



Univerzitet u Novom Sadu
Prirodno-matematički fakultet
Departman za hemiju,
biohemiju i zaštitu životne
sredine



Sanja Vlasisavljević

**HEMIJSKA, BIOHEMIJSKA I MIKROBIOLOŠKA
KARAKTERIZACIJA *Trifolium pratense* L.**

-doktorska disertacija-

Novi Sad, 2014.

Eksperimentalni deo istraživanja ove doktorske disertacije urađeno u okviru Projekta (br. 172058) finansiranog od strane Ministarstva prosvete i nauke Republike Srbije.

Veliku zahvalnost dugujem svom mentoru docentu dr Biljani Kaurinović, koja mi je nesebično pomogla prilikom eksperimentalnog rada, kao i pri interpretaciji dobijenih rezultata. Hvala joj što je svaku moju ideju iskreno podržala i što mi je ukazala na mnoge stvari koje su mi bile od velikog značaja za moje istraživačko, ali i mentalno sazrevanje na Fakultetu.

Prof. dr Miri Popović dugujem duboku zahvalnost od samog početka mog naučno-istraživačkog rada, za mnogobrojne stručne i prijateljske savete i velikoj, iskrenoj i srdačnoj pomoći.

Od ranih studentskih i istraživačkih dana, pa sve do danas, prof. dr Neda-Mimica Dukić mi je dala mogućnost da napredujem i ostvarujem svoje naučne poduhvate. Stoga joj se ovom prilikom zahvaljujem na velikodušnosti, srdačnosti i brojnim dobronamerenim savetima.

Iskreno se zahvaljujem prof. dr Svetlani Trivić na pruženoj pomoći, mnogim rešenim nedoumicama i na divnoj i korektnoj saradnji od samog početka mog rada.

Svojim laboratorijskim cimerkama, Mileni Rašeti i Jasmini Erdei-Popović se zahvaljujem na nesebičnoj i bezuslovnoj pomoći, smehu, pozitivnoj energiji i specifičnom humoru koji je rad činio lakšim.

Koleginici i prijatelju, Bojani Vasiljević, hvala na podršci, pomoći pri realizaciji ideja vezanih za mikrotalasnu ekstrakciju i na ostaloj nesebičnoj pomoći u toku mog rada.

Dr Sanji Vasiljević sa Instituta za ratarstvo i povrtarstvo u Novom Sadu neizmerno hvala za to što me uvela u svet leguminoza i što me naučila toliko toga o ovim biljkama, a pri tom joj nikada nije bilo teško da mi da savet u bilo koje doba, čak i kada je bila na putu.

Zahvaljujem se Vasiljki Keravici, na velikoj tehničkoj podršci i pomoći u toku izvođenja eksperimentata.

Kristini Bekvalac dugujem zahvalnost za pomoć pri hromatografskoj analizi i strpljenju pri tumačenju rezultata.

Docentu dr Dejanu Nikoliću sa Farmaceutskog fakulteta u Čikagu, zahvaljujem se na profesionalnoj i divnoj saradnji i što mi je pružio mogućnost dobijanja dela rezultata predstavljenih u tezi, kao i na davanju stručnih saveta pri tumačenju istih.

Maji Đurendić- Brenesel sa Instituta za sudsku medicinu u Novom Sadu hvala na dugogodišnjoj saradnji i pomoći pri GC-MS analizi rezultata.

Takođe se zahvaljujem timu Katedre za farmakologiju i toksikologiju, Medicinskog fakulteta u Novom Sadu.

Docentu dr Goranu Anačkovu se zahvaljujem što je izvršio determinaciju biljnog materijala.

Zahvalnost dugujem docentu dr Dragoljubu Cvetkoviću sa Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu, na prihvaćenju i lepoj saradnji i dobroj volji da mi pomogne pri mikrobiološkoj analizi. Zahvaljujem se prof. dr Milanu Popoviću sa Poljoprivrednog fakulteta u Novom Sadu.

Veliko hvala svim preostalim članovima Katedre za biohemiju i hemiju prirodnih proizvoda koje nisam pomenula u prethodnim redovima ove zahvalnice, a čiji je udeo tokom rada na ovoj tezi takođe vrlo značajan.

Dragim prijateljima od srca hvala na dosadašnjem razumevanju i iskrenoj podršci.

Mom Slavenku hvala na razumevanju, toleranciji, vedrom duhu i ljubavi.

Mami i sestri svaka reč zahvalnosti bi bila škrta fraza, i zato njima dvema posvećujem ovu doktorsku disertaciju, kao svoj skromni doprinos svemu onome što su učinile za mene.

Autor

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. OPŠTI DEO.....	4
2.1. Slobodni radikali, uzroci i posledice njihovog nastanka i delovanja	5
2.1. Antioksidativna zaštita	14
2.2.1. Enzimaska antioksidativna zaštita	15
2.2.2. Sekundarni metaboliti kao prirodni antioksidanti.....	17
2.2.2.1. Biljni fenoli	17
2.2.2.2. Fenolne kiseline	18
2.2.2.3. Flavonoidi	20
2.3. Izoflavonoidi kao fitoestrogeni	23
2.3.1. Mehanizam delovanja	28
2.4. Etarska ulja.....	31
2.5. Biljke roda <i>Trifolium</i> L.	34
2.6. <i>Trifolium pratense</i> L., crvena detelina	35
2.6.1. Poreklo i morfološke karakteristike	36
2.6.2. Crvena detelina kao krmna biljka	38
2.6.3. Hemijski sastav	38
2.6.4. Farmakološka aktivnost najzastupljenijih flavonoida	42
2.6.5. Farmakološko dejstvo	47
3. EKSPERIMENTALNI DEO	51
3.1. Priprema biljnog materijala i ekstrakata	52
3.2. Izolacija etarskog ulja asistiranom mikrotalasnom hidrodestilacijom	56
3.3. LC/MS-MS analiza odabranih fenolnih jedinjenja	57
3.4. Analiza hemijskog sastava etarskog ulja gasnom hromatografijom sa spektrometrijom masa (GC-MS analiza)	59
3.5. Određivanje antioksidantne aktivnosti.....	59
3.5.1. Određivanje sadržaja ukupnih fenola	60
3.5.2. Određivanje ukupnog sadržaja flavonoida	61
3.5.3. Određivanje neutralizacije DPPH• radikala	62
3.5.4. Određivanje neutralizacije OH• radikala	63
3.5.5. Određivanje neutralizacije O ₂ ^{-•} radikala	65
3.5.6. Određivanje neutralizacije NO• radikala	66

3.5.7. Određivanje neutralizacije H ₂ O ₂ radikala	67
3.5.8. Merenje intenziteta lipidne peroksidacije (LPx)	68
3.5.9. Određivanje redoks kapaciteta	69
3.6. <i>In vivo</i> određivanja biokemijskih parametara	71
3.6.1. Redukovani glutation (GSH)	72
3.6.2. Glutation-peroksidaza (GSHPx)	72
3.6.3. Glutation-reduktaza (GSHR)	73
3.6.4. Lipidna peroksidacija (LPx)	73
3.6.5. Peroksidaza (Px)	73
3.6.6. Katalaza (CAT)	74
3.6.7. Ksantin-oksidaza (XOD)	74
3.6.8. Određivanje koncentracije ukupnih proteina	74
3.7. Određivanje estrogene, antiestrogene aktivnosti i citotoksičnosti.....	75
3.8. Određivanje antimikrobne aktivnosti	78
4. REZULTATI I DISKUSIJA	80
4.1. LC-MS/MS analiza ekstrakata <i>T. pretense</i> L.	81
4.2. Kvalitativna i kvantitativna analiza etarskog ulja <i>T. pratense</i> L.	84
4.2.1. Određivanje količine ukupnog etarskog ulja	84
4.2.2. GC-MS analiza	85
4.3. Određivanje antioksidantne aktivnosti	87
4.3.1. Određivanje sadržaja ukupnih fenola	88
4.3.2. Određivanje sadržaja ukupnih flavonoida	88
4.3.3. Određivanje sposobnosti neutralizacije DPPH radikala ekstraktima	90
4.3.4. Određivanje sposobnosti neutralizacije DPPH radikala etarskim uljima... 90	
4.3.5. Određivanje sposobnosti neutralizacije OH• radikala ekstraktima	91
4.3.6. Određivanje sposobnosti neutralizacije OH• radikala etarskim uljima	92
4.3.7. Određivanje sposobnosti neutralizacije O ₂ ^{-•} radikala ekstraktima	93
4.3.8. Određivanje sposobnosti neutralizacije O ₂ ^{-•} radikala etarskim uljima	94
4.3.9. Određivanje sposobnosti neutralizacije NO• radikala ekstraktima	94
4.3.10. Određivanje sposobnosti neutralizacije NO•radikala etarskim uljima	95
4.3.11. Određivanje sposobnosti neutralizacije H ₂ O ₂ ekstraktima	96
4.3.12. Određivanje sposobnosti neutralizacije H ₂ O ₂ etarskim uljima	97
4.3.13. Određivanje stepena inhibicije lipidne peroksidacije ekstraktima	98

4.3.14. Određivanje stepena inhibicije lipidne peroksidacije etarskim uljima	99
4.3.15. Određivanje ukupnog redukcionog potencijala ekstrakata	101
4.3.16. Određivanje ukupnog redukcionog potencijala etarskih ulja	103
4.4. Hepatoprotektivni efekat ispitivanih ekstrakata <i>T. pratense</i>	107
4.4.1. Hepatoprotektivni efekat na homogenatu jetre miševa	108
4.4.2. Hepatoprotektivni efekat na hemolizatu krvi miševa	113
4.5. Ispitivanje estrogene, antiestrogene i citotoksične aktivnosti ekstrakata <i>T. pratense</i>	116
4.6. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti etarskih ulja i ekstrakata <i>T. pratense</i>	121
4.6.1. Ispitivanje antibakterijske aktivnosti etarskih ulja	121
4.6.2. Ispitivanje antibakterijske aktivnosti ekstrakata.....	121
5. ZAKLJUČAK.....	123
6. SUMMARY	129
7. LITERATURA	133
8. PRILOG.....	159

1. UVOD

Priroda predstavlja neiscrpan izvor bioaktivnih jedinjenja već hiljadama godina, a mnogobrojni savremeni lekovi vode poreklo od prirodnih proizvoda i to najčešće od biljaka.

Korišćenje biljki kao lekova kroz istoriju, podrazumevalo je izolaciju aktivnih komponenti, počevši sa izolacijom morfina iz opijuma u ranom devetnaestom veku, a odmah potom izolacijom kokaina, kodeina, digitoksina, kinina i dr., od kojih se neke i danas koriste. Izolacija i karakterizacija bioaktivnih komponenti iz biljaka i danas je veoma aktuelna i nije izgubila na značaju. Ne tako davno, u proučavanju biljaka korišćene su mnoge tehnike kojima su se mogle rasvetliti neke od komponenti koje se u njima nalaze (Philipson, 2001).

Danas se sve više pažnje poklanja razumevanju kompleksne uloge biljne ishrane, odnosno funkcionalne hrane, u prevenciji mnogih bolesti, jer ona podrazumeva unos više od 25000 bioaktivnih sastojaka. Najčešće bioaktivne supstance u biljkama su sekundarni metaboliti. Oni se mogu posmatrati kao produkti sporednih biohemijskih puteva u ćelijama biljke koji imaju ulogu u adaptaciji biljke na razne uslove životne sredine, međutim nisu uključeni u procese njenog rasta i razvoja. Biljni fenoli, danas predstavljaju jednu od najistraživanijih grupa sekundarnih biomolekula. Izoflavoni su veoma rasprostranjena i proučavana grupa biljnih fenola. Oni predstavljaju podgrupu fitoestrogena, tj. jedinjenja koja „imitiraju“ endogene estrogene i vezuju se za iste receptore. Takođe poseduju i antioksidantnu, antiinflamatornu, antimikrobnu i dr. aktivnost (Kurzer i Xu, 1997). Sintetišu se u mnogim biljkama, ali su najzastupljeniji u familiji Leguminosae, tj. leguminoza (mahunarki). Interesovanje za leguminoze i bioaktivne supstance prisutne u njima, raste poslednjih godina, jer mnoga istraživanja ukazuju na njihov pozitivan uticaj na ljudsko zdravlje, prvenstveno u lečenju hormon-zavisnih kancera, kardiovaskularnih oboljenja, osteoporoze, kognitivnog deficita, i dr. Sa agronomskog aspekta ove biljke su izuzetno značajne jer predstavljaju dobre azotofiksatore.

Crvena detelina (*Trifolium pratense* L.) je jedan od najznačajnijih predstavnika ove familije. Iako je poznato da se koristi kao stočna hrana, ova se biljka poslednjih godina dosta istražuje zbog svog izuzetnog farmakološkog dejstva, kojem doprinosi prisustvo dominantnih izoflavona (genisteina, daidzeina, formononetina i biohanina A), ali i ostalih biljnih fenola. Ovakav fitohemijski sastav ukazuje na potencijalnu primenu crvene deteline i njenih preparata u hormonskoj supstitucionoj terapiji, odnosno u lečenju ili

ublažavanju neželjenih problema koji se javljaju kod žena u menopauzi (osteoporoza, hiperlipidemija, hipertenzija, itd.), ali i u lečenju drugih bolesti.

Budući da prethodna istraživanja, vezana za *Trifolium pratense* L., obuhvataju ograničena fitohemijska ispitivanja hemijske, kao i ispitivanja biološke i farmakološke aktivnosti, cilj ove doktorske teze je da se istraživanja *Trifolium pratense* L., kao potencijalnog prirodnog leka, prošire. U skladu sa tim, istraživanja će obuhvatiti fitohemijska i biološka ispitivanja *Trifolium pratense* L. var. *sativa* Schreb., u tri različite faze rasta (30 cm, 50 cm i početak butonizacije) sa teritorije Bačkog Gradišta (Rimski Šančevi) UTM 34T DR 2 01. Odabrane su tri različite faze ontogenetskog razvoja, jer se u tom slučaju javljaju razlike u fitohemijskom sastavu, a samim tim i u biološkoj aktivnosti. Cilj hemijskih ispitivanja biće identifikacija i kvantifikacija fenolnih i isparljivih jedinjenja *T. pratense* u različitim fazama razvića.

Nastavak istraživanja obuhvatiće ispitivanja biološke aktivnosti, a to podrazumeva da se određivanjem antioksidantne, estrogene tj. antiestrogene, citotoksične i antimikrobne aktivnosti, ispita mogućnost šire primene ove biljke u terapijske svrhe. *In vitro* određivanje antioksidantne aktivnosti ekstrakata i etarskih ulja *T. pratense* ogledaće se u praćenju kapaciteta neutralizacije slobodnoradikalnih i neradikalnih molekularnih vrsta, redukcionog potencijala i inhibicije lipidne peroksidacije. Da bi se upotpunili rezultati dobijeni u *in vitro* istraživanjima, pristupiće se i *in vivo* ispitivanjima antioksidantne aktivnosti, koja će obuhvatati određivanje aktivnosti enzima u homogenatu i serumu jetre laboratorijskih miševa. *In vivo* antioksidantni testovi treba da ukažu na eventualni hepatoprotektivni efekat bioaktivnih molekula biljke u različitim fazama rasta i na oksidativne procese u ćelijama jetre i u toku metaboličkih reakcija koje se odigravaju u njima. Naredni cilj je će biti ispitivanje estrogene, antiestrogene i citotoksične aktivnosti na gajenoj Ishikawa ćelijskoj liniji, koja poseduje estrogen-inducibilnu alkalnu fosfatazu, praćenjem brzine nastajanja *p*-nitrofenola iz *p*-nitrofenolfosfata. Ispitivanje antimikrobnog dejstva biće određeno pomoću disk-difuzionog testa na Gram pozitivne i Gram negativne bakterije.

2. OPŠTI DEO

2.1. SLOBODNI RADIKALI, UZROCI I POSLEDICE NJIHOVOG NASTANKA I DELOVANJA

Slobodni radikali su atomi, molekuli ili joni koji sadrže barem jedan nespareni elektron u spoljnom elektronskom omotaču, zbog čega su oni vrlo reaktivni, nestabilni i imaju visok energetska potencijal. Jedan ili više nesparenih elektrona znače slobodnu i vrlo nestabilnu valencu, zbog čega se slobodni radikali vežu za molekule sa kojima dolaze u kontakt, posebno za proteine, lipide i njima bogate biomolekulske strukture. Pritom dolazi do burne lančane reakcije i brojnih oštećenja ćelija koje na taj način brže stare i ulaze u degenerativne procese (Mc Cord, 2000). U živim organizmima, nivo slobodnih radikala i ostalih reaktivnih vrsta kontrolisan je od strane kompleksnog sistema antioksidativne odbrane koji smanjuje oštećenje biomolekula.

Nespareni elektron se može nalaziti na atomima različitih elemenata, pa se slobodni radikali mogu podeliti na: reaktivne vrste kiseonika (ROS - *reactive oxygen species*), reaktivne vrste azota (RNS - *reactive nitrogen species*), reaktivne vrste hlora (RCS - *reactive chlorine species*), reaktivne vrste broma (RBS - *reactive bromine species*) (Tabela 1) i reaktivne vrste sumpora (RSS - *reactive sulphur species*) (Halliwell i Gutteridge, 2006).

Radikali koji potiču od kiseonika predstavljaju najznačajniju klasu slobodnih radikalskih vrsta u živim sistemima. Termin reaktivne kiseonične vrste (ROS) se često koristi u naučnoj literaturi i nije samo zajednički termin koji obuhvata radikalske kiseonične vrste, već i neradikalske kiseonične forme kao što su vodonik-peroksid, singletni kiseonik i hipohlorna kiselina. Pored reaktivnih kiseoničnih vrsta, reaktivne azotne vrste su takođe značajne za biološke sisteme. Reaktivne kiseonične vrste (ROS), kao i reaktivne azotne vrste (RNS), proizvode se konstantno u normalnom ćelijskom metabolizmu. Poznato je da i ROS, kao i RNS imaju dvostruku ulogu u biološkim sistemima, tj. da u isto vreme mogu biti štetni i korisni za ljudski organizam (Valko i sar., 2006).

Tabela 1. Reaktivne slobodnoradikalske i neradikalske vrste

Slobodnoradikalske vrste	Neradikalske vrste
Reaktivne vrste kiseonika	
Superoksid anjon radikal, $O_2^{\bullet-}$ Hidroksil-radikal, OH^{\bullet} Hidropeoksil-radikal, HO_2^{\bullet} Peroksil-radikal, RO_2^{\bullet} Alkoksil-radikal, RO^{\bullet} Karbonatni radikal, $CO_3^{\bullet-}$ Ugljendioksidni radikal, $CO_2^{\bullet-}$ Singletni kisonik, $^1\Sigma_g^+ O_2$	Vodonik peroksid, H_2O_2 Hipohlorna kiselina, $HOCl$ Hipobromna kiselina, $HOBr$ Singletni kiseonik, $^1\Delta_g O_2$ Ozon, O_3 Organski peroksidi, $ROOH$ Peroksinitrit, $ONOO^{\bullet}$ Peroksinitritna kiselina, $ONOOH$
Reaktivne vrste hlora	
Atomski hlor, Cl^{\bullet}	Hipohlorna kiselina, $HOCl$ Nitril (nitronijum) hlorid, NO_2Cl Hloramini Hlor (gas), Cl_2 Brom hlorid, $BrCl$ Hlor (IV) oksid, ClO_2
Reaktivne vrste broma	
Atomski brom, Br^{\bullet}	Hipobromna kiselina, $HOBr$ Brom (gas), Br_2 Brom hlorid, $BrCl$
Reaktivne vrste azota	
Azotmonoksidni radikal, NO^{\bullet} Azotdioksidni radikal, NO_2^{\bullet} Nitrati radikal, NO_3^{\bullet}	Azotasta kiselina, HNO_2 Nitrozil katjon, NO^+ Nitroksidni anjon, NO^- Azot(IV)-oksid, N_2O_4 Azot(III)-oksid, N_2O_3 Peroksinitrit, $ONOO^{\bullet}$ Peroksinitritna kiselina, $ONOOH$ Nitronijum (nitril) katjon, NO^{2+} Alkilperoksinitriti, RO_2ONO Nitril (nitronijum) hlorid, NO_2Cl

Jedan od paradoksa života je da je O_2 , molekul koji je neophodan za život, ujedno i najtoksičniji prirodni polutant. Neophodan je za respiraciju i energetski metabolizam. Kiseonik brzo reaguje sa prelaznim metalima, radikalima, enzimima koji katalizuju redukciju kiseonika i vrlo lako može da se pobudi apsorpcijom energije, pri čemu nastaju njegovi reaktivni oblici. Izvori nastanka reaktivnih kiseoničnih vrsta mogu biti endogenog (ksantin-oksidaža, oksidaze, makrofage, citohrom P-450 izoenzimi, flavoenzimi i dr.) ili

egzogenog porekla (etanol, duvanski dim, lekovi, pesticidi, UV, radioaktivno zračenje i dr.).

Od reaktivnih oblika kiseonika redukovanih kiseonika najznačajniji su aktivirani (singletni) i redukovani oblici (superoksid anjon radikal, hidroksil radikal vodonik peroksid) (Halliwell, 2001).

Singletni (aktivirani) oblici O_2 nastaju u fotohemijским ili termičkim reakcijama premeštanjem jednog nesparenog elektrona iz razvezujuće π^* orbitale molekula kiseonika, imaju visok sadržaj energije i veoma lako mogu započeti slobodnoradikalne reakcije u organizmu. Ovi oblici kiseonika mogu da reaguju sa velikom brojem biomolekula (tokoferoli, askorbinska kiselina, bilirubin, DNA, holesterol, β -karoten, triptofan, metionin, cistein, NADH i polinezasićene masne kiseline). Od biološkog značaja su reakcije singlet kiseonika sa masnim kiselinama, kao i one u kojima nastaju dioksani (Halliwell i Gutteridge, 2006).

Superoksid anjon radikal ($O_2^{\bullet-}$) nastaje jednoelektronskom redukcijom molekula kiseonika ili jednoelektronskom oksidacijom H_2O_2 na različite načine:

- prilikom prolaska O_2 kroz elektron-transportni lanac mitohondrija, usled „šaltovanja“ elektrona na nivou NADH dehidrogenaze i koenzima Q;
- pod uticajem enzima koji direktno proizvode superoksid radikal oksidujući različite supstance (ksantin oksidaza, aldehid oksidaza, peroksidaza, triptofan dioksigenaza, indolamin dioksigenaza, monoaminooksidaze, diaminooksidaze, urikaza) (Linás i sar., 1990; Shaw i Jayatilleke, 1990);
- „propuštanjem“ elektrona sa NADPH-citohrom P-450-reduktaze na kiseonik u endoplazmatičnom retikulumu ćelija jetre (Fleury i sar., 2002);
- reakcijom kiseonika sa jonima prelaznih metala od strane ćelija fagocita (neutrofili, monociti, makrofagi, eozinofili) pod uticajem enzima NADPH oksidaze (Babior, 2002);
- oksidacijom nekih neutralnih organskih molekula, koji imaju lako odlazeće vodonikove atome (npr. dopamin, adrenalin, riboflavin, triptofan) u procesu poznatom kao autooksidacija;
- u toku degradacije oksihemoglobina, pri čemu nastaju $O_2^{\bullet-}$ i neaktivni methemoglobin;
- reakcijom kiseonika sa elektronima nastalim u fotosistemu tokom procesa fotosinteze.

Po hemijskim osobinama superoksid anjon radikal predstavlja slabu kiselinu, a pravac reaktivnosti zavisi da li se reakcija odvija u vodenoj sredini ili u organskom medijumu gde je stabilniji. Ovaj radikal retko sam izaziva veća oštećenja ćelija jer ne prolazi kroz lipide ćelijske membrane. Međutim, brzo dismutira, pri čemu nastaju veoma reaktivni OH^\bullet i H_2O , koji lako difunduju i do drugih tkiva oštećujući ih. Više od 90% kiseonika utrošenog u procesu „respiratorne eksplozije“ u fagocitima, transformiše u superoksid anjon radikal.

Hidroksil radikal OH^\bullet je najaktivniji i najtoksičniji redukovani oblik kiseonika. Nastaje tokom hemijskih reakcija u prisustvu redukovanih oblika prelaznih metala ili $\text{O}_2^{\bullet-}$ u Fentonovoj ($\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{OH}^\bullet + \text{OH}^- + \text{Fe}^{3+}$) i Haber-Weissovoj reakciji ($\text{O}_2^{\bullet-} + \text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{O}_2 + \text{Fe}^{2+}$; $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^\bullet + \text{HO}^-$); tokom fotohemijskih reakcija razlaganja vode dejstvom jonizujućeg zračenja; homolitičkim raskidanjem O-O veze pod dejstvom toplotne energije, a može nastati i reakcijom vode i ozona u alkalnoj sredini. Ovaj radikal izaziva velika oštećenja unutar malog radijusa od mesta produkcije, kratkog je poluzivota i nespecifično napada i oštećuje sve ćelijske biomolekule, inicirajući pri tome lančane, slobodnoradikalne procese i uzrokujući razne ćelijske i metaboličke poremećaje (Halliwell, 2001).

Vodonik peroksid (H_2O_2) nije radikal, ali vrlo lako prolazi kroz ćelijsku membranu i na taj način brzo stiže do tkiva. Nastaje dvoelektronskom redukcijom molekularnog kiseonika ($2\text{H}^+ + \text{O}_2 + 2\text{e}^- \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2$), jednoelektronskom redukcijom superoksid anjon radikala ($\text{O}_2^{\bullet-} + \text{e}^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2$) ili reakcijom dismutacije superoksidnog radikala ($\text{O}_2^{\bullet-} + \text{O}_2^{\bullet-} + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$), kao i redukcijom kosupstrata različitih enzima.

Iako može direktno da oksidiše intraćelijske biomolekule, njegova toksičnost je prvenstveno posledica mogućnosti interakcije sa $\text{O}_2^{\bullet-}$ u prisustvu metala sa promenljivom valencom ($\text{Fe}^{2+/3+}$, $\text{Cu}^{+/2+}$), pri čemu nastaje visokoreaktivni OH^\bullet (Nordberg i sar., 2001).

Od reaktivnih vrsta azota (RNS) izdvaja se azot-monoksid radikal (NO^\bullet), koji je jedan od najproučavanijih molekula uopšte. Zbog svojih izuzetnih osobina, NO^\bullet je 1992. godine proglašen molekulom godine u naučnom časopisu *Science Magazine* (Koshland, 1992). To je mali, kratkoživeći (svega nekoliko sekundi) molekul sadrži jedan nespareni elektron u $2\pi_y^*$ razvezujućoj orbitali. Primarno se sintetiše u endotelnim ćelijama, ali i u neutrofilima, makrofagama, Kupferovim ćelijama, nadbubrežnoj žlezdi, kao i u nervnim

ćelijama. Veoma je reaktivan i ima ulogu signalnog molekula u raznim fiziološkim procesima, uključujući neurotransmisiju, regulaciju krvnog pritiska, relaksaciju glatke muskulature, regulaciju imunog sistema i antimikrobnu aktivnost (Bergendi, i sar. 1999). NO[•] nastaje u biološkim tkivima pri konverziji L-arginina u L-citrulin pod dejstvom azot-oksida sintaze (tri izoenzima) uz odgovarajuću količinu kiseonika (Ghafourifar i Cadenas, 2005). Sa superoksid anjon radikalom, gradi visoko toksični peroksinitritni (ONOO⁻) koji se u kiselj sredini može transformisati u peroksinitritnu kiselinu (ONOOH), a dalje u OH[•] radikal, pri čemu dolazi do indukcije oksidativnog stresa. Zbog toga je toksičnost NO[•] radikala posledica njegove sposobnosti da produkuje OH[•] radikal. Pod dejstvom ONOOH dolazi do oksidacije SH-grupa proteina, lipidne peroksidacije, iniciranja lančanih reakcija u DNK lancu, kao i do prekida DNK lanca. Pošto su NO[•] i O₂ lipofilni molekuli, primarno mesto oksidacije NO[•] je lipidni dvosloj membrane. S obzirom na redukovani sadržaj H₂O u hidrofobnom okruženju, glavni produkt oksidacije NO[•] sa O₂ je N₂O₃ čiji je primarni efekat nitrozovanje tj. nitrozativni stres. Nitrozovanjem amina nastaju nitrozamini, koji su potencijalni kancerogeni, dok nitrozovanjem SH grupa u proteinima, nastaju S-nitrozotoli, pri čemu može da dođe ili do inhibicije enzimske aktivnosti ili do modulacije signalne transdukcije. N₂O₃ može da dovede do dezaminacije azotnih baza u DNK, čime se menja struktura DNK i dolazi do mutacija. Ćelije imunog sistema generišu NO[•] i kao takav je uključen u nespecifične odbrambene mehanizme. Interakcija ROS sa RNOS ukazuje na sinergizam "respiratorne eksplozije", jer nastali ONOO⁻ ima veći citotoksični efekat od NO[•] i O₂^{-•} iz kojih nastaje (Beckman i Koppenol, 1996). Uzroci štetnih svojstava kiseonika bili su nerazjašnjeni do Geršmanove teorije toksičnosti kiseonika 1954. Iste godine Komoner i saradnici objavljuju istraživanje o slabom signalu elektron paramagnetne rezonance, karakterističnom za slobodne radikale koji se nalaze u različitim liofiliziranim biološkim sistemima (Valko i sar., 2007). Svet slobodnih radikala je uskoro 1956. bio istražen od strane Denama Hermana koji je smatrao da oni igraju važnu ulogu u procesima starenja. Drugom epohom istraživanja o slobodnim radikalima u biološkim sistemima smatra se 1969. godina, odnosno kada su McCord i Fridovich otkrili enzim superoksid-dismutazu (SOD) i time dokazali značaj slobodnih radikala u biološkim sistemima (McCord i sar., 1969). Treća era datuma značajnih za istraživanja o slobodnim radikalima je 1977. godina kada su Mittal i Murad dokazali da hidroksil radikal stimuliše aktivaciju guanilat ciklaze i formiranje sekundarnog mesindžera cikličnog guanozin monofosfata (cGMP) (Mittal i Murad, 1969).

Od tada postoje brojni dokazi da se živi organizmi raznim mehanizmima ne samo prilagođavaju na prisustvo slobodnih radikala, već je njihovo prisustvo neophodno za mnoge fiziološke procese u biološkim sistemima. ROS deluju u malim koncentracijama i uključeni su tada u mnoge fiziološke procese, kao što su odbrana od raznih infektivnih agenasa, a imaju ulogu i u ćelijskoj komunikaciji, kao i u indukciji mitogenog odgovora. Štetan efekat slobodnih radikala ogleda se u tome što oni izazivaju razna oštećenja ćelija (Kovacic i Jacintho, 2001). Ovo se događa u biološkim sistemima gde postoji hiperprodukcija ROS i RNS sa jedne strane i smanjena aktivnost enzimatskih i neenzimatskih faktora sa druge strane. Stanja koja tom prilikom nastaju su oksidativni, odnosno nitrozativni stres. Višak ROS uništava ćelijske lipide, proteine ili DNK, inhibirajući njihovu normalnu funkciju. Zbog toga je oksidativni stres uključen u brojne bolesti kao i u procese starenja. Balans između dobrih i loših efekata slobodnih radikala je jedan od važnih aspekata živih organizama, a postiže se mehanizmom koji se naziva „redoks regulacija“. Redoks regulacija štiti žive organizme od oksidativnog stresa i održava redoks homeostazu kontrolišući redoks status *in vivo* (Droge, 2002).

Pojam oksidativni stres ukazuje na stanje u kojem dolazi do ozbiljnog poremećaja između produkcije reaktivnih vrsta i sistema zaštite, a može biti posledica:

- smanjenja antioksidanata ili kada neki toksični agensi negativno utiču na ovaj sistem (npr. visoka koncentracija ksenobiotika smanjuje GSH).
- povećanja produkcije ROS/RNS usled brojnih toksina i spoljnih štetnih uticaja ili od strane ćelija imunog sistema (kod hroničnih inflamatornih bolesti).

Oksidativni stres može izazvati oštećenje svih važnih ćelijskih biomolekula kao što su DNK, proteini i lipidi. Međutim, nije razjašnjeno koja je prva meta napada zbog toga što se mehanizmi nastanka oksidativnog oštećenja prepliću. Rađena su neka istraživanja gde se vodonik-peroksid uvodio u mnoge ćelije sisara i raskidanje DNK lanca je nastupilo pre nego što je detektovana lipidna peroksidacija ili oštećenje proteina (Halliwell, 2001).

Procenjuje se da se u molekulu DNK svake ljudske ćelije svakodnevno dogodi oko 10000 oksidacionih udara. Ovaj podatak upućuje na činjenicu da je oksidativni stres prisutan i kod zdravih i kod bolesnih osoba (Zhao i sar., 2004).

Poznato je da OH[•] radikal reaguje sa svim komponentama DNK molekula, oštećujući i purinske i pirimidinske baze i raskidajući sve veze unutar lanca. Najviše istraženo oštećenje DNK je formiranje 8-hidroksiguanina (8-H-G). Ukoliko DNK sistem reparacije ne reaguje odmah, dolazi do pogrešnog uparivanja baza tokom replikacije, pri čemu može

doći do mutageneze, kancerogeneze i starenje (Valko i sar., 2007). Oksidativno oštećenja proteina *in vivo* može uticati na funkciju receptora, enzima, transportnih proteina, čak i na produkciju novih antigena koji bi učestvovali u imuno odgovoru.

Produkti oksidativnog oštećenja proteina mogu da doprinesu sekundarnom oštećenju drugih biomolekula, kao na primer inaktivaciji DNK polimeraze (Aruoma, 1998). Krajevi lanaca svih aminokiselinskih ostataka i proteina su pogodni za oksidaciju od strane ROS/RNS (Stadtman, 2004). Oksidacijom cistinskih ostataka može doći do formiranja mešovitih disulfida između tiolnih grupa proteina i tiola male molekulske mase (npr. glutationa). Reaktivne vrste napadaju aminokiselinske ostatke histidina, arginina, lizina i prolina, pri čemu nastaju karbonilne funkcije koje mogu poslužiti za merenje oksidativnog oštećenja (Marshall i Roberts, 1990).

Polinezasićene masne kiseline su zbog svojih višestrukih dvostrukih veza odlična metaza napad slobodnih radikala. Lipidna peroksidacija (LP) predstavlja oksidativno oštećenje koje zahvata ćelijske membrane, lipoproteine i druge molekule koji sadrže lipide, pod uticajem oksidativnog stresa. Najčešće mete oksidativnog napada su lipidi ćelijskih membrana (fosfolipidi, glikolipidi i holesterol), ali i neki proteini, odnosno enzimi (Anderson i sar., 2012). Posledica lipidne peroksidacije su promene u aktivnosti membranskih enzima, transportu jona, permeabilnosti ćelijske membrane, što dovodi do poremećaja funkcije same ćelije i brojnih patogenih stanja organizma. Ona je jedan od najproučavanijih procesa oksidativnog oštećenja ćelijskih membrana.

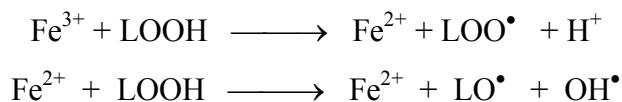
Sam proces lipidne peroksidacije sastoji se iz tri faze:

a) Inicijacija polinezasićene kiseline: $LH \longrightarrow L^{\bullet} + H^{\bullet}$.

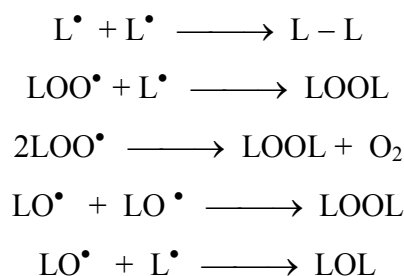
Reakcija započinje uklanjanjem H atoma iz metil grupe (-CH₂-) koja se nalazi u α -položaju od mesta dvostruke veze u ugljovodoničnom lancu nezasićene masne kiseline pri čemu nastaje slobodni alkil radikal L[•].

b) Propagacija: dolazi do intramolekulskog premeštanja dvostruke veze, alkil radikal L[•] prelazi u konjugovani dien koji sa kiseonikom gradi peroksi radikal LOO[•]. On produžava reakciju, oduzimajući H atom susedne metilenske grupe nezasićene masne kiseline i nastaje hidroperoksid (LOOH) i novi alkil radikal (L[•]) (Halliwell i Guteridge, 1990). LOOH može ciklizacijom preći u petočlani ciklični alkil endoperoksid koji dalje reaguje sa kiseonikom, a razgradnjom nastaju brojni sekundarni produkti oksidacije. Razgradnjom LOOH i L[•] raste broj slobodnih radikala i tako se proces nastavlja.

Iako je LOOH pri fiziološkim uslovima stabilan, u prisustvu jona prelaznih metala brzo se razgrađuje (reakcijama sličnim Fentonovoj) redoks mehanizmom dajući nove slobodne radikale:



c) Terminacija: predstavlja završetak reakcije oksidacije. Međusobnim interakcijama slobodni radikali grade tercijarne produkte oksidacije, dimere i polimere koji su stabilni i neaktivni.



Raspadanjem ovih intermedijera (alkil radikali, peroksi- i alkoksi- radikali, lipidni hidroperoksidi) nastaju sekundarni proizvodi lipidne peroksidacije: kratkolančani isparljivi ugljovodonici, aldehidi (Parola i sar., 1998). Najtoksičnijim oblicima lipidne peroksidacije smatraju se malonilaldehid (MDA) i 4-hidroksi-2(trans)-nonenal (4-HNE). Malonildialdehid, kao jedan od krajnjih proizvoda lipidne peroksidacije, može reagovati sa tiolnim i amino grupama enzima i potpuno ih inhibirati, dok produkt 4-HNE može inhibirati biosintezu proteina. Peroksidacija može biti završena reakcijama između pomenutih intermedijera i antioksidanata (vitamin E, biljni polifenoli, glutation i dr.). Do danas postoji mnogo metoda za određivanje produkata nastalih u LP (MDA, 4-HNE, konjugovani dieni, hidroperoksidi). Međutim, najviše se koriste spektrofotometrijske metode koje se baziraju na reakciji ovih produkata i tiobarbiturne kiseline (TBA). Do peroksidacije lipida može doći i direktnom reakcijom singlet kiseonika sa lipidima u membranama. Smatra se da izvesna količina singlet kiseonika nastaje i u toku peroksidacije lipida što izaziva dalju destrukciju membrana. Peroksidaciju lipida u mikrozomima mogu započeti i ostale kiseonične vrste (preferil $\text{Fe}^{3+} - \text{O}_2^-$ i feril FeOH^{3+} radikal) koje nastaju u reakciji sličnoj Fentonovoj (Devasagayam i sar., 2003).

Oksidativni stres izazvan uticajem reaktivnih vrsta se povećava tokom životnog ciklusa čoveka, pri čemu dolazi do starenje, kardiovaskularnih, neurodegenerativnih, hroničnih bolesti i kancera.

Na osnovu Hermanove „slobodnoradikalske teorije starenja“, sve više biva prihvatljivo da se produkcija slobodnih radikala i oksidativno oštećenje povećavaju starenjem organizma (Sohal i sar., 2002). Teorija slobodnih radikala podržava hipotezu o „brzini življenja“ prema kojoj dužina životnog veka zavisi od brzine metabolizma, a to potvrđuje da oksidativno oštećenje DNK, lipida i proteina raste starenjem (Ku i sar., 1993). U zapadnim zemljama srčani udar je jedan od glavnih razloga smrtnosti ljudi. Mnoga naučna istraživanja ukazuju da je infarkt povezan sa slobodnim radikalima koji potiču od ksantin-oksidade, ciklooksigenaze, inflamatornih ćelija i iz mitohondrija (Piantadosi i Zhang, 1996). Mitohondrijalni transport elektrona se menja za vreme ishemije i reperfuzije, što takođe predstavlja jedan od izvora slobodnoradikalnih vrsta (Simms i Anderson, 2002). Dokazano je da se u toku ishemijskog infarkta povećava oksidativno oštećenje DNK, a i pojava lipidne peroksidacije je zabeležena kod ovakvih pacijenata (Mariani i sar., 2005). Moždani udar je takođe povezan sa oksidativnim stresom. Povećana produkcija slobodnoradikalnih vrsta čini mozak prihvatljivijim za iste, jer je on sposoban da troši značajnu količinu kiseonika, siromašan je antioksidantnim sistemom zaštite, a bogat prooksidantnim molekulima i sadrži visoku koncentraciju lipida podložnih brzom oksidaciji (Cherubini i sar., 2005).

Nastanak i razvoj ateroskleroze zavisi od ravnoteže između proinflamatornih, antiinflamatornih i antioksidantnih mehanizama zaštite. Slobodni radikali igraju važnu ulogu u patologiji vaskularnih oboljenja, tako što dovode do oksidacije LDL-a i do stvaranja plakova (Galle i sar., 2006). Oksidacija LDL-a dovodi do endotelijalne disfunkcije, što može rezultovati rastu i smrću ćelije i tome izazvati vazokonstrikciju.

Mnoge studije ukazuju na povezanost između produkcije slobodnih radikala i raznih neurodegenerativnih bolesti kao što su Alzheimerova, Parkinsonova, Huntingtonova bolest i druge. Alzheimerova bolest spada u najrasprostranjenije iz ove grupe bolesti i povezana je sa starenjem i oksidacijom proteina i lipida. Oksidativno oštećenje igra značajnu ulogu u nakupljanju β -amiloida (koji može da izazove „cross-linking“) i drugih citoskeletnih proteina (Bellomo i Mirabelli, 1992). Lipidna peroksidacija je takođe izmerena u mozgu ljudi obolelih od Alzheimerove bolesti i detektovan je povećan nivo 4-hidroksi-2-nonenal glutation konjugata (Völkel i sar., 2006). Kod ovakvih bolesnika javlja se oštećenje DNK limfocita, a zabeležena je i oksidativna modifikacija proteina frontalnog korteksa (Korolainen i sar., 2006). Takođe, uočeno je da oksidacijom dopamina nastaju potencijalno toksični semihinoni i da ubrzan metabolizma dopamin monoamin oksidaze

može indukovati formiranje vodonik-peroksida, superoksid anjon- i hidroksil-radikala, što predstavlja osnovu u razvoju Parkinsonove bolesti. Dalja istraživanja pokazuju da je oksidativni stres odgovoran za gubitak nigralnih dopaminskih receptora (Wersinger i Sidhu, 2002).

Postoje mnogi naučni dokazi da slobodni radikali učestvuju u razvoju insulin rezistencije, disfunkcije β -ćelija, smanjenju tolerancije na glukozu i diabetes mellitus-a drugog tipa. Hiperglikemija može indukovati oksidativni stres koji se povećava starenjem, preko nekoliko mehanizama, uključujući autooksidaciju glukoze, formiranje „advanced glycation product“, AGE i aktivaciju puta poliola. Drugi cirkularni faktori koji su povišeni u diabetesu, kao što su slobodne masne kiseline i leptin, takođe doprinose povećanju ROS-a. Zabeleženo je značajno povećanje AGE starenjem. Akumulacija AGE dovodi do povećanja mikrovaskularnih lezija, koja se javlja kod dijabetične retinopatije, a takođe je i odgovorna za kardiovaskularne komplikacije viđene kod dijabetičara (Jay i sar., 2006). Oštećenje izazvano ROS dovodi do primarnog glaukoma otvorenog ugla, koji vodi nepovratnom slepilu (Izzotti i sar., 2006).

2.1. ANTIOKSIDATIVNA ZAŠTITA

„Antioksidans” je često korišćen termin u literaturi i, iako se o njemu već pola veka intezivno raspravlja, još uvek ga je teško jasno definisati. Naučnici koji se bave ishranom ljudi, koriste ovaj termin kod inhibicije lipidne peroksidacije, procesa koji uzrokuje užeglost namirnica. Kustosi muzeja ga koriste u prevenciji organskog artefakta. Oni koji rade sa polimerima koriste antioksidans za kontrolu polimerizacije u proizvodnji guma, plastike, kao i za zaštitu plastike od UV zraka. Dakle, svi ovi naučnici imaju njihovo viđenje antioksidanasa i znaju za šta bi trebali da budu dobri u njihovoj oblasti. Međutim, kod živih organizama situacija je nešto složenija. Kada se reaktivne vrste formiraju *in vivo*, onda u igru ulaze mnogi sistemi odbrane. Njihov značaj zavisi koje su sve vrste formirane, gde su formirane i koji su ciljni biomolekuli čije se oštećenje meri.

Antioksidans je svaka supstanca koja kada je prisutna u maloj koncentraciji, u odnosu na oksidabilni supstrat, značajno usporava ili sprečava oksidaciju tog supstrata. Termin „oksidabilni supstrat” obuhvata svaku vrstu molekula nađenog *in vivo*. Nema univerzalnog „najboljeg” antioksidansa, različiti antioksidansi su potrebni da zaštite ćeliju od raznih biomolekula *in vivo* (Gutteridge i Halliwell, 2010). Antioksidativna zaštita predstavlja dinamičku ravnotežu dejstava endogenih antioksidanasa (enzima

antioksidativne zaštite i neenzimskih antioksidanasa) i produkcije ROS-a. Antioksidansi deluju kao „hvatači“ slobodnih radikala, kompleksiraju jone metala, sprečavajući njihovu katalitičku funkciju u procesima razgradnje lipidnih vodonik-peroksida i nastanka slobodnih radikala, razgrađuju hidroperokside lipida, sprečavaju dejstvo singletnih kiseonika, inhibiraju neke enzime, itd. Sa funkcionalnog aspekta antioksidativna zaštita organizma obuhvata tri nivoa delovanja:

1. Sistemi antioksidativne zaštite koji sprečavaju endogeno stvaranje slobodnih radikala.
2. Angažovanje sistema u uslovima normalnog i pojačanog stvaranja slobodnih radikala.

Prema prirodi i načinu delovanja antioksidanti se dele na:

- a) enzimske (primarna linija odbrane): superoksid-dizmutaze, katalaza, ksantin-oksidaža, peroksidaze, glutation-peroksidaza, glutation-raduktaza, glutation-S-transferaza
- b) neenzimske (sekundarna linija odbrane):
 - liposolubilne (vitamin A, vitamin E, β -karoteni, koenzim Q, flavonoidi i drugi fenoli, itd.). Deluju u lipidnoj fazi ćelijske membrane i membrana subcelularnih organela, kao i unutar serumskih lipoproteina.
 - hidrosolubilne (vitamin C, mokraćna kiselina, ceruloplazmin, glutation, transferin, i dr.). Deluju u vodenoj fazi, ostvarujući interakciju sa liposolubilnim antioksidantima na graničnoj površini membrana.
- c) enzimske antioksidanti koji učestvuju u reparaciji nastalog oksidativnog oštećenja lipida, proteina, ugljenih hidrata i nukleinskih kiselina. U ovu grupu enzima spadaju: fosfolipaza A2, različiti proteinski enzimi, glikozilaze, DNK-ligaze, DNK-polimeraze i dr. (Đorđević i sar., 2000).

2.2.1. Enzimska antioksidativna zaštita

Superoksid-dismutaza (SOD) katalizuje dismutaciju superoksidnih radikala ($O_2^{\bullet-}$) u vodonik-peroksid i O_2 , pri čemu se jedan $O_2^{\bullet-}$ oksiduje u O_2 , a drugi redukuje u H_2O_2 :

Prokarioti sadrže gvožđe zavisnu (Fe SOD) i mangan zavisnu SOD (Mn SOD). Kod eukariota uključujući i čoveka prisutne su tri izoforme SOD:

- bakar, cink zavisna SOD (Cu, Zn SOD): bakar koji ulazi u aktivni centar enzima odgovoran je za reakciju dismutacije, pri čemu se ovaj metal u toku katalizovane reakcije menja svoju valencu, primajući i otpuštajući elektrone

- mangan zavisna SOD (Mn SOD): lokalizovana je u matriksu mitohondrija, mada se primarno sintetiše u citosolu. Ne nalazi se u eritrocitima ni u bakterijskim ćelijama;
- ekstracelularna SOD (EC SOD): prisutna je u međućelijskom prostoru i ekstracelularnoj tečnosti (plazma, limfa, sinovija, likvor, ascit). Sintetišu je fibroblasti, glijalne ćelije, makrofagi, hondrociti i endotelijalne ćelije (Nozaik-Grayck i sar., 2005).

Katalaza (CAT) katalizuje razgradnju toksičnog H_2O_2 do vode i molekuskog kiseonika.

Ovaj enzim sadrži veći broj aerobnih bakterija i neke anaerobne. Prisutna je takođe u svim tkivima sisara, a visokom aktivnošću se ističe u jetri i eritrocitima, dok je u mozgu, srcu i skeletnim mišićima karakteristična mala aktivnost. U ćelijama su lokalizovani pretežno u peroksizomima (čini 40% proteina) i mitohondrijama. Katalaza po strukturi pripada grupi hemohromoproteida (sadrži četiri feri-protoporfirinska prstena koji ulaze u aktivni centar enzima). Poseban doprinos u proceni značaja katalaze u detoksikaciji tkiva od vodonik-peroksida predstavljaju rezultati dobijeni ispitivanjem osoba sa potpunim odsustvom katalaze (akatalazija). Ova nasledna enzimopatija je često praćena gingivitisom, stomatitisom i pojačanom osetljivošću eritrocita na jonizovano zračenje (Yan i Harding, 1997).

Peroksidaze (Px) katalizuju reakcije različitih redukovanih supstrata u prisustvu vodonik-peroksida, kojeg redukuju do vode: $SH_2 + H_2O_2 \longrightarrow S + 2H_2O$. Njihova aktivnost se najčešće ispituje u ćelijskim ekstraktima pomoću veštačkih supstrata gvajakola, benzidina i o-dianizdina. Oni se u prisustvu H_2O_2 i peroksidaza oksiduju pri čemu nastaju obojeni proizvodi (Auchere and Capeille-Blandin, 1999).

Glutation-peroksidaza (GSH-Px) katalizuje reakciju redukcije vodonik peroksida ili organskih hidroperoksida (DNK peroksidi, lipidni peroksidi) u prisustvu redukovanog glutaciona: $2GSH + H_2O_2 (ROOH) \longrightarrow GSSG + (ROH) + H_2O$.

Klasična selen zavisna GSH-Px, izolovana iz različitih organa (eritrociti, pluća, jetra), predstavlja homotetramer, gde svaka subjedinica sadrži jedan atom selena u formi selenocisteina. Podložna je oksidativnoj modifikaciji i inaktivaciji od strane oksidanasa, posebno vodonik-peroksida (Arnao i sar., 1990).

Glutation-reduktaza (GSHR) je flavoprotein koji katalizuje transformaciju oksidativnog glutaciona (GSSG) u redukovani (GSH) u prisustvu NADPH kao koenzima, kao i redukciju drugih disulfida koji nastaju reakcijom glutaciona i jedinjenja koja sadrže -SH grupe (koenzim H, cistein, SH-proteini i dr.). Nalazi se u citosolu i mitohondrijama.

Najvažnija uloga ovog enzima je održavanje fiziološkog nivoa redukovanog glutationa, čime se obezbeđuje neophodna količina GSH za delovanje GSHPx i glutation-S-transferaze.

2.2.2. Sekundarni metaboliti kao prirodni antioksidanti

U toku evolucije biljke su razvile efikasne odbrambene mehanizme protiv štetnih uticaja vidljive, ultraljubičaste svetlosti i zračenja i predstavljaju prirodan izvor različitih antioksidantnih jedinjenja. Među nekoliko hiljada biološki aktivnih sekundarnih biomolekula viših biljaka potvrđeno je da fenoli, flavonoidi, fenolkarboksilne kiseline, alkaloidi, terpenoidi i dr., ispoljavaju snažno antioksidantno delovanje (Mimica-Dukić, 1997; Wink, 2003).

Njihov značaj je veći od sintetskih antioksidanasa, koji nakon duže upotrebe ispoljavaju neželjene efekte, čak su i neki od njih povučeni sa tržišta kao mogući kancerogeni. Sekundarni metaboliti ispoljavaju svoju aktivnost preko različitih mehanizama: uklanjajući slobodne radikale, vezujući metalne jone, inhibirajući enzimske sisteme koji produkuju slobodnoradikalske forme, povećavajući koncentraciju biološki važnih endogenih antioksidanasa i indukujući ekspresiju niza gena odgovornih za sintezu enzima koji sprečavaju oksidativni stres (Primiano i sar., 1997).

2.2.2.1. Biljni fenoli

Fenolna jedinjenja su zastupljena u svim biljnim tkivima i predstavljaju najčešće i najaktivnije biljne antioksidante. Obuhvataju široki spektar biljnih supstanci i imaju aromatični prsten koji nosi jednu ili više hidroksilnih grupa kao supstituente i pokazuju aktivnost kako u hidrofiličnim, tako i u lipofiličnim sistemima. Najčešće su vezani za šećerne komponente preko jedne ili više fenolnih grupa (glikozidi), što je razlog njihove rastvorljivosti u vodi. Najveći broj biljnih fenola se sintetiše preko dva sintetska puta: a) poliacetatni put i b) fenilpropanoidni put sa šikimi kiselinom kao intermedijerom (šikimatni put), dok se neki od njih sintetišu kombinacijom ova dva puta (Harborne, 1994).

Jedna od važnih karakteristika ovih jedinjenja je antioksidantna aktivnost, koja je prvenstveno rezultat njihove sposobnosti da budu donori vodonikovih atoma i kao takvi uklanjaju slobodne radikale, uz formiranje fenoksil radikala, koji je stabilizovan rezonancijom, a kao posledica toga, manje reaktivan. Sa povećanjem stabilnosti nastalog

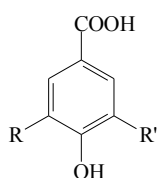
fenoksi radikala, povećava se mogućnost nastajanja rekombinantnih reakcija koje dovode do terminacije slobodnoradikalskih procesa. Fenoksi radikal nastao u toku hvatanja radikala od strane nekog fenolnog jedinjenja je sposoban da oksiduje i proteine i lipide. Kao posledica toga, uloga bioloških antioksidanata može biti limitirana njihovom mogućnošću da uzrokuju citotoksičan i genotoksičan efekat, tako da se reaktivnost fenoksi radikala mora uzeti u obzir kao kritična tačka u razvoju novih antioksidativnih preparata.

Polifenoli reaguju sa lipidima i proteinima ćelijske membrane i time sprečavaju njihova oštećenja. Efikasnost prolaska kroz ćelijsku membranu zavisi od hidrofobnosti, tj. hidrofilnosti fenola, kao i od broja hidroksilnih grupa i stepena polimerizacije (Verstraeten i sar., 2005). Neutrališući slobodne radikale u ćelijama, fenolna jedinjenja kao snažni antioksidanti mogu različitim mehanizmima da spreče oksidativna oštećenja DNK i nastanak mnogih bolesti (Hung i sar., 2004).

2.2.2.2. Fenolne kiseline

Pojam fenolne kiseline obuhvata sva jedinjenja koja sadrže najmanje jednu fenolnu i jednu karboksilnu grupu, a u praksi se obično pod njim podrazumevaju dve grupe jedinjenja:

a) Derivati benzojeve kiseline



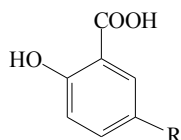
R=R'=H: p-hidroksibenzojeva kiselina

R=R'=OH: galna kiselina

R=R'=OCH₃: iriginska kiselina

R=OH, R'=H: protokatehinska kiselina

R=OCH₃, R'=H: vanilinska kiselina



R=H: salicilna kiselina

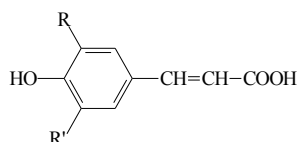
R=OH: genistinska kiselina

Slika 1. Hemijske formule osnovnih derivata benzojeve kiseline

Ar-C₁ jedinjenja mogu nastati putem šikimi kiseline. Međutim, oni generalno nastaju degradacijom bočnog niza odgovarajućih cimetnih kiseline.

b) Fenilpropanoidi (derivati cimetne kiseline)

Fenilpropanoidi spadaju u grupu C₆-C₃ fenola, koji imaju na aromatičnom prstenu vezan bočni niz sa tri C atoma.



R=R'=H: p-kumarna kiselina

R=R'=OCH₃: sinapinska kiselina

R=OH, R'=H: kafena kiselina

R=OCH₃, R'=H: ferulna kiselina

Slika 2. Hemijske formule osnovnih derivata cimetne kiseline

Ova jedinjenja nastaju kondenzacijom šikimi kiseline sa fosfoenolpiruvatom dajući horizminsku kiselinu. Dodatnim reakcijama dekarboksilacije, transaminacije i dezaminacije nastaju cimetna (3-fenil propenska) kiselina i hidroksi cimetne kiseline. Naknadnim reakcijama hidroksilacije, metoksilacije, i dr., nastaju derivati cimetne kiseline: p-kumarna kiselina (p-hidroksi cimetna kiselina), kafena kiselina (2,3-dihidroksi cimetna kiselina), ferulna kiselina (2-metoksi-3-hidroksi cimetna kiselina), sinapinska kiselina (2,4-dimetoksi-3-hidroksi cimetna kiselina) (Dixon i sar., 2005).

Biološki i farmakološki značaj fenolnih kiseline

Sve više pažnje se poklanja proučavanju hemijske strukture i farmakološkog delovanja fenolkarbonskih kiseline i njihovih glikozida. Utvrđeno je da mnoge droge koje se tradicionalno koriste, sadrže upravo ova jedinjenja kao aktivne sastojke. Brojna istraživanja ukazuju da su derivati cimetne kiseline (C₆-C₃) efikasniji antioksidanti u odnosu na supstituisanu benzojevu kiselinu (C₆-C₁), najverovatnije zbog nastajanja slobodnoradikalskog intermedijera, čija je stabilnost povećana usled konjugacije aromatičnog prstena sa propenskim bočnim nizom.

Antioksidantni potencijal derivata benzojeve i cimetne kiseline značajno variraju u zavisnosti od broja hidroksilnih grupa benzenovog prstena, a proporcionalan je broju elektron-donorskih supstituenata, kao i stepenu stabilizacije (broju rezonantnih struktura) nastalih slobodnoradikalskih intermedijera.

Fenolne kiseline i njihova aktivnost su već godinama predmet brojnih bioloških, hemijskih i medicinskih studija. Uglavnom su prisutne u cerealijama (pšenici, ječmu, raži), a posebno ferulna kiselina, esterifikovana sa polisaharidima koji su sastavni deo ćelijskog zida biljke (Sun i sar., 2001). U hrani se pojavljuju kao glikozidi ili estri sa drugim jedinjenjima kao što su steroli, alkoholi, glukozidi i masne kiseline (Mandal i Chakraborty, 2010). Poseduju snažnu antioksidantnu, antiinflamatornu, antikancerogenu i antimikrobnu aktivnost, a takođe su pokazale i pozitivan efekat u lečenju mnogih

kardiovaskularnih bolesti i sprečavanju ateroskleroze (Hwang i sar., 2006; Madlener i sar., 2007; Zhang i sar., 2008; Mandal i Chakraborty, 2010).

Dai i Mumper (2010) su pokazali da fenolne kiseline pokazuju jači antioksidativni efekat od vitamin C i E i karotenoida prema slobodnoradikalnim vrstama.

2.2.2.3. Flavonoidi

Flavonoidi čine najveću grupu biljnih fenola. Imaju C₆-C₃-C₆ skelet, izveden od flavona ili flavana.

Nastaju kondenzacijom tri molekula malonil-CoA (nastalih iz acetata preko citoplazmatičnog oblika acetyl-CoA karboksilaze) sa molekulom 4-kumaroil-CoA (proizvod centralnog dela fenilpropanoidnog puta). Na ovaj način formira se aktivirana poliketidna struktura, čijom ciklizacijom nastaje halkonska struktura (osnovni skelet, C₆-C₃-C₆). Naknadno dolazi do ciklizacije i nastajanja piranskog prstena i formiranja molekula flavanona. Daljim transformacijama nastaju svi ostali tipovi flavonoidnih molekula: flavoni, flavonoli, flavanoni, dihidroflavonoli, flavan-3,4-dioli, flavan-3-, flava 4-oli, antocijanidini, auron, halkoni, izoflavonoidi, proantocijanidini (Gould i Lister, 2006; Dewick, 2009).

Raznovrsnost i veliki broj flavonoida su posledica mogućih brojnih modifikacija njihove osnovne strukture, kao što su dodatne hidroksilacije, O-metilacije hidroksilnih grupa, dimerizacije, vezivanje neorganskog sulfata. Najbitnija modifikacija je glikolizacija hidroksilnih grupa (nastajanje O-glikozida) ili flavonoidnog jezgra (nastajanje C-glikozida).

Iako su sve klase flavonoida, odnosno fenolnih jedinjenja, zastupljene u biljnim familijama, ipak su najbrojniji flavonoli (3-hidroksiflavoni), a zatim i flavoni, flavan-3-oli, kao i zoflavoni. Od flavonola u biljkama su najzastupljeniji kvercetin, kamferol i miricetin, kao i metilovani derivat izohromatin. Iako su u biljkama uglavnom prisutni kao glikozidi, među flavonolima je poznato oko 200-300 aglikona. Od flavona su u biljkama najzastupljeniji luteolin i apigenin. Javljaju se u obliku O- i C-glikozida. Ova jedinjenja se mogu javiti u još jednoj strukturnoj varijaciji, kao biflavoni. Izoflavoni daidzein, genistein, formononetin i biohanin A se javljaju u familije Fabaceae i to uglavnom kao glikozidi.

Biološki i farmakološki značaj flavonoida

Biološki i farmakološki efekat flavonoida u vezi je sa inhibicijom određenih enzima i njihovom antioksidantnom aktivnošću.

Brojna istraživanja ukazuju da je antioksidantni kapacitet flavonoida znatno veći od vitamina C i E, kao i od mnogih komercijalnih sintetskih preparata (Prior i sar., 2000).

Svoje antioksidantno dejstvo pokazuju na nekoliko načina:

- mogu otkloniti hidroksil radikal, peroksi radikale, „hvatači“ su superoksid anjon radikala, pri čemu sami prelaze u radikale, koji su rezonantno stabilizovani i nemaju dovoljno energije da pokrenu nove lančane reakcije;
- uklanjaju $^1\text{O}_2$: prisustvo OH grupe na prstenu C aktivira dvostruku vezu za napad elektrofila, odnosno $^1\text{O}_2$;
- aktiviraju antioksidantne enzime indukujući enzime II faze detoksifikacije (NAD(P)H-oksidoireduktazu, glutation S-transferazu i UDP-glukuronozil transferazu) koji predstavljaju glavne sisteme odbrane od elektrofilnih toksikanata i oksidativnog stresa (Nerland i sar., 2007);
- redukuju α -tokoferol radikal koji je potencijalni prooksidant, donirajući mu atom vodonika i time sprečavaju i oksidaciju LDL-a (Hirano i sar., 2001);
- sprečavaju Fentonovu reakciju, jer raspored hidroksilnih grupa u molekulu omogućava građenje stabilnih helatnih kompleksa sa jonima gvožđa i bakra (Feralli i sar., 1997).

Antioksidantna aktivnost flavonoida zavisi od njihove molekularne strukture, odnosno hidroksilacije i alkoksilacije A i B prstena ovih jedinjenja, zatim lokacije slobodnih hidroksilnih grupa na A prstenu i OH grupe na C-3 položaju C prstena. Flavonoidi koji imaju u *orto*-položaju hidroksilnu grupu u B prstenu i višestruke hidroksilacije u A prstenu predstavljaju efikasnije antioksidante. Glikozilacija jedne ili više OH grupa flavonoida znatno smanjuje antioksidantnu aktivnost.

Pored antioksidantnog efekta flavonoidi mogu izraziti i svoju *prooksidantnu aktivnost* koja je direktno proporcionalna ukupnom broju hidroksilnih grupa u molekulu flavonoida. (Hanasaki i sar., 1994).

Epidemiološke studije sa početka devedesetih godina ovog veka, ukazuju na korelaciju između flavonoida i smanjenja rizika od nastanka mnogih degenerativnih bolesti. Dokazano je da ova jedinjenja pokazuju antiinflamatornu, antialergenu, antimikrobnu, hepatoprotektivnu, antiviralnu, kardioprotektivnu, antidiabetiku,

antikancerogenu i mnoge druge aktivnosti. Zbog velikog nutritivnog i terapijskog značaja, flavonoidi danas privlače najviše pažnje među fitojedinjenjima. Mnoge studije na ljudskoj populaciji ukazuju na protektivni efekat flavonoida kada je reč o kardiovaskularnim oboljenjima (Huxley i sar., 2003). Iako još ovaj mehanizam nije do kraja razjašnjen, smatra se da deluju na metabolizam krvnih sudova i povećavaju njihovu otpornost, pa se koriste u lečenju hemoragije, hipertenzije i arteroskleroze (najefikasniji su derivati rutina, katehini, flavoni, i izoflavoni). Oni takođe štite lipoproteine plazme od oksidativnog oštećenje, povećavaju aktivnost lipaze i time smanjuju mogućnost pojave hiperholesterolemije kao jednog od osnovnih faktora u nastanku ateroskleroze. Neki rezultati ukazuju na to da unošenje flavonoida putem hrane tokom dužeg perioda, pokazuje značajno smanjenje nivoa ukupnog holesterola, LDL-a i apolipoproteina B u plazmi (Zern i sar., 2003). Svoju potencijalnu antiinflamatornu aktivnost pokazuju inhibirajući ciklooksigenazu (COX) i 5-lipoksigenazu (5-LO) (Takano-Ishikawa i sar., 2006). Tako na primer, katehin i kvercetin inhibiraju adheziju monocita u *in vitro* gajenim endotelijalnim ćelijama (Koga i Meydani, 2001), silimarin inhibira produkciju inflamatornih citokinina, kao što su interleukotrieni i interferoni, iz makrofaga (Matsuda i sar., 2005).

Biljni flavonoidi mogu da modifikuju aktivnost niza enzimskih sistema uključenih u ćelijske komunikacije, funkcije imunog sistema, ćelijske transformacije, rast tumora i metastaze. Antitumorna aktivnost flavonoidi se ogleda u apoptozi, supresiji aktivnosti protein tirozin kinaze, antiproliferaciji, antimetastazi i antiangiogenezi. Inhibicija protein kinaza je jedna od ključnih stvari u regulaciji ćelijske proliferacije. Mnoge klase flavonoida utiču na aktivnost protein kinaze C, epidermalnog rastućeg receptor faktora (eng. Epidermal Growth Factor Receptor) i fokalne adhezione kinaze (eng. Focal Adhesion Kinase).

Poseduju antiviralnu antifungalnu i antimikrobnu aktivnost. Najranija istraživanja Graziani i saradnika, ukazuju na antiviralno dejstvo kvercetina koji je pokazao smanjenu fosforilativnu aktivnost Rous sarkoma virusa, transformišući produkte gena *in vivo* i *in vitro* (Graziani i sar., 1977). Veliki značaj se pridavao i istraživanjima vezanim za inhibitornu aktivnost pojedinih flavonoida protiv HIV (Human Immunodeficiency Virus) virusa. Baikalein, robustaflavon i hinokiflavon inhibiraju HIV-1 reverznu transkriptazu. Neki katehini inhibiraju DNK polimerazu, a dimetilovani gardenin A i 3,2-dihidroksiflavon inhibiraju HIV-1 proteinazu. Pored HIV-1 virusa, flavonoidi pokazuju

inhibitorno dejstvo prema ostalim virusima kao što su herpes simpleks virus, poliovirus, Sindbis virus, koksaki B virus, korona virus.

Antifungalnu aktivnost prema sojevima *Candida albican*, *Aspergillus flavus*, *Cladosporium sphaerospermum*, *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum* pokazuju mnogi flavonoidi izolovani iz raznih biljaka i popolisa (Cafarchia, 1999).

Biljni ekstrakti bogati flavonoidima su se vekovima koristili kao efikasni antibaktericidni agensi, protiv mnogih bakterijskih sojeva kao što su *Escherichia coli*, *Staphylococcus nervous*, *Staphylococcus epidermis*, *Saccharomyces cerevisiae* i dr. (Cushnie i Lamb, 2005).

2.3. Izoflavonoidi kao fitoestrogeni

Fitoestrogeni su definisani kao bilo koja biljna supstanca ili metabolit koji indukuje biološki odgovor kod kičmenjaka i koji može da imitira ili modulira aktivnost endogenih estrogena (npr. 17- β -estradiola), vezujući se uglavnom za estrogene receptore (Madej i sar., 2002). Fitoestrogeni obuhvataju grupu od oko stotinu različitih jedinjenja koji su podeljeni prema svojoj hemijskoj strukturi. U ishrani se najčešće pojavljuju izoflavonoidi, lignani, kumestani i stilbeni (Pilšáková i sar., 2010).

Tabela 2. Najvažniji izvori fitoestrogena i njihove koncentracije*

Klase fitoestrogena	Izvori	Koncentracija (mg/100g)
Izoflavonoidi	Voće, cerealijske, leguminoze	0.1
Kumestani	Leguminoze	0-0.58
	Sojino mleko	5-10
	Sojino brašno	150
	Integralni hleb	0
Lignani	Soja	0.05
	Pasulj	3.6
	Alfalfa (lucerka)	4.7
	Grašak	0.2
	Cerealijske	0.5
	Laneno seme	60-370
	Čajevi	2.04

*USDA-Iowa State University Isoflavone Database, 2002.

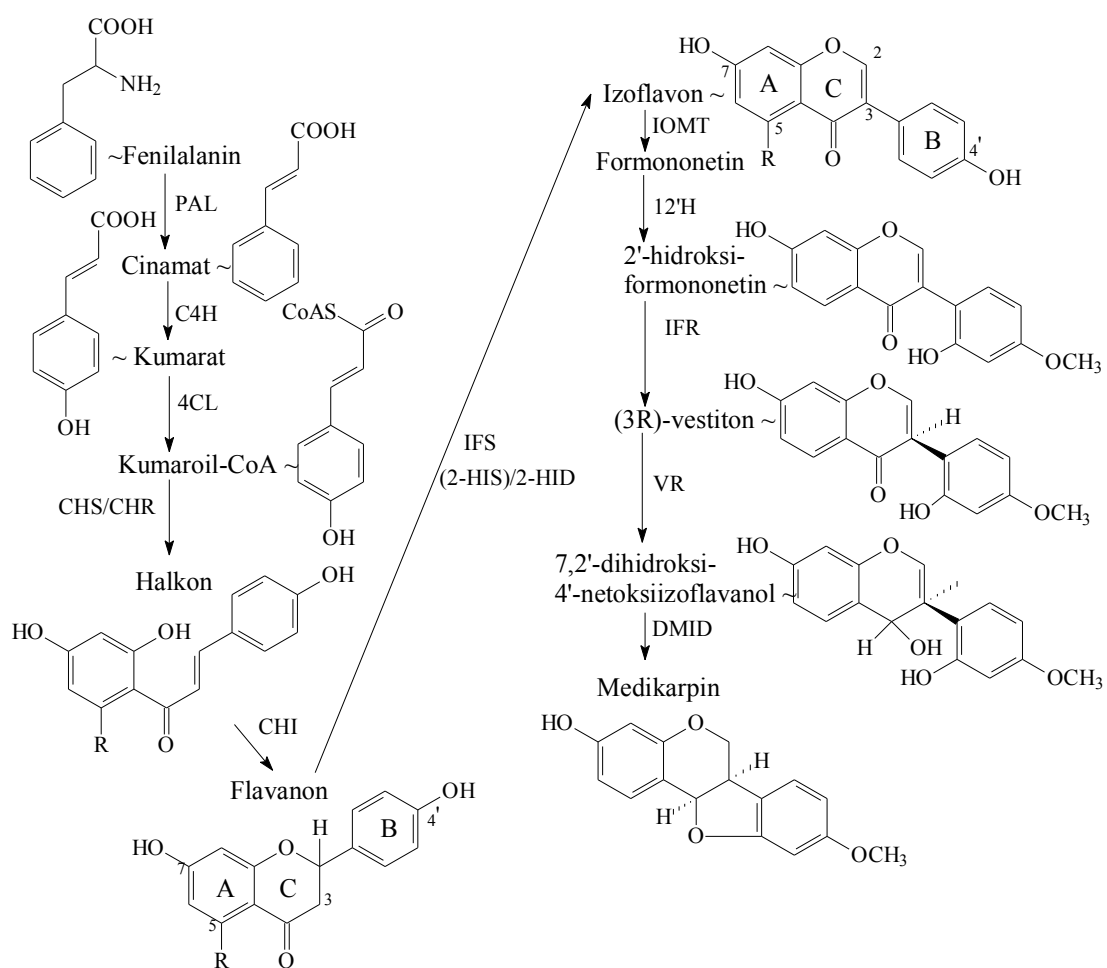
Fitoestrogeni se mogu unositi putem hrane ili u obliku dodataka ishrani. O potrebnim količinama postoje različita mišljenja, ali se za ostvarivanje željenih rezultata najčešće preporučuje dnevni unos od 130–160 mg u obliku glikozida (prirodni iz hrane) ili oko 100 mg u obliku aglikona. Budući da svi fitoestrogeni nemaju istu bioraspoloživost, a time i

delotvornost, korisno je odabrati preparate koji su standardizovani i koji imaju deklarisanu tačnu količinu i vrstu pojedinačnog fitoestrogena. Najzastupljenija i najistraživanija grupa fitoestrogena su izoflavoni, odnosno izflavonoidi.

Izoflavoni obuhvataju veliku i posebnu subklasu flavonoida, sa oko 364 aglikonskih formi, a u ishrani se uglavnom nalaze u obliku glikozida (Dewick 1993).

Razlikuju se strukturno od ostalih klasa flavonoida tako što imaju aromatični heterociklični prsten na C-3, a ne na C-2.

Na *Slici 3* prikazana je sinteza izoflavonoida fenilpropanoidnim putem.



Slika 3. Fenilpropanoidni put i biosinteza odabranih izoflavonoida.

Enzimi: FAL-fenilalanin amonijum liaza; C4H-cinamat 4 hidroksilaza; 4KL-4-kumarat CoA ligaza; HS-halkon sintaza; HR-halkon reduktaza; HI-halkon izomeraza; IFS-izoflavon sintaza; 2-HID-2-hidroksi-izoflavon dehidrataza; IOMT-izoflavon-O-metiltransferaza; I2 'H-izoflavon 2'-hidroksilaza; IFR-izoflavon reduktaza; VR –vestiton reduktaza; DMID-7, 2'-dihidroksi, 4'-metoksiizoflavanol dehidrataza (Wang, 2010).

Prikazana sinteza (izo)flavonoida se odvija u prisustvu mnogobrojnih enzima. Fenilalanin amonijum liaza (FAL) je prvi enzim u glavnom fenilpropanoidnom putu koji katalizuje pretvaranje L-fenilalanina u cinamat (prekursor fenilpropanoida). Cinamat 4-hidroksilaza (C4H), citohrom P-450 enzim, uvodi hidroksilnu grupu na para poziciju u fenilnom prstenu cinamata pri čemu nastaje p-kumarat. Zatim, 4-kumarat CoA-ligaza (4KL) katalizuje poslednji korak u osnovnom fenilpropanoidnom putu, sintetišući odgovarajuće CoA tiolne estre, kao na primer p-kumaroil-CoA. Ubikvitin-konjugujući enzim, halkon sintaza (HS), katalizuje prvi korak u flavonoidnom putu, kondenzaciju jednog p-kumaroil-CoA i tri malonil-CoA molekula do forme halkona. Halkon reguktaza (HR), ketoreduktaza koja je identifikovana samo kod leguminoza (Leguminosae), zajedno sa halkon sintazom, katalizuje sintezu intermedijera, deoksihalkona. Halkon izomeraza (HI) vrši ciklizaciju halkona do forme flavanona. Preko biosintetskog puta, specifičnog za leguminoze, izoflavon sintaza (IFS) vrši konverziju flavanona u 2-hidroksiizoflavanon, vršeći premeštanje aromatičnog B prstena sa pozicije C-2 na poziciju C-3, preko aril-migracionog mehanizma, i hidroksilaciju na poziciji C-2. Dehidrogenovanje 2-hidroksiizoflavona se dešava ili spontano ili katalizom 2-hidroksiizoflavon dehidrataze (2-HID) do izoflavona, npr. daidzeina i genisteina (Wang, 2010).

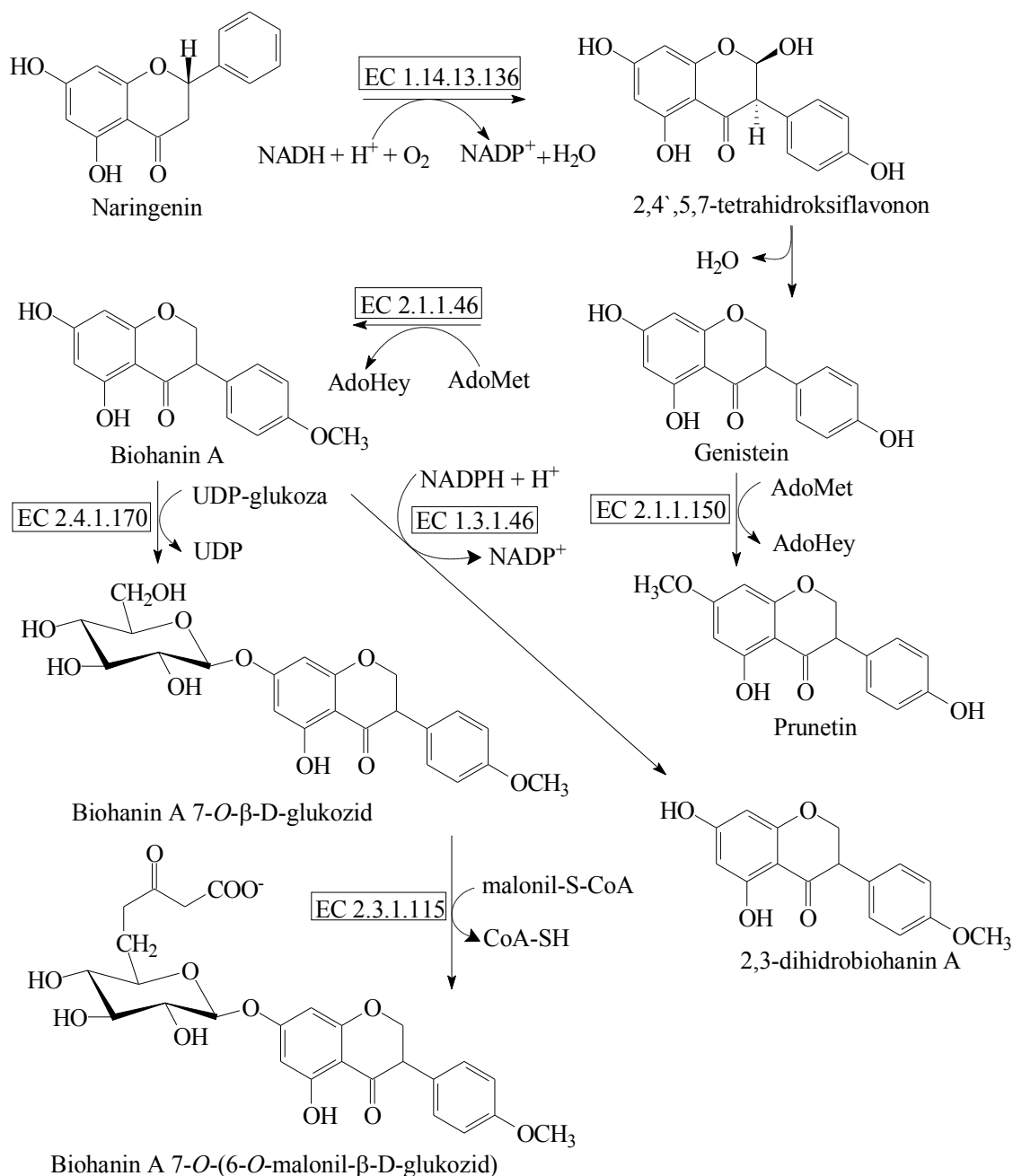
Izoflavon sintaza (IFS, ili tačnije 2-HIS (2-hidroksi-izoflavanon sintaza)) je ključni enzim u sintezi izoflavonoida koji pripada CYP93C subfamiliji citohrom P450 enzima. Ovaj enzim konvertuje flavone u izoflavonoide, posle čega se oni transformišu u različite derivate posredstvom nekih drugih P450 enzima.

Veliki broj derivata izoflavonoida su fitoaleksini u leguminozama koji imaju važnu ulogu u zaštiti biljke protiv mikroorganizama i brojnih štetočina. Međutim, danas su oni tema brojnih farmakoloških ispitivanja.

Najzastupljeniji izoflavoni u ishrani su genistein (4',5,7-trihidroksiizoflavon), daidzein (4',7-dihidroksiizoflavon), glicitein (4',7-dihidroksi-6-metoksiizoflavon), formononetin (7-hidroksi-4'-metoksiizoflavon) i biohanin A (5,7-dihidroksi-4'-metoksiizoflavon). Ova jedinjenja se pojavljuju u više od 300 biljnih vrsta, međutim najviše ih ima u biljkama porodice Leguminosae (Fabaceae) (Klejdus i sar., 2005). Nađeni su u soji, crvenoj detelini, klicama alfalfa (lucerke), u lanenom semenu, kao i u ekstraktima crnog vina, a mogu da ih proizvedu i neke bakterije i gljive. Naučno interesovanje za ove prirodne komponente inicirano je hormonskim promenama koje su

se javile kod životinja koje pasu. Estrogena aktivnost crvene deteline, jednog od najbogatijeg izvora fitoestrogena, opisana je još pre 50 godina, gde je kod ovaca koje pasu dijagnostikovano hiperestrogenizam i pojava neplodnosti (Bennets i sar., 1946).

Na *Slici 4* prikazana je biosinteza biohanina A i daidzeina, kao i njihovih derivata.

