezane jonske funkcionalne grupe sa sposobnošću da vezuju i otpuštaju druge jone. U zavisnosti od prirode prisutnih jonogenih funkcionalnih grupa, jonoizmenjivačke smole mogu biti katjonske (sadrže kisele grupe koje izmenjuju katjone), anjonske (sadrže bazne grupe koje izmenjuju anjone) i amfoterne (sadrže i kisele i bazne grupe koje izmenjuju i katjone i anjone zavisno od pH vrednosti). Eluiranje se vrši dodavanjem konkurentnih jona u mobilnu fazu, tj. katjoni se eluiraju hlorovodoničnom kiselinom, dok se anjoni eluiraju kalijum/natrijum–hidroksidom. Kako joni eluenta ne bi ometali detekciju koja je najčešće elektrohemijska, u sistemu je neophodno da postoji supresor koji će izdvajati jone eluenta iz efluenta. Detekcija može biti konduktometrijska, UV/Vis, amperometrijska ili masena [92].

Visokoefikasna anjonsko–izmenjivačka hromatografija u kombinaciji sa pulsno–amperometrijskom detekcijom (eng. *Pulsed Amperometric Detection*, PAD) se najčešće koristi za identifikaciju i kvantifikaciju šećera i poliola prisutnih u uzorcima. Princip hromatografskog odvajanja zasniva se na slabo kiseloj prirodi ugljenih hidrata koji se u alkalnim uslovima pri visokim pH vrednostima deprotonuju i formiraju oksoanjone. Za eluiranje se koristi rastvor natrijum–hidroksida, a za razdvajanje kolona punjena anjonskom jonoizmenjivačkom smolom sa funkcionalnim grupama kvaternernih amonijum jedinjenja. Pulsno–amperometrijska detekcija se zasniva na merenju promene struje između radne i referentne elektrode u određenim vremenskim intervalima pri pulsnom potencijalu. HPAEC u kombinaciji sa PAD predstavlja metodu izbora za razdvajanje i određivanje sastava ugljenih hidrata u kompleksnim uzorcima s obzirom na svoju visoku selektivnost i osetljivost.

Visokoefikasna tankoslojna hromatografija

Visokoefikasna tankoslojna hromatografija (eng. *High-Performance Thin-Layer Chromatography*, HPTLC) predstavlja modernu analitičku tehniku zasnovanu na principima tečne hromatografije. HPTLC je brza, jednostavna, efikasna i ekonomična metoda čije su karakteristike unapređene u odnosu na konvencionalnu TLC u cilju povećanja efikasnosti razdvajanja komponenata smeše što je postignuto smanjenjem veličine čestica stacionarne faze. Pored toga, prednost HPTLC u odnosu na druge hromatografske tehnike ogleda se u tome što se istovremeno može analizirati veliki broj uzoraka koji se razdvajaju pod istim hromatografskim uslovima čime je smanjeno vreme trajanja analize, priprema ekstrakata je jednostavnija, podržava širok opseg koncentracija analita, koristi se mala zapremina ekstrakata kao i manja zapremina rastvarača za mobilnu fazu. Za razliku od drugih hromatografskih metoda, kod HPTLC se uvek koristi nova ploča kao nosač stacionarne faze pri svakoj analizi tako da ne postoji mogućnost ometanja prethodnim analizama [93].

Za opisivanje hromatografskog zadržavanja jedinjenja u HPTLC sistemu koristi se retencioni (retardacioni) faktor:

$$R_F = \frac{a}{b}$$

Retardacioni faktor (R_F) predstavlja odnos pređenog puta analiziranog jedinjenja od polazne mrlje do težišta hromatografske zone (a) i pređenog puta rastvarača od polazne mrlje do fronta rastvarača (b). Vrednost R_F može biti između 0 i 1, a u optimalnim hromatografskim uslovima važi da je $0,2 < R_F < 0,8$. Ovaj parametar zavisi od izbora stacionarne faze i rastvarača za razvijanje hromatograma kao i od polarnosti/nepolarnosti jedinjenja koja se ispituju. Ukoliko je vrednost $R_F < 0,2$ analit ostvaruje jake interakcije sa stacionarnom fazom, dok suprotno, kada je $R_F > 0,8$ analit neselektivno putuje sa mobilnom fazom, odnosno frontom rastvarača. Kako su pod strogim eksperimentalnim uslovima R_F vrednosti reproduktivne za svako ispitivano jedinjenje, ova činjenica je iskorišćena u svrhu identifikacije nepoznatih jedinjenja na osnovu R_F vrednosti standardnih jedinjenja.

HPTLC hromatogram predstavlja otvoreni sistem kojim se može lako manipulirati, kod kojeg postoji mogućnost vizuelne detekcije analita. Zone razdvojenih jedinjenja se mogu detektovati bez prethodne derivatizacije na osnovu toga što imaju svoju prirodnu boju, apsorbuju u UV oblasti, fluoresciraju ili gase fluorescenciju. Ukoliko to nije slučaj, vrši se derivatizacija reagens–rastvorima kojima se jedinjenja hemijskim reakcijama prevode u jedinjenja koja su obojena u vidljivoj oblasti spektra, apsorbuju u UV oblasti ili fluoresciraju. U zavisnosti od izbora reagens–rastvora za derivatizaciju ciljano se detektuju jedinjenja od značaja. Veliki broj reagens–rastvora i metoda za derivatizaciju je opisano u literaturi [94].

Pored hemijske identifikacije fitojedinjenja, HPTLC metodom mogu biti identifikovana i biološki aktivna jedinjenja. Određivanje biološke aktivnosti direktno na razvijenim HPTLC hromatogramima vrši se derivatizacijom odgovarajućim rastvorima. U tom slučaju reč je o direktnoj bioautografiji (eng. *High-Performance Thin-Layer Chromatography – Direct Bioautography*, HPTLC–DB).

2.6.2. Indukovano spregnuta plazma sa optičkom emisionom spektroskopijom

Indukovano spregnuta plazma sa optičkom emisionom spektroskopijom (eng. *Inductively Coupled Plasma – Optical Emission Spectroscopy*, ICP–OES) se koristi u kvalitativnoj i kvantitativnoj analizi elementalnog sastava velikog broja uzoraka. ICP–OES tehnika je vrsta emisione spektroskopije koja koristi indukovano spregnutu plazmu za pobuđivanje atoma i jona koji emituju elektromagnetno zračenje karakteristično za svaki ispitivani element. Prednosti ICP–OES metode su velika osetljivost, širok opseg linearnosti, niska granica detekcije (1 – 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$), visoka tačnost i preciznost kao i mogućnost istovremenog analiziranja više od 70 elemenata u kratkom vremenskom periodu. Rastvor ispitivanog uzorka se prvo prevede u aerosol pomoću raspršivača u komori za raspršivanje, a zatim se fine čestice aerosola uvode u plazmu. U plazmi dolazi do brojnih fizičkih promena aerosola uzorka pri čemu se uzorak prvo desolvatiše i prevodi u čvrsto stanje, a

zatim isparava, dolazi do njegove jonizacije i pobuđivanja atoma i jona. Na osnovu detekcije elektromagnetnog zračenja emitovanog od strane pobuđenih atoma i jona prilikom njihovog vraćanja na niži energetski nivo dobijaju se kvalitativni i kvantitativni podaci. Kvalitativna analiza se zasniva na detekciji emisione linije karakteristične talasne dužine za svaki pojedinačni element, dok kvantitativna analiza podrazumeva merenje intenziteta emitovanog elektromagnetnog zračenja [95].

2.7. Metode za određivanje biološke aktivnosti

2.7.1. Ultraljubičasta/vidljiva spektrofotometrija

Ultraljubičasta/vidljiva (UV/Vis) spektrofotometrija se koristi u kvantitativnoj hemijskoj analizi za određivanje koncentracije analita. Analiza se zasniva na principima Lamber–Berovog (*Lambert–Beer*) zakona iz kojeg proističe da je molarna koncentracija nekog jedinjenja direktno proporcionalna njegovoj apsorbciji. U zavisnosti od apsorbcije ispitivanih jedinjenja u UV/Vis oblasti, analizira se elektromagnetno zračenje koje se apsorbuje u oblasti 200 – 800 nm. Jedinjenja ekstrahovana iz biljaka apsorbuju u UV/Vis oblasti zbog hemijske strukture molekula, fenolnog prstena, hidroksilnih grupa ili ostataka šećera vezanih za prsten, konjugovanih dvostrukih veza i drugih hromofora koje imaju uticaj na pomeranje apsorpcionih maksimuma ka manjim ili većim talasnim dužinama.

Razvijen je veliki broj *in vitro* spektrofotometrijskih testova za određivanje koncentracije različitih jedinjenja kao što su fenoli, terpeni, antocijani, alkaloidi, karotenoidi, ali i za određivanje različitih vrsta biološke aktivnosti poput antioksidativne, antidijabetske, antiinflamatorne, antiestrogene, usporavanja starenja kože i slično. Prednost spektrofotometrijskog određivanja je ta što se koncentracija jedinjenja ili biološka aktivnost određuju u celokupnom ekstraktu gde su prisutne sve njegove komponente koje mogu međusobno da ostvaruju sinergističke ili antagonističke efekte čime se dobijaju relevantniji rezultati.

Određivanje ukupnog sadržaja fenola

Folin–Čikalteu (eng. *Folin–Ciocalteu*, FC) test je najčešće korišćena metoda za spektrofotometrijsko određivanje ukupnog sadržaja fenola (eng. *Total Phenolic Content*, TPC). Mehanizam FC testa zasniva se na prenosu elektrona (SET), pri čemu se fenolatni jon oksiduje dok se FC reagens redukuje, menjajući boju iz žute u plavu. FC reagens je žut rastvor fosfovolframove i fosfomolibdenske kiseline u kojem dolazi do redukcije volframa (+6) i molibdena (+6) u niže oksidaciono stanje (+5), što rezultuje formiranjem kompleksa molibdensko plavo u prisustvu fenolnih jedinjenja. Ukupni sadržaj fenola se indirektno određuje radi ispitivanja antioksidativne aktivnosti (AOA) ekstrakata, jer rezultati pokazuju direktnu korelaciju između TPC i AOA. Zbog ovih karakteristika, FC test se često koristi ne samo za kvantifikaciju ukupnih fenola, već i za procenu antioksidativnog potencijala biljnih ekstrakata [96, 97].

Određivanje antioksidativne aktivnosti

Kao što je već pomenuto, u zavisnosti od mehanizma hemijskih reakcija, antioksidativni testovi se mogu zasnivati na transferu elektrona (eng. *Single–Electron Transfer*, SET), transferu atoma vodonika (eng. *Hydrogen Atom Transfer*, HAT) ili na heliranju prelaznih metala. Metode koje se zasnivaju na SET mehanizmu mere redukcionu kapacitet antioksidanasa, dok metode zasnovane na HAT mehanizmu mere sposobnost antioksidanasa za doniranje atoma vodonika [30].

Razvijen je veliki broj spektrofotometrijskih antioksidativnih testova koji funkcionišu na principu uklanjanja slobodnih radikala ili na potencijalu redukcije prelaznih metala. Antioksidativni testovi zasnovani na principu uklanjanja slobodnih radikala su: DPPH' (2,2–difetil–1–pikrilhidrazil'), ABTS (2,2'–azino–bis(3–etilbenzotiazolin–6–sulfonska kiselina) diamonijum so), test reaktivne vrste tiobarbiturne kiseline (eng. *Thiobarbituric Acid Reactive Species assay*, TBARS), test uklanjanja radikala azot–oksida (eng. *Nitric Oxide Radical Scavenging Assay*), test uklanjanja peroksinitrita (eng. *Peroxynitrite Scavenging Assay*), test uklanjanja superoksidnog radikala (eng. *Superoxide Radical Scavenging Assay*), test uklanjanja vodonik–peroksida (eng. *Hydrogen Peroxide Scavenging Assay*). Antioksidativni testovi čiji mehanizam uključuje potencijal redukcije prelaznih metala su test

za određivanje sposobnosti redukcije jona gvožđa (*Ferric Ion Reducing Antioxidant Power*, FRAP) i test za određivanje sposobnosti redukcije jona bakra (*Cupric Reducing Antioxidant Capacity*, CUPRAC). Testovi za ispitivanje antioksidativne aktivnosti koji se ne svrstavaju u dve prethodno pomenute grupe su: FC test, test ukupne redukcione moći (eng. *Total Reducing Power*, TRP), test ukupnog antioksidativnog kapaciteta – fosfomolibdenski metod (eng. *Total Antioxidant Capacity*, TAC), test heliranja jona gvožđa (eng. *Ferrous Ion Chelating Assay*, *Ferrozine Assay*) i test izbeljivanja karotena (eng. *β -Carotene Bleaching Assay*) [30].

U **Tabeli 1** je prikazan pregled testova korišćenih za ispitivanje antioksidativne aktivnosti ekstrakata u okviru ovog istraživanja gde su navedene prednosti, ograničenja kao i pretpostavljeni molekularni mehanizmi [29, 30, 98].

Tabela 1. Prednosti, ograničenja i molekularni mehanizmi antioksidativnih testova

Antioksidativni test	Prednosti	Ograničenja	Molekularni mehanizam
FC (TPC)	Jednostavan i jeftin; Direkta korelacija između sadržaja fenola i antioksidativne aktivnosti.	Nije specifičan za fenole.	SET: $\text{Mo(VI)} + e^- (\text{ArOH}) \rightarrow \text{Mo(V)}$
DPPH	Jednostavan, brz, jeftin; DPPH radikal je komercijalno dostupan; Pogodan za termolabilna jedinjenja; Visoko senzitivna; Fenolna jedinjenja su u korelaciji.	Nestabilan rastvor DPPH radikala; Fotosenzitivan.	SET ili SET+HAT SET: $\text{DPPH}^\cdot + \text{ArOH} \rightarrow \text{DPPH} + \text{ArOH}^{\cdot+}$ HAT: $\text{DPPH}^\cdot + \text{ArOH} \rightarrow \text{DPPH-H} + \text{ArO}^\cdot$
ABTS	Jednostavan i jeftin; Stabilan rastvor; Visoko senzitivna; Ponovljivi rezultati; Fenolna jedinjenja imaju dobru korelaciju.	Hemijsko generisanje katjon radikala $\text{ABTS}^{\cdot+}$; Vremenski zavisna.	SET ili SET+HAT SET: $\text{ABTS}^{\cdot+} + \text{ArOH} \rightarrow \text{ABTS} + \text{ArOH}^{\cdot+}$ HAT: $\text{ABTS}^{\cdot+} + \text{ArOH} \rightarrow \text{ABTS} + \text{ArO}^\cdot + \text{H}^+$
TRP	Jeftin; Veliki broj bioaktivnih jedinjenja.	Nije jednostavan; Nespecifičan; Temperaturno i vremenski zavisna.	SET: $\text{Fe(CN)}_6^{3-} + \text{ArOH} \rightarrow \text{Fe(CN)}_6^{4-} + \text{ArO}^\cdot + \text{H}^+$ i $\text{Fe(CN)}_6^{4-} + \text{Fe}^{3+} + \text{K}^+ \rightarrow \text{KFe[Fe(CN)}_6]$
TAC	Jednostavan i jeftin; Širok spektar aktivnih uzoraka.	Niska brzina odvijanja reakcije; Temperaturno i vremenski zavisna; Neselektivna za fenolna jedinjenja; Fenolna jedinjenja su loše korelisana.	SET ili HAT $[\text{H}_3\text{PO}_4(\text{MoO}_3)_{12}] + \text{ArOH} \rightarrow$ i $[\text{H}_4\text{PMo}_8^{\text{VI}}\text{Mo}_4^{\text{V}}\text{O}_{40}]^{3-} + \text{ArOH}^+$

2.7.2. Visokoefikasna tankoslojna hromatografija – direktna bioautografija

Analiza usmerena na efekte (eng. *effect-directed analysis*, EDA) kombinuje planarnu hromatografiju sa biološkim i biohemijskim testovima za otkrivanje prirodnih jedinjenja koja ispoljavaju određenu biološku aktivnost. Direktna bioautografija pripada EDA metodama kod koje se jedinjenja razdvajaju tankoslojnom hromatografijom (TLC, HPTLC), a zatim se hromatogrami derivatizuju odgovarajućim reagens–rastvorima. Iako se pojam bioautografija prvenstveno koristi za određivanje antimikrobne i antifungalne aktivnosti, korišćenje pojma bioautografije se proširilo i koristi se i za određivanje antioksidativne, antidijabetske, antiinflamatorne, antiestrogene, antimutagene i drugih aktivnosti [99]. Bioautografija može biti kontakta, „agar overlay“ i direktna [100].

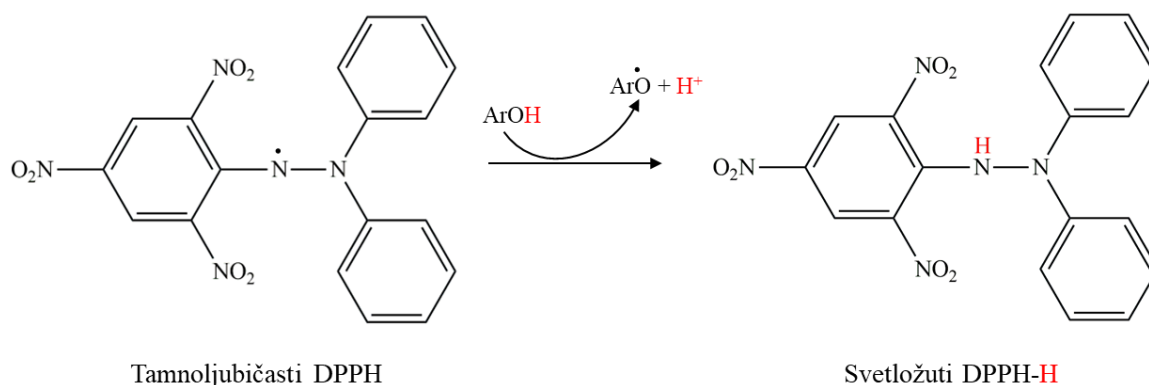
Kontaktna bioautografija podrazumeva da se razvijeni TLC hromatogram stavi na površinu inokulisane podloge tokom nekog vremena dovoljno da komponente difunduju sa ploče na agar. Zatim se ploča skloni, a nakon odgovarajućeg vremena inkubiranja aktivne zone koje ispoljavaju antibakterijsku aktivnost postaju vidljive. Što se tiče „agar overlay“ bioautografije, razvijena TLC ploča se uroni u inokulisanu podlogu ili se stavi na dno Petri–šolje preko koje se izlije podloga. Nakon inkubacije zone sa antibakterijskom aktivnošću postaju vidljive. Kod visokoeфикаsne tankoslojne hromatografije – direktne bioautografije (HPTLC–DB), razvijena (HP)TLC ploča se prska ili uranja u suspenziju bakterija. Time se tanak sloj suspenzije zadržava na razvijenom hromatogramu, ploča se inkubira u plastičnoj kutiji u kojoj su obezbeđeni odgovarajuća vlažnost i temperatura. Nakon vremena potrebnog za inkubaciju ploču je neophodno derivatizovati rastvorom odgovarajućeg reagensa kako bi se vizualizovale zone koje ispoljavaju antibakterijsku aktivnost. Kod HPTLC–DB metode, ploču je moguće derivatizovati bilo kojim reagens–rastvorom u zavisnosti od biološke aktivnosti koja se određuje i to je najveća prednost planarne hromatografije u odnosu na hromatografske metode u koloni koje se ne mogu primenjivati u ove svrhe. U okviru ovog istraživanja HPTLC–DB metoda je po prvi put korišćena za ispitivanje antioksidativne, antidijabetske i antibakterijske aktivnosti ekstrakata listova čuvarkuće i preparata čuvarkuće i meda. U nastavku su objašnjeni mehanizmi funkcionisanja korišćenih testova.

Određivanje antioksidativne aktivnosti direktnom bioautografijom

Antioksidativni testovi su razvijeni na HPTLC pločama metodom direktne bioautografije kako bi bila identifikovana tačno ona jedinjenja koja pokazuju ispitivanu biološku aktivnost. Antioksidativni testovi koji su ranije prevedeni na ploču su FC, DPPH i ABTS testovi [101–103]. Pored ova tri antioksidativna HPTLC–DB testa, prvi put je u okviru ovog istraživanja antioksidativna aktivnost određena metodom direktne bioautografije primenom TRP i TAC testa. Testovi TRP i TAC imaju široku primenu u određivanju antioksidativne aktivnosti ekstrakata spektrofotometrijskom metodom, ali je njihova primena u direktnoj bioautografiji sada prvi put opisana.

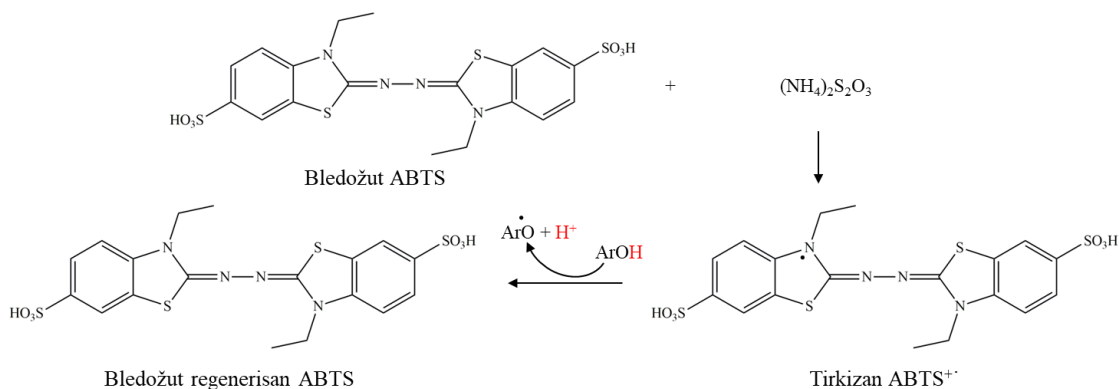
Razvijeni HPTLC hromatogrami se nakon sušenja derivatizuju reagens–rastvorima kojima se omogućava vizualizacija zona onih jedinjenja koja ispoljavaju antioksidativnu aktivnost. U te svrhe, može se koristiti:

- vodeni rastvor FC reagensa pri čemu dolazi do promene boje iz žute u plavu
- metanolni rastvor DPPH, pri čemu dolazi do promene boje iz tamnoljubičaste u svetložutu. Mehanizam reakcije prikazan je na **Slici 8**:



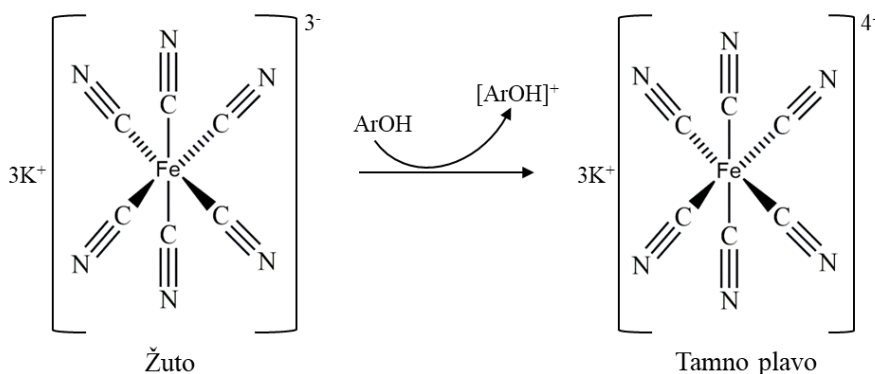
Slika 8. Mehanizam reakcije DPPH [30]

- vodeni rastvor ABTS kod kojeg dolazi do promene boje iz tirkizne u bledoplavu. Mehanizam ABTS reakcije je prikazan na **Slici 9**:



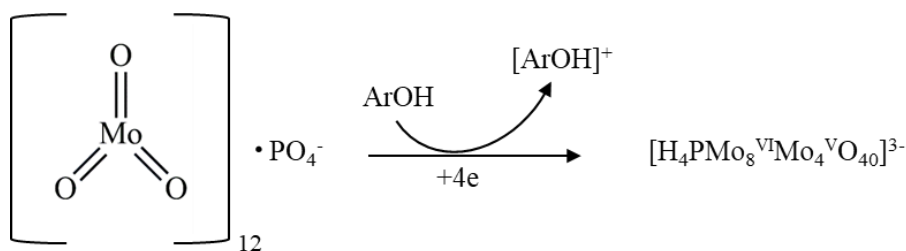
Slika 9. Mehanizam reakcije ABTS [30]

- vodeni rastvor gvožđe(III)–hlorida i kalijum–heksacijanoferata(III) za HPTLC–TRP test gde dolazi do promene boje iz žute u tamnoplavu. Mehanizam reakcije prikazan je na **Slici 10**:



Slika 10. Mehanizam TRP testa [30]

- vodenim rastvorom natrijum–fosfata, amonijum–molibdata i koncentrovane sumporne kiseline koji se koristi za derivatizaciju hromatograma kod HPTLC–TAC testa. Mehanizam reakcije ovog testa prikazan je na **Slici 11**:



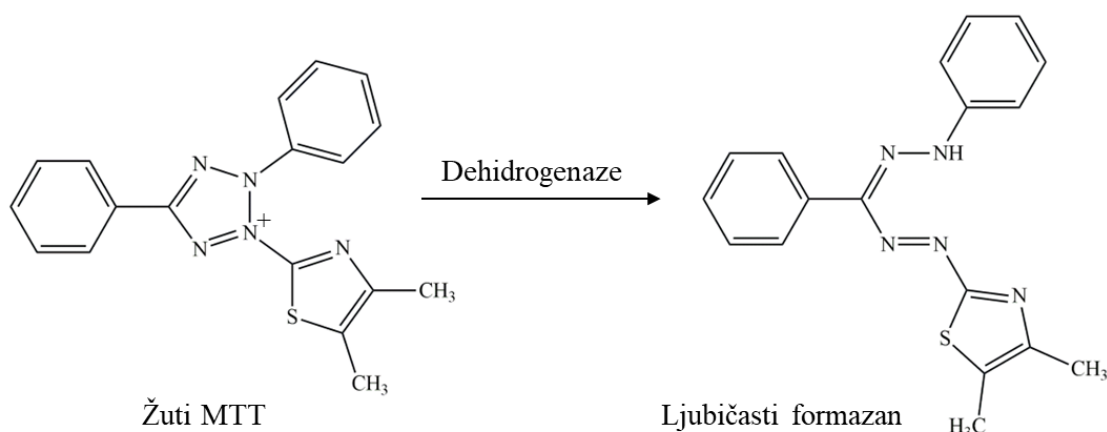
Slika 11. Mehanizam TAC testa [30]

Određivanje antidijabetske aktivnosti direktnom bioautografijom

Metodom direktne bioautografije na razvijenim HPTLC hromatogramima ispitana je inhibitorna aktivnost velikog broja fitojedinjenja na enzime α -amilazu, α -glukozidazu i β -glukozidazu [99]. U okviru ovog istraživanja antidijabetska aktivnost fitojedinjenja ispitana je inhibiranjem enzima α -amilaze. Razvijen HPTLC hromatogram se prvo derivatizuje rastvorom α -amilaze, a zatim i rastvorom skroba koji predstavlja supstrat ovom enzimu. Kada je enzim α -amilaza aktivan dolazi do degradacije skroba na proste ugljene hidrate. Međutim, ukoliko je enzim inhibiran od strane aktivnih jedinjenja razdvojenih na ploči, u tom slučaju ne dolazi do razgradnje skroba. Na mestima gde se nalaze zone aktivnih jedinjenja ostaje intaktan skrob koji u reakciji sa Lugolovim rastvorom (rastvor joda i kalijum-jodida) daje ljubičasto obojene aktivne zone naspram bele pozadine.

Određivanje antibakterijske aktivnosti direktnom bioautografijom

HPTLC-DB metoda se široko primenjuje za određivanje antibakterijske aktivnosti fitojedinjenja [99]. HPTLC ploče derivatizovane suspenzijom bakterija u odgovarajućem hranljivom medijumu se inkubiraju na odgovarajućoj temperaturi. Kao reagens za derivatizaciju hromatograma i vizualizaciju zona aktivnih jedinjenja koristi se rastvor 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijum-bromida (MTT). Žive bakterijske ćelije pod dejstvom enzima dehidrogenaza redukuju žute tetrazolijum soli do ljubičastog formazana. Ukoliko je došlo do inhibicije rasta bakterija pod dejstvom aktivnih jedinjenja, ne dolazi do ove redukcije, pa se zone aktivnih jedinjenja uočavaju kao blede-žute zone naspram ljubičaste pozadine. Mehanizam reakcije prikazan je na **Slici 12**:



Slika 12. Redukcija MTT-a do formazana

2.7.3. Priprema slika hromatograma za multivarijantu analizu

Hromatogrami predstavljaju veliki izvor informacija o fizičkim i hemijskim karakteristikama ispitivanih uzoraka/ekstrakta. Za dalju obradu neophodno je izvući podatke sa hromatograma što se može postići skeniranjem hromatograma pomoću TLC skenera ili slikanjem hromatograma i daljom obradom slike u odgovarajućim programima. Za prevođenje slika hromatograma u matricu podataka koja se može koristiti u multivarijantnoj analizi primenjuje se besplatno dostupan ImageJ program (<https://imagej.net/Downloads>).

ImageJ program se može koristiti za jednostavne izmene slika poput rotiranja, sečenja, promena formata, ali i za složene izmene kao što su korekcija bazne linije, uklanjanje pozadine, smanjenje šuma i povećanje rezolucije. Obrada slike u ImageJ programu podrazumeva svodenje slika svih hromatograma na istu veličinu, rotiranje slike za 90° , podela slike u tri kanala (crveni – R, plavi – B i zeleni – G) ukoliko su zone obojene ili prevođenje slike u sivu skalu kada su zone iste boje, obeležavanje površine profila svakog pojedinačnog uzorka/ekstrakta, isecanje selektovane površine, crtanje grafika profila koji prikazuje zavisnost intenziteta zone u pikselima u odnosu na rastojanje (hR_F) i na kraju eksportovanje podataka u Excel.

Obrada podataka koja prethodi analizi glavnih komponenata (eng. *Principal Component Analysis*, PCA) podrazumeva njihovo poravnanje i centriranje za šta se koristi PLS Toolbox statistički paket (v.6.2.1, www.eigenvector.com/software/pls_toolbox.htm, Eigenvector Research, Wenatchee, WA, USA) u okviru MATLAB softvera (v. 7.12.0, R2011a, MathWorks Inc., Natick, MA, USA). Potreba za dodatnom obradom podataka javlja se usled pomeranja zona istog jedinjenja u okviru jedne ploče ili između ploča zbog razlika u vlažnosti, temperaturi, sastavu mobilne faze, zasićenju komore parama rastvarača, načinu sušenja ploče kao i zbog slučajnih grešaka analitičara. Poravnanje podataka podrazumeva svođenje zona istog jedinjenja na istu hR_F vrednost, a najčešće se koriste procedure poravnanja pikova (eng. *warping procedure*) poput korelacije optimizacije savijanja (eng. *Correlation Optimized Warping*, COW) i poravnanje signala (eng. *peak alignment*). Centriranjem se postiže da svi podaci budu jednako značajni odnosno svedeni na istu jedinicu tako što se vrši centriranje podataka u odnosu na prosečan srednji intenzitet pika (eng. *mean centering*) ili u odnosu na medijanu (eng. *median centering*) [104]. U slučaju kvantitativnih rezultata koristi se autoskaliranje čime se podaci svode na jediničnu standardnu devijaciju i nultu aritmetičku sredinu.

2.7.4. Teorija funkcionala gustine

Teorija funkcionala gustine (eng. *Density Functional Theory*, DFT) je računarska tehnika zasnovana na principima kvantne mehanike koja naglašava gustinu naelektrisanja kao bitnu fizičku karakteristiku sistema, na osnovu koje se dalje mogu odrediti različita fizičko–hemijska svojstva sistema. Dakle, DFT metoda zamenjuje složene talasne funkcije elektrona sa gustinom naelektrisanja. DFT se koristi u hemiji i fizici za istraživanje karakteristika, elektronske strukture i energije atoma, molekula i drugih sistema na osnovu poznavanja gustine naelektrisanja osnovnog stanja. Analiza zasnovana na DFT metodi ima široku primenu za istraživanje kako jednostavnih tako i složenih molekulskih sistema. Ova metoda je jednostavna, pouzdana, isplativa i ne zahteva veliki utrošak vremena. U poslednje vreme DFT se sve više koristi za ispitivanje svojstava i mehanizama antioksidativnog kapaciteta molekula čija je glavna uloga neutralizacija slobodnih radikala i zaštita ćelija od oksidativnog stresa [105].

Reaktivnost molekula prema slobodnim radikalima i drugim reaktivnim vrstama se može predvideti DFT metodom, što je važno za razumevanje veze između mehanizama ispoljavanja antioksidativne aktivnosti i molekulske strukture. Na ispoljavanje antioksidativnog kapaciteta utiče nekoliko faktora kao što su entalpije raskidanja veze (eng. *Bond Dissociation Enthalpies*, BDEs) i jonizacioni potencijali (eng. *Ionization Potentials*, IPs) koji se izračunavaju primenom DFT metode. BDE je energija koja je potrebna da se raskine veza između molekula antioksidansa i atoma vodonika koji će biti doniran radikalima i time ga neutralisati. Što je niža BDE molekuli su bolji antioksidansi jer lakše dolazi do raskidanja veze i otpuštanja atoma vodonika. IP je energija koja je potrebna da se ukloni elektron iz molekula. Molekuli sa nižim IP ispoljavaju jaču antioksidativnu aktivnost jer lakše doniraju elektrone kojima će slobodni radikali biti neutralisani [105].

Nekoliko metoda zasnovanih na DFT je razvijeno kako bi se ispitaio uticaj rastvarača (eng. *Solvation model density*, SMD) na antioksidativnu efikasnost jedinjenja. Antioksidansi su pretežno hidrofobni molekuli koji stupaju u interakcije sa lipidima i drugim hidrofobnim molekulima u biološkim membranama. S druge strane, brojni fiziološki procesi se odigravaju u vodenoj sredini gde se javlja uticaj efekta solvatacije. Antioksidativna aktivnost molekula je obrnuto proporcionalna njegovoj rastvorljivosti u vodi, zbog smanjenja mogućnosti interakcije hidrofobnih antioksidanasa sa radikalima koji su prisutni u vodenoj sredini. Uticaj rastvarača se ogleda kroz njegovu polarnost, rastvorljivost kao i mogućnost solvatacije molekula antioksidanasa, a razumevanje ovog uticaja je značajno za razvijanje efikasnih antioksidanasa [105].

Primenom DFT metode analiziraju se elektronske strukture i karakteristike molekula pomoću kojih se istražuju mehanizmi ispoljavanja antioksidativne aktivnosti i uticaji rastvarača različite polarnosti na efikasnost antioksidanasa. Takođe, DFT služi i za optimizaciju strukture postojećih antioksidanasa kako bi se poboljšala njihova efikasnost ali i za brže otkrivanje i dizajn novih antioksidativnih molekula koji bi se mogli primenjivati u medicini i industriji [105].

2.7.5. Agar–difuzioni metod u bunarićima

Za određivanje antibakterijske aktivnosti biljnih ekstrakata koristi se agar–difuzioni metod u bunarićima (eng. *Agar–well diffusion method*). U Petri–šolju se izlije odgovarajuća rastopljena mlaka agarna podloga inokulisana suspenzijom bakterija, a zatim se po njenom očvršćavanju izbuše otvori – "bunarići" prečnika do 10 mm u koje se unosi određena zapremina ispitivanih ekstrakata određene koncentracije. Tokom inkubiranja na odgovarajućoj temperaturi, jedinjenja prisutna u ekstraktima radialno difunduju u agar. Ukoliko ekstrakt ispoljava antibakterijsku aktivnost oko bunarića se uočava zona inhibicije rasta bakterija koja se izražava u milimetrima [106].

2.8. Analiza glavnih komponenata

Analiza glavnih komponenata je moćna multivarijantna metoda koja smanjuje dimenzionalnost složenih skupova podataka formiranjem manjeg broja veštačkih varijabli koje su poznate kao glavne komponente (eng. *Principal Components*, PC). Glavne komponente se definišu preko vektora koeficijenata latentnih varijabli i obuhvataju većinu varijacija među posmatranim varijablama. Odabirom pravca latentnih varijabli, PCA maksimizira varijabilnost rezultata objekata u izabranim pravcima. Komponente su ortogonalne jedna na drugu omogućavajući prikupljanje maksimalne količine informacija u vezi sa ispitivanim višedimenzionalnim prostorom. PC1 obuhvata najveći varijabilitet među podacima, dok se sa PC2, koja je normalna na PC1, opisuje maksimum preostalog varijabiliteta. Svaka sledeća glavna komponenta je normalna na prethodnu, opisuje varijanse koje ranije nisu opisane i pruža sve manje informacija o podacima. Dobijene glavne komponente predstavljaju polazne podatke za metode multivarijante analize kao što su regresija, klaster analiza, diskriminaciona analiza i dr. [107].

Regresionom analizom koja je korišćena za obradu podataka u okviru ovog istraživanja dobijaju se grafik skorova latentnih varijabli i grafik vektora latentnih varijabli. Na grafiku skorova latentnih varijabli (eng. *Scores plot of data*) prikazuje se struktura ispitivanog seta podataka gde se uočava grupisanje među uzorcima, njihove sličnosti i razlike, kao i spoljašnje vrednosti. Grafik vektora latentnih varijabli (eng. *Loadings plot for data*) daje informacije o uticaju ispitivanih varijabli na razdvajanje uzoraka na grafiku skorova latentnih varijabli [107].

3. EKSPERIMENTALNI DEO

U okviru ove doktorske disertacije ispitan je fitohemijski profil i biološka aktivnost dvadeset uzoraka osušenih listova čuvarkeće kao i preparata koji je pripremljen mešanjem svežih listova čuvarkeće sa bagremovim i livadskim medom, čistih uzoraka meda i svežih listova čuvarkeće od kojih je preparat pripremljen.

3.1. Uzorci čuvarkeće i meda

Uzorci listova čuvarkeće sakupljeni su tokom proleća i leta 2021. godine. Pored prinosa ekstrakcije, lokacije i sezone sakupljanja, u **Tabeli 2** navedeni su i brojevi vaučera uzoraka čuvarkeće koji su konzervirani u BEOU Herbarijumu Univerziteta u Beogradu – Biološkog fakulteta.

Tabela 2. Lista uzoraka čuvarkeće sa navedenim brojem vaučera, prinosom ekstrakcije, lokacijom i sezonom sakupljanja.

Br. uzorka	Broj vaučera	Lokacija	Sezona sakupljanja	Prinos ekstrakcije
1	BEOU17966	Starčevo	April, 2021	25,46%
2	BEOU17967	Starčevo	April, 2021	18,36%
3	BEOU17968	Skrobara	Jun, 2021	22,04%
4	BEOU17969	Starčevo	April, 2021	19,81%
5	BEOU17970	Umka	Maj, 2021	18,32%
6	BEOU17971	Banjica	Jun, 2021	20,60%
7	BEOU17972	Pirot	Jun, 2021	17,26%
8	BEOU17973	Stara planina	Jul, 2021	18,30%
9	BEOU17974	Starčevo	April, 2021	20,23%
10	BEOU17975	Starčevo	April, 2021	16,87%
11	BEOU17976	Vranje	Jul, 2021	21,25%
12	BEOU17977	Skrobara	Maj, 2021	28,76%
13	BEOU17978	Starčevo	April, 2021	20,98%
14	BEOU17979	Starčevo	April, 2021	20,21%
15	BEOU17980	Starčevo	April, 2021	21,46%
16	BEOU17981	Skrobara	Maj, 2021	23,11%
17	BEOU17982	Reva	Jun, 2021	17,15%
18	BEOU17983	Starčevo	April, 2021	20,57%
19	BEOU17984	Zemun Polje	Jun, 2021	13,63%
20	BEOU17985	Banjica	Jun, 2021	16,50%

Sveži listovi su skinuti sa rozeta, oprani pod mlazom vode i isprani dejonizovanom vodom. Višak vode je pokupljen suvom krpom, a zatim su listovi usitnjeni kako bi se brže osušili. Oprani, čisti, usitnjeni listovi osušeni su u dehidratoru za hranu Gorenje FDK 500 GCW (Ljubljana, Slovenija) na 40 °C tokom 72 h. Ovakva priprema uzoraka iskorišćena je za određivanje sadržaja vlage u sukulentnim listovima čuvarkeće koji su bogati vodom. Sadržaj vlage (V) izračunat je iz razlike masa izmerenih listova pre i posle sušenja:

$$V = \frac{a - b}{a} \times 100\%$$

gde su:

- a – izmerena masa listova pre sušenja (g),
- b – izmerena masa listova posle sušenja (g).

Osušeni listovi su samleveni korišćenjem električnog mlina Bosch TSM6A017C (Minhen, Nemačka) i čuvani u plastičnim, dobro zaptivenim bočicama na sobnoj temperaturi.

Za pripremu preparata čuvarkuće i meda korišćeni su sveže ubrani listovi čuvarkuće i po tri uzorka bagremovog i livadskog meda. Jedan zbirni uzorak svežih listova čuvarkuće je usitnjen i homogenizovan ručnim mikserom Bosch MSM14100 (Minhen, Nemačka). U staklenim teglama odmereno je ~ 112,5 g svežih listova čuvarkuće i ~ 187,5 g meda na tehničkoj vagi. Preparat je dobro promešan i homogenizovan, tegle su zavijene aluminijumskom folijom i čuvane u frižideru na +4 °C. Sadržaj u teglama je bio promešan svakog dana.

3.2. Hemikalije, reagensi i standardi

Reagensi korišćeni za pripremu ekstrakata

Etanol 96% (v/v), hlorovodonična kiselina 37% (v/v) i vodonik–peroksid (30%) nabavljeni su od firme *Sani–Hem* (Novi Bečej, Srbija). Azotna kiselina (65%) nabavljena je od firme *Sigma–Aldrich* (Steinheim, Nemačka), a metanol (HPLC čistoće) od proizvođača *Merck* (Darmstadt, Nemačka). U radu je korišćena ultračista voda koja je dobijena sistemom za prečišćavanje vode *Thermo Fisher TKA MicroPure* (0,055 µS/cm, Niederelbert, Nemačka). Politetrafluoroetilenski (PTFE) i najlonski (NY) špric–filteri membrane 0,22 µm i 0,45 µm nabavljeni su od firme *Supelco* (Bellefonte, SAD). Papir za filtriranje (Whatman No. 1) nabavljen je od firme *Merck* (Darmstadt, Nemačka). Kertridži za čvrsto–tečnu ekstrakciju (C18, 500 mg, 6 mL) nabavljeni su od firme *Macherey–Nagel GmbH & Co.* (Duren, Nemačka).

Identifikacija i kvantifikacija polifenola

Sirćetna kiselina, acetonitril i mravlja kiselina nabavljeni su od proizvođača *Merck* (Darmstadt, Nemačka). Svi rastvarači su bili HPLC čistoće. Standardi fenolnih jedinjenja neohlorogena kiselina (NCGA), *p*–hidroksibenzoeva kiselina (PHBA), eskulin (AEN), eskuletin (AET), kofeinska kiselina (CA), viteksin (VIT), izokvercetin (IQUE), *p*–kumarinska kiselina (PCOA), taksifolin (TAX), aromadendrin (AR), astragalin (AST), ruzmarinska kiselina (RA), elaginska kiselina (ELA), florizin (PHL), luteolin (LUT), kvercetin (QUE), naringenin (NAN), izoramnetin (IRH) i kempferol (KAE) su nabavljeni od firme *Sigma–Aldrich* (Steinheim, Nemačka).

Kvantifikacija šećera

Natrijum–acetat trihidrat i rastvor natrijum–hidroksida (50%) nabavljeni su od firme *Sigma–Aldrich* (Steinheim, Nemačka). Standardi šećera i šećernih alkohola korišćeni za identifikaciju i kvantifikaciju: glukoza (Glu) je kupljena od firme *Merck* (Darmstadt, Nemačka); fruktoza (Fru), arabinoza (Ara), melibioza (Mel), rafinoza (Raf), maltoza (Mal), trehaloza (Tre), izomaltoza (Imal), gentiobioza (Gen), turanoza (Tur) i erloza (Erl) su nabavljeni od firme *Sigma–Aldrich* (Steinheim, Nemačka), dok su saharoza (Sah), galaktitol (Gal), sorbitol (Sor) i manitol (Man) kupljeni od firme *Supelco* (Bellefonte, PA, SAD).

Multielementalna analiza – određivanje sadržaja makro– i mikro–elemenata

Semi–kvantitativni osnovni rastvor (štok) makro– i mikro–elemenata u koncentraciji od 0,0100 g/L nabavljen je od firme *Alfa Aesar* (Ward Hill, Massachusetts, SAD) i upotrebljen je za pripremu rastvora standardne serije (1; 10; 50; 100 i 250 µg/L) za određivanje Al, Bi, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni i Zn. Osnovni (štok) rastvor makro–elemenata u koncentraciji od 0,5000 g/L nabavljen je od *VHG Labs* (Manchester, SAD) i korišćen je za pripremu standardnih rastvora (0,5; 1,0; 5,0; 10,0 i 25,0 mg/L) za određivanje Ca, K, Mg, Na, P i S.

Određivanje ukupnog sadržaja fenola i antioksidativne aktivnosti

FC reagens, natrijum–karbonat, amonijum–heptamolibat, kalijum–persulfat i trihlorosirćetna kiselina nabavljeni su od firme *Merck* (Darmstadt, Nemačka). 2,2–Difenil–1–pikrilhidrazil (DPPH) je kupljen od firme *Fluka Chemie AG* (Buch, Švajcarska). 2,2'–Azino–bis(3–etilbenzotiazolin–6–sulfonska kiselina) diamonijum so (ABTS), troloks, komponente fosfatnog pufera (natrijum–hidrogenfosfat i natrijum–dihidrogenfosfat), natrijum–fosfat i gvožđe(III)–hlorid nabavljeni su od firme *Sigma–Aldrich* (Steinheim, Nemačka), a kalijum–heksacijanoferat(III) od firme *Thermo Fisher Scientific* (Bremen, Nemačka). Standard askorbinske kiseline nabavljen je od firme *Supelco* (Bellefonte, PA, SAD), a standard galne kiseline od firme *Acros organics* (Geel, Belgija).

Određivanje antibakterijske aktivnosti

Natrijum–dihidrogenfosfat, natrijum–hidroksid i triton X–100 nabavljeni su od firme *Sigma–Aldrich* (Steinheim, Nemačka). 3–(4,5–dimetiliazol–2–il)–2,5–difeniltetrazolijum–bromid (MTT) nabavljen je od firme *Fluka Chemie AG* (Buch, Švajcarska). Hranljivi kosi agar kupljen je od firme *Lab M* (Bury, UK), a tripton LP0042 i ekstrakt kvasca LP0021 od firme *Oxoid LTD* (Basingstoke, UK). Bujon Luria Bertani (LB) nabavljen je od firme *Merck* (Darmstadt, Nemačka). Korišćeni su sojevi četiri Gram–pozitivne bakterije: *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Micrococcus lysodeikticus* (ATCC 4698), meticilin rezistentni *Staphylococcus aureus* (MRSA) (ATCC 33591) i *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538); i dva soja Gram–negativnih bakterija: *Escherichia coli* (ATCC 35218) i *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 29665).

Određivanje antidijabetske aktivnosti

Enzim α –amilaza, dinitro–salicilna kiselina (DNSA), škrob, kalijum–natrijum–tartarat tetrahidrat, natrijum–hidroksid, natrijum–dihidrogenfosfat i natrijum–hlorid kupljeni su od *Sigma–Aldrich* (Steinheim, Nemačka). Akarboza je nabavljena od *Acros organics* (Geel, Belgija).

HPTLC

Rastvarači korišćeni za pripremu mobilnih faza: toluen je nabavljen od firme *Zorka Pharma* (Šabac, Srbija), etil–acetat od dobavljača *Betahem* (Beograd, Srbija), a anhidrid mravlje kiseline od firme *Lach–Ner* (Neratovice, Češka). Reagensi za derivatizaciju 2–aminoetil difenilborinat (NEU) i *p*–anisaldehyd nabavljeni su od firme *Sigma–Aldrich* (Steinheim, Nemačka), dok je polietilen–glikol 4000 (PEG 4000) nabavljen od proizvođača *Merck* (Darmstadt, Nemačka). HPTLC 20 × 10 cm staklene ploče prevučene silika–gelom 60 F₂₅₄ su nabavljene od firme *Merck* (Broj artikla: 1.05642.0001, Lot: HX16997242, Darmstadt, Nemačka).

3.3. Priprema ekstrakata

Ekstrakcija fenolnih jedinjenja iz osušenih listova čuvarkuće

Osušeni listovi čuvarkuće su precizno odmereni na analitičkoj vagi Ohaus Adventurer (New Jersey, SAD) sa tačnošću na četvrtoj decimali (~ 1,0000 g) i ekstrahovani dodatkom 10 mL smeše etanol–voda (70:30, v/v) u ultrazvučnom kupatilu Sonic (Niš, Srbija) tokom 1 h na sobnoj temperaturi. Ekstrakti su centrifugirani u centrifugi Thermo Scientific SL 16 (Waltham, SAD) tokom 15 minuta na 10000 obrtaja u minuti (eng. *round per minute*, rpm). Supernatant je prebačen u prethodno izmereni balon sa okruglim dnom i uparen do suva koristeći vakuum uparivač IKA–Werke HB4 basic (Staufen, Nemačka) na temperaturi od 40 °C pod sniženim pritiskom. Balon sa ostatakom nakon uparavanja je ponovo izmeren. Iz razlike masa balona pre i posle uparavanja supernatanta izračunat je tačan prinos ekstrakcije svakog uzorka (**Tabela 1**). Upareni ostatak ekstrakata rastvoren je u odgovarajućoj zapremini metanola (HPLC čistoće) da se dobije ista koncentracija svih ekstrakata od 50 mg/mL. Ekstrakti su profiltrirani kroz politetrafluoroetilenski (PTFE) špric–filter membrane 0.45 μ m i čuvani do upotrebe u zamrzivaču na -20 °C.

U ovako pripremljenim ekstraktima osušenih listova čuvarkuće identifikovana su i kvantifikovana fenolna jedinjenja i ispitana je biološka aktivnost (antioksidativna, antidiijabetska i antimikrobna).

Ekstrakcija fenolnih jedinjenja iz preparata čuvarkuće i meda, uzoraka meda i svežih listova čuvarkuće

I način pripreme ekstrakata: Na tehničkoj vagi u erlenmajeru od 150 mL odmereno je ~ 30 g preparata čuvarkuće i meda i podvrgnuto ekstrakciji sa 50 mL ultračiste zakišeljene vode (pH vrednost 2, podešena dodavanjem 37% HCl) tokom 30 minuta na sobnoj temperaturi u ultrazvučnom kupatilu. Ekstrakti su na ovaj način prepremani na svakih nedelju dana tokom pet nedelja (1, 7, 14, 21. i 28. dana). Istim postupkom jednokratno su ekstrahovani i fenoli iz svežih, usitnjenih listova čuvarkuće, dok su fenoli iz meda ekstrahovani iz ~ 15 g odmerenog uzorka meda sa 50 mL ultračiste zakišeljene vode.

II način pripreme ekstrakata: Na tehničkoj vagi je odmereno ~ 30 g smeše čuvarkuće i meda u erlenmajeru od 150 mL i bez dodatka rastvarača postavljena je ekstrakcija na ultrazvučno kupatilo tokom 30 minuta na sobnoj temperaturi. Ovim postupkom ekstrakti su pripremljeni 1. i 28. dana. Na isti način, bez dodatka rastvarača, jednokratno je pripremljen i ekstrakt od svežih listova čuvarkuće.

Ekstrakti pripremljeni na oba načina su centrifugirani 15 min na 10000 rpm, a zatim su profiltrirani kroz filter–papir. Profiltrirani ekstrakti su prečišćeni sistemom za čvrsto–tečnu ekstrakciju (eng. *Solid–Phase Extraction*, SPE). Zbog velikih zapremina ekstrakata korišćena su po dva SPE kertridža za svaki ekstrakt. Kondicioniranje kertridža izvršeno je propuštanjem 10 mL zakišeljene vode (pH 2) i 10 mL metanola. Nakon što su ekstrakti propušteni, kertridži su isprani sa 15 mL zakišeljene vode (pH 2) kako bi se uklonili šećeri, a zaostali fenoli su eluirani propuštanjem 15 mL metanola.

Eluati svih ekstrakata su upareni do suva na vakuum uparivaču pri temperaturi od +40 °C pod sniženim pritiskom. Ostatak nakon uparavanja rastvoren je u odgovarajućoj zapremini metanola (HPLC čistoće) da koncentracija ekstrakata bude 25 mg/mL. Ekstrakti su profiltrirani kroz politetrafluoroetilenski (PTFE) špic–filter membrane 0,45 µm i čuvani do upotrebe u zamrzivaču na -20 °C.

Priprema ekstrakata osušenih listova čuvarkuće za analizu šećera

Vodeni ekstrakti osušenih listova čuvarkuće za analizu šećera pripremljeni su ekstrakcijom ~ 0,05 g osušenih listova čuvarkuće sa 10 mL ultračiste vode na ultrazvučnom kupatilu u trajanju od 1 h na sobnoj temperaturi. Ekstrakti su centrifugirani 15 minuta na 10000 rpm, profiltrirani kroz *Supelco* NY špic–filter membrane 0,22 µm i čuvani u zamrzivaču na -20 °C.

Priprema ekstrakata preparata čuvarkuće i meda, uzoraka meda i svežih listova čuvarkuće za analizu šećera

Vodeni ekstrakti za analizu šećera pripremljeni su tako što je na analitičkoj vagi odmereno ~ 1,0000 g svežih listova čuvarkuće/preparata čuvarkuće i meda, dodato 25 mL ultračiste vode i ekstrahovano na sobnoj temperaturi u ultrazvučnom kupatilu tokom 1 h. Uzorci meda su istim postupkom pripremljeni za analizu šećera pri čemu je odmerena masa uzorka iznosila ~ 0,5000 g. Ekstrakti su centrifugirani 15 minuta na 10000 rpm, profiltrirani kroz *Supelco* najlonski (NY) špic–filter membrane 0,22 µm i čuvani u zamrzivaču na -20 °C.

