

UNIVERZITET U BEOGRADU

FARMACEUTSKI FAKULTET



Dubravka J. Bigović

**KARAKTERIZACIJA SUVIH EKSTRAKATA
CVASTI SMILJA, *Helichrysum plicatum* DC.
I ISPITIVANJE NJIHOVE
ANTIOKSIDATIVNE, CITOTOKSIČNE,
SPAZMOLITIČKE I ANTIMIKROBNE
AKTIVNOSTI**

doktorska disertacija

Beograd, 2013

UNIVERZITET U BEOGRADU

FARMACEUTSKI FAKULTET



Dubravka J. Bigović

**KARAKTERIZACIJA SUVIH EKSTRAKATA
CVASTI SMILJA, *Helichrysum plicatum* DC.
I ISPITIVANJE NJIHOVE
ANTIOKSIDATIVNE, CITOTOKSIČNE,
SPAZMOLITIČKE I ANTIMIKROBNE
AKTIVNOSTI**

doktorska disertacija

Beograd, 2013

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF PHARMACY



Dubravka J. Bigović

**CHARACTERIZATION OF DRY EXTRACTS
OF EVERLASTING INFLORESCENCES,
Helichrysum plicatum DC., AND ASSAYING
THEIR ANTIOXIDANT, CYTOTOXIC,
SPASMOLYTIC AND ANTIMICROBIAL
ACTIVITY**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2013

Svojim mentorima, redovnom profesoru dr Zorici Đurić i naučnom savetniku dr Nebojši Menkoviću izražavam neizmernu zahvalnost na sveobuhvatnom angažovanju i izuzetnoj podršci, savetima i stručnoj pomoći tokom izrade ove disertacije.

Zahvaljujem se naučnom savetniku dr Katarini Šavikin, na neprocenljivoj pomoći i stalnom usmeravanju u usavršavanju, vanrednom profesoru dr Suzani Branković, kao i naučnom saradniku dr Tatjani Stanojković na svestranoj stručnoj pomoći, korisnim sugestijama i podršci u toku izrade ovog rada.

Najtoplije se zahvaljujem višem naučnom saradniku dr Teodori Janković i dr Gordani Zdunić na svesrdnoj podršci i pomoći u hemijskoj karakterizaciji ekstrakata, dr Tatjani Stević, na nesebičnoj podršci i pomoći oko određivanja mikrobiološke aktivnosti ekstrakata, mr Milki Jadranin na pomoći u tečno-masenoj hromatografiji, dr Dejanu Pljevljakušiću na pomoći oko statističke obrade podataka, hem. tehničarima Slavici Zoraji i Marijani Kostić i farm. tehničarima Jasmini Stojanov i Snežani Vild, na tehničkoj pomoći u laboratoriji.

Radnoj ekipi Sektora za proizvodnju Instituta za proučavanje lekovitog bilja "Dr Josif Pančić", koji su mi svako na sebi svojstven način pomogli u izradi ovog rada, dugujem veliku zahvalnost.

Zahvaljujem se svim kolegama iz Instituta, koji su me podržavali tokom doktorskih studija.

Najveću zahvalnost dugujem svojoj porodici koja je uvek verovala u mene, roditeljima koji su me učili da ne odustajem, sestri i prijateljima čije bodrenje je bilo dragoceno.

Univerzitet u Beogradu
Farmaceutski fakultet

Doktorska disertacija je urađena na Katedri za farmaceutsku tehnologiju, Farmaceutskog fakulteta - Univerziteta u Beogradu. Deo eksperimenata je urađen u Institutu za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić“ u Beogradu, u Institutu za hemiju, tehnologiju i metalurgiju Univerziteta u Beogradu, u Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije u Beogradu i na Katedri za fiziologiju, Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Nišu.

Mentor:

Prof. dr Zorica Đurić, redovni profesor
Katedra za farmaceutsku tehnologiju
Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Mentor:

Dr Nebojša Menković, naučni savetnik
Institut za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić“, Beograd

Članovi komisije:

Dr Katarina Šavikin, naučni savetnik
Institut za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić“ Beograd

Dr Tatjana Stanojković, naučni saradnik
Institut za onkologiju i radiologiju Srbije, Beograd

Dr Suzana Branković, vanredni profesor
Katedra za fiziologiju, Medicinski fakultet, Univerzitet u Nišu

Datum odbrane: _____

**Karakterizacija suvih ekstrakata cvasti smilja,
Helichrysum plicatum DC. i ispitivanje njihove
antioksidativne, citotoksične, spazmolitičke i antimikrobne
aktivnosti**

- Rezime -

U ovoj doktorskoj disertaciji izvršena je karakterizacija suvih ekstrakata cvasti smilja, *Helichrysum plicatum* DC. i ispitana njihova antioksidativna, citotoksična, spazmolitička i antimikrobna aktivnost. Posebna pažnja posvećena je pronalaženju korelacija između hemijskog sastava i farmakoloških aktivnosti suvih ekstrakata u cilju utvrđivanja mogućih aktivnih supstanci ili aktivnih markera.

U okviru preformulacionih ispitivanja, biljna droga cvasti smilja - *Helichrysi flos* (biološki izvor *Helichrysum plicatum* DC.) je precizno definisana, identifikovana i ispitana. Suvi ekstrakti dobijeni su ekstrakcijom usitnjene biljne droge, primenom metode trostruke perkolacije, prečišćavanjem dobijenog tečnog ekstrakta metodom re-ekstrakcije i uparavanjem pod vakuumom. U toku procesa ekstrakcije varirana su tri faktora: stepen usitjenosti biljne droge, vrsta ekstragensa (40%, 50%, 60% etanol) i vrsta rastvarača za re-ekstrakciju (5:5, 9:1, 100:0 etilacetat:etanol; v:v), na tri nivoa.

Razvijena je HPTLC fingerprintna metoda za brzu i pouzdanu identifikaciju glikozida i aglikona flavonoida, prisutnih u biljnoj drogi i ekstraktima. Njihova identifikacija je bazirana na različito obojenim fluorescentnim mrljama uz primenu standarda.

Tentativna LC-UV-MS analiza ekstrakata dobijenih re-ekstrakcijom je pokazala prisustvo 18 jedinjenja. Identifikovane su fenolne kiseline i flavonoidi. Flavonoidi su bili zastupljeni sa 4 grupe jedinjenja: flavanoni (naringenin i njegovi derivati), flavoni (apigenin, derivati apigenina i luteolina), flavonoli (kvercetin i kempferol i njihovi derivati) i halkoni (izosalipurpozid). Tentativna LC-UV-MS analiza biljne droge i ekstrakta cvasti smilja pokazala je da ima razlike u njihovim hromatogramima, zato što su pojedine komponente u biljnoj drogi zastupljene u nižim koncentracijama i detektuju se tek nakon procesa prečišćavanja ekstrakta. Takođe, identifikovana je komponenta cinarin, koja do sada nije identifikovana ni u jednoj *Helichrysum* vrsti. Dobijeni

hemijski profil *H. plicatum* DC. ukazuje na veliku sličnost sa oficinalnom vrstom *H. arenarium* (L.) Moench, a u isto vreme i na razlike u odnosu na nju.

U okviru hemijske karakterizacije suvih ekstrakata *Helichrysi flos* (biološki izvor *Helichrysum plicatum* DC.) određivan je sadržaj ukupnih fenola u svim uzorcima ekstrakata i on se kretao od 89,6 do 390,1 mg GAE/g. Uspostavljena je statistički značajna negativna korelacija između prinosa suvih ekstrakata i sadržaja ukupnih fenola u ekstraktu ($r = - 0,73$).

Sadržaj naringenina, apigenina i kempferola, određivan je metodom tečne hromatografije u hidrolizovanim i nehidrolizovanim uzorcima suvih ekstrakata, uz primenu standarda. U svim hidrolizovanim uzorcima suvih ekstrakata identifikovani su i određeni sadržaji naringenina (248,6-754,7 mg/g) i apigenina (19,7-138,5 mg/g). Kempferol je identifikovan u svim uzorcima i kvantifikovan u određenom broju uzoraka ekstrakata (4,5-193,9 mg/g). Rezultati određivanja sadržaja naringenina (10,1-17,4 mg/g), apigenina (4,1-16,2 mg/g) i kempferola (0,7-3,8 mg/g) u nehidrolizovanim uzorcima suvih ekstrakata, ukazuju da su flavonoidi u cvasti smilja, dominantno zastupljeni u vidu glikozida.

Optimizacija procesa ekstrakcije, bazirana na analizi uticaja faktora je pokazala različite optimalne oblasti izvođenja ekstrakcije u zavisnosti od cilja koji je postavljen u ekstrakciji. U cilju povećanja prinosa suvih ekstrakata, optimizacija procesa ekstrakcije se zasniva na uticaju varirajućih faktora (stepena usitnjenosti biljne droge, vrste ekstragensa i vrste rastvarača za re-ekstrakciju) na prinose ekstrakata. Najveći uticaj na prinose ekstrakata ispoljio je rastvarač za re-ekstrakciju, kao i interakcija stepena usitnjenosti biljne droge i rastvarač za re-ekstrakciju. U okviru optimizacije procesa ekstrakcije u cilju povećanog sadržaja ukupnih fenola, naringenina, apigenina i kempferola, ispitan je uticaj varirajućih faktora (stepena usitnjenosti biljne droge, vrsta ekstragensa i vrsta rastvarača za re-ekstrakciju) na sadržaj ukupnih fenola, sadržaj naringenina, apigenina i kempferola. Veći prinos ekstrakta je dobijen primenom nižih koncentracija etanola u ekstragensu (50%) i etilacetat : etanol 5:5 (rastvarač za reekstrakciju), dok je veći sadržaj ukupnih fenola i flavonoida dobijen primenom viših koncentracija etanola u ekstragensu (60%) i etilacetat : etanol 9:1 (rastvarača za re-ekstrakciju). Optimalan stepen usitnjenosti biljne droge za ekstrakcije je sadržavao 53-57 % frakcije 355-2000 μm i 42-45 % frakcije $> 2000 \mu\text{m}$.

Ispitivanje antioksidativne aktivnosti uzoraka suvih ekstrakata je vršeno na bazi sposobnosti redukcije DPPH radikala. Ekstrakti *Helichrysi flos* (biološki izvor *Helichrysum plicatum* DC.) su pokazali različitu antioksidativnu aktivnost (IC_{50} vrednosti 37,17-88,61 $\mu\text{g/ml}$), nižu od aktivnosti trolox-a, kao referentne supstance. Ekstrakti bogati ukupnim fenolima pokazali su najveći antioksidativni potencijal.

Citotoksična aktivnost odabranih ekstrakata *Helichrysi flos* (biološki izvor *Helichrysum plicatum* DC.) i standarda naringenin, apigenin i kempferol je ispitivana *in vitro* na tri vrste humanih malignih ćelija i to: ćelije adenokarcinoma grlića materice HeLa, ćelije karcinoma prostate PC3 i ćelije mijeloidne leukemije K 562. Svi ispitivani uzorci ekstrakata su pokazali sličnu, umerenu aktivnost na ćelije adenokarcinoma grlića materice HeLa (IC_{50} vrednosti 41,9-42,1 $\mu\text{g/ml}$), dok uzorak ekstrakta sa najvišim sadržajem ukupnih fenola je pokazao najveću aktivnost na ćelije mijeloidne leukemije K 562 (IC_{50} vrednosti 25,9 $\mu\text{g/ml}$) i na ćelije karcinoma prostate PC3 (IC_{50} vrednost 39,2 $\mu\text{g/ml}$). Među ispitivanim aglikonima, kempferol je pokazao snažnu aktivnost na sve tri vrste ćelija.

Rezultati *in vitro* ispitivanja spazmolitičke aktivnosti odabranog ekstrakta *Helichrysi flos* (biološki izvor *Helichrysum plicatum* DC.) na izolovanom tankom crevu pacova pokazuju da ekstrakt ima spazmolitički efekat na spontane kontrakcije tankog creva, kao i na kontrakcije indukovane acetilholinom, histaminom, barijum jonom i kalijum jonom. Kumulativna koncentracija ekstrakta izaziva spazmolitički efekat na spontane kontrakcije tankog creva, izazivajući srednji kontraktilni odgovor od 81,68 % (pri koncentraciji 0,01 mg/ml) i 30,08 % (pri koncentraciji od 1 mg/ml), slično dejstvu papaverina (koncentracije 0,01-3 $\mu\text{g/ml}$), koji se koristi kao referentna supstanca. Ekstrakt (0,01-1 mg/ml) je relaksirao kontrakciju izazvanu visokom koncentracijom K^+ (80 mM), slično dejstvu papaverina (0,01-3 $\mu\text{g/ml}$). Ekstrakt je, u koncentraciji 0,03-0,3 mg/ml, takođe indukovao značajnu depresiju krive zavisnosti doza-odgovor za acetilholin (5–1500 nM) ($p < 0,01$). Atropin (140 nM) je poništio efekat acetilholina. Ekstrakt (0,03–0,3 mg/ml) je redukovao kontrakcije indukovane histaminom (1–300 nM) i barijum-hloridom (3–900 μM) ($p < 0,01$).

Antimikrobna aktivnost odabranog ekstrakta *Helichrysi flos* (biološki izvor *Helichrysum plicatum* DC.) ispitivana je *in vitro* mikrodilucionom metodom na 20

mikroorganizama. Rezultati ispitivanja ukazuju na njegov jak antibakterijski (MIC vrednosti su se kretale od 0,010 do 0,055 mg/ml) i antifungalni potencijal (MIC vrednosti su se kretale od 0,005 do 0,04 mg/ml). Od bakterija, najosetljiviji je bio *B. subtilis* (MIC vrednost 0,01 mg/ml), a najotpornija *E. coli* (MIC vrednost 0,055 mg/ml). Rast kvasca *C. albicans* bio je inhibiran sa MIC od 0,02 mg/ml.

Fitopatogene gljive su bile osetljivije od bakterija na ispitivani ekstrakt (MIC vrednosti 0,005-0,04 mg/ml). Potencijalni proizvođač aflatoksina, *Aspergillus flavus*, je inhibiran veoma niskim koncentracijama (MIC 0,04 mg/ml) ovog ekstrakta. Ovi rezultati ukazuju na mogućnost primene ekstrakta u zaštiti lekovitog bilja od fitopatogenih gljiva. Takođe, postoji mogućnost primene ekstrakta smilja u prehrambenoj industriji kao prirodnog konzervansa.

Rezultati ispitivanja hemijskog sastava i farmakološke aktivnosti ekstrakata *Helichrysi flos* (biološki izvor *Helichrysum plicatum* DC.) ukazuju na: a) pozitivnu korelaciju između antioksidativne aktivnosti ekstrakata i sadržaja ukupnih fenola ($r = 0,79$), b) pozitivnu korelaciju između antioksidativne aktivnosti ekstrakata i sadržaja kempferola ($r = 0,83$), c) pozitivnu korelaciju između citotoksične aktivnosti ekstrakta na PC3 i K562 kulture ćelija sa sadržajem ukupnih fenola ($r = 0,98$ i $r = 0,99$), d) pozitivnu korelaciju između citotoksične aktivnosti ekstrakata na PC3 i K562 kulture ćelija sa sadržajem kempferola ($r = 0,88$ i $r = 0,94$) i e) pozitivnu korelaciju između citotoksične aktivnosti ekstrakta na PC3 i K562 kulture ćelija i njihove antioksidativne aktivnosti ($r = 0,94$ i $r = 0,98$). Navedene korelacije ukazuju na to da bi ukupni fenoli / kempferol mogli biti aktivne supstance, odnosno aktivni markeri na koje se standardizuje ekstrakt *Helichrysi flos* (biološki izvor *H. plicatum* DC.), kada se očekuje antioksidativno/citotoksično dejstvo.

Uzorci ekstrakata koji su ispoljili spazmolitičku i snažnu antimikrobnu aktivnost, imali su visok sadržaj ukupnih fenola i određenih aglikona naringenina, apigenina i kempferola, tako da i ti rezultati sugerišu korelaciju između sadržaja ukupnih fenola i flavonoida sa spazmolitičkom, antibakterijskom i antifungalnom aktivnosti.

Prezentovani rezultati potvrđuju primenu biljne vrste *H. plicatum* DC. u tradicionalnoj medicini i ukazuju na sličnost sa *H. arenarium* (L.) Moench, a takođe, predstavljaju dobru osnovu za naredna ispitivanja.

Ključne reči: smilje, *Helichrysum plicatum*, optimizacija procesa ekstrakcije, fenolna jedinjenja, flavonoidi, antioksidativna aktivnost, antimikrobna aktivnost, citotoksična aktivnost, spazmolitička aktivnost

Naučna oblast: Farmacija

Uža naučna oblast: Farmaceutska tehnologija, farmakognozija

UDK 615.451.1 : 582.929.4 : 57.083.36 (043.3)

Characterization of dry extracts of everlasting inflorescences, *Helichrysum plicatum* DC., and assaying their antioxidant, cytotoxic, spasmolytic and antimicrobial activity

- Summary -

In this doctoral dissertation, the characterization of dry extracts of everlasting inflorescences, *Helichrysum plicatum* DC., and assay of their antioxidant, cytotoxic, spasmolytic and antimicrobial activity were carried out. Special attention was paid to investigation of correlation between chemical composition and pharmacological effects of dry extracts to determine potentially active substances or active markers.

In the preformulation study, the herbal drug *Helichrysi flos* (*Helichrysum plicatum* DC.) was precisely defined, identified and tested. The dry extracts were prepared from powdered herbal drug by triple percolation method and purification of obtained liquid extracts by means of re-extraction method and vacuum evaporation. The following factors varied in the extraction procedures at three levels: degree of fineness of herbal drug, type of extragens (40%, 50%, 60% ethanol/water ratio) and re-extraction solvent (5:5, 9:1, 100:0 ethylacetate/ethanol ratio; v/v).

The HPTLC fingerprint method was developed for rapid and reliable identification of glycosides and aglicone flavonoids present in the herbal drugs and extracts *H.plicatum*. This identification was based on the color fluorescence, and application of the standards.

The tentative LC-UV-MS analysis of purified extracts revealed the presence of 18 compounds. Phenolic acids and flavonoids were also identified. As for flavonoids, there were four groups of compounds present: flavanones (naringenin and derivatives), flavones (apigenin and derivatives, luteolin), flavonols (quercetin and derivatives; kaempferol and derivatives) and flavones (isosalipurposide). The tentative LC-UV-MS analysis of drug and extract of everlasting inflorescences showed the difference between chromatograms of herbal drugs and extracts, because some compounds in herbal drug were present in small amounts and their presence was detected after extract purification process. A cynarin component was also identified that has not been identified in any of *Helichrysum* species. Thus obtained chemical profile *H. plicatum* DC. indicates a

significant similarity to *H. arenarium* (L.) Moench, and at the same time the differences present.

In the chemical characterization of *Helichrysi flos* (*Helichrysum plicatum* DC.) dry extracts, the total content of phenols has been determined in all extract samples and it is in the range of 89,6 to 390,1 mg GAE/g. Statistically significant negative correlation has been established between extraction yields and total contents of phenols in extracts ($r = - 0,74$).

Naringenin, apigenin and kaempferol content was determined by HPLC methods in hydrolyzed and nonhydrolysed samples of dry extracts, and by application of standards. In all hydrolysed samples of the extracts, certain naringenin (248,6-754,7 mg/g) and apigenin content (19,7-138,5 mg/g) was identified and determined. Kaempferol was identified in all samples, and quantified in several samples of extracts (4,5-193,9 mg/g). The results of naringenin (10,1-17,4 mg/g), apigenin (4,1-16,2 mg/g) and kaempferol (0,7-3,8 mg/g) content determination in nonhydrolysed samples of dry extracts show that flavonoids in everlasting inflorescences are mainly in the form of glycosides.

Extraction process optimization, based on factor analysis, showed different optimum extraction performance depending on the extraction target. In order to increase the dry extract yields, the extraction process optimization was based on the influence of various factors (degree of fineness of herbal drug, type of extragens and re-extraction solvent) on the extraction yields. The greatest effect of re-extraction solvent on extraction yields was observed as well as the degree of fineness of herbal drug - re-extraction solvent interaction. For the purpose of increasing the total content of phenols, naringenin, apigenin and kaempferol, the extraction process optimization was based on the influence of variable factors (degree of fineness of herbal drug, type of extragens and re-extraction solvent) on total phenols, naringenin, apigenin and kaempferol content. The higher dry extract yield was obtained by application of lower ethanol concentration in extragens (50%) and ethyl acetate : ethanol 5:5 (re-extraction solvent), while the higher content of phenols and flavonoids was obtained by application of higher ethanol concentration in extragens (60%) and ethyl acetate : ethanol 9:1 (re-extraction solvent). The optimum degree of fineness of herbal drug used for extraction

contained 53-57% of fraction in the range of 355-2000 μm and 42-45% of fraction $>2000 \mu\text{m}$.

Antioxidant activity of dry extract samples was evaluated on the basis of the ability of DPPH radical reduction. The extracts of *Helichrysi flos* (*Helichrysum plicatum* DC.) showed different antioxidant activities (IC_{50} values 37,17-88,61 $\mu\text{g/mL}$), lower than the activity of reference substance. The extracts rich in total phenols showed the highest antioxidant potential.

Cytotoxic activity of selected extracts of *Helichrysi flos* (*Helichrysum plicatum* DC.) and standard substances (naringenin, apigenin and kaempferol) was tested *in vitro* on three types of human cancer cells: Cervix Aden carcinoma Hela cells, PC3 prostate cancer cell lines and myelogenous leukemia K562 cells. All tested extracts exhibited moderate activity against Hela cells (IC_{50} value 41,9-42,1 $\mu\text{g/ml}$), whereas the extract containing the highest total phenols was the most active against K562 cells (IC_{50} value 25,9 $\mu\text{g/ml}$) and PC3 lines (IC_{50} value 39,2 $\mu\text{g/ml}$). Among aglycones tested, kaempferol displayed strong cytostatic activity against all cell lines.

The results of *in vitro* spasmolytic activity testing of selected extract of *Helichrysi flos* (*Helichrysum plicatum* DC.), assayed on isolated rat ileum, showed spasmolytic effect of dry extract on spontaneous ileum contractions and contractions induced by acetylcholine, histamine, barium and potassium ions. Cumulative concentrations of the extract induced a spasmolytic effect on spontaneous rat ileum contractions and caused a mean contractile response of 81,68 % (at the concentration of 0,01 mg/ml) and 30,08 % (at the concentration of 1 mg/ml). A similar effect was observed with papaverine (0,01–3 $\mu\text{g/ml}$) that was used as the reference substance. The extract (0,01–1 mg/ml) relaxed high K^+ (80 mM) precontractions, an effect similar to that caused by papaverine (0,01–3 $\mu\text{g/ml}$). The plant extract (0,03–0,3 mg/ml) also induced a significant depression of the cumulative concentration response curve for acetylcholine (5–1500 nM) ($p < 0,01$). Atropine (140 nM) abolished the acetylcholine effect. The extract (0.03–0.3 mg/ml) reduced the contractions induced by the histamine (1–300 nM) and BaCl_2 (3–900 μM) ($p < 0,01$).

Antimicrobial activity of selected extract of *Helichrysi flos* (*Helichrysum plicatum* DC.) was tested by *in vitro* micro dilution method against 20 microorganisms.

The results indicated its strong antibacterial (MIC values 0,010 – 0,055 mg/ml), and antifungal potential (MIC values of 0,005 - 0,04 mg/ml). The most sensitive was *B. subtilis* (MIC value of 0,01 mg/ml), but the most resistant was *E. coli* (MIC value of 0,055 mg/ml). The extract inhibited the growth of yeast *C. albicans* (MIC value 0,02 mg/ml).

Phytopathogene yeasts were more sensitive than bacteria on the tested extract (MIC values of 0,005-0,04 mg/ml). Potential aflatoxin producer, *A. flavus*, was inhibited at very low concentrations (MIC 0,04 mg/ml). These results enable the application of the extract to the protection of medicinal plants against plant pathogenic fungi. There is also a possibility of everlasting extract use in the food industry as a natural preservative.

The results of *Helichrysi flos* (*Helichrysum plicatum* DC.) chemical composition and pharmacological activity analyses indicated the following: a) positive correlation between antioxidant activity extracts and total phenols content ($r = 0,79$), b) positive correlation between antioxidant activity extracts and kaempferol content ($r = 0,83$), c) positive correlation between extract cytotoxic activity against PC3 and K562 cells and total phenols content ($r = 0,98$ and $r = 0,99$), d) positive correlation between extract cytotoxic activity against PC3 and K562 cells and kaempferol content ($r = 0,88$ and $r = 0,94$), e) positive correlation between extract cytotoxic activity against PC3 and K562 cells and their antioxidant activity ($r = 0,94$ and $r = 0,98$). These correlations suggest that the total phenols / kaempferol could be active substances or active markers used for *H.flos* extract standardization (biological source *Helichrysum plicatum* DC.) when the antioxidant/cytotoxic effect is expected.

The samples of extracts, that showed spasmolytic and strong antimicrobial activity, had high total phenol content and all determined aglycones of naringenin, apigenin and kaempferol, and these results suggest a correlation between the content of total phenols and flavonoids with spasmolytic, antibacterial and antifungal activities.

The results, as demonstrated above, justify the traditional use of *H. plicatum* DC. and indicate the similarity to *H. Arenarium* (L.) Moench, which is a good basis for further investigations.

Keywords: everlasting, *Helichrysum plicatum*, extraction process optimization, , phenols compounds, flavonoids, antioxidant activity, antimicrobial activity, cytotoxic activity, spasmolytic activity

Scientific field: Pharmacy

Scientific discipline: Pharmaceutical technology, Pharmacognosy

UDK 615.451.1 : 582.929.4 : 57.083.36 (043.3)

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. Rod <i>Helichrysum</i> Mill.	1
1.1.1. Opis i rasprostranjenost vrste <i>Helichrysum arenarium</i> (L.) Moench subsp. <i>arenarium</i>	3
1.1.2. Opis i rasprostranjenost vrste <i>Helichrysum plicatum</i> DC. subsp. <i>plicatum</i>	5
1.1.3. Hemijski sastav <i>Helichrysum arenarium</i> (L.) Moench	7
1.1.4. Hemijski sastav <i>Helichrysum plicatum</i> DC.	7
1.2. Pregled oficinalnih monografija <i>Helichrysum arenarium</i> (L.) Moench	9
1.2.1. Pregled zahteva za <i>Helichrysi flos</i> (biološki izvor <i>H. arenarium</i> L.) prema monografijama ГФСССР XI, Ph. Helv. 11 th i WHO	9
1.2.2. Pregled aktivnosti i farmakoloških dejstava <i>Helichrysi flos</i> (biološki izvor <i>H. arenarium</i>) prema monografijama WHO, PDR i Komisije E i u tradicionalnoj medicini	9
1.3. Pregled očekivanih farmakoloških dejstava i aktivnosti <i>Helichrysum plicatum</i> DC. u tradicionalnoj medicini	10
1.4. Ekstrakti: definicija, metode ekstrakcije, klasifikacija	11
1.5. Flavonoidi	13
1.6. Metode ekstrakcije flavonoida iz <i>Helichrysum</i> vrsta	14
1.6.1. Metode ekstrakcije flavonoida iz <i>H. arenarium</i> (L.) Moench i <i>H. italicum</i> (Roth)	14
1.6.2. Metode ekstrakcije flavonoida iz <i>H. plicatum</i> DC.	15
1.7. Preformulaciona i formulaciona istraživanja biljnih lekova	15
1.8. Biofarmaceutska karakterizacija biljnih lekova	18
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	20
3. MATERIJAL I METODE ISTRAŽIVANJA	21
3.1. Biljni materijal	21
3.2. Metode preformulacionih ispitivanja biljne droge i ekstrakata <i>Helichrysi flos</i> (biološki izvor <i>Helichrysum plicatum</i> DC.)	21
3.2.1. Ispitivanja biljne droge	21
3.2.2. Priprema za ekstrakciju i ispitivanje stepena usitnjenosti biljne droge	23
3.2.3. Uticaj formulacionih i tehnoloških parametara na suvi ostatak u tečnom ekstraktu (1:1) ili na prinos suvog ekstrakta	24
3.2.3.1. Uticaj odnosa droga : ekstragens na suvi ostatak u tečnom ekstraktu (1:1)	24
3.2.3.2. Uticaj načina proticanja ekstragensa kroz drogu na suvi ostatak u tečnom ekstraktu (1:1)	26
3.2.3.3. Uticaj odnosa droga : rastvarač za re-ekstrakciju na prinos suvog ekstrakta	28
3.3. Metoda dobijanja suvog ekstrakta <i>Helichrysi flos</i> (biološki izvor <i>H. plicatum</i> DC.)	29
3.3.1. Metoda dobijanja ekstrakta	29
3.3.2. Dizajn eksperimenta	32

3.3.3. Određivanje suvog ostatka u tečnom ekstraktu	33
3.3.4. Određivanje procenta etanola u tečnom ekstraktu nakon destilacije	33
3.3.5. Optimizacije procesa ekstrakcije u cilju dobijanja većeg suvog ostatka/prinosa suvog ekstrakta	34
3.3.5.1. Optimizacija procesa tečne ekstrakcije u cilju dobijanja većeg suvog ostatka	34
3.3.5.2. Optimizacija procesa ekstrakcije u cilju dobijanja većeg prinosa suvog ekstrakta	35
3.4. Metode hemijske karakterizacije suvih ekstrakata <i>Helichrysi flos</i> (biološki izvor <i>H. plicatum</i> DC.)	36
3.4.1. HPTLC fingerprintna analiza glikozida i aglikona flavonoida droge/ekstrakta uz primenu standarda glikozida i aglikona	36
3.4.1.1. HPTLC fingerprintna analiza glikozida flavonoida droge/ekstrakta uz primenu standarda glikozida	36
3.4.1.2. HPTLC fingerprintna analiza aglikona flavonoida ekstrakta uz primenu standarda aglikona	37
3.4.2. Tentativna LC-UV-MS analiza biljne droge/ekstrakta	38
3.4.3. Određivanje sadržaja ukupnih fenola u suvim ekstraktima	39
3.4.4. Određivanje sadržaja aglikona flavonoida naringenina, apigenina i kempferola, metodom tečne hromatografije	40
3.5. Optimizacije procesa ekstrakcije u cilju dobijanja većeg sadržaja ukupnih fenola i flavonoida u suvim ekstraktima <i>Helichrysi flos</i> (biološki izvor <i>H. plicatum</i> DC.)	41
3.5.1. Optimizacija procesa ekstrakcije u cilju dobijanja većeg sadržaja ukupnih fenola	41
3.5.2. Optimizacije procesa ekstrakcije u cilju dobijanja većeg sadržaja flavonoida	42
3.6. Metode ispitivanja antioksidativne, citotoksične, spazmolitičke i antimikrobne aktivnosti suvih ekstrakata <i>Helichrysi flos</i> (biološki izvor <i>H. plicatum</i> DC.)	42
3.6.1. Metoda ispitivanja antioksidativne aktivnosti	42
3.6.2. Metoda ispitivanja citotoksične aktivnosti	43
3.6.3. Metoda ispitivanja spazmolitičke aktivnosti	45
3.6.4. Metoda ispitivanja antimikrobne aktivnosti	46
4. REZULTATI I DISKUSIJA ISTRAŽIVANJA	51
4.1. Rezultati preformulacionih ispitivanja biljne droge i ekstrakata <i>Helichrysi flos</i> (biološki izvor <i>H. plicatum</i> DC.)	51
4.1.1. Rezultati ispitivanja biljne droge	51
4.1.2. Priprema za ekstrakciju i ispitivanje stepena usitnjenosti biljne droge	52
4.1.3. Rezultati uticaja formulacionih i tehnoloških parametara na suvi ostatak u tečnom ekstraktu (1:1) ili na prinos suvog ekstrakta	57
4.1.3.1. Uticaj odnosa droga: ekstragens na suvi ostatak u tečnom ekstraktu (1:1)	57
4.1.3.2. Uticaj načina proticanja ekstragensa kroz drogu na suvi ostatak u tečnom ekstraktu (1:1)	59
4.1.3.3. Uticaj odnosa droga : rastvarač za re-ekstrakciju na prinos suvog ekstrakta	60
4.1.4. Rezultati i diskusija preformulacionih ispitivanja	61
4.2. Karakterizacija dobijenih tečnih ekstrakata i prikaz prinosa suvih ekstrakata	62

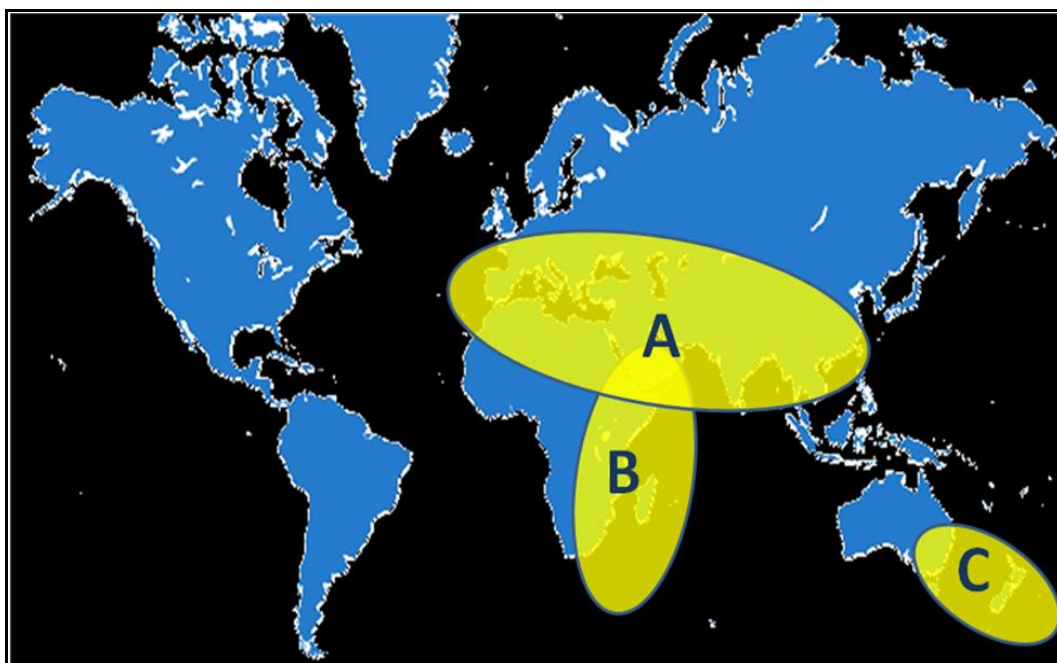
<i>Helichrysi flos</i> (biološki izvor <i>H. plicatum</i> DC.)	
4.3. Optimizacije procesa ekstrakcije u cilju dobijanja većeg suvog ostatka/prinosa suvog ekstrakta <i>Helichrysi flos</i> (biološki izvor <i>H. plicatum</i> DC.)	65
4.3.1. Optimizacija procesa tečne ekstrakcije u cilju dobijanja većeg suvog ostatka	65
4.3.2. Optimizacija procesa ekstrakcije u cilju dobijanja većeg prinosa suvog ekstrakta	67
4.4. Rezultati hemijske karakterizacije suvih ekstrakata <i>Helichrysi flos</i> (biološki izvor <i>H. plicatum</i> DC.)	76
4.4.1. Rezultati HPTLC fingerprintne analize glikozida i aglikona flavonoida droge/ekstrakta uz primenu standarda glikozida i aglikona	76
4.4.1.1. Rezultati HPTLC fingerprintne analize glikozida flavonoida droge/ekstrakta uz primenu standarda glikozida	76
4.4.1.2. HPTLC fingerprintna analiza aglikona flavonoida ekstrakta uz primenu standarda aglikona	77
4.4.2. Rezultati tentativne LC-UV-MS analize biljne droge/ekstrakta	79
4.4.3. Rezultati određivanja sadržaja ukupnih fenola	84
4.4.4. Rezultati određivanja sadržaja aglikona flavonoida naringenina, apigenina i kempferola, metodom tečne hromatografije	87
4.5. Optimizacije procesa ekstrakcije cilju dobijanja većeg sadržaja fenola i flavonoida u suvim ekstraktima <i>Helichrysi flos</i> (biološki izvor <i>H. plicatum</i> DC.)	94
4.5.1. Optimizacija procesa ekstrakcije u cilju dobijanja većeg sadržaja ukupnih fenola	94
4.5.2. Optimizacije procesa ekstrakcije u cilju dobijanja većeg sadržaja flavonoida	100
4.6. Rezultati ispitivanja antioksidativne, citotoksične, spazmolitičke i antimikrobne aktivnosti suvih ekstrakata <i>Helichrysi flos</i> (biološki izvor <i>H. plicatum</i> DC.)	107
4.6.1. Rezultati ispitivanja antioksidativne aktivnosti	107
4.6.2. Rezultati ispitivanja citotoksične aktivnosti	110
4.6.3. Rezultati ispitivanja spazmolitičke aktivnosti	112
4.6.4. Rezultati ispitivanja antimikrobne aktivnosti	117
4.7. Uspostavljanje korelacija između aktivnosti i hemijskog sastava suvih ekstrakata <i>Helichrysi flos</i> (biološki izvor <i>H. plicatum</i> DC.)	120
5. ZAKLJUČAK	123
6. LITERATURA	128
7. PRILOZI	141
7.1. Taksonomski prikaz vrsta roda <i>Helichrysum</i> u Evropi	141
7.2. Pregled zahteva ГФСССР XI, Ph. Helv. 11 th., monografija WHO za biljnu drogu <i>Helichrysi flos</i> (biološki izvor <i>H. arenarium</i>)	142
7.3. Pregled aktivnosti i farmakoloških dejstava <i>Helichrysi flos</i> (biološki izvor: <i>Helichrysum arenarium</i>) prema monografijama WHO, PDR, Komisije E	143

1. UVOD

1.1. Rod *Helichrysum* Mill.

Rod *Helichrysum* Mill. koji pripada porodici *Asteraceae*, je široko rasprostranjen u evropskoj flori i sastoji se od taksonomski složene grupe biljaka koje se koriste u tradicionalnoj medicini.

Biljke iz roda *Helichrysum* Mill. su višegodišnje, zeljaste biljke ili polužbunovi. Listovi su im celi i često pustenasto dlakavi. Imaju glavice sa mnogo cvetova u gronjastim cvastima, retko pojedinačne. Listići involukruma su potpuno suvo kožičasti i goli, poredani kao crepovi na krovu, u više redova, često člankovito savijeni i sa zračno proširenim vrhom. Cvetovi su svi hermafroditni, cevasti ili obodni ženski, sa končasto cevastom krunicom. Papus se sastoji od mnogobrojnih, jednostavnih čekinjastih dlačica, u jednom redu. Ahenije valjkaste, sa pet ivica, jedva nešto spljoštene (Stjepanović *et al.*, 1976; Stevanović, 1999; Flora Europea, 2006). Rod *Helichrysum* obuhvata oko 600 vrsta. Ime vrste potiče od grčke reči *helios*- sunce i *chrysos* – zlato, što ukazuje na atraktivne žute cvetove. U svetu su rasprostranjene u tri zone (slika 1.1).



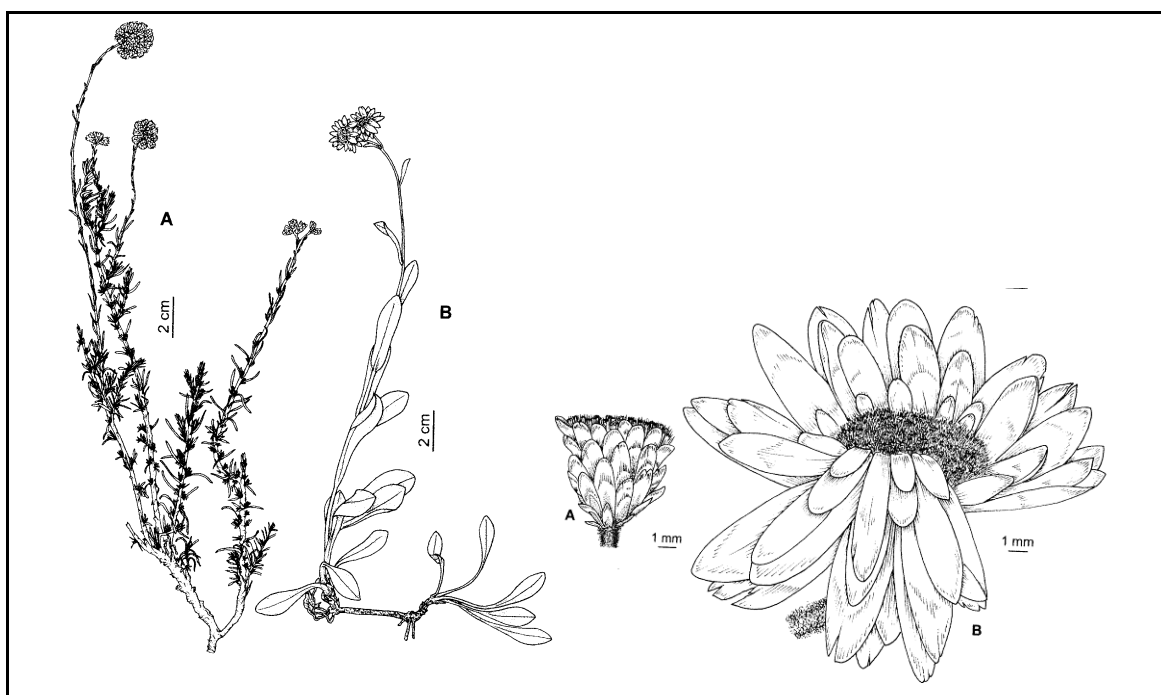
Slika 1.1 Prikaz rasprostranjenja roda *Helichrysum* u svetu:
Mediteran, Srednja i Južna Evropa, Zapadna i Centralna Azija (A);
Južna Afrika, Madagaskar, Istočna tropska Afrika i Severoistočna tropska Afrika (B);
Istočna i Jugoistočna Australija i Novi Zeland (C)

U flori Evrope nalazi se 25 vrsta roda *Helichrysum* Mill. Taksonomski pregled evropskih vrsta (Flora Europea, 2006) prikazan je u Prilogu 7.1.

Rod *Helichrysum* Mill. u flori Evrope svrstan je u tri sekcije: sekcija *Virginiea* (DC.), sekcija *Helichrysum* (u okviru koje se nalazi grupa *H. stoechas*), sekcije *Xerochlaena* (DC.) (Flora Europea, 2006). U Evropi je prisutna mešavina dva tipa smilja: mediteranskog i azijskog tipa. Mediteranski tip smilja poseduje habitus bez rozete, razgranato stablo i cvasti sa više cvetova. Azijski tip smilja ima habitus sa rozetom i jednim stablom, na vrhu stabljike se razvija jedan veliki cvet. Na slici 1.2 prikazane su razlike u habitusu mediteranskog i azijskog tipa smilja.

U flori Srbije prisutne su dve vrste roda *Helichrysum*, obe vrste pripadaju sekciji *Helichrysum*, i to su: ***Helichrysum arenarium* (L.) Moench** i ***Helichrysum plicatum* DC.**

Prema literaturnim podacima vrste roda *Helichrysum* imaju holeretičnu i holagognu aktivnost, antiinflamatornu i antialergijsku aktivnost, smatra se zbog prisustva fenolnih komponenti (Sala *et al.*, 2003 (a), Sala *et al.*, 2003 (b)).



Slika 1.2 Prikaz razlika u izgledu habitusa i cvetnog dela dva tipa smilja: mediteranski tip (A) i azijski tip (B)

1.1.1. Opis i rasprostranjenost vrste *Helichrysum arenarium* (L.) Moench subsp. *arenarium*



Slika 1.3 *Helichrysum arenarium* (L.) Moench, Lokalitet: Kladovska peščara

Narodni nazivi: smilje, stepsko smilje, peščarsko smilje (Stevanović, 1999).

Opis biljke: višegodišnja biljka, koja raste do visine 10-30 (50) cm, sa vretenastim, odrvenelim rizomom. Stabljika je belo vunasto dlakava, sa mnogo listova. Prizemni listovi su obrnuto jajoliki, gornji listovi su linearno lancetasti, po obodu celi, sivo, vunasto-pustenasto dlakavi. Cvast je terminalna gronja sa po 3 – 20 glavica. Listići involukruma su suvokožičasti, limunžuti ili narandžasti, vrlo retko beli. Cvetovi su zlatnožute boje, cevasti dvopolni. Plod je ahenija dužine 1 mm (slika 1.3).

Vreme cvetanja: jul-avgust (septembar).

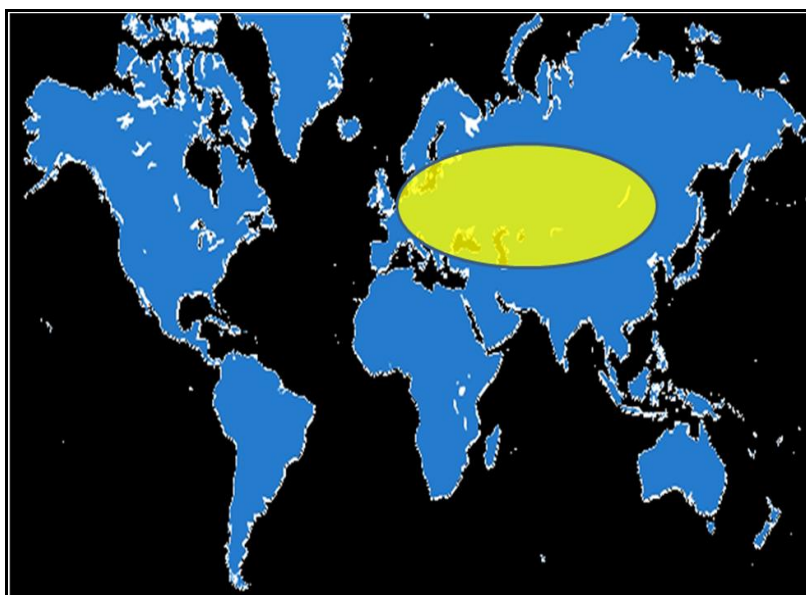
Stanište: raste na peskovitim i suvim travnatim mestima.

Rasprostranjenje u Srbiji: rasprostire se u Subotičko - Horgoškoj peščari, Deliblatskoj peščari, Kladovu i Nišu (Slika 1.4). Krajnje ugrožen takson u Srbiji. (Stevanović, 1999)

Rasprostranjenje u svetu: Raste u Evropi (severna granica areala u južnoj Švedskoj, zapadna u Rajnskoj oblasti, Belgiji i Holandiji, južna na Balkanskom poluostrvu (Dobrudža) i Panonskoj niziji) i Aziji (Baltik, Ukrajina, Rusija, južni i centralni Sibir) (slika 1.5).



Slika 1.4 Rasprostranjenje *Helichrysum arenarium* (L.) Moench u Srbiji: Subotičko - horgoška pešćara (1); Deliblatska pešćara (2); Kladovo (3); Niš (4)



Slika 1.5 Rasprostranjenje *Helichrysum arenarium* (L.) Moench u svetu

1.1.2. Opis i rasprostranjenost vrste *Helichrysum plicatum* DC. subsp. *plicatum*

Opis biljke: *Helichrysum plicatum* DC. subsp. *plicatum* ima uspravnu ili ustajuću, granatu stabljiku, koja je pri osnovi odrvenela. Stabljika je žlezdasto dlakava. Listovi su zeleni, žlezdasti i lepljivi. U donjem delu stabljike listovi su lopatičasto-lancetasti, a gornji listovi su linearni. Cvasti su žute do narandžaste, prečnika 2-6 cm, guste i skoro loptaste. Listići involukruma su zlatnožuti, goli, uzdužno naborani. Ahenije su braon, sitno belo bradavičave. Biljka se razmnožava semenom ili generativno (izdanci iz rizoma)(Stevanović, 1999), (slika 1.6).



Slika 1.6 *Helichrysum plicatum* DC.; lokalitet: Tomoros - NP "Galičica"

Vreme cvetanja: jun-jul, stvara plodove u periodu od avgusta do septembra. U fazi cvetanja čitava biljka je lepljiva i otužnog jakog, gotovo neprijatnog mirisa.

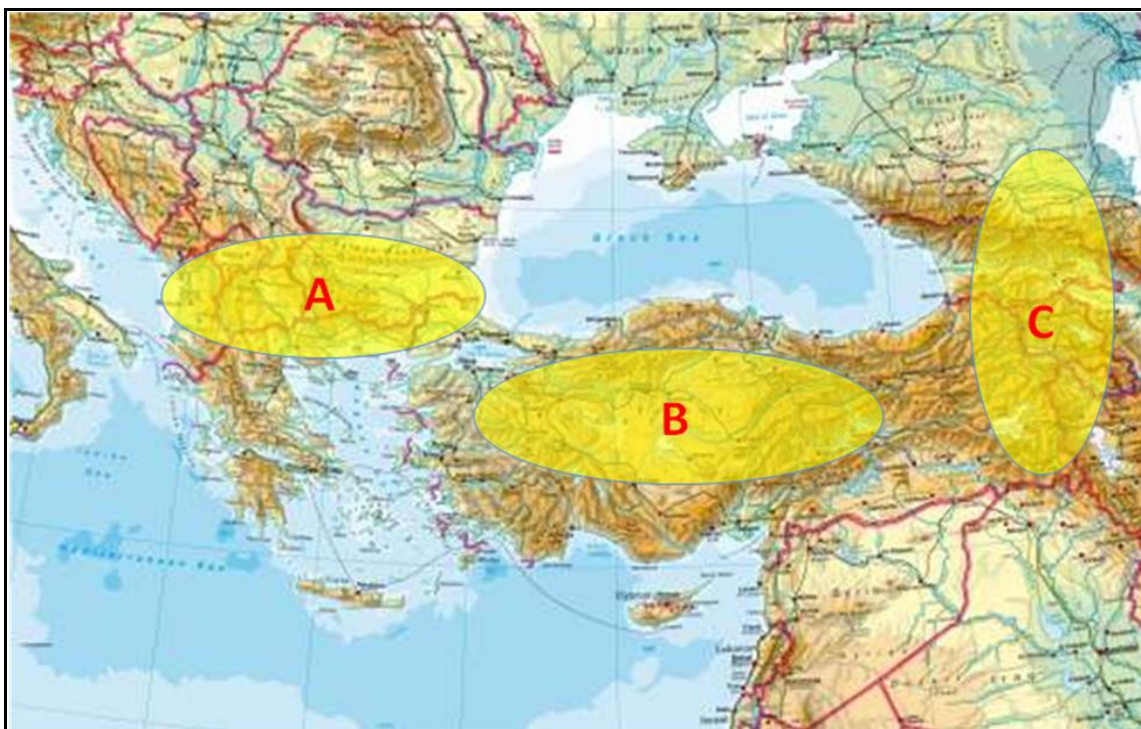
Stanište: Biljka suvih pašnjaka. Raste na peščanim i kamenitim staništima, od 1200 do 1700 mnv pa i više. Raste pojedinačno ili u malim, fragmentiranim individualnim populacijama.

Rasprostranjenje u Srbiji: rasprostire se u Jugoistočnoj Srbiji (Bosilegrad i Rudina planina) i Metohija (Paštrik)(Stevanović, 1999)(Slika 1.7).

Opšte rasprostranjenje: Rasprostranjenje *Helichrysum plicatum* DC. u svetu locirano je na uži areal i to: Balkansko poluostrvo, Mala Azija, Kavkaz i Iran, što je prikazano na slici 1.8.



Slika 1.7 Lokaliteti *Helichrysum plicatum* DC. u Srbiji: Jugoistočna Srbija - Bosilegrad, Rudina planina (1); Metohija – Paštrik (2)



Slika 1.8 Rasprostranjenje *Helichrysum plicatum* DC. u svetu: Balkansko poluostrvo - Albanija, Srbija, Makedonija, Grčka i Bugarska (A); Mala Azija (B); Kavkaz i Iran (C)

1.1.3. Hemijski sastav *Helichrysum arenarium* (L.) Moench

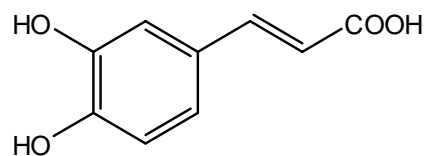
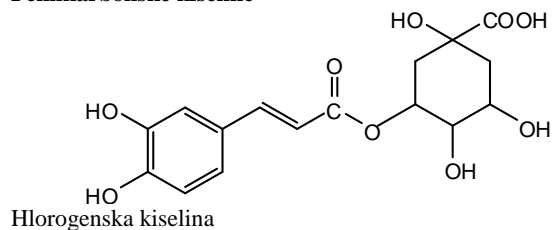
Cvetovi smilja imaju kompleksan hemijski sastav. Sadrže tanine, hinone, kumarine, flavonoide, aromatične supstance, smole, karotenoide, ftalide, gorka jedinjenja, etarsko ulje itd. Posebnu pažnju zavređuju polifenolna jedinjenja smilja za koje se smatra da ispoljavaju značajne farmakološke aktivnosti. U prvom redu to su flavonoidni sastojci prisutni u formi aglikona i odgovarajućih heterozida. U *H. arenarium* identifikovani su sledeći polifenolni kompleksi: fenolne kiseline (kafena i hlorogenska kiselina), flavanoni (naringenin, naringenin-5-*O*-glukozid), flavoni (apigenin, apigenin-7-*O*-glukozid, luteolin, luteolin-7-*O*-glukozid), flavonoli (kempferol, kempferol-3-*O*-glukozid, kvercetin i kvercetin-3-*O*-glukozid) i halkoni (izosalipurpozid) (Czinner *et al.*, 2002). Flavonoidi prisutni u *H. arenarium* prikazani su na slici 1.9. Wang *et al.* (2009) su iz *H. flos* izolovali i helichrisin A, heliciozid, naringenin-5,7-di-*O*-glukozid, naringenin-7-*O*-glukopiranozid. Etarsko ulje iz *H. arenarium* se dobija destilacijom vodenom parom i sadrži: linalol, anetol, timol, eugenol, karvakrol, β -azaron i dr. komponente (Czinner *et al.*, 2000; Lemberkovics *et al.*, 2001).