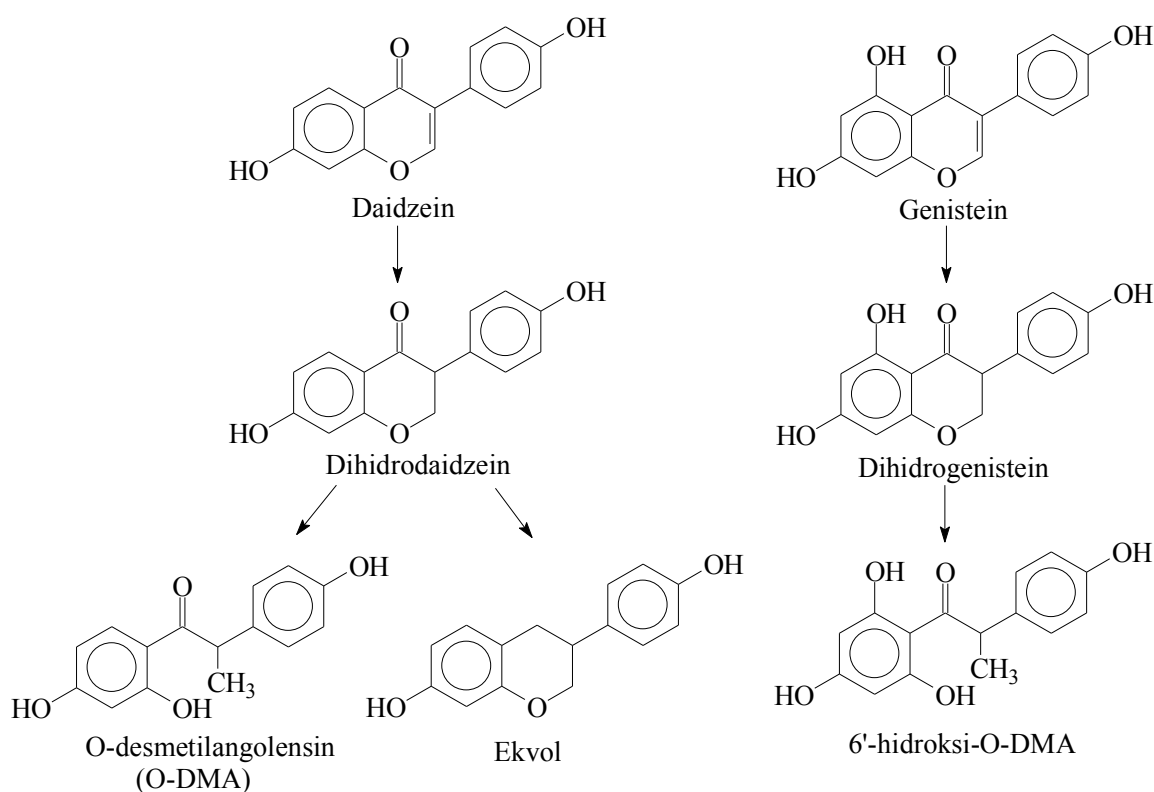


Slika 4. Biosinteza biohanina A, genisteina i njihovih derivata

Enzimi: EC 1.14.13.136 –izoflavonoid sintaza; EC 2.1.1.46-izoflavon 4'-O-metiltransferaza; EC 2.1.1.150-izoflavon 7-O-metiltransferaza; EC2.1.1.154-izolikviritigen 2' O-metiltransferaza; EC2.1.1.212-2,7,4'-trihidroksiizoflavon 4'-O-metiltransferaza; EC2.3.1.170 6'-deoksihalkon sintaza; EC4.2.1.105-2-hidroksiizoflavon dehidrataza, EC 5.5.1.6-halkon izomeraza

Farmakološka efikasnost izoflavonoida zavisi od njihovih farmakokinetičkih osobina, tj. absorpcije i distribucije do ciljnih tkiva. Izoflavonoidi se u hrani nalaze uglavnom kao glukozid konjugati. Posle ingestije dolazi do hidrolize ovih glukozida od strane intestinalnih mukoznih bakterija (npr. *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp. i dr.) i β -glukozidaza, pri čemu se dobijaju aglikonski oblici koji se mogu apsorbirati u krv ili dalje metabolisati (Atkinson i sar., 2005). Metabolizam izoflavonoida igra značajnu ulogu u dostupnosti i bioaktivaciji ovih jedinjenja u intestinalnom traktu. Tako na primer, S-ekvol je najdominantniji i najaktivniji metabolit daidzeina, značajnog izoflavona. S-ekvol je strukturno sličan humanom, endogenom estradiolu i može doprineti smanjenju nekih tegoba koje se javljaju tokom menopauze (Slika 5)(Setchell i Clerici, 2010).

Ovaj metabolit se jače i sa većim afinitetom vezuje za estrogene receptore od daidzeina. Pored S-ekvola, bakterije intestinalnog trakta proizvode i ostale metabolite izoflavona, koji su slabo identifikovani (Tsuchihaschi i sar., 2008).



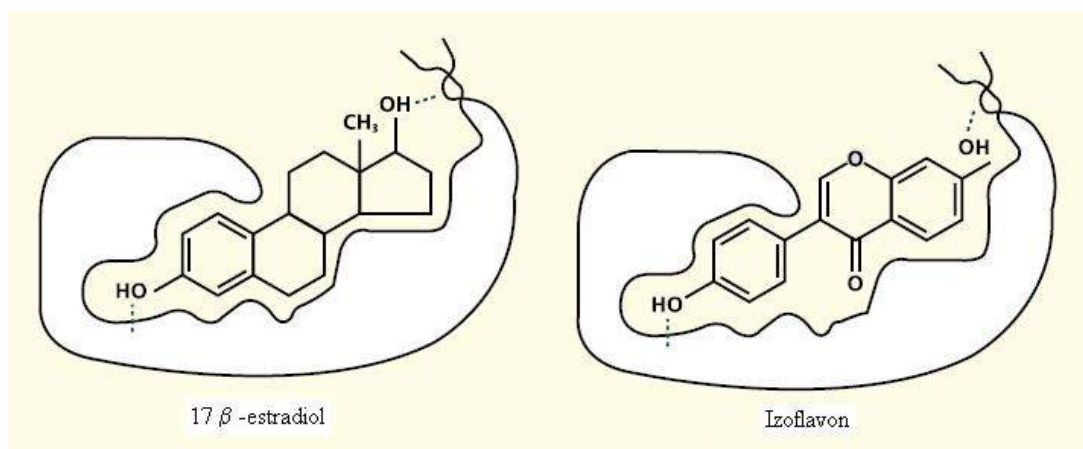
Slika 5. Predpostavljeni metabolički put katabolizma daidzeina i genisteina posredstvom humanih bakterija intestinalnog trakta (Kurzer i Xu, 1997).

Formiranje O-DMA iz daidzeina i 6'-hidroksi-O-DMA iz genisteina uključuje nekoliko reakcija redukcije. Nastali ekvol iz dihidrodaidzeina može dalje ući reakcije redukcije, dehidratacije i dr. (Kurzer i Xu, 1997).

2.3.1. Mehanizam delovanja izoflavona

Zbog njihove strukturne sličnosti sa 17- β -estradiolom, izoflavoni imaju sposobnost vezivanja za estrogene receptore (Slika 6). Ovi receptori su nađeni u dve forme, ER α i ER β , i imaju različitu ekspresiju u tkivima. Skorija istraživanja ukazuju na to da ER α igra glavnu ulogu u posredovanju estrogene aktivnosti u materici, hipotalamusu, kostima i drugim tipičnim target estrogen tkivima, a ER β u jajnicima, kardiovaskularnom sistemu, mozgu kao i u procesima inflamacije.

Estrogeni receptori pripadaju steroidnoj/tiroidnoj superfamiliji intracelularnih receptora, smeštenih na unutrašnjoj membrani jedra. Afinitet genisteina za ER β je oko 20-30 puta jači nego za ER α , što je uporedivo sa afinitetom 17- β -estradiola za isti receptor (Morito i sar., 2011). Afinitet ostalih izoflavona je u proseku 100-500 puta manji od 17- β -estradiola. Dakle, izoflavoni deluju kao agonisti estrogenih receptora, samo što je njihova aktivnost, uglavnom, niža od aktivnosti 17- β -estradiola.



Slika 6. Vezivanje endogenog hormona i izoflavona za isti receptor

Efekat izoflavona zavisi od nivoa endogenog estradiola, pošto su izoflavoni u kompeticiji sa estradiolom za vezivanje za estrogene receptore. U periodu većeg nivoa endogenih estrogena (npr. kod žena u folikularnoj fazi menstrualnog ciklusa), izoflavoni mogu da ometaju potpunu estrogenu aktivnost tako što okupiraju delove estrogenih receptora. Nasuprot tome, u stanju niske koncentracije endogenih estrogena (kod muškaraca, kod žena u menopauzi, posle operacije vađenja jajnika, i dr.), estrogenu aktivnost izoflavona postaje očigledna. Zbog toga se izoflavoni i koriste kao zamenska

(supstitucionu) hormonska terapija kod žena u menopauzi. Oni intereaguju sa polnim hormonima na nekoliko načina. Izoflavoni inhibiraju aktivnost 5 α -reduktaze koja katalizuje konverziju testosterona u 5 α -dihidrotestosteron, kao i aromataze P-450, koja učestvuje u konverziji testosterona u estradiol (Adlercreutz i sar., 1993). Aktivnost aromataze je inhibirana malom koncentracijom izoflavona, dok visoka koncentracija izoflavona povećava njenu aktivnost (Almstrup i sar., 2002). Izoflavoni se vezuju za hormon-vezujući globulin (eng. *sex hormone binding globulin*, SHBG) i stimulišu njegovu sintezu. Kod miševa koji su hranjeni visokim sadržajem izoflavona, zabeležen je smanjen sadržaj testosterona (Weber i sar., 2001). Pored interakcija izoflavona sa polnim hormonima, zabeležene su i reakcije sa hormonima tiroidne žlezde. U jednom istraživanju je ustanovljeno da ishrana bogata izoflavonima povećava koncentraciju tirotropina, dok se koncentracija trijodtironina i tiroksina ne menja (samo kod muškaraca).

Postoje mnogi dokazi, koji potiču od brojnih epidemioloških i eksperimentalnih studija, o preventivnom uticaju izoflavona kod mnogih hroničnih oboljenja, uključujući kancer (dojke, prostate, debelog creva i pluća), osteoporozu, kardiovaskularne bolesti, kao i simptome u menopauzi (Duncan i sar., 2003). Nizak nivo 17- β -estradiola je povezan sa niskim sadržajem kalcijuma i aktivacijom citokinina koji ubrzavaju njegovu resorpciju (IL-1, IL-6, IL-11), zbog čega dolazi do njegovog gubitka u kostima. Zbog toga osteoporoza i predstavlja priličnu komplikaciju kod žena u postmenopauzi. Polkowski i Mazurek (2000) su pretpostavili da pozitivan efekat izoflavona može biti posredovan sa najmanje dva mehanizma. Prvi je aktivacija apoptoze osteoklasta, a drugi je inhibicija aktivnosti tirozin-kinaze preko podešavanja membrane receptora estrogena, sa promenama u aktivnosti alkalne fosfataze. Smatra se da izoflavoni deluju na kardiovaskularni sistem tako što regulišu vazoaktivnosti i povećavaju metabolizam lipida. Aktivacija estrogen receptora jedra od strane izoflavona pospešuje povećanje ekspresije NO-sintaze, redukuje oksidativni stres i povećava bioraspodivnost NO (Mahn i sar., 2005). Izoflavoni podešavaju puteve ćelijske komunikacije kroz nekoliko genomskih akcija, posle aktivacije membranskih ćelijskih receptora, uključujući cAMP/protein kinazu A, fosfatidilinozitol-3-kinazu (PI3-kinaza)/protein kinaza B i ekstracelularne regulatorne kinaze 1 i 2 (ERK 1/2), što uzrokuje povećanje NO sintaze, a samim tim i produkciju NO. PI3-kinaza posreduje u indukciji hem oksigenaze 1 (HO-1) i drugih antioksidantnih gena sistema odbrane u oksidativnom stresu.

Shin i saradnici (2007) su zaključili da postoji povećanje koncentracije NO u plazmi pod uticajem genisteina koji je bio praćen ekspresijom ciklooksigenaze-2 (COX-2) i produkcijom E2 prostaciklina u endotelijalnim ćelijama preko estrogen-receptor mehanizma. Izoflavoni smanjuju kontrakcije krvnih sudova inhibicijom RhoA/Rho-kinaze. Dalje, oni inhibiraju tromboksan A2 receptore na glatkoj mišićnoj muskulaturi i trombocitima. Takođe inhibiraju rast i migraciju vakularnih ćelija glatkih mišića, čime se sprečava nastanak ateroskleroze (Pan i sar., 2001).

Prema nekim istraživanjima životinje koje se hrane hranom bogatom izoflavonima, kao što su soja i crvena detelina, pokazuju manju učestalost oboljevanja od kancera dojke. Žene u menopauzi koje su unosile izoflavone putem hrane, takođe su bile u manje rizičnoj grupi da obole od kancera dojke i mlečnih žlezda (Atkinson i sar., 2004). Ovaj efekat je povezan sa sposobnošću izoflavona da povećavaju koncentraciju serumskog SHBG i samim tim redukuju raspoloživost polnih hormona u hormon zavisnim tkivima (Kurzer, 2002). U perifernim tkivima izoflavoni inhibiraju enzime (tirozin kinaza i aromataza P-450) uključene u proliferaciju ćelija i redukuju dostupnost estradiola inhibirajući efekat aromataze P-450.

U ćelijskim kulturama, visok sadržaj genisteina i biohanina A inhibira rast ćelija kancera prostate. Kod miševa je zabeleženo smanjenje zapremine i mase prostate posle dužeg unošenja izoflavona (Fritz i sar., 2002).

Slično estradiolu, izoflavoni prolaze kroz krvno-moždanu barijeru. Kod miševa koji su konzumirali veću količinu hrane bogate izoflavonima, zabeleženo je povećanje koncentracije izoflavona u bazalnim delovima hipotalamusa, malog mozga i prednjeg korteksa (Lephart i sar., 2002).

Takođe, duže unošenje izoflavona u organizam utiče pozitivno na kongnitivne funkcije kao što su pamćenje i logično razmišljanje (Kreijkamp-Kaspers i sar., 2007). Najrasprostranjeniji izoflavoni daidzein i genistein, poseduju značajnu antimikrobnu aktivnost, kako prema patogenim, tako i prema nepatogenim mikroorganizmima.

Antimikrobna aktivnost osnovnih izoflavona prisutnih u leguminozama, ogleda se u tome što imaju ulogu fitoaleksina (Dakora i sar., 1996). Inhibiraju rast i gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterija, a takođe poseduju i antifugalnu aktivnost. Najjaču antimikrobnu aktivnost pokazuju genistein, protiv stafilokoka, kao i sofraizoflavon A i 6,8-difenilgenistein protiv *Staphylococcus aureus*, salmonele i šigele. Biohanin A inhibira

rast *Mycobacterium smegmatis* i *Mycobacterium tuberculosis in vitro* (Lechner i sar., 2008).

2.4. Etarska ulja

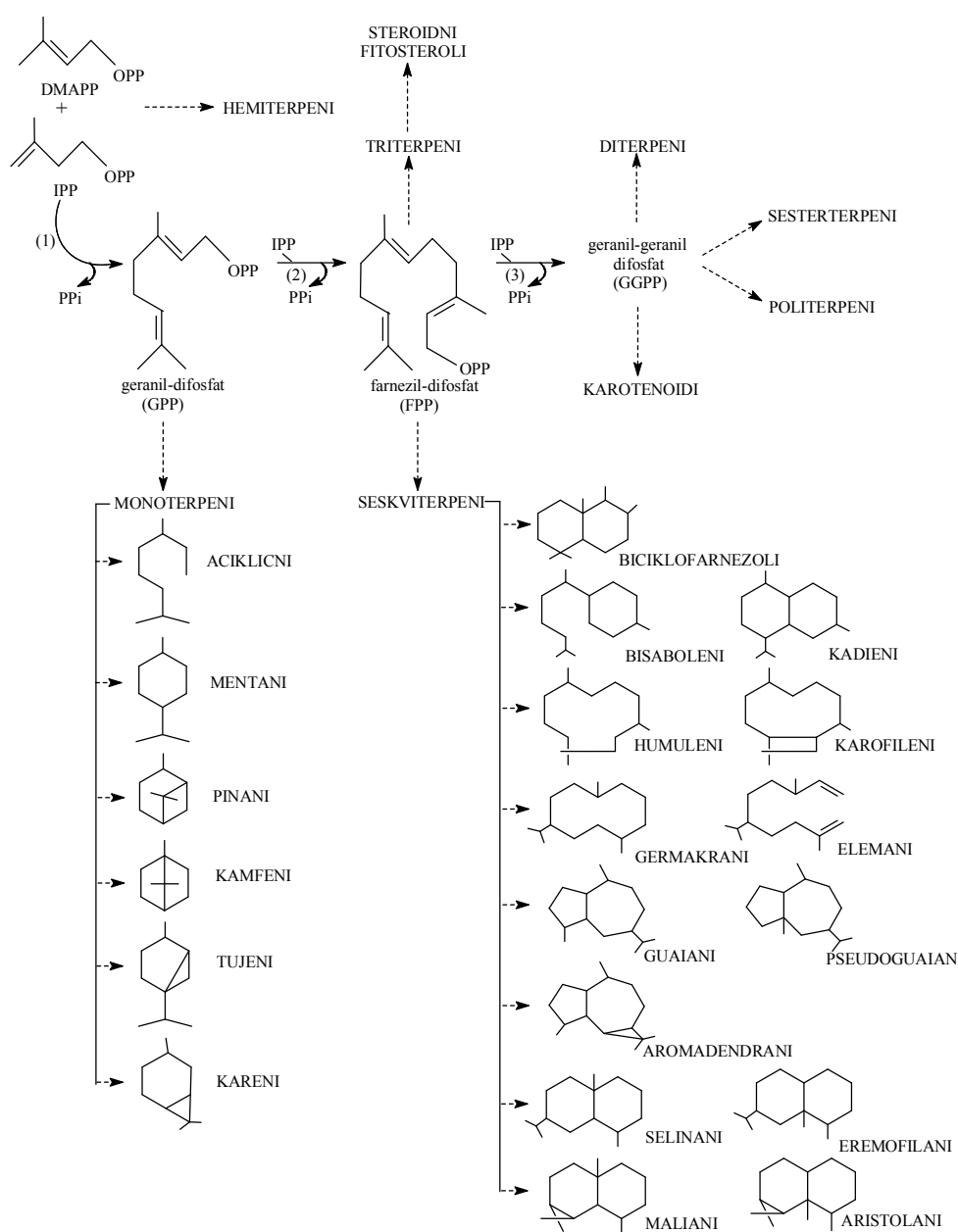
Etarska ulja su aromatične, lako isparljive uljane tečnosti dobijene iz biljnog materijala (cveta, pupoljka, semena, stabljike, lista, drveta, ploda i korena) raznim fizičkim postupcima. Ime „etarska ulja“ potiče još iz 16. veka od oca medicine Paracelsus von Hohenheim-a, kada je aktivne komponente iz biljaka nazvao *Quinta essentia* (Guenther, 1948). Istorija eteričnih ulja je započela na Istoku, proces destilacije začet je u starim civilizacijama Egipta, Indije i Persije. Ipak, kao što je to slučaj u mnogim područjima, tek je na Zapadu taj proces doživeo svoj potpuni razvoj (Burt, 2004).

Sinteza i sekrecija etarskog ulja u biljkama odvija se u specijalizovanim strukturama koje se mogu podeliti na spoljne (žlezdane dlake i osmofore) i unutrašnje (uljne ćelije, sekretorne šupljine, sekretorne kanale). Sekretorne ćelije u kojima se vrši sinteza terpena imaju plastide koji delimično ili potpuno okruženi endoplazmatičnim retikulumom. Utvrđeno je da su u nekim biljkama razdvojena mesta sinteze monoterpena i seskviterpena. Biosinteza monoterpena odvija se u epitelnim ćelijama i tesno je povezana sa leukoplastima, dok se sinteza seskviterpena povezuje sa endoplazmatičnim retikulumom (Bosabalidis i Tsekos, 1982; Kostić i sar., 2012).

Etarska ulja su kompleksne smeše različitih hemijskih jedinjenja (u jednom etarskom ulju može se naći i do 800 jedinjenja). Dominantna grupa jedinjenja predstavljaju terpenoidi, ali mogu biti prisutna i druga isparljiva jedinjenja kao što su: ugljovodonici, aldehidi, ketoni, alkoholi, aromatična jedinjenja i specifična jedinjenja koja sadrže sumpor i azot.

Struktura terpenoida se može izvesti umnožavanjem izoprenskih jedinica, a s obzirom na njihov broj dele se na hemi- (C_5), mono- (C_{10}), seskvi- (C_{15}), di- (C_{20}), sester- (C_{25}), tri- (C_{30}) i tetraterpene (C_{40}). Formiranje osnovne C_5 jedinice, izopentenil-difosfata (IPP) i dimetilalil-fosfata ide preko dva alternativna puta: mevalonatnog (od acetyl-CoA) i metileritritol-fosfatnog, koji je skoro otkriven (Rodriguez-Concepcion i Boronat, 2002). Prvi sintetski put se odigrava u citosolu i endoplazmatičnom retikulumu, dok se drugi odigrava u plastidima, a prekursori su gliceraldehid-3-fosfat i piruvat. Oba puta daju izopentenil-difosfat (IPP) koji se izomerizuje i formira dimetilalil-difosfat (DMAPP) dejstvom izopren sintaze. Kondenzacijom ova dva molekula nastaju geranil-difosfat (GPP), farnezil-difosfat (FPP) i drugi prekursori terpenoida (Bohlmann i Keeling, 2008).

Ovi prenil-difosfati podležu nizu reakcija ciklizacije dajući na taj način osnovne skelete različitih klasa monoterpena iz GPP i seskviterpena iz FPP. Ciklizacije se dešavaju u prisustvu enzima terpenoid-ciklaza koje katalizuju najkompleksije reakcije ciklizacije koje su inicirane formiranjem visoko reaktivnog karbo-katjona u poliizoprenskom supstratu. Osnovni ciklični skelet se naknadno transformiše redoks reakcijama, izomerizacijama i reakcijama konjugacije dajući krajnja izoprenoidna jedinjenja, tipična za etarska ulja (Lange i Croteau, 1999).



Slika 7. Biosinteza terpenoidnih prekursora i osnovne klase monoterpena i seskviterpena (Lesburg i sar., 1998)

Kvalitativni, ali i kvantitativni sastav etarskih ulja je specifična karakteristika određene vrste ili varijeteta uslovljen geo-klimatskim, genetskim faktorima i godišnjim dobom. Etarska ulja ispoljavaju brojne biološke i farmakološke aktivnosti od kojih se posebno izdvaja njihovo antimikrobno delovanje.

Iako postoje mnogobrojni navodi o antimikrobnoj aktivnosti etarskih ulja i iz njih izolovanih jedinjenja, mehanizam antimikrobnog dejstva još uvek nije u potpunosti ispitan. Lipofilna priroda im omogućava da lako prolaze kroz ćelijsku membranu bakterija, modifikujući aktivnost kalcijumovih kanala i redukujući pH gradijent. Predpostavlja se da u ćeliji postoji nekoliko ciljnih mesta njihovog delovanja. Hemijska struktura pojedinih jedinjenja koja se nalaze u etarskim uljima utiče na njihov antimikrobni karakter. Istraživanja koja su vršena u cilju ispitivanja delovanja etarskih ulja na brojne mikroorganizme, pokazala su da je antibakterijska aktivnost etarskih ulja delimično bolja protiv Gram-pozitivnih (G+) nego Gram-negativnih (G-) bakterija. Ovakva razlika u antimikrobnoj aktivnosti se može objasniti time što G- mikroorganizmi poseduju spoljašnju membranu koja okružuje zid ćelije i na taj način ograničava difuziju hidrofilnih jedinjenja kroz njihov lipopolisaharidni omotač (Burt, 2004).

Metode kojima se najčešće određuje antimikrobni potencijal etarskih ulja *in vitro* su Agar difuzioni test, cerijski Agar ili Bujon dilucioni test i test kod koga se ispituje antimikrobna aktivnost isparljivih jedinjenja prisutnih u etarskim uljima (Friedman i sar., 2004). Mnoga *in vitro* istraživanja ukazuju da etarska ulja deluju kao antibakterijski agensi na širok spektar patogenih bakterija uključujući *Listeria monocytogenes*, *L. innocua*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Shigella dysenteria*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella typhimurium* (Schmidt i sar., 2005; Jirovetz i sar., 2005). Ispitivanjem mikrobiološke aktivnosti 4 mediteranske vrste familije Lamiaceae, od kojih su dve (*Satureja montana* i *Thymus vulgaris*) imale dominantnu količinu pomenutih jedinjenja u svom ulju uočene su zanimljive korelacije izmenu aktivnostii hemijske strukture ispitivanih jedinjenja. Zatim, utvrđeno je da su *trans*-izomeri aktivniji od *cis*-izomera (geraniol i nerol). Najveću aktivnost pokazivala su jedinjenja koja sadrže *p*-mentanov skelet i alkoholnu ili keto-grupu. Nezasićenost cikloheksanovog prstena takođe povećava njihovu aktivnost (terpinolen, terpineol i terpinenol) (Hinou i sar., 1989).

Baktericidno svojstvo etarskih ulja se pokazalo efikasnim u tretmanu mnogih dermatoloških oboljenja, infekcija usne šupljine (gingivitis), respiratornih i gastrointestinalnih oboljenja koje bakterije izazivaju. Takođe, u mnogim istraživanjima se

navodi da etarska ulja, a pre svega seskviterpeni, povećavaju baktericidno dejstvo antibiotika, jer promene koje izazivaju u ćelijskoj membrani mikroorganizama (povećanje permeabilnosti) omogućavaju antibiotiku da brže prodre u unutrašnjost mikroorganizma i samim tim ima i brže dejstvo. Antimikrobna aktivnost etarskog ulja često je izraženija od aktivnosti pojedinih komponenata ili smeše jedinjenja.

Supresivnu aktivnost etarska ulja su pokazala na mnogim ćelijskim linijama kancera glioma, debelog creva, jetre, pluća, dojke, limfnih čvorova (De Angelis, 2001). Etarska ulja pokazuju i antivirusnu aktivnost. Predpostavlja se da mogu sprečiti razvoj nekih virusa kao što su herpes simpleks virus, influence i HIV-1. Takođe, njihovi volatilni konstituenti pokazali su antioksidativnu aktivnost kod LDL oksidacije, smanjenja ukupnog holesterola i triglicerida. Neka jedinjenja etarskih ulja mnogih biljaka pokazuju i antitrombotički efekat.

Mnoge studije ukazuju na antioksidantnu aktivnost mnogih terpenoida koji pokazuju inhibitorni efekat na lipidnu peroksidaciju (Tsimidou i Boskou, 1994).

Kao potencijalni antioksidanti, etarska ulja mogu biti deo dnevnih suplemenata (dodataka ishrani) ili se mogu koristiti kao aditivi u prevenciji oksidativnog stresa i nastanka mnogih degenerativnih oboljenja.

Inhalacija etarskih ulja ili njegovih pojedinačnih komponenata ima značajnu ulogu u kontroli centralnog nervnog sistema, najverovatnije delujući preko gama-aminobutarne kiseline (GABA). Etarsko ulje pojedinih biljaka se koristi u supresiji simptoma inflamacije, odnosno protiv akumulacije neutrofila i stvaranje edema (Maruyama i sar., 2005). Međutim, pored mnogobrojnih blagotvornih efekata na zdravlje, etarska ulja mogu biti i toksična i izazvati alergijske reakcije. Alergije se mogu javiti na neke komponente iz etarskih ulja kao što su benzil alkohol, cinamil alkohol, eugenol, izoeugenol, hidroksictronelal, geraniol i mnoge druge. Zbog toga prilikom njihove aplikacije moraju se praviti razliku između njihove primene u estetske svrhe i kliničkog korišćenja (Prashar i sar., 2004).

2.5. BILJKE RODA *TRIFOLIUM* L.

Trifolium L. je jedan od najbrojnijih rodova u ovoj familiji sa oko 255 vrsta koje su rasprostranjene u umerenim i tropskim područjima (Ellison i sar., 2006). Kao značajno svojstvo roda *Trifolium* je postojanje trolista. Kod nekih predstavnika, u listu mogu biti

zastupljeno do 9 liski. Od ukupnog broja vrsta smatra se da je 30% višegodišnjih, a 70% je autofertilno. Deteline su biljke dugog dana, pa su fotoperiodske potrebe veoma izržene.

Cvetovi su sakupljeni u više ili manje glavičaste cvasti, tipične građe kao i kod drugih familija Fabaceae. Zohary i Heller (1984) su detaljno opisali rod *Trifolium* i predložili klasifikaciju. Prema ovim autorima vrste iz roda *Trifolium* mogu se svrstati u 8 sekcija, koje su dalje podeljene na podsekcije i serije. Sekcija *Trifolium* L. (72 vrste) najviše je rasprostranjena u evro-azijskom delu kontinenta (Đukić, 2002). Takođe nastanjuje i severozapadnu Ameriku i istočnu Afriku. *Trifolium* vrste se pojavljuju na raznim staništima kao što su livade, ravnice, otvorene šume, polupustinje, planine, pa čak i alpske vrhove. Zajednička karakteristika svih ovih staništa je da su izložena velikom sunčevom zračenju, jedino nekoliko vrsta deteline su tolerantne na hlad. Najmanje 16 vrsta roda *Trifolium* se gaji, što je prilično veliki broj za jednu vrstu (Gillett i Taylor, 2001).

Biljke roda *Trifolium* su koristile mnoge kulture u tradicionalnoj medicini. Na primer, u turskoj narodnoj medicini, *Trifolium* vrste su korišćene kao ekspektoransi, analegetici, antiseptici i u lečenju reumatskim oboljenja. Visoka koncentracija kvercetina u nekim vrstama ovog roda čini to da su one potencijalni izvor fitohemijskih molekula korisnih za zdravlje ljudi (Sabudak i sar., 2009).



Slika 8. *Trifolium repens* L.



Slika 9. *Trifolium subterraneum* L.

(<http://concord.newenglandwild.org/genus/trifolium/>)

2.6. *TRIFOLIUM PRATENSE* L., CRVENA DETELINA

(eng. Red clover; sinonimna imena: trojka, kravljača, konjarka, kumbara i dr.)

2.6.1. Poreklo i morfološke karakteristike

Stari narodi su je nazivali *Trifilon*, što znači „tri lista”. Ovaj termin je takođe povezan sa zajedničkim nazivom *Clover* koji potiče od reči „clava”, što u prevodu znači trolisni. Tri lista prema mitologiji odgovaraju trijadi boginja, a prema kasnijim verovanjima srednjovekovnog hrišćanstva, povezuju ih sa Svetom Trojicom (Jack Ritchason, 1995).

Prema drugim izvorima ime detelina je zapravo Anglosaksonskog porekla (eng. *Red clover*). *Clover* se verovatno odnosi na tri svezane toljage koje su pripadale Herkulesu, liku iz rimske mitologije, jer *clava* na latinskom znači toljaga. *Trifolium* potiče od latinske reči *tres* što znači tri, i *folium* što znači list. Drugi deo imena, *pratense*, ukazuje na livadu kao stanište. Verovalo se da ko pronađe detelinu sa tri lista moći će da otkrije veštice, čarobnjake i vile. Crvena detelina je bila poznata čoveku od davnih vremena i kao ukrasna biljka „vere u sreću”. Postoje i stari zapisi o njenom blagotvornom uticaju na zemljište zbog čega joj se pripisivala božanska moć.

Prapostojbina ove biljne vrste je Mala Azija i jugoistočna Evropa gde se gaji najviše ekotipova. Za njeno rasprostranjenje i gajenje kao kulture, prema mnogima izvorima podataka, zasluga pripada arapskom carstvu u oblasti Mediterana i Španije, potom zemljama i narodima zapadne Evrope. Njena ekspanzija u centralnu Evropu je počela u 16. veku (1561-1579) pod nazivom „španska detelina”. U to vreme u Italiji je bila poznata kao „herba spagna”. Podaci o prvom gajenju u Francuskoj i Nemačkoj pominju se 1550. godine. U Englesku je prenesena iz Nemačke tek 1645. godine, u centralnoj Evropi se gajila krajem 17. i početkom 18. veka, a u Severnoj Americi tek u 19. veku kao krmna kultura.



Trifolium pratense L. je izuzetno polimorfna vrsta u kojoj je opisano više od 40 botaničkih varijeteta, među kojima su Zohary i Heller (1984) opisali šest. To je kratkotrajna biljka (dužina života 2-3 godine) koja se razmnožava uvek polno. Što se tiče morfoloških karakteristika, crvena detelina ima moćan koren, koji vretenast i raste duboko. Stablo deteline je jednogodišnje, zeljasto, prosečne visine oko 70 cm (ponekad prvi otkos

Slika 10. *Trifolium pratense* L.
(<http://www.dereila.ca/edible/>)

oko 90-100 cm) razgranato od osnove i po visini. Stabla i bočne grančice se završavaju glavičastim cvastima. Crvena detelina ima složen troper list. Listići su dužine 3-4 cm, široki 1,5-2,0 cm, približne veličine. Boja lista je tamnozeleno sa retkim tankim dlačicama na površini. Na listićima se nalaze karakteristične poprečne pege, simetrične su, prečnik pega je u proseku 1,5-2,0 mm.

List je najkrupniji kod crvene deteline u vreme pupljenja, a kasnije nešto sitniji. Cvet crvene deteline je karakterističan za leptirnjače, s tim što su čašični i krunični listići, uzani, dugački zbog međusobno stisnutog položaja. Cvetovi su grupisani u glavičaste (izdužene) cvasti eliptičnog oblika, koje se nalaze na vrhovima glavnih stabala i bočnih grana. Boja cvetova je ružičasto do ljubičastocrvena. U cvastima se se nalazi obično 40-50, a varira 30-120 cvetova. Cvetovi su zbijeni, sedeći na izduženoj cvetnoj loži, vretenastog oblika (Mišković, 1986).

Koren je vretenast sa mnogobrojnim adventivnim žilama. Zahtevi crvene deteline prema klimi su umereni. Traži dosta vode i umerenu toplotu, dok sušu slabije podnosi. To je biljka dugog dana koja dobro podnosi oblačnost i zasenu. Nema velike zahteve ni prema zemljištu. Najbolje joj odgovaraju rastresita, manje peskovita i vodopropusna zemljišta, koja su dovoljno obezbeđena vlagom. Zemljišna pH za detelinu je najbolja u granicama 5.5-7.0 (Đukić, 2002).



Slika 11. Trolist *Trifolium pratense* L.
(<http://concord.newenglandwild.org/genus/trifolium/>)



Slika 12. Samonikla *Trifolium pratense* L.
(<http://www.nablacognition.org/photo/935>)

2.6.2. Crvena detelina kao krmna biljka

Gajenje crvene deteline ima pozitivan uticaj na zemljište jer ostavlja zemljište čisto od korova, u rastresitiom stanju, obogaćuje ga azotom i ostalim hranljivim elementima. (Taylor i Quesenberry, 1996). U asocijaciji sa Rhizobium bakterijama, ima sposobnost da fiksira čak 125 do 220 kg/ha azota godišnje (La Rue i Paterson, 1981). Ova osobina uz visok prinos, dobar kvalitet i pogodnost za konzervaciju, čine ovu biljku atraktivnim usevom za krmnu proizvodnju (Frame, 1990). Kada su u pitanju proizvodnja i plasman semena širom sveta i broj sorti koji je na raspolaganju, među krmnim leguminozama, crvena detelina je na drugom mestu (Boller i sar., 2010).

2.6.3. Hemijski sastav

a) Hranljive materije

Po sadržaju esencijalnih aminokiselina (cistina, triptofana, leucina) crvena detelina prevazilazi seme kukuruza i ovsa. Proteinima je naročito bogato lišće, čiji sadržaj iznosi oko 25% u fazi butonizacije, što govori o posebnoj vrednosti lista crvene deteline pri spravljanju kvalitetne stočne hrane. Sadržaj vitamina i mineralnih materija čine je jednom od najkvalitetnijih krmnih vrsta. Odlikuje se velikom količinom provitamina A, vitaminima C, D, E, K, B1, B2, B3 i mikroelementima Mo, Co, B, Cu, Mn. Posедуje visok sadržaj rastvorljivih ugljenih hidrata što je čini dobrim energetskim hranivom. Posebno mesto u domenu kvaliteta crvene deteline kao krmne biljke, zauzima odnos strukturnih i nestrukturnih ugljenih hidrata.

Autori Taylor i Quesenberry (1996) navode da su dva najmerodavnija parametra kvaliteta sadržaj sirovih proteina i *in vitro* svarljivost suve materije. Vrednost oba ova parametra opada sa starenjem, kod svih višegodišnjih leguminoza kao rezultat smanjenja udela lista u odnosu na stabljiku i procesa lignifikacije. U rano proleće mlade biljke crvene deteline imaju veliki udeo lista, visok sadržaj vlage, proteina i minerala, a malo celuloze. Tokom perioda vegetacije pod uticajem dužih dana i viših temperatura sa starenjem biljaka dolazi do morfoloških promena, a kvalitet drastično opada, naročito svarljivost, sadržaj proteina i mineralnih materija. Ispitivanjem najvažnijih parametara kvaliteta crvene deteline između divergentnih genotipova po fenološkim fazama, druge godine života crvene deteline nisu utvrđene značajnije razlike (Vasiljevic i sar., 2009). Značajne i očekivane razlike su utvrđene između pojedinih fenoloških faza. Ispitujući relativnu hranljivu vrednost crvene deteline (*Trifolium pratense* L.) u različitim fazama

razvića, autori Markovic i saradnici (2010) utvrdili su da se kod crvene deteline ova vrednost mnogo brže smanjuje sa rastom i razvićem.

b) Najzastupljenije fenolne komponente

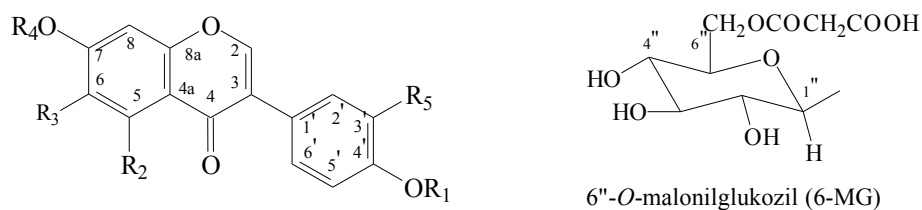
U *Tabeli 3* navedena su fenolna jedinjenja prisutna u *T.pratense* koja se mogu naći u dosadašnjim navodima.

Tabela 3. Literaturni podaci o fenolnom profilu *T. pratense*

Grupa fenolnih jedinjenja	Fenolno jedinjenje	Referenca
Izoflavonoidi i njihovi derivati	daidzein, genistein, formononetin, biokanin A, genistin (genistein 7-O- β -D-glukozid), daidzin (daidzein-7-O- β -D-glukozid), ononin (formononetin A-7-O- β -D-glukozid), sisotrin (biokanin A-7-O- β -D-glukozid) glicitein, glicitin (glicitein-7-O- β -D-glukozid), pratenzein, pratenzein 7-O- β -D-glukozid, irilon, irilon 4-O- β -D-glukozid, pseudobaptigenin, rotindin (pseudobaptigenin 7-O- β -D-glukozid), prunetin, trifosid (prunetin-4-O- β -glukozid), kalikozin, makianin, teksazin, orobol, 7-O- β -D-glukozid 6-O-malonat, glicitein-7-O- β -D-glukozid 6-O-malonat, formononetin 7-O- β -D-glukozid 6-O-malonat, biohanin 7-O- β -D-glukozid 6-O-malonat, prunetin 4-O- β -D-glukozid 6-O-malonat, formononetin-7-O- β -D-galaktopiranozid, inermine-3-O- β -D-galaktopiranozid, genistein-7-O- β -D-galaktopiranozid, formononetin acetyl glikozid, biokanin-A-acetyl glikozid	Drenin i sar., 2011; Saviranta i sar., 2010; Janda i sar., 2009; Saleem i sar., 2005; Polasek i sar., 2007; Oleszek i sar., 2007; Kicel i sar., 2006; Booth i sar., 2006; Tsao i sar., 2006; Ewald i sar., 2005; Toebe i sar., 2005; Wu i sar., 2003; Krenn i sar., 2002; de Rijke i sar., 2001;
Fenolne kiseline i njihovi derivati	fazelična kiselina, protokatehinska, p-hidroksibenzojeva, genistinska, kafena, klovamid, p-kumarinska, ferulna, salicilna,	Klejdus i sar., 2001; He i sar., 2000; Lin i sar., 2000
Flavonoidi i njihovi derivati	kvercetin, izokvercetin (kvercetin-3-O- β -D-galaktozid), hiperozid (kvercetin-3-O- β -D-glukozid), kvercetin-3-O- β -D-glukozid -6-O-malonat, kamferol, kamferol-3-O- β -D-glikozid, naringenin, luteolin, fisetil	
Kumarini	ksantotoksol, kumestrol, dafnoretin, skopoletin	

Biljke roda *Trifolium* mogu da sintetišu različite fenolne i polifenolne komponente kao što su flavonoidi, fenolne kiseline, klovamidini (estri kafene kiseline) i druge. Među najzastupljenijim jedinjenjima su izoflavoni čija se koncentracija u nadzemnim delovima biljke, kreće oko 51-97 mg/g suve materije (Kolodziejczyk-Czepas, 2012).

Najzastupljeniji izoflavonoidi u listovima crvene deteline su daidzein, genistein, formononetin i biohanin A, koji se pojavljuju uglavnom kao glukozidi, glukozid-malonat estri ili kao slobodni aglikoni (u vakuolama), dok su pratenzin, prunetin, irilon i drugi prisutni u nešto manjoj meri u obliku aglikona i glikozida (Tabela 4) (Dixon, 2004; Drenin i sar., 2010; Kicel i sar., 2011).



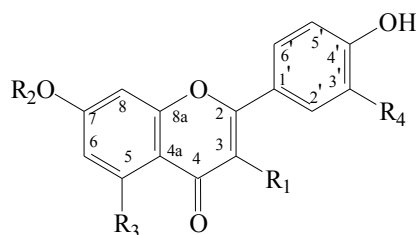
Slika 13. Osnovni skelet dominantnih izoflavona i njihovih glikozida u *T.pratense*

Tabela 4. Izoflavoni prisutni u *Trifolium pratense* L.

Ime izoflavona	R1	R2	R3	R4	R5
Daidzein	H	H	H	H	H
Daidzin (Daidzein-7-O-β-D-glukozid)	H	H	H	glk	H
Genistein	H	OH	H	H	H
Genistin (Genistein-7-O-β-D-glukozid)	H	OH	H	glk	H
Genistein-6''-O-malonat	H	OH	H	6-MG	H
Formononetin	Me	H	H	H	H
Ononin (Formononetin-7- kalikozin-7-O-β-D-galaktozid)	Me	H	H	glk	H
Formononetin-7-O- β-D-glukozid-6''-O-malonat	Me	H	H	6-MG	H
Biohanin A	Me	OH	H	H	H
Sistorin (Biohanin A-7- O- β-D-glukozid)	Me	OH	H	glk	H
Ime izoflavona	R1	R2	R3	R4	R5
Biokanin A-7- O- β-D-glukozid-6''-malonat	Me	OH	H	6-MG	H
Kalikozin	Me	H	H	H	OH
Kalikozin-7-O-β-D-galaktozid	Me	H	H	gal	OH
Kalikozin-7-O-β-D-glukozid	Me	H	H	glk	OH
Kalikozin-7-O-β-D-glukozid-6''-malonat	Me	H	H	6-MG	OH
Prunetin	H	OH	H	Me	H
Trifosid (Prunetin-4'- O-β-D-glukozid)	glk	OH	H	Me	H
Trifosid-6''-O-malonat	6-MG	OH	H	Me	H
Glicitein	H	H	OMe	H	H
Glicitein (glicitein-7- O-β-D-glukozid)	H	H	OMe	glk	H

Irilon	H	OH	OCH ₂ -	OCH ₂ -	H
Irilon-4'- O-β-D-glukozid	glk	OH	OCH ₂ -	OCH ₂ -	H
Irilon-4'- O-β-D-glukozid'-6'' -O-malonat	6-MG	OH	OCH ₂ -	OCH ₂ -	H
Afromozin	Me	H	OMe	H	H
Afromozin-7-O-β-D-glukozid	Me	H	OMe	Glc	H
Pratzenzein	Me	OH	H	H	OH
Pratzenzein-7-O-β-D-glukozid	Me	OH	H	Glc	OH
Pratzenzein-7-O-β-D-glukozid-6'' -O-malonat	Me	OH	H	6-MG	OH
Pseudobaptigenin	CH ₂ -	H	H	H	O-
Rotindin (Pseudobaptigenin-7-O-β-D-glukozid)	CH ₂ -	H	H	glk	O-
Pektolinarigenin	Me	OH	OMe	H	H

Pored izoflavonoida, u većem sadržaju su prisutni i ostali flavonoidi (*Tabela 5*) kao što su kvercetin, kamferol, apigenin, luteolin i njihovi derivati (Lin i sar., 2000; Swinny i Ryan, 2005).

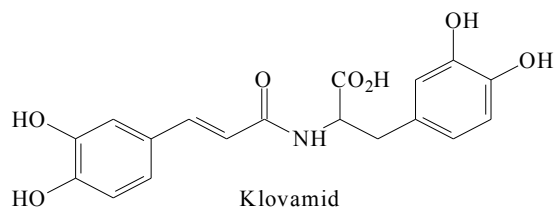


Slika 14. Osnovni skelet građe dominantnih flavonoida prisutnih u *Trifolium pratense* L.

Tabela 5. Flavonoidi prisutni u *Trifolium pratense* L.

Ime flavona	R1	R2	R3	R4
Kvercetin	OH	H	OH	OH
Izokvercetin	O-glc	H	OH	OH
Izokvercetin-6''-O-malonat	6-MG	H	OH	OH
Hiperozid	O-gal	H	OH	OH
3-Metilkcvercetin	OMe	H	OH	OH
3-Metilkcvercetin-7-O-β-D-glukozid	OMe	glc	OH	OH
3-Metilkcvercetin-7-O-β-D-glukozid-6''-O-malonat	OMe	6-MG	OH	OMe
Izoramnnetin	OH	H	OH	OH
Luteolin	H	H	OH	OH
Luteolin-7-O- β-D-glukozid	H	glc	OH	H
Kamferol	OH	H	OH	
Apigenin	H	H	OH	H
Apigenin-7-O- β-D-glukozid	H	glc	OH	H

Kvalitativna analiza fenolnih kiselina prisutnih u listovima crvene deteline, ukazuje na prisustvo p-hidrobenzojeve, salicilne, protokatehinske, genistinske, p-kumarinske, kafene i ferulne kiseline (Kicel i Wolbis, 2006).



Slika 15. Struktura klovamida, derivata fenilpropanoida prisutnog u *Trifolium pratense* L.

2.6.4. Farmakološka aktivnost najzastupljenijih flavonoida

Genistein poseduje najveću farmakološku aktivnost od svih gore navedenih fitoestrogena. U prirodi se uglavnom nalazi u obliku glikozida, genistina, koji se ingestijom prevodi u aglikonski oblik i kao takav ispoljava svoje biloške efekte (Setchell, 2001).

Poznato je da inhibira protein-tirozin kinazu (PTK) i na taj način doprinosi antikancerogenoj aktivnosti. *Genistein* takođe inhibira topoizomerazu I i II i protein histidin kinazu koje i time pokazuje svoj antiproliferativni ili pro-apoptotički efekat. Dokazano je da *genistein* poseduje i snažan antioksidativni efekat, tj. da štiti ćelije od oksidativnog oštećenja, inhibirajući ekspresiju gena odgovornih za stres (eng. stress response) (Lamartiniere, 2000). *Genistein* utiče na lipide plazme tako što smanjuje LDL holesterol, ukupni holesterol kod žena u predmenopauzi (Merz i sar., 2000).

Zbog strukturne sličnosti sa estrogenom, 17 β -estradiol se može vezati za estrogen receptore i hormone vezujući protein (*sex hormone binding globulin-SHBG*) i zbog toga pokazuje estrogenu i antiestrogenu aktivnost i ulazi u kompeticiju sa estradiolom. Strukturnu sličnost pokazuje i sa tamoksifenom, sintetskim antiestrogenom koji je klinički testiran kao hemoprotektivni agens i koji se koristi u tretmanima lečenja kancera dojke. Uspešno se primenjuje u terapiji lečenja mnogih tegoba koje se javljaju kod žena u menopauzi (Barnes i sar., 2000).

Genistein poseduje hidroksilnu grupu na C-5 ugljenikovom atomu i u poređenju sa daidzeinom pokazuje veću antioksidantnu aktivnost, dok je hidroksilna grupa na položaju C-4' odgovorna za neutralizaciju peroksil radikala, superoksid anjon radikala i sprečava formiranje vodonik-peroksida. Ovo ukazuje na to da hidroksil supstituent na poziciji C-5 povećava antioksidativnu aktivnost. Sa druge strane, 7-O- β -glikozidi *genisteina* i

daidzeina poseduju istu antioksidantnu aktivnost kao i njihovi aglikoni, što ukazuje na to da hidroksilna grupa na C-7 položaju nema efekta na antioksidantnu aktivnost izoflavonoida (Zhang i sar., 2003).

Daidzein se u hrani biljnog porekla, kao i genistein, nalazi u obliku 7-O-glikozida, daidzina. Digestijom i dejstvom crevnih mikroorganizama glukozidni oblici daidzeina, prelaze u aglikonske oblike. U ovom obliku daidzein se može absorbovati u krv ili dalje transformisati uz aktivnost intestinalnih bakterija u metabolite kao što su ekvol (4',7'-isoflavandiol) i O-desmetilangolensin (O-DMA). Daidzein inhibira humanu alkohol dehidrogenazu (ADH) i mitohondrijalnu aldehyd dehidrogenazu (ALDH-2) (Keung i sar., 1993). Pokazuje antioksidantni efekat, ali nešto slabiji od genisteina (Atkinson i sar., 2005). Dokazano je da daidzein ima snažanu i estrogenu i antiestrogenu aktivnost. U *in vivo* testovima je dokazano da je njegova estrogena aktivnost $\frac{1}{4}$ estrogene aktivnosti genisteina, dok njegovi metaboliti ekvol i O-DMA pokazuju veći afinitet vezivanja za estrogenske receptore (Messina, 2003). Slično genisteinu, daidzein takođe poseduje antikancerogenu, antiaterogeničnu aktivnost i pozitivan efekat kod smanjenja simptoma postmenopauze.

Formononetin je najdominantniji izoflavon u *Trifolium pretense* L. koji se metaboliše do metabolički aktivnog daidzeina. Ekstrakti ove biljne vrste sadrže formononetin koji pokazuje snažnu antioksidantnu aktivnost u *in vitro* testovima. U *in vivo* testovima se oko 81% formononetina metaboliše u ekvol koji inhibira LDL oksidaciju i neutrališe superoksida anjon radikal. Formononetin inhibira lipidnu peroksidaciju (Corinna i Sabine, 2006). Sadržaj formononetina varira u različitim delovima biljke, pri čemu ga u listovima ima najviše. Ovaj fitoestrogen aktivira ekspresiju estrogen-odgovornog gena u humanim MCF-11 kancer ćelijama dojke, osteosarkoma ćelijama i povećava aktivnost alkalne fosfataze u MG-63 ćelijama (Chen i sar., 2011). Takođe inhibira lecitin peroksidaciju indukovanu hidroksil radikalom što doprinosi njegovoj antioksidantnoj aktivnosti. Predpostavlja se da je formononetin uključen u izazivanje vazorelaksacije, otvarajući K^+ jonske kanale vaskularne glatke muskulature (Hu i sar., 2003).

Biohanin A je metilovani derivat genisteina. Kao i ostali fitoestrogeni pokazuje antikancerogeni efekat na testiranim tumor ćelijama, kao što su MCF-7 kancer ćelije dojke. Poseduje antioksidantnu aktivnost i može zaštititi ćelije od oksidativnog oštećenja izazvanog uticajem raznih ksenobiotika, redukujući aktivnost CYP1A1 i CYP1B1 enzima (Han i sar., 2006). Ovaj fitoestrogeni molekul poseduje i snažnu antimikrobnu aktivnost,

posebno na sojeve bakterija roda *Clostridium*. Metoksil grupa čini biohanin A aktivnijim u pogledu antimikrobnog delovanja, u odnosu na njegov metabolit genistein.

Kvercetin je jedan od najrasprostranjenijih flavonoida. Zbog njegovog poznatog antioksidantnog efekta i sposobnosti vezivanja metalnih jona, kvercetinu se pripisuje važna uloga u lečenju inflamatornih bolesti, arteroskleroze, krvarenja, alergija i otoka. Mnoga epidemiološka istraživanja ukazuju i na njegov pozitivan efekat u lečenju mnogih kancerogenih oboljenja. Smatra se da je on jedan od najaktivnijih flavonoida koji je sposoban da intereaguje sa enzimima (ciklooksigenaze, lipooksigenaze, fosfodiesteraze i tirozin kinaze) modulira njihovu aktivnost. Prisutan je uglavnom u vidu glikozida, ili vezan za neku fenolnu kiselinu ili alkohol. Glikozidi kvercetina pokazuju snažnu antioksidantnu aktivnost i potrebni su organizmu kako bi lakše absorbovao vitamin C. Doprinosu relaksaciji glatkih mišića kod sisara, pokazuju antiinflamatornu i hemoprotektivnu aktivnost (Materska, 2008). Broj hidroksilnih i metoksi grupa u B prstenu, kao i lipofilnost, utiču na bioraspoloživost ovog flavonoida (Lin i sar., 2003). Posle ingestije, derivati bivaju hidrolizovani u gastrointestinalnom traktu, a potom absorbovani ili dalje metabolisani. Najrasprostranjeniji derivati kvercetina su njegovi O-glikozidi. Kvercetin-3-O-glikozid i kvercetin-3-O-diglikozid se pojavljuju u mnogim leguminozama, pa tako i *T. pratense*, kao i kvercetin-7-O-glikozid (Chang i sar., 2004, Lin i sar., 2000).

Kamferol sprečava natanak kancera, ateroskleroze, kardiovaskularnih oboljenja, snažana je antioksidanti i antiinflamatorni agens. U prirodi se kamferol pojavljuje u obliku glikozida, čime se povećava njegova biološka aktivnost. Sposobnost da smanjuje nivo superoksid anjon radikala u ćeliji, doprinosi njegovoj antioksidantnoj aktivnosti (Klaunig i Kamendulis, 2004). Zatim, kamferol inhibira aktivnost enzima koji generišu reaktivne kiseonične vrste (ksantin-oksidadu) i redukuje hidroksi radikal nastao u Fentonovoj reakciji. Takođe povećava ekspresiju ili aktivnost superoksid dismutase, katalaze i hem-oksigenaze. Druge studije pokazuju da kamferol i njegovi glikozidi učestvuju u inhibiciji lipidne peroksidacije (Ozgova i sar., 2003; Hou i sar., 2004). Antiinflamatornu aktivnost pokazuje preko nekoliko mehanizama, a jedan od njih je i aktivacija nuklearnog kappa B (κ B) faktora, povećavajući ekspresiju pro-inflamatornih citokinina, hemokinina i enzima (npr. TNF- κ IL-1, IL-6, IL8, COX-2, iNOS). Kamferol inhibira angiogenezu *in vitro* i pri tom sprečava nastanak malignih tumora (Ahn i sar., 2009). Ovaj flavonoid pokazuje i snažnu estrogenu ili antiestrogenu aktivnost u zavisnosti

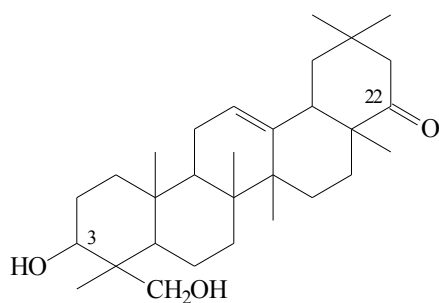
od koncentracije endogenih estrogena. Antiestrogena aktivnost kamferola je može inhibirati rast hormone-zavisnih kancera (kancer dojke i prostate) (Oh i sar., 2009).

Brojni naučni radovi ukazuju na antibakterijsku, antiviralnu, antifungalnu i antiprotozoalnu aktivnost kamferola i biljaka u kojima je prisutan. Sinergistički može reagovati sa mnogim antibioticima (rifampicinom, vankomicinom, meticilinom, eritromicinom i klindamicinom), protiv bakterija rezistentnih na antibiotike (Lim i sar., 2007). Konzumiranje hrane bogate kamferolom je povezano sa smanjenjem smrtnosti od kardiovaskularnih oboljenja, incidencije infarkta miokarda i cerebrovaskularnih poremećaja (Lin i sar., 2007).

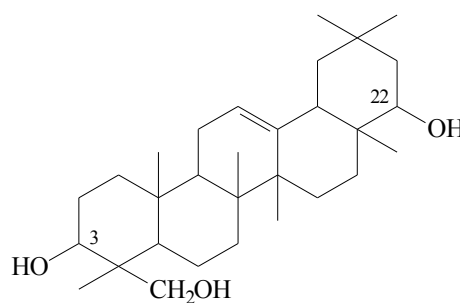
c) Triterpenski saponini i njihovi derivati

Trifolium pratense L. sadrži i triterpenske saponine koji se nalaze u manjim koncentracijama (Sabudak i Guler, 2009).

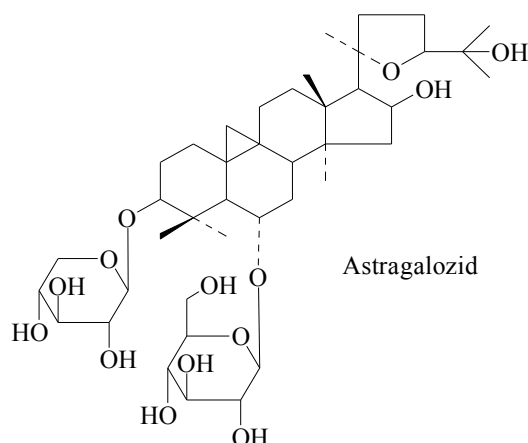
Sojasaponini su bioaktivne komponente nađene u mnogim leguminozama. Triterpenski saponini imaju hemotaksonomski značaj u determinaciji rodova i vrsta familije Fabaceae. U *Trifolium pratense* su identifikovana (u manjim količinama) četiri strukturno različita glikozida saponina: sojasaponin I, astragalozid, 22-O-glikozid i 22-O-diglukozid. Sojasapogenol I, odnosno njegov aglikon sojasapogenol B, predstavlja taksonomski marker za rod *Trifolium* (Slika 16). Najveća koncentracija sojasapogenola B nađena je u semenu ove biljke (Oleszek i Stochmal, 2002).



Sojasapogenol A (SA)



Sojasapogenol B (SB)



Slika 16. Hemijske strukture triterpenskih saponina prisutnih u *T.pratense*

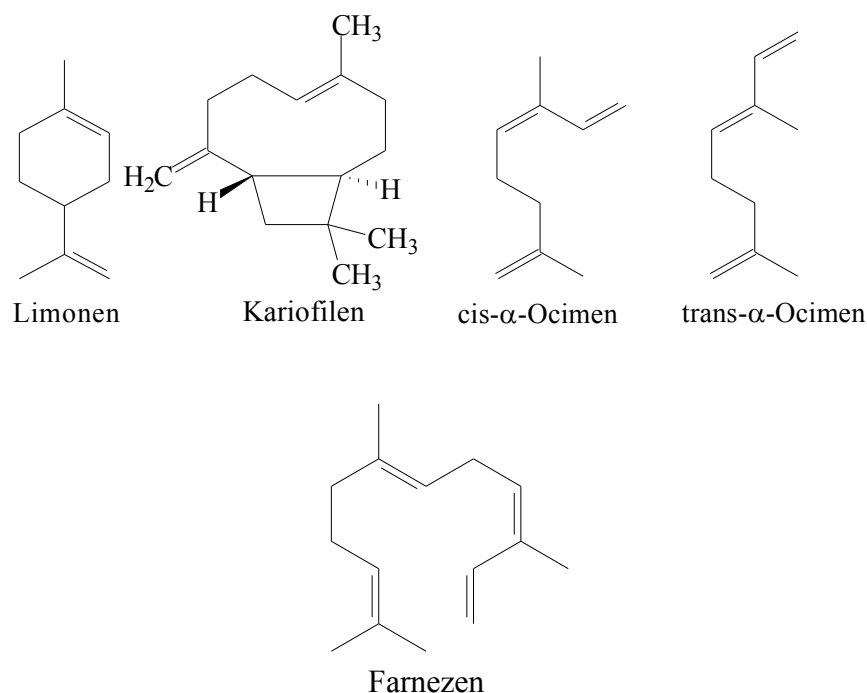
Triterpenski saponini poseduju značajnu farmakološku aktivnost. Predstavljaju snažne imunostimulatore, imaju antitumornu, antialergijsku i hepatoprotektivnu aktivnost i posebno su značajni u regulaciji lipidnog statusa i nivoa glukoze u krvi. Ishrana bogata ovim jedinjenjima pomaže u očuvanju dentalnog zdravlja, sprečavajući nastanak karijesa. Koriste se i kao antidoti u slučaju trovanja (Shi i sar., 2004). Prema nekim istraživanjima mnoga jedinjenja iz ove grupe pokazuju inhibitorski efekat na ćelije kancera debelog creva (HT-29), međutim mehanizam ovog delovanja još nije istražen. U ovakvim *in vitro* testovima, sojasaponin B iz *T. pratense*, pokazao je najznačajniju biološku, odnosno farmakološku aktivnost (Gurfinkek i Rao, 2003). Sojasapogenol B zbog svoje estrogene aktivnosti i strukturne sličnosti sa endogenim 17- β -estradiolom, sprečava proliferaciju humanih kancer ćelija dojke (Rowlands i sar., 2002).

d) Isparljiva jedinjenja

Tabela 6. Literaturni podaci o volatilnim komponentama prisutnim u *T. pratense* L.

Referenca	Identifikovana jedinjenja	Uzorak
Figueiredo, 2007	3-oktanol, 6,10,14-trimetil-2-pentadekanon, benzaldehid, kariofilen, farnezen, 3-metil-1-butanol, i dr.	Suva i sveža biljka
Buchbauer, 1996	Preko 50 jedinjenja od kojih se izdvajaju: maltol, 1-feniletil alkohol, acetofenon, 3-heksenil acetat, limonene, ocimen, geraniol, β -kariofilen, i dr.	Ekstrakt cveta biljke
Srinivas, 1988	210 jedinjenja	CH ₂ Cl ₂ ekstrakt
Buttery, 1984	25 komponenti od kojih se izdvajaju 3-heksenil acetat, 3-heksenol i ocimen	Listovi biljke
Kami, 1974	80 komponenti iz grupe kiselina, fenola, aldehida, ketona, alkohola, estara	Etarsko ulje nadzemnog dela biljke dobijeno destilacijom vodenom parom

Kao što se može videti iz *Tabele 6*, literatura raspolaže oskudnim podacima o hemijskom sastavu etarskih ulja i isparljivih komponenti prisutnih u crvenoj detelini. Uglavnom su zastupljeni aldehidi, ketoni, alkoholi i kiseline, koji imaju ekoloških značaj za samu biljku, a vrlo malo podataka postoji o prisutnim terpenoidima, koji su odgovorni za njenu farmakološku aktivnost. Na *Slici 17* date su strukture nekih mono- i seskviterpena nađenih u crvenoj detelini.



Slika 17. Terpeni prisutni u *T.pratense*

2.6.5. Farmakološko dejstvo

Biljka se tradicionalno koristila u alternativnoj medicini kao diuretik, ekspektorans, relaksant. Travari su je dugo koristili za prečišćavanje krvi i izbacivanje toksina, zatim kod lečenja bronhitisa, lepre i sifilisa. Interno se koristila kod kožnih oboljenja, kancera dojke, grla, jajnika i limfnog sistema, zatim degerativnih hroničnih oboljenja i raznih vrsta kašlja. Čaj napravljen od vrhova cvetova crvene deteline se koristi da stimuliše jetrene i žučne enzime, kao i kod opstipacije i slabog apetita. U tradicionalnoj kineskoj i zapadnoj narodnoj medicini ova biljka je korišćena za slične namene i to uglavnom kao diuretik i supresant kašlja. Sveži i usitnjeni cvetovi su se koristili protiv uboda insekata, a tinkture protiv konjuktivitisa. Danas se crvena detelina koristi kao droga (osušena biljka) ili u obliku suplemenata (farmaceutski pripravci). U komercijalnoj upotrebi najpopularniji

preparat na bazi crvene deteline je Promensil® (Novogen) koji sadrži izoflavone ekstrahovane u etanolu. Svaka tableta je standardizovana i sadrži 40 mg ukupnih izoflavona: 4 mg genisteina, 3.5 mg daidzeina, 24.5 mg biohanina A i 8 mg formononetina (prisutnih u aglikonskom obliku).

Iako je u crvenoj detelini identifikovano oko 125 hemijskih jedinjenja, smatra se da su izoflavonoidi najviše odgovorni za njenu terapeutsku primenu. Oni predstavljaju fitoestrogene, mimike endogenih hormona, i kao takvi vezuju se za estrogene receptore ispoljavajući svoje efekte kao antagonisti ili agonisti. Stoga se na crvenu detelinu gleda uglavnom kao na potencijalni alternativni lek za ublažavanje simptoma menopauze (<http://www.pigncispi.com/forums/others/messages/364.html>).

Međutim, molekularni mehanizam fiziološkog i terapeuskog efekta izoflavona koji se nalaze u ekstraktima i suplementima crvene deteline, još uvek nije u potpunosti razjašnjen. *In vitro* studije Booth i saradnika (2006) na ekstraktima crvene deteline koji su sadržali 35.54% izoflavona, 1.11% flavonoida, 0.06% pterokarpana i oko 0.03% tiramina, su potvrdila njenu estrogenu aktivnost. Ovi naučnici su takođe dokazali da se svi izoflavoni (sem formononetina) vezuju za jedan ili oba estrogena receptora (α i β). Pošto izoflavoni, posle unošenja putem hrane, prolaze kroz razne metaboličke transformacije, važno je proučiti fitoestrogenu aktivnost njihovih metabolita. Aktivnost izoflavona iz crvene deteline, kao i njihovih metabolita, može se odrediti praćenjem sposobnosti njihovog vezivanja za estrogene, ali i androgene i progesteron receptore. Istraživanja Pfitscher i saradnika (2008), koji su koristili ćelije kvasca kao model sistem, su pokazala da metaboličke transformacije izoflavona dovode do promena, kako u njihovom vezivanju za estrogen receptore, tako i u transaktivacionom potencijalu. Tako na primer, demetilacija formononetina i biohanina A u daidzein i genistein, rezultuju povećanje sposobnosti vezivanja za pomenute receptore. Posebno značajan i pozitivan efekat na ljudsko zdravlje ima ekvol, metabolit daidzeina, koji poseduje trideset puta jaču fitoestrogenu aktivnost od svog prekursora, daidzeina, ali zato sto puta slabiju aktivnost od redukovanog metabolita dihidrodaidzeina. Za razliku od formononetina i biohanina A, irilon, prunetin i pseudobaptigenin se ne metabolišu u gastrointestinalnom traktu, odnosno oni su detektovani u krvnoj plazmi u onom obliku u kojem su i uneti u organizam. Metilendioksi most zakačen za A prsten kod irilona, štiti ovaj fitoestrogen od moguće degradacije od strane mikroorganizama humane crevne flore (Maull i Kuling, 2010).

Nissan i saradnici (2007) su u eksperimentima na humanim ćelijskim linijama dokazali da se neke komponente iz ekstrakata crvene deteline mogu vezati za μ - i β -opioidne receptore. Ovi receptori igraju važnu ulogu u regulaciji telesne temperature, raspoloženja i hormona, pa se zbog toga ekstrakti ove biljne vrste koriste u terapiji ublažavanja ili otklanjanju simptoma koji se javljaju kod žena u menopauzi.

Ekstrakti crvene deteline su danas sve više u komercijalnoj upotrebi kao dodaci ishrani. Iako je poznato da izoflavonoidi iz ove biljke poseduju mnoga terapeutska dejstva, posebno se koriste u lečenju hormon-zavisnih bolesti. Reiter i saradnici (2011) su *in vitro* uslovima ispitali antiproliferativnu aktivnost izoflavona iz *T.pratense* na 11 humanih kancer ćelija, a na linijama fibroblasta i citotoksičnu aktivnost. Ova jedinjenja su smanjila ćelijsku proliferaciju i povećali njihovu apoptozu. Međutim, pored svih istraživanja, mnogi autori nemaju dokaze o neželjenim efektima kod kratkoročnog korišćenja crvene deteline, ali ni dokaze o bezbednosti njenog dugoročnog korišćenja. Zbog toga su potrebna dalja istraživanja na ovom polju.

In vivo ispitivanja Mu i saradnika (2009) pokazala su da unošenje izoflavona crvene deteline (posebno formononetina) značajno utiče na antioksidantni status kod laboratorijskih miševa povećavajući superoksid dismutazu, glutation peroksidazu, katalazu i redukujući lipidnu peroksidaciju. Antioksidantna aktivnost crvene deteline je uglavnom rezultat visokog sadržaja izoflavonoida i drugih fenolnih jedinjenja, kao što su katehini, saponini, klovamidi i fenolne kiseline (Kroyer, 2004; Mu i sar., 2009).

Neka istraživanja ukazuju na izuzetnu antioksidativnu aktivnost klovamida u prevenciji lipidne peroksidacije i zaštite lipida od oksidativnog oštećenja. Smatra se da ovaj derivat kafene kiseline poseduje snažniju antioksidativnu aktivnost od kvercetina i epikatehina. Klovamidi (*Slika 15*) predstavljaju interesantnu i nedovoljno istraženu grupu fenola i zbog toga predstavljaju izazov za dalja ispitivanje njihove biološke i fiziološke aktivnosti (Ley i Bertram, 2003).

Lam i saradnici (2004) su dokazali da izoflavoni koji potiču iz crvene deteline mogu sprečiti inflamaciju. Tretirajući humane endotelijalne ćelije ovim izoflavonima povećava se ekspresija i aktivnost endotelijalne azot-oksid sintaze (Simonicini i sar., 2005). Dokazano je da pojedini izoflavoni iz *T.pratense* (daidzein i genistein) poseduju snažnu inhibitornu aktivnost na angiogenezu, tako što regulišu gene i mRNK nivo proteina koji su uključeni u ovaj process kao što su IL-8, metaloproteinaza 13 i fibronektin (Krenn i Paper, 2009). Postoji mnogi navodi o antikancerogenoj aktivnosti ekstrakata crvene

deteline kod lečenja kancera prostate. *In vitro* istraživanja pokazuju da izoflavoni *T.pratense* supresuju proinflamatorni efekat rastućeg $\beta 1$ faktora u humanim primarnim kancer ćelijama prostate (Liu i sar., 2011). Utvrđeno je i da ova jedinjenja imaju pozitivan uticaj na lečenje metaboličkog sindroma. Nađeno je da ekstrakti crvene deteline utiču na funkciju peroksizom proliferator-aktivirajućeg receptora (PPAR γ), važnog regulatora diferencijacije adipocita i osetljivosti insulina. Ekstrakti crvene deteline i izoflavoni kao što su biohanin A i genistein deluju kao ligandi i aktivatori PPAR γ (Mueller i sar., 2003). Takođe, ovi izoflavoni utiču na smanjenje krvnog pritiska kod žena u menopauzi koje pate od diabetesa tipa II (Howes i sar., 2003).

Asgary i saradnici (2007) su utvrdili eksperimentima na aterosklerotičnim laboratorijskim miševima, da formononetin izolovan iz *T. pratense* značajno smanjuje C-reaktivan protein, trigliceride, ukupni holesterol i LDL holesterol, dok povećava HDL holesterol. Ekstrakti crvene deteline sprečavaju nastanak aterosklerotičnih lezija, što ima značajnu ulogu u prevenciji kardiovaskularnih oboljenja. Crvena detelina je i jedan od najkorisnijih lekova u lečenju dečijih kožnih bolesti. U dermatologiji se preporučuje *per os* korišćenje ove biljke u obliku tinkture u lečenju alergija, vaskulitisa i vitiliga (Drenim, 2011).

O farmakološkom dejstvu etarskog ulja crvene detelina, ima veoma malo podataka, a naučnih istraživanja vezanih za ispitivanje biološke aktivnosti etarskih ulja, gotovo da nema. Raniji podaci govore o korišćenju i blagotvornom dejstvu etarskog ulja ove biljne vrste u lečenju psorijaze, ekcema i raznih drugih eritrodermija (Severe, 1986).

3. EKSPERIMENTALNI DEO

3.1. PRIPREMA BILJNOG MATERIJALA I EKSTRAKATA

Listovi gajene biljne vrste *Trifolium pratense* L. sakupljeni su u toku proleća 2011. godine sa teritorije Bačkog Gradišta (Rimski Šančevi). Biljna vrsta je sakupljena po fazama rasta i to u fazi rasta od 30 cm, 50 cm i pre početka butonizacije (faza pupljenja) (Tabela 7). Determinacija je odrađena na Departmanu za biologiju i ekologiju (BUNS Herbarium), Prirodno-matematičkog fakulteta, Univerziteta u Novom Sadu (*Trifolium pratense* L. 1753 var. *sativa* Schreb. 1804, No 2-1751, No 2-1752, No 2-1753; različite faze rasta), Novi Sad, Rimski Šančevi, UTM 34T DR 2 01. Pripremljen biljni material je sušen na promajnom mestu, u hladu, a nakon sušenja je pakovan u papirne vreće u kojima je čuvan na suvom mestu do početka izvođenja eksperimenata (Holmgrenm, 2003).

Tabela 7. Biljni materijal korišćen u eksperimentima

<i>Uzorak</i>	<i>Sorta</i>	<i>Faza rasta</i>	<i>Datum kosidbe</i>	<i>Vaučer 1753 var. Sativa schreb</i>
* TP1	Una	30 cm	19.04.2011.	No 2-1751
** TP2	Una	50 cm	29.04.2011.	No 2-1752
*** TP3	Una	početak butonizacije	10.05.2011.	No 2-1753

*etarsko ulje *Trifolium pratense* L. u fazi rasta od 30 cm

** etarsko ulje *Trifolium pratense* L. u fazi rasta od 50 cm

*** etarsko ulje *Trifolium pratense* L. u fazi rasta od početak butonizacije (pupljenja)

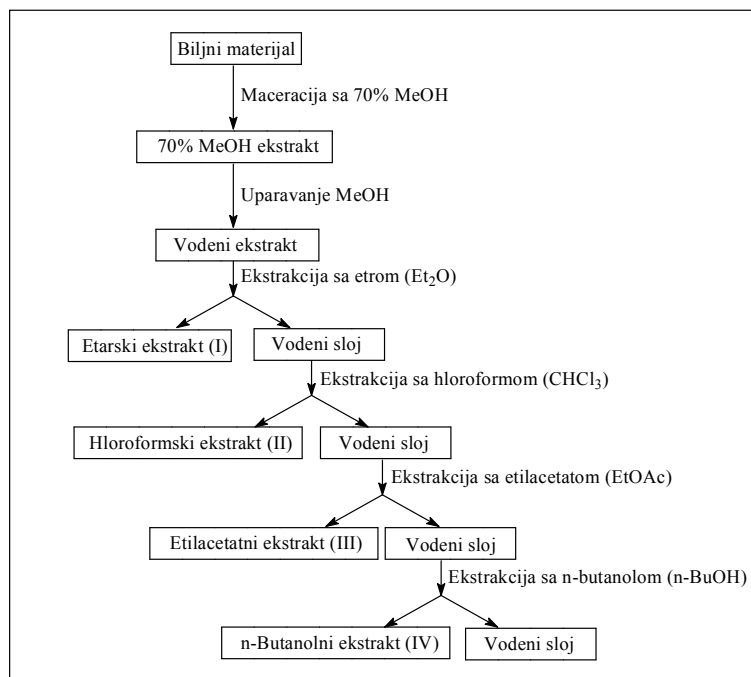
Biljni materijal uglavnom sadrži jedinjenja različite polarnosti i ni sa jednim rastvaračem (ekstragensom) se ne mogu ekstrahovati sva jedinjenja, zato je potrebno ekstrakciju vršiti sa više rastvarača kako bi izolovanje sekundarnih biomolekula bilo efikasnije.

a) Priprema ekstrakata *Trifolium pratense* L. maceracijom i sukcesivnom tečno-tečno ekstrakcijom

Na ovaj način su pripremljeni ekstrakti koji su korišćeni u antioksidantnim testovima, kao i za LC-MS/MS analizu ekstrakata *Trifolium pratense* L.

Dobijanje ekstrakata je vršeno tako što je odmereno 200 g suve herbe, koja je prethodno fino usitnjena, a potom je izvršena maceracija, odnosno ekstrakcija na hladno, 70% metanolom. Posle 24h macerat je proceden kroz Büchner-ov levak da bi se uklonio zaostali biljni material i postupak je ponovljen još dva puta. Metanolni ekstrakt je uparen na vakuum uparivaču, pri čemu je ostao vodeni ekstrakt. Preostali vodeni ekstrakt je sukcesivno ekstrahovan sa ekstragensima različite polarnosti: etrom, hloroformom, etilacetatom i n-butanolom (Slika 18). Svi dobijeni ekstrakti su upareni do suva. Nakon

što su izmereni prinosi suvih ekstrakata, oni su rastvoreni u 50% (w/v) etanolu, pri čemu su pripremljeni osnovni rastvori koncentracije 100 mg/ml (10%) od kojih je kasnije napravljena serija razblaženja korišćena u eksperimentima. Za LC-MS/MS analizu hemijskog sastava korišćeni su metanolni (ukupni) ekstrakti sva tri uzorka, zbog najvećeg sadržaja fenolnih jedinjenja. Osnovni rastvori čuvani su u frižideru u staklenim bočicama sa teflonskim čepovima na temperature od 4°C.



Slika 18. Dobijanje ekstrakata sukcesivnom tečno-tečnom ekstrakcijom

Tabela 8. Ekstrakti uzoraka TP1, TP2 i TP3 dobijeni sukcesivnom tečno-tečnom ekstrakcijom

Ekstrakti	Metanolni	Etarski	Hloroformski	Etilacetatni	Butanolni	Vodeni
Uzorci	TP1 _{MeOH}	TP1 _{Et2O}	TP1 _{CHCl3}	TP1 _{EtOAc}	TP1 _{n-BuOH}	TP1 _{H2O}
	TP2 _{MeOH}	TP2 _{Et2O}	TP2 _{CHCl3}	TP2 _{EtOAc}	TP2 _{n-BuOH}	TP2 _{H2O}
	TP3 _{MeOH}	TP3 _{Et2O}	TP3 _{CHCl3}	TP3 _{EtOAc}	TP3 _{n-BuOH}	TP3 _{H2O}

b) Priprema ekstrakata *Trifolium pratense* L. asistiranom mikrotalasnom ekstrakcijom

Ekstrakti dobijeni metodom mikrotalasne asistirane ekstrakcije korišćeni su za ispitivanje estrogene, antiestrogene aktivnosti, citotoksičnosti i antimikrobne aktivnosti. Konvencionalne tehnike ekstrakcije bioaktivnih komponenata iz biljnog materijala su često nepovoljne, jer se koriste velike količine organskih rastvarača, visoke temperature koje dovode do degradacije termolabilnih jedinjenja, a i manje su efikasne. Zbog toga

mnogi naučnici u poslednje vreme tragaju i koriste metode kojima bi se izbegli ovi nedostaci. Metodom mikrotalasne ekstrakcije se postiže velika efikasnost dobijanja aktivnih biomolekula iz biljnog materijala, uz veliku uštedu energije, male količine rastvarača i minimalno oštećenje biljnih ćelija u kojima su bioaktivne komponente smeštene (Ganzler i sar., 1986; Faridah i sar., 2010).

Mikrotalasi zagrevaju rastvarač ili smešu rastvarača direktno, odnosno, direktna interakcija mikrotalasa i slobodnih molekula vode prisutnih u žlezdama i vaskularnom sistemu biljke rezultuje pucanju ciljnog biljnog tkiva i otpuštanju aktivnih komponenti u organski rastvarač. Princip zagrevanja pomoću mikrotalasa zasniva se na njihovom direktnom kontaktu sa polarnim materijalima/rastvaračima i kontrolisan je dvema pojavama: jonskom kondukcijom (elektroforetička migracija jona pod uticajem promene električnog polja) i dipolarnom rotacijom (reorganizacija dipola molekula brzom promenom električnog polja), koje se najčešće simultano dešavaju. Mikrotalasna ekstrakcija zavisi od prirode rastvarača, karakteristika matriksa i temperature (Bicchi i sar., 2000; Gao i Lin., 2006). Distribucija mikrotalasne energije u mikrotalasnom, asistiranom sistemu, može se predstaviti Maksvelovom jednačinom uz odgovarajuće uslove koji su definisani konfiguracijom sistema i graničnom površinom tretiranog biljnog materijala i slobodnog, “šupljeg” prostora (Routray i Orsat, 2012):

$$\epsilon^* = \epsilon' - j \epsilon''$$

ϵ^* - opisuje dielektrične osobine biljnog materijala i zavisi od slobodnog prostora u sistemu; ϵ' - dielektrična konstanta koja opisuje “sposobnos”t biljnog materijala za skladištenjem energije kada se nalazi u EM polju; ϵ'' - imaginarna” konstanta, dielektrični faktor gubitka koji utiče na konverziju EM energije u toplotnu, $j-\sqrt{(-1)}$.