Priprema uzoraka osušenih listova čuvarkuće za multielementalnu analizu

Sprašeni, osušeni listovi čuvarkuće su podvrgnuti kiseloj vlažnoj digestiji za pripremu rastvora uzoraka za analizu elemenata. U plastične kivete je odmereno ~ 0,3 g uzorka, dodat je 1 mL vodonik–peroksida (30%, v/v) i 4 mL koncentrovane azotne kiseline (65%, v/v), a zatim su kivete stavljene na vodeno kupatilo na 90 °C dok sadržaj u kivetama nije uparen do suva. Suvi ostatak je rastvoren u maloj zapremini ultračiste vode, zatim je kvantitativno prenet u odmerni sud koji je dopunjen

ultračistom vodom do krajnje zapremine od 25 mL. Ovako pripremljeni rastvori su filtrirani kroz 0,45 µm PTFE špric-filter i čuvani do analize u plastičnim kivetama u frižideru na +4 °C.

3.4. Fitohemijaska karakterizacija

Fitohemijaski profil etanolnih ekstrakata osušenih listova čuvaruće okarakterisan je određivanjem fenolnog profila spektrofotometrijski – merenjem ukupnog sadržaja fenola i identifikacijom i kvantifikacijom fenola primenom *UPLC–LTQ OrbiTrap MS* i *UPLC–DAD MS/MS*. Primenom uzlazne HPTLC razvijen je fenolni profil na HPTLC pločama. Takođe, određen je i profil šećera jonskom hromatografijom *HPAEC/PAD*, kao i sadržaj elemenata *ICP–OES* metodom.

Fitohemijaski profil ekstrakata preparata čuvaruće i meda, čistih uzoraka meda i svežih listova čuvaruće određen je spektrofotometrijskim merenjem TPC i razvijanjem HPTLC fenolnog profila.

3.4.1. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnog sadržaja fenola

Ukupni sadržaj fenola određen je FC testom na GBC UV–Visible Cintra 6 spektrofotometru (Dandenong, VIC, Australija) merenjem apsorbancije pripremljenih rastvora na 765 nm, kako je ranije opisano u literaturi [108]. U epruvetu je dodato 0,5 mL ekstrakta/standarda, 0,5 mL ultračiste vode i 2,5 mL FC reagensa (10%). Rastvor je promućkan, nakon 5 minuta inkubacije na sobnoj temperaturi, dodato je 2,0 mL rastvora natrijum–karbonata (7,5%) a zatim je rastvor ponovo dobro promućkan. Nakon inkubiranja rastvora na sobnoj temperaturi tokom 1 h na tamnom mestu izmerena je apsorbancija. Analiza je urađena u duplikatu za svaki ekstrakt i standardnu seriju. Galna kiselina (eng. *gallic acid*, GA) je korišćena kao standardno jedinjenje za konstruisanje kalibracione prave u rasponu koncentracija 20 – 120 µg/mL. TPC vrednosti su izražene kao gram–ekvivalenti galne kiseline po kilogramu suve mase uzorka (g GAE/kg SM).

3.4.2. Identifikacija fenolnih jedinjenja primenom *UPLC–LTQ OrbiTrap MS*

Za razdvajanje i identifikaciju fenolnih jedinjenja u ekstraktima osušenih listova čuvaruće korišćen je sistem ultraefikasne tečne hromatografije koji se sastoji od kvaternerne *Accela 600* pumpe i *Accela* autosamplera koji su povezani sa hibridnim masenim spektrometrom visoke rezolucije (*LTQ OrbiTrap MS*) sa zagrejanom elektrosprej jonizacionom sondom *HESI–II* (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Nemačka). Ovaj sistem je opremljen *Synchronis C18* analitičkom kolonom (100 × 2,1 mm, 1,7 µm veličina čestica, Thermo Fisher Scientific) koja je korišćena za razdvajanje fenolnih jedinjenja. Fenolna jedinjenja identifikovana su u negativnom jonizacionom režimu. Zapremina injektovanog ekstrakta je bila 5 µL. Razdvajanje fenolnih jedinjenja izvršeno je korišćenjem mobilne faze koja se sastoji od: (A) voda + 0,1% mravlja kiselina i (B) acetonitril + 0,1% mravlja kiselina. Korišćen je protok linearnog gradijenta pri brzini od 0,3 mL/min. Primljeni gradijent eluiranja i parametri *HESI* izvora su postavljeni kako je ranije opisano [109]. Fenoli, fenolne kiseline i njihovi derivati su identifikovani prema vremenu zadržavanja, tačnoj masi i karakterističnim fragmentima jona.

3.4.3. Kvantifikacija fenolnih jedinjenja primenom *UPLC–DAD MS/MS*

Fenolna jedinjenja prisutna u ekstraktima osušenih listova čuvaruće su razdvojena i kvantifikovana primenom *Dionex Ultimate 3000 UPLC* sistema (Thermo Fisher Scientific, Waltham, SAD). Sistem je spregnut sa *DAD* detektorom sa nizom dioda (eng. *Diode Array Detector*) i trostrukim kvadrupolnim masenim spektrometrom *TSQ Quantum Access Max* (ThermoFisher Scientific) sa jonskim izvorom elektrosprej jonizacije sa zagrevanjem *HESI* (eng. *Heated Electro Spray Ionization*). Sistem je opremljen *Hypersil gold C18* analitičkom kolonom (50 × 2,1 mm, veličine čestica 1,9 µm, Thermo Fisher Scientific). Mobilna faza se sastoji od eluenta (A): 0,2% sirćetne kiseline u vodi i eluenta (B): acetonitril (HPLC čistoće). Gradijentni način eluiranja je podešen sa brzinom protoka od 0,4 mL/min. Ekstrakti su injektovani u zapremini od 5 µL. Fenolna jedinjenja su identifikovana direktnim poređenjem sa komercijalno dostupnim standardima. Osnovni rastvor (1000 mg/L) svakog standardnog jedinjenja je razblažen mobilnom fazom da bi se dobili radni

rastvori (0,025, 0,050, 0,100, 0,250, 0,500, 0,750 i 1,000 mg/L). Ukupni sadržaj svakog jedinjenja je izračunat integraljenjem površine pikova i izražen je kao mg/kg SM.

3.4.4. Razvijanje HPTLC fenolnog profila

Fenolni profil ekstrakata osušenih listova čuvaruće razvijen je tehnikom uzlazne HPTLC. Hromatografski sistem se sastojao od normalno-fazne staklene HPTLC ploče prevučene slojem silika-gela i mobilne faze koju čine toluen : etil-acetat : mravlja kiselina u odnosu 5:4:1 (v/v/v). Zapremina ekstrakata od 6 µL naneta je na HPTLC ploču koristeći *Linomat 5* (CAMAG, Muttenz, Švajcarska) u obliku traka dužine 6 mm na 10 mm od donje ivice ploče, dok je pređeni put rastvarača iznosio 70 mm. Hromatogrami su razvijeni u vertikalnoj kadi sa dva kanala (CAMAG) koja je prethodno sićena 20 minuta parama mobilne faze. Derivatizacija razvijenog hromatograma izvedena je uranjanjem HPTLC ploče u 0,5% metanolni rastvor NEU reagensa tokom 3 sekunde pri brzini od 4,5 cm/s koristeći *TLC chromatogram immersion device* (CAMAG), a nakon sušenja, HPTLC ploča je uronjena i u 5% metanolni rastvor PEG 4000 tokom 3 sekunde pri brzini od 4,5 cm/s. NEU reagens dovodi do fluoresciranja fenolnih jedinjenja i njihove vizualizacije pod UV lampom, dok PEG 4000 služi za pojačavanje i stabilizaciju boje. Slike hromatograma su dokumentovane pod UV lampom na 366 nm koristeći Samsung Galaxy S21 kupljen od firme *Samsung electronics* (Suwon, Južna Koreja) koji je opremljen kamerom od 64 MPs. Takođe, razvijeni hromatogrami su derivatizovani i rastvorom *p*-anisaldehida koji je pripremljen mešanjem 1,5 mL *p*-anisaldehida sa 212 mL metanola, 25 mL glacijalne sirćetne kiseline i 12,5 mL sumporne kiseline. Ovako derivatizovani hromatogrami slikani su pod vidljivim svetlom kamerom Samsung Galaxy S21.

HPTLC fenolni profil ekstrakata meda, svežih listova čuvaruće i preparata čuvaruće i meda (č+m) razvijen je istim postupkom kao i HPTLC profil ekstrakata osušenih listova čuvaruće. Mobilnu fazu korišćenu za razvijanje hromatograma čini smeša etil-acetat : toluen : mravlja kiselina : voda (16:4:3:2, v/v/v/v). Ekstrakti su naneti u zapremini od 4 µL u obliku traka dužine 6 mm, a pređeni put rastvarača je iznosio 70 mm. Za vizualizaciju fenolnog profila ovih ekstrakata korišćeni su NEU i PEG reagens-rastvori.

3.4.5. Određivanje profila šećera jonskom hromatografijom

Sistem visokoefikasne anjonsko-izmenjivačke hromatografije sa pulsno-amperometrijskom detekcijom (HPAEC/PAD) korišćen za analizu šećera i šećernih alkohola je *DIONEX ICS 3000 DP* (Sunnyvale, SAD). Opremljen je kvaternarnom gradijentnom pumpom, elektrohemijским detektorom koji se sastoji od Au radne elektrode i Ag/AgCl referentne elektrode, autosamplerom (AS-DV) i softverom *Chromeleon* (Chromatography Workstation and Chromeleon 6.7 Chromatography Management Software). Razdvajanje je izvršeno na *Carbo Pac PA100* koloni (4 × 250 mm (analitička) i 4 × 50 mm (zaštitna); Dionex) termostiranoj na 30 °C. Brzina protoka mobilne faze bila je 0,7 mL/min. Korišćen je gradijentni tip eluiranja mobilne faze sledećim redosledom: -20 – 5 min = 15% 300 mmol/L NaOH; 5 – 12 min = 15% 300 mmol/L NaOH i 2% 500 mmol/L NaOAc; 12 – 20 min = 15% 300 mmol/L NaOH i 4% 500 mmol/L NaOAc; 20 – 30 min = 20% 300 mmol/L NaOH i 20% 500 mmol/L NaOAc; ostatak do 100% je ultračista voda. Ukupno vreme trajanja analize je 30 minuta.

3.4.6. Multielementalna analiza primenom ICP-OES

Sistem indukovano spregnute plazme sa optičkom emisionom spektroskopijom *ICP-OES 6500 Duo* (Thermo Fisher Scientific, United Kingdom) opremljen sa *CID86* detektorom i *Iteva* softverom (*iCAP Software Iteva*, izdanje 8), korišćen je za kvantitativno određivanje elemenata u pripremljenim ekstraktima osušenih listova čuvaruće za elementalnu analizu. Instrumentalni uslovi su podešeni tako da je RF radna snaga iznosila 1150 W, glavni protok argona 12 L/min, dok je protok argona u raspršivaču bio 0,5 L/min. Protok uzorka iznosio je 1 L/min. Komora za raspršivanje je ciklonska sa koncentričnim raspršivačem. Svi uzorci su analizirani u duplikatu, u tri ponovljena merenja.

3.5. Određivanje biološke aktivnosti

3.5.1. Antioksidativna aktivnost

Antioksidativna aktivnost 70% etanolnih ekstrakata osušenih listova čuvaruće određena je spektrofotometrijskim testovima (DPPH, ABTS, TRP i TAC), HPTLC–antioksidativnim testovima (HPTLC–FC, HPTLC–DPPH, HPTLC–ABTS, HPTLC–TRP i HPTLC–TAC) i DFT metodom.

Antioksidativna aktivnost ekstrakata preparata čuvaruće i meda, uzoraka meda i svežih listova čuvaruće ispitana je spektrofotometrijskim DPPH testom i HPTLC–DPPH antioksidativnim testom.

Određivanje antioksidativne aktivnosti spektrofotometrijskim testovima

DPPH antioksidativni test

Alikvotu ekstrakta od 0,1 mL dodato je 4 mL rastvora DPPH (79 $\mu\text{mol/L}$). Rastvori su inkubirani na sobnoj temperaturi na tamnom mestu tokom 45 minuta, a zatim je izmerena apsorbanacija na 517 nm. Osnovni rastvor troloksa (1000 $\mu\text{mol/L}$) korišćen je za pravljene rastvora standardne serije (100 – 600 $\mu\text{mol/L}$) [110]. Rezultati su izraženi kao mmol troloks ekvivalenta po kilogramu suve mase uzorka (mmol TE/kg SM).

ABTS antioksidativni test

Radni rastvor ABTS radikala napravljen je tako što je pomešano 5 mL ABTS (7 mmol/L) i 5 mL kalijum–persulfata (2,4 mmol/L). Nakon 16 h na tamnom mestu, radni rastvor je razblažen destilovanom vodom da bi se postigla apsorbanacija rastvora oko 0,700 (1 mL radnog rastvora razblažen je sa 45 mL destilovane vode). Pomešano je 0,15 mL ekstrakta i 2,85 mL razblaženog rastvora ABTS i nakon 7 minuta izmerena je apsorbanacija na 734 nm. Troloks je korišćen kao standardno jedinjenje od čijeg osnovnog rastvora (1000 $\mu\text{mol/L}$) su napravljeni rastvori standardne serije (25 – 400 $\mu\text{mol/L}$) [111]. Rezultati su izraženi kao mmol troloks ekvivalenta po kilogramu suve mase uzorka (mmol TE/kg SM).

Test ukupne redukcionne moći

Osnovni rastvor je napravljen odmeravanjem 0,4 mL ekstrakta kojem je dodato 0,4 mL 96% etanola, 2,0 mL fosfatnog pufera (0,2 mol/L, pH 6,6) i 2,0 mL 1% kalijum–heksacijanoferata(III). Rastvor je inkubiran tokom 20 minuta na 50 °C, a nakon što je prohladen dodato je 2,0 mL 10% trihlorosirćetne kiseline. Od ovako pripremljenog rastvora odmereno je 2,0 mL alikvota, a zatim je dodato 2,0 mL destilovane vode i 0,4 mL 0,1% gvožđe(III)–hlorida. Nakon dva minuta inkubacije apsorbanacija je izmerena na 700 nm. Rastvor askorbinske kiseline (1000 $\mu\text{mol/L}$) iskorišćen je za pravljenje rastvora standardne serije u opsegu 50 – 400 $\mu\text{mol/L}$ [112]. Rezultati su izraženi kao mmol ekvivalenta askorbinske kiseline po kilogramu suve mase uzorka (mmol AAE/kg SM).

Ukupni antioksidativni kapacitet – fosfomolibdenski metod

Rastvor reagensa koji je potreban za ovaj test napravljen je mešanjem 0,6 M sumporne kiseline, 28 mM natrijum–fosfata i 4 mM amonijum–molibdata. Zapremeni od 0,5 mL ekstrakta dodato je 3,0 mL reagensa. Rastvor je zatim inkubiran 10 minuta na 95 °C, a nakon hlađenja apsorbanacija je izmerena na 695 nm. Osnovni rastvor askorbinske kiseline (1000 mg/L) razblažen je da se dobiju rastvori standardne serije (12,5 – 150 $\mu\text{g/mL}$) [113]. Rezultati su izraženi kao mmol ekvivalenta askorbinske kiseline po kilogramu suve mase uzorka (mmol AAE/kg SM).

Određivanje antioksidativne aktivnosti HPTLC–antioksidativnim testovima

HPTLC ploče za ispitivanje antioksidativne aktivnosti ekstrakata osušenih listova čuvarkuće su pripremljene tako što je naneto 4 μL ekstrakta kao zone dužine 6 mm koristeći *Linomat 5* (CAMAG). Nakon razvijanja profila mobilnom fazom toluen : etil–acetat : mravlja kiselina (5:4:1, v/v/v) i dužini puta od 70 mm, hromatogrami su derivatizovani uranjanjem u odgovarajuće rastvore tokom 3 sekunde pri brzini od 4,5 cm/s koristeći *TLC chromatogram immersion device* (CAMAG) radi vizualizacije zona koje ispoljavaju antioksidativnu aktivnost. Svi dobijeni hromatogrami slikani su pod vidljivim svetlom kamerom Samsung Galaxy S21.

Ekstrakti meda, svežih listova čuvarkuće i preparata čuvarkuće i meda (č+m) su naneti na HPTLC ploče u zapremini od 2 μL u dužini od 6 mm, a hromatogrami su razvijeni smešom etil–acetat : toluen : mravlja kiselina : voda (16:4:3:2, v/v/v/v). Kod ovih ekstrakata određen je samo HPTLC–DPPH antioksidativni profil.

HPTLC–FC test

Za derivatizaciju hromatograma korišćen je vodeni rastvor FC reagensa (3:2, v/v). Aktivne zone tamno–plave boje naspram žute pozadine pojavile su se nakon zagrevanja ploče u sušnici na 100 °C tokom 2 minuta [101].

HPTLC–DPPH test

Razvijeni hromatogram je derivatizovan metanolnim rastvorom DPPH (0,1%). Bele trake naspram ljubičaste pozadine predstavljaju aktivne zone [102].

HPTLC–ABTS test

Radni rastvor ABTS pripremljen je mešanjem 5 mL ABTS (7 mmol/L) i 5 mL kalijum–persulfata (2,4 mmol/L) i ostavljen na tamnom mestu tokom 16 h. Za derivatizaciju hromatograma, radni rastvor je razblažen destilovanom vodom u odnosu 1:10 (v/v). Aktivne zone se pojavljuju kao blede–žute zone naspram tirkizne pozadine [103].

HPTLC–TRP test

Vodeni rastvor koji sadži 5% gvožđe(III)–hlorida i 0,5% kalijum–heksacijanoferata(III) korišćen je za derivatizaciju razvijenog hromatograma. Aktivne zone su tamno–plave boje naspram žute pozadine [114].

HPTLC–TAC test

Hromatogram je derivatizovan vodenim rastvorom koji u 200 mL sadži 2,88 g natrijum–fosfata, 3,92 g amonijum–molibdata i 47,04 mL koncentrovane sumporne kiseline. Aktivne zone se uočavaju nakon zagrevanja hromatograma u sušnici na 100 °C kao plave zone naspram bele pozadine.

Određivanje antioksidativne aktivnosti DFT metodom

Osnovne 3D strukture identifikovanih jedinjenja koja ispoljavaju antioksidativnu aktivnost su preuzete iz *PubChem* baze podataka. Konformaciono pretraživanje ovih struktura obavljeno je korišćenjem *MMFF94s* polja sile [115], a zatim je geometrija konformera najniže energije dodatno optimizovana korišćenjem PM7 poluempirijske kvantno–hemijske metode primenjene u *MOPAC 2016* [116]. Entalpija disocijacije veze (BDE) je izračunata iz entalpije koja je korigovana za energiju nulte tačke (H) za neutralni molekul (Mol–H), radikal (Mol*) i atom vodonika (H*) koristeći sledeću jednačinu:

$$\text{BDE} = \text{H}(\text{Mol}^*) + \text{H}(\text{H}^*) - \text{H}(\text{Mol–H}) \quad (1)$$

Jonizacioni potencijal (IP) je izračunat kao razlika između entalpije katjon–radikala i neutralnog molekula koristeći sledeću jednačinu:

$$\text{IP} = \text{H}(\text{Mol}^{*+}) - \text{H}(\text{Mol–H}) \quad (2)$$

Frekvencija je proračunata za sve neutralne molekule, radikale i katjon–radikale da bi se potvrdilo da odgovaraju minimumu potencijala na površini. Metoda DFT nudi dobar balans između tačnosti termodinamičkih podataka i računskih troškova. Funkcional *M06–2Ks* je izabran za proračun energije reakcija koje uključuju radikalne vrste zbog svoje preciznosti. Korišćen je osnovni set 6–31G+(d,p), a efekti rastvarača vode i pentil–etanoata su simulirani korišćenjem modela gustine solvatacije (SMD). Svi proračuni su obavljani korišćenjem Gaussian 16, verzija A.01 [117].

3.5.2. Antidijabetska aktivnost

Određivanje antidijabetske aktivnosti spektrofotometrijskim amilaza testom

Za određivanje antidijabetske aktivnosti spektrofotometrijskom metodom bilo je neophodno da se ekstrakti osušenih listova čuvaruće prečiste sistemom za čvrsto–tečnu ekstrakciju (SPE) kako bi se uklonili šećeri. Kondicioniranje SPE kertridža izvršeno je propuštanjem 5 mL metanola i 5 mL ultračiste vode. Nakon što su osnovni ekstrakti propušteni (0,3 mL, 50 mg/mL), SPE kertridži su isprani sa 10 mL ultračiste vode kako bi se uklonili šećeri, a vezani fenoli su eluirani propuštanjem 1,5 mL metanola. Konačna koncentracija ekstrakata nakon SPE prečišćavanja bila je 10 mg/mL.

Za određivanje inhibitorne aktivnosti ekstrakata na enzim α –amilazu primenjena je modifikovana metoda iz literature [118]. Pomešano je 50 μ L SPE prečišćenih ekstrakata osušenih listova čuvaruće (konc. 1, 5 i 10 mg/mL) i 50 μ L 1% rastvora skroba. Rastvor je inkubiran 10 minuta na 25 °C. Dodato je 50 μ L α –amilaze (0,5 mg/mL) i rastvor je ponovo inkubiran na 25 °C tokom 10 minuta. Na kraju je dodato još 100 μ L DNSA reagensa i rastvor je inkubiran 5 minuta na 100 °C. Pripremljeni rastvor je razblažen dodatkom 1 mL ultračiste vode i apsorbancija je izmerena na 540 nm.

Određivanje antidijabetske aktivnosti HPTLC–amilaza antidijabetskim testom

Dvadeset 70% etanolnih ekstrakata osušenih listova čuvaruće naneto je na HPTLC ploču u zapremini od 8 μ L u obliku traka dužine 6 mm upotrebom *Linomat 5* (CAMAG). Nakon razvijanja hromatograma mobilnom fazom toluen : etil–acetat : mravlja kiselina (5:4:1, v/v/v) HPTLC ploča je sušena u struji hladnog vazduha tokom 30 minuta. Ploča je ručno uronjena tokom 5 sekundi u 1% rastvor α –amilaze u fosfatnom puferu (20 mmol/L, pH 7,15), a zatim inkubirana 30 minuta na 37 °C. Inkubacija jer sprovedena u plastičnim kutijama u kojima se natopljenim vlažnim filter–papirom održava vlažna sredina koja je neophodna za uspešno odvijanje reakcije između aktivnih fenolnih jedinjenja i enzima. Zatim je ploča uronjena u 1% vodeni rastvor krompirovog skroba (supstrat enzima) i ponovo inkubirana tokom 30 minuta na 37 °C da se omogući reakcija između enzima i supstrata. Lugolov reagens koji služi za vizualizaciju aktivnih hromatografskih zona korišćen je za derivatizaciju ploče. Pripremljen je rastvaranjem prethodno homogenizovanih 1 g joda i 2 g kalijum–jodida u 300 mL ultračiste vode. Aktivne zone su ljubičaste boje naspram bele pozadine. Hromatogram je slikan Samsung Galaxy S21 mobilnim telefonom na vidljivoj svetlosti.

Istim postupkom dobijen je HPTLC–antidijabetski profil ekstrakata meda, svežih listova čuvaruće i preparata čuvaruće i meda. Ekstakti su na ploču naneti u zapremini od 4 μ L u dužini od 6 mm, a hromatogrami su razvijeni smešom etil–acetat : toluen : mravlja kiselina : voda (16:4:3:2, v/v/v/v).

3.5.3. Antibakterijska aktivnost

Antibakterijska aktivnost ekstrakata osušenih listova čuvarkuće u 70% etanolu određena je agar–difuzionim metodom u bunarićima i HPTLC–antibakterijskim testovima na Gram–pozitivne bakterije: *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Micrococcus lysodeikticus* (ATCC 4698), meticilin–rezistenti *Staphylococcus aureus* (MRSA) (ATCC 33591) i *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), kao i na Gram–negativne bakterije: *Escherichia coli* (ATCC 35218) i *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 29665).

Antibakterijska aktivnost ekstrakata preparata čuvarkuće i meda, uzoraka meda i svežih listova čuvarkuće ispitana je HPTLC–antibakterijskim testovima na Gram–pozitivnu bakteriju *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), kao i na Gram–negativnu bakteriju *Escherichia coli* (ATCC 35218).

Određivanje antibakterijske aktivnosti agar–difuzionim metodom u bunarićima

Tečne kulture bakterija pripremljene su u 5 mL LB bujona. Nakon inkubacije od 18 h na 37 °C i 220 obrtaja u minuti u Biosan Orbital Shaker ES–20 inkubatoru nabavljenom od firme *Sigma–Aldrich* (Steinheim, Germany) izmerene su gustine bakterijskih suspenzija koje su iznosile 17,7 – 21,7 McF. Bakterijske suspenzije su razblažene fiziološkim rastvorom do gustine od ~ 5 McF. Zapremina od 1 mL ovako razblaženih suspenzija bakterija dodata je u 50 mL hranljivog agara (rastopljenog i ohlađenog medijuma). Zasejani rastopljeni tečni agar je sipan u Petri–šolju prečnika 15 cm. Nakon što očvrstne, u agaru su izbušeni bunarići prečnika 10 mm u koje je dodato 60 µL ekstrakata osušenih listova čuvarkuće (50 mg/mL) i 60 µL metanola koji predstavlja negativnu kontrolu. Inokulisane Petri–šolje ostavljene su u frižideru tokom 1 h da se obezbedi difundovanje jedinjenja u agar, a zatim su inkubirane na 37 °C tokom 24 h. Prečnici zona inhibicije izmereni su u mm.

Određivanje antibakterijske aktivnosti HPTLC–antibakterijskim testovima

Prekonoćne suspenzije bakterija pripremljene su inokulacijom 10 mL LB bujona sa 0,1 mL suspenzije bakterijskih ćelija u fiziološkom rastvoru i inkubirane na 37 °C i 220 o/min tokom 16 – 18 h u šejker–inkubatoru Biosan Orbital Shaker ES–20 (Riga, Letonija). Suspenzija bakterija za derivatizaciju HPTLC ploča pripremljena je dodavanjem 0,2 mL prekonoćne kulture u 200 mL LB bujona. Suspenzija je inkubirana na 37 °C dok se ne postigne odgovarajući broj bakterija koji je potvrđen merenjem gustine suspenzije na DEN–1B McFarland Densitometer Biosan (Riga, Letonija). Za bakterijske suspenzije u koje su uronjeni razvijeni hromatogrami tokom 6 s gustina je iznosila 5,07 McF za *B. subtilis*, 3,83 McF za *M. lysideikticus*, 5,25 McF za MRSA, 5,31 McF za *S. aureus*, 2,26 McF za *E. coli*, 3,84 McF za *K. pneumoniae*. Ploče su inkubirane na 37 °C tokom 90 minuta u plastičnim kutijama u kojima je obezbeđena vlažna sredina. Reagens korišćen za derivatizaciju hromatograma inkubiranih sa Gram–pozitivnim bakterijama je 0,1% rastvor MTT u fosfatnom puferu (100 mM, pH 7,2), dok je za derivatizaciju hromatograma inkubiranih sa Gram–negativnim bakterijama korišćen rastvor MTT koji sadrži 20 kapi surfaktanta Triton X–100 u 200 mL MTT rastvora. Nakon derivatizacije MTT rastvorom, ploče su inkubirane još 60 minuta na 37 °C do pojave aktivnih hromatografskih zona bele boje naspram ljubičaste pozadine. HPTLC ploče su snimljene pod vidljivim svetlom koristeći mobilni telefon Samsung Galaxy S21 opremljen kamerom od 64 MP.

Istim principom su pripremljene i derivatizovane ploče za razvijanje HPTLC–antibakterijskog profila ekstrakata meda, svežih listova čuvarkuće i preparata čuvarkuće i meda (č+m). Na ploču su ekstrakti naneti u zapremini od 4 µL u dužini trake od 6 mm, a hromatogrami su razvijeni smešom etil–acetat : toluen : mravlja kiselina : voda (16:4:3:2, v/v/v/v). Gustina suspenzija bakterija iznosila je 4,78 McF za *B. subtilis* i 2,75 McF za *E. coli*.

3.6. Obrada podataka

Obrada podataka obuhvatila je određivanje parametara deskriptivne statistike, obradu slika hromatograma i njihovo prevođenje u matricu podataka, kao i PCA.

Parametri deskriptivne statistike dobijeni su korišćenjem *Analysis toolpack* dodatka u okviru *Microsoft Office Excel*-a. Slike hromatograma su svedene na iste dimenzije korišćenjem alatke *snipping tool*, a zatim su obrađene u ImageJ programu (<https://imagej.net/Downloads>) u cilju dobijanja podataka koji predstavljaju zavisnost intenziteta piksela u funkciji rastojanja. Hromatogrami su u okviru ImageJ programa prvo prevedeni u crno-beli format (8-bit), a zatim je zbog neujednačenog osvetljenja korigovana pozadina korišćenjem opcije *Subtract Background* (širina 500 piksela) i uklanjanjem šuma podešavanjem širine *Mean Filter*-a na 2 piksela. Dobijene matrice podataka dodatno su obrađene algoritmima koji su deo PLS ToolBox statističkog paketa (v.6.2.1, www.eigenvector.com/software/pls_toolbox.htm, Eigenvector Research, Wenatchee, WA, USA) u okviru MATLAB softvera (v. 7.12.0, R2011a, MathWorks Inc., Natick, MA, USA). Navedeni PLS ToolBox korišćen je i za PCA analizu.

Algoritmi u okviru PLS ToolBox statističkog paketa koji su korišćeni za dodatnu obradu podataka dobijenih za osušene listove čuvarkuće, kao i za preparat svežih listova čuvarkuće i meda navedeni su u nastavku:

Osušeni listovi čuvarkuće:

Fenolni profil (LC-MS): Autoscale;

Šćerni profil (HPEAC): Autoscale;

Elementalni sastav (ICP-OES): Autoscale;

Antioksidativna aktivnost (Spektrofotometrija): Autoscale;

Antioksidativna aktivnost (HPTLC): Smoothing (order: 0, window: 15 pt, incl only, tails: polyinterp), Normalize (1-Norm, Area = 1), Median Center;

Antidijabetska aktivnost (HPTLC): Smoothing (order: 0, window: 15 pt, incl only, tails: polyinterp), Normalize (1-Norm, Area = 1), Mean Center;

Antibakterijska aktivnost (HPTLC): Variable Alignment (COW, slack = 5), Normalize (1-Norm, Area = 1), Mean Center.

Preparat svežih listova čuvarkuće i meda:

Fenolni profil (HPTLC): Variable Alignment (COW, slack = 5), Normalize (1-Norm, Area = 1), Mean Center;

Antioksidativna aktivnost (HPTLC): Variable Alignment (COW, slack = 5), Normalize (1-Norm, Area = 1), Mean Center;

Antidijabetska aktivnost (HPTLC): Variable Alignment (COW, slack = 5), Normalize (1-Norm, Area = 1), Mean Center;

Antibakterijska aktivnost (HPTLC): Variable Alignment (COW, slack = 5), Normalize (1-Norm, Area = 1), Mean Center.

4. REZULTATI I DISKUSIJA

Listovi čuvarkeće se u tradicionalnoj medicini koriste u svežem ili osušenom obliku, kao i u obliku soka koji se dobija ceđenjem iz listova. U okviru ove disertacije izvršena je fitohemijska karakterizacija i procena biološke aktivnosti ekstrakata pripremljenih od osušenih listova čuvarkeće. Ispitivanje osušenog biljnog materijala, naročito kod biljaka s visokim sadržajem vode, pruža značajne prednosti. Naime, koncentracija fitojedinjenja u osušenom materijalu je veća, a određena jedinjenja pokazuju veću stabilnost zbog eliminacije vode koja bi u svežem materijalu mogla dovesti do degradacije i transformacije usled enzimske aktivnosti. Uz to, listovi čuvarkeće se mogu koristiti za pripremu ekstrakata ili konzervirati u kombinaciji s medom, što dodatno doprinosi očuvanju biološki aktivnih jedinjenja i korisnih svojstava.

Tradicionalni način pripreme preparata čuvarkeće i meda podrazumeva mešanje 300 g svežih listova čuvarkeće sa 500 g meda. Pravilnik o kvalitetu meda i drugih proizvoda pčela navodi da gotov proizvod meda sa dodacima mora da sadrži najmanje 60% meda [71]. U slučaju tradicionalnog načina pripreme preparata čuvarkeće i meda, sadržaj meda u gotovom proizvodu iznosi 62,5% tako da je uslov propisan Pravilnikom ispunjen.

Ekstrakti ovih preparata su napravljeni na dva načina: sa zakišljenom vodom (pH 2) i bez rastvarača, kako je i opisano u poglavlju 3.3. Radi poređenja, pripremljeni su i ekstrakti čistog meda sa zakišljenom vodom kao i ekstrakti svežih listova čuvarkeće sa zakišljenom vodom i bez rastvarača. Upotreba zakišljene vode kao rastvarača odabrana je s ciljem maksimalne ekstrakcije bioaktivnih jedinjenja iz preparata čuvarkeće i meda. Dodavanje usitnjenih svežih listova čuvarkeće dovelo je do promene konzistencije meda, čineći čitav preparat tečnim zbog visokog sadržaja vode iz listova. Zbog toga je odabran i postupak ekstrakcije bez rastvarača. Ovaj pristup pripreme ekstrakata omogućava ispitivanje promena koje se dešavaju tokom procesa maceracije, što je relevantno s obzirom na to da se preparat u takvom obliku koristi u tradicionalnoj medicini. Budući da se preporučuje upotreba ovog preparata u okviru mesec dana od pripreme, ekstrakti su pripremani tokom pet nedelja kako bi bila ispitana stabilnost preparata tokom vremena.

Prema našem saznanju, u raspoloživoj literaturi nema podataka o karakterizaciji mešavine čuvarkeće i meda. U okviru izrade ove doktorske disertacije, ovaj preparat je prvi put okarakterisan i ispitana je njegova biološka aktivnost. S obzirom na široku upotrebu čuvarkeće u tradicionalnoj medicini, važno je razumeti njene interakcije sa medom, kako bi se bolje razumela potencijalna sinergija u biološkoj aktivnosti kao i mogućnosti primene ovog preparata.

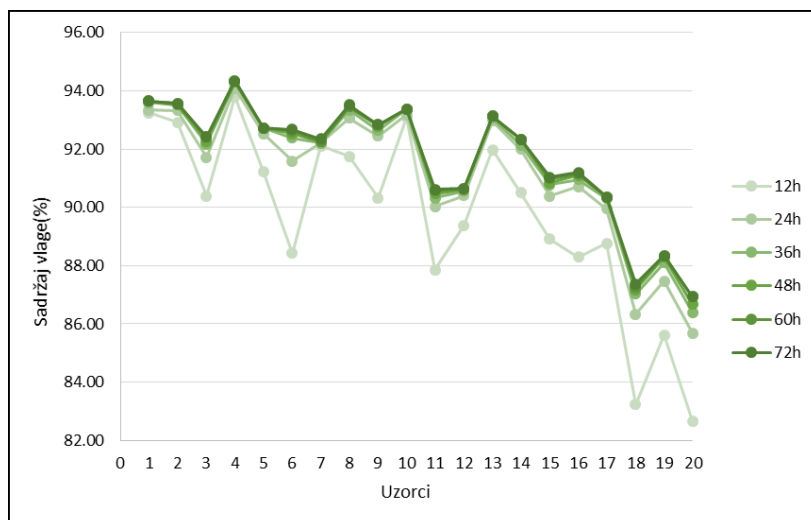
4.1. Fitohemijska karakterizacija

4.1.1. Sadržaj vlage u uzorcima listova čuvarkeće

Biljke iz porodice Crassulaceae razvile su sočne i mesnate listove kako bi se prilagodile uslovima sredine u kojoj žive. Mediteran, kao njihovo prirodno stanište sa kojeg potiču, i rast na kamenitim podlogama sa ograničenom dostupnošću vode uticali su na razvijanje karakterističnih sukulentnih listova koji služe kao rezervoari vode. Listovi čuvarkeće mogu se koristiti sveži ili osušeni ili se može iscediti sok iz njih. Sveži listovi i sok se moraju iskoristiti odmah ili u što kraćem vremenskom periodu, s obzirom na to da veliki sadržaj vode može brzo da dovede do propadanja i truljenja biljnog materijala. S druge strane, osušenim listovima produžen je rok trajanja.

Postoji veliki broj tradicionalnih i savremenih metoda sušenja biljnog materijala. Najčešća metoda koja se koristi za očuvanje biljnog materijala je sušenje u sušnici na umerenoj temperaturi od 40 – 60 °C [119]. Temperatura može značajno da utiče na očuvanje jedinjenja prisutnih u uzorcima. Povećanje temperature može dovesti do gubitka lako–isparljivih jedinjenja, ali može prouzrokovati i potencijalnu degradaciju ostalih prisutnih jedinjenja, što se odražava na smanjenje bioaktivnog potencijala biljnog materijala [120, 121]. U prethodnim istraživanjima, listovi čuvarkeće za analizu osušeni su do konstante mase na temperaturi od 40 °C bez navođenja podataka o sadržaju vlage [64, 122]. U okviru ovog ispitivanja, listovi čuvarkeće osušeni su do konstantne mase u dehidratoru za hranu na temperaturi od 40 °C u trajanju od 72 h. Masa osušenih listova praćena je na svakih 12 h

kako bi se optimizovao proces sušenja i kako bi se dobile informacije o potrebnom vremenu sušenja ovog biljnog materijala.



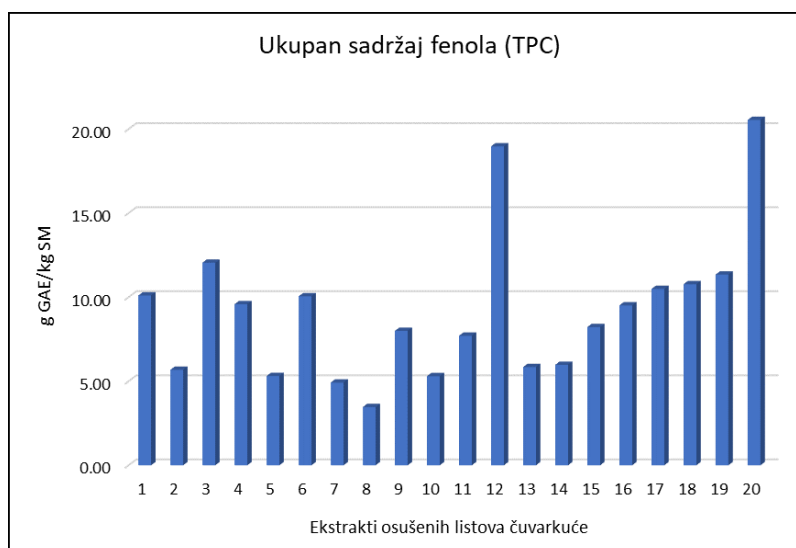
Slika 13. Uticaj dužine sušenja listova čuvarkuće na sadržaj vlage

Sa grafika (**Slika 13**) se uočava da se najveći gubitak vlage iz listova čuvarkuće tokom sušenja na 40 °C događa u prvih 24 sata. Iako su listovi čuvarkuće bogati vodom, njihova masa se ustalila već nakon 48 sati sušenja. Nakon 72 sata sušenja, sadržaj vlage u listovima iznosio je između 86,9 – 94,3%. Najniži sadržaj vlage zabeležen je u uzorku 20 (86,9%), kao i u uzorcima 18 i 19 (87,4% i 88,4%). Ostali uzorci imaju sadržaj vlage veći od 90%, pri čemu uzorak 4 ima najveći sadržaj vlage (94,3%). Jedini dostupni podatak u literaturi navodi da listovi čuvarkuće vrste *Sempervivum marmoreum*, osušeni do konstantne mase na temperaturi od 105 °C, sadrže 88,1% vlage [67]. Rezultati dobijeni za sadržaj vlage u listovima osušanim do konstantne mase na 40 °C u saglasnosti su sa prethodno objavljenim podatkom. S obzirom na visok sadržaj vlage, listove čuvarkuće potrebno je čuvati na način koji sprečava propadanje biljnog materijala, gubitak bioaktivnih svojstava i razvoj mikroorganizama. Preporučuje se sušenje listova na niskim temperaturama, do 40 °C, ili liofilizacija, čime se smanjuje sadržaj vlage, sprečava degradacija i održava aktivnost prisutnih jedinjenja. Nakon sušenja, listove je najbolje skladištiti u hermetički zatvorenim posudama, na suvom, tamnom i hladnom mestu.

4.1.2. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnog sadržaja fenola

Osušeni listovi čuvarkuće

Fenoli i njihovi derivati su najzastupljeniji sekundarni metaboliti u biljkama [123]. Određivanje ukupnog sadržaja fenola je od velikog značaja jer se njihovo prisustvo u biljkama povezuje sa ispoljavanjem biološke aktivnosti poput antioksidativne, antimikrobne, antidijabetske, antiinflamatorne, kardioprotektivne, neuroprotektivne, itd. [123–125]. Dobijeni rezultati za ukupan sadržaj fenola prikazani su grafički na **Slici 14** i u **Tabeli P1**.

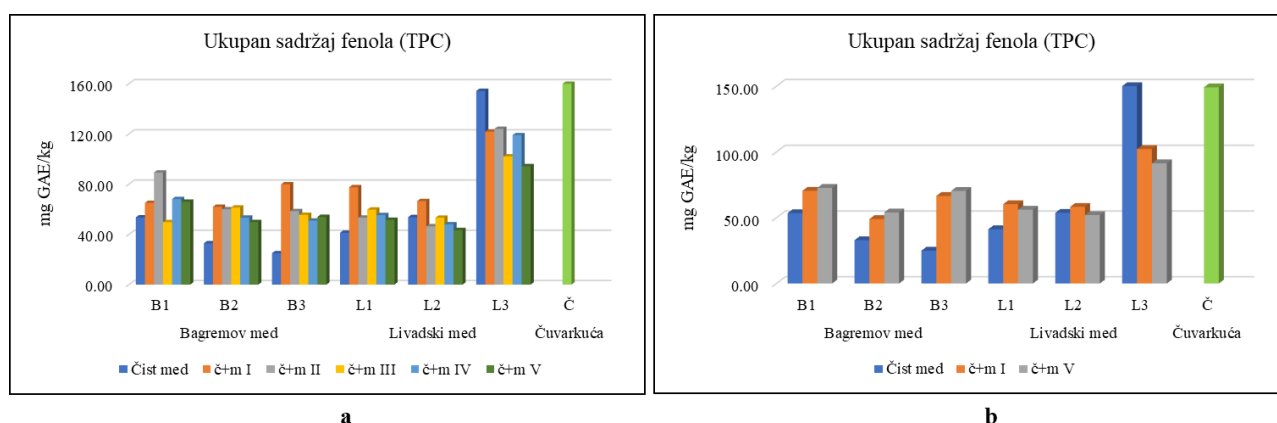


Slika 14. Ukupan sadržaj fenolnih jedinjenja u ekstraktima čuvaruče (g GAE/kg SM)

Ukupan sadržaj fenola u 70% etanolnim ekstraktima osušenih listova čuvaruče varira u rasponu 3,46 – 20,54 g GAE/kg SM. Sa grafika se uočava da je najviša TPC vrednost određena u ekstraktima 12 i 20, dok najnižu TPC vrednost ima ekstrakt 8 (**Slika 14**). Prosečna vrednost TPC iznosi 9,19 g GAE/kg SM i niža je u odnosu na vrednosti koje su dobijene u drugim studijama. U prethodnom istraživanju Rovčanina (Rovčanin) i saradnika, TPC u 70% etanolnom ekstraktu listova čuvaruče koji su prethodno osušeni na 25–28 °C iznosio je 16,0 mg GAE/g ekstrakta [50]. Knez Marevci i saradnici su ispitali TPC u ekstraktima liofilizovanih listova čuvaruče iz Slovenije, kao i u ekstraktima listova čuvaruče iz Kine osušeni na vazduhu. Koristeći različite tehnike ekstrakcije i rastvarače, zaključili su da je najveći TPC od 50,66 mg GAE/g materijala dobijen u ekstraktima liofilizovanih listova čuvaruče koji su pripremljeni ultrazvučnom ekstrakcijom sa 50% etanolom. Nasuprot tome, TPC osušenih listova čuvaruče iz Kine bio je niži i iznosio je 18,24 mg GAE/g materijala. Razlike u vrednostima TPC mogu se pripisati različitim klimatskim uslovima uzgajanja biljaka, različitim metodama sušenja biljnog materijala, kao i postupcima ekstrakcije i izboru rastvarača koji je korišćen za ekstrakciju [65]. Takođe, primećeno je da dodavanje vode organskim rastvaračima povećava polarnost sistema, što pozitivno utiče na efikasnost ekstrakcije [64].

Preparati čuvaruče i meda, sveži listovi čuvaruče i čist med

Prilikom pripreme preparata s medom, dodavanjem svežih listova čuvaruče u med unosi se velika količina vode koja je prisutna u listovima (oko 90%). Da bi bio okarakterisan preparat čuvaruče i meda (č+m) i ispitaio uticaj mešanja ove dve komponente, određen je TPC. Rezultati su prikazani grafički na **Slici 15** kao i u **Tabeli P2**.



Slika 15. Ukupan sadržaj fenola određen u ekstraktima preparata pripremljenih sa zakišljenom vodom (I–V nedelja) (a) i u ekstraktima preparata pripremljenim bez rastvarača (I i V nedelja) (b)

TPC za tri uzorka bagremovog meda B1, B2 i B3 iznosio je 53,44 mg GAE/kg, 32,89 mg GAE/kg i 24,97 mg GAE/kg, redom, sa prosečnom vrednošću od 37,10 mg GAE/kg. Bertancelj i saradnici su dobili slične vrednosti TPC za bagremov med u rasponu od 25,7 – 67,9 mg GAE/kg [126]. Slično tome, Krpan i saradnici su kvantifikovali TPC u bagremovom medu iz Hrvatske u vrednosti 31,72–80,11 mg GAE/kg [127]. Vrednosti TPC za livadski med iznosile su 41,24 mg GAE/kg (L1), 53,69 mg GAE/kg (L2) i 154,17 mg GAE/kg (L3), sa prosečnom vrednošću od 83,03 mg GAE/kg. Dobijene vrednosti za prva dva uzorka livadskog meda su niže od onih koje se mogu naći u literaturi, dok je vrednost TPC za treći uzorak livadskog meda u skladu sa prethodno objavljenim rezultatima [126, 128, 129].

Ukupan sadržaj fenola u ekstraktu svežih listova čuvaruće koji je pripremljen sa zakišeljnom vodom iznosi 159,87 mg GAE/kg, dok je u ekstraktu koji je pripremljen bez dodatka rastvarača 149,12 mg GAE/kg. S obzirom da ne postoji velika razlika u vrednostima TPC u zavisnosti od upotrebljenog rastvarača za ekstrakciju, korišćenje zakišeljene vode nije imalo uticaja na povećanje količine ekstrahovanih jedinjenja, a samim tim ni na povećanje TPC. U poređenju sa TPC vrednostima dobijenim za ekstrakte osušenih listova čuvaruće, pripremljenih uz upotrebu 70% etanola, vrednosti TPC svežih listova čuvaruće su znatno niže. Ove razlike ukazuju na to da TPC zavisi od stanja biljnog materijala (suv ili svež) i izbora ekstrakcionog sredstva. Kod svežih listova čuvaruće, zakišeljena voda je korišćena kako bi se ekstrakti pripremili na isti način kao i preparati čuvaruće i meda, što je omogućilo direktno praćenje uticaja ovih proizvoda na vrednosti TPC pod istim eksperimentalnim uslovima. Prema podacima iz literature, TPC ekstrakta svežih listova čuvaruće koji je pripremljen sa metanolom iznosi 0,59 mg GAE/g svežeg biljnog materijala [67]. Vrednosti TPC dobijene za ispitane uzorke svežih listova su niže u odnosu na literaturni podatak.

Dodavanje svežih listova čuvaruće u med dovelo je do povećanja TPC u poređenju sa čistim medom, uprkos visokom sadržaju vode u preparatu. Vrednosti za TPC ostale su relativno konstantne tokom pet nedelja ispitivanja preparata, što ukazuje na stabilnost preparata u periodu predviđenom za njegovu upotrebu. Ekstrakti preparata sa bagremovim medom, bez obzira na primenjeni metod ekstrakcije, imali su veći TPC u poređenju sa čistim bagremovim medom. Nasuprot tome, ekstrakti preparata sa livadskim medom L3 imaju niži TPC u poređenju sa čistim medom L3, dok su ekstrakti preparata sa preostala dva livadska meda imali veće vrednosti TPC–a u odnosu na svoje odgovarajuće čiste medove (**Slika 15a**, **Tabela P2**). Dobijeni rezultati ukazuju da izbor ekstrakcionog sredstva nema presudnu ulogu u povećanju koncentracije ekstrahovanih fenolnih jedinjenja u ovim specifičnim preparatima. Ekstrakti koji su pripremljeni bez rastvarača reflektuju tradicionalan način pripreme i primene preparata, omogućavajući praćenje promena u preparatu tokom vremena i procenu stabilnosti preparata. Ovaj pristup olakšava posmatranje potencijalnih degradacija ili promene u bioaktivnim komponentama, pružajući uvid u dugoročnu stabilnost i efikasnost preparata u uslovima koji imitiraju tradicionalnu upotrebu.

4.1.3. Identifikacija fenolnih jedinjenja

Fenolna jedinjenja su identifikovana u svih dvadeset etanolnih ekstrakta osušenih listova čuvaruće primenom UPLC–LTQ OrbiTrap masene spektrometrije. Identifikovano je ukupno 38 fenolnih jedinjenja uključujući osam fenolnih aglikona, 25 glikozida fenola, jedna slobodna fenolna kiselina i tri derivata fenolnih kiselina, kao i jedan derivat dihidrohalkona. Identifikovana fenolna jedinjenja su navedena u **Tabeli 3** sa retencionim vremenom (t_R), molekulskom formulom, tačnom i izračunatom masom, greškom (Δ ppm) kao i glavnim jonima koji nastaju fragmentacijom jedinjenja.

Identifikacija fenolnih aglikona

Identifikovane su tri grupe flavonoida uključujući tri flavan-3-ola, četiri flavonola i jedan flavanon. U ekstraktima osušenih listova čuvaruće (epi)galokatehin i (epi)galokatehin–galat (**2** i **8**) koji pripadaju grupi flavan-3-ola su identifikovani i prilikom ranijih istraživanja [42]. S druge strane, prvi put je identifikovan prodelfinidin–galat B tipa (**10**) $[M-H]^-$ na m/z 761 i na osnovu MS/MS fragmenata na m/z 609 i 305 što je uslovno potvrđeno podacima iz literature [130, 131]. Na osnovu

masenih spektara identifikovana su četiri flavonola – miricetin, kempferol, kvercetin i izoramnetin (**30**, **35**, **36** i **38**), kao i jedan flavanon – naringenin (**37**). U ranije objavljenim rezultatima identifikacije fenolnih jedinjenja kod različitih vrsta roda *Sempervivum* spp. nije potvrđeno prisustvo slobodnih flavonoidnih aglikona osim izoramnetina (**38**) sa molekulskim jonom na m/z 315 [42]. Identifikovani flavonoli razlikuju se u broju i položaju hidroksilnih grupa na C3 i C5 atomima ugljenika. Molekuli miricetina ($[M-H]^-$ na m/z 317), kempferola ($[M-H]^-$ na m/z 285) i kvercetina ($[M-H]^-$ na m/z 301) fragmentacijom daju MS/MS fragment na m/z 151. Naringenin (**37**) je identifikovan u ekstraktima na osnovu molekulskog jona $[M-H]^-$ na m/z 271 i karakterističnih MS/MS fragmenata na m/z 151, 107 i 65.

Identifikacija fenolnih glikozida

Na osnovu masenih spektara identifikovano je prisustvo flavonolnih glikozida kempferola (**15**), kvercetina (**6**) i miricetina (**3**), kao i flavanon glikozid eriodiktiola (**1**). Poređenjem literaturnih podataka sa podacima predstavljenim u **Tabeli 3** uočava se da je dvanaest glikozida koji su identifikovani u svrhu ovog ispitivanja prethodno već identifikovano u ekstraktima čuvarkuće među kojima su: kvercetin 3-*O*-(2'-ramnozil)-heksozid-7-*O*-ramnozid (**6**), kempferol 3-*O*-(2'-ramnozil)-heksozid-7-*O*-ramnozid (**12**), kvercetin 3-*O*-heksozid-7-*O*-ramnozid (**13**), kvercetin 3-*O*-heksozid **1** (**14**), miricetin 3-*O*-heksozid (**15**), kempferol 3-*O*-(2'-ramnozil)-pentozid-7-*O*-ramnozid (**16**), kempferol 3-*O*-heksozid-7-*O*-ramnozid (**17**), kvercetin 3-*O*-heksozid **2** (**19**), kempferol 3-*O*-(6'-ramnozil)-heksozid-7-*O*-ramnozid (**20**), kempferol 3-*O*-(2'-ramnozil)-heksozid (**22**), kempferol 3-*O*-(2'-pentozil)-ramnozid-7-*O*-ramnozid (**24**) i kempferol 3-*O*-heksozid (**27**) [5, 32, 42, 60, 62].

Kempferol 3-*O*-ramnozil-heksozid-7-*O*-ramnozid (**12**) sa $[M-H]^-$ jonom na m/z 739 je potvrđen na osnovu MS/MS fragmentnih jona na m/z 593 (-146 Da, gubitak ramnozil grupe) i 285 (-308 Da, gubitak ramnozil-heksozil grupe) [5, 32, 60]. U literaturi se navodi da kod 3,7-di-*O*-glikozida prvo dolazi do fragmentacije šećerne komponente koja je vezana preko 7-OH grupe za molekul aglikona, a zatim se dešava i fragmentacija jedinice koja je vezana za 3-OH grupu [132]. Istim redosledom dolazi do fragmentacije i u identifikovanom jedinjenju. U ranije ispitanim ekstraktima čuvarkuće identifikovano je samo jedno jedinjenje sa molekulskim jonom na m/z 739, međutim, naša studija je potvrdila prisustvo dva slična jedinjenja koja se razlikuju prema položaju -OH grupe preko koje ramnozil ostatak ostvaruje vezu sa molekulom heksoze za koju je vezan: kempferol 3-*O*-(2'-ramnozil)-heksozid-7-*O*-ramnozid (**12**) ili kempferol 3-*O*-(6'-ramnozil)-heksozid-7-*O*-ramnozid (**20**).

Identifikacija kvercetin 3-*O*-heksozida je zasnovana na literaturnim podacima [60, 32]. U **Tabeli 3** se može videti da su identifikovana dva izomerna jedinjenja sa $[M-H]^-$ na m/z 463 (**14** i **19**). Fragmentacijom kvercetin 3-*O*-heksozida formira se MS^2 jon na m/z 301, što ukazuje da je došlo do gubitka heksozil grupe (-162 Da) i potvrđeno je prisustvo kvercetina kao aglikona.