1.1.4. Hemijski sastav *Helichrysum plicatum* DC.

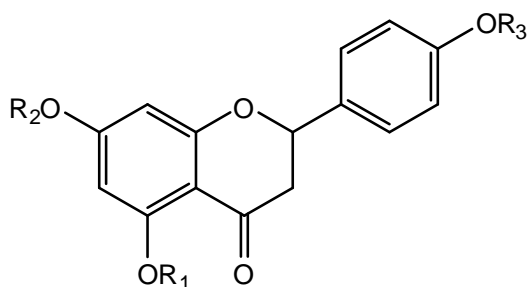
Kao kod ostalih *Helichrysum* vrsta i kod *H. plicatum* DC. fenoli su jedinjenja koja su najviše ispitivana. Kulevanova *et al.*, (2000) u cvastima i listovima *H. plicatum* DC. su identifikovali: apigenin i naringenin kao slobodne aglikone i glikozide apigenina, naringenina, kempferola i kvercetina. Albayarak *et al.*, (2010) su u *H. plicatum* subsp. *plicatum*, identifikovali i sledeće fenolne komponente: hlorogenska kiselina, kafena kiselina, ferulinska kiselina, *p*-kumarinska kiselina, *p*-hidroksibenzoeva kiselina, hesperidin i luteolin. Aslan *et al.*, (2007) kao značajne komponente koje su izolovane iz ove biljne vrste navode: izoastragalin, izosalipurpozid, helihrisin A i B.

Kolayli *et al.*, (2010) identifikovali su u cvastima *H. plicatum* DC. subsp. *plicatum* i galnu kiselinu, katehin i rutin, a u listovima i epikatehin.

Fenilkarbonske kiseline



Flavanoni – naringeninski derivati



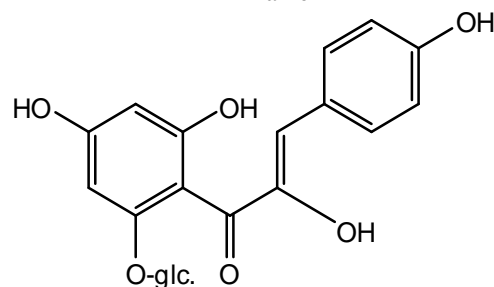
Naringenin

 $R_1 = R_2 = R_3 = \text{OH}$

Naringenin -5-O-glukozid

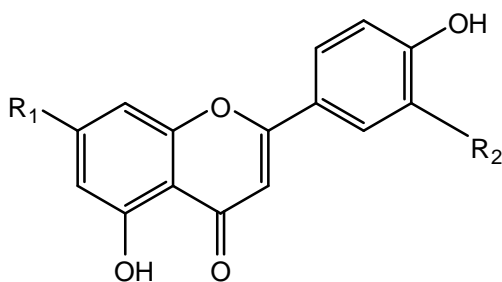
 $R_2 = R_3 = \text{OH}; R_1 = \text{glukoza}$

Halkoni



Izosalipurposid

Flavoni – derivati apigenina i luteolina



Apigenin

 $R_1 = \text{OH}; R_2 = \text{H}$

Apigenin -7-O-glukozid

 $R_1 = \text{O-glukozid}; R_2 = \text{H}$

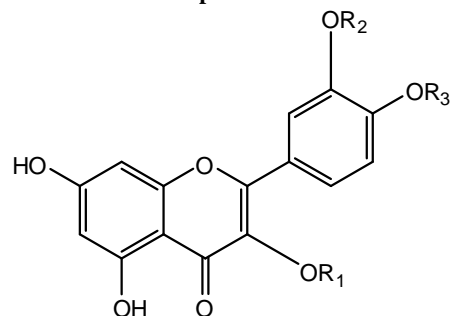
Luteolin

 $R_1 = \text{OH}; R_2 = \text{OH}$

Luteolin -7-O-glukozid

 $R_1 = \text{O-glukozid}; R_2 = \text{OH}$

Flavonoli – derivati kempferola i kvercetina



Kempferol

 $R_1 = R_3 = \text{OH}; R_2 = \text{H}$

Kempferol-3-O-glukozid

 $R_1 = \text{glukoza}; R_2 = \text{H}; R_3 = \text{OH}$

Kvercetin

 $R_1 = R_2 = R_3 = \text{OH}$

Kvercetin-3-O-glukozid

 $R_1 = \text{glukoza}; R_2 = R_3 = \text{OH}$ Slika br.1.9 Fenolne komponente prisutne u *H. arenarium* (L). Moench

1.2. Pregled oficinalnih monografija *Helichrysum arenarium* (L.) Moench

1.2.1. Pregled zahteva za *Helichrysi flos* (biološki izvor *Helichrysum arenarium*) prema monografijama ГФСССР XI, Ph. Helv. 11 th., WHO

Od vrsta roda *Helichrysum* najveći terapijski značaj ima *H. arenarium* (L.) Moench (peščarsko smilje), koji se koristi kao izvor droge *Helichrysi flos* (flores) (cvasti peščarskog smilja) i oficinalan je u Государственная Фармакопея СССР XI (ГФСССР XI), Pharmacopoeia Helvetica 11 (Ph. Helv. 11th.) Cvasti peščarskog smilja u svojim izdanjima obradile su i: Svetska zdravstvena organizacija (WHO), Physician's desk reference (PDR) for herbal medicines, The complete German Commission E monographs: therapeutic guide to herbal medicines i dr. U prilogu 7.2 dat je pregled zahteva ГФСССР XI, Ph. Helv. 11 th., i monografije WHO za biljnu drogu *Helichrysi flos* (biološki izvor *H.arenarium*).

1.2.2. Pregled aktivnosti i farmakoloških dejstava *Helichrysi flos* (biološki izvor *Helichrysum arenarium*) prema monografijama WHO, PDR, Komisije E i u tradicionalnoj medicini

Prema navedenim monografijama droga *Helichrysi flos* (biološki izvor *Helichrysum arenarium*) se koristi kao holagog, u tretmanu dispeptičnih oboljenja, u tradicionalnoj medicini kao holeretik, hepatoprotektiv, za detoksikaciju, diuretik, blag spazmolitik. Nema podataka o sprovedenim kliničkim ispitivanjima primene navedene droge. Rađena su eksperimentalna farmakološka ispitivanja i to: antioksidativno, antimikrobno, spazmolitičko, diuretično, hipotenzivno i citotoksično dejstvo *H. arenarium*. U prilogu 7.3 dat je pregled aktivnosti i farmakoloških dejstava *Helichrysi flos* (biološki izvor *Helichrysum arenarium*) prema monografijama WHO, PDR, Komisije E.

Helichrysi flos (biološki izvor *Helichrysum arenarium*) u tradicionalnoj medicini: se upotrebljava kao holeretik, hepatoprotektiv, sredstvo za detoksikaciju, diuretik, kao blago antimikrobno i spazmolitično sredstvo (WHO Monographs on Selected Plants, 2002). U ruskoj tradicionalnoj medicini galenski preparati peščarskog

smilja umanjuju koncentraciju žučnih kiselina, povećavaju sadržaj holata i bilirubina u žuči, holato-holesterinski koeficijent, tonus žučne kese i pospešuju izlučivanje žuči i spazmolitički deluju na sfinkter žučne kese. Koristi se u obliku čaja, infuza, dekokta, preparata na bazi suvih ekstrakata i preparata na bazi suvog ekstrakta bogatog flavonoidima (Flamin tablete) (Лебеда *et al.*, 2004). Za sada nema podataka o kliničkim ispitivanjima preparata na bazi *Helichrysum arenarium* (WHO Monographs on Selected Plants, 2002).

1.3. Pregled očekivanih farmakoloških dejstava i aktivnosti *Helichrysum plicatum* DC. u tradicionalnoj medicini

Vrsta *Helichrysum plicatum* DC. (smilje) je srodan takson *Helichrysum arenarium* (L.) Moench (peščarsko smilje), nije oficinalna ni u jednoj farmakopeji i široko primenjuje u tradicionalnoj medicini u više zemalja.

Cvasti smilja *Helichrysum plicatum* se koriste u srpskoj i makedonskoj narodnoj medicini za lečenje bolesti želuca i jetre. Takođe, ispitivana je antidijabetička, antioksidativna i antibakterijska aktivnost ekstrakata *Helichrysum plicatum* (Czinner *et al.*, 2000; Aslan *et al.*, 2007; Tepe *et al.*, 2005), kao i njihovo antiurolitijazno dejstvo (Bayir *et al.*, 2011).

U Južnoj Africi postoji veliki broj vrsta roda *Helichrysum*, koje se koriste u tradicionalnoj medicini i neke od njih su ispitivane na antimikrobnu i *in vitro* citotoksičnu aktivnost (Lourens *et al.*, 2008; Lourens *et al.*, 2011). Pregled očekivanih farmakoloških dejstava i aktivnosti *Helichrysum plicatum* dat je u tabeli 1.1.

Tabela 1.1 Pregled očekivanih farmakoloških dejstava i aktivnosti *H. plicatum* DC. u tradicionalnoj medicini različitih zemalja

Biološki izvor	<i>Helichrysum plicatum</i> DC.
Naziv droge	<i>Helichrysi flos</i>
Zemlja	Turska (Tepe <i>et al.</i> , 2005; Aslan <i>et al.</i> , 2006; Bayir <i>et al.</i> , 2011) Makedonija (Kulevanova <i>et al.</i> , 2000)
Dejstvo i upotreba	za lečenje diabetes mellitus, diuretik, litagog, stomahik (Aslan <i>et al.</i> , 2006) poremećaji želuca i jetre (Kulevanova <i>et al.</i> , 2000) tretman urolitijaze (Bayir <i>et al.</i> , 2011)
Ispitivane aktivnosti	antioksidativna aktivnost <i>in vitro</i> (Tepe <i>et al.</i> , 2005; Albayarak <i>et al.</i> , 2010) hipoglukemijski potencijal antidijabetička i antioksidativna aktivnost <i>in vivo</i> (Aslan <i>et al.</i> , 2007) antiurolitijazna aktivnost <i>in vivo</i> (Bayir <i>et al.</i> , 2011)
Farmaceutski oblik	dekot, infuz

1.4. Ekstrakti: definicija, metode ekstrakcije, klasifikacija

Suvi ekstrakti su čvrsti biljni preparati dobijeni evaporacijom rastvarača, koji je upotrebljen za ekstrakciju. Suvi ekstrakti imaju gubitak sušenjem ili sadržaj vode ne više od 5 m/m %. Zbog svoje higroskopnosti, čuvaju se u hermetički zatvorenoj posudi, zaštićeno od svetlosti.

Proizvodnja ekstrakata

Ekstrakti se dobijaju nekom od sledećih metoda: maceracija, perkolacija ili nekim drugim prikladnim i validiranim postupkom. Kao rastvarači (ekstragensi) za ekstrakciju se koriste etanol, voda, propilenglikol i dr. Biljna droga pre ekstrakcije može podlegati nekom prethodnom tretmanu npr. inaktivaciji enzima, usitnjavanju ili odmašćivanju. Kod mekih i suvih ekstrakata, iz kojih se evaporacijom uklanja organski rastvarač, za izradu druge serije ekstrakta može se koristiti recikliran rastvarač. Reciklirani rastvarač mora odgovarati standardima koji važe za taj rastvarač pre ponovljene upotrebe.

Koncentrovanje ekstrakta do odgovarajuće konzistencije se vrši na pogodan način, načelno, pod sniženim pritiskom i pri temperaturi na kojoj je degradacija komponenata u sastavu ekstrakta svedena na minimum.

Pri izradi standardizovanih i kvantifikovanih ekstrakata, mogu se primeniti procedure prečišćavanja, koje povećavaju sadržaj komponenti do očekivane vrednosti i takvi ekstrakti se označavaju kao „rafinisani“ (European Pharmacopoeia, 7th edition, Jugoslovenska farmakopeja 2000).

Reperkolacija

Reperkolacija podrazumeva proces ponovne perkolacije biljnog materijala dobijenim perkولاتom. Neke farmakopeje propisuju reperkolaciju za izradu tečnih ekstrakata iz aromatičnih droga. Droga se podeli u nekoliko delova, obično u tri dela. Prvi deo droge se perkolira određenim ekstragensom i sakuplja jedan prethodni i jedan naknadni perkolat. Naknadnim perkولاتom se zatim preliiva drugi deo droge i ponovo se sakuplja drugi prethodni i naknadni perkolat. Naknadni perkolat, dobijen u drugoj ekstrakciji, koristi se za perkolaciju trećeg dela droge. Prvi, drugi i treći prethodni

perkolat se pomešaju i obrazuje se konačan perkolat, koji sadrži željenu koncentraciju aktivnih materija.

Klasifikacija biljnih ekstrakata

Evropska agencija za lekove (EMA) i Evropska Farmakopeja (European Pharmacopoeia, 7th edition, Ph.Jug V, EMEA/HMPC/CHMP/344/03, /HMPC/CHMP/CVMP/287539/2005) definiše sledeće tipove ekstrakata:

A Standardizovani ekstrakti – sadrže komponente (jednu ili više) koji su jedini odgovorni za dokazano i dokumentovano terapeutsko dejstvo (standardizovani suvi ekstrakt lista sene). Standardizacija se vrši na tačno određeni sadržaj jedne komponente ili na sadržaje više komponenti, pri čemu se koristi neka inertna supstanca, ili isti ekstrakt kao i onaj koji se standardizuje, ali različite koncentracije.

B1 Kvantifikovani ekstrakti – sadrže hemijski definisane komponente (jednu ili više) koje imaju značajne farmakološke karakteristike (aktivni markeri). Ove komponente verovatno doprinose kliničkoj efikasnosti, međutim, nije dokazano da su one glavnodelujuće komponente (ekstrakt ginka i kantariona). Podešavanje ekstrakta se vrši mešanjem različitih serija biljne droge pre ekstrakcije ili mešanjem različitih serija biljnog preparata, ali ne i upotrebom ekscipijenasa.

B2 Ostali ekstrakti - koji ne sadrže komponente za koje postoje podaci o određivanju ili o efikasnosti ili farmakološkom ili kliničkom značaju. U tom slučaju, hemijski definisane komponente (analitički markeri) bez poznatog terapeutskog dejstva, mogu se koristiti za potrebe kontrole (npr. suvi ekstrakt korena valerijane). Ovi ekstrakti se definišu preko podataka o proizvodnji (stanje biljne droge, rastvarač, uslovi ekstrakcije) i specifikacijom dobijenog ekstrakta.

U biljnim lekovima, aktivnom supstancom se smatra biljni preparat (ekstrakt) u celini.

1.5. Flavonoidi

Flavonoidi su fenolne supstance izolovane iz velikog broja biljaka i broje preko 8000 poznatih komponenti. Oni u biljkama imaju ulogu antioksidanasa, antimikrobnih supstanci, fotoreceptora, vizuelnih atraktanata i dr. Takođe, flavonoidi pokazuju mnoge biološke aktivnosti kao što su antialergenska, antiviralna, antiinflamatorna i vazodilatatorna aktivnost. Kao jedna od najznačajnijih aktivnosti flavonoida je antioksidativna aktivnost, usled njihove sposobnosti da redukuju slobodne radikalske formacije i odstrane slobodne radikale (Skakun *et al.*, 1988; Walle, 2004).

Biosinteza flavonoida je jedan segment sinteze sekundarnih metabolita, kao što su fenolne kiseline, lignini, lignani i stilbeni. Glavni prekursor sinteze flavonoida je fenilalanin. Smatra se da je, većina enzima koji učestvuju u biosintezi flavonoida, a koji su okarakterisani do sada, aktivna u enzimskom kompleksu lociranom u citosolu. Sintetisani flavonoidi se transportuju do različitih subcelularnih ili ekstracelularnih lokacija, dok se u vakuoli, obično, transportuju oni flavonoidi koji su uključeni u pigmentaciju.

Klase flavonoida su: flavonoli (kvercetin, kempferol, miricetin); flavoni (apigenin, luteolin); katehini; flavanoni (naringenin); antocijanidini i proantocijanidini. Flavonoidi mogu biti izdvojeni, kvantifikovani i identifikovani u jednom koraku i to metodom tečne hromatografije sa UV, masenim ili NMR detektorom. Flavonoidi se lako detektuju, zahvaljujući prisustvu fenil prstena, koji je odlična hromofora i koji je UV aktivan. Njihov UV spektar obezbeđuje informacije o strukturi, na osnovu kojih se određuje tip fenola.

Metoda tečne hromatografije se koristi za kvantitativno određivanje biljnih komponenti u hemotaksonomskim istraživanjima. Za svaku klasu flavonoida vrši se optimizacija stacionarne faze, rastvarača i gradijenta.

Izbor rastvarača za ekstrakciju je u funkciji tipa flavonoida. Polarnost rastvarača igra veoma veliku ulogu u ekstrakciji flavonoida. Manje polarni flavonoidi (izoflavoni, flavanoni, metilovani flavoni i flavonoli) se ekstrahuju hloroformom, dihlormetanom, dietiletom ili etilacetatom, dok flavonoidni glikozidi i polarniji aglikoni se ekstrahuju etanolom i mešavinom etanola i vode. Glikozidi su rastvorljivi u vodi, pa su za njihovu ekstrakciju pogodni vodeno-etanolni rastvori.

Metoda tečne hromatografije kuplovana sa masenom spektrometrijom je jedna od najvažnijih tehnika koja se zasniva na hromatografiji kao separacionoj metodi i masenoj spektrometriji kao alatu za molekularnu identifikaciju (Andersen *et al.*, 2006).

1.6. Metode ekstrakcije flavonoida iz *Helichrysum* vrsta

1.6.1. Metode ekstrakcije flavonoida iz *H. arenarium* (L.) Moench i *H. italicum* (Roth)

Prema raspoloživoj literaturi suvi ekstrakt peščarskog smilja, koji se koristi u proizvodnji biljnih lekova, može da se dobije metodom perkolacije biljne droge, na sobnoj temperaturi, ekstragensom 10% etanolom, uparavanjem i sušenjem dobijenog tečnog ekstrakta.

Poznato je dobijanje “Flamin”-a – suvog ekstrakta metodom perkolacije biljne droge, korišćenjem ekstragensa 50% etanola, uparavanjem dobijenog ekstrakta, iz koga se posle odvajanja smole, izdvajaju materije mešavinom etilacetat : etanol (9:1) i suše.

Razvijena je metoda istovremenog dobijanje ekstrakta smilja i Flamin-a u jednom tehnološkom postupku metodom cirkulacione ekstrakcije, ekstragensom zagrejanom vodom (70-80°C), brzinom 2000-2500 l/h, 55-65 min. Dobijeni ekstrakt se uparava do 25-35 l i meša sa 75-130 l koncentrovanog etanola, odstoji 1,5-2 h, dekantuje, uparava, razblažuje sa vodom, a zatim reekstrahuje višestepenom ekstrakcijom (dva do tri puta) etilacetatom ili mešavinom etilacetata i etanola 9:1. Uparavanjem etilacetatnog ekstrakta dobija se ekstrakt bogat flavonoidima tzv. Flamin. Uparavanjem vodene faze se dobija ekstrakt sa ostalim komponentama smilja (Salo *et al.*, 1978).

Proizvodnja ekstrakta od cvasti aromatične biljne droge *Helichrysum italicum*, koji se koristi za izradu biljnih lekova, a koji sadži, pre svega etarsko ulje i druge farmakološki aktivne komponente, zasniva se na procesu reperkolacije. Usitnjena biljna droga se ekstrahuje mešavinom organskog rastvarača i vode (najbolje 70% etanolom), metodom perkolacije (najbolje reperkolacije), pri odnosu droga : ekstragens 1:10 do 1:15, na sobnoj temperaturi. Dobijeni tečni ekstrakt se uparava na 50 °C, pri sniženom pritisku, dok ne upari organski rastvarač i delimično i voda, dok se ne dobije frakcija nerastvorljiva u vodi tzv. “ekstrakt nerastvorljiv u vodi”, koji sadži farmakološki

aktivne supstance. Zatim, "ekstrakt nerastvorljiv u vodi" se odvoji centrifugiranjem od "rastvorljivog vodenog ekstrakta", suši liofilizacijom i dobija suvi ekstrakt u kojem se određuje kafeil-hina derivati (iskazan kao hlorogenska) kiselina i koji imaju antiinflamatorno dejstvo (Bonanomi *et al.*, 2007).

1.6.2. Metode ekstrakcije flavonoida iz *H. plicatum* DC.

U raspoloživoj literaturi nisu opisani postupci dobijanja suvog ekstrakata radi izrade biljnih ili tradicionalnih biljnih lekova. U literaturi mogu da se nađu opisani jednostavni postupci ekstrakcije, u Soxhlet aparatu, uz upotrebu metanola i na 60 °C, dužina trajanja ekstrakcije 6 h (Tepe *et al.*, 2005; Albayarak *et al.*, 2010; Kolayli *et al.*, 2010), koji služe za hemijsku karakterizaciju biljne droge i ekstrakata.

Pokazalo se da u cilju identifikacije i određivanja flavonoida, prečišćavanje ekstrakta dovodi do bolje kvantifikacije hemijskih komponenti koja obuhvata sledeće faze: a) ekstrakcija upotrebom metanola ili mešavine etanol : voda (7:3, v/v) b) uparavanje organskog rastvarača i reekstrakcija vodenog ekstrakta etilacetatom ili etrom c) uparavanje etilacetatnog ili etarskog ekstrakta dobija se suvi ekstrakt za kvantifikaciju. Ukoliko se, nakon rastvaranja suvog ekstrakta, primeni kiselina ili alkalna hidroliza, dobiju se aglikoni flavonoida, koji se ekstrahuju etilacetatom/etrom i kvantifikuju (Kulevanova *et al.*, 2000; Sroka *et al.*, 2004).

1.7. Preformulaciona i formulaciona istraživanja biljnih lekova

Pri formulaciji biljnih lekova polazi se od osnovnih preformulacionih i formulacionih ispitivanja, dopunjenih specifičnim ispitivanjima koja doprinose da se dobije kvalitetan, stabilan i bezbedan biljni lek (Sarfaraz, 2007). Kvalitet supstanci biljnog porekla zavisi od: geografskog porekla (od geografskog porekla mogu poticati mnoge varijacije u hemotipu), uslova gajenja i žetve, uslova sušenja, od hemijskog tretmana u toku gajenja (pesticidi, herbicidi) i posle žetve (fumiganti) i dr.

Preformulaciona istraživanja se izvode u cilju racionalne formulacije i proizvodnje biljnih preparata i lekova. Preformulaciona istraživanja suvih ekstrakata obuhvataju sledeće:

- izrada standardizovanog ekstrakta
- ispitivanja biljne droge
- priprema supstanci biljnog porekla za ekstrakciju
- odabir ekstragensa
- standardizacija ekstrakata
- organoleptičko ispitivanje ekstrakta
- veličina i oblik čestica suvih ekstrakata
- ispitivanje rastvorljivosti suvog ekstrakta
- mehaničke osobine suvog ekstrakta (protočnost i kompresibilnost)
- ispitivanje ekstrakata prema opštim monografijama za ekstrakte
- ispitivanje hemijskog profila ekstrakata
- praćenje stabilnosti dobijenog ekstrakta
- praćenje aktivnosti dobijenog ekstrakta
- efikasnost i bezbednost biljnog leka (sprovođenje kontrolisanih kliničkih studija)

Ispitivanja biljne droge obuhvataju sledeće:

- definicija droge,
- osobine (makroskopija i mikroskopija uzorka),
- testovi identifikacije (testovi koji su specifični samo za navedenu biljnu vrstu i obično su kombinacija hromatografskih i hemijskih metoda),
- prisustvo stranih primesa,
- sadržaj vlage ili gubitak sušenjem,
- ukupni pepeo,
- određivanje prisustva toksičnih metala,
- ispitivanje mikrobiološke čistoće, ispitivanje prisustva mikotoksina, herbicida, pesticida, fumiganata,
- Ispitivanje hemijskog profila biljne droge i određivanje aktivne komponente - ako je moguće primeniti metodu specifičnu samo za tu aktivnu komponentu.

Identifikacija biljne droge: s obzirom na široku primenu tankoslojne hromatografije (TLC) u različitim oblastima, ali i nedostataka koji su se pre svega odnosili na primenu isključivo u kvalitativnoj analizi, razvijena je visoko efikasna tankoslojna hromatografija (HPTLC). Prednosti HPTLC u odnosu na TLC su preciznije

nanošenje uzoraka, bolje razdvajanje, kraće vreme trajanja analize i mogućnost kvantitativne analize više uzoraka odjednom. Primenom denzitometrije sada je moguće razvijenu hromatografsku ploču obraditi i prevesti u odgovarajuću krivu tako da se može uraditi integracija dobijenih zona preko površine ispod pikova ili visine pikova. Određivanje sadržaja traženog jedinjenja uglavnom se radi pomoću eksternog standarda uz kalibracionu krivu (Lesli, 2002). Ova metoda, u poslednje vreme, ima značajnu primenu u ispitivanju kako biljnih droga, tako i biljnih preparata.

Ispitivanje hemijskog profila biljne droge: kod biljnih droga koje sadrže komponente (jednu ili više) za koje je dokazano i dokumentovano da su odgovorne za terapeutsko dejstvo u biljnim ekstraktima, kvantitativno se određuju te komponente. Kod biljnih droga koje sadrže poznate sastojke sa značajnim farmakološkim karakteristikama i za koje se smatra da doprinose terapijskom dejstvu tzv. aktivne markere, kvantifikuju se ti tzv. aktivni markeri. U biljnim drogama koje ne sadrže komponente za koje postoje podaci o određivanju ili o efikasnosti ili farmakološkom ili kliničkom značaju, pronalaze se i ispituju tzv. analitički markeri i neophodne su studije kojima se ispituje uticaj markiranih supstanci na terapeutsko dejstvo.

Priprema supstanci biljnog porekla za ekstrakciju

Supstanca biljnog porekla, koja ulazi u proces ekstrakcije mora biti na adekvatan način prerađena tj. prečišćena, usitnjena do određenog stepena usitnjenosti, u praksi se najčešće koristi frakcija 0,75 do 2 mm. Kvalitet ekstrakta značajno zavisi od stepena usitnjenosti droge, koji se obavezno proverava pre ekstrakcije.

Odabir ekstragensa se vrši na osnovu hemijskog sastava jedne ili grupe komponenata koje se ekstrahuju. Najčešće se koriste sledeći rastvarači: etanol, voda, mešavina etanola i vode u različitim odnosima, mešavina propilen-glikola i vode i dr.

Preformulaciona istraživanja služe da bi se ispitale fizičko-hemijske osobine aktivnih komponenata, u ovom slučaju supstanci biljnog porekla i biljnih preparata koji su osnova za izradu biljnih lekova. Dobijeni rezultati služe za sledeću fazu, fazu formulacije, u kojoj se biraju pomoćne supstance, metod izrade i metode praćenja kvaliteta dobijenog leka.

Prilikom formulacije farmaceutskog preparata, kao i pri izvođenju same proizvodnje istog, neophodno je poznavati fizičke, hemijske i biološke osobine komponenti i parametre svake proizvodne faze, koji će zajedno rezultirati zadovoljavajućim proizvodom. Racionalan pristup u selekciji ekscipijensa i određivanje grupe uslova u kojima se odvija proizvodnja, rezultuje optimalnim izvođenjem proizvodnje. Tehnike eksperimentalnog dizajna (DoEs) se primenjuju u optimizaciji formulacije i procesa proizvodnje i predstavljaju veoma efikasno sredstvo za identifikaciju i proučavanje efekata faktora i njihove interakcije na karakteristike proizvoda. Definisanjem pravila koja ukazuju kako se karakteristika proizvoda menja u zavisnosti od promene procesnih promenljivih, može se izabrati prosek koji je u predelu optimuma (Gibson, 2012).

1.8. Biofarmaceutska karakterizacija biljnih lekova

Nasuprot hemijski definisanim lekovitim proizvodima, o biofarmaceutskom kvalitetu i ponašanju biljnih lekova često, nema dovoljno podataka. U većini slučajeva, *in vitro/in vivo* biofarmaceutska karakterizacija je komplikovana kompleksnim sastavom proizvoda na bazi bilja, složenim metabolizmom njihovih sastojaka i problemima u analitici (EMA/HMPWP/344/03, 2003). Principi biofarmaceutske karakterizacije biljnih lekova moraju biti u skladu sa kvalitetom biljnih lekova, sa specifikacijama o procedurama ispitivanja i prihvatljivim kriterijumima za supstance biljnog porekla, biljne preparate i biljne lekove i u skladu sa ispitivanjem bioraspoloživosti i bioekvivalencije generičkih lekova. Biljni lekovi mogu pokazati velike razlike u odnosu na upotrebljene ekstrakte, dozirani oblik i jačinu i zato je jako značajna biofarmaceutska karakterizacija i bioekvivalencija ovih lekova. Za biofarmaceutsku klasifikaciju biljnih lekova (BCS) trenutnog dejstva, od presudnog značaja je *rastvorljivost* kompletnog ekstrakta (tip B2), „aktivnih markera“ (tip B1) ili komponenti sa poznatim terapijskim dejstvom (tip A) i *gastrointestinalna permeabilnost*. BCS pomaže da se izaberu biofarmaceutski najbolji markeri. Takođe, daju informaciju da li može biti primenjeno *in vitro* poređenje dva proizvoda u cilju procene moguće terapijske razlike. Biljni proizvodi koji sadrže markere I i III klase BCS, mogu se porediti koristeći ispitivanje rastvorljivosti markera iz lekovitog oblika i na njih se mogu primeniti tzv. kriterijumi za oslobađanje proizvoda od ispitivanja BR/BE (biowaiver kriterijum). Ukoliko biljni

proizvodi sadrže markere II i IV grupe, biowaiver kriterijum se ne može primeniti i treba sprovesti *in vivo* testove. Za ekstrakte A kategorije (sa aktivnom komponentom poznatog terapijskog dejstva), principi BSC mogu lako biti primenjeni kako na lekovitim supstancama, tako i njihovim proizvodima, da bi se uspostavila bioekvivalencija između gotovih proizvoda. Međutim, za kategorije ekstrakata B1 i B2, BSC klasifikacija je ograničena izborom markera i izborom odgovarajućih performansi testova (Blume *et al.*, 2000; EMEA/HMPWP/344/03, 2003; Parojčić *et al.*, 2006; Waldmann *et al.*, 2012).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Predložena tema doktorske disertacije je u skladu sa aktuelnim pravcima istraživanja u formulaciji biljnih lekova. Opšti cilj ovog istraživanja je utvrđivanje potencijalnih glavnodelujućih komponenti ili aktivnih markera odabranih ekstrakata cvasti smilja *Helichrysi flos* (biološki izvor *Helichrysum plicatum* DC), kao i mogućnost primene *Helichrysum plicatum* DC. bilo kao zamene za oficinalnu *Helichrysum arenarium* (L.) Moench, bilo kao potencijalno novu biljnu lekovitu sirovinu i stvaranje osnova za njenu racionalnu fitoterapijsku primenu.

Pojedinačni ciljevi istraživanja obuhvataju:

- I. Usporedna botanička i fitohemijska karakterizacija biljnih vrsta *H. plicatum* i *H. arenarium*
- II. Optimizacija procesa ekstrakcije, u zavisnosti od primenjenih preformulacionih i formulacionih parametara, u cilju:
 - a. dobijanja većeg prinosa ekstrakta,
 - b. dobijanja većeg sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja
 - c. dobijanja većeg sadržaja pojedinačnih flavonoida: naringenina, apigenina, kempferola
- III. Karakterizacija dobijenih ekstrakata sa posebnim osvrtom na polifenolne komponente (naringenin, apigenin i kempferol)
- IV. Ispitati antioksidativnu, citotoksičnu, spazmolitičku i antimikrobnu aktivnost odabranih ekstrakata cvasti smilja *Helichrysi flos* (biološki izvor *Helichrysum plicatum* DC)
- V. Uspostaviti korelaciju između hemijskog sastava i ispoljenih farmakoloških aktivnosti suvih ekstrakata u cilju utvrđivanja aktivnih komponenti ili aktivnih markera odgovornih za delovanje.

3. MATERIJAL I METODE ISTRAŽIVANJA

3.1. Biljni materijal

Biljni materijal čine cvetne glavice smilja *Helichrysum plicatum* DC. subsp. *plicatum* (u daljem tekstu *H. flos* (biološki izvor *H. plicatum* DC.)), sakupljene pre otvaranja, prirodno sušene. Biljni materijal je kupljen od firme Agroherbal, Tirana, Albanija, u julu 2007. godine.

3.2. Metode preformulacionih ispitivanja biljne droge i ekstrakata *Helichrysi flos* (biološki izvor *Helichrysum plicatum* DC.)

3.2.1. Ispitivanje biljne droge

Definicija:

Supstance biljnog porekla jesu sve biljke u celini ili delovima, u neprerađenom, suvom ili svežem stanju, kao i određeni eksudati koji nisu podvrgnuti specifičnim postupcima prerade (Zakon o lekovima i medicinskim sredstvima br. 30/2010. i 107/2012.). Termin „biljne droge“ je sinonim za termin „supstance biljnog porekla“ koji se koristi u legislativi Evropske Unije za biljne lekove (Ph. Eur. 7.0).

Biljna droga je, kako to zahteva Ph. Eur. 7.0, precizno definisana pomoću botaničkog naučnog imena, u skladu sa binarnom nomenklaturom (rod, vrsta i autor) (Flora Europea 2006.)

Identifikacija:

Biljna droga je identifikovana na osnovu makroskopskog opisa cvasti, koji je dat u Flora Europea 2006. i Stevanović (1999).

Strane primese:

Strane primese se određuju u biljnoj drogi pre pripreme za proces ekstrakcije, prema metodi koju propisuje Ph.Eur.6.0.(2.8.2.)

Princip:

Biljne droge ne smeju da sadrže plesni (mikroorganizme), insekte i druga onečišćenja životinjskog porekla. Pod stranim primesama se podrazumevaju: delovi iste biljke koji u opisu droge nisu propisani i delovi drugih biljaka ili materije mineralnog porekla.

Metoda:

Odmereno je 100 g ispitivane droge i postavljena je u tankom sloju. Biljna droga je pregledana golim okom uz korišćenje lupe (uvećanje 6 x). Strane primese koje su odvajane sa strane su: onečišćenja životinjskog porekla, mineralne primese, ostaci cvetonosnih korpica, cvasti sa ostatkom stabla dužim od 1 cm i prisustvo usitnjenih čestica, koje prolaze kroz sito otvora 2 mm. Strane primese su izdvojene, izmerene i izračunat njihov procentualni udeo u biljnoj drogi.

Monografija ГФСССР XI za drogu *H. flores* (biološki izvor *H. arenarium*) ima poseban zahtev da se određuje prisustvo usitnjenih čestica, koje prolaze kroz sito otvora 2 mm i njihov udeo ne sme biti veći od 5 %.

Metoda:

Odmereno je 100 g ispitivane droge i prosejano kroz sito promera otvora 2 mm, izmereno i izračunat njihov procentualni udeo u biljnoj drogi.

Gubitak sušenjem

Aparat: Gubitak sušenjem biljne droge određen je na aparatu: IR vlagomer Denver Instruments.

Metoda: Odmereno je oko 0,5g biljne droge, preneseno u aluminijumske posudice i zagrevano na temperaturi od 103°C do 105°C, do konstantne mase. Gubitak sušenjem je određen iz razlike mase nesusene i sušene biljne droge i izraženo u procentima (%).

Sadržaj pepela

Aparat: Sušnica „Instrumentaria“, Peć za žarenje „Elektron“

Metoda: Za određivanje sadržaja pepela u biljnoj drogi korišćena je metoda opisana u Ph.Eur. 7.0. (2.4.16.). Porcelanski lončić za žarenje je zagrevan do crvenog usijanja 30 min, ostavljen da se ohladi u eksikatoru i zatim odmeren. U lončiću je ravnomerno raspoređeno 1,0 g sprasene biljne droge. Sušeno je na 100°C do 105°C u toku 1 h, a zatim žareno do konstantne mase u peći za žarenje na 600°C ± 25°C, pri čemu je lončić ohladjen u eksikatoru posle žarenja.

3.2.2. Priprema za ekstrakciju i ispitivanje stepena usitnjenosti biljne droge

Oprema: Za pripremu biljne droge za ekstrakciju korišćen je Univerzalni mlin UMČ-20, „Biljotehnika“. Za mlevenje korišćena su sita sa okruglim otvorima promera 8 i 5 mm. Dobijene čestice su sejane kroz industrijski sistem sita 2/0,71 mm (gornje sito 2 mm i donje sito 0,71) i industrijski sistem sita 0,71/0,30 mm (gornje sito 0,71 mm i donje sito 0,30).

Postupak: 6 kg biljne droge *H. flos* je homogenizovano i podeljeno u četiri dela po 1,5 kg. Primenjena su četiri različita načina (a-d) pripreme biljne droge za ekstrakciju.

- a. **Prvi deo biljne droge** je samleven u mlinu, korišćenjem sita promera otvora 8 mm, prosejan kroz sistem sita 2/0,71 mm i sakupljena je frakcija biljne droge koja je prošla kroz sito 2 mm, a ostala na situ 0,71 mm.
- b. **Drugi deo biljne droge** je samleven u mlinu, korišćenjem sita promera otvora 8 mm, prosejan kroz sistem sita 0,71/0,30 mm i sakupljena je frakcija biljne droge koja je prošla kroz sito 0,71 mm, a ostala na situ 0,30 mm.
- c. **Treći deo biljne droge** je samleven u mlinu, korišćenjem sita promera otvora 5 mm, prosejan kroz sistem sita 2/0,71 mm i sakupljena je frakcija biljne droge koja je prošla kroz sito 2 mm, a ostala na situ 0,71 mm.
- d. **Četvrti deo biljne droge** je samleven u mlinu, korišćenjem sita promera otvora 5 mm, prosejan kroz sistem sita 0,71/0,30 i sakupljena je frakcija biljne droge koja je prošla kroz sito 0,71 mm, a ostala na situ 0,30 mm.

Ispitivanje stepena usitnjenosti dobijenih uzoraka biljne droge vršeno je primenom set sita koje propisuje Ph. Eur. 6.0.

Metoda: Izmereno je 100 g biljne droge, prosejano kroz sistem sita (2000 µm, 710 µm, 355 µm) u trajanju od 10 minuta. Nakon sejanja, izmerene su frakcije droge koje su

zaostale na svakom situ i izračunat je procenat u odnosu na ukupnu masu koja je ispitana. Na ovaj način dobijeno je četiri frakcije čestica: frakcija > 2000 µm, frakcija 2000 - 710 µm, frakcija 710 - 355 µm i frakcija < 355 µm. Rezultati ispitivanja stepena usitnjenosti su prikazani kao frakcije određene veličine čestica i njihov procentualni udeo u ukupnoj masi uzorka (m/m).

3.2.3. Uticaj formulacionih i tehnoloških parametara na suvi ostatak u tečnom ekstraktu (1:1) ili na prinos suvog ekstrakta

3.2.3.1. Uticaj odnosa droga : ekstragens na suvi ostatak u tečnom ekstraktu (1:1)

Aparatura: tri staklena perkolatora

Uslovi izvođenja: uslovi izvođenja ekstrakcije dati su u tabeli 3.1 (ekstrakt „0“ i „00“)

Protokol ekstrakcije: 150g biljne droge *H. flos* (biološki izvor *H. plicatum* DC), pripremljene za ekstrakciju, podeljeno u tri jednaka dela (po 50g).

Tabela 3.1 Uslovi izvođenja procesa ekstrakcije radi ispitivanja uticaja odnosa droga : ekstragens na suvi ostatak u tečnom ekstraktu *H. flos* (biološki izvor *H. plicatum* DC.) (1:1)

Protokol ekstrakcije	Ekstrakt „0“	Ekstrakt „00“	Određivanje
Stepen usitnjenosti droge	2000	<i>In toto</i>	
Ekstragens (etanol, v/v)	50%	50%	suvi ostatak u tečnom ekstraktu (%)
Odnos droga : ekstragens (m:m)	1:14	1:5	
Način proticanja ekstragensa	maceracija droge 24h		

I perkolator:

Postupak P-I-A:

Prvi deo droge (50g) prelišen dovoljnom količinom ekstragensa da bude ravnomerno i potpuno vlažna, upakovana je u perkolator i dodato je dovoljno ekstragensa da zasiti usitnjenu drogu i obrazuje sloj iznad nje. Kada je tečnost počela da

ističe iz perkolatora, perkolator je zatvoren, maceriranje droge je trajalo 24h, a zatim je perkolat pušten da polako ističe. Odvojeno je i sačuvano prvih 50g perkolata kao primarni ekstrakt. Nastavljen je proces sakupljanja ekstrakta iz perkolatora, koji se koristio kao ekstragens za nalivanje drugog perkolatora.

Postupak P-I-B₁:

Droga u perkolatoru je ponovo nalivena svežim ekstragensom, perkolator je otvoren i perkolat je bez zadržavanja prošao kroz drogu i korišćen je kao ekstragens za II perkolator.

II perkolator:

Postupak P-II-A:

Preleven je drugi deo usitnjene droge (50g) količinom perkolata sakupljenog u prethodnim operacijama, tako da je droga bila ravnomerno i potpuno vlažna. Maceracija droge u perkolatoru je trajala (24h) i perkolirana je kao prvi deo droge. Sakupljeno je prvih 50g perkolata i priključeno primarnom ekstraktu iz prethodne faze. Nastavljen je proces sakupljanja perkolata koji se koristio kao ekstragens za nalivanje droge u III perkolatoru.

Postupak P-II-B₁:

Droga u perkolatoru je ponovo nalivena svežim ekstragensom, perkolator je otvoren i perkolat je bez zadržavanja prošao kroz drogu i korišćen je kao ekstragens za II perkolator.

III perkolator:

Preleven je treći deo usitnjene droge (50g) količinom perkolata, prikupljenih u prethodnom procesu, tako da droga bude ravnomerno i potpuno vlažna. Tako vlažna droga je upakovana u cilindrični perkolator, macerirana i perkolirana kao prethodni delovi droge. Porcije perkolata iz prethodne operacije, korišćene su kao ekstragens po redosledu po kojem su prikupljene i kada to nije bilo dovoljno, nastavljeno je sa dodatkom rastvarača koji je prošao kroz II perkolator (bez maceracije) i korišćen kao ekstragens za III perkolator. Sakupljenih 50g perkolata koji ističe iz III perkolatora,

pomešano sa primarnim ekstraktom iz prethodnih operacija i dobijeno ukupno 150g tečnog ekstrakta *H. flos* (biološki izvor *H. plicatum* DC.) (1:1). Perkolat koji je nastavio da ističe, sakupljan je pod nazivom „ostatak“ od ekstrakcije i u njemu je određivan suvi ostatak (%).

3.2.3.2. Uticaj načina proticanja ekstragensa kroz drogu na suvi ostatak u tečnom ekstraktu (1:1)

Aparatura: tri staklena perkolatora

Uslovi izvođenja: uslovi izvođenja ekstrakcije dati su u tabeli 3.2 (ekstrakt „000“ i „R“)

Protokol ekstrakcije: 150g biljne droge *H. flos* (biološki izvor *H. plicatum* DC), pripremljene za ekstrakciju, podeljeno u tri jednaka dela (po 50g).

Tabela 3.2 Uslovi izvođenja procesa ekstrakcije radi ispitivanja uticaja načina proticanja ekstragensa kroz stub droge na suvi ostatak u tečnom ekstraktu *H. flos* (biološki izvor *H. plicatum* DC.) (1:1)

Protokol ekstrakcije	Ekstrakt „000“	Ekstrakt „R“	Određivanje
Stepen usitnjenosti droge	2000	2000	
Ekstragens (etanol, v/v)	50%	50%	suvi ostatak u tečnom ekstraktu (%)
Odnos droga : ekstragens (m:m)	1:6	1:5	
Način proticanja ekstragensa	maceracija (24h +2h)		

I perkolator:

Postupak P-I-A:

Prvi deo droge (50g) prelišen dovoljnom količinom ekstragensa da bude ravnomerno i potpuno vlažna, upakovana je u perkolator i dodato dovoljno ekstragensa da zasiti usitnjenu drogu i obrazuje sloj iznad nje. Kada je tečnost počela da ističe iz perkolatora, perkolator je zatvoren, maceriranje droge je trajalo 24h, a zatim je perkolat pušten da polako ističe. Odvojeno je i sačuvano prvih 50g perkolata kao primarni ekstrakt. Nastavljen je proces sakupljanja ekstrakta iz perkolatora, koji se koristio za nalivanje drugog perkolatora.

Postupak P-I-B₂:

Naliveno u prvi perkolator još svežeg ekstragensa da droga ogrezne i ostavljeno da se droga macerira 2h, perkolat ispušten iz perkolatora i takođe, korišćen kao ekstragens za drugi perkolator.

II perkolator:*Postupak P-II-A:*

Preleven drugi deo usitnjene droge (50g) količinom perkolata sakupljenog u prethodnim operacijama, tako da je droga bila ravnomerno i potpuno vlažna. Maceracija droge u perkolatoru je trajala (24h) i perkolirana je kao prvi deo droge. Sakupljeno je prvih 50g perkolata i priključeno primarnom ekstraktu iz prethodne faze. Nastavljen je proces sakupljanja perkolata koji se koristio kao ekstragens za nalivanje droge u III perkolatoru.

Postupak P-II-B₂:

Naliveno u prvi perkolator još svežeg ekstragensa da droga ogrezne i ostavljeno da se droga macerira 2h, perkolat ispušten iz perkolatora i takođe, korišćen kao ekstragens za drugi perkolator.

III perkolator:

Preleven je treći deo usitnjene droge (50g) količinom perkolata, prikupljenog u prethodnom procesu, tako da je droga bila ravnomerno i potpuno vlažna. Tako vlažna droga je upakovana u cilindrični perkolator, macerirana i perkolirana kao prethodni delovi droge. Porcije perkolata iz prethodne operacije, korišćene su kao ekstragens po redosledu po kojem su prikupljene i kada to nije bilo dovoljno, nastavljeno je sa dodatkom rastvarača koji je prošao kroz II perkolator i korišćen kao ekstragens za III perkolator. Sakupljenih 50g perkolata koji ističe iz III perkolatora, pomešano sa primarnim ekstraktom iz prethodnih operacija, i dobijeno ukupno 150g tečnog ekstrakta

H. flos (biološki izvor *H. plicatum* DC.) (1:1). Perkolat koji je nastavio da ističe, sakupljan je pod nazivom „ostatak“ od ekstrakcije i u njemu je određivan suvi ostatak.

3.2.3.3. Uticaj odnosa droga : rastvarač za re-ekstrakciju na prinos suvog ekstrakta

Aparati: tri staklena perkolatora, rotacioni vakuum uparivač - Büchi CH, centrifuga „Tehnica“, levak za odvajanje

Polazni ekstrakti:

Tečni ekstrakt „000“

Tečni ekstrakt „R“

Uslovi izvođenja re-ekstrakcije dati su u tabeli 3.3

Postupak re-ekstrakcije tečnog ekstrakta:

Ekstrakt, dobijen trostrukom perkolacijom, je uparavan na 80°C, pod sniženim pritiskom, u vakuum - uparivaču, dok nije odstranjen etanol. Upareni ekstrakt je ostavljen u frižideru 24 h na 8°C. Nakon toga, ekstrakt je centrifugiran na 3500 o/min 20 min i dekantovan bistar ekstrakt.

Dobijeni bistar ekstrakt reekstrahovan je mešavinom etilacetat : etanol u odnosu 9:1, izmučkavanjem u levku za odvajanje.

Uparavanje tečnog ekstrakta

Dobijeni prečišćeni ekstrakt je uparavan, na 60 °C pod sniženim pritiskom (u vakuum uparivaču) i dobijen je suvi ekstrakt. Prinos suvog ekstrakta je izražen kao masa suvog ekstrakta dobijena od 100g biljne droge, izražen kao % (m/m).

Tabela 3.3 Uslovi izvođenja procesa re-ekstrakcije radi ispitivanja uticaja odnosa droga : ekstragens za re-ekstrakciju na prinos suvog ekstrakta *H. flos* (biološki izvor *H. plicatum* DC.)

Protokol re-ekstrakcije	Ekstrakt „000“	Ekstrakt „R“	Određivanje
Odnos droga : ekstragens za re-ekstrakciju (m:m)	1:3	1:6	prinos suvog ekstrakta (%)

3.3. Metoda dobijanja suvog ekstrakta *Helichrysi flos* (biološki izvor *H. plicatum* DC.)

3.3.1. Metoda dobijanja ekstrakta

Aparatura: tri staklena perkolatora, rotacioni vakuum uparivač - Büchi CH, centrifuga „Tehnica”, levak za odvajanje

Nepromenljivi faktori u procesu ekstrakcije:

Postupak dobijanja tečnog ekstrakta: trostruka perkolacija (frakciona perkolacija)

Odnos droga : ekstragens = 1:5

Odnos droga : ekstragens za re-ekstrakciju = 1:6,8

Promenljivi faktori u procesu ekstrakcije:

Stepen usinjenosti droge: 710, 2000, *in toto* (neisitnjena biljna droga)

Ekstragens za ekstrakciju: etanola u različitim koncentracijama (40%, 50%, 60 %).

Rastvarač za re-ekstrakciju: mešavina etilacetata i etanola u različitim odnosima (5:5, 9:1 i 100:0 etilacetat : etanol)

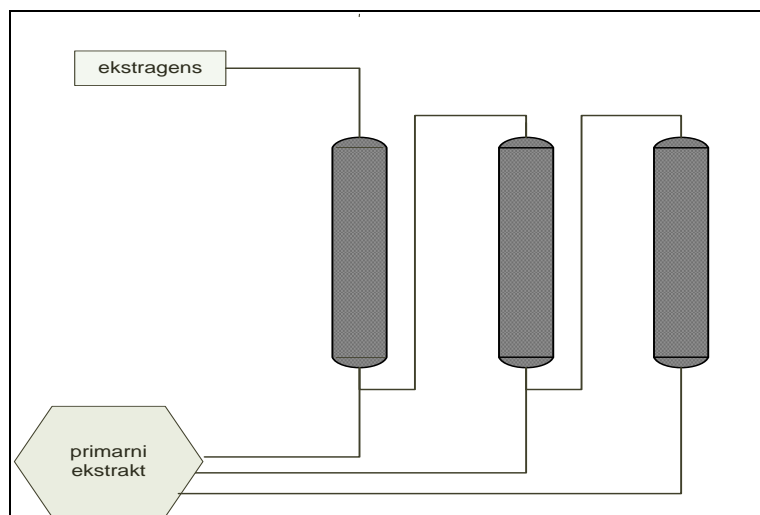
Kombinacija primenjenih promenljivih faktora i nivoa faktora u procesu izrade suvih ekstrakata (uzorci 1-15) prikazana je tabeli 3.4.

Tabela 3.4 Promenljivi faktori i nivoi faktora u procesu ekstrakcije i dobijanja ekstrakata *H. flos* (biološki izvor *H. plicatum* DC.) (uzorci 1-15)

Faktor	Promenljiva	Niži nivo	Srednji nivo	Viši nivo
Stepen usitnjenosti	A	710	2000	<i>in toto</i>
Vrsta ekstragensa (koncentracija etanola,(v/v,%))	B	40	50	60
Rastvarač za re-ekstrakciju etilacetat : etanol (v:v)	C	5:5	9:1	100 :0

Protokol ekstrakcije:

150g biljne droge *H. flos* (biološki izvor *H. plicatum* DC.), pripremljene za ekstrakciju, podeljeno u tri jednaka dela (po 50g) (Slika 3.1).



Slika 3.1. Šema trostruke perkolacije za izradu tečnog ekstrakta *H. flos* (biološki izvor *H. plicatum* DC.)

FAZA I (izrada tečnog ekstrakta)

I perkolator:

Postupak P-I-A:

Prvi deo droge (50g) prelivem dovoljnom količinom ekstragensa da bude ravnomerno i potpuno vlažna, upakovana je u perkolator i dodato je dovoljno ekstragensa da zasiti usitnjenu drogu i obrazuje sloj iznad nje. Kada je tečnost počela da ističe iz perkolatora, perkolator je zatvoren, maceriranje droge je trajalo 24h, a zatim je perkolat pušten da polako ističe. Odvojeno je i sačuvano prvih 50g perkolata kao primarni ekstrakt. Nastavljen je proces sakupljanja ekstrakta iz perkolatora, koji se koristio za nalivanje drugog perkolatora.

Postupak P-I-B₂:

Naliveno je u prvi perkolator još svežeg ekstragensa da droga ogrezne i ostavljeno da se droga macerira 2 h, perkolat ispušten iz perkolatora i takođe, korišćen kao ekstragens za drugi perkolator.

II perkolator:

Postupak P-II-A:

Preleven drugi deo usitnjene droge (50g) količinom perkolata sakupljenog u prethodnim operacijama, tako da je droga bila ravnomerno i potpuno vlažna. Maceracija droge u perkolatoru je trajala (24h) i perkolirana je kao prvi deo droge. Sakupljeno je prvih 50g perkolata i priključeno primarnom ekstraktu iz prethodne faze. Nastavljen je proces sakupljanja perkolata koji se koristio kao ekstragens za nalivanje droge u III perkolatoru.

Postupak P-II-B₂:

Droga u II perkolatoru je nalivena svežim ekstragensom, koji je samo prošao kroz drogu u I perkolatoru, macerirana 2h, pušten je perkolat da ističe i korišćen kao ekstragens za III perkolator.