Dielektrične osobine uzorka su glavni parameter ove jednačine, kao i efikasnost elektromagnetne energije (EM), distribucije EM polja i konverzije EM energije u toplotnu energiju.

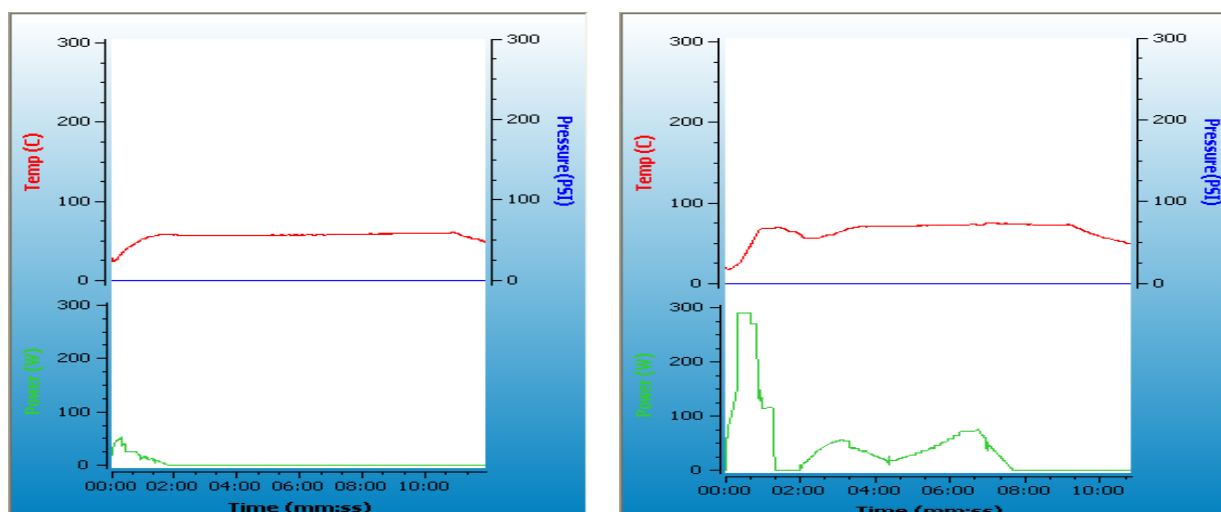
Ekstrakti su pripremljeni korišćenjem modifikovane metode mikrotalasne ekstrakcije (Gallo i sar., 2010). U eksperimentima je korišćena mikrotalasna peć, pod nazivom Microwave Synthesis Sistem – Discover Bench Mate, NIP oznaka 1. 9. /01/ 2006 – 07 JH – XIII / 1. Uređaj je podešen za balone zapremine 5-125ml, za reakcije pod atmosferskim pritiskom i balone od 10ml, za zatvoreni sistem, snage od 0-300W i mogućnosti programiranja temperature do 300°C. Mikrotalasne peći poseduje mikrotalasne reaktore koji funkcionišu uz temperaturno-kontrolni mod, a temperatura

reakcije programira se u skladu sa zahtevima sinteze. Na početku zagrevanja magnetron oslobađa maksimalnu količinu snage u cilju što bržeg dostizanja željene temperature, nakon čega ona pada na vrednost koja omogućava održavanje temperature tokom vremena. U slučaju monomodnog mikrotalasnog reaktora (*CEM Discover BenchMate*), snage od 0 - 300 W, koji se nalazi u mikrotalasnoj peći korišćenoj u ovim eksperimentima, temperatura se prati spoljnim IR-senzorom, integrisanim u mikrotalasnoj pećnici, kojim se detektuje temperatura na površini reakcionog suda do 300 °C.

Za ekstrakciju odmereno je 1 g osušenog i prethodno usitnjenog biljnog materijala i prebačeno u balon, a potom je dodato je 50 ml rastvarača (etanola/etilacetata). Smeša je stavljena u mikrotalasnu peć (otvoren sistem) (*Tabela 9*). Nakon isteka vremena ekstrakcije, sadržaj je proceđen kroz Büchner-ov levak i uparen do suva na rotacionom vakuum uparivaču. Napravljen je osnovi rastvor (100 mg/g) svih uzoraka, od kojeg su pravljena razblaženja korišćena u daljim eksperimentima.

Tabela 9. Optimizacija metode mikrotalasne ekstrakcije

Uzorak (ekstrakt)	Rastvarač (%)	Početna konc. (mg/g)	Temperatura (°C)	Vreme ekstr. (min)
TP1 _{EtOH}	50% Etanol	100	50	10
TP2 _{EtOH}				
TP3 _{EtOH}				
TP1 _{EtOAc}	60% Etilacetat	100	70	10
TP2 _{EtOAc}				
TP3 _{EtOAc}				



Slika 19. Temperaturni profili asistirane mikrotalasne ekstrakcije

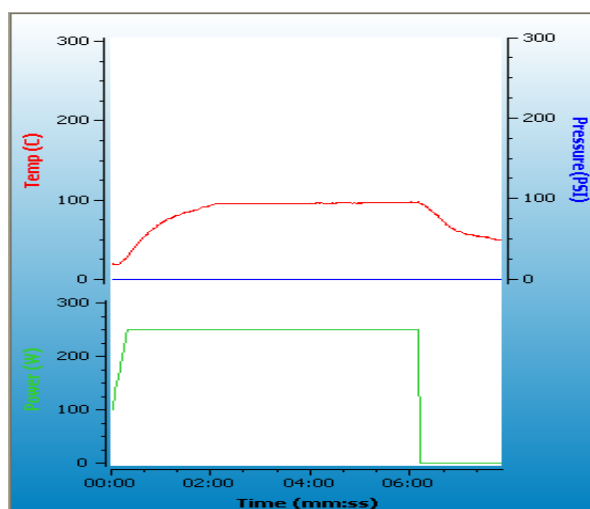
3.2. IZOLACIJA ETARSKOG ULJA ASISTIRANOM MIKROTALASNOM HIDRODESTILACIJOM

Kao i kod dobijanje ekstrakata, snaga mikrotalasa se može koristiti i za izolaciju etarskih ulja iz biljaka. Tokom destilacije vodenom parom, uljani sadržaj se oslobađa iz trihoma, uljanih žlezda, usled visoke temperature i one bivaju „ispumpane“. Međutim, ako se koristi snaga mikrotalasa za izolaciju ulja umesto vodene pare, dolazi do interakcija elektromagnetnog polja sa polisaharidima i tečnostima prisutnim u zidovima trihoma što izaziva njihovo pucanje. Na ovaj način se etarska ulja lako i brzo oslobađaju iz ćelije. Ovaj mehanizam otkriva prednosti korišćenja mikrotalasa za izolaciju etarskog ulja, na samom početku procesa, gde se prva kap ulja javlja za veoma kratko vreme (svega par minuta), dok je kod primene klasične hidrodestilacije ovaj proces mnogo sporiji i samim tim dug (oko 3h)(Korminl i sar., 2010).

Izolacija etarskog ulja urađena je po modifikovanoj metodi asistirane mikrotalasnne hidrodestilacije (Stashenko i sar., 2004). Na mikrotalasnju peć je dodat hladnjak za hidrodestilaciju koji se koristi i u klasičnoj, konvencionalnoj metodi po Clevenger-u (*Slika 21*).

Tabela 10. Optimizacija metode asistirane mikrotalasnne hidrodestilacije

Uzorak (etarsko ulje)	Rastvarač (%)	Početna konc. (mg/g)	Temperatura (°C)	Vreme hidrodestilacije (min)
TP1	Detsilovana voda	100	96	5
TP2				
TP3				



Slika 20. Temperaturni profil asistirane mikrotalasnne hidrodestilacije



Slika 21. Modifikovana aparatura za mikrotalasnu hidrodestilaciju

Osušeni biljni materijal je najpre usitnjen, nakon toga je u balon za destilaciju odmereno 4 g tako pripremljenog biljnog materijala i preliveno sa 50 ml vode. Hidrodestilacija je trajala 5 minuta, a etarsko ulje je skupljano u n-heksanu. Nakon isteka odgovarajućeg vremena, rastvor etarskog ulja u n-heksanu je sušen sa natrijum-sulfatom, zatim je proceden kroz Büchner-ov levak, a zaostali n-heksan uparen na rotacionom vakuum uparivaču. Dobijeno etarsko ulje čuvano je u hermetički zatvorenim flašicama, u frižideru na +4⁰C do početka eksperimenta.

3.3. LC/MS-MS ANALIZA ODABRANIH FENOLNIH JEDINJANJA

Razdvajanje komponenti pripremljenih ekstrakata izvršeno je na tečnom hromatografu Agilent Technologies 1200 Series kuplovanim sa Agilent Technologies 6410A TripleQuad masenim detektorom sa elektrosprej jonskim izvorom (ESI). Injektovano je 5 μ L ekstrakta/rastvora standarda i jedinjenja su razdvojena na Zorbax Eclipse XDB-C18 (50 mm x 4.6 mm, 1.8 μ m) koloni, termostatiranoj na 50 °C, pri protoku od 1 mL/min mobilne faze, čiji je sastav: A = 0.05 % HCOOH, B = MeOH, i gradijent: 0 min 30 % B, 6 min 70 %, 9-12 min 100 %, post time 3 min. Detekcija eluiranih komponenti, jonizovanih pomoću ESI (engleski: Electrospray Ionisation), je izvršena u dinamičkom SRM modu (engleski: Selected Reactions Monitoring), pri sledećim parametrima jonskog izvora: negativni polaritet, pritisak gasa za nebulizaciju 40 psi, protok gasa za sušenje (N₂) 9 L/min i temperatura 350 °C, napon na kapilari 4 kV. U tabeli brdati su SRM parametri određivanja svakog od odabranih jedinjenja.

Tabela 11. SRM parametri određivanja

Redni broj	Jedinjenje	*Mw	t _R [min]	**V _f	m/z prekursora	m/z produkta	***V _{co}
1.	hinska kiselina	192	0.52	150	191	85	20
2.	galna kiselina	170	0.58	90	169	125	10
3.	katehin	290	0.74	150	289	245	10
4.	protokatehinska kiselina	154	0.79	105	153	109	9
5.	hlorogenska kiselina	354	0.8	100	353	191	10
6.	epigalokatehin-galat	458	0.81	165	457	169	16
7.	epikatehin	290	0.95	150	289	245	10
8.	gentizinska kiselina	154	1.03	100	153	109	9
9.	p-hidroksibenzoeva kiselina	138	1.08	80	137	93	10
10.	eskuletin	178	1.13	105	177	133	15
11.	kafena kiselina	180	1.18	100	179	135	10
12.	vanilinska kiselina	168	1.24	100	167	108	15
13.	siringinska kiselina	198	1.31	90	197	182	7
14.	p-kumarinska kiselina	164	1.69	90	163	119	9
15.	umbeliferon	162	1.73	120	161	133	19
16.	skopoletin	192	1.77	80	191	176	8
17.	ferulna kiselina	194	1.9	90	193	134	11
18.	viteksin	432	1.9	200	431	311	22
19.	sinapinska kiselina	224	1.92	100	223	193	17
20.	cinarozid	448	2.13	230	447	285	30
21.	hiperozid	464	2.16	200	463	300	30
22.	izokvercitrin	464	2.25	210	463	300	30
23.	rutin	610	2.33	135	609	300	42
24.	apiin	564	2.6	250	563	269	36
25.	o-kumarinska kiselina	164	2.62	100	163	119	5
26.	miricetin	318	2.67	150	317	179	20
27.	kvercitrin	448	2.75	190	447	300	27
28.	astragalin	448	2.8	190	447	284	30
29.	kosmetin	432	2.81	135	431	268	41
30.	sekoizolaricirezinol	362	2.9	130	361	165	26
31.	3,4-dimetoksicimetna kis.	208	2.99	110	207	103	7
32.	bajkalin	446	3.4	140	445	269	22
33.	daidzein	254	3.43	145	253	208	31
34.	matairezinol	358	3.66	130	357	122	24
35.	kvercetin	302	3.74	130	301	151	15
36.	naringenin	272	3.87	130	271	151	16
37.	cimetna kiselina	148	3.91	100	147	103	5
38.	luteolin	286	4.03	135	285	133	25
39.	genistein	270	4.12	145	269	133	32
40.	kemferol	286	4.55	130	285	285	0
41.	apigenin	270	4.71	130	269	117	25
42.	izoramnetin	316	4.79	160	315	300	21
43.	krizoeriol	300	4.82	125	299	284	20
44.	bajkalein	270	5.15	165	269	269	0
45.	amentoflavon	538	5.78	220	537	375	35

* M_w – molekulska masa jedinjenja; t_R – retenciono vreme; V_f^{**} – napon fragmentora [V]

*** V_{col} – kolizijski napon [V]

Površine pikova na hromatogramima očitane su korišćenjem Agilent MassHunter Workstation Software - Qualitative Analysis (ver. B.03.01). Iz podataka dobijenih očitavanjem površina referentnih standarda konstruisane su kalibracione krive, pomoću kojih je zatim određen sadržaj ispitivanih jedinjenja u ekstraktima.

3.4. ANALIZA HEMIJSKOG SASTAVA ETARSKOG ULJA GASNOM HROMATOGRAFIJOM SA SPEKTROMETRIJOM MASA (GC-MS ANALIZA)

Kvalitativna i kvantitativna analiza sastava etarskih ulja uzoraka *T.pratense* (TP1, TP2 i TP3) rastvorenih u n-heksanu izvršena je na gasnom hromatografu *Agilent Technologies* 6890N sa 5973 masenim selektivnim detektorom (MSD), autosemplerom 7683 i na *Agilent Technologies* DB-5MS kapilarnoj koloni (30m x 0.2mm⁵ x 0.25 μ m). Injektovano je 1 μ l uzorka (temperature 230°C) u splitless modu. Helijum (čistoće 99.999%) je korišćen kao gas nosač, sa protokom 1 ml/min. Razdvajanje komponenti je vršeno prema sledećem programu: početna temperatura 60°C, 3°C/min do 280°C. Komponente su analizirane na masenom spektrometru (temperatura transfer-linije 280°C, temperatura jonskog izvora 230°C, energija elektrona 70 eV) u sken modu, u opsegu m/z 50-550.

Identifikacija komponenti se bazirala na poređenju njihovih masenih spektara nakon denkonvolucije programom AMDIS (Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System) i NIST MS *Search* softverom, sa spektrima iz spektralne biblioteke Wiley Registry of Mass Spectral Data 7th Edition i NIST/EPA/NHA Mass Spectral Library 05. Identitet detektovanih jedinjenja je potvrđen poređenjem Kovats-evih retencionih indeksa (KI) sa podacima iz literature (Adams, 2001). Za određivanje KI korišćen kao standard je korišćeno je dizel ulje koje sadrži smešu n-alkana (C₈-C₂₈).

3.5. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDANTNE AKTIVNOSTI

Postoji mnogo in vitro metoda koje su razvijene za merenje efikasnosti prirodnih antioksidanata, čistih ili izolovanih iz biljnih ekstrakata. Ove metode mogu biti podeljene u dve osnovne grupe:

a) Metode koje se zasnivaju na reakcijama transfera vodonikovog atoma: kapacitet absorbance kiseoničnog radikala (ORAC- Oxygen Radical Absorbance Capacity), ukupni antioksidantni potencijal „hvatanja“ (TRAP- Total radical trapping antioxidant potential) i metoda obezbojavanja karotena (β -Carotene bleaching assay).

b) Metode koje se zasnivaju na transferu elektrona, kao što su: ukupni redukujući potencijal (FRAP- Ferric reducing antioxidant power), DPPH (difenil-pikril-hidrazil) test, kao testovi određivanja kapaciteta hvatanje superoksid anjon-, hidroksil-, azot-oksidi radikala. Pomenute metode su popularne zbog njihove brzine određivanja i osetljivosti. Prilikom evaluacije antioksidantnog kapaciteta biljnih ekstrakata i izolovanih etarskih ulja potrebno je primeniti više metoda zbog kompleksnosti prisutnih jedinjenja.

Metode koje su korišćene u ovoj tezi za određivanje antioksidantnog potencijala ekstrakata i etarskog ulja *T. pratense* zasnivaju se na spektrofotometrijskom merenju intenziteta boje produkta (na određenoj talasnoj dužini) nastalog u datim reakcijama. Za spektrofotometrijska merenja je korišćen spektrofotometar *Thermo, Scientific Multiscan Spectrum®*. Antioksidantna aktivnost ekstrakata i etarskih ulja pomenutih uzorka, poređena je sa antioksidantnom aktivnošću komercijalnih, sintetskih antioksidanata: 2,6-di-terc-butil-4-metilfenolom (butilovani toluen, BHT) i (1,1-dimetil)-4-metoksifenolom (butilovani hidroksianizol, BHA). Ovi sintetski antioksidanti se koriste u prehrambenoj, kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji u prevenciji oksidacije namirnica, kozmetičkih preparata, suplemenata, i dr. Oko 40 zemalja koriste ove antioksidante kao direktne ili indirekne aditive, a njihovo korišćenje je odobreno od strane FDA (US Food and Drug Administration).

Sve krive pomoću kojih su izračunati rezultati dobijeni u *in vitro* antioksidantnim testovima, konstruisane su korišćenjem softvera OriginPro 8. Sva merenja su rađena u tri ili pet ponavljanja.

3.5.1. Određivanje sadržaja ukupnih fenola

Količina fenola u ekstraktima određena je spektrofotometrijski pomoću Folin-Ciocalteu reagensa korišćenjem metode Fukumoto i Mazza (2000) uz male modifikacije (Božin i sar., 2008).

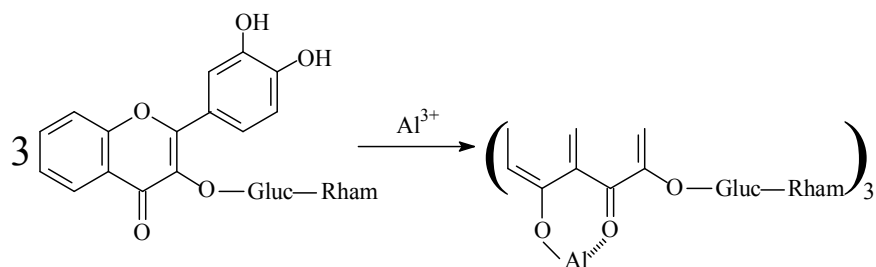
1 ml ekstrakta je rastvoreno u 10 ml destilovane vode i filtrira. U 0.5 ml filtrata je dodato 2.5 ml 0.2 M Folin-Ciocalteu reagensa, a potom se rastvor mućkao 5 minuta. Posle toga je dodato 2 ml pripremljenog rastvora Na_2CO_3 (75 mg/dm^3). Smeša je inkubirana na

sobnoj temperaturi 2h, a apsorbancu očitana na 760 nm. Kao slepa proba je korišćen 70% MeOH.

Količina ukupnih fenola određena je na osnovu kalibracione krive standarda galne kiseline (1mg/mL), dobijene na osnovu serija razblažanje (0-1000 $\mu\text{mol/L}$). Sadržaj ukupnih fenola u ispitivanim ekstraktima izražen je kao mg ekvivalenta galne kiseline/1g suvog ekstrakta.

3.5.2. Određivanje ukupnog sadržaja flavonoida

Određivanje ukupnih flavonoida urađeno je metodom čiji se princip zasniva na osobinama flavonoida i flavon glikozida da sa jonima metala daju odgovarajuće komplekse:



Slika 22. Nastajanje obojenog kompleksa Al^{3+} jona i flavonoida

Ovo je jednostavna spektrofotometrijska metoda koja se zasniva na građenju obojenog kompleksa sa apsorpcionim maksimumom na 430 nm (Markham, 1982).

Rastvori:

- Rastvor za ekstrakciju: U 140 ml MeOH je dodato 50 ml H_2O i 10 ml cc CH_3COOH
- AlCl_3 reagens: 133 mg $\text{AlCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ i 400 mg CH_3COONa je rastvoreno u destilovanoj H_2O i preneto u odmerni sud od 100 ml, pa dopunjeno do crte.
- Standardni rastvor rutina: 50 mg rutina je rastvoreno u MeOH i dopunjeno metanolom do 50 ml. Od ovog rastvora 1 ml je preneto u odmerni sud od 100 ml, a zatim dopunjeno metanolom do crte.

Postupak:

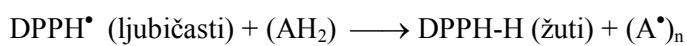
100 μl ekstrakta je ekstrahovano 1h (uz povremeno mućkanje) sa 10 ml rastvora za ekstrakciju. 2.5 ml ovog rastvora preneto je u normalni sud od 50 ml i dopunjeno destilovanom vodom do crte. Apsorbancija rastvora je očitana nakon 5 min stajanja. Standardna kriva je konstruisana na osnovu rezultata dobijenih merenjem apsorbance

serije različitih koncentracija rastvora rutina. Iz kalibracione krive izračunat je sadržaj flavonoida u ispitivanim ekstraktima i izražen kao mg ekvivalenata rutina/g suvog ekstrakta.

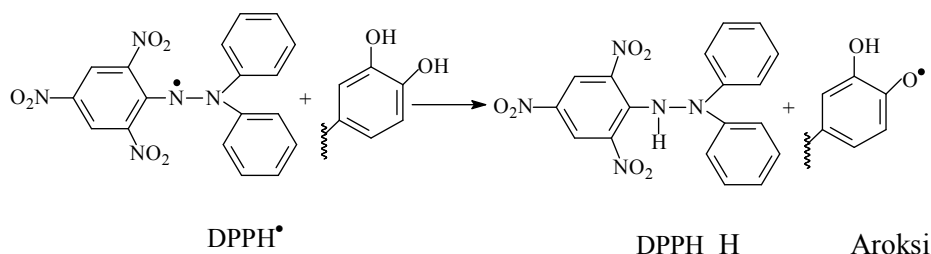
3.5.3. Određivanje neutralizacije DPPH• radikala

Iako 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH•) predstavlja sintetski radikal koji u prirodi ne postoji, rezultati istraživanja koji se baziraju na sposobnosti njegovog prevođenja u neutralni oblik (DPPH-H) od strane određenih biomolekula mogu se koristiti kao preliminarni pokazatelj antioksidantnog delovanja i kao takvi iskoristiti u definisanju aktivnosti u kombinaciji sa rezultatima dobijenim nekim drugim testovima.

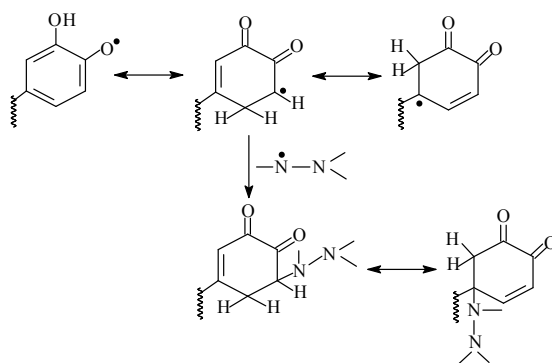
Spektrofotometrijsko određivanje „scavenging“ aktivnosti ispitivanih ekstrakata bazirano je na praćenju transformacije DPPH• radikala (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikala u redukovanu, neutralnu (DPPH-H) formu (Slika 23). Ova transformacija se prati gubljenjem ljubičaste boje rastvora DPPH• radikala u prisustvu antioksidanasa, na 515 nm, pri čemu se dobija žuto obojen rastvor (Sanches-Moreno i sar., 1998; Espin i sar., 2000).



- Predaja H atoma DPPH• radikalima



-, „Hvatanje“ DPPH• radikala



Slika 23. Mehanizam antioksidantnog dejstva fenolnih jedinjenja na DPPH• radikal

Rastvori:

- 0,4 mM rastvor DPPH: 1,57 mg DPPH se rastvori u 100 ml EtOH
- Radni 90 μ M DPPH (22,5 ml 0,4 mM rastvora DPPH u etanolu je dopunjeno metanolom do 100 ml)
- Metanol

Postupak:**Proba:**

1,0 ml 90 μ l DPPH

10 μ l ekstrakata/etarskog ulja

Proba je dopunjena metanolom do 4 ml

Reakciona smeša je inkubirana na sobnoj temperaturi 60 min. ApSORBANCija je očitana na 515 nm, u odnosu na referentni rastvor (95% metanol).

Kontrola:

10 μ l ekstrakata/etarskog ulja

Kontrola je dopunjena metanolom do 4 ml

Izračunavanje:

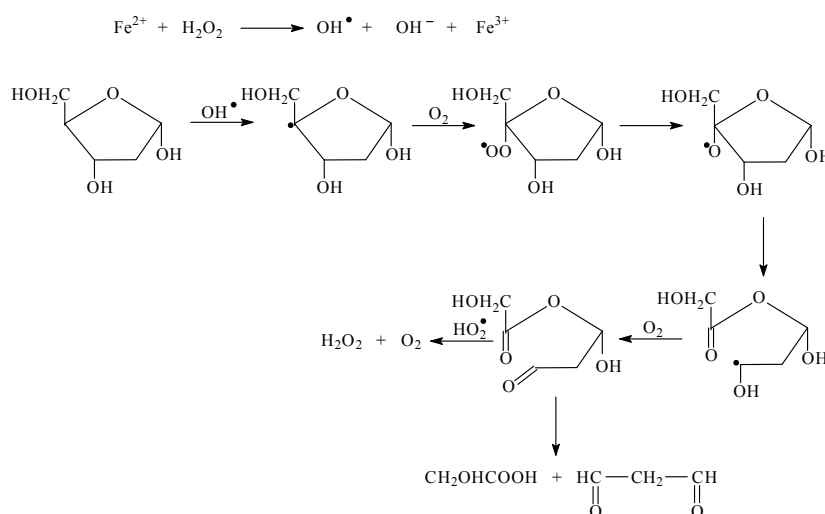
$$\% \text{ Radical Scavenging Capacity (DPPH}^\bullet) = 100 \times (A_{\text{kontrola}} - A_{\text{uzorak}} / A_{\text{kontrola}})$$

Iz dobijenih vrednosti inhibicije (RSC) izračunate su IC₅₀ vrednosti, koncentracija pri kojoj je neutralisano 50% DPPH[•] radikala.

3.5.4. Određivanje neutralizacije OH[•] radikala

Hidroksilni radikal (OH[•]) se određuje praćenjem reakcije degradacije dezoksiriboze (Cheesman i sar., 1988) (Slika 24). Reakciju počinje OH[•] radikal oduzimanjem H atoma dezoksiriboze, pri čemu nastaju produkti koji reaguju sa tiobarbiturnom kiselinom (TBA). Nastali produkti se određuju spektrofotometrijski.

U reakciji Fe²⁺ jona sa H₂O₂ nastaje OH[•] radikal koji je glavni pokretač razgradnje 2-dezoksiriboze do krajnjih produkata od kojih je za samu metodu najvažniji MDA, koji se meri pomoću TBA-testa (Buege i Aust, 1978).



Slika 24. Degradacija 2-deoksi-D-riboze do MDA

Rastvori:

- Rastvor za ekstrakciju (10 ml 10% HClO₄ je zasićen na hladno tiobarbiturnom kiselinom (TBA) i dodato je 30 ml 20% trihlorsirćetne kiseline (TCA).
- 10 mmol/dm³ rastvor FeSO₄
- 1 mmol/dm³ H₂O₂
- 1 mmol/dm³ 2-dezoksi-D-riboza
- 0,5 mol/dm³ fosfatni pufer, pH=7,4

Postupak:**Proba:**0,1 ml rastvora FeSO₄0,1 ml H₂O₂

0,1 ml 2-deoksi-D-riboze

10 μl ekstrakata/etarskog ulja

Proba je dopunjena fosfatnim puferom do 3ml

Kontrola:

0,1 ml biološkog materijala

0,1 ml rastvora FeSO₄0,1 ml H₂O₂

0,1 ml 2-deoksi-D-riboze

Kontrola je dopunjena fosfatnim puferom do 3ml

Reakciona smeša je inkubirana 60 min na 37⁰C. Po isteku vremena reakcionoj smeši je dodato 2 ml TBA reagensa. Epruvete su ostavljene da stoje 20 minuta u ključalom vodenom kupatilu (faza terminacije), potom su ohlađene i centrifugirane na 4000 o/min 10 minuta. Supernatant je odvojen, a apsorbancija je izmerena na 532 nm.

Izračunavanje:

$$\% \text{ Radical Scavenging Capacity (OH}\cdot\text{)} = 100 \times (A_{\text{kontrola}} - A_{\text{uzorak}} / A_{\text{kontrola}})$$

Iz dobijenih vrednosti inhibicije izračunate su IC₅₀ vrednosti, koncentracija pri kojoj je neutralisano 50% OH[•] radikala.

3.5.5. Određivanje neutralizacije O₂^{-•} radikala

Superoksid anjon radikali generisani su u sistemu ksantin/ksantin-oksidaza, a količina O₂^{-•} određena je nitritnom metodom uz modifikacije (Cos i sar., 1998).

Rastvori:

- Ksantin (0,0019 g u 100 ml fosfatnog pufera)
- Hidroksilamin (0,0035 g u 100 ml fosfatnog pufera)
- EDTA (0,0073 g u 100 ml fosfatnog pufera)
- XOD (3,12 mU/ml u 100 ml fosfatnog pufera)
- Sulfanilna kiselina (0,3300 g sulfanilne kiseline, 0,0055 NEDA i 16,7 ml AcOH je rastvoreno u 100 ml fosfatnog pufera)

Postupak:**Proba:**

10 µl ekstrakta/etarskog ulja

0,8 ml ksantina

0,8 ml hidroksilamina

0,8 ml EDTA

Proba je dopunjena fosfatnim puferom do 4 ml

3,2 ml

Reakcionoj smeši je dodato 0,8 ml ksantin-oksidaze, a smeša je potom inkubirana 30 min na temperaturi od 37⁰C. Nakon inkubacije, dodato je 0,4 ml bojenog reagensa (sulfanilna kiselina). Smeša je ostavljena da stoji 30 minuta. Apsorbancija je merena na 550 nm.

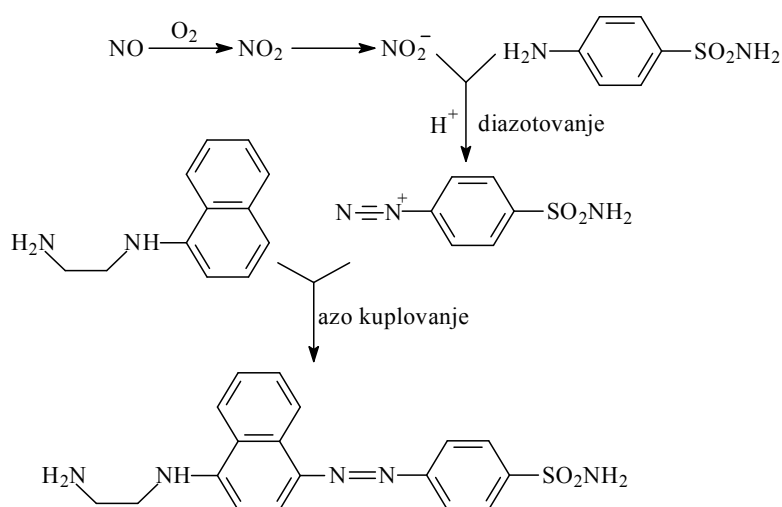
Izračunavanje:

$$\% \text{ Radical Scavenging Capacity O}_2^{\cdot-} = 100 \times (A_{\text{kontrola}} - A_{\text{uzorak}} / A_{\text{kontrola}})$$

Iz dobijenih vrednosti inhibicije izračunate su IC₅₀ vrednosti, koncentracija pri kojoj je neutralisano 50% O₂^{-•} radikala.

3.5.6. Određivanje neutralizacije NO^\bullet radikala

Nastanak NO^\bullet radikala se određuje spektrofotometrijski. NO^\bullet radikal, nastao iz natrijum-nitroprusida (SNP) u vodenom rastvoru na fiziološkom pH, reaguje sa kiseonikom dajući nitritne jone. Koncentracija nitritnih jona je određena (Green i sar., 1982) korišćenjem Griess-ovog reagensa (Babu i sar., 2001). Nitritni joni na sobnoj temperaturi reaguju sa Griess-ovim reagensom pri čemu nastaje purpurno-ružičasto obojen kompleks (Slika 25), a intenzitet obojenja (funkcija koncentracije nitrita) je meren spektrofotometrijski ($\lambda=546 \text{ nm}$).



Slika 25. Reakcija nitritnih jona sa Griess-ovim reagensom

Rastvori:

- Rastvor SNP (0,2980 g natrijum-nitroprusida je rastvoreno u 100 ml fosfatnog pufera (pH=4).
- Griess-ov reagens (smeša 0,1% N-(1-naftil)-etilendiamina dihlorida, NEDA (u destilovanoj vodi)) i 1% sulfanilamida, SA (u 5% fosfatnoj kiselini). Pojedinačni rastvori su stabilni 4 meseca na 4⁰C, dok je smeša stabilna 12h na 4⁰C

Postupak:

Proba:

1,5 ml SNP
 10 μl ekstrakta/etarskog ulja
 Proba je dopunjena fosfatnim puferom do
 3ml

Kontrola:

1,5 ml SNP
 1,5 ml fosfatnog pufera

Reakciona smeša je inkubirana na sobnoj temperaturi 60 min na mestu izloženom sunčevoj svetlosti. Po isteku vremena 0,75 ml probe i kontrole je pomešano sa 0,75 ml Griess-ovog reagensa. Apsorbancija nastale hromofore je merena na 546 nm.

Izračunavanje:

$$\% \text{ Radical Scavenging Capacity (NO}\cdot\text{)} = 100 \times (A_{\text{kontrola}} - A_{\text{uzorak}} / A_{\text{kontrola}})$$

Iz dobijenih vrednosti inhibicije izračunate su IC₅₀ vrednosti, koncentracija pri kojoj je neutralisano 50% NO[•] radikala.

3.5.7. Merenje neutralizacije H₂O₂

Određivanje antioksidantnog delovanja ekstrakata obuhvata sposobnost neutralizacije H₂O₂, koji predstavlja protonovanu formu peroksidnog jona (O₂²⁻), nastalog dismutacijom superoksid anjon radikala u vodenoj sredini, pri neutralnoj pH reakciji. Međutim, u ćeliji odnosno, peroksizomima, lokalizovani su enzimi koji su u stanju da proizvode H₂O₂ i bez prisustva O₂^{•-}. Iako nije radikal, H₂O₂ u organizmu predstavlja jedan od glavnih prooksidanata delujući kao okidač u formiranju drugih visoko reaktivnih kiseoničnih radikala (Mates i sar., 2000). Metoda se zasniva na spektrofotometrijskom određivanju procenta neutralizacije H₂O₂ (Ruch i sar., 1989).

Rastvori:

- 40mM H₂O₂
- Fosfatni pufer pH=7,4

Postupak:**Proba:**

10 µl ekstrakta/etarskog ulja

0,6 ml H₂O₂

3,4 ml fosfatnog pufera

Reakciona smeša je inkubirana 30 min na temperaturi od 37⁰C. Nakon inkubacije, u cilju detekcije H₂O₂, apsorbancija je merena na 230 nm.

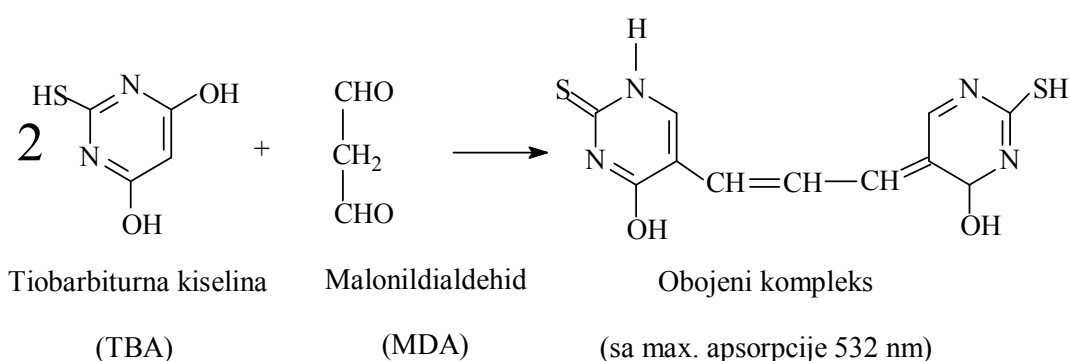
Izračunavanje:

$$\% \text{ Radical Scavenging Capacity (H}_2\text{O}_2\text{)} = 100 \times (A_{\text{kontrola}} - A_{\text{uzorak}} / A_{\text{kontrola}})$$

Iz dobijenih vrednosti inhibicije izračunate su IC₅₀ vrednosti, koncentracija pri kojoj je neutralisano 50% H₂O₂.

3.5.8. Merenje intenziteta lipidne peroksidacije (LPx)

Intenzitet lipidne peroksidacije određen je iz količine malonildialdehida (MDA) nastalog u procesu peroksidacije membranskih lipida indukovane jonima gvožđa (Afanas'ev i sar., 1989; Fukuzawa i sar., 1981; Buege i Aust, 1978). TBA-test (TBA-tiobarbiturna kiselina) je jedan od najčešće korišćenih metoda za određivanje intenziteta peroksidacije nezasićenih masnih kiselina koje se nalaze u sastavu ćelijskih membrana. Metoda se zasniva na formiranju obojenog adukta TBA sa MDA, koji nastaje u reakciji malonildialdehida, kao produkta peroksidacije lipida, i tiobarbiturne kiseline (Slika 26). Kompleks pokazuje maximum apsorpcije na 532 nm.



Slika 26. Reakcija formiranja obojenog kompleksa TBA sa MDA

Rastvori:

- tiobarbiturna kiselina
- 0,1 mol/dm³ rastvor FeSO₄
- 0,1 mol/dm³ rastvor askorbinske kiseline
- 0,1 mol/dm³ rastvor EDTA
- 0,5 mol/dm³ fosfatni pufer, pH=7,4

Postupak:

Proba:

50 µl biološkog materijala (lipozoma)
 20 µl rastvora FeSO₄
 20 µl rastvora askorbinske kiseline
 10 µl ekstrakta/etarskog ulja
 Proba je dopunjena puferom do 3ml

Kontrola:

50 µl biološkog materijala
 20 µl rastvora FeSO₄
 20 µl rastvora askorbinske kiseline
 Kontrola je dopunjena puferom do 3ml

Reakciona smeša je inkubirana na sobnoj temperaturi 60 min. Po isteku vremena dodato je 0,2 ml 0,1 mol/dm³ EDTA i 1,5 ml TBA reagensa. Epruvete su ostavljene da stoje 20 minuta u ključalom vodenom kupatilu (faza terminacije), ohlađenu su i centrifugirane na 4000 o/min 10 minuta. Supernatant je odvojen, a apsorbancija izmerena na 532 nm.

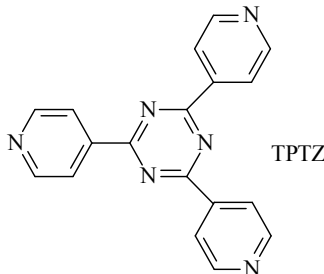
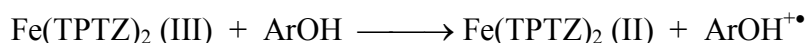
Izračunavanje:

$$\% I_{LPx} = 100 \times (A_{kontrola} - A_{uzorak} / A_{kontrola})$$

Iz dobijenih vrednosti inhibicije izračunate su IC₅₀ vrednosti, koncentracija pri kojoj je inhibirano 50% lipidne peroksidacije.

3.5.9. Određivanje redoks kapaciteta

a) FRAP metoda (*Ferric Reducing Antioxidant Power Assay*) (Benzie i Strain, 1999.) Ovo je spektrofotometrijska metoda zasnovana na reakciji redukcije Fe³⁺ u Fe²⁺. Nastali fero-joni sa prisutnim ligandom grade plavo obojeni kompleks Fe²⁺ - TPTZ (gvožđe – tripiridiltriazin). Hemijska reakcija između Fe³⁺ (TPTZ) i fenolnih jedinjenja kao donora elektrona se može prikazati na sledeći način:



Slika 27. Strukturna formula tripiridil triazina (TPTZ)

Rastvori:

- Rastvor I: 300 mM acetatni pufer pH=3,6 (3,1 g CH₃COONa · 3H₂O + 16 ml glacijalna CH₃COOH, dopunjeno do 1000 ml destilovane H₂O)
- Rastvor II: 10 mM TPTZ (tripiridiltriazin) u 40 mM HCl (0,34 ml 36% HCl dopunjeno destilovane H₂O do 100 ml; 10 mM TPTZ = 0,3123 g u 100 ml 40 mM HCl)
- Rastvor III: 20 mM FeCl₃ · 6H₂O (0,5406 g FeCl₃ · 6H₂O rastvoreno u 100 ml destilovane H₂O)

- Rastvor askorbinske kiseline: 0.0176 g askorbinske kiseline u 100 ml destilovane vode
- FRAP reagens se dobija mešanjem tri rastvora u odnosu rastvor I : rastvor II : rastvor III = 10 : 1 : 1. FRAP reagens mora biti svež, jer stajanjem se zasićuje.

Postupak:**Proba:**

3,0 ml FRAP reagensa
10 µl ekstrakta/etarskog ulja
(askorbinske kiseline)

Kontrola:

3,10 ml destilovane vode

Izračunavanje:

Redukcioni potencijal izračunat je na osnovu kalibracione krive (funkcija apsorpcije u zavisnosti od koncentracije) standardnog rastvora askorbinske kiseline. Rezultat je izražen kao srednja vrednost tri merenja (miligram ekvivalenta askorbinske kiseline po gramu suvog ekstrakta).

b) Modifikovana metoda po Yen i Chen-u

Metoda se zasniva na sposobnosti biljnih ekstrakata da redukuju Fe^{3+} u Fe^{2+} , što se može pratiti spektrofotometrijski na osnovu građenja kompleksa Berlinsko-plavo po metodi Yen i Chen-a (1997), uz izvesne modifikacije (Yildirim i sar., 2001).

Rastvori:

- Fosfatni pufer pH= 6,6 (2,872 g KH_2PO_4 i 1,7956 g Na_2HPO_4 u 500 ml H_2O)
- 1% $K_3[Fe(CN)_6]$
- 10% CCl_3COOH
- 0,1% $FeCl_3$

Postupak:**Slepa proba:**

1,0 ml fosfatnog pufera
1,0 ml $K_3[Fe(CN)_6]$

Proba:

10 µl biljnog ekstrakta
(0,5%, 1%)
1,0 ml fosfatnog pufera
1,0 ml $K_3[Fe(CN)_6]$

Korekcija:

10 µl biljnog ekstrakta
2,0 ml fosfatnog pufera

Reakciona smeša je inkubirana na $50^{\circ}C$, 30 min. Po isteku vremena u sve epruvete je dodato 1 ml CCl_3COOH . Smeša je centrifugirana na 3000 o/min 10 minuta.

Nakon centrifugiranja je iz svake epruvete odpipetirano po 1 ml rastvora i dodato po 1 ml destilovane vode i 0,2 ml rastvora FeCl₃. Apsorbancija je očitana na 700 nm.

3.6. *IN VIVO* ODREĐIVANJA BIOHEMIJSKIH PARAMETARA

Hepatoprotektivni efekat ekstrakata crvene deteline ispitivan je na belim laboratorijskim miševima soja BALB/C (20-30 g) starosti od 2-3 meseca. Životinje su boravile u štali Zavoda za farmakologiju, toksikologiju i kliničku farmakologiju Medicinskog fakulteta u Novom Sadu. Imale su slobodan pristup vodi i hrani tokom celog dana. Bile su izložene smeni dana i noći, a temperatura prostorije je bila od 21-24 °C. Vlažnost vazduha je bila 55±1.5%. Etarski, hloroformski, etilacetatni, n-butanolni i vodeni ekstrakti su upareni do suva i rastvoreni u fiziološkom rastvoru (0.9% NaCl), tako da su dobijeni ekstrakti masene koncentracije 1%. Životinje su metodom slučajnog izbora podeljene u šest grupa po 10 životinja (*Tabela 12*).

Tabela 12. Podela i tretiranje životinja

Grupa laboratorijskih miševa	Način primene	Ekstrakt <i>T.pratense</i>	Koncentracija (ml/kg)
I	intraperitonealno	fiziološki rastvor	1
II	intraperitonealno	Etarski	1
III	intraperitonealno	Hloroformski	1
IV	intraperitonealno	Etilacetatni	1
V	intraperitonealno	n-butanolni	1
VI	intraperitonealno	Vodeni	1

Posle sedam dana po pet životinja iz svake grupe je žrtvovano, jetra je brzo izvađena, izmerena (izražena kao relativna masa jetre RMJ), a zatim homogenizirana u Potter homogenizatoru, sa puferom TRIS HCl/saharoza (50 mmol/0,25ml, pH7.4) u odnosu 1:3, na 4⁰C. Dobiveni homogenat je proceđen kroz gazu i određivani su biohemijski parametri iz homogenata jetre i seruma, kao i GSH iz krvi: sadržaj redukovanog glutationa (GSH) u krvi i jetri, aktivnost glutation-peroksidaze (GSHPx), glutation-reduktaze (GSHR), sadržaj lipidne peroksidacije (LPx), aktivnost peroksidaze (Px), katalaze (CAT) i ksantin-oksidge (XOD), kao i sadržaj ukupnih proteina.

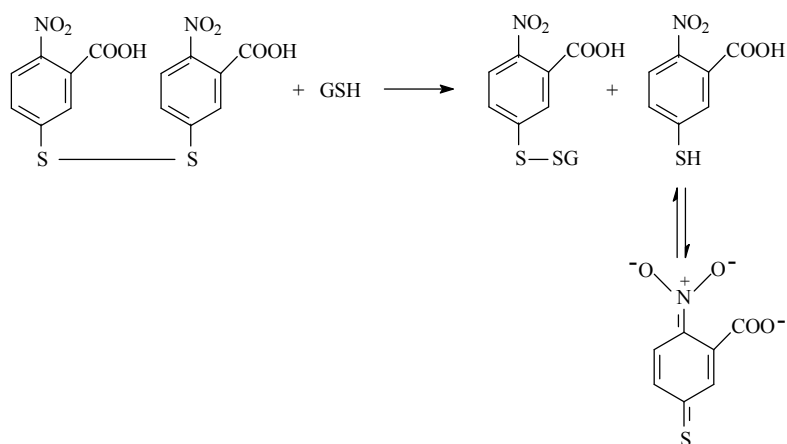
Ostalih pet životinja iz svake grupe je primilo CCl_4 u maslinovom ulju (1:1) i.p. (2 ml/kg) i nakon 24h životinje su žrtvovane. U homogenatu jetre i serumu ovih životinja određivani su nabrojani biohemijski parametri.

3.6.1. Redukovani glutation (GSH) (Beuthler i sar., 1983; Kapetanović i Mieval, 1979)

Sadržaj GSH određen je na osnovu količine ne-protein sulfhidrilnih ostataka pomoću Ellman-ovog reagensa.

Određivanje GSH u krvi: na 1,8 ml destilovane vode i 0,2 ml krvi dodato je 3 ml 4% sulfosalicilne kiseline i centrifugirano 10 min na 3000 o/min. Potom je pomešan 1 ml supernatanta i 4 ml Ellman-ovog reagensa (0,2 mol/dm³ 5,5-ditiobis-(2-nitrobenzojeva kiseline) u 0,1 mmol/dm³ fosfatnom puferu, pH=8) i merena je apsorbancija nastalog bojenog produkta na 412 nm. Sadržaj GSH izračunat je iz molarnog koeficijenta ($\epsilon=1,36 \cdot 10^4$ dm³/molcm), a preračunat na ml eritrocita preko hematokrita.

Određivanje GSH u homogenatu: 1 ml homogenata centrifugiran je sa 2 ml 4% sulfosalicilne kiseline 10 min na 3000 o/min. 0,05 ml supernatanta pomešano je sa 2 ml Ellman-ovog reagensa i merena je apsorbancija na 412 nm. Sadržaj GSH izračunat je iz molarnog koeficijenta, a preračunat na mg proteina preko sadržaja ukupnih proteina.



Slika 28. Mehanizam dejstva GSH sa DTNB

3.6.2. Glutation-peroksidaza (GSHPx) (Chin i sar., 1976)

Sadržaj GSHPx je određen pomoću kumolhidroperoksida kao supstrata.

0,05 ml homogenata je pomešano sa 0,75 ml 50 mmol/dm³ TRIS HCl pufera pH=7,6 (pufer I) i termostatirano 10 min na 37⁰C. U kontrolu je zatim dodato 0,1 ml GSH (0,006

g u 10 ml pufera I), a u uzorak 0,1 ml GSH i 0,1 ml kumolhidroperoksida (0,05 ml u 10 ml MeOH) i ponovo termostatirano 5 min na 37⁰C. Potom je u obe probe dodato po 1 ml 20% TCA, a u kontrolu još 0,1 ml kumolhidroperoksida. Ohlađeni rastvor je centrifugiran na 3000 o/min u toku 10 min. Od obe probe uzeto je po 1 ml supernatanta i dodato 2 ml 0,4mol/dm³ TRIS HCl pufera pH=8,9 (pufer II), 0,1 ml DTNB (0,02 g u 5 ml pufera II) i merena je apsorbancija na 412 nm. Rezultati su izraženi u nmol/mg proteina x min ($\epsilon=1,36 \cdot 10^4 \text{ dm}^3/\text{molcm}$).

3.6.3. *Glutation-reduktaza (GSHR)* (Glatzle i sar., 1974)

2.00 ml 0.075 mol/dm³ KPi koji sadrži 0.15 % (w/V) BSA + 0.30 ml 1 mmol/dm³ NADPH +0.30 ml 2% G-S-S-G (w/V). Reakcija započinje dodatkom uzorka, homogenata jetre ili hemolizata, odgovarajuće zapremine (10-100 μ l). Apsorpcija se prati u toku 3 min. na 340 nm. Aktivnost GSHR izražava se u specifičnim jedinicama aktivnosti na mg proteina.

3.6.4. *Lipidna peroksidacija (LPx)* (Buege i Aust, 1978)

Lipidna peroksidacija je određena pomoću tiobarbiturne kiseline, pri čemu je merena oksidacija lipida ćelijskih membrana preko reakcije lipid-peroksidnih produkata nastalih u reakcionom sistemu sa tiobarbiturnom kiselinom.

0,05 ml homogenata zagrevano je 15 min na vodenom kupatilu sa 3 ml rastvora činidle (0,375% tiobarbiturna kiselina u 15% TCA (3,75 g TBA + 15 g CCl₃COOH + 20,72 ml 37% HCl + 1-2 kapi α -tokoferola na 1dm³ rastvora). Rastvor je zatim centrifugiran 10 min na 3000 o/min i merena je apsorbancija nastalog proizvoda reakcije na 535 nm. Rezultati su izraženi u nmol/mg proteina ($\epsilon=1,56 \cdot 10^5 \text{ dm}^3/\text{molcm}$).

3.6.5. *Peroksidaza (Px)* (Simon i sar., 1974)

Sadržaj Px je određen pomoću vodonikperoksida kao supstrata.

0,05 ml homogenata dodato je u 3 ml fosfatnog pufera (0,1 mol/dm³, pH=7), 50 μ l gvajakola (250 mg u 100 ml H₂O) i 0,04 ml vodonikperoksida (140 μ l 30% H₂O₂ u 100 ml H₂O). Rastvor je centrifugiran na 3000 o/min u toku 10 min. Merena je apsorbancija reakcionog produkta na 436 nm, a rezultati su izraženi u nmol/mg proteina x min ($\epsilon=2,3 \cdot 10^4 \text{ dm}^3/\text{molcm}$).

3.6.6. Katalaza (CAT) (Beers i Sizer, 1952)

Sadržaj CAT je određen pomoću vodonik-peroksida kao supstrata.

0,02 ml homogenata dodato je u 3 ml pufera (0,05 mol/dm³ fosfatnog pufera, pH=7 i 0,075 ml 30% H₂O₂ na 50 ml kPi). Rastvor je centrifugiran na 3000 o/min u toku 10 min. Merena je apsorbancija na 240 nm, a rezultati su izraženi u nmol/mg proteina x min ($\epsilon = 4,36 \cdot 10^4 \text{ dm}^3/\text{molcm}$).

3.6.7. Ksantin-oksidaza (XOD) (Bergmayer, 1970)

Aktivnost XOD određena je spektrofotometrijski na osnovu promene optičke gustine na 293 nm pri prelazu hipoksantina u mokraćnu kiselinu.

0,03 ml homogenata jetre dodato je u 3 ml 0,05 mol/dm³ kalijum-fosfata pH=7,5, u kome se nalazio EDTA i hipoksantin, u koncentraciji od 1 mol/dm³. Rastvor je centrifugiran na 3000 o/min u toku 10 min. Merena je apsorbancija reakcionog produkta na 293 nm, a rezultati su izraženi u nmol/mg proteina x min ($\epsilon = 1,2 \cdot 10^4 \text{ dm}^3/\text{molcm}$).

3.6.8. Određivanje koncentracije ukupnih proteina (Gornal i Nardwall, 1949)

Ukupni proteini određeni su biuretskom metodom modifikovanom prema Gornal-u i Nardwall-u (1949).

0,05 ml homogenata jetre dodato je u 3 ml biuret reagensa (5 g CuSO₄ · 5H₂O, 45 g K,Na-tartarat, 50g rastvora KI, 6 g NaOH), a posle 30 min merena je apsorbancija nastalog jedinjenja na 540 nm. Sadržaj proteina određen je na osnovu kalibracione krive dobijene merenjem različite koncentracije BSA (5-50 mg/dm³).

Statistička obrada dobijenih rezultata: Svi testovi su rađeni u tri ponavljanja, a rezultati su izraženi kao srednja vrednost ± standardna devijacija. Dobijeni podaci su statistički obrađeni *one-way* ANOVA testom ($p < 0.05$).

3.7. ODREĐIVANJE ESTROGENE, ANTIESTROGENE AKTIVNOSTI I CITOTOKSIČNOSTI

Estrogena, antiestrogena aktivnost i citotoksičnost etilacetatnih i etanolnih ekstrakata *Trifolium pratense* L. je određena primenom imunoadsorpcionog, ELISA (eng. *The enzyme-linked immunosorbant assay*), testa na Ishikawa ćelijskoj liniji izolovanoj na Yale Univerzitetu, New Haven, CT, USA. Enzim-supstrat kompleks koji se koristi u ovom testu uključuje alkalnu fosfatazu (enzim) sa p-nitrofenol fosfatom (supstrat), pri čemu se stvara žuto obojeni produkt, p-nitrofenol. Za ovaj test korišćen je ELISA reader (Power Wave 200 microplate scanning spectrophotometer, Bio-Tek Instrument, Winooski, VT) (Pisha i Pezzuto, 1997).

Ishikawa ćelijska linija predstavlja stabilnu liniju humanog endometrijalnog karcinoma koja sadrži estrogen-inducibilnu alkalnu fosfatazu koja se može koristiti za brzo određivanje kako estrogene, tako i antiestrogene aktivnosti. Estrogena jedinjenja stimulišu, dok antiestrogena inhibiraju aktivnost ovog enzima. Prednosti korišćenja Ishikawa ćelijskih linija u *in vivo* studijama, kao i u *in vitro* testovima su ekonomičnost i skraćeno vreme trajanja eksperimenta.

Klinički korišćen antiestrogen, tamoksifen, u tretmanu kancera dojke i njegov mogući hemoprotektivni efekat kod žena sa visokim rizikom za razvoj kancera dojke, je doveo do intenzivnih istraživanja o drugim antiestrogenima. Zabrinutost za estrogene iz životne okoline i njihova moguća povezanost sa kancerom dojke, ali i muškim sterilitetom, dovela je do pojačanog proučavanja njihovog mehanizma delovanja.

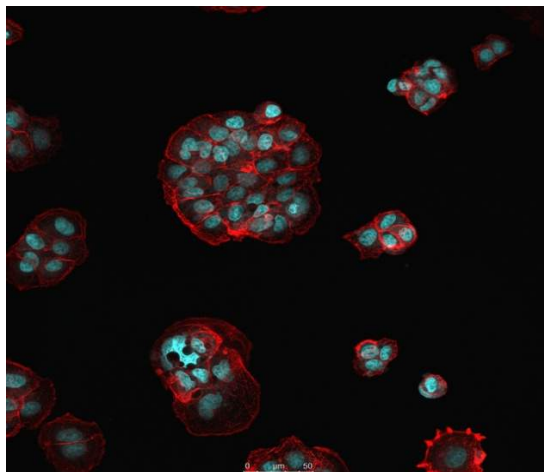
Priprema uzoraka:

1. Dva puta prečišćen goveđi serum (*Fetal Bovine Serum*, FBS) (odstranjeni svi endogeni estrogene iz seruma): dodato je 1 g aktivnog uglja i 0.1 g dekstrana u čašu od 500 ml u kojoj je inaktivirani FBS i promeša se. Rastvor je zagrevan na 60C°, 30 min sa povremenim mućkanjem, a posle ohlađen na sobnoj temperaturi. Ugalj i dekstran su odstranjeni centrifugiranjem (1000 rpm, 5 min). Supernatant je vraćen nazad u čašu, procedura je ponovljena na 37C°. Dbijeni supernatant je profiltriran ostavljen na -20C° (50ml) da stoji.
2. Slani fosfatni pufer: dodato je 1l ddH₂O, 8g NaCl, 0.2g KCl, 1.15 g Na₃PO₄ i 0.2 g KH₂PO₄ (pH=7.4)

3. Medijum ćelijske kulture: sjedinjeno je 500 ml DMEM/F12 medijuma (Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12) sa 10% zagrejanim FBS (50 ml), Na-piruvat (5ml), penicilin-streptomycin (5ml) i Glutamax 1 (5 ml). Sve ovo je čuvano na 4 C°.
4. Rastvor za određivanje citotoksičnosti:
 - a) Pripremljeno je 4l 1% sirćetne kiseline (v/v)
 - b) Rastvoreno je 400 mg rodamin sulfata B (SRB) u 1l 1% sirćetne kiseline (0.04%w/v)
 - c) 1l 0.1mM Tris pufera (12.1 mg/l)
5. U 1 l dejonizovane vode dodato je 12.1g Trizma® (2-Amino-2-(hidroksimetil)-1,3-propanediol) (0.1M) i podeseno na pH na 9.8. Rastvor se čuva na 4C°.

Ćelijska kultura:

1. Medijum je menjan svaka tri dana, koji je potom promenjen medijumom očišćenim od estrogena („estrogen free” medijum) posle pranja ćelija sa fosfatnim puferom.
2. Testiranje: 24h posle menjanja medijuma sa „estrogen free” medijumom, ćelije su oprane dva puta sa sterilnim fosfatnim puferom. fosfatni pufer je odstranjen i dodato je 1.5 ml tripsina, koji treba da prekrije ćelije, zatim je tripsin odstranjen i ostavljen oko 100-200 µl da se inkubira na 37C°, 7 min.
3. Ćelije su potom izbrojane pomoću hemocitometra. Za određivanje estrogene ili antiestrogene aktivnosti pravljeno je razblaženje od 26×10^6 ćelija /ml. Dok je za ispitivanje citotoksičnost pravljeno razblaženje 5×10^6 ćelija/ml.
Priprema uzorka: uzorak je razblažen u DMSO (dimetil sulfoksidu) (2000 puta veća od konačne koncentracije). Svaki plejt u kome se određuje estrogena aktivnost, treba da ima ćelijsku kontrolu (bez dodate testiranog uzorka) i estrogenu kontrolu. Svaki „antiestrogeni“ plejt treba da ima ćelijsku kontrolu, DMSO i tamoksifen kao antiestrogenu kontrolu. Dodato je 10 µl uzorka u svaki plejt, potom je dodato 90 µl 100% metanola. 10 µl ovog rastvora je preneto u drugi plejt i dodato 90 µl ”estrogen free” medijuma za ispitivanje estrogene aktivnosti. Za određivanje antiestrogene aktivnosti, dodato je ”estrogen free” medijuma zajedno sa 2×10^{-8} M estrogenom. Plejetovi su čuvani na -20°C do početka analize.



Slika 29. Prikaz Ishikawa ćelijske linije posmatrane pod elektronskim mikroskopom

Priprema plejtova:

1. *Indukcija:* Odstranjen je medijum iz plejtova, a zatim isprani tri put sa nesterilnim PBS i ostavljeni da se osuše na papiru. Dodato je 50 μ l Tris/Trion rastvora. Sve ovo je čuvano na -80 C° i tako plejtovi bivaju stabilni nekoliko nedelja.
2. *Citotoksičnost:* Odstranjen je medijum iz plejta. Dodato je 50 μ l hladne 20% TCA (trihlor sirćetne kiseline, Trichloroacetic acid) u svako udubljenje na plejtu kako bi se fiksirali ćelijski proteini. Inkubacija je vršena najmanje jedan sat na 4C° (mogu se ostaviti i preko noći da se inkubiraju). Zatim su plejtovi isprani vodom sa česme četiri puta i ostavljeni da se osuše. Dodato je 100 μ l sumporhloramina i inkubirano je 30 minuta, a potom su plejtovi isprani četiri puta 1% sirćetnom kiselinom i ostavljeni da se osuše. Plejtovi su čuvani u mraku sve do početka eksperimenta.

Merenje indukcije:

Plejtovi su izvađeni da se odmrznu i dosegnu 37C° . Potom je dodato 150 μ l 25mM fosfatnog supstrata (p-nitrofenilfosfata) u svako udubljenje. Plejtovi su stavljeni na mešanje 30 sekundi, a potom su odmah očitani kinetički parametri na svakih 15 sekundi, uz 10 sekundi mešanja između 16-20 čitanja. Nagib je izračunat pomoću ELISA reader software (BT 2000, KinCalc 1.120) kao mera promene optičke gustine po vremenu, a takođe i R^2 . Za određivanje estrogene aktivnosti izračunat je procenat indukcije koji je poreden sa kontrolom estrogena koristeći sledeći proračun:

$$\% \text{ Indukcija} = [(\text{nagib}_{\text{uzorak}} - \text{nagib}_{\text{DMSO}}) / (\text{nagib}_{\text{uzorak}} - \text{nagib}_{\text{DMSO}})] \times 100$$

Merenje citotoksičnosti:

Dodato je 200 µl 0.1 mM Tris pufera u svako udubljenje na plejtu. Plejt je ostavljen da stoji 5 minuta sve dok se boja ne stabilizuje. Očitavanje je vršeno na 515 nm. Procenat citotoksičnosti ispitivanih ekstrakata prema Ishikawa ćelijama izračunat je pomoću formule:

$$\% \text{ Rasta ćelija} = [(OD_{\text{uzorak}} - OD_{0 \text{ dan}}) / (OD_{\text{DMSO}} - OD_{0 \text{ dan}})] \times 100$$

3.8. ODREĐIVANJE ANTIMIKROBNE AKTIVNOSTI

Bakterijski sojevi korišćeni za ispitivanje antibakterijske aktivnosti ekstrakata i etarskih ulja *Trifolium pratense* L. dati su u Tabeli 13.

Tabela 13. Ispitivani bakterijski sojevi

Organizam	Izvor
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 10526
<i>Salmonella typhimurium</i>	ATCC 14028
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 11632
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 10876
<i>Micrococcus luteus</i>	Koža zdravog konja

Sojevi *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* se čuvaju se u kolekciji kultura Odeljenja za mikrobiologiju Laboratorije za ispitivanje prehrambenih proizvoda Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu. Animalna bakterija, *Micrococcus luteus*, je izolovana u mikrobiološkoj laboratoriji Departmana za Biologiju i ekologiju, Univerziteta u Novom Sadu.

Disk difuziona metoda

Ova metoda se koristi za evaluaciju antibakterijske aktivnosti uzoraka. Bakterijski sojevi su u cilju pripreme za ispitivanje pasažiranina kosom Mueller-Hinton agaru (HiMedia[®], Mumbai, India) i inkubirane na 37°C, 24 h, uz proveru čistoće kultura. Posle inkubacije, ćelije se isprane sa površine medijuma i suspendovane u sterilnom fiziološkom rastvoru. Broj ćelija u 1 ml je procenjivan McFarland-ovim nefelometrom i podešen na 3×10⁸ CFU/mL. 1 ml ove suspenzije je homogenizovan sa 9 ml istopljenog temperiranog (na 47°C) Müller-Hinton agra, koji je potom izliven u Petriplöče. Na površinu agara je stavljen sterilan disk prečnika 6 mm (HiMedia[®], Mumbai, India), a na

njega naneto 15 μ L odgovarajuće koncentracije ekstrakata i etarskog ulja. Nakon upijanja, Petri ploče su inkubirane 48h na 37°C. Posle isteka ovog vremena, mereni su prečnici (mm) zona inhibicije rasta (ZI) koji predstavljaju merilo antimikrobne aktivnosti ispitanih supstanci. Sva ispitivanja antibakterijske aktivnosti uzoraka rađena su u tri ponavljanja.

4. REZULTATI I DISKUSIJA

4.1. LC-MS/MS ANALIZA EKSTRAKATA *T. PRATENSE*

Ispitivanje fitohemijskog sastava ekstrakata uzoraka TP1, TP2 i TP3 obuhvatalo je kvalitativnu i kvantitativnu analizu 43 odabranih fenolnih komponenti (15 fenolnih kiselina, 23 flavonoida, 3 kumarina i 2 lignana) koristeći specifičnu i visoko selektivnu LC-MS/MS tehniku. Rezultati analize fenolnih komponenti u uzorcima TP1, TP2 i TP3 dati su u Prilogu, *Tabela 8.1.*

Kada se govori o fenolnom profilu *T. pratense* i ostalim vrstama roda *Trifolium*, uglavnom se u naučnoj literaturi navodi kvalitativna analiza izoflavona i njihovih glikozida kao najdominantnijih komponenti (de Rijke i sar., 2001; Krenn i sar., 2002; Kolodziejczyk, 2012).

Izoflavoni daidzein i genistein su detektovani u sva tri metanolna ekstrakta uzoraka TP1, TP2 i TP3. Najveći sadržaj ovih jedinjenja određen je u uzorku TP1 (1.527 ± 0.077 $\mu\text{g/g}$ s.e. za daidzein i 0.588 ± 0.056 $\mu\text{g/g}$ s.e. za genistein). Poređenjem naših rezultata sa rezultatima Saviranta i sar. (2008), koji su u crvenoj detelini našli od 0.0-0.28 mg/g s.e. daidzeina i od 0.07-0.54 mg/g s.e. genisteina proizilazi da su ispitivani uzorci mnogo siromašniji ovim izoflavonima. Šta u preostala dva uzorka TP2 i TP3 koncentracija se još više smanjuje. Ovo smanjenje se može objasniti procesom starenje biljke, pri čemu dolazi do različitih fizioloških i biohemijskih procesa u samoj biljci, što se odražava i u promeni koncentracije u njoj prisutnih fenolnih komponenti. Tsao i saradnici (2006) su takođe dokazali da se sadržaj detektovanih izoflavona (prunetin, genistein, irilon, pseudobaptigenin, daidzein, kalikozin, biohanin A, formononetin i pratenzein) smanjuje starenjem i rastom biljke. Osim toga postoje brojni navodi o prisustvu izoflavona u crvenoj detelini koji se javljaju uglavnom u obliku glikozida i malonilglikozida (Tsao i sar., 2006).

Ove forme su značajne u pogledu njihovih direktnog efekta na bioraspoloživost i bioaktivnost izoflavona. Mnoge studije pokazuju da su malonat konjugati izoflavona nestabilni tokom procesa obrade biljke, dok su glikozidi izoflavona relativno stabilni, ali ne smatraju se biološki aktivnom formom. Naime, tokom ekstrakcije fenolnih komponenata dolazi do hidrolize glikozida, delovanjem enzima β -glikozidaze na aglikone aglikoni daidzein i genistein koji se mnogo brže absorbuju kroz intestinalne humane ćelije (Swinny i Ryan, 2005; Toebeš i sar., 2005). Takođe, daidzein i genistein su biološki značajniji od njihovih metilovanih formi biohanina A i formononetina, koji se u jetri brzo demetiluju. Ova demetilacija se dešava i kod ljudi i kod životinja (Tham i sar., 1998).

Iako su izoflavoni važne i dominantne komponente u crvenoj detelini, detekcija ostalih fenolnih jedinjenja je takođe značajna za bolje razumevanje biohemijskih mehanizama i međusobnih interakcija koje se dešavaju među njima, a sve u cilju gajenja kultura crvene deteline koja bi bila bogat izvor ovih komponenti i koja bi se koristila kao funkcionalna hrana ili kao suplement ishrani u prevenciji mnogih bolesti. Zbog toga su predmet istraživanja ove doktorske teze bila i ostala fenolna jedinjenja ove biljne vrste.

Od 15 ispitanih fenolnih kiselina, u metanolnim ekstraktima TP1, TP2 i TP3 detektovano ih je 5 (protokatehinska, 2,5-dihidroksibenzojeva, p-hidroksibenzojeva, kafena i p-kumarinska kiselina). Ekstrakti TP1 i TP2 sadrže značajniju količinu ovih jedinjenja u odnosu na uzorak TP3. U sva tri uzorka prisutne su p-hidroksibenzojeva i kafena kiselina, koje se izdvajaju po sadržaju u odnosu na preostale tri fenolne kiseline, pri čemu se izdvaja kafena kiselina čiji je najveći sadržaj zabeležen u uzorku TP2 ($1.041 \pm 0.052 \mu\text{g/g s.e.}$). Preostale tri fenolne kiseline, protokatehinska, 2,5-dihidroksibenzojeva i p-kumarinska kiselina, su detektovane samo u ekstraktima uzoraka TP1 i TP2, pri čemu je njihova koncentracija u uzorku TP1 (0.197 ± 0.004 za protokatehinsku, 0.088 ± 0.001 za 2,5-dihidroksibenzojevu i $0.246 \pm 0.027 \mu\text{g/g s.e.}$ za p-kumarinsku kiselinu) veća nego u uzorku TP2 (0.079 ± 0.003 za protokatehinsku, 0.087 ± 0.001 za 2,5-dihidroksibenzojevu i $0.080 \pm 0.013 \mu\text{g/g s.e.}$ za p-kumarinsku kiselinu). U istraživanju Kolodziejczyk-Czepas (2012) pored ovih fenolnih kiselina, navodi se prisustvo genistinske, protokatehinske, ferulne i salicilne kiselina. U istraživanjima Kicel i Wolbis (2006) može se naći podatak da je kafena kiselina najdominantnija, što je u skladu sa istraživanjima dobijenih u ovoj tezi. Janda i saradnici (2009) ukazuju na prisustvo hlorogenske kiselina koja nije identifikovana u našim uzorcima.

U ekstraktu TP1 identifikovan je veći broj različitih flavonoida u poređenju sa ekstraktima TP2 i TP3, dok je najveća količina ispitanih fenolnih jedinjenja prisutna u ekstraktima TP1 i TP2. U sva tri ekstrakta uzoraka TP1, TP2 i TP3 detektovano je prisustvo apigenina i luteolina, pri čemu je najveća količina ovih flavona zabeležena u ekstraktu TP1 (0.320 ± 0.037 i $0.229 \pm 0.032 \mu\text{g/g s.e.}$). Od njihovih glikozida, u sva tri ekstrakta, prisutan je apigenin-7-O-glukozid, pri čemu se u TP2 nalazi u najvećoj količini ($0.288 \pm 0.052 \mu\text{g/g s.e.}$), dok je luteolin-7-O-glukozid prisutan samo u ekstraktu TP2. Od flavonola su prisutni kamferol, u ekstraktima TP1 ($0.062 \pm 0.001 \mu\text{g/g s.e.}$) i TP3

(0.015 ± 0.001 $\mu\text{g/g}$ s.e.), dok je kvercetin prisutan u sva tri ekstrakta, ali se njegova količina značajno izdvaja u ekstraktu TP1 (0.128 ± 0.042 $\mu\text{g/g}$ s.e). Glikozidi flavonola, kamferol-3-O-glukozid i kvercetin 3-O-glukozid detektovani su u sva tri uzorka, pri čemu su u većoj količini prisutni samo u ekstraktu TP2 (8.544 ± 0.095 za kamferol-3-O-glukozid i 24.243 ± 0.371 $\mu\text{g/g}$ s.e. za kvercetin 3-O-glukozid). Rutin je prisutan u tragovima u ekstraktu TP2 (0.157 ± 0.027 $\mu\text{g/g}$ s.e.), dok se u ekstraktu TP1 nalazi u vrlo maloj količini. U TP1 ekstraktu nalaze se viteksin i amentoflavon (0.246 ± 0.001 i 0.345 ± 0.001 $\mu\text{g/g}$ s.e), dok se u ekstraktima TP2 i TP3 nalaze u veoma maloj količini. Najdominantnij fenolno jedinjenje u ispitivanim ekstraktima je flavonol glikozid, hiperozid, koji je identifikovan u sva tri uzorka *T. pratense*. Međutim, najveća koncentracija ovog jedinjenja primetno je detektovana u ekstraktu TP2 (45.259 ± 0.628 $\mu\text{g/g}$ s.e.) Podaci o prisustvu luteolina, apigenina, kvercetin-3-glikozida, hiperozida, mogu se naći u nekoliko publikacija (Lin i sar., 2000; He, 2000; Krenn i sar., 2002), pri čemu je rađeno samo kvantitativno određivanje fenolnih jedinjenja.

Od ostalih klasa flavonoida u ekstraktima TP1 i TP3 u malim količinama detektovano je prisustvo flavanona, naringenina TP1 (0.014 ± 0.002 $\mu\text{g/g}$ s.e) i TP3 (0.062 ± 0.005 $\mu\text{g/g}$ s.e). Analizom prisustva kumarina u sva tri uzorka, utvrđeno je prisutan samo eskuletina (0.606 ± 0.033 , 0.293 ± 0.028 i 0.076 ± 0.017 $\mu\text{g/g}$ s.e. u TP3). Do danas nema nijednog podatka u literaturi o prisustvu eskuletina u crvenoj detelini i zato je ovo prvi podatak o prisustvu ovog fenolnog jedinjenja u *T. pratense*.

Iz dobijenih rezultata LC-MS/MS analize fenolnih jedinjenja metanolnih ekstrakata *T. pratense*, može se zaključiti da je sadržaj nekih fenola kao što su kafena kiselina, kamferol-3-O-glukozid, kvercetin-3-O-glikozid i hiperozid veći ili približan sadržaju izoflavona daidzeina i genisteina, čiji je sadržaj u dosadašnjim navodima zabeležen kao dominantan u odnosu na ostala fenolna jedinjenja. Prema tome, pored izoflavona, daidzeina i genisteina, i ostala pomenuta fenolna jedinjenja (flavonoidi, njihovi glikozidi, fenolne kiseline) prisutna u *T. pratense* mogu u značajnoj meri da doprinesu biološkoj (antioksidantnoj, estrogenoj, antimikrobnoj, i dr.) aktivnosti ove biljke. Ekstrakt *T. pratense* u najnižoj fazi rasta (TP1), iako sadrži najveći broj fenolnih jedinjenja, ne sadrži i najveću koncentraciju pojedinačnih fenola. S obzirom na to da je poznato da sadržaj biljnih fenola zavisi od mnogih faktora, kao i od međusobnih interakcija među fenolnim komponentama, raznih fizioloških i biohemijskih procesa, ovakve razlike u

sadržaju fenolnih jedinjenja nisu iznenađujuće, ali ih je ponekad teško objasniti zbog složenosti mnogobrojnih mehanizama koji se dašavaju u biljnoj ćeliji.

Dosadašnja istraživanja vezana za fitohemijski skrining crvene deteline bazirala su se uglavnom na kvalitativnoj analizi, zbog toga ova teza može poslužiti kao jedini izvor kvantitativne, LC/MS-MS analize fenolnih komponenata prisutnih u ekstraktima ove biljne vrste. Takođe, ovi podaci mogu biti od značaja za dalja fitohemijska istraživanja, kao i za mnoga biološka istraživanjima u cilju korišćenja *T. pratense* kao funkcionalne hrane. Cilj ove disertacije je i da se utvrdi korelacija detektovanih fenolnih komponentni i biološka aktivnosti *T. pratense*. Farmakološka aktivnost pojedinačnih fenolnih jedinjenja odgovornih za biološku aktivnost crvene deteline opisana je u drugom poglavlju ove doktorske disertacije.

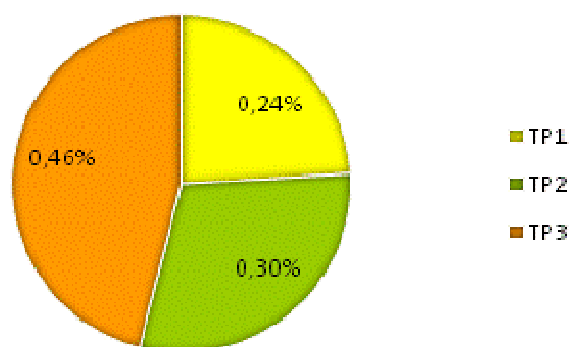
4.2. KVALITATIVNA I KVANTITATIVNA ANALIZA ETARSKOG ULJA *T. PRATENSE* L.

Analize etarskih ulja u ispitivanim uzorcima *Trifolium pratense* L. obuhvatale su:

- a) Određivanje količine ukupnog etarskog ulja u uzorcima TP1, TP2 i TP3
- b) GC-MS analizu

4.2.1. Određivanje količine ukupnog etarskog ulja

Rezultati količine ukupnog etarskog ulja u osušenim listovima vrste *Trifolium pratense* L. su prikazani na slici. Prikazane vrednosti u izražene kao g/100 g (%) osušenog biljnog materijala (Slika 30).



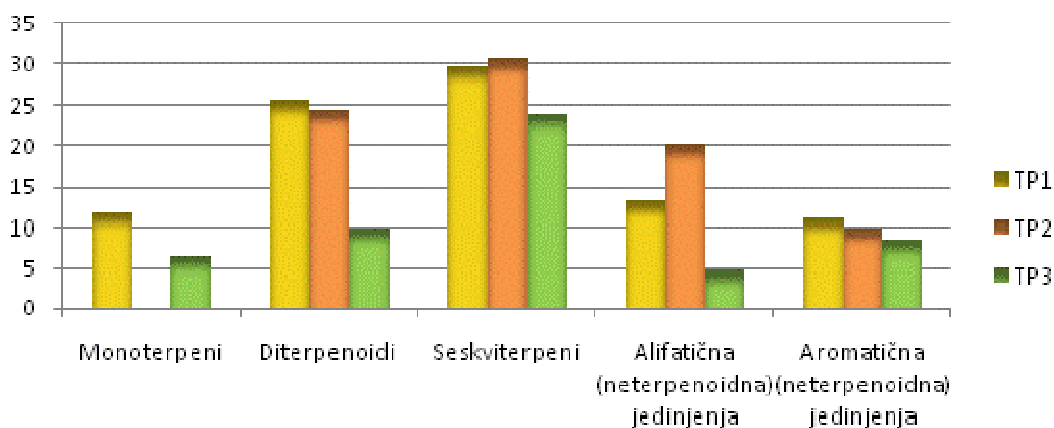
Slika 30. Količina etarskog ulja u uzorcima *Trifolium pratense* L.

Iz gore prikazanih rezultata (Slika 30) možemo zaključiti da je najveći prinos etarskog ulja imao uzorak TP3 (0,46%), dok su uzorci TP1 (0,24%) i TP2 (0,30%) imali približan prinos. Ovo je verovatno rezultat toga što je biljci, tj. listovima, bilo potrebno više

vremena za formiranje etarskog ulja u uljanim ćelijama (trihomama) biljke. Iz tog razloga je biljka u najvišem stadijumu rasta imala najveći sadržaj etarskog ulja, odnosno, sadržaj etarskog ulja u listu zavisi od ontogenetskog razvoja lista (Sangwan i sar., 2000). Osim toga, ovi rezultati potvrđuju ranije navode da niz faktora utiče na prinos etarskih ulja, a to su: vreme prikupljanja biljnog materijala, zrelost biljaka, metoda izolacije ulja, usitnjenost materijala, vreme sušenja, agroekološki uslovi i dr. Pored toga, nađeno je da se prinos etarskog ulja menja sa promenom intenziteta svetlosti i medijuma u kome raste biljka (Letchamo i sar., 1995). Neslaganja u prinosima etarskih ulja potiču takođe i od načina izražavanja rezultata. Literaturnih podataka o prinosu etarskog ulja vrste *Trifolium pratense* L. u različitim fazama rasta gotovo da nema, tako da ne možemo izvršiti poređenje sa poznatim podacima vezanim za ovu biljnu vrstu.

4.2.1. GC-MS analiza

Analiza sastava etarskog ulja uzoraka *Trifolium pratense* L. (TP1, TP2 i TP3) izvršena je primenom metode gasne hromatografije sa masenom spektrometrijom (GC-MS), a rezultati su izraženi kao relativni udeo (%) komponenata u etarskom ulju i prikazani na *Histogramu 1* i u Prilogu, *Tabela 8.2*.



Histogram 1. Udeo detektovanih klasa jedinjenja u etarskom ulju *T.pratense*

Hemijski sastav etarskog ulja zavisi, od genetskih, ekoloških faktora, kao i od vrste, lokaliteta i vremena ubiranja i korišćene metode za izolovanja biljnog materijala (Smith i sar., 2005).

GC-MS analizom hemijskog sastava etarskih ulja uzoraka TP1, TP2 i TP3 identifikovano je 39 različitih volatilnih jedinjenja. Dominantne komponente etarskih ulja pomenutih uzoraka su neterpenoidini ugljovodonici: aldehidi, ketoni, alkoholi, kao i

terpenoidi: mono-, di- i seskviterpeni. Predpostavlja se da su aldehidi i alkoholi nastali lipooksigenaznom oksidacijom polinezasićenih masnih kiselina dejstvom lipooksigenaze, samo nekoliko sekundi nakon mehaničkog oštećenja biljnog tkiva lista biljke (Pichersky i sar., 2002; Holopainen i sar., 2004).