Tabela 3. Karakterizacija fenolnih jedinjenja identifikovanih u listovima čuvaruće primenom UPLC–LTQ OrbiTrap MS

Br.	Jedinjenje	t_R , min	Molekulska formula, [M–H] ⁻	Tačna masa, [M–H] ⁻	Izračunata masa, [M–H] ⁻	Greška, Δ ppm	MS ² Fragmenti, (% osnovnog pika)	MS ³ Fragmenti, (% osnovnog pika)	MS ⁴ Fragmenti, (% osnovnog pika)	Ekstrakti u kojima su identifikovana jedinjenja
1	Galoil heksoza	1,08	C ₁₃ H ₁₅ O ₁₀ ⁻	331,06707	331,06703	0,13	125(4), 169 (100), 170(4)	125 (100)	53(12), 68(24), 81 (100), 97(72), 107(36)	1–7, 9–18, 20
2	(Epi)galokatehin	2,18	C ₁₅ H ₁₃ O ₇ ⁻	305,06668	305,06646	0,69	125(30), 137(23), 165(30), 179 (100), 219(61), 221(72), 261(45)	107(1), 109(3), 135(24), 137(18), 151(44), 161(1), 164 (100)	92(2), 108(3), 120 (100), 123(3), 131(1), 136(5), 164(3)	1–7, 9–20
3	Kofeinska kiselina	3,09	C ₉ H ₇ O ₄ ⁻	179,03498	179,03556	-3,23	89(2), 133(3), 134(1), 135 (100), 136(6), 143(2), 161(2)	79(8), 91(80), 93(9), 106(22), 107 (100), 121(6), 135(19)		1–18, 20
4	Kvercetin 3–(<i>p</i> – kumaroil)–heksozid	3,22	C ₃₀ H ₂₅ O ₁₄ ⁻	609,12498	609,12419	1,30	195(10), 255(27), 271(26), 300 (100), 301(23), 445(11), 581(9)	166(15), 167(11), 227(7), 254(13), 255 (100), 271(81), 272(94)		4–6, 9, 11, 13, 18, 19
5	Miricetin 3– <i>O</i> –(2'– ramnozil)–heksozid– 7– <i>O</i> –ramnozid	3,27	C ₃₃ H ₃₉ O ₂₁ ⁻	771,19893	771,19962	-0,89	316(2), 317(2), 445(3), 462(2), 625 (100), 626(51), 627(4)	271(28), 287(13), 316 (100), 317(16), 359(9), 505(17), 607(17)	166(9), 244(8), 244(11), 270(81), 271(89), 287 (100), 288(16)	1–20
6	Kvercetin 3– <i>O</i> –(2'– ramnozil)–heksozid– 7– <i>O</i> –ramnozid	3,52	C ₃₃ H ₃₉ O ₂₀ ⁻	755,20402	755,20447	-0,60	609 (100), 610(10)	195(11), 255(25), 271(26), 300 (100), 301(26), 445(18), 581(14)	166(20), 228(7), 254(5), 255 (100), 256(5), 271(80), 272(63)	1–20
7	Feruloil heksoza	3,71	C ₁₆ H ₁₉ O ₉ ⁻	355,10346	355,10352	-0,19	173(20), 191(11), 193 (100), 194(9), 316(4), 317(3), 318(4)	134(73), 149 (100), 178(74)	134 (100)	1–20
8	(Epi)galokatehin– galat	3,74	C ₂₂ H ₁₇ O ₁₁ ⁻	457,07764	457,07792	-0,62	169 (100), 193(9), 269(5), 275(3), 287(7), 305(23), 331(41)	125 (100)		1–7, 9–20
9	Eriodiktioil 7– <i>O</i> – heksozid	3,80	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₁ ⁻	449,10894	449,10924	-0,68	259(43), 260(6), 269(40), 270(6), 287 (100), 288(12), 431(4)	125(3), 180(1), 199(1), 201(6), 243(17), 259 (100), 269(5)	125(54), 151(16), 165(12), 172(16), 173(29), 215 (100), 241(21)	1–20
10	Prodelfinidin–galat B tipa	3,81	C ₃₇ H ₂₉ O ₁₈ ⁻	761,13594	761,13657	-0,84	423(98), 424(16), 441(43), 465(21),	303(8), 305 (100), 423(76), 441(24),	125(25), 137(27), 165(43), 179 (100),	1–7, 9–20

							591(54), 609 (100), 610(23)	483(41), 565(4), 591(35)	219(70), 221(65), 261(25)	
11	Miricetin 3- <i>O</i> - ramnozil-6- <i>O</i> - heksozid	3,86	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₇ ⁻	625,14102	625,14177	-1,19	267(28), 311(36), 317(14), 462 (100), 463(74), 479(79), 480(15)	287(4), 315 (100)	215(2), 231(2), 243(15), 259(17), 271(37), 287 (100), 297(3)	1-20
12	Kempferol 3- <i>O</i> -(2'- ramnozil)-heksozid- 7- <i>O</i> -ramnozil	4,04	C ₃₃ H ₃₉ O ₁₉ ⁻	739,20910	739,20951	-0,55	593 (100), 594(38), 595(9)	255(28), 257(5), 284 (100), 285(33), 327(8), 429(43), 447(10)	227(8), 255 (100), 256(11)	1-20
13	Kvercetin 3- <i>O</i> - heksozid-7- <i>O</i> - ramnozil	4,20	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₆ ⁻	609,14611	609,14679	-1,11	301(3), 446(2), 447(7), 448(1), 462(6), 463 (100), 464(7)	195(2), 255(12), 271(11), 272(8), 300 (100), 301(37), 313(3)	166(2), 200(3), 227(3), 254(15), 255 (100), 271(88), 272(80)	1-20
14	Kvercetin 3- <i>O</i> - heksozid 1	4,20	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₂ ⁻	463,08820	463,08872	-1,13	255(13), 271(10), 272(8), 300 (100), 301(53), 302(6), 313(3)	166(3), 200(2), 227(1), 243(3), 255 (100), 271(76), 272(77)	157(1), 183(2), 211(2), 213(2), 227 (100), 255(4)	1-20
15	Miricetin 3- <i>O</i> - heksozid	4,24	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₃ ⁻	479,08311	479,08374	-1,31	179(2), 271(1), 315(3), 316 (100), 317(45), 318(5), 461(2)	151(6), 179(16), 242(6), 270(31), 271 (100), 287(36), 288(9)	199(9), 203(3), 215(12), 227(29), 229(5), 243 (100), 271(12)	1-20
16	Kempferol 3- <i>O</i> -(2'- ramnozil)-pento- zid-7- <i>O</i> -ramnozil	4,44	C ₃₂ H ₃₇ O ₁₈ ⁻	709,19854	709,19902	-0,68	563 (100), 564(15)	227(2), 255(16), 257(2), 284 (100), 285(15), 399(17), 417(3)	227(8), 239(2), 255 (100), 256(10)	1-20
17	Kempferol 3- <i>O</i> - heksozid-7- <i>O</i> - ramnozil	4,50	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₅ ⁻	593,15119	593,15147	-0,46	285(23), 286(4), 431(12), 431(36), 432(8), 447 (100), 448(18)	151(4), 227(3), 255(19), 284 (100), 285(23), 299(3), 327(17)	227(15), 255 (100), 256(19)	1-20
18	Kempferol 3- <i>O</i> - pento- zid-7- <i>O</i> - ramnozil	4,63	C ₂₆ H ₂₇ O ₁₄ ⁻	563,14063	563,14152	-1,58	284(3), 285(12), 417 (100), 418(16), 430(53), 431(31), 432(3)	151(2), 227(1), 255(10), 284 (100), 285(21), 327(12), 357(1)	227(13), 239(1), 255 (100), 256(19)	1-20
19	Kvercetin 3- <i>O</i> - heksozid 2	4,74	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₂ ⁻	463,08820	463,08860	-0,86	151(1), 179(1), 299(1), 300(35), 301 (100), 302(10), 343(1)	151(83), 179 (100), 229(6), 256(7), 257(13), 272(9), 273(16)	107(1), 151 (100)	1-20
20	Kempferol 3- <i>O</i> -(6'- ramnozil)-heksozid- 7- <i>O</i> -ramnozil	4,76	C ₃₃ H ₃₉ O ₁₉ ⁻	739,20910	739,21014	-1,41	285(40), 286(4), 431(36), 432(7), 593 (100), 594(22), 619(5)	229(2), 257(3), 267(1), 285 (100), 431(1)	151(30), 213(24), 229(53), 239(20), 241(37), 257 (100), 267(35)	1-20
21	Kempferol 3- <i>O</i> -(6'- heksozil)-heksozid	4,77	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₆ ⁻	609,14611	609,14681	-1,15	229(2), 257(2), 284(2), 285 (100), 286(9)	197(20), 213(25), 229(48), 239(16),	163(68), 185(20), 187(19), 211(13),	1-7, 9-20

								241(30), 257 (100), 267(40)	213(25), 229 (100), 239(45)	
22	Kempferol 3-O-(2'-ramnozil)-heksozid	4,79	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₅ ⁻	593,15119	593,15194	-1,25	255(26), 284 (100), 285(51), 429(40), 430(11), 431(17), 447(46)	227(9), 255 (100), 256(14), 257(1), 285(1)	167(5), 183(6), 187(20), 211 (100), 213(29), 227(64), 255(34)	1-20
23	Floretin 3',5'-C-di- heksozid	4,85	C ₂₇ H ₃₃ O ₁₅ ⁻	597,18249	597,18313	-1,07	357(96), 358(18), 387(72), 417(25), 459(19), 477 (100), 478(20)	315(3), 357 (100), 369(2), 387(39), 417(1), 459(8)	123(4), 167(9), 189(6), 207(6), 209 (100), 229(7), 251(15)	1-20
24	Kempferol 3-O-(2'- pentozil)-ramnozid- 7-O-ramnozid	4,85	C ₃₂ H ₃₇ O ₁₈ ⁻	709,19854	709,19943	-1,25	563 (100), 564(23)	227(4), 255(20), 283(4), 284 (100), 285(32), 413(25), 431(9)	227(7), 255 (100), 256(9)	1-20
25	Kempferol 3-O- ramnozid-7-O- pentozid	4,92	C ₂₆ H ₂₇ O ₁₄ ⁻	563,14063	563,14148	-1,52	284(12), 285(13), 413(4), 417(12), 430(5), 431 (100), 432(19)	285(100)	169(57), 185(57), 213(77), 229(42), 243(83), 257 (100), 285(92)	1-20
26	Kempferol 3-O-(6'- galoil)-heksozid	4,97	C ₂₈ H ₂₃ O ₁₅ ⁻	599,10424	599,10563	-2,31	285(56), 313 (100), 357(49), 387(34), 447(72), 448(18), 477(72)	125(9), 151(4), 169 (100), 211(5), 223(6), 241(15), 253(5)	107(2), 125 (100)	1-7, 9-20
27	Kempferol 3-O- heksozid	5,10	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁ ⁻	447,09329	447,09340	-0,26	227(3), 255(14), 256(4), 284 (100), 285(89), 286(8), 327(10)	227(13), 255 (100), 256(17)	167(3), 183(4), 210(7), 211(54), 213(3), 227 (100), 255(12)	1-20
28	Kempferol 3-O-(2'- ramnozil)-pentozid	5,22	C ₂₆ H ₂₇ O ₁₄ ⁻	563,14063	563,14127	-1,13	255(22), 256(5), 284 (100), 285(39), 286(5), 399(22), 400(6)	227(9), 255 (100), 256(10)	167(16), 183(17), 187(16), 211(96), 213(43), 227 (100), 255(48)	1-20
29	Kempferol 3-O- pentozid	5,32	C ₂₀ H ₁₇ O ₁₀ ⁻	417,08272	417,08296	-0,57	173(7), 179(42), 225(8), 255(10), 284 (100), 285(58), 327(8)	227(13), 255 (100), 256(19)	167(4), 183(9), 187(1), 211(61), 213(2), 227(100), 255(16)	1-20
30	Miricetin	5,34	C ₁₅ H ₉ O ₈ ⁻	317,03029	317,03055	-0,81	137(8), 151(40), 179 (100), 180(8), 192(12), 193(9), 287(6)	107(1), 151 (100), 169(1)	63(7), 65(2), 83(18), 107 (100)	1-20
31	Kempferol 3-O-(6'- acetyl)-heksozid	5,38	C ₂₃ H ₂₁ O ₁₂ ⁻	489,10385	489,10409	-0,48	255(4), 283(4), 284(13), 285 (100), 286(8), 445(3), 470(3)	163(19), 213(33), 229(67), 241(31), 256(23), 257 (100), 267(36)	163(44), 187(15), 189(21), 213(37), 229 (100), 239(38), 257(18)	1-20

32	Kempferol 3- <i>O</i> -ramnozid	5,59	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₀ ⁻	431,09837	431,09849	-0,27	205(8), 249(17), 251(6), 284(46), 285 (100), 286(14), 385(7)	163(22), 213(30), 229(66), 241(23), 256(60), 257 (100), 267(58)	163 (100), 185(65), 187(21), 211(31), 213(40), 229(74), 239(33)	1-20
33	<i>p</i> -Kumarinska kiselina	5,64	C ₉ H ₇ O ₃ ⁻	163,04007	163,04037	-1,88	91(61), 99(14), 115(10), 119 (100), 120(13), 128(17), 143(9)	91(28), 101 (100)		1-7, 9-17, 19, 20
34	Kvercetin 7- <i>O</i> -ramnozid	5,92	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁ ⁻	447,09329	447,09351	-0,51	299(2), 301 (100), 302(6)	201(33), 211(51), 229 (100), 239(52), 255(67), 283(33), 301(31)	136(17), 157(28), 159(22), 185(36), 187(13), 201 (100), 211(23)	1-20
35	Kempferol	6,20	C ₁₅ H ₉ O ₆ ⁻	285,04046	285,04061	-0,50	107(9), 151 (100), 169(1), 199(2), 213(10), 241(29), 257(34)	63(4), 65(4), 83(11), 107 (100)		2, 3, 6-11, 16, 17, 20
36	Kvercetin	6,20	C ₁₅ H ₉ O ₇ ⁻	301,03538	301,03543	-0,16	107(6), 151(82), 179 (100), 180(8), 193(6), 257(13), 273(16)	107(2), 151 (100), 169(1)	63(4), 65(3), 83(19), 107 (100)	1-20
37	Naringenin	6,82	C ₁₅ H ₁₁ O ₅ ⁻	271,06120	271,06155	-1,29	107(9), 119(6), 151 (100), 152(8), 177(27), 225(9), 227(5)	65(6), 83(6), 107 (100), 109(3)	51(1), 63(12), 65 (100)	1-20
38	Izoramnetin	7,12	C ₁₆ H ₁₁ O ₇ ⁻	315,05103	315,05115	-0,41	173(4), 211(2), 229(2), 267(2), 300 (100), 301(15), 302(3)	151 (100), 227(42), 244(20), 255(49), 271(92), 272(77), 283(37)	63(2), 65(5), 83(10), 107 (100), 109(3)	1-7, 9-18, 20

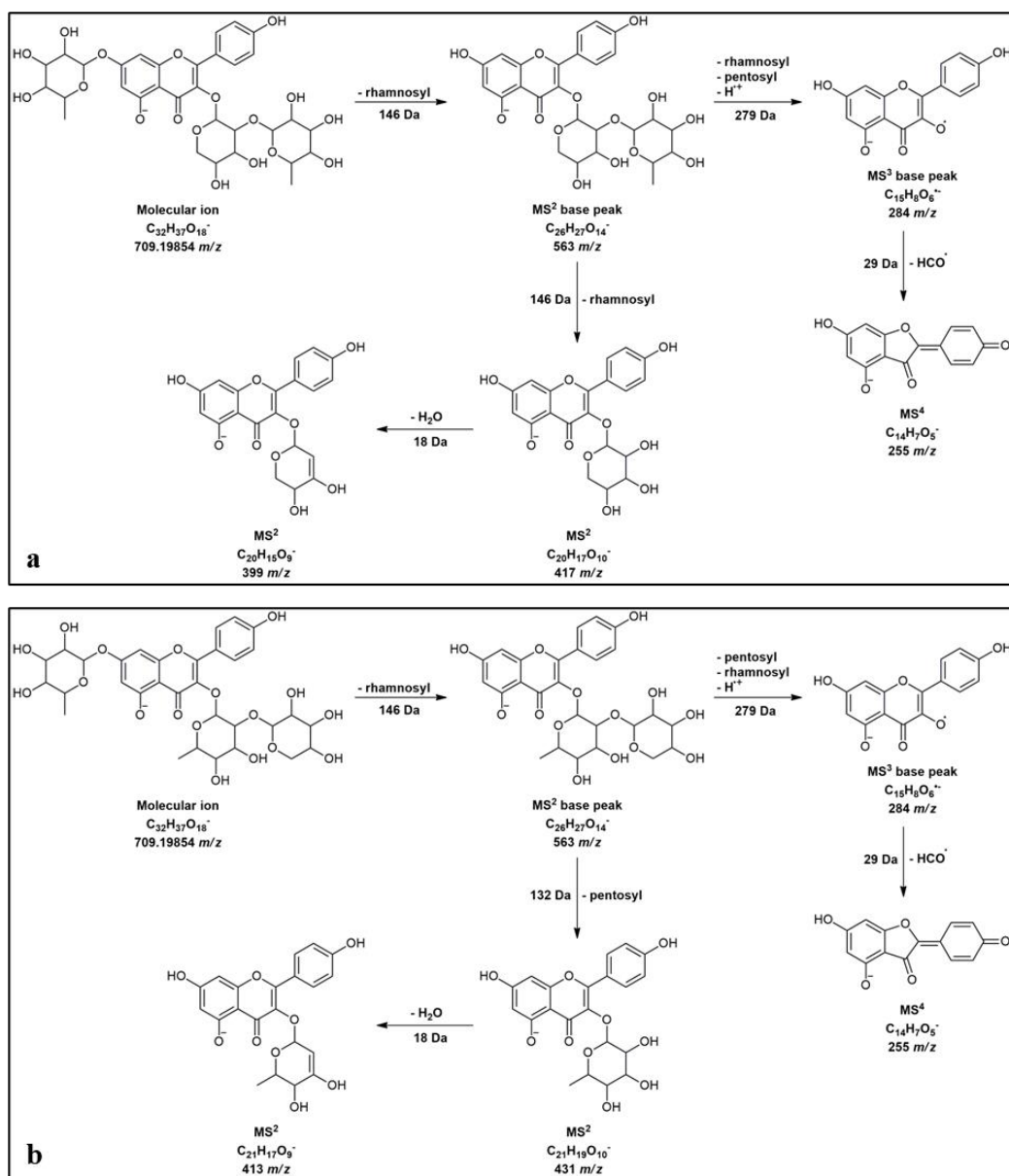
Kempferol 3-*O*-heksozid (**27**) sa $[M-H]^-$ na m/z 447 i MS/MS fragmentnim jonima na m/z 285 (-162 Da, gubitak heksozil ostatka), 255 i 227 je identifikovan u ispitanim ekstraktima listova čuvaruće kao i u prethodno publikovanim istraživanjima [5, 32, 60, 62]. Pored ovog glikozida kempferola (**27**) prvi put je identifikovan kvercetin 7-*O*-ramnozid (**34**) sa istim molekulskim jonom na m/z 447 i fragmentnim jonima na m/z 301 (-146 Da, gubitak ramnozil ostatka), 229 i 201.

Dva derivata kempferola sa $[M-H]^-$ na m/z 593 su identifikovana u ekstraktima listova čuvaruće kao kempferol 3-*O*-heksozid-7-*O*-ramnozid (**17**) i kempferol 3-*O*-(2'-ramnozil)-heksozid (**22**). Jedinjenje **17** fragmentacijom generiše MS^2 jon na m/z 447 (-146 Da, gubitak ramnozil ostatka) i MS^3 jon na m/z 284 (-162 Da, gubitak heksozil ostatka) [5, 32]. Jedinjenje **22** nakon fragmentacije ramnozil-heksozil ostatka (-308 Da) formira MS^2 jon na m/z 284 [42, 60, 62]. Oba ova jedinjenja su prethodno identifikovana u ekstraktima čuvaruće ali ne u okviru istih publikacija.

Triglikozidi kempferol 3-*O*-(2'-ramnozil)-pentozid-7-*O*-ramnozid (**16**) i kempferol 3-*O*-(2'-pentozil)-ramnozid-7-*O*-ramnozid (**24**) imaju isti molekulski jon na m/z 709, a fragmentacijom daju karakteristične fragmente: MS^2 na m/z 563 (-146 Da, gubitak ramnozil ostatka) i MS^3 na m/z 284 (-279 Da, gubitak pentozil-ramnozil ostatka) što je u skladu sa već publikovanim podacima [32]. Kako je ranije pomenuto, prvo dolazi do odvajanja ramnozil grupe koja je za molekul kempferola vezana preko 7-OH grupe [132]. Jedinjenja nastala nakon prve fragmentacije koja predstavljaju MS^2 bazni pik, mogu da imaju različiti put dalje MS^2 fragmentacije preostalih vezanih šećernih komponenti kao što je prikazano na **Slici 16**. U zavisnosti od toga da li se prvo odvoja ramnozil ili pentozil ostatak sa MS^2 baznog pika, formiraće se dva nova ali različita MS^2 fragmenta na m/z 417 i 431 za jedinjenja **16** i **24**, redom. Jedinjenja sa sličnim masenim spektrima su ranije identifikovana [5, 32].

Jedinjenja **4**, **13** i **21** imaju tačnu masu molekulskog jona $[M-H]^-$ na m/z 609. Jedinjenja **4** i **13** fragmentacijom daju jon na m/z 300 karakterističan za kvercetin, dok se fragmentacijom jedinjenja **21** dobija MS/MS fragmentni jon na m/z 285 karakterističan za kempferol. Jedinjenje **4** identifikovano je kao kvercetin 3-(*p*-kumaroil)-heksozid jer karakteristični jon na m/z 300 nastaje gubitkom *p*-kumaroil-heksozil grupe (-309 Da). Fragmentacijom kvercetin 3-*O*-heksozid-7-*O*-ramnozida (**13**) formiraju se MS^2 karakteristični joni na m/z 463 (-146 Da) i 300 (-163 Da) što ukazuje na gubitak deoksiheksozil i heksozil ostatka, redom [5, 32]. Derivat kempferola (**21**) formira MS^2 fragment na m/z 285 nakon gubitka heksozil-heksozil jedinice (-324 Da) na osnovu čega se zaključuje da je ovo jedinjenje kempferol 3-*O*-(6'-heksozil)-heksozid. Jedinjenja **4** i **21** prvi put su identifikovana u ekstraktima čuvaruće u okviru ovog ispitivanja.

U ekstraktima čuvaruće prvi put su identifikovana tri derivata kempferola (**18**, **25** i **28**) jednake mase molekulskog jona $[M-H]^-$ na m/z 563. Jedinjenja **18** i **25** se razlikuju po tome koja šećerna jedinica je vezana za dve hidroksilne grupe aglikona kempferola na položajima 3 i 7, u ovom slučaju pentoza ili ramnoza. Fragmentacijom nastaje MS^2 jon na m/z 447 u slučaju jedinjenja **18** što ukazuje na gubitak ramnozil jedinice (-146 Da), dok kod jedinjenja **25** fragmentacijom pentozil ostatka (-132 Da) nastaje MS^2 jon na m/z 431. Formiranje navedenih glavnih fragmentnih MS^2 jona na m/z 447 i 431 potvrđuje činjenicu da kod oba jedinjenja (**18** i **25**) prvo dolazi do fragmentacije šećerne komponente koja je vezana za aglikon preko 7-OH grupe [132]. Jedinjenja identifikovana kao kempferol 3-*O*-pentozid-7-*O*-ramnozid (**18**) i kempferol 3-*O*-ramnozid-7-*O*-pentozid (**25**) daljom fragmentacijom gube pentozil jedinicu (-133 Da) i ramnozil jedinicu (-146 Da), redom, pri čemu kod oba jedinjenja nastaje MS^3 jon na m/z 285 koji ukazuje da su identifikovana jedinjenja derivati kempferola. Fragmentacijom jedinjenja **28** dobija se MS^2 fragmentni jon na m/z 284 što ukazuje na gubitak ramnozil-pentozil jedinice (-279 Da) sa molekula kempferola, te je ovo jedinjenje identifikovano kao kempferol 3-*O*-(2'-ramnozil)-pentozid.



Slika 16. MS/MS fragmentacija kempferol 3-*O*-(2'-ramnosil)-pentozid-7-*O*-ramnozida (**16**) (a) i kempferol 3-*O*-(2'-pentozil)-ramnozid-7-*O*-ramnozida (**24**) (b)

Jedinjenje sa molekulskim jonom na m/z 599 koje fragmentacijom daje jone na m/z 313 [M-H-286]⁻, 169 i 125 okarakterisano je kao kempferol 3-*O*-(6'-galoil)-heksozid (**26**). Kempferol 3-*O*-(6'-acetil)-heksozid (**31**) okarakterisan je na osnovu molekuskog jona na m/z 489 koji fragmentacijom daje jone na m/z 285 [M-H-204]⁻, 257 i 229. Oba ova jedinjenja (**26** i **31**) uslovno su okarakterisana na osnovu podataka dobijenih fragmentacijom i ranije nisu identifikovana u ekstraktima čuvarkuće.

Dva monoglikozida kempferola koja ranije nisu identifikovana kod čuvarkuće su kamferol 3-*O*-pentozid (**29**) i kempferol 3-*O*-ramnozid (**32**). Jedinjenje **29** sa molekulskim jonom na m/z 417 fragmentacijom daje MS² jon na m/z 284 što odgovara gubitku pentoze. Molekulski jon na m/z 431 nakon gubitka ramnoze daje fragmentni jon na m/z 285 na osnovu čega je identifikovano jedinjenje **32**.

Jedinjenje **6** sa molekulskim jonom [M-H]⁻ na m/z 755 koji fragmentacijom daje MS/MS jone na m/z 609 [M-H-146]⁻ i 300 [M-H-308]⁻ nakon gubitka ramnosil i ramnosil-heksozil ostataka, redom, identifikovano je kao kvercetin 3-*O*-(2'-ramnosil)-heksozid-7-*O*-ramnozid. Prisustvo ovog jedinjenja je ranije potvrđeno u ekstraktu čuvarkuće [5].

Glikozid eriodiktiola (**9**) prvi put je identifikovan u ekstraktima čuvaruće. Molekulski jon na m/z 449 nakon gubitka heksoze daje fragmentni jon na m/z 287 što odgovara molekulskoj masi eriodiktiola. Jedinjenje je identifikovano kao eriodiktiol 7-*O*-heksozid.

Identifikovana su tri glikozida miricetina: miricetin 3-*O*-(2'-ramnozil)-heksozid-7-*O*-ramnozid (**5**), miricetin 3-*O*-ramnozid-6-*O*-heksozid (**11**) i miricetin 3-*O*-heksozid (**15**). Jedinjenja **5** i **11** su u okviru ove disertacije uslovno okarakterisana na osnovu jona koje daju fragmentacijom. Miricetin 3-*O*-(2'-ramnozil)-heksozid-7-*O*-ramnozid (**5**) daje molekulski jon $[M-H]^-$ na m/z 771 koji daljom fragmentacijom daje jone MS^2 na m/z 625 (-146 Da, gubitak ramnozil jedinice) i MS^3 na m/z 316 (-309, gubitak ramnozil-heksozil jedinice). Deprotonovani molekul $[M-H]^-$ na m/z 625 daje fragmentne jone MS^2 na m/z 462 $[M-162-2H]^-$ nakon gubitka heksoze i MS^3 na m/z 315 $[M-146-H]^-$ nakon gubitka ramnoze, na osnovu čega je okarakterisan kao miricetin 3-*O*-ramnozid-6-*O*-heksozid (**11**). Na osnovu $[M-H]^-$ jona na m/z 479 i jona koji nastaje fragmentacijom na m/z 316 (MS^2) gubitkom heksoze (-162 Da) identifikovan je miricetin 3-*O*-heksozid (**15**). Prisustvo jedinjenja **15** je potvrđeno u ekstraktu čuvaruće tokom ranijih istraživanja [32].

Identifikacija fenolnih kiselina i njihovih derivata

U ispitanim ekstraktima osušenih listova čuvaruće identifikovan je samo jedan derivat galne kiseline: galoil-heksoza (**1**). Gubitak heksozne jedinice (-162 Da) dovodi do stvaranja fragmenta MS^2 baznog pika na m/z 169 koji odgovara galnoj kiselini. Prisustvo galoil-heksoze u ekstraktima čuvaruće je ranije potvrđeno [32, 60]. Kofeinska kiselina (**3**) i *p*-kumarinska kiselina (**33**) kao derivati hidroksicimetne kiseline identifikovani su u tragovima u ranijim ispitivanjima čuvaruće *S. davisii* [42]. Feruloil-heksoza (**7**) sa $[M-H]^-$ na m/z 355 identifikovana je prvi put u ekstraktima čuvaruće u okviru ovog ispitivanja. Nakon fragmentacije feruloil-heksoza daje jon MS^3 baznog pika na m/z 134 koji pripada ferulinskoj kiselini.

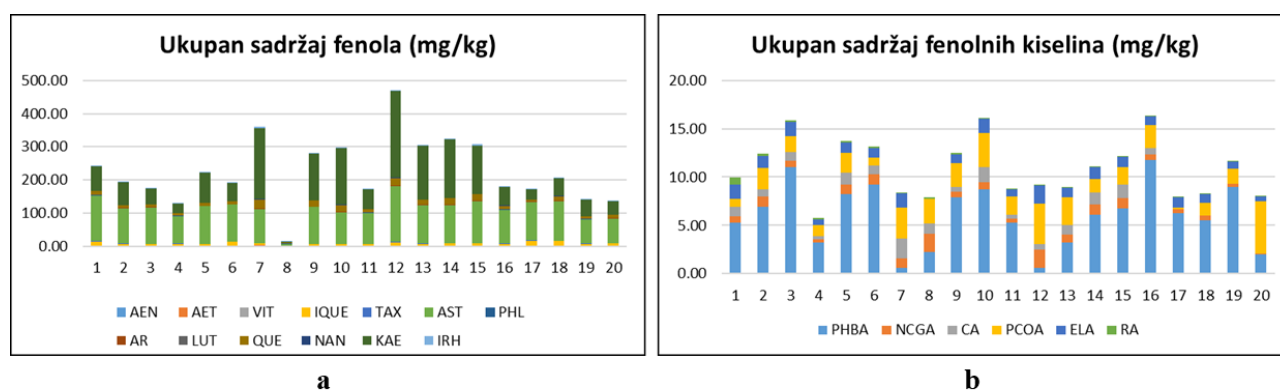
Identifikacija derivata dihidrohalkona

Prvi put je u okviru ovog ispitivanja u ekstraktima listova čuvaruće identifikovan derivat dihidrohalkona. Floretin 3',5'-*C*-di-heksozid (**23**) sa $[M-H]^-$ na m/z 597 fragmentacijom daje MS^2 bazni pik na m/z 477 i MS^3 bazni pik na m/z 357. Identifikacija je izvršena na osnovu podataka iz literature [133].

UPLC-LTQ OrbiTrap MS analizom utvrđeno je da su flavonoidi i njihovi glikozidi najzastupljenija grupa jedinjenja u 70% etanolnim ekstraktima osušenih listova čuvaruće. Među njima dominiraju glikozidi kempferola, dok su glikozidi kvercetina manje zastupljeni, što je u skladu sa prethodno objavljenim istraživanjima [32, 60, 134]. U okviru prvih istraživanja listova čuvaruće, nakon kisele hidrolize kempferol je identifikovan kao jedini aglikon u ekstraktu [47]. Dodatno, prema istraživanjima koje su sprovedi Alberti i saradnici, glikozidi kempferola su glavna bioaktivna jedinjenja u ekstraktima čuvaruće, dok su Šentjurski i saradnici objavili da su kempferol i njegovi derivati glavne fenolne komponente ekstrakta [33, 60]. U okviru ovog istraživanja po prvi put je u ekstraktima listova čuvaruće identifikovano prisustvo jedinjenja: **4, 5, 7, 9-11, 18, 20, 21, 23, 25, 26, 28-32, 34-37** (Tabela 3). Takođe, u ispitanim ekstraktima identifikovano je šest flavonoidnih triglikozida: **5, 6, 12, 16, 20 i 24** (Tabela 3), čije je prisustvo od posebnog značaja, s obzirom na to da se ova jedinjenja retko nalaze u biljkama iz familije Crassulaceae [62].

4.1.4. Kvantifikacija fenolnih jedinjenja

Određivanje koncentracije fenolnih jedinjenja u 70% etanolnim ekstraktima osušenih listova čuvaruće urađeno je primenom UPLC–DAD MS/MS tehnike. Ova analiza podrazumeva kvantifikaciju unapred definisanih fenolnih jedinjenja, koristeći odgovarajuće referentne standarde. Kvantifikovano je ukupno 19 fenolnih jedinjenja od čega šest fenolnih kiselina (*p*-hidroksibenzoeva kiselina – PHBA, neohlorogena kiselina – NCGA, kofeinska kiselina – CA, *p*-kumarinska kiselina – PCOA, elaginska kiselina – ELA, ruzmarinska kiselina – RA), sedam aglikona flavonoida: tri flavonola (kvercetin – QUE, kempferol – KAE, izoramnetin – IRH), dva flavanonola (taksifolin – TAX i aromadendrin – AR), flavanon naringenin – NAN i flavon luteolin – LUT, tri glikozida flavonoida (viteksin – VIT, astragalin – AST i izokvercetin – IQUE), dva derivata kumarina (eskulin – AEN i eskuletin – AET) i dihidrohalkon florizin – PHL. Ukupan sadržaj fenola i fenolnih kiselina u svih dvadeset ekstrakata prikazan je na **Slici 17**, dok je sadržaj svakog pojedinačnog fenolnog jedinjenja prikazan u **Tabeli P3**.



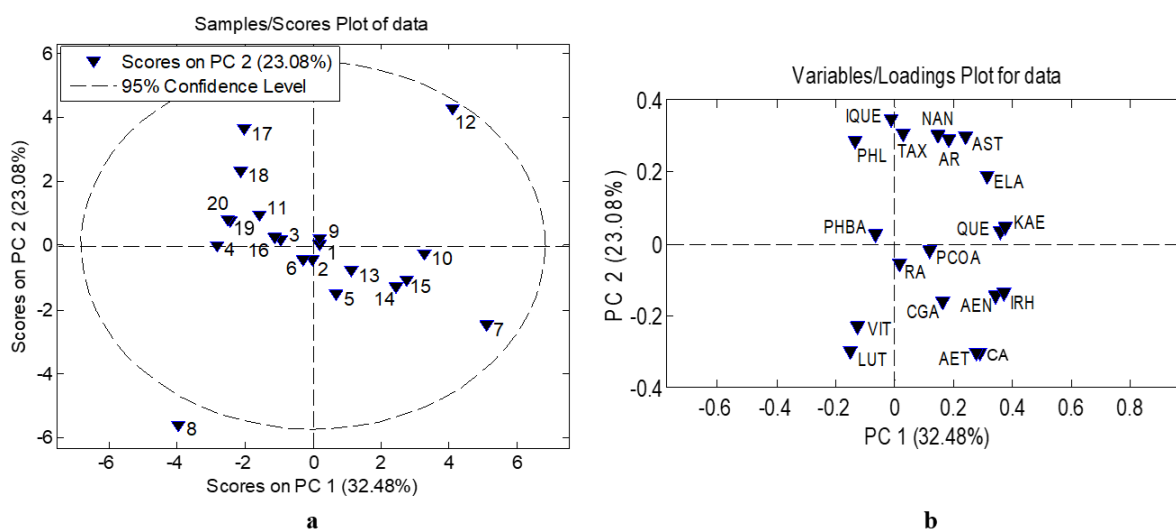
Slika 17. Ukupan sadržaj fenola (**a**) i ukupan sadržaj fenolnih kiselina (**b**) kvantifikovanih primenom UPLC–DAD MS/MS tehnike

U ekstraktima osušenih listova čuvaruće najzastupljeniji fenoli su kempferol (KAE) i njegov derivat kempferol 3-*O*-glukozid, odnosno astragalin (AST) (**Slika 17a**). Nasuprot tome, kvercetin (QUE) i njegov derivat kvercetin 3-*O*-glukozid, odnosno izokvercetin (IQUE) su prisutni u manjoj količini, što je u skladu sa ranije objavljenim rezultatima [32, 60, 67]. Među kvantifikovanim fenolnim kiselinama najzastupljenija je *p*-hidroksibenzoeva kiselina (PHBA), a zatim *p*-kumarinska kiselina (PCOA) (**Slika 17b**). U svakom pojedinačnom ekstraktu ukupan sadržaj fenola je mnogo viši od ukupnog sadržaja fenolnih kiselina, osim u ekstraktu 8 gde nema velike razlike u njihovom sadržaju. Najveći ukupan sadržaj fenolnih jedinjenja kvantifikovan je u ekstraktima 12 i 7 (470,96 mg/kg SM i 360,48 mg/kg SM, redom), pri čemu su KAE (261,96 mg/kg SM i 213,00 mg/kg SM, redom) i AST (167,00 mg/kg SM i 102,37 mg/kg SM, redom) dominantna jedinjenja. Ukupan sadržaj fenolnih kiselina u ova dva ekstrakta iznosi 9,20 mg/kg SM i 8,38 mg/kg SM, redom, pri čemu je PCOA najzastupljenija u oba ekstrakta (4,24 mg/kg SM i 3,18 mg/kg SM, redom). Ekstrakt 8 ima najmanji ukupan sadržaj svih fenolnih jedinjenja, u poređenju sa svim ostalim ekstraktima. U ekstraktu 8 ukupno je kvantifikovano 14,08 mg/kg SM fenolnih jedinjenja i 7,87 mg/kg SM fenolnih kiselina, sa najvećom zastupljenošću AST (4,43 mg/kg SM) i PCOA (2,56 mg/kg SM). Najveći ukupan sadržaj fenolnih kiselina kvantifikovan je u ekstraktima 16, 10 i 3 sa vrednostima od 16,31 mg/kg SM, 16,11 mg/kg SM i 15,89 mg/kg SM, redom. Dominantna fenolna kiselina u ova tri ekstrakta je PHBA (11,75 mg/kg SM, 8,76 mg/kg SM i 11,00 mg/kg SM, redom). Luteolin (LUT) je kvantifikovan samo u ekstraktu 8 (0,46 mg/kg SM).

Najveći ukupan sadržaj fenolnih jedinjenja kvantifikovan je u ekstraktu 12, dok ovaj ekstrakt ima i najviši TPC. Suprotno tome, ekstrakt 8 ima najniži ukupan sadržaj fenolnih jedinjenja i najniži TPC. Kod ostalih ekstrakata zabeležene su varijacije između rezultata dobijenih LC–MS i spektrofotometrijskom metodom, što može biti posledica činjenice da su LC–MS metodom kvantifikovani samo određeni polifenoli čiji su standardi dostupni. Fenolna jedinjenja koja nisu

kvantifikovana ovom metodom mogla su doprineti pozitivnoj reakciji sa FC reagensom, što je dovelo do viših TPC vrednosti. Ekstrakt 20 pokazuje najviši TPC, iako je LC–MS analizom kvantifikovan najmanji ukupan sadržaj fenolnih jedinjenja. Dodatno, UPLC–LTQ OrbiTrap MS metodom identifikovano je prisustvo velikog broja fenolnih jedinjenja u ekstraktima, od kojih su najbrojniji glikozidi kempferola, a zatim i kvercetina. Iako ova jedinjenja nisu mogla biti kvantifikovana zbog nedostatka standarda, verovatno su dala značajan doprinos TPC vrednostima. Ovi rezultati ukazuju na kompleksnost biljnih ekstrakata i važnost kombinovanja različitih analitičkih pristupaka za potpuniju karakterizaciju njihovih fenolnih profila.

PCA model za kvantifikovane fenole i fenolne kiseline sastoji se od četiri glavne komponente koje opisuju 79,00% ukupne varijabilnosti među podacima (PC1 – 32,48%, PC2 – 23,08%, PC3 – 12,81% i PC4 – 10,64%). Grafik skorova latentnih varijabli i grafik vektora latentnih varijabli konstruisani su na osnovu prve dve glavne komponente PC1 i PC2 (**Slika 18**).



Slika 18. Analiza glavnih komponenata na osnovu rezultata dobijenih kvantifikacijom fenola i fenolnih kiselina u 70% etanolnim ekstraktima listova čuvarkuće: grafik skorova latentnih varijabli (a), grafik vektora latentnih varijabli (b).

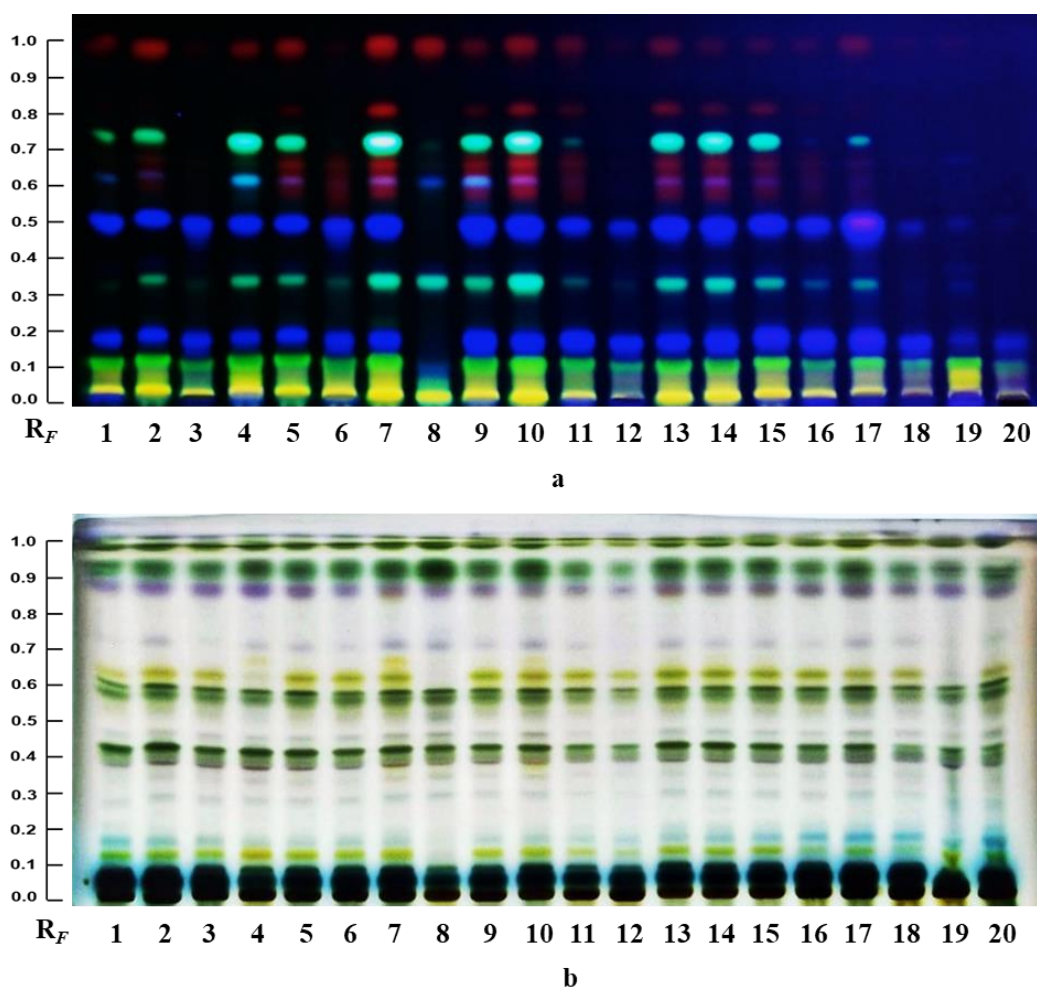
Na grafiku skorova latentnih varijabli (**Slika 18a**) najveće razdvajanje uočava se za ekstrakte 7, 8 i 12. Ekstrakt 12 se izdvaja u odnosu na druge ekstrakte u gornjem desnom kvadrantu zbog najvećeg ukupnog sadržaja svih jedinjenja. Najzastupljenija jedinjenja kvantifikovana u ekstraktu 12: KAE, AST, QUE (21,87 mg/kg SM) i IQUE (10,56 mg/kg SM) imaju uticaj na njegovo izdvajanje od svih ostalih ekstrakata duž obe ose (**Slika 18b**). Ekstrakti 7, 10, 14 i 15 se nalaze sa desne strane duž PC1 ose, i sva četiri ekstrakta imaju visok ukupan sadržaj fenolnih jedinjenja između 315,14 mg/kg i 368,86 mg/kg SM. Međutim, ekstrakt 7 se izdvaja od ostalih pomenutih ekstrakata i nalazi se niže u donjem desnom kvadrantu jer sadrži najveću količinu QUE (28,38 mg/kg SM), IRH (5,62 mg/kg SM), CA (2,07 mg/kg SM), AEN (1,71 mg/kg SM) i AET (1,11 mg/kg SM) koji imaju uticaja na ovakvo razdvajanje. Sa leve strane grafika skorova (**Slika 18a**) nalaze se ekstrakti 3, 4, 8, 11, 16 – 20 sa niskim ukupnim sadržajem fenolnih jedinjenja. Ekstrakti 17 i 18 imaju viši sadržaj AST (115,23 mg/kg SM i 119,74 mg/kg SM, redom) i IQUE (15,66 mg/kg SM i 14,41 mg/kg SM, redom) u poređenju sa ostalim ekstraktima pozicioniranim sa leve strane grafika skorova, što ih od istih razdvaja duž PC2 ose. Ekstrakt 8 koji ima najniži ukupan sadržaj fenola i fenolnih kiselina (21,95 mg/kg SM) nalazi se u donjem levom kvadrantu grafika skorova i pozicioniran je izvan 95% nivoa pouzdanosti Hotellingove elipse. Nizak ukupan sadržaj fenolnih jedinjenja i fenolnih kiselina, kao i prisustvo LUT (0,46 mg/kg SM) koji je kvantifikovan samo u ovom ekstraktu, uticali su na njegovo razdvajanje od svih ostalih ekstrakata duž obe PC ose (**Slika 18b**).

4.1.5. HPTLC fenolni profil

Osušeni listovi čuvarkuće

Razvijanje fenolnog profila HPTLC metodom često se koristi za brzo ispitivanje složenih matriksa biljnih ekstrakata. Fenolni profil 70% etanolnih ekstrakata osušenih listova čuvarkuće razvijen je mobilnom fazom koju čini smeša toluen : etil–acetat : mravlja kiselina (5:4:1, v/v/v) [135]. Ovo je ujedno bio i prvi put da je razvijen HPTLC fenolni profil ekstrakata listova čuvarkuće.

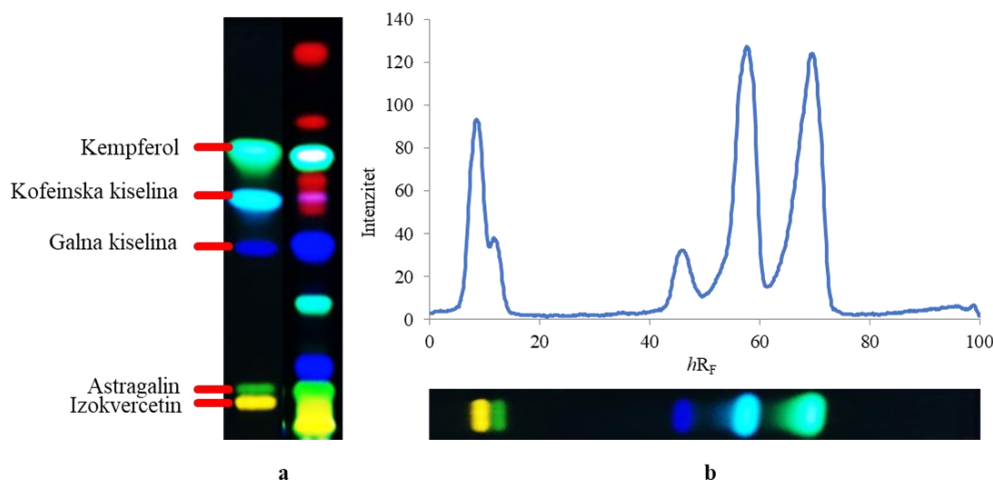
Za detekciju bioaktivnih jedinjenja razvijeni hromatogrami su derivatizovani rastvorima NEU i PEG reagenasa, kao i rastvorom *p*-anisaldehida. Reagensi NEU i PEG karakteristični su za derivatizaciju fenolnih jedinjenja, dok je anisaldehyd neselektivni reagens koji daje reakciju sa različitim jedinjenjima poput fenola, terpena, steroida i šećera. HPTLC ploča je dokumentovana pod UV svetlom na 366 nm nakon derivatizacije rastvorima NEU+PEG (**Slika 19a**), a nakon derivatizacije rastvorom anisaldehyda HPTLC ploča je dokumentovana na vidljivom svetlu (**Slika 19b**).



Slika 19. HPTLC fenolni profil nakon derivatizacije hromatograma rastvorima NEU+PEG (**a**), nakon derivatizacije hromatograma rastvorom anisaldehyda (**b**)

Vizuelnim pregledom oba hromatograma uočavaju se slični fenolni profili svih dvadeset etanolnih ekstrakata osušenih listova čuvarkuće (**Slika 19**). Polarnija fenolna jedinjenja jače su adsorbovana na površinu silika gela, a manifestovana su kao žute, zelene i tamnoplave trake na 366 nm koje se nalaze na nižim hR_F vrednostima (hR_F 0 – 20) (**Slika 19a**). Manje polarna jedinjenja ostvaruju slabije interakcije sa silika gelom, i, nošene mobilnom fazom, prelaze duži put. Veći broj zona koje odgovaraju nepolarnijim jedinjenjima ($hR_F > 70$) uočava se na hromatogramu nakon derivatizacije rastvorom anisaldehyda (**Slika 19b**).

Za identifikaciju razdvojenih fenolnih jedinjenja iz ekstrakata čuvarkuće razvijen je hromatogram smeše standarda (**Slika 20**). Nakon derivatizacije hromatograma rastvorima NEU+PEG identifikovano je prisustvo svih pet jedinjenja iz smeše: izokvercetin (IQUE, hR_F 8), astragalin (AST, hR_F 11), galna kiselina (GA, hR_F 48), kofeinska kiselina (CA, hR_F 58) i kempferol (KAE, hR_F 69).



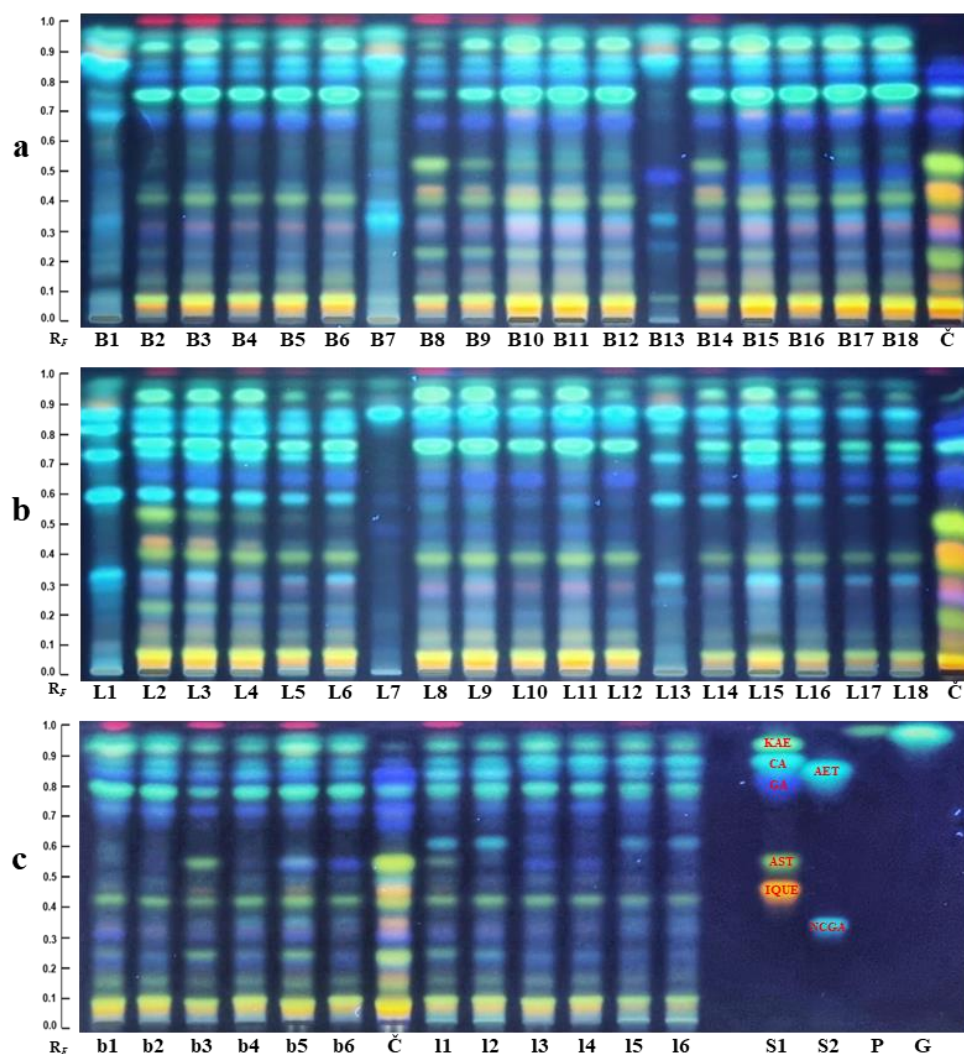
Slika 20. Hromatogram smeše standarda i ekstrakta 7 derivatizovan rastvorima NEU+PEG dokumentovan pod UV svetlom na 366 nm (a), intenzitet piksela u odnosu na rastojanje (hR_F) za hromatogram smeše standarda (b)

Na hromatogramu nakon derivatizacije rastvorima NEU+PEG (**Slika 19a**) uočavaju se dve glavne tamnoplave zone na hR_F 18 i 48. Fenolno jedinjenje na hR_F 48 identifikovano je kao galna kiselina (GA) i prisutno je u svim ekstraktima izuzev ekstrakta 8, dok je u ekstraktima 18 – 20 slabo uočljivo. Na osnovu veličine i intenziteta zone, GA je identifikovana kao najzastupljeniji metabolit, s tim da je zona galne kiseline najizraženija u ekstraktu 17. Tamnoplava zona na hR_F 18 se uočava u svim ekstraktima osim u ekstraktu 8, a predstavlja glavni metabolit ekstrakata 18 – 20. Zelena zona nepoznatog fenolnog jedinjenja na hR_F 33 uočava se u svim ekstraktima osim kod ekstrakata 1, 3, 12, 18 i 20. Zona na hR_F 33 je najintenzivnija u ekstraktu 10, dok u ekstraktu 8 predstavlja glavni metabolit. Kempferol (KAE) je identifikovan na hR_F 69 i kao zelena zona prisutan je u ekstraktima 1, 2, 4, 5, 7, 9 – 11, 13 – 15 i 17. Fenolno jedinjenje predstavljeno svetloplavom zonom na hR_F 58 identifikovano kao kofeinska kiselina (CA) najjači intenzitet ispoljava u ekstraktima 4 i 9, dok je slabije izražena u ekstraktima 1, 2, 5, 7, 8, 10, 13 – 15. Polarnija fenolna jedinjenja identifikovana kao izokvercetin (IQUE) i astragalin (AST) na hR_F 8 i hR_F 11, redom, prisutna su u svim ekstraktima.