III perkolator:

Preleven je treći deo usitnjene droge (50g) količinom perkolata, prikupljenih u prethodnom procesu, tako da droga bude ravnomerno i potpuno vlažna. Tako vlažna droga je upakovana u cilindrični perkolator, macerirana i perkolirana kao prethodni delovi droge. Porcije perkolata iz prethodne operacije, korišćene su kao ekstragens po redosledu po kojem su prikupljene i kada to nije bilo dovoljno, nastavljeno je sa dodatkom rastvarača koji je prošao kroz II perkolator (bez maceracije) i korišćen kao ekstragens za III perkolator. Sakupljenih 50g perkolata koji ističe iz III perkolatora, pomešano sa primarnim ekstraktom iz prethodnih operacija, i dobijeno ukupno 150g tečnog ekstrakta *H. flos* (biološki izvor *H. plicatum* DC.) (1:1). Ostatak perkolata iz III perkolatora, nakon izvršenih predviđenih ispitivanja primarnog ekstrakta i ostatka (suvi ostatak, procenat etanola), priključen je primarnom ekstraktu.

FAZA II (re-ekstrakcija tečnog ekstrakta)

Ekstrakt, dobijen trostrukom perkolacijom, je uparavan na 80 °C, pod sniženim pritiskom, u vakuum - uparivaču, dok nije odstranjen etanol. Upareni ekstrakt je

ostavljen u frižideru 24h na 8°C. Nakon toga, ekstrakt je centrifugiran na 3500 o/min 20 min i dekantovan bistar ekstrakt.

Dobijeni bistar ekstrakt re-ekstrahovan je ekstragensom za re-ekstrakciju, izmućkavanjem u levku za odvajanje.

FAZA III (uparavanje tečnog ekstrakta)

Dobijeni prečišćeni ekstrakt je uparavan, na 60°C pod sniženi pritiskom (u vakuum uparivaču) i dobijen je suvi ekstrakt.

3.3.2. Dizajn eksperimenta

Za dobijanje suvih ekstrakata (uzorci 1-15) primenjena je metoda ekstrakcije koja je opisana u odeljku 3.3.1. i promenljivi faktori u toku procesa ekstrakcije (opisani u tabeli 3.4) prema dizajnu eksperimenata datom u obliku kodiranih i realnih vrednosti (tabele 3.5 - 3.6).

Tabela 3.5 Promenljivi faktori i nivoi faktora u procesu ekstrakcije i dobijanja ekstrakata *H. flos* (biološki izvor *H. plicatum* DC.) (uzorci 1-15) u obliku kodiranih vrednosti

Broj uzorka	A	B	C
1	-1	-1	0
2	1	-1	0
3	-1	1	0
4	1	1	-1
5	-1	0	-1
6	1	0	-1
7	0	1	-1
8	0	-1	-1
9	0	0	-1
10	-1	0	0
11	0	0	0
12	-1	0	1
13	0	0	1
14	0	1	0
15	-1	1	-1

Tabela 3.6 Promenljivi faktori i nivoi faktora u procesu ekstrakcije i dobijanja ekstrakata *H. flos* (biološki izvor *H. plicatum* DC.) (uzorci 1-15) u obliku realnih vrednosti

Broj uzorka	Stepen usitnjenosti	Ekstragens (EtOH %)	Rastvarač za re-ekstrakciju (EtAc:EtOH)
1	710	40	9:1
2	<i>in toto</i>	40	9:1
3	710	60	9:1
4	<i>in toto</i>	60	5:5
5	710	50	5:5
6	<i>in toto</i>	50	5:5
7	2000	60	5 :5
8	2000	40	5:5
9	2000	50	5:5
10	710	50	9:1
11	2000	50	9:1
12	710	50	100 : 0
13	2000	50	100 : 0
14	2000	60	9:1
15	710	60	5:5

3.3.3. Određivanje suvog ostatka u tečnom ekstraktu

Aparat: IR vlagomer Denver Instruments

Metoda: Odmereno je oko 0,5 g tečnog ekstrakta, preneseno u aluminijumske posudice i zagrevano na temperaturi od 103°C – 105°C do konstantne mase. Suvi ostatak je određivan iz razlike mase ekstrakta pre i posle sušenja i izražen u procentima (%). Dobijeni rezultati predstavljaju srednju vrednost tri ponavljanja.

3.3.4. Određivanje procenta etanola u tečnom ekstraktu nakon destilacije

Aparat i pribor: piknometar, balon za destilaciju od 250 ml, T nastavak sa termometrom, Liebigov kondenzator, prihvatna lula, tikvica od 100 ml, stakleni levak, filter papir.

Hemikalije i rastvarači: prečišćena voda, talk

Postupak: 25 ml ekstrakta pomešano je u balonu za destilaciju sa 75 ml vode, dodato nekoliko staklenih kuglica i vršena je destilacija preko Liebigovog kondenzatora u

odmerenu tikvicu od 100 ml, sve dok ne predestiluje oko 75 ml. Destilat ohlađen do 20°C, dopunjeno vodom do oznake i bistrom destilatu je piknometrom određena relativna gustina.

Izračunavanje: U tabeli je za određenu relativnu gustinu, očitani odgovarajući sadržaji etanola. Množenjem te vrednosti sa 4 dobijen je procenat etanola u ekstraktu. Dobijeni rezultati predstavljaju srednju vrednost tri ponavljanja.

3.3.5. Optimizacije procesa ekstrakcije u cilju dobijanja većeg suvog ostatka/prinosa suvog ekstrakta

3.3.5.1. Optimizacija procesa tečne ekstrakcije u cilju dobijanja većeg suvog ostatka

Metoda: analiza uticaja varirajućih faktora na suvi ostatak u tečnom ekstraktu *H. flos* (biološki izvor *H. plicatum* DC.) radi se dvofaktorijalnom analizom varijanse.

Promenljivi faktori i nivoi: prikazani u tabeli 3.7

Matrica eksperimenta: prikazani u tabeli 3.8

Odgovor : suvi ostatak u tečnom ekstraktu (metoda opisana u odeljku 3.3.3.)

Tabela 3.7 Prikaz faktora i nivoa proizvedenih suvih ekstrakata *H. flos* (biološki izvor *H. plicatum* DC.) u vidu realnih vrednosti obuhvaćenih optimizacijom procesa ekstrakcije u cilju dobijanja većeg suvog ostatka(%) u tečnom ekstraktu

Faktor	Promenljiva	Niži nivo	Srednji nivo	Viši nivo
Stepen usitnjenosti	A	710	2000	<i>In toto</i>
Ekstragens (EtOH %)	B	40	50	60

Tabela 3.8 Prikaz faktora i nivoa proizvedenih suvih ekstrakata u vidu kodiranih i realnih vrednosti i praćenog odgovora - suvi ostatak (%) - obuhvaćenih optimizacijom procesa ekstrakcije u cilju dobijanja većeg suvog ostatka u tečnom ekstraktu

Broj eksperimenta	Broj uzorka*	A	B	Stepen usitnjenosti	Ekstragens (EtOH %)	Suvi ostatak(%)
1	5	-1	-1	710	50	
2	9	+1	-1	2000	50	
3	15	-1	+1	710	60	
4	7	+1	+1	2000	60	
5	10	-1	-1	710	50	
6	11	+1	-1	2000	50	
7	3	-1	+1	710	60	
8	14	+1	+1	2000	60	

*Broj uzorka označava broj uzorka ekstrakta iz tabele 3.6

3.3.5.2. Optimizacija procesa ekstrakcije u cilju dobijanja većeg prinosa suvog ekstrakta

Metoda: trofaktorijalni dizajn na dva nivoa - 2^3

Promenljivi faktori i nivoi: prikazani u tabeli 3.9

Matrica eksperimenta: prikazani u tabeli 3.10

Odgovor: prinos ekstrakta (%)

Tabela 3.9 Prikaz faktora i nivoa proizvedenih suvih ekstrakata *H. flos* (biološki izvor *H. plicatum* DC.) u vidu realnih vrednosti obuhvaćenih optimizacijom procesa ekstrakcije u cilju dobijanja većeg prinosa suvog ekstrakta (%)

Faktor	Promenljiva	Niži nivo	Viši nivo
Stepen usitnjenosti	A	710	2000
Ekstragens (EtOH %)	B	50	60
Rastvarač za re-ekstrakciju (EtAc:EtOH)	C	5:5	9:1

Tabela 3.10 Prikaz promenljivih faktora i nivoa u procesu ekstrakcije u vidu kodiranih i realnih vrednosti i praćenog odgovora – prinos ekstrakta (%) - obuhvaćenih optimizacijom procesa ekstrakcije u cilju dobijanja većeg prinosa suvog ekstrakta

Broj eksperimenta	Broj uzorka*	A	B	C	Stepen usitnjenosti	EtOH (%)	EtAc:EtOH (v:v)	Prinos ekstrakta (%)
1	5	-1	-1	-1	710	50	5:5	
2	9	+1	-1	-1	2000	50	5:5	
3	15	-1	+1	-1	710	60	5:5	
4	7	+1	+1	-1	2000	60	5:5	
5	10	-1	-1	+1	710	50	9:1	
6	11	+1	-1	+1	2000	50	9:1	
7	3	-1	+1	+1	710	60	9:1	
8	14	+1	+1	+1	2000	60	9:1	

*Broj uzorka označava broj uzorka ekstrakta iz tabele 3.6

3.4. Metode hemijske karakterizacije suvih ekstrakata *Helichrysi flos* (biološki izvor *H. plicatum* DC.)

3.4.1. HPTLC fingerprintna analiza glikozida i aglikona flavonoida droge/ekstrakta uz primenu standarda glikozida i aglikona

Aparat: visokoefikasna tankoslojna hromatografija (HPTLC) je rađena na aparatu Camag (Švajcarska) opremljenim sa Linomat 5 aplikatorom, ADC2 automatskom komorom za razvijanje ploče, Scanner 3 spektrodensitometrom i Reprostar 3 sistemom za dokumentaciju.

3.4.1.1. HPTLC fingerprintna analiza glikozida flavonoida droge/ekstrakta uz primenu standarda glikozida

Stacionarna faza: za analizu je korišćena TLC silika gel 60 F₂₅₄ aluminijumska ploča (Merk, Nemačka), dimenzije 20 cm x 10 cm.

Mobilna faza: ploče su razvijane u mobilnoj fazi etilacetat : mravlja kiselina : sirćetna kiselina : voda u odnosu 100:11:11:26 (v/v), u automatskoj komori koja je prethodno bila zasićena parama mobilne faze u trajanju od 10 minuta.

Priprema uzoraka: droga *H. flos* (biološki izvor *H. plicatum*) za analizu je pripremljena tako što je odmereno 500 mg osušenog cveta i ekstrahovano 50% etanolom na ultrazvučnom kupatilu u trajanju od 30 minuta. Suvi ekstrakt broj 1 (16 mg) je rastvoren u 5 ml metanola i tako pripremljen rastvor je korišćen za analizu.

Postupak: test rastvori su naneti na ploču u zapremini od 4 µl, dok su rastvori standarda naringenin-7-glukozida (konc. 1 mg/ml), kvercetin-3-glukozida (0,6 mg/ml), kempferol-3-glukozida (1 mg/ml), apigenin-7-glukozida (1 mg/ml) i hlorogenske kiseline (0,25 mg/ml) naneti u zapremini od 2 µl. Svi rastvori su naneti u vidu traka dužine 9 mm, na visini 8 mm od ivice ploče, pomoću šprica Hamilton (zapremine 100 µl). Ploča je razvijana do visine od 85 mm od ivice ploče.

Derivatizacioni reagens: nakon razvijanja, ploča je osušena na vazduhu. Pre prskanja sa prirodnim reaktivom ploča je zagrejana na 100°C 3 minuta, osušena u struji hladnog vazduha, a zatim prska polietilen glikolom (NP/PEG).

Detekcija hromatograma: vršena je na talasnoj dužini 366 nm, i slika hromatograma je dobijena pomoću softverski kontrolisane digitalne kamere.

3.4.1.2. HPTLC fingerprintna analiza aglikona flavonoida ekstrakta uz primenu standarda aglikona

Stacionarna faza: za analizu je korišćena TLC silika gel 60 F₂₅₄ aluminijska ploča (Merk, Nemačka), dimenzije 20 cm x 10 cm.

Mobilna faza: ploče su razvijane u mobilnoj fazi etilacetat : toluol 1:1 (v/v), u automatskoj komori koja je prethodno bila zasićena parama mobilne faze u trajanju od 10 minuta.

Priprema uzorka hidrolizovanog ekstrakta: odmereno 100 mg suvog ekstrakta smilja *H. flos* (biološki izvor: *H. plicatum*) i rastvoreno u 20 ml metanola u tikvici od 250 ml sa okruglim dnom i šlifom. U rastvor dodato 20 ml 5% (m/m) rastvora sulfatne kiseline i na vodenom kupatilu, uz vazdušni hladnjak, zagrevano 2h od momenta ključanja smeše. Ohlađeni rastvor se neutrališe sa 10% rastvorom natrijum bikarbonata do pH=7 (približno). Ovim je izvršena hidroliza flavonoida da bi se dobili aglikoni flavonoida. Zatim je rastvor uparavan na 50°C pod vakuumom, da upari metanol (na oko 1/3 od početne zapremine), a potom je u levku za odvajanje izvršena višekratna re-ekstrakcija dietiletom (3 x 50 ml). Etarski ekstrakti su pod vakuumom upareni do suva. Upareni ekstrakt (100 mg) je rastvoren u 10 ml metanola i tako pripremljen rastvor je korišćen za analizu.

Rastvori standarda: pripremljeni su rastvori apigenina (konc. 0,5 mg/ml), kempferola (1 mg/ml) i naringenina (1 mg/ml MeOH) u metanolu.

Postupak: test rastvor ekstrakta su naneti na ploču u zapremini od 5 µl (1), 2,5 µl (2) i 1 µl (3), dok su rastvori standarda apigenina, kempferola i naringenina naneti u zapremini od 2 µl. Svi rastvori su naneti u vidu traka dužine 8 mm, na visini 8 mm od ivice ploče, pomoću šprica Hamilton (zapremine 100 µl). Ploča je razvijana do visine od 80 mm od ivice ploče.

Derivatizacioni reagens: nakon razvijanja, ploča je osušena na vazduhu. Pre prskanja sa prirodnim reaktivom ploča je zagrejana na 100°C 3 minuta, osuši se u struji hladnog vazduha, a zatim prska polietilen glikolom (NP/PEG).

Detekcija hromatograma: vršena je na talasnoj dužini 366 nm, i slika hromatograma je dobijena pomoću softverski kontrolisane digitalne kamere.

3.4.2. Tentativna LC-UV-MS analiza biljne droge/ekstrakta

Aparatura: HPLC aparat (Agilent 1100 Series, Agilent Technologies) sa degaserom, autosamplerom, kolonom i DAD detektorom u kombinaciji sa 6210 Time-of-Flight LC/MS sistemom (Agilent Technologies).

Priprema uzorka droge za analizu: tačno odmerena količina (do 1,000g) usitnjenih suvih cvasti smilja, ekstrahovana je dva puta sa po 10 ml metanola, na ultrazvučnom kupatilu, u trajanju od 30 minuta. Dobijeni ekstrakt profiltriran u normalni sud od 25 ml i dopunjen do crte metanolom. Neposredno pred HPLC analizu, uzorak je filtriran pomoću teflonskih Millipor filtra tipa HV 0,45.

Priprema uzorka ekstrakta za analizu: tačno odmerena količina ekstrakta broj 1 (oko 100 mg) rastvorena u 10 ml metanola. Neposredno pred HPLC analizu, uzorak filtriran pomoću teflonskih Millipor filtra tipa HV 0,45.

Injekciona zapremina: 10 µL

Kolona: LiChrospher 100 RP18e, dimenzija 250 x 4,0 mm, veličina čestica 5 µm, temperatura kolone 25°C.

Mobilna faza: smesa rastvarača A (0,2% rastvor mravlje kiseline u vodi) i B (acetonitril) sa programiranim izokratnim i gradijentnim eluiranjem, koji je prikazan u Tabeli 3.11

Protok : 1,00 ml/min

Tabela 3.11 Program eluiranja mobilne faze u LC-UV-MS analizi droge i ekstrakta *H. flos* (biološki izvor *H. plicatum* DC.)

Vreme (minuti)	Faza A (ml)	Faza B (ml)
0,00	90	10
5,00	80	20
10,0	80	20
20,0	70	30
30,0	30	70
35,0	0	100
40,0	30	70
41,0	90	10
45,0	90	10

MSD uslovi: Negativno naelektrisani molekularni joni dobijeni su elektrosprej jonizacijom (ESI) na atmosferskom pritisku. Eluirana jedinjenja su mešana sa azotom u zagrejanom interfejsu, a polarnost je podešena na negativnu, sa sledećim vrednostima ES parametara: potencijal kapilare 4000 V; temperatura gasa 350°C; protok gasa za

sušenje 12 l/min; pritisak nebulajzera, 45 psig (310,26 Pa); napon fragmentora, 140 V, a mase su merene u opsegu 100-2500 m/z.

DAD detektor: detekcija signala u opsegu talasnih dužina 190-550 nm

Obrada podataka: korišćen je softver MassHunter Workstation. Identifikacija jedinjenja je izvršena na osnovu karakterističnog izgleda UV spektara, molekulske formule izračunate iz preciznih masa kvazimolekulskih jona u ESI masenim spektrima i retencionih vremena, koji su zatim upoređivani sa odgovarajućim podacima za standardna jedinjenja.

3.4.3. Određivanje sadržaja ukupnih fenola u suvim ekstraktima

Aparat: UV-VIS Spektrofotometar, model HP 8543

Metoda: Sadržaj ukupnih fenola u suvim ekstraktima je određivan spektrofotometrijski na bazi reakcije sa Folin-Ciocalteu reagensom (Singleton *et al.*, 1965) uz male modifikacije. U reakciji redukcije Folin-Ciocalteu reagensa fenolnim komponentama u alkalnoj sredini, razvija se plava boja i meri se absorbancija na 765 nm.

Priprema uzorka za analizu: 200 µl rastvora ekstrakta u metanolu odgovarajuće koncentracije je dodato u 1 ml razblaženog (1:10) Folin-Ciocalteu reagensa. Posle 4 min, dodato je 800 µl natrijum – karbonata (75 g/l). Nakon inkubacije 2 h na sobnoj temperaturi, merena je absorbancija na 765 nm. Za izradu kalibracione krive korišćena je galna kiselina (0-100 mg /l). Rezultati su izraženi kao mg ekvivalent galne kiseline na gram suvog ekstrakta (mg GAE/g suvog ekstrakta). Dobijeni rezultati predstavljaju srednju vrednost tri ponavljanja.

3.4.4. Određivanje sadržaja aglikona flavonoida naringenina, apigenina i kempferola, metodom tečne hromatografije

Aparat: Hewlett Packard 1090 sa DAD detektorom

Metoda: visokoefikasna tečna hromatografija sa UV detektorom (HPLC-UV)

Stacionarna faza: analitička kolona Lichrospher RP-18, dimenzija 250 x 4 mm, veličina čestica 5 µm (Agilent).

Mobilna faza: kao mobilna faza A korišćena je 1% H₃ PO₄ u vodi, a kao mobilna faza B i MeCN (B).

Uslovi izvođenja: injekciona zapremina uzorka je 10 µl, a eluiranje je vršeno gradijentom prema programu eluiranja datom u Tabeli 3.12. Brzina protoka je 1 ml/min, a UV apsorbancija je merena na 260 i 340 nm. Za kvantifikaciju su korišćene kalibracione krive pripremljene sa standardima: naringenin (čistoće 95%), apigenin (čistoće 95%) i kempferol (čistoće 96%), proizvođača Sigma. Dobijeni rezultati predstavljaju srednju vrednost tri određivanja.

Tabela 3.12 Program eluiranja mobilne faze u HPLC metodi za suvi ekstrakt *H. flos* (biološki izvor *H. plicatum* DC.)

Vreme (minuti)	Faza A (ml)	Faza B (ml)
0-5	90-80	10-20
5-10	80	20
10-20	80-70	20-30
20-30	70-30	30-70
30-35	30-0	70-100

Priprema uzorka nehidrolizovanog ekstrakta: suvi ekstrakt (20 mg) je rastvoren u 10 ml metanola i tako pripremljen rastvor je korišćen za analizu.

Priprema uzorka hidrolizovanog ekstrakta: odmereno 100 mg suvog ekstrakta smilja *H. flos* (biološki izvor *H. plicatum*) i rastvoreno u 20 ml metanola u tikvici od 250 ml sa okruglim dnom i šlifom. U rastvor dodato 20 ml 5% (m/m) rastvora sulfatne kiseline i na vodenom kupatilu, uz vazdušni hladnjak, zagrevano 2h od momenta ključanja smeše. Ohlađeni rastvor se neutrališe sa 10% rastvorom natrijum bikarbonata do pH=7 (približno). Ovim je izvršena hidroliza flavonoida da bi se dobili aglikoni flavonoida. Zatim je rastvor uparavan na 50°C pod vakuumom, da upari metanol (na oko 1/3 od početne zapremine), a potom je u levku za odvajanje izvršena višekratna re-ekstrakcija

dietiletrom p.a. (3 x 50 ml). Etarski ekstrakti su pod vakuumom upareni do suva. Upareni ekstrakt (20 mg) je rastvoren u 10 ml metanola i tako pripremljen rastvor je korišćen za analizu.

3.5. Optimizacija procesa ekstrakcije u cilju dobijanja većeg sadržaja ukupnih fenola i flavonoida u suvim ekstraktima *Helichrysi flos* (biološki izvor *H. plicatum* DC.)

3.5.1. Optimizacija procesa ekstrakcije u cilju dobijanja većeg sadržaja ukupnih fenola

Metoda: analiza uticaja varirajućih faktora na sadržaj ukupnih fenola u suvim ekstraktima, primenom trofaktorijalnog dizajna na dva nivoa - 2^3

Promenljivi faktori i nivoi: prikazani u tabeli br. 3.13

Matrica eksperimenta: prikazana u tabeli br. 3.10

Odgovor: sadržaj ukupnih fenola (mg GAE/g ekstrakta)

Tabela 3.13 Prikaz promenljivih faktora i nivoa u procesu ekstrakcije u vidu kodiranih i realnih vrednosti i praćenog odgovora - sadržaj ukupnih fenola (mg GAE/g) - obuhvaćenih optimizacijom procesa ekstrakcije u cilju dobijanja većeg sadržaja ukupnih fenola u suvim ekstraktima *H. flos* (biološki izvor *H. plicatum* DC.)

Broj eksperimenta	Broj uzorka*	A	B	C	Stepen usitnjenosti	EtOH %	EtAc:EtOH (v:v)	Sadržaj ukupnih fenola (mg GAE/g)
1	5	-1	-1	-1	710	50	5:5	
2	9	+1	-1	-1	2000	50	5:5	
3	15	-1	+1	-1	710	60	5:5	
4	7	+1	+1	-1	2000	60	5:5	
5	10	-1	-1	+1	710	50	9:1	
6	11	+1	-1	+1	2000	50	9:1	
7	3	-1	+1	+1	710	60	9:1	
8	15	+1	+1	+1	2000	60	9:1	

*Broj uzorka označava broj ekstrakta iz tabele 3.6

3.5.2. Optimizacija procesa ekstrakcije u cilju dobijanja većeg sadržaja flavonoida

Metoda: analiza uticaja varirajućih faktora na sadržaj aglikona flavonoida : naringenina, apigenina i kempferola, primenom trofaktorijalnog dizajna na dva nivoa - 2³

Promenljivi faktori i nivoi: prikazani u tabeli br. 3.9

Matrica eksperimenta: prikazani u tabeli br. 3.14

Odgovor: sadržaj aglikona flavonoida: naringenin, apigenin, kempferol (mg/g ekstrakta)

Tabela 3.14 Prikaz promenljivih faktora i nivoa u procesu ekstrakcije u vidu kodiranih i realnih vrednosti i praćenog odgovora - sadržaj aglikona flavonoida (mg/g) - obuhvaćenih optimizacijom procesa ekstrakcije u cilju dobijanja većeg sadržaja aglikona flavonoida (mg/g) u suvim ekstraktima *H. flos* (biološki izvor *H. plicatum* DC.)

Broj eksperimenta	Broj uzorka*	A	B	C	Stepen usitnjenosti	EtOH %	EtAc:EtOH (v:v)	Sadržaj aglikona flavonoida (mg/g)
1	5	-1	-1	-1	710	50	5:5	
2	9	+1	-1	-1	2000	50	5:5	
3	15	-1	+1	-1	710	60	5:5	
4	7	+1	+1	-1	2000	60	5:5	
5	10	-1	-1	+1	710	50	9:1	
6	11	+1	-1	+1	2000	50	9:1	
7	3	-1	+1	+1	710	60	9:1	
8	15	+1	+1	+1	2000	60	9:1	

*Broj uzorka označava broj ekstrakta iz tabele 3.6

3.6. Metode ispitivanja antioksidativne, citotoksične, spazmolitičke i antimikrobne aktivnosti suvih ekstrakata *H. flos* (biološki izvor *H. plicatum*).

3.6.1. Metoda ispitivanja antioksidativne aktivnosti

Aparat: UV-VIS Spektrofotometaru, model HP 8543

Metoda: Ispitivanje antioksidativne aktivnosti ekstrakata se bazira na sposobnosti izabranog ekstrakta da neutrališe stabilni 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radikal (antiradikalna aktivnost), u skladu sa opisanom procedurom (Silva *et al.*, 2005) koja je malo modifikovana. Antiradikalna aktivnost svakog ekstrakta je ispitivana upotrebom

serije razblaženih rastvora ekstrakata. Ekstrakti (100 μ l) su pomešani sa 1400 μ l 80 μ M rastvora DPPH u metanolu. Merena je absorbancija na 517 nm, posle 20 min. Procenat neutralizacije se izračunava upotrebom sledeće formule:

$$I = [(A_0 - A_i)/A_0] \times 100$$

gde je A_0 – absorbancija kontrole (slepe probe) i A_i je absorbancija uzorka.

Konstruisan je grafik zavisnosti procenta neutralizacije DPPH radikala od koncentracije ekstrakta.

Koncentracije ekstrakata koje neutrališu 50% DPPH radikala (EC_{50} vrednosti) su određene upotrebom algoritma nelinearne regresije. Dobijeni rezultati predstavljaju srednju vrednost tri ponavljanja. Kao pozitivna kontrola korišćen je Trolox (Hoffman – LaRoche). Trolox je hidrosolubilni analog vitamina E, koji ima antioksidativno dejstvo.

3.6.2. Metoda ispitivanja citotoksične aktivnosti

Aparat: ELISA čitač

Metoda: za određivanje ćelijskog preživljavanja primenjen je MTT test, koji predstavlja kolorimetrijski test kojim se meri redukcija tetrazolijumske soli (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid)(MTT), mitohondrijalnom sukcinat ehidrogenazom.

Ćelijske linije: kao ciljne ćelijske linije u našem radu korišćene su HeLa ćelije (ćelije humanog adenokarcinoma grlića materice), PC3 (ćelije raka prostate) kao i K562 ćelije, (ćelije humane mijeloidne leukemije).

Hranljiva podloga: za rast i održavanje HeLa i K562 ćelijskih linija korišćena je hranjiva podloga RPMI 1640 sa 10% inaktivisanim serumom govečeta (FBS), L-glutaminom, tako da finalna koncentracija bude 3 mM, zatim sa 100 IU/ml penicilina, 100 μ g/ml streptomocina i 25 mM Hepesa, pH je podešen bikarbonatnim puferom na 7.2. Ćelije adenokarcinoma grlića materice HeLa i kulture ćelija raka prostate PC3 su održavani kao jednoslojna kultura, a ćelije mijeloidne leukemije K562 u suspenziji kulture.

Priprema uzorka za ispitivanje: ispitivani suvi ekstrakti su najpre rastvoreni u dimetilsulfoksidu (DMSO) do štok koncentracije. Nakon toga se ekstrakti razblažuju u hranljivom medijumu do odgovarajućih radnih koncentracija. Finalne koncentracije ispitivanih ekstrakata, primenjene na ciljne maligne ćelije, bile su: 100, 50, 25, 12,5 i 6.25 µg/ml.

Tretman ćelijskih linija: u testovima za određivanje ćelijskog preživljavanja (MTT test) (Mosmann *et al.*, 1983) korišćene su mikrotitar ploče sa 96 bunarića (Nunc, Nalgene, Danska). Ćelije su ravnomerno zasejavane u odgovarajućoj gustini. Gustina HeLa ćelija je bila 2000 ćelija po bunariću u 100 µl podloge, gustina PC3 - 5000 ćelija po bunariću u 100 µl podloge i gustina K562 ćelija je bila 3000 ćelija po bunariću u 100µl podloge; kao slepa proba korišćen je hranjivi medijum. 24 časa nakon zasejavanja ćelija, u bunariće sa malignim ćelijama kao i u odgovarajuće slepe probe, dodato je po 50 µl pet različitih koncentracija ispitivanih ekstrakata, a na kontrolne ćelije i slepe probe, dodato je po 50 µl svežeg hranjivog medijuma. Izuzetno, kod K562 ćelija koje rastu u suspenziji, rastvori različitih koncentracija ekstrakata su dodavana 2 časa nakon sađenja u mikrotitar plejtove. Ćelije su inkubirane 72h u CO₂ inkubatoru na 37°C. Nakon inkubacije, u svaki bunarić je dodato po 20 µl MTT rastvora (5mg MTT/ml PBS), a 4h kasnije je dodato 100 µl rastvora 10% natrijum-dodecilsulfata (SDS) u 0,01 mol hlorovodonične kiseline (za rastvaranje kristala formazana u ćelijama). Intenzivna obojenost formazana koja se pri tom javlja, omogućuje korišćenje ove metode za citohemijsku kvantifikaciju broja metabolički aktivnih ćelija. Sledećeg dana, absorbancija je merena na 570 nm. Cisplatin je korišćen kao pozitivna kontrola.

Određivanje ćelijskog preživljavanja (MTT test): ćelijsko preživljavanje S (%) je izračunato korišćenjem sledeće jednačine:

$$S(\%) = (A_t - A_s) \times 100 / (A_k - A_s)$$

gde je,

A_s - absorbancija uzoraka sa slepom probom,

A_t - absorbancija uzoraka sa tretiranim ćelijama,

A_k - absorbancija uzoraka kontrolnih ćelija,

IC₅₀ koncentracija se definiše kao koncentracija supstance koja za 50% inhibiše ćelijsko preživljavanje u odnosu na netretiranu kontrolu.

Statistička analiza je izvršena koristeći statistički program Statistica, verzija 7.0. Koeficijenti korelacije (r) su izračunati linearnom regresionom analizom pri $p < 0.05$ nivoa značajnosti.

3.6.3. Metoda ispitivanja spazmolitičke aktivnosti

Aparat: Transducer–TSZ-04-E, Experimetria doo, Budimpešta, Mađarska

Metoda: za ispitivanje spazmolitičke aktivnosti odabranih ekstrakata *H. plicatum*, korišćeni su biološki testovi na tankom crevu pacova

Rastvori i lekovi: korišćen je Tyrodov rastvor u sledećem sastavu: 150 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 2,00 mM MgCl₂, 12 mM NaHCO₃, 0,4 mM NaH₂PO₄, 1,8 mM CaCl₂ i 5,5 mM glukoze. U biološkim testovima korišćene su sledeće supstance: acetilholin-hlorid (Sigma, USA), histamin-dihlorid (Sigma, USA), atropin-sulfat (Sigma, USA), papaverin-hidrohlorid (Merck, Germany), barijum-hlorid (Zorka, Šabac) i kalijum-hlorid (Zorka Šabac). Sve supstance su rastvarane u destilovanoj vodi.

Priprema uzorka: uzorak suvog ekstrakta *Helichrysi flos* (biološki izvor *H. plicatum* DC.), uzorak br. 11 (tabela 3.6) je rastvoren u etanolu (20 % m/m), a onda razblažen destilovanom vodom do odgovarajuće koncentracije.

Eksperimentalne životinje: ovo istraživanje je sprovedeno u skladu sa Direktivom Evropskog Saveta od 24. novembra, 1986 (86/609/EEC). Muški i ženski Wistar albino miševi (200-250g), starosti 3-4 meseca, su korišćeni posle 24 h posta i neograničenog pristupa vodi. Ileum je pripremljen i stavljen u 10 ml rastvora za tkiva, koji sadrži Tyrod-ov rastvor, na 37°C uz konstantno uvođenje ugljen dioksida (Radenkovic *et al.*, 2006). Preparati su ostavljeni 30 minuta. U eksperimentima je žrtvovano 30 pacova. Promena kontraktilnosti creva je zabeležena pomoću aparata Transducer-a, evidentirana i analizirana pomoću SPEL Advanced ISOSYS Data Acquisition System.

Protokol ispitivanja: u prvoj eksperimentalnoj seriji izolovano crevo pacova je tretirano ekstraktom u koncentraciji od 0,01-1 mg/ml. Kao kontrola korišćen je papaverin u koncentraciji 0,01-3 µg/ml. U drugoj seriji eksperimenata, izolovani delovi creva su kontrahovani rastvorom KCl (80 mM). Nakon dobijenih toničnih kontrakcija, ekstrakt

H. plicatum koncentracije 0,01-1 mg/ml je kumulativno dodat u intervalima od 15 min. U kontrolnoj seriji eksperimenata dodavan je papaverin u koncentraciji 0,01-3 µg/ml .

Radi razjašnjavanja potencijalnog mehanizma dejstva, kontrakcije ileuma su izazivane kumulativnim dodavanjem acetilholina (5-1500 nM), histamina (1-300 nM) i barijum-hlorida (3-900 µM), a zatim su efekti acetilholina (5-1500 nM), histamina (1-300 nM) i barijum-hlorida (3-900 µM) registrovani u prisustvu navedenog ekstrakta (0,03-0,3 mg/ml).

Statistička analiza: srednja vrednost i standardna devijacija je računata za svaku grupu rezultata ($n = 6$ za svaki set eksperimenata) i značajnost razlike između srednjih vrednosti je određivana Student- t testom. Verovatnoća $p < 0.05$ ili manja je pokazatelj značajnosti. Vrednost EC_{50} (koncentracija supstance koja izaziva 50% od maksimalnog odgovora) je izračunata regresionom analizom.

3.6.4. Metoda ispitivanja antimikrobne aktivnosti

Metoda: za ispitivanje antimikrobne i antifungalne aktivnosti ekstrakta korišćena je mikrodiluciona metoda na mikrotitracionim pločama, 96-sistem (Hanel *et al.*, 1988; Daouk *et al.*, 1995; NCCLS, 1997).

Antimikrobna aktivnost ekstrakta smilja *Helichrysi flos* (biološki izvor *H. plicatum* DC.), ispitivana je na Gram-pozitivnim i Gram-negativnim bakterijama (kolekcija ATCC) sojeva, kvascima, kao i na gljivama izolovanim i identifikovanim sa biljnih droga.

Ispitivanje je sprovedeno na sledećim Gram pozitivnim bakterija :

Bacillus subtilis (ATCC 10907)

Staphylococcus aureus (ATCC 29213)

Micrococcus luteus (ATCC 10240)

Micrococcus flavus (ATCC 14452)

Listeria monocytogenes (ATCC 19117)

Ispitivanje je sprovedeno na sledećim Gram negativnim bakterijama:

Escherichia coli (ATCC 35210)

Salmonella typhimurium (ATCC 13311)

Salmonella enteritidis (ATCC 13076)

Pseudomonas aeruginosa (ATCC 27853)

Proteus mirabilis (ATCC 29906)

Enterobacter cloacae (ATCC 13883)

Od kvasaca je testiran *Candida albicans* (ATCC 10231).

Ispitivanje je sprovedeno na sledećim gljivama:

Fusarium solani

Fusarium subglutinans

Fusarium equiseti

Fusarium verticillioides

Curvularia lunata

Aspergillus flavus

Chaetomium sp.

Alternaria alternata

Penicillium sp.

Mikroorganizmi su nabavljeni iz Mikološke laboratorije, Odseka za biljnu fiziologiju Instituta za biološka istraživanja "Siniša Stanković" u Beogradu. Određivanje minimalnih inhibitornih koncentracija (MIC) vršeno je dodavanjem različitih, rastućih, zapremine ekstrakta smilja u odgovarajući tečni medijum (Muller-Hinton bujon za bakterije i Tryptic bile Soy bujon za gljive). Za svaku koncentraciju rađeno je po dve kolone, u pet ponavljanja. Ekstrakt smilja *Helichrysi flos* (biološki izvor *H. plicatum* DC.), uzorak br. 11 (tabela 3.6), rastvaran je u dimetilsulfoksidu u koncentraciji 1 mg/ml. Odatle su u bunare mikrotitracionih ploča dodavane rastuće zapremine ekstrakta od 5 µl po bunaru do 55 µl po bunaru, što odgovara koncentraciji ekstrakta od 0,005 mg/ml do 0,055 mg/ml.

Na kraju je dodavano po 10 µl bakterijskog inokuluma u svaki bunar sa podlogom i ekastraktom. Za gljive je određen volumen suspenzije sa inokulumom, za svaku gljivu drugačiji, tako da konačna koncentracija bude $1,0 \times 10^5$ CFU/ml medijuma (metoda je opisana ispod).

Na pločama sa bakterijama u svaki bunar dodavano je 10 µl resazurin indikatora (270 mg tableta/40 µl sterilne vode). Mikroploče inkubirane su na 37°C za bakterije u trajanju od 72 sata. Nakon završene inkubacije utvrđivana je minimalna inhibitorna koncentracija, vizuelno na osnovu promene boje za bakterije, kao i presejavanjem na

Muller-Hinton agar. Svaka promena boje iz ljubičaste u roze ili bezbojnu ocenjuje se kao pozitivna. Najniža koncentracija pri kojoj je došlo do promene boje predstavlja - Minimalnu inhibitornu koncentraciju - MIC vrednost.

Odabrane gljive koje smo koristili u našim testiranjima izolovane su i identifikovane sa biljnih droga koje su obezbeđene iz Instituta za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić“. Korišćeni su uzorci usitnjenih biljnih droga pre ulaska u proizvodni proces, kao i gotovi proizvodi tj. monokomponentni čajevi. Biljne droge u kojima je determinisana mikopopulacija su: herba i listovi nane (*Mentha piperita* L.), listovi koprive (*Urtica dioica* L.), cvetovi nevena (*Calendula officinalis* L.), herba rastavića (*Equisetum arvense* L.) i kukuruzna svila (*Maydis stigmata*) (Stević, 2013).

Od vrsta roda *Fusarium* korišćene su *Fusarium solani* sa herbe rastavića, *F. subglutinans* sa kukuruzne svile, *F. equiseti* sa herbe rastavića i *F. verticillioides* sa lista koprive, a od predstavnika ostalih rodova gljiva *Curvularia lunata* sa lista i herbe nane, *A. flavus* sa kukuruzne svile, *Chaetomium* sp. sa herbe rastavića, *Alternaria alternata* sa lista koprive, *Penicillium* sp. sa lista nane. U ovim istraživanjima najviše su testirane vrste roda *Fusarium* jer su one procentualno najviše izolovane sa biljnih droga.

Kod gljiva, najmanja koncentracija na kojoj nije bilo rasta mikromiceta uzimana je za MIC. Mikroploče inkubirane su na 28°C tokom 5 dana. Radi potvrde, presejavano je iz svakog bunara 2-5 µl inolukuma na Potato dextrose agar i proveravano je, nakon inkubacije, da li je došlo do rasta.

Stepen aktivnosti ekstrakta, jak, umeren i slab, utvrđivan je u odnosu na inhibitornu aktivnost komercijalnog antibiotika i antimikotika, kao i literaturnih podataka.

Pripremanje koncentracije spora gljiva za mikrodilucionu metodu:

Gljive su gajene na PDA podlozi (Potato dextrose agar), u periodu od 10 do 21 dana, u zavisnosti od izolovane vrste gljive, stornirane na +4°C do daljne upotrebe (Booth, 1971).

Inokulum je pripremljen tako što su isprane spore sa površine agarnih ploča sterilnim rastvorom 0,85% NaCl-a koji sadrži 0,1% Tween 80 (v/v). Suspenzija spora je sterilnim rastvorom NaCl dovedena do konačne koncentracije od $1,0 \times 10^5$ CFU/ml medijuma. Tako pripremljen inokulum držan je na - 18°C do upotrebe. Radi provere

validnosti inokuluma, kao i odsustva kontaminacije, vršena je inokulacija na čvrstu podlogu (PDA).

U epruvetu sa kulturom mikromicete sipana je određena zapremina fiziološkog rastvora i Tween 80 (oko 3 ml za slabo sporulišuće vrste, i do 5 ml za dobro sporulišuće). Sterilnim štapićem za bris pokupljene su zaostale spore sa kulture i procedene kroz duplu sterilnu gazu u sterilnu epruvetu. Nanešeno je 50 µl inokuluma na pločicu za brojanje i prekriveno pokrovnim staklom. Na mikroskopu su pronalažene i prebrojavane spore u 2-3 polja. Izračunavana je aritmetička sredina.

Preračunavano je koliko µl inokuluma treba dodati u "bunarčić" mikrotitracione ploče za svaku gljivu, da bi broj spora bio približno 1×10^5 . Ukoliko je broj spora po polju bio izuzetno mali (što se vidi po velikoj zapremini inokuluma koju bi trebalo dodati u bunarčić da bi dobili željenu koncentraciju spora), sa već spranim inokulumom spirana je još jedna kultura kako bi ukoncentrisali spore. Ponavljao se ceo postupak brojanja.

Ukoliko je broj spora po polju suviše veliki, da se ne može izbrojati po jednom polju, pristupalo se razblaživanju 10 ili više puta (u zavisnosti od toga koliko su spore koncentrisane), tako što se 100 µl inokuluma spora sipa u ependorf sa 900 µl fiziološkog rastvora i Tween 80 i pristupa se ponovnom računanju.

Materijal:

Podloge: Sve podloge korišćene u ovom radu sterilisane su u autoklavu na 120°C, pri pritisku od jednog bara u trajanju od 15 minuta. Sterilnost podloga je testirana prekonoćnom inkubacijom na 37°C.

Krompir-dekstrozni-agar (Potato dextrose agar - PDA): agar (17g), krompir (200g), D-glukoza (20g), destilovana voda(1l), pH = 7 (reguliše se 1N NaOH),

Sabouraud - agar (SBA): glukoza (40g), pepton (10g), agar (18g), destilovana voda.(1l), pH=5,6 (reguliše se 1N NaOH)

Tryptic bile Soy Broth (TSB): kazein (20g), žučne soli (1,50g), X-B-D glukuronska kiselina (0,075g), dimetilsulfoksid (3,0g), destilovana voda (1l)

Muller-Hinton agar: kazein hidrolizat (17,5g), mesni ekstrakt (2,0g), skrob (1,5g), agar (17g), destilovana voda (1l).

Za mikrodilucionu metodu na bakterijama, kao i za prekonocnu kulturu bakterija, korišćena je tečna podloga (Muller Hinton bujon) bez dodavanja agara, dok je za gljive korišćen Sabouraud maltose bujon.

Kao kontrola korišćeni su Diflucan“ kapsule za gljive, 50 mg – antimikotik za sistemsku primenu (aktivna supstanca flukonazol), Pfizer PGM, Francuska i Streptomicin sulfat 1g, prašak za rastvor za injekcije (antibiotik za sistemsku primenu), Galenika ad. Srbija.

4. REZULTATI I DISKUSIJA ISTRAŽIVANJA

4.1. Rezultati preformulacionih ispitivanja biljne droge i ekstrakata *Helichrysi flos* (biološki izvor: *H. plicatum* DC.)

4.1.1. Rezultati ispitivanja biljne droge

Za biljnu drogu *Helichrysi flos* (biološki izvor *H. plicatum* DC. subsp. *plicatum*), u daljem tekstu (*H. flos* (biološki izvor *H. plicatum* DC.)), cvasti smilja, izvršena su osnovna ispitivanja koja definišu kvalitet biljne droge, a to su: makroskopija, ispitivanje stranih primesa, gubitak sušenjem i sadržaj pepela. Biljna droga *H. flos* (biološki izvor *H. plicatum* DC.), je korišćena kao sirovina za dobijanje suvih ekstrakata, koji su dalje ispitivani.

Makroskopija:

Cvasti smilja su 2-6 cm u prečniku, skoro loptaste, guste. Involukrum je poluloptast, prečnika oko 5 mm. Listići involukruma zlatnožuti, goli, uzdužno naborani. Cvetovi žute do narandžaste boje. Ahenije su braon, sa sitnim belim bradavicama (slika 4.1).



Slika 4.1 Izgled biljne droge cvasti milja, *Helichrysi flos* (biološki izvor *H. plicatum* DC.)

Rezultati ispitivanja stranih primesa, gubitak sušenjem i sadržaj pepela prikazani su u Tabeli br. 4.1.

Tabela 4.1 Rezultati ispitivanja biljne droge cvasti smilja *Helichrysi flos* (biološki izvor *H. plicatum* DC.) i zahtevi monografije ГФСССР XI za *Flores Helichrysi arenarii*.

Vrsta ispitivanja	Rezultati ispitivanja	Zahtevi za <i>Flores Helichrysi arenarii</i> ГФСССР XI
Onečišćenja životinjskog porekla	odsutne	odsutne
Ostaci cvetonosnih korpica	0,5 %	ne više od 5%
Cvasti sa ostatkom stabla dužim od 1 cm	0 %	ne više od 5%
Usitnjene čestice, koje prolaze kroz sito otvora 2 mm	0,3 %	ne više od 5%
Mineralne primese	0 %	ne više od 0,5%
Gubitak sušenjem	10.1 %	ne više od 12 % (sadržaj vlage)
Sadržaj pepela	7.9 %	ne više od 8 %

Rezultati određivanja stranih primesa su pokazali da onečišćenja životinjskog porekla nisu prisutna, da mineralnih primesa nema, da su prisutne organske primese 0,8 %, što odgovara zahtevima Ph.Eur.7.0, koja zahteva da količina stranih primesa ne sme biti veća od 2 % (m/m).

U biljnoj drogi *H. flos* (biološki izvor *H. plicatum* DC.), određivano je, prema zahtevima monografije ГФСССР XI za drogu *Flores Helichrysi arenarii*: prisustvo usitjenih čestica, koje prolaze kroz sito otvora 2 mm, ostaci cvetonosnih korpica i cvasti sa ostatkom stabla dužim od 1 cm. Utvrđeno je da stranih primesa nema u većoj količini nego što su zahtevi navedene monografije.

Takođe, gubitak sušenjem biljne droge koji je iznosio 10.1 % i sadržaj pepela 7,9 % su u skladu sa zahtevima iste monografije.

4.1.2. Priprema za ekstrakciju i ispitivanje stepena usitjenosti biljne droge

Da bi se odabrala dva različita stepena usitjenosti biljne droge *H. flos* (biološki izvor *H. plicatum* DC.) za ekstrakciju, droga je prerađena na četiri načina i ispitan je stepen usitjenosti dobijenih uzoraka. Rezultati ispitivanja stepena usitjenosti su prikazani kao frakcije određene veličine čestica i njihov procentualni udeo u ukupnoj masi uzorka (uzorci a.- d.). Sitanom analizom svakog uzorka dobijene su četiri frakcije

biljne droge (frakcija > 2000 μm , frakcija 2000 – 710 μm , frakcija 710 - 355 μm i frakcija < 355 μm) i njihov procentualni udeo u ukupnoj masi uzorka. Rezultati ispitivanja stepena usitnjenosti su prikazani u tabeli br. 4.2.

Tabela 4.2 Prikaz udela frakcija (%) uzoraka usitnjene biljne droge *H. flos* (biološki izvor: *H. Plicatum* DC.) dobijenih različitim načinima prerade (a.- d.)

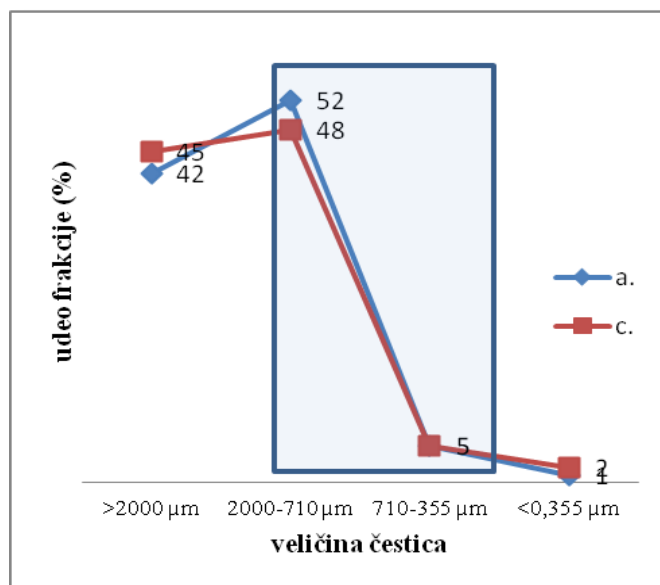
Načini prerade	a.	c.	b.	d.
Udeo frakcije	(%)	(%)	(%)	(%)
> 2000 μm	42	45	33	0
2000-710 μm	52	48	36	54
710-355 μm	5	5	19	31
< 355 μm	1	2	12	15
Oznaka uzoraka u matrici eksperimenta	2000		-	710

Uzorak **a.** ima 42% frakcije > 2000 μm , 52% frakcije 2000 - 710 μm , 5% frakcije 710 - 355 μm i 1% frakcije < 355 μm .

Uzorak **b.** ima 33% frakcije > 2000 μm , 36% frakcije 2000 - 710 μm , 19% frakcije 710 - 355 μm i 12% frakcije < 355 μm .

Uzorak **c.** ima 45 % frakcije > 2000 μm , 48 % frakcije 2000 - 710 μm , 5 % frakcije 710 - 355 μm i 2 % frakcije < 355 μm .

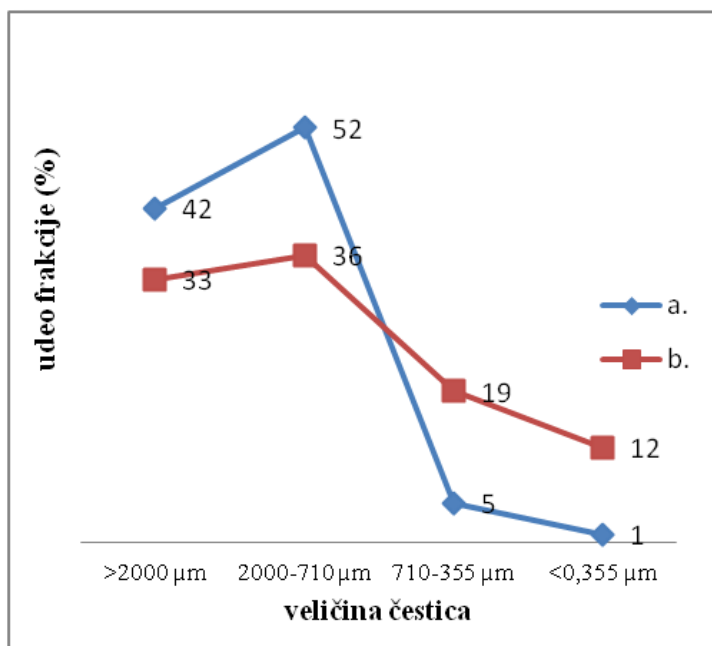
Uzorak **d.** ima 0 % frakcije > 2000 μm , 54 % frakcije 2000 - 710 μm , 31 % frakcije 710 - 355 μm i 15 % frakcije < 355 μm .



Slika 4.2 Poređenje distribucije veličine čestica uzoraka **a.** i **c.** biljne droge *H. flos* (biološki izvor: *H. plicatum* DC.), pripremljene za ekstrakciju (frakcija “2000”)

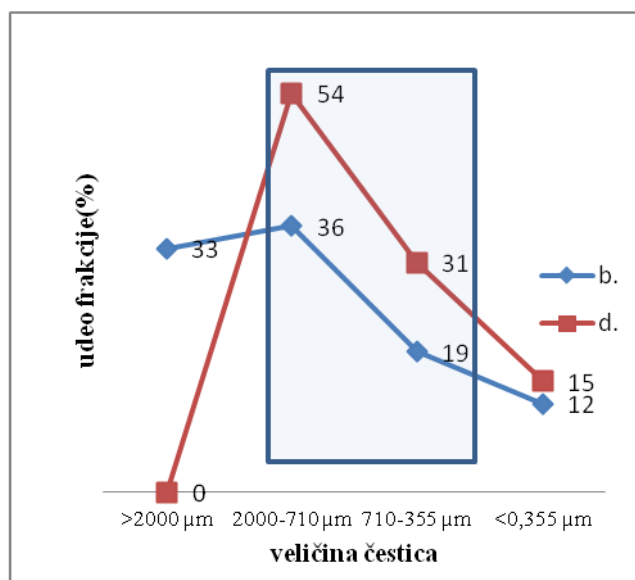
Rezultati sitane analize uzoraka **a.** i **c.** biljne droge prikazani su na slici 4.2. Rezultati pokazuju da uzorci **a.** i **c.** imaju sličnu raspodelu frakcija, jer imaju frakcije od 2000 do 355 μm 57% (uzorak **a.**) odnosno 53% (uzorak **c.**), udeo frakcije > 2000 μm : 42 % (uzorak **a.**) odnosno 45% (uzorak **c.**) i vrlo mali udeo frakcije < 355 μm: 1 % (uzorak **a.**) i 2% (uzorak **c.**).

Uzorak **b.**, takođe, ima frakcije od 2000 do 355 μm 55%, ali se od uzoraka **a.** razlikuje po tome što ima znatno više frakcije < 355 μm i to 12 %, što je prikazano na slici 4.3.