Aktivnost oksigenaze i nastanak pomenutih ugljovodonika opisali su i Salas i saradnici (2005). Zatim, Dudareva i saradnici (2004) ukazali su da su mnoga isparljiva jedinjenja koja su detektovana i u uzorcima etarskih ulja TP1, TP2 i TP3, nastala oksidacijom polaznih jedinjenja, dehidrogenacijom, alkilacijom i drugim tipovima reakcija u kojima, pored ostalog, učestvuju i citohrom P-450 i NADP/NAD-zavisni enzimi (Dudareva i sar., 2004).

U uzorcima etarskih ulja TP1, TP2 i TP3 zabeleženo je prisustvo monoterpena, diterpena i seskviterpena, kao značajnih bioaktivnih jedinjenja. Uzimajući u obzir da *T. pratense* ne spada u aromatične biljke, etarska ulja pomenutih uzoraka sadrže značajan sadržaj terpenskih jedinjenja. Diterpen β -jonon prisutan je u sva tri etarska ulja uzoraka TP1, TP2 i TP3 (9.90%, 9.46% i 9.07%), kao i seskviterpen 5,6,7,7-tetrahidro-4,4,7-trimetil-2(4H)-benzofuranon (7.81%, 7.77% i 7.60%).

Kao i što se može videti sa *Histograma 1*, uzorak etarskog ulja TP1 sadrži nešto veći sadržaj pomenutih terpena. Posmatrajući pomenuti histogram, može se zaključiti da su terpeni naizmenično prisutni u uzorcima etarskih ulja TP1, TP2 i TP3. Tako je u uzorcima TP1 i TP2 zabeleženo prisustvo seskviterpena heksahidroksifarnezil acetona (6.29% i 7.63%), dok ovo jedinjenje nije prisutno u uzorku TP3. Aciklični diterpen fitol je prisutan samo u uzorcima TP2 i TP3 (14.54% i 15.46%). Zatim, monoterpeni β -mircen (4.55%), p-cimen (3.59%), limonen (0.86%), kao i diterpen tetrahidrojonon (1.56%) su detektovani samo u etarskom ulju uzorka TP1. Analogno tome, prisustvo oksidovanog monoterpena dihidrokarvona (2.47%) i seskviterpena megastigmatrienona (16.10%) je zabeleženo samo u etarskom ulju uzorka TP3.

Iako nisu najdominantnija jedinjenja etarskih ulja uzoraka *T. pratense*, terpeni predstavljaju važnu klasu jedinjenja koja doprinose antioksidantnoj, antimikrobnoj i mnogim drugim farmakološkim aktivnostima. Figueiredo i saradnici (2007) u svojoj studiji takođe navode prisustvo diterpena β -jonona, kao i monoterpena dihidrokarvona u etarskom ulju crvene deteline, pri čemu je sadržaj β -jonona (1.49%) manji u odnosu na njegov sadržaj u ispitivanim etarskim uljima uzoraka TP1, TP2 i TP3. Ovi autori takođe

navode i prisustvo megastigmatrienona, prisutnog u značajno manjem sadržaju (0.89 %) negokod ispitivanog etarskog ulja *T. pratense* TP3 u ovoj tezi (16.10%).

Inače, megastigmatrienon pokazuje citotoksičnu aktivnost. O prisustvu seskviterpena u *Trifolium pratense* L. govore Holopainen i saradnici (2004) u njihovim ranijim studijama. Smatra se da se sadržaj monoterpena smanjuje starenjem biljke, kao i usled mehaničkog oštećenja (Vuorinen i sar., 2004). Ovaj podatak je u korelaciji sa dobijenim rezultatima ove teze, gde *T. pratense* u najnižoj fazi rasta TP1, pokazuje najveći sadržaj β -jonona (9.90%).

U uzorcima etarskih ulja TP1, TP2 i TP3 prisutan je i značajni sadržaj alkohola. Tako je u sva tri uzorka prisutan 7-okten-4-ol (3.47%, 1.35% i 0.88%), a uzorak TP3 sadrži 1,2,6-heksanetriol, dok je u uzorku etarskog ulja TP1 prisutan 3-heksen-1-ol (5.20%). Prisustvo ovih alkohola se takođe pominje u radu Figueiredo i saradnika (2007).

Od aldehida najzastupljeniji je benzaldehid koji je prisutan samo u etarskom ulju TP3 uzorka (5.52%) (Vlaisavljevic i sar., 2014). Ovaj aldehid verovatno potiče od reakcije oksidacije cimetine kiseline ili fenilacetaldehida (Biehl i Ziegler, 2003). Od ketona se izdvaja 2-pentanon koji je prisutan samo u etarskom ulju TP2 (6.66%). U uzorcima etarskih ulja TP1 i TP2 prisutna je heksadekanska kiselina (3.22% i 2.09%), čije prisustvo verovatno predstavlja rezultat enzimske hidrolize estara. Voaltilne komponente u etarskih ulja TP1, TP2 i TP3 se smanjuju prema redosledu TP1>TP2>TP3, što znači da se etarsko ulje biljke u početnoj fazi rasta (TP1) izdvaja i po broju prisutnih jedinjenja i po sadržaju istih u njemu.

1.3. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDANTNE AKTIVNOSTI *T. PRATENSE* L.

Kao što je i u drugom poglavlju ove doktorske teze rečeno, sekundarni metaboliti biljaka (fenoli, terpeni i drugi) imaju sposobnost neutralizacije mnogih slobodnoradikalnih vrsta.

Neke o prethodnih studija ukazuju na antioksidantni potencijal bioaktivnih komponenti prisutnih u *Trifolium pratense* L. (Kapiotis i sar., 1997; Lissin i sar., 2000; Kroyer, 2004; Campbell i sar., 2004; Mu i sar., 2009).

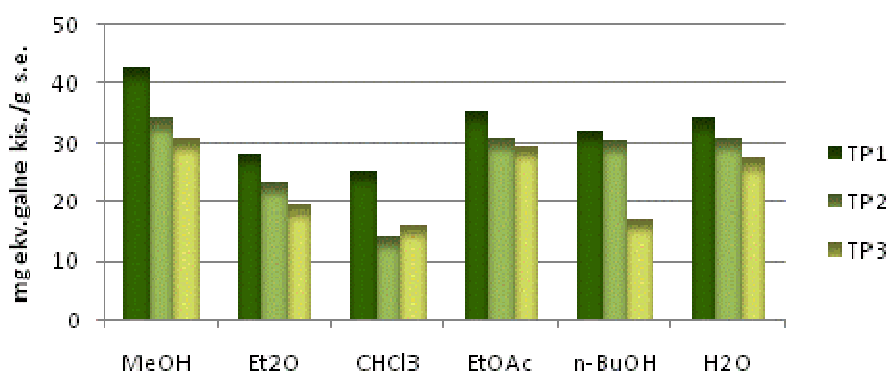
Procena antioksidantne aktivnosti *T. pratense* se ogledala u: određivanju sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja i flavonoida u ekstraktima *T. pratense*, ispitivanju kapaciteta „hvatanja“ DPPH•, OH•, O₂^{-•}, NO• radikala (RSC-Radical Scavenging Capacity),

neutralizacije H_2O_2 , određivanju sposobnosti inhibicije lipidne peroksidacije i merenju redukcionog kapaciteta kako ekstrakata, tako i etarskih ulja *T. pratense*.

Rezultati svih spektrofotometrijskih merenja, kao i grafici sa kojih su očitane IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$; mg/ml) vrednosti prikazani su u poglavlju 8.2. i u Prilogu, *Tabele 8.3.-8.147*.

4.3.1. Određivanje sadržaja ukupnih fenola

Vrednosti količine ukupnih fenola u ekstraktima uzoraka TP1, TP2 i TP3 dati su na *Histogramu 2*.

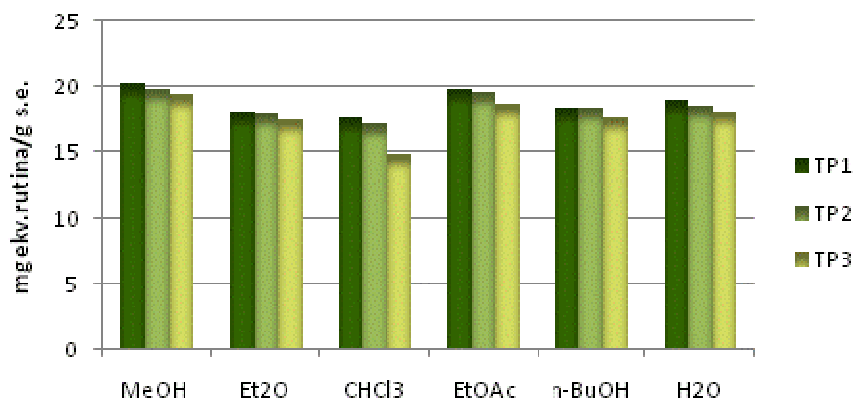


Histogram 2. Količina ukupnih fenola u ekstraktima uzoraka TP1, TP2 i TP3 izražena kao mg ekvivalenta galne kiseline/g suvog ekstrakta

Iz priloženih rezultata može se videti da metanolni (ukupni) ekstrakti sva tri uzorka imaju najveći sadržaj ukupnih fenola, pri čemu je uzorak TP1 najbogatiji ovim komponentama ($TP1_{\text{MeOH}}=42.74$ mg ekv.galne kis./g s.e.), dok je razlika u sadržaju fenola kod uzoraka TP2 ($TP2_{\text{MeOH}}=34.34$ mg ekv.galne kis./g s.e.) i TP3 ($TP3_{\text{MeOH}}=30.99$ mg ekv.galne kis./g s.e.) vrlo mala. Etilacetatni, n-butanolni i vodeni ekstrakti sva tri uzorka (TP1, TP2 i TP3) pokazuju približne vrednosti sadržaja ukupnih fenola. Međutim, izdvaja se n-butanolni ekstrakt uzorka TP3 sa приметно nižim sadržajem ovih jedinjenja ($TP3_{\text{n-BuOH}}=17.48$ mg ekv.galne kis./g s.e.). Hloroformski ekstrakti TP1, TP2 i TP3, pokazuju značajno manji sadržaj fenolnih komponenti u odnosu na sve ostale ekstrakte.

4.3.2. Određivanje sadržaja ukupnih flavonoida

Vrednosti količine ukupnih flavonoida u ekstraktima uzoraka TP1, TP2 i TP3 dati su na *Histogramu 3*.



Histogram 3. Količina ukupnih flavonoida u ekstraktima uzoraka TP1, TP2 i TP3 izražena kao mg ekvivalenta rutina/g suvog ekstrakta

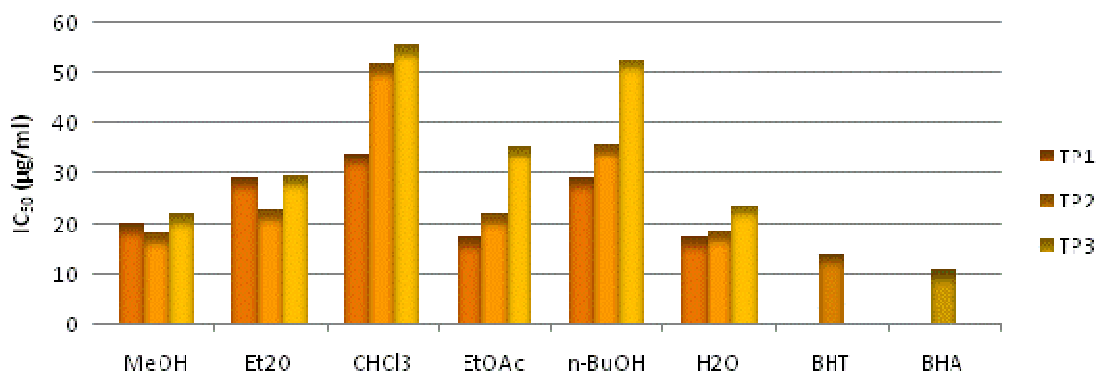
Iz podataka prikazanih na *Histogramu 3*, može se videti da metanolni ekstrakti TP1, TP2 i TP3 imaju najveći sadržaj ukupnih flavonoida, pri čemu se izdvaja vrednost uzorka TP1 ($TP1_{MeOH}=20.22$ mg ekv.rutina/g s.e.). Ostali ekstrakti imaju približno isti sadržaj ovih jedinjenja, pri čemu su vrednosti sadržaja flavonoida u etilacetatnim i vodenim ekstraktima sva tri uzorka neznatno veće od vrednosti sadržaja ovih komponenti u preostalim ekstraktima (etarskom, hloroformskom i n-butanolnom).

Poređenjem sadržaja ukupnih fenolnih komponenata i flavonoida između ekstrakata uzoraka TP1, TP2 i TP3, može se zaključiti da su ekstrakti biljke *T. pratense* u najnižoj fazi rasta (TP1) pokazali najveći sadržaj ovih bioaktivnih jedinjenja. Različiti sadržaj ukupnih fenola i flavonoida u biljkama u različitim fazama njihovog razvoja ukazuje na to da potencijalna efikasnost antioksidanata u biljci varira tokom njenog sazrevanja (Pandjaitan i sar., 2005). Razlika u sadržaju fenolnih komponenata u uzorcima TP1, TP2 i TP3 se javlja verovatno zbog različitih mehanizama biosintetskih i kataboličkih reakcija koji se dešavaju tokom ontogenetskog razvoja biljke. Da bi se ovi mehanizmi bolje razjasnili potrebna su brojna istraživanja biohemijskih i fizioloških procesa biljke čija se biološka aktivnost i hemijski sastav ispituju.

Posmatrajući *Histogram 3*, može se zaključiti da su flavonoidi i njihovi derivati najzastupljenije komponente među fenolnim jedinjenjima u ekstraktima uzoraka TP1, TP2 i TP3. Među preostalim najzastupljenijim komponentama su verovatno prisutne fenolne kiseline koje se pominju u naučnoj literaturi, kao i u *Tabeli 8.1*.

4.3.3. Određivanje sposobnosti neutralizacije DPPH radikala ekstraktima

Rezultati spektrofotometrijskog određivanja sposobnosti neutralizacije DPPH[•] radikala ekstraktima TP1, TP2 i TP3 prikazani su na *Histogramu 4*.

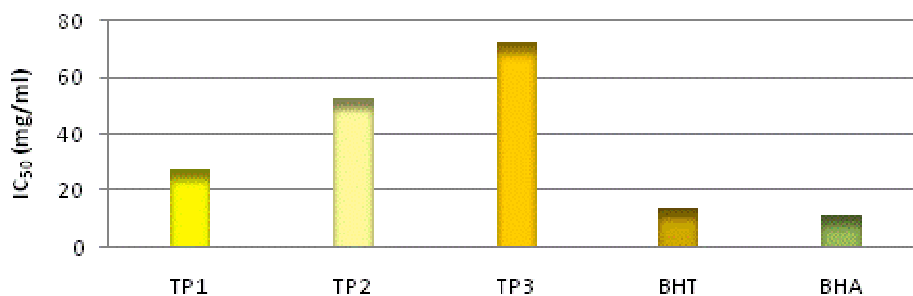


Histogram 4. Antioksidantni potencijal neutralizacije DPPH radikala ekstrakata *T. pratense*

Kao što se može videti iz prikazanih rezultata, najveću sposobnost neutralizacije DPPH[•] pokazali su metanolni, etilacetatni i vodeni ekstrakti. Etilacetatni i vodeni ekstrakt crvene deteline u najnižoj fazi rasta, pokazali su najbolji antioksidantni efekat prema DPPH[•] radikalu ($IC_{50TP1EtOAc}=17.82 \mu\text{g/ml}$, $IC_{50TP1H2O}=17.47 \mu\text{g/ml}$), čija je IC_{50} vrednost bila približna istoj za sintetske antioksidanate BHA i BHT ($IC_{50}=14.31 \mu\text{g/ml}$, $IC_{50}=11.08 \mu\text{g/ml}$). Nešto manju sposobnost neutralizacije DPPH[•], pokazali su etarski, hloroformski, n-butanolni ekstrakt uzoraka TP1, TP2 i TP3. Ovakvi rezultati ukazuju na dve činjenice. Prvo, ekstrakt biljke koja se nalazi najnižoj fazi razvoja (TP1) pokazuje najveću sposobnost neutralizacije DPPH[•] radikala stvorenog u *in vitro* uslovima. Drugo, polarniji ekstrakti kao što su metanol, etilacetat i voda, pokazali su se boljim, u odnosu na preostala dva (hloroformski i n-butanolni), u izolovanju polarnih fenolnih komponenata koje su odgovorne za njenu antioksidantnu aktivnost.

4.3.4. Određivanje sposobnosti neutralizacije DPPH radikala etarskim uljima

Rezultati spektrofotometrijskog određivanja sposobnosti neutralizacije stabilne forme DPPH radikala etarskim uljima uzoraka TP1, TP2 i TP3 u njegovu redukovanu formu, prikazani su na *Histogramu 5*.



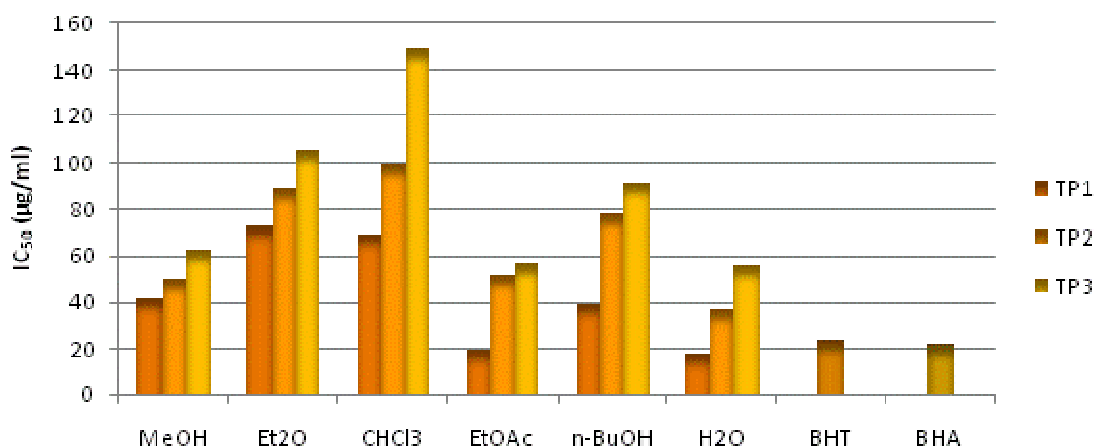
*Histogram 5. Antioksidantni potencijal neutralizacije DPPH etarskim uljem *T. pratense**

Sva tri ispitivana uzorka (TP1, TP2 i TP3) etarskog ulja pokazala su sposobnost da redukuju DPPH radikal. Međutim, najbolju antioksidantnu aktivnost pokazalo je etarsko ulje uzorka TP1 ($IC_{50TP1}=27.61$ mg/ml), približnu aktivnost sintetskim antioksidantima, odnosno značajno bolju od ostala dva uzorka, TP2 ($IC_{50TP2}=52.56$ mg/ml) i TP3 ($IC_{50TP3}=72.49$ mg/ml). Značajna razlika u antioksidantnom delovanju ispitivanih etarskih ulja zavisi kako od faze rasta biljke, tako i od načina pripreme biljnog materijala, odnosno načina dobijanja etarskih ulja, pa se uočene velike razlike između IC_{50} vrednosti dobijene za etarsko ulje uzorka TP1 sa jedne strane, i onih dobijenih za etarska ulja uzoraka TP2 i TP3, sa druge strane, bar delimično mogu objasniti navednim činjenicama.

4.3.5. Određivanje sposobnosti neutralizacije OH^{\bullet} radikala ekstraktima

Hidroksil radikal (OH^{\bullet}) je hemijski najreaktivnija forma „aktiviranog kiseonika”, koja nastaje tokom univalentne redukcije molekulskog kiseonika i ova forma je najodgovornija za citotoksične efekte kiseonika (Halliwell, 2006).

Rezultati kapaciteta neutralizacije OH^{\bullet} ekstraktima *T. pratense* su prikazani na *Histogramu 6*.

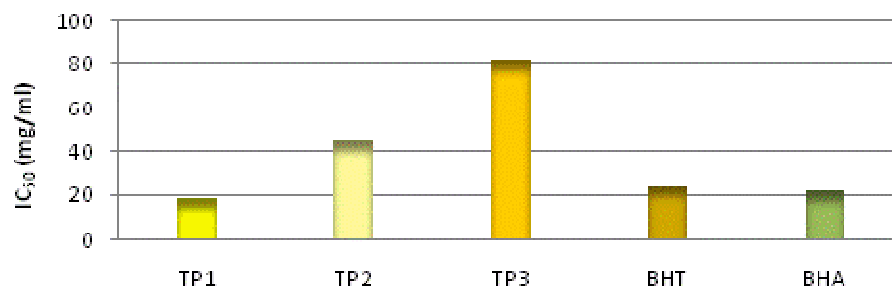


Histogram 6. Antioksidantni potencijal neutralizacije OH• ekstraktima T. pratense

Kao što se može videti iz priloženih rezultata neutralizacije OH• svi ekstrakti uzorka TP1 su pokazali značajno bolji kapacitet neutralizacije OH• radikala u odnosu na ekstrakte preostala dva, TP2 i TP3, uzorka. Etilacetatni i vodeni ekstrakti sva tri uzorka ponovo su pokazali najbolju antioksidantnu aktivnost, pri čemu se ističu etilacetatni i vodeni ekstrakti uzorka TP1 čije su izmerene IC₅₀ vrednosti (IC_{50TP1EtOAc} = 19.79 µg/ml; IC_{50TP1H2O} = 18.44 µg/ml) manje od IC₅₀ vrednosti sintetskih antioksidanata BHT i BHA (IC_{50BHT} = 24.12 µg/ml; IC_{50BHA} = 22.17 µg/ml). Nešto slabiji antiradikalni kapacitet pokazali su metanolni ekstrakti sva tri uzorka. Fenolne komponente prisutne u etilacetatnim i vodenim ekstraktima TP1, TP2 i TP3 inhibiraju nastajanje OH• radikala u sistemu Fe²⁺-H₂O₂ inhibirajući Fentonovu reakciju na taj način što poseduju sposobnost kompleksiranja Fe²⁺ jona i time doprinose antioksidantnoj aktivnosti.

4.3.6. Određivanje sposobnosti neutralizacije OH• radikala etarskim uljima

Na *Histogramu 7* prikazani su rezultati spektrofotometrijskog očitavanja sposobnosti neutralizacije OH• radikala etarskim uljima uzoraka TP1, TP2 i TP3.

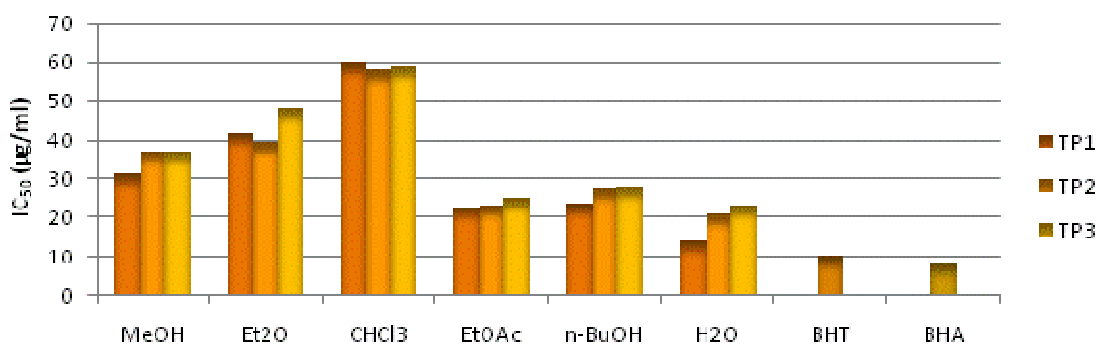


Histogram 7. Antioksidantni potencijal neutralizacije OH• etarskim uljima T. pratense

Iz dobijenih rezultata neutralizacije OH• radikala i na osnovu njih izračunatih IC₅₀ može se uočiti da je etarsko ulje uzorka TP1 ispoljilo najbolju antioksidantnu aktivnost (IC₅₀=18.297 mg/ml), koja je bolja i od antioksidantne sposobnosti sintetskih antioksidanata BHT (IC₅₀BHT=24.12 mg/ml) i BHA (IC₅₀BHA=22.17 mg/ml). Ostala dva uzorka su takođe ispoljila sposobnost neutralizacije OH• radikala, ali je ta sposobnost za oko 50% slabija od aktivnosti sintetskih antioksidanata (IC₅₀TP2=44.88 mg/ml; IC₅₀TP3=82.03 mg/ml).

4.3.7. Određivanje sposobnosti neutralizacije O₂^{-•} radikala ekstraktima

Rezultati sposobnosti neutralizacije O₂^{-•} radikala, generisanog u sistemu ksantin/ksantin-oksidaža, ekstraktima uzoraka TP1, TP2 i TP3 prikazani su na *Histogramu 8*.



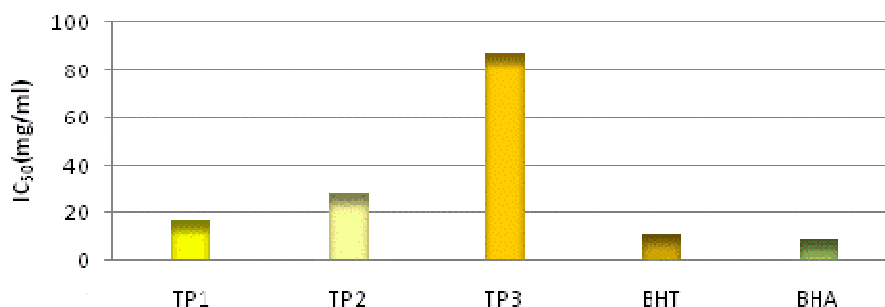
Histogram 8. Antioksidantni potencijal neutralizacije O₂^{-•} ekstraktima T. pratense

Iz priloženih rezultata se može videti da su etilacetatni, n-butanolni i vodeni ekstrakti uzoraka TP1, TP2 i TP3 pokazali najveću i međusobno sličnu „skevindžer“ aktivnost prema O₂^{-•} radikalu u odnosu na ostala tri ekstrakta. Od navedena tri ekstrakta posebno se ističu vodeni ekstrakti sva tri uzorka koji su ispoljili najbolji antioksidantni kapacitet

($IC_{50TP1H_2O}=13.93 \mu\text{g/ml}$, $IC_{50TP2H_2O}= 20.95 \mu\text{g/ml}$, $IC_{50TP3H_2O}= 23.92 \mu\text{g/ml}$). Kao što se može videti, ističe se vodeni ekstrakt uzorka TP1, gde je njegova sposobnost neutralizacije superoksid anjon radikala, približna onoj kod sintetskog antioksidanta, BHT ($IC_{50BHT} = 10.46 \mu\text{g/ml}$). Etarski i hloroformski ekstrakti uzoraka TP1, TP2 i TP3 su u poređenju sa BHT i BHA pokazali veoma slab potencijal za neutralizaciju $O_2^{\bullet-}$ radikala. Snažna antioksidantna aktivnost vodenih ekstrakata se može, između ostalog, objasniti time što su listovi crvene deteline, bogati izoflavonom formononetinom, koji poseduje snažnu antiradikalnu aktivnost prema superoksid anjon radikalu. Ovaj izoflavon se u gastrointestinalnom traktu metaboliše u ekvol, koji predstavlja još potentnije antioksidantno jedinjenje (Davies i sar., 1989).

4.3.8. Određivanje kapaciteta neutralizacije $O_2^{\bullet-}$ radikala etarskim uljima

Rezultati dobijeni merenjem kapaciteta neutralizacije $O_2^{\bullet-}$ radikala etarskim uljima uzoraka TP1, TP2 i TP3 prikazani su na *Histogramu 9*.

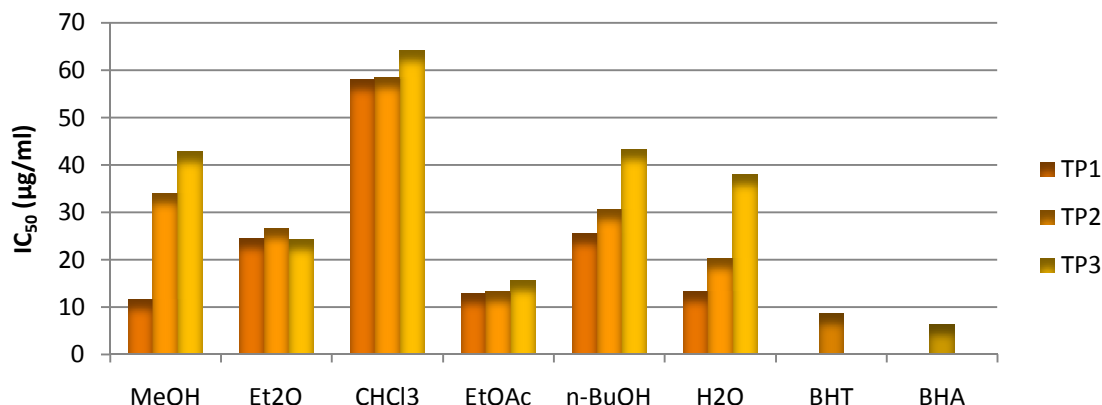


Histogram 9. Antioksidantni potencijal neutralizacije $O_2^{\bullet-}$ etarskim uljima *T. pratense*

Od ispitivanih etarskih ulja uzoraka TP1, TP2 i TP3 najbolju sposobnost inhibicije $O_2^{\bullet-}$ radikala pokazalo je etarsko ulje uzorka TP1 ($IC_{50TP1}=16.62 \text{ mg/ml}$), dok je etarsko ulje uzorka TP3 ($IC_{50TP3}=87.21 \text{ mg/ml}$) pokazalo značajno manju antiradikalnu aktivnost u odnosu na preostala dva uzorka etarskog ulja.

4.3.9. Određivanje sposobnosti neutralizacije NO^{\bullet} radikala ekstraktima

Rezultati sposobnosti neutralizacije NO^{\bullet} ekstraktima uzoraka TP1, TP2 i TP3 su prikazani na *Histogramu 10*.

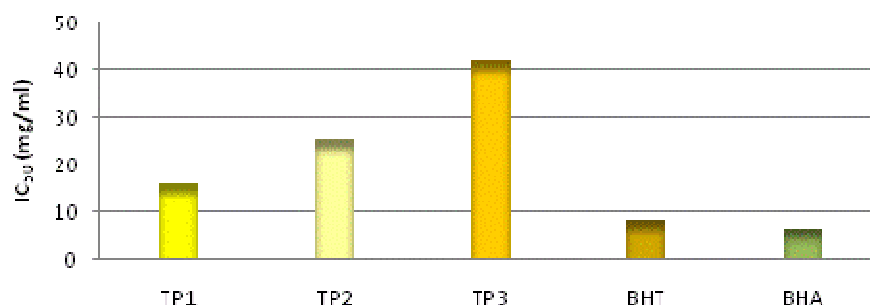


Histogram 10. Antioksidantni potencijal neutralizacije NO•ekstraktima *T. pratense*

Kao što se može videti iz dobijenih rezultata, svi ekstrakti pokazuju slabiju aktivnost od sintetskih antioksidanata BHT ($IC_{50BHT}=8.63 \mu\text{g/ml}$) i BHA ($IC_{50BHA}=6.31 \mu\text{g/ml}$). Značajno slabiju aktivnost pokazuju hloroformski ekstrakti sva tri uzorka ($IC_{50TP1CHCl_3}=58.00 \mu\text{g/ml}$, $IC_{50TP2CHCl_3}=58.46 \mu\text{g/ml}$, $IC_{50TP3CHCl_3}=64.08 \mu\text{g/ml}$). Najbolju sposobnost neutralizacije NO• radikala pokazuje metanolni ekstrakt uzorka TP1 ($IC_{50TP1MeOH}=11.69 \mu\text{g/ml}$). Međusobno sličnu antioksidantnu aktivnost pokazuju i etilacetatni ekstrakti sva tri uzorka, pri čemu je TP1, kao i u prethodnim testovima, pokazao najveću aktivnost ($IC_{50TP1EtOAc}=12.87 \mu\text{g/ml}$), ali takođe i vodeni TP1 ekstrakt ($IC_{50TP1H_2O}=13.33 \mu\text{g/ml}$).

4.3.10. Određivanje sposobnosti neutralizacije NO•radikala etarskim uljima

Na *Histogramu 11* prikazani su rezultati spektrofotometrijskog očitavanja neutralizacije NO• radikala etarskim uljima *Trifolium pratense* L.



Histogram 11. Antioksidantni potencijal neutralizacije NO•etarskima uljima *T. pratense*

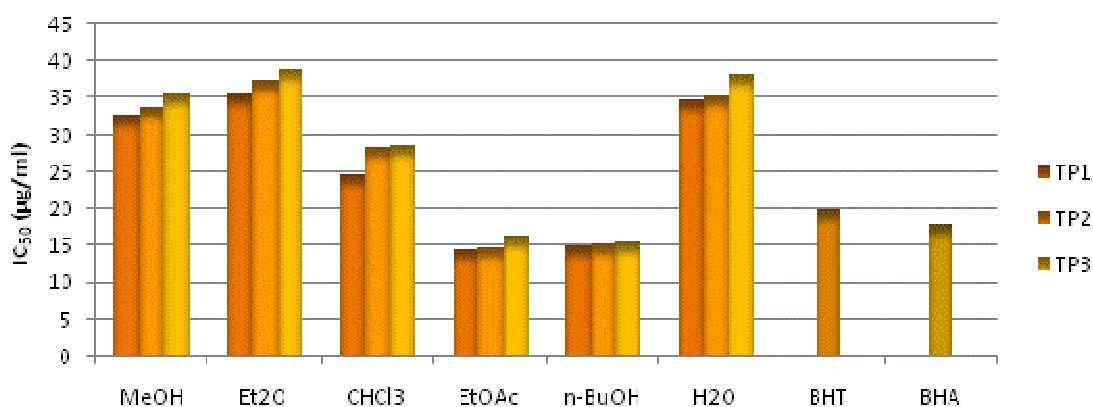
Na osnovu *Histograma 11* može se zaključiti da je najveći uticaj na neutralizaciju NO[•] radikala, tj. najbolji antiradikalni kapacitet među uzorcima TP1, TP2 i TP3, pokazalo etarsko ulje TP1, jer je njegova IC₅₀ vrednost (IC_{50TP1}=16.03 mg/ml) približna IC₅₀ vrednosti sintetskom antioksidantu BHT (IC_{50BHT}=8.46 mg/ml). Ostala dva uzorka pokazala su znatno manju antiradikalnu aktivnost, pri čemu se izdvaja uzorak P3 (IC₅₀=41.69 mg/ml).

Inhibicija NO[•] radikala etarskim uljima vrste *Trifolium pratense* L. je veoma značajna ukoliko joj dodamo i sposobnost neutralizacije superoksid anjon radikala. Naime, superoksid anjon radikal i azot-oksidi radikal zajedničkom reakcijom daju peroksinitril anjon (ONOO⁻) koji je veoma reaktivan. U tom pogledu naročito pogodnim se može smatrati etarsko ulje TP1 koje pokazuje kako sposobnost neutralizacije superoksid anjon radikala, tako i sposobnost neutralizacije azot-oksidi radikala.

4.3.11. Određivanje sposobnosti neutralizacije H₂O₂ ekstraktima

Rezultati sposobnosti neutralizacije H₂O₂ ekstraktima *T. pratense* su prikazani na *Histogramu 12*.

Pored ispitivanja kapaciteta neutralizacije slobodnih radikala (RSC), određivanje antioksidantne aktivnosti ispitivanih ekstrakata obuhvatilo je i određivanje sposobnosti uklanjanja H₂O₂. Uzimajući u obzir da nije radikal, vodonik peroksid u aerobnim organizmima predstavlja jedan od glavnih prooksidanata, delujući kao „okidač“ u produkciji drugih visoko reaktivnih kiseoničnih radikala (Mates i sar., 2000). On predstavlja izvor veoma toksičnog hidroksi radikala, naročito u prisustvu prelaznih metalnih jona kao što su gvožđe i bakar. Takođe, H₂O₂ prolazi kroz membrane i može polako oksidivati veliki broj ćelijskih komponenata.

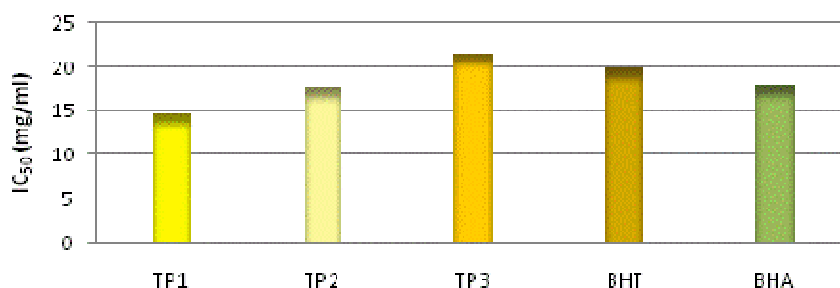


Histogram 12. Antioksidantni potencijal neutralizacije H₂O₂ ekstraktima *T. pratense*

Iz priloženih rezultata se vidi da su etilacetatni i n-butanolni ekstrakti *T. pratense* pokazali snažnu i približno istu antioksidantnu aktivnost, jer su njihove IC_{50} vrednosti manje od IC_{50} vrednosti sintetskih antioksidanata BHT ($IC_{50BHT}=19.96 \mu\text{g/ml}$) i BHA ($IC_{50BHA}=17.84 \mu\text{g/ml}$). Kao i u prethodnim antioksidantnim testovima, posebno se izdvajaju uzorci ekstrakata biljke u najnižoj fazi rasta, TP1 ($IC_{50TP1EtOAc}=14.55 \mu\text{g/ml}$ i $IC_{50TP1n-BuOH}=14.95 \mu\text{g/ml}$). U ovom slučaju hloroforsmki ekstrakti ($IC_{50TP1CHCl_3}= 24.75 \mu\text{g/ml}$, $IC_{50TP2 CHCl_3}= 28.39 \mu\text{g/ml}$, $IC_{50TP3 CHCl_3}= 28.73 \mu\text{g/ml}$) ne pokazuju značajno manju sposobnost za neutralizaciju vodonik-peroksida, kao što je to bio slučaj u prethodnim testovima. Ovo se može objasniti time da su nepolarna jedinjenja prisutna u hloroformskim ekstraktima odgovorna za ovako jak antioksidantni efekat. Značajnu ulogu u otklanjanju H_2O_2 imaju metilovani izoflavoni formononetin i biohanin A, kao i kvercetin koji radukujući vodonik-peroksid i druge radikale, igra ulogu u zaštiti ćelijskih membrana od oksidacije.

4.3.12. Određivanje sposobnosti neutralizacije H_2O_2 etarskim uljima

Na *Histogramu 13* prikazani su rezultati spektrofotometrijskog očitavanja sposobnosti neutralizacije H_2O_2 etarskim uljima vrste *Trifolium pratense* L.



Histogram 13. Antioksidantni potencijal neutralizacije H_2O_2 etarskim uljima *T. pratense*

Kao što se i može videti iz priloženih rezultata, najveći kapacitet neutralizacije H_2O_2 , pokazalo je kao i u prethodnim slučajevima etarsko ulje TP1 ($IC_{50TP1}=14.76 \text{ mg/ml}$), s tim što je ono pokazalo mnogo bolji antioksidantni kapacitet i od sintetskih antioksidanata BHT ($IC_{50BHT}=19.96 \text{ mg/ml}$) i BHA ($IC_{50}=17.84 \text{ mg/ml}$). Takođe, bolji antioksidantni potencijal pri neutralizaciji H_2O_2 ispoljilo je i etarsko ulje TP2 ($IC_{50TP2}=17.64 \text{ mg/ml}$), dok je etarsko ulje TP3 ponovo pokazalo najslabiji učinak ($IC_{50TP3}=41.63 \text{ mg/ml}$).

Značajne razlike u procesu neutralizacije H₂O₂ su takođe pronađene i u literaturi i zavise, kao i u slučaju neutralizacije DPPH radikala, od zrelosti biljke, biljnog materijala i načina pripreme etarskog ulja (Pedraza-Chaverri i sar., 2006).

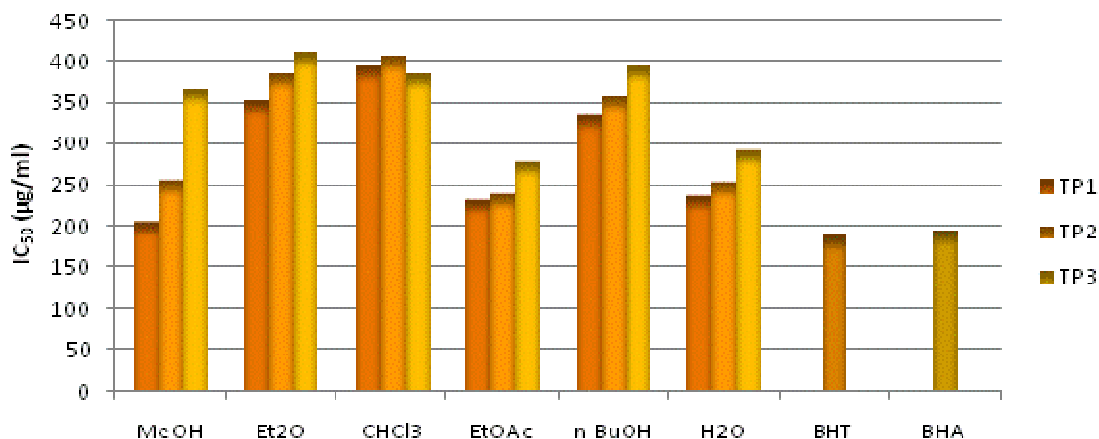
Poređenjem IC₅₀ vrednosti dobijenih tokom određivanja antiradikalskog delovanja ispitivanih etarskih ulja na nekoliko radikalskih oblika i vodonik-peroksid, uočljiva je zajednička karakteristika da etarsko ulje ispitivane biljne vrste *Trifolium pratense* L. u fazi rasta od 30 cm (TP1), pokazuje značajno bolji antioksidantni kapacitet od ostala dva etarska ulja, tj. biljki u fazi rasta od 50 cm i na početku butonizacije.

Dobijeni rezultati su najverovatnije posledica toga što vegetativni razvoj biljke, u ovom slučaju, a u ostalim slučajevima i drugi faktori, veoma utiču na hemijski sastav etarskog ulja biljke. U našem slučaju to znači da etarsko ulje izolovano iz biljke koja je u svom najnižem stepenu razvića, pokazuje najbolju antioksidantnu aktivnost, što je verovatno posledica prisustva većeg broja jedinjenja sa izraženijom sposobnošću za neutralizacijom slobodnoradikalskih i neradikalskih vrsta u odnosu na ostala dva ispitivana etarska ulja. Ovaj rezultat je u skladu sa podacima koji se mogu pronaći u literaturi (Zouari i sar., 2012).

4.3.13. Određivanje stepena inhibicije lipidne peroksidacije ekstraktima

Budući da peroksidacija lipida u organizmu pre svega predstavlja oksidativno oštećenje ćelijskih membrana, ali i svih ostalih sistema koji sadrže lipide (Halliwell, 2006), u određivanju celokupne antioksidantne aktivnosti različitih supstanci potrebno je, pored antiradikalskog delovanja, ispitati i njihov uticaj na procese lipidne peroksidacije. Međutim, uticaj različitih prirodnih proizvoda (izolovanih jedinjenja, ekstrakata i etarskih ulja) na intenzitet lipidne peroksidacije proučava se na velikom broju različitih supstrata (lipozomi, linoleinska kiselina, mikrozomi, različita masna ulja, homogenat jetre). Pojedini supstrati (lipozomi i linoleinska kiselina) se upotrebljavaju češće od drugih prvenstveno zbog jednostavnosti izvođenja metode, ali i zbog njihovog lakšeg dispergovanja u ispitivanom sistemu u odnosu na masno ulje, odnosno postupka izolacije mikrozoma i hepatocita. Zbog svega navedenog, određivanje uticaja ispitivanih ekstrakata na procese lipidne peroksidacije izvršeno je na lipozomima

Rezultati inhibicije lipidne peroksidacije (LPx) ekstraktima *T. pratense* prikazani su na *Histogramu 14*.

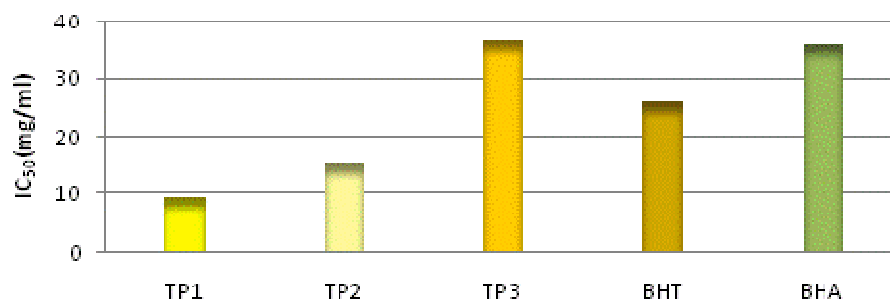


*Histogram 14. Antioksidantni potencijal inhibicije lipidne peroksidacije ekstraktima *T. pratense**

Sa prikazanog histograma može se zaključiti da je najveću sposobnost inhibicije Fe^{2+} /askorbat indukovane lipidne peroksidacije (LP) su pokazali metanolni ekstrakti uzoraka TP1, TP2 i TP3, pri čemu se svojom aktivnošću ističe uzorak TP1 ($\text{IC}_{50\text{TP1MeOH}}=204.66 \mu\text{g/ml}$), čiji je kapacitet inhibicije LP, približan kapacitetu sintetskog antioksidanta BHA ($\text{IC}_{50\text{BHA}}=196.08 \mu\text{g/ml}$). Približni rezultati su dobijeni i za etilacetatne i vodene ekstrakte sva tri uzorka, pri čemu su najveću antioksidantnu aktivnost pokazali etilacetatni ekstrakti sva tri uzorka ($\text{IC}_{50\text{TP1EtOAc}}=232.59 \mu\text{g/ml}$, $\text{IC}_{50\text{TP2EtOAc}}=240.35 \mu\text{g/ml}$ i $\text{IC}_{50\text{TP3EtOAc}}=277.91 \mu\text{g/ml}$).

4.3.14. Određivanje stepena inhibicije lipidne peroksidacije etarskim uljima

Rezultati spektrofotometrijskog očitavanja uticaja etarskih ulja uzoraka TP1, TP2 i TP3 na inhibiciju lipidne peroksidacije, u Fe^{2+} /askorbat sistemu indukcije, prikazani su na *Histogramu 15*.



*Histogram 15. Antioksidantni potencijal inhibicije lipidne peroksidacije etarskim uljima *T. pratense**

U testiranom modelu lipidne peroksidacije lipozoma, sva ispitivana etarska ulja su pokazala sposobnost inhibicije lipidne peroksidacije. Kao i u prethodnim *in vitro* testovima, ponovo se najaktivnijim pokazalo etarsko ulje TP1 jer je sa najmanjom koncentracijom postiglo IC_{50} ($IC_{50}=9.35$ mg/ml). I uzorak TP2 je ispoljio primetnu sposobnost inhibicije LPx ($IC_{50}=15.27$ mg/ml). Oba uzorka su pokazala bolju sposobnost inhibicije LPx od sintetskih antioksidanata BHT ($IC_{50}=26.15$ μ g/ml) i BHA ($IC_{50}=36.08$ mg/ml). Za razliku od ostalih, *in vitro* testova, i etarsko ulje P3 je pokazalo dobar efekat pri ispitivanju inhibicije LPx ($IC_{50}=36.80$ mg/ml).

U poslednje vreme, mnogi naučnici ispituju antioksidantne osobine drugih vrsta roda *Trifolium*, npr. Kolodziejczyk i sar. (2011) su ispitivali antioksidantne osobine klovamid-bogate frakcije dobijene iz nadzemnih delova biljke *Trifolium pallidum* u zaštiti krvnog plateleta i plazme od RNOS i ROS, izazvanih peroksinitritom (ONOO⁻). U ovom ispitivanju je ustanovljeno da prisustvo klovamid-bogatog ekstrakta *Trifolium pallidum* delimično inhibira ONOO-izazvanu karbonilaciju protein i nitraciju.

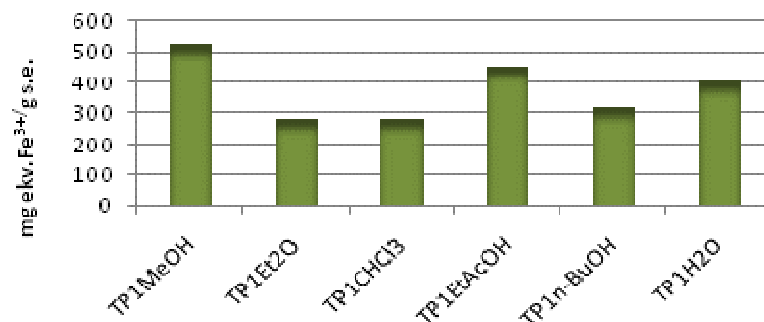
Osim toga, ustanovili su da *Trifolium pallidum* ekstrakt redukuje lipidnu peroksidaciju u plazmi, ali je antioksidantna aktivnost testiranog ekstrakta u krvnim zrnima bila manje efikasna. Malinowska i sar. (2012) su ispitivali *in vitro* oksidativne promene indukovane modelom hiperhomocisteinemije u prisustvu fenolnih frakcija izabranih vrsta deteline (*T. pallidum* i *T. scabrum*) i ustanovili su da testirane fenolne frakcije značajno inhibiraju oksidativni stres u plazmi koja je tretirana homocisteinom ili homocistein tiolaktonom. Fenolna frakcija *T. pallidum* i *T. scabrum* je, takođe, prouzrokovala značajnu redukciju plazma lipidne peroksidacije (određivanu pomoću nivoa tiobarbiturne kiseline) indukovanu po modelu hiperhomocisteinemije.

Na osnovu rezultata dobijenih određivanjem antiradikalske sposobnosti navedenih ekstrakata crvene deteline u sve tri faze rasta poređenjem sa antiradikalnim efektom sintetskih antioksidanata (BHT i BHA), može se zaključiti da etilacetatni i vodeni ekstrakti *T. pratense* poseduju značajan antioksidantni efekat. Predpostavlja se da ovakvom efektu doprinose mnogobrojni polarni flavonoidi koji su detektovani prilikom analize fenolnog profila biljke: daidzein, genistein, kamferol, kvercetin, apigenin, kafena, ferulna kiselina i ostala jedinjenja. Ova činjenica ukazuje takođe i na značaj odabira rastvarača pri ekstrakciji fenolnih komponenata iz crvene deteline. Etilacetat i voda su potencijalni rastvarači za dobijanje ekstrakata ove biljne vrste, koji se dalje mogu koristiti za različita biološka ispitivanja.

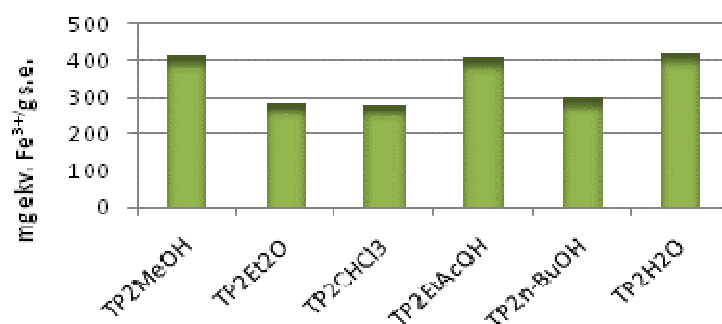
4.3.15. Određivanje ukupnog redukcionog potencijala ekstrakata

a) Modifikovana metoda po Yen i Chen-u

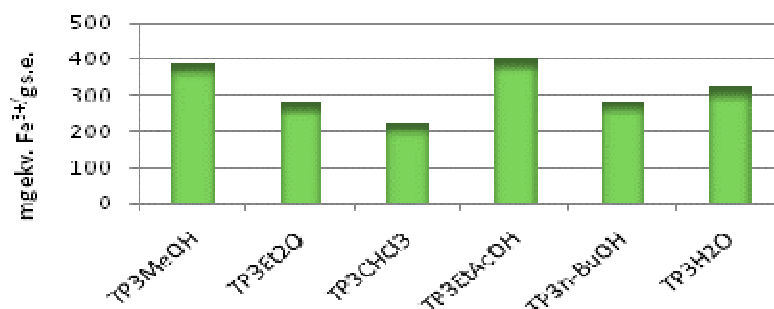
Rezultati određivanja redoks potencijala ekstrakata *T. pratense* prikazani su na *Histogramima 16, 17 i 18* i izraženi su kao masa redoks ekvivalenta jona Fe^{3+} u odnosu na masu suvog ekstrakta.



Histogram 16. Vrednosti ukupnog redukcionog potencijala ekstrakata uzorka TP1 (mg ekvivalenta Fe^{3+} /g suvog ekstrakta)



Histogram 17. Vrednosti ukupnog redukcionog potencijala ekstrakata uzorka TP2 (mg ekvivalenta Fe^{3+} /g suvog ekstrakta)

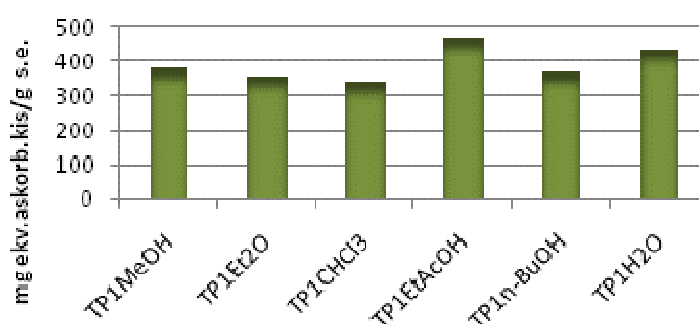


Histogram 18. Vrednosti ukupnog redukcionog potencijala ekstrakata uzorka TP3 (mg ekvivalenta Fe^{3+} /g suvog ekstrakta)

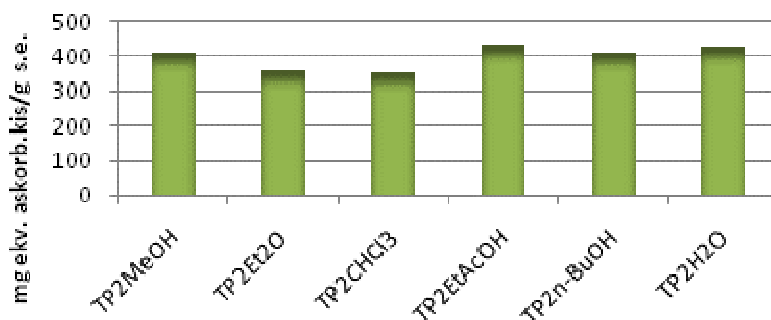
Sa *Histogramama 16, 17 i 18* se može videti da je metanolni ekstrakt uzorka TP1 pokazao najveći redukcionni potencijal (528.76 mg ekv. Fe^{3+} /g s.e.), dok je kod preostala dva uzorka (TP2 i TP3) najveći redukcionni potencijal primećen kod etilacetatnog i vodenog ekstrakta. Etarski i hloroformski ekstrakti sva tri uzorka su pokazali najmanji redukcionni potencijal.

b) FRAP (Ferric Ion Reducing Antioxidant Power) metoda

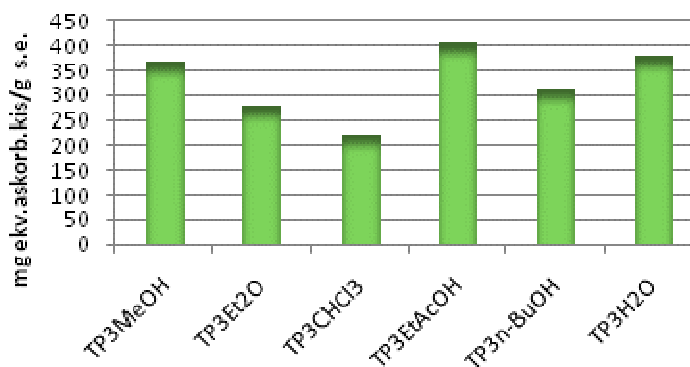
Rezultati redoks potencijala ekstrakata *T. pratense* dobijeni ovom metodom, prikazani su na *Histogramima 19, 20 i 21* i izraženi su kao masa redoks ekvivalenta askorbinske kiseline, u odnosu na masu suvog ekstrakta.



Histogram 19. Vrednosti ukupnog redukcionog potencijala ekstrakata uzorka TP1 (mg ekvivalenta askorbinske kiseline/g suvog ekstrakta)



Histogram 20. Vrednosti ukupnog redukcionog potencijala ekstrakata uzorka TP2 (mg ekvivalenta askorbinske kiseline/g suvog ekstrakta)



Histogram 21. Vrednosti ukupnog redukcionog potencijala ekstrakata uzorka TP3 (mg ekvivalenta askorbinske kiseline/g suvog ekstrakta)

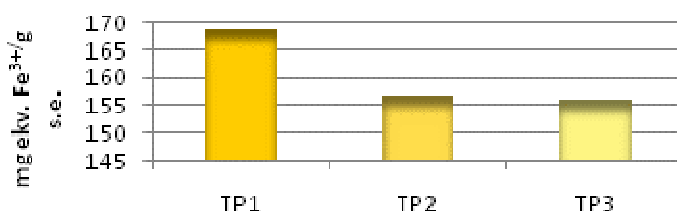
Iz prikazanih rezultata na *Histogramima 19, 20 i 21* može se zaključiti da su etilacetatni ($TP1_{EtAcOH} = 471.25$ mg ekv. askorb.kis./g s. e., $TP2_{EtAcOH} = 434.12$ mg ekv. askorb.kis./g s. e., $TP3_{EtAcOH} = 408.49$ mg ekv. askorb.kis./g s. e.) i vodeni ekstrakti sva tri uzorka ($TP1_{H_2O} = 435.24$ mg ekv. askorb.kis./g s.e., $TP2_{H_2O} = 431.46$ mg ekv. askorb.kis./g s. e., $TP3_{H_2O} = 378.16$ mg ekv. askorb.kis./g s.e.) pokazali najveći redukcionu potencijal, odmah zatim i njihovi metanolni ekstrakti. Za razliku od rezultata dobijenih FRAP metodom za ispitivanje redukcionog potencijala, n-butanolni ekstrakt sva tri uzorka pokazuju redoks potencijal sličan metanolnim ekstraktima uzoraka TP1, TP2 i TP3.

Ovakvi rezultati se, između ostalog, mogu objasniti time što hidroksilne grupe flavonoida zastupljenih u crvenoj detelini, mogu reagovati sa askorbinskom kiselinom, koja regeneriše flavonoid radikal (koji donirao vodonikov jon slobodnim radikalima) i time doprinosi njegovoj antioksidantnoj aktivnosti.

4.3.16. Određivanje ukupnog redukcionog potencijala etarskih ulja

a) Modifikovana metoda po Yen i Chen-u

Na osnovu kalibracione krive standardnog rastvora Fe^{2+} izračunate su vrednosti ukupnog redukcionog potencijala etarskih ulja uzoraka TP1, TP2 i TP3 koje su prikazane na *Histogramu 22*.

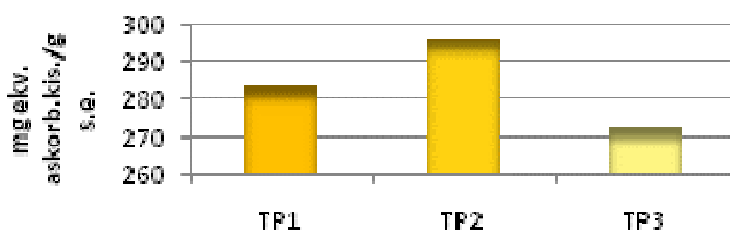


Histogram 22. Redukcioni potencijali etraskih ulja TP1, TP2 i TP3

Sa prikazanog histograma može se videti da su etarska ulja uzoraka TP1, TP2 i TP3 pokazala su približno iste vrednosti ukupnog redukcionog potencijala (156.17-168.71 mg ekv. Fe²⁺/g s.e.). Najmanju vrednost redukcionog potencijala pokazalo je etarsko ulje uzorka TP3 (156.17 mg ekvivalenta Fe²⁺/g s.e.), dok je najveću vrednost imalo ulje P1 (168.71 mg ekv. Fe²⁺/g s.e.).

b) FRAP (*Ferric Ion Reducing Antioxidant Power*) metoda

Na osnovu kalibracione krive standardnog rastvora askorbinske kiseline izračunate su vrednosti ukupnog redukcionog potencijala etraskih ulja uzoraka TP1, TP2 i TP3 koje su prikazane na *Histogramu 23*.



Histogram 23. Redukcioni potencijali etraskih ulja TP1, TP2 i TP3

Kao i u prethodnom slučaju etarska ulja P1, P2 i P3 pokazala su približno iste vrednosti ukupnog redukcionog potencijala (272.53-296.22 mg ekv. askorb.k./g s. e.). Međutim, u ovom slučaju nešto višu vrednost ukupnog redukcionog potencijala pokazalo je etarsko ulje TP2 (296.22 mg ekv. askorb.k./g s. e.), dok je najmanju vrednost imalo ulje TP3 (272.53 mg ekv. askorb.k./g s. e.).

Na osnovu rezultata dobijenih određivanjem ukupnog redukcionog potencijala etraskih ulja uzoraka *T. pratense*, može se zaključiti da, kao i u slučaju neutralizacije slobodnih radikala, etarska ulja uzoraka biljke u nižem ontogenetskom razvoju pokazuju bolju antioksidantnu aktivnost. Ovakvi rezultati su u skladu sa literaturnim podacima (Tonceri i sar., 2009).

Ispitivanjem antioksidantnog potencijala ekstrakata TP1, TP2 i TP3, primenom gore pomenutih testova, generalno se može zaključiti: (a) najveći antiradikalni, tj. antioksidantni potencijal pokazuju polarniji, metanolni, etilacetatni i vodeni ekstrakti uzoraka TP1, TP2 i TP3; (b) uzorak biljne vrste *T. pratense* u najnižoj fazi rasta (TP1) pokazuje najveći antioksidantni (antiradikalni) efekat. Ove dve činjenice se mogu objasniti na nekoliko načina. Polarniji ekstrakti uzoraka TP1, TP2 i TP3 sadrže veću količinu fenolnih komponenti koje doprinose antioksidantnoj aktivnosti. Takođe antiradikalna, odnosno antioksidantna aktivnost ekstrakata TP1, TP2 i TP3 je u korelaciji sa strukturom fenolnih komponenti detektovanih u njima i zavisi od faze rasta same biljke (Kaurinovic i sar., 2012). Povećanju stabilnosti formiranja fenoksil radikala, pre svega, doprinosi delokalizacija elektrona kao i postojanje više rezonantnih strukturnih formi. Istražujući strukturu flavonoida, došlo se do zaključka da su tri faktora važna za njihovu biološku i antiradikalnu aktivnost: a) *o*-dihidroksi funkcionalna grupa na B prstenu; b) 2,3-dvostruka veza konjugovana sa 4-okso funkcijom, koja je odgovorna za delokalizaciju B prstena; i c) dodatno prisustvo 3- i 5-hidroksilne grupe koje poseduju maksimalnu sposobnost neutralizacije slobodnih radikala. Povezanost između povećane hidroksilacije i povećane antioksidantne aktivnosti flavonoida je nađena u različitim lipidnim sistemima kao što su ulja i lipozomi. Takođe, vicinalne diolne grupe kod fenolnih kiselina protokatehinske, 2,5-dihidroksibenzoeve, *p*-hidroksibenzoeve i kafene i kumarina, eskuletina, prisutnih u metanolnim ekstraktima uzoraka TP1, TP2 i TP3, pokazuju značajnu antiradikalnu aktivnost (Bors i sar., 1990).

Sposobnost nekih flavonoida da helatiraju jone prelaznih metala, sprečava formiranje slobodnih radikalnih vrsta. Oni neutrališu lipid-alkoksil i lipid-peroksil radikal, generišu α -tokoferol redukujuću α -tokoferol radikal i time sprečavaju lipidnu peroksidaciju.

Hidroksilacija B-prstena je najznačajniji parameter u određivanju antiradikalne aktivnosti. Hidroksilne grupe na B prstenu doniraju vodonikov jon ili elektron hidroksil, peroksil i peroksinitril radikal, stabilišući ga. Hidroksilne grupe na 3. i 4. položaju B prstena prisutne kod apigenina, luteolina, kamferola, rutina, naringenina, detektovanih u metanolnim ekstraktima *T. pratense*, povećavaju inhibiciju lipidne peroksidacije. Ovakva struktura je odlika flavonoida koji su potentni skevindžeri peroksil-, superoksid anjon radikala i peroksinitrita. Flavonoidi koji imaju hidroksilnu grupu na 5. i 7. položaju A prstena, kao što je slučaj kod genisteina i daidzeina detektovanih u uzorcima TP1, TP2 i TP3, takođe pokazuju značajan antioksidantni efekat. Slobodna hidroksilna grupa na 3.

položaju značajno utiče na antioksidantne osobine flavonoida. Visoki potencijal kamferola u inhibiciji oksidovanog stresa (indukovanog metalima ili drugim agensima), potiče upravo od pomenute hidroksilne grupe. Slobodne hidroksile grupe pomenutih flavonoida detektovanih u ekstraktima uzoraka *T. pratense* (TP1, TP2 i TP3) štite lipide ćelijskih membrane neutrališući hidroksil-, peroksil radikale, helatirajući bivalentne metalne jone i intereaguju sa askorbinskom kiselinom, koja može opet da redukuje nastali flavonoid radikal. Aglikoni daidzeina i genisteina pokazuju veći antioksidantni efekat od njihovih 7-O-glikozida. Zatim, glikozidacija 7-OH grupe flavona, luteolin-O-7-glukozida, koji je detektovan u uzorku TP2, redukuje antioksidantnu aktivnost u odnosu na njihove aglikone i zbog toga ekstrakt ovog uzorka pokazuje i manji antioksidantni efekat u odnosu na ekstrakt uzoraka TP1 u kome ovo jedenjenje nije detektovano. 7-O-glukozidacija dovodi do konformacionih promena u molekulu flavonoida, tj. do teže delokalizacije elektrona, a time se smanjuje sposobnost 7-O-hidroksilne grupe da donira atom vodonika (Burda i sar., 2001).

Nivo antioksidantne aktivnosti zavisi od genotipa, faze rasta, odnosno starosti biljke (Chirinos i sar., 2007). Odabir vremenskog perioda branja biljke je veoma važan zbog promene u antioksidantnoj aktivnosti ili sastavu bioaktivnih molekula koje se javljaju u toku njenog razvoja (Fu i sar., 2008).

Iz rezultata dobijenih ispitivanjem antioksidantnog potencijala biljke *T. pratense*, može se zaključiti da je biljka u najnižoj fazi rasti, tj. od 30 cm visine, pokazala najbolji antioksidantni kapacitet. Prethodno je pomenuto da koncentracija fenolnih komponenti zavisi, između ostalog, od ontogenetskog razvoja biljke, pa se može pretpostaviti da *T. pratense* u najnižoj fazi rasta sadrži i najveću količinu fenolnih, ali i drugih komponenti odgovornih za izražavanje njenog antioksidantnog potencijala. Ovaj podatak može biti važan pri korišćenju ove biljne vrste u ishrani, ali i pri daljim biološkim istraživanjima.

Situacija je slična i kod rezultata dobijenih ispitivanjem antioksidantne aktivnosti etarskih ulja uzoraka *T. pratense*. Poređenjem IC_{50} vrednosti dobijenih tokom određivanja antioksidantne aktivnosti ispitivanih etarskih ulja na nekoliko radikalskih oblika i vodonik-peroksid, uočljiva je zajednička karakteristika da etarsko ulje ispitivane biljne vrste *Trifolium pratense* L. faze rasta 30 cm (TP1), pokazuje značajno bolju "skevindžer" aktivnost od ostala dva uzorka etarskih ulja (TP2 i TP3), tj. osušenih listova biljke u fazi rasta od 50 cm i na početku butonizacije. Dobijeni rezultati su najverovatnije, posledica toga što vegetativni razvoj, i drugi faktori, veoma utiču na hemijski sastav etarskog ulja

biljke. U našem slučaju to znači da etarsko ulje izolovano iz biljke koja je u svom najnižem stepenu razvika pokazuje najbolju antioksidantnu aktivnost (Zouari i sar., 2012), što je verovatno posledica prisustva većeg broja jedinjenja sa izraženijim antiradikalnim kapacitetom u odnosu na ostala dva ispitivana uzorka etarskog ulja (TP2 i TP3).

Važno je napomenuti da do sada ne postoji nijedan navod naučne literature o antioksidantnoj aktivnosti etarskih ulja *Trifolium pratense* L., stoga su rezultati ove teze jedini izvor ovakvih podataka i predstavljaju doprinos daljim biološkim istraživanjima vezanim za ovu biljnu vrstu.

4.4. HEPATOPROTEKTIVNI EFEKAT ISPITIVANIH EKSTRAKATA *T. PRATENSE*

U prethodnom poglavlju, prikazani rezultati antioksidantnih aktivnosti pokazuju da su ekstrakti ispitivane biljne vrste, naročito etilacetatni i vodeni ekstrakti, efikasni u zaštiti tkiva i ćelija od oksidacionog stresa. Ipak, s obzirom na varijacije u pogledu antioksidantnih aktivnosti testiranih raznim *in vitro* modelima, neophodni su i *in vivo* testovi da bi se potvrdila antioksidantna aktivnost ispitivanih ekstrakata. *In vivo* testovi su neophodni i iz razloga što većina biljnih fenola podleže biotransformaciji u toku aktivnog metabolizma. Kao i u *in vitro* ispitivanjima, tako je dokazan visok stepen *in vitro* sposobnosti različitih oblika polifenola i flavonoida da neutrališu kiseonične slobodne radikale (Buttemeyer i sar., 2003; Furukawa i sar., 2003). Osim toga, široka i česta upotreba fitopreparata nameće potrebu za poznavanjem ne samo pozitivnog terapijskog efekta, već i bezbednosti njihove primene. Jedan od potencijalnih mehanizama akutnog i, mnogo češće, hroničnog oštećenja zdravlja i promene odgovora na konvencionalnu, ali i alternativnu terapiju je iscrpljivanje sistema primarne antioksidantne zaštite u organizmu.

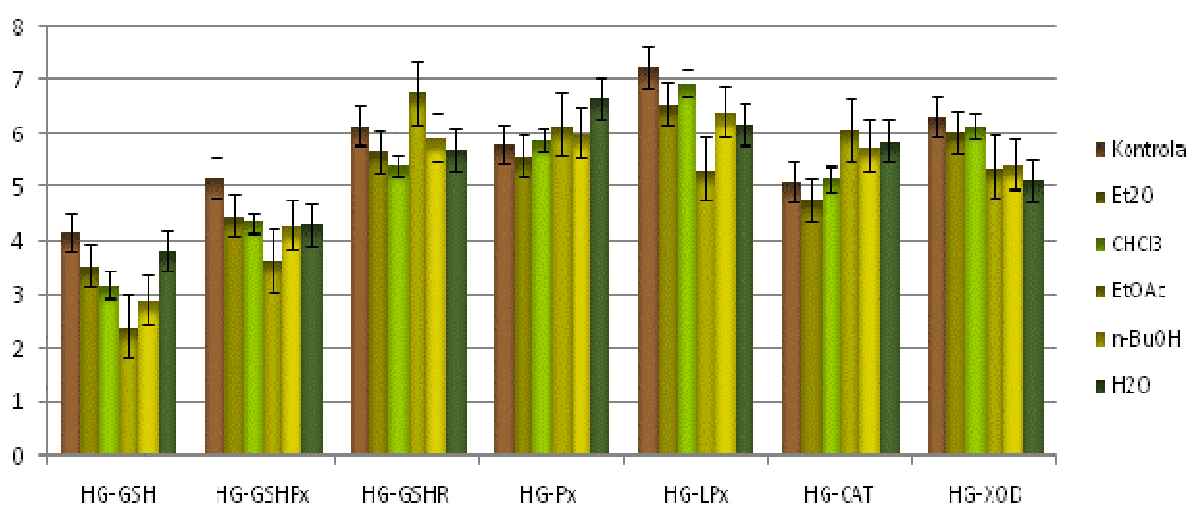
Najveći antioksidantni kapacitet prema ksenobioticima poseduje jetra, s obzirom na to da sve materije unesene u organizam u okviru metaboličkih promena ostvaruju izvesno dejstvo na ovaj organ. Pored toga, tokom svog metabolizma, različita jedinjenja koja čine sastavni deo fitopreparata mogu i sama biti izvor reaktivnih metabolita, potencirati njihovo stvaranje ili trošiti postojeće odbrambene i zaštitne mehanizme i tako dovesti do oštećenja tkiva (De Smet, 2004).

Na osnovu svega pomenutog, deo ove doktorske teze je bio dizajniran tako da se ispita uticaj različitih ekstrakata *T. pratense* na aktivnost antioksidantnih sistema (GSHPx, GSHR, Px, XOD, CAT), količinu endogenih antioksidanata (GSH), intenzitet peroksidacije membranskih lipida (LPx), kao i na oksidativni stres prouzrokovan

dejavstvom ugljentetrahlorida (CCl₄). Hepatotoksičnost ugljentetrahlorida se često koristi kao model za proučavanje oštećenja jetre, izazvanih slobodno radikalskim reakcijama (Cheesman, 1982). I u ovoj disertaciji, CCl₄ je korišćen za proveru potencijalnih protektivnih osobina ekstrakata *T. pratense*, pre i posle njegove administracije.

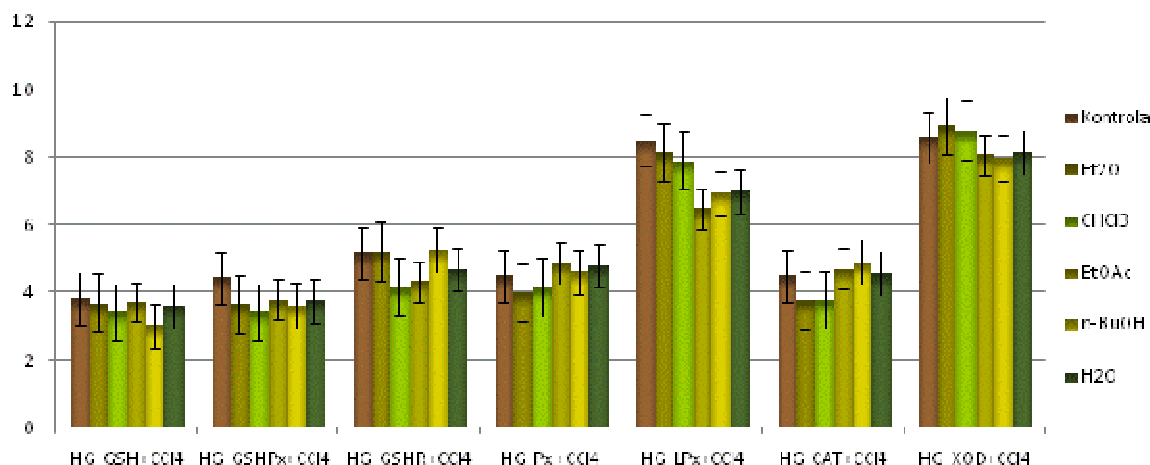
4.4.1. Hepatoprotektivni efekat na homogenatu jetre miševa

Rezultati delovanja ekstrakata *T. pratense* na određene biohemijske parametre u homogenatu krvi miševa prikazani su na *Histogramima 24 i 25* i u Prilogu, *Tabele 8.148.-8.149.*



Histogram 24. Uticaj ekstrakata *Trifolium pratense* na biohemijske parametre u homogenatu jetre miševa

$p \leq 0.05$, $n = 6$, $x \pm SD$. Sadržaj GSH je izražen u nmol GSH/mg proteina. Aktivnosti GSHPx, GSHR, Px, CAT i XOD su izražene u nmol/mg of protein min^{-1} . Intenzitet LPx je izražen u nmol malonilaldehida/mg proteina.



*Histogram 25. Uticaj ekstrakata *Trifolium pratense* na biohemijske parametre u homogenatu miševa tretiranih sa CCl_4*

$p \leq 0.05$, $n = 6$, $\bar{x} \pm \text{SD}$. Sadržaj GSH je izražen u $\text{nmol GSH/mg proteina}$. Aktivnosti GSHPx, GSHR, Px, CAT i XOD su izražene u $\text{nmol/mg of protein min}^{-1}$. Intenzitet LPx je izražen u $\text{nmol malonaldehida/mg proteina}$.

Svi ekstrakti *T. pratense* su smanjili sadržaj GSH (*Histogram 24*), ali tretman sa vodenim ekstraktom ne dovodi do statistički značajne promene u sadržaju GSH. Tretman sa CCl_4 dovodi do smanjenja sadržaja GSH u homogenatu jetre miševa ($3.81 \pm 0.17 : 4.17 \pm 0.21 \text{ nmol GSH/mg proteina}$). Ovo smanjenje je očekivano jer je poznato da je CCl_4 prooksidant, a smanjenje sadržaja GSH je jedan od odbrambenih puteva zaštite organizma od radikala (Younes i Siegers, 1981; Valenziela i sar., 1989). Kombinacija svih ekstrakata *T. pratense* sa CCl_4 dovodi do smanjenja sadržaja GSH u odnosu na životinje tretirane samo sa CCl_4 , ali samo tretman sa n-butanolnim ekstraktom u kombinaciji sa CCl_4 dovodi do statistički značajnog smanjenja. Ovo je najverovatnije posledica iscrpljivanja navedenog enzima usled prisustva veće količine sumpornih jedinjenja (<http://www.ars-grin.gov/duke>), jer je moglo doći do „preusmeravanja“ enzima na njih, pa je nakon prevođenja GSH u oksidovani oblik konsekvntno došlo i do pada u njegovoj količini. Pored toga, objašnjenje može ležati i u tome da pojedina sumporna jedinjenja u niskim koncentracijama imaju antioksidantno delovanje, dok u većim količinama mogu ispoljiti prooksidantni efekat (Lawson, 1998). Takođe, utvrđeno je da reakcijom određenih sumpornih jedinjenja (npr. alicin) i glutaciona nastaju disulfidi tipa S-alil-merkaptoglutationa, koji poseduju znatno slabije antioksidantno delovanje od osnovnih jedinjenja (Rabinkov i sar., 1998).

Svi ekstrakti *T. pratense* su smanjili aktivnost glutation peroksidaze (GSHPx), a najviše etilacetatni ekstrakt. GSHPx omogućava korišćenje GSH za zaštitu membranskih lipida od peroksidativnih oštećenja izazvanih slobodnim radikalima tako što vrši simultano prevođenje peroksi lipida u hidroksi jedinjenja uz oksidaciju GSH u GSSG. Smanjena aktivnost GSHPx za vreme tretmana pokazuje da ovaj sistem nema glavnu ulogu u otklanjanju H₂O₂. Tretman sa CCl₄ je povećao aktivnost GSHPx u odnosu na netretirane životinje ($6.41 \pm 0.27 : 5.18 \pm 0.26$ nmol/mg proteina x min⁻¹). U kombinaciji sa CCl₄, svi ekstrakti *T. pratense* su smanjili aktivnost GSHPx u odnosu na CCl₄-kontrolu.

Glutation reduktaza (GSHR) je enzim čija je glavna uloga redukcija oksidovanog glutationa (GSSG) u svoj redukovani, biološki aktivan oblik GSH uz učešće NADPH kao kofaktora (Arnao i sar., 1990). Ekstrakti *T. pratense* su različito uticali na aktivnost GSHR. Etilacetatni ekstrakt povećava aktivnost GSHR, dok je aktivnost GSHR statistički značajno smanjena pri tretiranju sa etarskim i hloroformskim ekstraktom. n-Butanolni i vodeni ekstrakti, takođe, smanjuju aktivnost GSHR, ali statistički neznatno. Tretman sa CCl₄ je smanjio aktivnost GSHR u odnosu na netretirane životinje ($5.17 \pm 0.21 : 6.16 \pm 0.28$ nmol/mg proteina x min⁻¹). Hloroformski, etilacetatni i vodeni ekstrakti su, posle intoksikacije sa CCl₄, statistički značajno smanjili aktivnost GSHR, dok tretman sa etarskim i n-butanolnim ekstraktom bitnije ne utiče na aktivnost GSHR.

U poređenju sa kontrolom, intenzitet LPx je statistički značajno smanjen pri tretmanu sa etarskim, etilacetatnim, n-butanolnim i vodenim ekstraktom *T. pratense*. Upotreba hloroformskog ekstrakta bitnije ne utiču na intenzitet LPx. Rezultat dobijen upotrebom etilacetatnog i vodenog ekstrakta je u skladu sa vrednostima dobijenim u eksperimentu sa lipozomima kao model sistemu, gde je utvrđeno da etilacetatni i vodeni ekstrakt pokazuju najbolje antioksidantne osobine, jer je IC₅₀ dostignuta sa najmanjom koncentracijom. Tretman sa CCl₄ dovodi do povećanja intenziteta LPx u poređenju sa netretiranim životinjama ($8.48 \pm 0.26 : 7.24 \pm 0.28$ nmol MDA/mg proteina). U kombinaciji etarskog i hloroformskog ekstrakta *T. pratense* sa CCl₄, dobijene vrednosti su slične kontroli što potvrđuje primarni efekat samog CCl₄. Ostala tri ekstrakta (etilacetatni, n-butanolni i vodeni) su u kombinaciji sa CCl₄ ispoljila protektivno dejstvo što ukazuje da imaju antioksidantni efekat tj. da sadrže veći sadržaj antioksidantnih jedinjenja. Poznato je da je lipidna peroksidacija značajan pokazatelj oksidativnog stresa, pa inhibiranje procesa LPx od strane ovih ekstrakata *T. pratense* ukazuje na njihove antioksidativne sposobnosti. S obzirom na to da *T. pratense* sadrži flavonoide (kvercetin, rutin, njihove derivate,

izo flavone, moguće je da efekat smanjenja LPx od strane ekstrakata *T. pratense* potiče od ovih flavonoida.