Razvijeni hromatogram nakon derivatizacije rastvorom anisaldehida (**Slika 19b**) takođe pokazuje sličnost fenolnih profila među svim ekstraktima. Ovde se uočava mnogo veći broj zona celom dužinom razvijenog hromatograma što je rezultat neselektivne prirode anisaldehida kao reagensa. Zone fenolnih jedinjenja koje su dominantne na hromatogramu nakon derivatizacije rastvorom NEU+PEG (**Slika 19a**) slabo su ispoljene na hromatogramu derivatizovanom anisaldehydom (**Slika 19b**), gde se manifestuju kao zone svetlosive, svetloplave i svetložute boje. S druge strane, na hromatogramu derivatizovanom anisaldehydom (**Slika 19b**) postaju vidljive i intenzivnije zone koje nisu uočljive na hromatogramu derivatizovanom rastvorima NEU+PEG. U svim ekstraktima najjači intenzitet ispoljavaju tamnozelenozone na hR_F 41, 60 i 92. Nepoznato nepolaro jedinjenje na hR_F 92 daje najintenzivniju traku u ekstraktu 8, a zatim i u ekstraktima 4, 7, 10, 13 – 15 i 17. Jedinjenje predstavljeno ljubičastom zonom na hR_F 90 kao i dva jedinjenja koja su ispoljena kao žute zone na hR_F 11 (AST) i na hR_F 63 su prisutna u svim ekstraktima. Pored toga, ljubičasta zona jedinjenja na hR_F 38 se uočava u svim ekstraktima. Najslabiji intenzitet traka uočen je u ekstraktu 12, a zatim u ekstraktima 11, 18 – 20. Svi ekstrakti imaju izraženu tamnu zonu jakog intenziteta veoma polarnih jedinjenja nedaleko od mesta nanošenja ekstrakata.

Preparati čuvarkuće i meda, sveži listovi čuvarkuće i čist med

S obzirom na veliki broj polarnih fenolnih jedinjenja, HPTLC fenolni profil ekstrakata preparata čuvarkuće i meda, svežih listova čuvarkuće i čistog meda razvijen je polarnijom mobilnom fazom od one koja je korišćena za razvijanje fenolnog profila ekstrakata osušenih listova čuvarkuće. Fenolni profil razvijen je mobilnom fazom koju čini smeša etil–acetat : toluen : mravlja kiselina : voda (16:4:3:2, *v/v/v/v*) [99]. Hromatogrami su derivatizovani rastvorima NEU+PEG. Dobijeni hromatogrami prikazani su na **Slici 21**. Način obeležavanja ekstrakata prilikom prikazivanja rezultata dobijenih HPTLC analizom prikazan je u **Tabeli P4**.



Slika 21. HPTLC fenolni profil nakon derivatizacije hromatograma rastvorima NEU+PEG posmatran pod UV svetlom na 366 nm: hromatogram ekstrakata preparata sa bagremovim medom pripremljeni sa zakišeljnom vodom (**a**), hromatogram ekstrakata preparata sa livadskim medom pripremljeni sa zakišeljnom vodom (**b**), hromatogram ekstrakata preparata sa bagremovim i livadskim medom pripremljeni bez rastvarača, S1 – smeša standarda izokvercetina (IQUE), astragalina (AST), galne kiseline (GA), kofeinske kiseline (CA) i kempferola (KAE), S2 – smeša standarda neohlorogene kiseline (NCGA) i eskuletina (AET), P – pinocembrin, G – galangin (**c**)

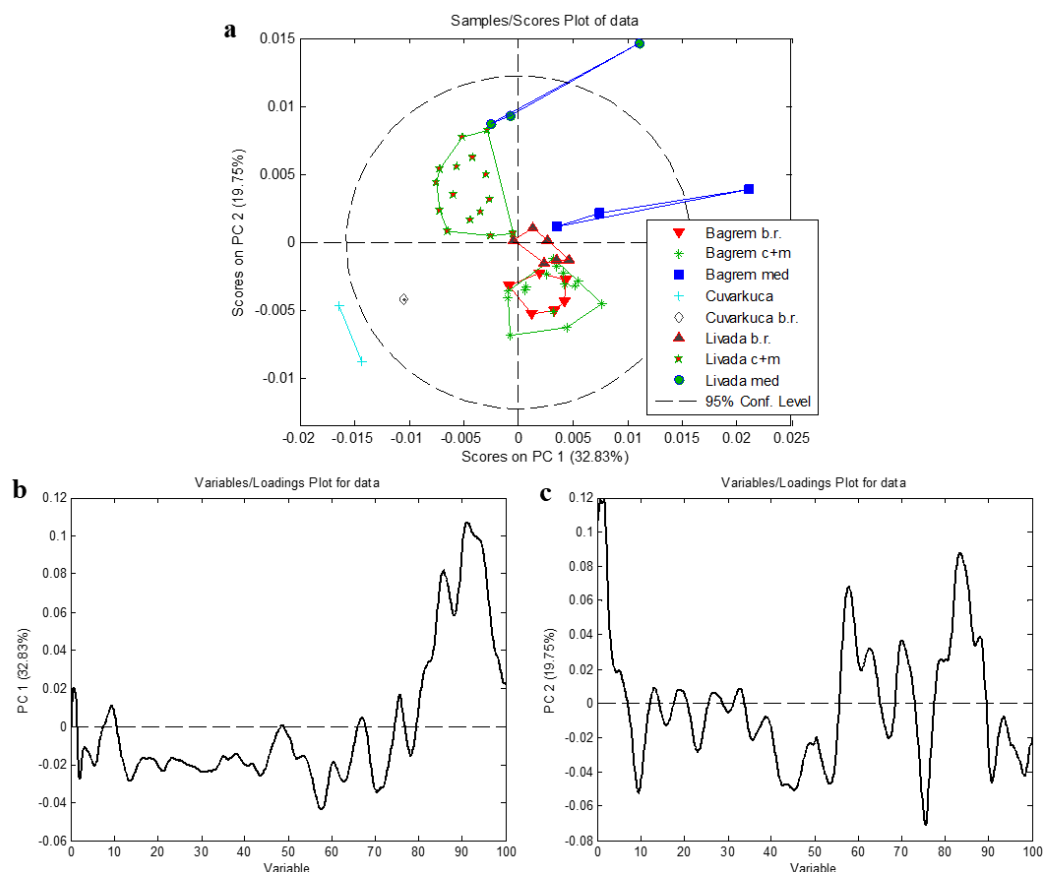
Na hromatogramima se uočavaju brojne zone fenolnih jedinjenja ekstrakata čistih uzoraka medova i čuvarkuće, kao i bogat fenolni profil ekstrakata preparata (**Slika 21**). Fenolna jedinjenja prisutna u ekstraktima su identifikovana na osnovu pređenog puta (hR_F) i boja zona poznatih fenolnih jedinjenja – standarda, koji su takođe razdvojeni na ploči (**Slika 21c**). U svim ekstraktima čistog meda dominantne su svetloplave zone na $hR_F > 50$, dok je fenolni profil ekstrakata čiste čuvarkuće bogat polarnijim fenolima koji su manifestovani velikim brojem zona različitih boja na $hR_F < 50$.

U sva tri ekstrakta bagremovog meda (B1, B7 i B13) identifikovani su neohlorogena kiselina (NCGA, hR_F 31), eskuletin (AET, hR_F 84), kofeinska kiselina (CA, hR_F 87) i galangin (G, hR_F 96) (**Slika 21a**). AET se pojavljuje u vidu svetloplave zone slabijeg intenziteta u poređenju sa ostalim identifikovanim fenolima. Zona NCGA je najviše izražena u ekstraktu B7. U sva tri bagremova meda prisutno je i jedinjenje čija se zona narandžaste boje nalazi na hR_F 90, jedinjenje koje daje zeleno-plavu zonu na hR_F 73, kao i dve svetlije zone na hR_F 7 i 26. Tamnoplava zona na hR_F 48 uočava se, takođe, u sva tri ekstrakta bagremovog meda, a najviše je izražena u ekstraktu B13. Samo u ekstraktu B1 uočava se svetloplava zona na hR_F 68. Fenolna jedinjenja NCGA, AET, CA i G su identifikovana i u sva tri ekstrakta livadskog meda (L1, L7 i L13) (**Slika 21b**). Ekstrakt livadskog meda L1 ima najizraženije svetloplave zone fenolnih jedinjenja u poređenju sa ostala dva ekstrakta L7 i L13. U ekstraktu L1 najjače su izražene zone identifikovanih jedinjenja NCGA i AET, kao i neidentifikovanih jedinjenja na hR_F 58 i 71, koje se u L7 ne uočavaju, a u ekstraktu L13 su slabijeg intenziteta. Galangin i narandžasta zona jedinjenja na hR_F 90 prisutni su u sva tri ekstrakta livadskog meda. Zona CA je dominantna u ekstraktima L7 i L13. Fenolni profil ekstrakta L7 je najsiromašniji od sva tri ekstrakta livadskog meda, u kojem se dodatno uočava plava zona slabog intenziteta na hR_F 48. Prisustvo ovih fenolnih jedinjenja ranije je identifikovano u bagremovom i livadskom medu [109, 136]

Ekstrakti svežih listova čuvarkuće, pripremljeni sa zakišljenom vodom ili bez upotrebe rastvarača, pokazuju slične fenolne profile. Ekstrakt čuvarkuće koji je pripremljen korišćenjem zakišljene vode (**Slika 21a, b**) daje izraženije zone fenolnih jedinjenja u poređenju sa ekstraktom koji je pripremljen bez korišćenja rastvarača (**Slika 21c**). U ekstraktima čuvarkuće identifikovana su tri fenolna jedinjenja koja daju zone intenzivnih boja: izokvercetin – narandžasta zona (IQUE, hR_F 45), astragalin – zelena zona (AST, hR_F 54) i galna kiselina – tamnoplava zona (GA, hR_F 79). Prisustvo CA (hR_F 87) i kempferola (KAE, hR_F 92) u vidu traka slabog intenziteta najbolje se uočava u ekstraktu čuvarkuće pripremljenom bez upotrebe rastvarača (**Slika 21c**). Pored identifikovanih jedinjenja neophodno je istaći i prisustvo velikog broja neidentifikovanih fenolnih jedinjenja koja daju zone svetlozelene (hR_F 26 i 43), narandžaste (hR_F 18), ljubičaste (hR_F 28) roze (hR_F 29), zeleno-plave (hR_F 73) i tamnoplave (hR_F 67) boje.

Na HPTLC fenolnom profilu ekstrakata preparata čuvarkuće i meda ispoljene su zone koje odgovaraju jedinjenjima koja potiču kako iz meda, tako i iz čuvarkuće, što ukazuje na uspešnu ekstrakciju fenola iz obe komponente preparata. Tokom vremena mogu se uočiti razlike u broju i intenzitetu zona (**Slika 21**). Zone na $hR_F < 50$ koje u ekstraktima preparata potiču od čuvarkuće slabijeg su intenziteta u poređenju sa profilom ekstrakta čiste čuvarkuće (Č), osim najpolarnijih jedinjenja na $hR_F < 10$. Jedinjenja koja potiču od čuvarkuće, a vidljiva su na fenolnom profilu preparata, nalaze se na hR_F 29, 43, 67, 73 i 79 (GA). Intenzitet zelene zone jedinjenja na hR_F 73 i KAE jače je izražen u svim ekstraktima preparata u poređenju sa ekstraktom čiste čuvarkuće (Č). Takođe, sva jedinjenja prisutna u ekstraktima čistih medova, manifestuju se i u profilima preparata. Ovaj trend se odnosi na preparate koji su pripremljeni sa obe vrste meda i ekstrahovani na oba načina – sa zakišljenom vodom i bez upotrebe rastvarača za ekstrakciju.

Analizom glavnih komponenata analizirani su podaci dobijeni obradom HPTLC hromatograma fenolnog profila (**Slika 21**) u ImageJ programu kako bi se ispitalo da li dolazi do grupisanja ekstrakata preparata čuvarkuće i meda prema vrsti meda od kojih su pripremljeni, kao i na osnovu načina pripreme ekstrakata. Dobijeni PCA model opisan je sa šest glavnih komponenata koje opisuju 84,49% ukupnog varijabiliteta među podacima (PC1 – 32,83%, PC2 – 19,75%, PC3 – 15,79%, PC4 – 7,65%, PC5 – 5,65% i PC6 – 2,81%). Grafik skorova latentnih varijabli konstruisan na osnovu komponenti PC1 i PC2, kao i grafici vektora latentnih varijabli prikazani su na **Slika 22**.



Slika 22. Analiza glavnih komponenta za HPTLC hromatograme na kojima su razvijeni fenolni profili: grafik skorova latentnih varijabli (a), grafik vektora latentnih varijabli za PC1 (b), grafik vektora latentnih varijabli za PC2 (c)

Ekstrakti pripremljeni od čistog bagremovog i livadskog meda među sobom se potpuno razdvajaju duž PC2 ose što se uočava na grafiku skorova latentnih varijabli (Slika 22a). Ekstrakti L1 i L13 se nalaze u gornjem levom kvadrantu odvojeni od ekstrakta L7. Ekstrakti B1 i B7 nalaze u gornjem desnom kvadrantu odvojeni od ekstrakta B13. Sa grafika vektora latentnih varijabli očitava se da na ovakvo razdvajanje navedenih ekstrakata utiču zone na hR_F 58 i 71 koje su prisutne u ekstraktima L1 i L13, kao i zona na hR_F 68 prisutna u B1 i B7 (Slika 22b, c). Takođe, mnogo jače ispoljena zona AET na hR_F 84 kod ekstrakata livadskog meda (L1 i L13) uticala je na pozicioniranje ovih uzoraka u gornji levi kvadrant. Ekstrakti L7 i B13 u poređenju sa ostalim ekstraktima medova imaju zone najslabijeg intenziteta, stoga su pozicionirani izvan granice od 95% nivoa pouzdanosti Hotellingove elipse u gornjem desnom kvadrantu. Sa suprotne strane grafika skorova latentnih varijabli u levom donjem kvadrantu izvan granice 95% nivoa pouzdanosti Hotellingove elipse, negativno duž obe PC ose, nalaze se ekstrakti čuvarkuće pripremljeni sa zakišljenom vodom, dok se ekstrakt čuvarkuće bez rastvarača nalazi unutar granica Hotellingove elipse (Slika 22a). Na ovakvo razdvajanje uticale su zone na hR_F 54 (AST) i 73, a kako su ove zone slabije izražene u ekstraktu pripremljenom bez rastvarača to se on nalazi unutar granica Hotellingove elipse.

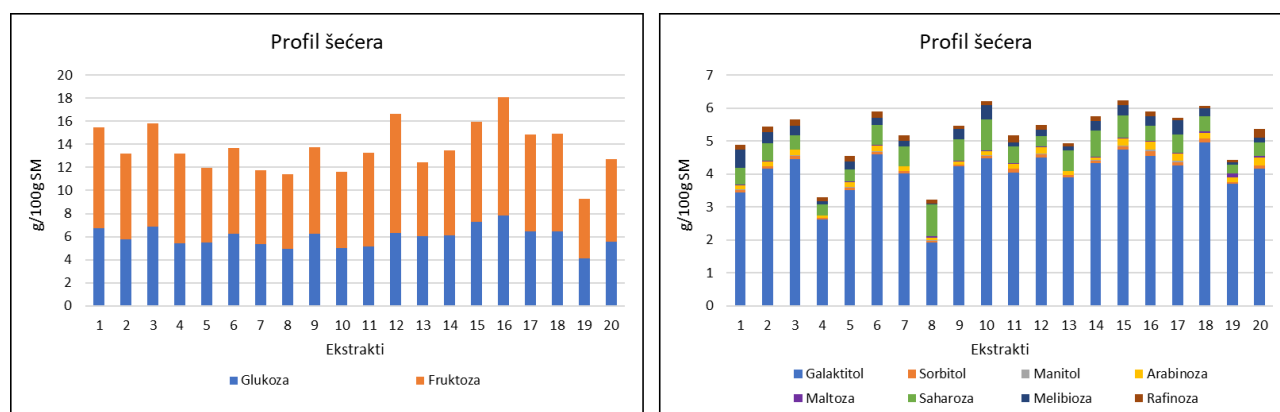
Na grafiku skorova latentnih varijabli uočava se razdvajanje ekstrakata preparata čuvarkuće i meda u zavisnosti od toga da li su pripremljeni sa bagremovim ili sa livadskim medom (Slika 22a). Pozicioniranje ekstrakata sa bagremovim medom je uniformno, ekstrakti su manje rasuti i nalaze se pretežno u donjem desnom kvadrantu, odvojeni od ekstrakata preparata sa livadskim medom. Na ovakvo razdvajanje preparata sa bagremovim medom utiče jedinjenje jakog intenziteta na hR_F 73 i to što su zone na hR_F 84 (AET) i 87 (CA) slabije izražene u odnosu na ekstrakte preparata sa livadskim medom. Način pripreme ekstrakata preparata sa bagremovim medom nije uticao na sastav fenolnih jedinjenja, dok je sa druge strane uticao na hemijski sastav preparata pripremljenih sa livadskim medom.

Na grafiku skorova latentnih varijabli ekstrakti preparata sa livadskim medom su međusobno razdvojeni u zavisnosti od toga da li su pripremljeni sa zakišljenom vodom ili bez rastvarača (**Slika 22a**). Ekstrakti preparata sa livadskim medom pripremljeni sa zakišljenom vodom pozicionirani su u gornjem levom kvadrantu. Ovi ekstrakti zauzimaju veću površinu i više su rasuti u poređenju sa ekstraktima bagremovih preparata. Centralni deo grafika skorova zauzimaju ekstrakti preparata sa livadskim medom bez rastvarača. Na razdvajanje ekstrakata sa livadskim medom utiču zone jakog intenziteta na hR_F 43, 58, 71 i 73 (**Slika 22b, c**).

4.1.6. Profil šećera

Osušeni listovi čuvarkuće

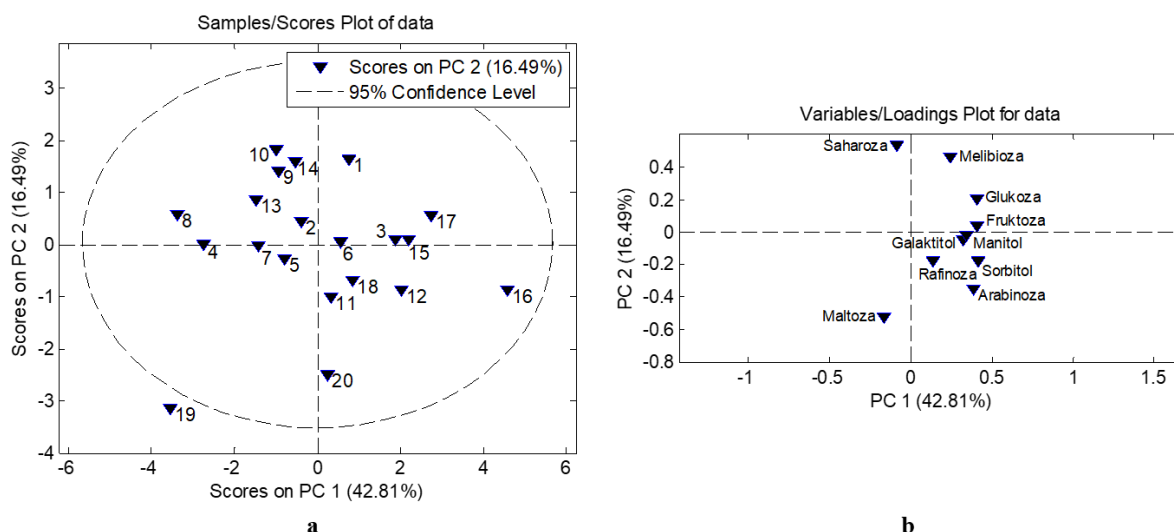
Određena je koncentracija ukupno sedam šećera od čega: tri monosaharida (glukoza, fruktoza, arabinoza), tri disaharida (maltoza, saharoza, melibioza) i jednog trisaharida (rafinoza), kao i tri poliola: galaktitol, sorbitol i manitol. Profil šećera prikazan je na **Slici 23** i u **Tabeli P5**.



Slika 23. Profil šećera dobijen HPAEC/PAD tehnikom

Ukupan sadržaj šećera u ekstraktima bio je u opsegu od 13,74 g/100 g SM do 23,98 g/100 g SM. Najmanji sadržaj šećera uočava se u ekstraktu 19, dok je najveći sadržaj šećera kvantifikovan u ekstraktu 16 (**Slika 23**). Monosaharidi fruktoza i glukoza su najviše zastupljeni šećeri u svim analiziranim ekstraktima listova čuvarkuće, što je u skladu sa prethodno objavljenim rezultatima [45]. Fruktoza je najzastupljeniji šećer (5,21 – 10,32 g/100 g SM), a zatim glukoza (4,10 – 7,82 g/100 g SM). Fruktoza je najviše zastupljena u ekstraktima 12 i 16 (10,32 g/100 g SM i 10,27 g/100 g SM, redom), dok ekstrakt 16 ima i najveći sadržaj glukoze (7,82 g/100 g SM) u poređenju sa ostalim ekstraktima. Najzastupljeniji disaharid u svim ekstraktima je saharoza (0,27 – 0,96 g/100 g SM) osim u ekstraktu 1 gde je kvantifikovan najveći sadržaj melibioze (0,55 g/100 g SM). Rafinoza je jedini trisaharid koji je kvantifikovan u ekstraktima u opsegu od 0,06 – 0,28 g/100 g SM. Galaktitol je najzastupljeniji polioliol u svim ekstraktima (1,92 – 4,96 g/100 g SM).

Analizom glavnih komponenata dobijen je šestokomponentni model koji opisuje 93,12% ukupnog varijabiliteta. Na osnovu prve dve komponente PC1 i PC2 koje opisuju 42,81% i 16,49% varijabiliteta, redom, konstruisani su grafik skorova i grafik vektora latentnih varijabli (**Slika 24**).

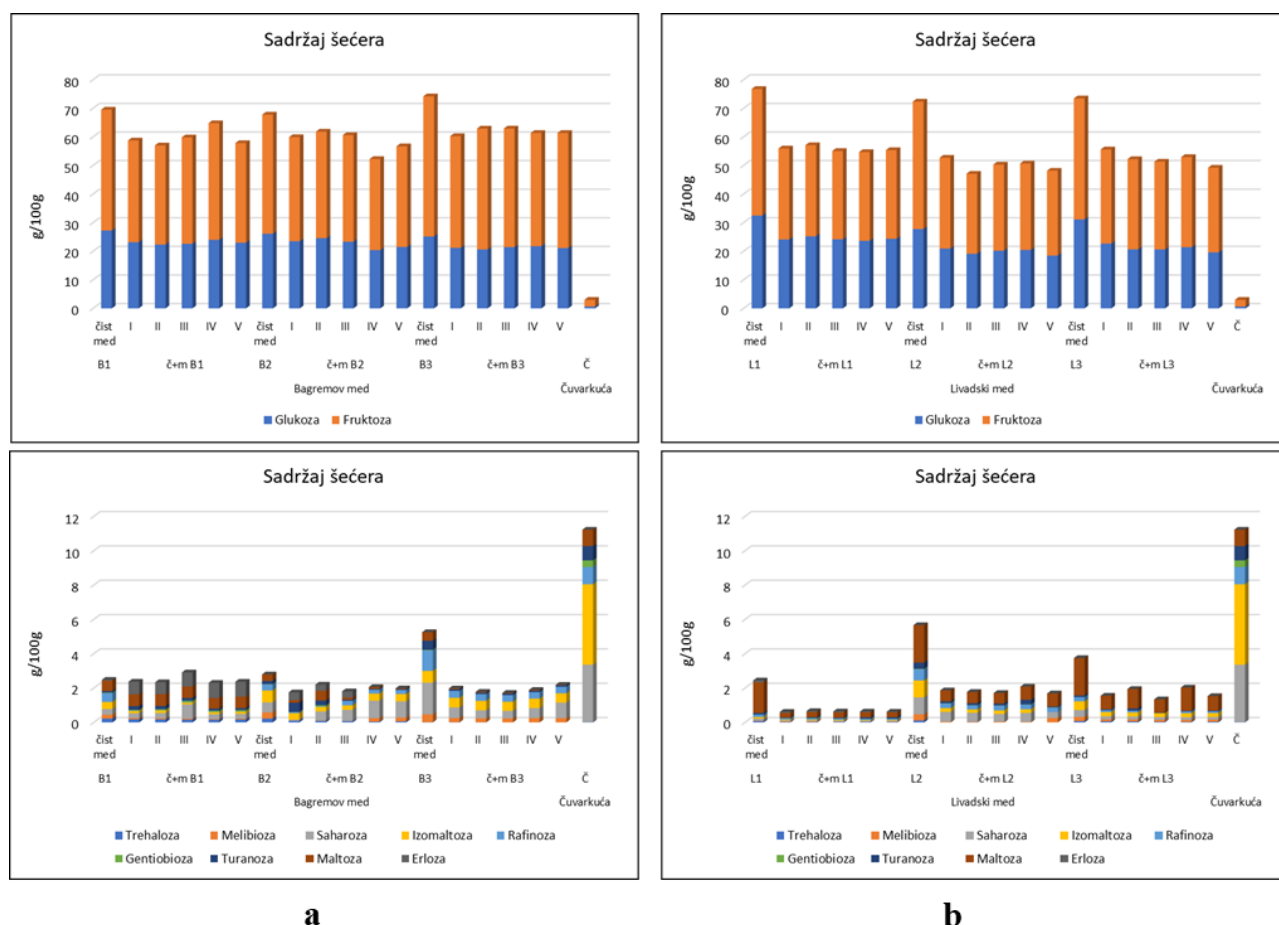


Slika 24. Analiza glavnih komponenta profila šećera: grafik skorova latentnih varijabli (a), grafik vektora latentnih varijabli (b)

Sa grafika skorova (**Slika 24a**) uočava se da svih 20 ekstrakata ima sličan profil šećera, međutim, izdvajaju se tri ekstrakta: 16, 19 i 20. Ekstrakt 16 ima najveći ukupan sadržaj šećera (23,98 g/100 g SM), što ga izdvaja od ostalih ekstrakata duž PC1 ose u donjem desnom kvadrantu grafika skorova (**Slika 24a**). Glukoza, fruktoza, arabinoza, galaktitol, manitol i sorbitol prisutni u većim količinama u ekstraktu 16, u poređenju sa ostalim ekstraktima, utiču na odvajanje ovog ekstrakta sa desne strane duž PC1 ose. Uticaj šećera i poliola na razdvajanje ekstrakta duž obe ose očitava se sa grafika vektora (**Slika 24b**). Ekstrakti koji se nalaze na desnoj strani grafika skorova imaju ukupan sadržaj šećera veći od 19,00 g/100 g SM, dok ekstrakti na levoj strani imaju niži ukupni sadržaj šećera. Najveći sadržaj arabinoze i rafinoze (0,24 g/100 g SM i 0,28 g/100 g SM, redom) je kvantifikovan u uzorku 20, što ga odvaja od ostalih ekstrakata u donjem delu grafika skorova duž PC2 ose. Ekstrakt 19, koji se nalazi izvan 95% nivoa pouzdanosti Hotellingove elipse u donjem levom kvadrantu grafika skorova, ima najniži ukupan sadržaj šećera (13,74 g/100 g SM). Prisustvo maltoze značajno utiče na razdvajanje ekstrakata duž obe PC ose, što je najizraženije kod ekstrakta 19, u kojem je određena najveća koncentracija maltoze (0,13 g/100 g SM). Ekstrakt 8 koji je pozicioniran sa leve strane grafika skorova negativno duž PC2 ose takođe ima nizak ukupan sadržaj šećera (14,65 g/100 g SM).

Preparati čuvarkuće i meda, sveži listovi čuvarkuće i čist med

U vodenim ekstraktima preparata čuvarkuće i meda, svežih listova čuvarkuće i čistog meda određen je sadržaj ukupno jedanaest šećera, od čega: dva monosaharida (glukoza i fruktoza), sedam disaharida (maltoza, saharoza, melibioza, trehaloza, izomaltoza, gentiobioza i turanoza) i dva trisaharida (rafinoza i erloza). Sadržaj šećera prikazan je na **Slici 25** i u **Tabeli P6**.



a

b

Slika 25. Sadržaj šećera u vodenim ekstraktima preparata sa bagremovim medom (a) i preparata sa livadskim medom (b)

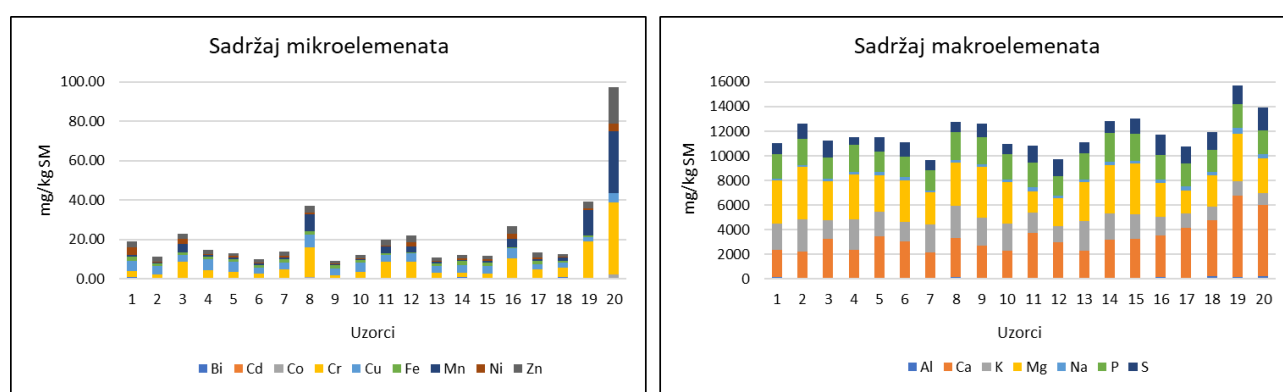
Ukupan sadržaj šećera u uzorcima bagremovog meda iznosio je 70,57 – 79,42 g/100 g, dok je u livadskom medu bio 77,18 – 79,20 g/100 g (**Tabela P6**). Najzastupljeniji šećeri su monosaharidi fruktoza i glukoza. Fruktoza je dominantan šećer u svim ekstraktima obe vrste meda sa više od 40 g/100 g, dok je sadržaj glukoze u opsegu 25,15 – 32,46 g/100 g. Prema Pravilniku o kvalitetu meda i drugih proizvoda pčela, količina glukoze i fruktoze u nektarnom medu ne sme biti manja od 60 g/100 g [71]. Svi ispitivani medovi ispunjavaju ovaj uslov u pogledu kvaliteta meda. U bagremovom medu B3 kvantifikovan je najveći sadržaj saharoze od 1,84 g/100 g i rafinoze od 1,20 g/100 g. U sva tri uzorka livadskog meda sadržaj maltoze je viši nego u ekstraktima bagremovog meda i iznosi 1,78 g/100 g (L1), 2,18 g/100 g (L2) i 2,18 g/100 g (L3).

Sveži listovi čuvarkuće imaju nizak sadržaj šećera. Kvantifikovan je najveći sadržaj izomaltoze (4,68 g/100 g) i saharoze (3,34 g/100 g) (**Tabela P6**). Fruktoza (2,36 g/100 g) je dominantan šećer u odnosu na glukožu (0,63 g/100 g), što je ranije potvrđeno prilikom određivanja sadržaja šećera u ekstraktima osušenih listova čuvarkuće (**Tabela P5**).

U ekstraktima preparata čuvaruće i meda zabeleženo je očekivano smanjenje ukupnog sadržaja šećera u poređenju sa čistim medom, zbog dodavanja svežih listova čuvaruće koji sadrže veliku količinu vode. Ovaj efekat smanjenja sadržaja šećera je izraženiji u ekstraktima preparata sa livadskim medom. Analizom je potvrđeno smanjenje sadržaja pojedinačnih šećera uz prisustvo nekih izuzetaka (**Slika 25, Tabela P6**). U svim preparatima najzastupljeniji su monosaharidi glukoza i fruktoza, a njihov sadržaj tokom svih pet nedelja niži je od sadržaja u medu od kojeg je preparat napravljen. Što se tiče ostalih šećera, dolazi do povećanja sadržaja gentiobioze, turanoze, maltoze i erloze u ekstraktima preparata sa medom B1 tokom svih pet nedelja u poređenju sa sadržajem ovih šećera u čistom medu B1. U preparatu sa medom B2 dolazi takođe do povećanja gentiobioze, turanoze, maltoze i erloze, ali ne tokom svih pet nedelja. Što se tiče sadržaja šećera u preparatima sa livadskim medom tokom nedelja došlo je do smanjenja sadržaja svih ispitivanih šećera.

4.1.7. Elementalna analiza

U dvadeset uzoraka osušenih listova čuvaruće određen je sadržaj devet mikroelemenata (Bi, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Zn) i sedam makroelemenata (Al, Ca, K, Mg, Na, P, S). Dobijeni rezultati izraženi u mg/kg SM prikazani su u **Tabeli P7** i grafički na **Slici 26**.

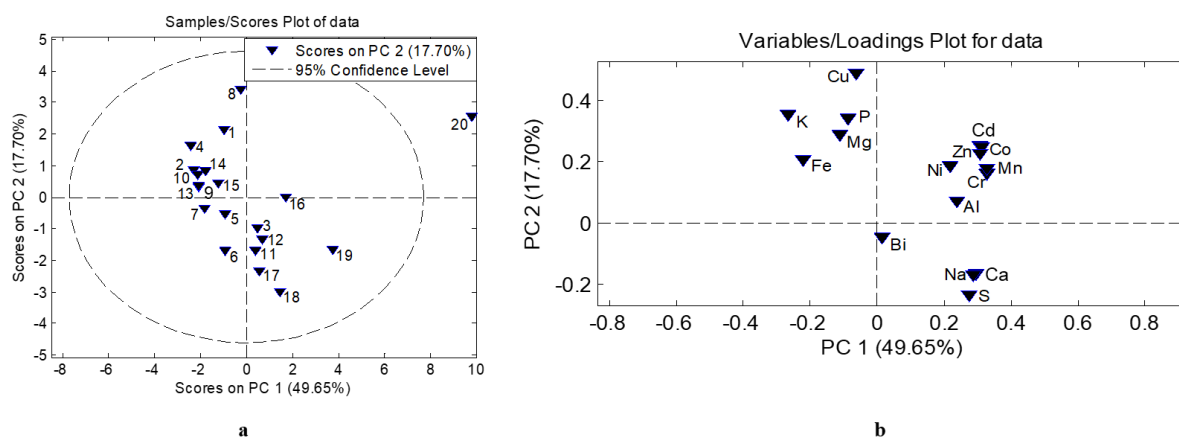


Slika 26. Sadržaj mikroelemenata i makroelemenata u uzorcima osušenih listova čuvaruće

Najzastupljeniji makroelementi u uzorcima listova čuvaruće su Ca (2075 – 6615 mg/kg SM), Mg (1772 – 4263 mg/kg SM) i K (959 – 2623 mg/kg SM) što odgovara prethodno publikovanim rezultatima [64, 67, 69, 122]. Prisustvo ovih elemenata ostvaruje direktan ili indirektan uticaj na fotosintezu. Magnezijum je centralna komponenta molekula hlorofila, dok kalijum i kalcijum imaju uloge u regulaciji otvaranja i zatvaranja stoma [137–139]. Pored navedenog, Mg i K imaju uticaj na aktivaciju i aktivnost *Rubisco* enzima, na formiranje strukture hloroplasta kao i na translokaciju ugljenih hidrata kroz biljku [139]. Prvi put je prilikom ovog ispitivanja kvantifikovan sadržaj P (1630 – 2342 mg/kg SM) i S (669 – 1830 mg/kg SM) u uzorcima listova čuvaruće. Kvantifikovane vrednosti za Na i Al su u opsegu vrednosti koje su ranije publikovane [122]. Najveći ukupan sadržaj makroelemenata određen je u uzorku 19 (15,71 g/kg SM), a zatim sledi uzorak 20 (13,90 g/kg SM). Ukupan sadržaj mikroelemenata najveći je u uzorku 20 (97,20 mg/kg SM) a potom u uzorku 19 (39,19 mg/kg SM) i uzorku 8 (37,02 mg/kg SM). U uzorku 20 kvantifikovano je najviše Mn, Zn i Cr (31,24 mg/kg SM, 18,15 mg/kg SM i 36,81 mg/kg SM, redom). Sadržaj Cr takođe je visok u uzorcima 8 i 19 (14,65 mg/kg SM i 18,06 mg/kg SM, redom). Sadržaj esencijalnih mikroelemenata bakra i gvožđa u uzorcima je u opsegu 2,43 – 6,46 mg/kg SM za Cu i 0,35 – 2,43 mg/kg SM za Fe. Kobalt je u uzorcima prisutan u tragovima, a najviše je prisutan u uzorku 20 (1,35 mg/kg SM). Bizmut je kvantifikovan u svim uzorcima u opsegu 0,26 – 1,19 mg/kg SM. Određen je i sadržaj toksičnih elemenata kadmijuma i nikla. Kadmijum je kvantifikovan u tragovima samo kod osam uzoraka i to u količini manjoj od 0,045 mg/kg SM, osim u uzorku 20 u kojem je kvantifikovano 0,162 mg/kg SM. Sadržaj Ni u uzorcima je 0,36 – 4,04 mg/kg SM. Dozvoljena granica za Cd je utvrđena Smernicama Svetske zdravstvene organizacije (SZO) i iznosi 0,3 mg/kg, dok ne postoji dozvoljena granica za Ni koju navodi SZO [140]. U literaturi se navodi da je prosečan sadržaj Ni u biljkama 0,10 – 5,0 mg/kg SM [141]. Sadržaj toksičnih elemenata Cd i Ni u uzorcima listova čuvaruće je u okviru dozvoljenih

granica. Prethodno objavljeni rezultati ukazuju na postojanje razlika u sadržaju elemenata u uzorcima čuvaruće sakupljenim sa različitih staništa. Sastav elemenata u biljci je pod uticajem ekoloških faktora okruženja u kojem biljka raste, kao i razvojne faze biljke u trenutku sakupljanja [122].

Analiza glavnih komponenta kojom su obrađeni rezultati elementalnog sastava uzoraka osušenih listova čuvaruće dala je model opisan sa pet glavnih komponenta koje opisuju 89,34% ukupnog varijabiliteta među podacima. Prve dve glavne komponente na osnovu kojih su konstruisani grafik skorova i grafik vektora latentnih varijabli (**Slika 27**) opisuju 67,35% ukupnog varijabiliteta (PC1 – 49,65%, PC2 – 17,70%).



Slika 27. Analiza glavnih komponenti rezultata elementalnog sastava: grafik skorova latentnih varijabli (a), grafik vektora latentnih varijabli (b)

Sa grafika skorova se uočava da se određeni uzorci grupišu u gornjem levom kvadrantu, dok se druga grupa uzoraka nalazi u donjem desnom kvadrantu (**Slika 27a**). Obe ove grupe razdvojene su duž obe PC ose, ali ne postoji jasna granica među grupama. Na grafiku vektora latentnih varijabli prikazano je na koji način određeni element utiče na razdvajanje među uzorcima (**Slika 27b**). Uzorak 20 je odvojen od ostalih uzoraka duž PC1 ose, pozicioniran u gornjem desnom kvadrantu van 95% nivoa pouzdanosti Hotellingove elipse. Najveći pozitivni uticaj na razdvajanje uzorka 20 duž PC1 ose imaju varijable Cd, Zn, Co, Mn, Cr, Al, Ni. Navedeni elementi su kvantifikovani u najvećim koncentracijama u uzorku 20 u odnosu na ostale uzorke (**Tabela P7**). Uzorak 19 koji ima najveći ukupan sadržaj kvantifikovanih elemenata, prevashodno zbog visoke količine makroelemenata (15,71 g/kg SM), blago se odvaja od ostalih uzoraka takođe duž PC1 ose u donjem desnom kvadrantu, na osnovu visokog sadržaja Na, Ca i S. U gornjem levom kvadrantu duž PC2 ose odvaja se uzorak 8. U uzorku 8 određena je najveća koncentracija Cu (6,46 mg/kg SM) i K (2623 mg/kg SM), a takođe su i Mg, Fe i P zastupljeni u većim koncentracijama u odnosu na druge uzorke. Na izdvajanje uzorka 8 duž PC2 ose utiču najzastupljeniji elementi (Cu, K, Mg, Fe i P) što se može očitati sa grafika vektora (**Slika 27b**).

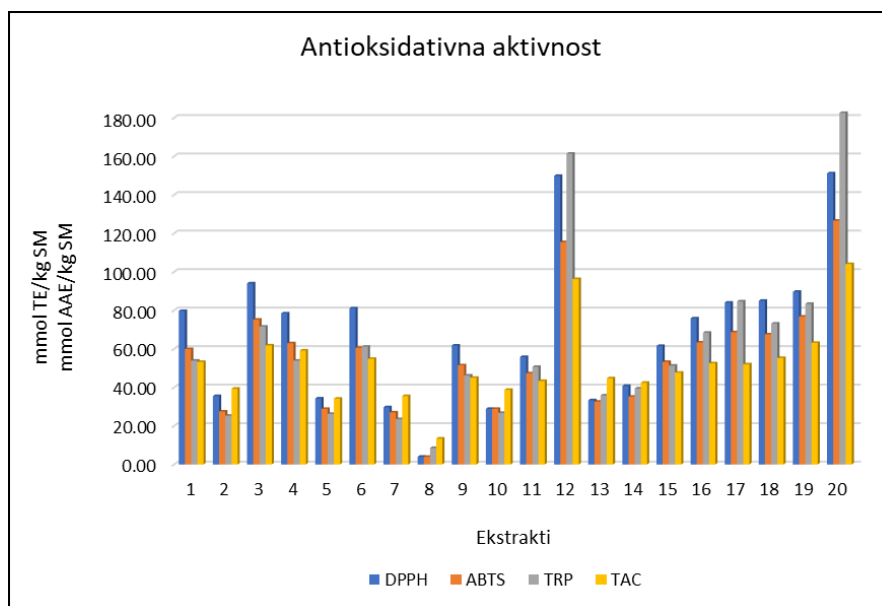
4.2. Biološka aktivnost

4.2.1. Antioksidativna aktivnost

4.2.1.1. Spektrofotometrijsko određivanje antioksidativne aktivnosti

Osušeni listovi čuvarkuće

Antioksidativna aktivnost (AOA) 70% etanolnih ekstrakata osušenih listova čuvarkuće određena je primenom četiri antioksidativna testa – DPPH, ABTS, TRP i TAC. DPPH i ABTS su dva najčešće korišćena testa za ispitivanje antioksidativne aktivnosti. S druge strane, TRP i TAC testovi se ređe koriste, a prvi put su u okviru ove disertacije upotrebljeni za ispitivanje antioksidativne aktivnosti ekstrakata listova čuvarkuće. Rezultati ovih testova prikazani su grafički na **Slici 28** i u **Tabeli P1**.



Slika 28. Antioksidativna aktivnost 70% etanolnih ekstrakata osušenih listova čuvarkuće

Sa grafika se uočava da ekstrakti označeni brojevima 12 i 20 pokazuju najvišu antioksidativnu aktivnost u svim testovima u poređenju sa ostalim analiziranim ekstraktima, dok ekstrakt 8 ispoljava najnižu aktivnost, što je u skladu sa ukupnim sadržajem fenola u ovim ekstraktima (**Slika 28**). Rezultati su u saglasnosti sa ranijim istraživanjima koja su potvrdila da fenolna jedinjenja predstavljaju glavne bioaktivne komponente odgovorne za ispoljavanje antioksidativne aktivnosti ekstrakata čuvarkuće [134]. DPPH i ABTS testovi, koji funkcionišu sličnim molekulskim mehanizmima (SET ili SET+HAT), daju konzistentne rezultate antioksidativne aktivnosti, u rasponu od 3,99 do 151,12 mmol TE/kg SM za DPPH test, i od 3,93 do 126,57 mmol TE/kg SM za ABTS test. Antioksidativna aktivnost dobijena TRP testom (SET mehanizam) i TAC testom (SET ili HAT mehanizam) varira od 8,54 do 182,50 mmol AAE/kg SM i od 13,43 do 104,05 mmol TE/kg SM, redom. Ovi podaci ističu značaj odabira specifičnih testova i metoda za određivanje antioksidativne aktivnosti, jer omogućavaju preciznije tumačenje uticaja fenolnih jedinjenja na biološku aktivnost ekstrakata.

Placer (*Platzer*) i saradnici su ispitali antioksidativnu aktivnost različitih fenolnih jedinjenja, uključujući fenolne kiseline, flavonole, flavanole i flavanone, koristeći DPPH i ABTS testove [142]. Utvrđeno je da antioksidativna svojstva fenolnih kiselina zavise prvenstveno od broja hidroksilnih grupa, pri čemu su kiseline sa više OH grupa pokazale jaču aktivnost. Najveću aktivnost imala je galna kiselina, a derivati hidroksibenzoeve kiseline pokazali su veću aktivnost od derivata hidroksicimetne kiseline. Kod flavonola, jedinjenja sa kateholnom grupom na B-prstenu, poput kvercetina, imala su jaču aktivnost od onih bez kateholne grupe, kao što je kempferol. Prisustvo šećerne komponente u molekulu kvercetina imalo je minimalan uticaj na aktivnost u DPPH testu, ali je imalo negativan uticaj u ABTS testu. Epikatehin je pokazao visoku antioksidativnu aktivnost u oba

testa. Generalno, antioksidativna aktivnost zavisi od strukture jedinjenja, uključujući broj i poziciju OH grupa, prisustvo metoksi ili glikozidnih ostataka, kao i njihovih međusobnih interakcija u različitim rastvaračima, što je uticalo na brzinu i efikasnost reakcija [142].

Prilikom spektrofotometrijskog ispitivanja nije moguće precizno odrediti koja su pojedinačna jedinjenja odgovorna za ispoljavanje antioksidativne aktivnosti, jer dobijeni rezultati reflektuju celokupan sadržaj ekstrakta. Kompleksnost biljnih ekstrakata, koji često sadrže stotine do hiljade bioaktivnih komponenata, dovodi do toga da se ukupni efekat zasniva na međusobnom delovanju svih prisutnih jedinjenja. Zbog toga, rezultati spektrofotometrijskih testova reflektuju kombinovani učinak svih komponenata ekstrakta, što otežava identifikaciju pojedinačnih jedinjenja koja doprinose antioksidativnoj aktivnosti. Ipak, ranija istraživanja pokazuju da oligomerni polifenoli imaju najveći doprinos antioksidativnoj aktivnosti ekstrakata čuvarkuće. Kempferol, kvercetin i njihovi glikozidi kao najzastupljenija jedinjenja, doprinose ispoljavanju antioksidativne aktivnosti ovih ekstrakata [42].

Stepen linearne zavisnosti između ukupnog sadržaja fenola i antioksidativne aktivnosti predstavljen je Pirsonovim (*Pearson*) koeficijentom korelacije (R^2) (**Tabela 4**).

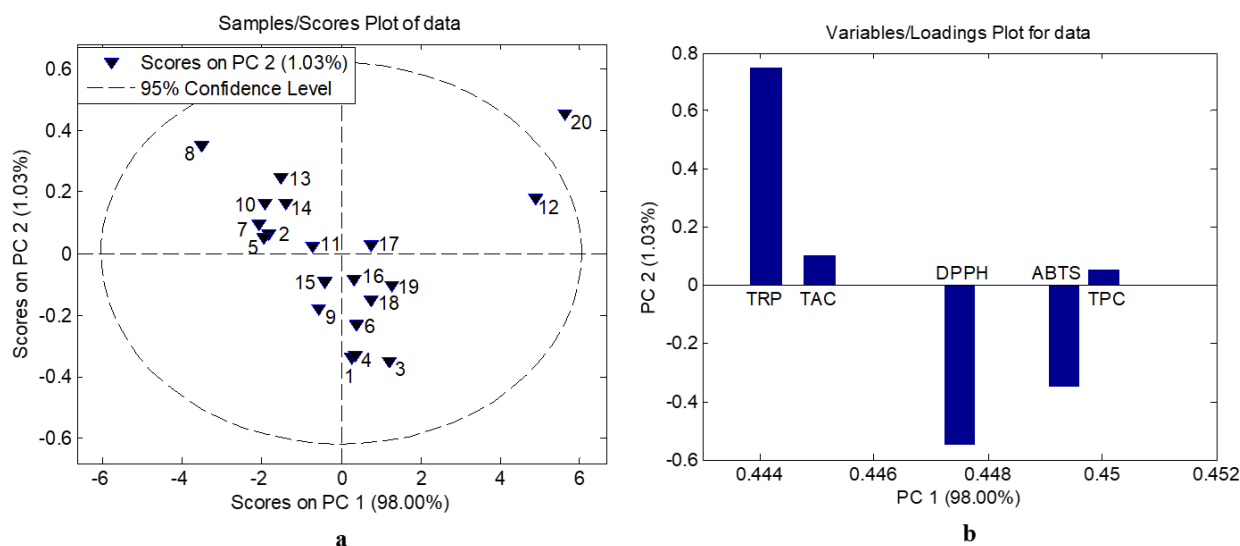
Tabela 4. Korelacija između ukupnog sadržaja fenola i antioksidativne aktivnosti

R^2	DPPH	ABTS	TRP	TAC
TPC	0,9745	0,9750	0,9645	0,9491
DPPH		0,9892	0,9131	0,9328
ABTS			0,9346	0,9496
TRP				0,9256

Prema literaturi, postoji dobra linearna zavisnost između ukupnog sadržaja fenola i rezultata antioksidativnih testova koji se zasnivaju na SET mehanizmu [143]. U okviru ovog istraživanja svi primenjeni antioksidativni testovi (DPPH, ABTS, TRP i TAC) temelje se na SET mehanizmu ili kombinaciji SET i HAT mehanizama, što objašnjava očekivanu dobru linearnu zavisnot među testovima. Vrednosti korelacionog koeficijenta iznad 0,9 potvrđuju postojanje značajne linearne zavisnosti, što je u skladu sa ranije objavljenim rezultatima [64, 67]. Takođe, vrednosti antioksidativne aktivnosti pojedinačnih testova međusobno su dobro korelisane, što ukazuje na konzistentnost rezultata kroz različite testove.

Alberti (*Alberti*) i saradnici su ispitali antioksidativnu aktivnost (IC_{50}) frakcija 80% metanolnih ekstrakata listova čuvarkuće pomoću DPPH testa i zaključili da je antioksidativna aktivnost celog ekstrakta pre frakcionisanja veća u poređenju sa zbirom antioksidativnih aktivnosti pojedinačnih frakcija [32]. Ovi rezultati potvrđuju prisustvo sinergističkih efekata među prisutnim jedinjenjima u celokupnom ekstraktu listova čuvarkuće, što naglašava značaj interakcija između fenolnih komponenata u ostvarivanju punog antioksidativnog potencijala.

Analizom glavnih komponenata istovremeno su obrađeni rezultati antioksidativne aktivnosti dobijeni primenom četiri antioksidativna testa (DPPH, ABTS, TRP i TAC) i rezultati za TPC jer postoji direktna povezanost između ukupnog sadržaja fenola i antioksidativne aktivnosti ekstrakata [30]. Ukupna varijabilnost podataka opisana je sa dve glavne komponente i iznosi 99,03%, od čega PC1 opisuje 98,00% varijabiliteta, a PC2 opisuje 1,03% varijabiliteta. Grafik skorova i grafik vektora latentnih varijabli prikazani su na **Slici 29**.

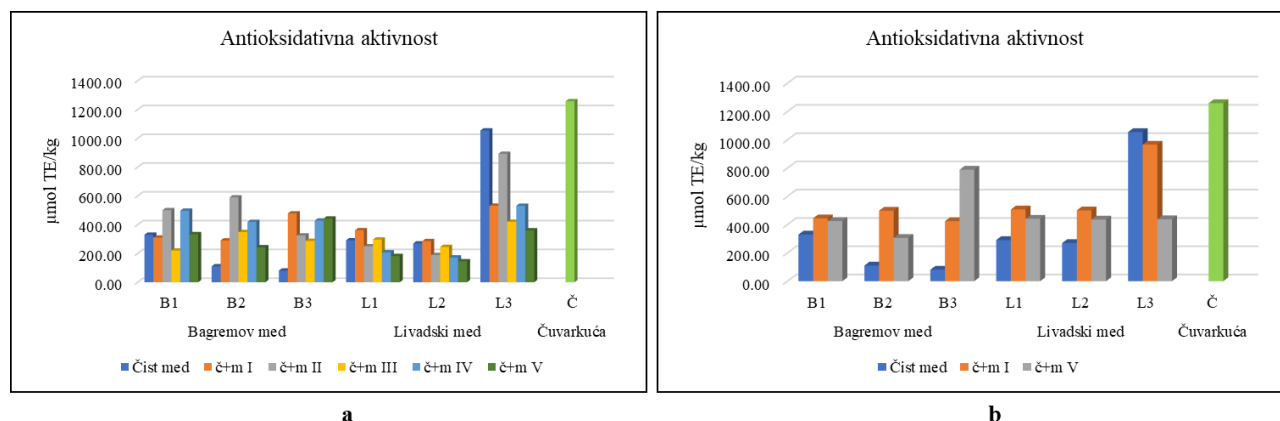


Slika 29. Analiza glavnih komponenta rezultata antioksidativne aktivnosti: grafik skorova latentnih varijabli (a), grafik vektora latentnih varijabli (b)

Na grafiku skorova latentnih varijabli (Slika 29a) uočava se izdvajanje ekstrakata 8, 12 i 20 u odnosu na ostale ekstrakte, s tim što je ekstrakt 20 pozicioniran izvan 95% nivoa pouzdanosti Hotellingove elipse. Kao što je ranije pomenuto, ekstrakti 12 i 20 imaju najviše vrednosti TPC, kao i najveću AOA (Tabela P1) što ih odvaja od ostalih ekstrakata na grafiku skorova. Ova dva ekstrakta pozicionirani su u desnom gornjem kvadrantu i odvojeni su od ostalih ekstrakata duž PC1 ose. S druge strane, najniži sadržaj TPC i najniža vrednost AOA ekstrakta 8 (Tabela P1) utiču na njegovo pozicioniranje u gornjem levom kvadrantu, takođe odvojen od ostalih ekstrakata duž PC1 ose. Sa leve strane duž PC1 ose na grafiku skorova pozicionirani su ekstrakti koji imaju niže vrednosti AOA u poređenju sa ekstraktima koji su pozicionirani sa desne strane duž PC1 ose.