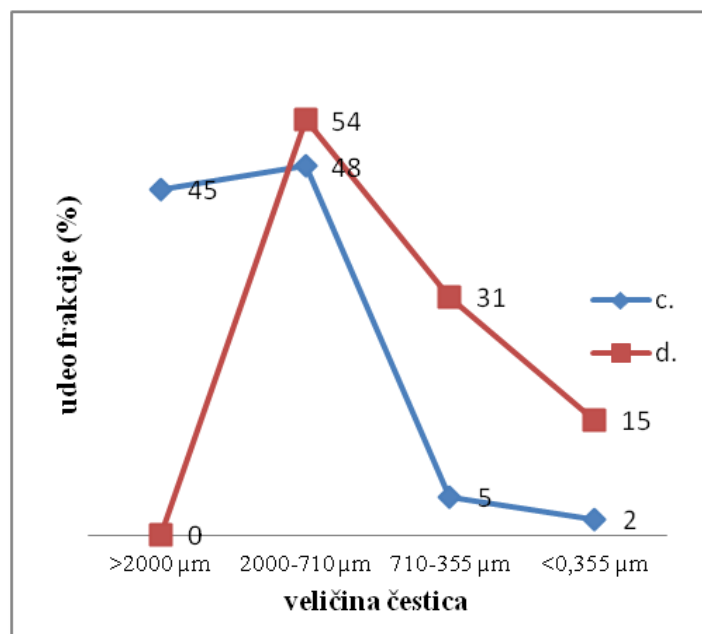
Slika 4.3 Poređenje distribucije veličine čestica uzoraka a. ("2000") i b. biljne droge *H. flos* (biološki izvor: *H. plicatum* DC.) pripremljene za ekstrakciju

Uzorak **d.**, za razliku od drugih uzoraka droge, najviše ima frakcije od 2000 do 355 μm i to 85%. Od uzorka **b.** razlikuje se po tome što ima znatno više frakcije < 355 μm i to 12 % i što ne sadrži frakciju > 2000 μm, što je prikazano na slici br. 4.4.



Slika 4.4 Poređenje distribucije veličine čestica uzoraka **b.** i **d.** ("710") biljne droge *H. flos* (biološki izvor: *H. plicatum* DC.) pripremljene za ekstrakciju

Distribucija veličine čestica uzoraka **c.** i **d.** je različit, što je vidljivo na slici 4.5.



Slika 4.5 Poređenje distribucije veličine čestica uzoraka c. („2000”) i d. („710”) biljne droge *H. flos* (biološki izvor: *H. plicatum* DC.) pripremljene za ekstrakciju

Analiza dobijenih rezultata ispitivanja stepena usitnjenosti uzoraka biljnih droga, uticala je na odabir dva uzorka koji imaju različitu distribuciju veličine čestica i koji su se koristili u proseku ekstrakcije: uzorak a. ili c., koji imaju 53-57% frakcije od 2000 do 355 μm (koji je u daljem tekstu označen kao „2000“) i uzorak (d), koja ima 85% frakcije od 2000 do 355 μm, od toga 31% frakcije 710 - 355 μm (koji je u daljem tekstu označen kao „710“). Na slikama 4.2 i 4.4 i u tabeli br.4.2 uokvirene su frakcije koje su preporučene za proces ekstrakcije.

Takođe, dobijeni rezultati ispitivanja stepena usitnjenosti različitih uzoraka, pokazali su da, bez obzira na to što je biljna droga industrijski sejana kroz sita promera otvora npr. 2 mm, može da sadrži i frakciju čestica veličine > od 2 mm, ili droga koja je sejana kroz sito promera otvora 0,71 mm, može da sadrži frakciju čestica veličine > 0,71 mm. To se objašnjava time da veličina čestica koje prolaze kroz otvor sita ne zavisi samo od veličine otvora sita, već i od ugla pod kojim čestica pada na sito, od brzine kretanja čestica, kao i od oblika samog otvora na situ.

4.1.3. Uticaj formulacionih i tehnoloških parametara na suvi ostatak u tečnom ekstraktu (1:1) ili na prinos suvog ekstrakta

4.1.3.1. Uticaj odnosa droga : ekstragens za ekstrakciju na suvi ostatak u tečnom ekstraktu (1:1)

Ispitivanje uticaja formulacionog parametra - odnos droga : ekstragens za ekstrakciju - na procenat suvog ostatka u tečnom ekstraktu (1:1) *H. flos* (biološki izvor *H. plicatum* DC.), je sprovedeno u cilju definisanja optimalnog odnosa droga : ekstragens koji treba da se primeni u procesu ekstrakcije. Cilj definisanja optimalnog odnosa droga : ekstragens je dobiti što veći stepen iskorišćenja biljne droge, sa racionalnim utroškom ekstragensa. Suvi ostatak ekstrakta je jedan od pokazatelja stepena iskorišćenja biljne droge, tj. što je on veći, to je i stepen iskorišćenja droge veći. Ekstrakcija je praćena do faze dobijanja tečnih ekstrakata.

Ekstrakt „0“ je dobijen pri sledećim uslovima ekstrakcije: stepen usitnjenosti droge 2000 µm, ekstragens 50% etanol, odnos droga : ekstragens (1:14) i dobijen je primarni ekstrakt, koji je sadržavao 2,23% suvog ostatka, odnos droga : ekstrakt (1:10). Ekstrakt „00“ je dobijen pri sledećim uslovima ekstrakcije : korišćena je droga *in toto*, ekstragens 50% etanol, odnos droga : ekstragens = (1 : 5) i dobijen je primarni ekstrakt, koji sadrži 5,08 % suvog ostatka, odnos droga : ekstrakt (1:2,5). Rezultati dobijeni praćenjem procesa ekstrakcije radi ispitivanja uticaja odnosa droga : ekstragens na suvi ostatak u tečnom ekstraktu *H. flos* (1:1) prikazani su u Tabeli 4.3.

Prikazani rezultati pokazuju da kada se u procesu ekstrakcije primeni odnos droga:ekstragens (1:14), dobije se primarni ekstrakt (1:1) i ostatak, a masa „ostatka“ od ekstrakcije je devet puta veća od primarnog ekstrakta. Oba ekstrakta (primarni i ostatak) imaju vrlo sličan i relativno nizak suvi ostatak (2,23 %, 2,20 %). Droga je upila četiri puta više ekstragensa u odnosu na svoju masu (1: 4). Stepen usitnjenosti biljne droge nije bio isti u obe ekstrakcije, ali je njegov uticaj na krajni odnos droga : ekstrakt nije bio od velike važnosti i zanemaren je.

Tabela 4.3 Rezultati dobijeni praćenjem procesa ekstrakcije radi ispitivanja uticaja odnosa droga : ekstragens na suvi ostatak u tečnom ekstraktu *H. flos* (biološki izvor: *H. plicatum* DC.) (1:1)

Protokol ekstrakcije	Ekstrakt „0“	Ekstrakt „00“
Stepen usitnjenosti droge	2000	<i>In toto</i>
Ekstragens (etanol, %, v/v)	50%	50%
Odnos droga: ekstragens (m:m)	1:14	1:5
Proticanje ekstragensa (faza I)	maceracija droge 24 h	
Rezultati ekstrakcije		
Upijanje droge (m:m)	1:4	1:2.5
Suvi ostatak u tečnom ekstraktu 1:1	2,23 %	5.08%
Droga : ukupan ekstrakt	1:10	1:2.5
Suvi ostatak u „ostatku“ ekstrakta	2,20 %	4.49 %

Dalje, rezultati pokazuju da kada se u procesu ekstrakcije primeni odnos droga : ekstragens (1:5), dobije se odnos primarnog ekstrakta u odnosu na drogu (1:1), a masa „ostatka“ od ekstrakcije je oko 1,5 puta veća od primarnog ekstrakta. Primarni ekstrakt ima suvi ostatak 5,08 %, dok „ostatka“ od ekstrakcije ima suvi ostatak 4,49 %. Droga je upila ekstragensa u odnosu na svoju masu 1: 2,4.

Bez obzira na nizak suvi ostatak u dobijenom ekstraktu 1:10 (ekstrakt „0“), veći je ukupni suvi ostatak u tom ekstraktu, nego u ekstraktu 1:2,5 (ekstrakt „00“).

S druge strane, za ekstrakt „0“ utrošeno je skoro tri puta više ekstragensa, a procenjeno je da bi prinos suvog ekstrakta bio svega 1,5 put veći. Upijanje droge u ekstraktu „0“ je bilo znatno veće (1:4) u odnosu na upijanje droge u ekstraktu „00“ koje je bilo 1:2,5, što predstavlja dodatni gubitak ekstragensa. Iz iznetih rezultata, zaključeno je da je odnos droga : ekstragens = 1:5 optimalan za proces ekstrakcije biljne droge *H. flos* (biološki izvor *H.plicatum* DC.)

4.1.3.2. Uticaj tehnološkog parametra - način proticanja ekstragensa kroz drogu – na suvi ostatak u tečnom ekstraktu (1:1)

Ispitivanje uticaja tehnološkog parametra - načina proticanja ekstragensa kroz perkolatore – na suvi ostatak u tečnom ekstraktu *H. flos* (biološki izvor *H. plicatum* DC.)(1:1), je sprovedeno u cilju definisanja protoka ekstragensa kroz drogu, kojim treba da se obezbedi veći stepen iskorišćenja biljne droge, a time i veći suvi ostatak u ekstraktu. Ekstrakcija je praćena do faze dobijanja tečnih ekstrakata i rezultati su prikazani u tabeli 4.4.

Tabela 4.4 Rezultati dobijeni praćenjem procesa ekstrakcije radi ispitivanja uticaja načina proticanja ekstragensa kroz stub droge na suvi ostatak u tečnom ekstraktu *H. flos* (biološki izvor *H. plicatum* DC.) (1:1)

Protokol ekstrakcije	Ekstrakt „00“	Ekstrakt „000“	Ekstrakt „R“
Stepen usitnjenosti droge	<i>In toto</i>	2000	2000
Ekstragens (etanol, %, v/v)	50%	50%	50%
Odnos droga: ekstragens (m:m)	1:5	1:6	1:5
Proticanje ekstragensa	maceracija 24h	maceracija (24h +2h)	
Rezultati ekstrakcije			
Upijanje droge (m:m)	1:2,5	1:2,7	1:2,6
Suvi ostatak u tečnom ekstraktu (1:1)	5.08 %	5.35%	5,34

Ekstrakti „000“ i „R“ su izrađivani po protokolu opisanom u odeljku metoda za proizvodnju suvog ekstrakta 3.2.3.2., što podrazumeva dvostruku maceraciju droga u perkolatorima (24h + 2h) u fazi izrade tečnog ekstrakta (Fazi I) i dobijeni su ekstrakti sa 5,35%, odnosno 5,34% suvog ostatka. Ekstrakti „000“ i „R“, bez obzira na razlike u odnosu droga : ekstragens (1:6 i 1:5) su imali vrlo sličan suvi ostatak. Ekstrakt koji je dobijen po protokolu ”maceracija 24 h” i perkolacija (ekstrakt „00“) je imao 5,08 % suvog ostatka. Rezultati dobijeni praćenjem procesa ekstrakcije radi ispitivanja uticaja načina proticanja ekstragensa kroz stub droge na suvi ostatak u tečnom ekstraktu *H. flos* (1:1) prikazani su u Tabeli 4.4.

Kako su se, uvođenjem još jedne maceracije droge od 2h, pre perkolacije, dobili ekstrakti sa većim suvim ostatkom, dalje u eksperimentima je prihvaćen metod „maceracije 24h +2h“.

4.1.3.3. Uticaj odnosa droga : rastvarač za re-ekstrakciju na prinos suvog ekstrakta.

Ispitivanje uticaja formulacionog parametra - odnos droga : ekstragens za re-ekstrakciju - na prinos suvog ekstrakta *H. flos* (biološki izvor *H. plicatum* DC.), je sprovedeno u cilju obezbeđenja većeg stepen iskorišćenja biljne droge, a time i većeg prinosa suvog ekstrakta. Ekstrakcija je praćena do faze dobijanja suvih ekstrakata (FAZA I-III). Suvi ekstrakt je dobijen uparavanjem samo primarnog ekstrakta. U tabeli br. 4.5. prikazani su rezultati ekstrakcije radi ispitivanja uticaja odnosa droga : rastvarač za re-ekstrakciju na prinos suvog ekstrakta.

Tabela 4.5 Rezultati dobijeni praćenjem procesa ekstrakcije radi ispitivanja uticaja odnosa droga: rastvarača za re-ekstrakciju na prinos suvog ekstrakta *H. flos* (biološki izvor *H. plicatum* DC.)

Potokol ekstrakcije	Ekstrakt“ 000“	Ekstrakt R
Stepen usitnjenosti droge	2000	2000
Ekstragens (etanol, %, v/v)	50%	50%
Odnos droga: ekstragens	1:6	1:5
Proticanje ekstragensa	maceracija (24h +2h)	
Odnos droga:rastvarača Za re-ekstrakciju	1:3	1:6
Rezultati ekstrakcije		
Prinos suvog ekstrakta	1,44 %	2,97 %

Ekstrakt “ 000“ i ekstrakt „R“ su dobijeni iz droge istog stepena usitnjenosti, sa istim ekstragensom (50% etanol), ali sa različitim odnosom droga : rastvarač za re-ekstrakciju. Dobijeni tečni ekstrakti su delimično upareni, pa re-ekstrahovani

rastvaračem za re-ekstrakciju, tako da različit odnos droga : ekstragens za ekstrakciju ne utiče na prinos suvog ekstrakta.

Ekstrakt "000" je re-ekstrahovan mešavinom etilacetata i etanola (9:1) (v:v) i to u odnosu droga : ekstragens za re-ekstrakciju (1:3) i dobijen je 1,44 % prinos suvog ekstrakta *H. flos* (biološki izvor *H. plicatum*).

Ekstrakt "R" je re-ekstrahovan mešavinom etilacetata i etanola (9:1) i to u odnosu droga : ekstragens za re-ekstrakciju (1:6) i dobijen je 2,97% prinos suvog ekstrakta.

Ekstrakt "R" koji je imao dvostruko veći prinos od ekstrakta "000", je dokaz da je odnos droga : rastvarač za re-ekstrakciju (1:6), dao dva puta veći prinos od odnosa (1:3).

Zaključeno je da postupak re-ekstrakcije u kojem je odnos droga : ekstragens za re-ekstrakciju (1:6), efikasniji od odnosa (1:3), i primenjen je u metodi dobijanja suvog ekstrakta *H. flos* (biološki izvor *H. plicatum*).

4.1.4. Rezultati i diskusija preformulacionih ispitivanja

U drogi *H. flos* (biološki izvor *H. plicatum*) je ispitano prisustvo stranih primesa, sadržaj vlage i ukupni pepeo. Kako nema monografiju u farmakopejama, za ocenu makroskopskog kvaliteta, primenjena je monografija za *Flores Helichrysi arenarii* (ГФСССР XI).

Biljna droga je pripremana za ekstrakciju mlevenjem i prosejavanjem i dobijena su četiri uzorka, kojima je ispitan stepen usitnjenosti. Odabrana su dva uzorka biljne droge koja su imala različitu distribuciju veličine čestica: uzorak a. ili c. (2000) i uzorak d. (710) i koji će se koristiti u dizajnu eksperimenta za procenu uticaja faktora stepena usitnjenosti na suvi ostatak u tečnom ekstraktu i na prinos suvog ekstrakta.

U preformulacionim ispitivanjima, definisana su dva formulaciona i jedan tehnološki parametar, koji igraju vrlo važnu ulogu u dizajniranju procesa ekstrakcije i biće primenjeni kao nepromenljivi faktori. Definisani su formulacioni faktori: odnos droga : ekstragens (1:5) i droga : rastvarač za re-ekstrakciju (1:6,8), koji su izabrani u cilju povećanja suvog ostatka u tečnom ekstraktu, odnosno prinosa suvog ekstrakta. Tehnološki parametar, koji će biti nepromenljivi faktor u ekstrakciji je način protoka ekstragensa kroz stub droge i izabran je način protoka koji podrazumeva dvostruku

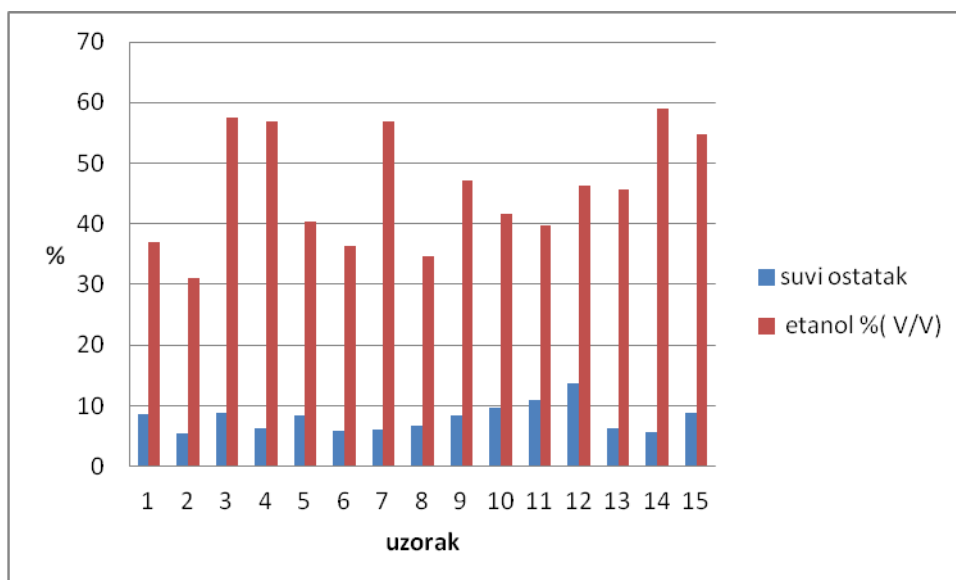
maceraciju biljne droge (24 +2 h), kao protokol koji doprinosi većem suvom ostatku u tečnom ekstraktu. Na taj način su izabrani parametri za dizajniranje procesa ekstrakcije kao metode za dobijanje suvog ekstrakta.

4.2. Karakterizacija dobijenih tečnih ekstrakata pre re-ekstrakcije i prikaz prinosa suvih ekstrakata *H. flos* (biološki izvor *H. plicatum*)

Radi praćenja procesa ekstrakcije u Fazi I, u dobijenim tečnim ekstraktima *H. flos* (biološki izvor *H. plicatum*) (1:1) ispitivani su suvi ostatak i sadržaj etanola, inače, ispitivanja koja propisuje Ph.Eur.7.0 za tečne ekstrakte. Suvi ostatak i sadržaj etanola ispitivani su nakon prve faze ekstrakcije, u cilju praćenja toka ekstrakcije i kvaliteta dobijenih tečnih ekstrakata, koji su kasnije prečišćavani i uparavani da bi se dobio suvi ekstrakt. Rezultati ispitivanja su prikazani u tabeli 4.6 i na slici 4.6.

Tabela 4.6 Rezultati karakterizacije dobijenih tečnih ekstrakata *H. flos* (biološki izvor *H.plicatum* DC.) (1:1), (uzorci 1-15) pre faze re-ekstrakcije

Broj uzorka	Stepen usitnjenosti	Ekstragens (EtOH %)	Suvi ostatak (%)	Sadržaj etanola (% ,v/v)
1	710	40 %	8,65	37,04
2	<i>In toto</i>	40%	5,50	31,16
3	710	60%	8,73	57,56
4	<i>In toto</i>	60 %	6,31	56,84
5	710	50%	8,45	40,36
6	<i>In toto</i>	50 %	5,88	36,4
7	2000	60%	6,09.	56,84
8	2000	40%	6,69	34,66
9	2000	50%	8,29	47,08
10	710	50%	9,67	41,68
11	2000	50%	10,97	39,68
12	710	50%	13,60	46,40
13	2000	50%	6,31	45,72
14	2000	60 %	5,75	59,00
15	710	60 %	8,85	54,72



Slika 4.6 Suvi ostatak i sadržaj etanola u uzorcima tečnog ekstrakta *H. flos* (biološki izvor *H. plicatum* DC.) (1:1), (uzorci 1-15) pre faze re-ekstrakcije

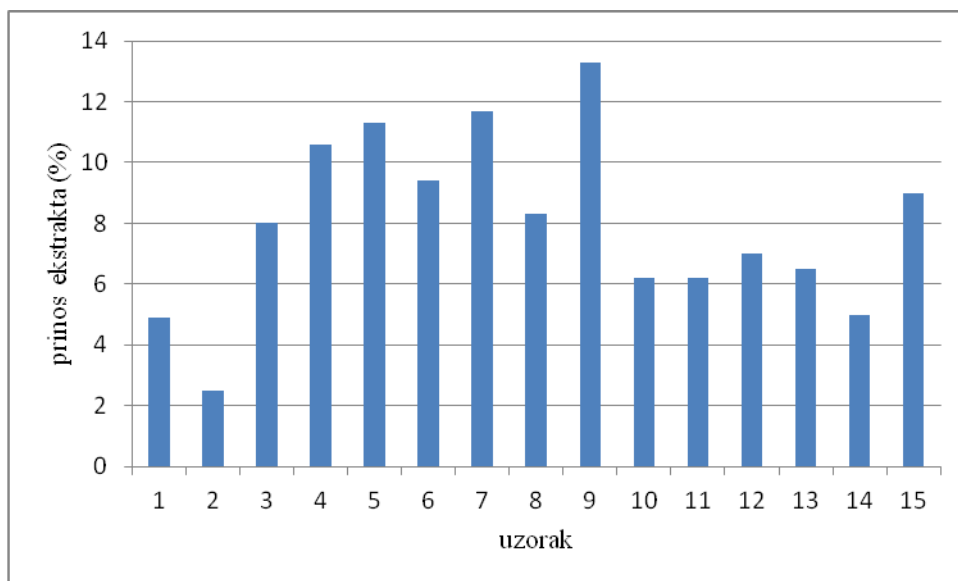
Najveći suvi ostatak (13,60%) imao je uzorak br. 12, koji je rađen sa biljnom drogom *H. flos* stepena usitnjenosti 710 (koja sadrži 85% frakcije 355-2000 μm), koja je ekstrahovana ekstragensom (50% etanol), dok je najmanji suvi ostatak (5,50%) imao uzorak ekstrakta dobijen ekstrakcijom *in toto* biljne droge ekstrahovanom ekstragensom (40 % etanol). Sadržaj etanola u tečnim ekstraktima se kretao od 31,16 % (v/v) (uzorak br. 2) u ekstraktima koji su izrađeni sa 40% etanola do 59 % (v/v) (uzorak br. 14), koji je izrađen sa 60 % etanola.

Prinos suvog ekstrakta se izražava u procentima i predstavlja masu suvog ekstrakta dobijenu od 100 g sušene biljne droge (% m/m). Visok prinos ekstrakta je važan za biljne lekove koji kod kojih je celokupan ekstrakt deklarisan kao aktivna materija. Prikaz prinosa suvih ekstrakata dat je u tabeli 4.7 i slici 4.7.

Prinos suvog ekstrakta se kretao 2,5 - 13,3%. Najveći prinos suvog ekstrakta imao je ekstrakt br. 9, koji je dobijen ekstrakcijom droge stepena usitnjenosti 2000 (53-57 % frakcije 355-2000 μm), ekstragensom (50% etanol) i re-ekstrakcija rastvaračem (etilacetat:etanol 5:5). Najmanji prinos suvog ekstrakta imao je ekstrakt br. 2 koji je dobijen ekstrakcijom *in toto* droge, ekstragens 40% etanol i re-ekstrakcija rastvaračem etilacetat:etanol 9:1.

Tabela 4.7 Prikaz prinosa dobijenih suvih ekstrakata (%) *H. flos* (biološki izvor *H. plicatum*) (uzorci 1-15)

Broj uzorka	Stepen usitnjenosti	Ekstragens (EtOH%)	Ekstragens za re-ekstrakciju (EtAc:EtOH)	Prinos suvog ekstrakta (%)
1	710	40	9:1	4,9
2	<i>in toto</i>	40	9:1	2,5
3	710	60	9:1	8,0
4	<i>in toto</i>	60	5:5	10,6
5	710	50	5:5	11,3
6	<i>in toto</i>	50	5:5	9,4
7	2000	60	5:5	11,7
8	2000	40	5:5	8,3
9	2000	50	5:5	13,3
10	710	50	9:1	6,2
11	2000	50	9:1	6,2
12	710	50	100 %	7,0
13	2000	50	100 %	6,5
14	2000	60	9:1	5,0
15	710	60	5:5	9,0

**Slika 4.7** Prinos ekstrakta u uzorcima 1-15 suvog ekstrakta *H. flos* (biološki izvor *H. plicatum* DC)

Albayarak *et al.*, (2010.) su vršili ekstrakciju 16 vrsta biljaka iz roda *Helichrysum*, primenom metanola u Soxhlet aparatu, 6h pri temperaturi od 60°C, filtrirali, uparavali pod sniženim pritiskom i dobili prinos ekstrakata od 8,00 % do 33,36

% Prinos ekstrakta *H. plicatum* subsp. *plicatum* je bio 14,79 %, prinos *H. plicatum* subsp. *polyphyllum* 19,70% i prinos za *H. arenarium* 12,60%.

Aslan *et al.* (2007) u ekstrakciji *H. plicatum* subsp. *plicatum* toplom destilovanom vodom (1. način) i 80% etanolom (2. način) 24h na sobnoj temperaturi, dobili su prinos vodenog ekstrakta 17,5% i etanolnog 19,3%

Nizak prinos suvog ekstrakta u ovom radu je očekivano niži od prinosa koji su dobili drugi autori, jer je u toku procesa izrade ekstrakta primenjena re-ekstrakcija u cilju prečišćenja ekstrakata.

4.3. Optimizacija procesa ekstrakcije u cilju dobijanja većeg suvog ostatka/većeg prinosa suvog ekstrakta *Helichrysi flos* (biološki izvor *H. plicatum*)

4.3.1. Optimizacija procesa tečne ekstrakcije u cilju dobijanja većeg suvog ostatka

Ispitivanje uticaja stepena usitnjenosti biljne droge i vrste ekstragensa na suvi ostatak

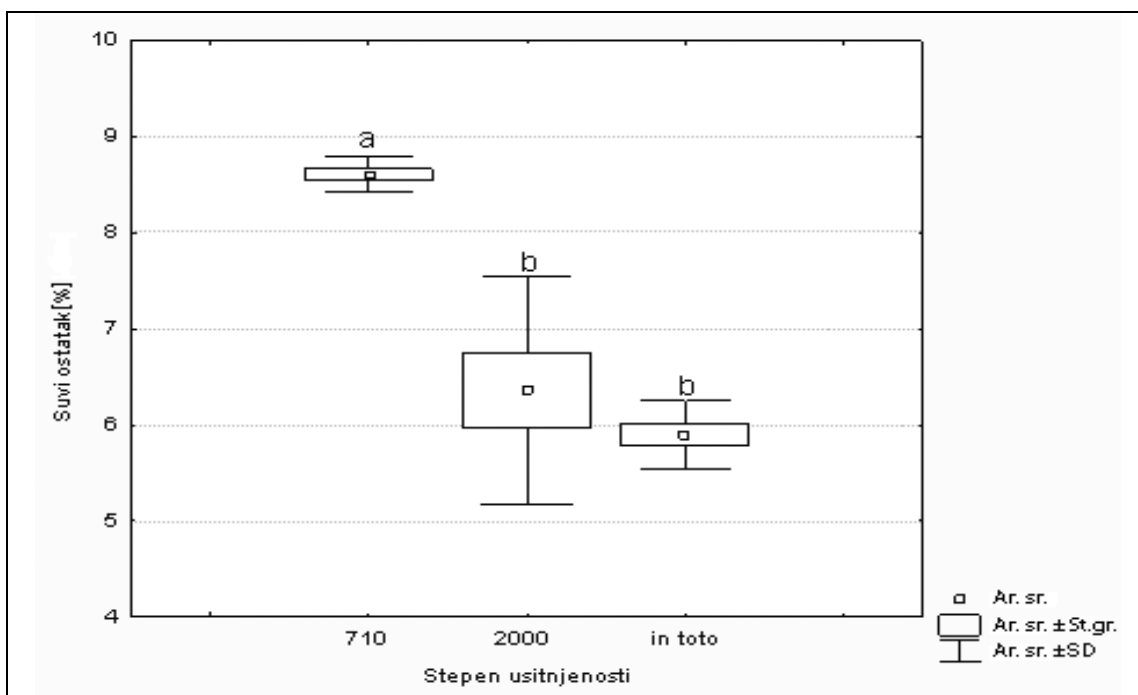
Ako izradu suvog ekstrakta podelimo u dve faze, prva - izrada tečnog ekstrakta i druga - prečišćavanje i uparavanje ekstrakta, onda se u fazi izrade tečnog ekstrakta može analizirati uticaj stepena usitnjenosti biljne droge i vrste ekstragensa (fiksni faktori) na suvi ostatak u tečnom ekstraktu, kao i interakciju ta dva faktora. Od 15 dobijenih ekstrakata izabrano je osam, koji odgovaraju matrici eksperimentalnog dizajna.

Testiranjem uticaja faktora na variranje vrednosti procenta suvog ostatka (tabela 4.8.) zaključeno je da stepen usitnjenosti biljnog materijala statistički veoma značajno ($p < 0.01$) utiče na suvi ostatak, dok vrsta ekstragensa (50%, 60% etanol) nije statistički značajno uticao na procenat suvog ostatka u tečnom ekstraktu. Interakcija između ova dva posmatrana faktora takođe nije ocenjena statističkom značajnošću.

Tabela br. 4.8. Testiranje značajnosti uticaja faktora i njihove interakcije na variranje vrednosti suvog ostatka ekstrakta *H. flos* (biološki izvor *H. plicatum* DC.)

Izvor varijacije (faktor)	SS	Stepeni slobode	MS	F faktor	P
(A) Stepen usitnjenosti	37,692	2	18,846	31,512	0,000001
(B) Etanol [%]	0,155	2	0,078	0,130	0,879014
Interakcija faktora					
A x B	1,557	4	0,389	0,651	0,633765

SS-suma kvadrata, MS-srednja vrednost, F-faktor i p-nivo značajnosti.



Slika 4.8 Uticaj stepena usitnjenosti biljne droge (faktor A) na procenat suvog ostatka u tečnom ekstraktu *H. flos* (biološki izvor *H. plicatum* DC.); a i b su različiti nivoi značajnosti

Na slici 4.8 je prikazan uticaj stepena usitnjenosti biljne droge na suvi ostatak u tečnom ekstraktu *H. flos* (biološki izvor *H. plicatum*). Najveći suvi ostatak imali su ekstrakti pripremljeni od biljne droge koja ima 85% frakcije 335-2000 μm (označen kao 710) ($\bar{x} = 8.60\%$), dok su ekstrakti dobijeni od biljne droge koja ima 53-57% frakcije 335-2000 μm (oznaka „2000” i „in toto” imali niže vrednosti suvog ostatka ($\bar{x} = 6,35\%$ i $\bar{x} = 5,90\%$). Dankan-ov test je pokazao da se statistički značajno razlikuju suvi ostatak u ekstraktu izrađenom od biljne droge stepena usitnjenosti „710” (nivo značajnosti a), od suvog ostatka u ekstraktu izrađenom od biljne droge stepen usitnjenosti „2000” i „in toto” droge (nivo značajnosti b). Uticaj stepena usitnjenosti „710” na suvi ostatak se statistički značajno razlikovao od uticaja preostale dve frakcije (a). Srednje vrednosti označene istim slovom (b) se statistički značajno ne razlikuju na nivou $p < 0,05$.

Optimizacija procesa tečne ekstrakcije u cilju dobijanja većeg suvog ostatka

Prva faza u izradi suvog ekstrakta je bila izrada tečnog ekstrakta, koja može znatno da utiče na prinos suvog ekstrakta. Rezultati ispitivanjem uticaja stepena usitnjenosti i vrste ekstragensa na suvi ostatak, doprinose definisanju optimalnih uslova

za izvođenje tečne ekstrakcije. Dobijeni rezultati ukazuju na to da je stepen usitnjenosti biljne droge *H. flos* (biološki izvor: *H. plicatum*) koji sadrži 85% frakcije veličine čestica 335-2000 μm (označen "710") optimalan za izvođenje ekstrakcije, kako bi se dobio veći suvi ostatak.

4.3.2. Optimizacija procesa ekstrakcije u cilju dobijanja većeg prinosa suvog ekstrakta

Ispitivanja uticaja procesnih i formulacionih parametara na prinos ekstrakta

U literaturi su dostupni podaci o efikasnosti ekstrakcije i ispitivanjima uticaja različitih uslova ekstrakcije na prinos suvog ekstrakata (Zdravković *et al.*, 2012; Stanojević *et al.*, 2007; Stanojević *et al.*, 2009; Stanojević *et al.*, 2011). Na povećanje prinosa utiču mnogi faktori u ekstrakciji kao što su: vreme i temperature ekstrakcije, odnos droga : ekstragens, tip rastvarača, veličina čestica i zato je važno ispitati i postaviti optimalne uslove za izvođenje procesa ekstrakcije (Galvan d'Alessandro *et al.*, 2012.). Na slici 4.9 je prikazan suvi ekstrakt *H. flos* (biološki izvor: *H. plicatum*).



Slika 4.9 Suvi ekstrakt cvasti smilja, *H. flos* (biološki izvor *H.plicatum* DC.)

Primenom faktorijalnog dizajna 2^3 ispitan je uticaj tri promenljiva faktora u procesu ekstrakcije i njihove međusobne interakcije na prinos suvog ekstrakta (%) na osam uzoraka ekstrakata *H. flos* (*H. plicatum*), koji odgovaraju matrici dizajna

eksperimenta. Ispitivani faktori su stepen usitnjenost biljne droge *H. flos* (biološki izvor *H. plicatum*), vrsta ekstragensa i vrsta rastvarača za re-ekstrakciju i prikazani su u tabeli 4.9. Ispitivani nivoi stepena usitnjenosti su: 2000 (53-57% frakcije 355-2000 μm) i 710 (koja sadrži 85% frakcije 355-2000 μm) i izabrani su jer su ispoljili veći uticaj na suvi ostatak (u tečnom ekstraktu) od *in toto* droge. Ispitivani nivoi koncentracije etanola su 50% i 60% (v/v) (kao ekstragens) i ispitivani nivoi udela etilacetata su (5:5 i 9:1) (v:v) (kao rastvarači za re-ekstrakciju) i prikazani su u tabeli 4.10.

Tabela 4.9 Prikaz faktora i nivoa proizvedenih suvih ekstrakata *H. flos* (biološki izvor *H. plicatum* DC.) u vidu realnih vrednosti

Faktor	Promenljiva	Niži nivo	Viši nivo
Stepen usitnjenosti	A	710	2000
Vrsta ekstragensa (koncentracija etanola, EtOH %)	B	50	60
Vrsta rastvarača (etilacetat:etanol, EtAc:EtOH)	C	5:5	9:1

Tabela 4.10 Prikaz faktora i nivoa proizvedenih suvih ekstrakata u vidu kodiranih i realnih vrednosti i praćenog odgovora – prinos ekstrakta (%) - obuhvaćenih optimizacijom procesa ekstrakcije u cilju dobijanja većeg prinosa ekstrakta

Broj eksperimenta	Broj uzorka*	A	B	C	Stepen usitnjenosti	EtOH (%)	EtAc:EtOH (v:v)	Prinos ekstrakta (%)
1	5	-1	-1	-1	710	50	5:5	11,4
2	9	+1	-1	-1	2000	50	5:5	13,3
3	15	-1	+1	-1	710	60	5:5	9,0
4	7	+1	+1	-1	2000	60	5:5	11,7
5	10	-1	-1	+1	710	50	9:1	6,2
6	11	+1	-1	+1	2000	50	9:1	6,2
7	3	-1	+1	+1	710	60	9:1	8,0
8	14	+1	+1	+1	2000	60	9:1	5,0

*Broj uzorka označava broj ekstrakta iz table 4.6

Dobijeni koeficijenti ($b_1 - b_{1,2,3}$) pokazuju da najveći uticaj na prinos suvog ekstrakta ($b_3 = -5.00$) ima vrsta rastvarača za re-ekstrakciju tj. udeo etilacetata u ekstragensu za re-ekstrakciju (faktor C) i ima negativan predznak, što znači da porast

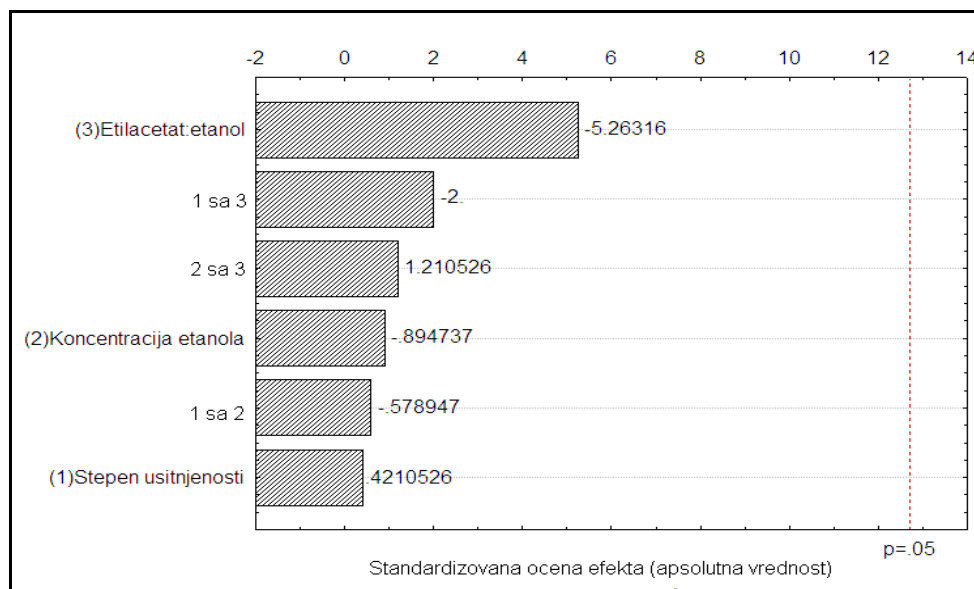
udela etilacetata u ekstragensu za re-ekstrakciju izaziva smanjenje prinosa suvog ekstrakta. Uticaj koncentracije etanola (faktor B) je manji ($b_2 = -0,85$) od uticaja udela etilacetata (faktora C) i takođe ima negativan predznak, što znači da povećanje koncentracije etanola u ekstragensu za ekstrakciju dovodi do smanjenja prinosa suvog ekstrakta. Stepenn usitnjenosti (faktor A) ima najmanji uticaj na prinos suvog ekstrakta ($b_1 = 0,400$) od sva tri faktora i taj uticaj je pozitivan, što znači kada stepenn usitnjenosti ide sa 710 (niži nivo) na 2000 (viši nivo), raste i prinos suvog ekstrakta. Najveća interakcija je između stepena usitnjenosti i udela etilacetata ($b_{13} = -1,900$), a najmanja sva tri faktora ($b_{123} = -0,950$). U tabeli br. 4.11 prikazani su efekti promenljivih A,B,C i njihovih međusobnih interakcija na prinos suvog ekstrakta.

Tabela 4.11 Efekti promenljivih A,B,C i njihovih međusobnih interakcija na prinos suvih ekstrakata *H. flos* (biološki izvor *H.plicatum* DC.)

Efekat	Faktor	Koeficijent
8,850		b ₀
0,400	A	b ₁
-0,850	B	b ₂
-0,550	AB	b ₁₂
-5,000	C	b ₃
-1,900	AC	b ₁₃
1,150	BC	b ₂₃
-0,950	ABC	b ₁₂₃
	<i>Srednji C</i>	
-6,9	Viši A	
-3,1	Niži A	
-1,9	AxC	

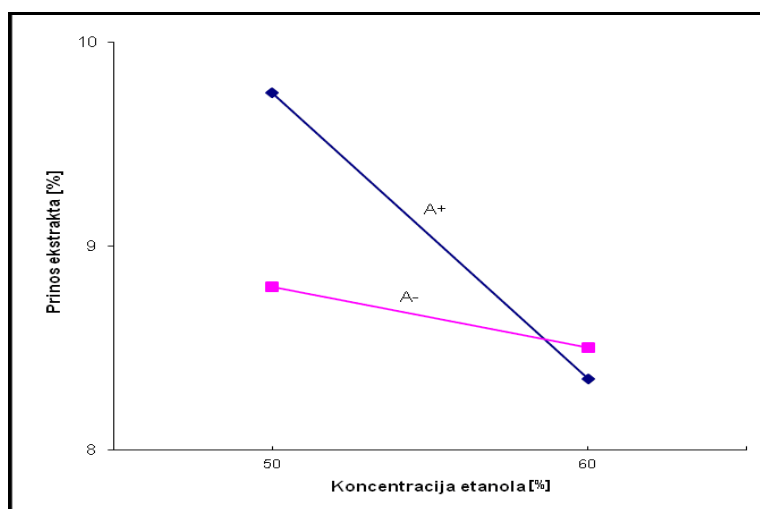
Vrsta rastvarača za re-ekstrakciju, na osnovu efekta faktora $b_3 = -5,00$, snižava prinos ekstrakta za 5 %, kada je rastvarač etilacetat:etanol 9:1, u odnosu na rastvarač etilacetat:etanol 5:5. Interakcija stepena usitnjenosti i vrste rastvarača za re-ekstrakciju se određuje kao polovinina razlike u srednjem uticaju vrste rastvarača na visokom i niskom nivou stepena usitnjenosti. U ekstraktima dobijenim iz droge sa stepenom usitnjenosti 2000 (viši nivo faktora), prinos ekstrakta je bio za 6,9 % niži kada se koristio rastvarač etilacetat : etanol (9:1), u odnosu kada je korišćen rastvarač etilacetat : etanol 5:5. Međutim, u ekstraktima dobijenim iz droge stepena usitnjenosti 710 (niži nivo faktora), na višem nivou rastvarača etilacetat : etanol 9:1, prinos ekstrakta je bio za 3,1 % niži nego na nivou rastvarača etilacetat : etanol 5:5. Očigledno je da postoji

interakcija ova dva faktora i da će efekat vrste rastvarača na nižem nivou biti veći, pa će prinos ekstrakta biti za 1,9% manji. Pareto karta (slika 4.10.) standardizovanih efekata faktora pokazuje da nijedan faktor, ni interakcija nije statistički značajan (95% nivo značajnosti). Vrednosti efekata faktora na Pareto karti nisu iste kao vrednosti faktora u tabeli 4.11, ali su u korelaciji.



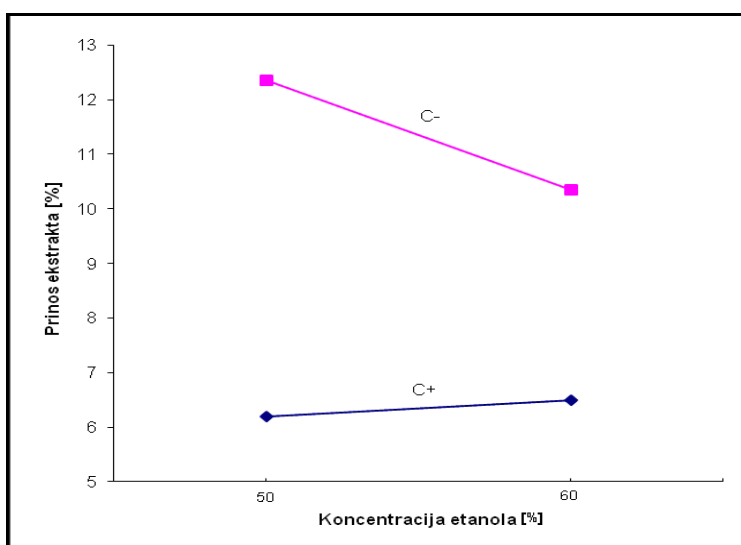
Slika 4.10 Pareto karta prikazuje standardizovanu ocenu efekata faktora ekstrakcije na prinos suvog ekstrakta *H. flos* (biološki izvor: *H. plicatum* DC.)

Na slici 4.11 - 4.13 dat je prikaz interakcije faktora u procesu ekstrakcije i ukazuje na to da su svi faktori interagujući u odnosu na prinos ekstrakcije.



Slika 4.11 Interakcija između stepena usitnjenosti biljne droge (faktor A) i vrste ekstragensa (faktor B) za viši nivo faktora- „2000“ (A⁺) i niži nivo faktora „710“ (A⁻) i njihov uticaj na prinos ekstrakta (%)

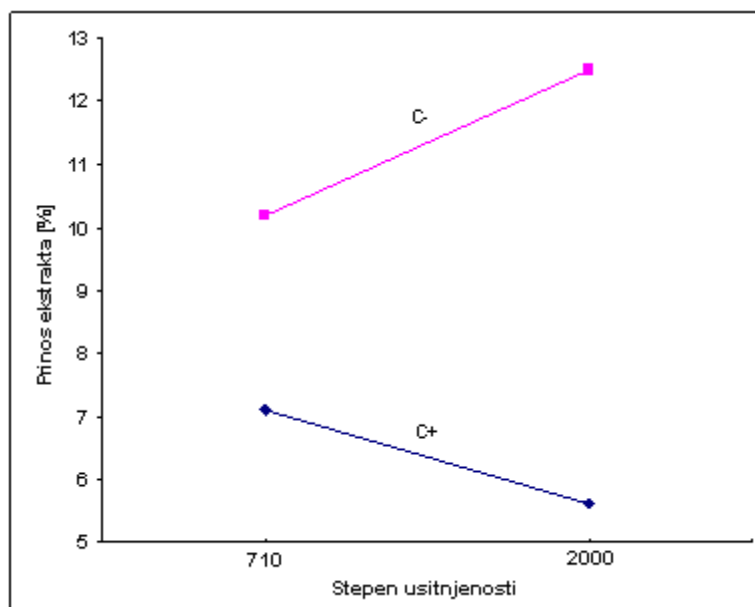
Na slici 4.11 se vidi interakcija između stepena usitnjenosti biljne droge (faktor A) i vrste ekstragensa (koncentracije etanola) (faktor B). Kada je za ekstrakciju korišćen 50% etanol (ekstragens) prinos ekstrakta je veći za viši nivo faktora A (A^+), odnosno „2000“ nego kada je stepen usitnjenosti na nižem nivou (A^-) i to „710“. Kada je za ekstrakciju korišćen 60% etanol (ekstragens) prinos ekstrakta je niži za viši nivo faktora A (A^+), odnosno „2000“ nego za stepen usitnjenosti na nižem nivou (A^-) i to „710“. Iz ovoga se vidi interakcija faktora A i B i jači uticaj faktora B % etanola na prinos suvog ekstrakta.



Slika 4.12 Interakcija između vrste rastvarača za re-ekstrakciju (etilacetat:etanol) (faktor C) i vrste ekstragensa (koncentracije etanola) (faktor B) za viši (C^+) i niži (C^-) nivo faktora C i njihov uticaj na prinos ekstrakta (%)

Na slici 4.12 se vidi interakcija između vrste ekstragensa (% etanola) (faktor B) i vrste rastvarača za re-ekstrakciju (etilacetat:etanol) (faktor C). Kada je za ekstrakciju korišćen 50% etanol (ekstragens) prinos ekstrakta je veći za niži nivo faktora C (C^-), odnosno etilacetat : etanol 5:5, nego kada je rastvarač za re-ekstrakciju na višem nivou (C^+) i to etilacetat : etanol 9:1. Kada je za ekstrakciju korišćen 60% etanol (ekstragens) prinos ekstrakta je, takođe, veći za niži nivo faktora C (C^-), odnosno etilacetat : etanol 5:5, nego kada je rastvarač za re-ekstrakciju na višem nivou (C^+) i to etilacetat : etanol 9:1. Iz ovoga se vidi interakcija faktora B i C i jači uticaj faktora C na prinos ekstrakta (%).

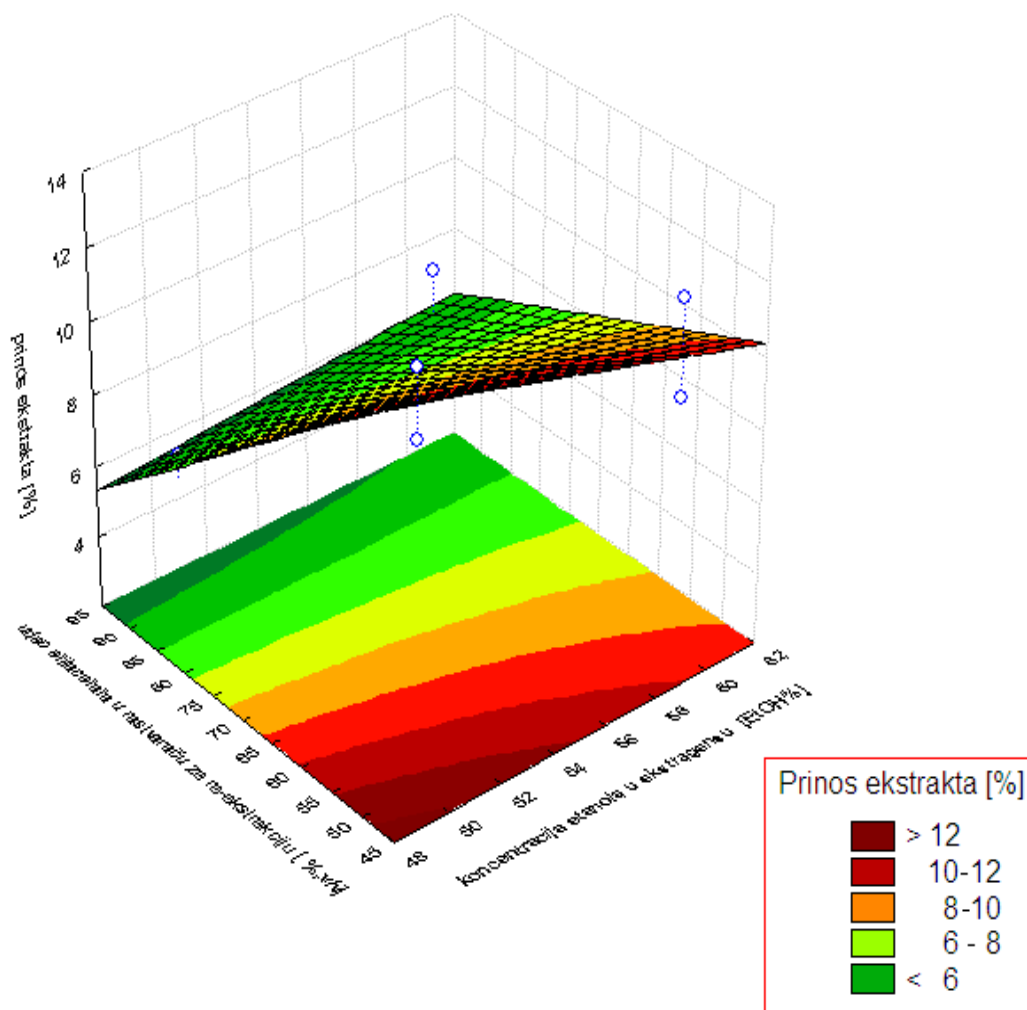
Na slici 4.13 se vidi interakcija između stepena usitnjenosti biljne droge (faktor A) i vrste rastvarača za re-ekstrakciju (etilacetat:etanol) (faktor C) Kada je za ekstrakciju korišćen 50% etanol (ekstragens) prinos ekstrakta je veći za niži nivo faktora C (C^-), odnosno etilacetat : etanol 5:5, nego kada je rastvarač za re-ekstrakciju na višem nivou (C^+) i to etilacetat : etanol 9:1. Kada je za ekstrakciju korišćen 60% etanol (ekstragens) prinos ekstrakta je, takođe, veći za niži nivo faktora C (C^-), odnosno etilacetat : etanol 5:5, nego kada je rastvarač za re-ekstrakciju na višem nivou (C^+) i to etilacetat : etanol 9:1. Iz ovoga se vidi interakcija faktora A i C i jači uticaj faktora C na prinos ekstrakta (%).