Osim mehanizma protektivne zaštite (preko helatiranja Fe^{2+}) moguće je da ova jedinjenja deluju kao hvatači (skevindžeri) OH^\bullet radikala, pri čemu sami prelaze u radikalsku formu koja može da se rezonantno stabilizuje (Rice-Evans i sar., 1996). Handa i saradnici (1986) su utvrdili da sekundarni biomolekuli tipa flavonoida, ksantona i tanina deluju kao protektivni agensi na jetru u prisustvu CCl_4 . Fenolne komponente prisutne u listu *T. pratense* su poznati kao snažni inhibitori CCl_4 -indukovane LP (Cholbi i sar., 1991). Flavonoidi mogu delovati u početnoj fazi lipidne peroksidacije (faza inicijacije) mešajući se u metabolizam CCl_4 , bilo hvatanjem nastalih radikala, bilo smanjenjem mikrozomalnih enzimskih sistema neophodnih za metabolizam CCl_4 (Sousa, 1985). U nastavku procesa, flavonoidi mogu hvatati lipoperokside i njihove radikale ili se ponašati kao helatni agensi za Fe^{2+} jon i na taj način stopirati Fentonovu reakciju (Rekka i sar., 1991). Na osnovu ovih rezultata, možemo zaključiti da su etilacetatni i vodeni ekstrakt *T. pratense* pokazali protektivni efekat u odnosu na CCl_4 -izazvanu lipidnu peroksidaciju.

Aktivnost Px je statistički značajno povećana pri tretiranju životinja sa vodenim ekstraktom *T. pratense*. Tretman sa ostala četiri ekstrakta bitnije ne utiče na aktivnost Px. Intoksikacija sa CCl_4 je statistički značajno smanjila aktivnost Px u odnosu na kontrolu. Sa *Histograma 25* se može uočiti da nijedan ekstrakt, izuzev etilacetatnog, u kombinaciji sa CCl_4 nije bitnije uticao na nivo aktivnosti ovog enzima. Kombinacija etilacetatnog ekstrakta sa CCl_4 povećava aktivnost Px. Ovakvo ponašanje navedenog ekstrakta se može objasniti činjenicom da biljni fenoli prisutni u njemu mogu predati elektron peroksidazama u reakcijama sa H_2O_2 (Sakihama i sar., 2002). Iako je poznata važna uloga peroksidaze u oksidativnom stresu, u literaturi se mogu naći podaci i o njenim drugim aktivnostima. Tako neke peroksidaze iz biljki se koriste u tretmanima fenolnih voda, tj. uklanjanja fenola, anilina i drugih ksenobiotika (Yu i sar., 1994).

Kod životinja koje su primale etilacetatni, n-butanolni i vodeni ekstrakt *T. pratense* aktivnost CAT u homogenatu jetre miševa je značajno povećana. Etarski i hloroformski ekstrakti nisu statistički značajno uticali na promenu aktivnosti CAT. Ugljentetrahloridni tretman je statistički značajno smanjio aktivnost CAT u odnosu na netretirane životinje ($4.48 \pm 0.176 : 5.11 \pm 0.19 \text{ nmol/mg proteina} \times \text{min}^{-1}$). Aktivnost CAT je smanjena samo u kombinaciji etarskog i hloroformskog ekstrakta *T. pratense* i CCl_4 , a povećana kod

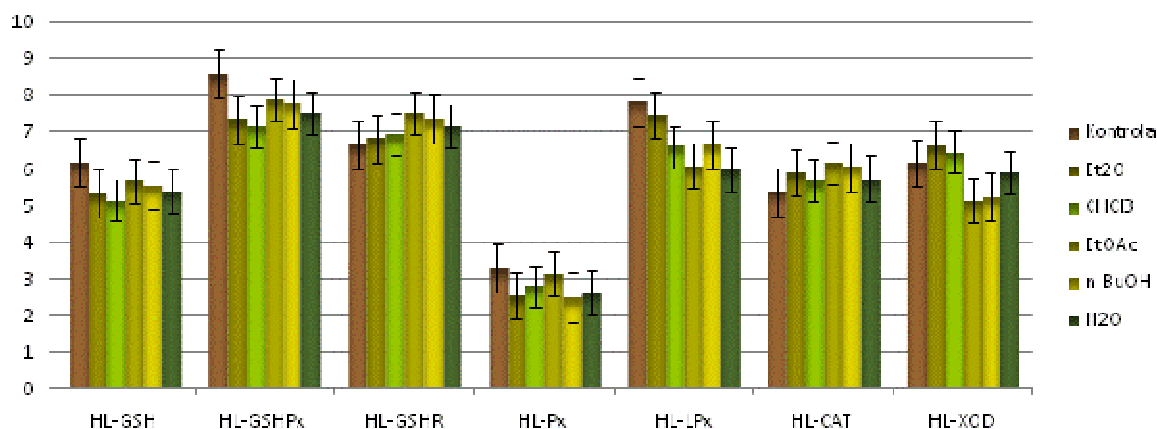
kombinacije etilacetatnog, n-butanolnog i vodenog ekstrakta i CCl₄, ali ne statistički značajno.

Aktivnost ksantin-oksidge (XOD) je statistički značajno smanjena pri tretmanu sa etilacetatnim, n-butanolnim i vodenim ekstraktom, dok ostala dva ekstrakta (etarski i hloroformski ekstrakt) takođe smanjuju aktivnost ovog enzima, ali nema statističke značajnosti. Aktivnost ovog enzima u jetri miševa je povećao tretman sa CCl₄ u odnosu na kontrolnu grupu. Svi ispitivani ekstrakti su nakon aplikacije CCl₄, u odnosu na netretirane životinje, povećali aktivnost XOD, enzima koji ima sposobnost da se u organizmu vezuje za glukozilaminoglikane na površini vaskularnih endotelnih ćelija i, ako ga ima u dovoljnoj količini, započne oksidativno oštećenje organa prenosom elektrona jedno- ili dvoelektronskim transfornim sistemom. Navedeni enzim katalizuje i hidroksilaciju N-heterocikličnih i aldehidnih supstrata, učestvuje u obrazovanju reaktivnih oblika kiseonika (Cadenas i Davies, 2000) i inicijaciji reakcije peroksidacije lipida (Chatterjee i Agarwal, 1998). XOD pokazuje niske vrednosti kod zdravih ljudi, a u slučaju povećanja nivoa uglavnom potiče iz jetre i pokazatelj je jetrenog oštećenja, pogotovo u ranim, akutnim fazama. To je enzim koji se u organizmu nalazi u dva oblika, kao NAD⁺ zavisna ksantin dehidrogenaza koja dominira in vivo i O₂-zavisna ksantin oksidaza. Poznato je da postojeća dva oblika XOD mogu preći jedan u drugi na dva načina, reverzibilno pomoću reaktivatora koji poseduju sulfhidrilne grupe i ireverzibilno proteolizom. S obzirom na navedeno, dobijeni rezultati povećanja nivoa aktivnosti XOD ne moraju direktno biti pokazatelj neželjenih efekata ispitivanih ekstrakata jer je veoma verovatno da je do promene u nivou aktivnosti došlo zbog prisustva veće količine sumpornih jedinjenja u ekstraktima (<http://www.ars-grin.gov/duke>). U poređenju sa CCl₄-kontrolom, aktivnost XOD je smanjena u kombinaciji etilacetatnog, n-butanolnog i vodenog ekstrakta i CCl₄, dok etarski i hloroformski ekstrakt nisu bitnije uticali na aktivnost XOD. Protektivni efekat etilacetatnog, n-butanolnog i vodenog ekstrakta u kombinaciji sa CCl₄ ogleda se u smanjenju aktivnosti XOD, enzima čija je povećana aktivnost vezana za produkciju superoksid anjon radikala. Smanjena aktivnost XOD verovatno potiče od prisutnih flavonoida, koji pored inhibitornog dejstva na aktivnost XOD deluju i kao skevindžeri superoksid anjon radikala (Cos i sar., 1998). Neka istraživanja ukazuju na vezu između povišene aktivnosti XOD i oksidativnog stresa u hipertenziji, kao i produkcije super oksid anjon radikala u diabetesu (Swei i sar., 1998). Alopurinol, inhibitor XOD poznat u

kliničkoj praksi, smanjuje oksidativni stress u dijabetesu intereagujući sa nekim peoksi radikalima, kao što je $\text{CCl}_3\text{OO}^\bullet$ (Desco i sar., 2002).

4.4.2. Hepatoprotektivni efekat na hemolizatu krvi miševa

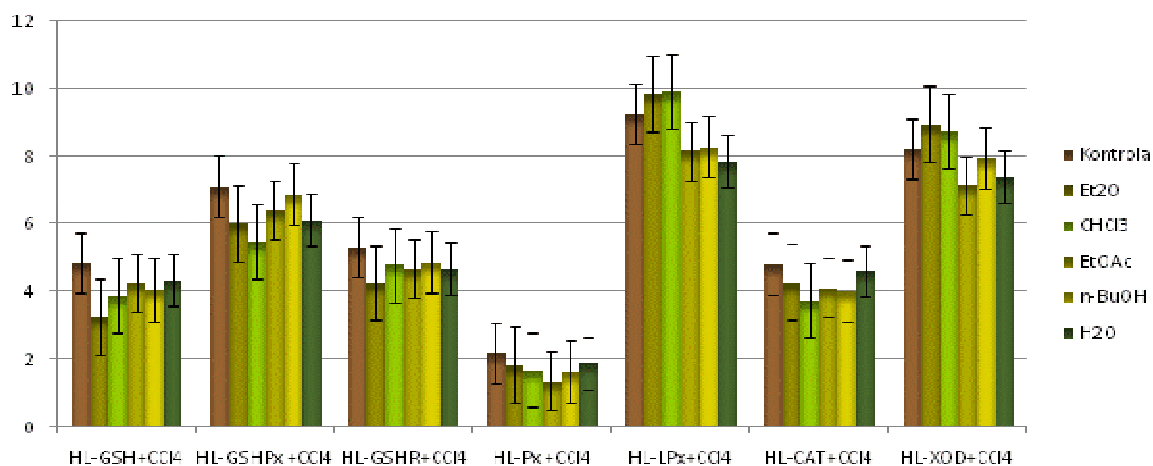
Rezultati delovanja ekstrakata *T. pratense* na određene biohemijske parametre u hemolizatu krvi miševa prikazani su na *Histogramima 26 i 27* i u Prilogu, *Tabele 8.150.-8.151.*



Histogram 26. Uticaj ekstrakata *Trifolium pratense* na biohemijske parametre u homolizatu jetre miševa

$p \leq 0.05$ $n = 6$; $x \pm \text{SD}$. Sadržaj GSH je izražen u nmol GSH/mL proteina.

Aktivnosti GSHPx, GSHR, Px, CAT i XOD su izraženi nmol/mL eritrocita min^{-1} . Intenzitet LPx je izrađen u nmol malonilaldehida/mL eritrocita.



Histogram 27. Uticaj ekstrakata *Trifolium pratense* na biohemijske parametre u homolizata miševa tretiranih sa CCl_4

$p \leq 0.05$ $n = 6$; $x \pm \text{SD}$. Sadržaj GSH je izražen u nmol GSH/mL proteina. Aktivnosti GSHPx, GSHR, Px, CAT i XOD su izraženi nmol/mL eritrocita min^{-1} . Intenzitet LPx je izrađen u nmol malonilaldehida/mL eritrocita.

Svi ekstrakti *T. pratense* smanjili su sadržaj GSH u hemolizatu krvi miševa (*Histogram 26*). Najveće smanjenje sadržaja GSH izazvano je upotrebom hloroformskog ekstrakta. Poređenjem vrednosti dobijenih za sadržaj GSH iz hemolizata krvi netretiranih i sa CCl₄ tretiranih životinja, vidi se da je tretman sa CCl₄ smanjio vrednost GSH ($6.17 \pm 0.17 : 4.84 \pm 0.27 \mu\text{mol GSH}/\text{dm}^3$ eritrocita). Smanjen sadržaj GSH kod životinja tretiranih sa CCl₄ je očekivan jer GSH, osim uloge u sprečavanju oksidativnog stresa, učestvuje i u konjugaciji i eliminaciji metabolita. Kombinacija ekstrakta sa CCl₄ još više smanjuje sadržaj GSH u odnosu na netretirane životinje i kontrolu. Na osnovu ovih rezultata možemo zaključiti da ekstrakti *T. pratense* nisu pokazali zaštitni efekat, jer je došlo do smanjenja sadržaja GSH u odnosu na CCl₄ tretirane životinje.

Aktivnost GSHPx u hemolizatu krvi miševa je smanjena pri upotrebi svih ekstrakata *T. pratense*. Slični rezultati su dobijeni i pri ispitivanju aktivnosti GSHPx u homogenatu jetre miševa. Tretman sa CCl₄ doveo je do smanjenja aktivnosti GSHPx u odnosu na netretirane životinje. Kao i u slučaju netretiranih životinja, kombinacija ekstrakata sa CCl₄ dovodi do dodatnog smanjenja aktivnosti ovog enzima. U kombinaciji sa CCl₄, najveće smanjenje aktivnosti GSHPx izaziva upotreba hloroformskog ekstrakta *T. pratense*.

Svi ekstrakti *T. pratense* su povećali aktivnost GSHR, dok kod etarskog i hloroformskog ekstrakta nije zapaženo statistički značajno povećanje. Do najvećeg povećanja aktivnosti GSHR dolazi pri tretmanu sa etilacetatnim ekstraktom. Tretman sa CCl₄ je smanjio GSHR u odnosu na netretirane životinje ($5.31 \pm 0.32 : 6.64 \pm 0.18 \text{ nmol}/\text{dm}^3 \text{ eritrocita} \times \text{min}^{-1}$). Aktivnost GSHR u kombinaciji sa CCl₄ je statistički značajno smanjena pri delovanju etarskog i etilacetatnog ekstrakta, dok ostala tri ekstrakta (hloroformski, n-butanolnog i vodeni ekstrakt) zadržavaju vrednost GSHR na nivou CCl₄-kontrola.

Svi ispitivani ekstrakti, osim etarskog ekstrakta, su doveli do značajnog smanjenja intenziteta LPx u hemolizatu krvi eksperimentalnih životinja. Na osnovu literaturnih podataka (Larson, 1988; Toda i sar., 1991) redukcija serumske LPx može biti posledica antioksidantne aktivnosti nekoliko klasa fenolnih komponenata (kafene i hlorogenske kiseline, flavonoida i biflavonoida, 1,3,6,7-tetrahidroksi-ksantona, i acilfloroglucinola). Cock i Samman (1996) (Cock i sar., 1996) su pokazali da kvercetin i rutin i njihovi glukozidi ispoljavaju jak inhibitorski efekat na LPx. Intoksikacija rastvorom CCl₄ dovodi do povećanja intenziteta LPx u odnosu na netretirane životinje ($9.23 \pm 0.25 : 7.81 \pm 0.29 \text{ nmol MDA}/\text{dm}^3$ eritrocita). Veoma bitno je naglasiti da je tretman sa CCl₄ povećao

intenzitet LPx i u homogenatu jetre miševa, i u hemolizatu krvi (*Histogram 27*). Međutim, to povećanje intenziteta LPx u homogenatu jetre miševa je mnogo manje od povećanja intenziteta LPx u hemolizatu krvi. Na osnovu ovih rezultata možemo zaključiti da je vreme potrebno za izvođenje eksperimenta suviše kratko da bi se jetra našla na “udaru”. Smanjenje intenziteta LPx zabeleženo je u grupama koje su primale kombinacije CCl₄ i etilacetatnog, n-butanolnog i vodenog ekstrakta. Ovi rezultati ukazuju na zaštitnu ulogu ova tri ekstrakta. Ostala dva ekstrakta (etarski i hloroformski ekstrakt) u kombinaciji sa CCl₄ povećavaju vrednost LPx u odnosu na CCl₄-kontrolu.

Svi ekstrakti *T. pratense* su smanjili aktivnost Px u hemolizatu krvi miševa, ali etilacetatni ekstrakt statistički neznajno. Tretman sa CCl₄ je dodatno smanjio aktivnost Px u odnosu na životinje koje su primale samo fiziološki rastvor. Kombinacija ekstrakata i CCl₄ dovodi do još većeg smanjenja aktivnosti Px. Zanimljivo je primetiti da je tretman sa etilacetatnim ekstraktom i CCl₄ doveo do najvećeg smanjenja aktivnosti Px. Dobijeni rezultat nije u skladu sa rezultatima dobijenih pri tretmanu sa čistim etilacetatnim ekstraktom. Na osnovu toga možemo pretpostaviti da je došlo do negativnog sinergizma između radikalskog metabolizma CCl₄ i sekundarnih biomolekula koji se nalaze u etilacetatnom ekstraktu *T. pratense*.

Aktivnost CAT je povećana pri tretiranju sa svim ekstraktima *T. pratense*, ali povećanje nivoa CAT pri tretmanu sa etarskim, hloroformskim i vodenim ekstraktom nema statističku značajno. Najveće povećanje aktivnosti CAT izazvao je tretman sa etilacetatnim ekstraktom. S obzirom na to da je uloga katalaze razlaganje vodonik peroksida, možemo zaključiti da su komponente prisutne u etilacetatnom ekstraktu aktivirale razlaganje nastalog vodonik peroksida. Tretman sa CCl₄ je statistički neznajno smanjio aktivnost CAT u odnosu na netretirane životinje. Kao i prilikom ispitivanja aktivnosti Px, i u ovom slučaju dobijamo zanimljiv rezultat pri tretmanu sa čistim etilacetatnim ekstraktom uočeno je najveće povećanje aktivnosti CAT, dok je tretman etilacetatni ekstrakt + CCl₄ doveo do prilično velikog smanjenja aktivnosti ovog enzima. I u ovom slučaju možemo pretpostaviti da je došlo do negativnog sinergizma između radikalskog metabolizma CCl₄ i sekundarnih biomolekula koji se nalaze u etilacetatnom ekstraktu *T. pratense*.

Aktivnost XOD u hemolizatu krvi je povećana pri tretiranju životinja sa etarskim i hloroformskim, dok ostala tri ekstrakta (etilacetatni, n-butanolni i vodeni ekstrakt) smanjuju aktivnost XOD. Najveće smanjenje aktivnosti XOD izaziva tretman sa

etilacetatnim ekstraktom. Ugljentetrahloridni tretman je uticao na povećanje aktivnosti XOD u odnosu na netretirane životinje. Slični rezultati dobijeni su i prilikom kombinacije ekstrakata i CCl₄. Ponovo dva nepolarna ekstrakta, etarski i hloroformski, dovode do povećanja aktivnosti XOD. Ovaj put to povećanje je statistički značajno. Prema današnjim istraživanjima, smatra se da je povećanje aktivnosti XOD povezano sa oksidativnim stresom i produkcijom slobodnih radikala (Jang i sar., 2008). Na osnovu ovih rezultata, može se zaključiti da je visok nivo XOD u hemolizatu krvi miševa tretiranih sa ova dva ekstrakta *T. pratense* verovatno posledica oštećenja jetre, te da su ovi ekstrakti pokazali hepatotoksični efekat (Gileri sar., 1975). Pojačana produkcija superoksid anjon radikala i vodonik peroksida je verovatno uticala na pojačanu aktivnost XOD (Descio i sar., 2002).

4.5. ISPITIVANJE ESTROGENE, ANTIESTROGENE I CITOTOKSIČNE AKTIVNOSTI EKSTRAKATA *T. PRATENSE*

Crvena detelina je jedna od 300 biljaka koje pokazuju estrogenu aktivnost.

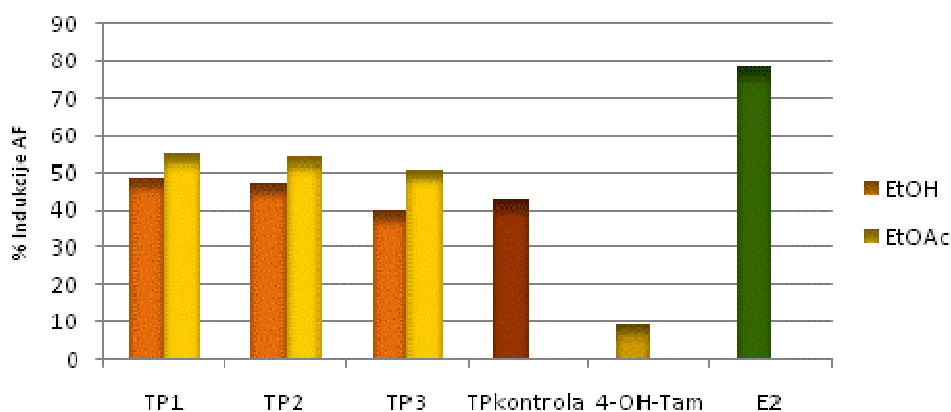
Da bi se ispitala estrogena aktivnost *T. pratense* u ovom istraživanju je korišćen sistem Ishikawa ćelijskih linija. Liniju humanih Ishikawa ćelija su u svom istraživanju prvi put upotreбили Nishada i saradnici (1985).

Ishikawa ćelije su glandularne epitelne ćelije ćelije endometrijalnog humanog adenokarcinoma. Ove ćelije reaguju na estrogene ili antiestrogene komponente pri fiziološkim koncentracijama. Vezivanjem estrogena za estrogene/antiestrogene za receptore ćelijskih membrane stimuliše/inhibira se aktivnost alkalne fosfataze u Ishikawa ćelijama. Test indukcije alkalne fosfataze se bazira na merenju brzine pretvranja *p*-nitrofenola iz *p*-nitrofenolfosfata. Za ispitivanje antiestrogene aktivnosti, odnosno inhibicije alkalne fosfataze korišćen je sintetski antiestrogeni lek (5 μM) uz prisustvo egzogenog estrogena (0.5 nM).

T. pratense sadrži izoflavone (fitoestrogene) kao što su: daidzein, genistein, biohanin A i formononetin, kao i njihove derivate, koji doprinose estrogenu aktivnosti biljke. Estrogenu aktivnost fitoestrogena zavisi od njihove interakcije sa estrgeon receptorima ERα i ERβ. Strukturno su slični 17β-estradiolu i zato se vezuju i aktiviraju estrogen receptore. Genistein i daidzein detektovani u uzorcima TP1, TP2 i TP3 se vezuju za receptore ERβ, dok se 17β-estradiol vezuje za ERα. Kao što je i prethodno pomenuto u ovoj tezi, navedeni fitoestrogeni poseduju potencijalni terapijski značaj u lečenju

poremećaja koji se javljaju u menopauzi i postmenopauzi, neurodegenerativnih i kardiovaskularnih oboljenja, kao i hormon-zavisnih kancera. Sve ove promene su povezane sa nedostatkom estrogena, zbog toga se pribegava hormonskoj zamenskoj terapiji koja može da smanji ili da bude prevencija u nastanku pomenutih poremećaja i tegoba. Međutim, neka naučne studije ukazuju da zamenska terapija sintetskim estrogenima povećava rizik od nastanka endometrijalnog i kancera dojke zbog neselektivne etrogene aktivnosti (de Lignieres i sar., 2002; Fernandez i sar., 2003; Gambacciani i sar., 2003; Beck i sar., 2005). Iz toga razloga poslednjih godina sve veći broj žena pribegava lečenju prirodnim lekovima kao alternativnoj terapiji.

Estrogena aktivnost ekstrakata *T. pratense*, predstavljena kao procenat indukcije alkalne fosfataze u Ishikawa ćelijama, u odnosu na estradiol (koji indukuje alkalnu fosfatazu) kao kontrolu, prikazana je na *Histogramu 28* i u Prilogu, *Tabela 8.152*.



Histogram 28. Estrogena aktivnost etanolnih i etilacetatnih ekstrakata TP1, TP2 i TP3 na Ishikawa ćelijskoj liniji

U naučnoj literaturi najbrojniji su upravo podaci o estrogenoj aktivnosti *Trifolium pratense* L., tj. u literaturi postoji najviše podataka vezanih za ispitivanje ove osobine crvene deteline. Ovom metodom ispitana je aktivnost etanolnih i etilacetatnih ekstrakata uzoraka TP1, TP2 i TP3.

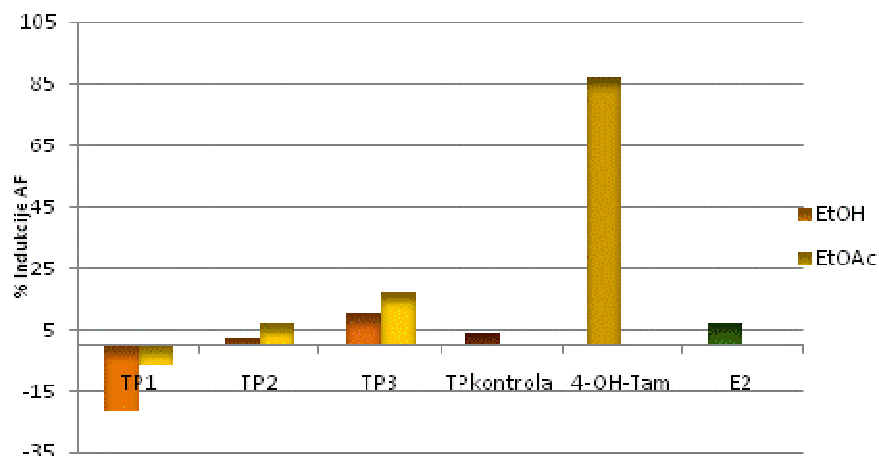
Sa *Histograma 28* se može primetiti da sintetski estrogen, estradiol, pokazuje najveću sposobnost indukcije alkalne fosfataze (78.39%). Što se tiče ekstrakata ispitivanih uzoraka *T. pratense*, etilacetatni i etanolni ekstrakt TP1 uzorka pokazuju najbolju estrogenu aktivnost (TP1_{EtOAc}=55.32%; TP1_{EtOH}=48.91%). Međutim, uopšteno gledajući, etilacetatni ekstrakti su pokazali bolju estrogenu aktivnost u odnosu na etanolne ekstrakte. Ovakvi rezultati još jednom potvrđuju efikasnost etilacetata kao pogodnog estragensa u

izolaciji izoflavona. Kako je u eksperimentu ispitivana estrogena aktivnost *T. pratense* u različitim fazama rasta (TP1, TP2 i TP3), iz dobijenih rezultata se može zaključiti da je najveću sposobnost indukcije alkalne fosfataze, u odnosu na estradiol, imala biljka u najnižoj fazi rasta, TP1. Ovakva estrogena aktivnost određena u Ishikawa ćelijama je u korelaciji sa sadržajem izoflavona detektovanih LC/MS-MS analizom u uzorcima TP1, TP2 i TP3, jer je sadržaj daidzeina i genisteina najveći u metanolnom ekstraktu uzorka TP1. Ovaj podatak je značajan prilikom odabira vremenskog perioda branja biljke u svrhu njenog korišćenja kao medicinskog suplementa, odnosno fitopreparata. Smatra se da daidzein i genistein najviše doprinose estrogenu aktivnosti u Ishikawa ćelijama, jer se druga dva izoflavona, formononetin i biohanin A, ne mogu demetilovati u daidzein i genistein u ovim ćelijama (Booth i sar., 2006)

Ispitujući estrogenu aktivnost biljnih suplemenata i biljaka *in vitro* testovima, koristeći ćelijske kulture, često se ne računa na metaboličke procese izoflavona koji se dešavaju *in vivo* uslovima. Tako na primer, formononetin i biohanin A se *in vivo* metabolički konvertuju u daidzein i formononetin, dok se daidzein dalje može transformisati u ljudskom organizmu u ekvol koji je takođe pokazuje visoku estrogenu aktivnost (Setchell i sar., 2002). Dakle, ekvol je prisutan samo kao metabolit u ljudskoj crevnoj flori, zato se ne može detektovati ni izmeriti u biljci. Takođe, drugi izoflavoni koji su prisutni u ekstraktima crvene deteline, kao što je prunetin, mogu se metabolisati u genistein, jedan od najdominantnijih fitoestrogena ove biljke (Hu i sar., 2003).

Iz gore navedenog, određivanje biološke aktivnosti crvene deteline *in vitro* testovima može biti problematično zbog kompleksnosti metaboličkih puteva u njoj prisutnih izoflavona. Ovo treba imati na umu kada se ispituje biološka, tj. estrogena aktivnost crvene deteline, ali pri pravljenju suplemenata koji trebaju da se budu biološki standardizovani.

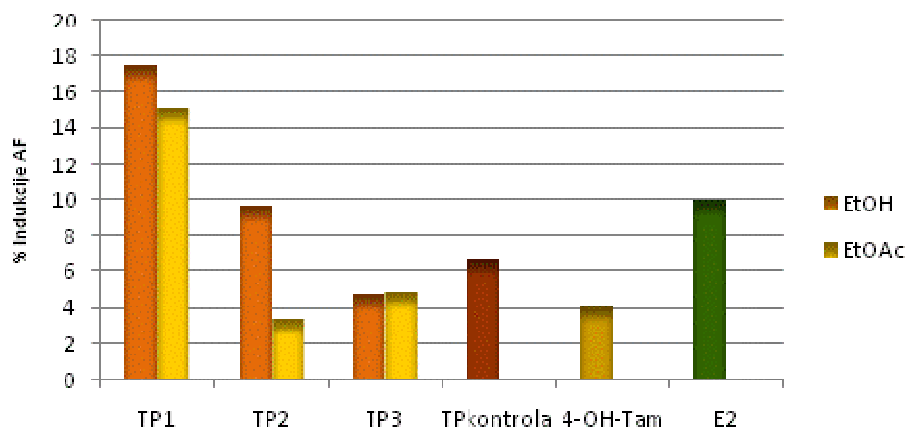
Na *Histogramu 29* i u Prilogu, *Tabela 8.153.*, prikazani su rezultati antiestrogene aktivnosti ekstrakata *T. pratense*, pri čemu je korišćen poznati sintetski antiestrogen tamoksifen (za inhibiciju AF), kao kontrola.



Histogram 29. Anitestrogena aktivnost etanolnih i etilacetatnih ekstrakata TP1, TP2 i TP3 na Ishikawa ćelijskoj liniji

Iz prikazanih rezultata može se videti da nijedan od ekstrakata testiranih uzoraka *T. pratense* ne pokazuje estrogenu aktivnost, odnosno procenat indukcije alkalne fosfataze je daleko ispod 50%. Međutim, kod etanolnog ekstrakta uzorka TP1 i etilacetatnog ekstrakta uzorka TP3 može se uočiti odstupanje od ostalih rezultata. Naime, kod ova dva ekstrakta dobijene su negativne vrednosti indukcije alkalne fosfataze (u prisustvu estradiola i tamoksifena). Ove negativne vrednosti ukazuju da su jedinjenja, prisutna u ovim uzorcima, više indukovala ekspresiju alkalne fosfataze, nego u slučaju kada je estradiol sam prisutan. Drugim rečima, pretpostavlja se da pomenuta jedinjenja “pojačavaju” aktivnost estradiola. Ovaj fenomen se može objasniti alosternim efektom, tj. da jedan ligand (jedinjenje prisutno u ispitivanom uzorku), pojačava dejstvo drugog liganda (estradiola). Njegov uzrok i poreklo nisu do danas razjašnjeni, tj. u potpunosti istraženi.

Na *Histogramu 30* i u Prilogu, *Tabela 8.154.*, prikazani su rezultati dobijeni ispitivanjem citotoksičnog kapaciteta ekstrakata *T. pratense*.



Histogram 30. Citotoksičnost etanolnih i etilacetatnih ekstrakata TP1, TP2 i TP3 na Ishikawa ćelijskoj liniji

Ispitivanje citotoksičnosti ekstrakata u slučaju kada se određuje estrogena i antiestrogena aktivnost je veoma značajno. Naime, ukoliko ispitivani ekstrakti pokazuju citotoksičnu aktivnost, može doći do “maskiranja” estrogene ili antiestrogene aktivnosti koja se želi ispitati. Tako na primer, ukoliko ekstrakti pobiju sve ćelije, to se može protumačiti kao posledica njihove antiestrogene aktivnosti, a u stvari nije. Zbog toga se često javljaju problemi pri tumačenju ovakvih rezultata.

Kao što se može videti, nijedan od ispitivanih etanolnih i etilacetatnih ekstrakata uzoraka TP1, TP2 i TP3 nije pokazao citotoksičnu aktivnost prema Ishikawa ćelijama, stoga se sa većom sigurnošću mogu utvrditi preostale dve (gore pomenute) aktivnosti.

4.6. ISPITIVANJE ANTIMIKROBNE AKTIVNOSTI ETARSKIH ULJA I EKSTRAKATA *T. PRATENSE*

Antibakterijsko dejstvo etarskih ulja i ekstrakata crvene deteline ispitano je na 6 laboratorijskih sojeva Gram-pozitivnih (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus*) i Gram-negativnih bakterija (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis*) primenom disk difuzionog testa koji se koristi za preliminarno određivanje antimikrobne aktivnosti.

4.6.1. Ispitivanje antibakterijske aktivnosti etarskih ulja

Rezultati ispitivanja antimikrobne aktivnosti etarskih ulja *T. pratense* na sojeve bakterija *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* i *Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus* i *Pseudomonas aeruginosa* dobijeni disk difuzionom metodom prikazani su u Prilogu, *Tabela 8.155*.

Većina etarskih ulja različitih biljnih vrsta poseduju antimikrobnu aktivnost zbog njihovog liposolubilnog karaktera, što im omogućava lak prolaz kroz fosfolipidni dvosloj ćelijske membrane mikroorganizma. Kao što se može videti u Prilogu iz *Tabele 8.155*, nijedan od uzoraka etarskog ulja *T.pratense* ne pokazuju antimikrobno dejstvo. Iako je poznato da monoterpeni kao što su β -mircen, p-cimen, l-limonen i dihidrokarvon koji su detektovani u etarskom ulju uzorka TP1, poseduju potencijalnu antimikrobnu aktivnost, ovo etarsko ulje ipak ne pokazuje antimikrobnu sposobnost (Cristani i sar., 2007). Ovi rezultati se mogu objasniti time da ispitivani uzorci etarskih ulja *T.pratense*, imaju veoma nizak sadržaj etarskih ulja, kao i bioaktivnih jedinjenja odgovornih za antimikrobnu aktivnost, što verovatno nije dovoljno za posedovanje mikrobiološkog efekta. Takođe, važno je napomenuti da do sada u naučnoj literaturi nema nijednog navoda o biološkoj aktivnosti etarskog ulja biljne vrste *Trifolium pratense* L., stoga je ova teza jedini izvor podataka vezanih za ovu vrstu istraživanja.

4.6.2. Ispitivanje antibakterijske aktivnosti ekstrakata

S obzirom na to da etarska ulja ispitivanih uzoraka *T.pratense* nisu pokazala aktivnost na ispitivane bakterijske sojeve, ispitana je antibakterijska aktivnost ekstrakta ove biljne vrste. Rezultati ispitivanje antimikrobne aktivnosti na šest bakterijskih sojeva

etilacetatnihi etanolnih ekstrakata uzoraka TP1, TP2 i TP3 prikazani su u Prilogu, Tabele 8.156. i 8.157.

Analizom ovih rezultata može se videti da nijedan od ekstrakata *T. pratense* ne pokazuje antibakterijsku aktivnost na ispitivane sojeve bakterija. Postoji samo jedan navod (Bonjor i sar., 2004) o antimikrobnoj aktivnosti ekstrakata crvene deteline na sojeve humanih patogenih mikroorganizama. U navedenom istraživanju ekstrakt korena *T. pratense* je ispitan na sledeće mikroorganizme: *Esherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Klebsiella pneumonia*, *Bordetella bronchiseptica*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus punilus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Candida utilis*. Ekstrakt korena nije ispoljio antimikrobnu aktivnost ni na jedan ispitani soj.

Samo za jednu vrstu roda *Trifolium*, *T.alexandrium*, potvrđeno je da pokazuje značajnu antibakterijsku aktivnost. Ekstrakti listova *T.alexandrium* pokazali su se efektivnim protiv nekoliko ispitanih mikroorganizama. *Staphylococcus albus*, *Streptococcus haemolyticus*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella typhi*, *Shigella boydii*, *Shigella dysenteriae*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Edwardsiella tarda*, pri čemu si nepolarni ekstrakti pokazali znatno slabiju aktivnost od polarnih ekstrakata (Khan i sar., 2012).

Dobijeni rezultati ispitivanih ekstrakata TP1, TP2 i TP3 nisu pokazali antimikrobnu aktivnost prema odabranim bakterijskim sojevima, što ne znači da kod njih postoji odsustvo iste, već bi se dalja ispitivanja trebala vršiti na širem spektru mikroorganizama.

5. ZAKLJUČAK

Ciljevi ove teze su ostvareni kroz hemijska, biohemijska i mikrobiološka ispitivanja biljne vrste *Trifolium pratense* L. gajene na teritoriji Bačkog Gradišta (Rimski Šančevi) u fazi rasta od 30 cm, 50 cm i pre početka butonizacije (*Trifolium pratense* L. 1753 var. *sativa* Schreb. 1804, No 2-1751, No 2-1752, No 2-1753).

Kvalitativno i kvantitativno ispitivanje hemijskog sastava metanolnih ekstrakata uzoraka TP1, TP2 i TP3 obuhvatalo je analizu 43 odabranih fenolnih komponenti (15 fenolnih kiselina, 23 flavonoida, 3 kumarina i 2 lignana) LC-MS/MS tehnikom. Pored izoflavonoida daidzeina i genisteina, u većoj količini zastupljeni su i druga fenolna jedinjenja kao što su p-hidroksibenzojeva, kafena kiselina, kamferol-3-O-glukozid, kvercetin-3-O-glukozid, hiperozid i eskuletin. Uzorci TP1, TP2 i TP3 se razlikuju po sadržaju fenolnih komponenti, pri čemu se metanolni ekstrakt TP1 izdvaja zbog prisustva najvećeg broja detektovanih fenolnih jedinjenja, dok se metanolni ekstrakti uzoraka TP2 i TP3 odlikuju manjim brojem ovih jedinjenja. Međutim, ekstrakti uzoraka TP1 i TP2 se uglavnom malo razlikuju u koncentraciji određenih fenola. Izoflavonoidi daidzein i genistein su prisutni u sva tri ekstrakta (0.121-1.527 µg/ml), a u uzorku TP1 u najvećem sadržaju. Sva tri ekstrakta sadrže p-hidroksibenzojevu kiselinu, koja je u ekstraktu uzorka TP1 prisutna u najvećoj količini (0.713 µg /ml), dok je kafena kiselina takođe prisutna podjednako u sva tri ekstrakta, pri čemu je njen sadržaj nešto veći u ekstraktu uzorka TP2 (1.041 µg /ml). Kamferol-3-O-glikozid je najviše zastupljen u ekstraktu TP2, zatim ekstraktu TP1, a dosta manje u ekstraktu TP3. Takođe, ekstrakt TP2 se značajno izdvaja po sadržaju kvercetin-3-O-glukozida (24.243 µg/ml) u odnosu na preostala dva ekstrakta (TP1: 1.344 µg/ml i TP3: 0.277 µg/ml). Hiperozid je najdominantnije jedinjenje prisutno u sva tri ekstrakta, pri čemu dominira u ekstraktu uzorka TP2 (45.259 µg/ml). Amentoflavon je prisutan samo u ekstraktu TP1 (0.345 µg/ml), a kumarin, eskuletin, u sva tri ekstrakta (TP1: 0.606 µg/ml; TP2: 0.293 µg/ml i TP3: 0.076 µg /ml).

Ispitivanje hemijskog sastava etarskih ulja *T. pratense* GC-MS analizom identifikovano je 39 različitih volatilnih hemijskih jedinjenja, od kojih se izdvajaju mnogi ugljovodonici, aldehidi, ketoni, alkoholi, kao i terpeni. Od ukupnih jedinjenja u etarskom ulju uzorka TP1 identifikovano 92%, u etarskom ulju uzorka TP2 85.61%, dok je u etarskom ulju uzorka TP3 određeno samo 53.69% od ukupno prisutnih volatilnih jedinjenja. Iako nije aromatična biljka, crvena detelina se odlikuje određenim sadržajem terpena, koji su inače odgovorni za biološku aktivnost izolovanog etarskog ulja. Tako je diterpen β-jonon detektovan u sva tri etarska ulja (9.90%, 9.46% i 9.07%), kao i

seskviterpen 5,6,7,7-tetrahidro-4,4,7-trimetil-2(4H)-benzofuranon (7.81%, 7.77% i 7.60%). Seskviterpen heksahidroksifarnezil acetone je prisutan u etarskim uljima uzoraka TP1 i TP2 (6.29% i 7.63%), dok se fitol izdvaja svojim prisustvom u većem procentu u uzorcima TP2 i TP3 (14.54% i 15.46%). Samo u etarskom ulju uzorka TP1 su detektovani monoterpeni β -mircen (4.55%), *p*-cimen (3.59%), limonen (0.86%), kao i diterpen tetrahidrojonon (1.56%). U etarskom ulju uzorka TP3 se izdvaja megastigmatrienon (16.10%), ali dihidrokarvon (2.47%) koji poseduje farmakološku aktivnost, pri čemu ova dva jedinjenja nisu prisutna u ostala dva etarska ulja (TP1 i TP2). Od jedinjenja koja ne poseduju farmakološku aktivnost, najzastupljeniji su: benzaldehid (TP1: 5.52%), 2-pentanon (TP2: 6.66%), heksadekanska kiselina (TP1: 3.22% i TP2: 2.09%). Etarsko ulje biljke u početnoj fazi rasta (TP1) se izdvaja po sadržaju volatilnih jedinjenja koja doprinose, ali i onih koja ne doprinose farmakološkoj aktivnosti etarskog ulja biljke.

Evaluacija antioksidantnog kapaciteta ekstrakata i etarskih ulja obuhvatalo je primenu metoda koje su se zasnivale na transferu elektrona, neutralizaciji slobodnoradikalnih i neradikalnih vrsta i sposobnosti inhibicije lipidne peroksidacije indukovane u lipozomima kao model sistemu. Poređenje dobijenih rezultata je vršeno u odnosu na sintetske antioksidante BHT (butilovani hidroksitoluen) i BHA (butilovani hidroksianizol):

- sposobnosti neutralizacije DPPH radikala: etilacetatni, vodeni ekstrakt i etarsko ulje crvene deteline u najnižoj fazi rasta (TP1), pokazali su najbolji antioksidantni efekat (17.82 $\mu\text{g/ml}$, 17.47 $\mu\text{g/ml}$, 27.61 $\mu\text{g/ml}$), pri čemu su njihove IC_{50} vrednosti približne onima kod sintetskih antioksidanata BHA i BHT;
- sposobnost neutralizacije OH^\bullet radikala: etilacetatni, vodeni ekstrakti i etarsko ulje uzorka TP1 pokazali najveći antioksidantni kapacitet s obzirom na to da su njihove izmerene IC_{50} vrednosti (19.79 $\mu\text{g/ml}$, 18.44 $\mu\text{g/ml}$ i 18.29 $\mu\text{g/ml}$) bile niže od IC_{50} vrednosti sintetskih antioksidanata BHT i BHA;
- kapacitet neutralizacije $\text{O}_2^{\bullet-}$ radikala: vodeni ekstrakt i etarsko ulje uzorka TP1 (10.77 $\mu\text{g/ml}$ i 16.03 $\mu\text{g/ml}$) su pokazali najbolju antioksidantnu aktivnost, gde je njihova aktivnost približna aktivnosti sintetskog antioksidanta BHT;
- sposobnost neutralizacije H_2O_2 : etilacetatni, n-butanolni ekstrakti uzorka i etarsko ulje TP1 su pokazali snažnu i približno istu antioksidantnu aktivnost, odnosno IC_{50} vrednosti (14.55 $\mu\text{g/ml}$, 14.95 $\mu\text{g/ml}$ i 14.76 $\mu\text{g/ml}$), koje su manje od IC_{50} vrednosti sintetskih antioksidanata BHT i BHA;

- inhibicija Fe^{2+} /askorbat indukovane lipidne peroksidacije (LP): najveću sposobnost inhibicije su pokazali metanolni ekstrakt i etarsko ulje uzorka TP1 (IC_{50} =204.66 i 9.35 $\mu\text{g/ml}$). Etarsko ulje TP2 je takođe ispoljio veliku sposobnost inhibicije LP (IC_{50} =15.27 $\mu\text{g/ml}$);
- redukcionni potencijal: svi ekstrakti su pokazali visok redukcionni potencijal primenom obe metode, s tim što se izdvajaju metanolni ekstrakt (528.76 mg ekv. Fe^{2+} /g s. e.) uzorka TP1 (određen FRAP metodom), kao i etilacetatni ekstrakt (471.25 mg ekv. askorb. kis./g s. e.) uzorka TP1 (određen Yeni Chen metodom). Etarska ulja sva tri uzorka pokazala su približan redoks potencijal, pri čemu se izdvajaju etarsko ulje TP1 (168.71 mg ekv. Fe^{2+} /g s.e.-FRAP metoda) i etarsko ulje TP2 (296.22 mg ekv. askorb.kis./g s. e.);
- sadržaj ukupnih fenola: kretao se od 14.22-42.74 mg galne kis./g s.e. Utvrđeno je da metanolni i etilacetatni ekstrakti uzoraka TP1, TP2 i TP3 sadrže najviše fenolnih jedinjenja, pri čemu se izdvajaju ekstrakti uzorka TP1;
- sadržaj ukupnih flavonoida: kretao se od 14.04-20.22 mg rutina kis./g s.e. Metanolni ekstrakti TP1, TP2 i TP3 poseduju najveći sadržaj ukupnih flavonoida, pri čemu se izdvaja vrednost uzorka TP1 (TP1_{MeOH} =20.22 mg/g).

Iz dobijenih rezultata može se zaključiti da je uzorak crvene deteline u najnižoj fazi rasta pokazao najbolji antioksidantni kapacitet budući da sadrži i najveći sadržaj fenolnih komponenti.

In vivo određivanje antioksidantne aktivnosti ekstrakata *T. pratense* na homogentu i hemolizatu laboratorijskih miševa, urađena su isitivanjem pomenutih ekstrakata na aktivnost antioksidantnih sistema (GSHPx, GSHR, Px, XOD, CAT), količinu endogenih antioksidanata (GSH), intenzitet peroksidacije membranskih lipida (LPx), kao i na oksidativni stres prouzrokovan dejstvom ugljentetrahlorida (CCl_4). Dobijeni su sledeći rezultati:

Homogenat: svi ekstrakti *T. pratense* su smanjili sadržaj GSH, GSHPx, u tretmanu sa CCl_4 došlo je takođe do smanjenja sadržaja ovih enzima. Samo je etilacetatni ekstrakt povećao aktivnost GSHR, dok su svi ekstrakti u tretmanu sa CCl_4 smanjivali njegovu aktivnost. Etilacetatni, n-butanolni i vodeni ekstrakt *T. pratense* su smanjili intenzitet lipidne peroksidacije (LPx), a u kombinaciji sa CCl_4 su ispoljili protektivni efekat. Jedino vodeni ekstrakt je statistički značajno povećao aktivnost peroksidaze Px, a u tretmanu sa CCl_4 etilacetatni ekstrakt je povećao aktivnost ovog enzima. Etilacetatni, n-butanolni i

vodeni ekstrakta su povećali aktivnost katalaze (CAT) bez i u kombinaciji sa CCl_4 . Aktivnost ksantin-oksidaze (XOD) je statistički značajno smanjena pri tretmanu sa etilacetatnim, n-butanolnim i vodenim ekstraktom, dok su u tretmanu sa CCl_4 svi ekstrakti povećali aktivnost ovog enzima.

Hemolizat: svi ekstrakti su smanjili aktivnost GSH, pri čemu se posebno ističe hloroformski ekstrakt. Ekstrakti *T. pratense* nisu pokazali protektivni efekat (smanjena je aktivnost enzima) u kombinaciji sa CCl_4 . Svi ekstrakti su smanjili GSHPx bez i sa tretiranjem sa CCl_4 . Tretman sa etilacetatnim ekstraktom pokazao je statistički najznačajnije povećanje GSHR, dok je u kombinaciji sa CCl_4 njegova aktivnost značajno smanjena tretiranjem sa etarskim i etilacetatnim ekstraktom. Svi, osim etarskog ekstrakta (sem etarskog) su do značajnog smanjenja lipidne peroksidacije, a tretman sa CCl_4 povećao je intenzitet LPx, više nego u homogenatu. Svi ekstrakti su smanjili aktivnost Px, bez i sa tretmanom sa CCl_4 . Tretman sa etilacetatnim ekstraktom, izazvao je najznačajnije povećanje aktivnosti CAT, a u kombinaciji etilacetatni ekstrakt+ CCl_4 , zabeleženo je najveće smanjenje aktivnosti ovog enzima. Najveće smanjenje XOD izazvao je tretman sa etilacetatnim ekstraktom, dok su etarski i hloroformski ekstrakti u kombinaciji sa CCl_4 uticali na povećanje XOD.

Raznolikosti u rezultatima dobijenim ispitivanjem hepatoprotektivnog efekta ekstrakata *T. pratense*, posledica su brojnih i složenih mehanizama koji se odigravaju u jetri u prisustvu raznih biomolekula i ksenobiotika.

Evaluacije antimikrobne aktivnosti ekstrakata i etarskih ulja *T. pratense* izvršena je na 6 laboratorijskih sojeva, 3 Gram-pozitivne (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus*) i 3 Gram-negativne bakterije (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis*). Dobijenu su sledeći rezultati:

- nijedan od ispitivanih ekstrakata i etarskih ulja uzoraka crvene deteline TP1, TP2 i TP3 nije pokazao antimikrobu aktivnost.

Pretpostavlja se da sekundarni molekuli prisutni u uzorcima nemaju potencijalnu antimikrobnu aktivnost. Smatra se da način izolovanja bioaktivnih komponenti (sa potencijalnom antimikrobnom aktivnošću), kao ekološki, fiziološki i drugi faktori, doprinose odsustvu ili nemogućnosti detektovanja antimikrobne aktivnosti.

Ispitivanje estrogene, antiestrogene aktivnosti i citotoksičnosti ekstrakata *T. pratense* izvršeno je merenjem indukcije alkalne fosfataze, pri čemu su dobijeni sledeći rezultati:

- etilacetatni i etanolni ekstrakt TP1 uzorka pokazuju najbolju estrogenu aktivnost (TP1_{EtOAc}=55.32±1.44%; TP1_{EtOH}=48.91±5.97%);
- nijedan od ekstrakata nije pokazao antiestrogenu aktivnost prema Ishikawa ćelijama;
- nijedan od ekstrakata nije pokazao citotoksičnu aktivnost prema Ishikawa ćelijskoj liniji.

Estrogena aktivnost crvene deteline potiče od prisustva isfolavona i njihovih derivata, čija bi se biološka aktivnost trebala dalje ispitati.

Iz svega gore navedenog i analiziranog, mogao bi se izvesti opšti zaključak, a to je da crvena detelina usled značajnog sadržaja bioaktivnih jedinjenja, dobro pokazanog antioksidantnog kapaciteta, kao i estrogene aktivnosti, predstavlja potencijalni izvor prirodne i funkcionalne hrane, odnosno suplementa u ljudskoj ishrani i u promociji zdravlja.

Buduća istraživanja bi trebala da idu u pravcu detaljnije i šire hemijske karakterizacije bioaktivnih komponenata, kao i njihovih metabolita, kao i ispitivanje njihove biološke aktivnosti kako u *in vivo*, tako i u *in vitro* uslovima.

6. SUMMARY

Trifolium L. (Fabaceae) is widely spread genus, represented by 103 species in temperate and subtropical regions of both hemispheres. Mediterranean basin, Western North America and the high lands of eastern Africa are the three geographic regions with the greatest diversity of *Trifolium* species.

Some *Trifolium* species exhibited biologically activities, including anti-inflammatory, antioxidant, cytostatic, and estrogenic activity and are used as a chemoprotective agent against cancers and cardiovascular diseases in some traditional medical applications. *Trifolium pratense* L. (Red clover) contains high concentrations of isoflavones (daidzein, genistein, formononetin, biochanin A), compounds widely distributed in the Leguminosae family (Dixon, 2004; Savirana i sar., 2010). Therefore the majority of the studies on the biological properties of *T. pratense* focused on its phytoestrogenic action. Interactions of isoflavones with estrogen receptors are possible due to their structural similarity to 17 β -estradiol. For that reason, red clover is a source of dietary supplements and herbal remedies administered as an alternative to the conventional hormonal replacement therapy in the prevention of hormone-related cancers, cardiovascular diseases and osteoporosis and to relieve menopausal symptoms (Booth i sar., 2006). Beneficial effects of red clover as well as other clovers may be dependent on the action of other various biologically active substances occurring in these herbs, not only isoflavonoids.

Internally, the plant is used in the treatment of skin complaints (especially eczema and psoriasis), cancers of the breast, ovaries and lymphatic system, chronic degenerative diseases, gout whopping cough and dry coughs. Previous researches have included a small number of studies related to this plant, and the subject of researches in this doctoral thesis are based on a detail chemical and biological testing of extracts and essential oil of *Trifolium pratense* L. var. *sativa* Schreb., in three different stage growth (30 cm, 50 cm and beginning of butonization) from locality of Bačko Gradište (Rimski Šančevi) UTM 34T DR 2 01. Chemical investigation of methanolic extracts included qualitative and quantitative determination of 44 selected phenolic compounds using LC/MS-MS technique. Significant differences in the content of these compounds in three different growth stages of the plant species was determined. Isoflavonoids genistein and daidzein, as well as other phenols: p-hydroxybenzoic, caffeic, kaempferol 3-O-glucoside, quercetin 3-O-glucoside, hyperoside, aesculetin are the most abundant compounds in all of three extracts. Methanolic extract of *Trifolium pratense* L. in the lowest stage of growth contains the greatest amounts of these compounds. The chemical composition of the

essential oil obtained by microwave-assisted hydrodistillation was analyzed using GC-MS technique. Thirty-nine different components were identified. All essential oils contain various volatile compounds such as: β -ionon, 5,6,7,7-tetrahydro-4,4,7-trimethyl-2(4H)-benzofuranone, hexahydrofarnesyl acetone, β -myrcene, p-cymene, limonen (0.86%), tetrahydroionone, megastigmatrienone, dihydrocarvone which are responsible for biological activity. Essential oil of plant in the lowest growth stage contains the most content of these volatile compounds. Antioxidant activity of six extracts of different polarity and essential oils are determined by methods that are based on measuring radical and non-radical scavenger capacity, reduction potential and inhibition of lipid peroxidation. Extracts and essential oils showed good antioxidant capacity, exactly all samples showed good antioxidant capacity when compared to the synthetic antioxidants. However, essential oils and extracts showed poor ability to inhibit lipid peroxidation. In correlation with content of bioactive compounds, the extracts and essential oils of red clover in the lowest growth phase, indicated effective antioxidant and radical scavenging capacity.

Furthermore, methanolic extract of *T. pratense* in all three growth stages were used to study *in vivo* effect on antioxidant systems (activities of GSHPx, GSHR, Px, LP_x and, XOD and GSH content) in the mice liver and blood-hemolysate, after treatment with the examined extracts, or in combination with carbon tetrachloride (CCl₄). Investigated extracts showed a certain protective effect, which is more pronounced on the liver than on serum parameters. A possible explanation may be the liver richness in enzymatic system which can be involved in the pathways of the antioxidant mechanism.

Evaluation the estrogen, anti-estrogen and cytotoxic potential of ethanolic and ethylacetate extracts of *T. pratense* was determined using cultured Ishikawa cells. This cell line possesses an estrogen-inducible alkaline phosphatase and estrogenic activity is indicated by assessing the rate of p-nitrophenol generated from p-nitrophenylphosphate (pNPP).

All of ethyl acetate and ethanolic extracts in the lowest stage of growth showed estrogenic, but they did not show anti-estrogenic activity and cytotoxicity.

These results indicated that dried leaves extracts of red clover also show estrogenic activity, not just concentrated plant in dietary supplements that can be found in the earlier reports. Antimicrobial activity of extracts and essential oils was tested against three Gram positive (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus*) and three

(*Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*) Gram negative bacteria strains. None extract as well as essential oils did exhibit antimicrobial activity against bacterial strains surveyed.

Finally, extracts and preparations of red clover may be regarded as effective natural and functional dietary food supplement due to their content of polyphenolic substances and to their great antioxidant capacity, estrogen activity with special regard to their nutritional and physiological implications and their health promoting effect.

7. LITERATURA

- Adams, R.P. (2001): *Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectrometry*. Allured Publishing Corporation, Illinois, USA.
- Adlercreutz, H., Bannwart, C., Wähälä, K., Mäkelä, T., Brunow, G., Hase, T., Arosemena, P., Kellis, J., Vickery, L. (1993): Inhibition of human aromatase by mammalian lignans and isoflavonoid phytoestrogens. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, **44**: 147-153.
- Afanas'ev, I.B., Dorozhko, A.I., Brodski, A.V., Kostyk, V.A., Potapovich, A.I. (1989): Chelating and free radical scavenging mechanism of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. *Biochemical Pharmacology*, **38**:1763-1768.
- Ahn, M.R., Kunimasa, K., Kumazawa, S., Nakayama, T., Kaji, K., Uto, Y., Hori, H., Nagasawa, H., Ohta, T.(2009): Correlation between antiangiogenic activity and antioxidant activity of various components from propolis. *Molecular Nutrition and Food Research*, **53**: 643-51.
- Almstrup, K., Fernandez, M., Petersen, J., Olea, N., Skakkebaek, N., Leffers, H. (2002): Dual effects of phytoestrogens result in U-shaped dose-response curves. *Environmental Health Perspective*, **110**: 743-748.
- Alul, R.H., Wood, M., Longo, J., Marcotte, A.L., Campione, A.L., Moore, M.K., Lynch, S.M. (2009): Vitamin C protects low-density lipoprotein from homocysteine-mediated oxidation. *Free Radical Biology Medicine*, **34**:881–91.
- Anderson, E., Katunga L., Willis M. (2012). Mitochondria as a Source and Target of Lipid Peroxidation Products in Healthy and Diseased Heart. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, **39**: 1440-1681.
- Arnao, M.B., Acosta, M., del Rio, J.A., Varon, R., Garcia-Canovas, F. (1990): Inactivation of peroxidase by hydrogen peroxide and its protection by a reductant agent. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1038**:85-89.
- Atkinson, C., Frankenfeld, C.L., Lampe, J.W. (2005): Gut bacterial metabolism of the soy isoflavone daidzein: exploring the relevance to human health. *Experimental Biology and Medicine*, **230**:155-170.
- Atkinson, C., Warren, R., Sala, E., Dowsett, M., Dunning, A., Healey, C., Runswick, S., Day, N., Bingham, S. (2004): Red-clover-derived isoflavones and mammographic breast density: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Breast Cancer Research*, **6**: 170-179.

- Auchere, F., Capeille-Blandin, C. (1999): NADPH as a co-substrate for studies of the chlorinating activity of myeloperoxidase. *Biochemical Journal*, **343**:603-613.
- Auroma, O. I. (1998): Free Radicals, Oxidative Stress, and Antioxidants in Human Health and Disease. *JAOCS*, **75** (2).
- Babior, B.M., Lamberth, J.D., Nauseff, W. (2002): The neutrophil NADH oxidase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **397**: 242-344.
- Babu, B.H., Shylesh, B.S., Padikkala, J. (2001): Antioxidant and hepatoprotective effect of *Acanthu silicifolius*. *Fitoterapia*, **72**:272-277.
- Bakkali, F., Averbeck, S., D. Averbeck, D., Idaomar., M. (2008): Biological effects of essential oils-A review. *Food and Chemical Toxicology*, **46**: 446-475.
- Barnes, S., Kim, H., Darley Usmar, V., Patel, R., Xu, J., Boersma, B., Luo, M. (2000): Beyond ER alpha and ER beta: estrogen receptor binding is only part of the isoflavone story. *Journal of Nutrition*, **130**: 656-657.
- Beck, V., Rohr, U., Jungbauer, A. (2005): Phytoestrogens derived from red clover: An alternativeto estrogen replacement therapy? *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, **94**: 499–518.
- Beckman, J.S., Koppenol, W.H. (1996): Nitric oxide, superoxide and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *American Journal of Physiology*, **271**: 1424–1437
- Beers, R.F.J., Sizer, J.W. (1950): Spectrophotometric method for measuring of breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *Journal of Biological Chemistry*, **195**:133-140.
- Bellomo, G, Mirabelli, F. (1992): Oxidative stress and cytoskeletal alterations. *Annual NY Academy Science*, **663**:97–109.
- Bennetts, H.W., Underwood, E.J., Shier, F.L. (1946): A specific breeding problem of sheep on subterranean clover pastures in Western Australia. *Australian Veterinary Journal*, **22**:2–12.
- Benzie, I.F.F., Strain, J.J. (1999): Feric reducing antioxidant power assay: Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant powe and ascorbic acid and concentration. *Methods in Enzymology*, **299**:15-17.
- Bergendi, L., Benes, L., Durackova, Z., Ferencik, M. (1999): Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life Science*, **65**:1865–1874.
- Bergmeyer, U.H. (1974):In: *Methods of Enzymatics Analysis*. New York: Academic Press Inc., Verlag Chemie, 521-522.

- Bicchi, C., Binello, A. Rubiolo, P. (2000): Determination of Phenolic Diterpene Antioxidants in Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) with Different Methods of Extraction and Analysis. *Phytochemical Analysis*, **11**: 236-242.
- Biehl, B., Ziegleder, G. (2003): Cocoa/chemistry of processing. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*, 1436–1448.
- Bohlmann, J., Keeling, C.I. (2008): Terpenoid biomaterials. *Plant Journal*, **54**: 656-669.
- Boller, B., Schubiger F.X., Kölliker, R. (2010): Handbook of Plant Breeding: Fodder Crops and Amenity Grasses, Springer Science Business Media, New York, pp. 439-456.
- Bonjor G.H., Aghighi S., Karimi Nik A. (2004): Antibacterial and antifungal survey in plants used in indigenous herbal-medicine of south east regions of Iran. *Journal of biological sciences*, **4**: 405-412.
- Booth, N.L., Overk, C.R., Yao, P., Totura, S., Deng, Y., Hedayat, A.S., Bolton, J. L., Paul, G.F., Farnsworth, N.R. (2006): Seasonal Variation of Red Clover (*Trifolium pratense* L., Fabaceae) Isoflavones and Estrogenic Activity. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **54**: 1277-1282.
- Bors, W. Heller, W. Michel, C. Saran, M. (1990): Flavonoids as antioxidants: Determination of radical scavenging efficiencies. *Methods in Enzymology*, **186**: 343–355
- Bosabalidis, A., Tsekos I. (1982): Ultrastructural studies on the secretory cavities of *Citrus deliciosa* TEN. II. Development of the oil-accumulating central space of the gland and process of active secretion. *Protoplasma*, **112**: 63-70.
- Božin, B., Mimica-Dukić, N., Samojlik, I., Anačkov, G., Igić, R. (2008): Phenolic in garlic (*Allium sativum* L., Alliaceae). *Food Chemistry*, **111**: 925-929.
- Buchbauer, G., Jirovetz, L. Nikiforov, A. (1996): Comparative Investigation of Essential Clover Flower Oils from Austria Using Gas Chromatography–Flame Ionization Detection, Gas Chromatography–Mass Spectrometry, and Gas Chromatography–Olfactometry *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **44**: 1827-1828.
- Buege, A.L., Aust, D.S. (1978): Microsomal lipid peroxidation. In: Fleisher, S., Parker, L. (eds.): *Methods in Enzymology*. New York: Academic Press, 306-310.
- Burda, S., Oleszek, W. (2001): Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **49**: 2774–2779.

- Burt, S. (2004): Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*, **94**: 223–253.
- Buttemeyer, R., Philipp, A.W., Schlenzka, L., Beissenhitz, M., Lisdat, F. (2003): Epigallocatechin gallate can significantly decrease free oxygen radicals in the reperfusion injury *in vivo*. *Transplantation Proceeding*, **35**:3116-3120.
- Buttery, R.G., Kamm, J.A., Ling, L.C. (1984): Volatile components of red clover leaves, flowers, and seed pods: possible insect attractants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **32**: 254–256.
- Cadenas, E., Davies, J.A.K. (2000): Mitochondrial free radical generation, oxidative stress and aging. *Free Radical Biology and Medicine*, **29**: 222-230.
- Cafarchia, C., Laurentis, N., Milillo, M.A., Losacco, V., Puccini, V. (1999): Antifungal activity of Apulia region propolis. *Parassitologia*, **41**:587.
- Campbell, M.J. (2004): Effect of red clover-derived isoflavone supplementation on insulin-
- Chang, Q., Wong, Y.S. (2004): Identification of flavonoids in Hakmeitau beans (*Vigna sinensis*) by high performance liquid chromatography- electrospray mass spectrometry (LC-ESI/MS). *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **52**: 6694–6699.
- Chatterjee, N., Agarwal, S. (1988): Liposomes as membrane model for study of lipid peroxidation. *Free Radical Biology and Medicine*, **4**:51-72.
- Cheesman, K.H. (1982): Mc Brien, D.C.H., Slater, T.F. (ur.) *Free Radicals, Lipid Peroxidation and Cancer*. London: Academic Press, pp. 197.
- Cheesman, K.H., Beavis, A., Eserbauer, H. (1988): Hydroxyl-radical-induced-iron-catalysed degradation of 2-deoxyribose. *Biochemical Journal*, **252**:649-653.
- Chen, J., Zeng, J., Xin, M., Huang, W., Chen, X. (2011): Formononetin Induces Cell Cycle Arrest of Human Breast Cancer Cells via IGF1/PI3K/Akt Pathways In Vitro and In Vivo. *Hormone and Metabolic Research*, **43**: 681-686.
- Cherubini, A., Vigna, G.B., Zuliani, G., Ruggiero, C., Senin, U., Fellin, R. (2005): Role of antioxidants in atherosclerosis: epidemiological and clinical update. *Current Pharmaceutical Design*, **11**:2017–2032.
- Chin, P.T.Y., Stults, F.H., Tappel, A.L. (1976): Purification of rat lung soluble glutathione peroxidase. *Biochemistry and Biophysica Acta*, **445**:558-660.
- Chirinos, R., Campos, D., Arbizu, C., Rees, J., Larondelle, Y., Herve, R., Noratto, G., Cisneros-Zevallos, L. (2007): Effect of genotype, maturity stage and post-harvest

- storage on phenolic compounds, carotenoid content and antioxidant capacity of Andean mashua tubers (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz and Pavón). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **87**: 437-446.
- Cholbi, M.R.; Paya, M.; Alcaraz, M.J. (1991): Inhibitory effect of phenolic compounds on CCl₄-induced microsomal lipid peroxidation. *Experimentia*, **47**:195-198.
- Cock, N.C., Samman, S. (1996): Flavonoids chemistry metabolism, cardio protection effects and dietary sources. *Nutritional Biochemistry*, **7**:66-76.
- Corinna, E.R., Sabine, E.K. (2006): Antioxidant activity of isoflavones and their major metabolites using different in vitro assays. *Journal of Agriculture of Food Chemistry*, **54**: 2926–2931.
- Cos, P. Ying, L., Callome, M., Hu, P., Cimanga, K., Van Poel, B., Pieters, L., Vlietinck, J., Van den Berghe, D. (1998): Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of Xanthine oxidase and superoxide scavengers. *Journal of Natural Products*, **61**: 71-76.
- Cristani M.; D'Arrigo M., Mandalari G., Castelli F., Sarpietro M.G., Micieli D., Venuti V., Bisignano G., Saija A., Trombetta, D. (2007): Interaction of Four Monoterpenes Contained in Essential Oils with Model Membranes: Implications for Their Antibacterial Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **55**: 6300–6308.
- Croteau, R., Kutchan, T.M., Lewis, N.G. (2000): Natural products (secondary metabolites). In: *Biochemistry i Molecular Biology of Plants*, Buchanan, B.B., Gruissem, W., Jones, R.L., (Eds.). *American Society of Plants Physiologists*, Rockville, MD, USA, 1250-1318.
- Cushnie, T.T.P., Andrew, J. L. (2005): Antimicrobial activity of flavonoids T.P. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **26**: 343–356.
- Dai, J., Mumper, R. (2010): Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, **15**: 7313-7352.
- Dakora, F.D., Phillips, D.A. (1996): Diverse functions of isoflavonoids in legumes transcend antimicrobial definitions of phytoalexins. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **49**: 1–20.
- Davies, H., Loyd,H., Hill, J.L. (1989): The effect of diet on the metabolism in sheep of the tritiated isoflavones formono-netin and biochanin A. *Australian Journal of Agriculture Research*, **40**:157–163.

- De Angelis L. (2001) : Brain tumors. *The New England Journal of Medicine*, **344**: 114–123.
- De Lignieres, B., de Vathaire, F., Fournier, S., Urbinelli, R., Allaert, F., Le, M.G., Kuttenn, F. (2002): Combined hormone replacement therapy and risk of breast cancer in a French cohort study of 3175 women. *Climacteric*, **5**: 332–340.
- De Rijke E., Zafra-Gomez, A., Ariese, F., Brinkman, U. A., Gooijer, C. (2001): Determination of isoflavone glucoside malonates in *Trifolium pratense* L. (red clover) extracts: quantification and stability studies. *Journal of Chromatography A*, **932**: 55–64.
- De Smet, P.A.G.M. (2004): Health risks of herbal remedies: An update. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, **76**:1-17.
- Desco, M. Asensi, M. Marquez, R. Martinez-Valls, J. Vento, M. Pallardo, F.V. Sastre, J. Viña, J. (2002): Xanthine oxidase is involved in free radical production in type 1 diabetes: Protection by allopurinol. *Diabetes*, **51**: 1118–1124.
- Devasagayam, T.P.A, Tilak, J.C., Bloor, K.K. (2004): Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. *Journal of the Association of Physicians of India*, **52**:794–804.
- Dewick, P.M. (1993): Isoflavonoids. *The Flavonoids: Advances in research since 1986*. Chapman & Hall: London.
- Dewick, P.M. (2009): *Medicinal natural products: A biosynthetic approach*, John Wiley & Sons Ltd, Chippingham, UK.
- Dixon, R.A. (2004): Phytoestrogens. *Annual Review of Plant Biology*, **55**: 225–261.
- Dixon, R.A., Xie, D.Y., Sharma, S.B. (2005): Proanthocyanidins—a final frontier in flavonoid research? *New Phytologist*, **165**:9–28.
- Đorđević, V.B., Pavlović, D.D., Kocić, G.M. (2000): *Biohemija Slobodnih Radikala*. Niš: Medicinski fakultet.
- Drenin, A.A., Botirov, E.K., Turov, U.P. (2011): A New Isoflavone Glycoside from *Trifolium pratense* L. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 862–865.
- Droge, W. (2002): Free radicals in the physiological control of cellfunction. *Physiological Reviews*, **82**: 47–95.
- Dudareva, N., Pichersky, E., Gershenzon, J. (2004): Biochemistry of Plant Volatiles. *Plant Physiology*, **135**:1893–1902.
- Đukić, D.J. (2002): *Biljke za proizvodnju stočne hrane*, Novi Sad: Poljoprivredni fakultet.

- Duncan, A., Phipps, W., Kurzer, M.: Phyto-oestrogens. (2003): *Best Practice and Research Clinical Endocrinology Metabolism*, **17**: 253-271, 2003.
- Edwards, J.M., Raffauf, R.F., Quesne, W.L. (1979): Antineoplastic activity and cytotoxicity of flavones, isoflavones and flavanones. *Journal of Natural Products*, **42**: 85-91.
- Ellison, N.W., Liston, A., Steiner, J.J., Williams, W.M., Norman, L., Taylor, N.L. (2006): *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **39**:688–705.
- Espin, C.J., Soler-Rivas, G., Wichers, J.H. (2000): Characterization of the total free radical scavenger capacity of vegetable oils and oil fractions using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **48**:648-656.
- Ewald, E., Ryan, S., Ryan K. (2005): Red Clover *Trifolium pratense* L. Phytoestrogens: UV-B Radiation Increases Isoflavone Yield, and Postharvest Drying Methods Change the Glucoside Conjugate Profiles. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **53**: 8273-8278.
- Faridah K., Iqbal A., Rosli B., Mohd Y., Zainal A., Aohd Y. (2010): The potential of modified microwave extraction system (mmes) to extract bioactive components from ferns. *International Journal of Engineering and Technology*, **10**:2-7.
- Fernandez, E. Gallus, S., Bosetti, C., Franceschi, S., Negri, E., La Vecchia, C. (2003): Hormone replacement therapy and cancer risk: a systematic analysis from a network of case-control studies, *International Journal of Cancer*, **105**: 408–412.
- Ferrali, M., Signorini, C., Caciotti, B., Sugherini, L., Ciccoli, L., Giachetti, D., Comporti, M. (1997): Protection against oxidative damage of erythrocyte membranes by the flavonoid quercetin and its relation to iron chelating activity. *FEBS Letter*, **416**:123–129.
- Figueiredo. R., Rodrigues, A.I., Do Ceu Costa, M. (2007): Volatile composition of red clover (*Trifolium pratense*) forages in Portugal: The influence of ripening stage and sensilage. *Food Chemistry*, **104**: 1445–1453.
- Fleury, C., Mignotte, B., Vayssiere, J.L. (2002): Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling. *Biochemistry*, **84**:131-141.
- Frame, J. (1990): The role of red clover in United Kingdom pastures. The West of Scotland College. *Outlook on Agriculture* **19**:49-55
- Friedman, M., P.R. Henika, C.E. Levin, Mandrell, R.E. (2004): Antibacterial activities of plant essential oils and their components against *Escherichia coli* O157:H7 and

- Salmonella enterica* in apple juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**: 6042–6048.
- Fritz, W., Eltoun, I., Cotroneo, M., Lamartiniere, C. (2002): Genistein alters growth but is not toxic to the rat prostate. *Journal Nutrition*, **132**: 3007-3011.
- Fu, M., He, Z., Zhao, Y., Yang, J., Mao, L. (2009): Antioxidant properties and involved compounds of daylily flowers in relation to maturity. *Food chemistry*, **114**: 1192-1197.
- Fukumoto, L., Mazza, G. (2000): Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **48**: 3597-3604.
- Fukuzawa, K., Seko, T., Minami, K., Terao, J. (1993): Dynamics of iron-ascorbate-induced lipid peroxidation in charged and uncharged phospholipid vesicles. *Lipids*, **28**:497-503.
- Furukawa, A., Oikawa, S., Murata, M., Hiraku, Y., Kawanishi, S. (2003): Epigallocatechin gallate causes oxidative damage to isolated and cellular DNA. *Biochemical Pharmacology*, **66**:1769-1778.
- Galle, J., Hansen-Hagge, T., Wanner, C., Seibold, S. (2006): Impact of oxidized low density lipoprotein on vascular cells. *Atherosclerosis*, **185**:219–26.
- Gallo, M., Ferracane, R., Graziani, G., Ritieni, A., Fogliano, V., (2010): Microwave Assisted Extraction of Phenolic Compounds from Four Different Spices. *Molecules*, **15**: 6365-6374.
- Gambacciani, M., Monteleone, P., Sacco, A., Genazzani, A.R. (2003): Hormone replacement therapy and endometrial, ovarian and colorectal cancer. *Best Practice Research: Clinical Endocrinology Metabolism*, **17**:139–147.
- Ganzler, K.; Salgo, A.; Valko, K. (1986): Microwave extraction-a novel sample preparation method for chromatography. *Journal of Chromatography*, **371**: 299-306.
- Gao, B. S., Lin, C. (2006): Dynamic microwave assisted extraction of flavonoids from *Saussurea medusa* Maxim. Cultured cells. *Biochemical Engineering Journal*, **332**:79-83.
- Ghafourifar, P., Cadenas, E. (2005): Mitochondrial nitric oxide synthase. *Trends in Pharmacological Science*, **26**:190–195.
- Ghasemzadeh, A., Jaafar, H.Z.E., Rahmat, A. (2010): Elevated Carbon Dioxide Increases Contents of Flavonoids and Phenolic Compounds, and Antioxidant Activities in Malaysian Young Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) Varieties. *Molecules*, **15**: 7451-7466.

- Giler, S., Sperling, O., Brosh, S. Urca, I., de Vries, A. (1975): Serum xanthine oxidase in jaundice. *Clinica Chimica Acta*, **63**: 37-40.
- Gillett, J.M., Taylor, N.L. (2001): *The World of Clovers*. Iowa State Pree, Ames, 457.
- Glatzle, D., Vuillenmir, Y.P., Weber, F., Decker, K. (1974): Glutathione reductase test with whole blood-a convenient procedure for the assesment of the riboflavine status in humans. *Experimentia*, **30**:565-638.
- Gobbo-Neto, L., Lopes, N.P. (2007): Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Quimica Nova*, **30**: 374-381.
- Gornall, H.G., Nardwall, C.L. (1949): Estimation of total protein in tissue homogenate. *The Journal of Biological Chemistry*, **177**:751-756.
- Gould, K.S., Lister, C. (2006): Flavonoid functions in plants, u: Andersen, M., Markham, K.R., *Flavonoids: Chemistry, biochemistry and applications*, Taylor & Francis, Boca Raton, USA.
- Graziani, Y., Winikoff, J., Chayoth R. (1977): Regulation of cyclic AMP level and lactic acid production in Ehrlich ascites tumor cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, **497**: 499-506.
- Green, L.C., Wagner, D.A., Glogowski, J., Skipper, P.I., Wishnok, J.S., Tannenbaum, S.R. (1982): Analysis of nitrat, nitrit and [¹⁵N] nitrit in biological fluids. *Analytical Biochemistry*, **126**:131-138.
- Guenther, E. (1948): *The Essential Oils*. D. Van Nostrand, New York.
- Gurfinkel, D.M., Rao, V. (2003): Soyasaponins: The Relationship Between Chemical Structure and Colon Anticarcinogenic Activity. *Nutrition and Cancer*, **47**: 24-33.
- Gutteridge, J.M., Halliwell, B. (2010): Antioxidants: Molecules, medicines, and myths. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **393**:561–564.
- Halliwell, B. (2006): Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic life. *Plant Physiology*, **141**: 312-322.
- Halliwell, B. Free Radicals and other reactive species in Disease. (2001): *Encyclopedia of life sciences*, National University of Singapore, Singapore.

- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (1990): The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trends in Biochemical Sciences*, **15**:129–135.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C. (2007): *Free radicals in biology and medicine* 4th edition. Oxford University Press Inc, New York, USA.
- Han, E.H., Kim, J.Y., Jeong, H.G. (2006): Effect of biochanin A on the aryl hydrocarbon receptor and cytochrome P4501A1 in MCF-7 human breast carcinoma cells. *Archives of Pharmacal Research*, **29**:570-576.
- Hanasaki, Y., Ogawa, S., Fukui, S. (1994): The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine*, **16**: 845–850.
- Handa, S.S., Sharma, A., Chakraborti, K.K. (1986): Natural products in plants as liver protecting drugs. *Fitoterapia*, **57**: 307-310.
- Harborne, J. B. (1994): For the content of “Flavonoids”. *Dictionary of Natural Products*; Buckingham, J., Ed.; Chapman and Hall: New York.
- He, X-G. (2002): On-line identification of phytochemical constituents in botanical extracts by combined high-performance liquid chromatographic–diode array detection–mass spectrometric techniques. *Journal of Chromatography A*, **880**: 203–232.
- Hirano, R., Sasamoto, W., Matsumoto, A., Itakura, H., Igarashi, O., Kondo, K. (2001): Antioxidant ability of various flavonoids against DPPH radicals and LDL oxidation. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, **47**:357–362.
- Holopainen, J. K. (2004): Multiple functions of inducible plant volatiles. *Trends in Plant Science*, **9**: 529–533.
- Hou, L., Zhou, B., Yang, L., Liu, Z.L. (2004): Inhibition of free radical initiated peroxidation of human erythrocyte ghosts by flavonols and their glycosides. *Organic Biomolecular Chemistry*, **2**:1419-23.
- Howes, J., Waring, M., Huang, L., Howes, L.G. (2002): Long-term pharmacokinetics of an extract of isoflavones from red clover (*Trifolium pratense*). *Journal of Alternative and Complementary Medicine*, **8**:135–142.
- <http://concord.newenglandwild.org/genus/trifolium>
<http://www.dereila.ca/edible>
<http://concord.newenglandwild.org/genus/trifolium>
<http://www.nablacognition.org/photo/935>
<http://www.pigncispi.com/forums/others/messages/364.html>

<http://www.ars-grin.gov/duke>

- Hu, M. Krausz, K. Chen, J. Ge, X. Li, J. Gelboin, H. L. Gonzalez, F. J. (2003): Identification of CYP1A2 as the main isoform for the phase I hydroxylated metabolism of genistein and a prodrug converting enzyme of methylated isoflavones. *Drug Metabolism and Disposition*, **31**: 924-931.
- Hung, H.C., Joshipura, K.J., Jiang, R., Hu, F.B., Hunter, D., Smith-Warner, S.A., Colditz, G.A., Rosner, B., Spiegelman, D., Willett, W.C. (2004): Fruit and vegetable intake and risk of major chronic disease. *Journal of the National Cancer Institute*, **96**:1577–1584.
- Huxley, R.R., Neil, H.A.W. (2003): The relation between dietary flavonol intake and coronary heart disease mortality: A meta-analysis of prospective cohort studies. *European Journal of Clinical Nutrition*, **57**:904–908.
- Hwang, H.J., Park, H.J., Chung, H.J., Min, H.Y., Park, E.J., Hong, J.Y., Lee, S.K. (2006): Inhibitory effects of caffeic acid phenethyl ester on cancer cell metastasis mediated by the down-regulation of matrix metalloproteinase expression in human HT1080 fibrosarcoma cells. *Journal of Nutritional Biochemistry*, **5**: 356-362.
- Izzotti, A., Bagnis, A., Saccà, S.C. (2006): The role of oxidative stress in glaucoma. *Mutation Research*, **612**:105–114.
- Jack Ritchason Little Herb Encyclopedia, Woodland Publishing Incorporated, 1995.
- Janda, B., Stochmal, A., Montoro, P., Piacente, S., Oleszek, W. (2009): Phenolics in aerial parts of Persian clover *Trifolium resupinatum*. *Natural Product Communications*, **12**:1661–1664.
- Jang, S. Kelley, K.W. Johnson, R.W. (2008): Luteolin reduces IL-6 production in microglia by inhibiting JNK phosphorylation and activation of AP-1. *Proceeding of National Academy of Sciences USA*, **105**: 7534-7539.
- Jay, D., Hitomi, H., Griendling, K.K. (2006): Oxidative stress and diabetic cardiovascular complications. *Free Radical Biology Medicine*, **40**:183–92.
- Jirovetz, L., Buchbauer, G., Denkova, Z. (2005): Antimicrobial testings and gas chromatographic analysis of pure oxygenated monoterpenes 1,8-cineol, α -terpineol, terpen-4-ol and camphor as well as target compounds in essential oils of pine (*Pinus pinaster*), rosemary (*Rosmarinus officinalis*) and tee tree (*Melaleuca alternifolia*). *Scientia Pharmaceutica*, **73**: 27–39.
- Kami, T. (1978): Qualitative and quantitative analyses of the essential oils of red and ladino white clovers. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **26**: 1194–1197.