Preparati čuvarkuće i meda, sveži listovi čuvarkuće i čist med

Antioksidativna aktivnost ekstrakata meda, svežih listova čuvarkuće i preparata čuvarkuće i meda određena je DPPH testom. Dobijene vrednosti prikazane su grafički na Slici 30 i u Tabeli P8.



Slika 30. Antioksidativna aktivnost određena u ekstraktima preparata pripremljenim zakišljenom vodom (I-V nedelja) (a) i u ekstraktima preparata pripremljenim bez rastvarača (I i V nedelja) (b)

AOA bagremovog meda iznosi 329,81 µmol TE/kg (B1), 110,37 µmol TE/kg (B2) i 80,89 µmol TE/kg (B3), dok su vrednosti AOA livadskog meda 291,14 µmol TE/kg (L1), 269,51 µmol TE/kg (L2) i 1054,46 µmol TE/kg (L3). Visoku AOA ima ekstrakt svežih listova čuvarkuće pripremljen sa zakišljenom vodom (1257,27 µmol TE/kg), kao i ekstrakt pripremljen bez rastvarača (1259,14 µmol TE/kg) (Slika 30, Tabela P8).

Dodavanje svežih listova čuvarkeće u med ispoljilo je različiti uticaj na AOA preparata. Kod preparata sa bagremovim medom dodatak čuvarkeće uticao je na povećanje AOA u poređenju sa čistim medom, pri čemu je najveće povećanje primećeno u preparatima pripremljenim sa medovima B2 i B3. Nasuprot tome, kod preparata sa livadskim medom, dodatak svežih listova čuvarkeće doveo je do smanjenja AOA u poređenju sa čistim medom. Preparati pripremljeni bez korišćenja rastvarača pokazali su višu AOA, osim u slučaju preparata sa medom L3, kod koga je zabeleženo smanjenje.

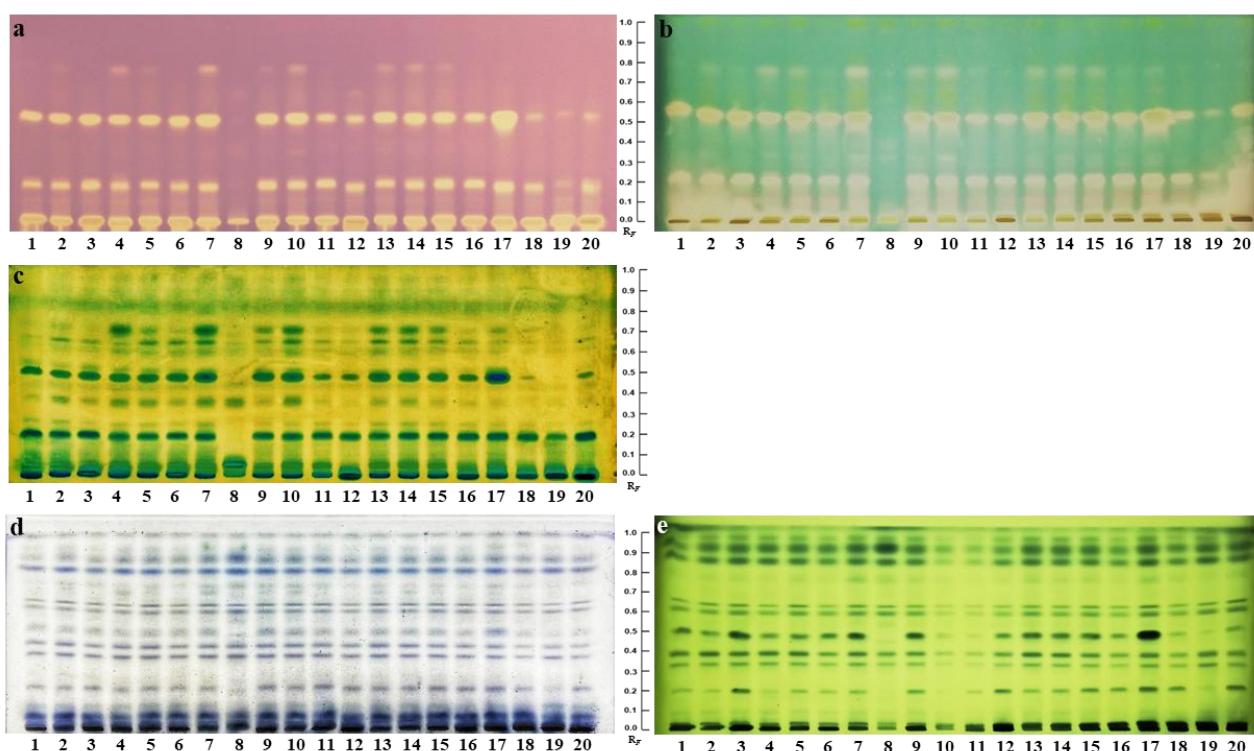
Rezultati AOA su u direktnoj korelaciji sa rezultatima dobijenim za TPC. Veći ukupan sadržaj fenola povezan je sa jačim ispoljavanjem antioksidativne aktivnosti ekstrakata. Ekstrakti svih preparata pripremljeni bez rastvarača pokazali su veću AOA u prvoj i petoj nedelji ispitivanja u poređenju sa ekstraktima istih preparata koji su pripremljeni sa zakišljenom vodom. Ovakvi rezultati potvrđuju da je preparat stabilan tokom celog perioda ispitivanja. Pored toga, način pripreme ekstrakata bez korišćenja rastvarača daje verodostojniji uvid u antioksidativnu aktivnost, s obzirom na to da je to način na koji se preparat primenjuje u tradicionalnoj medicini.

4.2.1.2. HPTLC–antioksidativni testovi

Osušeni listovi čuvarkeće

U okviru ovog ispitivanja prvi put je određena AOA pojedinačnih, razdvojenih jedinjenja prisutnih u 70% etanolnim ekstraktima osušenih listova čuvarkeće na HPTLC pločama. Pored toga, dva potpuno nova antioksidativna testa prvi put su optimizovana i razvijena HPTLC tehnikom (HPTLC–TRP i HPTLC–TAC) [135].

HPTLC profil ekstrakata osušenih listova čuvarkeće razvijen je prethodno pomenutom mobilnom fazom toluen : etil–acetat: mravlja kiselina u zapreminskom odnosu 5:4:1 (v/v/v), a zatim je svaka HPTLC ploča derivatizovana odgovarajućim rastvorom u cilju dobijanja HPTLC antioksidativnih profila. Dobijeni hromatogrami prikazani su na **Slici 31**.



Slika 31. HPTLC antioksidativni profili ekstrakata listova čuvarkeće slikani pod vidljivim svetlom: HPTLC–DPPH (a), HPTLC–ABTS (b), HPTLC–TRP (c), HPTLC–TAC (d) i HPTLC–FC (e)

Na HPTLC–DPPH hromatogramu zone aktivnih jedinjenja manifestuju se kao žute trake na ljubičastoj pozadini (**Slika 31a**). Najjači intenzitet pokazuju zona galne kiseline (GA) i jedinjenje koje se nalazi na hR_F 18. Takođe se može uočiti slaba aktivnost zone na kojoj je identifikovan kempferol (KAE). Početna zona svih ekstrakata, osim ekstrakta 8, pokazuje jaku AOA što se pripisuje visoko polarnim jedinjenjima kao što su polihidroksiflavonski glikozidi supstituisani sa jednim, dva ili tri molekula šećera.

Aktivna jedinjenja na HPTLC–ABTS hromatogramu su ispoljena kao zone belo-žute boje naspram tirkizne pozadine (**Slika 31b**). Na HPTLC–ABTS hromatogramu najjači intenzitet su ispoljile zona GA i jedinjenje na hR_F 18, kao i početna zona. Zona koja odgovara KAE može se uočiti u svim ekstraktima i nešto je jačeg intenziteta u poređenju sa zonom KAE koja se javlja na HPTLC–DPPH hromatogramu. Pored navedenog, uočava se da slabu AOA pokazuje i jedinjenje koje se nalazi na hR_F 33.

Plave zone na žutoj pozadini predstavljaju jedinjenja koja ispoljavaju AOA na HPTLC–TRP hromatogramu (**Slika 31c**). Na osnovu intenziteta plave boje GA i jedinjenje na hR_F 18 ispoljavaju najjaču AOA. I na ovom hromatogramu se uočava aktivna zona KAE različitog intenziteta u zavisnosti od koncentracije ovog jedinjenja u ekstraktima. Najintenzivnije ispoljena zona KAE nalazi se u ekstraktima 4 i 7. Neidentifikovano jedinjenje na hR_F 6 se prvi put jasno uočava na ovom hromatogramu, a najjaču AOA ispoljava u ekstraktu 8.

Na HPTLC–TAC hromatogramu uočava se veliki broj zona aktivnih jedinjenja duž celog hromatograma (**Slika 31d**). Najintenzivnije su zone neidentifikovanih jedinjenja koja se nalaze na hR_F 33, 38, 86 i 92. Na ovom hromatogramu se može uočiti i zona GA koja ispoljava AOA ali dosta slabijeg intenziteta u poređenju sa intenzitetom na ostalim HPTLC antioksidativnim hromatogramima.

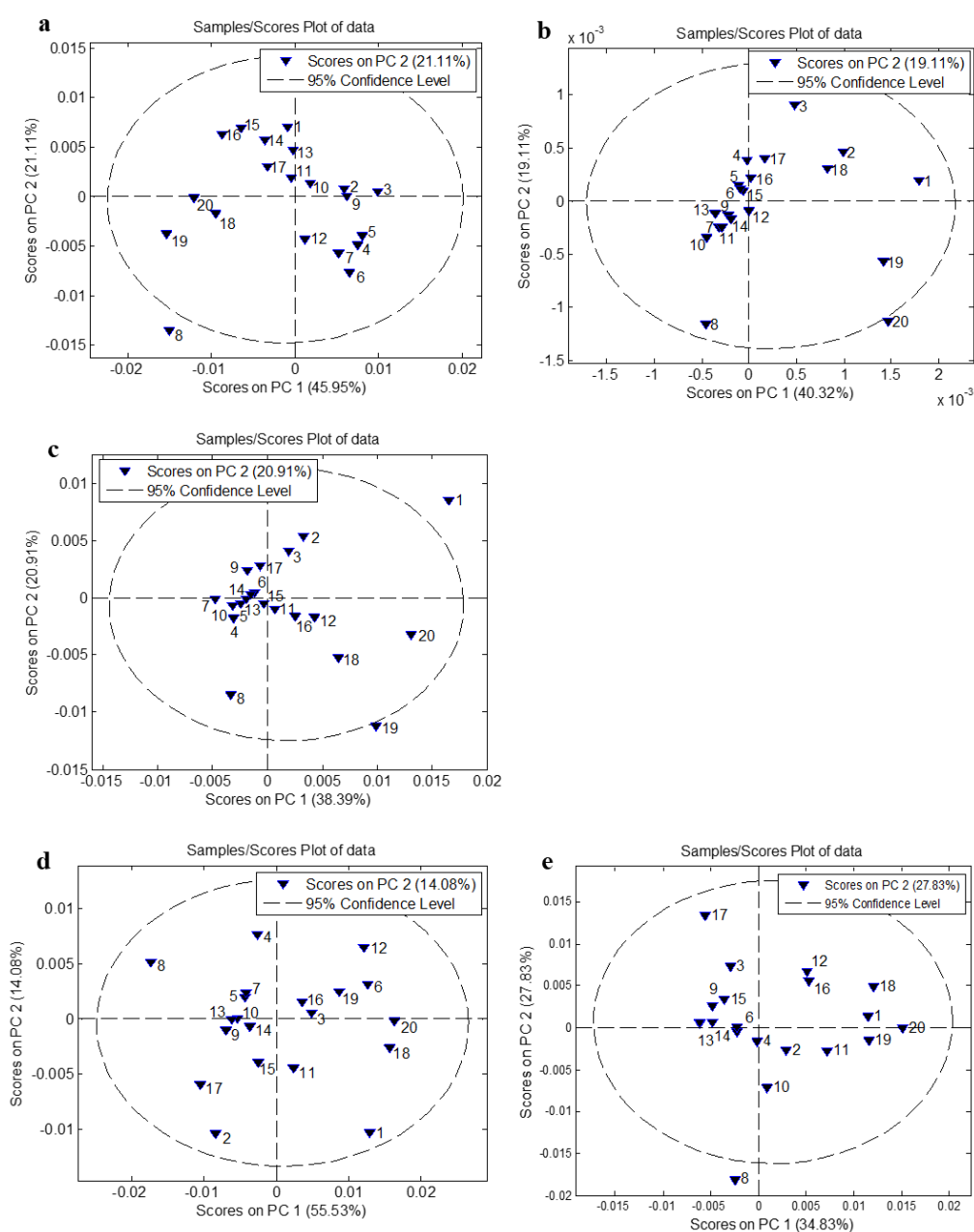
Na hromatogramu dobijenom HPTLC–FC testom formiraju se zone aktivnih jedinjenja koje su plave boje na žutoj pozadini (**Slika 31e**). Galna kiselina daje zonu najjačeg intenziteta u ekstraktu 17. Pored GA, aktivna jedinjenja nalaze se na hR_F 33, 38, 86 i 92.

HPTLC–DPPH i HPTLC–ABTS hromatogrami pokazali su slične antioksidativne profile jedinjenja koja ispoljavaju AOA. Jači intenzitet zona aktivnih jedinjenja na hromatogramu koji je derivatizovan ABTS reagensom ukazuje na to da je ovaj test osetljiviji, što je i ranije potvrđeno [103]. Profil dobijen na HPTLC–TRP hromatogramu podseća na prethodna dva hromatograma, s tim što se ispoljavaju zone nekoliko novih, aktivnih, neidentifikovanih jedinjenja. Ova tri hromatograma izgledom najviše podsećaju na hromatogram fenolnog profila nakon derivatizacije rastvorima NEU+PEG (**Slika 19a**). S druge strane, HPTLC–TAC i HPTLC–FC hromatogrami na kojima se pojavljuje veliki broj zona aktivnih jedinjenja su međusobno veoma slični. Svojim izgledom podsećaju na hromatogram koji je dobijen derivatizacijom rastvorom anisaldehida (**Slika 19b**). Ovo ukazuje na to da su rastvori koji se koriste za derivatizaciju hromatograma u slučaju HPTLC–TAC i HPTLC–FC testa neselektivni i iz tog razloga reaguju sa većim brojem različitih jedinjenja čija se AOA manifestuje u većem broju aktivnih zona. Oba ova testa su vremenski i temperaturno zavisna.

Antioksidativni odgovor, procenjen direktnim HPTLC–AO testovima, zavisi od nekoliko faktora, uključujući potencijal pojedinačnih jedinjenja da ispolje antioksidativnu aktivnost. Efikasnost aktivnih jedinjenja, kao i intenzitet njihovih zona na hromatogramu, mogu da zavise od koncentracije jedinjenja u određenoj zoni, interakcije sa stacionarnom fazom, kao i od reakcije sa derivatizacionim reagensom. Ciesla i saradnici su istakli značaj izbora stacionarne faze za ispoljavanje antioksidativne aktivnosti pojedinačnih fenolnih jedinjenja [144]. Na stacionarnoj fazi silika–gela, fenolne kiseline, uključujući galnu kiselinu (GA), ispoljavaju najintenzivniju antioksidativnu aktivnost [144], pri čemu se u okviru ovog ispitivanja zona GA pojavljuje kao dominantno aktivna u svim ekstraktima.

Razlike u rezultatima antioksidativne aktivnosti dobijenim spektrofotometrijskim testovima i HPTLC metodom mogu se objasniti različitim pristupom: spektrofotometrijski testovi procenjuju antioksidativnu aktivnost celokupnog ekstrakta, gde dolazi do međusobnih sinergističkih ili antagonističkih efekata svih prisutnih jedinjenja. Nasuprot tome, HPTLC metoda omogućava evaluaciju aktivnosti pojedinačnih razdvojenih jedinjenja ili frakcija, što može dovesti do različitih rezultata u pogledu antioksidativnog odgovora. Ovakav kombinovani pristup ne samo da pruža uvid u složeni hemijski profil ekstrakata, već i omogućava identifikaciju ključnih bioaktivnih jedinjenja koja doprinose ukupnoj antioksidativnoj aktivnosti.

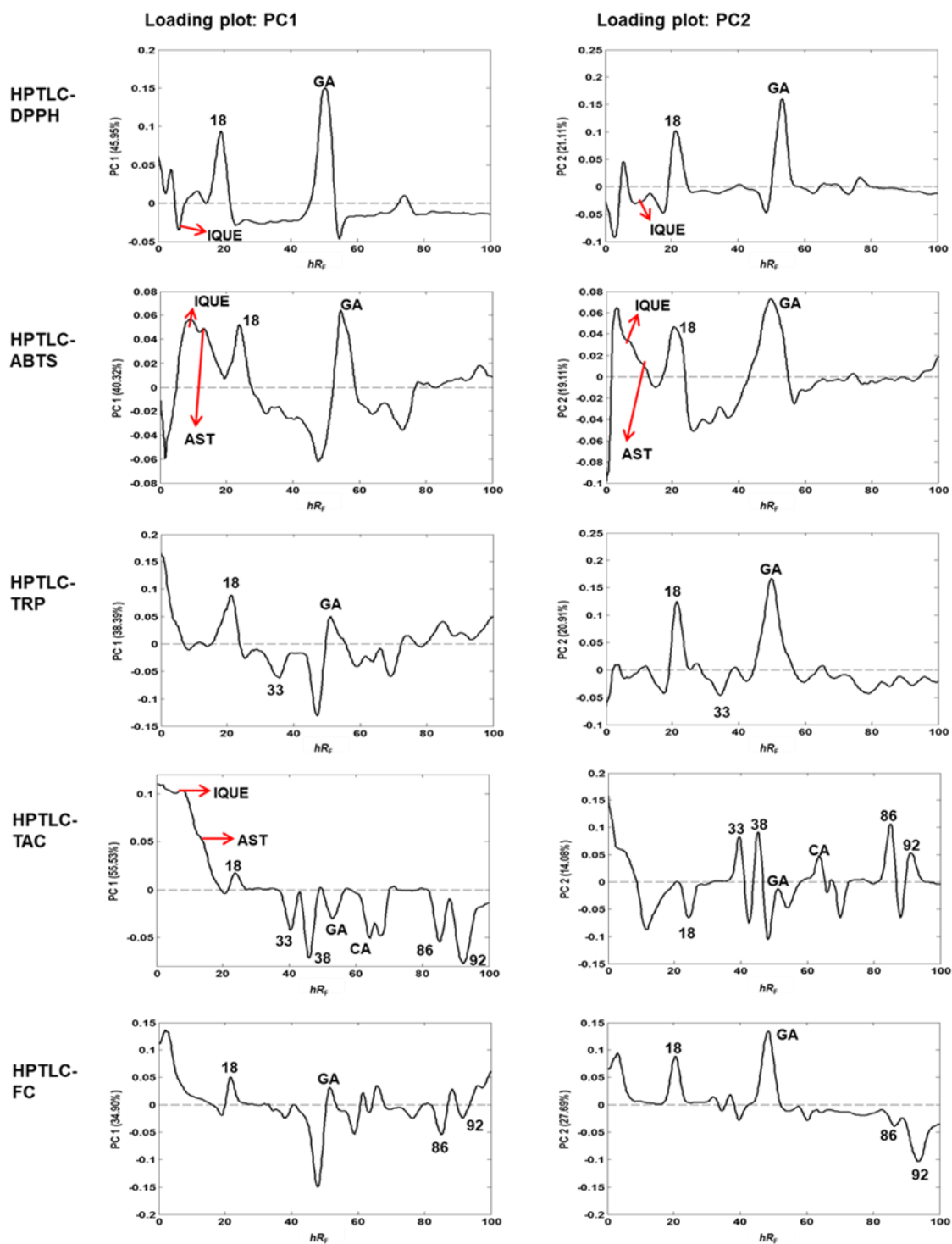
Analizom glavnih komponenata za svaki pojedinačno obrađeni hromatogram dobijeni su modeli opisani sa četiri glavne komponente. Procenat varijabiliteta koji je opisan glavnim komponentama pojedinačnih hromatograma dat je u **Tabeli P9**. Grafici skorova (**Slika 32**) i vektora (**Slika 33**) latentnih varijabli konstruisani su na osnovu prve dve glavne komponente PC1 i PC2.



Slika 32. Grafici skorova latentnih varijabli konstruisani na osnovu glavnih komponenata PC1 i PC2 za svaki pojedinačni HPTLC antioksidativni hromatogram: HPTLC–DPPH (a), HPTLC–ABTS (b), HPTLC–TRP (c), HPTLC–TAC (d) i HPTLC–FC (e)

Grafici skorova latentnih varijabli za hromatograme HPTLC–DPPH, HPTLC–ABTS i HPTLC–TRP pokazuju slične obrasce razdvajanja među ekstraktima (**Slika 32a, b, c**). Ekstrakti 18, 19 i 20 formiraju grupu u donjem levom kvadrantu (**Slika 32a**), dok su isti ovi ekstrakti pojedinačno raspoređeni na preostala dva grafika skorova latentnih varijabli (**Slika 32b, c**). Na granici 95% nivoa pouzdanosti Hotellingove elipse nalaze se ekstrakt 20 na HPTLC–ABTS grafiku skorova (**Slika 32b**) kao i ekstrakt 19 na HPTLC–TRP grafiku skorova (**Slika 32c**). Na HPTLC–ABTS grafiku skorova uočava se izdvajanje ekstrakata 1 – 3 od ostalih ekstrakata, dok je ekstrakt 1 pozicioniran izvan granica 95% nivoa pouzadnosti Hotellingove elipse na HPTLC–TRP grafiku skorova. Ekstrakt 8 pozicioniran je u donjem levom kvadrantu na sva tri grafika skorova tako da je odvojen od svih ostalih ekstrakata, a na HPTLC–DPPH grafiku skorova pozicioniran je izvan granica Hotellingove elipse. Ostali ekstrakti su grupisani u centralnom delu ova tri grafika skorova (**Slika 32a, b, c**). Sa grafika vektora latentnih varijabli za ova tri HPTLC antioksidativna testa (**Slika 33**) uočava se da najvažniji uticaj na ovakvu klasifikaciju ekstrakata duž obe ose imaju GA i jedinjenje na hR_F 18. Pored toga, IQUE i AST imaju uticaj na razdvajanje ekstrakata kod HPTLC–ABTS testa, dok jedinjenje na hR_F 33 ima uticaj na razdvajanje ekstrakata u slučaju HPTLC–TRP testa.

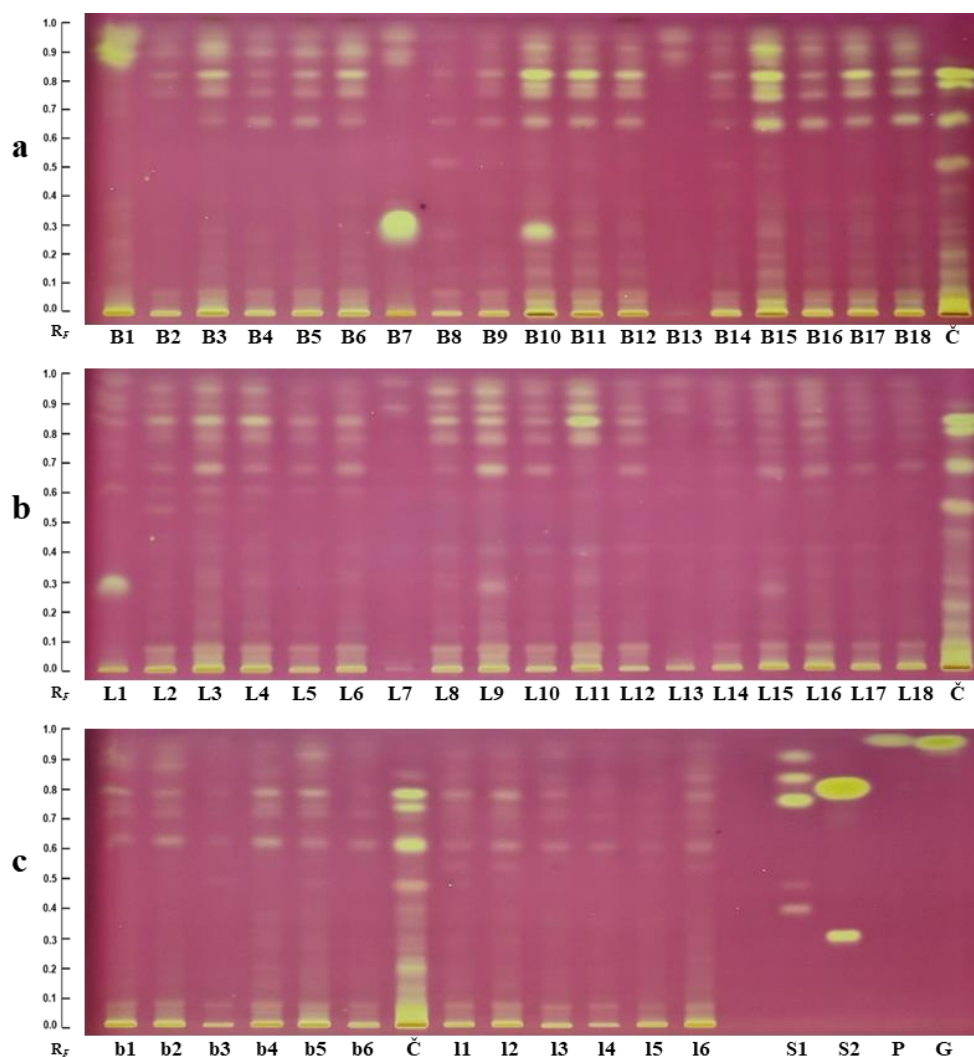
Na graficima skorova za HPTLC–TAC i HPTLC–FC hromatograme (**Slika 32d, e**) uočava se da su ekstrakti široko raspoređeni duž obe ose. Ekstrakt 8 se izdvaja od ostalih ekstrakata i nalazi se van granica Hotellingove elipse na grafiku skorova za HPTLC–FC hromatogram (**Slika 32e**). Na razdvajanje ekstrakata utiče veći broj zona aktivnih jedinjenja koje se pojavljuju na HPTLC–TAC i HPTLC–FC hromatogramima, što dovodi do toga da ekstrakti ne formiraju jasne grupe, ali se može uočiti da se neki ekstrakti ipak izdvajaju u odnosu na druge. Grafici vektora latentnih varijabli ističu da su GA, kao i neidentifikovana jedinjenja na hR_F 18, 86 i 92, markeri koji imaju uticaj na razdvajanje ekstrakata duž obe ose za ova dva testa (**Slika 33**). Pored toga, na razdvajanje ekstrakata na grafiku skorova za HPTLC–TAC hromatogram utiču i IQUE, AST, CA kao i neidentifikovana jedinjenja na hR_F 33 i 38. Ovakvi rezultati potvrđuju da drugačija jedinjenja ispoljavaju AOA na HPTLC–TAC i HPTLC–FC hromatogramima u poređenju sa rezultatima dobijenim sa HPTLC–DPPH, HPTLC–ABTS i HPTLC–TRP hromatograma.



Slika 33. Grafici vektora latentnih varijabli konstruisani na osnovu glavnih komponenata PC1 i PC2 za svaki pojedinačni HPTLC antioksidativni hromatogram

Preparati čuvarkuće i meda, sveži listovi čuvarkuće i čist med

Antioksidativna aktivnost ekstrakata meda, svežih listova čuvarkuće i preparata čuvarkuće i meda određena je HPTLC metodom, koristeći rastvor DPPH reagensa za derivatizaciju hromatograma i vizualizaciju zona aktivnih jedinjenja koje su manifestovane kao žute zone naspram ljubičaste pozadine. Rezultati HPTLC–DPPH antioksidativnog testa prikazani su na **Slici 34**.

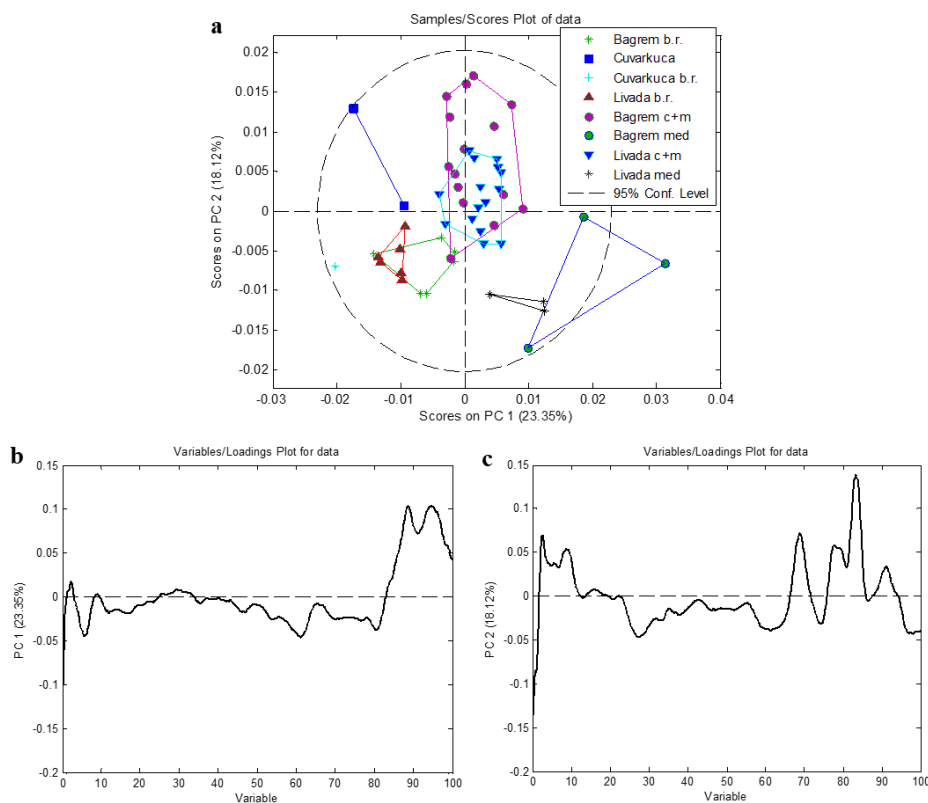


Slika 34. HPTLC–DPPH antioksidativni profil dokumentovan pod vidljivim svetlom: ekstrakti preparata sa bagremovim medom pripremljeni sa zakišljenom vodom (**a**), ekstrakti preparata sa livadskim medom pripremljeni sa zakišljenom vodom (**b**), ekstrakti preparata sa bagremovim i livadskim medom pripremljeni bez rastvarača, S1 – smeša standarda izokvercetina (IQUE), astragalina (AST), galne kiseline (GA), kofeinske kiseline (CA) i kempferola (KAE), S2 – smeša standarda neohlorogene kiseline (NCGA) i eskuletina (AET), P – pinocembrin, G – galangin (**c**)

Ekstrakti čistog bagremovog meda ispoljavaju zone jačeg intenziteta od ekstrakata čistog livadskog meda (**Slika 34**). Dominantne zone koje ispoljavaju AOA u ekstraktu B1 su jedinjenja hR_F 84 (AET), 87 (CA) i 96 (G). Ova tri jedinjenja uočavaju se kao aktivne zone slabijeg intenziteta i u druga dva ekstrakta bagremovog meda B7 i B13. Zona NCGA pokazuje najjaču AOA u ekstraktu B7, dok se u ekstraktima B1 i B13 ne uočava njena aktivnost (**Slika 34a**). S druge strane, zone aktivnih jedinjenja ekstrakata čistog livadskog meda su slabije. U sva tri ekstrakta livadskog meda (L1, L7 i L13) uočava se jako slaba AOA jedinjenja AET, CA i G. Pored ovih jedinjenja, u ekstraktu L1 se uočava najjača aktivnost zone NCGA (**Slika 34b**). Ekstrakti čuvarkuće imaju najbogatiji AOA profil u kojem se uočava veći broj zona aktivnih jedinjenja. Najveću aktivnost pokazuju zone na hR_F 67, 73 i 79 (GA), a nešto slabijeg intenziteta su zone na hR_F 45 (IQUE) i 54 (AST).

Na sva tri hromatograma se uočava sličan obrazac u antioksidativnom profilu ekstrakata preparata čuvarkuće i meda (**Slika 34**). Profil sa najintenzivnijim zonama imaju ekstrakti preparata od bagremovog meda iz grupe B14–B18, zatim ekstrakti B8–B12 i najslabiji antioksidativni profil imaju ekstrakti B2–B6. Zona GA pokazuje najjaču AOA u svim ekstraktima preparata sa bagremovim medom. Zone u ekstraktu B10 su najjače u poređenju sa ostalim ekstraktima iz te grupe (B8–B12), i pored GA, uočava se jaka aktivna zona NCGA koja potiče iz meda od kojeg je preparat napravljen (B7). U grupi ekstrakata B14–B18 najjače zone ima ekstrakt B15, u kome pored GA, jak intenzitet ispoljavaju i zone na hR_F 67, 73, 79 (GA) i 87 (CA), kao i zona na hR_F 71, koja se uočava i na fenolnom profilu ekstrakata preparata, ali je nema u ekstraktima medova (**Slika 21a**, **Slika 34a**). Antioksidativni profil ekstrakata preparata sa livadskim medom ima veliki broj zona aktivnih jedinjenja slabijeg intenziteta. Najveća AOA ispoljena je u ekstraktima L8–L12, a najslabija u ekstraktima L14–L18. Aktivne zone različitog intenziteta mogu se uočiti u svim ekstraktima na hR_F 67, 79 (GA), 87 (CA) i 96 (G). Ekstrakti L3 i L4 daju zone jačeg intenziteta u poređenju sa ostalim ekstraktima iz te grupe (L2–L6). Najjači intenzitet imaju zone GA i G, dok se u ekstraktu L3 po intenzitetu izdvaja i zona na hR_F 67. U grupi ekstrakata L8–L12, ekstrakti L9 i L11 ispoljavaju najveći broj zona (L9) ili zone najvećeg intenziteta (L11). U ekstraktu L9 uočavaju se zone na hR_F 31 (NCGA) i 67 koje ispoljavaju najjaču AOA u poređenju sa drugim ekstraktima iz ove grupe. U ekstraktu L11 zona GA pokazuje najjači intenzitet u odnosu na ostale ekstrakte iz ove grupe, ali i u odnosu na sve ostale ekstrakte preparata sa livadskim medom (**Slika 34b**). Na antioksidativnom profilu ekstrakata sa bagremovim i sa livadskim medom koji su pripremljeni bez korišćenja rastvarača zone aktivnih jedinjenja su slabije ispoljene (**Slika 34c**). U većini ovih ekstrakata pored jedinjenja u početnoj zoni, najaktivnija je zona GA, a zatim zona jedinjenja na hR_F 67.

PCA model opisan je sa šest glavnih komponenata koje opisuju 76,50% ukupnog varijabiliteta među podacima (PC1 – 23,35%, PC2 – 18,12%, PC3 – 14,44%, PC4 – 8,68%, PC5 – 6,85% i PC6 – 5,06%). Grafik skorova latentnih varijabli konstruisan na osnovu komponenti PC1 i PC2, kao i grafici vektora latentnih varijabli prikazani su na **Slici 35**.



Slika 35. Analiza glavnih komponenata HPTLC–DPPH hromatograma: grafik skorova latentnih varijabli (a), grafik vektora latentnih varijabli za PC1 (b), grafik vektora latentnih varijabli za PC2 (c)

Na grafiku skorova latentnih varijabli uočava se međusobno razdvajanje ekstrakata čistih medova i čiste čuvaruće od ekstrakata preparata čuvaruće i meda (**Slika 35a**). Svi ekstrakti čistih medova nalaze se u donjem desnom kvadrantu na grafiku skorova latentnih varijabli. Ekstrakti bagremovog meda ne formiraju uniformnu grupu i međusobno se odvajaju zbog ispoljavanja različitih aktivnih zona. Ekstrakt B1 se nalazi izvan granica 95% nivoa pouzdanosti Hotellingove elipse. Ekstrakti B1 i B7 razdvajaju se na osnovu zona na $hR_F > 80$ koje su aktivnije u ekstraktu B1 i na osnovu zone na $hR_F < 31$ (NCGA) koja je dominantna u ekstraktu B7. Svi ekstrakti livadskog meda formiraju uniformnu grupu. Ekstrakt L1 ima najjače izraženu zonu NCGA, dok ekstrakti L7 i L13 imaju sličan AO profil bez izdvajanja neke karakteristične zone. Ekstrakti čuvaruće sa zakišljenom vodom pozicionirani su u gornjem levom kvadrantu, dok se ekstrakt čuvaruće bez rastvarača nalazi u donjem levom kvadrantu. Ovi ekstrakti odvojeni su duž PC2 ose.

PCA modelom ekstrakti preparata čuvaruće i meda razdvojeni su na osnovu načina pripreme ekstrakata – sa zakišljenom vodom ili bez rastvarača. U ovom slučaju izbor meda od kojeg su napravljeni preparati nije imao uticaj na razdvajanje ekstrakata. Ekstrakti preparata sa zakišljenom vodom pozicionirani su u centralnom i pretežno gornjem delu grafika skorova latentnih varijabli. U donjem levom kvadrantu pozicionirani su ekstrakti preparata pripremljeni bez rastvarača. Ekstrakti preparata sa livadskim medom pripremljeni i sa zakišljenom vodom i bez rastvarača daju uniformnije grupe na grafiku skorova latentnih varijabli iz razloga što su njihovi AO profili veoma slični, gde nijedna aktivna zona ne dolazi do izražaja. Na AO profilima ekstrakata preparata sa bagremovim medom pripremljenih sa zakišljenom vodom pojedinačne aktivne zone su jačeg intenziteta. Na ovakvo odvajanje ekstrakata preparata uticala su jedinjenja koja se nalaze na hR_F 67, 79 (GA), 87 (CA) i 96 (G).

4.2.1.3. Teorija funkcionala gustine (DFT)

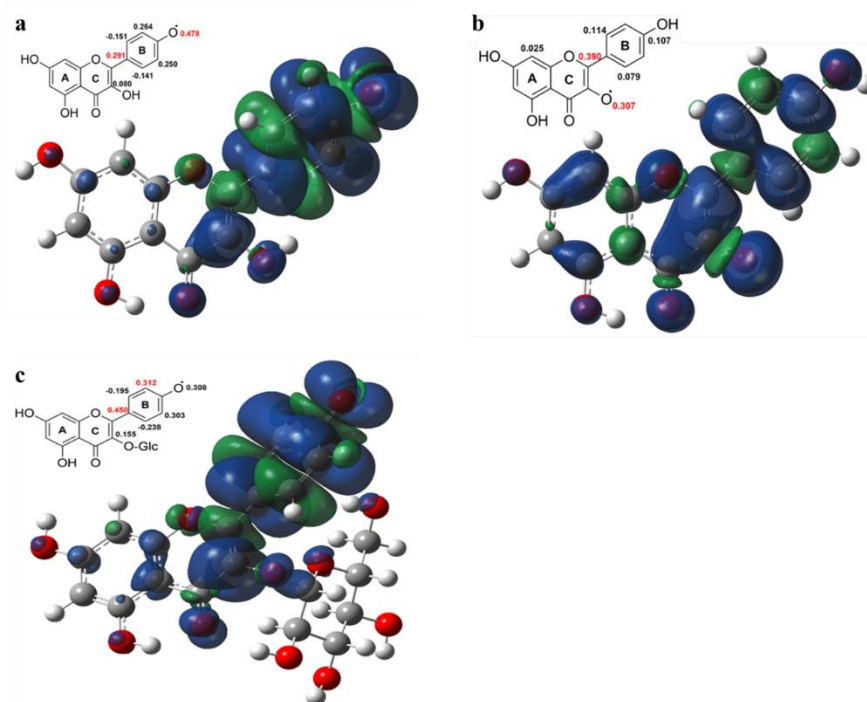
Da bi se stekao uvid u mehanizme uklanjanja radikala pojedinačnih jedinjenja iz ekstrakata listova čuvaruće koja su identifikovana HPTLC–antioksidativnim testovima, BDE i IP su izračunati kao molekularni deskriptori HAT i SET mehanizama koristeći DFT sa M06–2X funkcionalnim i 6–31+ G(d,p) osnovnim skupom. Izračunate vrednosti BDE i IP u gasnoj fazi, vodi i pentil–etanoatu za jedinjenja CA, GA, KAE, AST, QUE i IQUE navedene su u **Tabeli 5**. Efekti solvatacije uzeti su u obzir simulacijom fizioloških uslova u vodi i simulacijom lipidnog okruženja ćelijske membrane pentil–etanoatom.

Niže vrednosti BDE u odnosu na IP vrednosti u sva tri okruženja za svih šest jedinjenja ukazuju na to da je HAT mehanizam povoljniji mehanizam uklanjanja slobodnih radikala. Hidroksilna grupa na trećem atomu C prstena pokazuje najjači antioksidativni kapacitet sa BDE od 76,64 kcal/mol u gasnoj fazi što je slično kao kod molekula resveratrola (76,58 kcal/mol) [145]. Takođe, vrednosti IP su niže u vodi u poređenju sa IP vrednostima gasne faze i pentil–etanoata jer voda ima najveći stabilizujući efekat na polarne intermedijere koji se formiraju u prvom koraku SET–PT procesa (**Tabela 5**). Najniže vrednosti IP su dobijene za kofeinsku kiselinu u vodi što znači da CA ima najveći afinitet prema SET mehanizmu. Pored toga, slične BDE vrednosti za 3–OH i 4–OH grupu galne kiseline ukazuju na to da GA ima dve podjednako moćne HAT grupe.

Tabela 5. BDE i IP izračunati za nekoliko antioksidanasa prisutnih u čuvarkući pomoću M06–2X/6–31G+(d,p) metode u gasnoj fazi i SMD modeli vode i pentil etanoata. Sve energije su date u kcal/mol. Apstraktna mesta za vezivanje vodonika (HAT) navedena su u prvoj koloni.

Jedinjenje, HAT mesto	BDE _{gasna faza}	IP _{gasna faza}	BDE _{voda}	IP _{voda}	BDE _{pentil-etanoat}	IP _{pentil-etanoat}
CA, 3–OH	89,60	185,16	86,63	134,90	87,08	146,79
CA, 4–OH	78,66		83,26		79,51	
GA, 3–OH	84,01	191,76	87,85	140,54	84,67	154,36
GA, 4–OH	83,28		84,36		82,44	
KAE, 7–OH	108,71	178,28	101,07	136,49	98,67	146,22
KAE, 4'–OH	108,53		96,17		94,44	
KAE, 3–OH	77,77		80,90		78,23	
AST, 7–OH	108,51	184,51	101,76	143,40	99,28	153,04
AST, 4'–OH	90,74		91,97		90,11	
QUE, 7–OH	108,73	177,98	101,09	136,46	98,75	146,24
QUE, 3–OH	76,64		80,85		77,62	
QUE, 3'–OH	81,74		85,83		82,41	
QUE, 4'–OH	89,20		86,90		87,20	
IQUE, 7–OH	108,64	182,54	101,81	138,63	99,51	150,11
IQUE, 3'–OH	90,76		87,48		88,22	
IQUE, 4'–OH	81,59		85,29		82,04	

2D prikaz raspodele gustine spina (eng. *spin density*, SD) je korišćen da bi se vizuelno uočio stepen delokalizacije spina i relativna stabilnost različitih radikala koji su se pokazali korisnim za razumevanje antioksidativnih mehanizama. Na **Slici 36** dat je 2D prikaz raspodele SD za dva najstabilnija KAE radikala i jedan AST radikal.



Slika 36. 2D prikaz raspodele gustine spina za KAE 4'–O radikal (a), KAE 3–O radikal (b) i AST 4'–O radikal (c)

Uočava se da radikal na C prstenu ima najveći stepen SD delokalizacije sa više od 69% raspoređenog SD po celoj strukturi molekula (**Slika 36b**). Suprotno, radikal na B prstenu ima 52% delokalizovanog SD prvenstveno kroz B prsten sa zanemarljivim transferom na A i C prstenove (**Slika 36a**). Ova vrsta delokalizacije spina je primećena i u molekulu AST gde se radikal nalazi na B prstenu (**Slika 36c**). Analiza optimizovane geometrije osnovnih stanja i odgovarajućih radikala ukazuje na to da je torzija između B i C prstenova u aglikonu veća nego u glikozidima (**Tabela 6**). Dok su apstraktna mesta za vezivanje vodonika u B prstenu imala mali uticaj na geometriju molekula, postojanje ovih mesta na C prstenu dovodi do planarnosti oba aglikona, što rezultuje dobrom rezonantnom stabilizacijom radikala.

Tabela 6. Torzioni ugao između B i C prstenova kempferola, kvercetina i njihovih 3-O glukoziida.

Torzioni ugao θ , °	KAE	AST	QUE	IQUE
Osnovno stanje	42,22	32,19	41,23	31,55
Radikal, B prsten	41,60	29,19	40,81	29,13
Radikal, C prsten	0,02	/	0,01	/

U ranijim istraživanjima je na osnovu DFT proračuna na nivou teorije B3LYP/6-31+G (d,p) zaključeno da glikozilovanje 3-OH grupe kempferola i kvercetina nije značajno uticalo na BDE i IP u poređenju sa osnovnim molekulima [146]. Rezultati dobijeni u okviru ovog ispitivanja ukazuju na to da dolazi do smanjenja antioksidativnog kapaciteta molekula ukoliko je 3-OH grupa na C prstenu flavonoida blokirana vezanim glikozidima, kao i do smanjenja verovatnoće SET mehanizma usled povećanja IP za 2 – 5 kcal/mol. Niži antioksidativni kapacitet glikozida u poređenju sa aglikonima je u ranijim istraživanjima eksperimentalno potvrđen [33]. Šentjurc (*Šentjurc*) i saradnici su primenom elektron-paramagnetne rezonantne (EPR) spektroskopije zaključili da KAE i AST doprinose antioksidativnoj aktivnosti ekstrakta listova čuvaruće s tim što je KAE moćniji antioksidans jer blokira formiranje hidroksilnih radikala za 76% u poređenju sa AST koji blokira formiranje hidroksilnih radikala za 49% [33].

4.2.2. Antidijabetska aktivnost

4.2.2.1. Spektrofotometrijsko određivanje antidijabetske aktivnosti

Inhibitorna aktivnost na enzim α -amilazu ispitana je za tri različite koncentracije dvadeset etanolnih ekstrakata osušenih listova čuvaruće: 1 mg/mL, 5 mg/mL i 10 mg/mL. Izračunate vrednosti procenta inhibicije α -amilaze prikazane su u **Tabeli 7**.

Tabela 7. *In vitro* ispitivanje inhibitorne aktivnosti ekstrakata na enzim α -amilazu

Br. ekstrakta	C = 1 mg/mL	C = 5 mg/mL	C = 10 mg/mL
	Procentat inhibicije (%)		
1	–	3,65	29,47
2	–	2,65	30,19
3	–	1,38	38,37
4	4,91	12,97	40,26
5	5,37	27,33	49,07
6	–	5,42	47,83
7	8,95	13,33	45,97
8	–	18,82	47,28
9	–	16,29	41,93
10	–	20,00	47,21
11	1,44	19,60	54,63
12	8,73	24,77	65,17
13	1,19	25,31	53,18
14	6,21	25,55	53,03
15	–	17,45	43,10
16	–	5,55	45,23
17	–	3,56	51,43
18	2,29	13,01	47,46
19	1,63	19,90	64,29
20	–	11,50	57,32

* – Antidijabetska aktivnost nije detektovana

Rezultati pokazuju zavisnost inhibicije enzima α -amilaze od koncentracije ekstrakata. Pri najnižoj koncentraciji ekstrakata od 1 mg/mL najveći procenat inhibicije pokazali su ekstrakti 7 i 12 (8,95% i 8,73%, redom). U ovim ekstraktima je kvantifikovan najveći sadržaj kvercetina i kempferola koji ostvaruju jaku inhibitornu aktivnost na ispitivani enzim [147]. Čak jedanaest ekstrakata pri najnižoj ispitanoj koncentraciji nije pokazalo inhibitornu aktivnost. Pri koncentraciji od 5 mg/mL svi ekstrakti su pokazali određenu inhibitornu aktivnost. Procenat inhibicije α -amilaze od strane ekstrakata koncentracije 5 mg/mL je u opsegu 1,38 – 27,33%. Najniži procenat inhibicije pokazuje ekstrakt 3. S druge strane, ekstrakt 5 ispoljio je najveći procenat inhibicije, a zatim slede ekstrakti 12 (24,77%), 13 (25,31%) i 14 (25,55%). Sa porastom koncentracije ispitivanih ekstrakata raste i procenat inhibicije enzima. Tako su ekstrakti sa najvećom koncentracijom od 10 mg/mL pokazali najveću inhibitornu aktivnost. Ekstrakti 1 i 2 ostvaruju najniži procenat inhibicije koji iznosi 29,47% i 30,19%, redom. Ekstrakti sa najvećim procentom inhibicije α -amilaze su 12 i 19 (65,17% i 64,29%, redom). Pored ovih ekstrakata još pet ekstrakata (11, 13, 14, 17 i 20) je ispoljilo inhibitornu aktivnost iznad 50%.

Flavonoidi i njihovi glikozidi su najbrojnija grupa jedinjenja u ekstraktima listova čuvaruće, a njihova inhibitorna aktivnost prema α -amilazi u velikoj meri zavisi od prisutnih hidroksilnih grupa. Ove grupe omogućavaju formiranje vodoničnih veza, koje su ključne za postizanje inhibitornog efekta [148]. Ipak, Takahama i saradnici sugerišu da α -amilaza ima najmanje dva mesta za vezivanje

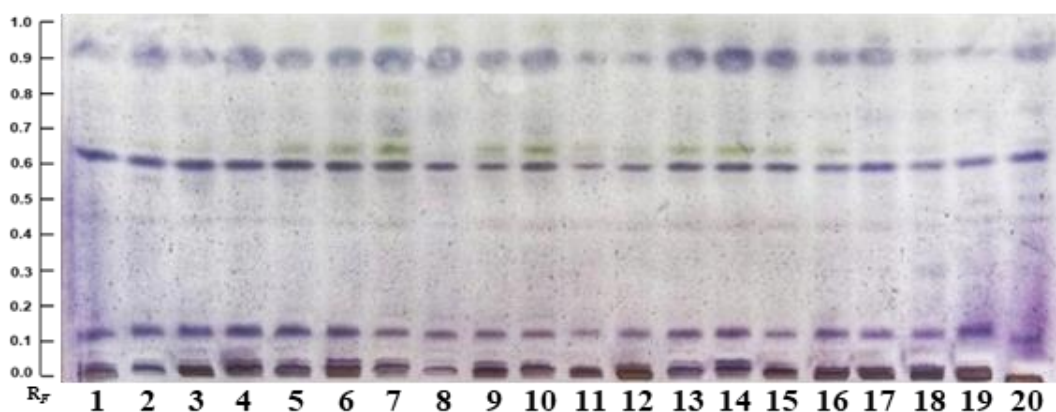
flavonoida: jedno mesto ostvaruje vezivanje putem vodoničnih veza, dok drugo mesto omogućava hidrofobne interakcije, što dodatno doprinosi inhibitornoj aktivnosti flavonoida [149]. Inhibitorna aktivnost flavonolnih aglikona raste sledećim redosledom: kempferol < kvercetin < miricetin [149]. Flavanonoli taksifolin i aromadendrin, takođe, inhibiraju aktivnost α -amilaze [149, 150]. Fenolne kiseline prisutne u ekstraktima čuvarkuće, kao što su neohlorogena (NCGA), *p*-kumarinska (PCOA), kofeinska (CA) i galna kiselina (GA), potvrđeno ispoljavaju antidijabetsku aktivnost inhibirajući enzim α -amilazu. Ključna karakteristika ovih kiselina je broj hidroksilnih grupa, pri čemu veći broj hidroksilnih grupa doprinosi snažnijoj aktivnosti. Kao rezultat toga, NCGA je najaktivniji derivat hidroksicimetne kiseline, dok je GA najaktivniji derivat hidroksibenzojeve kiseline [151]. Takođe, pirogalol tip katehina koji su identifikovani u ovim ekstraktima (jedinjenja **2** i **8**) takođe pokazuju antidijabetsku aktivnost [151].

Međutim, spektrofotometrijskom metodom se može dobiti uvid u ukupan doprinos antidijabetskoj aktivnosti ekstrakata svih prisutnih jedinjenja bez mogućnosti identifikacije specifičnih jedinjenja koja ispoljavaju ovu aktivnost. Zbog toga je antidijabetski test izveden i na HPTLC ploči, što omogućava odvajanje i identifikaciju aktivnih komponenata unutar kompleksnih smeša. Ovaj pristup omogućava i poređenje aktivnosti jedinjenja na osnovu veličine i intenziteta njihovih zona na HPTLC ploči.

4.2.2.2. HPTLC–antidijabetski test

Osušeni listovi čuvarkuće

Prvi put je HPTLC metodom ispitana antidijabetska aktivnost (ADA) ekstrakata osušenih listova čuvarkuće (50 mg/mL) na enzim α -amilazu. Izvođenje antidijabetskog testa na HPTLC pločama ima za cilj da iz složenog matriksa ekstrakta jasno identifikuje one zone aktivnih jedinjenja koja ispoljavaju antidijabetsku aktivnost. Hromatogram je najpre razvijen mobilnom fazom toluen : etil-acetat : mravlja kiselina u odnosu 5:4:1 (*v/v/v*), a zatim derivatizovan rastvorima za izvođenje HPTLC antidijabetskog testa. Antidijabetski profil ekstrakata na kojem su zone aktivnih jedinjenja ljubičaste boje naspram bele pozadine prikazan je na **Slici 37**.