Slika 4.13 Interakcija između stepena usitnjenosti biljne droge (faktor A) i vrste rastvarača za re-ekstrakciju (etilacetat:etanol) (faktor C) za viši (C^+) i niži (C^-) nivo faktora C i njihov uticaj na prinos ekstrakta (%)

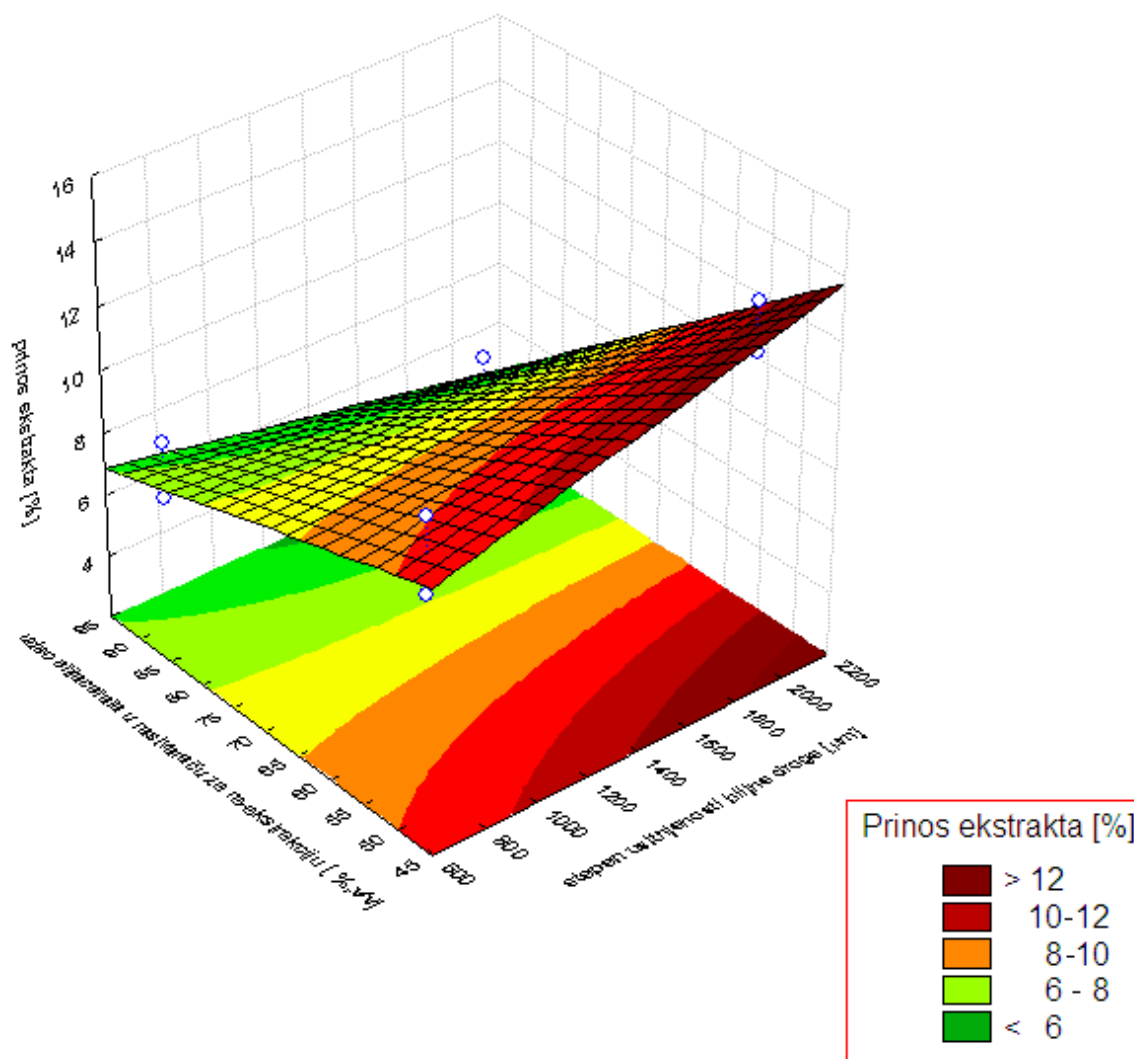
Optimizacija procesa ekstrakcije u cilju dobijanja većeg prinosa ekstrakta

Rezultati ispitivanja uticaja tri faktora koji su varirani u procesu ekstrakcije doprinose definisanju optimalnih uslova za izvođenje ekstrakcije. Na slikama 4.14-4.16 mogu se videti površine odgovora gde se može locirati optimalna zona izvođenja ekstrakcije. Površina prinosa suvog ekstrakta na slici 4.14 pokazuje da prinos suvog ekstrakta raste u zonama u kojima se smanjuje udeo etilacetata u rastvaraču za re-ekstrakciju i u kojima se smanjuje koncentracija etanola u ekstragensu.



Slika 4.14 Površina prinosa ekstrakta *H. flos* (biološki izvor *H. plicatum* DC.) sa faktorima B (koncentracija etanola) i C (udeo etilacetata u rastvaraču za re-ekstrakciju)

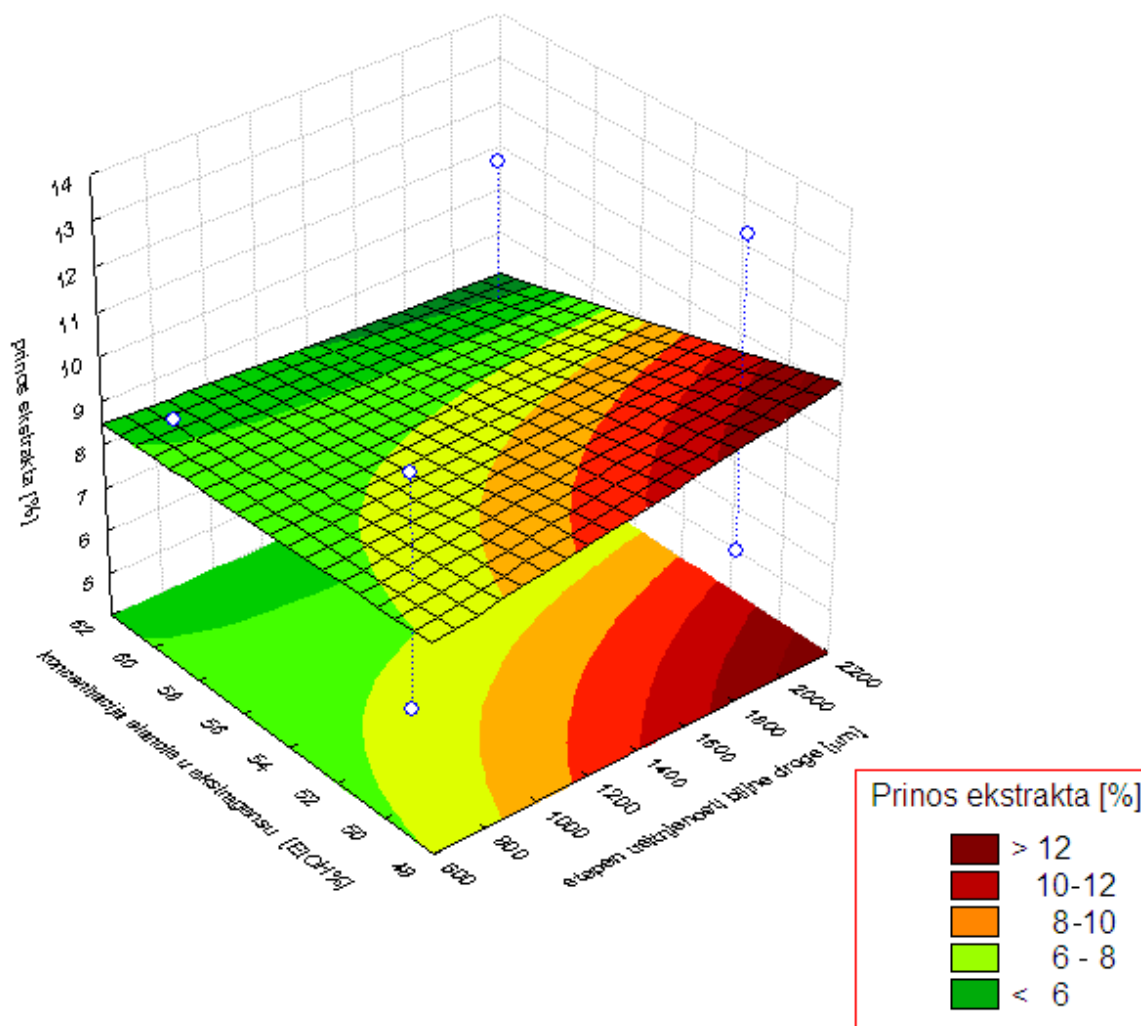
Površina prinosa suvog ekstrakta na slici 4.15 pokazuje da prinos suvog ekstrakta raste u zonama u kojima se smanjuje udeo etilacetata u rastvaraču za re-ekstrakciju i kako se ide ka veličini čestica od 2000 μm u biljnoj drogi. Površina prinosa suvog ekstrakta na slici 4.16 pokazuje da prinos suvog ekstrakta raste u zonama u kojima se smanjuje koncentracija etanola i kako se povećava udeo frakcije od 2000 μm u biljnoj drogi.



Slika 4.15 Površina prinosa ekstrakta *H. flos* (biološki izvor *H. plicatum* DC.) sa faktorima A (stepen usitnjenosti biljne droge) i C (udeo etilacetata u rastvaraču za re-ekstrakciju)

Veći prinos ekstrakta se dobija u procesu ekstrakcije droge stepena usitnjenosti 2000 (53-57% frakcije 355-2000 μm) sa ekstragensom 50% etanolom i rastvaračem za re-ekstrakciju etilacetat : etanol (5:5).

Optimizacija procesa ekstrakcije u cilju većeg prinosa ekstrakta se primenjuje kada u ekstraktu nisu poznate aktivne supstance, nego se sadržaj celokupnog ekstrakta smatra aktivnom supstancom.



Slika 4.16 Površina prinosa ekstrakta *H. flos* (biološki izvor *H. plicatum* DC.) sa faktorima A (stepen usitnjenosti) i B (koncentracija etanola)

U optimizaciji procesa ekstrakcije u cilju dobijanja većeg prinosa ekstrakta u drugim polifenolnim biljnim vrstama, korišćen je sličan metod i dizajn eksperimenta i dobijeni rezultati ukazuju na slične optimalne uslove izvođenja (Kukula-Koch *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2011).

4.4. Rezultati hemijske karakterizacije suvih ekstrakata *Helichrysi flos* (biološki izvor *H. plicatum* DC.)

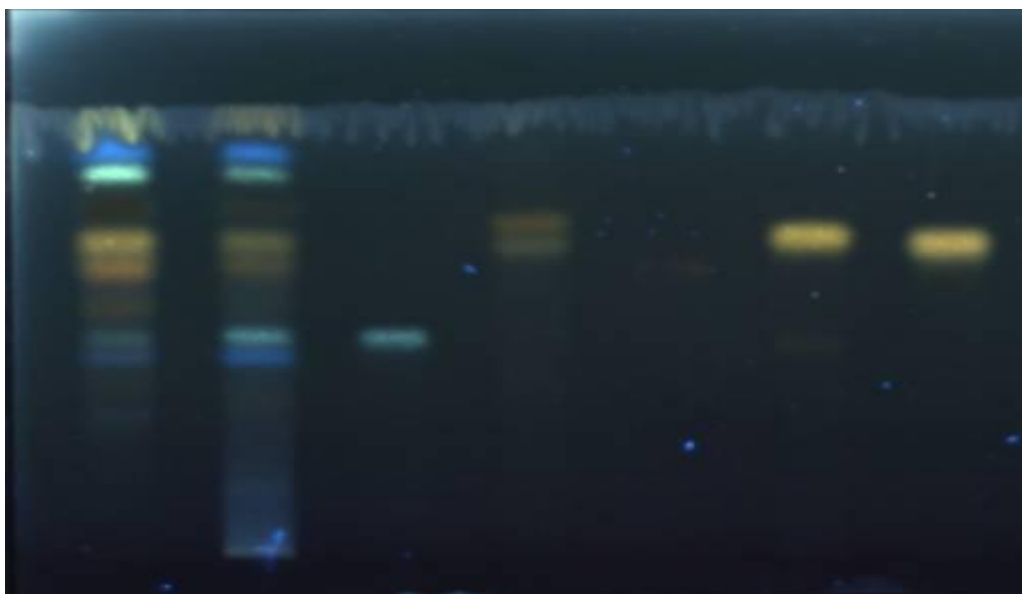
4.4.1. Rezultati HPTLC fingerprintne analize glikozida i aglikona flavonoida droge/ekstrakta uz primenu standarda glikozida i aglikona

4.4.1.1. Rezultati HPTLC fingerprintne analize glikozida flavonoida droge/ekstrakta uz primenu standarda glikozida

Kvalitet biljnih droga i proizvoda na bazi biljaka se ispituje korišćenjem različitih testova kojima se utvrđuje identifikacija, čistoća i sadržaj karakterističnih aktivnih komponenti u datim uzorcima. Pored makroskopskih i mikroskopskih testova, identifikacija biljnih droga i ekstrakata se vrši hromatografskim tehnikama, kao što su tankoslojna, tečna ili gasna hromatografija. Visokoeffikasna tankoslojna hromatografija (HPTLC) se zbog svoje osetljivosti, jednostavnosti korišćenja, mogućnosti testiranja više uzoraka istovremeno kao i niskih operativnih troškova, u poslednje vreme sve više koristi kao tehnika izbora za kvalitativnu i kvantitativnu analizu aktivnih komponenti u biljnim uzorcima. Zbog toga je ova metoda korišćena za fingerprintnu karakterizaciju flavonoidnih glikozida u uzorcima droge i ekstrakta *H. flos* (biološki izvor *H. plicatum*). Na pločicu su nanete različite zapremine pripremljenog rastvora suvog ekstrakta, ekstrakt biljne droge i rastvori standarda i to sledećim redom: 1) rastvor suvog ekstrakta, (2) ekstrakt biljne droge, 3) hlorogenska kiselina, 4) naringenin-7-glukozid, 5) kvercetin-3-glukozid, 6) kempferol-3-glukozid, 7) apigenin-7-glukozid. HPTLC hromatogram je prikazan na slici 4.17.

Opis pločice:

Test rastvori ekstrakta (traka 1) i droge (traka 2) pokazuju žuto-narandžaste i žuto-zelene zone karakteristične za flavonske glikozide (R_f od 0,6-0,8), i fluorescentno plave zone karakterisitične za fenolne kiseline. Naringenin-7-glukozid (traka 4) i kvercetin-3-glukozid (traka 5) su žuto-narandžaste i nalaze se na R_f 0,71 odnosno 0,62. Traka 6 (R_f 0,68) i traka 7 (R_f 0,67) fluoresciraju žuto-zeleno i predstavljaju kempferol-3-glukozid odnosno apigenin-7-glukozid. Svetlo plava zona na R_f 0,47 pripada hlorogenskoj kiselini (traka 3). Na osnovu izgleda HPTLC pločice za ekstrakt (1) i drogu (2), oba uzorka sadrže ispitivane glikozide, vrlo su slične i pokazuju da potiču od iste biljne vrste.



Slika 4. 17 Prikaz HPTLC pločice : ekstrakt (1); droga (2); hlorogenska kiselina (3); naringenin-7-glukozid (4); kvercetin-3-glukozid (5), kempferol-3-glukozid (6), apigenin-7-glukozid (7)

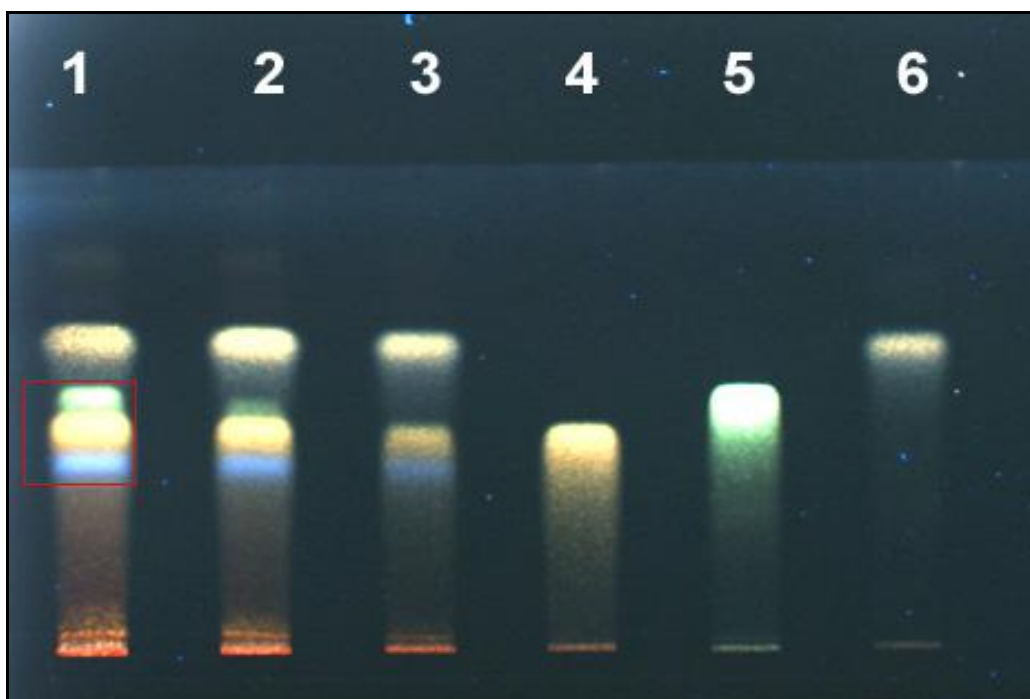
Na osnovu dobijenih rezultata, može se zaključiti da je HPTLC tehnika veoma pogodna za brzu i pouzdanu hemijsku karakterizaciju kako biljne droge *H. flos* (biološki izvor *H. plicatum*), tako i ekstrakata dobijenih u različitim fazama procesa ekstrakcije.

4.4.1.2. Rezultati HPTLC fingerprintne analize aglikona ekstrakta uz primenu standarda aglikona

Na pločicu su nanete različite zapremine pripremljenog rastvora ekstrakta i rastvori standarda i to sledećim redom: 1) ekstrakt (5 μ l), 2) ekstrakt (2,5 μ l), 3) ekstrakt (1 μ l), 4) apigenin, 5) kempferol, 6) naringenin. HPTLC hromatogram je prikazan na slici 4.18.

Opis pločice:

Dužina fronta razvijanja hromatograma je 80 mm. Uočavaju se po UV lampom na 366 nm sledeće zone standardnih supstanci : zona apigenina - intezivno žuta ka oker fluorescencija, R_f vrednost oko 0,46 (traka 4), kempferol- zelenkasto do svetlo- žuta fluorescencija, R_f približno 0,54, (traka 5) , naringenin – blede- žuta fluorescencija , R_f vrednost oko 0,66 (traka 6).



Slika 4. 18 Prikaz HPTLC pločice : ekstrakt (5 μ l) (1); ekstrakt (2,5 μ l) (2); ekstrakt (1 μ l) (3); apigenin(4); kempferol (5), naringenin (6)

Postoje razlike u uzorcima ekstrakata (1-3) koje potiču od razlike u koncentracijama. Takođe je primetno u svim koncentracijama ekstrakata i prisustvo svetlo plavo fluorescentne zona na R_f oko 0,41, koja, najverovatnije, pripada fenol karbonskim kiselinama, koje su prisutne u drogi *Helichrysi flos*. HPTLC metodom, detektovani su flavonoidi: apigenin, kempferol i naringenin u uzorku suvog ekstrakata br.1. HPTLC postupak, uz primenu standarda apigenina, kempferola i naringenina, je brz i efikasan metod kvalitativne analize koji se može primeniti kako za identifikaciju biljne droge *H. plicatum* tako i u međufaznoj i finalnoj identifikaciji ekstraktivnih preparata dobijenih od nje. U literaturi nije pronađen opis HPTLC fingerprinta biljne droge *Helichrysi flos* (biološki izvor *H. Plicatum* DC.).

4.4.2. Rezultati tentativne LC-UV-MS analize biljne droge/ekstrakta

Tentativna LC-UV-MS analiza je izvršena na ekstraktima cvasti smilja i prečišćenom suvom ekstraktu dobijenom od *H. flos* (biološki izvor *H. plicatum* DC.)(ekstrakt br. 1).

Na slici 4.19 prikazan je LC-UV-MS hromatogram prečišćenog ekstrakta (metoda opisana u odeljku 3.3.1.) dobijenog precizno definisanim kompleksnim postupkom ekstrakcije i na slici 4.20 hromatogram jednostavnog ekstrakta cveta *H. flos* (biološki izvor *H. plicatum* DC.) od kojeg je izrađen ekstrakt. Kao što se vidi sa hromatograma suvog ekstrakta, prisutno je 18 dobro razdvojenih i kvalitativno identifikovanih pikova jedinjenja, isključivo polifenolne prirode. Uočavaju se dve glavne grupe polifenola, flavonoidi i fenilkarbonske kiseline. Flavonoidi su zastupljeni sa četiri grupe jedinjenja i to: flavanoni (naringenin i njegovi derivati), zatim flavonoli (derivati kvercetina i kempferola), flavoni (derivati apigenina i luteolina) i halkoni (izosalipurpozid), dok su derivati fenilkarbonskih kiselina predstavljeni hlorogenskom kiselinom i cinarinom. Pikovi na hromatogramu obeleženi su brojevima, koji imaju sledljivost u tabeli 4.12 i u prikazu formula (slika 4.21) i upućuju na ime komponente, dok boja pika označava pripadnost komponente hemijskoj grupi jedinjenja.

Pik **1** i **6** pripadaju hlorogenskoj kiselini odnosno cinarinu. Hlorogenska kiselina (**1**), identifikovana je u mnogim vrsta roda *Helichrysum* pa i u vrsti *H. arenarium* (Czinner *et al.*, 2002). Po literaturnim podacima jedinjenje cinarin (**6**), nije detektovan ni u jednoj vrsti roda *Helichrysum*.

Na hromatogramu dominantan je crveno obojen flavanonski kompleks, koji čine naringenin i njegovi derivati. Najdominantniji derivati su naringenin-4'-O-glukozid (**3**) i naringenin-5-O-glukozid (**4**), koji su prvi put izolovani u vrsti *H. arenarium* (Meričli *et al.*, 1986; Czinner *et al.*, 2002). Pažnju privlači pik broj **2** (naringenin derivat*), koji se prvi put pojavljuje u rodu *Helichrysum*. Ovaj derivat naringenina ima 2 puta veću masu (M-868), nego naringenin glukozidi. U naringeninski kompleks spada i naringenin aglikon (**15**) i njegov 7-O-glukozid (**7**). Ova grupa jedinjenja je odgovorna za holagorno delovanje smilja zajedno sa isosalipurpozidom (**13**), čije je prisustvo u rodu *Helichrysum* identifikovano od strane italijanskih naučnika (Pietta *et al.*, 1991).

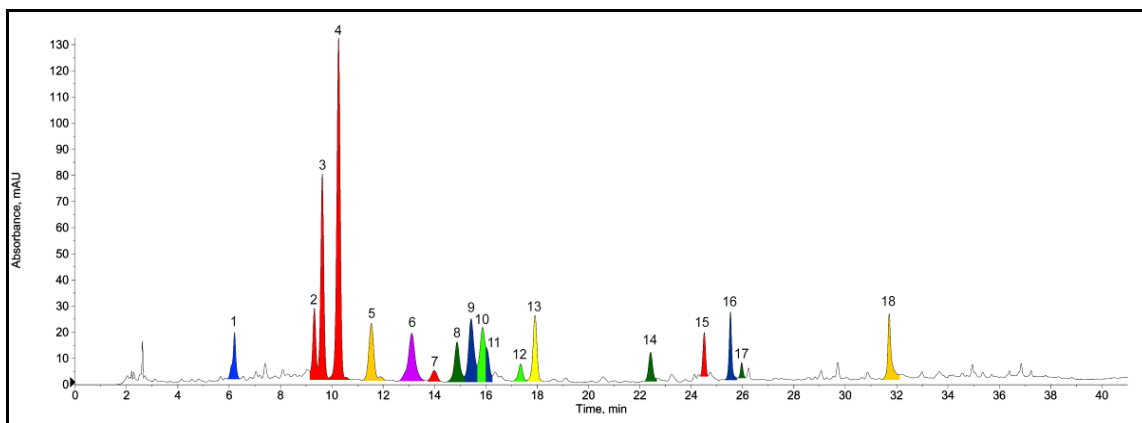
Flavonolni kompleks je predstavljen derivatima kvercetina (**18**) i njegovog 3-O-glukozida (**5**), kao i kempferolom (**14**), metilkempferolom (**17**) kao i njegovim 3-O-glukozidom (**8**).

Flavonski kompleks sadrži apigenin (**16**) i njegove 4'- i 7-O glukozide (**11**, **9**), kao i Luteolin-4'-O-glukozid(**12**) i 7-O-glukozid (**10**).

U hromatogramu prečišćenog ekstrakta vidljivi su pikovi, koji nisu vidljivi na hromatogramu ekstrakta iz cveta (Slika 4.20) i to su : luteolin7-O-glukozid (**10**); Luteolin-4'-O-glukozid (**12**), kempferol (**14**), metilkempferolom (**17**) i kvercetin(**18**). Razlika u hromatogramima prečišćenog ekstrakta i jednostavnog ekstrakta cveta može se objasniti time da su navedene komponente u biljnoj drogi zastupljene u nižim koncentracijama i pojavljuju se tek prečišćavanjem ekstrakata.

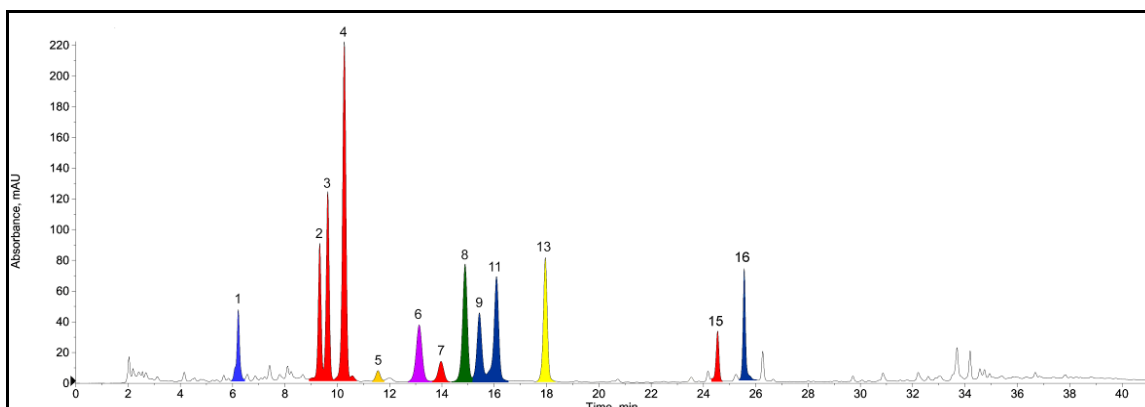
Prema podacima u literaturi nema LC-UV-MS analize za *H. flos* (biološki izvor: *H. plicatum* DC.), tako da je vršeno poređenje rezultata sa podacima u literaturi koji se odnose na *H. flos* (biološki izvor *H. arenarium* (L) Moench). Prema podacima u literaturi u *H. flos* (biološki izvor *H. arenarium* L) Moench) primenom LC-UV-MS metode identifikovano je 10 jedinjenja: hlorogenska kiselina, naringenin-4'-O-glukozid, naringenin-5-O-glukozid, kvercetin-3-O-glukozid, kempferol-3-O-glukozid, a apigenin-7-O-glukozid, izosalipurpozid, naringenin, apigenin i kempferol (Czinner *et al.*, 2002).

Ovakav hemijski profil ekstrakata i droge *H. flos* (biološki izvor *H. plicatum* DC.), ukazuje na veliku sličnost sa oficinalnom vrstom *H. arenarium* (L.) Moench, a istovremeno i na razlike, koja hemotaksonomski odvaja *H. plicatum* od *H. arenarium*. Kvalitativna LC-UV-MS tehnika je brz i pouzdan metod za identifikaciju pikova jedinjenja polifenolnog kompleksa u ovoj drogi.



Slika 4.19 LC-UV-MS hromatogram suvog ekstrakta *H. flos* (biološki izvor *H. plicatum* DC.), uzorak br 1

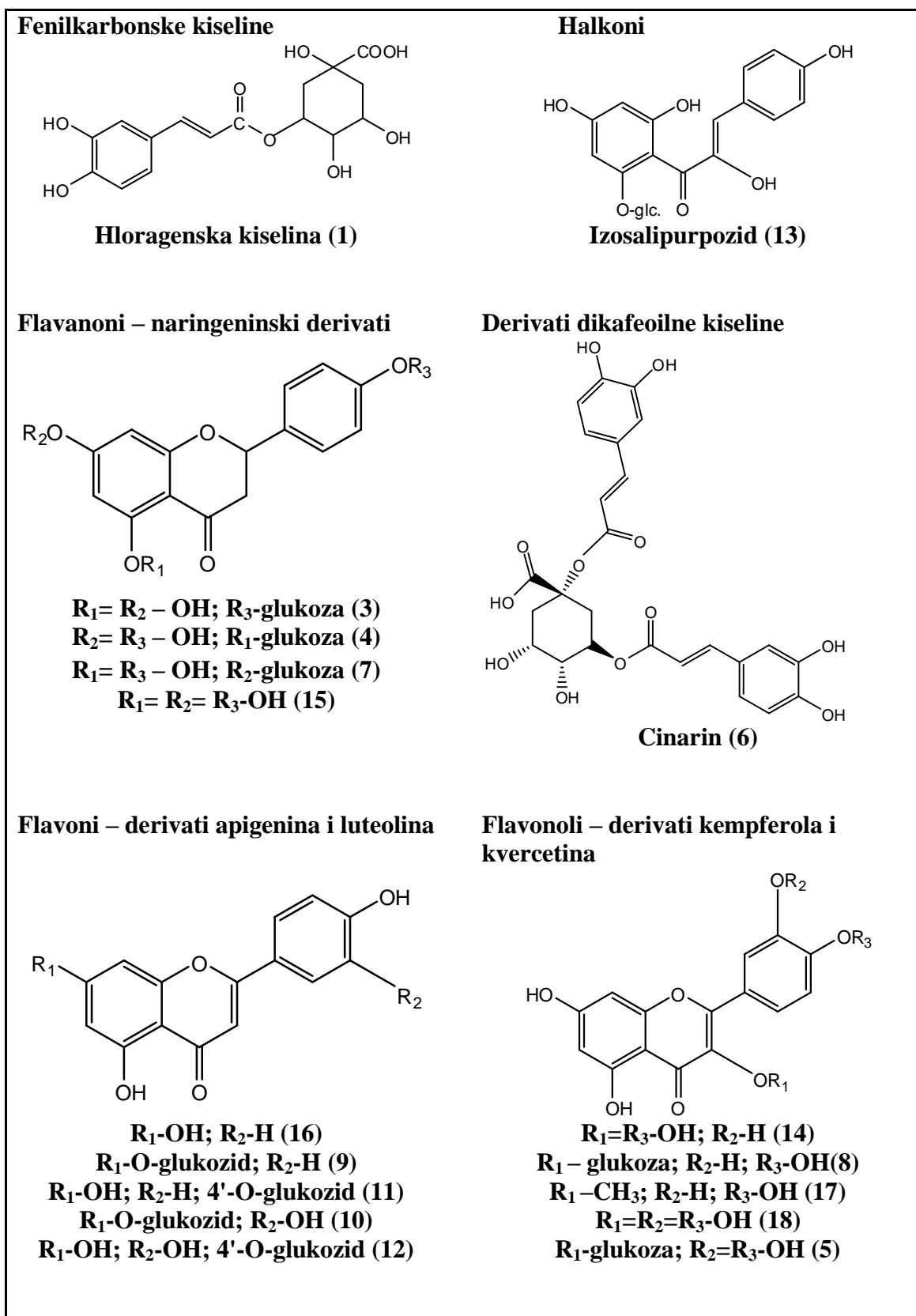
Legenda bojenih pikova



Slika 4. 20. LC-UV-MS hromatogram biljne droge *H. flos* (biološki izvor *H. plicatum* DC.) od koje je izrađen suvi ekstrakt

Tabela 4.12 Tentativna identifikacija komponenti u suvom ekstraktu (uzorak br. 1) i drogi *H. flos* (biološki izvor *H. plicatum* DC.), cvasti smilja, korišćenjem LC-UV- MS tehnike

Pik br.	Jedinjenje	t _r (min)	[M]	[M-1] ⁻ (m/z)	[M+35] ⁻ (m/z)	[M+45] ⁻ (m/z)	UV λ _{max} (nm)
1	Hlorogenska kiselina	6.21	354	353	388	398	242,310,326
2	Naringenin derivat	9.32	868	867	903	913	232, 294
3	Naringenin-4'-O-glukozid	9.63	434	433	469	479	230,289
4	Naringenin-5-O-glukozid	10.26	434	433	469	479	228,280
5	Kvercetin-3-O-glukozid	11.54	464	465	499	509	256,262 _(r) ,310 _(r) ,350
6	Dikafeoilhina kiselina derivat (Cinarin)	13.11	516	515	551	561	246,308 _(r) ,328
7	Naringenin derivat (7 o -glukozid)	13,99	434	433	469	479	284
8	Kempferol-3-O-glukozid	14,88	448	447	483	493	254 _(r) ,266,308 _(r) ,346
9	Apigenin-7-O-glukozid	15,42	432	431	467	477	265,300 _(r) ,338
10	Luteolin-7-O-glukozid	15,87	448	447	483	493	258 _(r) ,268,338
11	Apigenin -4'-O-glukozid	16,05	432	431	467	477	268,328
12	Luteolin-4'-O-glukozid	17,36	448	447	483	493	249 _(r) ,268,336
13	Isosalipurpozid	17,92	434	433	469	479	234,370
14	Kempferol	22,42	286	285	321	331	252,258 _(r) ,348
15	Naringenin	24,51	272	271	307	317	288
16	Apigenin	25,53	270	269	305	315	268,306 _(r) ,338
17	Metilkempferol	25,97	300	299	335	345	250,268,348
18	Kvercetin	31,71	302	301	337	347	258 _(R) ,278, 374



Slika 4.21 Hemijske formule jedinjenja identifikovanih LC-UV-MS metodom u suvom ekstraktu (uzorak br. 1) i drogi *H. flos* (biološki izvor *H. plicatum* DC.)

4.4.3. Rezultati određivanja sadržaja ukupnih fenola

Fenolna jedinjenja predstavljaju jednu od najrasprostranjenijih grupa sekundarnih metabolita biljaka. U svojoj strukturi imaju jednu ili više hidroksilnih grupa vezanih direktno za aromatično jezgro. Do sada je identifikovano preko 8000 fenolnih jedinjenja, od jednostavnih sa jednim aromatičnim prstenom, do polimernih kompleksnih tanina i drugih složenih polifenolnih struktura (Crozier *et al.*, 2006). Fenolna jedinjenja, među njima i flavonodi i fenolne kiseline pokazuju antioksidativnu (Braca *et al.*, 2002; Lekse *et al.*, 2001) i antiradikalisku (Alvarez *et al.*, 2002) aktivnost *in vitro*. Postoje dokazi da fenolna jedinjenja *in vivo* mogu delovati kao antioksidansi i protiv slobodnih radikala (Mojzisova *et al.*, 2001). Takođe, mogu usporiti procese starenja (Halliwell *et al.*, 1999), razvoj hroničnih oboljenja kao što su ateroskleroza (Miura *et al.*, 2001), kardiovaskularna oboljenja (Mojzisova *et al.*, 2001) i maligna oboljenja (Hirvonen *et al.*, 2001).

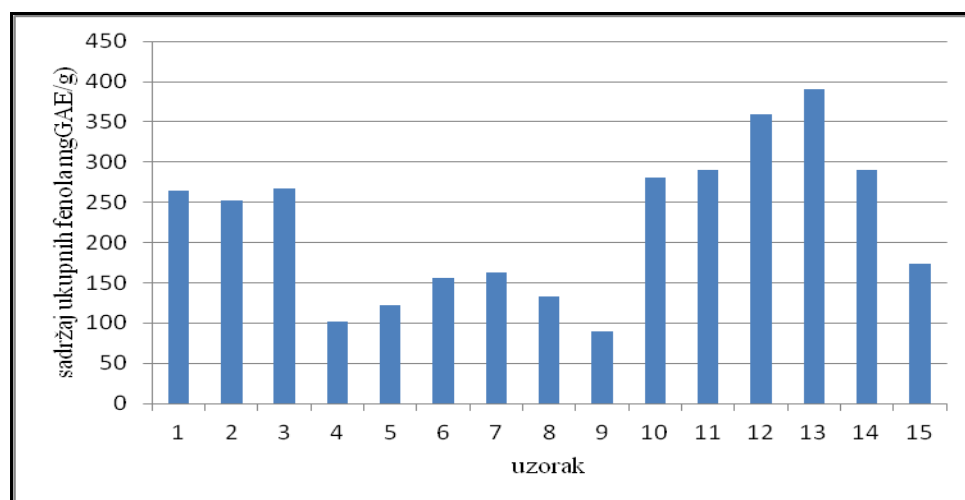
Sadržaj ukupnih fenola u suvim ekstraktima je određivan spektrofotometrijski na bazi reakcije sa Folin-Ciocalteu reagensom, a rezultati izraženi u milligram ekvivalent galne kiseline na gram suvog ekstrakta (mg GAE/g suvog ekstrakta).

Rezultati određivanja sadržaj ukupnih fenola u uzorcima ekstrakata 1-15 su se kretali od 89,6 mg GAE/g do 390,1 mg GAE/g suvog ekstrakta i prikazani su u tabeli br. 4.13 i na slici 4.22. Najveći sadržaj ukupnih fenola imaju uzorak br. 13 (390,1 mg GAE/g) i uzorak br.12 (359,8 mg GAE/g). Najmanji sadržaj ukupnih fenola ima uzorak br. 9 (89,6 mg GAE/g). Uzorci br.1-3, 10,11 imaju veći sadržaj ukupnih fenola (>250 mg GAE/g).

Takođe, rezultati pokazuju da uzorak br. 9 koji ima najmanji sadržaj ukupnih fenola (89,6 mg GAE/g), istovremeno ima i najveći prinos ekstrakta (13,3%). Obrnuto, uzorak br. 2 ima minimalni prinos ekstrakta (2,5%), a relativno visok sadržaj ukupnih fenola (252,3 mg GAE/g). Generalno, uzorci ekstrakta koji imaju dobre prinose ekstrakta (8,3-13,3%) imaju niži sadržaj ukupnih fenola (89,6 do 163,1 mg GAE/g), dok uzorci ekstrakata koji imaju prinose ekstrakta (6,5 i 7,0%) imaju najviši sadržaj ukupnih fenola (359,8 i 390,1 mg GAE/g).

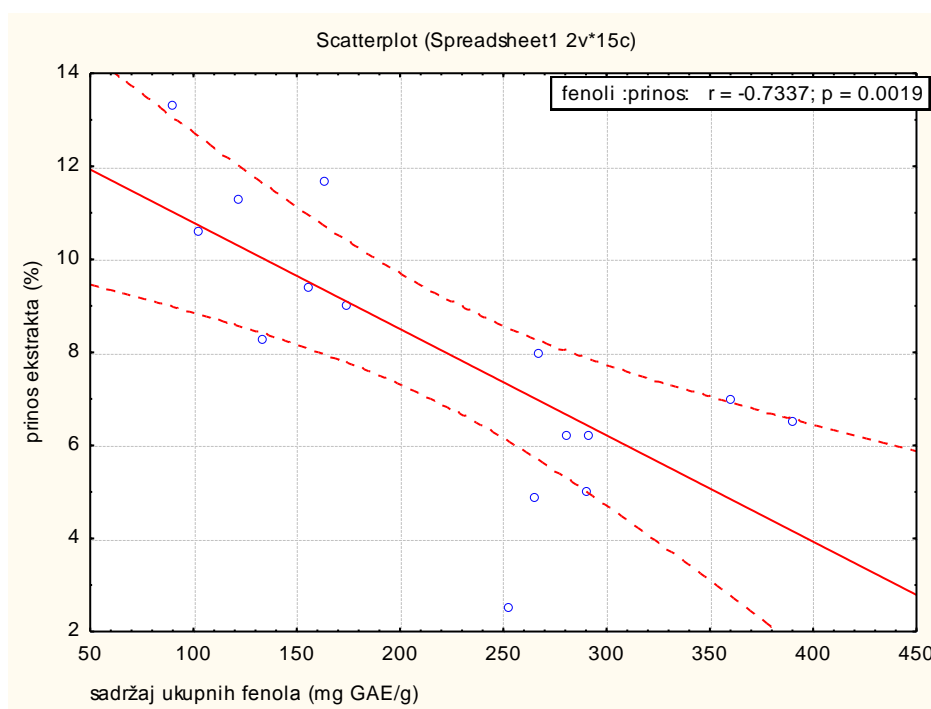
Tabela 4.13 Sadržaj ukupnih fenola i prinos suvih ekstrakata *H. flos* (biološki izvor *H. plicatum* DC.), uzorci 1-15

Broj uzorka	Stepen usitnjenosti	Ekstragens za ekstrakciju (% EtOH)	Ekstragens za reekstrakciju (EtOAc:EtOH)	Sadržaj ukupnih fenola (mg GAE/g)	Prinos ekstrakta (%)
1	710	40	9:1	264,6 ± 9,1	4,9
2	<i>in toto</i>	40	9:1	252,3 ± 8,9	2,5
3	710	60	9:1	266,9 ± 7,2	8,0
4	<i>in toto</i>	60	5:5	102,4 ± 6,1	10,6
5	710	50	5:5	121,6 ± 3,8	11,3
6	<i>in toto</i>	50	5:5	156,1 ± 5,6	9,4
7	2000	60	5:5	163,1 ± 2,6	11,7
8	2000	40	5:5	133,1 ± 2,5	8,3
9	2000	50	5:5	89,6 ± 1,4	13,3
10	710	50	9:1	280,4 ± 8,8	6,2
11	2000	50	9:1	290,8 ± 9,2	6,2
12	710	50	100:0	359,8 ± 3,5	7,0
13	2000	50	100:0	390,1 ± 9,3	6,5
14	2000	60	9:1	290,1 ± 6,9	5,0
15	710	60	5:5	173,9 ± 5,1	9,0

**Slika 4.22** Prikaz sadržaja ukupnih fenola (mg GAE/g) i prinosa suvih ekstrakata *H. flos* (biološki izvor *H. plicatum* DC.), (uzorci 1-15)

U procesu ekstrakcije koji daje visok prinos suvog ekstrakta (neselektivni ekstragens, kraće vreme ekstrakcije) ekstrahuju se i balastne materije i dobijeni ekstrakti imaju niži sadržaj aktivnih supstanci (analitičkih markera) za razliku od ekstrakata dobijenih selektivnijim rastvaračima u efikasnijim procesima ekstrakcije, koji imaju manji prinos, ali i veći sadržaj aktivnih supstanci (analitičkih markera).

U našim ispitivanjima utvrđeno je da postoji statistički značajna ($p < 0.01$) negativna korelacija između prinosa ekstrakta i sadržaja ukupnih fenola, sa koeficijentom korelacije je $r = -0,73$, što znači, da sa povećanjem prinosa ekstrakta, opada sadržaj ukupnih fenola u njemu i obrnuto (slika 4.23).



Slika 4.23 Korelacija sadržaja ukupnih fenola (mg GAE/g) i prinosa suvih ekstrakata *H. flos* (biološki izvor *H. plicatum* DC.), uzorci(1-15)

Albayrak *et al.*, (2010) su određivali sadržaj ukupnih fenola, (Folin-Ciocalteu metoda) u suvim ekstraktima dobijenim ekstrakcijom metanolom više vrsta biljaka iz roda *Helichrysum* i sadržaj ukupnih fenola je bio od 66,74 do 160,63 mg GAE/g. *H. plicatum* subsp. *plicatum* je sadržavao 87,36 mg GAE/g i *H. plicatum* subsp. *polyphyllum* 154,64 mg GAE/g, što je znatno niže od vrednosti koje su dobijene u ovom radu. *H. arenarium* subsp. *aucheri* je sadržao 115,76 mg GAE/g ukupnih fenola. Visok

prinos u ovom radu je očekivano viši od sadržaja ukupnih fenola koji su dobili drugi autori, jer je u toku procesa izrade ekstrakta primenjena re-esktrakcija u cilju prečišćenja ekstrakata i izdvajanja fenolnih komponenti.

Dobijeni prinosi ekstrakata u istom radu su bili znatno veći (8,00 - 33,36%) nego prinosi ekstrakata dobijenih u ovim ispitivanjima (5% - 13,3%), jer se radilo o neprečišćenim ekstraktima, za razliku od prečišćenih ekstrakata koji su dobijeni u ovom radu.

4.4.4. Rezultati određivanja sadržaja aglikona flavonoida naringenina, apigenina i kempferola, metodom tečne hromatografije

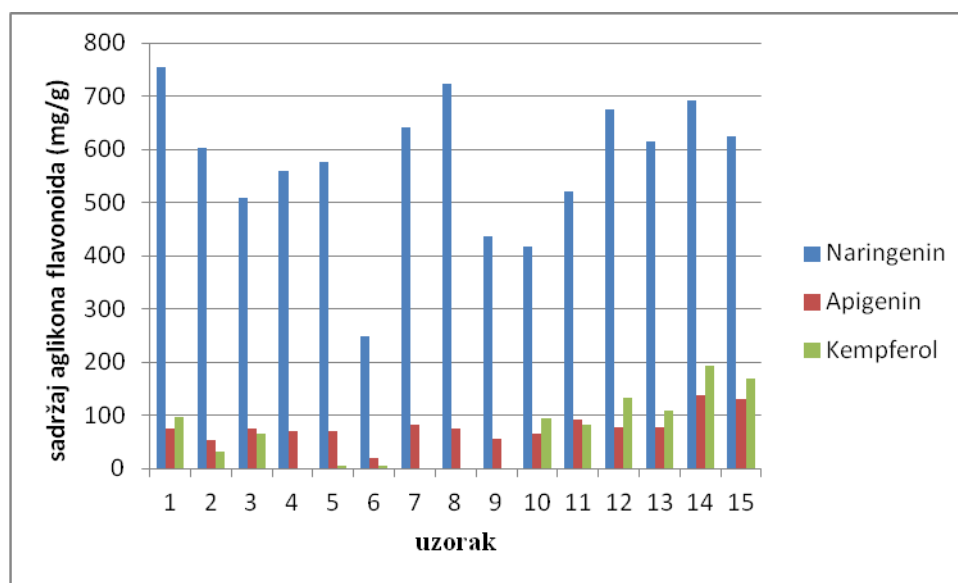
Određivanje sadržaja ukupnih fenola, određivanih Folin-Ciocalteu–om procedurom, ne daje potpunu sliku o kvalitetu i kvantitetu pojedinačnih fenolnih komponenti u ekstraktima (Wojdylo *et al.*, 2007). Zbog toga se pristupilo daljoj detaljnoj analizi flavonoida u hidrolizovanim i nehidrolizovanim uzorcima ekstrakata, koristeći metodu tečne hromatografije. Poređenjem retencionih vremena i UV spektara jedinjenja iz uzoraka sa retencionim vremenima i UV spektrima standarda, identifikovani i kvantifikovani su aglikoni glikozida flavonoida u hidrolizovanim i nehidrolizovanim uzorcima suvih ekstrakata.

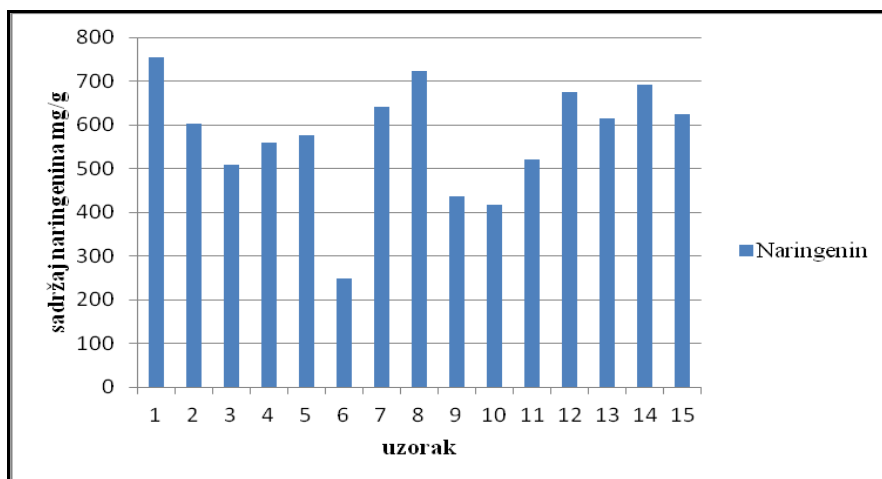
Prema dobijenim podacima u svim uzorcima ekstrakata *H. plicatum* identifikovani su i određeni sadržaji naringenina i apigenina, dok je kempferol identifikovan u svim uzorcima, a kvantifikovan u većoj količini, u deset uzoraka ekstrakata

Sadržaj naringenina u ekstraktima se kretao od 248,6 mg/g (uzorak br.6) do 754,7 (uzorak br. 1) mg/g suvog ekstrakta. Sadržaj apigenina u ekstraktima se kretao od 19,7 mg/g (uzorak br. 6) do 138,5 mg/g (uzorak br. 14). Sadržaj kempferola u ekstraktima u kojima je kvantifikovan kretao se od 4,5 (uzorak br. 6) do 193,9 (uzorak br. 14). Posebno se izdvajaju uzorci br. 12 i 13 u kojima je sadržaj kempferola > 100 mg/g suvog ekstrakta. Kempferol je detektovan u tragovima u uzorcima ekstrakata br.4, 6-9. Zbog velikog variranja sadržaja kempferola u uzorcima suvog ekstrakta neće se primeniti analiza uticaja faktora na sadržaj kempferola u suvom ekstraktu. Sadržaj naringenina, apigenina i kempferola prikazani su u tabeli 4.14 i na slikama 4.24-4.27. Sadržaj naringenina, apigenina i kempferola u svakom uzorku prikazanano je na slikama 4.28-4.30.

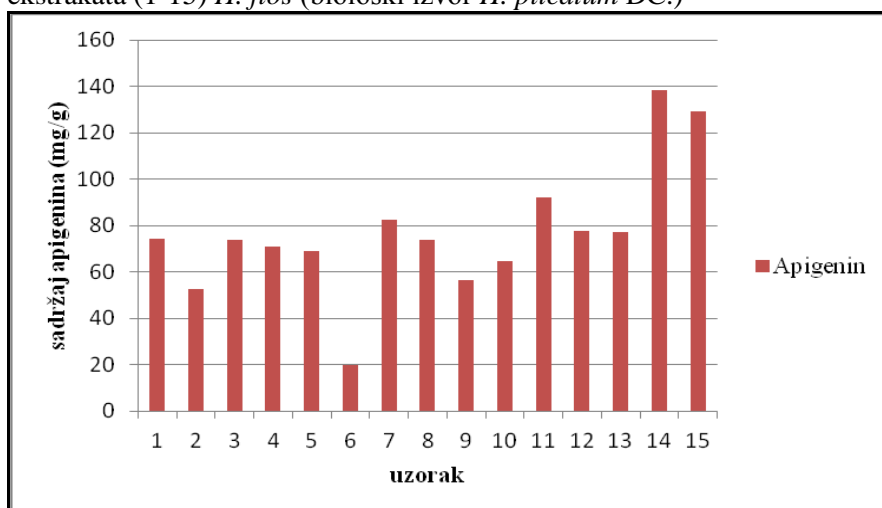
Tabela 4.14 Sadržaj aglikona flavonoida (mg/g) u hidrolizovanim uzorcima (1-15) suvih ekstrakata *H. flos* (biološki izvor *H. plicatum* DC.)

Broj uzorka	Stepen usitnjenosti	Ekstragens za ekstrakciju (% EtOH)	Ekstragens za reekstrakciju (EtOAc:EtOH)	Naringenin (mg/g)	Apigenin (mg/g)	Kempferol (mg/g)
1	710	40	9:1	754,7±8,8	74,4±2,1	96,6±3,6
2	<i>in toto</i>	40	9:1	601,6±5,4	52,5±1,8	31,2±1,4
3	710	60	9:1	508,8±4,2	74,0±2,8	65,1±2,7
4	<i>in toto</i>	60	5:5	558,9±5,1	70,9±2,3	T
5	710	50	5:5	576,4±3,8	69,0±2,2	5,6±0,2
6	<i>in toto</i>	50	5:5	248,6 ±2,3	19,7±2,0	4,5 ± 0,4
7	2000	60	5:5	640,1±4,9	82,6±3,0	T
8	2000	40	5:5	723,5±7,0	73,9±2,2	T
9	2000	50	5:5	436,5±3,3	56,5±2,0	T
10	710	50	9:1	418,1±3,2	64,7±1,9	94,6±3,1
11	2000	50	9:1	521,1±4,4	92,2±3,4	81,9±1,7
12	710	50	100:0	675,1±5,2	77,6±2,1	132,6±2,9
13	2000	50	100:0	614,2±6,0	77,3±1,7	108,7±3,3
14	2000	60	9:1	691,8 ±7,5	138,5±3,0	193,9±2,8
15	710	60	5:5	623,7± 6,9	129,2±3,2	168,0±1,9

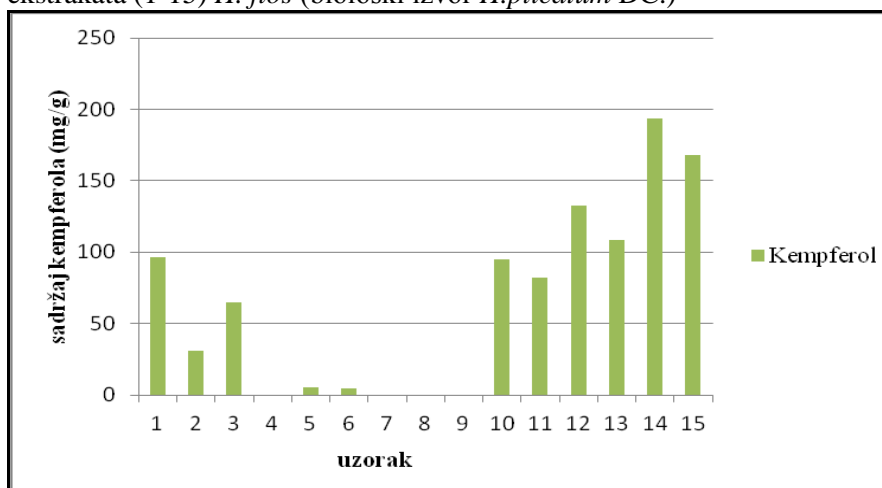
**Slika 4.24.** Sadržaj aglikona flavonoida (mg/g) u hidrolizovanim uzorcima (1-15) suvih ekstrakata *H. flos* (biološki izvor *H. plicatum* DC.)