- Kapetanović, I.M., Mieyal, I.I. (1997): Inhibition of acetoaminophen induced hepatotoxicity by phenacetin and its alkoxy analogs. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapy*, **209**: 25-30.
- Kapiotis, S., Hermann, (1997): Genistein, the dietary derived angiogenesis inhibitor, prevents LDL oxidation and protects endothelial cells from damage from atherogenic LDL. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, **17**: 2868–2874.
- Kaurinovic, B., Popovic, M., Vlasisavljevic, S., Raseto, M. (2011): Antioxidant Activities of *Melittis melissophyllum* L. (Lamiaceae), *Molecules*, **16**:3152-3167.
- Kaurinovic B., Popovic M., Vlasisavljevic S., Schwartzova H., Vojinovic-Miloradov M. (2012): Antioxidant Profile of *Trifolium pratense* L. *Molecules*, **17**:11156-11172.
- Keung, W-M., Vallee, B.L. (1993): Daidzin and daidzein suppress free-choice ethanol intake by Syrian Golden hamsters. *Proceedings of the National Academy of Science of USA*. **90**:10008-10012.
- Khan, A., Ahmed, Q., U., Indu Shukla,i., Khan, A. A. (2012): Antibacterial activity of leaves extracts of *Trifolium alexandrinum* Linn. against pathogenic bacteria causing tropical diseases. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, **2**: 189-194.
- Kicel, A., Wolbis, M. (2006): Phenolic acids in flowers and leaves of *Trifolium repens* L. and *Trifolium pratense* L. *Herba Polonica*, **54**:52–56.
- Klaunig, J.E., Kamendulis, L.M. (2004): The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, **44**: 239-67.
- Klejdus, B., Mikelová, R., Petrlová, J., Potěšil, D., Adam, V., Stiborová, M., Hodek, P., Vacek, J., Kizek, R., Kubáň, V. (2005): Evaluation of isoflavone aglycon and glycoside distribution in soy plants and soybeans by fast column high-performance liquid chromatography coupled with a diode-array detector. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **53**: 5848-5852.
- Klejdus, B., Vitamvasova-Sterbova, D., Kuban, V. (2001): Identification of isoflavone conjugates in red clover (*Trifolium pratense*) by liquid chromatography–mass spectrometry after two-dimensional solid-phase extraction. *Analytica Chimica Acta*, **450**: 81–97.
- Koga, T., Meydani, M. (2001): Effect of plasma metabolites of (+)-catechin and quercetin on monocyte adhesion to human aortic endothelial cells. *American Journal of Clinical Nutrition*, **73**:941–948.

- Kolodziejczyk-Czepas, J. (2012): Trifolium species-derived substances and extracts Biological activity and prospects for medicinal applications. *Journal of Ethnopharmacology*, **143**: 14–23.
- Korminl F., Ahmdel I., Yunusl R.M., Mohd Yusof Z.A. (2010): The potential of modified microwave extraction system (MMES) to extract bioactive components from ferns. *International Journal of Engineering and Technology* **10**: 027.
- Korolainen, M.A., Goldsteins, G., Tuula, A., Alafuzoff, I., Koistinaho, J., Pirttila, T. (2006): Oxidative modification of proteins in the frontal cortex of Alzheimer's disease brain. *Neurobiology of Aging*, **27**:42–53.
- Koshland, D. E. (1992): The molecule of the year. *Science*, **258**: 1861
- Kostić I., Marković T., Krnjajić S. (2012): Sekretorne strukture aromatičnih biljaka sa posebnim osvrtom na strukture sa etarskim uljima, mesta sinteze ulja i njihove važnije funkcije. *Lekovite sirovine*, **32**: 3-25.
- Kovačević, N. (2004): Osnovi farmakognozije, 3. izd.; Srpska školska knjiga, Beograd.
- Kovacic, P., Jacintho, J. D. (2001): Mechanisms of carcinogenesis:Focus on oxidative stress and electron transfer. *Currents in Medicinal Chemistry*, **8**: 773–796.
- Kreijkamp-Kaspers, S., Kok, L., Grobbee, D., Haan, E., Aleman, A., Van Der Schouw, Y. (2007): Dietary phytoestrogen intake and cognitive function in older women. *Journal of Gerontology Series A: Biological Medical Sciences*, **62**: 556-562.
- Krenn, L., Unterrieder, I., Ruprechter, R. (2002): Quantification of isoflavones in red clover by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*, **777**: 123–128.
- Krenn, L., Paper, D.H. (2009): Inhibition angiogenesis and inflammation by an extract of red clover (*Trifolium pratense* L.). *Phytomedicine*, **16**: 1083–1088.
- Kroyer, G.T. (2004): Red clover extract as antioxidant active and functiona food ingredient. *Innovative Food Science and Emerging Technology*, **5**:101–105.
- Ku, H.H, Brunk, U.T, Sohal, R.S. (1993): Relationship between mitochondrial superoxide and hydrogen peroxide production and longevity of mammalian species. *Free Radical Biology Medicine*, **15**:621–627.
- Kurzer, M. Xu, X. (1997): Dietary phytoestrogens. *Annual Review of Nutrition*, **17**: 353 – 381.
- Kurzer, M. (2002): Hormonal effects of soy in premenopausal women and men. *Journal of Nutrition*, **132**: 570-573.

- Lam, A.N.C., Demasi, M., James, M.J., Husband, A.J., Walker, C. (2004) : Effect of red clover isoflavones on COX-2 activity in murine and human monocyte/macrophage cells. *Nutrition and Cancer* **49**: 89–93.
- Lamartiniere, C.A. (2000): Protection against breast cancer with genistein: a component of soy. *American Journal of Clinical Nutrition*, **71**:1705-1707.
- Lange, B.M., Croteau, R. (1999): Genetic engineering of essential oil production in mint. *Current Opinion in Plant Biology*, **2**:139-144.
- Langsjoen, P.H., Langsjoen, A.M. (1999): Overview of the use of CoQ₁₀ in cardiovascular disease. *Biofactors*, **9**:273–84.
- Larson, R.A. (1998): The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry*, **27**: 969–978.
- LaRue, T.A., Patterson, T.G. (1981): How much nitrogen do legume fix? *Advances in Agronomy* **34**: 15-38.
- Lawson, L.D. (1998): Garlic: a review of its medicinal effects and indicated active compounds. U: Lawson, L.D., Bauer, R. (ur.) *Phytomedicines of Europe: chemistry and biological activity*. ACS Symposium Series, No 691. Washington, DC: American Chemical Society.
- Lechner, D.; Gibbons, S.; Bucar, F. (2008): Plant phenolic compounds as ethidium bromide efflux inhibitors in *Mycobacterium smegmatis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **62**: 345–348.
- Lephart, E., Rhee R., Setchell, K., Bu, L., Lund, T. (2003): Estrogens and phytoestrogens: brain plasticity of sexually dimorphic brain volumes. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, **85**: 299-309.
- Lesburg, A.C., Caruthers, M.J., Paschall, M.C., Christianson, W.D. (1998): Managing and manipulating carbocations in biology: terpenoid-cyclase structure and mechanism. *Current Opinion in Plant Biology*, **8**:695-703.
- Letchamo, W., Hi, X.U., Gosselin, A. (1995): Photosynthetic potential of *Thymus vulgaris* selection under 2 light regimes and 3 soil-water levels. *Scientia Horticulturae*, **62**: 89-101.
- Ley, J.P., Bertram, H-J. (2003): Synthesis of lipophilic clovamide derivatives and their antioxidative potential against lipid peroxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1**: 4596–4602.
- like growth factor, lipid and antioxidant status in healthy female volunteers: a pilot study. *European Journal of Clinical Nutrition*, **8**: 173–179.

- Lim, Y.H., Kim, I.H., Seo, J.J. (2007): *In vitro* activity of kaempferol isolated from the *Impatiens balsamina* alone and in combination with erythromycin or clindamycin against *Propionibacterium acnes*. *Journal of Microbiology*, **45**: 473-477.
- Lin, J., Rexrode, K.M., Hu, F., Albert, C.M., Chae, C.U., Rimm, E.B., Stampfer, M.J., Manson, J.E. (2007): Dietary intakes of flavonols and flavones and coronary heart disease in US women. *American Journal of Epidemiology*, **165**: 1305-1313.
- Lin, L-Z., He, X-G., Lindenmaier, M., Yang, J., Cleary, M., Sheng-Xiang Qiu, S-X., Cordell, G.A. (2000): LC-ESI-MS Study of the Flavonoid Glycoside Malonates of Red Clover (*Trifolium pratense*). *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **48**: 354-365.
- Lin, Y.T., Hsiu, S.L., Hou, Y.C., Chen, H.Y., Chao, P.D. (2003): Degradation of Flavonoid Aglycones by Rabbit, Rat and Human Fecal Flora. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, **26**:747-751.
- Linass, S.L., Whittenburg, D., Repine, J.F. (1990): Role of xanthine oxidase in ischemia/reperfusion injury. *American Journal of Physiology*, **258**:711-716.
- Lissin, L.W., Cooke, J.P. (2000): Phytoestrogens and cardiovascular health. *Journal of the American College of Cardiology*, **35**:1403-1410.
- Littarru, G.P., Tiano L. (2005): Clinical aspects of coenzyme Q10: an update. *Current Opinion in Clinical and Metabolic Care*, **8**:641-646.
- Liu, X., Piao, Y-S., Arnold, J.T. (2011): Transforming growth factor b1 increase of hydroxysteroid dehydrogenase proteins is partly suppressed by red clover isoflavones in human primary prostate cancer-derived stromal cells. *Carcinogenesis*, **32**: 1648-1654.
- Madej, A., Persson, E., Lundh, T., Ridderstrale, Y. (2002): Thyroid gland function in ovariectomized ewes exposed to phytoestrogens. *Journal of Chromatography B - Analytical Technologies in The Biomedical and Life Sciences*, **777**:281-287.
- Madlener, S., Illmer, C., Horvath, Z., Saiko, P., Losert, A., Herbacek, I., Grusch, M., Elford, H.L., Krupitza, G., Bernhaus, A. (2007): Gallic acid inhibits ribonucleotide reductase and cyclooxygenases in human HL-60 promyelocytic leukemia cells. *Cancer Letters*, **245**: 156-162.
- Madsen, H.L., Bertelsen, G. (1995): Spices as antioxidants. *Trends in Food and Science Technology*, **6**:271-277.
- Mahn, K., Borrás, C., Knock, G., Taylor, P., Khan, I., Sugden, D., Poston, L., Ward, J., Sharpe, R., Viña, J., Aaronson, P., Mann, G. (2005): Dietary soy isoflavone induced

- increases in antioxidant and eNOS gene expression lead to improved endothelial function and reduced blood pressure in vivo. *FASEB Journal*, **19**: 1755-1775.
- Malinowska, J., Kołodziejczyk-Czepas, J., Moniszko-Szajwaj, B., Kowalska, I., Oleszek, W., Stochmal, A., Olas, B. (2012): Phenolic fractions from *Trifolium pallidum* and *Trifolium scabrum* aerial parts in human plasma protect against changes induced by hyperhomocysteinemia *in vitro*. *Food Chemistry and Toxicology*, **50**: 4023-4027.
- Mandal, S.M., Chakraborty, D.S. (2010): Phenolic acids act as signaling molecules in plant–microbe symbioses. *Plant Signaling and Behavior*, **5**: 359-368.
- Marchand, L. (2002): Cancer preventive effects of flavonoids – a review. *Biomedical Pharmacotherapy*, **56**: 296-30.
- Mariani, E., Polidori, M.C., Cherubini, A., Mecocci, P. (2005): Oxidative stress in brain aging, neurodegenerative and vascular diseases: An overview. *Journal Chromaography B*, **827**:65–75.
- Markham, K.R. (1982): Techniques of flavonoid identification. Academic Press, London, UK.
- Marković, J., Štrbanović, R., Terzić, D., Pojić, M., Vasić, T., Babić, S. (2010): Relative feed value od alfalfa (*Medicago sativa* L.) and red clover (*Trifolium pratense* L.) at different stage of growth. *Biotechnology in Anima Husbandry*, **26**:469-474.
- Marshall, T.A., Roberts, R. J. (1990): In vitro and in vivo assessment of lipid peroxidation of infant nutrient preparations; effect of nutrition on oxygen toxicity. *Journal of American College of Nutrition*, **9**:190-199.
- Maruyama, N., Sekimoto, Y., Ishibashi, H. Shigeharu, I., Oshima, H., Yamaguchi, H., Abe, S. (2005): Suppression of neutrophil accumulation in mice by cutaneous application of geranium essential oil. *Journal of Inflammation*, **2**: 1–11.
- Materska, M. (2008): Quercetin and its derivatives: chemical structure and bioactivity – a review. *Polish journal of food and nutrition sciences*, **58**: 407-413.
- Mates, J.M., Perez-Gomez, C., Blanca, M. (2000): Chemical and biological activity of free radical ‘scavengers’ in allergic diseases. *Clinica Chimica Acta*, **296**: 1-15.
- Mates, M.J., Perez-Gowez, C., Blanca, M. (2000): Chemical and biological activity of free radical “scavengers” in allergic diseases. *Clinica et Chimica Acta*, **296**:1-15.
- Matsuda, T., Ferreri, K., Todorov, I., Kuroda, Y., Smith, C.V., Kandeel, F., Mullen, Y. (2005): Silymarin protects pancreatic-cells against cytokine-mediated toxicity:

- Implication of c-Jun NH2-terminal kinase and Janus kinase/signal transducer and activator of transcription pathways. *Endocrinology*, **146**: 175–185.
- Maul, R., Kulling, S.E. (2010): Absorption of red clover isoflavones in human subjects: results from a pilot study. *British Journal of Nutrition*, **103**: 1569–1572.
- McCord, J. M., Fridovich, I. (1969): Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocyte Hemocuprein. *Journal of Biochemical Chemistry*, **244**: 6049–6055.
- McCord, J.M. 2000: The evolution of free radicals and oxidative stress. *American Journal of Medicine*, **108**:652-659.
- Merz Demlow, B.E., Duncan, A.M., Wangen, K.E., Xu, X., Carr, T.P., Phipps, W.R., Kurzer, M.S. (2000): Soy isoflavones improve plasma lipids in normocholesterolemic, premenopausal women. *American Journal of Clinical Nutrition*, **71**:1462–1469.
- Messina, M. A. (2003): Close look at Soybeans. *4th Edition Nutritional Perspectives*, 176-177.
- Mimica-Dukić, N. (1997): *In vivo* and *in vitro* study of antioxidant activity of plant extracts. *Archive of Pharmacy*, **5**:475-493.
- Mimica-Dukic, N., Bozin, B., Sokovic, M., Simin, N. (2004): Antimicrobial and antioxidant activities of *Melissa officinalis* L. (Lamiaceae) essential oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**: 2485– 2489.
- Mittal, C. K., Murad, F. (1977): Activation of guanylate cyclase by superoxide-dismutase and hydroxyl radical—Physiological regulator of guanosine 3,5-monophosphate formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences. U.S.A.*, **74**: 4360–4364.
- Mišković, B. (1986): Krmno bilje, Naučna knjiga, Beograd.
- Morito, K., Hirose, T., Kinjo J., Hirakawa T., Okawa M., Nohara T., Ogawa S., Inoue S., Muramatsu M., Masamune Y. (2011): Interaction of phytoestrogens with estrogen receptors alpha and beta. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, **24**: 351-356.
- Mu, H., Bai, Y-H., Wang, T., Zhu, Z-M., Zhang, Y-W. (2009): Research of antioxidant effects and estrogenic effect of formononetin from *Trifolium pratense* (red clover). *Phytomedicine*, **16**: 314-319.
- Mueller, M., Jungbauer, A., (2008): Red clover extract: a putative source for simultaneous treatment of menopausal disorders and the metabolic syndrome. *Menopause*, **15**: 1120–1131.
- Nerland, D.E. (2007): The antioxidant/electrophile response element motif. *Drug Metabolism Reviews*, **39**:235–48.

- Nishidam, K.; Kasaharam, K., Iwasaki, I. (1985): Establishment of a new human endometrial adenocarcinoma cell line, Ishikawa cells, containing estrogen and progesterone receptors. *Acta Obstetrica et Gynaecologica Japonica*, **37**:1103-1111.
- Nissan, H.P., Lu, J., Booth, N.L., Yamamura, H.I., Farnsworth, N.R., Wan, Z. J. (2007): A red clover (*Trifolium pratense*) phase II clinical extract possesses opiateactivity. *Journal of Ethnopharmacology*, **112**: 207–210.
- Nordberg J., Arner, E. S. (2001): Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biology Medicine*, **3**: 1287-1312.
- Nozaik-Grayck, E., Suliman, H.B., Piantadosi, C.A. (2005): Extracellular superoxide dismutase. *International Journal of Biochem and Cell Biology*, **37**:2466-2471.
- Nozik-Grayck, E., Suliman, H.B., Piantadosi, C.A. (2005): Extracellular superoxide dismutase. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, **37**: 2466-2471.
- Oh, S.M., Kim, Y.P., Chung, K.H. (2009): Biphasic effects of kaempferol on the estrogenicity in human breast cancer cells. *Archives of Pharmaceutical Research*, **29**: 354-62.
- Oleszek, W., Stochmal, A. (2002): Triterpene saponins and flavonoids in the seeds of *Trifolium* species. *Phytochemistry*, **61**: 165–170.
- Oleszek, W., Stochmal, A., Janda, B. (2007): Concentration of isoflavones and other phenolics in the aerial parts of *Trifolium* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **55**: 8095–8100.
- Ozgova, S., Hermanek, J., Gut, I. (2003): Different antioxidant effects of polyphenols on lipid peroxidation and hydroxyl radicals in the NADPH-, Fe-ascorbate- and Fe-microsomal systems. *Biochemical Pharmacology*, **66**: 1127-37.
- P.K., Holmgren, N.H. (2003): Additions to Index Herbariorum (Herbaria), Edition – 8 Fourteenth Series. *Taxonomy*, **52**: 385-389.
- Pan, W., Ikeda, K., Takebe, M., Yamori, Y. (2001): Genistein, daidzein and glycitein inhibit growth and DNA synthesis of aortic smooth muscle cells from stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Journal of Nutrition*, **131**: 1154-1158.
- Pandjaitan, N., Howard, L. R., Morelock, T., Gil, M. I. (2005): Antioxidant capacity and phenolic content of Spinach as affected by genetics and maturation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**: 8618-8623.

- Parola, M., Leonarduzzi, G., Robino, G., Albano, E., Poli, G., Dianzani, M.U. (1996): On the role of lipid peroxidation in the pathogenesis of liver damage induced by long-standing cholestasis. *Free Radical Biology and Medicine*, **20**:351-357.
- Pedraza-Chaverri, J., Cárdenas-Rodríguez, N., Orozco-Ibarra, M., Pérez-Rojas, J.M. (2008): Medicinal properties of mangosteen (*Garcinia mangostana*). *Food Chemistry and Toxicology*, **46**: 3227–3239.
- Pekić B. (1983): Hemija i tehnologija farmaceutskih proizvoda (alkaloidi i etarska ulja), Tehnološki fakultet u Novom Sadu, Novi Sad.
- Pfischer, A., Reiter, E., Jungbauer, A. (2008): Receptor binding and transactivation activities of red clover isoflavones and their metabolites. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, **112**: 87–94.
- Phillipson, J.D. (2001): Phytochemistry and medicinal plants. *Phytochemistry*, 237–243.
- Piantadosi, C.A., Zhang J. (1996): Mitochondrial generation of reactive oxygen species after brain ischemia in the rat. *Stroke*, **27**:327–32.
- Pichersky, E., Gershenzon, J. (2002): The formation and function of plant volatiles: Perfumes for pollinator attraction and defense. *Current Opinion in Plant Biology*, **5**: 237-243.
- Pilšáková, L., Riečanský, I., Jagla, F. (2010): The Physiological Actions of Isoflavone Phytoestrogens. *Physiological Research*, **59**: 651-664.
- Pisha, E., Pezzuto, J. M. (1997): Cell-based assay for the determination of estrogenic and anti-estrogenic activities. *Methods in Cell Science*, **19**: 37-43.
- Polasek, J., Queiroz, E.F., Hostettmann, K. (2007): On-line identification of phenolic compounds of *Trifolium* species using HPLC-UV-MS and post-column UV derivatisation. *Phytochemical Analysis*, **18**:13–23.
- Polkowski, K., Mazurek, A. (2000): Biological properties of genistein. A review of in vitro and in vivo data. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, **57**: 135-155.
- Prashar, A., Locke, I., Evans, C. (2004): Cytotoxicity of lavender oil and its major components to human skin cells. *Cell Proliferation* **37**: 221–229.
- Primiano, T., Sutter, T.R., Kensler, T.W. (1997): Antioxidant-inducible genes. *Advances in Pharmacology*, **38**:293–328.
- Prior, R.L., Cao, G. (2000): Antioxidant phytochemicals in fruits and vegetables: diet and health implications. *Horticultural Sciences*, **35**:588–592.

- Rabinkov, A., Miron, T., Konstantinovski, L., Wilchek, M., Mirelman, D., Weiner, L. (1998): The mode of action of allicin: trapping of radicals and interaction with thiol containing proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1379**:233-244.
- Reiter, E., Gerster, P., Jungbauer, A. (2011): Red clover and soyisoflavones—an in vitro safety assessment. *Gynecological Endocrinology*, **27**:1037–1042.
- Rekka, E., Kourounakis, P.N. (1991): Effect of hydroxyethyl rutoside and related compounds on lipid peroxidation and free radical scavenging activity. Some structural aspects. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **43**: 486-490.
- Rice-Evans, A., Miller, J., Paganga, G. (1996): Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, **20**: 933-956.
- Rodriguez-Concepcion, M., Boronat, A. (2002): Elucidation of the methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria and plastids. A metabolic milestone achieved through genomics. *Plant Physiology*, **130**: 1079–1089.
- Routray, W., Orsat, V. (2012): Microwave-Assisted Extraction of Flavonoids: A Review. *Food and Bioprocess Technology*, **5**:409–424.
- Rowlands J.C., Berhow, M. A., Badger, T. M. (2002): Estrogenic and antiproliferative properties of soy sapogenols in human breast cancer cells in vitro. *Food and Chemical Toxicology*, **40**:1767–1774.
- Ruch, R.J., Cheng, S.J., Klaunig, J.E. (1989): Prevention of cytotoxicity and inhibition of
- Sabudak, T., Guler, N. (2009): *Trifolium L.*—a review on its phytochemical and pharmacological profile. *Phytotherapy Research*, **23**:439–446.
- Sakihama, Y., Cohen, M.F., Grace, S.C., Yamasaki, H. (2002): Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. *Toxicology*, **177**:67-80.
- Saleem, A., Walshe-Roussel, B., Harris, C., Asim, M., Tamayo, C., Sit, S., Arnason, J.T. (2009): Characterisation of phenolics in Flor-Essence—a compound herbal product and its contributing herbs. *Phytochemistry Analysis*, **20**:395-401.
- Sanchez-Moreno, C., Larrauri, J.A., Saura-Calixto, F. (1998): A procedure to measure their anti-radical efficiency of polyphenols. *Journal of the Science of Food Agriculture*, **76**:270-276.
- Sangwan, N.S., Farooqi, A.H.A., Shabih, F., Sangwan, R.S. (2001): Regulation of essential oil production in plants. *Plant Growth Regulation*, **34**: 3-21.

- Saviranta, N.M.M.; Julkunen-Tiitto, R.; Oksanen, O.; Karjalainen, R.O. Leaf phenolic compounds in red clover (*Trifolium pratense* L.) induced by exposure to moderately elevated ozone. (2010): *Environmental Pollution*. **158**: 440–446.
- Saviranta, N.M.M.; Julkunen-Tiitto, R.; Oksanen, O.; Karjalainen, R.O. (2010): Leaf phenolic compounds in red clover (*Trifolium pratense* L.) induced by exposure to moderately elevated ozone. *Environmental Pollution*, **158**: 440–446.
- Schmidt, E., Jirovetz, L., Buchbauer, G., Denkova, Z., Stoyanova, A., Murgov, I., Geissler, M.(2005): Antimicrobial testing and gas chromatographic analysis of aroma chemicals. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, **8**: 99–106.
- Setchell, K. D., Brown, N. M., Lydeking-Olsen, E. (2002): The clinical importance of the metabolite equol: A clue to the effectiveness of soy and its isoflavones. *Journal of Nutrition* **132**: 3577-3584.
- Setchell, K.D., Clerici, C. (2010): Equol: history, chemistry, and formation. *Journal of Nutrition* **140**:1355–1362.
- Setchell, K.D.R., Brown, N.M., Desai, P., Zimmer-Nechemias, L., Wolfe, B.E., Brashear, W.T., Kirschner, A.S., Cassidy, A. & Heubi, J.E. (2001): Bioavailability of pure isoflavones in healthy humans and analysis of commercial soy isoflavone supplements. *Journal of Nutrition*, **131**:1362-1375.
- Severe, M.B. (1986) Cutaneous reactions to alternative remedies. *British Medical Journal*, **293**:665–6.
- Shaw, S., Jayatilake, E. (1990): The role of aldehyde oxidase in ethanol-induced hepatic lipid peroxidation in the rat. *Biochemical Journal*, **268**:579-583.
- Shi, J., Arunasalam, K., Yeung, D., Kakuda, Y., Mittal, G., Jiang, Y. (2004): Medicinal Food Saponins from Edible Legumes: Chemistry, Processing, and Health Benefits. *Journal of Medicinal Food*, **7**: 67-78.
- Shin, J., Lee, Y., Kim, Y., Hwang, J., Park, O. (2007): Possible link between NO concentrations and COX-2 expression in systems treated with soy-isoflavones. *Annual New York of Academy Science*, **1095**: 564-573.
- Simms, N.R., Anderson, M.F. (2002): Mitochondrial contributions to tissue damage in stroke. *Neurochemistry International*, **40**:511–26.
- Simon, L.M., Fatrai, Z., Jonas, D.E., Matkovics, B. (1974): Study of metabolism enzymes during the development of phaseous vulgaris. *Biochem Physiol Pflanz*, **166**:389-393.

- Simoncini, T., Fornari, L., Mannela, P., Caruso, A., Garibaldi, S., Baldacci, S., Genazzani, A.R. (2005): Activation of nitric oxide synthesis in human endothelial cells by red clover extracts. *Menopause*, **12**: 69–77.
- Smith, R.L., Cohen, S.M., Doull, J, Feron, V.J., Goodman, J.I., Marnett, L.J., Portoghese, P.S., Waddell, W.J., Wagner, B.M., Hall, R.L., Higley, N.A., Lucas-Gavin, C., Adams, T.B. (2005): A procedure for the safety evaluation of natural flavor complexes used as ingredients in food: essential oils. *Food and Chemical Toxicology*, **43**: 345–363.
- Sohal, R.S., Mockett, R.J, Orr, W.C.(2002): Mechanisms of Aging: An appraisal of the oxidative stress hypothesis. *Free Radical Biological Medicine*, **33**:575–86.
- Soulinna, E.M., Buchsbaum, R.N., Racker, E. (1975): The effect of flavonoids on aerobic glycolysis and growth of tumor cells. *Cancer Research*, **35**: 1865-1872.
- Sousa, R.L., Marletta, M.A. (1985): Inhibition of cytochrome P-450 activity in rat liver microsomes by the natural occurring flavonoid, quercetin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **240**: 345-348.
- Srinivas, S.R. (1988): Volatile constituents in alfalfa and red clover extracts. *Review food science*, **18**: 343-353.
- Stadtman, E. R. (2004): Role of oxidant species in aging. *Currents in Medical Chemistry*, **11**: 1105–1112.
- Stashenko E.E., Jaramillo B.E., Martinez J.R. (2004): Analysis of volatile secondary metabolites from Colombian *Xylopiia aromatica* (Lamarck) by different extraction and headspace methods and gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, **1025**: 105-113.
- Sun, R.C., Sun, X.F., Zhang, S.H. (2001): Quantitative determination of hydroxycinnamicacids in wheat, rice, rye, and barley straws, maize stems, oil palm frond fiber, and fast-growing poplar wood. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49**:5122–5129.
- Swei, A. Suzuki, H. Parks, D.A. Delano, F.A. Schmid-Schonbein, G.W. Mechanism of oxygen free radical formation in experimental forms of hypertension. In On-line Proceedings of the 5th Internet World Congress on Biomedical Sciences '98, Hamilton, ON, Canada 16–17 December 1998.
- Takano-Ishikawa, Y., Goto, M., Yamaki, K. (2006): Structure-activity relations of inhibitory effects of various flavonoids on lipopolysaccharide-induced prostaglandin

- E2 production in rat peritoneal macrophages: Comparison between subclasses of flavonoids. *Phytomedicine*, **13**:310–317.
- Tapiero, H., Townsend, D.M., Tew, K.D. (2004): The role of carotenoids in the prevention of human pathologies. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, **58**:100–110.
- Taylor, N.L., Quesenberry, K.H. (1996): Red clover science. *Kluwer Academic Publishers*, 226pp.
- Tham, D. M.; Gardner, C. D.; Haskell, W. L. (1998): Clinical review 97: Potential health benefits of dietary phytoestrogens: A review of the clinical, epidemiological, and mechanistic evidence. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **83**: 2223-2235.
- Toda, S., Kumura, M., Ohnishi, M. (1991): Effect of phenolcarboxylic acids on superoxide anion and lipid peroxidation induced by superoxide anion. *Planta Medica*, **57**:8-10.
- Toebes, A. H. W., de Boer, V., Verkleij, J. A. C., Lingeman, H., Ernst, W. H. O. (2005): Extraction of isoflavone malonylglucosides from *Trifolium pratense* L. *Journal Agricultural Food Chemistry*, **53**: 4660-4666.
- Tsao, R., Papadopoulus, Y., Yang, R., J. Chris Young, C., McRae, K. (2006): Isoflavone Profiles of Red Clovers and Their Distribution in Different Parts Harvested at Different Growing Stages. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **54**: 5797-5805.
- Tsimidou, M., Boskou, D. (1994): Antioxidant activity of essential oils from the plants of the Lamiaceae family. In: G. Charalambous (Ed.), *Spices, herbs and edible fungi*, 273–284.
- Tsuchihashi, R., Sakamoto, S., Kodera, M., Nohara, T., Kinjo, J. (2008): Microbial metabolism of soy isoflavones by human intestinal bacterial strains. *Journal of Natural Medicines*, **62**: 456-460.
- Tucker, J.M., Townsend, D.M. (2005): Alpha-tocopherol: roles in prevention and therapy of human disease. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, **59**:380–387.
- Turunen, M., Olsson, J., Dallner, G. (2004): Metabolism and function of coenzyme Q. *Biochimica and Biophysica Acta*, **1660**:171–99.
- Valenziela, A., Aspillaga, M., Soledad, V., Guerra, R. (1989): Selectivity of sylimarin on the increase of the glutathione content in different tissue of the rat. *Planta Medica*, **55**:420-422.

- Valko, M., Leibfritz, D., Moncola, J., Cronin, M.T.D., Mazura, M., Telser, J. (2007): Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, **39**:44–84,
- Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M. (2006): Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.*, **160**, 1–40.
- Vasiljevic S, Glamocic D, Jajic I, Cupina B, Katic S, Milic D, Mikic V (2008): Fibre fractions of red clover (*Trifolium pratense* L) at different harvests over two seasons. EGF, Grassland Science in Europe **13**: 510-513.
- Verstraeten, S.V., Hammmestone, J.F., Keen, C.L., Fraga, C.G., Oteiza, P.L. (2005): Antioxidant and membrane effects of procyanidin dimers and trimeris isolated from peanut and Cocoa. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**:5041–5048.
- Vlaisavljevic, S., Kaurinovic, B., Popovic, M., Djurendic-Brenesel, M., Vasiljevic B., Cvetkovic, D., Vasiljevic, S. (2104): *Trifolium pratense* L. as a Potential Natural Antioxidant. *Molecules*, **19**: 713-725.
- Völkel, W., Sicilia, T., Pähler, A., Gsell, W., Tatschner, T., Jellinger K., Leblhuber F., Riederer P., Lutz W.K., Gotz, M.E. (2006): Increased brain levels of 4-hydroxy-2-nonenal glutathione conjugates in severe Alzheimer's disease. *Neurochemistry International*, **48**:679–686.
- Vourinen T., Reddy, G.V.P., Nerg, A.M., Holopainen, J. (2004): Monoterpene and herbivore-induced emissions from cabbage plants grown at elevated atmospheric CO₂ concentration. *Atmospheric Environment*, **38**: 675-682.
- Wang, X. (2010): Structural studies and mechanisms of isoflavonoid biosynthesis. Isoflavones biosynthesis, occurrence and health effects, 99. 234-254.
- Weber, K., Setchell, K., Stocco, D., Lephart, E. (2001): Dietary soy-phytoestrogens decrease testosterone levels and prostate weight without altering LH, prostate 5 α -reductase or testicular steroidogenic acute regulatory peptide levels in adult male Sprague-Dawley rats. *Journal of Endocrinology*, **170**: 591-599.
- Wersinger, C., Sidhu, A. (2002): Inflammation and Parkinson's disease. *Current Drug Targets Inflammation and Allergy*, **1**:221–242.
- Wink, M. (2003): Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry*, **64**: 3-19.

- Wu, Q., Wang, M., Simon, J.E. (2003): Determination of isoflavones in red clover and related species by high-performance liquid chromatography combined with ultraviolet and mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*, **1016**:195–209.
- Yan, H., Harding, J.J. (1997): Glycation-induced inactivation and loss of antigenicity of catalase and superoxide dismutase. *Biochemical Journal*, **328**:599-605.
- Yen, G.H., Chen, H.Y. (1997): Antioxidant activity of a various tea extracts in relation to their antimutagenicity. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **43**:27-32.
- Yildirim, A., Oktay, M., Bilaloglu, V. (2001): The antioxidant activity of the leaves of *Cydonia vulgaris*. *Turkish Journal of Medical Science*, **31**:23-27.
- Younes, M., Siegers, G.P. (1981): Mechanistic aspects of enhanced lipid peroxidation following glutathione depletion *in vivo*. *Cheico- Biological Interacteration*, **34**:257-266.
- Yu, J., Taylor, K.E., Zou, H., Biswas, N., Bewtra, J.K. (1994): Phenol conversion and dimeric intermediates in horseradish peroxidase-catalysed phenol removal from water. *Environmental Science Technology*, **28**: 2154–2160.
- Zern, T.L., West, K.L., Fernandez, M.L.(2003): Grape polyphenols decrease plasma triglycerides and cholesterol accumulation in the aorta of ovariectomized guinea pigs. *Journal of Nutrition*, **133**:2268–2272.
- Zhang, H.Y., Wang, L.F., Sun, Y.M. (2003): Why B-ring is the active center for genistein to scavenge peroxy radical: a DFT study. *Bioorganic and Medical Chemistry Letter*, **13**: 909-911.
- Zhang, Y., Seeram, N.P., Lee, R., Feng L., Hebe, D. (2008): Isolation and identification of strawberry phenolics with antioxidant and human cancer cell antiproliferative properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **56**: 670-675.
- Zhao, J., Liu, X.J., Ma, J.W., Zheng, R.L. (2004): DNA damage in healthy term neonate. *Early Human Development*, **77**:89-98.
- Zohary, M., Heller, D., (1984): *The Genus Trifolium*. Israel Academy of Sciences and Humanities, Jerusalem, Israel. 606.
- Zouari, S., Dhief, A., Aschi-Smiti, S. (2012): Chemical Composition of Essential Oils of *Calligonum comosum* Cultivated at the South-Eastern of Tunisia: A Comparative Study between Flowering and Fructification Stages. *Journal of Essential oil Bearing Plants*, **15**:320-327.

8. PRILOG

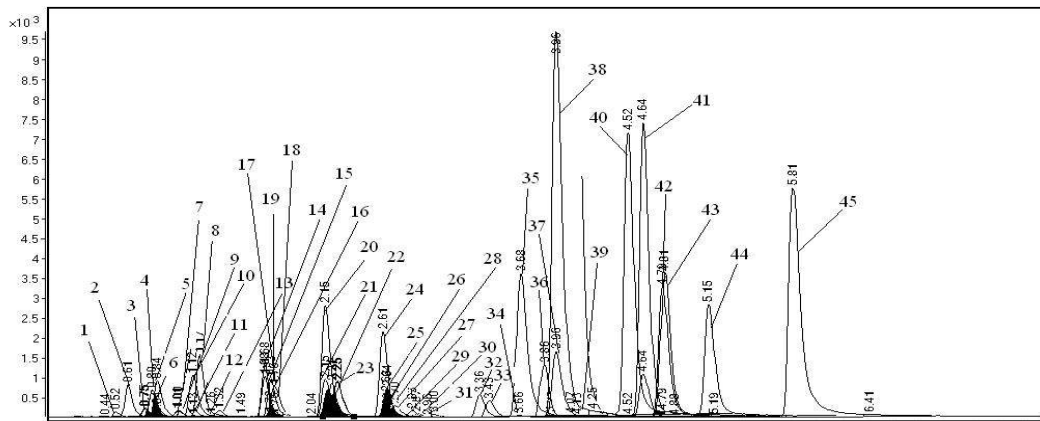
8.1. FITOHEMIJSKA ANALIZA *T.PRATENSE*

8.1.1. LC-MS/MS ANALIZA FENOLNIH KOMPONENATA

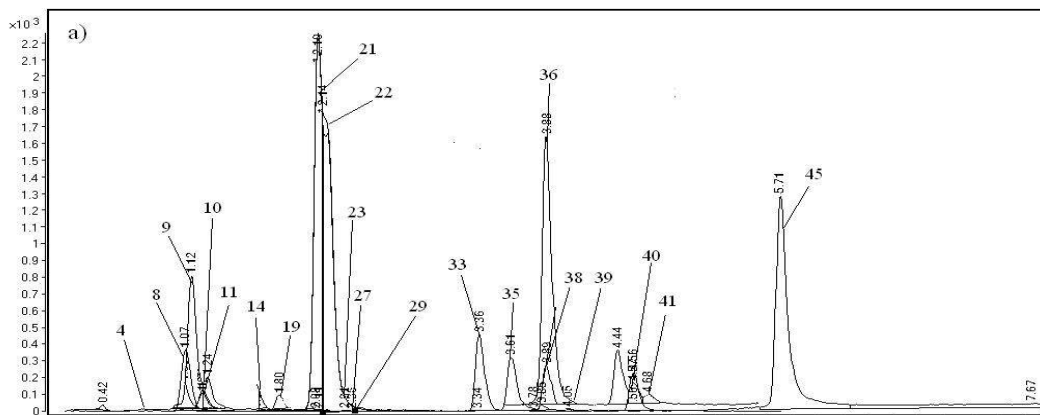
Tabela 8.1. Količina odabranih fenolnih komponenti u metanolnim ekstraktima *T.pratense*
Sadržaj fenola u ekstraktima *T. pratense* (µg/g s.e.)

	Jedinjenje	TP1	TP 2	TP 3
Fenolne kiseline	Hinska kiselina	nd	nd	nd
	Galna kiselina	nd	nd	nd
	Protokatehinska kiselina	0.197±0.004	0.079±0.003	nd
	Hlorogenska kiselina	nd	nd	nd
	2,5-dihidroksibenzojeva	0.088±0.001	0.087±0.001	nd
	p-hidroksibenzojeva	0.713±0.034	0.180±0.021	0.042±0.004
	Kafena kiselina	0.922±0.043	1.041±0.052	0.086±0.011
	Vanilinska kiselina	nd	nd	nd
	Siringinska kiselina	nd	nd	nd
	p-kumarinska kiselina	0.246±0.027	0.080±0.013	nd
	Ferulna kiselina	nd	nd	nd
	Sinapinska kiselina	nd	nd	nd
	o-kumarinska kiselina	nd	nd	nd
	3,4-dimetoksi cimetna kiselina	nd	nd	nd
	Cimetna kiselina	nd	nd	nd
Flavonoidi	Apigenin	0.320±0.037	0.012±0.001	0.144±0.041
	Apigenin 7-O-glukozid	0.034±0.001	0.288±0.052	0.014±0.002
	Apigein	nd	nd	nd
	Viteksin	0.246±0.001	0.080±0.001	nd
	Amentoflavon	0.345±0.001	nd	0.018±0.002
	Baikalein	nd	nd	nd
	Isorhamnetin	nd	nd	nd
	Kamferol	0.062±0.001	nd	0.015±0.001
	Kamferol -3-O-glukozid	1.344±0.081	8.544±0.095	0.277±0.049
	Krizoeriol	nd	nd	nd
	Luteolin	0.229±0.032	0.011±0.001	0.028±0.003
	Luteolin-7-O-glukozid	nd	0.032±0.004	nd
	Kvercetin	0.128±0.042	0.017±0.002	0.018±0.002
	Kvercetin- 3-O-glukozid	3.137±0.109	24.243±0.371	0.817±0.016
	Hiperozid	5.624±0.212	45.259±0.628	1.540±0.059
	Rutin	0.020±0.001	0.157±0.027	nd
	Miricetin	nd	nd	nd
	Naringenin	0.014±0.002	nd	0.062±0.005
	Epikatehin	nd	nd	nd
	Katehin	nd	nd	nd
Epigalokatehin galat	nd	nd	nd	
Izoflavoni	Daidzein	1.527±0.077	0.121±0.031	0.878±0.064
	Genistein	0.588±0.056	0.031±0.004	0.561±0.038
Kumarini	Umbeliferon	nd	nd	nd
	Eskuletin	0.606±0.033	0.293±0.028	0.076±0.017
	Skopoletin	nd	nd	nd
Lignani	Matairesinol	nd	nd	nd
	Sekoizolaricirezinol	nd	nd	nd

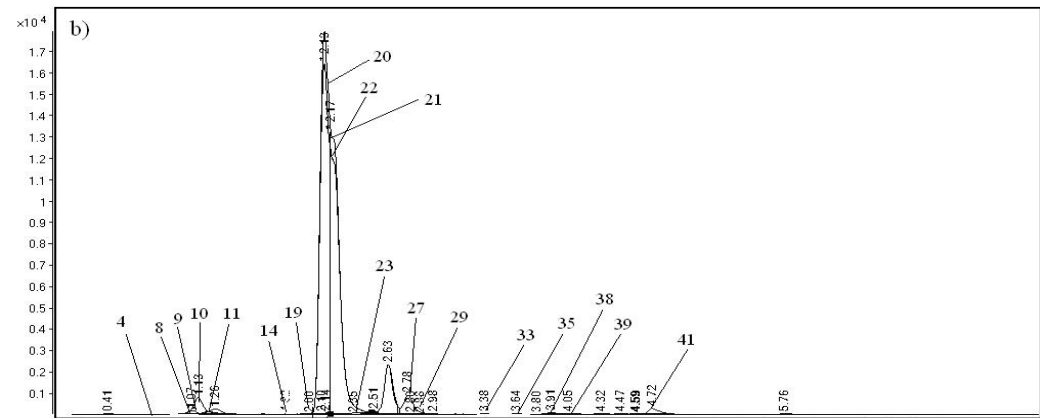
- nd – nedetektovano



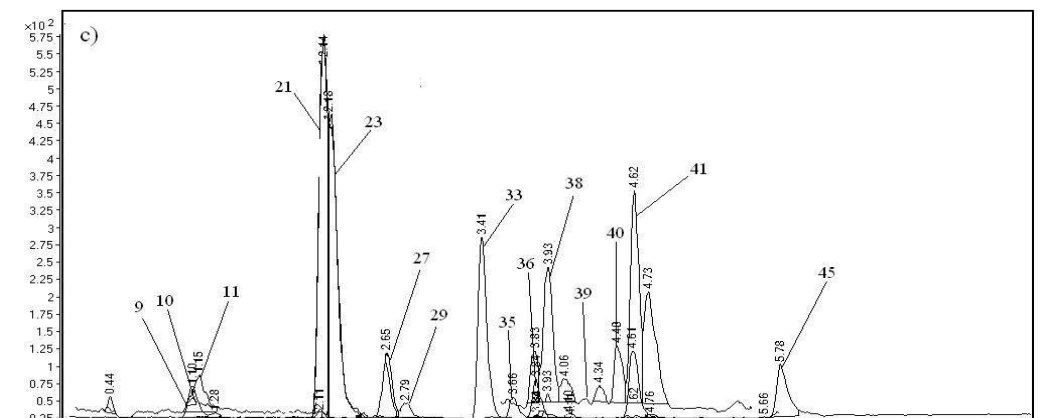
Slika 8.1. Hromatogram standard odabranih fenola



Slika 8.2. Hromatogram metanolog ekstrakta uzorka TP1



Slika 8.3. Hromatogram metanolog ekstrakta uzorka TP2



Slika 8.4. Hromatogram metanolog ekstrakta uzorka TP3

8.1.2. GC-MS ANALIZA VOLATILNIH KOMPONENTI

Tabela 8.2. Sadržaj volatilnih jedinjenja prisutnih u etarskom ulju *T. pratense*

R.br.	Jedinjenje	RI	Sadržaj (%)			Identifikacija
			TP1	TP2	TP3	
1.	Heksan	604	1.70	-	-	RI, MS
2.	2-Pentanon	680	-	6.66	-	RI, MS
3.	Metilbenzen	769	2.14	2.57	-	RI, MS
4.	1,3-Dimetilbenzen	867	1.10	-	-	RI, MS
5.	1,4-Dimetilbenzen	883	-	2.01	-	RI, MS
6.	Pentanska kiselina	904	-	2.39	1.42	RI, MS
7.	7-Okten-4-ol	963	1.47	1.35	0.88	MS
8.	Beta-mircen	990	4.5	-	-	RT, RI, MS
9.	Ciklopropan	ni	0.36	-	-	RI, MS
10.	Nonanal	1108	-	-	1.72	RI, MS
11.	2,4-Heptadienal	1011	-	-	0.35	RI, MS
12.	1-Bromocikloheksan	1023	-	-	1.28	RI, MS
13.	Fenhil alkohol	1140	0.40	-	-	MS
14.	1,2,6-Hexanetriol	ni	-	-	0.56	MS
15.	p-Cimen	1026	3.59	-	-	RT, RI, MS
16.	l-Limonen	1030	3.86	-	-	RI, MS
17.	Benzaldehid	1045	-	-	5.52	RI, MS
18.	Izobornil tiocijanoacetat	1790	0.76	-	-	MS
19.	Dekan	1005	0.39	0.44	-	RI, MS
20.	Undekan	1109	-	2.94	-	RI, MS
21.	Dihidrokarvon	1201	-	-	6.47	RI, MS
22.	Beta-jonon	1424	9.46	9.07	9.90	RT, RI, MS
23.	10-Metillonadekan	1943	0.61	-	-	RI, MS
24.	2(4H)-Benzofuranon, 5,6,7,7a-tetrahidro-4,4,7a-trimetil	1527	5.60	5.77	5.81	MS
25.	3-heksen-1-ol	1392	2.20	-	-	MS
26.	Megastigmatrienon	1560	-	-	16.10	RI, MS
27.	Heksadekan	1590	2.69	-	-	RI, MS
28.	Dodekanska kiselina	1568	0.54	-	-	RI, MS
29.	2,6-Diizopropilnaftalen	1728	7.51	5.44	1.76	RI, MS
30.	Tetradekan	1400	0.31	-	-	RI, MS
31.	Pentadekan	1498	-	-	0.91	RI, MS
32.	Izopropil mrstat	1830	-	0.51	-	MS
33.	Tetrahydrojonon	1470	1.56	-	-	RI, MS
34.	Heksahidrofarnezil aceton	1922	6.29	7.63	-	RI, MS
35.	Okenol	2068	0.39	-	-	MS
36.	Fitol	2128	-	14.54	15.46	RI, MS
37.	4-Bromo-1-metil-5-nitroimidazol	ni	0.46	-	-	RI, MS
38.	n-Heksadekanska kiselina	1983	3.22	2.09	-	RI, MS
39.	Pentakozan	2493	-	3.81	-	RI, MS

- ni-neidentifikovao

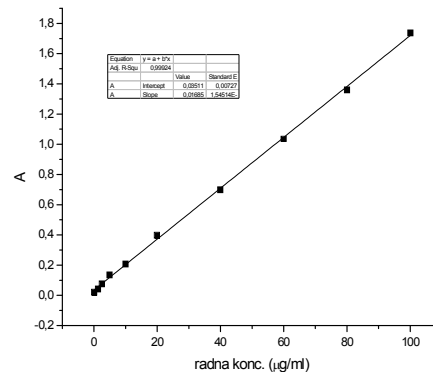
Ukupno	92.00	85.61	53.69
Monoterpeni	12.00	-	6.47
Seskviterpeni	29.90	30.86	23.91
Diterpenoidi	25.56	24.53	9.90
Alifatična jedinjenja	13.34	20.20	4.85
Aromatična jedinjenja	11.20	10.02	8.56

8.2. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDANTNOG KAPACITETA EKSTRAKATIMA *T. PRATENSE*

8.2.1. Sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima *T.pratense*

Tabela 8.3. Kalibraciona kriva galne kiseline

Početna konc. [$\mu\text{g/ml}$]	Radna konc. [$\mu\text{g/ml}$]	A_1	A_2	A_3	\bar{A}	$A_{\text{konačno}}$
0	0	0.052	0.081	0.057	0.063	0.02333
12.5	1.25	0.091	0.074	0.07	0.078	0.04233
25	2.5	0.119	0.122	0.121	0.121	0.07467
50	5	0.185	0.163	0.145	0.164	0.13633
100	10	0.258	0.254	0.237	0.250	0.20667
200	20	0.432	0.437	0.453	0.441	0.39867
400	40	0.744	0.723	0.76	0.742	0.70133
600	60	1.103	1.145	1.076	1.108	1.037
800	80	1.405	1.361	1.406	1.391	1.36167
1000	100	1.741	1.813	1.77	1.775	1.73867



Tabele 8.4.-8.6.-Sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima TP1, TP2, TP3

Tabela 8.4.

TP1	A_1	A_2	A_3	\bar{A}	Očitana konc. [$\mu\text{g/ml}$]	Sadržaj galne kis. u mg/lg suvog ekstrakta
Et ₂ O	0.4636	0.4683	0.4767	0.4695	25.78	28.33
CHCl ₃	0.4812	0.4953	0.5067	0.4944	23.10	25.38
EtOAc	0.5601	0.5742	0.6045	0.5796	32.31	35.51
n-BuOH	0.564	0.5218	0.5057	0.5305	29.40	32.31
ukupni	0.662	0.7128	0.6968	0.6905	38.90	42.74
vodeni	0.5255	0.5628	0.5969	0.5617	31.25	34.34

Tabela 8.5.

TP2	A_1	A_2	A_3	\bar{A}	Očitana konc. [$\mu\text{g/ml}$]	Sadržaj galne kis. u mg/lg suvog ekstrakta
Et ₂ O	0.3839	0.4191	0.3826	0.3952	21.37	23.48
CHCl ₃	0.3039	0.333	0.3363	0.3246	13.02	14.22
EtOAc	0.491	0.5113	0.5285	0.5103	28.20	30.99
n-BuOH	0.4997	0.5071	0.5059	0.5042	27.84	30.59
ukupni	0.5255	0.5628	0.5969	0.5617	31.25	34.34
vodeni	0.5028	0.5117	0.5129	0.5091	28.13	30.91

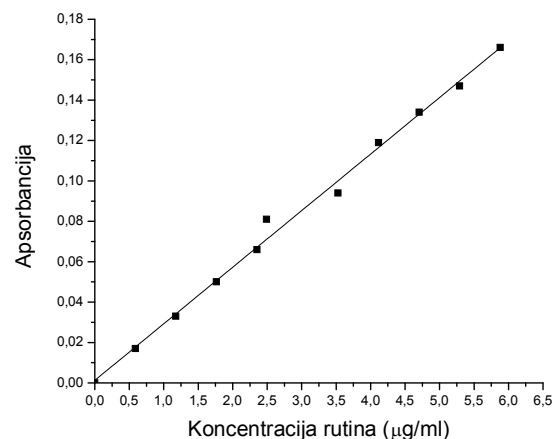
Tabela 8.6.

TP3	A_1	A_2	A_3	\bar{A}	Očitana konc. [$\mu\text{g/ml}$]	Sadržaj galne kis. u mg/lg suvog ekstrakta
Et ₂ O	0.3388	0.33	0.3357	0.3348	17.79	19.55
CHCl ₃	0.3591	0.3513	0.3477	0.3528	14.67	16.14
EtOAc	0.5005	0.5227	0.4379	0.4870	26.82	29.47
n-BuOH		0.2919	0.3144	0.3032	15.91	17.48
ukupni	0.491	0.5113	0.5285	0.5103	28.20	30.99
vodeni	0.4923	0.4866	0.3909	0.4566	25.01	27.49

8.2.2. Sadržaj ukupnih flavonoida u ekstraktima *T.pratense*

Tabela 8.7. Kalibraciona kriva rutina

Rastvor rutina [ml]	Voda [ml]	Rastvor AlCl ₃ [ml]	Koncentracija rutina [µg/ml]	Apsorbancija
0	12	5	0.000	0.000
1	11	5	0.588	0.017
2	10	5	1.176	0.033
3	9	5	1.764	0.050
4	8	5	2.352	0.066
5	7	5	2.490	0.081
6	6	5	3.528	0.094
7	5	5	4.116	0.119
8	4	5	4.704	0.134
9	3	5	5.292	0.147
10	2	5	5.880	0.166



Tabele 8.8.-8.10.- Sadržaj ukupnih flavonoida u ekstraktima TP1, TP2, TP3

Tabela 8.8.

TP1	A ₁	A ₂	A ₃	\bar{A}	Očitana konc. [µg/ml]	Sadržaj rutina u mg/lg suvog ekstrakta
Et ₂ O	0.1523	0.1510	0.1486	0.1506	5.3344	18.14
CHCl ₃	0.1463	0.1446	0.1470	0.1460	5.1677	17.57
EtOAc	0.1647	0.1650	0.1638	0.1645	5.8296	19.82
n-BuOH	0.1544	0.1468	0.1559	0.1524	5.3963	18.35
ukupni	0.1679	0.1674	0.1681	0.1678	5.9475	20.22
vodeni	0.1580	0.1576	0.1566	0.1574	5.5761	18.96

Tabela 8.9.

TP2	A ₁	A ₂	A ₃	\bar{A}	Očitana konc. [µg/ml]	Sadržaj rutina u mg/lg suvog ekstrakta
Et ₂ O	0.1473	0.15	0.1491	0.1488	5.2689	17.91
CHCl ₃	0.1417	0.1422	0.1434	0.1424	5.0415	17.14
EtOAc	0.1620	0.1631	0.1609	0.1620	5.7404	19.52
n-BuOH	0.1533	0.1509	0.1523	0.1522	5.3892	18.32
ukupni	0.1648	0.1660	0.1638	0.1649	5.8427	19.87
vodeni	0.1544	0.1530	0.1536	0.1537	5.4427	18.51

Tabela 8.10.

TP3	A ₁	A ₂	A ₃	\bar{A}	Očitana konc. [µg/ml]	Sadržaj rutina u mg/lg suvog ekstrakta
Et ₂ O	0.1472	0.1439	0.1458	0.1456	5.1558	17.53
CHCl ₃	0.1223	0.1276	0.1221	0.1240	4.3832	14.90
EtOAc	0.1548	0.1544	0.1543	0.1545	5.4725	18.61
n-BuOH	0.1465	0.1462	0.1469	0.1465	5.1880	17.64
ukupni	0.1567	0.1609	0.1643	0.1606	5.6915	19.35
vodeni	0.1499	0.1501	0.1496	0.1499	5.3070	18.04

8.2.3. Neutralizacija DPPH radikala – ekstrakti

(Tabele 8.11.- 8.28.)

Tabela 8.11.

TP _{1MeOH}					
Radna konc. [$\mu\text{g/ml}$]	A_1	A_2	A_3	\bar{A}	RSC [%]
125.00	0.0590	0.0575	0.0578	0.0581	71.67
62.50	0.0831	0.0837	0.0834	0.0834	59.34
25.00	0.0959	0.0965	0.0949	0.0958	53.31
12.50	0.1237	0.1238	0.1230	0.1235	39.79
6.25	0.1435	0.1434	0.1437	0.1435	30.02
2.50	0.1758	0.1767	0.1755	0.1760	14.19

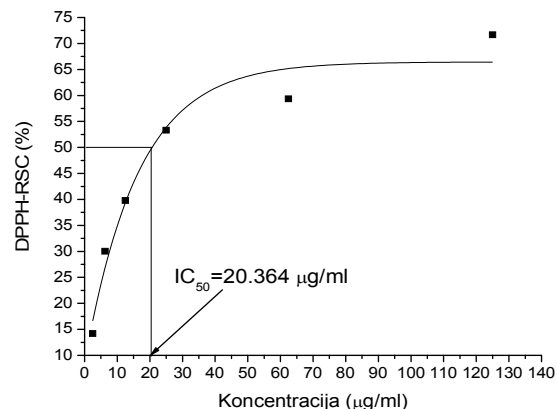


Tabela 8.12.

TP _{1Et2O}					
Radna konc. [$\mu\text{g/ml}$]	A_1	A_2	A_3	\bar{A}	RSC [%]
125.00	0.0641	0.0650	0.0659	0.0650	68.85
62.50	0.0741	0.0748	0.0747	0.0745	64.29
25.00	0.1106	0.1105	0.1112	0.1108	46.93
12.50	0.1507	0.1495	0.1496	0.1499	28.16
6.25	0.1662	0.1659	0.1663	0.1661	20.40
2.50	0.1918	0.1911	0.1907	0.1912	8.39

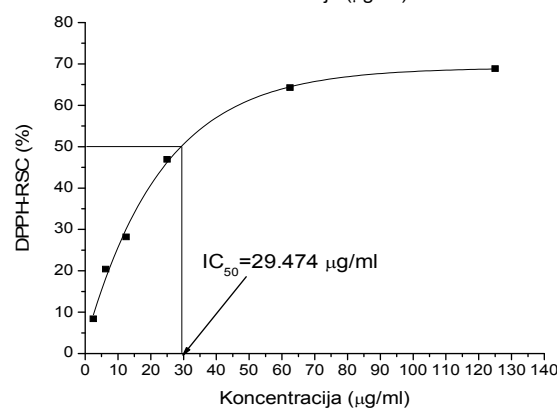


Tabela 8.13.

TP _{1CHCl3}					
Radna konc. [$\mu\text{g/ml}$]	A_1	A_2	A_3	\bar{A}	RSC [%]
125.00	0.0687	0.0679	0.0673	0.0680	67.21
62.50	0.0898	0.0907	0.0899	0.0901	56.52
25.00	0.1118	0.1116	0.1110	0.1115	46.23
12.50	0.1416	0.1410	0.1413	0.1413	31.84
6.25	0.1516	0.1514	0.1522	0.1517	26.80
2.50	0.1714	0.1713	0.1721	0.1716	17.22

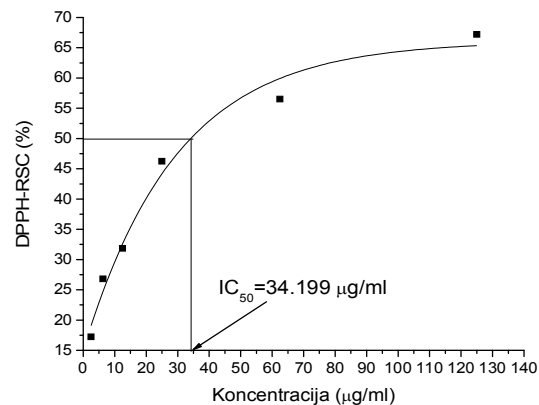


Tabela 8.14.

TP _{1EtOAc}					
Radna konc. [$\mu\text{g/ml}$]	A_1	A_2	A_3	\bar{A}	RSC [%]
125.00	0.0755	0.0631	0.0626	0.0671	67.20
62.50	0.0793	0.0695	0.0657	0.0715	65.04
25.00	0.0856	0.0770	0.0853	0.0826	59.61
12.50	0.1239	0.1225	0.1263	0.1242	39.27
6.25	0.1412	0.1453	0.1380	0.1415	30.81
2.50	0.1642	0.1699	0.1653	0.1665	18.58

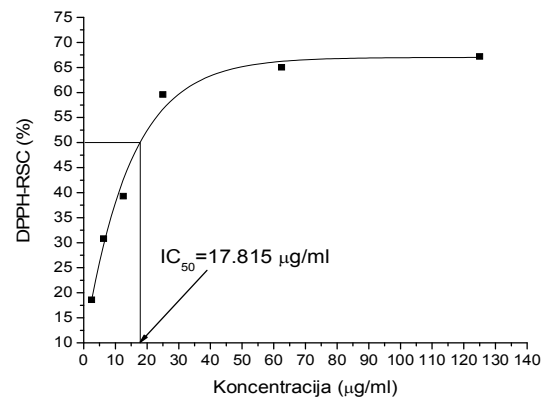


Tabela 8.15.

TP _{1BuOH}					
Radna konc. [$\mu\text{g/ml}$]	A_1	A_2	A_3	\bar{A}	RSC [%]
125.00	0.0641	0.0650	0.0659	0.0650	68.85
62.50	0.0741	0.0748	0.0747	0.0745	64.29
25.00	0.1106	0.1105	0.1112	0.1108	46.93
12.50	0.1507	0.1495	0.1496	0.1499	28.16
6.25	0.1662	0.1659	0.1663	0.1661	20.40
2.50	0.1918	0.1911	0.1907	0.1912	8.39

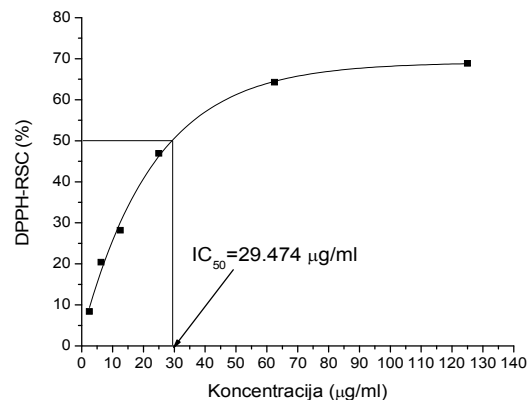


Tabela 8.16.

TP _{1H2O}					
Radna konc. [$\mu\text{g/ml}$]	A_1	A_2	A_3	\bar{A}	RSC [%]
125.00	0.0310	0.0309	0.0319	0.0313	85.20
62.50	0.0654	0.0658	0.0660	0.0657	68.88
25.00	0.0812	0.0819	0.0813	0.0815	61.43
12.50	0.1158	0.1162	0.1165	0.1162	45.00
6.25	0.1664	0.1662	0.1653	0.1660	21.42
2.50	0.1744	0.1748	0.1749	0.1747	17.28

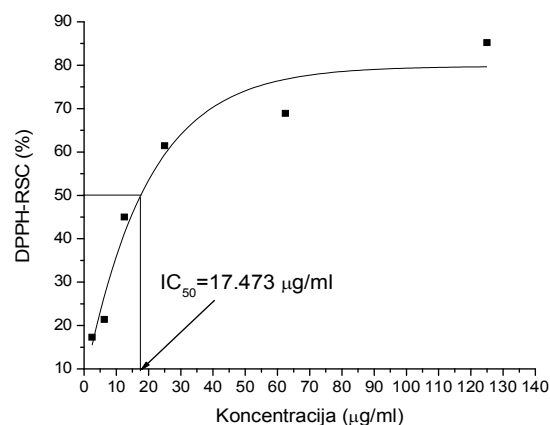


Tabela 8.17.

TP _{2MeOH}					
Radna konc. [$\mu\text{g/ml}$]	A_1	A_2	A_3	\bar{A}	RSC [%]
125.00	0.0653	0.0657	0.0652	0.0654	69.31
62.50	0.0712	0.0719	0.0724	0.0718	66.29
25.00	0.0954	0.0948	0.0956	0.0953	55.28
12.50	0.1243	0.1245	0.1250	0.1246	41.53
6.25	0.1315	0.1318	0.1311	0.1315	38.31
2.50	0.1576	0.1580	0.1572	0.1576	26.04

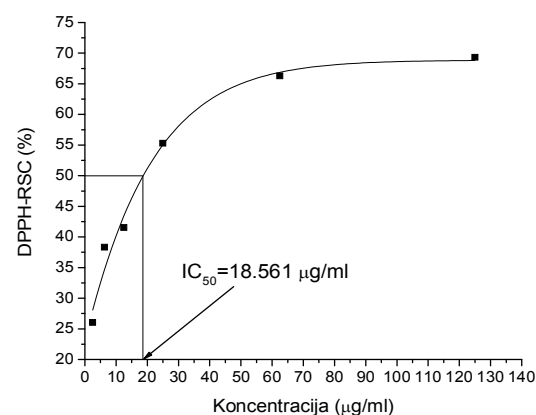


Tabela 8.18.

TP _{2Et2O}					
Radna konc. [$\mu\text{g/ml}$]	A_1	A_2	A_3	\bar{A}	RSC [%]
125.00	0.0524	0.0527	0.0519	0.0523	74.95
62.50	0.0705	0.0703	0.0709	0.0706	66.22
25.00	0.0838	0.0831	0.0834	0.0834	60.06
12.50	0.1256	0.1261	0.1263	0.1260	39.68
6.25	0.1436	0.1438	0.1431	0.1435	31.31
2.50	0.1550	0.1540	0.1543	0.1544	26.07

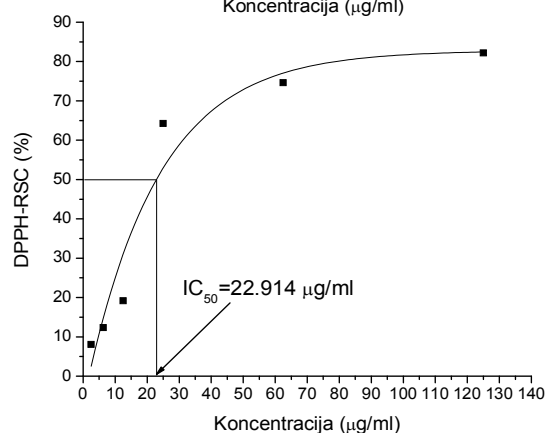


Tabela 8.19.

TP ₂ CHCl ₃					
Radna konc. [µg/ml]	A ₁	A ₂	A ₃	\bar{A}	RSC _{DPPH} [%]
125.00	0.0853	0.0847	0.0853	0.0851	60.29
62.50	0.1058	0.1044	0.1049	0.1050	50.99
25.00	0.1371	0.1376	0.1371	0.1373	35.95
12.50	0.1573	0.1564	0.1568	0.1568	26.82
6.25	0.1831	0.1833	0.1821	0.1828	14.68
2.50	0.2015	0.2016	0.2024	0.2018	5.82

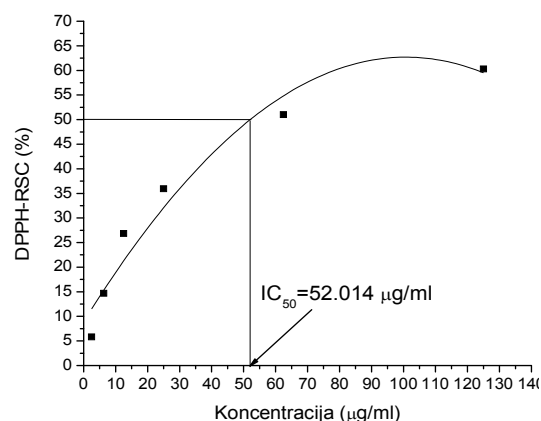


Tabela 8.20.

TP ₂ EtOAc					
Radna konc. [µg/ml]	A ₁	A ₂	A ₃	\bar{A}	RSC _{DPPH} [%]
125.00	0.0512	0.0511	0.0503	0.0509	73.91
62.50	0.0664	0.0661	0.0678	0.0668	65.76
25.00	0.0839	0.0845	0.0841	0.0842	56.84
12.50	0.1328	0.1316	0.1318	0.1321	32.29
6.25	0.1558	0.1554	0.1548	0.1553	20.40
2.50	0.1657	0.1660	0.1653	0.1657	15.07

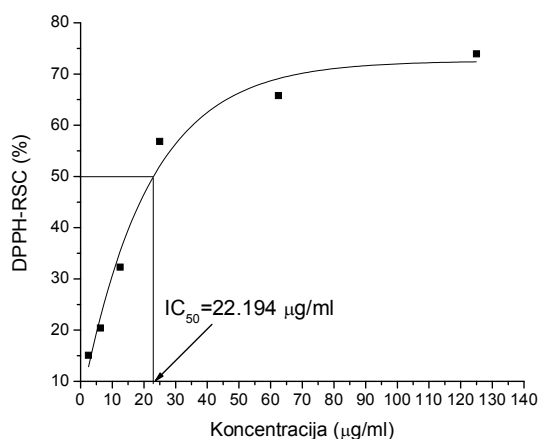


Tabela 8.21.

TP ₂ BuOH					
Radna konc. [µg/ml]	A ₁	A ₂	A ₃	\bar{A}	RSC _{DPPH} [%]
125.00	0.0586	0.0579	0.0581	0.0582	70.56
62.50	0.0833	0.0827	0.0829	0.0830	58.03
25.00	0.1144	0.1156	0.1146	0.1149	41.90
12.50	0.1367	0.1365	0.1354	0.1362	31.11
6.25	0.1714	0.1711	0.1707	0.1711	13.47
2.50	0.1777	0.1785	0.1782	0.1781	9.90

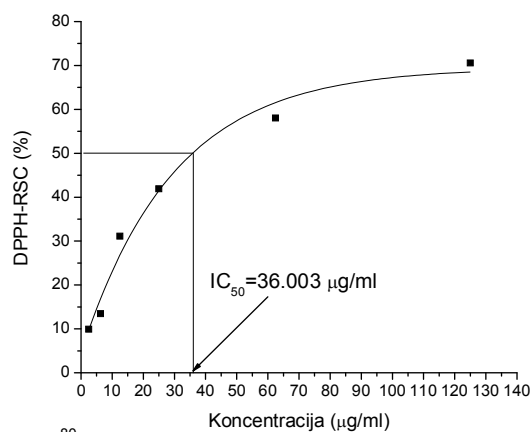


Tabela 8.22.

TP ₃ H ₂ O					
Radna konc. [µg/ml]	A ₁	A ₂	A ₃	\bar{A}	RSC [%]
125.00	0.0349	0.0340	0.0345	0.0345	82.17
62.50	0.0490	0.0487	0.0495	0.0491	74.62
25.00	0.0682	0.0698	0.0694	0.0691	64.24
12.50	0.1565	0.1561	0.1562	0.1563	19.16
6.25	0.1699	0.1694	0.1691	0.1695	12.33
2.50	0.1774	0.1779	0.1778	0.1777	8.07

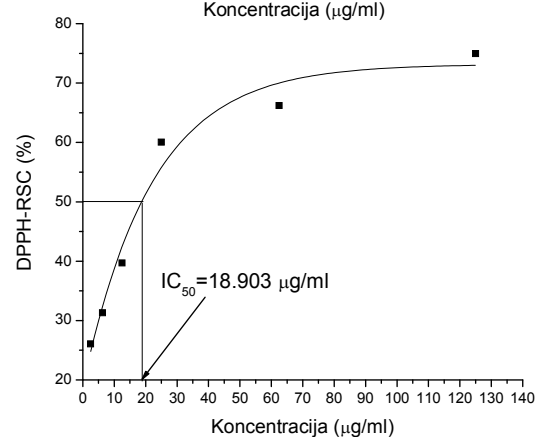


Tabela 8.23.

TP ₃ MeOH					
Radna konc. [$\mu\text{g/ml}$]	A_1	A_2	A_3	\bar{A}	RSC [%]
125.00	0.0315	0.0311	0.0322	0.0316	83.99
62.50	0.0364	0.0360	0.0358	0.0361	81.73
25.00	0.0975	0.0974	0.0971	0.0973	50.69
12.50	0.1251	0.1258	0.1258	0.1256	36.39
6.25	0.1646	0.1643	0.1646	0.1645	16.67
2.50	0.1881	0.1885	0.1879	0.1882	4.68

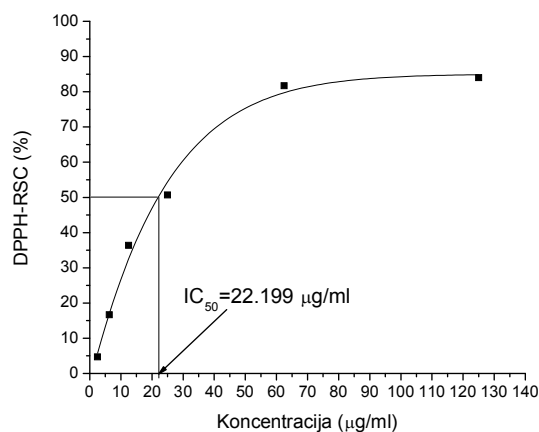


Tabela 8.24.

TP ₂ Et ₂ O					
Radna konc. [$\mu\text{g/ml}$]	A_1	A_2	A_3	\bar{A}	RSC [%]
125.00	0.0428	0.0415	0.0424	0.0422	78.77
62.50	0.0673	0.0675	0.0671	0.0673	66.16
25.00	0.1156	0.1155	0.1052	0.1121	43.69
12.50	0.1270	0.1276	0.1274	0.1273	35.98
6.25	0.1588	0.1584	0.1591	0.1588	20.18
2.50	0.1762	0.1755	0.1747	0.1755	11.78

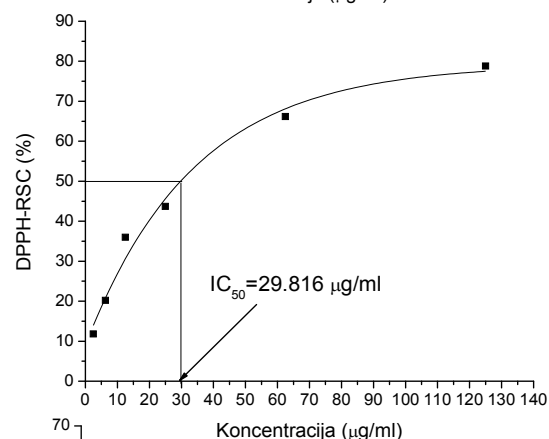


Tabela 8.25.

TP ₃ CHCl ₃					
Radna konc. [$\mu\text{g/ml}$]	A_1	A_2	A_3	\bar{A}	RSC [%]
125.00	0.0744	0.0736	0.0741	0.0740	63.99
62.50	0.0923	0.0927	0.0921	0.0924	55.07
25.00	0.1479	0.1475	0.1470	0.1475	28.27
12.50	0.1532	0.1526	0.1530	0.1529	25.62
6.25	0.1698	0.1696	0.1694	0.1696	17.51
2.50	0.1849	0.1838	0.1845	0.1844	10.31

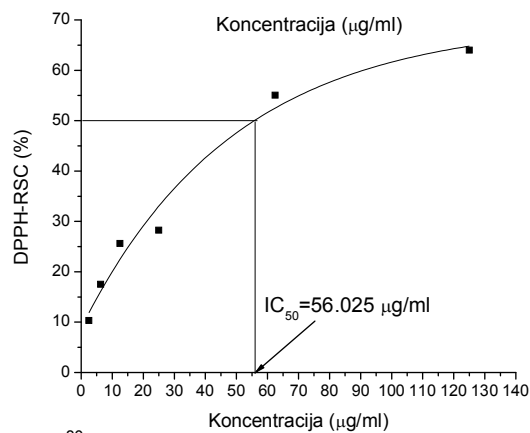


Tabela 8.26.

TP ₃ EtOAc					
Radna konc. [$\mu\text{g/ml}$]	A_1	A_2	A_3	\bar{A}	RSC [%]
125.00	0.0608	0.0604	0.0611	0.0608	69.14
62.50	0.0751	0.0740	0.0735	0.0742	62.34
25.00	0.1101	0.1106	0.1098	0.1102	44.06
12.50	0.1247	0.1252	0.1241	0.1247	36.70
6.25	0.1535	0.1537	0.1534	0.1535	22.08
2.50	0.1665	0.1676	0.1669	0.1670	15.23

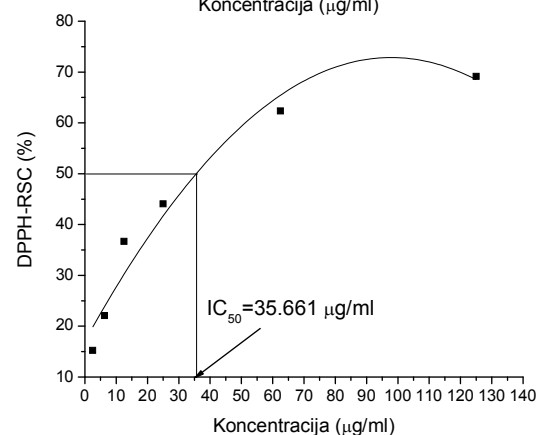
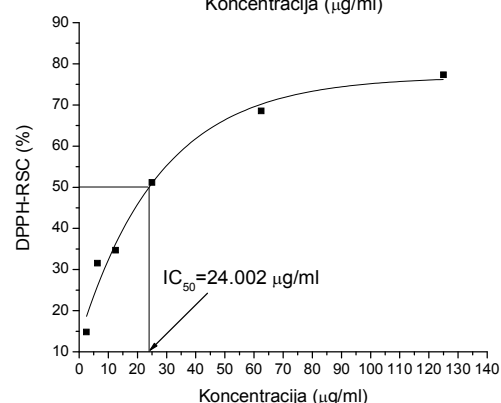
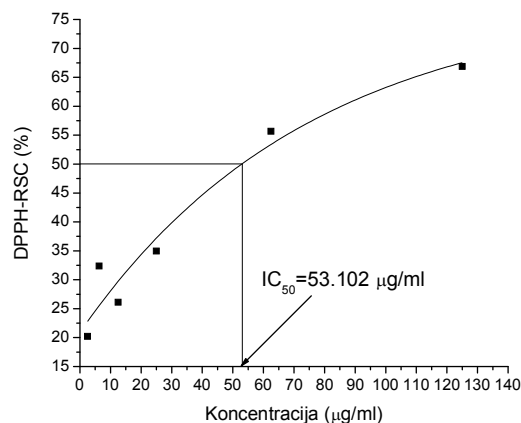


Tabela 8.27.

TP _{3nBuOH}					
Radna konc. [$\mu\text{g/ml}$]	A_1	A_2	A_3	\bar{A}	RSC [%]
125.00	0.0704	0.0707	0.0694	0.0702	66.86
62.50	0.0945	0.0938	0.0933	0.0939	55.66
25.00	0.1371	0.1381	0.1380	0.1377	34.94
12.50	0.1566	0.1567	0.1559	0.1564	26.12
6.25	0.1435	0.1428	0.1432	0.1432	32.37
2.50	0.1692	0.1691	0.1684	0.1689	20.22

Tabela 8.28

TP _{3H₂O}					
Radna konc. [$\mu\text{g/ml}$]	A_1	A_2	A_3	\bar{A}	RSC [%]
125.00	0.0452	0.0451	0.0439	0.0447	77.32
62.50	0.0622	0.0617	0.0623	0.0621	68.53
25.00	0.0960	0.0958	0.0971	0.0963	51.17
12.50	0.1291	0.1281	0.1292	0.1288	34.69
6.25	0.1356	0.1349	0.1344	0.1350	31.56
2.50	0.1686	0.1675	0.1679	0.1680	14.81



8.2.4. Neutralizacija OH[•]radikala-ekstrakti

(Tabele 8.29.-8.46.)

Tabela 8.29.

TP _{1MeOH}							
Radna konc. [$\mu\text{g/ml}$]	A_1	A_2	A_3	A_4	A_5	\bar{A}	RSC [%]
222.22	0.0939	0.0946	0.0931	0.0933	0.0936	0.0937	59.42
166.67	0.0972	0.0958	0.0964	0.0969	0.0972	0.0967	58.13
111.10	0.0991	0.0988	0.0995	0.0993	0.0983	0.0990	57.11
55.50	0.1127	0.1139	0.1145	0.1134	0.1145	0.1138	50.72
22.22	0.1186	0.1199	0.1203	0.1183	0.1199	0.1194	48.31
11.11	0.1341	0.1340	0.1329	0.1333	0.1337	0.1336	42.15

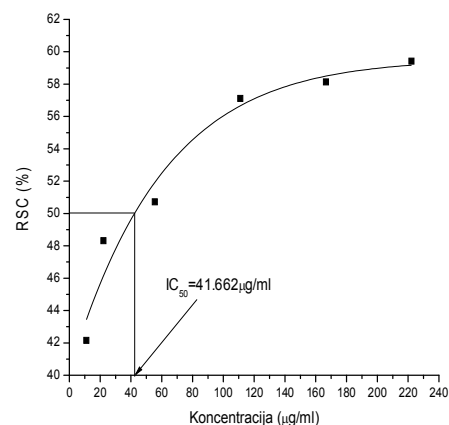


Tabela 8.30.