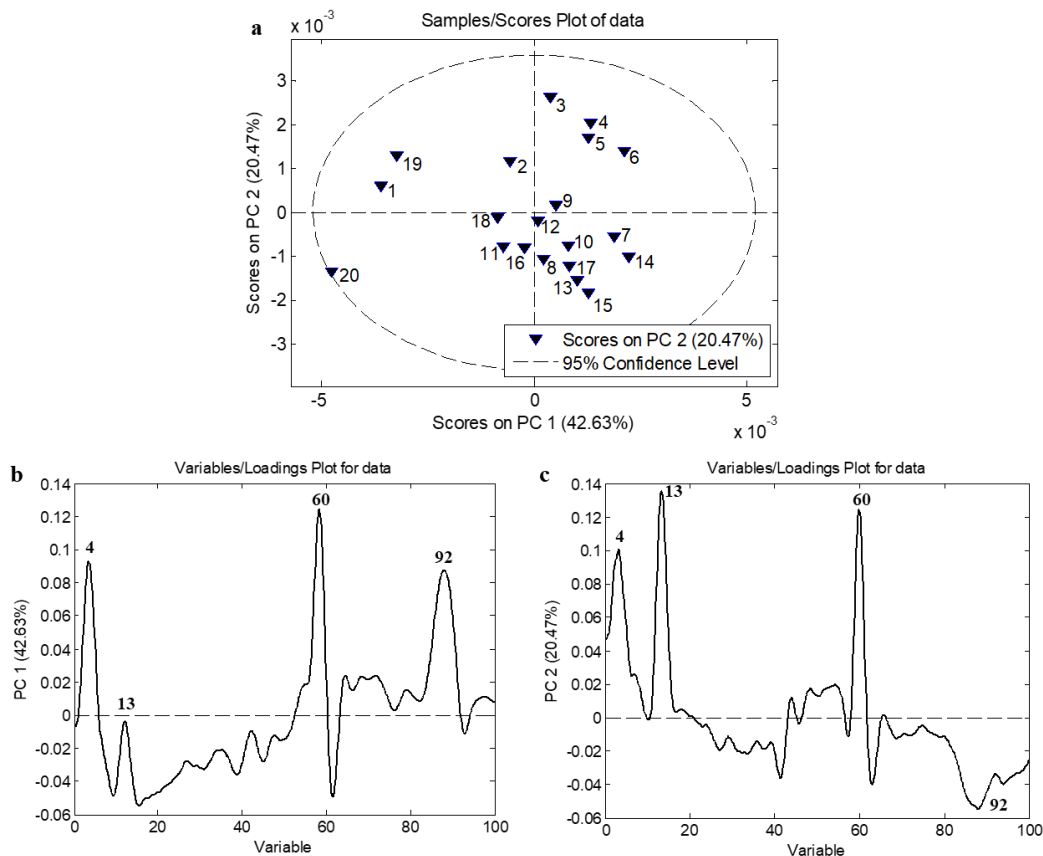


Slika 37. HPTLC–antidijabetski profil ekstrakata listova čuvarkuće dokumentovan pod vidljivim svetlom

HPTLC–antidijabetskim testom dobijen je sličan profil svih dvadeset ekstrakata listova čuvarkuće. Sa hromatograma se očitava da ADA na enzim α -amilazu ispoljavaju jedinjenja koja se nalaze na *hR_F* 3, 13, 60 i 92 (**Slika 37**). Zone najjačeg intenziteta imaju jedinjenja na *hR_F* 13 i 60, dok jedinjenje na *hR_F* 92 daje široku zonu slabijeg intenziteta. Uočavaju se i dve bledoljubičaste zone na *hR_F* 43 i 72. Zona na *hR_F* 43 uočava se u svim ekstraktima, dok se zona na *hR_F* 72 najbolje uočava u ekstraktu 7. Intenzivna ljubičasta boja na polaznoj mrlji ukazuje na jaku antidijabetsku aktivnost hidrofилnih jedinjenja prisutnih u ekstraktima, koja nisu bila efikasno razdvojena primenjenim hromatografskim uslovima. Primenom UPLC–LTQ OrbiTrap MS tehnike identifikovan je veliki broj

glikozida kempferola i kvercetina, koji mogu da ostvaruju inhibitory efekat na enzim α -amilazu [149].

Model dobijen analizom glavnih komponenta sastoji se iz četiri glavne komponente koje opisuju 80,97% ukupnog varijabiliteta među podacima (PC1 – 42,63%, PC2 – 20,47%, PC3 – 9,87% i PC4 – 8,00%). Na **Slici 38** prikazani su grafik skorova i grafik vektora latentnih varijabli konstruisanih na osnovu PC1 i PC2.



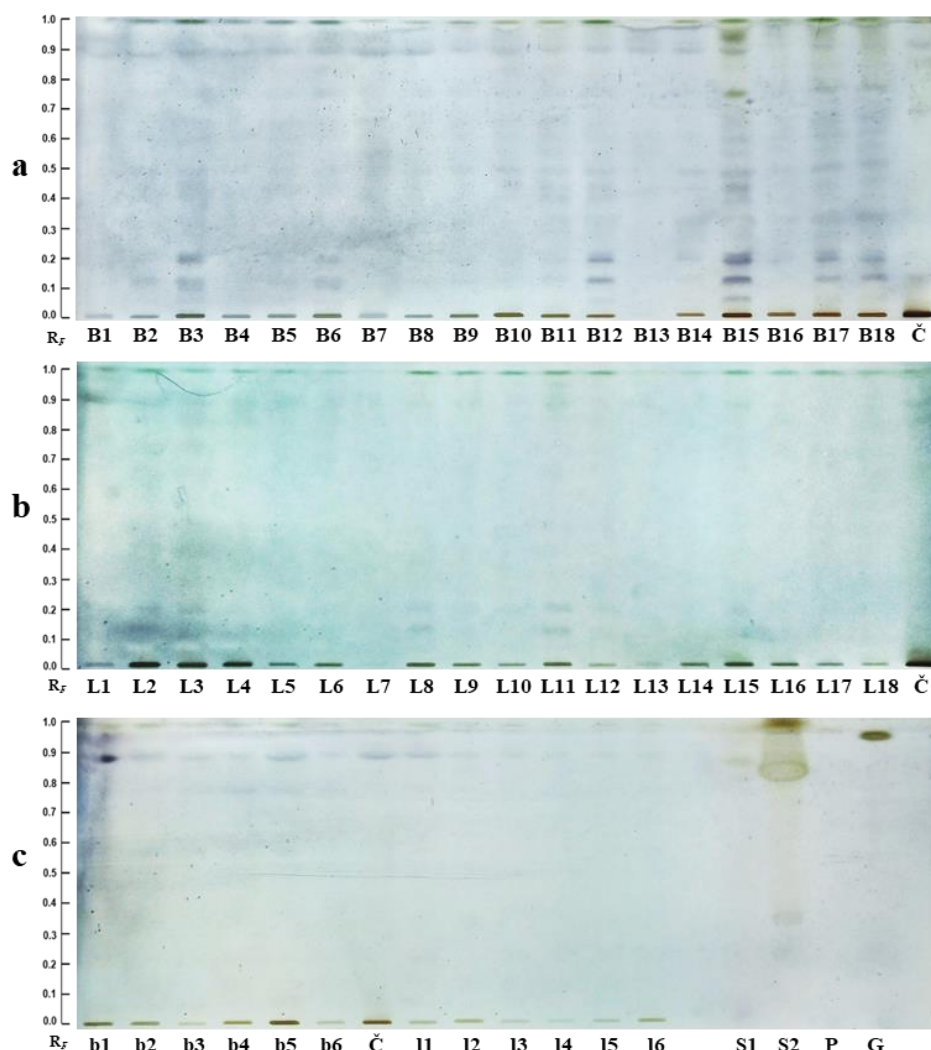
Slika 38. Analiza glavnih komponenta za HPTLC–antidijabetski profil: grafik skorova latentnih varijabli (a), grafik vektora latentnih varijabli za PC1 (b), grafik vektora latentnih varijabli za PC2 (c)

Na grafiku skorova latentnih varijabli uočava se izdvajanje ekstrakata 1, 19 i 20 na levoj strani grafika, odvojeno od ostalih ekstrakata duž PC1 ose (**Slika 38a**). Ekstrakti 1 i 19 su pozicionirani u gornjem levom kvadrantu, dok je ekstrakt 20 pozicioniran u donjem levom kvadrantu na granici 95% nivoa pouzdanosti Hotellingove elipse. Na graficima vektora latentnih varijabli predstavljen je uticaj pojedinačnih zona na razdvajanje ekstrakata (**Slika 38b, c**). Ekstrakti 1, 19 i 20 imaju slabije izraženu zonu jedinjenja na hR_F 92 što je uticalo na njihovo pozicioniranje sa leve strane grafika skorova. Takođe se može uočiti izdvajanje ekstrakata 3–6 u gornjem desnom kvadrantu grafika skorova. Na njihovo izdvajanje od ostalih ekstrakata utiče jače izražena zona jedinjenja na hR_F 13 (**Slika 38c**). Zona jedinjenja na hR_F 92 je najintenzivnije izražena u ekstraktima 13–15 i ostvaruje uticaj na njihovo pozicioniranje u donjem desnom kvadrantu (**Slika 38b, c**).

HPTLC antidijabetski profil ekstrakata osušenih listova čuvarkuće (50 mg/mL) ukazuje na to da su u svim ekstraktima prisutna ista jedinjenja koja ispoljavaju antidijabetsku aktivnost, ali u različitim koncentracijama što se zaključuje na osnovu intenziteta i veličine zona (**Slika 37**). Razlike u intenzitetu i veličini zona dovele su do delimičnog razdvajanja ekstrakata na grafiku skorova latentnih varijabli. HPTLC–DB metodom se ističu samo ona jedinjenja koja ispoljavaju aktivnost u vidu aktivnih zona, s druge strane, spektrofotometrijom se dobijaju podaci o aktivnosti celokupnog ekstrakta u kojem prisutna jedinjenja međusobno u matriksu mogu da ostvaruju sinergističke ili antagonističke efekte.

Preparati čuvarkuće i meda, sveži listovi čuvarkuće i čist med

Antidijabetska aktivnost ekstrakata meda, svežih listova čuvarkuće i preparata čuvarkuće i meda ispitana je α -amilaza testom na HPTLC pločama. Aktivna jedinjenja manifestovana su kao zone ljubičaste boje naspram bele pozadine, a dobijeni HPTLC-amilaza hromatogrami su prikazani na **Slici 39**.

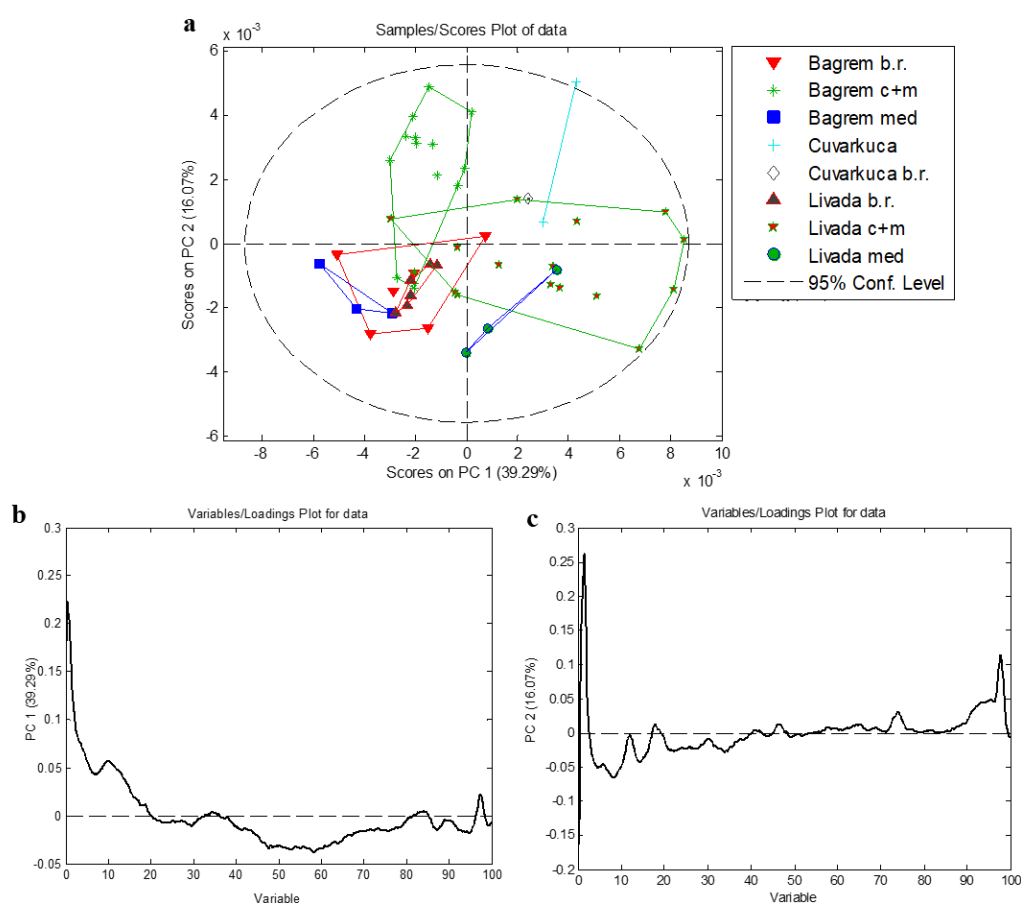


Slika 39. HPTLC-amilaza antidijabetski profil dokumentovan pod vidljivim svetlom: ekstrakti preparata sa bagremovim medom pripremljeni sa zakišljenom vodom (**a**), ekstrakti preparata sa livadskim medom pripremljeni sa zakišljenom vodom (**b**), ekstrakti preparata sa bagremovim i livadskim medom pripremljeni bez rastvarača, S1 – smeša standarda izokvercetina (IQUE), astragalina (AST), galne kiseline (GA), kofeinske kiseline (CA) i kempferola (KAE), S2 – smeša standarda neohlorogene kiseline (NCGA) i eskuletina (AET), P – pinocembrin, G – galangin (**c**)

HPTLC-antidijabetski profili ekstrakata meda, svežih listova čuvarkuće i preparata čuvarkuće i meda pokazuju slabu aktivnost (**Slika 39**). Najveća aktivnost se uočava na hromatogramu na kojem je razvijen profil ekstrakata preparata sa bagremovim medom koji su ekstrahovani zakišljenom vodom (**Slika 37a**). Ekstrakti preparata sa livadskim medom pripremljeni sa zakišljenom vodom imaju slabiju antidijabetsku aktivnost sa par aktivnih zona slabog intenziteta (**Slika 37b**), dok ekstrakti preparata pripremljeni bez rastvarača pokazuju najslabiju aktivnost (**Slika 37c**). Zona aktivnog jedinjenja na hR_F 87 koja odgovara kofeinskoj kiselini (CA) prisutna je u svim ispitanim ekstraktima. U ekstraktima bagremovog i livadskog meda, kao i u ekstraktu svežih listova čuvarkuće bez rastvarača, uočava se samo aktivnost zone CA, dok se u ekstraktima čuvarkuće sa zakišljenom vodom jedinjenja koja pokazuju aktivnost nalaze na hR_F 13, 67, 84 (AET) i 87 (CA).

Na hromatogramu ekstrakata preparata sa bagremovim medom pripremljenih sa zakišljenom vodom uočava se veći broj zona aktivnih jedinjenja koje potiču od čuvarkuće, ali se njihove aktivne zone ne uočavaju u samom ekstraktu listova čuvarkuće (**Slika 37a**). Ovo se može objasniti time da med dodatno pospešuje ekstrakciju jedinjenja prisutnih u listovima čuvarkuće. Najbogatiji antidijabetiski profil ispoljavaju ekstrakti B15, B17 i B18 u kojima se uočavaju aktivne zone na hR_F 13, 18, 31 (NCGA), 48, 67, 73, 84 (AET) i 87 (CA). Aktivna zona na hR_F 48 se uočava u svim ekstraktima, dok su zone na hR_F 13 i 18 dominantne u ekstraktima B3, B6 i B12. Antidijabetiski profil ekstrakata preparata sa livadskim medom (**Slika 37b**) pokazuje dosta slabiju aktivnost. Najveću aktivnost ispoljavaju jedinjenja na hR_F 13 i 18, a najveći intenzitet ispoljen je u ekstraktima L2, L3, L8, L11 i L15. U svim ekstraktima preparata sa bagremovim i livadskim medom pripremljenim bez rastvarača (**Slika 37c**) uočava se slaba antidijabetiska aktivnost jedinjenja na hR_F 87 (CA). U ekstraktima sa bagremovim medom ispoljava se aktivna zona GA na hR_F 79, ali se ona ne uočava u ekstraktima preparata sa livadskim medom.

PCA model opisan je sa šest glavnih komponenta koje opisuju 83,48% ukupnog varijabiliteta među podacima (PC1 – 39,29%, PC2 – 16,07%, PC3 – 10,56%, PC4 – 8,27%, PC5 – 5,06% i PC6 – 4,23%). Grafik skorova latentnih varijabli konstruisan na osnovu komponenti PC1 i PC2, kao i grafici vektora latentnih varijabli prikazani su na **Slici 40**.



Slika 40. Analiza glavnih komponenta HPTLC–amilaza hromatograma: grafik skorova latentnih varijabli (**a**), grafik vektora latentnih varijabli za PC1 (**b**), grafik vektora latentnih varijabli za PC2 (**c**)

Na grafiku skorova latentnih varijabli (**Slika 40a**) uočava se da su ekstrakti bagremovog i livadskog meda međusobno odvojeni. Ekstrakti B1, B7 i B13 su pozicionirani u donjem levom kvadrantu, ekstrakti L1, L7 i L13 su pozicionirani u donjem desnom kvadrantu, a ekstrakti čuvarkuće se nalaze u gornjem desnom kvadrantu grafika skorova.

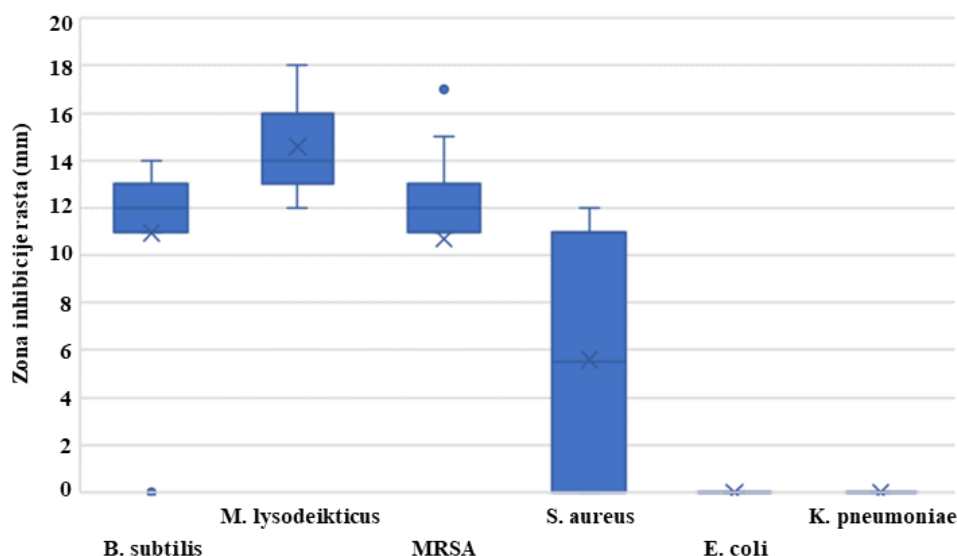
Obe grupe ekstrakta sa bagremovim medom pozicionirane su na levoj strani grafika skorova latentnih varijabli (**Slika 40a**). Ove dve grupe su delimično preklopljene, mada je najveći broj ekstrakata preparata sa bagremovim medom pripremljenih zakišljenom vodom pozicioniran u gornjem levom kvadrantu. Ekstrakti preparata sa livadskim medom pripremljeni sa zakišljenom vodom su rasuti na velikoj površini pretežno zauzimajući desnu stranu grafika skorova latentnih varijabli. Ekstrakti preparata sa livadskim medom bez rastvarača pozicionirani su uniformo u donjem levom kvadrantu grafika skorova, potpuno preklopljeni sa ekstraktima preparata od bagremovog meda bez rastvarača. Sa grafika vektora latentnih varijabli (**Slika 40b, c**) se uočava da nijedno jedinjenje ne ostvaruje veliki uticaj na razdvajanje ovih ekstrakata na osnovu antidijabetske aktivnosti. Ovakav rezultat je posledica slabog antidijabetskog odgovora pojedinačnih jedinjenja na razvijenim hromatogramima.

4.2.3. Antibakterijska aktivnost

4.2.3.1. Agar–difuzioni metod u bunarićima

Antibakterijska aktivnost (ABA) 70% etanolnih ekstrakata osušenih listova čuvarkuće ispitana je agar–difuzionim metodom u bunarićima. Ova metoda je pogodna jer omogućava da se ispita aktivnost celokupnog sadržaja ekstrakata, čime se dobija objektivna procena njihove ABA. U literaturi se nalaze podaci o antimikrobnoj aktivnosti ekstrakata čuvarkuće koja je ispitana primenom tehnika razblaživanja (dilucije) i difuzije [5, 47, 50].

U okviru ovog ispitivanja ABA ekstrakata listova čuvarkuće (50 mg/mL) je procenjena na osnovu veličine zona inhibicije rasta bakterija oko bunarića. Prečnici zona inhibicije rasta bakterija su izmereni od ivice do ivice i izraženi su u milimetrima (mm): nema inhibicije (-), prečnik zone inhibicije 11 – 14 mm (+) i prečnik zone inhibicije iznad 14 mm (++). Dobijeni rezultati izraženi u milimetrima (mm) predstavljeni su grafički (**Slika 41**) i tabelarno (**Tabela P10**).



Slika 41. Antibakterijska aktivnost dvadeset etanolnih ekstrakata listova čuvarkuće izražena u milimetrima dužine prečnika zone inhibicije rasta bakterija (mm) procenjena agar–difuzionim metodom u bunarićima

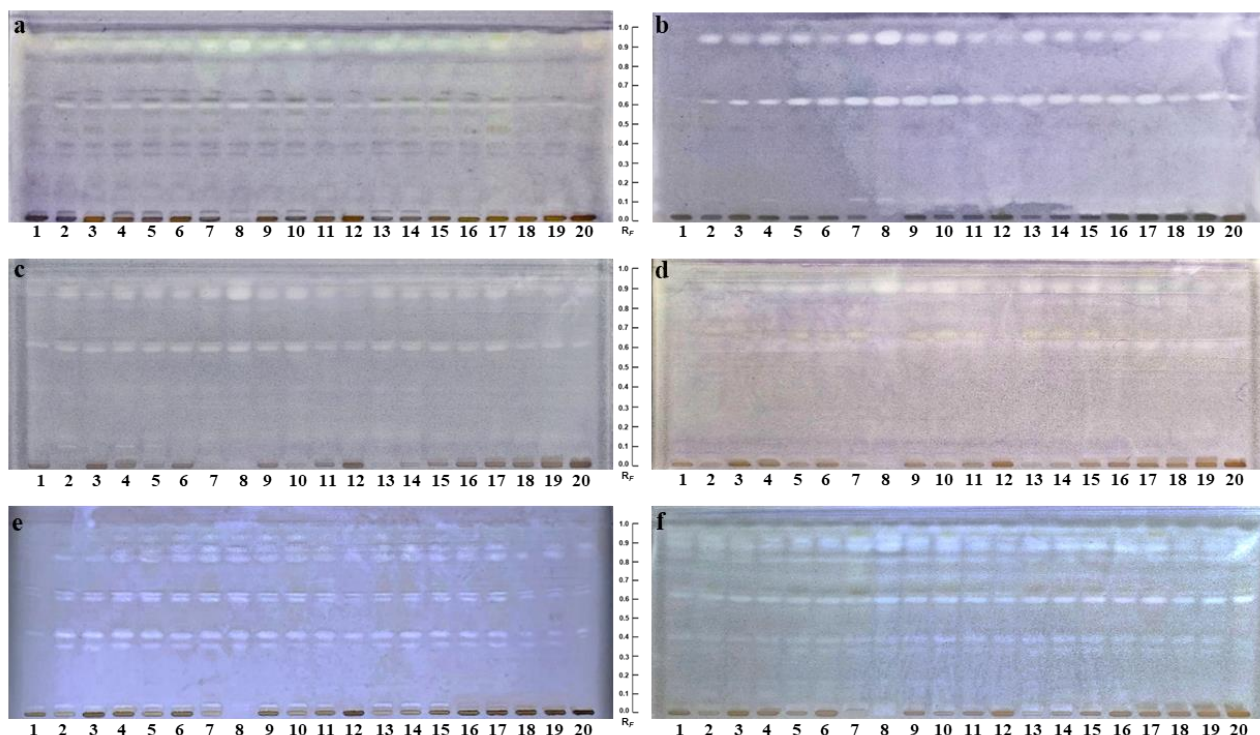
Od svih ispitanih bakterija, jedino *M. lysodeikticus* pokazuje osetljivost na svaki od ekstrakata listova čuvarkuće. U poređenju sa svim ostalim sojevima bakterija, *M. lysodeikticus* je najosetljiviji što je manifestovano dužinom prečnika zone inhibicije rasta koja je iznosila 12–18 mm. Najveću aktivnost pokazao je ekstrakt 14 (++) . Svi ostali ekstrakti ispoljili su visoku antibakterijsku aktivnost sa prečnikom zone inhibicije iznad 12 mm, osim ekstrakata 12 i 18 koji su imali najmanji prečnik inhibicije (+). Meticilin rezistentni *S. aureus* (MRSA) pokazuje veću osetljivost na ekstrakte u poređenju sa *S. aureus*. Prečnici zone inhibicije rasta *S. aureus* ne prelaze 12 mm, a najveći su kod ekstrakata 9 i 20. *S. aureus* ne pokazuje osetljivost na čak deset ekstrakata, dok MRSA nije osetljiva na samo tri ekstrakta. Ekstrakti 5 – 7 nisu pokazali aktivnost (-) ni na MRSA ni na *S. aureus*. S druge strane, najveću antibakterijsku aktivnost na MRSA pokazuje ekstrakt 1 (++) , dok ekstrakti 2 – 4, 14, 15 i 19 daju zonu inhibicije rasta u dužini prečnika iznad 12 mm. Prečnici zona inhibicije rasta *B. subtilis* iznosili su 11 – 14 mm. Ekstrakti 17 i 18 nisu ispoljili antibakterijsku aktivnost (-) dok je najveću zonu inhibicije pokazao ekstrakt 13 (+). Od svih ispitanih Gram–pozitivnih bakterija, najmanje osetljivim na ekstrakte pokazao se soj bakterije *S. aureus*. Nijedan od dvadeset testiranih ekstrakata listova čuvarkuće nije pokazao ABA prema Gram–negativnim bakterijama *E. coli* i *K. pneumoniae*. Rezultati antibakterijske aktivnosti dobijeni u okviru ovog istraživanja u skladu su sa prethodno objavljenim literaturnim podacima gde se navodi veća osetljivost Gram–pozitivnih bakterija na ekstrakte čuvarkuće [47]. Takođe, u literaturi se navodi da je antibakterijski potencijal flavonoida više usmeren ka Gram–pozitivnim bakterijama [152]. Pored toga, Gram–negativne bakterije su otpornije na biljne ekstrakte jer poseduju ćelijski zid od lipopolisaharida koji ih dodatno štiti od antibakterijskih agenasa [153].

Ekstrakti čuvarkuće, bogati fenolnim jedinjenjima, pokazuju određenu antibakterijsku aktivnost. Specifično, antibakterijska aktivnost kempferola i njegovih glikozida detaljno je proučena u brojnim studijama na Gram–pozitivne i Gram–negativne bakterije [154, 155]. U literaturi se nalazi da GA i QUE inhibiraju *K. pneumoniae*, dok CA, GA i QUE pokazuju inhibitornu aktivnost prema *S. aureus* i *E. coli* [156]. Aromadendrin (AR) je efikasan u inhibiciji *S. aureus* i MRSA. Neki flavonoidi, poput katehina, pokazuju antibakterijsku aktivnost prema oba tipa bakterija, uključujući MRSA, *S. aureus* i *E. coli*. Miricetin doprinosi antibakterijskoj aktivnosti ekstrakata prema *S. aureus*, *B. cereus* i *E. coli* blokirajući enzime helikaze, ključnih za metabolizam nukleinskih kiselina [157]. Agar–difuzionim metodom dobija se uvid u ukupnu antibakterijsku aktivnost ekstrakta. Kombinacija ove metode sa razvijenim HPTLC–antibakterijskim biohromatogramima omogućava detaljniju analizu ekstrakata, omogućavajući identifikaciju specifičnih jedinjenja koja su odgovorna za ispoljavanje ove aktivnosti.

4.2.3.2. HPTLC–antibakterijski testovi

Osušeni listovi čuvarkuće

HPTLC–antibakterijski testovi izvedeni su na šest sojeva bakterija: četiri Gram–pozitivne bakterije (*B. subtilis*, *M. lysodeikticus*, MRSA i *S. aureus*) i dve Gram–negativne bakterije (*E. coli* i *K. pneumoniae*). HPTLC biohromatogrami pokazali su razlike u osetljivosti bakterija na razdvojena jedinjenja ispitivanih ekstrakata listova čuvarkuće, gde su bioaktivni fitokonstituenti manifestovani u vidu belih zona na ljubičastoj pozadini (Slika 42).



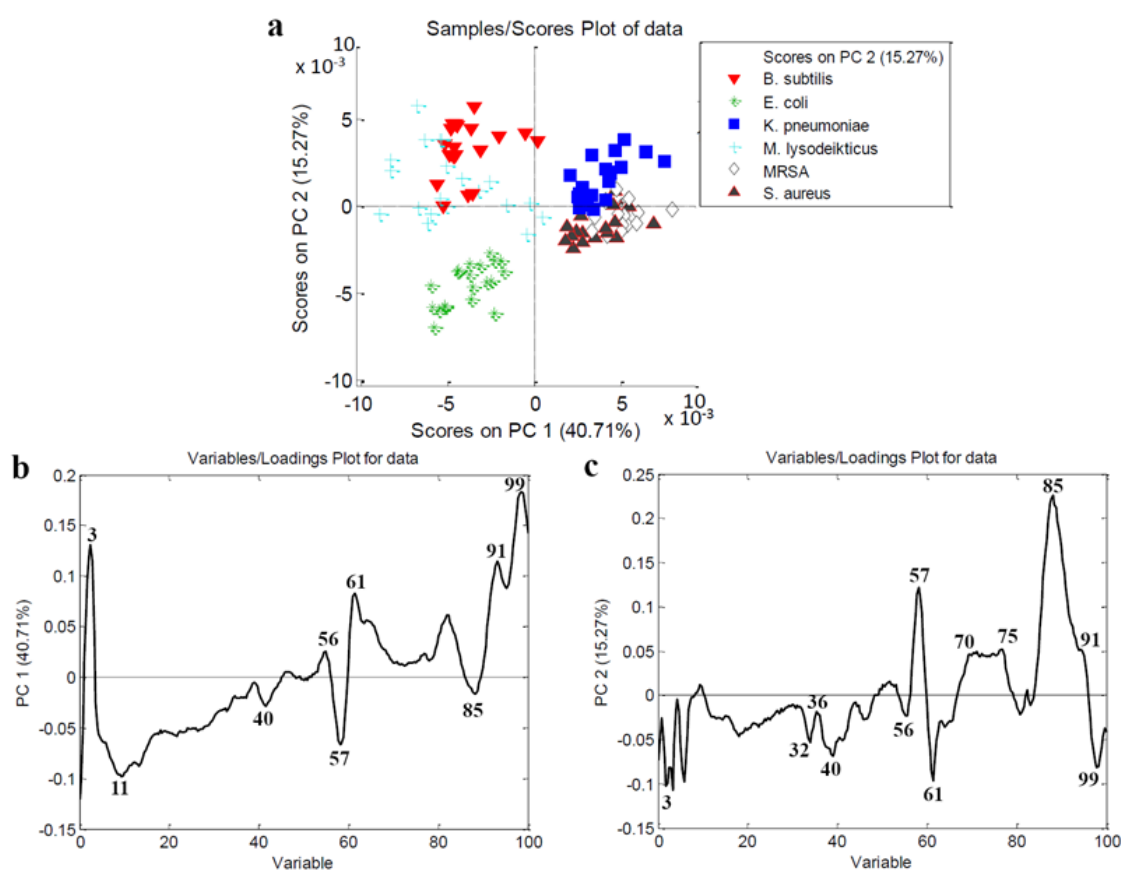
Slika 42. HPTLC biohromatogrami ekstrakata listova čuvarkuće razvijeni na *B. subtilis* (a), *M. lysodeikticus* (b), MRSA (c), *S. aureus* (d), *E. coli* (e) i *K. pneumoniae* (f) dokumentovani pod vidljivim svetlom

Sva četiri HPTLC biohromatograma kojima je ispitana ABA ekstrakata osušenih listova čuvarkuće na Gram–pozitivne bakterije pokazuju veoma slične profile (Slika 42a–d). Na ovim biohromatogramima se uočava da postoje dva dominantno aktivna jedinjenja koja se nalaze na hR_F 57 i 91. Intenzitet hromatografskih zona aktivnih jedinjenja najjače se ispoljava na biohromatogramu *M. lysodeikticus* (Slika 42b). U ekstraktima 8 i 10 su ispoljene zone aktivnih jedinjenja najjačeg intenziteta na sva četiri HPTLC biohromatograma razvijenim na Gram–pozitivne bakterije (Slika 42a–d). Zona neidentifikovanog aktivnog jedinjenja na hR_F 91 pokazuje jaku antibakterijsku aktivnost. Ovo može biti rezultat jače antibakterijske aktivnosti ovog jedinjenja u poređenju s ostalim jedinjenjima ili zbog njegove visoke koncentracije u ekstraktima. Na biohromatogramu razvijenom na MRSA (Slika 42c) kao aktivne zone slabijeg intenziteta dodatno se uočavaju jedinjenja na hR_F 11, 36 i 40.

HPTLC biohromatogrami razvijeni na Gram–negativne bakterije (Slika 42e, f) pokazuju veliki broj zona aktivnih jedinjenja na hR_F 3, 36, 40, 56, 57, 85 i 91. Zona na hR_F 91 je jedva primetna na biohromatogramu *E. coli* (Slika 42e), dok ista zona pokazuje najjači intenzitet na biohromatogramu *K. pneumoniae* (Slika 42f). Za biohromatogram *K. pneumoniae* (Slika 42f) karakteristične su brojne zone manjeg intenziteta na $hR_F < 20$ i između hR_F 70–80, dok su za biohromatogram *E. coli* (Slika 42e) karakteristične zone aktivnih jedinjenja na hR_F 85 i 91.

HPTLC–ABA biohromatogrami ukazuju na veću osetljivost Gram–negativnih bakterija na pojedinačne komponente ispitivanih ekstrakata što se manifestuje prisustvom većeg broja zona aktivnih jedinjenja (**Slika 42e, f**) u poređenju sa odgovorom dobijenim na hromatogramima za Gram–pozitivne bakterije (**Slika 42a–d**). Ovi rezultati potvrđuju da, iako flavonoidi često pokazuju veću sklonost ka inhibiciji Gram–pozitivnih bakterija, određena jedinjenja mogu biti podjednako efikasna protiv Gram–negativnih bakterija [152]. Nasuprot tome, rezultati dobijeni metodom difuzije u agaru pokazuju da su Gram–pozitivne bakterije bile osetljive na ekstrakte čuvarkuće, dok Gram–negativne bakterije nisu pokazale osetljivost na iste ekstrakte.

Da bi se uočilo grupisanje ekstrakata na osnovu antibakterijske aktivnosti koju ispoljavaju na ispitane sojeve Gram–pozitivnih i Gram–negativnih bakterija primenjena je analiza glavnih komponenata. Matrica podataka se sastojala od 120 objekata koji predstavljaju ispitivane ekstrakte. Dobijeni PCA model sastojao se od četiri glavne komponente koje opisuju 76,68% ukupnog varijabiliteta među podacima (PC1 – 40,71%, PC2 – 15,27%, PC3 – 10,90% i PC4 – 9,80%), a grafički je prikazan kao uzajamna projekcija na osnovu prve dve glavne komponente PC1 i PC2 (**Slika 43**).



Slika 43. Analiza glavnih komponenata za šest antibakterijskih HPTLC biohromatograma: grafik skorova latentnih varijabli (a), grafik vektora latentnih varijabli za PC1 (b), grafik vektora latentnih varijabli za PC2 (c)

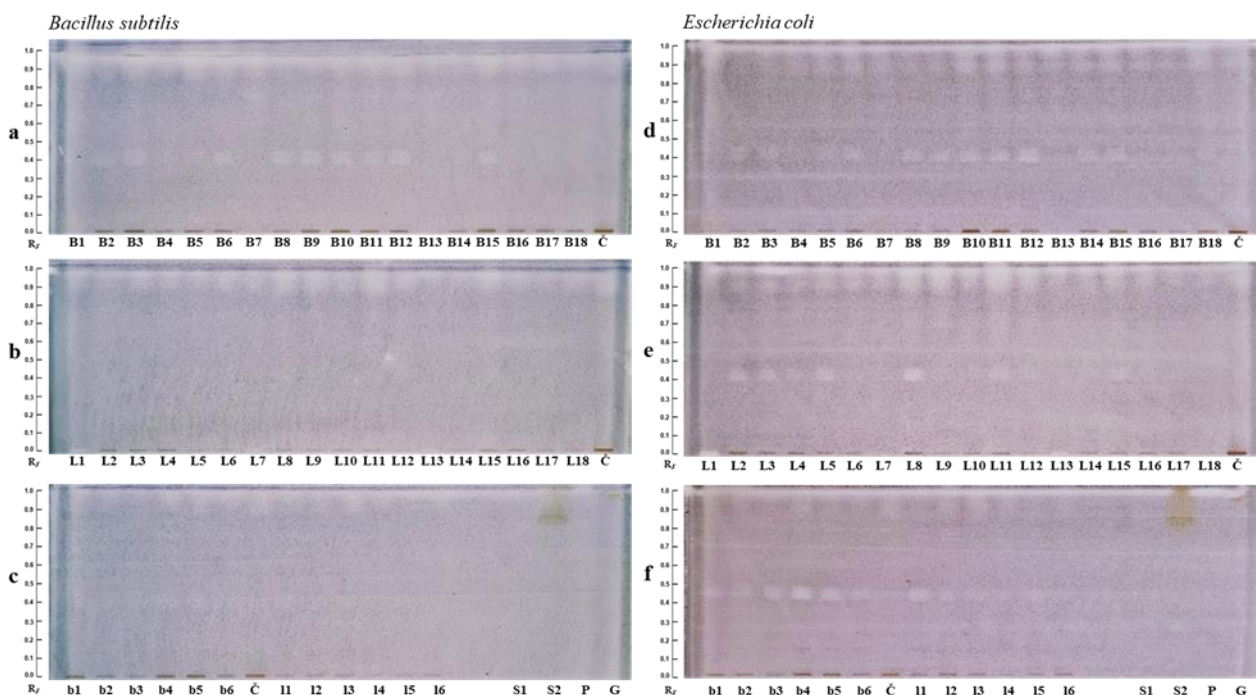
Na grafiku skorova latentnih varijabli formirana su tri klastera (**Slika 43a**). Prvi klaster se sastoji od objekata dobijenih sa biohromatograma za MRSA, *S. aureus* i *K. pneumoniae* i pozicioniran je sa desne strane grafika skorova. U okviru ovog klastera objekti dobijeni sa biohromatograma za Gram–pozitivne bakterije MRSA i *S. aureus* su uniformno grupisani ali dolazi do delimičnog preklapanja sa objektima dobijenim sa biohromatograma za *K. pneumoniae*. Ovo se može pripisati zonama aktivnih jedinjenja na hR_F 56, 57, 85, 91 i 99 (**Slika 43b, c**). Drugi klaster pozicioniran je u gornjem levom kvadrantu grafika skorova i čine ga objekti dobijeni sa biohromatograma za *B. subtilis* i *M.*

lysodeikticus. Ovaj klaster je nešto manje uniforman zbog toga što su prepoznate razlike u ispoljavanju antibakterijske aktivnosti objekata sa biohromatograma za *M. lysodeikticus*. Na pozicioniranje ovog klastera uticale su zone na hR_F 56 i 91 koje su jačeg intenziteta na ova dva biohromatograma u poređenju sa ostalim biohromatogramima. Treći klaster se nalazi u donjem levom kvadrantu grafika skorova i čine ga objekti dobijeni sa biohromatograma za *E. coli*. Ovaj klaster objekata se dobro odvajaju od dva prethodno opisana klastera duž obe PC ose, na šta su imale uticaj zone na hR_F 32, 40 i 57.

Rezultati dobijeni na HPTLC biohromatogramima obrađeni analizom glavnih komponenata pružaju veliki izvor informacija koje mogu jasno da ukažu na trend biološke aktivnosti ekstrakata čuvaruće. Hemometrijska obrada podataka omogućila je uvid u sličnosti i razlike među ekstraktima na osnovu ispoljavanja antibakterijske aktivnosti na određene sojeve Gram–pozitivnih i Gram–negativnih bakterija.

Preparati čuvaruće i meda, sveži listovi čuvaruće i čist med

Antibakterijska aktivnost ekstrakata meda, svežih listova čuvaruće i preparata čuvaruće i meda određena je HPTLC–DB metodom na Gram–pozitivnu bakteriju *B. subtilis* (Slika 44a, b, c) i Gram–negativnu bakteriju *E. coli* (Slika 44d, e, f). Bele zone naspram ljubičaste pozadine predstavljaju aktivna jedinjenja prisutna u ekstraktima.

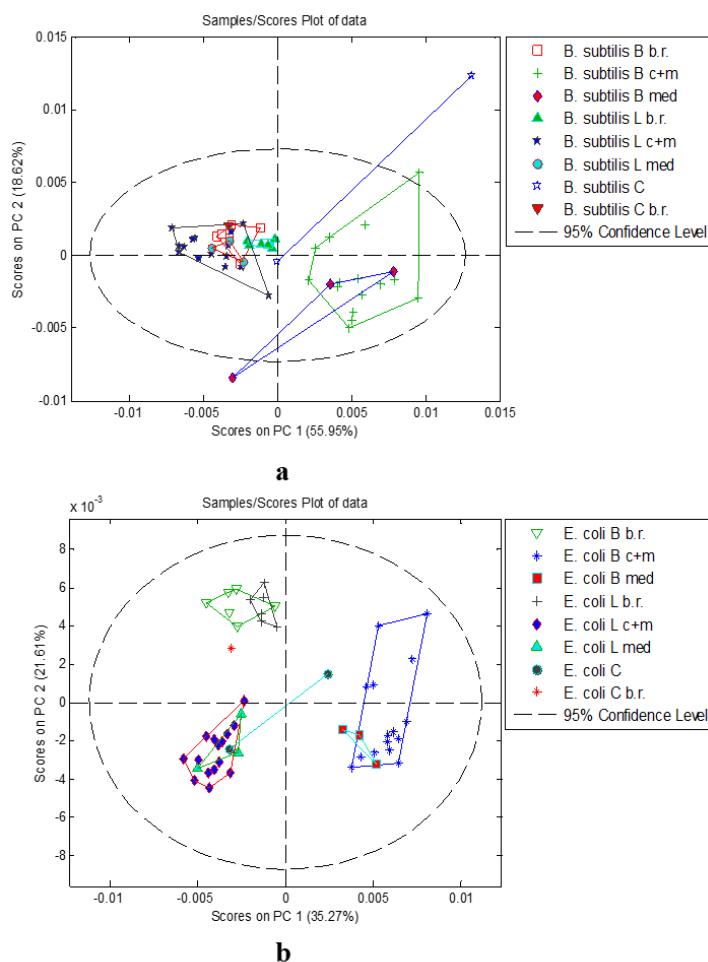


Slika 44. HPTLC biohromatogrami razvijeni na *B. subtilis*: ekstrakti preparata sa bagremovim medom pripremljeni sa zakišljenom vodom (B č+m) (a), ekstrakti preparata sa livadskim medom pripremljeni sa zakišljenom vodom (L č+m) (b), ekstrakti preparata sa bagremovim (B b.r.) i livadskim (L b.r.) medom pripremljeni bez rastvarača (c) i HPTLC biohromatogrami razvijeni na *E. coli*: ekstrakti preparata sa bagremovim medom pripremljeni sa zakišljenom vodom (B č+m) (d), ekstrakti preparata sa livadskim medom pripremljeni sa zakišljenom vodom (L č+m) (e), ekstrakti preparata sa bagremovim (B b.r.) i livadskim (L b.r.) medom pripremljeni bez rastvarača (f), S1 – smeša standarda izokvercetina (IQUE), astragalina (AST), galne kiseline (GA), kofeinske kiseline (CA) i kempferola (KAE), S2 – smeša standarda neohlorogene kiseline (NCGA) i eskuletina (AET), P – pinocembrin, G – galangin (c, f) dokumentovani pod vidljivim svetlom

Na osnovu vizuelne inspekcije biohromatograma uočava se da ista jedinjenja prisutna u ekstraktima ispoljavaju ABA na obe ispitane bakterije (**Slika 44**). Jači je intenzitet zona aktivnih jedinjenja na biohromatogramima koji su razvijeni na *E. coli* (**Slika 44d, e, f**) u poređenju sa intenzitetom aktivnih zona na biohromatogramima koji su razvijeni na *B. subtilis* (**Slika 44a, b, c**). Zone aktivnih jedinjenja nalaze se na $hR_F \sim 40$ i na $hR_F > 85$. Svi ekstrakti medova kao i ekstrakti čuvaruće imaju aktivne zone na $hR_F > 85$ slabijeg intenziteta u poređenju sa ekstraktima preparata. Na biohromatogramima za *B. subtilis* ekstrakata preparata od bagremovog (**Slika 44a**) i livadskog meda (**Slika 44b**) sa zakišljenom vodom aktivna zona na $hR_F > 85$ je jednakog intenziteta, dok se zone aktivnih jedinjenja na $hR_F \sim 40$ uočavaju samo u profilima ekstrakata sa bagremovim medom (**Slika 44a**). Ekstrakti preparata pripremljeni od obe vrste meda bez rastvarača ispoljavaju aktivne zone na $hR_F > 85$ slabijeg intenziteta (**Slika 44c**).

Zone aktivnih jedinjenja na biohromatogramima razvijenim na *E. coli* (**Slika 44d, e, f**) su jače izražene i bolje međusobno razdvojene. Na sva tri biohromatograma se nalaze iste zone aktivnih jedinjenja na $hR_F \sim 40$ i na $hR_F > 85$. Aktivne zone na $hR_F > 85$ su najviše izražene na biohromatogramu ekstrakata preparata sa livadskim medom pripremljenih sa zakišljenom vodom (**Slika 44e**). Ovde se jasno može videti prisustvo dve aktivne zone koje odgovaraju kofeinskoj kiselini ($hR_F 87$) i galanginu ($hR_F 96$). Antibakterijska aktivnost galangina ranije je potvrđena [158]. Ekstrakti L8, L9 i L11 ispoljavaju zone najjačeg intenziteta. Zone na $hR_F \sim 40$ najjače su u ekstraktu L8. Ekstrakti preparata sa bagremovim medom imaju nešto slabije izražene aktivne zone, a najjaču aktivnost ispoljavaju u ekstraktima B10, B11 i B12 (**Slika 44d**). U ekstraktima preparata sa bagremovim medom pripremljenim bez rastvarača jače su izražene zone aktivnih jedinjenja na $hR_F \sim 40$ u poređenju sa intenzitetom istih zona u ekstraktima sa livadskim medom bez rastvarača (**Slika 44f**).

Podaci dobijeni sa HPTLC antibakterijskih biohromatograma upotrebom ImageJ programa obrađeni su analizom glavnih komponenata. Primenom PCA ispitan je uticaj različitih faktora na razdvajanje ekstrakata meda, svežih listova čuvaruće i preparata čuvaruće i meda na osnovu antibakterijske aktivnosti koju ispoljavaju aktivna jedinjenja na biohromatogramima (**Slika 44**). Grafici skorova latentnih varijabli su konstruisani prema bakteriji na kojoj je test izveden (**Slika 45**), prema vrsti meda od kojeg je preparat napravljen (**Slika 46**) i prema načinu ekstrakcije koji je korišćen za pripremu ekstrakata preparata čuvaruće i meda (**Slika 47**). Dobijeni PCA modeli opisani su sa četiri glavne komponente. Procenat varijabiliteta opisan glavnim komponentama dat je u **Tabela P11**. Grafici skorova (**Slika 45, Slika 46 i Slika 47**) latentnih varijabli konstruisani su na osnovu prve dve glavne komponente PC1 i PC2.

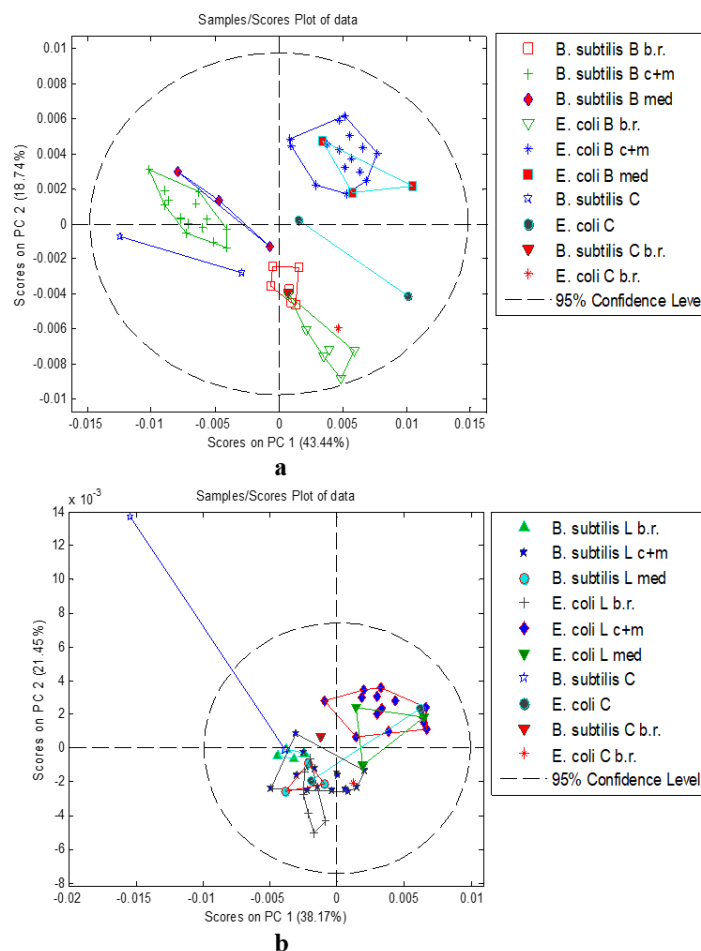


Slika 45. Grafici skorova latentnih varijabli konstruisani na osnovu aktivnosti ekstrakata koju ispoljavaju prema: *B. subtilis* (a), *E. coli* (b)

Na graficima skorova latentnih varijabli konstruisanim prema ispoljenoj aktivnosti ekstrakata na određenu bakteriju (**Slika 45**) uticaj na razdvajanje ekstrakata se posmatra u odnosu na vrstu meda i u odnosu na način pripreme ekstrakata (ekstrakcija sa zakišljenom vodom ili bez rastvarača).

Na grafiku skorova latentnih varijabli za *B. subtilis* (**Slika 45a**) ekstrakti preparata sa zakišljenom vodom (B č+m i L č+m) su razdvojeni na osnovu vrste meda od kojih su pripremljeni. Izbor meda nije imao uticaja na razdvajanje ekstrakata preparata pripremljenim bez rastvarača (B b.r. i L b.r.). Takođe, ekstrakti preparata od bagremovog meda se potpuno odvajaju u odnosu na to da li su pripremljeni sa zakišljenom vodom (B č+m) ili bez rastvarača (B b.r.) dok su ekstrakti preparata od livadskog meda samo delimično odvojeni (L č+m i L b.r.). Slabiji antibakterijski odgovor ekstrakata L č+m, L b.r. i B b.r. na biohromatogramima (**Slika 44c, d**) uticao je na preklapanje ovih grupa ekstrakata. Ekstrakti B č+m pozicionirani su na desnoj strani grafika skorova latentnih varijabli odvojeni od svih ostalih ekstrakata preparata jer se u njihovom antibakterijskom profilu manifestuju zone aktivnih jedinjenja na $hR_F \sim 40$.

Na grafiku skorova latentnih varijabli za *E. coli* (**Slika 45b**) ekstrakti preparata pripremljenih sa zakišljenom vodom (B č+m i L č+m) su potpuno odvojeni od onih ekstrakata preparata pripremljenih bez rastvarača (B b.r. i L b.r.). Ekstrakti B č+m i L č+m među sobom su odvojeni i u zavisnosti od vrste meda od kojeg su pripremljeni, dok izbor meda nije imao uticaj na međusobno razdvajanje ekstrakata B b.r. i L b.r.. Ekstrakti medova preklapljeni su sa ekstraktima preparata sa zakišljenom vodom koji su napravljeni od iste vrste meda.



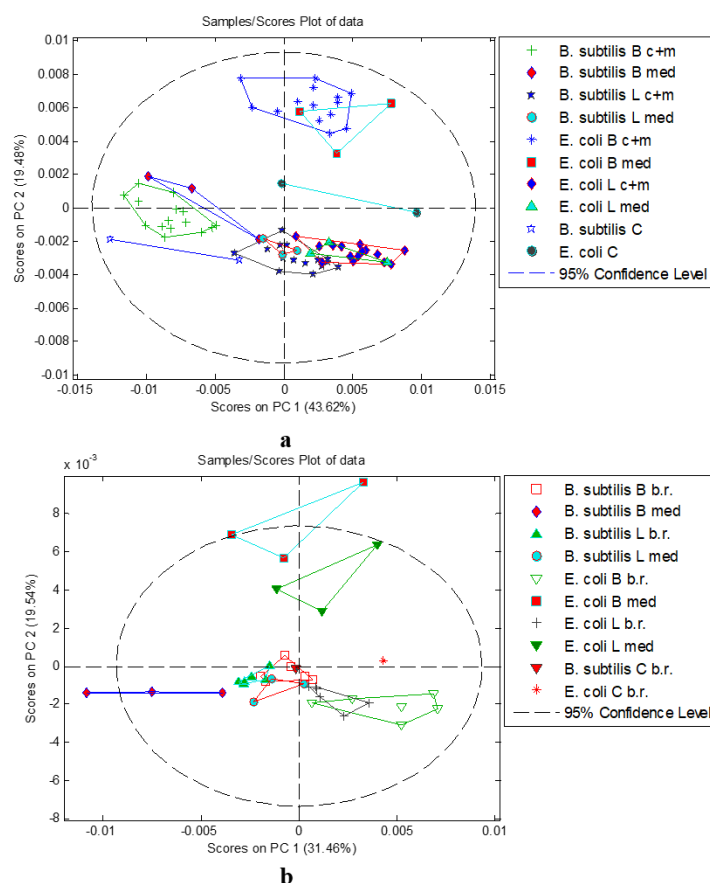
Slika 46. Grafici skorova latentnih varijabli konstruisani prema aktivnosti ekstrakata pripremljenih od dve vrste meda: bagremov med (**a**), livadski med (**b**)

Na graficima skorova latentnih varijabli koji su konstruisani u odnosu na vrstu meda koja je korišćena za pripremu preparata (**Slika 46**) posmatra se razdvajanje ekstrakata preparata na osnovu ispoljavanja antibakterijske aktivnosti na ispitane bakterije i načina ekstrakcije.