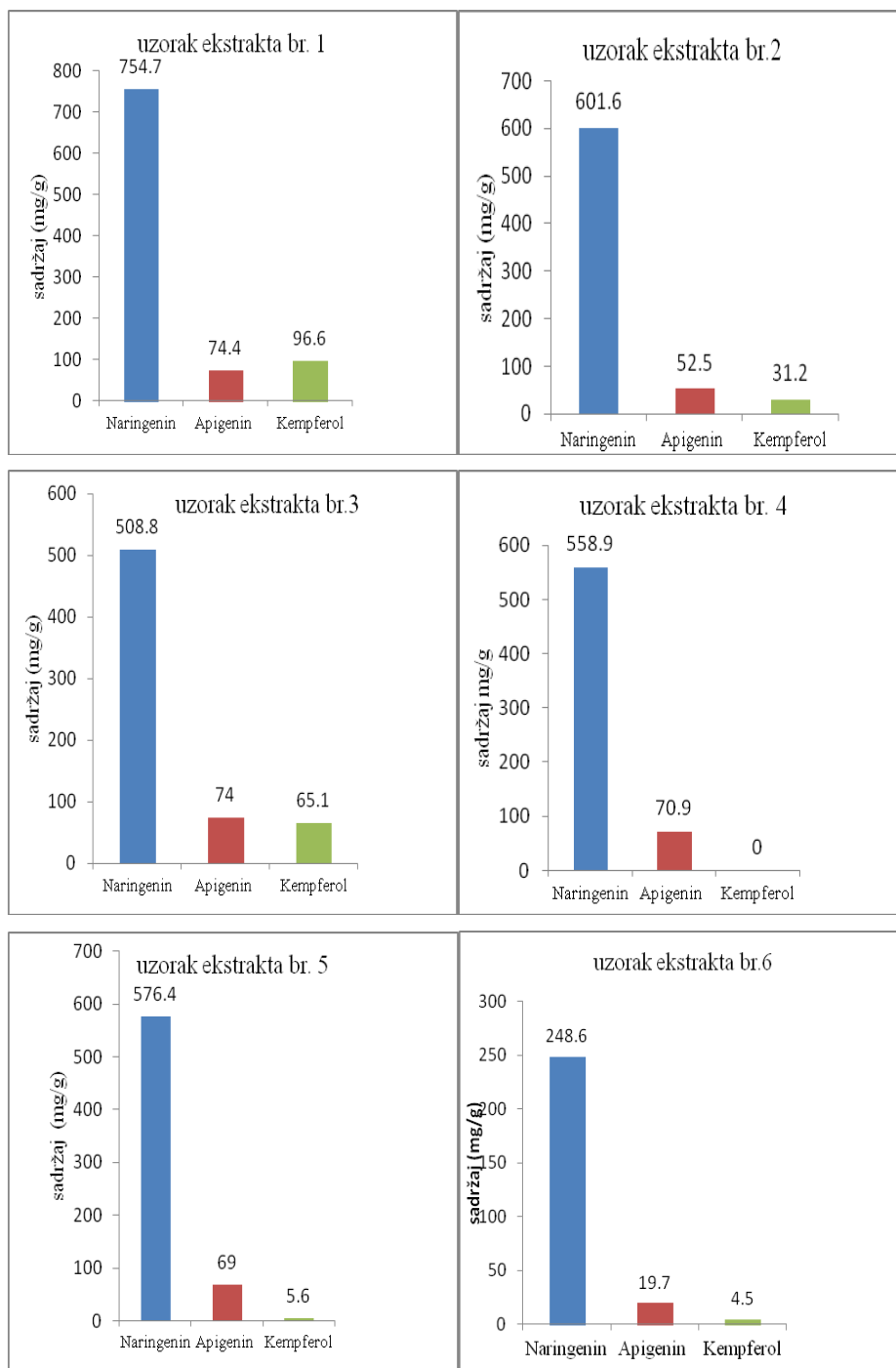
Slika 4.25 Sadržaj naringenina (mg/g) u hidrolizovanim uzorcima suvih ekstrakata (1-15) *H. flos* (biološki izvor *H. plicatum* DC.)



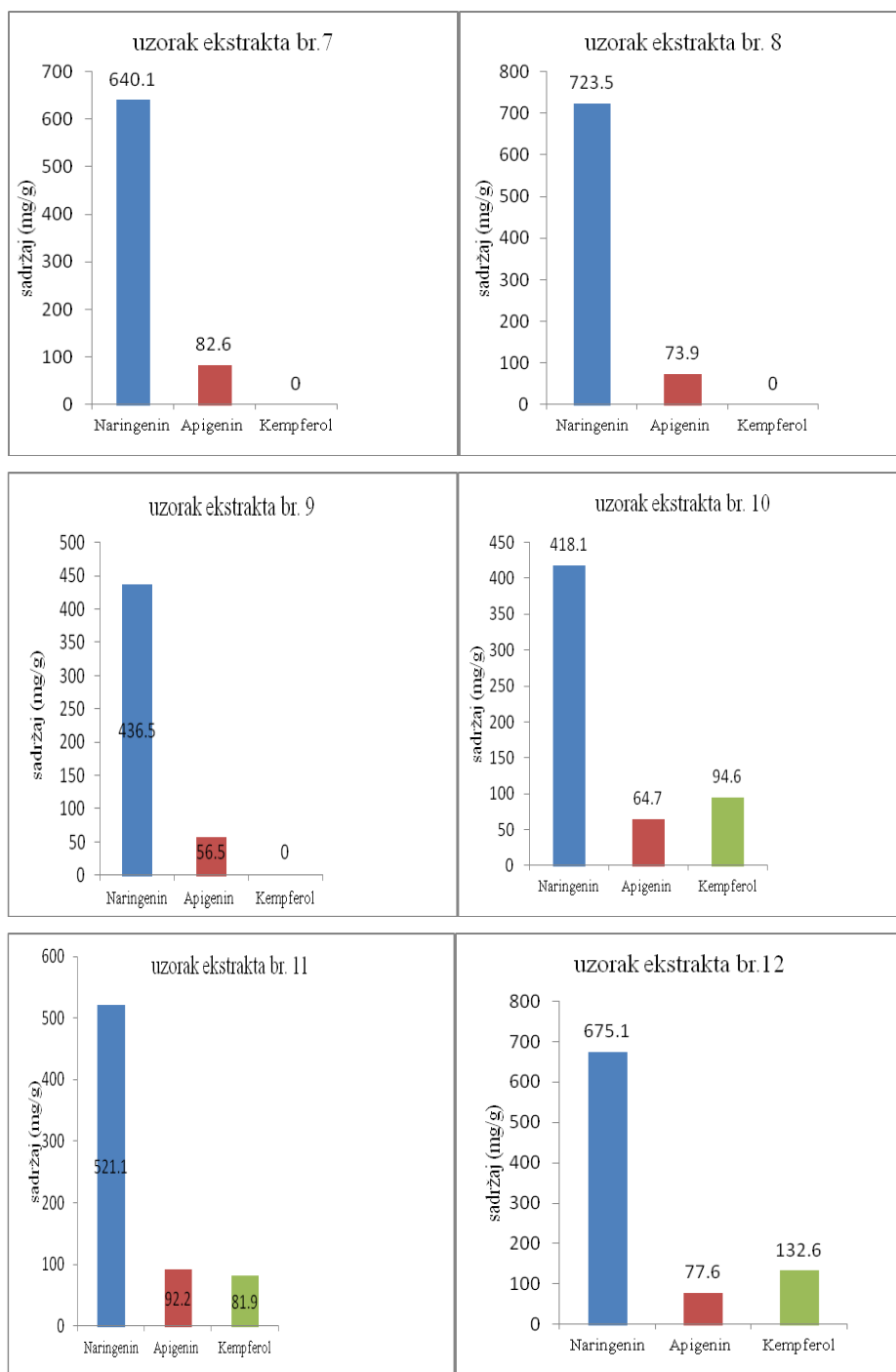
Slika 4.26 Sadržaj apigenina (mg/g) u hidrolizovanim uzorcima suvih ekstrakata (1-15) *H. flos* (biološki izvor *H. plicatum* DC.)



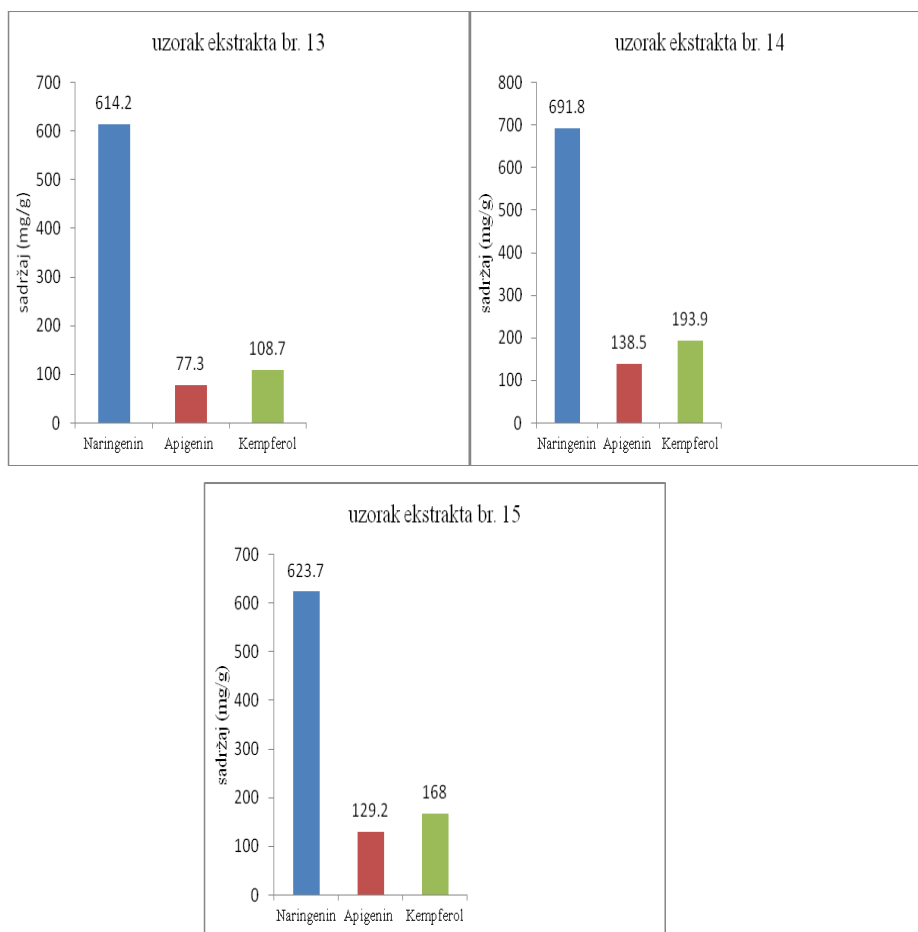
Slika 4.27 Sadržaj kempferola (mg/g) u hidrolizovanim uzorcima suvih ekstrakata (1-15) *H. flos* (biološki izvor *H. plicatum* DC.)



Slika 4.28 Sadržaj naringenina (mg/g), apigenina (mg/g), kempferola (mg/g) u uzorcima ekstrakata *H. flos* (biološki izvor: *H. plicatum* DC.) br. 1-6



Slika 4.29 Sadržaj naringenina(mg/g), apigenina(mg/g), kempferola (mg/g) u uzorcima ekstrakata *H. flos* (biološki izvor: *H. plicatum* DC.) br. 7-12



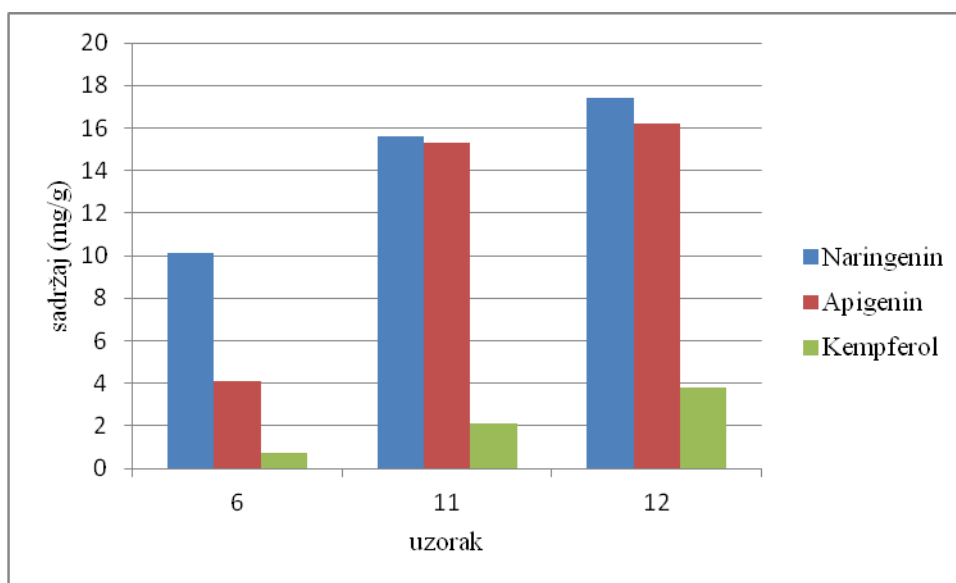
Slika 4.30 Sadržaj naringenina (mg/g), apigenina (mg/g), kempferola (mg/g) u uzorcima ekstrakata *H. flos* (biološki izvor *H. plicatum* DC.) br. 13-15

Kvantifikacija sadržaja aglikona flavonoida naringenina, apigenina i kempferola izvršena je i u nehrolizovanim uzorcima ekstrakata br. 6, 11 i 12. Rezultati su prikazani u tabeli br. 4.15 i na slici 4.31.

Tabela 4.15. Sadržaj aglikona flavonoida (mg/g suvog ekstrakta) u nehidrolizovanim uzorcima odabranih suvih ekstrakata *H. flos* (biološki izvor *H. plicatum* DC.)

Broj uzorka	Naringenin mg/g	Apigenin mg/g	Kempferol mg/g
6	10,1	4,1	0,7
11	15,6	15,3	2,1
12	17,4	16,2	3,8

*Broj uzorka označava broj ekstrakta iz tabele 4.6



Slika 4.31 Sadržaj aglikona flavonoida (mg/g) u nehidrolizovanim uzorcima odabranih suvih ekstrakata *H. flos* (biološki izvor *H. plicatum* DC.)

Uzorci ekstrakata (uzorci br. 6, 11 i 12) sadžavali su sva tri flavonoida. Sadržaj naringenina se kretao od 10,1 mg/g suvog ekstrakta (uzorak br. 6) do 17,4 mg/g suvog ekstrakta (uzorak br. 12). Sadržaj apigenina od 4,1 mg/g suvog ekstrakta (uzorak br. 6) do 16,2 mg/g suvog ekstrakta (uzorak br. 12), sadržaj kempferola od 0,7 mg/g suvog ekstrakta (uzorak br. 6) do 3,8 mg/g suvog ekstrakta (uzorak br. 12).

Prema dobijenim rezultatima u nehidrolizovanim uzorcima ekstrakta, sadržaj sva tri flavonoida je najveći u uzorku br.12, a najmanji u uzorku br. 6, u odnosu na ostale uzorke. Rezultati ispitivanja sadržaja flavonoida u nehidrolizovanim uzorcima ekstrakata su u skladu sa rezultatima dobijenim za hidrolizovane ekstrakte, prema kojima je takođe, najmanji sadržaj sva tri flavonoida u uzorku br. 6, a najveći u uzorku br. 12. Sadržaj aglikona flavonoida naringenina, apigenina i kempferola je bio mnogo

niži u nehidrolizovanim uzorcima ekstrakata, što govori da su flavonoidi uglavnom u obliku glikozida u biljnoj drogi.

Rezultati analize aglikona naringenina, apigenina i kempferola u nehidrolizovanim uzorcima suvih ekstrakata, pokazuju znatno viši sadržaj naringenina, apigenina i kempferola u odnosu na podatke u literaturi. Albayarak *et al.*, (2010) su ispitivali cvasti *H. plicatum* subsp. *plicatum* i u metanolnim ekstraktima metodom HPLC identifikovali i kvantifikovali između ostalih apigenin (37,9 µg/g suvog ekstrakta) i naringenin (9,97 µg/g suvog ekstrakta), dok je u *H. plicatum* subsp. *polyphyllum* bilo apigenina (36,3 µg/g suvog ekstrakta) i naringenina (13,20 µg/g suvog ekstrakta). *H. arenarium* subsp. *aucheri* je sadržavao apigenin (27,5 µg/g suvog ekstrakta) i naringenin (9,16 µg/g suvog ekstrakta). Kempferol nije kvantifikovan ni u jednoj od 16 ispitivanih *Helichrysum* vrsta. U literaturi nisu pronađeni rezultati određivanja aglikona flavonoida u hidrolizovanim uzorcima ekstrakata smilja, *H.plicatum* DC.

4.5. Optimizacije procesa ekstrakcije u cilju dobijanja većeg sadržaja ukupnih fenola i flavonoida *Helichrysi flos* (biološki izvor *H. plicatum* DC.)

4.5.1. Optimizacija procesa ekstrakcije u cilju dobijanja većeg sadržaja ukupnih fenola

Ispitivanja uticaja procesnih i formulacionih parametara na sadržaj ukupnih fenola

Primenom faktorijskog dizajna 2^3 ispitan je uticaj tri promenljiva faktora u procesu ekstrakcije i njihove međusobne interakcije na sadržaj ukupnih fenola (mg GAE/g) na osam uzoraka ekstrakata *H. flos* (*H. plicatum* DC.), koji odgovaraju matrici dizajna eksperimenta. Ispitivani faktori su stepen usitnjenosti droge *H. flos* (biološki izvor *H. plicatum* DC.), vrsta ekstragensa i vrsta rastvarača za re-ekstrakciju i prikazani su u tabeli br. 4.9. Ispitivani nivoi stepena usitnjenosti su: 2000 (53-57% frakcije 355-2000 µm) i 710 (koja sadrži 85% frakcije 355-2000 µm) i izabrani su jer su ispoljili veći uticaj na suvi ostatak (u tečnom ekstraktu) od *in toto* droge. Ispitivani nivoi vrste ekstragensa (koncentracije etanola 50% i 60% (v/v)) i ispitivani nivoi vrste rastvarača za re-ekstrakciju (etilacetata:etanol (5:5 i 9:1) (v:v)) i prikazani su u tabeli br.4.16.

Tabela 4.16 Prikaz promjenljivih faktora i nivoa u procesu ekstrakcije u vidu kodiranih i realnih vrednosti i praćenog odgovora - sadržaj ukupnih fenola (mg GAE/g) - obuhvaćenih optimizacijom procesa ekstrakcije u cilju dobijanja većeg sadržaja ukupnih fenola u suvim ekstraktima *H. flos* (biološki izvor *H. plicatum* DC.)

Broj eksperimenta	Broj uzorka*	A	B	C	Stepen usitnjenosti	EtOH %	EtAc:EtOH (v:v)	Sadržaj ukupnih fenola (mg GAE/g)
1	5	-1	-1	-1	710	50	5:5	121,6 ± 3,8
2	9	+1	-1	-1	2000	50	5:5	89,6 ± 1,4
3	15	-1	+1	-1	710	60	5:5	173,9 ± 5,1
4	7	+1	+1	-1	2000	60	5:5	163,1 ± 2,6
5	10	-1	-1	+1	710	50	9:1	280,4 ± 8,8
6	11	+1	-1	+1	2000	50	9:1	290,8 ± 9,2
7	3	-1	+1	+1	710	60	9:1	266,9 ± 7,2
8	14	+1	+1	+1	2000	60	9:1	290,1 ± 6,9

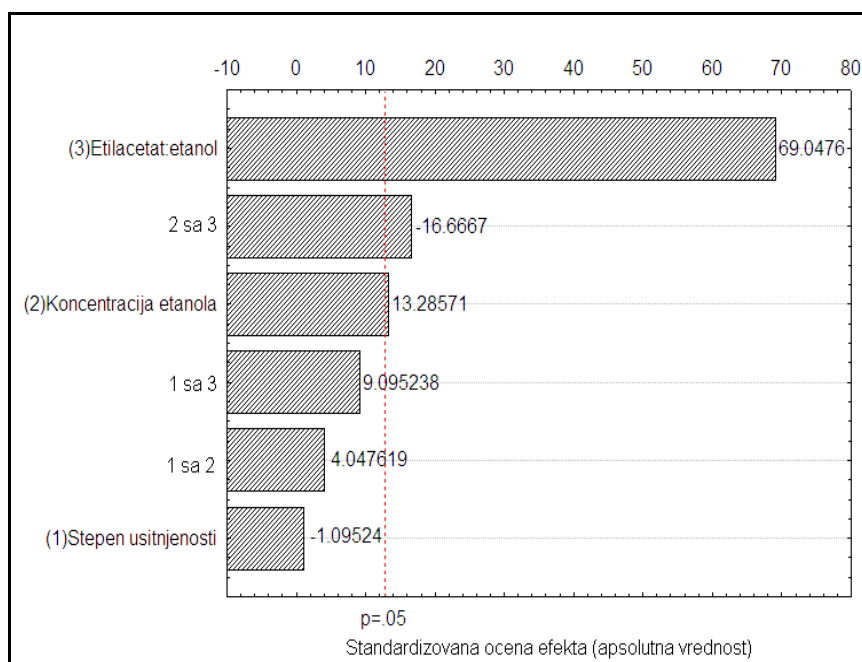
*Broj uzorka označava broj ekstrakta iz tabele 4.6

U tabeli br. 4.17 prikazani su efekti promjenljivih ABC i njihovih međusobnih interakcija na prinos suvih ekstrakata.

Tabela 4.17. Efekti promjenljivih na sadržaj ukupnih fenola u odabranim suvim ekstraktima *H. flos* (biološki izvor *H. plicatum* DC.), izračunati upotrebom 2^3 faktorijalnog dizajna

Faktori	Efekat
Srednja vrednost	209.6
Glavni efekti	
stepen usitnjenosti (A)	-2.3
koncentracija etanola (B)	27.9
etilacetat:etanol (C)	145.0
Interakcije dva faktora	
AxB	8.5
BxC	-35
AxC	19.1
Interakcije tri faktora	
(AxB)xC	19.1
(AxC)xB	8.5
Srednji C	
Visi B	110
Nizi B	180.1
BxC	-35.05

Dobijeni koeficijenti ($b_1 - b_{1,2,3}$) pokazuju da najveći uticaj na prinos suvog ekstrakta ($b_3 = -145$) ima udeo etilacetata u ekstragensu za re-ekstrakciju (faktor C) i ima pozitivan predznak, što znači da porast udela etilacetata u ekstragensu za re-ekstrakciju izaziva povećanje sadržaja ukupnih fenola u suvim ekstraktima (mg GAE/g). Uticaj koncentracije etanola (faktor B) je manji ($b_2 = 27,9$) od uticaja udela etilacetata (faktora C) i takođe ima pozitivan predznak, što znači da povećanje koncentracije etanola u ekstragensu za ekstrakciju dovodi do povećanja sadržaja ukupnih fenola u suvom ekstraktu. Stepenn usitnjenosti (faktor A) ima najmanji uticaj ($b_1 = -2,3$) od sva tri faktora i taj uticaj je sa negativnim predznakom, što znači kada stepenn usitnjenosti ide sa višeg na niži nivo, raste sadržaj ukupnih fenola. Najveći efekat na prinos ukupnih fenola ima interakcija između vrste ekstragensa i vrste rastvarača, tj. interakcija BC ($b_{13} = -35,0$), a najmanja interakcija sva tri faktora ($b_{123} = -2,1$). Statistički značajni uticaj na sadržaj ukupnih fenola ima vrsta rastvarača za re-ekstrakciju (etilacetata:etanol) i interakcija vrsta ekstragensa i vrste rastvarača za re-ekstrakciju (95% nivo značajnosti), što se može videti na Pareto karti (Slika 4.32). Uticaj faktora vrsta ekstragensa (koncentracija etanola) je na granici značajnosti. Vrednosti efekata faktora na Pareto karti nisu iste kao vrednosti faktora u tabeli 4.17, ali su u korelaciji.

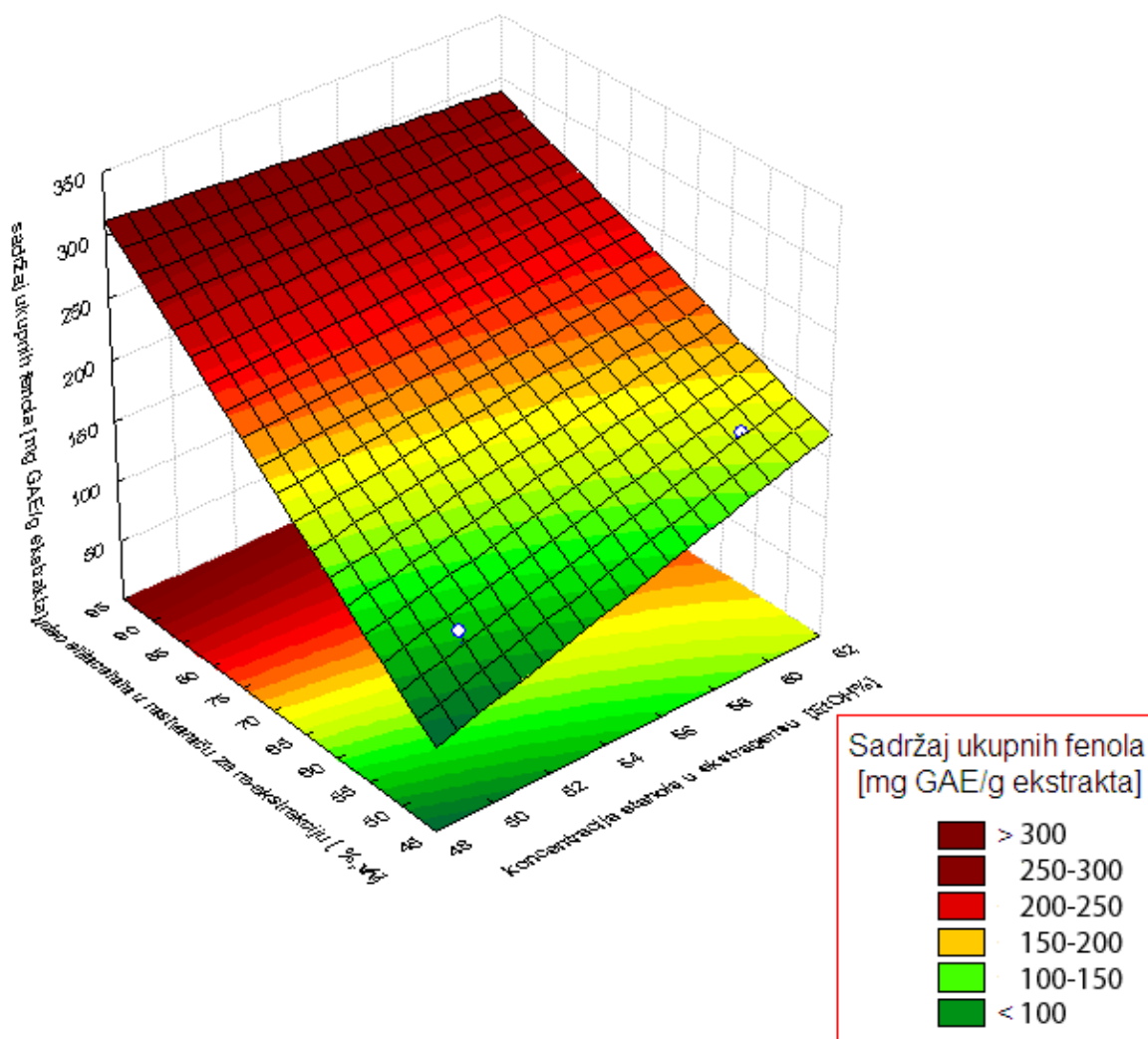


Slika 4.32 Pareto karta prikazuje standardizovanu ocenu efekata faktora ekstrakcije na sadržaj ukupnih fenola (mg GAE/g) u odabranim ekstraktima *H. flos* (biološki izvor *H. plicatum* DC.)

Vrsta rastvarača za re-ekstrakciju, na osnovu efekta faktora $b_3 = 145.00$, povećava prinos ukupnih fenola za 45 %, kada je rastvarač etilacetat:etanol 9:1, u odnosu na rastvarač etilacetat:etanol 5:5. Interakcija vrste ekstragensa i vrste rastvarača za re-ekstrakciju se određuje kao polovinina razlike u srednjem uticaju vrste rastvarača na visokom i niskom nivou stepena usitnjenosti. U ekstraktima dobijenim sa 60% ekstragensom 60 % etanolom (viši nivo faktora), prinos ekstrakta je bio za 10 % viši kada se koristio rastvarač etilacetat : etanol (9:1), u odnosu kada je korišćen rastvarač etilacetat : etanol (5:5). Međutim, u ekstraktima dobijenim kada se koristio etanol 50% kao ekstragens (niži nivo faktora), na višem nivou rastvarača etilacetat : etanol 9:1, sadržaj ukupnih fenola je bio za 80% viši nego na nivou rastvarača etilacetat : etanol 5:5. Očigledno je da postoji interakcija ova dva faktora i da će zbog nje efekat vrste rastvarača za re-ekstrakciju biti viši za 70 % na nižem nivou ekstragensa, pa će ukupan sadržaj fenola biti za 35% manji. Interakcija faktora stepen usitnjenosti i vrste rastvarača za re-ekstrakciju je značajna i zbog nje će efekat faktora vrste rastvarača biti za 38% veći na višem nivou faktora usitnjenosti (2000), nego na nižem i ukupan sadržaj fenola će biti manji za 19 %.

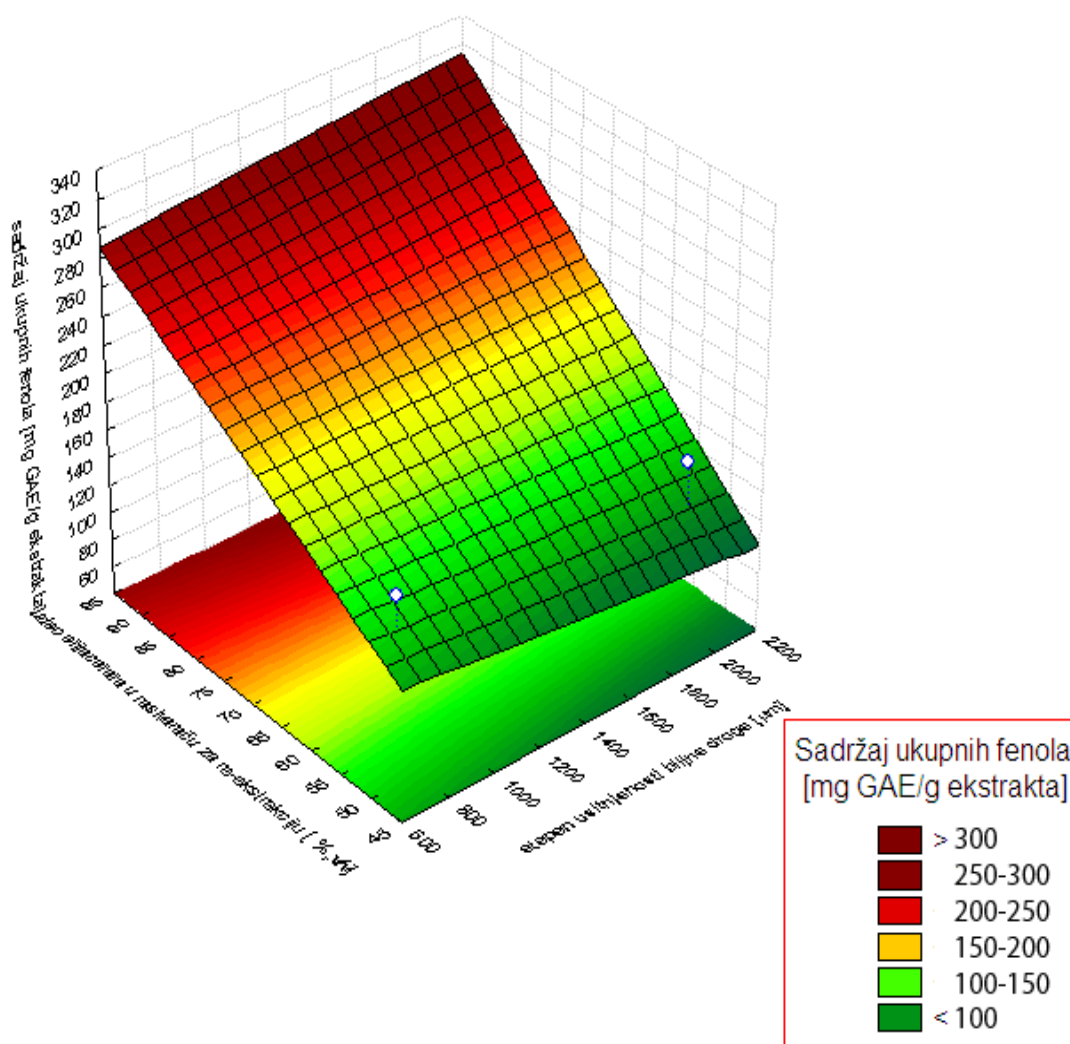
Optimizacija procesa ekstrakcije u cilju dobijanja većeg sadržaja ukupnih fenola

Površina sadržaja ukupnih fenola na slici 4.33 pokazuje da sadržaj ukupnih fenola raste u zonama crvene boje u kojima se povećava udeo etilacetata u rastvaraču za re-ekstrakciju i raste koncentracija etanola u ekstragensu. Iz navedenog se vidi da je optimalna oblast za izvođenje ekstrakcije, u cilju dobijanja većeg sadržaja ukupnih fenola je koncentracija etanola 60% kao ekstragensa i rastvarač za re-ekstrakciju (9:1).



Slika 4.33 Površina sadržaja ukupnih fenola u zavisnosti od faktora B i C (odnos etilacetat : etanol i koncentracija etanola)

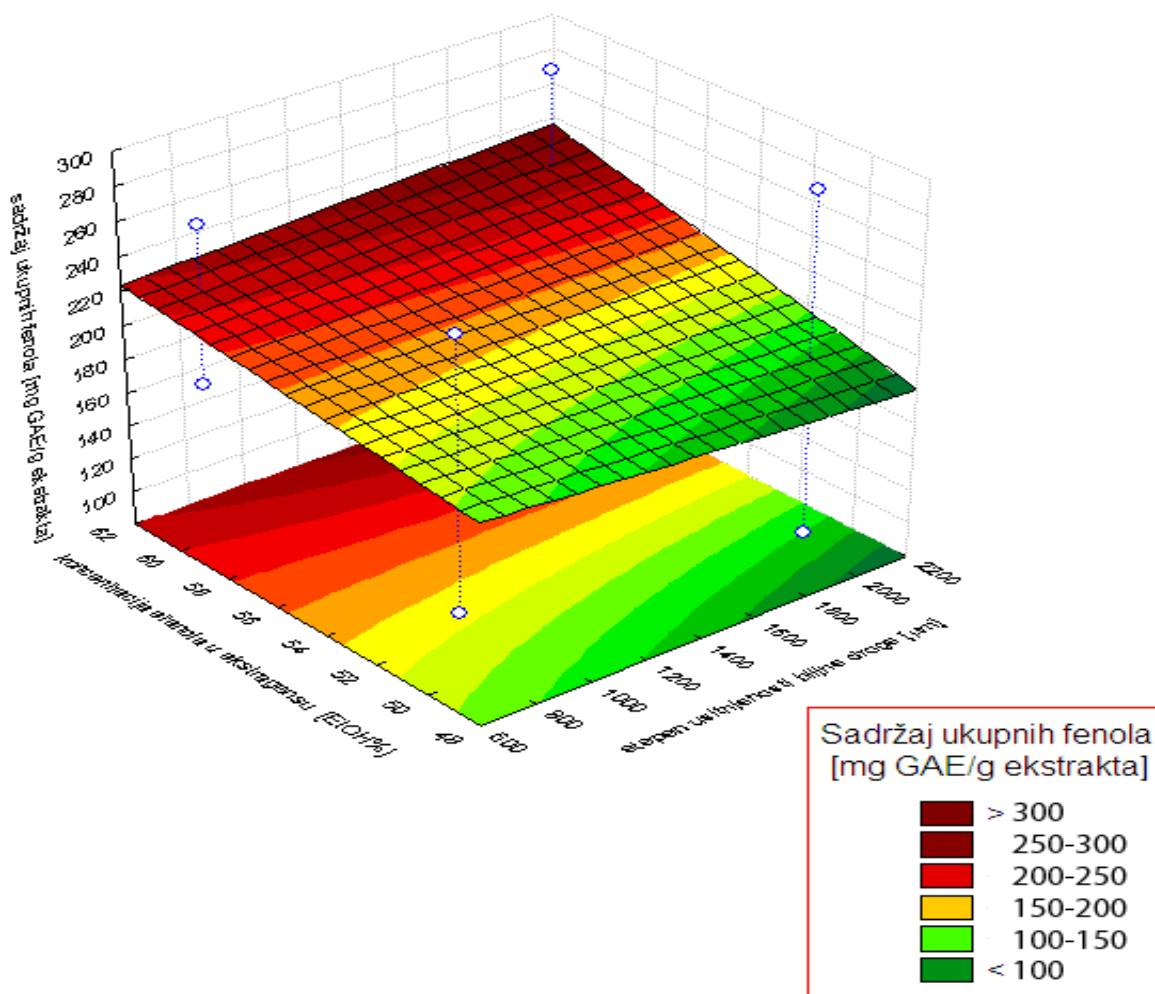
Površina sadržaja ukupnih fenola na slici 4.34 pokazuje da je optimalna oblast (crvena boja) za izvođenje ekstrakcije, u cilju dobijanja većeg sadržaja ukupnih fenola, biljna droga sa oznakom stepena usitnjenosti 2000 (koja sadrži 53-57 % frakcije 355 μm – 2000 μm) i rastvarač za re-ekstrakciju (9:1).



Slika br.4.34 Površina sadržaja ukupnih fenola u zavisnosti od faktora A i C (odnos etilacetat : etanol i stepena usitnjenosti biljne droge)

Površina sadržaja ukupnih fenola na Slici 4.35 pokazuje da sadržaj ukupnih fenola raste u zonama crvene boje u kojima raste koncentracija etanola u ekstragensu i kako se povećava udeo frakcije veličine čestica od 2000 μm .

Rezultati ispitivanja uticaja tri faktora koji su varirani u procesu ekstrakcije doprinose definisanju optimalnih uslova za izvođenje ekstrakcije. Veći sadržaja ukupnih fenola se dobija u procesu ekstrakcije droge stepena usitnjenosti 2000 (53-57% frakcije 355-2000 μm) sa ekstragensom etanolom 50% i u procesu re-ekstrakcije sa rastvaračem etilacetat:etanol (9:1).



Slika br.4.35 Površina prinosa ekstrakta u zavisnosti od faktora A i B (koncentracija etanola : stepen usitnjenosti biljne droge)

U optimizaciji procesa ekstrakcije u cilju dobijanja većeg sadržaja fenola, veće antioksidativne aktivnosti dobijenih ekstrakata i prinosa ekstrakta u drugim polifenolnim biljnim vrstama, korišćen je sličan metod i dizajn eksperimenta i dobijeni rezultati ukazuju na slične optimalne uslove izvođenja (Kukula-Koch *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2011).

4.5.2. Optimizacije procesa ekstrakcije u cilju dobijanja većeg sadržaj flavonoida

Ispitivanja uticaja procesnih i formulacionih parametara na sadržaj naringenina

Primenom faktorijalnog dizajna 2^3 na odabranim uzorcima koji odgovaraju matrici eksperimenta ispitan je uticaj tri promenljiva faktora u procesu ekstrakcije i

njihove međusobne interakcije na sadržaj flavonoidnog aglikona naringenina u suvim ekstraktima (mg/g). Ispitivani faktori i nivoi variranja prikazani su u tabeli br.4.9. Prikaz promenljivih faktora i nivoa u procesu ekstrakcije u vidu kodiranih i realnih vrednosti i sadržaj naringenina je dat u tabeli br. 4.18.

Tabela 4.18 Prikaz promenljivih faktora i nivoa u procesu ekstrakcije u vidu kodiranih i realnih vrednosti i pratećeg odgovora - sadržaj naringenina (mg/g) - obuhvaćenih optimizacijom procesa ekstrakcije u cilju dobijanja većeg sadržaja naringenina u suvim ekstraktima *H. flos* (biološki izvor *H. plicatum* DC.)

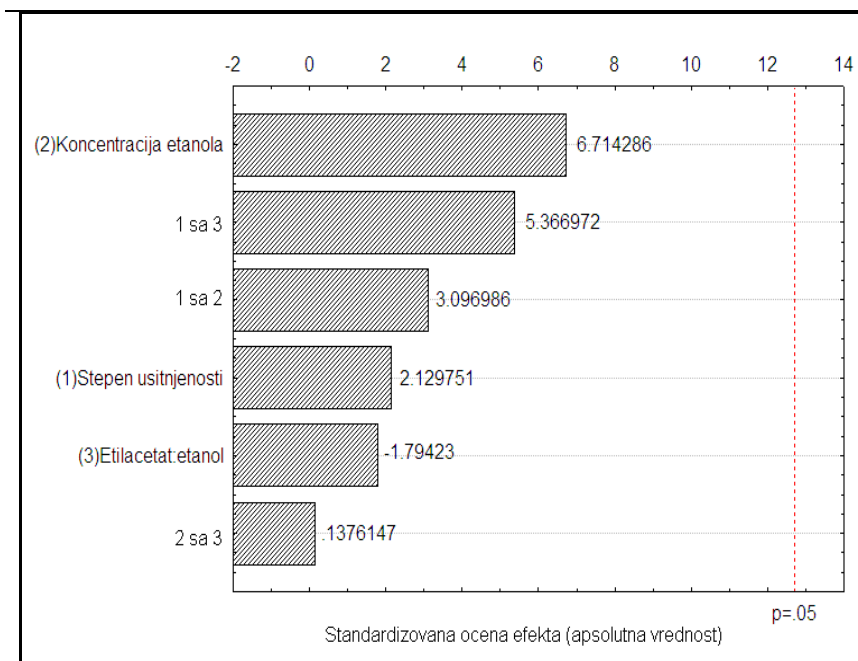
Broj eksperimenta	Broj uzorka *	A	B	C	Stepen usitnjenosti	EtOH %	EtAc:EtOH (v:v)	Sadržaj naringenina (mg/g)
1	5	-1	-1	-1	710	50	5:5	576,4
2	9	+1	-1	-1	2000	50	5:5	436,5
3	15	-1	+1	-1	710	60	5:5	623,7
4	7	+1	+1	-1	2000	60	5:5	640,1
5	10	-1	-1	+1	710	50	9:1	418,1
6	11	+1	-1	+1	2000	50	9:1	521,1
7	3	-1	+1	+1	710	60	9:1	508,8
8	14	+1	+1	+1	2000	60	9:1	691,8

*Broj uzorka označava broj ekstrakta iz tabele 4.6

U tabeli 4.19 prikazani su efekti promenljivih ABC i njihovih međusobnih interakcija na sadržaj naringenina u suvom ekstraktu.

Tabela 4.19 Efekti promenljivih faktora na sadržaj naringenina (mg/g) u odabranim suvim ekstraktima *H. flos* (biološki izvor *H. plicatum* DC.), izračunati upotrebom 2^3 dizajna

Efekti	Faktori	Keoficijenti
552,063		b0
40,625	A	b1
128,075	B	b2
59,075	AB	b12
-34,225	C	b3
102,375	AC	b13
2,625	BC	b23
-19,075	ABC	b123
	Srednji C	
68,15	Visi A	
-136,6	Nizi A	
102,375	AxC	



Slika 4.36 Pareto karta prikazuje standardizovanu ocenu efekata faktora ekstrakcije na sadržaj naringenina (mg/g) u odabranim suvim ekstraktima *H. flos* (biološki izvor *H. plicatum* DC.)

Dobijeni koeficijenti ($b_1 - b_{1,2,3}$) pokazuju da najveći uticaj na sadržaj naringenina u suvom ekstraktu ($b_2 = 128,075$) ima vrsta ekstragensa (faktor B) i ima pozitivan predznak, što znači da porast % etanola u ekstragensu za ekstrakciju izaziva povećanje sadržaja naringenina u suvim ekstraktima (mg/g). Stepen usitnjenosti (faktor A) ima manji uticaj ($b_1 = 40,625$) od procenta etanola u ekstragensu i taj uticaj je sa pozitivnim predznakom, što znači što je stepen usitnjenosti na višem nivou (2000), raste sadržaj naringenina. Uticaj vrste rastvarača za re-ekstrakciju (faktor C) je najmanji ($b_3 = -34,225$) i jedini ima negativan predznak, što znači da povećanje udela etilacetata u ekstragensu za re-ekstrakciju dovodi do smanjenja sadržaja naringenina u suvom ekstraktu. Najveća interakcija koja ima efekat na sadržaj naringenina je između između stepena usitnjenosti biljne droge i udela etilacetata, tj. interakcija BC ($b_{13} = 102,375$), a najmanja interakcija sva tri faktora ($b_{123} = -19,075$). Na slici 4.36 prikazana je Pareto karta standardizovanih efekata faktora na sadržaj naringenina u suvom ekstraktu, koja ukazuje da nema statistički značajnih uticaja faktora (95% nivo značajnosti). Vrednosti efekata faktora na Pareto karti nisu iste kao vrednosti faktora u tabeli 4.19, ali su u korelaciji.

Na osnovu efekta faktora $b_3 = 128$, vrsta ekstragensa, povećava sadržaj naringenina za 28%, kada je ekstragens 60% etanol, u odnosu na ekstragens 50% etanol.

Interakcija faktora stepen usitnjenosti biljne droge i vrste rastvarača za re-ekstrakciju je značajna i zbog nje će efekat faktora vrste rastvarača za re-ekstrakciju biti za 102% veći na višem nivou faktora usitnjenosti (2000), nego na nižem i ukupan sadržaj naringenina će biti veći za 2%. U ovoj analizi je prisutno niz interakcija faktora.

Optimizacija procesa ekstrakcije u cilju dobijanja većeg sadržaja naringenina

Rezultati ispitivanja uticaja tri faktora koji su varirani u procesu ekstrakcije doprinose definisanju optimalnih uslova za izvođenje ekstrakcije. Veći sadržaja naringenina se dobija u procesu ekstrakcije droge stepena usitnjenosti 2000 (53-57% frakcije 355-2000 μm) sa ekstragensom etanolom 60% u procesu reekstrakcije sa rastvaračem etilacetat : etanol 9:1 (može biti primenjen etilacetat : etanol 5:5).

Ispitivanja uticaja procesnih i formulacionih parametara na sadržaj apigenina

Primenom faktorijalnog dizajna 2^3 na odabranim uzorcima koji odgovaraju matrici eksperimenta ispitan je uticaj tri promenljiva faktora u procesu ekstrakcije i njihove međusobne interakcije na sadržaj flavonoidnog aglikona apigenina u suvim ekstraktima (mg/g). Ispitivani faktori i nivoi variranja prikazani su u tabeli br.4.9. Prikaz promenljivih faktora i nivoa u procesu ekstrakcije u vidu kodiranih i realnih vrednosti i sadržaj naringenina je dat u tabeli br. 4.20.

Tabela 4.20 Prikaz promenljivih faktora i nivoa u procesu ekstrakcije u vidu kodiranih i realnih vrednosti i pratećeg odgovora- sadržaj apigenin (mg/g) - obuhvaćenih optimizacijom procesa ekstrakcije u cilju dobijanja većeg sadržaja apigenin u odabranim suvim ekstraktima *H. flos* (biološki izvor *H. plicatum* DC.)

Broj eksperimenta	Broj uzorka *	A	B	C	Stepen usitnjenosti	EtOH %	EtAc:EtOH (v:v)	Sadržaj apigenina (mg/g)
1	5	-1	-1	-1	710	50	5:5	69,0
2	9	+1	-1	-1	2000	50	5:5	56,5
3	15	-1	+1	-1	710	60	5:5	129,2
4	7	+1	+1	-1	2000	60	5:5	82,6
5	10	-1	-1	+1	710	50	9:1	64,7
6	11	+1	-1	+1	2000	50	9:1	92,2
7	3	-1	+1	+1	710	60	9:1	74,0
8	14	+1	+1	+1	2000	60	9:1	138,5

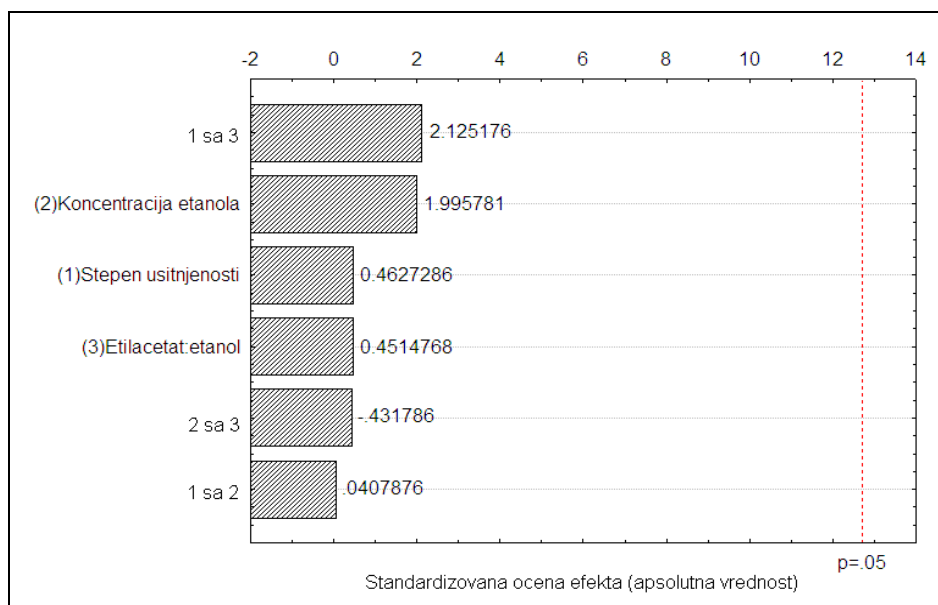
*Broj uzorka označava broj ekstrakta iz tabele 4.6

Ispitivani nivoi stepena usitnjenosti su: 2000 i 710. Ispitivani nivoi vrste ekstragensa (koncentracije etanola su 50% i 60% (v/v)) i ispitivani nivoi vrste rastvarača (etilacetat : etanol (5:5 i 9:1) (v:v). U Tabeli 4.21 prikazani su efekti promenljivih ABC i njihovih međusobnih interakcija na sadržaj apigenina u suvom ekstraktu.

Tabela 4.21 Efekti promenljivih A,B,C i njihovih međusobnih interakcija na sadržaj naringenina odabranim suvim ekstraktima *H. flos* (biološki izvor *H. plicatum* DC.), izračunati upotrebom 2^3 dizajna

Efekti	Faktori	Koeficijenti
88.338		b0
8.225	A	b1
35.475	B	b2
0.725	AB	b12
8.025	C	b3
37.775	AC	b13
-7.675	BC	b23
17.775	ABC	b123

Od primenjenih faktora, najveći uticaj na sadržaj apigenina u suvom ekstraktu ($b_2 = 35,475$) ima % etanola u ekstragensu za ekstrakciju (faktor B). Uticaj udela etilacetata (faktor C) i ($b_3 = 8,025$) i stepen usitnjenosti (faktor A) imaju sličan uticaj ($b_1 = 8,225$). Najveći efekat na sadržaj naringenina ima interakcija AC faktora ($b_{12} = 37,775$). Prema oceni standardizovanih efektata uticaj svih faktora je ispod nivoa značajnosti (95 % nivo značajnosti) (Slika 4.37). Vrednosti efekata faktora na Pareto karti nisu iste kao vrednosti faktora u tabeli 4.21, ali su u korelaciji.



Slika 4. 37 Pareto karta prikazuje standardizovanu ocenu efekata faktora ekstrakcije na sadržaj apigenina (mg/g) u odabranim suvim ekstraktima *H. flos* (biološki izvor *H. plicatum* DC.)

Optimizacija procesa ekstrakcije u cilju dobijanja većeg sadržaja apigenina

Rezultati ispitivanja uticaja tri faktora koji su varirani u procesu ekstrakcije doprinose definisanju optimalnih uslova za izvođenje ekstrakcije. Većina sadržaja naringenina se dobija u procesu ekstrakcije droge stepena usitnjenosti 2000 (53-57% frakcije 355-2000 μm) ili 710 (85% frakcije 355-2000 μm) sa ekstragensom etanolom 60% u procesu reekstrakcije sa rastvaračem etilacetat : etanol 9:1 .

Ispitivanja uticaja procesnih i formulacionih parametara na sadržaj kempferola

Za ispitivanje uticaja procesnih i formulacionih parametara na sadržaj kempferola nije primenjen faktorijalni dizajn, zbog velikog variranja u sadržaju kempferola (u uzorcima 4 i 6-9 je detektovan u tragovima, a u uzorcima 14 i 15 sadržaj kempferola je > 150 mg/g suvog ekstrakt. U prethodnim ispitivanjima uticaja na sadržaj naringenina i apigenina faktor sa velikim uticajem je udeo etilacetata u ekstragensu za reekstrakciju i može se reći da i ovde igra vrlo važnu ulogu, jer ekstrakti koji su reekstrahovani sa ekstragensom sa visokim udelom acetata (9:1 i 100%) imaju najviši sadržaj kempferola (31,2 -132,6 mg/g), dok u ekstraktima koji su re-ekstrahovani sa

ekstragensom sa nižim udelom etilacetata (5:5) kempferol ili je u tragovima ili je u vrlo malim količinama. Takođe, iz rezultata sledi da postoji pozitivna interakcija faktora procenta etanola i udela acetata, na sadržaj kemferola.