TP _{1Et2O}							
Radna konc. [$\mu\text{g/ml}$]	A_1	A_2	A_3	A_4	A_5	\bar{A}	RSC [%]
222.22	0.0885	0.0871	0.0879	0.0886	0.0881	0.0880	61.89
166.67	0.0942	0.0951	0.0948	0.0936	0.0955	0.0946	59.03
111.10	0.1018	0.1022	0.1027	0.1022	0.1018	0.1021	55.78
55.50	0.1137	0.1121	0.1152	0.1126	0.1128	0.1133	50.93
22.22	0.1473	0.1470	0.1483	0.1491	0.1486	0.1481	35.86
11.11	0.1628	0.1631	0.1627	0.1621	0.1625	0.1626	29.58

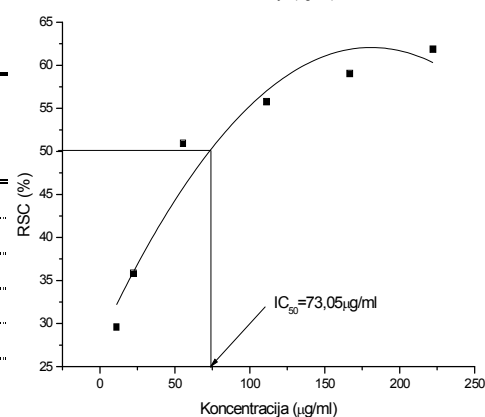


Tabela 8.31.

TP _{1CHCl3}							
Radna konc. [$\mu\text{g/ml}$]	A_1	A_2	A_3	A_4	A_5	\bar{A}	RSC [%]
222.22	0.0891	0.0899	0.0901	0.0881	0.0898	0.0894	61.30
166.67	0.0937	0.0949	0.0944	0.0946	0.0939	0.0943	59.17
111.10	0.1108	0.1092	0.1097	0.1107	0.1111	0.1103	52.24
55.50	0.1193	0.1190	0.1199	0.1186	0.1192	0.1192	48.38
22.22	0.1227	0.1225	0.1238	0.1235	0.1225	0.1230	46.71
11.11	0.1479	0.1471	0.1468	0.1471	0.1481	0.1474	36.18

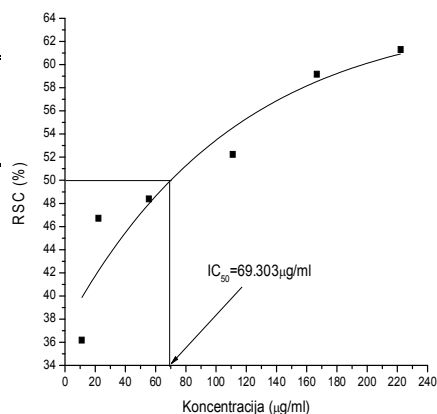


Tabela 8.32.

TP _{1EtOAc}							
Radna konc. [$\mu\text{g/ml}$]	A_1	A_2	A_3	A_4	A_5	\bar{A}	RSC [%]
222.22	0.0733	0.0738	0.0726	0.0727	0.0746	0.0734	68.19
166.67	0.0811	0.0801	0.0793	0.0796	0.0809	0.0802	65.28
111.10	0.0886	0.0894	0.0892	0.0887	0.0906	0.0893	61.34
55.50	0.0945	0.0948	0.0937	0.0934	0.0951	0.0943	59.17
22.22	0.1156	0.1148	0.1146	0.1157	0.1158	0.1153	50.06
11.11	0.1217	0.1205	0.1211	0.1215	0.1212	0.1212	47.53

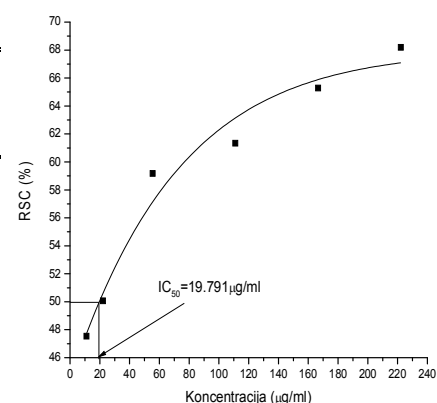


Tabela 8.33

TP _{1BuOH}							
Radna konc. [$\mu\text{g/ml}$]	A_1	A_2	A_3	A_4	A_5	\bar{A}	RSC [%]
222.22	0.0844	0.0840	0.0838	0.0839	0.0824	0.0837	63.74
166.67	0.0899	0.0903	0.0886	0.0887	0.0895	0.0894	61.28
111.10	0.0962	0.0966	0.0971	0.0969	0.0967	0.0967	58.11
55.50	0.1055	0.1059	0.1068	0.1063	0.1060	0.1061	54.07
22.22	0.1266	0.1261	0.1259	0.1255	0.1274	0.1263	45.31
11.11	0.1471	0.1480	0.1470	0.1467	0.1482	0.1474	36.18

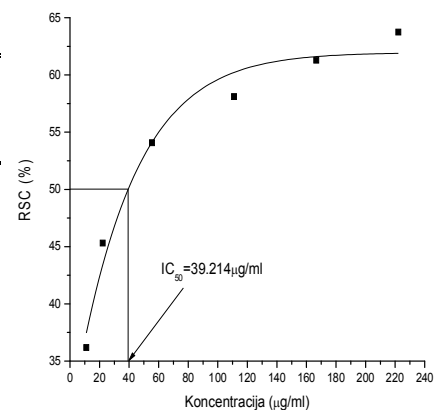


Tabela 8.34.

TP _{1H2O}							
Radna konc. [$\mu\text{g/ml}$]	A_1	A_2	A_3	A_4	A_5	\bar{A}	RSC [%]
222.22	0.0735	0.0744	0.0748	0.0731	0.0742	0.0740	67.95
166.67	0.0803	0.0804	0.0791	0.0793	0.0804	0.0799	65.39
111.10	0.0892	0.0887	0.0885	0.0893	0.0893	0.0890	61.46
55.50	0.0968	0.0971	0.0965	0.0965	0.0966	0.0967	58.11
22.22	0.1136	0.1138	0.1141	0.1133	0.1142	0.1138	50.71
11.11	0.1196	0.1192	0.1209	0.1204	0.1199	0.1200	48.05

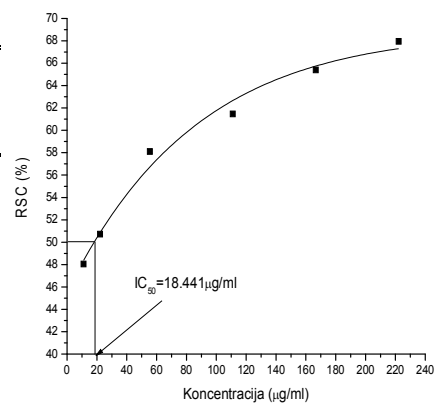


Tabela 8.35.

TP ₂ MeOH							
Radna konc. [$\mu\text{g/ml}$]	A_1	A_2	A_3	A_4	A_5	\bar{A}	RSC [%]
222.22	0.0736	0.0731	0.0744	0.0745	0.0728	0.0737	68.08
166.67	0.0799	0.0784	0.0789	0.0802	0.0805	0.0796	65.53
111.10	0.0833	0.0816	0.0824	0.0814	0.0808	0.0819	64.53
55.50	0.1113	0.1092	0.1087	0.1094	0.1099	0.1097	52.49
22.22	0.1264	0.1249	0.1287	0.1244	0.1242	0.1257	45.56
11.11	0.1536	0.1542	0.1525	0.1511	0.1518	0.1526	33.91

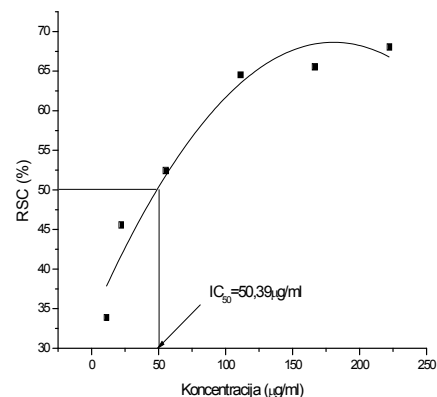


Tabela 8.36.

TP ₂ Et ₂ O							
Radna konc. [$\mu\text{g/ml}$]	A_1	A_2	A_3	A_4	A_5	\bar{A}	RSC [%]
222.22	0.0916	0.0913	0.0928	0.0911	0.0907	0.0915	60.37
166.67	0.0977	0.0986	0.0982	0.0989	0.0993	0.0985	57.34
111.10	0.1042	0.1048	0.1031	0.1033	0.1039	0.1039	55.00
55.50	0.1326	0.1317	0.1308	0.1311	0.1341	0.1321	42.79
22.22	0.1492	0.1508	0.1497	0.1517	0.1521	0.1507	34.73
11.11	0.1756	0.1759	0.1753	0.1751	0.1748	0.1753	24.08

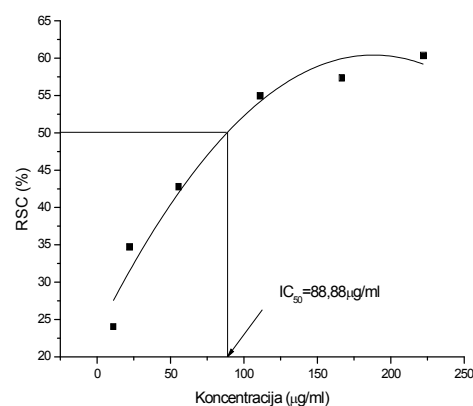


Tabela 8.37.

TP ₂ CHCl ₃							
Radna konc. [$\mu\text{g/ml}$]	A_1	A_2	A_3	A_4	A_5	\bar{A}	RSC [%]
222.22	0.0974	0.0981	0.0976	0.0972	0.0973	0.0975	57.77
166.67	0.1036	0.1038	0.1032	0.1039	0.1045	0.1038	55.05
111.10	0.1121	0.1121	0.1068	0.1128	0.1117	0.1111	51.88
55.50	0.1355	0.1344	0.1349	0.1361	0.1353	0.1352	41.45
22.22	0.1586	0.1579	0.1591	0.1573	0.1577	0.1581	31.53
11.11	0.1836	0.1829	0.1851	0.1844	0.1847	0.1841	20.27

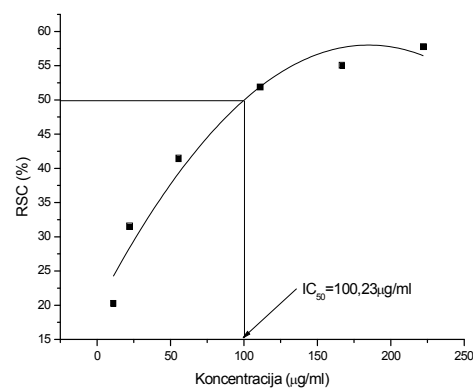


Tabela 8.38.

TP ₂ EtOAc							
Radna konc. [$\mu\text{g/ml}$]	A_1	A_2	A_3	A_4	A_5	\bar{A}	RSC [%]
222.22	0.0711	0.0719	0.0717	0.0712	0.0705	0.0713	69.12
166.67	0.0834	0.0841	0.0830	0.0828	0.0840	0.0835	63.84
111.10	0.0921	0.0936	0.0917	0.0919	0.0925	0.0924	59.98
55.50	0.1085	0.1080	0.1073	0.1095	0.1094	0.1085	53.01
22.22	0.1252	0.1249	0.1243	0.1247	0.1258	0.1250	45.86
11.11	0.1496	0.1476	0.1489	0.1493	0.1494	0.1490	35.47

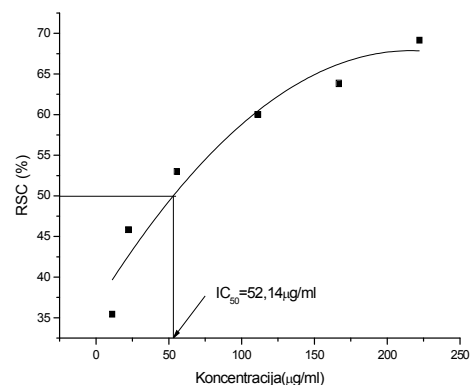


Tabela 8.39.

TP ₂ BuOH							
Radna konc. [$\mu\text{g/ml}$]	A_1	A_2	A_3	A_4	A_5	\bar{A}	RSC [%]
222.22	0.0851	0.0857	0.0852	0.0855	0.0846	0.0852	63.10
166.67	0.0916	0.0917	0.0928	0.0922	0.0925	0.0922	60.07
111.10	0.1027	0.1022	0.1028	0.1024	0.1013	0.1023	55.70
55.50	0.1194	0.1183	0.1207	0.1216	0.1204	0.1201	47.99
22.22	0.1462	0.1451	0.1468	0.1458	0.1453	0.1458	36.86
11.11	0.1772	0.1762	0.1773	0.1773	0.1769	0.1770	23.34

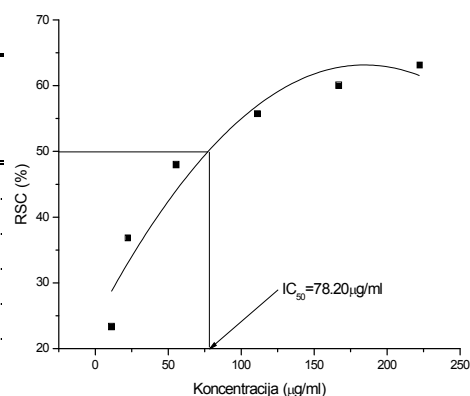


Tabela 8.40.

TP ₂ H ₂ O							
Radna konc. [$\mu\text{g/ml}$]	A_1	A_2	A_3	A_4	A_5	\bar{A}	RSC [%]
222.22	0.0714	0.0710	0.0712	0.0710	0.0709	0.0711	69.21
166.67	0.0753	0.0758	0.0749	0.0741	0.0752	0.0751	67.47
111.10	0.0828	0.0821	0.0829	0.0824	0.0824	0.0825	64.27
55.50	0.0973	0.0981	0.0988	0.0994	0.0975	0.0982	57.47
22.22	0.1124	0.1128	0.1117	0.1131	0.1113	0.1123	51.36
11.11	0.1541	0.1544	0.1535	0.1530	0.1537	0.1537	33.43

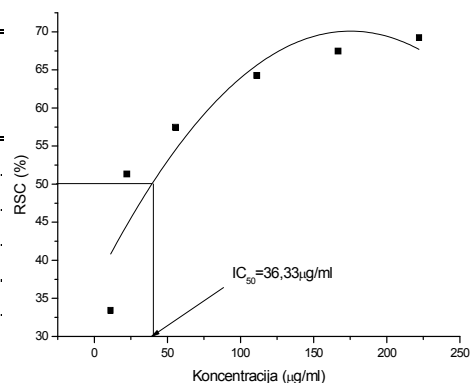


Tabela 8.41.

TP ₃ MeOH							
Radna konc. [$\mu\text{g/ml}$]	A_1	A_2	A_3	A_4	A_5	\bar{A}	RSC [%]
222.22	0.0833	0.0824	0.0827	0.0839	0.0846	0.0834	63.88
166.67	0.0875	0.0877	0.0863	0.0871	0.0874	0.0872	62.23
111.10	0.0918	0.0922	0.0927	0.0922	0.0918	0.0921	60.11
55.50	0.1132	0.1130	0.1124	0.1118	0.1119	0.1125	51.27
22.22	0.1403	0.1405	0.1403	0.1415	0.1410	0.1407	39.06
11.11	0.1643	0.1636	0.1649	0.1655	0.1658	0.1648	28.63

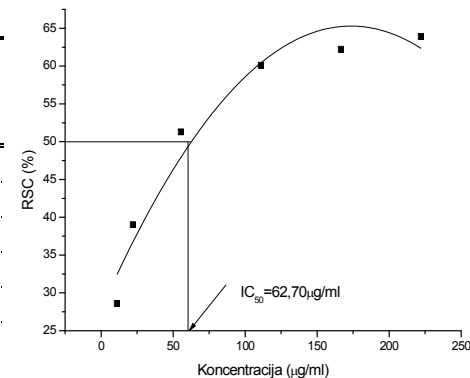


Tabela 8.42.

TP ₃ E ₂ O							
Radna konc. [$\mu\text{g/ml}$]	A_1	A_2	A_3	A_4	A_5	\bar{A}	RSC [%]
222.22	0.0975	0.0971	0.0975	0.0988	0.0967	0.0975	57.77
166.67	0.1013	0.1017	0.1009	0.1024	0.1020	0.1017	55.95
111.10	0.1137	0.1120	0.1118	0.1124	0.1113	0.1122	51.41
55.50	0.1451	0.1443	0.1437	0.1448	0.1456	0.1447	37.33
22.22	0.1778	0.1768	0.1774	0.1775	0.1772	0.1773	23.21
11.11	0.1930	0.1925	0.1937	0.1941	0.1929	0.1932	16.33

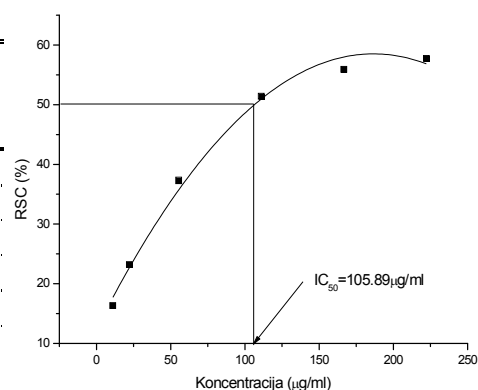


Tabela 8.43.

TP ₃ CHCl ₃							
Radna konc. [$\mu\text{g/ml}$]	A_1	A_2	A_3	A_4	A_5	\bar{A}	RSC [%]
222.22	0.0991	0.0986	0.0995	0.0984	0.0988	0.0989	57.17
166.67	0.1073	0.1080	0.1069	0.1079	0.1083	0.1077	53.36
111.10	0.1358	0.1355	0.1341	0.1346	0.1342	0.1348	41.62
55.50	0.1693	0.1688	0.1692	0.1675	0.1682	0.1686	26.98
22.22	0.1899	0.1889	0.1894	0.1890	0.1891	0.1893	18.02
11.11	0.2057	0.2044	0.2037	0.2046	0.2053	0.2047	11.35

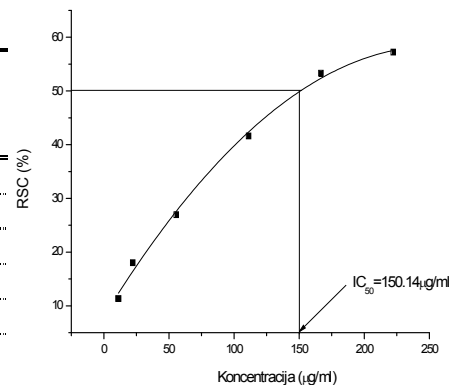


Tabela 8.44.

TP ₃ EtOAc							
Radna konc. [$\mu\text{g/ml}$]	A_1	A_2	A_3	A_4	A_5	\bar{A}	RSC [%]
222.22	0.0743	0.0748	0.0729	0.0736	0.0733	0.0738	68.04
166.67	0.0804	0.0805	0.0811	0.0817	0.0805	0.0808	65.01
111.10	0.0886	0.0892	0.0876	0.0881	0.0883	0.0884	61.72
55.50	0.1061	0.1057	0.1055	0.1063	0.1065	0.1060	54.09
22.22	0.1341	0.1349	0.1355	0.1351	0.1352	0.1350	41.53
11.11	0.1664	0.1668	0.1677	0.1662	0.1668	0.1668	27.76

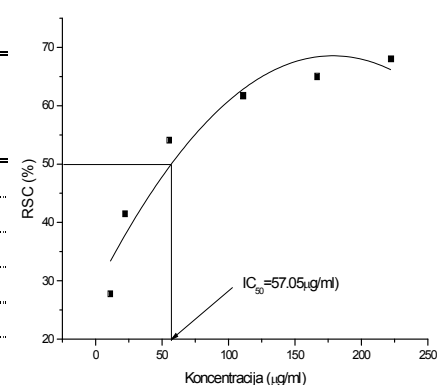


Tabela 8.45.

TP ₃ BuOH							
Radna konc. [$\mu\text{g/ml}$]	A_1	A_2	A_3	A_4	A_5	\bar{A}	RSC [%]
222.22	0.0782	0.0794	0.0788	0.0791	0.0796	0.0790	65.79
166.67	0.0994	0.0979	0.0986	0.0993	0.0991	0.0989	57.17
111.10	0.1041	0.1058	0.1055	0.1047	0.1063	0.1053	54.40
55.50	0.1185	0.1173	0.1177	0.1174	0.1168	0.1175	49.11
22.22	0.2024	0.2022	0.2014	0.2018	0.2009	0.2017	12.65
11.11	0.2129	0.2122	0.2130	0.2135	0.2131	0.2129	7.80

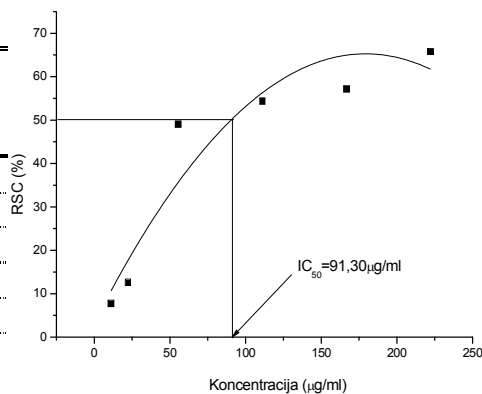
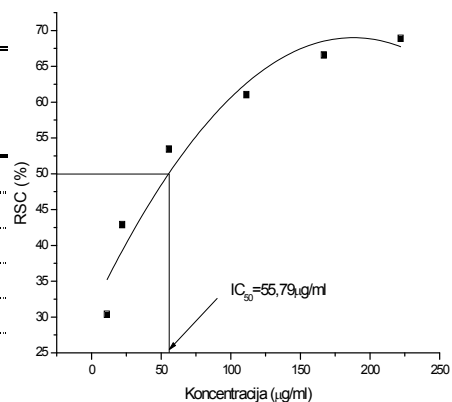


Tabela 8.46.

TP ₃ H ₂ O							
Radna konc. [$\mu\text{g/ml}$]	A_1	A_2	A_3	A_4	A_5	\bar{A}	RSC [%]
222.22	0.0716	0.0715	0.0719	0.0711	0.0725	0.0717	68.95
166.67	0.0776	0.0771	0.0773	0.0768	0.0766	0.0771	66.61
111.10	0.0902	0.0884	0.0911	0.0901	0.0895	0.0899	61.07
55.50	0.1073	0.1069	0.1072	0.1081	0.1077	0.1074	53.49
22.22	0.1320	0.1317	0.1312	0.1322	0.1317	0.1318	42.92
11.11	0.1608	0.1607	0.1602	0.1611	0.1614	0.1608	30.36



8.2.5. Neutralizacija $O_2^{\bullet-}$ radikala-ekstrakti

(Tabele 8.47.-8.64.)

Tabela 8.47.

Radna konc. [$\mu\text{g/ml}$]	TP _{1MeOH}				RSC _{O₂^{•-}} [%]
	A ₁	A ₂	A ₃	\bar{A}	
113.65	0.1087	0.1088	0.1086	0.1087	65.87
56.82	0.1354	0.1356	0.1357	0.1356	57.44
22.73	0.1684	0.1689	0.1689	0.1687	47.02
11.36	0.2095	0.2092	0.2092	0.2093	34.29
5.68	0.2381	0.2386	0.2386	0.2384	25.14
2.27	0.2832	0.2825	0.2826	0.2828	11.22

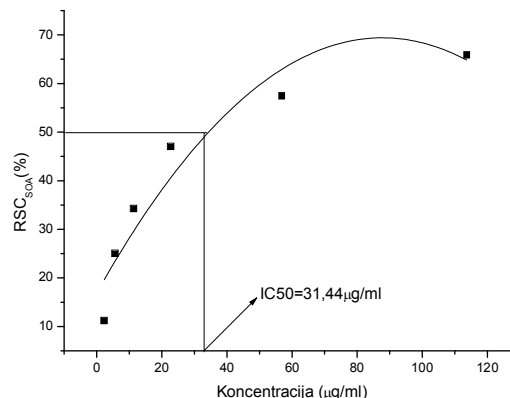


Tabela 8.48.

Radna konc. [$\mu\text{g/ml}$]	TP _{1Et2O}				RSC [%]
	A ₁	A ₂	A ₃	\bar{A}	
113.65	0.1573	0.1574	0.157	0.1572	57.96
56.82	0.1851	0.1848	0.1857	0.1852	50.48
22.73	0.2052	0.2054	0.2055	0.2054	45.09
11.36	0.2441	0.2443	0.2448	0.2444	34.65
5.68	0.2879	0.2884	0.2883	0.2882	22.94
2.27	0.3245	0.3247	0.3235	0.3242	13.31

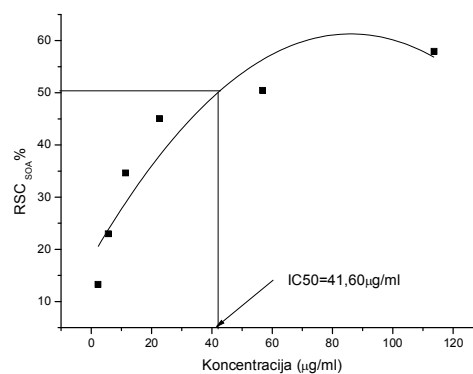


Tabela 8.49.

Radna konc. [$\mu\text{g/ml}$]	TP _{1CHCl3}				RSC [%]
	A ₁	A ₂	A ₃	\bar{A}	
113.65	0.1656	0.1652	0.16513	0.1653	55.41
56.82	0.2021	0.2025	0.203	0.2025	45.36
22.73	0.2411	0.2417	0.2416	0.2415	34.86
11.36	0.2821	0.2824	0.2821	0.2822	23.87
5.68	0.3012	0.3009	0.3012	0.3011	18.78
2.27	0.3395	0.3392	0.3391	0.3393	8.48

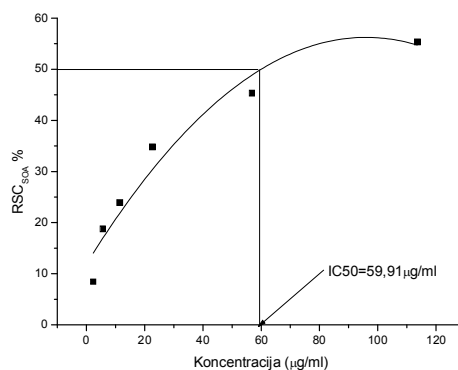


Tabela 8.50.

Radna konc. [$\mu\text{g/ml}$]	TP _{1EtOAc}				RSC [%]
	A ₁	A ₂	A ₃	\bar{A}	
113.65	0.0823	0.0819	0.0826	0.0823	74.40
56.82	0.1014	0.1008	0.1005	0.1009	68.61
22.73	0.1331	0.1329	0.1337	0.1332	58.55
11.36	0.1917	0.1922	0.1914	0.1918	40.33
5.68	0.2224	0.2227	0.2227	0.2226	30.74
2.27	0.2618	0.2619	0.2612	0.2616	18.60

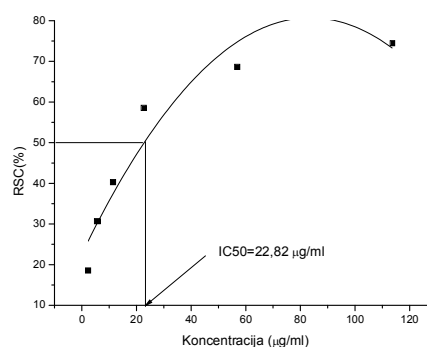


Tabela 8.51.

TP ₁ BuOH					
Radna konc. [$\mu\text{g/ml}$]	A_1	A_2	A_3	\bar{A}	RSC [%]
113.65	0.0851	0.0857	0.0849	0.0852	74.72
56.82	0.1113	0.1108	0.1107	0.1109	67.09
22.73	0.1541	0.1535	0.1542	0.1539	54.34
11.36	0.1976	0.1972	0.1971	0.1973	41.47
5.68	0.2092	0.2095	0.2093	0.2093	37.90
2.27	0.2528	0.2531	0.2522	0.2527	25.04

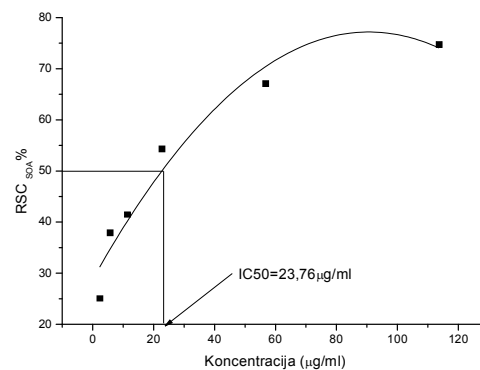


Tabela 8.52.

TP ₁ H ₂ O					
Radna konc. [$\mu\text{g/ml}$]	A_1	A_2	A_3	\bar{A}	RSC [%]
113.65	0.0743	0.0739	0.0744	0.0742	80.39
56.82	0.0951	0.0949	0.0951	0.0950	74.89
22.73	0.1375	0.1369	0.1373	0.1372	63.73
11.36	0.1861	0.1862	0.1859	0.1861	50.83
5.68	0.2144	0.2152	0.2147	0.2148	43.24
2.27	0.2581	0.2589	0.2583	0.2584	31.70

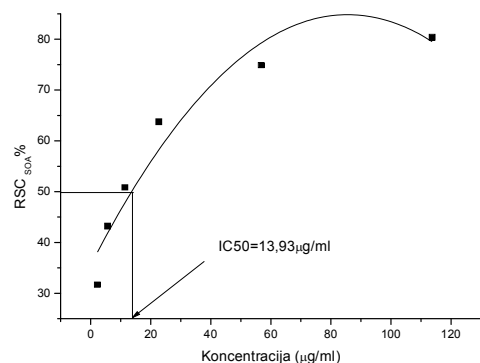


Tabela 8.53.

TP ₂ MeOH					
Radna konc. [$\mu\text{g/ml}$]	A_1	A_2	A_3	\bar{A}	RSC [%]
113.65	0.1085	0.1091	0.1087	0.1088	65.37
56.82	0.1387	0.1376	0.1377	0.1380	56.06
22.73	0.1706	0.1707	0.1701	0.1705	45.73
11.36	0.2096	0.2092	0.2092	0.2093	33.35
5.68	0.2384	0.2375	0.2377	0.2379	24.27
2.27	0.2791	0.2792	0.2785	0.2789	11.20

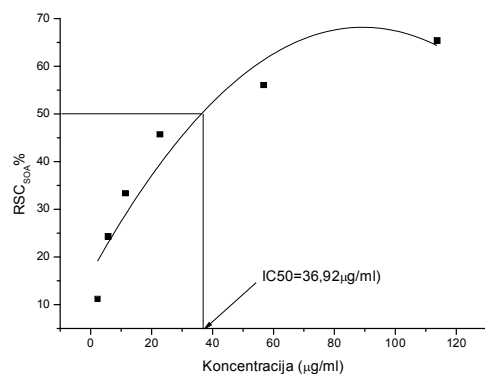


Tabela 8.54

TP ₂ E ₂ O					
Radna konc. [$\mu\text{g/ml}$]	A_1	A_2	A_3	\bar{A}	RSC [%]
113.65	0.1623	0.1625	0.1631	0.1626	57.02
56.82	0.1844	0.1832	0.1839	0.1838	51.42
22.73	0.1979	0.1976	0.1982	0.1979	47.70
11.36	0.2382	0.2384	0.2389	0.2385	36.97
5.68	0.2831	0.2828	0.2826	0.2828	25.26
2.27	0.3195	0.3189	0.3194	0.3193	15.63

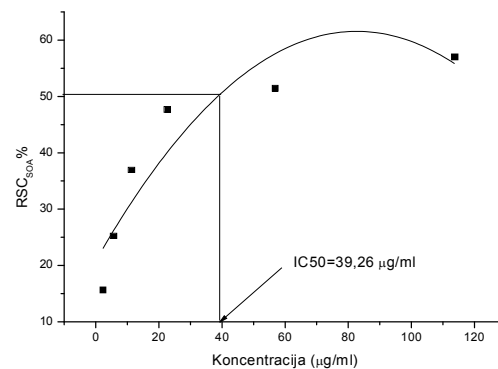


Tabela 8.55.

TP ₂ CHCl ₃					
Radna konc. [$\mu\text{g/ml}$]	A_1	A_2	A_3	\bar{A}	RSC [%]
113.65	0.3265	0.3261	0.3261	0.3262	54.67
56.82	0.2988	0.2982	0.2983	0.2984	46.03
22.73	0.2696	0.2691	0.2689	0.2692	35.84
11.36	0.2317	0.2317	0.2311	0.2315	25.39
5.68	0.1945	0.1946	0.1951	0.1947	17.29
2.27	0.1631	0.164	0.1635	0.1635	9.58

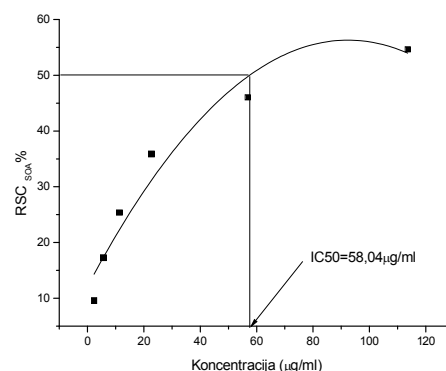


Tabela 8.56.

TP ₂ EtOAc					
Radna konc. [$\mu\text{g/ml}$]	A_1	A_2	A_3	\bar{A}	RSC [%]
113.65	0.0921	0.0917	0.0918	0.0919	73.37
56.82	0.1205	0.1207	0.1205	0.1206	65.05
22.73	0.1582	0.1585	0.1571	0.1579	54.22
11.36	0.1891	0.189	0.1897	0.1893	45.14
5.68	0.2178	0.2175	0.2174	0.2176	36.94
2.27	0.2601	0.2604	0.2592	0.2599	24.67

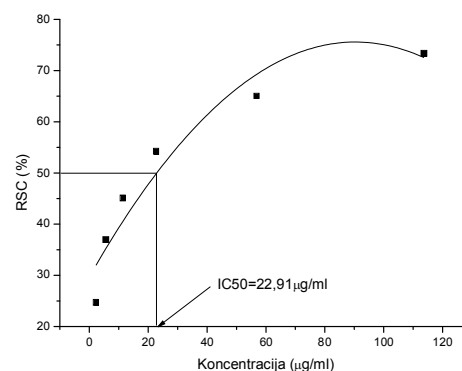


Tabela 8.57

TP ₂ BuOH					
Radna konc. [$\mu\text{g/ml}$]	A_1	A_2	A_3	\bar{A}	RSC [%]
113.65	0.0814	0.0811	0.0813	0.0813	75.20
56.82	0.1221	0.1224	0.1217	0.1221	62.75
22.73	0.1575	0.1582	0.1581	0.1579	51.81
11.36	0.1891	0.189	0.1885	0.1889	42.37
5.68	0.2275	0.2269	0.2267	0.2270	30.72
2.27	0.2613	0.2618	0.2614	0.2615	20.20

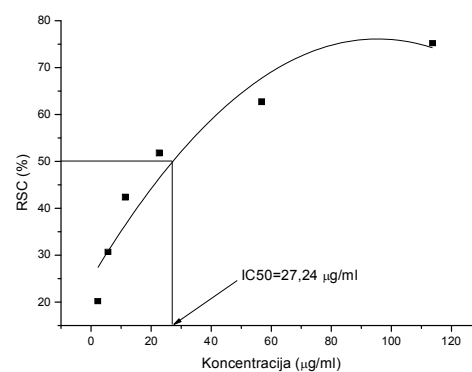


Tabela 8.58.

TP ₂ H ₂ O					
Radna konc. [$\mu\text{g/ml}$]	A_1	A_2	A_3	\bar{A}	RSC [%]
113.65	0.0703	0.0701	0.0695	0.0700	78.29
56.82	0.0884	0.0882	0.0882	0.0883	72.61
22.73	0.1311	0.1309	0.1312	0.1311	59.33
11.36	0.1805	0.1804	0.1799	0.1803	44.07
5.68	0.2086	0.2091	0.2088	0.2088	35.21
2.27	0.2722	0.2719	0.2713	0.2718	15.67

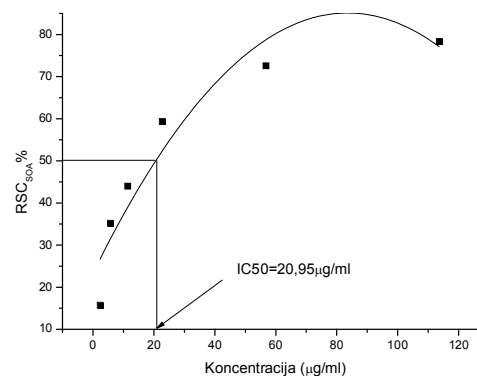


Tabela 8.59.

TP ₃ MeOH					
Radna konc. [$\mu\text{g/ml}$]	A_1	A_2	A_3	\bar{A}	RSC [%]
113.65	0.1126	0.1121	0.1119	0.1122	65.40
56.82	0.1437	0.1438	0.1432	0.1436	55.73
22.73	0.1756	0.1759	0.1754	0.1756	45.84
11.36	0.2142	0.214	0.2143	0.2142	33.96
5.68	0.2431	0.2436	0.2437	0.2435	24.93
2.27	0.2871	0.287	0.2876	0.2872	11.43

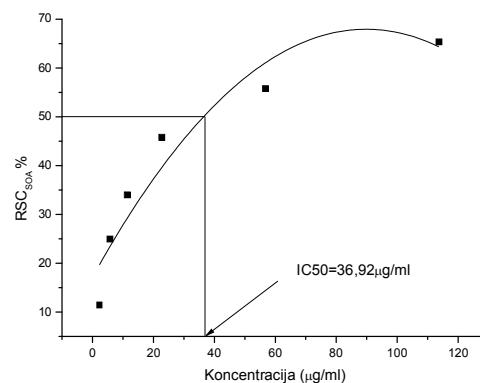


Tabela. 8.60.

TP ₃ Et ₂ O					
Radna konc. [$\mu\text{g/ml}$]	A_1	A_2	A_3	\bar{A}	RSC [%]
113.65	0.1618	0.1615	0.1614	0.1616	56.80
56.82	0.1931	0.193	0.1927	0.1929	48.41
22.73	0.2112	0.2117	0.2114	0.2114	43.47
11.36	0.2486	0.2493	0.2485	0.2488	33.48
5.68	0.2807	0.2803	0.2801	0.2804	25.04
2.27	0.3185	0.3178	0.3175	0.3179	14.99

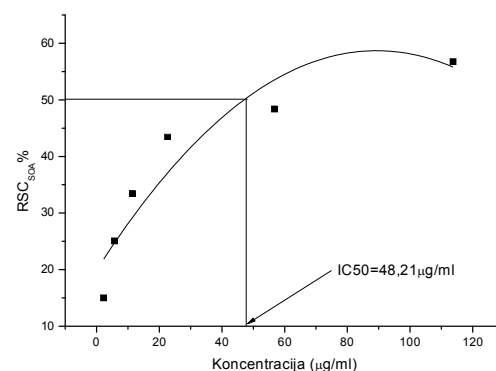


Tabela 8.61.

TP ₃ CHCl ₃					
Radna konc. [$\mu\text{g/ml}$]	A_1	A_2	A_3	\bar{A}	RSC [%]
113.65	0.1765	0.1769	0.1763	0.1766	52.16
56.82	0.2001	0.1997	0.1989	0.1996	45.93
22.73	0.2385	0.2381	0.2382	0.2383	35.45
11.36	0.2716	0.272	0.2718	0.2718	26.36
5.68	0.3042	0.3047	0.3041	0.3043	17.55
2.27	0.3317	0.3313	0.3311	0.3314	10.22

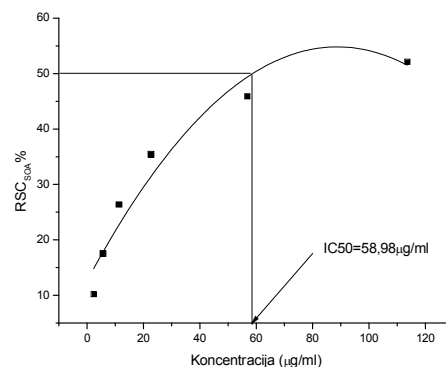


Tabela 8.62.

TP ₃ BuOH					
Radna konc. [$\mu\text{g/ml}$]	A_1	A_2	A_3	\bar{A}	RSC [%]
113.65	0.0895	0.0891	0.0902	0.0896	72.97
56.82	0.1284	0.1275	0.1277	0.1279	61.43
22.73	0.1603	0.1608	0.1607	0.1606	51.55
11.36	0.1946	0.1945	0.1953	0.1948	41.24
5.68	0.2231	0.2233	0.2227	0.2230	32.72
2.27	0.2584	0.2581	0.258	0.2582	22.12

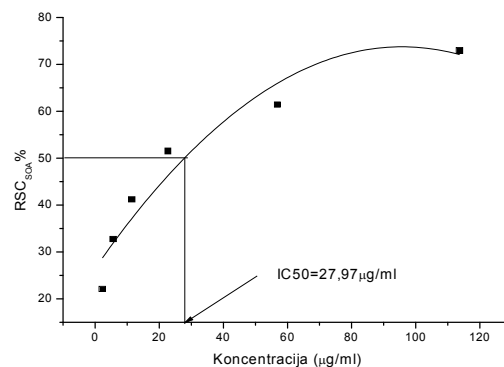


Tabela 8.63.

TP _{3EtOAc}					
Radna konc. [$\mu\text{g/ml}$]	A_1	A_2	A_3	\bar{A}	RSC [%]
113.65	0.0917	0.0917	0.0912	0.0915	73.27
56.82	0.1213	0.1215	0.1221	0.1216	64.48
22.73	0.1576	0.1571	0.1571	0.1573	54.07
11.36	0.1872	0.1873	0.1881	0.1875	45.23
5.68	0.2312	0.2314	0.2315	0.2314	32.43
2.27	0.2691	0.2691	0.2682	0.2688	21.50

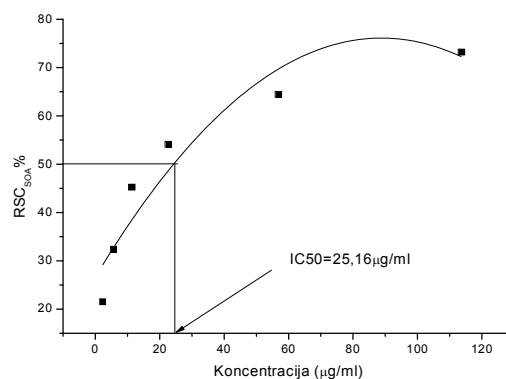
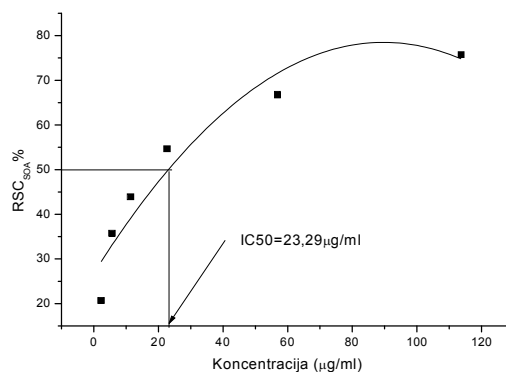


Tabela 8.64.

TP _{3H2O}					
Radna konc. [$\mu\text{g/ml}$]	A_1	A_2	A_3	\bar{A}	RSC [%]
113.65	0.0801	0.0798	0.0798	0.0799	75.74
56.82	0.1095	0.1098	0.1089	0.1094	66.79
22.73	0.1492	0.1492	0.1495	0.1493	54.68
11.36	0.1856	0.1847	0.1841	0.1848	43.90
5.68	0.2119	0.2114	0.2113	0.2115	35.78
2.27	0.2614	0.2611	0.2608	0.2611	20.73



8.2.6. Neutralizacija NO[•] radikala –ekstrakti

(Tabele 8.65.-8.82.)

Tabela 8.65.

TP _{1MeOH}					
Radna konc. [$\mu\text{g/ml}$]	A_1	A_2	A_3	\bar{A}	RSC [%]
83.25	0.3117	0.3085	0.3094	0.3099	68.17
41.62	0.4083	0.4085	0.4067	0.4078	58.10
16.65	0.4308	0.4274	0.4292	0.4291	55.91
8.32	0.5246	0.5267	0.5251	0.5255	46.02
4.16	0.6386	0.6359	0.6347	0.6364	34.62
1.66	0.7064	0.7058	0.7091	0.7071	27.36

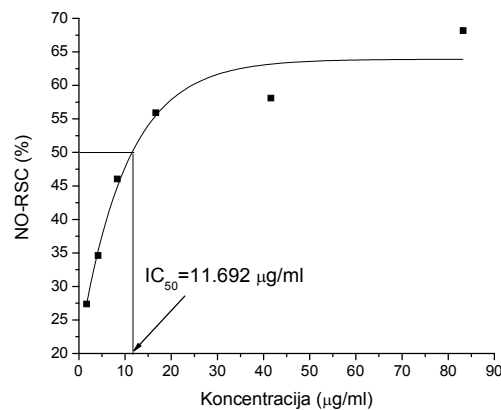


Tabela 8.66.

TP _{1Et2O}					
Radna konc. [$\mu\text{g/ml}$]	A_1	A_2	A_3	\bar{A}	RSC [%]
83.25	0.3918	0.3925	0.3846	0.3896	59.97
41.62	0.4289	0.4274	0.4256	0.4273	56.10
16.65	0.5526	0.5514	0.5517	0.5519	43.30
8.32	0.5801	0.5824	0.5837	0.5821	40.20
4.16	0.6653	0.6691	0.6635	0.6660	31.58
1.66	0.7117	0.7158	0.7069	0.7115	26.91

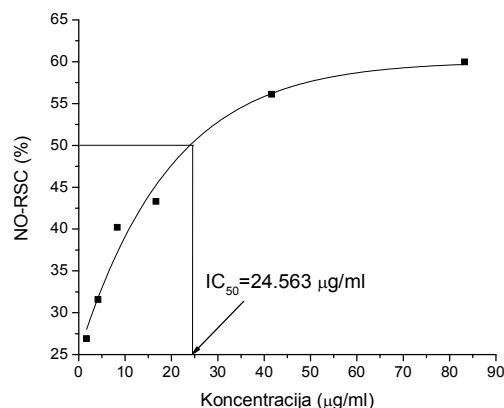


Tabela 8.67.

TP _{1CHCl3}					
Radna konc. [$\mu\text{g/ml}$]	A_1	A_2	A_3	\bar{A}	RSC [%]
83.25	0.4516	0.4541	0.4508	0.4522	53.55
41.62	0.5437	0.5424	0.5439	0.5433	44.18
16.65	0.6396	0.6348	0.6346	0.6363	34.63
8.32	0.7198	0.7291	0.7280	0.7256	25.45
4.16	0.8286	0.8236	0.8247	0.8256	15.18
1.66	0.9138	0.9164	0.9169	0.9157	5.93

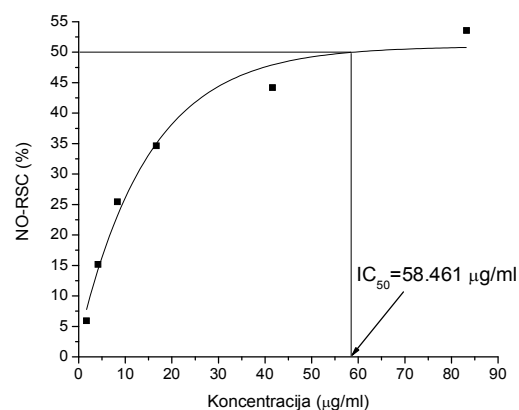


Tabela 8.68.

TP _{1EtOAc}					
Radna konc. [$\mu\text{g/ml}$]	A_1	A_2	A_3	\bar{A}	RSC [%]
83.25	0.3947	0.3961	0.3942	0.3950	59.42
41.62	0.4330	0.4357	0.4308	0.4332	55.50
16.65	0.4637	0.4652	0.4617	0.4635	52.38
8.32	0.5316	0.5291	0.5322	0.5310	45.45
4.16	0.6648	0.6653	0.6641	0.6647	31.71
1.66	0.7416	0.7439	0.7385	0.7413	23.84

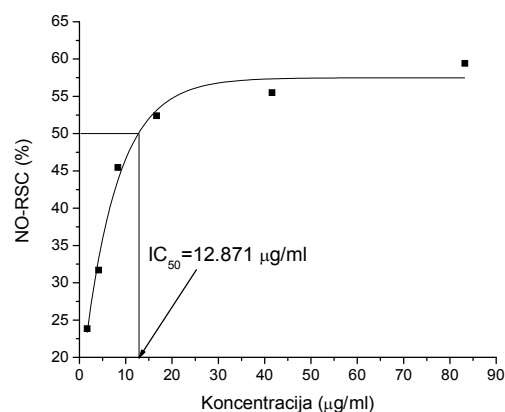


Tabela 8.69.

TP _{1BuOH}					
Radna konc. [$\mu\text{g/ml}$]	A_1	A_2	A_3	\bar{A}	RSC [%]
83.25	0.3881	0.3830	0.3889	0.3867	60.28
41.62	0.4237	0.4340	0.4381	0.4319	55.63
16.65	0.5194	0.5160	0.5088	0.5147	47.12
8.32	0.5928	0.5893	0.5884	0.5902	39.37
4.16	0.6065	0.6076	0.6068	0.6070	37.64
1.66	0.6121	0.6118	0.6105	0.6115	37.18

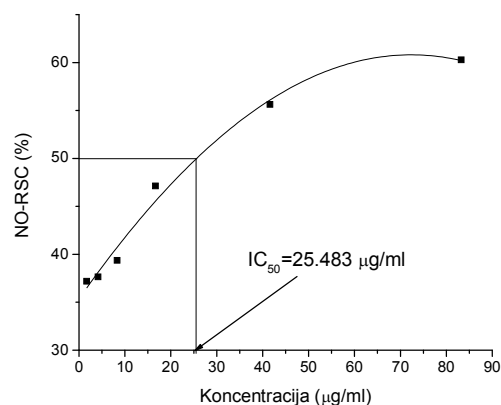


Tabela 8.70.

TP _{1H2O}					
Radna konc. [$\mu\text{g/ml}$]	A_1	A_2	A_3	\bar{A}	RSC [%]
83.25	0.3501	0.3485	0.3472	0.3486	64.19
41.62	0.3697	0.3674	0.3642	0.3671	62.29
16.65	0.4574	0.4561	0.4539	0.4558	53.17
8.32	0.5508	0.5514	0.5486	0.5503	43.47
4.16	0.5916	0.5931	0.5884	0.5910	39.28
1.66	0.6641	0.6618	0.6625	0.6628	31.91

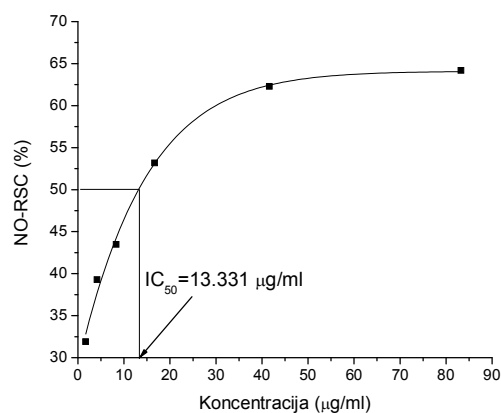


Tabela 8.71.

TP ₂ MeOH					
Radna konc. [$\mu\text{g/ml}$]	A_1	A_2	A_3	\bar{A}	RSC [%]
83.25	0.3607	0.3628	0.3594	0.3610	62.92
41.62	0.4440	0.4421	0.4496	0.4452	54.26
16.65	0.6706	0.6689	0.6685	0.6693	31.24
8.32	0.7017	0.7053	0.7047	0.7039	27.69
4.16	0.8830	0.8795	0.8819	0.8815	9.44
1.66	0.9326	0.9207	0.9189	0.9241	5.07

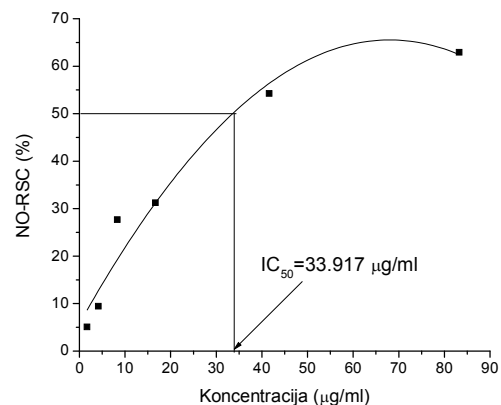


Tabela 8.72.

TP ₂ Et ₂ O					
Radna konc. [$\mu\text{g/ml}$]	A_1	A_2	A_3	\bar{A}	RSC [%]
83.25	0.3806	0.3856	0.3825	0.3829	60.66
41.62	0.4563	0.4558	0.4521	0.4547	53.28
16.65	0.5292	0.5290	0.5231	0.5271	45.85
8.32	0.5491	0.5494	0.5390	0.5458	43.93
4.16	0.6472	0.6428	0.6423	0.6441	33.83
1.66	0.7783	0.7666	0.7693	0.7714	20.75

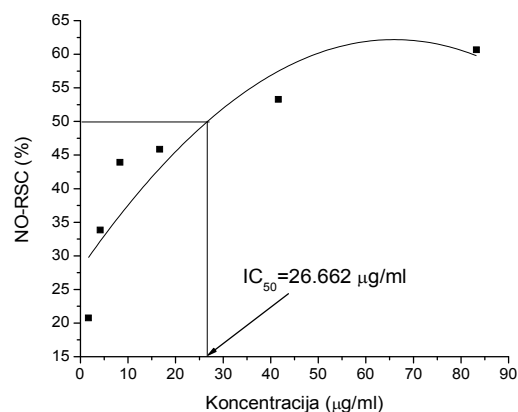


Tabela 8.73.

TP ₂ CHCl ₃					
Radna konc. [$\mu\text{g/ml}$]	A_1	A_2	A_3	\bar{A}	RSC [%]
83.25	0.4516	0.4541	0.4508	0.4522	53.55
41.62	0.5437	0.5424	0.5439	0.5433	44.18
16.65	0.6396	0.6348	0.6346	0.6363	34.63
8.32	0.7198	0.7291	0.7280	0.7256	25.45
4.16	0.8286	0.8236	0.8247	0.8256	15.18
1.66	0.9138	0.9164	0.9169	0.9157	5.93

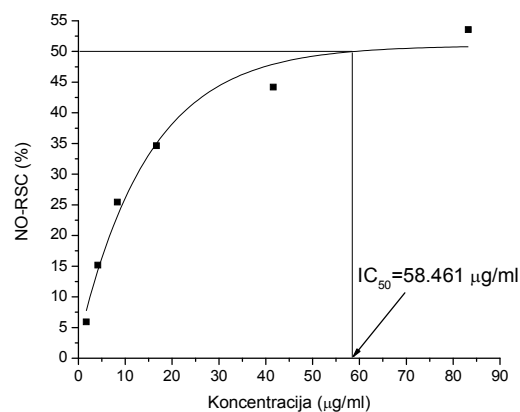


Tabela 8.74.

TP ₂ EtOAc					
Radna konc. [$\mu\text{g/ml}$]	A_1	A_2	A_3	\bar{A}	RSC [%]
83.25	0.3992	0.3987	0.3969	0.3983	59.08
41.62	0.4484	0.4471	0.4436	0.4464	54.14
16.65	0.4730	0.4749	0.4727	0.4735	51.36
8.32	0.5494	0.5521	0.5487	0.5501	43.49
4.16	0.6752	0.6718	0.6737	0.6736	30.80
1.66	0.7899	0.7881	0.7864	0.7881	19.03

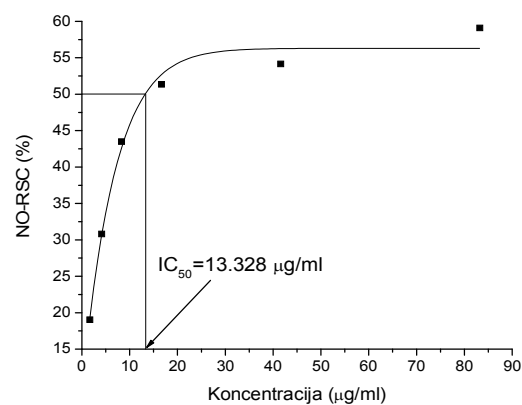


Tabela 8.75

TP _{2BuOH}					
Radna konc. [$\mu\text{g/ml}$]	A_1	A_2	A_3	\bar{A}	RSC [%]
83.25	0.3057	0.3024	0.3105	0.3062	68.54
41.62	0.4640	0.4625	0.4681	0.4649	52.24
16.65	0.5394	0.5348	0.5364	0.5369	44.85
8.32	0.5685	0.5628	0.5648	0.5654	41.92
4.16	0.6498	0.6457	0.6423	0.6459	33.64
1.66	0.7288	0.7275	0.7254	0.7272	25.29

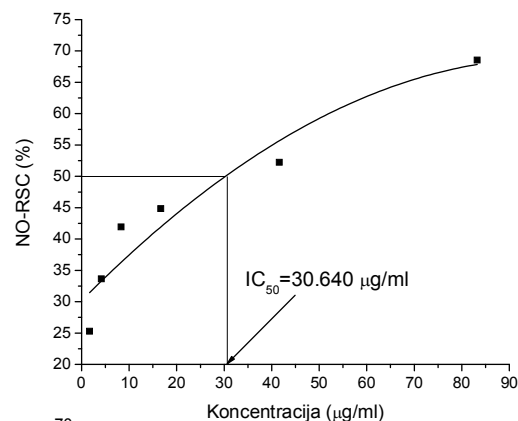


Tabela 8.76.

TP _{2H2O}					
Radna konc. [$\mu\text{g/ml}$]	A_1	A_2	A_3	\bar{A}	RSC [%]
83.25	0.3748	0.3769	0.3721	0.3746	61.52
41.62	0.4346	0.4383	0.4379	0.4369	55.12
16.65	0.5181	0.5173	0.5172	0.5175	46.83
8.32	0.6758	0.664	0.6641	0.6680	31.38
4.16	0.8214	0.8255	0.8241	0.8237	15.38
1.66	0.9083	0.9082	0.8976	0.9047	7.06

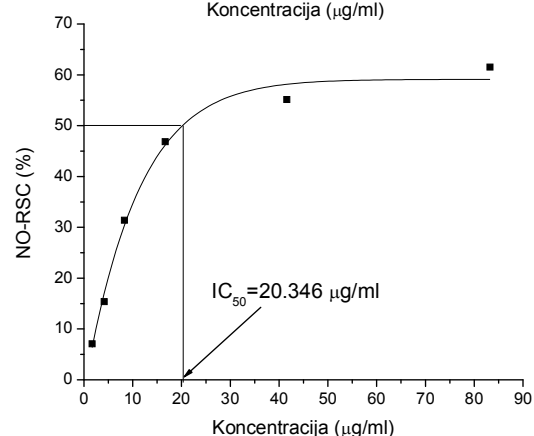


Tabela 8.77.

TP _{3MeOH}					
Radna konc. [$\mu\text{g/ml}$]	A_1	A_2	A_3	\bar{A}	RSC [%]
83.25	0.3698	0.3649	0.3657	0.3668	62.32
41.62	0.5205	0.5219	0.5184	0.5203	46.55
16.65	0.5783	0.5761	0.5739	0.5761	40.82
8.32	0.6442	0.6429	0.6417	0.6429	33.95
4.16	0.7095	0.7058	0.7064	0.7072	27.34
1.66	0.7385	0.7364	0.7369	0.7373	24.26

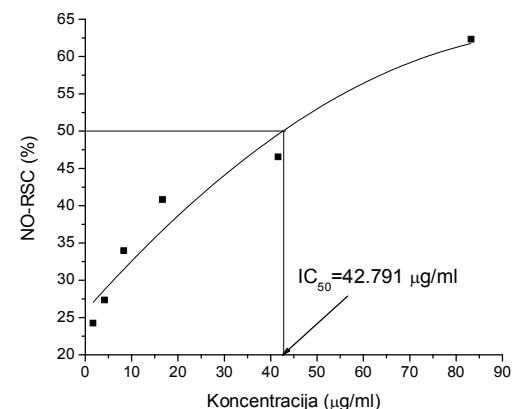


Tabela 8.78.

TP _{3Et2O}					
Radna konc. [$\mu\text{g/ml}$]	A_1	A_2	A_3	\bar{A}	RSC [%]
83.25	0.4243	0.4213	0.4251	0.4236	56.49
41.62	0.4809	0.4817	0.4792	0.4806	50.63
16.65	0.5246	0.5267	0.5238	0.5250	46.06
8.32	0.6656	0.6641	0.6627	0.6641	31.77
4.16	0.7225	0.7289	0.7274	0.7263	25.39
1.66	0.8484	0.8475	0.8451	0.8470	12.99

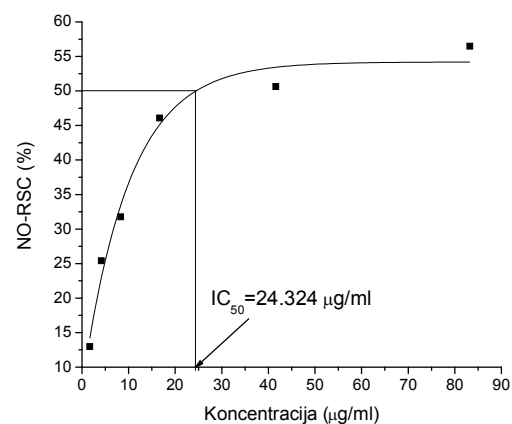


Tabela 8.79.

TP ₃ CHCl ₃					
Radna konc. [$\mu\text{g/ml}$]	A_1	A_2	A_3	\bar{A}	RSC [%]
83.25	0.4746	0.4769	0.4751	0.4755	51.15
41.62	0.5275	0.5228	0.5210	0.5238	46.19
16.65	0.7082	0.7125	0.7046	0.7084	27.22
8.32	0.7319	0.7388	0.7362	0.7356	24.43
4.16	0.8693	0.8681	0.8679	0.8684	10.78
1.66	0.9119	0.9130	0.9106	0.9118	6.32

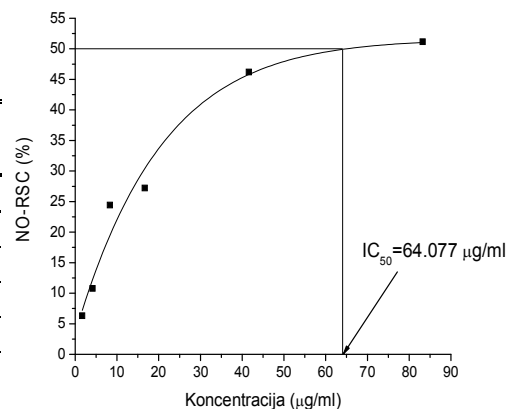


Tabela 8.80.

TP ₃ EtOAc					
Radna konc. [$\mu\text{g/ml}$]	A_1	A_2	A_3	\bar{A}	RSC [%]
83.25	0.3190	0.3154	0.3162	0.3169	67.45
41.62	0.3733	0.3754	0.3711	0.3733	61.65
16.65	0.4778	0.4792	0.4816	0.4795	50.74
8.32	0.6154	0.6147	0.6123	0.6141	36.91
4.16	0.7984	0.7956	0.7948	0.7963	18.20
1.66	0.9072	0.9024	0.9017	0.9038	7.15

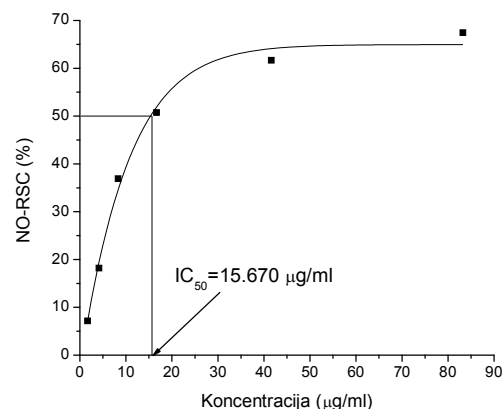


Tabela 8.81.

TP ₃ BuOH					
Radna konc. [$\mu\text{g/ml}$]	A_1	A_2	A_3	\bar{A}	RSC [%]
83.25	0.4420	0.4415	0.4434	0.4423	54.56
41.62	0.5232	0.5217	0.5198	0.5216	46.42
16.65	0.6683	0.6624	0.6638	0.6648	31.70
8.32	0.7803	0.7764	0.7756	0.7774	20.13
4.16	0.8261	0.8253	0.8237	0.8250	15.24
1.66	0.9221	0.9185	0.9231	0.9212	5.36

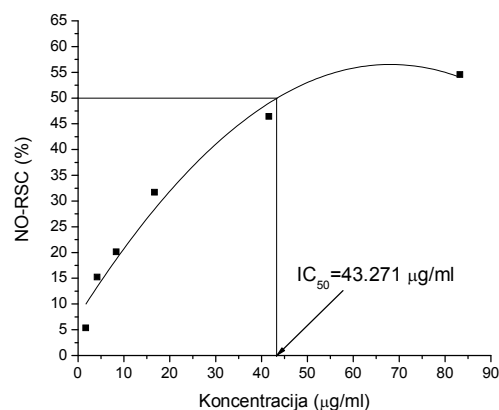
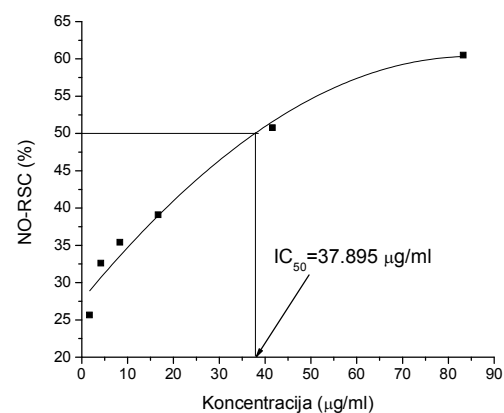


Tabela 8.82.

TP ₃ H ₂ O					
Radna konc. [$\mu\text{g/ml}$]	A_1	A_2	A_3	\bar{A}	RSC [%]
83.25	0.3821	0.3863	0.3851	0.3845	60.50
41.62	0.4785	0.4796	0.4799	0.4793	50.76
16.65	0.5951	0.5923	0.5913	0.5929	39.09
8.32	0.6351	0.6256	0.6257	0.6288	35.40
4.16	0.6521	0.6580	0.6579	0.6560	32.61
1.66	0.7239	0.7240	0.7232	0.7237	25.65



8.2.6. Neutralizacija H_2O_2 –ekstrakti

(Tabele 8.83.-8.100.)

Tabela 8.83.

Radna konc. [$\mu\text{g/ml}$]	TP _{1MeOH}				RSC [%]
	A_1	A_2	A_3	\bar{A}	
125.00	0.7138	0.7136	0.7139	0.7138	65.08
62.50	0.9652	0.9643	0.9657	0.9651	52.78
25.00	1.1573	1.1580	1.1581	1.1578	43.35
12.50	1.3492	1.3493	1.3487	1.3491	33.99
6.25	1.7361	1.7366	1.7367	1.7365	15.04
2.50	1.9056	1.9058	1.9039	1.9051	6.79

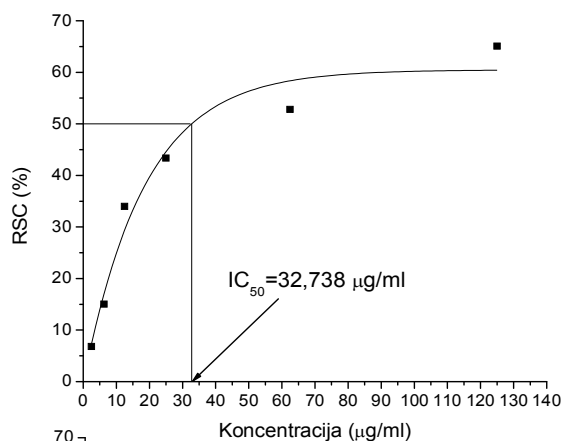


Tabela 8.84.

Radna konc. [$\mu\text{g/ml}$]	TP _{1Et2O}				RSC [%]
	A_1	A_2	A_3	\bar{A}	
125.00	0.7556	0.756	0.7561	0.7559	63.01
62.50	0.9951	0.9953	0.9947	0.9950	51.31
25.00	1.1863	1.1860	1.1860	1.1861	41.97
12.50	1.3685	1.3684	1.3680	1.3683	33.05
6.25	1.7653	1.7658	1.7651	1.7654	13.62
2.50	1.9241	1.9248	1.9246	1.9245	5.84

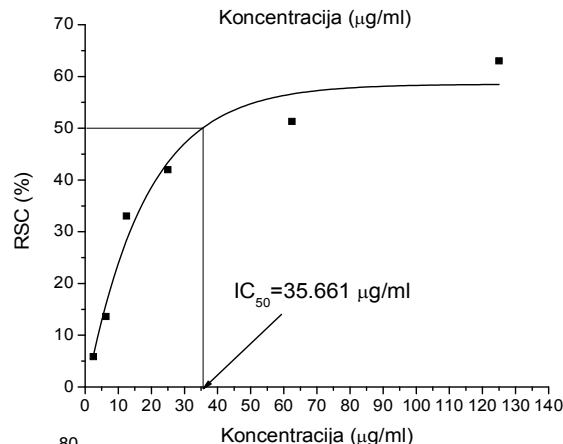


Tabela 8.85.

Radna konc. [$\mu\text{g/ml}$]	TP _{1CHCl3}				RSC [%]
	A_1	A_2	A_3	\bar{A}	
125.00	0.6106	0.6112	0.6108	0.6109	70.11
62.50	0.8547	0.8542	0.8540	0.8543	58.20
25.00	1.0084	1.0075	1.0076	1.0078	50.69
12.50	1.3112	1.3117	1.3111	1.3113	35.84
6.25	1.6314	1.6315	1.6318	1.6316	20.17
2.50	1.8432	1.8425	1.8428	1.8428	9.83

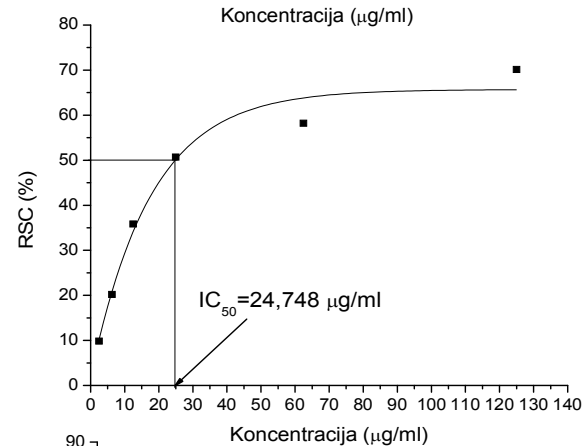


Tabela 8.86.

Radna konc. [$\mu\text{g/ml}$]	TP _{1EtOAc}				RSC [%]
	A_1	A_2	A_3	\bar{A}	
125.00	0.3217	0.3211	0.3218	0.3215	84.27
62.50	0.4873	0.4869	0.4871	0.4871	76.17
25.00	0.7964	0.7958	0.7965	0.7962	61.04
12.50	1.0875	1.0872	1.0873	1.0873	46.80
6.25	1.3127	1.3125	1.3127	1.3126	35.77
2.50	1.7538	1.7533	1.7536	1.7536	14.20

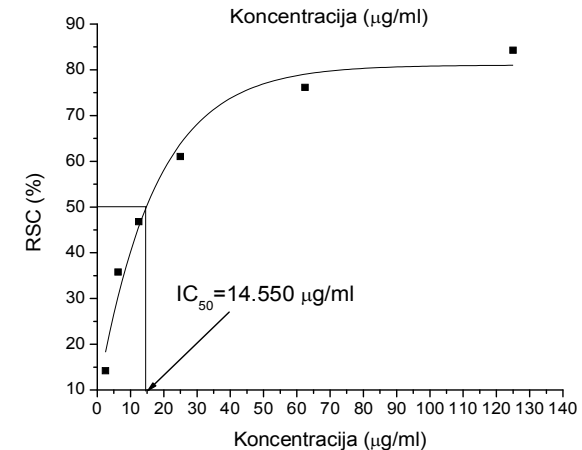


Tabela 8.87.

TP _{1BuOH}					
Radna konc. [$\mu\text{g/ml}$]	A_1	A_2	A_3	\bar{A}	RSC [%]
125.00	0.3241	0.3246	0.3243	0.3243	84.13
62.50	0.5275	0.5271	0.5275	0.5274	74.20
25.00	0.8117	0.8115	0.8109	0.8114	60.30
12.50	1.0273	1.0274	1.0274	1.0274	49.73
6.25	1.4051	1.405	1.4048	1.4050	31.26
2.50	1.6985	1.6997	1.6995	1.6992	16.86

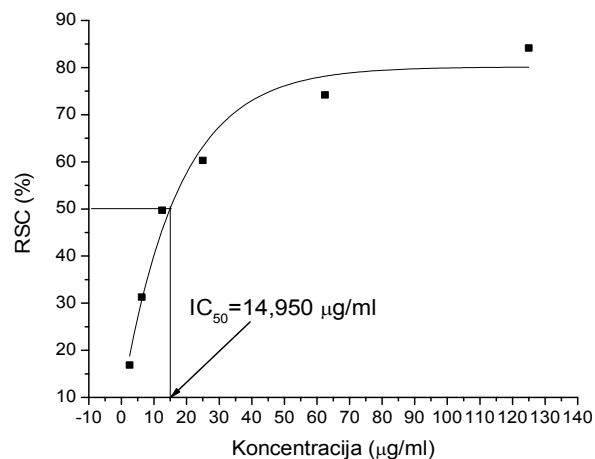


Tabela 8.88.

TP _{1H2O}					
Radna konc. [$\mu\text{g/ml}$]	A_1	A_2	A_3	\bar{A}	RSC [%]
125.00	0.7217	0.7209	0.7225	0.7217	64.69
62.50	0.9246	0.9238	0.9235	0.9240	54.79
25.00	1.1526	1.1518	1.1527	1.1524	43.62
12.50	1.3751	1.3753	1.3747	1.3750	32.72
6.25	1.6223	1.6227	1.6218	1.6223	20.62
2.50	1.8051	1.8047	1.8047	1.8048	11.69

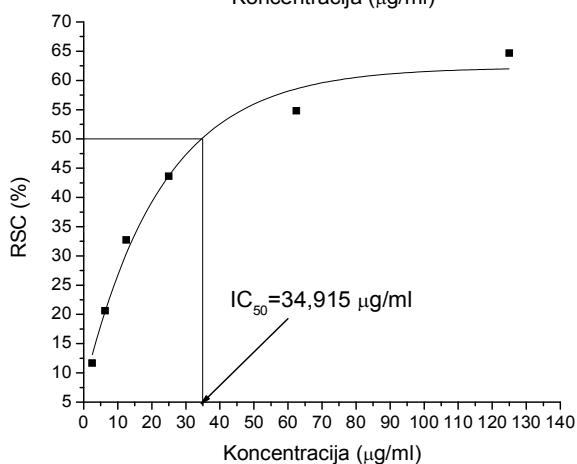


Tabela 8.89.

TP _{2MeOH}					
Radna konc. [$\mu\text{g/ml}$]	A_1	A_2	A_3	\bar{A}	RSC [%]
125.00	0.7218	0.7215	0.7210	0.7214	64.70
62.50	0.9642	0.9643	0.9637	0.9641	52.83
25.00	1.1715	1.1716	1.1710	1.1714	42.69
12.50	1.3542	1.3548	1.3543	1.3544	33.73
6.25	1.7342	1.7339	1.7339	1.7340	15.16
2.50	1.8981	1.8978	1.8974	1.8978	7.15

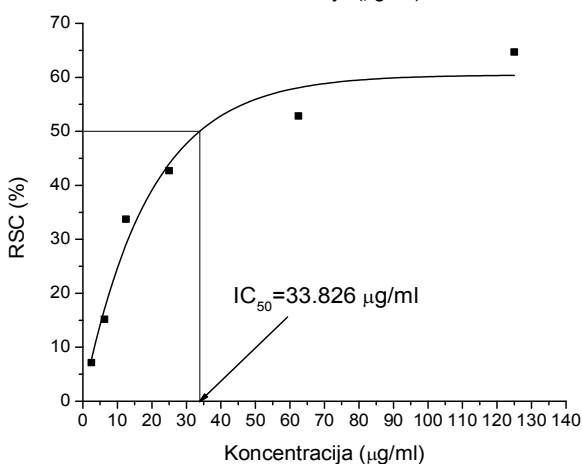


Tabela 8.90.

TP _{2Et2O}					
Radna konc. [$\mu\text{g/ml}$]	A_1	A_2	A_3	\bar{A}	RSC [%]
125.00	0.5986	0.5983	0.5981	0.5983	70.72
62.50	0.9141	0.9147	0.9135	0.9141	55.27
25.00	1.1965	1.1971	1.1972	1.1969	41.44
12.50	1.4145	1.4132	1.4136	1.4138	30.83
6.25	1.7328	1.7338	1.7329	1.7332	15.20
2.50	1.8974	1.8972	1.8972	1.8973	7.17

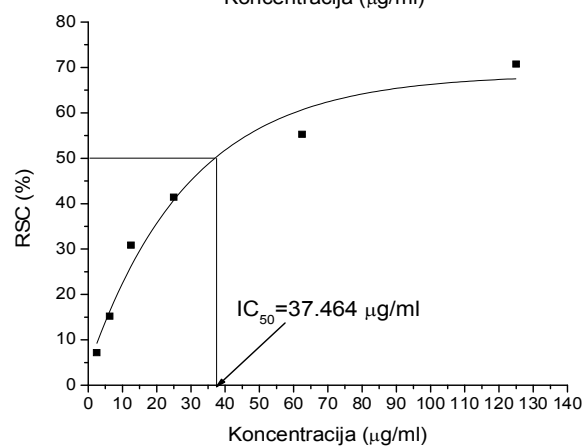


Tabela 8.91.

TP ₂ CHCl ₃					
Radna konc. [$\mu\text{g/ml}$]	A_1	A_2	A_3	\bar{A}	RSC [%]
125.00	0.6146	0.6151	0.6148	0.6148	69.92
62.50	0.8872	0.8875	0.8870	0.8872	56.59
25.00	1.1005	1.0998	1.0996	1.1000	46.18
12.50	1.3086	1.3084	1.3081	1.3084	35.98
6.25	1.6527	1.653	1.6539	1.6532	19.11
2.50	1.8752	1.8761	1.8760	1.8758	8.22

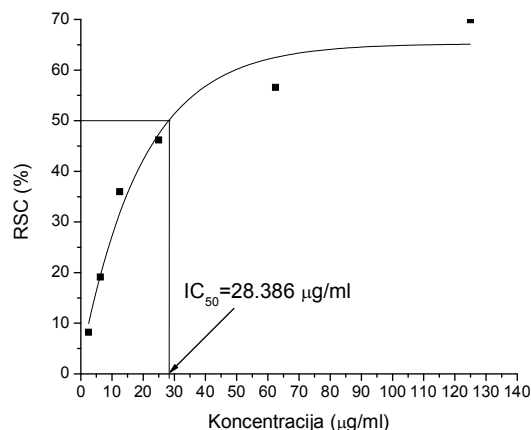


Tabela 8.92.

TP ₂ EtOAc					
Radna konc. [$\mu\text{g/ml}$]	A_1	A_2	A_3	\bar{A}	RSC [%]
125.00	0.3371	0.3365	0.3367	0.3368	83.52
62.50	0.5085	0.5089	0.5081	0.5085	75.12
25.00	0.8017	0.8021	0.8025	0.8021	60.75
12.50	1.0742	1.0736	1.0737	1.0738	47.46
6.25	1.3315	1.3311	1.3317	1.3314	34.86
2.50	1.7548	1.7541	1.7543	1.7544	14.16

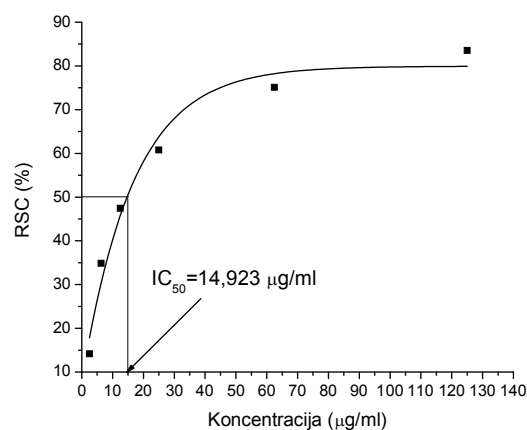


Tabela 8.93.

TP ₂ BuOH					
Radna konc. [$\mu\text{g/ml}$]	A_1	A_2	A_3	\bar{A}	RSC [%]
2.50	0.3074	0.3071	0.3075	0.3073	84.96
25.00	1.0118	1.0113	1.0109	1.0113	50.52
12.50	0.8046	0.88041	0.8041	0.8297	59.40
125.00	1.6895	1.6884	1.6882	1.6887	17.37
62.50	1.4106	1.4102	1.4109	1.4106	30.98
6.25	0.5246	0.5243	0.5248	0.5246	74.33

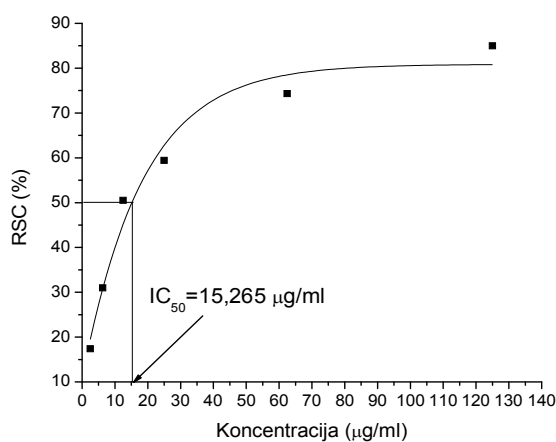


Tabela 8.94.