Ekstrakti preparata od bagremovog meda potpuno su razdvojeni na osnovu načina ekstrakcije (**Slika 46a**). Dodatno, ekstrakti pripremljeni sa zakišeljnom vodom (B č+m) razdvojeni su i na osnovu aktivnosti na bakterije *B. subtilis* i *E. coli*. Uticaj na ovakvo razdvajanje ispoljavaju aktivne zone na $hR_F > 85$ koje su jače ispoljene na *E. coli* biohromatogramu. Ekstrakti preparata pripremljeni bez rastvarača (B b.r.) samo su delimično odvojeni u odnosu na aktivnost koju ispoljavaju naspram ove dve ispitane bakterije.

Grafik skorova latentnih varijabli (**Slika 46b**) za ekstrakte preparata od livadskog meda pokazuje razdvajanje ekstrakata preparata pripremljenih sa zakišeljnom vodom na osnovu aktivnosti ekstrakata na određenu bakteriju. Ekstrakti L č+m ispoljavaju intenzivnije zone aktivnih jedinjenja na $hR_F > 85$ naspram *E. coli* što je uticalo na odvajanje ekstrakata na osnovu aktivnosti prema određenoj vrsti bakterije.

Ekstrakti preparata bez rastvarača (L b.r.) za oba soja bakterija pozicionirani su u donjem levom kvadrantu grafika skorova latentnih varijabli. Ekstrakti L č+m i L b.r. ispoljavaju potpuno isti antibakterijski profil naspram *B. subtilis* te su stoga potpuno preklapljeni, dok se na antibakterijskom profilu L b.r. za *E. coli* uočavaju aktivne zone na $hR_F \sim 40$ što je uticalo na blago razdvajanje ovih ekstrakata od pomenute grupe.



Slika 47. Grafici skorova latentnih varijabli konstruisani prema aktivnosti ekstrakata pripremljenih na dva načina: sa zakišljenom vodom (**a**), bez rastvarača (**b**)

Grafici skorova latentnih varijabli konstruisani su u odnosu na način ekstrakcije preparata – sa zakišljenom vodom ili bez rastvarača (**Slika 47**). U ovom slučaju, na razdvajanje ekstrakata preparata gleda se uticaj antibakterijske aktivnosti naspram određene vrste bakterije kao i vrsta meda od kojih su preparati pripremljeni.

Na grafiku skorova latentnih varijabli na kome se nalaze svi ekstrakti preparata napravljeni sa zakišljenom vodom dolazi do razdvajanja ekstrakata preparata na osnovu vrste meda od kojih su pripremljeni (**Slika 47a**). Ekstrakti preparata sa bagremovim medom (B č+m) su potpuno odvojeni i na osnovu ispoljavanja antibakterijske aktivnosti prema određenoj bakteriji. Ekstrakti preparata od livadskog meda (L č+m) delimično su preklapljeni, ali se može uočiti razdvajanje nekih ekstrakata ovih preparata u odnosu na ispoljenu antibakterijsku aktivnost.

Sve grupe ekstrakata preparata pripremljenih bez rastvarača (B b.r. i L b.r.) su pozicionirane blizu jedna druge na donjoj polovini grafika skorova latentnih varijabli (**Slika 47b**). Ekstrakti preparata B b.r. i L b.r. delimično su razdvojeni na osnovu ispoljavanja antibakterijske aktivnosti prema određenoj bakteriji. Ekstrakti preparata B b.r. i L b.r. pozicionirani su oko centra grafika skorova, sa leve strane, na osnovu antibakterijskog odgovora prema *B. subtilis*. Sa desne strane grafika skorova pozicionirani su ekstrakti preparata B b.r. i L b.r. na osnovu antibakterijske aktivnosti prema *E. coli*. Sa grafika skorova latentnih varijabli uočava se da vrsta meda od koje su preparati pripremljeni nije imala uticaja na razdvajanje.

5. ZAKLJUČAK

Fenolna jedinjenja prisutna u listovima čuvaruće značajno doprinose ispoljavanju raznovrsnih bioloških svojstava, što objašnjava široku upotrebu ove biljke u tradicionalnoj medicini. Iako čuvaruća ima dugu tradiciju primene, glavni nedostatak je odsustvo monografije ove biljke u farmakopejama. U okviru ove doktorske disertacije prvi put je sistematski ispitan fitohemijski profil i određena je biološka aktivnost dvadeset uzoraka listova čuvaruće. Pored toga, urađena je detaljna fitohemijska karakterizacija i procena biološke aktivnosti preparata svežih listova čuvaruće u kombinaciji sa bagremovim i livadskim medom, pri čemu su odgovarajući ekstrakti pripremljeni na dva načina: ekstrakcijom zakišljenom vodom i ekstrakcijom bez upotrebe rastvarača. Posebno je značajno istaći da ekstrakti pripremljeni bez rastvarača verno odražavaju prirodne uslove i interakcije koje se dešavaju unutar preparata tokom vremena.

Primenom UPLC–LTQ OrbiTrap MS tehnike u ekstraktima osušenih listova čuvaruće identifikovano je ukupno 38 jedinjenja, od kojih je prisustvo 21 jedinjenja po prvi put zabeleženo u okviru ove disertacije, uz detaljno opisanu fragmentaciju. Za kvantifikaciju fenolnih jedinjenja primenjena je UPLC–DAD–MS/MS tehnika kojom je određena koncentracija 19 fenolnih jedinjenja. Spektrofotometrijski je utvrđen niži ukupan sadržaj fenola u ekstraktima svežih listova čuvaruće u poređenju sa ekstraktima osušenih listova. Pored toga, u ekstraktima svežih listova čuvaruće, ukupan sadržaj fenola je veći u odnosu na čist med, dok ekstrakti preparata ukazuju na to da dodatak čuvaruće među povećava ukupan sadržaj fenola. Tokom perioda ispitivanja, ukupan sadržaj fenola ostao je stabilan u preparatima čuvaruće i meda pripremljenim kako ekstrakcijom sa zakišljenom vodom, tako i bez upotrebe rastvarača.

Prvi put je u okviru ove doktorske disertacije optimizovana i primenjena HPTLC metoda za dobijanje fenolnog profila ekstrakata osušenih listova čuvaruće, kao i preparata čuvaruće i meda, pružajući karakteristične informacije u obliku “otiska prsta” za svaki ekstrakt. Na hromatogramima se uočava sličan fenolni profil svih dvadeset ekstrakata osušenih listova čuvaruće, pri čemu se galna kiselina i neidentifikovano jedinjenje na hR_F 18 izdvajaju kao glavni metaboliti na osnovu veličine i intenziteta zona. Takođe, korišćenjem ove moćne, brze i jednostavne metode potvrđeno je prisustvo izokvercetina, kempferola, kofeinske kiseline i astragalina u ekstraktima listova čuvaruće. Ekstrakti meda su bogati svetloplavim zonama, od kojih su neke identifikovane kao neohlorogena kiselina, eskuletin, kofeinska kiselina i galangin. Hromatogrami na kojima su razvijeni profili ekstrakata preparata čuvaruće i meda ukazuju na sličnost sa fenolnim profilom pojedinačnih komponenata preparata.

Prema dostupnim podacima iz literature, do sada nije bio određen kompletan profil šećera u listovima čuvaruće, što predstavlja veliki nedostatak s obzirom na to da se ova biljka tradicionalno koristi za smanjenje nivoa šećera u krvi. U okviru ovog istraživanja, prvi put je određen kompletan profil šećera u uzorcima osušenih listova čuvaruće, preparatima čuvaruće i meda, kao i u uzorcima svežih listova čuvaruće i čistog meda primenom HPAEC–PAD tehnike. Najzastupljeniji šećeri u osušenim listovima čuvaruće su glukoza i fruktoza, uz visok sadržaj šećernog alkohola galaktitola. U svežim listovima čuvaruće dominantni šećeri su fruktoza, saharoza i izomaltoza, pri čemu je sadržaj glukoze i fruktoze niži u poređenju sa sadržajem u osušenim listovima. Ovi rezultati su od velikog značaja, budući da se, u cilju smanjenja nivoa šećera u krvi, preporučuje žvakanje svežih listova čuvaruće. Dodatak svežih listova čuvaruće u med dovodi do smanjenja sadržaja pojedinačnih šećera, a samim tim i do smanjenja ukupnog sadržaja šećera u preparatima.

Multielementalna analiza osušenih listova čuvaruće urađena je primenom ICP–OES metode, pri čemu su najzastupljeniji makroelementi Ca, Mg i K, što je u skladu sa prethodno objavljenim rezultatima. Važno je napomenuti da su koncentracije toksičnih elemenata, poput Cd i Ni, bile ispod propisanih granica u svim analiziranim uzorcima. Ukupan sadržaj makroelemenata je ujednačen među uzorcima, dok se uzorak 20 izdvaja od ostalih uzoraka zbog najvišeg sadržaja mikroelemenata, među kojima su dominantni Cr, Mn i Zn.

Antioksidativna aktivnost (AOA) ekstrakata osušenih listova čuvaruće ispitana je spektrofotometrijski primenom četiri antioksidativna testa – DPPH, ABTS, TRP i TAC, pri čemu su rezultati pokazali visoku korelaciju sa ukupnim sadržajem fenola. Ekstrakti 12 i 20 izdvajaju se po najvišim vrednostima ukupnog sadržaja fenola i antioksidativne aktivnosti, dok ekstrakt 8 ima najniže vrednosti ovih parametara, što ga jasno diferencira od ostalih. Antioksidativna aktivnost ekstrakata preparata čuvaruće i meda, čistog meda i svežih listova čuvaruće određena je primenom spektrofotometrijskog DPPH testa. Dodatak čuvaruće u bagremov med povećava antioksidativnu aktivnost, dok je njen dodatak u livadski med doveo do smanjenja AOA. Ipak, AOA ostaje stabilna tokom svih pet nedelja ispitivanja što ukazuje na stabilnost preparata. Antioksidativna aktivnost svežih listova čuvaruće je niža u poređenju sa ekstraktima osušenih listova, što je posledica visokog sadržaja vode u svežem biljnom materijalu.

U okviru ove disertacije, po prvi put je optimizovana i primenjena HPTLC metoda direktne bioautografije za određivanje biološke aktivnosti ekstrakata čuvaruće i odgovarajućih preparata sa medom, uključujući antioksidativnu, antidijabetsku i antibakterijsku aktivnost. Ova metoda, pored brzine i jednostavnosti, omogućava preciznu identifikaciju pojedinačnih bioaktivnih jedinjenja odgovornih za biološku aktivnost ekstrakata. Analiza glavnih komponentata dodatno je omogućila jasno prepoznavanje aktivnih jedinjenja i specifično grupisanje ekstrakata prema ispoljenim biološkim profilima.

HPTLC–TRP i HPTLC–TAC testovi su po prvi put optimizovani za određivanje antioksidativne aktivnosti ekstrakata. Prema saznanjima autora, na osnovu pregleda dostupne literature, ovi HPTLC testovi dosad nisu bili primenjivani za procenu antioksidativne aktivnosti, čime predstavljaju novinu u analitičkom pristupu.

Antioksidativni profili ekstrakata osušenih listova čuvaruće dobijeni HPTLC–DPPH, HPTLC–ABTS i HPTLC–TRP testovima su slični, pri čemu se uočava manji broj zona aktivnih jedinjenja, među kojima najveću aktivnost pokazuju galna kiselina i nepoznato jedinjenje na hR_F 18. Nasuprot tome, HPTLC–FC i HPTLC–TAC testovi pružaju hromatograme sa većim brojem zona aktivnih jedinjenja, uključujući galnu kiselinu, kao i neidentifikovana jedinjenja na hR_F 33, 38, 86 i 92. Ovi HPTLC antioksidativni testovi dodatno potvrđuju sličnost antioksidativnih profila svih testiranih ekstrakata, što je u skladu sa spektrofotometrijski dobijenim rezultatima. Sa antioksidativnog profila ekstrakata preparata, koji je dobijen HPTLC–DPPH testom, identifikovana su aktivna jedinjenja poput neohlorogene kiseline, galangina, galne kiseline, kofeinske kiseline, eskuletina, astragalina i izokvercetinina. Zona galne kiseline pokazala je najjači intenzitet u ekstraktima preparata i svežim listovima čuvaruće. Pored identifikovanih jedinjenja, antioksidativnu aktivnost ispoljavaju i neidentifikovana jedinjenja na hR_F 67, 71 i 73.

Teorija funkcionala gustine korišćena je za procenu antioksidativne aktivnosti šest jedinjenja identifikovanih u listovima čuvaruće: galne i kofeinske kiseline, kempferola, astragalina, kvercetinina i izokvercetinina. Dobijeni rezultati ukazuju na to da mehanizam hemijskih reakcija zasnovan na transferu atoma vodonika prevladava u uklanjanju slobodnih radikala u poređenju sa mehanizmom transfera elektrona. Radikali na C prstenu flavonoida pokazuju bolju rezonantnu stabilizaciju zahvaljujući većoj delokalizaciji gustine spina, što objašnjava zašto flavonoidi sa vezanom šećernom komponentom na ovoj poziciji (poput astragalina) imaju slabiju antioksidativnu aktivnost u poređenju sa odgovarajućim aglikonima (kempferolom).

U okviru ove disertacije, po prvi put je ispitana antidijabetska aktivnost ekstrakata osušenih listova čuvaruće i odgovarajućih preparata sa medom. Spektrofotometrijski rezultati inhibicije enzima α -amilaze potvrđuju direktnu zavisnost između koncentracije ekstrakata i antidijabetske aktivnosti. Svi ekstrakti su pokazali određeni nivo inhibicije pri višim koncentracijama (5 mg/mL i 10 mg/mL). Ekstrakti 12 i 19 su bili najefikasniji, sa procentima inhibicije iznad 65%, dok je još pet ekstrakata pokazalo je inhibiciju veću od 50%.

Dodatno, razvijen je HPTLC–antidijabetički profil koji je pokazao uniformnost između svih dvadeset ekstrakata osušenih listova čuvarkeće. Aktivna jedinjenja se nalaze na hR_F 3, 13, 60, i 92, pri čemu su razlike u intenzitetu ovih zona doprinele su razdvajanju ekstrakata primenom analize glavnih komponenata. Prednost HPTLC metode u određivanju antidijabetičke aktivnosti u odnosu na spektrofotometrijske metode leži u tome što nije bilo potrebe za prečišćavanjem ekstrakata od prisutnih šećera, koji ne utiču na izvođenje HPTLC testa, dok prisustvo prostih šećera, poput glukoze, može uticati na tačnost rezultata. HPTLC–amilaza testom procenjena je antidijabetička aktivnost ekstrakata preparata čuvarkeće i meda. Na hromatogramima se uočavaju pojedinačna aktivna jedinjenja slabog intenziteta, s tim da su neki ekstrakti preparata sa bagremovim medom imali izraženije zone. Identifikovana su aktivna jedinjenja kao što su kofeinska, neohlorogena i galna kiselina i eskuletin, a uočavaju se i brojne zone neidentifikovanih aktivnih jedinjenja na $hR_F < 50$.

Agar–difuzionim metodom ispitana je antibakterijska aktivnost ekstrakata osušenih listova čuvarkeće. Rezultati su pokazali da ekstrakti najefikasnije inhibiraju soj *M. lysodeikticus*, dok je soj *S. aureus* pokazao najmanju osetljivost. Gram–negativne bakterije nisu ispoljile osetljivost na ispitane ekstrakte. Nasuprot tome, na HPTLC–antibakterijskim hromatogramima uočava se veća osetljivost Gram–negativnih sojeva, uz prisustvo većeg broja zona aktivnih jedinjenja. Hromatogrami Gram–pozitivnih sojeva su bili međusobno slični, sa manjim brojem zona aktivnih jedinjenja. Analiza glavnih komponenata dodatno je ukazala na razlike u osetljivosti pojedinačnih bakterijskih sojeva prema ispitanim ekstraktima.

Antibakterijski profili ekstrakata preparata čuvarkeće i meda pokazuju veću osetljivost kod Gram–negativne bakterije. Uočava se mali broj zona aktivnih jedinjenja, pri čemu su zone slabije izražene na hromatogramu za *B. subtilis*, dok je intenzitet zona izraženiji na hromatogramima za *E. coli*. Na svim hromatogramima uočavaju se aktivne zone na $hR_F \sim 40$ i > 85 . Identifikovana su aktivna jedinjenja poput izokvercetina, kofeinske kiseline i galangina.

Ova disertacija pruža sveobuhvatan uvid u fitohemijsku karakterizaciju i biološku aktivnost listova čuvarkeće kao i njihovih preparata sa medom, sa posebnim naglaskom na fenolna jedinjenja koja značajno doprinose biološkim svojstvima ove biljke. Trenutno ne postoje standardizovane procedure za ispitivanje kvaliteta ove biljne droge, niti je njena upotreba regulisana zvanično priznatim smernicama. Rezultati ove disertacije mogu predstavljati korak ka uspostavljanju standardnih procedura, čime bi se doprinelo boljoj evaluaciji i širem prihvatanju čuvarkeće u fitoterapiji i medicini.

6. LITERATURA

- [1] Šarić-Kundalić B, Dobeš C, Klatte-Asselmeyer V, Saukel J. Ethnobotanical survey of traditionally used plants in human therapy of east, north and north-east Bosnia and Herzegovina. *J Ethnopharmacol* (2011) 133: 1051–76. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.11.033>.
- [2] Šarić-Kundalić B, Dobeš C, Klatte-Asselmeyer V, Saukel J. Ethnobotanical study on medicinal use of wild and cultivated plants in middle, south and west Bosnia and Herzegovina. *J Ethnopharmacol* (2010) 131: 33–55. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.05.061>.
- [3] Dimitrijević, D. Antioxidant and antimicrobial activity of different extracts from leaves and roots of *Jovibarba heuffelii* (Schott.) A. Löve and D. Löve. *J Med Plants Res* (2012) 6. <https://doi.org/10.5897/JMPR12.239>.
- [4] European Pharmacopoeia. tenth edition. Strasbourg: Council of Europe (2019).
- [5] Stojković D, Barros L, Petrović J, Glamoclija J, Santos-Buelga C, Ferreira ICFR, et al. Ethnopharmacological uses of *Sempervivum tectorum* L. in southern Serbia: Scientific confirmation for the use against otitis linked bacteria. *J Ethnopharmacol* (2015) 176: 297–304. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.11.014>.
- [6] Jarić S, Mačukanović-Jocić M, Djurdjević L, Mitrović M, Kostić O, Karadžić B, et al. An ethnobotanical survey of traditionally used plants on Suva planina mountain (south-eastern Serbia). *J Ethnopharmacol* (2015) 175: 93–108. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.09.002>.
- [7] Petrovska B. Historical review of medicinal plants' usage. *Phcog Rev* (2012) 6: 1. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.95849>.
- [8] Živković J, Ilić M, Šavikin K, Zdunić G, Ilić A, Stojković D. Traditional Use of Medicinal Plants in South-Eastern Serbia (Pčinja District): Ethnopharmacological Investigation on the Current Status and Comparison With Half a Century Old Data. *Front Pharmacol* (2020) 11: 1020. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.01020>.
- [9] Tucakov J. Lečenje biljem: lečenje čajevima lekovitog bilja. Beograd: Služebni Glasnik (2012).
- [10] World Health Organization. WHO global report on traditional and complementary medicine 2019. Geneva: World Health Organization (2019).
- [11] Zakon o lekovima i medicinskim sredstvima (2017).
- [12] Petrović S. Herbal and traditional Herbal Medicinal Products, EU Herbal monographs and EU list. *Arh Farm* (2019) 69: 221–69. <https://doi.org/10.5937/arhfarm1904221P>.
- [13] Kovačević N. Osnovi farmakognoziije. Farmaceutski fakultet Beograd (2004).
- [14] S. Agostini-Costa TD, F. R, R. H, Silveira D, A. M. Secondary Metabolites. In: Dhanarasu S, editor. *Chromatography and Its Applications*, InTech (2012). <https://doi.org/10.5772/35705>.
- [15] Mani V, Park S, Kim JA, Lee SI, Lee K. Metabolic Perturbation and Synthetic Biology Strategies for Plant Terpenoid Production—An Updated Overview. *Plants* (2021) 10: 2179. <https://doi.org/10.3390/plants10102179>.
- [16] Masyita A, Mustika Sari R, Dwi Astuti A, Yasir B, Rahma Rumata N, Emran TB, et al. Terpenes and terpenoids as main bioactive compounds of essential oils, their roles in human health and potential application as natural food preservatives. *Food Chem X* (2022) 13: 100217. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2022.100217>.

- [17] Wu M, Ni L, Lu H, Xu H, Zou S, Zou X. Terpenoids and Their Biological Activities from *Cinnamomum*: A Review. *J Chem-NY* (2020) 2020: 1–14. <https://doi.org/10.1155/2020/5097542>.
- [18] Yang W, Chen X, Li Y, Guo S, Wang Z, Yu X. Advances in Pharmacological Activities of Terpenoids. *Nat Prod Commun* (2020) 15: 1934578X2090355. <https://doi.org/10.1177/1934578X20903555>.
- [19] Saltveit ME. Synthesis and Metabolism of Phenolic Compounds. In: Yahia EM, editor. *Fruit and Vegetable Phytochemicals*. 1st ed., Wiley (2017), p. 115–24. <https://doi.org/10.1002/9781119158042.ch5>.
- [20] Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J Nutr Biochem* (2002) 13: 572–84. [https://doi.org/10.1016/S0955-2863\(02\)00208-5](https://doi.org/10.1016/S0955-2863(02)00208-5).
- [21] Nijveldt RJ, Van Nood E, Van Hoorn DE, Boelens PG, Van Norren K, Van Leeuwen PA. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nutr* (2001) 74: 418–25. <https://doi.org/10.1093/ajcn/74.4.418>.
- [22] Teoh ES. Secondary Metabolites of Plants. *Medicinal Orchids of Asia*, Cham: Springer International Publishing (2016), p. 59–73. https://doi.org/10.1007/978-3-319-24274-3_5.
- [23] Khursheed A, Jain V. Medicinal Research Progress of Natural Coumarin and its Derivatives. *J Nat Prod* (2021) 11: 648–62. <https://doi.org/10.2174/2210315510999201102201552>.
- [24] Edinoff AN, Kaplan LA, Khan S, Petersen M, Sauce E, Causey CD, et al. Full Opioid Agonists and Tramadol: Pharmacological and Clinical Considerations. *Anesth Pain Med* (2021) 11. <https://doi.org/10.5812/aapm.119156>.
- [25] Zulak KG, Liscombe DK, Ashihara H, Facchini PJ. Alkaloids. In: Crozier A, Clifford MN, Ashihara H, editors. *Plant Secondary Metabolites*. 1st ed., Wiley (2006), p. 102–36. <https://doi.org/10.1002/9780470988558.ch4>.
- [26] Moudi M, Go R, Yien CYS, Nazre M. Vinca alkaloids. *Int J Prev Med* (2013) 4: 1231–5.
- [27] Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Phcog Rev* (2010) 4: 118. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.70902>.
- [28] Pisoschi AM, Pop A, Cimpeanu C, Predoi G. Antioxidant Capacity Determination in Plants and Plant-Derived Products: A Review. *Oxid Med Cell Longev* (2016) 2016: 1–36. <https://doi.org/10.1155/2016/9130976>.
- [29] Amarowicz R, Pegg RB. Natural antioxidants of plant origin. *Advances in Food and Nutrition Research*, vol. 90, Elsevier (2019), p. 1–81. <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2019.02.011>.
- [30] Bibi Sadeer N, Montesano D, Albrizio S, Zengin G, Mahomoodally MF. The Versatility of Antioxidant Assays in Food Science and Safety—Chemistry, Applications, Strengths, and Limitations. *Antioxidants* (2020) 9: 709. <https://doi.org/10.3390/antiox9080709>.
- [31] Procházková D, Boušová I, Wilhelmová N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia* (2011) 82: 513–23. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2011.01.018>.
- [32] Alberti Á, Riethmüller E, Béni S, Kéry Á. Evaluation of Radical Scavenging Activity of *Sempervivum tectorum* and *Corylus avellana* Extracts with Different Phenolic Composition. *Natural Product Communications* (2016) 11: 1934578X1601100. <https://doi.org/10.1177/1934578X1601100412>.
- [33] Šentjurs M, Nemeč M, Connor HD, Abram V. Antioxidant Activity of *Sempervivum tectorum* and Its Components. *J Agric Food Chem* (2003) 51: 2766–71. <https://doi.org/10.1021/jf026029z>.

- [34] Pietta P-G. Flavonoids as Antioxidants. *J Nat Prod* (2000) 63: 1035–42. <https://doi.org/10.1021/np9904509>.
- [35] Gonzalez-Burgos E, Gomez-Serranillos MP. Terpene Compounds in Nature: A Review of Their Potential Antioxidant Activity. *Curr Med Chem* (2012) 19: 5319–41. <https://doi.org/10.2174/092986712803833335>.
- [36] Gutiérrez-del-Río I, López-Ibáñez S, Magadán-Corpas P, Fernández-Calleja L, Pérez-Valero Á, Tuñón-Granda M, et al. Terpenoids and Polyphenols as Natural Antioxidant Agents in Food Preservation. *Antioxidants* (2021) 10: 1264. <https://doi.org/10.3390/antiox10081264>.
- [37] Kardum N, Glibetic M. Polyphenols and Their Interactions With Other Dietary Compounds: Implications for Human Health. *Advances in Food and Nutrition Research*, vol. 84, Elsevier (2018), p. 103–44. <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2017.12.001>.
- [38] Przeor M. Some Common Medicinal Plants with Antidiabetic Activity, Known and Available in Europe (A Mini-Review). *Pharmaceuticals* (2022) 15: 65. <https://doi.org/10.3390/ph15010065>.
- [39] Shamim A, Ali A, Iqbal Z, Mirza MA, Aqil M, Kawish SM, et al. Natural Medicine a Promising Candidate in Combating Microbial Biofilm. *Antibiotics* (2023) 12: 299. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12020299>.
- [40] Khameneh B, Eskin NAM, Iranshahy M, Fazly Bazzaz BS. Phytochemicals: A Promising Weapon in the Arsenal against Antibiotic-Resistant Bacteria. *Antibiotics* (2021) 10: 1044. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10091044>.
- [41] Othman L, Sleiman A, Abdel-Massih RM. Antimicrobial Activity of Polyphenols and Alkaloids in Middle Eastern Plants. *Front Microbiol* (2019) 10: 911. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00911>.
- [42] Uzun Y, Dalar A, Konczak I. *Sempervivum davisii*: phytochemical composition, antioxidant and lipase-inhibitory activities. *Pharm Biol* (2017) 55: 532–40. <https://doi.org/10.1080/13880209.2016.1255979>.
- [43] Eid O, Ezzat S, Gonaïd M, Choucry M. Crassulaceae (chemistry and pharmacology) - A review. *Fut J Pharm Sci* (2018) 4: 234–40. <https://doi.org/10.1016/j.fjps.2018.07.003>.
- [44] Hassan MHA, Elwekeel A, Moawad A, Afifi N, Amin E, Amir DE. Phytochemical constituents and biological activity of selected genera of family Crassulaceae: A review. *S Afr J Bot* (2021) 141: 383–404. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2021.05.016>.
- [45] Cattaneo F, De Marino S, Parisi M, Festa C, Castaldo M, Finamore C, et al. Wound healing activity and phytochemical screening of purified fractions of *SEMPERVIVUM TECTORUM* L. leaves on HCT 116. *Phytochemical Analysis* (2019) 30: 524–34. <https://doi.org/10.1002/pca.2844>.
- [46] Cushman JC. Crassulacean Acid Metabolism. A Plastic Photosynthetic Adaptation to Arid Environments. *Plant Physiol* (2001) 127: 1439–48. <https://doi.org/10.1104/pp.010818>.
- [47] Abram V, Donko M. Tentative Identification of Polyphenols in *Sempervivum tectorum* and Assessment of the Antimicrobial Activity of *Sempervivum* L. *J Agric Food Chem* (1999) 47: 485–9. <https://doi.org/10.1021/jf980669d>.
- [48] Fleming T, editor. *PDR for herbal medicines*. 2., rev. ed. Montvale, N.J: Medical Economics Co (2000).
- [49] Šavikin K, Zdunić G, Menković N, Živković J, Čujić N, Tereščenko M, et al. Ethnobotanical study on traditional use of medicinal plants in South-Western Serbia, Zlatibor district. *J Ethnopharmacol* (2013) 146: 803–10. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.02.006>.

- [50] Rovčanin BR, Čebović T, Stešević D, Kekić D, Ristić M. Antibacterial effect of *Herniaria hirsuta*, *Prunus avium*, *Rubia tinctorum* and *Sempervivum tectorum* plant extracts on multiple antibiotic resistant *Escherichia coli*. *Biosci J* (2015) 31: 1852–61. <https://doi.org/10.14393/BJ-v31n6a2015-29091>.
- [51] Jarić S, Popović Z, Mačukanović-Jocić M, Djurdjević L, Mijatović M, Karadžić B, et al. An ethnobotanical study on the usage of wild medicinal herbs from Kopaonik Mountain (Central Serbia). *J Ethnopharmacol* (2007) 111: 160–75. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.11.007>.
- [52] Jarić S, Kostić O, Miletić Z, Marković M, Sekulić D, Mitrović M, et al. Ethnobotanical and ethnomedicinal research into medicinal plants in the Mt Stara Planina region (south-eastern Serbia, Western Balkans). *J Ethnobiol Ethnomed* (2024) 20: 7. <https://doi.org/10.1186/s13002-024-00647-2>.
- [53] Mustafa B, Hajdari A, Pajazita Q, Sylva B, Quave CL, Pieroni A. An ethnobotanical survey of the Gollak region, Kosovo. *Genet Resour Crop Ev* (2012) 59: 739–54. <https://doi.org/10.1007/s10722-011-9715-4>.
- [54] Mustafa B, Hajdari A, Pulaj B, Quave CL, Pieroni A. Medical and food ethnobotany among Albanians and Serbs living in the Shtërpçë/Štrpce area, South Kosovo. *J Herb Med* (2020) 22: 100344. <https://doi.org/10.1016/j.hermed.2020.100344>.
- [55] Lumpert M, Kreft S. Folk use of medicinal plants in Karst and Gorjanci, Slovenia. *J Ethnobiol Ethnomed* (2017) 13: 16. <https://doi.org/10.1186/s13002-017-0144-0>.
- [56] Gilca M, Tiplica GS, Salavastru CM. Traditional and ethnobotanical dermatology practices in Romania and other Eastern European countries. *Clin Dermatol* (2018) 36: 338–52. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2018.03.008>.
- [57] Guarrera PM, Forti G, Marignoli S. Ethnobotanical and ethnomedicinal uses of plants in the district of Acquapendente (Latium, Central Italy). *J Ethnopharmacol* (2005) 96: 429–44. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.09.014>.
- [58] Viegi L, Pieroni A, Guarrera PM, Vangelisti R. A review of plants used in folk veterinary medicine in Italy as basis for a databank. *J Ethnopharmacol* (2003) 89: 221–44. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2003.08.003>.
- [59] Casaru C, Bulgaru A, Danes D. Medicinal plants used in traditional veterinary medicine to treat ruminants in the curvature Subcarpathians area, Romania. *Vet Med* (2020) LXVI.
- [60] Alberti Á, Béni S, Lackó E, Riba P, Al-Khrasani M, Kéry Á. Characterization of phenolic compounds and antinociceptive activity of *Sempervivum tectorum* L. leaf juice. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* (2012) 70: 143–50. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2012.06.017>.
- [61] Stevens JF, Hart H, Elema ET, Bolck A. Flavonoid variation in eurasian *Sedum* and *Sempervivum*. *Phytochem* (1996) 41: 503–12. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(95\)00573-0](https://doi.org/10.1016/0031-9422(95)00573-0).
- [62] Alberti A, Blazics B, Kery A. Evaluation of *Sempervivum tectorum* L. Flavonoids by LC and LC–MS. *Chroma* (2008) 68: 107–11. <https://doi.org/10.1365/s10337-008-0750-z>.
- [63] Kekesi G, Dobos I, Benedek G, Horvath G. Antinociceptive activity of *Sempervivum tectorum* L. extract in rats. *Phytother Res* (2003) 17: 1032–6. <https://doi.org/10.1002/ptr.1288>.
- [64] Gentscheva G, Karadjova I, Minkova S, Nikolova K, Andonova V, Petkova N, et al. Optical Properties and Antioxidant Activity of Water-Ethanol Extracts from *Sempervivum tectorum* L. from Bulgaria. *Horticulturae* (2021) 7: 520. <https://doi.org/10.3390/horticulturae7120520>.

- [65] Knez Marevci M, Bjelić S, Dariš B, Knez Ž, Leitgeb M. The Influence of Extracts from Common Houseleek (*Sempervivum tectorum*) on the Metabolic Activity of Human Melanoma Cells WM-266-4. *Processes* (2021) 9: 1549. <https://doi.org/10.3390/pr9091549>.
- [66] Dégi DM, Imre K, Herman V, Dégi J, Cristina RT, Marcu A, et al. Antimicrobial Activity of *Sempervivum tectorum* L. Extract on Pathogenic Bacteria Isolated from Otitis Externa of Dogs. *Vet Sci* (2023) 10: 265. <https://doi.org/10.3390/vetsci10040265>.
- [67] Stojicevic S, Stanisavljevic I, Velickovic D, Veljkovic V, Lazic M. Comparative screening of the anti-oxidant and antimicrobial activities of *Sempervivum marmoreum* L. extracts obtained by various extraction techniques. *J Serb Chem Soc* (2008) 73: 597–607. <https://doi.org/10.2298/JSC0806597S>.
- [68] Szentmihályi K, Fehér E, Vinkler P, Kéry Á, Blázovics A. Metabolic Alterations of Toxic and Nonessential Elements by the Treatment of *Sempervivum tectorum* Extract in a Hyperlipidemic Rat Model. *Toxicol Pathol* (2004) 32: 50–7. <https://doi.org/10.1080/01926230490261069>.
- [69] Blázovics A, Lugasi A, Kemény T, Hagymási K, Kéry Á. Membrane stabilising effects of natural polyphenols and flavonoids from *Sempervivum tectorum* on hepatic microsomal mixed-function oxidase system in hyperlipidemic rats. *J Ethnopharmacol* (2000) 73: 479–85. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(00\)00333-0](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(00)00333-0).
- [70] Blázovics A, González-Cabello R, Barta I, Gergely P, Fehér J, Kéry Á, et al. Effect of liver-protecting *Sempervivum tectorum* extract on the immune reactivity of spleen cells in hyperlipidaemic rats. *Phytother Res* (1994) 8: 33–7. <https://doi.org/10.1002/ptr.2650080108>.
- [71] Pravilnik o kvalitetu meda i drugih proizvoda pčela, broj 101/15 (2015).
- [72] EU Council. Council Directive 2001/110/EC of 20 December 2001 relating to honey. *Off J Eur Communities* (2001): 47–52.
- [73] Kumar S, Verma M, Hajam YA, Kumar R. Honey infused with herbs: A boon to cure pathological diseases. *Heliyon* (2024) 10: e23302. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e23302>.
- [74] Rao PV, Krishnan KT, Salleh N, Gan SH. Biological and therapeutic effects of honey produced by honey bees and stingless bees: a comparative review. *Rev Bras Farmacogn* (2016) 26: 657–64. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2016.01.012>.
- [75] Dimitriu L, Constantinescu-Aruxandei D, Preda D, Nichițean A-L, Nicolae C-A, Faraon VA, et al. Honey and Its Biomimetic Deep Eutectic Solvent Modulate the Antioxidant Activity of Polyphenols. *Antioxidants* (2022) 11: 2194. <https://doi.org/10.3390/antiox11112194>.
- [76] Cornara L, Biagi M, Xiao J, Burlando B. Therapeutic Properties of Bioactive Compounds from Different Honeybee Products. *Front Pharmacol* (2017) 8: 412. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00412>.
- [77] Czernicka MA, Sowa-Borowiec P, Dudek T, Cichoński J, Puchalski C, Chrzanowski G. Antioxidant Capacity of Honey Enriched by Wildflowers. *Appl Sci* (2024) 14: 2018. <https://doi.org/10.3390/app14052018>.
- [78] Džugan M, Sowa P, Kwaśniewska M, Wesółowska M, Czernicka M. Physicochemical Parameters and Antioxidant Activity of Bee Honey Enriched With Herbs. *Plant Foods Hum Nutr* (2017) 72: 74–81. <https://doi.org/10.1007/s11130-016-0593-y>.
- [79] Grabek-Lejko D, Miłek M, Sidor E, Puchalski C, Džugan M. Antiviral and Antibacterial Effect of Honey Enriched with *Rubus* spp. as a Functional Food with Enhanced Antioxidant Properties. *Molecules* (2022) 27: 4859. <https://doi.org/10.3390/molecules27154859>.

- [80] Tomczyk M, Miłek M, Sidor E, Kapusta I, Litwińczuk W, Puchalski C, et al. The Effect of Adding the Leaves and Fruits of *Morus alba* to Rape Honey on Its Antioxidant Properties, Polyphenolic Profile, and Amylase Activity. *Molecules* (2019) 25: 84. <https://doi.org/10.3390/molecules25010084>.
- [81] Javadi SMR, Hashemi M, Mohammadi Y, MamMohammadi A, Sharifi A, Makarchian HR. Synergistic effect of honey and *Nigella sativa* on wound healing in rats. *Acta Cir Bras* (2018) 33: 518–23. <https://doi.org/10.1590/s0102-865020180060000006>.
- [82] Sidik K, Mahmood AA, Salmah I. Acceleration of wound healing by aqueous extract of *Allium sativum* in combination with honey on cutaneous wound healing in rats. *Int J Mol Med Adv Sci* (2006) 2: 231–5.
- [83] Vaghardoost R, Majd SGM, Tebyanian H, Babavalian H, Malaei L, Niazi M, et al. The healing effect of sesame oil, camphor and honey on second degree burn wounds in rat. *World J Plast Surg* (2018) 7: 67–71.
- [84] Choopani R, Sadr S, Kaveh S, Bayat H, Mosaddegh M. Efficacy and Safety of Iranian Poly Herbal Formulation (Compound Honey Syrup) in Pediatric Patients with Mild to Moderate Asthma: A Randomized Clinical Trial: *Galen Med J* (2017) 6. <https://doi.org/10.31661/gmj.v6i4.884>.
- [85] Poursaleh Z, Choopani R, Vahedi E, Khedmat AF, Ghazvini A, Salesi M, et al. Effect of herbal medicine formulation (Compound honey syrup) on quality of life in patients with COPD: A randomized clinical trial. *Tanaffos* (2022) 21: 336–47.
- [86] Alzergy AA, Elgharbawy SMS, Mahmoud GS, Mahmoud MR. Role of *Capparis spinosa* in ameliorating trichloroacetic acid induced toxicity in liver of Swiss albino mice. *Life Sci J* (2015) 12: 26–39.
- [87] Hidayati T, Indrayanti I, Darmawan E, Akrom A. Herbal Honey Preparations of *Curcuma Xanthorrhiza* and Black Cumin Protect against Carcinogenesis through Antioxidant and Immunomodulatory Activities in Sprague Dawley (SD) Rats Induced with Dimethylbenz(a)anthracene. *Nutrients* (2023) 15: 371. <https://doi.org/10.3390/nu15020371>.
- [88] Mazumder A, Kumar N, Das S. A Comparative Evaluation of Various Therapies of Synthetic Drugs with Amla and Honey Combination for the Treatment of Gastroesophageal Reflux Disease. *Ind J Pharm Edu Res* (2023) 57: 540–6. <https://doi.org/10.5530/ijper.57.2.66>.
- [89] Onyeka IP, Bako SP, Suleiman MM, Onyegbule FA, Morikwe UC, Ogbue CO. Antiulcer Effects of Methanol Extract of *Euphorbia hirta* and Honey Combination in Rats. *Biomed Res Int* (2020) 2020: 1–8. <https://doi.org/10.1155/2020/6827504>.
- [90] Siregar WW, Handayani D, Octavariny R, Anuhgera DE, Ritonga NJ, Sihotang SH. The Combination of Spinach, Tomato Juice and Honey to Improve the Levels of Hemoglobin on Pregnant Women Anemia: Proceedings of the International Conference on Health Informatics and Medical Application Technology, Medan, Indonesia: SCITEPRESS - Science and Technology Publications (2019), p. 203–10. <https://doi.org/10.5220/0009469702030210>.
- [91] Khedekar SB, Ravishankar B, Prajapati PK. Anti-diabetic activity of dried extract of *Tinospora cordifolia* (Guduchi ghana) and honey in streptozotacin induced diabetic rats. *Int J Green Pharm* (2015) 9: S31–8.
- [92] Corradini C, Cavazza A, Bignardi C. High-Performance Anion-Exchange Chromatography Coupled with Pulsed Electrochemical Detection as a Powerful Tool to Evaluate Carbohydrates of Food Interest: Principles and Applications. *Int J Carb Chem* (2012) 2012: 1–13. <https://doi.org/10.1155/2012/487564>.
- [93] Patel RB, Patel MR, Batel BG. Experimental Aspects and Implementation of HPTLC. In: Srivastava M, editor. *High-Performance Thin-Layer Chromatography (HPTLC)*, Berlin,

- Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg (2011), p. 41–54. https://doi.org/10.1007/978-3-642-14025-9_3.
- [94] Wagner H, Bladt S, Zgainski EM. *Plant Drug Analysis*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg (1984). <https://doi.org/10.1007/978-3-662-02398-3>.
- [95] Khan SR, Sharma B, Chawla PA, Bhatia R. Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry (ICP-OES): a Powerful Analytical Technique for Elemental Analysis. *Food Anal Methods* (2022) 15: 666–88. <https://doi.org/10.1007/s12161-021-02148-4>.
- [96] Martins GR, Monteiro AF, Do Amaral FRL, Da Silva AS. A validated Folin-Ciocalteu method for total phenolics quantification of condensed tannin-rich açai (*Euterpe oleracea* Mart.) seeds extract. *J Food Sci Technol* (2021) 58: 4693–702. <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04959-5>.
- [97] Bastola KP, Guragain YN, Bhadriraju V, Vadlani PV. Evaluation of Standards and Interfering Compounds in the Determination of Phenolics by Folin-Ciocalteu Assay Method for Effective Bioprocessing of Biomass. *Am J Anal Chem* (2017) 08: 416–31. <https://doi.org/10.4236/ajac.2017.86032>.
- [98] Apak R, Gorinstein S, Böhm V, Schaich KM, Özyürek M, Güçlü K. Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity (IUPAC Technical Report). *Pure Appl Chem* (2013) 85: 957–98. <https://doi.org/10.1351/PAC-REP-12-07-15>.
- [99] Schreiner T, Sauter D, Friz M, Heil J, Morlock GE. Is Our Natural Food Our Homeostasis? Array of a Thousand Effect-Directed Profiles of 68 Herbs and Spices. *Front Pharmacol* (2021) 12: 755941. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.755941>.
- [100] Choma I, Jesionek W. Effects-Directed Biological Detection. *Instrumental Thin-Layer Chromatography*, Elsevier (2015), p. 279–312. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417223-4.00011-X>.
- [101] Ibrahim RS, Khairy A, Zaatout HH, Hammada HM, Metwally AM. Digitally-optimized HPTLC coupled with image analysis for pursuing polyphenolic and antioxidant profile during alfalfa sprouting. *J Chromatogr B* (2018) 1099: 92–6. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.09.021>.
- [102] Ristivojević PM, Morlock GE. Effect-directed classification of biological, biochemical and chemical profiles of 50 German beers. *Food Chem* (2018) 260: 344–53. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.03.127>.
- [103] Danciu V, Hosu A, Cimpoi C. Comparative evaluation of antioxidant activity using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl and 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) methods. *JPC J Planar Chromatogr Mod TLC* (2016) 29: 306–9. <https://doi.org/10.1556/1006.2016.29.4.9>.
- [104] Ristivojević P, Trifković J, Andrić F, Milojković-Opsenica D. Recent trends in image evaluation of HPTLC chromatograms. *J Liq Chromatogr R T* (2020) 43: 291–9. <https://doi.org/10.1080/10826076.2020.1725555>.
- [105] Shaker LM, Al-Amiery AA, Abed TK, Al-Azzawi WK, Kadhum AAH, Sulaiman GM, et al. An overview of the density functional theory on antioxidant bioactivity predictive feasibilities: Insights from natural antioxidant products. *J Mol Struct* (2024) 1301: 137393. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2023.137393>.
- [106] Balouiri M, Sadiki M, Ibsouda SK. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *J Pharm Anal* (2016) 6: 71–9. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>.
- [107] Ristivojević P, Andrić FLj, Trifković JĐ, Vovk I, Stanisavljević LŽ, Tešić ŽLj, et al. Pattern recognition methods and multivariate image analysis in HPTLC fingerprinting of propolis

- extracts: Classification of propolis. *J Chemometrics* (2014) 28: 301–10. <https://doi.org/10.1002/cem.2592>.
- [108] Natić MM, Dabić DČ, Papetti A, Fotirić Akšić MM, Ognjanov V, Ljubojević M, et al. Analysis and characterisation of phytochemicals in mulberry (*Morus alba* L.) fruits grown in Vojvodina, North Serbia. *Food Chem* (2015) 171: 128–36. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.08.101>.
- [109] Gašić U, Kečkeš S, Dabić D, Trifković J, Milojković-Opsenica D, Natić M, et al. Phenolic profile and antioxidant activity of Serbian polyfloral honeys. *Food Chem* (2014) 145: 599–607. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.08.088>.
- [110] Ristivojević P, Trifković J, Stanković DM, Radoičić A, Manojlović D, Milojković-Opsenica D. Cyclic voltammetry and UV/Vis spectroscopy in combination with multivariate data analysis for the assessment of authenticity of poplar type propolis. *J Apic Res* (2017) 56: 559–68. <https://doi.org/10.1080/00218839.2017.1357217>.
- [111] Abuelizz HA, Anouar E, Marzouk M, Taie HAA, Ahudhaif A, Al-Salahi R. DFT study and radical scavenging activity of 2-phenoxy pyridotriazolo pyrimidines by DPPH, ABTS, FRAP and reducing power capacity. *Chem Pap* (2020) 74: 2893–9. <https://doi.org/10.1007/s11696-020-01126-0>.
- [112] Berker KI, Demirata B, Apak R. Determination of Total Antioxidant Capacity of Lipophilic and Hydrophilic Antioxidants In the Same Solution by Using Ferric–Ferricyanide Assay. *Food Anal Method* (2012) 5: 1150–8. <https://doi.org/10.1007/s12161-011-9358-2>.
- [113] Prieto P, Pineda M, Aguilar M. Spectrophotometric Quantitation of Antioxidant Capacity through the Formation of a Phosphomolybdenum Complex: Specific Application to the Determination of Vitamin E. *Anal Biochem* (1999) 269: 337–41. <https://doi.org/10.1006/abio.1999.4019>.
- [114] Barton GM, Evans RS, Gardner JAF. Paper Chromatography of Phenolic Substances. *Nature* (1952) 170: 249–50. <https://doi.org/10.1038/170249a0>.
- [115] Halgren TA. MMFF VI. MMFF94s option for energy minimization studies. *J Comput Chem* (1999) 20: 720–9. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-987X\(199905\)20:7<720::AID-JCC7>3.0.CO;2-X](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-987X(199905)20:7<720::AID-JCC7>3.0.CO;2-X).
- [116] Stewart JJP. Optimization of parameters for semiempirical methods VI: more modifications to the NDDO approximations and re-optimization of parameters. *J Mol Model* (2013) 19: 1–32. <https://doi.org/10.1007/s00894-012-1667-x>.
- [117] Gaussian 16, Revision B.01, Frisch, M.J., Trucks, G.W., Schlegel, H.B., Scuseria, G.E., Robb, M.A., Cheeseman, J.R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Petersson, G.A.; Nakatsuji, H.; Li, X.; Caricato, M.; Marenich, A.V.; Bloino, J., Janesko, B.G., Gomperts, R., Mennucci, B., Hratchian, H.P., Ortiz, J.V., Izmaylov, A.F., Sonnenberg, J.L., Williams-Young, D., Ding, F., Lipparini, F., Egidi, F., Goings, J., Peng, B., Petrone, A., Henderson, T., Ranasinghe, D., Zakrzewski, V.G., Gao, J., Rega, N., Zheng, G., Liang, W., Hada, M., Ehara, M., Toyota, K., Fukuda, R., Hasegawa, J., Ishida, M., Nakajima, T., Honda, Y., Kitao, O., Nakai, H., Vreven, T., Throssell, K., Montgomery Jr., J.A., Peralta, J.E., Ogliaro, F., Bearpark, M.J., Heyd, J.J., Brothers, E.N., Kudin, K.N., Staroverov, V.N., Keith, T.A., Kobayashi, R., Normand, J., Raghavachari, K., Rendell, A.P., Burant, J.C., Iyengar, S.S., Tomasi, J., Cossi, M., Millam, J.M., Klene, M., Adamo, C., Cammi, R., Ochterski, J.W., Martin, R.L., Morokuma, K., Farkas, O., Foresman, J.B., Fox, D.J. Gaussian, Inc., Wallingford CT (2016) GaussView 5.0. Wallingford, E.U.A. (n.d.).

- [118] Lordan S, Smyth TJ, Soler-Vila A, Stanton C, Ross RP. The α -amylase and α -glucosidase inhibitory effects of Irish seaweed extracts. *Food Chem* (2013) 141: 2170–6. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.04.123>.
- [119] Thamkaew G, Sjöholm I, Galindo FG. A review of drying methods for improving the quality of dried herbs. *Crit Rev Food Sci Nutr* (2021) 61: 1763–86. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1765309>.
- [120] ElGamal R, Song C, Rayan AM, Liu C, Al-Rejaie S, ElMasry G. Thermal Degradation of Bioactive Compounds during Drying Process of Horticultural and Agronomic Products: A Comprehensive Overview. *Agronomy* (2023) 13: 1580. <https://doi.org/10.3390/agronomy13061580>.
- [121] Stępień AE, Gorzelany J, Matłok N, Lech K, Figiel A. The effect of drying methods on the energy consumption, bioactive potential and colour of dried leaves of Pink Rock Rose (*Cistus creticus*). *J Food Sci Technol* (2019) 56: 2386–94. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-03656-2>.
- [122] Gentscheva G, Karadjova I, Radusheva P, Minkova S, Nikolova K, Sotirova Y, et al. Determination of the Elements Composition in *Sempervivum tectorum* L. from Bulgaria. *Horticulturae* (2021) 7: 306. <https://doi.org/10.3390/horticulturae7090306>.
- [123] Zhang Y, Cai P, Cheng G, Zhang Y. A Brief Review of Phenolic Compounds Identified from Plants: Their Extraction, Analysis, and Biological Activity. *Nat Prod Commun* (2022) 17: 1934578X2110697. <https://doi.org/10.1177/1934578X211069721>.
- [124] Kumar S, Pandey AK. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *Sci World J* (2013) 2013: 1–16. <https://doi.org/10.1155/2013/162750>.
- [125] Mutha RE, Tatiya AU, Surana SJ. Flavonoids as natural phenolic compounds and their role in therapeutics: an overview. *Futur J Pharm Sci* (2021) 7: 25. <https://doi.org/10.1186/s43094-020-00161-8>.
- [126] Bertonec J, Dobersek U, Jamnik M, Golob T. Evaluation of the phenolic content, antioxidant activity and colour of Slovenian honey. *Food Chem* (2007) 105: 822–8. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.01.060>.
- [127] Krpan M, Marković K, Šarić G, Skoko B, Hruškar M, Vahčić N. Antioxidant Activities and Total Phenolics of Acacia Honey. *Czech J Food Sci* (2009) 27: S245–7. <https://doi.org/10.17221/1112-CJFS>.
- [128] Beretta G, Granata P, Ferrero M, Orioli M, Maffei Facino R. Standardization of antioxidant properties of honey by a combination of spectrophotometric/fluorimetric assays and chemometrics. *Anal Chim Acta* (2005) 533: 185–91. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2004.11.010>.
- [129] Lachman J, Orsák M, Hejtmánková A, Kovářová E. Evaluation of antioxidant activity and total phenolics of selected Czech honeys. *LWT - Food Sci Technol* (2010) 43: 52–8. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2009.06.008>.
- [130] Bresciani L, Calani L, Cossu M, Mena P, Sayegh M, Ray S, et al. (Poly)phenolic characterization of three food supplements containing 36 different fruits, vegetables and berries. *PharmaNutrition* (2015) 3: 11–9. <https://doi.org/10.1016/j.phanu.2015.01.001>.
- [131] Ruiz-Riaguas A, Zengin G, Sinan KI, Salazar-Mendías C, Llorent-Martínez EJ. Phenolic Profile, Antioxidant Activity, and Enzyme Inhibitory Properties of *Limonium delicatulum* (Girard) Kuntze and *Limonium quesadense* Erben. *J Chem-NY* (2020) 2020: 1–10. <https://doi.org/10.1155/2020/1016208>.