Uporedna analiza optimizacija procesa ekstrakcije

Optimizacija procesa ekstrakcije, u fazi kada se utvrdi aktivna supstanca (jedna ili više komponente koje su jedine odgovorne za dokazano i dokumentovano terapeutsko dejstvo) ili aktivni markeri (jedan ili više hemijski definisanih supstanci, koje poseduju relevantno dejstvo) ide u cilju dobijanja tih supstanci. Optimizacija procesa ekstrakcije, bazirana na analizi uticaja faktora je pokazala različite optimalne oblasti izvođenja ekstrakcije u zavisnosti od cilja koji je postavljen u ekstrakciji.

Optimalni uslovi za ekstrakcije u cilju dobijanja većeg prinosa ekstrakta (%) su sledeći: biljna droga *H. flos* (biološki izvor *H. plicatum* DC.) sadrži 53-57% frakcije 355-2000 μm , ekstragens 50% etanol i rastvarač za re-ekstrakciju je etiacetat:etanol 5:5. Efekti faktora nisu statistički značajni.

Optimalni uslovi za ekstrakcije u cilju dobijanja većeg sadržaja ukupnih fenola (mg GAE/g) su: biljna droga *H. flos* (biološki izvor *H. plicatum* DC.) sadrži 53-57% frakcije 355-2000 μm , ekstragens 50% etanol i rastvarač za re-ekstrakciju je etiacetat:etanol 5:5, sa izraženim efektima (statistički značajnim) rastvarača za re-ekstrakciju i ekstragensa.

Optimalni uslovi za ekstrakcije u cilju dobijanja većeg sadržaja flavonoida naringenina i apigenina (mg /g) su: biljna droga *H. flos* (biološki izvor: *H. plicatum*) sadrži 53-57% frakcije 355-2000 μm , ekstragens 60% etanol i rastvarač za re-ekstrakciju je etilacetat:etanol 9:1. Efekti nisu statistički značajni.

U ekstrakciji u cilju većeg sadržaja ukupnih fenola i flavonoida postoji tendencija povećanja pozitivnog uticaja rastvarača i ekstragensa na njihov sadržaj, dok je slabiji uticaj faktora stepena usitnjenosti biljne droge. Kada je sadržaj analitičkog markera na višem nivou, veći je uticaj stepena usitnjenosti biljne droge. Što je niži sadržaj analitičkog markera u ekstraktu (apigenin i kempferol), to je veći uticaj rastvarača za ekstrakciju. U svim optimizacijama se pokazalo da je stepen usitnjenosti

biljne droge koji sadrži 53-57% frakcije 355-2000 μm i 42-45% frakcije $> 2 \text{ mm}$, optimalniji od biljne droge koja sadrži 85% frakcije 355-2000 μm i 15% frakcije $< 355 \mu\text{m}$.

4.6. Rezultati ispitivanja antioksidativne, citotoksične, spazmolitičke i antimikrobne aktivnosti suvih ekstrakata *Helichrysi flos* (biološki izvor: *H. plicatum* DC.)

4.6.1. Rezultati ispitivanja antioksidativne aktivnosti

Oksidacija je transfer elektrona sa jednog atoma na drugi i predstavlja osnovu aerobnog života i našeg metabolizma, dok je kiseonik obavezan elektronski akceptor u sistemu protoka elektrona koji proizvodi energiju u obliku ATP. Kada dođe do transfera nesparenih pojedinačnih elektrona stvaraju se slobodni radikali, poznati kao ROS (reactive oxygen species). ROS igraju različite uloge *in vivo* i neke od njih su pozitivne (stvaranje energije, regulisanje rasta ćelija, fagocitoza, sinteza biološki važnih komponenti), ali ROS mogu biti i vrlo štetne, pošto mogu delovati na lipide u ćelijskoj membrani, proteine u tkivima ili enzimima, ugljene hidrate i DNK i izazvati oštećenje membrane, modifikaciju proteina (uključujući i enzime) i promene na DNK. Smatra se da ove oksidativne promene izazivaju starenje i nekoliko degenerativnih oboljenja udruženih sa njim, kao što su kardiovaskularne bolesti, katarakta, kognitivne disfunkcije i maligna oboljenja (Halliwell *et al.*, 1999; Miura *et al.* 2001; Hirvonen *et al.*, 2001). Antioksidativni sistemi za zaštitu od slobodnih radikala, uključuju endogene (koji se stvaraju u organizmu) i egzogene antioksidanse (poreklom iz hrane)(Warma, 1995).

U poslednje vreme publikovano je puno podataka, koji ukazuju na to da biljni polifenoli spadaju u važnu klasu tzv. prirodnih antioksidanasa.

Sintetski antioksidansi kao što su butilhidroksianizol (BHA) i butilhidroksitoluen (BHT) se široko upotrebljavaju kao antioksidansi u hrani, da bi sprečili ili usporili oksidaciju lipida. Međutim, upotreba ovih komponenti je ograničena zbog njihove kancerogenosti i drugih sporednih efekata (Velioglu *et al.*,1998). Zbog toga je, poslednjih godina, u centru pažnje procena antioksidativne aktivnosti supstanci prirodnog porekla (Jayaprakasha *et al.*, 2004).

Ekstrakti biljnih vrsta koje pripadaju rodu *Helichrysum* pokazale su snažnu antioksidativnu aktivnost (Albayarak *et al.*, 2010; Suzgec *et al.*, 2005; Czinner *et al.*, 2000). Monografija Svetske Zdravstvene Organizacije za *H. arenarium* navodi da je ispitivana antioksidativna aktivnost metanolnih ekstrakta vrsta roda *Helichrysum* korišćenjem dva komplementarna testa, među kojima je i DPPH test (WHO monographs, 2002; Sroka *et al.*, 2004; Tepe *et al.*, 2005).

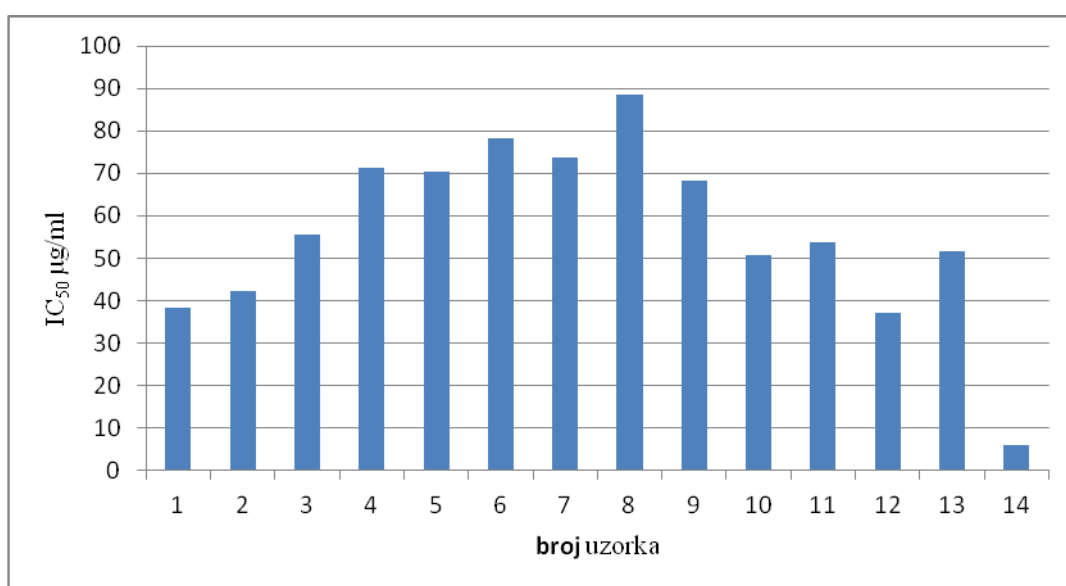
Sposobnost ekstrakata *H. flos* (biološki izvor *H. plicatum* DC.) ili nekih njegovih komponenti da budu donor vodonikovog atoma ili elektrona je merena obezbojavanjem ljubičaste boje metanolnog rastvora DPPH. U našem radu, ispitivana je antioksidativna aktivnost 13 uzoraka suvih ekstrakata. Kao pozitivna kontrola korišćen je Trolox. Rezultati antioksidativne aktivnosti ekstrakata prikazani su u tabeli 4. 22 i na slici 4.38.

Tabela 4. 22 DPPH antiradikalna aktivnost ekstrakata *H. flos* (biološki izvor *H.plicatum* DC.) (uzorci 1-13), sa Trolox-om kao pozitivnom kontrolom

Broj uzorka	IC ₅₀ (µg/ml)
1	38,44 ± 1,38
2	42,22 ± 3,25
3	55,42 ± 4,12
4	71,32 ± 2,35
5	70,25 ± 3,07
6	78,16 ± 3,89
7	73,62 ± 4,58
8	88,61 ± 4,36
9	68,38 ± 3,56
10	50,76 ± 3,06
11	53,73 ± 4,26
12	37,17 ± 3,28
13	51,72 ± 4,40
Trolox	6,09 ± 0,75

Najveće aktivnosti pokazali su br. 12, sa IC₅₀ vrednosti 37,17 µg/ml i uzorak br. 1 sa IC₅₀ vrednosti 38,44 µg/ml, dok je najnižu aktivnost pokazao uzorak br. 8 sa IC₅₀

vrednosti 88,61 $\mu\text{g/ml}$. Takođe, uzorci ekstrakata br. 6, 7 i 9 su pokazali niže antiradikalske aktivnosti sa IC_{50} vrednostima (78,16 $\mu\text{g/ml}$, 73.62 $\mu\text{g/ml}$ i 68,38 $\mu\text{g/ml}$). Uzorci koji imaju visoku aniradikalisku aktivnost (uzorci br. 1, 12) imaju ujedno i visok sadržaj ukupnih fenola (359,8 mg GAE/g i 264,6 mg GAE/g), dok uzorci 4-9 koji pokazuju nižu antiradikalisku aktivnost imaju niži sadržaj ukupnih fenola (89,6 – 163,1 mg GAE/g) i sadrže flavonoidni aglikon kempferol u vrlo malim koncentracijama. Svi uzorci su imali znatno nižu antioksidativnu aktivnost od Trolox-a, koji je upotrebljen kao pozitivna kontrola.



Slika 4.38 DPPH antiradikalska aktivnost ekstrakata *H. flos* (biološki izvor *H. plicatum* DC.) (uzorci 1-13), sa Trolox-om kao pozitivnom kontrolom (uzorak 14)

Dobijeni rezultati u skladu su sa podacima iz literature. Tepe *et al.*, (2005) su pokazali da ispitivani metanolni ekstrakti i njihove nepolarne (hloroformske) frakcije nemaju antioksidativnu aktivnost, dok polarne (vodene) frakcije pokazuju blagu aktivnost i to za *H. plicatum* IC_{50} je 48,0 $\mu\text{g/ml}$ i za *H. arenarium* IC_{50} je 47,6 $\mu\text{g/ml}$.

Glavne fenolne komponente roda *Helichrysum* su flavonoidi i oni imaju snažno antioksidativno dejstvo, pa se i antioksidativni potencijal ekstrakata tumači prisustvom ovih flavonoida (Czinner *et al.*, 2001; Oezgen *et al.*, 2004). Zbog toga su u mnogim radovima fenolne komponente označene kao “hvatači” slobodnih radikala (Madsen *et al.*, 1996; Moller *et al.*, 1999). Rezultati nekih ispitivanja antidijabetičkog i antioksidativnog dejstva ekstrakata *H. plicatum* izdvajaju apigenin i naringenin kao

delimično odgovorne za antioksidativno dejstvo ekstrakata *H. plicatum* (Aslan *et al.*, 2007).

4.6.2. Rezultati ispitivanja citotoksične aktivnosti

U literaturi postoji više podataka o citotoksičnoj aktivnosti nekih *Helichrysum* vrsta (Yagura *et al.*, 2008; Rosa *et al.*, 2007; Puerta *et al.*, 1993). Lourens *et al.*, (2008) su istraživali *Helichrysum* vrste koje rastu na teritoriji Južne Afrike, a koje se široko primenjuju u tradicionalnoj medicini i ispitivali *in vitro* citotoksičnu aktivnost ekstrakata (hloroform: metanol 1:1) 35 vrsta roda *Helichrysum* na tri vrste humanih malignih ćelija. Martynov *et al.*, (2000) ispitivali su antineoplastičnu aktivnost biljnih derivata glikoproteina iz *H. arenarium* (L.) Moench i utvrdili da ne inhibiraju sintezu proteina u tumorskim ćelijama. Sa druge strane, monografija Svetske Zdravstvene Organizacije za *H. arenarium* navodi da vodeni ekstrakt suvog cveta ove vrste nije ispoljio citotoksično dejstvo (May *et al.*, 1978; WHO Monographs on Selected Plants (2002)). U literaturi nisu pronađeni podaci o ispitivanjima citotoksične aktivnosti ekstrakata vrste *H. plicatum* DC.

U našem radu citotoksična aktivnost odabranih ekstrakata je ispitivana u *in vitro* testovima na tri vrste ćelija humanog kancera i to: ćelije adenokarcinoma grlića materice HeLa, ćelije raka prostate PC3 i ćelije mijeloidne leukemije K562. Za određivanje ćelijskog preživljavanja primenjen je MTT test, kolorimetrijski test kojim se meri redukcija tetrazolijumske soli mitohondrijalnom sukcinat-dehidrogenazom. MTT ulazi u ćeliju, prolazi u mitohondrije gde se redukuje do nerastvorljivog obojenog produkta, formazana. Intenzivna obojenost formazana koja se pri tom javlja, omogućuje korišćenje ove metode za citohemijsku kvantifikaciju broja metabolički aktivnih ćelija (Mosmann, 1983).

Na osnovu sadržaja ukupnih fenola i antiradikalske aktivnosti suvih ekstrakata *H. flos* (biološki izvor *H. plicatum* DC.), za ispitivanje citotoksičnih aktivnosti izabrani su uzorci ekstrakata br. 6, 11 i 12. Uzorak br. 6 (sadrži ukupnih fenola 156,1 mg GAE/g ekstrakta, naringenina 248,6 mg/g, apigenina 19,7 mg/g, kempferola 4,5 mg/g ekstrakta) je odabran kao uzorak ekstrakta sa nižim sadržajem ukupnih fenola i niskim sadržajem kempferola. Uzorak br 11 (sadrži ukupnih fenola 290,8 mg GAE/g ekstrakta, naringenina 521,1 mg/g, apigenina 92,2 mg/g, kempferola 81,9 mg /g ekstrakta) kao

uzorak ekstrakta sa višim sadržajem ukupnih fenola i sa umerenim sadržajem kemferola. Uzorak br. 12 (sadrži ukupnih fenola 359,8 mg GAE/g ekstrakta, naringenina 675,1 mg/g, apigenina 77,6 mg/g, kemferola 132,6 mg/g) je odabran kao uzorak ekstrakta sa vrlo visokim sadržajem ukupnih fenola, visokim sadržajem flavonoida i sa visokim sadržajem kemferola.

Rezultati citotoksičnog ispitivanja su prezentovani u tabeli 4.23 pokazuju da je uzorak br.12 imao najveću aktivnost na K562 i PC3 kulture ćelija sa vrednostima IC₅₀ 25,9 i 39,2 µg / ml. Uzorak br. 12 je imao najveći sadržaj kempferola i bio najaktivniji protiv ćelija K562. Uzorak br. 6 je pokazao najnižu aktivnost na svim kulturama ćelija sa IC₅₀ > 70 µg/ml. Svi testirani uzorci ekstrakata su pokazali umerenu aktivnost protiv HeLa ćelija (41,9 – 42,1 µg/ml).

Tabela 4.23 *In vitro* citotoksična aktivnost (IC₅₀) odabranih ekstrakata *H. flos* (biološki izvor *H. plicatum* DC.) (µg/ml) i aglikona flavonoida (µM)

Uzorak	HeLa	PC3	K562
6	42,0 ± 3,76	71,5 ± 3,19	72,3 ± 4,25
11	41,9 ± 4,41	42,0 ± 4,60	37,3 ± 2,93
12	42,1 ± 0,05	39,2 ± 1,14	25,9 ± 1,50
Apigenin	6,6 ± 1,75	29,5 ± 4,68	10,8 ± 3,41
Naringenin	23,0 ± 3,71	23,9 ± 1,55	22,0 ± 1,51
Kempferol	9,0 ± 0,57	18,5 ± 3,27	7,1 ± 0,89
Cisplatin*	2,1 ± 0,2	4,8 ± 0,2	7,9 ± 0,2

* Koristi se kao pozitivna kontrola

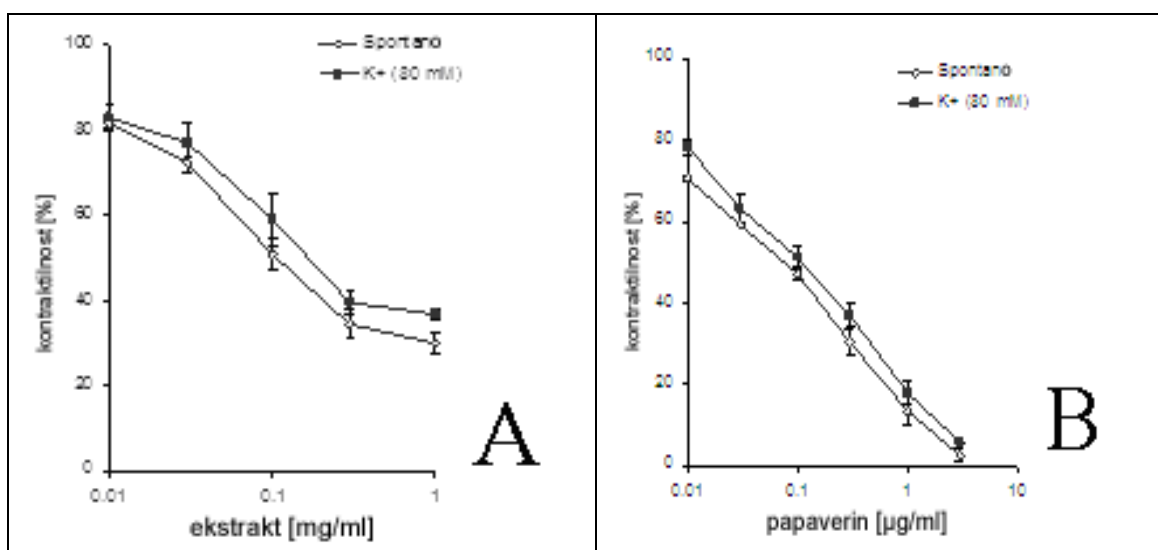
Rezultati ispitivanja citotoksične aktivnosti pojedinačnih aglikona flavonoida pokazuju da kempferol najaktivnije deluje na K562 kulturu ćelija i ta aktivnost je skoro identična aktivnosti pozitivne kontrole cisplatina. Apigenin je najaktivniji na HeLa kulturu ćelija, ali ima tri puta slabiju aktivnost od cisplatina, dok naringenin ima slabiju citotoksičnu aktivnost od druga dva ispitivana flavonoida.

Ispitivanje citotoksične aktivnosti ekstrakata *Helichrysum* vrsta iz Južne Afrike su pokazali *in vitro* citotoksičnu aktivnost, primenom sulforodamin B (SRB) testa. Ekstrakti 7 od 35 *Helichrysum* vrsta, dobijeni smešom organskih rastvarača

(chloroform:metanol 1:1), koncentracije 0,1 mg/ml, su inhibirali rast sledećih ćelijskih linija: izmenjene ćelije epitela humanog bubrega (Graham), ćelije adenokarcinoma dojke MCF-7 i ćelije glioblastoma SF-268 (Lourens *et al.*, 2011).

4.6.3. Rezultati ispitivanja spazmolitičke aktivnosti

U poslednje vreme u brojnim naučnim studijama se ispituju potencijalni efekti na intestinalne kontrakcije (Cimanga *et al.*, 2010), ali mehanizmi preko kojih oni ispoljavaju svoja dejstva, nisu potpuno razjašnjeni (Mahady *et al.*, 2005). Biljna vrsta *H. plicatum* se koristi u narodnoj medicini kod oboljenja želuca, jetre i žučnih puteva, a jedan od mehanizama delovanja je spazmolitička aktivnost. Galenski preparati *H. arenarium*, prema monografiji Svetske Zdravstvene Organizacije (WHO Monographs on Selected Plants, 2002), ispoljavaju slabo spazmolitičko dejstvo, koje zavisi od sadržaja flavonoida. Cilj ovog ispitivanja bio je ispitivanje spazmolitičke aktivnosti ekstrakta *H. flos* (biološki izvor *H. plicatum* DC.) na izolovanom tankom crevu pacova i ukoliko se ispolji spazmolitička aktivnost, utvrđivanje mehanizama te aktivnosti. Rezultati ispitivanja su prikazani na slikama 4.39-4.42 i u tabeli 4.24.

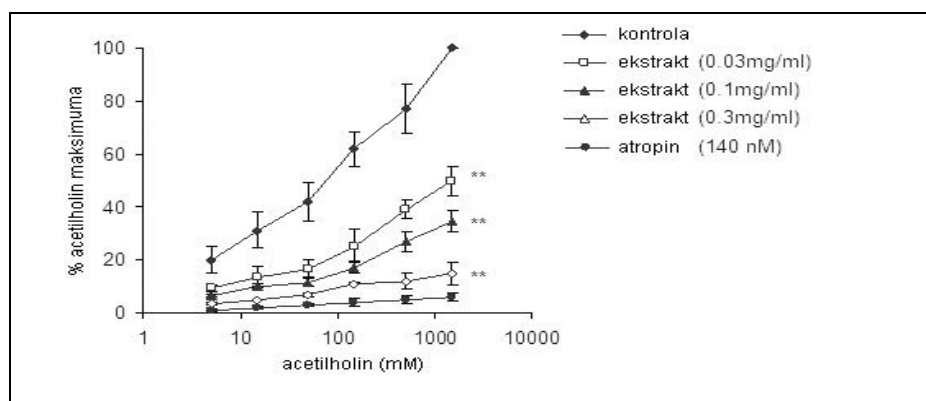


Slika 4.39 Inhibični efekat (A) ekstrakta *H. flos* (biološki izvor *Helichrysum plicatum*) i (B) papaverina na spontane kontrakcije i kontrakcije izazvane visokom koncentracijom K^+ na izolovanom tankom crevu pacova

Kumulativne koncentracije ekstrakta izazvale su spazmolitički efekat kod spontanih kontrakcija tankog creva pacova, koji zavisi od koncentracije ekstrakta (0,01 -

1 mg/ml) (slika 4.39). Ekstrakt *H. flos* (biološki izvor *H. plicatum* DC.) prouzročivao je srednji kontraktilni odgovor 81,68 % (pri koncentraciji od 0,01 mg/ml) i 30,08 % (pri koncentraciji od 1 mg/ml) ($p < 0.01$). Izračunata vrednost EC_{50} za ekstrakt je iznosila 0,13 mg/ml. Sličan efekat je pokazao i papaverin (vrednost EC_{50} je iznosila 0,06 mg/ml), koji je inhibitor ulaska Ca^{+} u ćeliju (Boselli *et al.*, 1998.) i inhibitor fosfodiesteraze (Sanchez de Rojas *et al.*, 1995; Kaneda *et al.*, 1998; Karamenderes *et al.*, 2003; Boselli-Smith *et al.*, 2006).

Ekstrakt *H. flos* (biološki izvor *H. plicatum* DC.) koji ima koncentraciju 0,01-1 mg/ml opušta prekontrakciju izazvanu visokom koncentracijom K^{+} (80 mM) i to pri vrednosti EC_{50} od 0,22 mg/ml (slika 4.39). Papaverin je korišćen kao pozitivna kontrola (vrednost EC_{50} od 0,09 mg/ml). Na slici 4.39 (A) prikazan je inhibični efekat etanolnog ekstrakta *H. flos* (biološki izvor: *H. plicatum*) (B) papaverina na spontane kontrakcije i kontrakcije izazvane visokom koncentracijom K^{+} na izolovanom tankom crevu pacova.

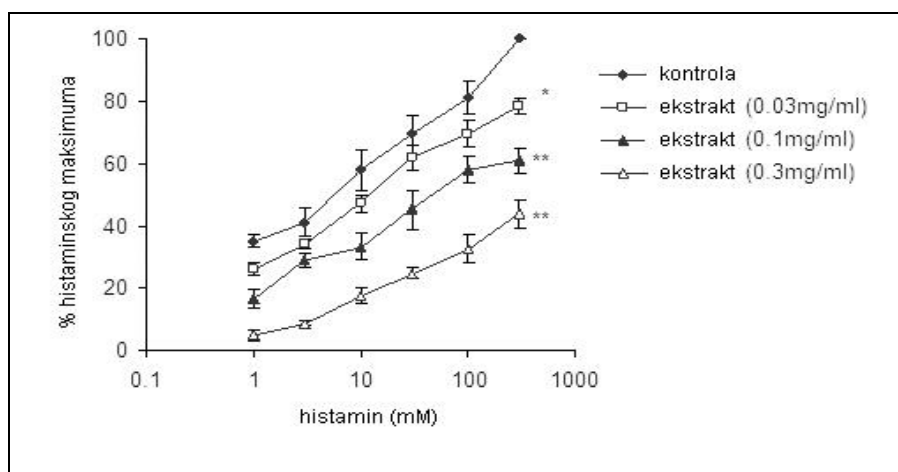


Slika 4.40 Poređenje krivih „doza - odgovor“ acetilholina u odsustvu i prisustvu ekstrakata *H. flos* (biološki izvor *H. plicatum* DC.) i atropina na izolovanom tankom crevu pacova; ** $p < 0.01$ značajno različito u poređenju sa kontrakcijama izazvanim simulatorom.

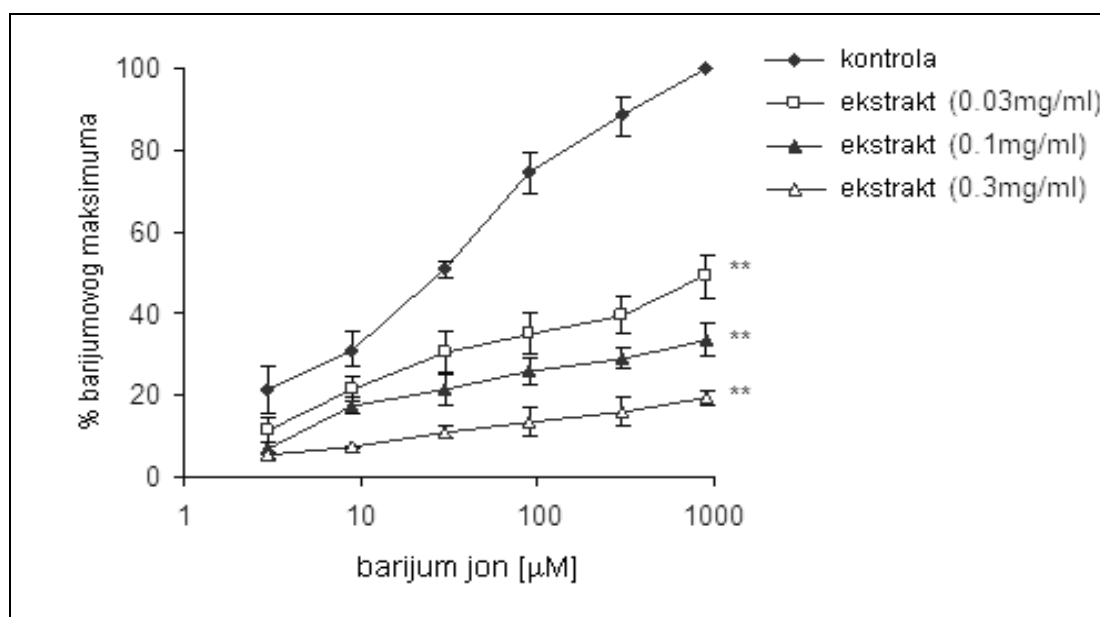
Tabela 4.24 Vrednosti EC_{50} i vrednosti E_{max} dobijene sa kumulativne krive acetilholina koja pokazuje zavisnost koncentracije i odgovora; ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

Antagonist	EC_{50} (nM)±S.D.	E_{max} (%)±S.D.
kontrola	58,86 ± 4,58	100
ekstrakt 0,03 (mg/mL)	951,28 ± 85,74**	49,87 ± 5,56**
ekstrakt 0,1 (mg/mL)	1,587,25 ± 95,42**	34,48 ± 4,21**
ekstrakt 0,3 (mg/mL)	2624,24 ± 104,69**	14,79 ± 4,22**
atropin (140 nM)	13,984.61 ± 967,25***	6,25 ± 0,58***

Acetilholin izaziva kontrakciju tankog creva pacova, koja zavisi od koncentracije acetilholina. Ekstrakt *H. flos* (biološki izvor *H. plicatum* DC.) (0,03-0,3 mg/ml) izaziva značajnu depresiju kumulativne koncentracione krive izazvane acetilholinom ($p < 0.01$) i modifikuje vrednost EC_{50} acetilholina sa 58,86 nM (u odsustvu ekstrakta) do 2624,24 nM u prisustvu ekstrakta koncentracije 0,3 mg/ml (tabela 4.24). Tretman tkiva atropinom (140 nM) poništava efekat acetilholina (slika 4.40).



Slika 4.41 Poređenje krivih "doza - odgovor" histamina u odsustvu i prisustvu etanolnih ekstrakata *H. flos* (biološki izvor *H. plicatum* DC.) na izolovanom tankom crevu pacova; * i ** $p < 0.05$ i $p < 0.01$ značajno različito u poređenju sa kontrakcijama izazvanim simulatorom



Slika 4.42 Poređenje "doza - odgovor" krivih barijum jona u odsustvu i prisustvu etanolnih ekstrakata *H. flos* (biološki izvor *H. plicatum* DC.) na izolovanom tankom crevu pacova. ** $p < 0.01$ značajno različito u poređenju sa kontrakcijama izazvanim simulatorom

Ekstrakt *H. flos* (biološki izvor *H. plicatum* DC.) koncentracije od 0,03 do 0,3 mg/ml inhibira kontrakcije indukovane histaminom, koje zavise od koncentracije histamina ($p < 0.01$), sa maksimalnom inhibicijom od 65,97 % (slika 4.41). Vrednost EC_{50} histamina od 56,39 nM je modifikovana ekstraktom do vrednosti EC_{50} od 1044,34 nM.

Efekti ekstrakta na kontrakcije izazvane barijum - hloridom su prikazani na slici 4.42. Ekstrakt značajno redukuje kontrakcije izazvane barijum - hloridom i to sa 50,94 do 89,65 ($p < 0.01$). Vrednost EC_{50} barijum-hlorida od 24,42 μ M je modifikovana ekstraktom do vrednosti EC_{50} od 1096,63 μ M.

Suvi ekstrakt (uzorak br.11) koji je korišćen u *in vivo* ispitivanju spazmolitičke aktivnosti je imao visok sadržaj ukupnih fenola (290,8 mg GAE/g), naringenina (521,1 mg/g), apigenina (92,2 mg/g) i kempferola (81,9 mg/g).

Rezultati *in vitro* ispitivanja pokazuju da ekstrakti imaju spazmolitičke efekte na spontane kontrakcije tankog creva pacova, kontrakcije indukovane acetilholinom, histaminom i jonom barijuma i kalijuma. Ispoljena spazmolitička aktivnost *H. flos* (biološki izvor *H. plicatum* DC.) je slabija od aktivnosti koju je ispoljio papaverin, kao nespecifični relaksans glatke muskulature.

Ekstrakt izaziva značajno depresorno dejstvo na krivi koja pokazuje zavisnost kontrakcije od koncentracije acetilholina. Acetilholin je neurotransmiter, koji izaziva kontrakcije tankog creva pacova, preko muskarinskih receptora na dva različita načina. Jedan mehanizam je aktivacija neselektivnih katjonskih kanala u ćelijskoj membrani, koja dovodi do depolarizacije membrane i otvaranja voltažno-zavisnih Ca^{2+} kanala i ulazak Ca^{2+} u ćeliju. Drugi mehanizam izazivanja kontrakcije je oslobađanje intracelularnog kalcijuma (Guata *et al.*, 2004).

Jedan od mogućih mehanizama za spazmolitičko dejstvo ekstrakta može biti posledica inhibicije histaminskih receptora. Dobijeni rezultati su pokazali inhibiciju kontrakcija tankog creva pacova, izazvane histaminom, koja zavisi od koncentracije. Histamin je poznat kao supstanca koja izaziva kontrakciju glatke muskulature gastrointestinalnog trakta, izazivajući, koncentraciono zavisnu, depolarizaciju membrane i povećanje ekscitabilnosti ćelija (Hemming *et al.*, 2000; Matsumoto *et al.* 2009).

Da bi se specificirala spazmolitička aktivnost ekstrakta i ispitalo da li su sastojci ekstrakta muskulotropne supstance, ispitivani su efekti ekstrakta na kontrakcije tankog creva pacova indukovane barijum-hloridom i kalijum-hloridom. Poznato je da barijum jon (Ba^{2+}) depolarizuje membrane ćelija glatke muskulature i otvara voltažno-zavisne Ca^{2+} kanale i joni Ca^{2+} ulaze u ćeliju (Karakı *et al.*, 1986). Ekstrakt izaziva statistički značajnu inhibiciju kontrakcija indukovanu barijum-hloridom.

Visoka koncentracija kalijum jona (K^+) izaziva kontrakcije glatke muskulature, otvaranjem voltažno zavisnih Ca^{2+} kanala, usled čega ekstracelularni Ca^{2+} ulazi u ćeliju i izaziva kontraktilni efekat (Godfrain *et al.*, 1986; Rang *et al.*, 2005). Ekstrakt pokazuje inhibični efekat na intestinalne kontrakcije izazvane barijum-hloridom i visokom koncentracijom K^+ . Činjenica da je ekstrakt *H. flos* (biološki izvor *H. plicatum* DC.) izazivao relaksaciju kontrakcija izazvanih K^+ , navodi na zaključak da je spazmolitičko dejstvo uslovljeno blokiranjem kalcijumovih kanala. Prema tvrdnjama Gilani *et al.*, (2006) i Gilani *et al.*, (2008) različiti biljni ekstrakti svoju spazmolitičku aktivnost, obično, ispoljavaju blokiranjem Ca^{2+} kanala. To ukazuje da biljni ekstrakti sprečavaju povećanje Ca^{2+} , time opuštaju mišiće (Rojas *et al.* 1995; Oliveira *et al.*, 2006; Brankovic *et al.*, 2009).

Postoji veliki broj dokaza da je spazmolitički efekat ekstrakata posledica prisustva fenolnih komponenti. Flavonoidi su jedna od najbrojnijih grupa fenola. Neki od njih *in vitro* inhibiraju intestinalni motilitet. Kvercetin izaziva relaksaciju tankog creva, koje je kontrahovano primenom kalijum-hlorida (Lozoya *et al.*, 1994). Apigenin i luteolin inhibiraju kontrakcije izolovanog intestinuma (Lemmens-Gruber *et al.*, 2006; Fleeer *et al.*, 2007). Ove komponente su antagonisti kalcijuma i ispoljavaju antiholinergičku aktivnost (Revuelta *et al.*, 1997; Gilani *et al.*, 2006).

Na osnovu dobijenih rezultata, spazmolitička aktivnost suvog ekstrakta *H. flos* (biološki izvor *H. plicatum* DC.) koja je ovde ispitivana, može se povezati sa prisustvom flavonoida i drugih fenolnih komponenti. Važna uloga fenolnih komponenti kao spazmolitičkih agenasa je naglašena u nekoliko radova. Takođe, naši rezultati su u skladu sa rezultatima spazmolitične aktivnosti drugih biljnih vrsta iz iste familije (Asteraceae), koje su objavili Mulatu *et al.*, (2007) i Palacios-Espinosa *et al.*, (2008).

4.6.4. Rezultati ispitivanja antimikrobne aktivnosti

Za ispitivanje antimikrobne aktivnosti ekstrakta smilja *H. flos* (biološki izvor *H. plicatum* DC.) korišćena je mikrodiluciona metoda na mikrotitracionim pločama, sistem od 96-bunara. Ekstrakt smilja razblažen je u dimetilsulfoksidu, a ispitivana su serijska razređenja.

Rezultati ukazuju na veoma dobar antibakterijski potencijal ekstrakta *H. flos* (biološki izvor *H. plicatum* DC.) (uzorak br. 11) koji je inhibirao rast testiranih bakterija, kvasaca pri niskim koncentracijama od 0,010 do 0,055 mg/ml i prikazani su u tabeli br. 4.25.

Gram pozitivne bakterije (*B. subtilis*, *L. monocytogenes*, *M. flavus*, *M. luteus*) su, sa pojedim izuzecima, bile osetljivije na ispitivani ekstrakt smilja od Gram negativnih bakterija, tj. njihov rast je bio potpuno inhibiran pri najnižim testiranim koncentracijama od 0,010 mg/ml do 0,02 mg/ml.

Tabela 4.25 Antibakterijska aktivnost ekstrakta smilja (mg /ml) *H. flos* (biološki izvor *H. plicatum* DC.)

Testirani mikroorganizmi	Ekstrakt smilja	Antibiotik
<i>Escherichia coli</i>	0,055	0,005
<i>Salmonella typhimurium</i>	0,050	0,038
<i>Salmonella enteritidis</i>	0,045	0,038
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,030	0,005
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,050	0,016
<i>Proteus mirabilis</i>	0,030	0,005
<i>Bacillus subtilis</i>	0,010	0,005
<i>Micrococcus flavus</i>	0,015	0,005
<i>Micrococcus luteus</i>	0,015	0,016
<i>Listeria monocytogenes</i>	0,020	0,016
<i>Candida albicans</i>	0,020	0,005

Najosetljivija je bila zemljišna bakterija *B. subtilis* čiji je rast bio inhibiran sa 0,010 mg/ml, dok je MIC vrednost za *M. luteus* i *M. flavus* bila je 0,015 mg/ml, za *C. albicans* bila je 0,020 mg/ml, a za *S. aureus* 0,03 mg/ml.

Za inhibiciju rasta Gram negativnih bakterija bile su neophodne veće koncentracije, kao što se može videti iz Tabele 4.25 . Najotpornija je *E. coli* za čiju je potpunu inhibiciju rasta bila neophodna koncentracija od 0,055 mg/ml.

Kada su u pitanju fitopatogene gljive, iz rezultata prikazanih u Tabeli 4.26 može se primetiti da su bile osjetljivije na ispitivani ekstrakt *H. flos* (biološki izvor *H. plicatum* DC.) od bakterija, odnosno da su za većinu testiranih gljiva utvrđene niže minimalne inhibitorne koncentracije ekstrakta smilja. Rast većeg broja testiranih gljiva bio je inhibiran koncentracijom od 0,005 mg/ml (5 µg/ml). Takođe, ekstrakt smilja je bio značajno aktivniji od referentnog antimikotika, flukonazola.

Veću otpornost na ispitivani ekstrakt ispoljili su *F. subglutinans*, *A. flavus* i *Chaetomium* sp. za koje je bila neophodna koncentracija od 0,04 mg/ml da bi se potpuno inhibirao njihov rast. Značajan je podatak da je i rast gljiva, potencijalnih producenata različitih mikotoksina, posebno aflatoksina (*A. flavus*) inhibiran veoma niskim koncentracijama ovog ekstrakta.

U istraživanjima Stanojković *et al.* (2003) među više biljaka familije *Asteraceae*, koje su ispitivali, ekstrakt smilja (biološki izvor *H. arenarium* (L.)) je, uz ekstrakt hajdučke trave, ispoljio najbolji inhibitorski efekat na rast većine testiranih bakterija. Rezultati dobijeni u našem radu ekstrakta *H. flos* (biološki izvor *H. plicatum* DC.) su u saglasnosti sa rezultatima Stanojković *et al.* (2003) za ekstrakt *H. arenarium* prema kojima su među testiranim bakterijama najotpornije na ekstrakt smilja bile koliformne bakterije *E. coli*, a među najosetljivijima *B. subtilis*.

Tabela 4.26 Antifungalna aktivnost ekstrakta smilja *H. flos* (biološki izvor *H. plicatum* DC.) izražena kroz MIC (mg /ml)

Testirane gljive	Ekstrakt	antimikotik
<i>Fusarium solani</i>	0,005	1,8
<i>Fusarium subglutinans</i>	0,04	1,6
<i>Fusarium equiseti</i>	0,005	1,0
<i>Fusarium verticillioides</i>	0,005	1,4
<i>Curvularia lunata</i>	0,01	1,0
<i>Aspergillus flavus</i>	0,04	1,8
<i>Chaetomium</i> sp.	0,04	2,0
<i>Alternaria alternata</i>	0,005	1,6
<i>Penicillium</i> sp.	0,005	1,8

Dobijeni rezultati ukazuju na jak antibakterijski i antifungalni potencijal ispitivanog ekstrakta *H. flos* (biološki izvor *H. plicatum* DC.) za šta su verovatno odgovorni flavonoidi.

Ekstrakt (uzorak br. 11) sa kojim je rađeno ispitivanje sadržavalo je ukupno fenola 290,8 mg GAE/g suvog ekstrakta, naringenina 521,1 mg/g, apigenina 92,2 mg/g i kempferola 81,9 mg/g.

Poznato je da flavonoidi jedinjenja poseduju izrazit antimikrobni potencijal kako u odnosu na bakterije tako i na gljive (Basile *et al.*, 1999; Saravanakumar *et al.*, 2009). U istraživanjima Arslan *et al.*, (2010), naringenin i apigenin su identifikovane u ispitivanom ekstraktu *H. plicatum* i dokazana je jaka inhibitorna aktivnost na rast kako bakterija tako i gljiva. Albayarak *et al.*, (2008; 2010) su ispitivali šesnaest ekstrakata biljaka iz roda *Helichrysum*, među kojima i *H. plicatum* subsp. *plicatum* i *H. plicatum* subsp. *polyphyllum*. Rezultati tog ispitivanja su pokazali da *H. plicatum* subsp. *plicatum* (koji je sadržavao 87,36 mg GAE/g ukupnih fenola) ispoljava antibakterijsko dejstvo na Gram pozitivne bakterije (*B. subtilis*, *S. aureus* (A) i (B)), najjače dejstvo od svih ispitivanih vrsta *Helichrysum* ima na *C. albicans*, dok na *E. coli* nije bio efikasan. *H. plicatum* subsp. *polyphyllum* je bio efikasniji na *E. coli*, a manje efikasan na *B. subtilis*, dok su ostale antimikrobne aktivnosti bile slične. *H. arenarium* subsp. *aucheri* je ispoljio jače dejstvo na Gram negativne bakterije blago antimikrobnu aktivnost na *E. coli* i jača aktivnost na *P. aeruginosa* u odnosu na gram pozitivne bakterije (na *B. subtilis* i *S. aureus* ne deluje) i slabije dejstvo na *C. albicans*.

Rezultati naših ispitivanja su u skladu sa navedenim rezultatima za *H. plicatum* subsp. *plicatum* i ukazuju, da ekstrakt smilja *H. plicatum* ima signifikantno antimikrobno dejstvo i može naći primenu u prehrambenoj industriji kao prirodni konzervans u borbi sa bakterijama uzročnicima kvarenja hrane kao što su *L. monocytogenes* ili *S. typhimurium*. U Rusiji se već koriste preparat u obliku granula tzv. arenarin, na bazi ekstrakta *H. arenarium*, koji se koristi u supresiji fitopatogenih bakterija (Stanojković *et al.*, 2003).

Kako je ekstrakt smilja *H. flos* (biološki izvor *H. plicatum* DC.) ispitivan u ovom radu ispoljio izrazit antifungalni potencijal na fitopatogene gljive izlovene i identifikovane sa lekovitog bilja tj. droga, jedna od mogućnosti je i njegova primena u zaštiti lekovitog bilja od fitopatogenih gljiva u vidu biološke kontrole. Biološka

kontrola podrazumeva primenu proizvoda prirodnog porekla, biljnih ekstrakata i etarskih ulja, kao i korisnih mikroorganizama i njihovih ekstrakata u zaštiti bilja (Pal i Gardener, 2006). S ovog aspekta, moguća je primena ekstrakta smilja *H. flos* (biološki izvor *H. plicatum* DC.) u kombinovanom tretmanu kako zemljišta u kome će biljka rasti, tako i folijanim prskanjem.

4.7. Uspostavljanje korelacija između aktivnosti i hemijskog sastava ekstrakata *Helichrysi flos* (biološki izvor *H. plicatum* DC.)

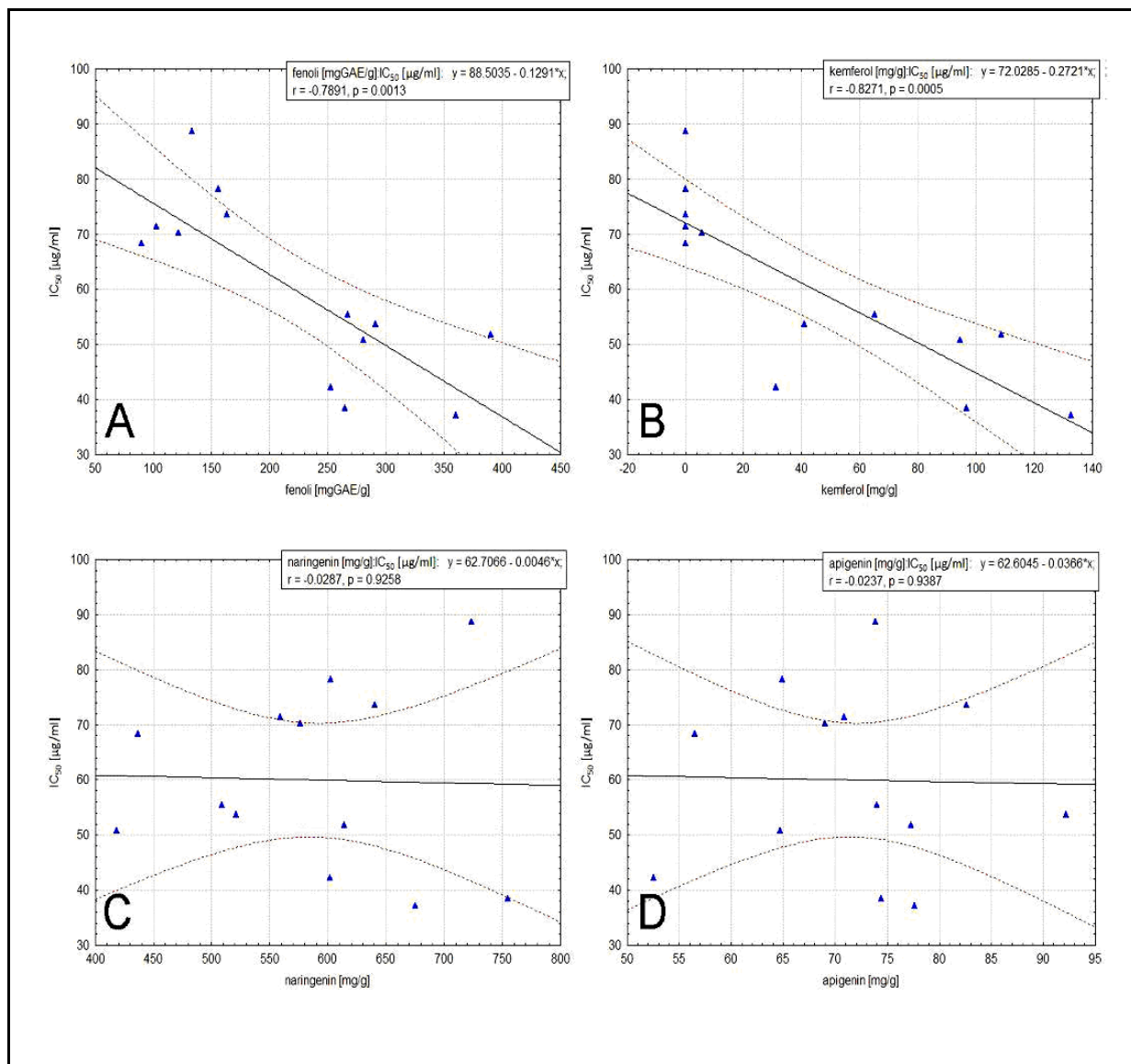
Korelacija između antioksidativne aktivnosti i sadržaja ukupnih fenola i kempferola u suvim ekstraktima

Dok jedni autori tvrde da je dobro poznato da su fenolna jedinjenja iz biljaka jaki oksidansi i da postoji bliska korelacija između sadržaja ukupnih fenola i DPPH antiradikalske aktivnosti (Jayaprakasha *et al.*, 2008; Pan *et al.*, 2008), drugi autori u svojim studijama nisu dokazali da ima korelacije između antioksidativne aktivnosti i sadržaja ukupnih fenola (Albayarak *et al.*, 2010).

Prikazani rezultati pokazuju da uzorci ekstrakta *H. flos* (biološki izvor *H. plicatum* DC.) sa višim sadržajem fenolnih komponenti (> 250 mg GAE/g) pokazuju bolju antiradikalnu aktivnost sa IC₅₀ vrednostima < 60 µg/ml, u poređenju sa uzorcima ekstrakata koji imaju nizak sadržaj ukupnih fenola (< 200 mg GAE/g) i IC₅₀ vrednostima > 60 µg/ml.

Proučavajući jačinu odnosa fenolnih jedinjenja u ekstraktima smilja *H. flos* (biološki izvor *H. plicatum* DC.) i antioksidativne aktivnosti tih ekstrakata, može se zaključiti da je vrednost inhibitorne koncentracije IC₅₀ u statistički veoma značajnoj (p<0.01) negativnoj korelaciji sa sadržajem ukupnih fenola i sa sadržajem kempferola, ostvarujući pri tom koeficijente korelacije $r = -0,79$ i $r = -0,83$, koji se daju okarakterisati kao jaka negativna korelacija (slika 4.43 A i B). Negativna korelacija IC₅₀ ekstrakata i sadržaja ukupnih fenola u njima, predstavlja pozitivnu korelaciju antioksidativne aktivnosti i sadržaja ukupnih fenola.

Za razliku od sadržaja ukupnih fenola i sadržaja kempferola, sadržaj naringenina i apigenina u ekstraktima, nisu pokazali statistički značajne jačine veza sa antioksidativnom aktivnošću ekstrakata (slika 4.43 C i D).



Slika 4.43 Korelacioni odnosi antioksidativne aktivnosti (IC_{50}) i sadržaja ukupnih fenola (mg GAE/g)(A); kempferola (mg/g) (B); naringenina (C) i apigenina (D)

Korelacija između spazmolitičke i antimikrobne aktivnosti i sadržaja ukupnih fenola

Takođe, uzorci ekstrakta koji su ispoljili snažnu spazmolitičku i antimikrobnost, imali su visok sadržaj ukupnih fenola i svih određivanih aglikona, tako da i ti rezultati sugerišu korelaciju između sadržaja ukupnih fenola i flavonoida sa spazmolitičkom i antimikrobnom aktivnosti.

Korelacija između citotoksične aktivnosti i sadržaja ukupnih fenola i kempferola

Statistička analiza citotoksične aktivnosti je pokazala značajnu negativnu korelaciju između sadržaja ukupnih fenola u uzorcima ekstrakata i inhibitorne koncentracije IC_{50} ekstrakata na PC3 i K562 ćelija ($r = -0,98$ i $r = -0,99$) i takođe, pokazala značajnu negativnu korelaciju između sadržaja kempferola u uzorcima ekstrakata i inhibitorne koncentracije IC_{50} ekstrakata na PC3 i K562 ćelija ($r = -0,88$ i $r = -0,94$). Iz dobijenih rezultata ispitivanja citotoksične aktivnosti i hemijske karakterizacije može se zaključiti da sa porastom sadržaja ukupnih fenola i sadržaja kempferola opadaju IC_{50} vrednosti tj. raste citotoksična aktivnost ekstrakata prema kulturama ćelija PC3 i K562.

Korelacija između sadržaja ukupnih fenola i citotoksične aktivnosti ukazuje na to da bi fenoli mogli biti aktivne supstanace, odnosno aktivni markeri na koji se standardizuje ekstrakt *H. flos* (biološki izvor *H. plicatum* DC.), kada se očekuje citotoksično dejstvo.

Korelacija kempferola i citotoksične aktivnosti ukazuje na to da bi i kempferol mogao biti aktivna supstanaca, odnosno aktivni marker na koji se standardizuje ekstrakt *H. flos* (biološki izvor *H. plicatum* DC.), kada se očekuje citotoksično dejstvo.

Korelacija između citotoksične aktivnosti i antioksidativne aktivnosti

Citotoksična aktivnost uzoraka 6,11 i 12 na K562 i PC3 kulture ćelija je u pozitivnoj korelaciji i sa njihovom antiradikalnom aktivnosti ($r = 0,98$ i $0,94$), što ukazuje na to da aktivne supstance, uklanjaju reaktivne molekule, koje prouzrokuju oštećenje ćelija. U skladu sa našim rezultatima, mnogi podaci iz literature govore o antitumorskom potencijalu, koji se vezuje za polifenolne komponente (Senthilkumar *et al.*, 2007; Geetha *et al.*, 2009).

5. ZAKLJUČAK

1. U doktorskoj disertaciji izvršena je karakterizacija suvih ekstrakata cvasti smilja, *Helichrysum plicatum* DC. u cilju optimizacije procesa ekstrakcije i ispitivanje njihove antioksidativne, citotoksične, spazmolitičke i antimikrobne aktivnosti. Posebna pažnja posvećena je pronalaženju korelacija između hemijskog sastava i ispoljenih farmakoloških aktivnosti suvih ekstrakata u cilju utvrđivanja aktivnih markera.
2. Izvršeno je ispitivanje stranih primesa, gubitak sušenjem i sadržaj pepela u biljnoj drogi i utvrđeno da odgovara zahtevima monografije ГФСССР XI za Flores *Helichrysi arenarii*, koja je jedina biljna vrsta iz roda *Helichrysum* koja ima monografiju u nacionalnim farmakopejama.
3. Biljna droga *H.flos* (biološki izvor *H. plicatum* DC.), je pripremljena za ekstrakciju tako da su dobijena dva uzorka, koji imaju različitu distribuciju veličine čestica. Utvrđeno je da formulacioni parametri (odnos droga : ekstragens i droga : rastvarač za re-ekstrakciju), kao i tehnološki parametar (način protoka ekstragensa) utiču na suvi ostatak u tečnom ekstraktu, odnosno na prinos suvog ekstrakta.
4. Suvi ekstrakti dobijeni su ekstrakcijom pripremljene biljne droge, primenom metode trostruke perkolacije (faza I), prečišćavanjem dobijenog tečnog ekstrakta metodom re-ekstrakcije (faza II) i uparavanjem pod vakuumom (faza III). U toku procesa ekstrakcije varirana su tri faktora: stepen usitnjenosti biljne droge, vrsta ekstragensa (40%, 50%, 60% etanol) i vrsta rastvarača za re-ekstrakciju (5:5, 9:1, 100:0; (v/v)) na tri nivoa. Na osnovu izvršene karakterizacije tečnih ekstrakata dobijenih u Fazi I vršeno je ispitivanje uticaja stepena usitnjenosti biljne droge i vrste ekstragensa za ekstrakciju na suvi ostatak u tečnom ekstraktu. Utvrđeno je da je najveći efekat na suvi ostatak u ekstraktu ima stepen usitnjenosti (koja ima 85% frakcije 355-2000 μm) i to veoma značajno utiče na suvi ostatak ($p < 0,01$).
5. Razvijena je HPTLC fingerprintna metoda za brzu i pouzdanu identifikaciju glikozida i aglikona flavonoida, prisutnih u biljnoj drogi i ekstraktima *H.flos* (biološki izvor *H. plicatum* DC.), koji se uočavaju u vidu različito obojenih fluorescentnih mrlja. HPTLC metoda je pokazala prisustvo žuto-narandžaste i žuto-zelene zone karakteristične za flavonske glikozide (glikozid apigenina i luteolina) i

fluorescentno plave zone karakteristične za fenolne kiseline. Glikozidi naringenin i kvercetin imaju žuto-narandžastu fluorescenciju, dok glukozid kempferola fluorescira žuto-zeleno. Takođe, i aglikoni fluoresciraju: zona apigenina - intezivno žuta do oker fluorescencija, kempferol- zelenkasto do svetlo-žuta fluorescencija, naringenin – blede-žuta fluorescencija.

6. Tentativna LC-UV-MS analiza prečišćenog ekstrakta *H.flos* (biološki izvor *H. plicatum* DC.), je pokazala prisustvo 18 jedinjenja. Identifikovani su fenolne kiseline (hlorogenska kiselina i cinarin) i flavonoidi koji su zastupljeni sa 4 grupe: flavanoni (naringenin i njegovi derivati), flavoni (apigenin, derivati apigenina i luteolina), flavonoli (kvercetin i kempferol i njihovi derivati) i halkoni (izosalipurpozid). Tentativnom LC-UV-MS analiza pokazala je da ima razlike u hromatogramima biljne droge i ekstrakata, zato što su pojedine komponente u biljnoj drogi zastupljene u nižim koncentracijama i detektuju se tek prečišćavanjem ekstrakata. Takođe, identifikovana je komponenta cinarin, koja do sada nije identifikovana ni u jednoj *Helichrysum* vrsti. Dobijeni hemijski profil *H. plicatum* DC. ukazuje na veliku sličnost sa oficinalnom vrstom *H. arenarium* (L.) Moench, a u isto vreme i na razlike u odnosu na nju.
7. U okviru hemijske karakterizacije suvih ekstrakata *H.flos* (biološki izvor *H. plicatum* DC.), određivan je sadržaj ukupnih fenola i on se kretao od 89,6 do 390,1 mg GAE/g suvog ekstrakta. Uspostavljena je statistički značajna ($p < 0,01$) negativna korelacija između prinosa ekstrakta (%) i sadržaja ukupnih fenola (mg GAE/g) sa koeficijentom korelacije $r = -0,73$.
8. Primenom tečne hromatografije u svim hidrolizovanim uzorcima ekstrakata *H. plicatum* identifikovani su i određeni sadržaji naringenina (248,6-754,7 mg/g) i apigenina (19,7-138,5 mg/g). Kempferol je identifikovan u svim uzorcima, a kvantifikovan u određenom broju uzoraka ekstrakata (4,5-132,6 mg/g). Rezultati određivanja sadržaja naringenina, apigenina i kempferola u nehidrolizovanim uzorcima ekstrakata, su bili mnogo niži i ukazuju na to da su flavonoidi u cvasti smilja, dominantno zastupljeni u vidu glikozida.
9. Optimizacija procesa ekstrakcije, bazirana na analizi uticaja faktora je pokazala različite optimalne oblasti izvođenja ekstrakcije u zavisnosti od cilja koji je

postavljen u ekstrakciji. U cilju povećanja prinosa suvih ekstrakata, optimizacija procesa ekstrakcije se zasniva na uticaju varirajućih faktora (stepena usitnjenosti biljne droge, vrste ekstragensa i vrste rastvarača za re-ekstrakciju) na prinose ekstrakata. Najveći uticaj na prinose ekstrakata ispoljio je rastvarač za re-ekstrakciju, kao i interakcija stepena usitnjenosti biljne droge i rastvarač za re-ekstrakciju. U okviru optimizacije procesa ekstrakcije u cilju povećanog sadržaja ukupnih fenola, naringenina, apigenina i kempferola, ispitan je uticaj istih varirajućih faktora na sadržaj ukupnih fenola, sadržaj naringenina, apigenina i kempferola. Veći prinos ekstrakta je dobijen primenom nižih koncentracija etanola u ekstragensu (50%) i etilacetat : etanol 5:5 (rastvarač za reekstrakciju), dok je veći sadržaj ukupnih fenola i flavonoida dobijen primenom viših koncentracija etanola u ekstragensu (60%) i etilacetat : etanol 9:1 (rastvarača za re-ekstrakciju). Optimalan stepen usitnjenosti biljne droge za ekstrakcije je sadržavao 53-57% frakcije 355-2000 μm i 42-45% frakcije $> 2000 \mu\text{m}$.

10. Antioksidativna aktivnost uzoraka suvih ekstrakata *H.flos* (biološki izvor *H. plicatum* DC.) je vršena kolorimetrijskim testom neutralizacije DPPH reagensa i ekstrakti su pokazali različitu antioksidativnu aktivnost (IC_{50} vrednosti 37,17-88,61 $\mu\text{g/ml}$), manju od aktivnosti referentne supstance. Uzorci ekstrakata koji su ispoljili najveću antioksidativnu aktivnost imali su najveći sadržaj ukupnih fenola i obrnuto.
11. Ispitivani uzorci ekstrakata *H.flos* (biološki izvor *H. plicatum* DC.) su pokazali sličnu, umerenu citotoksičnu aktivnost na ćelije adenokarcinoma grlića materice HeLa (IC_{50} vrednosti 41,9 - 42,1 $\mu\text{g/ml}$). Uzorak ekstrakata sa visokim sadržajem ukupnih fenola i kempferola je pokazao najveću aktivnost na ćelije mijeloidne leukemije K 562 (IC_{50} vrednosti 25,9 $\mu\text{g/ml}$) i na ćelije karcinoma prostate PC3 (IC_{50} vrednost 39,2 $\mu\text{g/ml}$). Kempferol, kao standardna supstanca, je bio najaktivniji na ćelije K 562 (IC_{50} vrednosti 7,1 μM), aktivniji od referentne supstance cisplatina. Takođe, vrlo je aktivan na ćelije HeLa (IC_{50} vrednosti 9,0 μM). Apigenin je najaktivniji protiv ćelija HeLa. Naringenin ima manju citotoksičnu aktivnost na navedene ćelije od druge dve standardne supstance.
12. Rezultati *in vitro* ispitivanja spazmolitičke aktivnosti odabranog ekstrakta *H. flos* (biološki izvor *H. plicatum* DC.) na izolovanom tankom crevu pacova, pokazuju da ekstrakt ima spazmolitičke efekte na spontane kontrakcije tankog creva, na

kontrakcije indukovane acetilholinom, histaminom, barijum jonom i kalijum jonom. Kumulativna koncentracija ekstrakta izaziva spazmolitički efekat na spontane kontrakcije tankog creva, izazivajući srednji kontraktilni odgovor od 81,68% (pri koncentraciji 0,01 mg/ml) i 30,08% (pri koncentraciji od 1 mg/ml), slično dejstvu papaverina (koncentracije 0,01-3 µg/ml). Ekstrakt (0,01-1 mg/ml) je relaksirao kontrakciju izazvanu visokom koncentracijom K⁺ (80 mM), slično dejstvu papaverina (0,01 - 3 µg/ml). Ekstrakt (0,03 - 0,3 mg/ml) je indukovao značajnu depresiju krive acetilholina (5 - 1500 nM) (p<0,01). Atropin (140 nM) je poništio dejstvo acetilholina. Ekstrakt u koncentraciji (0,03 - 0,3 mg/ml) je redukovao kontrakcije izazvane histaminom (1 - 300 nM) i barijum-hloridom (3 - 900 µM) (p<0,01).

13. Rezultati ispitivanja antimikrobne aktivnosti odabranog ekstrakta *H. flos* (biološki izvor *H. plicatum* DC.) mikrodilucionom metodom, na 20 mikroorganizama) ukazuju na njegov veoma dobar antibakterijski i antifungalni potencijal. MIC vrednosti za rast testiranih bakterija kretale su se od 0,010 do 0,055 mg/ml, pri čemu je najosetljivija bila *B. subtilis*, a najotpornija *E. coli*. Generalno, Gram pozitivne bakterije (*B. subtilis*, *L. monocytogenes*, *M. flavus* i *M. luteus*) su bile osetljivije na ispitivani ekstrakt od Gram negativnih bakterija (*E.coli* i *P. aeruginosa*). Veliku osetljivost na ekstrakt ispoljio je i kvasac *C. albicans* (MIC 0,02 mg/ml). Veoma dobar antibakterijski potencijal ispitivanog ekstrakta smilja ukazuje na mogućnost njegove primene u prehrambenoj industriji kao prirodni konzervans.
14. Fitopatogene gljive su bile osetljivije na ispitivani ekstrakt od bakterija, jer su utvrđene niže MIC vrednosti od 0,005 do 0,04 mg/ml, znatno niže nego i za komercijalni mikotik. Rast gljive *A. flavus*, potencijalnog producenta mikotoksina aflatoksina, je potpuno inhibiran veoma niskim koncentracijama (MIC 0,04 mg/ml) ekstrakta *H.flos* (biološki izvor *H. plicatum* DC.), što otvara mogućnost njegove primene u zaštiti lekovitog bilja od fitopatogenih gljiva u vidu biološke kontrole.
15. Rezultati ispitivanja hemijskog sastava i farmakološke aktivnosti ekstrakata, ukazuju na: a) pozitivnu korelaciju između antioksidativne aktivnosti ekstrakata i sadržaja ukupnih fenola ($r = 0,79$), b) pozitivnu korelaciju između antioksidativne aktivnosti ekstrakata i sadržaja kempferola ($r = 0,83$), c) pozitivnu korelaciju između citotoksične aktivnosti ekstrakata na PC3 i K562 kulture ćelija i sadržaja ukupnih

- fenola ($r = 0,98$ i $r = 0,99$), d) pozitivnu korelaciju između citotoksične aktivnosti ekstrakata na PC3 i K562 kulture ćelija i sadržaja kempferola ($r = 0,88$ i $r = 0,94$) i e) pozitivnu korelaciju između citotoksične aktivnosti ekstrakata na K562 i PC3 kulture ćelija i njihove antioksidativne aktivnosti ($r = 0,98$ i $r = 0,94$).
16. Korelacija između antioksidativne aktivnosti ekstrakata i sadržaja kempferola upućuje na zaključak da kempferol može biti aktivni marker kada se očekuje antioksidativno dejstvo ekstrakta i može da služi za standardizaciju ekstrakta smilja.
 17. Korelacija između citotoksične aktivnosti ekstrakata na PC3 i K562 kulture ćelija i sadržaja ukupnih fenola i kempferola upućuje na zaključak da ukupni fenoli i kempferol mogu biti aktivni markeri kada se očekuje citotoksično dejstvo ekstrakta na pomenute kulture malignih ćelija i mogu da služe za standardizaciju ekstrakta.
 18. Korelacija između antioksidativne aktivnosti ekstrakata i citotoksične aktivnosti ekstrakata na PC3 i K562 kulture ćelija ukazuje na mehanizam citotoksičnog dejstva aktivnih markera koji se zasniva na uklanjanju reaktivnih molekula tj. na njihovom antioksidativnom dejstvu. Takođe, uzorci ekstrakta koji su ispoljili snažnu spazmolitičku i antimikrobnu i aktivnost, imali su visok sadržaj ukupnih fenola i svih određivanih aglikona, tako da i ti rezultati sugerišu korelaciju između sadržaja ukupnih fenola i flavonoida sa spazmolitičkom, antimikrobnom i antifungalnom aktivnosti. Cilj uspostavljanja korelacije između hemijskog sastava ekstrakata *H. flos* (biološki izvor: *H. plicatum*) i njihovih farmakoloških dejstava, omogućava biofarmaceutsku karakterizaciju biljnih lekova u cilju formulacije kvalitetnih, bezbednih i efikasnih biljnih lekova ili tradicionalnih biljnih lekova koji sadrže ekstrakte *H. flos* (biološki izvor: *H. plicatum*).
 19. Može se zaključiti da su u doktorskoj disertaciji ispitani uticaji formulacionih i tehnoloških parametara na proces ekstrakcije biljne droge *H. flos* (biološki izvor *H. plicatum* DC.) u cilju optimizacije procesa ekstrakcije i izvršena je karakterizacija dobijenih ekstrakata. Pokazana je antioksidativna, citotoksična, spazmolitička i antimikrobna aktivnost ekstrakata, koja je bila u korelaciji sa hemijskim sastavom i koja može da doprinese pronalaženju aktivnih supstanci/markera u ekstraktima. Takođe, hemijski profil i ispoljene aktivnosti ekstrakata potvrđuju primenu *H. plicatum* DC. u tradicionalnoj medicini i ukazuju na sličnost ove vrste sa *H. arenarium* (L.) Moench. i predstavljaju dobru osnovu za naredna ispitivanja.

6. LITERATURA

Albayarak S., Sagdic O., Aksoy A., Hamzaoglu E. (2008) Antimicrobial and antioxidant activities of *Helichrysum* species from the Mediterranean region of Turkey. *Asian Journal of Chemistry*, 20, 3143-3152.

Albayarak S., Aksoy A., Sagdic O., Hamzaoglu E. (2010) Compositions, antioxidant and antimicrobial activities of *Helichrysum* (Asteraceae). *Food Chemistry*, 119, 114-122.

d'Alessandro L.G., Kriaa K., Nikov I., Dimitrov K. (2012) Ultrasound assisted extraction of polyphenols from black chokeberry, *Separation and Purification Technology*, 93, 42-47

Alvarez S., Zaobornyj T., Actis-Goretta L., Fraga G., Boveris A. (2002) Polyphenols and red wine as peroxy-nitrite scavengers: a chemiluminescent assay. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 957, 271-273.

Andersen Q., Markham K. (2006) Flavonoids. *Taylor & Francis group, Boca Raton*, 143-218.

Arslan S., Silicis., Percin D., Koc A.N., Er O. (2010) Antimicrobial Activity Of Poplar propolis on mutans streptococci and caries development in rats. Presented at the 88th IADR General Session and Exhibition, Barcelona.

Aslan M., Orhan D., Orhan N., Sezik E., Yesilada E. (2007) *In vivo* antidiabetic and antioxidant potential of *Helichrysum plicatum* ssp. *plicatum* capitulum in streptozotocin.- induced- diabetic rats. *J.Ethnopharmacology*, 109, 54-59.

Basile A., Giordano S., Lopez-Saez A., Cobianchi R. (1999) Antibacterial activity of pure flavonoids isolated from mosses. *Phytochemistry* (52), 1479-1482.

Bayir Y., Halic Z., Sait Keles M., Colak S., Cakir A., Kaya Y., Akçay F. (2011) *Helichrysum plicatum* DC. subsp. *plicatum* extract as a preventive agent in

experimentally induced urolithiasis model. *Journal of Ethnopharmacology*, 138,408-414.

Berghe V.A., Vlietinck A.J. (1991) Screening methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants. *Method for Plant Biochemistry*, 6, 47-68.

Blume H.H., Schug B.S. (2000) Biopharmaceutical characterisation of herbal medicinal products: are *in vivo* studies necessary? *European Journal of drug metabolism and pharmacokinetics*, 25, 01, 41-48.

Bonanomi M., Silvestrini B., Ghiara C., Mercati V. (2007) (WO/2007/083190) Water insoluble *Helichrysum* extract, process for preparing the same and uses thereof, PCT/IB2006/003921

Braca A., Sortino C., Politi M., Morelli I., Mendez J. (2002) Antioxidant activity of flavonoids from *Licania licaniaeflora*. *J. Ethnopharmacol.*, 79, 379-381.

Booth C. (1971) Fungal culture media. In: (Eds.J.R.Norris and D.W.Robbons), *Methods in microbiology*, Iv, 49-94. Academic Press, London and New York

Boselli C., Bianchi L., Barbieri A., Grana E. (1998) Effect of calcium antagonists on the response to noradrenaline in the whole and bisected rat vas deferens. *J Auton. Pharmacol.*, 18, 297-306.

Boselli-Smith V., Spina D., Page C.P. (2006) Phosphodiesterase inhibitors. *Br. J. Pharmacol.*, 47, 252-257.

Brankovic S., Kitic D., Radenkovic M., Veljkovic S., Golubovic T. (2009) Calcium blocking activity as a mechanism of the spasmolytic effect the essential oil of *Calamintha glandulosa* Silic on isolated rat ileum. *Gen Physiol Biophys*, 172-176.

Cimanga R., Mukenyi P., Kambu O., Tona G., Apers S., Totte J., Pieters L., Vlietinck A. (2010) The spasmolytic activity of extracts and some isolated compounds from the leaves of *Morinda morindoides* (Baker) Milne-Redh. (*Rubiaceae*). *J. Ethnopharmacol.*, 127, 215-220.

- Crozier A., Jaganath I. B., Clifford M. N. (2006) Phenols, polyphenols and tannins: an overview. In *Plant Secondary Metabolites* (Crozier A., Clifford M. N., Ashihara H., eds.) pp. 1–24, Blackwell Publishing Ltd, Oxford.
- Czinner E., Hagymási K., Blázovics A., Kéry Á., Szőke É. (2000) *In vitro* antioxidant properties of *Helichrysum arenarium* (L.) Moench. *Journal of Ethnopharmacology*, 73, 437-443.
- Czinner E., Hagymási K., Blázovics A., Kéry Á., Szőke É., Lemberkóczy E. (2001) The *in vitro* effect of *Helichrysum* flos on microsomal lipid peroxidation. *Journal of Ethnopharmacology*, 77, 31–35.
- Czinner E., Kusinszki L., Baumann D., Hamburger M., Kéry Á., Szőke É., Lemberkóczy E. (2002) Phytochemical study of phenolic compounds from *Helichrysum flos* by LC-DAD –MS, *Natural products in the New Millennium: Prospects and Industrial Application*, 99-109. Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands.
- Chiner E., Lemberkóczy E., Bihatsi–Karsai E., Vitanyi G., Lelik L. (2000) Composition of the essential oil from the inflorescence of *Helichrysum arenarium* (L.) Moench. *Journal of Essential Oil Research*, 12(6), 728-730.
- Daouk R., Dagher H., Sattout J. (1995) Antifungal activity of the essential oil of *Origanum syriacum* L. *J. Food Protect.*, 58, 1147-1149.
- Denny B.J., West P.W., Mathew T.C. (2008) Antagonistic interactions between the flavonoids hesperetin and naringenin and betalactam antibiotics against *Staphylococcus aureus*. *Brit J Biomed Sci*, 65, 145-147.
- Dombrowicz E., Swiatek L., Kopycki W. (1994) Phenolic acids in *Inflorescentia Helicrysi* and herba *Hieracii pilosellae*. *Pharmazie*, 47, 469-470.
- European Medicines Agency (2006) *CPMP/EWP/QWP/2820/00, EMEA/CVMP/815/00 Rev 1 – Guideline on specifications: Test procedures and acceptance criteria for herbal substances*¹, *Herbal preparations*² and *herbal medicinal products*³/traditional Herbal medicinal products.

European Medicines Agency (2003) Points to consider on the biopharmaceutical characterization of herbal medicinal products, *EMEA/HMPWP /344/03* London.

European Medicines Agency (2005) EMA/HMPC/CHMP/CVMP/287539/2005 Rev.1, Guideline on declaration of herbal substances and herbal preparations ¹ in herbal medicinal products ² /traditional herbal medicinal products

European Pharmacopoeia, 6 th edition, European Directorate for the Quality of Medicines, Strasbourg, France; 2008.

European Pharmacopoeia, 7 th edition, European Directorate for the Quality of Medicines, Strasbourg, France; 2011.

Fleer H., Verspohl E. (2007) Antispasmodic activity of an extract from *Plantago lanceolata* L. and some isolated compounds. *Phytomedicine*, 14, 409-414.

Flora Europea, Volume IV (2006) Plantaginaceae to *Compositae* (and *Rubiaceae*), Cambridge University Press, First published 1976, Sixth printing, 128-130.

Geetha S., Sai Ram M., Sharma S.K., Ilavazhagan G., Banerjee P.K., Sawhney R.C. (2009) Cytoprotective and antioxidant activity of seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) flavones against *tert*-butylhydroperoxide-induced cytotoxicity in lymphocytes. *Journal of Medicinal Food*, 12, 151-158.

Gibson M. (2012) Preformulacija i formulacija lekova, drugo izdanje, Beograd, 314-315.

Gilani A., Khan A., Ghayur M., Ali S., Herzig J. (2006) Antispasmodic effects of Rooibos tea (*Aspalathus linearis*) is mediated predominantly through K⁺ -channel activation. *Basic Clin.Pharmacol. Toxicol.*, 99, 365-373.

Gilani A., Khan A., Raoof M., Ghayur M., Siddiqui B., Vohra W., Begum S. (2008) Gastrointestinal, selective airways and urinary bladder relaxant effect of *Hyoscyamus niger* are mediated through dual blockade of muscarinic receptors and Ca²⁺ channels. *Fundam. Clin.Pharmacol.*, 22, 87-99.

Godfrain T., Miller R., Wibo M. (1986) Calcium antagonism and calcium entry blockade. *Pharmacol. Rev.* 38, 312-416

Государственная Фармакопея СССР (1990) XI Издания , В 2, Москва, Медицина, 244-246.

Guata Y., Aminata S., Amadou M., Babacar F. (2004) Myorelaxant and antispasmodic effects of the aqueous extract of *Mitragyna inermis barks* on Wistar rat ileum. *Fitoterapia* 75, 447-450.

Halliwell B., Gutteridge J. M. C. (1999) Ageing dihydroxyphenition, disease and therapy: a role for antioxidants? In Press, Oxford, England, 784-859.

Hanel H., Reaether W. (1988) A more sophisticated method of detrmning the fungicidal effect of water-insoluble preparations with a cell harvester, using miconazole as an example. *Mycoses*, 31, 148-154.

Hemming J. M., Guarraci F. A., Firth T. A., Jennings L. J., Nelson M. T., Mawe G. M. (2000) Actions of histamine on muscle and ganglia of the guinea pig gallbladder. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 279, 622-630.

Hui L.V., Qian LI., Zhong J., Liao L., Akber H. (2008) Studies on Flavonoids from *Helichrysum arenarium*. *Chinese Pharmaceutical ournal*, 43 (01), 11-13.

Hirvonen T., Virtamo J., Korhonen P., Albanes D., Pietinen P. (2001) Flavonol and flavone intake and the risk of cancer in male smokers (Finland). *Cancer Causes Control*, 12, 789-796.

Jayaprakasha G. K., Rao L. J., Sakariah K. K. (2004) Antioxidant activities offlavidin in different *in vitro* model systems. *Bioorganic Medicinal Chemistry*, 12, 5141–5146.

Jayaprakasha G.K., Girenavar B., Patil B.S. (2008) Radical scavenging activities of Rio Red grapefruits and Sour orange fruit extracts in different *in vitro* model systems. *Bioresource Technology*, 99, 4484-4494.

Jugoslovenska farmakopeja, peto izdanje (2000) Savezni zavod za zaštitu i unapređenje zdravlja, Savremena administracija, Beograd.

Kaneda T., Shimizu K., Nakajyo S., Urakawa N.(1998) The difference in the inhibitory mechanisms of papaverine on vascular and intestinal smooth muscles. *Eur. J. Pharmacol.*, 355, 149-157.

Karaki H., Satake N., Shibata S. (1986) Mechanism of barium-induced contraction in the vascular smooth muscle of rabbit aorta. *Br. J. Pharmacol.*, 88, 821-826.

Karamenderes C., Apaydin S. (2003) Antispasmodic effect of *Achillea nobillis* L. subsp. *sipylea* (O.Schwarz) Bassler on the rat isolated duodenum. *J. Ethnopharmacol.* 84, 175-179.

Kolayli S., Şahin H., Ulusoy E., Tarhan Ö. (2010) Phenolic Composition and antioxidant Capacities of *Helichrysum plicatum*, Hacettepe *J.Biol.&Chem.*, 38(4), 269-276.

Kukula-Koch W., Aligainnis N., Halabalaki M., Skaltsounis A.L., Glowniak K., Kalpoutzakis E. (2013) Influence of extraction procedures on phenolic content and antioxidant activity of Cretan barberry herb. *Food Chemistry*, 138, 406-413.

Kulevanova S., Stefova M., Stafilov T. (2000) HPTLC identification and determination of flavones aglycones in *Helichrysum plicatum* DC.(Asteraceae). *Pharmazie* 55(5), 391-392.

Лебеда А.Ф., Цуренко Х.И., Исайкина, Собко Б.Г. (2004) Лекарственные растения, Самая полная энциклопедия, Аст-Пресс Книга, Москва.

Lekse J. M., Xia L., Stark J., Morrow J. D., May J. M. (2001) Plant catechols prevent lipid peroxidation in human plasma and erythrocytes. *Mol. Cell Biochem.*, 226, 89-95.

Lemberkovics E., Chiner E., Balazs A., Bihatsi –Karsai E., Vitanyi G., Lelik L., Bernath J., Szoke E. (2001) New data on composition of the essential oil from the

inflorescence of *Helichrysum arenarium* (L.) Moench. *Acta Pharmaceutica Hungarica*, 71(2), 187-191

Lemmens-Gruber R., Marchart E., Rawnduzi P., Engel N., Benedek B., Kopp B. (2006) Investigation of the spasmolytic activity of the flavonoid fraction of *Achillea millefolium* s.l. on isolated guinea pig ilea. *Arzneimittelforschung*, 56, 582-588.

Leslie S. E. (2002) *Milestones in the Evaluation of Chromatography*, ISBN-13: 9780971714403, Publisher: ChromSource, 20614 NW Quail Hollow Drive, Portland, OR 97229.

Lourens A.C.U., Van Vuuren S.F., Viljoen A.M., Davids H., van Heerden F.R. (2011) Antimicrobial activity and *in vitro* cytotoxicity of selected South African *Helichrysum* species. *South African Journal of Botany*, 77, 229-235.

Lourens A.C.U., Viljoen A.M., van Heerden F.R. (2008) South African *Helichrysum* species: A review of the traditional uses, biological activity and phytochemistry. *J. Ethnopharmacology*, 119, 630-652.

Lozoya X., Meckes M., Abou-Zaid M., Tortoriello J., Nozzollilo C., Amason J. (1994) Quercetin glycosides in *Psidium guajava* L. leaves and determination of a spasmolytic principle. *Arch. Med.Res.*, 25, 11-15.

Madsen H. L., Nielsen B. R., Bertelsen G., Skibsted L. H. (1996) Screening of antioxidative activity of spices. A comparison between assays based on ESR spin trapping and electrochemical measurement of oxygen consumption. *Food Chemistry*, 57, 331-337.

Mahady G., Pendland S., Stoia A., Hamill F., Fabricant D., Dietz B., Chadwick L. (2005) *In vitro* susceptibility of *Helicobacter pylori* to botanical extracts used traditionally for the treatment of gastrointestinal disorders. *Phytother. Res.*, 19, 988-991.

- Martynov A.V., Smelians'ka M.V., Kozhukh I.O., Volkovich O.O., Popova N.V., Kislichenko V.S. (2000) The antineoplastic action of glycoproteins similar to IgG. *Farmatsevtichnii Zhurnal* (Kiev), (5) 78-81
- Matsumoto T., Horiuchi M., Kamata K., Seyama Y. (2009) Effects of *Bidens pilosa* L. var. radiata SCHERFF treated with enzyme on histamine-induced contraction of guinea pig ileum and on histamine release from mast cells. *J. Smooth Muscle Res.*, 45, 75-86.
- May G., Willuhn G. (1978) Antiviral activity of aqueous extracts from medicinal plants in tissue cultures. *Arzneimittel-Forschung*, 28, 1-7.
- Meriçli A.H., Damadyan B. Çubuku B. (1986) Flavonoids of Turkish *Helichrysum arenarium* (L) Moench (*Asteraceae*). *Sci.Pharm*, 54, 363-365.
- Miura Y., Chiba T., Tomita I., Koizumi H., Miura S., Umegaki K., Hara Y., Ikeda M., Tomita T. (2001) Tea catechins prevent the development of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J. Nutr.*, 131, 27-32.
- Mojzisova G., Kuchta M. (2001) Dietary flavonoids and risk of coronary heart disease. *Physiol. Res.*, 50, 529-535.
- Moller J. K. S., Madsen H. L., Altonen T., Skibsted L. H. (1999) Dittany (*Origanum dictamnus*) as a source of water-extractable antioxidants. *Food Chemistry*, 64, 215-219.
- Mosmann T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65, 55-63.
- Mulatu A., Mekonnen Y. (2007) Spasmolytic effects of *Artemisia afra* and *Artemisia rehan* in tissue preparations. *Ethiop. Med. J.*, 45, 371-376.
- NCCLS (1997) Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests: Approved Standard M2-A7. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA, USA.

- Oezgen U., Mavi A., Terzi Z., Coskun M., Yildirim A. (2004) Antioxidant activities and total phenolic compounds amount of some Asteraceae species, *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1(3), 203-216.
- Oliveira R., Lima J., Ribeiro L., Silva J., Monteiro F., Asis T., Agra M., Silva T., Almeida F., Silva B. (2006) Spasmolytic action of the methanol extract and isojuripidine from *Solanum asterophorum* Mart. (*Solanaceae*) leaves in guinea-pig ileum. *Z. Naturforsch*, 61, 799-805.
- Pal K., Gardener B. (2006) Biological Control of Plant Pathogens. *The Plant Health Instructor*, 10, 1117-42.
- Palacios-Espinosa F., Deciga-Campos M., Mata R. (2008) Antinociceptive, hypoglycemic and spasmolytic effects of *Brickellia veronicifolia*. *J. Ethnopharmacol.*, 13, 448-454.
- Pan Y., Wang K., Huang S., Wang H., Mu X., He C., Ji X, Zhang J., Huang F. (2008) Antioxidant activity of microwave-assisted extract of longan (*Dimocarpus longan* Lour.) peel. *Food Chemistry*, 106, 1264-1270.
- Parojčić J., Ibrić S., Đurić Z. (2006) Farmaceutska tehnologija sa biofarmacijom. Priručnik za praktičnu nastavu Biofarmacija-tablete-kapsule, Beograd.
- PDR for Herbal Medicines (2004) 3rd ed., Thomson PDR, Montvale, NJ, USA, 457-458.
- Pharmacopoeia Helvetica 11, Swiss Agency for Therapeutic Products, Bern, 2012 , 313-314.
- Pietta P., Mauri P., Gardana C. (1991) High-performance liquid determinatin of flavonoid glucosides from *Helichrysum italicum*, *J.Chromatogr.*, 537,449-452.
- Pietta P.G. (2000) Flavonoids as Antioxidants *J.Nat. Prod.* 63, 1035-1042.

- Puerta R., Saenz M.T., Garcia M.D. (1993) Cytotoxic activity against HEP-2 cells and antibacterial activity of essential oil from *Helichrysum picardii*. *Phytotherapy Research*, 7, 378-380.
- Radenkovic M., Ivetic V., Popovic M., Mimica-Dukic N., Veljkovic S. (2006) Neurophysiological effects of Mistletoe (*Viscum album* L.) on isolated rat intestines. *Phytother. Res.*, 20, 374–377.
- Rang H.P., Dale M.M., Ritter J.M., Moore P.K. (2005) Farmakologija, peto izdanje, Data Status, Beograd, 295.
- Revuelta M., Cantabrana B., Hidalgo A. (1997) Depolarization-dependent effect of flavonoids in rat uterine smooth muscle contraction elicited by CaCl₂. *Gen. Pharmacol.*, 29, 847-857.
- Rojas A., Cruz S., Rauch V., Bye R., Linares E., Mata R. (1995) Spasmolytic potential of some plants used in traditional medicine for the treatment of gastrointestinal disorders. *Phytomedicine*, 2, 51-55
- Rosa A., Deiana M., Atzeri A., Corona G., Incani A., Melis M.P., Appendino G., Dessi M.A. (2007) Evaluation of the antioxidant and cytotoxic activity of arzanol, a prenylated α -pyrone-phloroglucinol etherodimer from *Helichrysum italicum* subsp. *microphyllum*. *Chemico-Biological Interactions*, 165, 117-126.
- Sala A., Recio M.C., Schinella G., Mañez S., Giner R.M., Cerda-Nicolas M., Rios J.L. (2003a) Assessment of the anti-inflammatory activity and free radical scavenger activity of tiliroside. *European Journal of Pharmacology*, 461, 53-61.
- Sala A., Recio M.C., Schinella G., Mañez S., Giner R.M., Rios J.L. (2003b) A new dual inhibitor of arachidonate metabolism isolated from *Helichrysum italicum*. *European Journal of Pharmacology*, 460, 219-226.
- Сало В.П., Спиридонов Б.Н., Литвиненко В.И., Прокопенко А.П., Матвеев Б.И., Литвиненко А.Л., Георгиевский, Авторское свидетельство СССР N° 587 940, кл А 61, к 35/78, 1978.

- Sanchez de Rojas, V., Ortega T., Villar A. (1995) Inhibitory effects of *Cistus populifollus* on contractile responses in the isolated rat duodenum. *J. Ethnopharmacol.* 46, 59-62.
- Saravanakumar A., Venteshwaran K., Vanitha J., Ganesh M., Vasudevan M., Sivakumar T. (2009) Evaluation of antibacterial activity, phenol and flavonoid contents of *Thespesia populnea* flower extracts. *Pak. J. Pharm. Sci.*, 22 (3) 282-286.
- Sarfaraz N. (2007) Handbook of Preformulation Chemical, Biological, and Botanical Drugs, Pharmaceutical Scientist Inc. Deerfield, Illinois. By Informa Healthcare USA, Inc., 391-410.
- Senthilkumar N., Badami S., Cherian M.M., Hariharapura R.C. (2007) Potent *in vitro* cytotoxic and antioxidant activity of *Careya arborea* bark extracts. *Phytotherapy Research*, 21, 492-495.
- Silva B.A., Ferreres F., Malva J.O., Dias A.C.P. (2005) Phytochemical and antioxidant characterization of *Hypericum perforatum* alcoholic extracts. *Food Chemistry*, 90, 157-167.
- Singleton V.L., Ross J.A. (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-153.
- Skakun N., Stepanov N. (1988) Comparative evaluation of the hepatoprotective, antioxidant and choleric activity of flavonoid drugs. *Vrcebnoe Delo*, 12, 52-54.
- Suzgec A., Mericli A.H., Houghton P. C., Ubukcua B. (2005) Flavonoids of *Helichrysum compactum* and their antioxidant and antibacterial activity. *Fitoterapia*, 76, 269 – 272.
- Sroka Z., Kuta I., Cisowski W., Dryś A., (2004) Antiradical activity of hydrolyzed and non-hydrolyzed extracts from *Helichrysi inflorescentia* and its phenolic contents. *Zeitschrift für Naturforschung*, 59, 363–367.

Stanojević Lj., Stanković M., Nikolić Lj., Nikolić V. (2007) The influence of the operation conditions and the extraction techniques on the yield, kinetics and the composition of the ethanol extracts of *Hieracium pilosella* L., *CI&CEQ*, 13(4), 199-204.

Stanojević Lj., Stanković M., Cakić M., Nikolić V., Nikolić Lj., Ilić D. (2009) The effect of the operation conditions and the extraction techniques on the yield, kinetics and the composition of the methanol extracts of *Hieracium pilosella* L., *Hem. ind.* 63(2), 79–86.

Stanojević Lj., Stanković M., Veljković V., Cakić M., Nikolić V., Ilić D. (2011) Uticaj tehnike ekstrakcije na kinetiku, prinos i antioksidativna svojstva etilacetatnih ekstrakata *Hieracium pilosella* L., *Zbornik radova Tehnološkog fakulteta u Leskovcu*, 20 125-135.

Stanojković A., Petrović J., Čomić Lj., Čurčić (2003) Antibacterial activity of the water, ethanol and ethyl acetate extracts of *Helichrysum arenarum* (L.) Lek. *Sirovine*, XXIII, 23, 37-41.

Stevanović V. (1999) Iščezli i krajnje ugroženi taksoni. *Crvena knjiga Flore Srbije*, Beograd, 341.

Stević T. (2013) Komparativna analiza agenasa za biološku kontrolu patogenih gljiva izovanih sa lekovitih biljaka. Doktorska disertacija. Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu.

Tepe B., Munevver Sokmen H., Askin A., Atalay S. (2005) *In vitro* antioxidant activities of the methanol extracts of four *Helichrysum species* from Turkey. *Food Chemistry*, 90, 685-689.

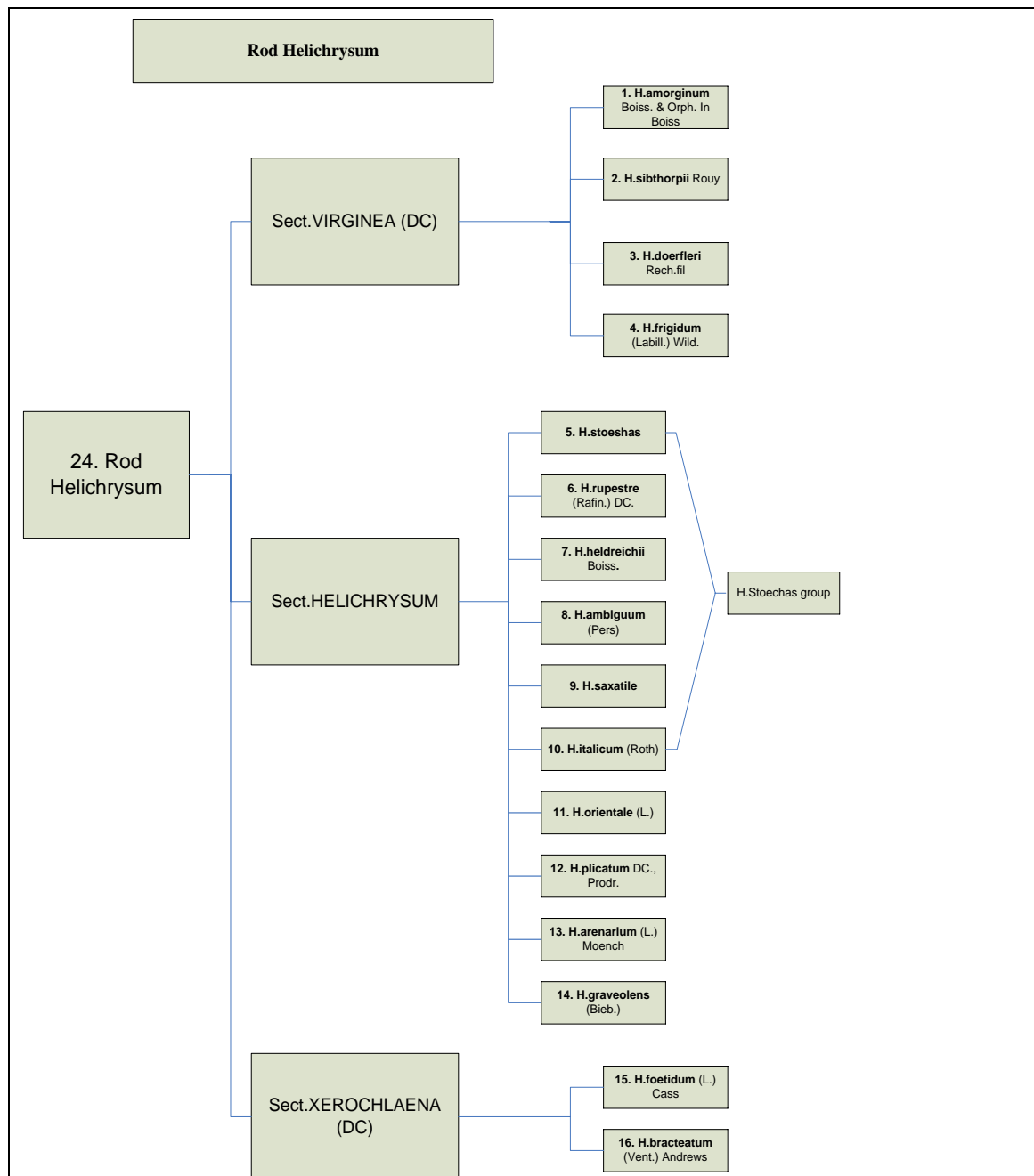
Velioglu Y. S., Mazza G., Gao L., Oomah B. D. (1998) Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 4113–4117.

Zakon o lekovima i medicinskim sredstvima, Sl. glasnik RS, br.30/2010., 15.

- Zdravković A., Stanojević Lj., Stanković M., Cakić M., Nikolić V., Nikolić Lj., Ilić D. (2012.) Uticaj operativnih uslova i tehnike ekstrakcije na prinos, kinetiku i sastav vodeno-etanolnih ekstrakata iz lista koprive (*Urtica dioica* L.). *Savremene tehnologije*, 1(1), 30-37
- Waldmann S., Almukainzi M., Bou-Chacra N.A., Amidon G. L., Lee B.J., Feng J., Kanfer I., Zuo J. Z, Wei H., Bolger M.B., Löbenberg R., (2012) Provisional Biopharmaceutical Classification of Some Common Herbs Used in Western Medicine, *Mol. Pharmaceutics*, 9, 815-822.
- Walle T. (2004) Absorption and metabolism of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine*, 36, 829-837.
- Wang L.B., Gao H.Y., Toshi M., Sun B.H., Huang J., Masayuki Y., Wu L.J. (2009) Flavonones from *Helichrysi flos* syn., *Chin J.Nat.Med*, 7(5), 357-359.
- Warma S.D., Devamanoharan P.S., Morris S.M. (1995) Prevention of cataracts by nutritional and metabolic antioxidants. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 35, 111-129.
- WHO Monographs on Selected Plants (2002), Vol 2, World Health Organization, Geneva, 175-185.
- Wojdylo A., Oszmianski J., Czemerys R. (2007) Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chemistry*, 105, 940–949.
- Wu X., Yu X. , Jing H., (2011) Optimization of Phenolic Antioxidant Extraction from Wuweizi (*Schisandra chinensis*) Pulp Using Random-Centroid Optimization Methodology, *Int J Mol Sci.*; 12(9), 6255-6266.
- Yagura T., Motomiya T., Ito M., Honda G., Iida A., Kiuchi F., Tokuda H., Nishino H. (2008) Anticarcinogenic compounds in the Uzbek medicinal plant *Helichrysum maracandicum*. *Journal of Natural Medicines*, 62, 174-178.

7. PRILOZI

Prilog 7.1 Taksonomski prikaz vrsta roda *Helichrysum* u Evropi (Flora Europea, 2006)



Prilog 7.2 Pregled zahteva ΓΦCCCP XI, Ph. Helv. 11 th., WHO monografija za biljnu drogu *H. flos* (biološki izvor *H. arenarium*)

	ΓΦCCCP XI	Ph. Helv. 11 th.	WHO
Opis	+	+	+
Mikroskopija	+	+	+
Identifikacija	Identifikacija. flavonoida bojenom reakcijom	TLC sa standardom hiperozida	TLC flavonoida
Kvalitativni sastav	ne manje od 6 % ukupnih flavonoida izraženo kao izosalipurpozid	-	ne manje od 6 % ukupnih flavonoida izraženo kao izosalipurpozid*/flavonoidi , ne manje od 0.6%računato kao hiperozid **/ ne manje od 0.5% računato kao kvercetin***
Sadržaj vlage	ne više 12 %	-	max 12 */10 ***
pepeo	ne više od 8%	ne više od 6 %	ne više od 8 /7 % *
Sulfatni pepeo		-	ne više od 8.5 %
Cvetovi sa ostacima stabljike > 1 cm	ne više od 5 %	-	max 5%
Ostaci korpica	ne više od 5 %	-	
Izlomljene cvetne glavice < 2mm	ne više od 5 %	-	max 5%
Organskih primesa	ne više od 0,5 %	-	ne više od 0,5%.
Ostale primese	-	Ne više od 2%	Ne više od 2%
Mineralne primesa	ne više od 0,5%.		ne više od 0,5%.
Odsustvo			<i>H. angustifolium</i> DC, <i>H.stoechas</i> <i>H. italicum</i>
Metoda za određivanje sadržaja	Spektrofotometrijsko određivanje isosalipurpozida	-	
Mikrobiološko ispitivanje	-	+	+
Rezidue pesticida	-	-	Aldrin i dieldrin ne više od 0.05 mg/kg
Teški metali	-	-	+
Radioaktivnost	-	-	+
Pakovanje	U platnene ili lanene vreće od 7 kg, papirne vreće od 4 kg	-	-
Rok trajanja	4 god.	-	-

Prilog 7.3 Pregled aktivnosti i farmakoloških dejstava *Helichrysi flos* (biološki izvor *Helichrysum arenarium*) prema monografijama WHO, PDR, Komisije E

	WHO	PDR	Komisija E
Primena popisana u farmakopejama i dr. propisima	Tretman dispeptičnih poremećaja (farmakopeje)	Sadrži antibakterijske komponente, Blag holeretik Blag spazmolitik Tretman dispeptičnih poremećaja	Tretman dispeptičnih poremećaja Blag holeretik
Primena u tradicionalnoj medicini	holeretik hepatoprotektiv detoksikaciona aktivnost diuretik antibakterijski sastojci pojačava lučenje sokova želuca i pankreasa blagi spazmolitik adjuvans kod hroničnog holecistitisa kod grčeva žučne kese oboljenja žučnih puteva smetnji u varenju povećanje apetita	Dodatak u tretmanu hronične upale žučnih puteva i žučne kese, praćeno grčevima. Diuretik kod žutice, gihta, reumatizma, bolova u bubrežima i hidropsije	-
Eksperimentalna farmakologija	Antioksidativna aktivnost Antimikrobna aktivnost Spazmolitična aktivnost Diuretička aktivnost Hipotenzivna aktivnost Citotoksična aktivnost	-	-
Klinička farmakologija	Nema podataka	-	-
Sporedni efekti	Nema podataka	Nema podataka	Nema podataka
Kontraindikacije	Kod obstrukcije žučnih puteva usled prisustva kamenja	Kod obstrukcije žučnih puteva usled prisustva kamenja	Obstrukcija žučnih puteva.
Mere opreza	Bilijarna kongestija usled hronične primene	-	Primena kod kamena u žuči (konsultacije sa lekarom)
Interakcija sa drugim lekovima, kancerogeno, mutageno, teratogeno dejstvo, primena u trudnoći i dojenju, primena kod dece	Nema podataka	-	Nema podataka
Dozirani oblici	Usitnjena droga za čaj i druge galenske oblike za internu upotrebu (Komisija E)	Usitnjena droga za infuze i druge galenske oblike za internu upotrebu. Ekstrakti ove biljne droge ulaze u sastav lekova koji imaju holagogno dejstvo. Pomoćni sastojak u mnogim čajnim mešavinama.	Usitnjena droga za infuze i druge galenske oblike za internu upotrebu
Doziranje	Srednja dnevna doza: 3 g biljne droge ili ekvivalentna količina biljnog preparata Internu upotrebu. Infuz: 1 kašika x 3 dnevno, 20-40 min pre jela (pripremljen dodatkom cvetova u 200 ml prokjučale vode, kuvati 15 min) Dekokt: 1 kašičica x 3 dnevno pre jela (pripremljen dodatkom 10 g droge u 200 ml ključale vode i kuvati 30 min. Suvi ekstrakt: iz sprasene droge, 1 g x 3 dnevno, 23 nedelje	Komercijalne farmaceutske forme : čajevi, kapi i složeni preparati Preparati: Infuz: 3-4 g (2 kafene kašičice) droge prelići ključalom vodom, 10 min odstoji, piti tokom dana. Svaki dan pripremiti svež napitak Dnevna doza : prosečna dnevna doza je 3 g droge	Srednja dnevna doza 3 g biljne droge i drugih galenskih preparata za internu upotrebu

SPISAK PUBLIKOVANIH RADOVA

D.Bigović, K.Šavikin, T.Janković, N.Menković, G.Zdunić, T.Stanojković, Z.Đurić, Antiradical and Cytotoxic Activity of Different *Helichrysum plicatum* Flower Extracts, Natural Product Communications, 2011 Vol.6, No6 819-822

D.Bigović, S.Branković, D.Kitic, M.Radenković, T.Janković, K.Šavikin, S.Živanović, Relaxant Effect of the Ethanol Extract of *Helichrysum plicatum* (Asteraceae) on Isolated Rat Ileum Contractions, Molecules 2010,15(5),3391-3401

BIOGRAFIJA AUTORA

Dubravka Bigović (rođ. Lazarov) je rođena 19. 07. 1968. godine u Bačkoj Palanci. U Somboru završila Srednju medicinsku školu „Dr Ružica Rip“, smer farmaceutski tehničar, sa prosečnom ocenom 5.00. Farmaceutski fakultet Univerziteta u Beogradu upisala je 1987. godine. Diplomirala je 1992. godine sa prosečnom ocenom 9,66. Poslediplomske studije je upisala 1994. godine na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, Katedra za farmaceutsku tehnologiju. Od 2007. godine upisana je na doktorske studije na Katedri za farmaceutsku tehnologiju i kozmetologiju Farmaceutskog fakulteta u Beogradu. Od 1992. do 1999.godine zaposlena u ICN Galenici, u Centru za istraživanje i razvoj farmaceutskih tehnologija. U tom periodu je formulisala i uvela u redovnu proizvodnju 8 lekova za upotrebu u veterini. Od 1999. godine je zaposlena u Institutu za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić“ i to na poslovima - rukovodilac primarne prerade bilja (1999.-2002.), rukovodilac Odseka farmaceutske proizvodnje (2002.-2009.) i pomoćnik direktora za proizvodnju (od 2010. god.), na kojima i sada radi.

Dipl ph Dubravka Bigović je rezultate svog naučnoistraživačkog rada objavila u ukupno **13** bibliografskih jedinica, od toga 1 patent i 2 rada u časopisima od međunarodnog značaja.

Dubravka Bigović (nee Lazarov) was born on 19th July 1968 in Bačka Palanka. She completed Secondary Medical School "Dr. Ruzica Rip", the Pharmacy Technician Department, with an average grade of 5.00. She enrolled on The Faculty of Pharmacy - the University of Belgrade in 1987 and graduated in 1992 with an average grade of 9.66. D. Bigović enrolled on her graduate studies in 1994 at Faculty of Pharmacy - the University of Belgrade, the Pharmaceutical Technology Department. In the year 2007 she enrolled on the PhD programme at the Department of Pharmaceutical Technology and Cosmetology, Faculty of Pharmacy. From 1992. to 1999 she was employed in the ICN Galenika, the Centre for Research and Development of Pharmaceutical Technology. During that period she formulated and implemented 8 drugs into the regular production of drugs for veterinary use. Since 1999 she has been employed with the Institute for Medicinal Plant Research "Dr Josif Pancic" holding the following

positions: the Head of Plant Primary Processing Department (1999 to 2002), Head of the Pharmaceutical Production Department (2002 to 2009); and since 2010 she has been holding the position of Assistant Production Director.

The results of her scientific- research work, BSc ph Dubravka Bigovic has published in 13 bibliographies, including 1 patent and 2 papers in journals of the international significance.

Изјава о ауторству

Потписани Дубравка Биговић
број уписа 91/2006

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Карактеризација сувих екстраката цвасти смиља, *Helichrysum plicatum* DC. и испитивање њихове антиоксидативне, цитотоксичне, спазмолитичке и антимикробне активности

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

Потпис докторанда

Д. Биговић

У Београду, 10. 09. 2013. године

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Дубравка Биговић
Број уписа 91/2006
Студијски програм докторске студије из области фармације, модул
фармацеутска технологија
Наслов рада „**Карактеризација сувих екстраката цвасти смиља,
Helichrysum plicatum DC. и испитивање њихове антиоксидативне,
цитотоксичне, спазмолитичке и антимикробне активности**“
Ментор Проф. др Зорица Ђурић и др Небојша Менковић

Потписани Дубравка Биговић

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

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

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

Потпис докторанда

D. Bogović

У Београду, 10.09.2013. године

Изјава о коришћењу

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

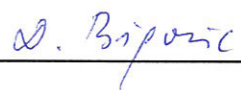
“Карактеризација сувих екстраката цвасти смиља, *Helichrysum plicatum* DC. и испитивање њихове антиоксидативне, цитотоксичне, спазмолитичке и антимикробне активности” која је моје ауторско дело.

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

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

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

Потпис докторанда



У Београду, 10. 09. 2013. године