- [132] Ablajan K, Abliz Z, Shang X, He J, Zhang R, Shi J. Structural characterization of flavonol 3,7-di-*O*-glycosides and determination of the glycosylation position by using negative ion electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Mass Spectrom* (2006) 41: 352–60. <https://doi.org/10.1002/jms.995>.
- [133] De Beer D, Schulze A, Joubert E, De Villiers A, Malherbe C, Stander M. Food Ingredient Extracts of *Cyclopia subternata* (Honeybush): Variation in Phenolic Composition and Antioxidant Capacity. *Molecules* (2012) 17: 14602–24. <https://doi.org/10.3390/molecules171214602>.
- [134] Karabegovic I, Stojicevic S, Velickovic D, Nikolic N, Lazic M. Direct ultrasound-assisted extraction and characterization of phenolic compounds from fresh houseleek (*Sempervivum marmoreum* L.) leaves. *Hem Ind* (2018) 72: 13–21. <https://doi.org/10.2298/HEMIND170402017K>.
- [135] Jankov M, Ristivojević P, Cvijetić I, Milojković-Opsenica D. Assessing radical scavenging capacity of *Sempervivum tectorum* L. leaf extracts: An integrated high-performance thin-layer chromatography/in silico/chemometrics approach. *Journal of Chromatography A* (2023) 1703: 464082. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2023.464082>.
- [136] Kečkeš S, Gašić U, Veličković TĆ, Milojković-Opsenica D, Natić M, Tešić Ž. The determination of phenolic profiles of Serbian unifloral honeys using ultra-high-performance liquid chromatography/high resolution accurate mass spectrometry. *Food Chem* (2013) 138: 32–40. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.10.025>.
- [137] Hochmal AK, Schulze S, Trompelt K, Hippler M. Calcium-dependent regulation of photosynthesis. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg* (2015) 1847: 993–1003. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2015.02.010>.
- [138] Rawat J, Pandey N, Saxena J. Role of Potassium in Plant Photosynthesis, Transport, Growth and Yield. In: Iqbal N, Umar S, editors. *Role of Potassium in Abiotic Stress*, Singapore: Springer Nature Singapore (2022), p. 1–14. https://doi.org/10.1007/978-981-16-4461-0_1.
- [139] Tränkner M, Tavakol E, Jákl B. Functioning of potassium and magnesium in photosynthesis, photosynthate translocation and photoprotection. *Physiol Plant* (2018) 163: 414–31. <https://doi.org/10.1111/ppl.12747>.
- [140] World Health Organization. WHO guidelines for assessing quality of herbal medicines with reference to contaminants and residues (2007): 105.
- [141] Stanojković-Sebić A, Maksimović J, Dinić Z, Poštić D, Ilić R, Stanojković A, et al. Microelements and Heavy Metals Content in Frequently Utilized Medicinal Plants Collected from the Power Plant Area. *Nat Prod Commun* (2017) 12: 1934578X1701200. <https://doi.org/10.1177/1934578X1701200211>.
- [142] Platzer M, Kiese S, Herfellner T, Schweiggert-Weisz U, Miesbauer O, Eisner P. Common Trends and Differences in Antioxidant Activity Analysis of Phenolic Substances Using Single Electron Transfer Based Assays. *Molecules* (2021) 26: 1244. <https://doi.org/10.3390/molecules26051244>.
- [143] Xu D-P, Li Y, Meng X, Zhou T, Zhou Y, Zheng J, et al. Natural Antioxidants in Foods and Medicinal Plants: Extraction, Assessment and Resources. *Int J Mol Sci* (2017) 18: 96. <https://doi.org/10.3390/ijms18010096>.
- [144] Cieśla Ł, Kryszewski J, Stochmal A, Oleszek W, Waksmundzka-Hajnos M. Approach to develop a standardized TLC-DPPH test for assessing free radical scavenging properties of selected phenolic compounds. *J Pharmaceut Biomed* (2012) 70: 126–35. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2012.06.007>.

- [145] Cvijetić I, Bigović M, Ristivojević P, Vitorović-Todorović M, Zloh M, Milojković-Opsenica D. DFT study of the radical scavenging activity of isoxanthohumol, humulones (α -acids), and iso- α -acids from beer. *Struct Chem* (2021) 32: 2051–9. <https://doi.org/10.1007/s11224-021-01780-4>.
- [146] de Souza GLC, de Oliveira LMF, Vicari RG, Brown A. A DFT investigation on the structural and antioxidant properties of new isolated interglycosidic O-(1 \rightarrow 3) linkage flavonols. *J Mol Model* (2016) 22: 100. <https://doi.org/10.1007/s00894-016-2961-9>.
- [147] Lim J, Ferruzzi MG, Hamaker BR. Structural requirements of flavonoids for the selective inhibition of α -amylase versus α -glucosidase. *Food Chem* (2022) 370: 130981. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130981>.
- [148] Sun L, Warren FJ, Gidley MJ. Natural products for glycaemic control: Polyphenols as inhibitors of alpha-amylase. *Trends Food Sci Technol* (2019) 91: 262–73. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.07.009>.
- [149] Takahama U, Hirota S. Interactions of flavonoids with α -amylase and starch slowing down its digestion. *Food Funct* (2018) 9: 677–87. <https://doi.org/10.1039/C7FO01539A>.
- [150] Lam T-P, Tran N-VN, Pham L-HD, Lai NV-T, Dang B-TN, Truong N-LN, et al. Flavonoids as dual-target inhibitors against α -glucosidase and α -amylase: a systematic review of in vitro studies. *Nat Prod Bioprospect* (2024) 14: 4. <https://doi.org/10.1007/s13659-023-00424-w>.
- [151] Ćorković I, Gašo-Sokač D, Pichler A, Šimunović J, Kopjar M. Dietary Polyphenols as Natural Inhibitors of α -Amylase and α -Glucosidase. *Life* (2022) 12: 1692. <https://doi.org/10.3390/life12111692>.
- [152] Kauffmann AC, Castro VS. Phenolic Compounds in Bacterial Inactivation: A Perspective from Brazil. *Antibiotics* (2023) 12: 645. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12040645>.
- [153] Martins S, Amorim ELC, Sobrinho TJSP, Saraiva AM, Pisciotto MNC, Aguilar CN, et al. Antibacterial activity of crude methanolic extract and fractions obtained from *Larrea tridentata* leaves. *Ind Crop Prod* (2013) 41: 306–11. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.04.037>.
- [154] M. Calderon-Montano J, Burgos-Moron E, Perez-Guerrero C, Lopez-Lazaro M. A Review on the Dietary Flavonoid Kaempferol. *Mini-Rev Med Chem* (2011) 11: 298–344. <https://doi.org/10.2174/138955711795305335>.
- [155] Tatsimo SJN, Tamokou JDD, Havyarimana L, Csupor D, Forgo P, Hohmann J, et al. Antimicrobial and antioxidant activity of kaempferol rhamnoside derivatives from *Bryophyllum pinnatum*. *BMC Res Notes* (2012) 5: 158. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-5-158>.
- [156] Vaquero MJR, Alberto MR, De Nadra MCM. Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines. *Food Control* (2007) 18: 93–101. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2005.08.010>.
- [157] Lobiuc A, Pavăl N-E, Mangalagiu II, Gheorghită R, Teliban G-C, Amăriucăi-Mantu D, et al. Future Antimicrobials: Natural and Functionalized Phenolics. *Molecules* (2023) 28: 1114. <https://doi.org/10.3390/molecules28031114>.
- [158] Górnaiak I, Bartoszewski R, Króliczewski J. Comprehensive review of antimicrobial activities of plant flavonoids. *Phytochem Rev* (2019) 18: 241–72. <https://doi.org/10.1007/s11101-018-9591-z>.

7. PRILOG

Tabela P1. Ukupan sadržaj fenola i antioksidativna aktivnost ekstraktata listova čuvaruće

Br. ekstrakta	TPC (g GAE/kg SM)	DPPH (mmol TE/kg SM)	ABTS (mmol TE/kg SM)	TRP (mmol AAE/kg SM)	TAC (mmol AAE/kg SM)
1	10 ± 2	80 ± 4	60 ± 2	54 ± 3	53 ± 2
2	5,7 ± 0,9	36 ± 3	27 ± 1	25 ± 2	39 ± 1
3	12 ± 2	94 ± 4	75 ± 2	72 ± 3	62 ± 1
4	10 ± 1	78 ± 3	63 ± 2	54 ± 2	59 ± 1
5	5 ± 1	34 ± 3	29 ± 1	26 ± 2	34 ± 1
6	10 ± 1	81 ± 3	61 ± 2	61 ± 3	55 ± 1
7	5 ± 1	30 ± 3	27 ± 1	23 ± 2	35,5 ± 0,9
8	3,5 ± 0,2	4,0 ± 0,6	3,9 ± 0,3	8,5 ± 0,4	13,4 ± 0,2
9	8 ± 1	62 ± 3	51 ± 2	46 ± 2	45 ± 1
10	5,3 ± 0,9	29 ± 3	29 ± 1	27 ± 2	38,8 ± 0,9
11	8 ± 1	56 ± 4	47 ± 2	51 ± 3	43 ± 1
12	19 ± 2	150 ± 5	115 ± 2	161 ± 6	96 ± 2
13	6 ± 1	33 ± 4	33 ± 2	36 ± 2	45 ± 1
14	6 ± 1	41 ± 3	35 ± 2	39 ± 2	42 ± 1
15	8 ± 1	62 ± 3	53 ± 2	51 ± 3	48 ± 2
16	10 ± 2	76 ± 4	63 ± 2	68 ± 3	52 ± 2
17	10,5 ± 0,8	84 ± 3	69 ± 2	85 ± 4	52,0 ± 0,9
18	11 ± 1	85 ± 4	68 ± 2	73 ± 3	55 ± 1
19	11 ± 2	90 ± 5	77 ± 2	83 ± 3	63 ± 2
20	21 ± 2	151 ± 5	127 ± 3	183 ± 6	104 ± 2

Tabela P2. Ukupan sadržaj fenola određen u ekstraktima čistog meda ekstrahovanog zakišljenom vodom (pH 2), čiste čuvaruće ekstrahovane zakišljenom vodom (pH 2) i bez rastvarača (b.r.), kao i preparata čuvaruće i meda (č+m) ekstrahovanog zakišljenom vodom (I–V nedelja) i bez rastvarača (I i V nedelja)

TPC (mg GAE/kg)	Bagremov med			Livadski med			Čuvaruća
	B1	B2	B3	L1	L2	L3	Č
Čist med	53,44	32,89	24,97	41,24	53,69	154,17	
č+m H ₂ O pH 2	I	65,04	61,96	79,81	77,52	66,51	121,82
	II	89,22	59,97	58,48	53,29	46,43	123,95
	III	49,71	61,34	55,54	59,69	53,21	102,04
	IV	68,11	53,27	50,93	55,31	48,02	118,93
	V	65,97	49,75	53,87	51,53	43,39	94,29
č+m b.r.	I	70,47	48,98	66,55	60,31	58,24	102,18
	V	72,69	53,99	70,38	56,14	52,00	91,38

Tabela P3. Sadržaj fenolnih jedinjenja u 70% etanolnim ekstraktima listova čuvarkuće kvantifikovani metodom UPLC–DAD MS/MS. Fenolna jedinjenja: eskulin – AEN, *p*-hidroksibenzoeva kiselina – PHBA, neohlorogena kiselina – NCGA, kofeinska kiselina – CA, eskuletin – AET, viteksin – VIT, *p*-kumarinska kiselina – PCOA, izokvercetin – IQUE, taksifolin – TAX, elaginska kiselina – ELA, astragalin – AST, ruzmarinska kiselina – RA, florizin – PHL, aromadendrin – AR, kvercetin – QUE, naringenin – NAN, kempferol – KAE, izoramnetin – IRH. U tabeli nije prikazan luteolin (LUT) koji je kvantifikovan samo u ekstraktu br. 8 ($0,46 \pm 0,03$ mg/kg).

Br.	Fenolna jedinjenja (mg/kg)								
	AEN	PHBA	NCGA	CA	AET	VIT	PCOA	IQUE	TAX
1	$1,01 \pm 0,09$	$5,3 \pm 0,7$	$0,71 \pm 0,03$	$0,92 \pm 0,05$	$0,65 \pm 0,03$	$0,24 \pm 0,06$	$0,84 \pm 0,08$	12 ± 1	$0,57 \pm 0,04$
2	$0,82 \pm 0,04$	$6,9 \pm 0,2$	$1,09 \pm 0,10$	$0,74 \pm 0,07$	$0,59 \pm 0,03$	$0,07 \pm 0,02$	$2,2 \pm 0,6$	$5,6 \pm 0,9$	$0,57 \pm 0,04$
3	$0,67 \pm 0,02$	$11,0 \pm 0,7$	$0,65 \pm 0,07$	$0,90 \pm 0,07$	$0,45 \pm 0,02$	$0,11 \pm 0,06$	$1,7 \pm 0,1$	$5,2 \pm 0,6$	$0,67 \pm 0,02$
4	$0,29 \pm 0,10$	$3,3 \pm 0,6$	$0,27 \pm 0,01$	$0,36 \pm 0,01$	$0,16 \pm 0,07$	–	$1,1 \pm 0,9$	$7,1 \pm 0,1$	$0,30 \pm 0,04$
5	$0,92 \pm 0,07$	$8,2 \pm 0,3$	$1,0 \pm 0,2$	$1,2 \pm 0,3$	$0,78 \pm 0,09$	–	$2,0 \pm 0,4$	$4,8 \pm 0,5$	$0,52 \pm 0,06$
6	$0,80 \pm 0,03$	$9,2 \pm 0,4$	$1,05 \pm 0,01$	$0,90 \pm 0,02$	$0,71 \pm 0,09$	$0,07 \pm 0,03$	$0,89 \pm 0,05$	11 ± 1	$0,38 \pm 0,03$
7	$1,7 \pm 0,6$	$0,59 \pm 0,02$	$1,01 \pm 0,04$	$2,1 \pm 0,7$	$1,1 \pm 0,2$	$0,11 \pm 0,04$	$3,2 \pm 0,7$	$5,9 \pm 0,4$	$0,27 \pm 0,09$
8	$0,67 \pm 0,01$	$2,2 \pm 0,8$	$1,9 \pm 0,4$	$1,0 \pm 0,3$	$0,60 \pm 0,08$	$0,44 \pm 0,04$	$2,6 \pm 0,3$	$0,62 \pm 0,04$	$0,43 \pm 0,07$
9	$0,67 \pm 0,03$	$7,9 \pm 0,3$	$0,60 \pm 0,05$	$0,51 \pm 0,01$	$0,31 \pm 0,02$	$0,11 \pm 0,06$	$2,5 \pm 0,3$	$5,7 \pm 0,8$	$0,49 \pm 0,01$
10	$0,81 \pm 0,05$	$8,8 \pm 0,9$	$0,68 \pm 0,07$	$1,6 \pm 0,4$	$1,04 \pm 0,1$	$0,07 \pm 0,04$	$3,5 \pm 0,9$	$5,0 \pm 1,0$	$0,57 \pm 0,06$
11	$0,82 \pm 0,05$	$5,3 \pm 0,8$	$0,43 \pm 0,01$	$0,39 \pm 0,04$	$0,20 \pm 0,03$	–	$1,9 \pm 0,4$	$5,13 \pm 0,4$	$0,73 \pm 0,10$
12	$1,2 \pm 0,2$	$0,56 \pm 0,04$	$1,9 \pm 0,8$	$0,54 \pm 0,09$	$0,25 \pm 0,05$	–	$4,2 \pm 0,2$	11 ± 2	$1,3 \pm 0,6$
13	$0,75 \pm 0,04$	$3,2 \pm 0,5$	$0,81 \pm 0,02$	$1,0 \pm 0,3$	$0,57 \pm 0,02$	$0,22 \pm 0,07$	$2,8 \pm 0,8$	$5,8 \pm 0,6$	$0,50 \pm 0,02$
14	$1,2 \pm 0,1$	$6,1 \pm 0,6$	$1,07 \pm 0,09$	$1,2 \pm 0,5$	$0,82 \pm 0,06$	–	$1,4 \pm 0,4$	$6,7 \pm 0,1$	$0,17 \pm 0,03$
15	$1,4 \pm 0,4$	$6,7 \pm 0,9$	$1,06 \pm 0,03$	$1,4 \pm 0,3$	$0,92 \pm 0,04$	–	$1,8 \pm 0,4$	$6,9 \pm 0,6$	$0,45 \pm 0,01$
16	$0,68 \pm 0,08$	$11,7 \pm 0,4$	$0,57 \pm 0,08$	$0,70 \pm 0,06$	$0,50 \pm 0,01$	$0,20 \pm 0,04$	$2,4 \pm 0,7$	$5,9 \pm 0,9$	$0,54 \pm 0,04$
17	$0,47 \pm 0,03$	$6,2 \pm 0,3$	$0,41 \pm 0,03$	–	$0,03 \pm 0,01$	$0,10 \pm 0,06$	$0,19 \pm 0,09$	16 ± 1	$1,2 \pm 0,3$
18	$0,29 \pm 0,05$	$5,5 \pm 0,7$	$0,51 \pm 0,03$	–	$0,10 \pm 0,04$	$0,13 \pm 0,01$	$1,2 \pm 0,1$	14 ± 1	$0,27 \pm 0,05$
19	$0,26 \pm 0,07$	$9,0 \pm 0,4$	$0,31 \pm 0,07$	–	$0,16 \pm 0,03$	–	$1,6 \pm 0,7$	$6,8 \pm 0,6$	$0,55 \pm 0,09$
20	$0,22 \pm 0,01$	$2,0 \pm 0,1$	$0,12 \pm 0,03$	–	$0,07 \pm 0,01$	$0,07 \pm 0,06$	$5,4 \pm 1,1$	$7,4 \pm 0,2$	$0,40 \pm 0,04$

* - Sadržaj je ispod granice detekcije. Granica detekcije za: CA 0,02 mg/L; VIT 0,01 mg/L.

Tabela P3. Nastavak

Br.	Fenolna jedinjenja (mg/kg)								
	ELA	AST	RA	PHL	AR	QUE	NAN	KAE	IRH
1	1,5 ± 0,6	138 ± 6	0,70 ± 0,10	1,2 ± 0,7	0,60 ± 0,03	11 ± 2	0,32 ± 0,06	74 ± 2	1,6 ± 0,3
2	1,2 ± 0,2	106 ± 9	0,24 ± 0,04	0,76 ± 0,09	1,4 ± 0,8	7,1 ± 0,5	0,30 ± 0,03	70 ± 2	1,5 ± 0,1
3	1,4 ± 0,2	109 ± 3	0,22 ± 0,06	1,2 ± 0,5	0,88 ± 0,04	6,9 ± 0,4	0,34 ± 0,01	48 ± 1	0,96 ± 0,05
4	0,57 ± 0,09	83 ± 1	0,14 ± 0,01	0,92 ± 0,03	0,56 ± 0,02	6,2 ± 0,6	0,38 ± 0,01	30 ± 1	0,50 ± 0,03
5	1,1 ± 0,7	113 ± 4	0,10 ± 0,03	0,66 ± 0,01	0,73 ± 0,02	8,2 ± 0,6	0,25 ± 0,05	92 ± 3	2,9 ± 0,4
6	1,0 ± 0,4	112 ± 5	0,11 ± 0,03	0,83 ± 0,05	0,83 ± 0,05	9,5 ± 0,5	0,36 ± 0,08	54 ± 2	1,8 ± 0,6
7	1,4 ± 0,9	102 ± 2	0,10 ± 0,02	0,59 ± 0,07	0,88 ± 0,03	28 ± 3	0,48 ± 0,05	213 ± 5	5,6 ± 1,1
8	–	4,4 ± 1,0	0,13 ± 0,03	0,92 ± 0,04	0,45 ± 0,05	1,2 ± 0,9	0,25 ± 0,07	3,6 ± 0,6	0,06 ± 0,02
9	0,91 ± 0,04	110 ± 3	0,12 ± 0,04	0,84 ± 0,06	0,90 ± 0,04	17 ± 1	0,51 ± 0,03	142 ± 5	2,3 ± 0,7
10	1,5 ± 0,1	95 ± 7	0,09 ± 0,03	0,61 ± 0,02	1,6 ± 0,7	20 ± 4	0,70 ± 0,06	170 ± 3	3,9 ± 0,5
11	0,74 ± 0,06	93 ± 2	0,06 ± 0,02	1,3 ± 0,7	0,71 ± 0,04	8,7 ± 0,4	0,49 ± 0,08	60 ± 2	0,92 ± 0,01
12	1,8 ± 0,4	167 ± 7	0,10 ± 0,02	1,5 ± 0,3	2,3 ± 0,6	22 ± 1	0,72 ± 0,01	262 ± 6	2,3 ± 0,4
13	1,0 ± 0,1	115 ± 5	0,11 ± 0,02	0,74 ± 0,01	1,1 ± 0,4	15 ± 4	0,43 ± 0,01	163 ± 4	2,9 ± 0,5
14	1,2 ± 0,4	115 ± 4	0,05 ± 0,01	0,76 ± 0,09	0,63 ± 0,06	21 ± 3	0,44 ± 0,08	176 ± 3	3,9 ± 0,7
15	1,1 ± 0,6	126 ± 3	0,08 ± 0,01	0,68 ± 0,04	0,96 ± 0,06	20 ± 2	0,43 ± 0,03	146 ± 3	3,5 ± 0,2
16	0,85 ± 0,04	102 ± 8	0,04 ± 0,02	1,3 ± 0,8	0,89 ± 0,03	10 ± 1	0,53 ± 0,03	56 ± 2	1,2 ± 0,2
17	1,1 ± 0,2	115 ± 4	0,03 ± 0,07	1,0 ± 0,6	1,6 ± 0,1	5,3 ± 0,5	0,54 ± 0,07	31 ± 1	0,18 ± 0,03
18	0,91 ± 0,05	120 ± 10	0,03 ± 0,01	1,5 ± 0,2	0,77 ± 0,05	14 ± 2	0,55 ± 0,11	54 ± 2	0,57 ± 0,08
19	0,74 ± 0,09	73 ± 6	0,04 ± 0,02	0,75 ± 0,01	0,84 ± 0,01	8,0 ± 0,6	0,49 ± 0,05	51 ± 1	0,66 ± 0,04
20	0,51 ± 0,07	74 ± 6	0,03 ± 0,01	1,1 ± 0,3	0,88 ± 0,03	10 ± 2	0,47 ± 0,08	40 ± 1	0,67 ± 0,04

* – Sadržaj je ispod granice detekcije. Granica detekcije za: ELA 0,05 mg/L.

Tabela P4. Oznake ekstrakata čistog meda i preparata čuvarkeće i meda koje su korišćene u predstavljanju rezultata dobijenih spektrofotometrijom i HPTLC analizom

Oznake uzoraka za spektrofotometriju		Oznake uzoraka za HPTLC analizu							
Uzorci meda		Čist med	Preparat č+m ekstrahovan zakišljenom vodom (H ₂ O, pH 2)					Preparat č+m bez rastvarača (b.r.)	
			Nedelja ispitivanja					Nedelja ispitivanja	
			I	II	III	IV	V	I	V
Bagremov med	B1	B1	B2	B3	B4	B5	B6	b1	b2
	B2	B7	B8	B9	B10	B11	B12	b3	b4
	B3	B13	B14	B15	B16	B17	B18	b5	b6
Livadski med	L1	L1	L2	L3	L4	L5	L6	l1	l2
	L2	L7	L8	L9	L10	L11	L12	l3	l4
	L3	L13	L14	L15	L16	L17	L18	l5	l6

Tabela P5. Sadržaj šećera i poliola u vodenim ekstraktima osušenih listova čuvaruće

Br. uzorka	Sadržaj šećera i poliola (g/100 g SM)											
	Galaktitol	Sorbitol	Manitol	Arabinoza	Glukoza	Fruktoza	Glu + Fru	Fru/Glu	Maltoza	Saharoza	Melibioza	Rafinoza
1	3,45	0,07	0,02	0,12	6,70	8,74	15,45	1,30	0,013	0,52	0,55	0,16
2	4,16	0,07	0,02	0,12	5,76	7,47	13,23	1,30	0,025	0,54	0,34	0,16
3	4,45	0,09	0,02	0,17	6,86	8,94	15,80	1,30	0,005	0,42	0,31	0,19
4	2,62	0,04	0,01	0,07	5,40	7,79	13,19	1,44	0,007	0,33	0,09	0,13
5	3,52	0,07	0,02	0,14	5,48	6,48	11,97	1,18	0,007	0,38	0,24	0,18
6	4,59	0,07	0,02	0,17	6,27	7,38	13,65	1,18	0,017	0,61	0,22	0,18
7	4,02	0,06	0,02	0,13	5,38	6,36	11,74	1,18	0,020	0,59	0,17	0,16
8	1,92	0,06	0,02	0,08	4,93	6,51	11,44	1,32	0,047	0,95	0,03	0,11
9	4,22	0,05	0,01	0,10	6,26	7,50	13,76	1,20	0,015	0,66	0,30	0,11
10	4,47	0,07	0,02	0,12	5,03	6,56	11,59	1,30	0,024	0,96	0,43	0,13
11	4,03	0,12	0,02	0,14	5,12	8,17	13,29	1,59	0,017	0,50	0,12	0,22
12	4,50	0,11	0,02	0,18	6,30	10,32	16,62	1,64	0,014	0,33	0,18	0,14
13	3,89	0,07	0,01	0,10	6,07	6,41	12,48	1,06	0,001	0,63	0,14	0,09
14	4,32	0,08	0,02	0,09	6,08	7,38	13,46	1,21	0,011	0,80	0,30	0,15
15	4,75	0,09	0,03	0,20	7,26	8,70	15,96	1,20	0,038	0,66	0,31	0,17
16	4,54	0,15	0,04	0,25	7,82	10,27	18,09	1,31	0,026	0,47	0,27	0,15
17	4,25	0,11	0,04	0,23	6,47	8,40	14,87	1,30	0,008	0,56	0,43	0,09
18	4,96	0,11	0,02	0,16	6,42	8,51	14,94	1,33	0,050	0,45	0,24	0,09
19	3,69	0,05	0,02	0,13	4,10	5,21	9,31	1,27	0,130	0,27	0,07	0,07
20	4,15	0,09	0,01	0,24	5,59	7,12	12,72	1,27	0,053	0,41	0,13	0,28

Tabela P6. Sadržaj šećera u vodenim ekstraktima preparata svežih listova čuvarkuće sa bagremovim i livadskim medom

		Sadržaj šećera (g/100 g) u vodenim ekstraktima preparata čuvarkuće i meda, čiste čuvarkuće i čistog meda														
		Glukoza	Fruktoza	Glu + Fru	Fru / Glu	Trehaloza	Melibioza	Saharaza	Izomaltoza	Rafinoza	Gentiobioza	Turanoza	Maltoza	Erloza	Ukupno	
Bagremov med	B1	čist med	27,22	42,29	69,51	1,55	0,225	0,223	0,331	0,414	0,508	0,034	0,089	0,610	0,046	71,99
	č+m B1	I	23,16	35,56	58,72	1,53	0,182	0,081	0,271	0,128	0,026	0,046	0,216	0,686	0,737	61,09
		II	22,31	34,68	56,99	1,55	0,175	0,064	0,307	0,146	0,026	0,051	0,188	0,695	0,690	59,33
		III	22,59	37,21	59,79	1,65	0,159	0,061	0,830	0,105	0,025	0,083	0,164	0,666	0,817	62,70
		IV	23,97	40,81	64,78	1,70	0,153	0,046	0,275	0,116	0,025	0,072	0,117	0,621	0,879	67,08
		V	22,98	34,85	57,83	1,52	0,171	0,050	0,279	0,123	0,021	0,074	0,116	0,670	0,863	60,19
	B2	čist med	26,12	41,65	67,77	1,59	0,225	0,363	0,584	0,685	0,360	0,015	0,182	0,381	–	70,57
	č+m B2	I	23,49	36,42	59,91	1,55	0,096	0,007	0,055	0,379	0,064	0,010	0,543	0,135	0,461	61,66
		II	24,59	47,22	71,81	1,92	0,093	0,012	0,531	0,266	0,032	0,064	0,277	0,565	0,363	74,01
		III	23,34	37,26	60,59	1,60	0,074	0,009	0,651	0,261	0,262	–	0,061	0,132	0,361	62,40
		IV	20,38	31,87	52,25	1,56	0,049	0,202	1,014	0,417	0,219	0,006	0,050	0,105	–	54,31
		V	21,49	35,19	56,68	1,64	0,066	0,216	0,941	0,432	0,232	–	0,043	0,052	–	58,67
	B3	čist med	25,15	49,01	74,16	1,95	0,012	0,461	1,842	0,685	1,198	0,025	0,536	0,497	–	79,42
	č+m B3	I	21,18	39,05	60,24	1,84	0,010	0,253	0,612	0,562	0,398	–	0,091	0,054	–	62,22
		II	20,59	42,30	62,89	2,05	0,005	0,234	0,464	0,554	0,392	–	0,082	0,049	–	64,67
III		21,42	41,48	62,90	1,94	0,004	0,231	0,438	0,533	0,385	–	0,091	0,038	–	64,62	
IV		21,76	39,60	61,36	1,82	0,003	0,255	0,577	0,551	0,379	–	0,080	0,049	–	63,25	
V		21,12	40,24	61,36	1,91	0,002	0,249	0,901	0,538	0,385	–	0,093	0,024	–	63,56	

* – Sadržaj je ispod granice detekcije. Granica detekcije za: Gentiobiozu 0,052 mg/g; Erlozu 0,067 mg/g.

Tabela P6. Nastavak

		Sadržaj šećera (g/100 g) u vodenim ekstraktima preparata čuvarkuće i meda, čiste čuvarkuće i čistog meda														
		Glukoza	Fruktoza	Glu + Fru	Fru / Glu	Trehaloza	Melibioza	Saharoza	Izomaltoza	Rafinoza	Gentiobioza	Turanoza	Maltoza	Erloza	Ukupno	
Livadski med	L1	čist med	32,46	44,30	76,76	1,36	0,074	0,027	0,124	0,088	0,143	0,005	0,090	1,785	0,105	79,20
	č+m L1	I	24,08	31,85	55,93	1,32	0,028	0,029	0,064	0,043	0,078	0,004	0,034	0,276	0,058	56,54
		II	25,23	31,85	57,08	1,26	0,029	0,028	0,061	0,044	0,076	0,012	0,054	0,303	0,054	57,74
		III	24,15	30,89	55,05	1,28	0,026	0,013	0,067	0,045	0,077	0,003	0,051	0,312	0,045	55,68
		IV	23,64	31,03	54,67	1,31	0,031	0,008	0,062	0,040	0,071	0,002	0,085	0,294	0,044	55,30
		V	24,33	31,03	55,36	1,28	0,028	0,013	0,062	0,041	0,072	0,002	0,086	0,286	0,033	55,98
	L2	čist med	27,74	44,58	72,32	1,61	0,113	0,356	0,993	0,981	0,653	0,027	0,361	2,183	–	77,99
	č+m L2	I	20,92	31,76	52,69	1,52	0,002	0,043	0,568	0,218	0,272	0,012	0,109	0,643	–	54,55
		II	19,11	27,98	47,09	1,46	0,010	0,031	0,519	0,194	0,240	0,010	0,116	0,655	–	48,86
		III	20,18	30,11	50,29	1,49	0,002	0,040	0,450	0,210	0,276	0,009	0,115	0,612	–	52,00
		IV	20,44	30,23	50,68	1,48	–	0,036	0,517	0,213	0,272	0,008	0,270	0,771	–	52,76
		V	18,44	29,70	48,14	1,61	0,002	0,258	0,342	–	0,261	0,013	0,047	0,759	0,008	49,83
	L3	čist med	31,12	42,31	73,43	1,36	0,079	0,241	0,399	0,510	0,246	0,005	0,089	2,179	–	77,18
	č+m L3	I	22,65	32,94	55,59	1,45	0,068	0,112	0,180	0,242	0,109	0,002	0,048	0,793	–	57,15
		II	20,65	31,55	52,20	1,53	0,066	0,108	0,168	0,238	0,104	0,002	0,131	1,131	–	54,15
		III	20,59	30,72	51,31	1,49	0,037	0,107	0,165	0,233	0,002	0,001	0,034	0,764	–	52,65
		IV	21,40	31,53	52,93	1,47	0,035	0,106	0,163	0,231	0,107	–	0,033	1,355	–	54,96
		V	19,60	29,61	49,21	1,51	0,050	0,107	0,159	0,228	0,106	–	0,033	0,851	–	50,74
	Čuvarkuća		0,63	2,36	2,99	3,64	0,018	–	3,343	4,682	1,010	0,382	0,835	0,955	–	13,71

* – Sadržaj je ispod granice detekcije. Granica detekcije za: Trehalozu 0,042 mg/g; Melibiozu 0,062 mg/g; Izomaltozu 0,063 mg/g; Gentiobiozu 0,052 mg/g; Erlozu 0,067 mg/g.

Tabela P7. Sadržaj mikroelemenata i makroelemenata u uzorcima osušenih listova čuvarkuće

Br. uzorka	Sadržaj mikroelemenata i makroelemenata (mg/kg SM)							
	Al	Bi	Ca	Cd	Co	Cr	Cu	Fe
1	145 ± 3	0,99 ± 0,02	2211 ± 12	0,045 ± 0,004	0,043 ± 0,001	2,9 ± 0,2	5,13 ± 0,09	2,43 ± 0,03
2	40,0 ± 0,7	0,78 ± 0,03	2199 ± 5	-	-	1,46 ± 0,06	4,40 ± 0,03	1,28 ± 0,02
3	61,51 ± 0,05	0,31 ± 0,02	3233 ± 24	-	0,19 ± 0,01	8,1 ± 0,2	3,68 ± 0,01	1,10 ± 0,01
4	26,9 ± 0,3	0,484 ± 0,002	2336 ± 40	-	-	3,8 ± 0,1	5,98 ± 0,09	0,93 ± 0,01
5	86,9 ± 0,3	0,60 ± 0,01	3347 ± 52	-	-	3,01 ± 0,04	4,99 ± 0,01	1,51 ± 0,01
6	50,62 ± 0,09	0,79 ± 0,03	2976 ± 46	-	-	2,1 ± 0,2	2,95 ± 0,01	1,28 ± 0,01
7	103,4 ± 0,5	0,62 ± 0,03	2074 ± 7	-	-	4,1 ± 0,1	3,84 ± 0,07	1,60 ± 0,01
8	170,2 ± 0,8	0,71 ± 0,02	3177 ± 15	0,032 ± 0,002	0,48 ± 0,01	14,65 ± 0,07	6,46 ± 0,07	1,99 ± 0,07
9	59,14 ± 0,02	0,67 ± 0,03	2684 ± 40	-	-	1,22 ± 0,02	3,58 ± 0,07	1,54 ± 0,03
10	59,0 ± 0,4	0,45 ± 0,03	2229 ± 55	-	-	3,10 ± 0,03	4,87 ± 0,06	1,28 ± 0,05
11	47,63 ± 0,06	0,55 ± 0,01	3725 ± 40	0,009 ± 0,001	0,082 ± 0,001	8,33 ± 0,08	3,30 ± 0,03	1,00 ± 0,01
12	72 ± 2	0,56 ± 0,02	2894 ± 35	0,011 ± 0,001	0,16 ± 0,01	8,0 ± 0,2	4,14 ± 0,05	0,65 ± 0,04
13	76,6 ± 0,8	0,255 ± 0,001	2241 ± 51	-	-	2,7 ± 0,2	3,57 ± 0,01	1,43 ± 0,05
14	75,2 ± 0,5	0,93 ± 0,06	3084 ± 73	-	-	2,10 ± 0,01	4,19 ± 0,05	1,84 ± 0,04
15	109 ± 2	0,38 ± 0,01	3163 ± 44	-	0,041 ± 0,001	2,3 ± 0,2	3,974 ± 0,001	1,70 ± 0,04
16	149 ± 2	0,49 ± 0,02	3386 ± 69	0,020 ± 0,001	0,31 ± 0,01	9,7 ± 0,6	5,03 ± 0,11	0,75 ± 0,03
17	96 ± 2	0,68 ± 0,01	4031 ± 91	0,014 ± 0,001	0,039 ± 0,003	4,0 ± 0,2	2,89 ± 0,11	1,47 ± 0,03
18	227 ± 4	1,19 ± 0,05	4550 ± 13	-	0,020 ± 0,002	4,6 ± 0,3	2,4 ± 0,1	0,91 ± 0,08
19	143 ± 3	0,5 ± 0,3	6615 ± 115	0,045 ± 0,004	0,23 ± 0,02	18,1 ± 0,5	2,5 ± 0,2	0,7 ± 0,2
20	222 ± 3	0,63 ± 0,01	5786 ± 92	0,162 ± 0,005	1,35 ± 0,02	36,8 ± 0,7	4,46 ± 0,03	0,35 ± 0,02

* – Sadržaj je ispod granice detekcije. Granica detekcije za: Cd 0,008 µg/L; Co 0,001 µg/L.

Tabela P7. Nastavak

Br. uzorka	Sadržaj mikroelemenata i makroelemenata (mg/kg SM)							
	K	Mg	Mn	Na	Ni	P	S	Zn
1	2175 ± 14	3458 ± 75	0,59 ± 0,01	186 ± 3	3,97 ± 0,08	1945 ± 42	878 ± 7	3,14 ± 0,04
2	2574 ± 34	4263 ± 14	0,29 ± 0,01	172,2 ± 0,7	0,411 ± 0,004	2125 ± 22	1235 ± 7	2,55 ± 0,04
3	1464 ± 7	3187 ± 18	4,46 ± 0,04	231 ± 2	2,39 ± 0,02	1666 ± 21	1390 ± 10	2,92 ± 0,03
4	2460 ± 5	3686 ± 2	0,96 ± 0,01	189 ± 2	0,46 ± 0,03	2164 ± 9	669,4 ± 0,4	2,37 ± 0,01
5	2021 ± 11	2963 ± 63	0,79 ± 0,02	251 ± 3	0,80 ± 0,04	1677 ± 25	1199 ± 28	1,58 ± 0,01
6	1582 ± 2	3424 ± 25	0,62 ± 0,01	242 ± 1	0,65 ± 0,01	1681 ± 24	1179 ± 12	1,45 ± 0,04
7	2261 ± 25	2583 ± 20	0,92 ± 0,02	181 ± 2	0,53 ± 0,01	1649 ± 12	793 ± 7	2,22 ± 0,01
8	2623 ± 25	3485 ± 48	8,5 ± 0,2	229 ± 3	0,76 ± 0,01	2268 ± 28	818 ± 11	3,42 ± 0,01
9	2272 ± 10	4121 ± 9	0,313 ± 0,003	207 ± 2	0,39 ± 0,03	2173 ± 14	1092 ± 6	1,47 ± 0,03
10	2216 ± 17	3384 ± 58	0,34 ± 0,02	200 ± 3	0,531 ± 0,003	2072 ± 38	820 ± 14	1,62 ± 0,01
11	1603 ± 5	1771 ± 19	3,34 ± 0,04	278 ± 2	0,53 ± 0,03	2025 ± 26	1379 ± 14	2,63 ± 0,03
12	1356 ± 8	2216 ± 24	3,01 ± 0,02	214 ± 3	2,16 ± 0,03	1629 ± 19	1320 ± 13	3,54 ± 0,06
13	2356 ± 17	3185 ± 21	0,70 ± 0,02	199 ± 2	0,36 ± 0,01	2174 ± 30	886 ± 13	1,79 ± 0,03
14	2153 ± 14	3930 ± 41	0,57 ± 0,01	245 ± 3	0,85 ± 0,02	2341 ± 13	1012 ± 4	1,788 ± 0,003
15	2002 ± 13	4078 ± 59	0,71 ± 0,03	245 ± 2	0,74 ± 0,01	2207 ± 39	1218 ± 16	2,115 ± 0,002
16	1517 ± 6	2776 ± 12	4,2 ± 0,1	260 ± 3	2,72 ± 0,02	1997 ± 16	1666 ± 16	3,67 ± 0,04
17	1205 ± 26	1864 ± 14	1,00 ± 0,01	300 ± 3	0,63 ± 0,05	1865 ± 7	1365 ± 25	2,91 ± 0,05
18	1090 ± 11	2537 ± 72	1,71 ± 0,01	320 ± 2	0,62 ± 0,02	1775 ± 27	1443 ± 37	1,26 ± 0,02
19	1209 ± 10	3842 ± 48	12,8 ± 0,2	463 ± 3	0,98 ± 0,02	1952 ± 23	1482 ± 17	3,39 ± 0,04
20	958 ± 10	2812 ± 30	31,3 ± 0,4	397 ± 5	4,04 ± 0,01	1923 ± 11	1802 ± 13	18,2 ± 0,4

Tabela P8. Antioksidativna aktivnost određena u ekstraktima čistog meda ekstrahovanog zakišljenom vodom (pH 2), čiste čuvarkuće ekstrahovane zakišljenom vodom (pH 2) i bez rastvarača (b.r.), kao i preparata čuvarkuće i meda (č+m) ekstrahovanog zakišljenom vodom (I-V nedelja) i bez rastvarača (I i V nedelja)

DPPH ($\mu\text{mol TE/kg}$)		Bagremov med			Livadski med			Čuvarkuća
		B1	B2	B3	L1	L2	L3	Č
	Čist med	329,81	110,37	80,89	291,14	269,51	1054,46	
	I	310,00	290,32	477,96	360,85	285,44	531,36	
č+m	II	500,52	589,55	324,83	249,62	188,70	891,90	
H ₂ O	III	219,84	348,28	287,35	295,88	245,04	420,14	1257,27
pH 2	IV	496,66	418,96	428,52	207,57	171,76	531,14	
	V	333,39	243,01	442,16	182,44	145,27	360,15	
č+m	I	444,33	498,16	424,59	507,27	500,58	965,66	1259,14
b.r.	V	425,41	305,94	788,42	441,17	435,91	438,04	

Tabela P9. Procenat varijabiliteta opisan glavnim komponentama za svaki pojedinačni antioksidativni PCA model

PCA model	Procenat varijabiliteta opisan glavnim komponentama (PC)			
	PC1 (%)	PC2 (%)	PC3 (%)	PC4 (%)
HPTLC–DPPH	45,95	21,11	14,77	5,43
HPTLC–ABTS	40,32	19,11	14,09	8,87
HPTLC–TRP	38,39	20,91	16,73	7,00
HPTLC–TAC	55,53	14,08	9,56	5,85
HPTLC–FC	34,83	27,83	12,36	9,12

Tabela P10. Antibakterijska aktivnost ispitana agar–difuzionim metodom u bunarićima predstavljena dužinom prečnika zone inhibicije rasta bakterija u milimetrima (mm)

Br. ekstrakta	<i>B. subtilis</i>	<i>M. lysodeikticus</i>	<i>S. aureus</i>	MRSA	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>
1	13	15	11	17	0	0
2	11	17	0	14	0	0
3	11	14	0	14	0	0
4	12	16	11	15	0	0
5	11	14	0	0	0	0
6	12	15	0	0	0	0
7	12	13	0	0	0	0
8	13	14	0	11	0	0
9	13	16	12	12	0	0
10	13	16	11	12	0	0
11	13	13	0	11	0	0
12	12	12	11	12	0	0
13	14	16	11	12	0	0
14	13	18	11	13	0	0
15	12	14	11	13	0	0
16	11	13	0	11	0	0
17	0	13	0	11	0	0
18	0	12	0	11	0	0
19	12	17	11	13	0	0
20	11	14	12	12	0	0

Tabela P11. Procenat varijabiliteta opisan glavnim komponentama za svaki pojedinačni antibakterijski PCA model

PCA model	Procenat varijabiliteta opisan glavnim komponentama (PC)			
	PC1 (%)	PC2 (%)	PC3 (%)	PC4 (%)
<i>B. subtilis</i>	55,95	18,62	6,30	4,81
<i>E. coli</i>	35,27	21,61	9,08	5,73
Bagremov med	43,44	18,74	12,27	5,92
Livadski med	38,71	21,45	8,56	5,81
Sa zakišeljenom vodom	43,62	19,48	11,09	5,06
Bez rastvarača	31,46	19,54	11,61	9,49

BIOGRAFIJA

Milica Jankov je rođena 29. 8. 1993. godine u Pančevu, Republika Srbija. Osnovnu školu „Vuk Stefanović Karadžić“ u Starčevu i Gimnaziju „Uroš Predić“ u Pančevu, prirodno–matematički smer, završila je kao vukovac. Integrisane akademske studije na studijskom programu Magistar farmacije na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu upisala je 2012. godine. Diplomirala je na Katedri za analitičku hemiju sa prosečnom ocenom 8,67 pod mentorstvom prof. dr Katarine Karljiković–Rajić i stekla zvanje magistar farmacije. Doktorske akademske studije na studijskom programu Hemija upisala je 2017. godine na Katedri za analitičku hemiju Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu pod mentorstvom prof. dr Dušanke Milojković–Opsenice.

Tokom 2017/2018. godine završila je pripravnički staž u apoteci i u junu 2018. položila stručni ispit za magistra farmacije. U zvanje istraživač–pripravnik izabrana je u junu 2018. godine, a od oktobra 2019. godine zaposlena je na Inovacionom centru Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. U julu 2021. godine izabrana je u zvanje istraživač–saradnik. Tokom 2023/2024. godine bila je saradnik na projektu saradnje sa domaćom privredom „Valorizacija boja za životne namirnice iz otpada voća i povrća izolovanih primenom zelenih ekstrakcija“.

Bila je angažovana kao saradnik za izvođenje laboratorijskih vežbi iz Analitičke hemije 1 na studijskom programu Biohemija, Odabranih oblasti analitičke hemije na studijskom programu Hemija na Univerzitetu u Beogradu – Hemijskom fakultetu, kao i na predmetu Klasična analitička hemija na Fakultetu za fizičku hemiju.

Član je Farmaceutске komore Srbije od 2018. godine i Srpskog hemijskog društva od 2020. godine.

Naučni radovi

1. Lazović, M.; Cvijetić, I.; **Jankov, M.**; Milojković-Opsenica, D.; Trifković, J.; Ristivojević, P. Efficiency of natural deep eutectic solvents to extract phenolic compounds from *Agrimonia eupatoria*: Experimental study and *in silico* modelling. *Plants* (2022), 11, 2346. <https://doi.org/10.3390/plants11182346>
2. **Milica Jankov, Petar Ristivojević, Ilija Cvijetić, Dušanka Milojković-Opsenica. Assessing radical scavenging capacity of *Sempervivum tectorum* L. leaf extracts: An integrated high-performance thin-layer chromatography/*in silico*/chemometrics approach. *Journal of Chromatography A* (2023), 1703, 464082. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2023.464082>**
3. Lazović, M., Cvijetić, I., **Jankov, M.**, Milojković-Opsenica, D., Trifković, J., Ristivojević, P. COSMO-RS in prescreening of natural eutectic solvents for phenolic extraction from *Teucrium chamaedrys*. *Journal of Molecular Liquids* (2023), 387, 122649. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2023.122649>
4. Mila Lazović, Đurđa Ivković, **Milica Jankov**, Ivica Dimkić, Tamara Janakiev, Jelena Trifković, Dušanka Milojković-Opsenica, Petar Ristivojević, Enhancement of propolis food preservation and functional ingredient characteristics by natural eutectic solvents extraction of phytochemicals, *Food Bioscience*, 57 (2024) 103467. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.103467>
5. Nina Tomčić, **Milica Jankov**, Petar Ristivojević, Jelena Trifković, Filip Andrić, Assessment of adulteration of sage (*Salvia* sp.) with olive leaves using high-performance thin-layer chromatography, image analysis, and multivariate linear modeling, *Journal of Chemometrics*. (2024) e3533, <https://doi.org/10.1002/cem.3533>
6. **Jankov Milica S**, Leguillier Vincent, Gasic Uros M, Anba Mondoloni Jamila, Krstic-Ristivojevic Maja V, Radoicic Aleksandra D, Dimkic Ivica Z, Ristivojevic Petar M, Vidic Jasmina, Antibacterial activities of *Agaricus bisporus* extracts and their synergistic effects with the antistaphylococcal drug AFN-1252, *Foods* (2024) 13(11), 1715; <https://doi.org/10.3390/foods13111715>
7. Svetlana Čujić, **Milica Jankov**, Petar Ristivojević, Filip Andrić, Multiobjective optimization of effect-directed planar chromatography as a promising tool for fast selection of polypotent natural products, *Journal of Chromatography A* (2024), 465252, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2024.465252>
8. Filip Andric, Minami Imamoto, **Milica Jankov**, Implementation of multiobjective decision-making algorithms and image analysis in HPTLC-guided extraction optimization of natural products, *Journal of Chromatography A* (2024), 465443, doi: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2024.465443>
9. **Milica S. Jankov, Dušanka M. Milojković Opsenica, Jelena Đ. Trifković, Pedja T. Janačković, Petar M. Ristivojević, Antibacterial profiling of *Sempervivum tectorum* L. (common houseleek) leaves extracts using high-performance thin-layer chromatography coupled with chemometrics, *JPC – Journal of Planar Chromatography – Modern TLC* (2023), <https://doi.org/10.1007/s00764-023-00269-6>**
10. Markovic B., Ivkovic B., **Jankov M.**, Karljickovic-Rajic K. „Odabrane analize hitozana iz dijetetskog suplementa na tržištu – razvoj modifikovanih metoda za određivanje stepena deacetilovanja“ *HRANA I ISHRANA* (Beograd), Vol. 58. No. 1., 27-34, 2017.

Saopštenja

1. B. Marković, **M. Jankov**, I. Popović, B. Ivković, K. Karljiković Rajić „Chitosan’s degree of deacetylation – volumetric and FTIR-ATR determination“ 13th International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry, Belgrade, Serbia, 26-30. Septembar 2016.
2. **Milica Jankov**, Bojan Markovic, Branka Ivkovic, Snezana Debeljakovic, Katarina Karljickovic Rajic „Biopolymer chitosan in dietary supplements – degree of deacetylation determination“ 13th CONGRESS OF NUTRITION Food and Nutrition – A Roadmap to Better Health, Belgrade, Serbia, 26-28. Oktobar 2016.
3. **Milica Jankov, Ilija Cvijetić, Dušanka Milojković-Opsenica: “DFT study of the antioxidant activity of polyhydroxyflavones identified in houseleek leaf extracts” 1st European Symposium on Phytochemicals in Medicine and Food, Belgrade, Serbia, September 7-9, 2022, 1-EuSPMF Book of Abstracts, p. 59, ISBN 978-86-7834-408-4**
4. **Milica Jankov**, Maja Krstić Ristivojević, Jamila Anba-Mondoloni, Petar Ristivojević, Jasmina Vidić: Antibacterial activities of ethanol and acetone extracts of *Agaricus bisporus*, XIII Congress of microbiologist of Serbia with international participation, 4-6 April 2024, Belgrade, Serbia, Book of abstracts PP 29, p. 47, ISBN 978-86-7078-178-8
5. **Milica S. Jankov, Petar M. Ristivojević, Aleksandra D. Radoičić, Nikola M. Horvacki, Dušanka M. Milojković Opsenica: Assessment of the antioxidant and antidiabetic activity of the extracts of houseleek leaves and honey mixture based on the phytochemical profile, The 3rd International UNIFood Conference, 28-29 Jun 2024, Belgrade, Serbia, Book of abstracts, p. 72, ISBN 978-86-7834-438-1**
6. **Milica S. Jankov, Petar M. Ristivojevic, Jelena Đ. Trifkovic, Ilija N. Cvijetic, Dušanka M. Milojkovic Opsenica: “Spectrophotometric determination of total phenolic content and antioxidant capacity of houseleek leaf extracts (*Sempervivum tectorum* L.) and phenolic profile” 58th Meeting of the Serbian Chemical Society, Book of Abstracts, Proceedings, Belgrade, Serbia, June 9-10, 2022, ISBN 978-86-7132-079-5**
7. Minami Imamoto, **Milica Jankov**, Petar Ristivojevic, Jelena Trifkovic, Dušanka Milojkovic Opsenica, Filip Andric: “HPTLC-guided optimization of ultrasound assisted extraction of polyphenols from green tea leaves (*Camellia sinensis*) using image analysis and multicriteria optimization” 58th Meeting of the Serbian Chemical Society, Belgrade, Serbia, June 9-10, 2022, Book of Abstracts, Proceedings, ISBN 978-86-7132-079-5
8. Đurđa D. Ivkovic, Maja V. Krstic Ristivojevic, **Milica S. Jankov**, Dušanka M. Milojkovic Opsenica, Jelena Đ. Trifkovic, Filip Lj. Andric, Petar M. Ristivojevic: “Skin anti-ageing potential of 18 medicinal herbs collected from Serbia” 58th Meeting of the Serbian Chemical Society, Belgrade, Serbia, June 9-10, 2022, Book of Abstracts, Proceedings, ISBN 978-86-7132-079-5
9. Mila C. Lazovic, **Milica S. Jankov**, Jelena Đ. Trifkovic, Ilija N. Cvijetic, Petar M. Ristivojevic, Dušanka M. Milojkovic Opsenica: “Green analytical approach for extraction and chemical profiling of phenolic compounds from natural products: A case study of *Teucrium chamaedrys* L.” 58th Meeting of the Serbian Chemical Society, Belgrade, Serbia, June 9-10, 2022, Book of Abstracts, Proceedings, ISBN 978-86-7132-079-5
10. **Milica S. Jankov, Petar M. Ristivojević, Dušanka M. Milojković-Opsenica: “Four radical scavenging activity-HPTLC assays in combination with chemometrics for the assessment of antioxidant activity of *Sempervivum tectorum* L. leaf extracts” 8th Conference of the Young Chemists of Serbia, Belgrade, 29th October 2022; Book of Abstracts, ISBN 978-86-7132-080-1**

11. Đurđa D. Ivković, Mila Č. Lazović, **Milica S. Jankov**, Petar M. Ristivojević: “Total phenolic, flavonoid contents and radical scavenging activities of NADES-based propolis extracts” 8th Conference of the Young Chemists of Serbia, Belgrade, 29th October 2022; Book of Abstracts, ISBN 978-86-7132-080-1
12. **Milica S. Jankov, Dušanka M. Milojković Opsenica, Petar M. Ristivojević: Assessment of antibacterial activity of *Sempervivum tectorum* L. leaves extracts using HPTLC bioassays and chemometrics, 9th Conference of Young Chemists of Serbia, 4th November 2023, Belgrade, Serbia, Book of abstracts PFC PP 25, p. 142, ISBN 978-86-7132-084-9**

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора **Милица Јанков**

Број индекса **ДХ06/2017**

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Фитохемијски профил и биолошка активност листа чуваркуће (*Sempervivum tectorum* L.)

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

У Београду, _____

Потпис аутора

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора	Милица Јанков
Број индекса	ДХ06/2017
Студијски програм	Хемија
Наслов рада	Фитохемијски профил и биолошка активност листа чуваркуће (<i>Sempervivum tectorum</i> L.)
Ментор	Проф. др Душанка Милојковић–Опсеница

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предала ради похрањивања у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду.

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

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

У Београду, _____

Потпис аутора

Изјава о коришћењу

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

**Фитохемијски профил и биолошка активност листа чуваркуће
(*Sempervivum tectorum* L.)**

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предала сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучила.

1. Ауторство (CC BY)

2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)

3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)

5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)

6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци. Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

У Београду, _____

Потпис аутора

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