TP ₂ H ₂ O					
Radna konc. [$\mu\text{g/ml}$]	A_1	A_2	A_3	\bar{A}	RSC [%]
125.00	0.7285	0.7284	0.7285	0.7285	64.36
62.50	0.9936	0.9929	0.9931	0.9932	51.40
25.00	1.1531	1.1541	1.1536	1.1536	43.56
12.50	1.3987	1.3988	1.3987	1.3987	31.56
6.25	1.6316	1.6309	1.6321	1.6315	20.17
2.50	1.8732	1.8736	1.873	1.8733	8.34

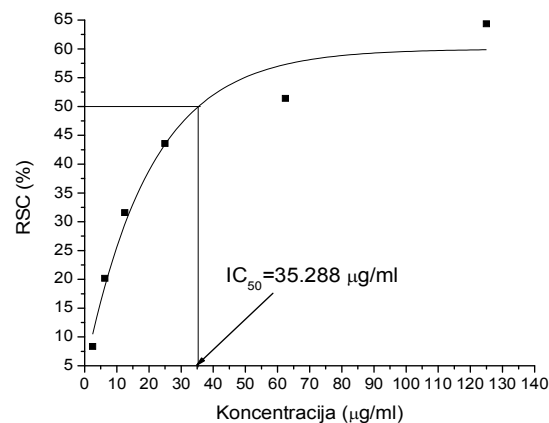


Tabela 8.95.

TP ₃ MeOH					
Radna konc. [$\mu\text{g/ml}$]	A_1	A_2	A_3	\bar{A}	RSC [%]
125.00	0.7556	0.756	0.7561	0.7559	63.01
62.50	0.9951	0.9953	0.9947	0.9950	51.31
25.00	1.1863	1.1860	1.1860	1.1861	41.97
12.50	1.3685	1.3684	1.3680	1.3683	33.05
6.25	1.7653	1.7658	1.7651	1.7654	13.62
2.50	1.9241	1.9248	1.9246	1.9245	5.84

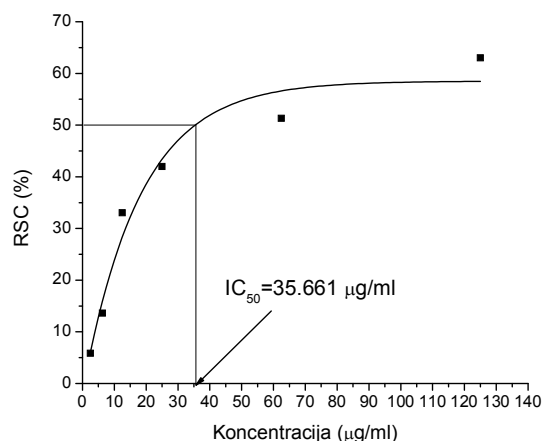


Tabela 8.96.

TP ₃ Et ₂ O					
Radna konc. [$\mu\text{g/ml}$]	A_1	A_2	A_3	\bar{A}	RSC [%]
125.00	0.6125	0.6127	0.6122	0.6125	70.03
62.50	0.9562	0.9569	0.9565	0.9565	53.20
25.00	1.2089	1.2085	1.2079	1.2084	40.87
12.50	1.4389	1.4392	1.4385	1.4389	29.60
6.25	1.7654	1.7658	1.7659	1.7657	13.61
2.50	1.9231	1.9228	1.9221	1.9227	5.93

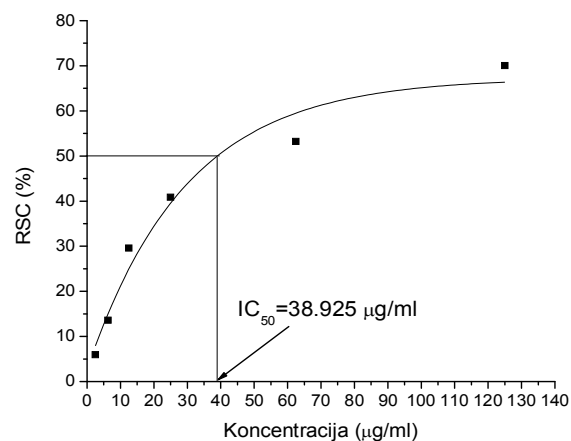


Tabela 8.97.

TP ₃ CHCl ₃					
Radna konc. [$\mu\text{g/ml}$]	A_1	A_2	A_3	\bar{A}	RSC [%]
125.00	0.5973	0.5971	0.5967	0.5970	70.79
62.50	0.8361	0.8355	0.8350	0.8355	59.12
25.00	1.0985	1.0976	1.0973	1.0978	46.29
12.50	1.2985	1.2983	1.2992	1.2987	36.46
6.25	1.6385	1.6381	1.6389	1.6385	19.83
2.50	1.8342	1.8347	1.8341	1.8343	10.25

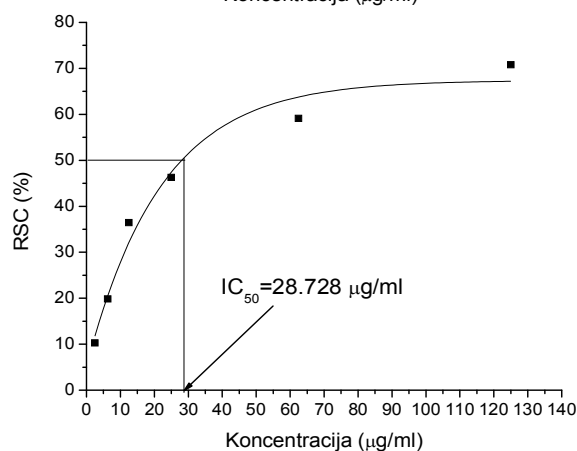


Tabela 8.98.

TP ₃ EtOAc					
Radna konc. [$\mu\text{g/ml}$]	A_1	A_2	A_3	\bar{A}	RSC [%]
125.00	0.3259	0.3254	0.3257	0.3257	84.07
62.50	0.5113	0.5119	0.5110	0.5114	74.98
25.00	0.8357	0.8358	0.8351	0.8355	59.12
12.50	1.0985	1.0972	1.0982	1.0980	46.28
6.25	1.3564	1.3561	1.3567	1.3564	33.63
2.50	1.7241	1.7249	1.7238	1.7243	15.63

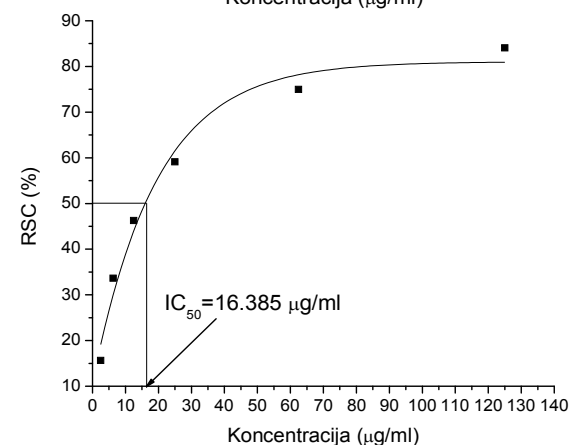


Tabela 8.99.

TP _{3BuOH}					
Radna konc. [$\mu\text{g/ml}$]	A_1	A_2	A_3	\bar{A}	RSC [%]
125.00	0.3146	0.3148	0.3143	0.3146	84.61
62.50	0.5316	0.5315	0.5318	0.5316	73.99
25.00	0.8231	0.8235	0.8237	0.8234	59.71
12.50	1.0543	1.0538	1.0544	1.0542	48.42
6.25	1.4361	1.436	1.4358	1.4360	29.74
2.50	1.7192	1.7187	1.7188	1.7189	15.90

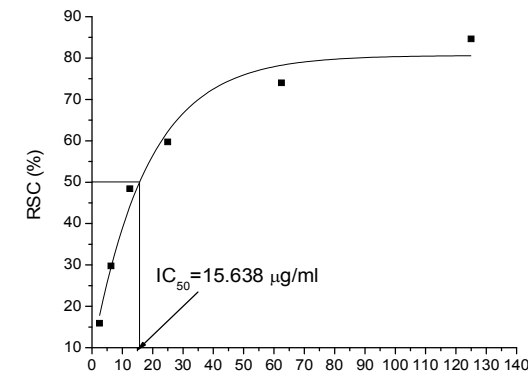
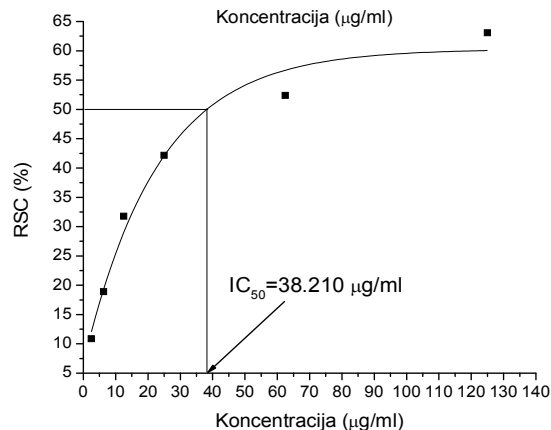


Tabela 8.100.

TP _{3H2O}					
Radna konc. [$\mu\text{g/ml}$]	A_1	A_2	A_3	\bar{A}	RSC [%]
125.00	0.7545	0.7549	0.7545	0.7546	63.08
62.50	0.9734	0.9737	0.9730	0.9734	52.37
25.00	1.1824	1.1821	1.1822	1.1822	42.16
12.50	1.3942	1.3945	1.3947	1.3945	31.77
6.25	1.6573	1.6572	1.6578	1.6574	18.90
2.50	1.8211	1.8219	1.8217	1.8216	10.87



8.2.8. Inhibicija lipidne peroksidacije-ekstrakti

(Tabele 8.101.-8.118.)

Tabela 8.101.

TP _{1MeOH}							
Radna konc. [$\mu\text{g/ml}$]	A_1	A_2	A_3	A_4	A_5	\bar{A}	I_{LPx} [%]
415.54	0.0608	0.0603	0.0611	0.0615	0.0607	0.0609	63.42
319.14	0.0642	0.0637	0.0625	0.0641	0.0635	0.0636	61.80
212.77	0.0891	0.0878	0.0862	0.0891	0.0890	0.0882	47.03
106.38	0.1096	0.1014	0.1045	0.1097	0.1050	0.1060	36.34
53.19	0.1218	0.1188	0.1215	0.1185	0.1196	0.1200	27.93
21.28	0.1442	0.1438	0.1429	0.1438	0.1447	0.1439	13.57

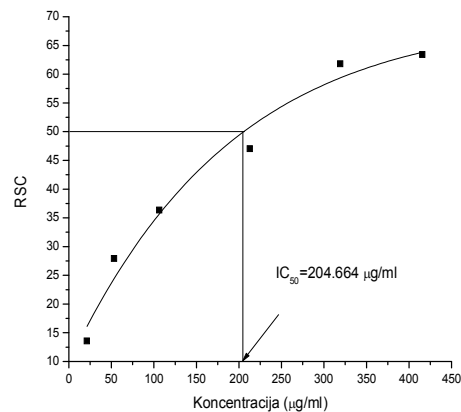


Tabela 8.102.

TP _{1Et2O}							
Radna konc. [$\mu\text{g/ml}$]	A_1	A_2	A_3	A_4	A_5	\bar{A}	I_{LPx} [%]
415.54	0.0775	0.0774	0.0762	0.0768	0.0766	0.0769	53.81
319.14	0.0922	0.0924	0.0918	0.0911	0.0916	0.0918	44.86
212.77	0.1016	0.1017	0.1008	0.1003	0.1004	0.1010	39.34
106.38	0.1240	0.1248	0.1252	0.1271	0.1265	0.1255	24.62
53.19	0.1353	0.1358	0.1359	0.1340	0.1325	0.1347	19.10
21.28	0.1556	0.1565	0.1573	0.1563	0.1569	0.1565	6.01

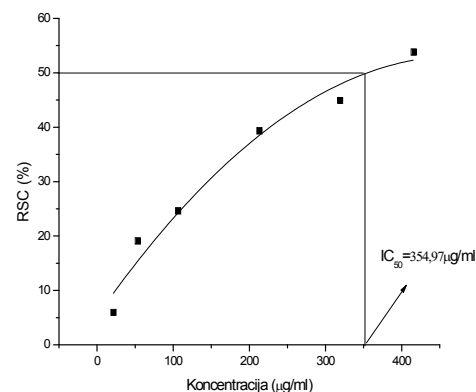


Tabela 8.103.

TP _{1CHCl3}							
Radna konc. [$\mu\text{g/ml}$]	A_1	A_2	A_3	A_4	A_5	\bar{A}	I_{LPx} [%]
415.54	0.0796	0.0791	0.0788	0.0793	0.0794	0.0792	52.43
319.14	0.0931	0.0928	0.0942	0.0925	0.0944	0.0934	43.91
212.77	0.1257	0.1242	0.1249	0.1268	0.1259	0.1255	24.62
106.38	0.1334	0.1338	0.1339	0.1348	0.1336	0.1339	19.58
53.19	0.1441	0.1460	0.1437	0.1433	0.1433	0.1441	13.45
21.28	0.1527	0.1531	0.1519	0.1518	0.1515	0.1522	8.59

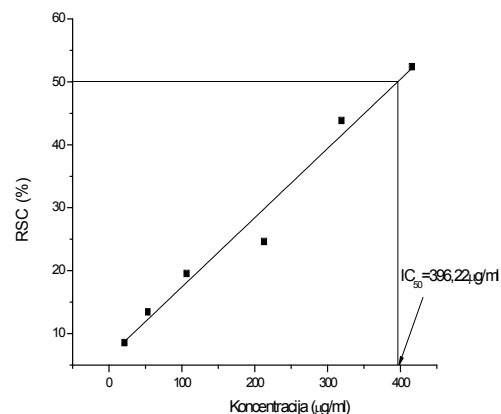


Tabela 8.104.

TP _{1EtOAc}							
Radna konc. [$\mu\text{g/ml}$]	A_1	A_2	A_3	A_4	A_5	\bar{A}	I_{LPx} [%]
415.54	0.0656	0.0659	0.0653	0.0651	0.0642	0.0652	60.84
319.14	0.0713	0.0706	0.0704	0.0708	0.0721	0.0710	57.36
212.77	0.0904	0.0916	0.0915	0.0913	0.0927	0.0915	45.05
106.38	0.1018	0.1014	0.1022	0.1040	0.1025	0.1024	38.50
53.19	0.1161	0.1172	0.1175	0.1184	0.1151	0.1169	29.79
21.28	0.1339	0.1315	0.1334	0.1332	0.1318	0.1328	20.24

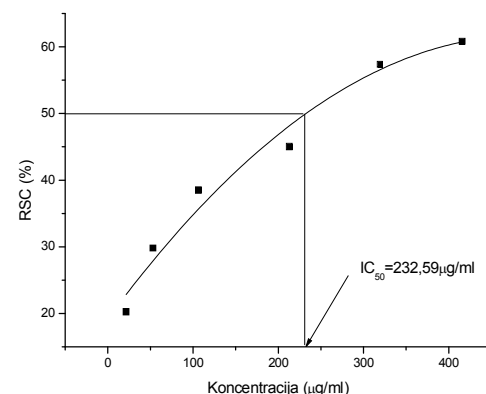


Tabela 8.105.

TP _{1BuOH}							
Radna konc. [$\mu\text{g/ml}$]	A_1	A_2	A_3	A_4	A_5	\bar{A}	I_{LPx} [%]
415.54	0.0731	0.0728	0.0724	0.0716	0.0731	0.0726	56.40
319.14	0.0910	0.0905	0.0907	0.0897	0.0893	0.0902	45.83
212.77	0.1021	0.1027	0.1026	0.1022	0.1019	0.1023	38.56
106.38	0.1185	0.1158	0.1175	0.1143	0.1189	0.1170	42.49
53.19	0.1326	0.1334	0.1353	0.1346	0.1355	0.1343	19.34
21.28	0.1458	0.1447	0.1469	0.1445	0.1446	0.1453	12.73

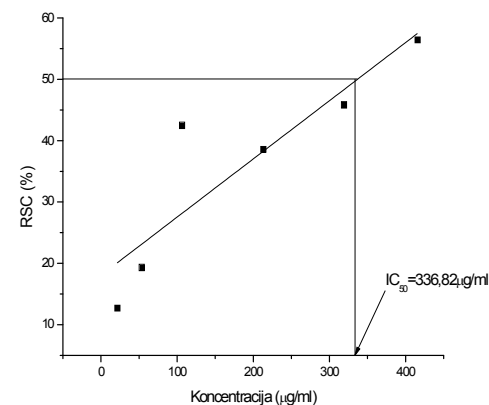


Tabela 8.106

TP _{1H2O}							
Radna konc. [$\mu\text{g/ml}$]	A_1	A_2	A_3	A_4	A_5	\bar{A}	I_{LPx} [%]
415.54	0.0696	0.0693	0.0687	0.0682	0.0681	0.0688	58.68
319.14	0.0742	0.0746	0.0751	0.0758	0.0743	0.0748	55.08
212.77	0.0874	0.0875	0.0891	0.0895	0.0883	0.0884	46.91
106.38	0.1182	0.1150	0.1146	0.1161	0.1168	0.1161	30.27
53.19	0.1371	0.1383	0.1400	0.1381	0.1376	0.1382	17.00
21.28	0.1539	0.1561	0.1560	0.1563	0.1535	0.1552	6.79

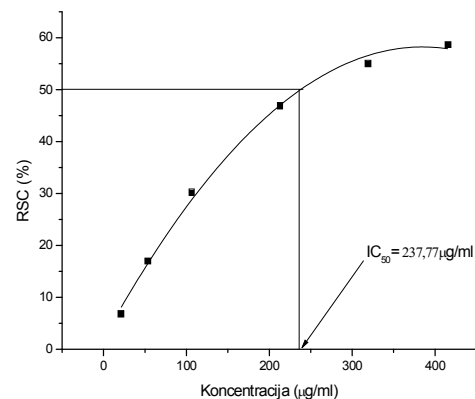


Tabela 8.107.

TP ₂ MeOH							
Radna konc. [$\mu\text{g/ml}$]	A_1	A_2	A_3	A_4	A_5	\bar{A}	I_{LPx} [%]
415.54	0.0694	0.0698	0.0685	0.0682	0.0683	0.0688	58.68
319.14	0.0743	0.0751	0.0762	0.0728	0.0734	0.0744	55.32
212.77	0.0974	0.0947	0.0983	0.0952	0.0910	0.0953	42.76
106.38	0.1153	0.1099	0.1107	0.1149	0.1165	0.1135	31.83
53.19	0.1425	0.1432	0.1435	0.1427	0.1406	0.1425	14.41
21.28	0.1591	0.1586	0.1607	0.1616	0.1593	0.1599	3.96

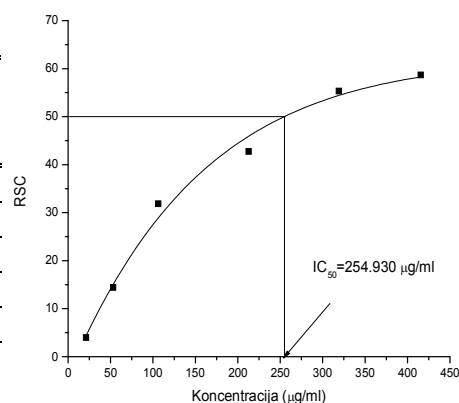


Tabela 8.108.

TP ₂ Et ₂ O							
Radna konc. [$\mu\text{g/ml}$]	A_1	A_2	A_3	A_4	A_5	\bar{A}	I_{LPx} [%]
415.54	0.0794	0.0799	0.0783	0.0805	0.0801	0.0796	52.19
319.14	0.0936	0.0937	0.0937	0.0928	0.0924	0.0932	44.02
212.77	0.1068	0.1057	0.1078	0.1047	0.1022	0.1058	36.46
106.38	0.1286	0.1281	0.1288	0.1295	0.1299	0.1290	22.52
53.19	0.1417	0.1444	0.1441	0.1456	0.1437	0.1439	13.57
21.28	0.1599	0.1570	0.1574	0.1584	0.1586	0.1583	4.92

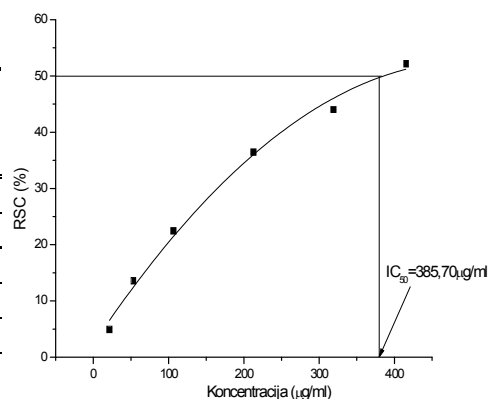


Tabela 8.109.

TP ₂ CHCl ₃							
Radna konc. [$\mu\text{g/ml}$]	A_1	A_2	A_3	A_4	A_5	\bar{A}	I_{LPx} [%]
415.54	0.0788	0.0781	0.0776	0.0775	0.0771	0.0778	53.27
319.14	0.0991	0.0979	0.0988	0.0995	0.0996	0.0990	40.54
212.77	0.1190	0.1185	0.1172	0.1203	0.1180	0.1186	28.77
106.38	0.1346	0.1349	0.1323	0.1320	0.1294	0.1326	20.36
53.19	0.1387	0.1388	0.1376	0.1379	0.1385	0.1383	16.94
21.28	0.1427	0.1430	0.1411	0.1416	0.1401	0.1417	14.89

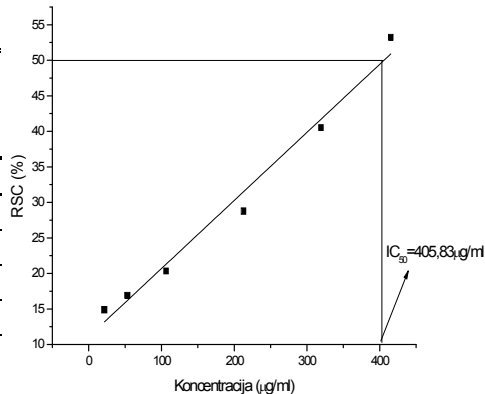


Tabela 8.110.

TP ₂ EtOAc							
Radna konc. [$\mu\text{g/ml}$]	A_1	A_2	A_3	A_4	A_5	\bar{A}	I_{LPx} [%]
415.54	0.0622	0.0629	0.0627	0.0618	0.0615	0.0622	62.64
319.14	0.0711	0.0706	0.0703	0.0710	0.0702	0.0706	57.60
212.77	0.0955	0.0953	0.0947	0.0946	0.0944	0.0949	43.00
106.38	0.1039	0.1024	0.1023	0.1049	0.1037	0.1034	37.90
53.19	0.1259	0.1288	0.1257	0.1280	0.1277	0.1272	23.60
21.28	0.1407	0.1394	0.1395	0.1395	0.1416	0.1401	15.86

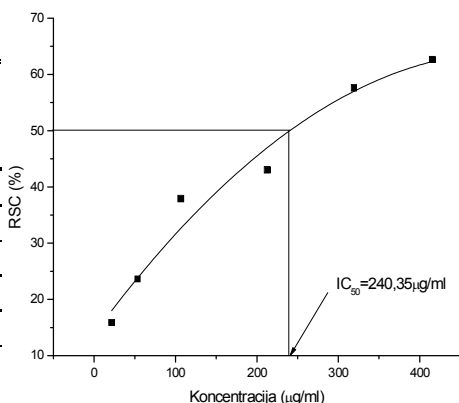


Tabela 8.111.

TP ₂ BuOH							
Radna konc. [$\mu\text{g/ml}$]	A_1	A_2	A_3	A_4	A_5	\bar{A}	I_{LPx} [%]
415.54	0.0772	0.0770	0.0768	0.0761	0.0784	0.0771	53.69
319.14	0.0883	0.0883	0.0879	0.0894	0.0892	0.0886	46.79
212.77	0.1061	0.1055	0.1067	0.1073	0.1052	0.1062	36.22
106.38	0.1212	0.1225	0.1236	0.1252	0.1239	0.1233	25.95
53.19	0.1321	0.1319	0.1301	0.1315	0.1324	0.1316	20.96
21.28	0.1485	0.1518	0.1508	0.1510	0.1496	0.1503	9.73

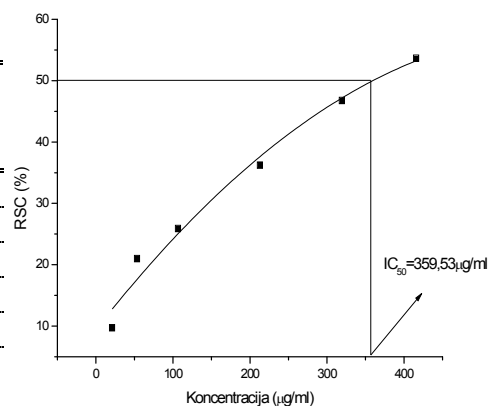


Tabela 8.112.

TP ₂ H ₂ O							
Radna konc. [$\mu\text{g/ml}$]	A_1	A_2	A_3	A_4	A_5	\bar{A}	I_{LPx} [%]
415.54	0.0671	0.0682	0.0675	0.0671	0.0668	0.0673	59.58
319.14	0.0755	0.0764	0.0763	0.0750	0.0758	0.0758	54.47
212.77	0.0973	0.0978	0.0977	0.0984	0.0980	0.0978	41.26
106.38	0.1083	0.1079	0.1071	0.1081	0.1075	0.1078	35.26
53.19	0.1249	0.1249	0.1272	0.1260	0.1262	0.1258	24.44
21.28	0.1536	0.1547	0.1552	0.1537	0.1533	0.1541	7.45

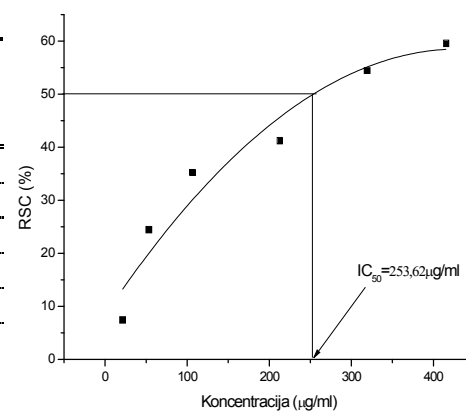


Tabela 8.113.

TP ₃ MeOH							
Radna konc. [$\mu\text{g/ml}$]	A_1	A_2	A_3	A_4	A_5	\bar{A}	I_{LPx} [%]
415.54	0.0749	0.0753	0.0731	0.0716	0.0717	0.0733	55.98
319.14	0.0986	0.0979	0.0993	0.0991	0.0984	0.0987	40.72
212.77	0.1051	0.1067	0.1062	0.1074	0.1053	0.1061	36.28
106.38	0.1264	0.1216	0.1206	0.1210	0.1204	0.1220	26.73
53.19	0.1349	0.1412	0.1356	0.1296	0.1387	0.1360	18.32
21.28	0.1574	0.1590	0.1590	0.1570	0.1537	0.1572	5.59

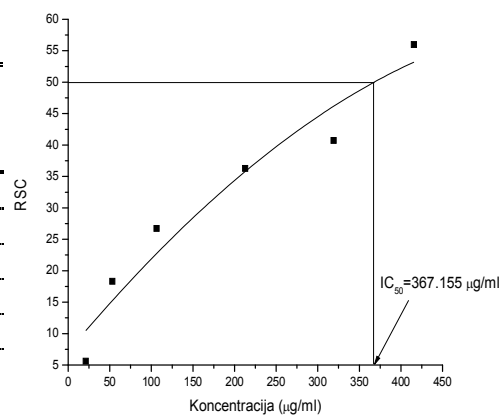


Tabela 8.114.

TP ₃ Et ₂ O							
Radna konc. [$\mu\text{g/ml}$]	A_1	A_2	A_3	A_4	A_5	\bar{A}	I_{LPx} [%]
415.54	0.0812	0.0797	0.0793	0.0790	0.0801	0.0799	52.01
319.14	0.1115	0.1134	0.1160	0.1141	0.1155	0.1141	31.47
212.77	0.1187	0.1192	0.1205	0.1197	0.1209	0.1198	28.05
106.38	0.1227	0.1229	0.1241	0.1233	0.1225	0.1231	26.07
53.19	0.1368	0.1346	0.1349	0.1350	0.1355	0.1354	18.68
21.28	0.1461	0.1453	0.1441	0.1447	0.1448	0.1450	12.91

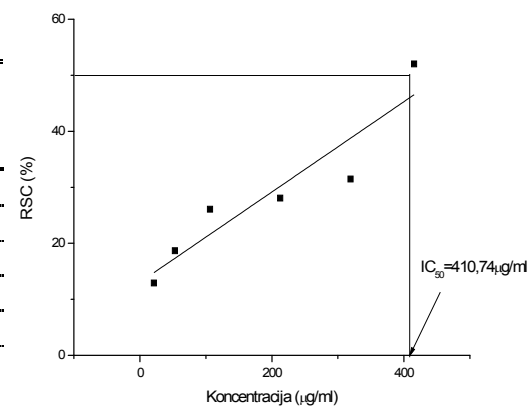


Tabela 8.115.

TP ₃ CHCl ₃							
Radna konc. [$\mu\text{g/ml}$]	A_1	A_2	A_3	A_4	A_5	\bar{A}	I_{LPx} [%]
415.54	0.0774	0.0764	0.0769	0.0761	0.0779	0.0769	53.81
319.14	0.0991	0.0979	0.0992	0.0984	0.0993	0.0988	40.66
212.77	0.1136	0.1139	0.1127	0.1128	0.1124	0.1131	32.07
106.38	0.1351	0.1358	0.1351	0.1347	0.1349	0.1351	18.86
53.19	0.1446	0.1449	0.1437	0.1428	0.1429	0.1438	13.63
21.28	0.1556	0.1551	0.1558	0.1554	0.1546	0.1553	6.73

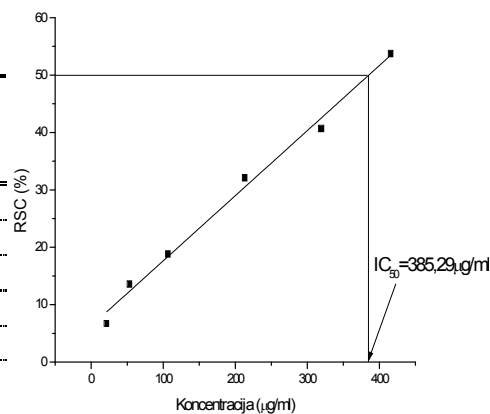


Tabela 8.116.

TP ₃ EtOAc							
Radna konc. [$\mu\text{g/ml}$]	A_1	A_2	A_3	A_4	A_5	\bar{A}	I_{LPx} [%]
415.54	0.0751	0.0749	0.0739	0.0748	0.0742	0.0746	55.20
319.14	0.0802	0.0811	0.0796	0.0799	0.0803	0.0802	51.83
212.77	0.0963	0.0967	0.0949	0.0968	0.0958	0.0961	42.28
106.38	0.1192	0.1186	0.1191	0.1179	0.1172	0.1184	28.89
53.19	0.1458	0.1448	0.1466	0.1469	0.1449	0.1458	12.43
21.28	0.1566	0.1548	0.1572	0.1570	0.1579	0.1567	5.89

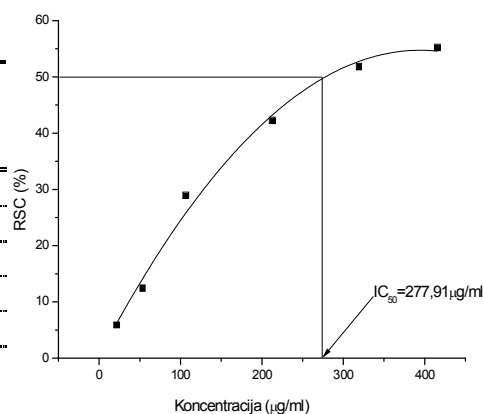


Tabela 8.117.

TP ₃ BuOH							
Radna konc. [$\mu\text{g/ml}$]	A_1	A_2	A_3	A_4	A_5	\bar{A}	I_{LPx} [%]
415.54	0.0814	0.0799	0.0806	0.0802	0.0801	0.0804	51.71
319.14	0.0944	0.0941	0.0935	0.0948	0.0933	0.0940	43.54
212.77	0.1196	0.1198	0.1215	0.1211	0.1200	0.1204	27.69
106.38	0.1291	0.1297	0.1299	0.1285	0.1298	0.1294	22.28
53.19	0.1310	0.1299	0.1310	0.1311	0.1308	0.1308	21.44
21.28	0.1328	0.1334	0.1318	0.1304	0.1296	0.1316	20.96

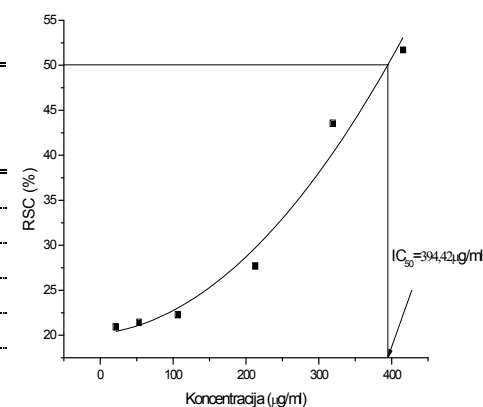
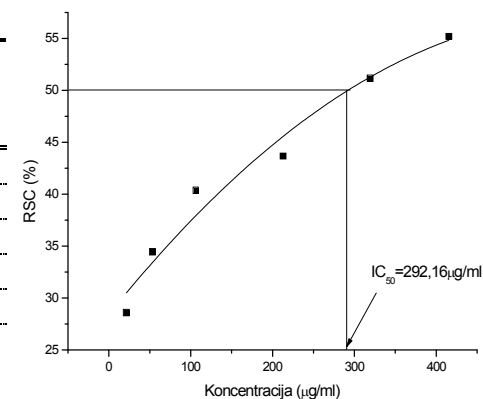


Tabela 8.118.

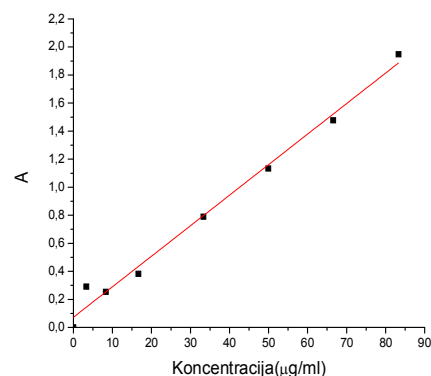
TP ₃ H ₂ O							
Radna konc. [$\mu\text{g/ml}$]	A_1	A_2	A_3	A_4	A_5	\bar{A}	I_{LPx} [%]
415.54	0.0746	0.0749	0.0738	0.0751	0.0744	0.0746	55.20
319.14	0.0816	0.0807	0.0819	0.0812	0.0813	0.0813	51.17
212.77	0.0921	0.0935	0.0944	0.0949	0.0941	0.0938	43.67
106.38	0.0978	0.0994	0.1006	0.0990	0.0997	0.0993	40.36
53.19	0.1078	0.1099	0.1096	0.1093	0.1090	0.1091	34.47
21.28	0.1210	0.1211	0.1145	0.1188	0.1192	0.1189	28.60



8.2.9. Ukupni redoks potencijal (FRAP metoda)

Tabela.8.119. Kalibraciona kriva $FeCl_2 \cdot 4H_2O$

Početna konc. Fe^{2+} [mg/ml]	Radna konc. [μg/ml]	A_1	A_2	A_3	\bar{A}	Akonačno
25.00	83.33	1.9614	1.9612	1.9598	1.9608	1.9480
20.00	66.60	1.4886	1.4887	1.4890	1.4891	1.4763
15.00	49.95	1.1465	1.1462	1.1441	1.1456	1.1328
10.00	33.33	0.8011	0.8023	0.8026	0.8020	0.7892
5.00	16.67	0.3953	0.3939	0.3940	0.3944	0.3816
2.50	8.33	0.2667	0.2688	0.2652	0.2669	0.2541
1.00	3.33	0.3041	0.3024	0.3028	0.3031	0.2903
0.00	0	0.0125	0.0132	0.0127	0.0128	--



(Tabele 8.120.-8.122.)

Tabela 8.120.

Ekstrakt TP1	Konc. ekstrakta [μg/ml]	A_1	A_2	A_3	\bar{A}	$A_{konačno}$	Očitana konc. [μg/ml]	mg ekv. Fe^{2+} /g s. e.
MeOH	3.30	0.4519	0.4512	0.4514	0.4674	0.4546	16.89	528.76
Et ₂ O	3.30	0.2903	0.289	0.2908	0.2900	0.2772	9.45	283.59
CHCl ₃	3.30	0.2901	0.289	0.2894	0.2895	0.2767	9.43	282.86
EtOAc	3.30	0.4152	0.4147	0.415	0.4150	0.4022	15.21	456.31
n-BuOH	3.30	0.3171	0.3185	0.3184	0.3180	0.3052	10.74	322.258
H ₂ O	3.30	0.3789	0.3793	0.3794	0.3792	0.3664	13.56	406.87

Tabela 8.121.

Ekstrakt TP2	Konc. ekstrakta [μg/ml]	A_1	A_2	A_3	\bar{A}	$A_{konačno}$	Očitana konc. [μg/ml]	mg ekv. Fe^{2+} /g s. e.
MeOH	3.30	0.3837	0.3851	0.3853	0.3847	0.3719	13.82	414.47
Et ₂ O	3.30	0.2947	0.2933	0.2939	0.2940	0.2812	9.63	289.03
CHCl ₃	3.30	0.2895	0.2881	0.2889	0.2888	0.2760	9.40	281.96
EtOAc	3.30	0.3784	0.3789	0.3794	0.3789	0.3661	13.55	406.45
n-BuOH	3.30	0.3033	0.3036	0.3029	0.3033	0.2905	10.06	301.89
H ₂ O	3.30	0.3929	0.3924	0.3922	0.3925	0.3797	14.18	425.25

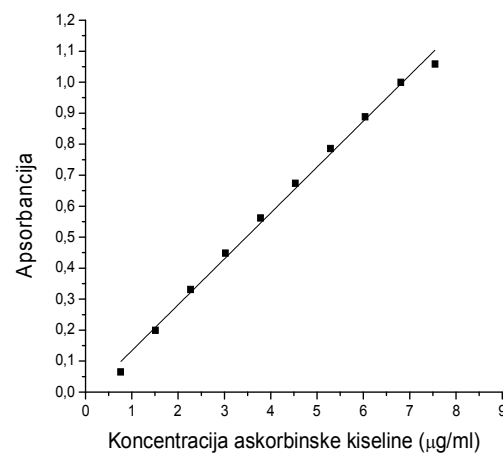
Tabela 8.122.

Ekstrakt TP3	Konc. ekstrakta [μg/ml]	A_1	A_2	A_3	\bar{A}	$A_{konačno}$	Očitana konc. [μg/ml]	mg ekv. Fe^{2+} /g s. e.
MeOH	3.30	0.3648	0.3638	0.363	0.3639	0.3511	12.86	385.67
Et ₂ O	3.30	0.2853	0.2859	0.2864	0.2859	0.2731	9.26	277.83
CHCl ₃	3.30	0.5526	0.5529	0.5519	0.5525	0.4866	3.3713	223.25
EtOAc	3.30	0.3758	0.3753	0.3752	0.3754	0.3626	13.39	401.66
n-BuOH	3.30	0.2904	0.2905	0.2917	0.2909	0.2781	9.49	284.75
H ₂ O	3.30	0.3161	0.3148	0.3152	0.3026	0.3026	10.62	318.62

8.2.10. Ukupni redoks potencijal (Yen i Chen metoda) ekstrakata

Tabela 8.123. Kalibraciona kriva askorbinske kiseline

Početna konc. mg/ml	Radna konc. µg/ml	A_1	A_2	A_3	\bar{A}	$A_{\text{konačno}}$
5.00	7.55	1.1230	1.1274	1.1235	1.1246	1.0587
4.50	6.81	1.0645	1.0692	1.0621	1.0654	0.9995
4.00	6.04	0.9512	0.9528	0.9586	0.9542	0.8883
3.50	5.29	0.8405	0.8513	0.8642	0.8520	0.7861
3.00	4,53	0,7191	0,7435	0,7557	0.7394	0.6735
2.50	3,78	0,6218	0,6229	0,6321	0.6277	0.5618
2.00	3,02	0,5160	0,5118	0,5141	0.5140	0.4481
1.50	2,27	0,4022	0,3894	0,3991	0.3969	0.3310
1.00	1,51	0,2804	0,2523	0,2627	0.2651	0.1992
0.50	0,76	0,1347	0,1258	0,1329	0.1311	0.0652
0	0	0,0652	0,0680	0,0671	0.0659	--



(Tabele 8.124. – 8. 126.)

Tabela 8.124.

TP1	Konc. ekstrakta [%]	A_1	A_2	A_3	\bar{A}	$A_{\text{konačno}}$	Očitana konc. [µg/ml]	mg ekv. ask. kis./g s.e.
MeOH	1.0	0.9101	0.9109	0.9105	0.9105	0.8446	5.8031	384.28
Et ₂ O	1.0	0.8617	0.8615	0.8608	0.8613	0.7954	5.4692	362.17
CHCl ₃	1.0	0.8109	0.8102	0.8117	0.8109	0.7450	5.1268	339.50
EtOAc	1.0	1.1039	1.1043	1.1034	1.1039	1.0380	7.1165	471.25
n-BuOH	1.0	0.8858	0.8857	0.8849	0.8855	0.8196	5.6331	373.02
H ₂ O	1.0	1.0239	1.0234	1.0241	1.0238	0.9579	6.5726	435.24

Tabela 8.125.

TP2	Konc. ekstrakta [%]	A_1	A_2	A_3	\bar{A}	$A_{\text{konačno}}$	Očitana konc. [µg/ml]	mg ekv. ask. kis./g s.e.
MeOH	1.0	0.975	0.9743	0.9745	0.9746	0.9087	6.2385	413.11
Et ₂ O	1.0	0.8579	0.8574	0.8562	0.8572	0.7913	5.4409	360.29
CHCl ₃	1.0	0.8486	0.8475	0.8479	0.8480	0.7821	5.3786	356.17
EtOAc	1.0	1.0212	1.0219	1.0208	1.0213	0.9554	6.5557	434.12
n-BuOH	1.0	0.9683	0.9678	0.9688	0.9683	0.9024	6.1957	410.28
H ₂ O	1.0	1.0239	1.0234	1.0241	1.0238	0.9579	6.5726	435.24

Tabela 8.126.

TP3	Konc. ekstrakta [%]	A_1	A_2	A_3	\bar{A}	$A_{\text{konačno}}$	Očitana konc. [µg/ml]	mg ekv. ask. kis./g s.e.
MeOH	1.0	0.873	0.8725	0.8726	0.8727	0.8068	5.5464	367.28
Et ₂ O	1.0	0.6753	0.6750	0.6758	0.6754	0.6095	4.2060	278.52
CHCl ₃	1.0	0.5526	0.5529	0.5519	0.5525	0.4866	3.3713	223.25
EtOAc	1.0	0.9647	0.9641	0.9642	0.9643	0.8984	6.1687	408.49
n-BuOH	1.0	0.7506	0.7513	0.7511	0.7510	0.6851	4.7198	312.54
H ₂ O	1.0	0.8971	0.8965	0.8971	0.8969	0.8310	5.7107	378.16

8.2.11. Neutralizacija DPPH[•]- etarska ulja

(Tabele 8.127.-8.129.)

Tabela 8.127.

TP ₁					
Radna konc. [mg/ml]	A ₁	A ₂	A ₃	\bar{A}	RSC [%]
125.00	0.3644	0.3569	0.3578	0.3597±0.0041	58.55
62.50	0.4451	0.4543	0.4490	0.4495±0.0046	48.20
25.00	0.5171	0.5132	0.5178	0.5160±0.0025	40.53
12.50	0.5874	0.5781	0.5859	0.5838±0.0050	32.72
6.25	0.6546	0.6532	0.6530	0.6536±0.0009	24.67
2.50	0.7332	0.7373	0.7352	0.7352±0.0021	15.27
Kontrola	0.8618	0.8518	0.8896	0.8677±0.0196	

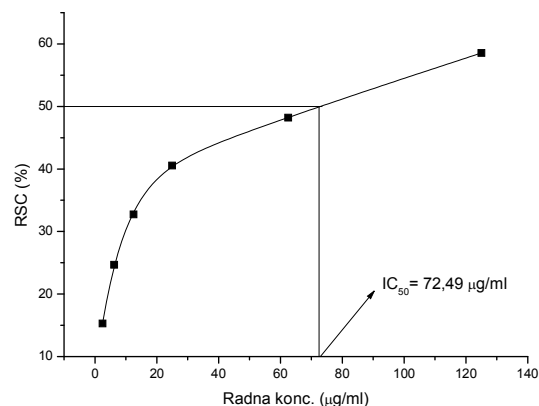


Tabela 8.128.

TP ₂					
Radna konc. [mg/ml]	A ₁	A ₂	A ₃	\bar{A}	RSC [%]
125.00	0.2319	0.2329	0.2319	0.2322±0.0006	73.24
62.50	0.2478	0.2401	0.2440	0.2440±0.0039	71.88
25.00	0.4764	0.4789	0.4745	0.4766±0.0022	45.07
12.50	0.5589	0.5620	0.5535	0.5581±0.0043	35.68
6.25	0.6273	0.6219	0.6721	0.6404±0.0276	26.19
2.50	0.6776	0.6263	0.6645	0.6561±0.0267	24.38
Kontrola	0.8618	0.8518	0.8896	0.8677±0.0196	

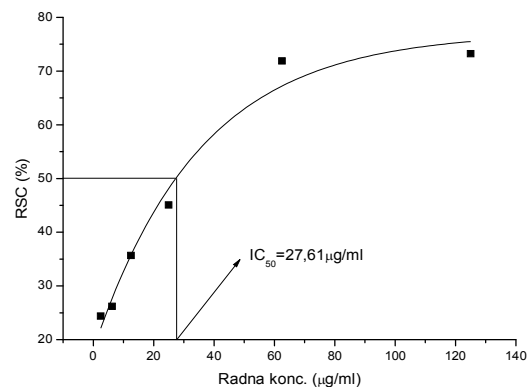
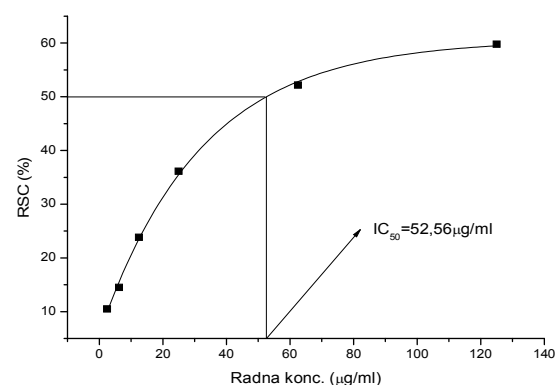


Tabela 8.129

TP ₃					
Radna konc. [mg/ml]	A ₁	A ₂	A ₃	\bar{A}	RSC [%]
125.00	0.3553	0.3423	0.3491	0.3489±0.0065	59.79
62.50	0.4168	0.4102	0.4187	0.4152±0.0045	52.15
25.00	0.5453	0.5417	0.5755	0.5542±0.0186	36.13
12.50	0.6611	0.6638	0.6582	0.6610±0.0028	23.82
6.25	0.7412	0.7432	0.7409	0.7418±0.0013	14.51
2.50	0.7775	0.7723	0.7803	0.7767±0.0041	10.49
Kontrola	0.8618	0.8518	0.8896	0.8677±0.0196	



8.2.12. Neutralizacija OH⁻-etarska ulja

(Tabele 8.130.-8.132.)

Tabela 8.130.

TP ₁					
Radna konc. [mg/ml]	A ₁	A ₂	A ₃	\bar{A}	RSC [%]
100.00	0.1152	0.1112	0.1136	0.1133±0.0142	61.38
50.00	0.1289	0.1241	0.1224	0.1251±0.0126	57.36
20.00	0.1483	0.1438	0.1462	0.1461±0.0063	50.20
10.00	0.1842	0.1801	0.1838	0.1827±0.0231	37.73
5.00	0.2120	0.2177	0.2150	0.2149±0.0083	26.76
2.00	0.2665	0.2622	0.2620	0.2636±0.0111	10.16
Kontrola	0.2905	0.2937	0.2960	0.2934±0.0289	

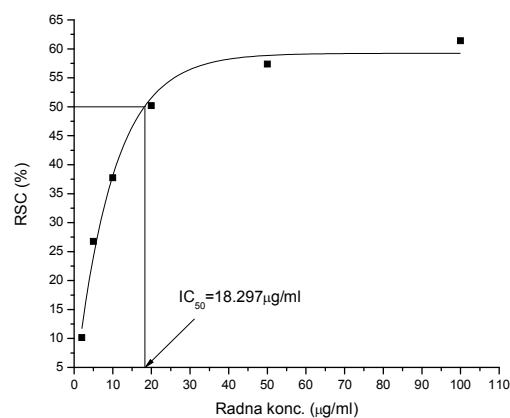


Tabela 8.131.

TP ₂					
Radna konc. [mg/ml]	A ₁	A ₂	A ₃	\bar{A}	RSC [%]
100.00	0.1210	0.1266	0.1294	0.1257±0.0076	57.15
50.00	0.1562	0.1561	0.1524	0.1549±0.0022	47.20
20.00	0.1883	0.1865	0.1879	0.1876±0.0407	36.06
10.00	0.2039	0.2025	0.2097	0.2053±0.0157	30.03
5.00	0.2478	0.2491	0.2416	0.2461±0.0188	16.12
2.00	0.2665	0.2695	0.2698	0.2686±0.0182	8.45
Kontrola	0.2905	0.2937	0.2960	0.2934±0.0289	

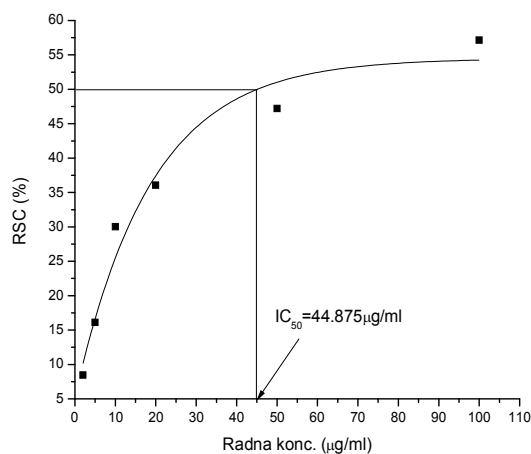
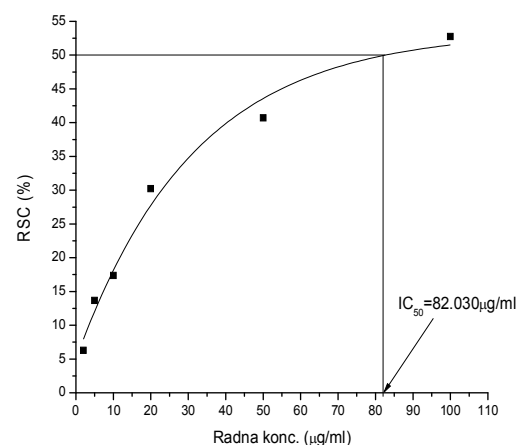


Tabela 8.132.

TP ₃					
Radna konc. [mg/ml]	A ₁	A ₂	A ₃	\bar{A}	RSC [%]
100.00	0.1397	0.1416	0.1346	0.1386±0.0125	52.76
50.00	0.1743	0.1767	0.1710	0.1740±0.0034	40.70
20.00	0.2066	0.2033	0.2042	0.2047±0.0032	30.23
10.00	0.2454	0.2411	0.2409	0.2425±0.0034	17.35
5.00	0.2507	0.2572	0.2521	0.2533±0.0034	13.67
2.00	0.2772	0.2775	0.2703	0.2750±0.0249	6.27
Kontrola	0.2905	0.2937	0.2960	0.2934±0.0289	



8.2.13. Neutralizacija $O_2^{\cdot-}$ -etarska ulja

(Tabele 8.133.-8.135.)

Tabela 8.133.

TP ₁					
Radna konc. [mg/ml]	A ₁	A ₂	A ₃	\bar{A}	RSC [%]
113.65	0.3114	0.3108	0.3199	0.3140±0.0051	63.59
56.82	0.3607	0.3592	0.3594	0.3598±0.0008	58.29
22.73	0.4632	0.4616	0.4613	0.4620±0.0010	46.44
11.36	0.5348	0.5335	0.5338	0.5340±0.0007	38.09
5.68	0.6752	0.6740	0.6733	0.6742±0.0010	21.84
2.27	0.7548	0.7530	0.7514	0.7531±0.0017	12.70
Kontrola	0.8687	0.8593	0.8599	0.8626±0.0053	

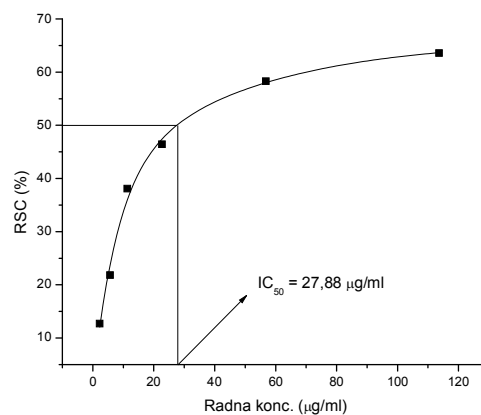


Tabela 8.134.

TP ₂					
Radna konc. [mg/ml]	A ₁	A ₂	A ₃	\bar{A}	RSC [%]
113.65	0.4142	0.4111	0.4123	0.4125±0.0016	52.18
56.82	0.4652	0.4648	0.4640	0.4647±0.0006	46.13
22.73	0.4732	0.4731	0.4724	0.4729±0.0004	45.18
11.36	0.5522	0.5529	0.5524	0.5525±0.0004	35.95
5.68	0.6725	0.6714	0.6716	0.6718±0.0006	22.12
2.27	0.7652	0.7641	0.7646	0.7646±0.0006	11.36
Kontrola	0.8687	0.8593	0.8599	0.8626±0.0053	

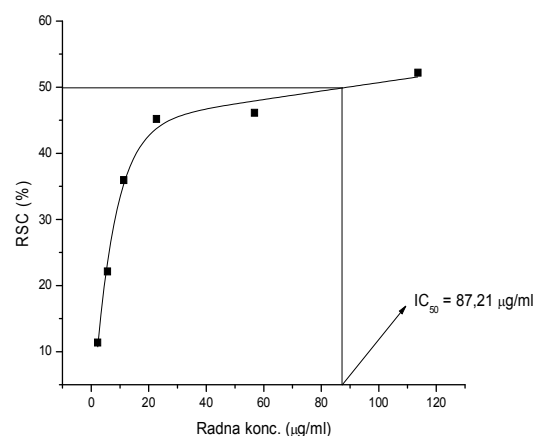
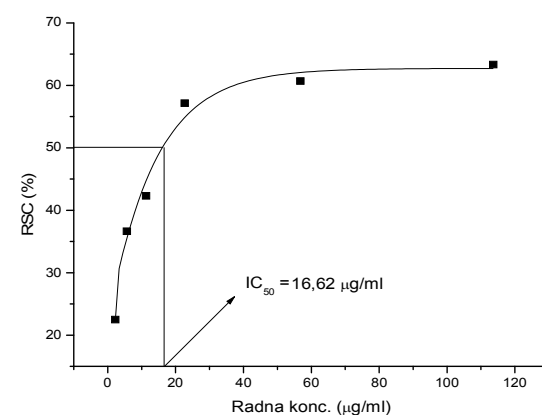


Tabela 8.135.

TP ₃					
Radna konc. [mg/ml]	A ₁	A ₂	A ₃	\bar{A}	RSC [%]
113.65	0.3138	0.3182	0.3171	0.3164±0.0023	63.32
56.82	0.3382	0.3397	0.3397	0.3392±0.0009	60.68
22.73	0.3721	0.3680	0.3692	0.3698±0.0021	57.13
11.36	0.4968	0.4983	0.4981	0.4977±0.0008	42.30
5.68	0.5410	0.5479	0.5508	0.5466±0.0050	36.64
2.27	0.6769	0.6653	0.6642	0.6688±0.0070	22.47
Kontrola	0.8687	0.8593	0.8599	0.8626±0.0053	



8.2.14. Neutralizacija NO[•]-etarska ulja

(Tabele 8.136.-8.138.)

Tabela 8.136.

TP ₁					
Radna konc. [mg/ml]	A ₁	A ₂	A ₃	\bar{A}	RSC [%]
83.25	0.3674	0.3657	0.3326	0.3552±0.0196	62.14
41.62	0.3867	0.3857	0.3733	0.3819±0.0075	59.30
16.65	0.4473	0.4478	0.4512	0.4488±0.0021	52.18
8.32	0.6042	0.6095	0.5951	0.6029±0.0073	35.75
4.16	0.6866	0.6801	0.6812	0.6826±0.0035	27.26
1.66	0.7989	0.7888	0.7737	0.7871±0.0127	16.12
Kontrola	0.9261	0.9301	0.9589	0.9384±0.0179	

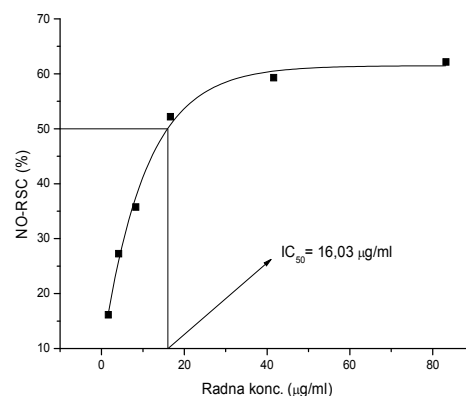


Tabela 8.137.

TP ₂					
Radna konc. [mg/ml]	A ₁	A ₂	A ₃	\bar{A}	RSC [%]
83.25	0.3119	0.3233	0.3247	0.3200±0.0070	65.90
41.62	0.4323	0.4304	0.4323	0.4317±0.0011	54.00
16.65	0.5112	0.5229	0.5180	0.5174±0.0059	44.87
8.32	0.5668	0.5182	0.5611	0.5487±0.0266	41.53
4.16	0.7635	0.7697	0.7815	0.7716±0.0091	17.78
1.66	0.8859	0.8780	0.8756	0.8798±0.0054	6.24

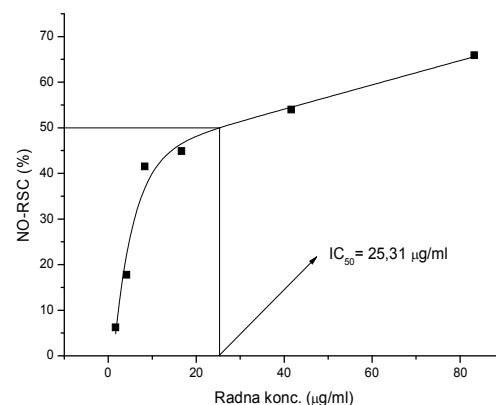
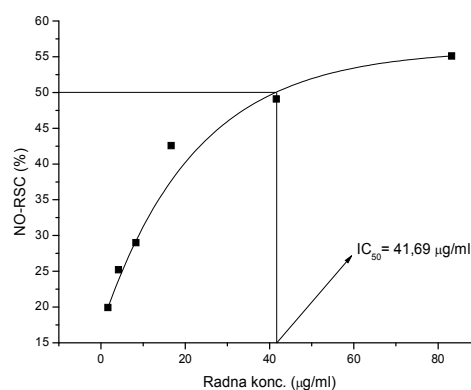


Tabela 8.138.

TP ₃					
Radna konc. [mg/ml]	A ₁	A ₂	A ₃	\bar{A}	RSC [%]
83.25	0.4196	0.4222	0.4219	0.4212±0.0014	55.11
41.62	0.4744	0.4735	0.4857	0.4779±0.0068	49.08
16.65	0.5485	0.5339	0.5347	0.5390±0.0082	42.56
8.32	0.6658	0.6661	0.6670	0.6663±0.0006	29.00
4.16	0.7025	0.7014	0.7018	0.7019±0.0006	25.20
1.66	0.7509	0.7528	0.7506	0.7514±0.0012	19.92
Kontrola	0.9261	0.9301	0.9589	0.9384±0.0179	



8.2.15. Inhibicija lipidne peroksidacije-etarska ulja

(Tabele 8.139.-8.141.)

Tabela 8.139.

TP ₁					
Radna konc. [mg/ml]	A ₁	A ₂	A ₃	\bar{A}	I_{LPx} [%]
10.64	0.0625	0.0709	0.0698	0.0677±0.0046	6.94
5.32	0.0707	0.0929	0.0836	0.0824±0.0111	8.45
2.13	0.0782	0.0908	0.0907	0.0866±0.0073	8.88
1.07	0.0699	0.0754	0.0697	0.0717±0.0033	7.35
0.54	0.0753	0.0751	0.0853	0.0786±0.0058	8.06
0.22	0.0736	0.0787	0.0695	0.0739±0.0046	7.58
Kontrola	0.0799	0.0746	0.0745	0.0763±0.0030	

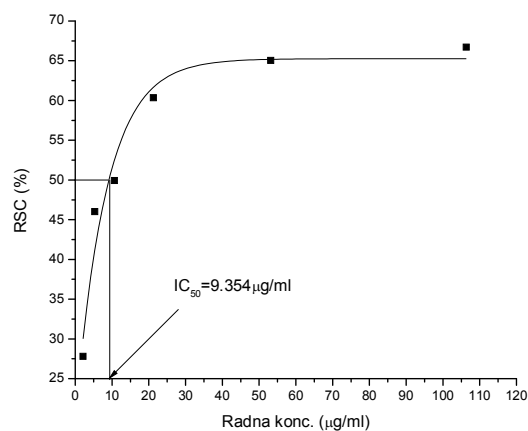


Tabela 8.140.

TP ₂					
Radna konc. [µg/ml]	A ₁	A ₂	A ₃	\bar{A}	I_{LPx} [%]
106.38	0.0667	0.0687	0.0607	0.0654±0.0133	62.90
53.19	0.0706	0.0726	0.0700	0.0711±0.0033	59.67
21.28	0.0824	0.0812	0.0882	0.0840±0.0038	52.35
10.64	0.0976	0.0950	0.0995	0.0974±0.0131	44.75
5.32	0.1275	0.1274	0.1256	0.1268±0.0063	28.08
2.13	0.1533	0.1599	0.1521	0.1551±0.0090	12.02
Kontrola	0.1799	0.1746	0.1745	0.1763±0.0030	

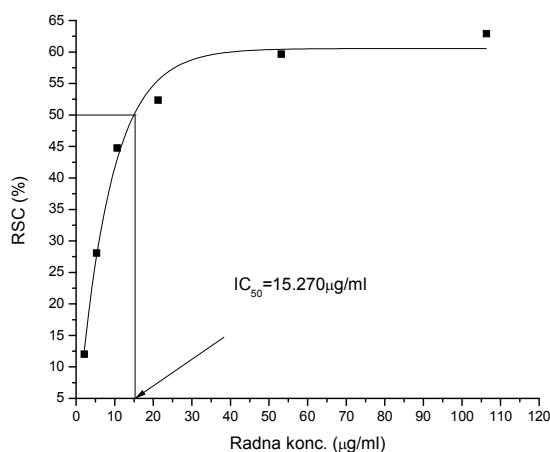
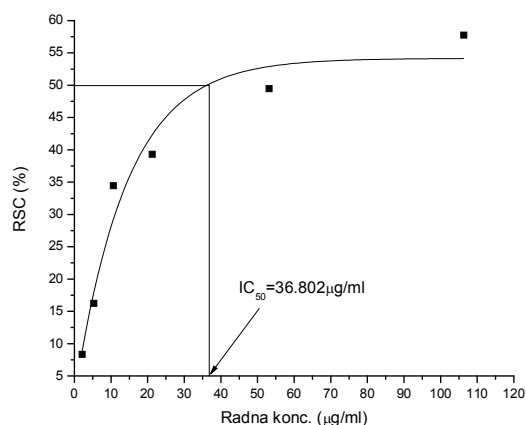


Tabela 8.141.

TP ₃					
Radna konc. [mg/ml]	A ₁	A ₂	A ₃	\bar{A}	I_{LPx} [%]
106.38	0.0751	0.0745	0.0739	0.0745±0.0028	57.74
53.19	0.0865	0.0896	0.0913	0.0891±0.0024	49.46
21.28	0.1075	0.1064	0.1071	0.1070±0.0264	39.31
10.64	0.1143	0.1155	0.1171	0.1156±0.0014	34.43
5.32	0.1470	0.1401	0.1460	0.1477±0.0107	16.22
2.13	0.1595	0.1615	0.1637	0.1616±0.0021	8.34
Kontrola	0.1799	0.1746	0.1745	0.1763±0.0030	



8.2.16. Redukcioni potencijal (FRAP metoda) etarskih ulja

(Tabele 8.142.-8.144.)

Tabela 8.142.

TP ₁							
Radna koncentracija [$\mu\text{g/ml}$]	A_1	A_2	A_3	\bar{A}	$A_{\text{konačno}}$	$\gamma_{\text{očit.}} [\mu\text{g/ml}]$	FRAP
33.33	0.8121	0.8108	0.8181	0.8137	0.8009	7.76	232.71
16.67	0.6347	0.6368	0.6346	0.6354	0.6226	5.98	179.49
3.33	0.3491	0.3475	0.3493	0.3486	0.3358	3.13	93.89

Tabela 8.143.

TP ₂							
Radna koncentracija [$\mu\text{g/ml}$]	A_1	A_2	A_3	\bar{A}	$A_{\text{konačno}}$	$\gamma_{\text{očit.}} [\mu\text{g/ml}]$	FRAP
33.33	0.7925	0.7908	0.7916	0.7916	0.7788	7.54	226.13
16.67	0.5561	0.5558	0.5548	0.5556	0.5428	5.19	155.66
3.33	0.3298	0.3314	0.3316	0.3309	0.3181	2.95	88.61

Tabela 8.144.

TP ₃							
Radna koncentracija [$\mu\text{g/ml}$]	A_1	A_2	A_3	\bar{A}	$A_{\text{konačno}}$	$\gamma_{\text{očit.}} [\mu\text{g/ml}]$	FRAP
33.33	0.7696	0.7668	0.7611	0.7658	0.7530	7.28	218.43
16.67	0.5704	0.5720	0.5713	0.5712	0.5584	5.34	160.34
3.33	0.3316	0.3340	0.3356	0.3337	0.3209	2.98	89.45

8.2.17. Redukcioni potencijal (Yen i Chen metoda) etarskih ulja

(Tabele 8.145.-8.147.)

Tabela 8.145.

TP ₁							
Koncentracija ekstrakta [$\mu\text{g/ml}$]	A_1	A_2	A_3	\bar{A}	$A_{\text{konačno}}$	$\gamma_{\text{očit.}}$ [$\mu\text{g/ml}$]	$\frac{\text{mg}}{\text{ekv. ask. kis}} / \text{g s.e.}$
1.0	0.9176	0.9194	0.9191	0.9187	0.8528	5.85	387.71
0.5	0.4564	0.4543	0.4522	0.4543	0.3884	2.72	180.06

Tabela 8.146.

TP ₂							
Koncentracija ekstrakta [$\mu\text{g/ml}$]	A_1	A_2	A_3	\bar{A}	$A_{\text{konačno}}$	$\gamma_{\text{očit.}}$ [$\mu\text{g/ml}$]	$\frac{\text{mg}}{\text{ekv. ask. kis}} / \text{g s.e.}$
1.0	0.9585	0.9613	0.9611	0.9603	0.8944	6.14	406.31
0.5	0.4675	0.4681	0.4680	0.4679	0.4020	2.81	186.13

Tabela 8.147.

TP ₃							
Koncentracija ekstrakta [$\mu\text{g/ml}$]	A_1	A_2	A_3	\bar{A}	$A_{\text{konačno}}$	$\gamma_{\text{očit.}}$ [$\mu\text{g/ml}$]	$\frac{\text{mg}}{\text{ekv. ask. kis}} / \text{g s.e.}$
1.0	0.8997	0.8981	0.8902	0.8960	0.8301	5.70	377.56
0.5	0.4217	0.4281	0.4288	0.4262	0.3603	2.53	167.50

8.3. HEPATOPROTEKTIVNI EFEKAT

(Tabele 8.148.-8.151.)

Tabela 8.148.

PARAMETAR	Kontrola	Et_2O	$CHCl_3$	$EtOAc$	$n-BuOH$	H_2O
GSHPx	5.18 ± 0.26	4.48 ± 0.19	4.38 ± 0.21	3.64 ± 0.25	4.29 ± 0.16	4.31 ± 0.25
GSH	4.17 ± 0.21	3.54 ± 0.19	3.17 ± 0.17	2.41 ± 0.15	2.91 ± 0.26	3.81 ± 0.23
GSHR	6.16 ± 0.28	5.67 ± 0.24	5.41 ± 0.26	6.78 ± 0.17	5.93 ± 0.19	5.71 ± 0.22
Px	5.81 ± 0.23	5.58 ± 0.18	5.89 ± 0.21	6.17 ± 0.16	6.02 ± 0.24	6.65 ± 0.25
LPx	7.24 ± 0.28	6.56 ± 0.91	6.95 ± 0.16	5.34 ± 0.23	6.41 ± 0.23	6.19 ± 0.22
CAT	5.11 ± 0.19	4.78 ± 0.19	5.18 ± 0.11	6.08 ± 0.25	5.78 ± 0.23	5.86 ± 0.27
XOD	6.32 ± 0.27	6.03 ± 0.14	6.17 ± 0.26	5.38 ± 0.28	5.43 ± 0.21	5.12 ± 0.28

Tabela 8.149.

PARAMETAR	Kontrola	Et_2O + CCl_4	$CHCl_3$ + CCl_4	$EtOAc$ + CCl_4	$n-BuOH$ + CCl_4	H_2O + CCl_4
GSHPx	4.41 ± 0.27	3.65 ± 0.21	3.41 ± 0.18	3.77 ± 0.30	3.61 ± 0.22	3.73 ± 0.18
GSH	3.81 ± 0.17	3.68 ± 0.18	3.41 ± 0.19	3.71 ± 0.23	3.02 ± 0.17	3.59 ± 0.21
GSHR	5.17 ± 0.21	5.21 ± 0.28	4.16 ± 0.22	4.31 ± 0.24	5.26 ± 0.17	4.67 ± 0.18
Px	4.47 ± 0.18	3.98 ± 0.16	4.15 ± 0.15	4.86 ± 0.28	4.61 ± 0.23	4.78 ± 0.25
LPx	8.48 ± 0.26	8.13 ± 0.24	7.87 ± 0.19	6.46 ± 0.19	6.93 ± 0.28	6.97 ± 0.27
CAT	4.48 ± 0.17	3.76 ± 0.25	3.77 ± 0.25	4.68 ± 0.22	4.88 ± 0.21	4.54 ± 0.18
XOD	8.56 ± 0.28	8.89 ± 0.27	8.78 ± 0.25	8.04 ± 0.19	7.95 ± 0.18	8.13 ± 0.23

Tabela 8.150.

PARAMETAR	Kontrola	Et_2O	$CHCl_3$	$EtOAc$	$n-BuOH$	H_2O
GSHPx	8.57 ± 0.24	7.31 ± 0.26	7.14 ± 0.19	7.87 ± 0.21	7.77 ± 0.25	7.51 ± 0.23
GSH	6.17 ± 0.17	5.32 ± 0.19	5.13 ± 0.16	5.64 ± 0.28	5.53 ± 0.23	5.37 ± 0.17
GSHR	6.64 ± 0.18	6.81 ± 0.19	6.92 ± 0.25	7.51 ± 0.23	7.34 ± 0.19	7.15 ± 0.18
Px	3.27 ± 0.19	2.54 ± 0.23	2.79 ± 0.28	3.14 ± 0.19	2.48 ± 0.25	2.63 ± 0.20
LPx	7.81 ± 0.29	7.46 ± 0.27	6.59 ± 0.31	6.08 ± 0.23	6.64 ± 0.33	5.98 ± 0.26
CAT	5.37 ± 0.27	5.87 ± 0.24	5.66 ± 0.29	6.14 ± 0.18	6.05 ± 0.11	5.72 ± 0.22
XOD	6.15 ± 0.29	6.62 ± 0.29	6.44 ± 0.17	5.13 ± 0.14	5.21 ± 0.28	5.88 ± 0.26

Tabela 8.151

PARAMETAR	Kontrola	Et_2O + CCl_4	$CHCl_3$ + CCl_4	$EtOAc$ + CCl_4	$n-BuOH$ + CCl_4	H_2O + CCl_4
GSHPx	7.10 ± 0.23	6.03 ± 0.21	5.48 ± 0.29	6.41 ± 0.25	6.88 ± 0.27	6.11 ± 0.26
GSH	4.84 ± 0.27	3.26 ± 0.23	3.87 ± 0.20	4.27 ± 0.22	4.05 ± 0.16	4.34 ± 0.21
GSHR	5.31 ± 0.32	4.26 ± 0.28	4.79 ± 0.34	4.67 ± 0.17	4.88 ± 0.34	4.69 ± 0.31
Px	2.19 ± 0.21	1.84 ± 0.26	1.70 ± 0.18	1.36 ± 0.13^a	1.66 ± 0.18	1.90 ± 0.21
LPx	9.23 ± 0.25	9.86 ± 0.27	9.91 ± 0.30	8.15 ± 0.26	8.28 ± 0.20	7.86 ± 0.19
CAT	4.82 ± 0.18	4.27 ± 0.23	3.76 ± 0.25	4.11 ± 0.16	4.01 ± 0.14	4.61 ± 0.24
XOD	8.21 ± 0.35	8.94 ± 0.27	8.75 ± 0.28	7.13 ± 0.18	7.93 ± 0.17	7.38 ± 0.26

8.4. ESTROGENA, ANTIESTROGENA I CITOTOKSIČNA AKTIVNOST EKSTRAKATA *T. PRATENSE*

(Tabele 8.152.-8.154.)

Tabela 8.152. Estrogena aktivnost etanolnih i etilacetatnih ekstrakata *T.pratense*

Uzorak	% Indukcije AF
Slepa proba	0.15±0.20
DMSO	-0.07±0.12
*E2 (0.5 nm)	78.39±18.30
**4-OH-Tam(5 µM)	9.44±1.27
TP _{kontrola} (2 µg/ml)	43.07±6.03
TP1 _{EtOH} (20 µg /ml)	48.91±1.44
TP2 _{EtOH} (20 µg /ml)	47.17±3.76
TP3 _{EtOH} (20 µg /ml)	40.42±1.82
TP1 _{EtOAc} (20 µg /ml)	55.32±5.97
TP2 _{EtOAc} (20 µg ug/ml)	54.61±2.57
TP3 _{EtOAc} (20 µg /ml)	50.96±0.61

Tabela 8.153. Antiestrogena aktivnost etanolnih i etilacetatnih ekstrakata *T.pratense*

Uzorak	%Indukcije AF
Slepa proba	100±0.12
DMSO	0±10.39
*E2 (0.5 nm)	7±16.78
**4-OH-Tam(5 µM)	87.51±1.13
TP _{kontrola} (2 µg /ml)	3.36±9.82
TP1 _{EtOH} (20 µg /ml)	-21.64±12.69
TP2 _{EtOH} (20 µg /ml)	2.03±13.97
TP3 _{EtOH} (20 µg /ml)	9.95±12.07
TP1 _{EtOAc} (20 µg /ml)	-7.32±10.62
TP2 _{EtOAc} (20 µg /ml)	7.06±8.59
TP3 _{EtOAc} (20 µg /ml)	16.72±2.92

Tabela 8.154. Citotoksičnost etanolnih i etilacetatnih ekstrakata *T.pratense*

Uzorak	% Citotoksičnosti
Slepa proba	6.14±5.59
DMSO	-2.57±1.25
*E2 (0.5 nm)	10.01±2.85
**4-OH-Tam (µM)	4.16±2.32
TP _{kontrola} (2 µg /ml)	6.64±4.40
TP1 _{EtOH} (20 µg /ml)	17.45±6.24
TP2 _{EtOH} (20 µg /ml)	9.7±2.39
TP3 _{EtOH} (20 µg /ml)	4.75±0.77
TP1 _{EtOAc} (20 µg /ml)	15.10±3.03
TP2 _{EtOAc} (20 µg /ml)	3.45±0.96
TP3 _{EtOAc} (20 µg /ml)	4.88±5.47

*-estradiol

**- 4-OH-Tamoksifen

8.4. ANTIMIKROBNA AKTIVNOST ETARSKIH ULJA I EKSTRAKATA *T. PRATENSE*Tabela 8.155. Antimikrobna aktivnost etarskih ulja *T.pratense* disk difuzionom metodom

Zona inhibicije			
Bakterijski soj	TP1	TP2	TP3
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i>	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-
<i>Micrococcus luteus</i>	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-

- - odsustvo zone inhibicije

Tabela 8.156. Antimikrobna aktivnost etanolnih ekstrakata *T.pratense* disk difuzionom metodom

Zona inhibicije			
Bakterijski soj	TP1	TP2	TP3
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i>	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-
<i>Micrococcus luteus</i>	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-

- -odsustvo zone inhibicije

Tabela 8.157. Antimikrobna aktivnost etilacetatnih ekstrakata *T.pratense* disk difuzionom metodom

Zona inhibicije			
Bakterijski soj	TP1	TP2	TP3
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i>	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-
<i>Micrococcus luteus</i>	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-

- -odsustvo zone inhibicije

**UNIVERZITET U NOVOM SADU
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET**

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada (dipl., mag., dokt.): VR	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora: AU	Sanja S. Vlaisavljević
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): MN	dr Biljana Kaurinović, docent Prirodno- matematičkog fakulteta, Univerziteta u Novom Sadu
Naslov rada: NR	Hemijska, biohemijska i mikrobiološka karakterizacija <i>Trifolium pratense</i> L.
Jezik publikacije: JP	Srpski (latinica)
Jezik izvoda: JI	Srpski / Engleski
Zemlja publikovanja: ZP	Republika Srbija
Uže geografsko područje: UGP	Vojvodina
Godina: GO	2014.
Izdavač: IZ	Autorski reprint
Mesto i adresa: MA	Novi Sad; Trg Dositeja Obradovića 3, 21000 Novi Sad, Republika Srbija

Fizički opis rada: Broj poglavlja: 8; Stranica: 203; Lit.citata: 311
FO Slika: 34; Tabela: 170; Grafika: 130;
Histograma: 30

Naučna oblast: Biohemija
NO

Naučna disciplina: Biohemija lekovitog bilja
ND

Predmetna odrednica, ključne reči: *Trifolium pratense* L., slobodnoradikalske vrste,
PO sekundarni metaboliti, antioksidantna aktivnost,
hepatoprotektivni efekat, LC-MS-MS, GC-MS,
estrogena aktivnost, antimikrobna aktivnost

UDK

Čuva se: Biblioteka Departmana za hemiju, biohemiju i
ČU zaštitu životne sredine, Prirodno-matematički
fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Trg
Dositeja Obradovića 3, 21000 Novi Sad,
Republika Srbija

Važna napomena:

VN

Izvod: Hemijska karakterizacija ekstrakata *T. pratense*
IZ L. određena je LC-MS-MS, a etarskih ulja GC-
MS analizom, pri čemu je identifikovano više
bioaktivnih jedinjenja. Spektrofotometrijskim
metodama ispitan je antioksidantni potencijal
ekstrakata i etarskih ulja. Hepatoprotektivni
efekat određen je na homogenatu i hemolizatu
jetre laboratorijskih miševa. Budući da ova
biljka ima visok sadržaj izoflavona, određena je
estrogena, antiestrogena aktivnost, kao i
citotoksičnost ekstrakata. Antimikrobna
aktivnost ekstrakata i etarskih ulja ispitana je
na šest bakterijskih sojeva. Ekstrakti i etarska
ulja su bili umereno aktivni u pogledu bioloških
aktivnosti, osim u slučaju antimikrobne
aktivnosti koju nije pokazao nijedan ispitivani
uzorak.

Datum prihvatanja teme od strane 22.05.2013.
NN veća:

DP

Datum odbrane:

DO

Članovi komisije:
(Naučni stepen/ime i
prezime/zvanje/fakultet)
KO

Predsednik: dr Neda Mimica-Dukić, redovni profesor
Prirodno-matematičkog fakulteta, Univerziteta
u Novom Sadu

Član: dr Mira Popović, redovni profesor Prirodno-
matematičkog fakulteta, Univerziteta u Novom
Sadu

Član: dr Milan Popović, redovni profesor Prirodno-
matematičkog fakulteta, Univerziteta u Novom
Sadu

Član: dr Dragoljub Cvetković, docent Tehnološkog
fakulteta u Novom Sadu

**UNIVERSITY OF NOVI SAD
FACULTY OF SCIENCES**

KEY WORD DOCUMENTATION

Accession number:
ANO

Identification number:
INO

Document type: Monograph documentation
DT

Type of record: Textual printed material
TR

Contents code: PhD Thesis
CC

Author: Sanja S. Vlasisavljević
AU

Mentor: Assistant Professor Biljana Kaurinović, PhD,
MN Faculty of Sciences, University of Novi Sad

Title: Chemical, biochemical and microbiological
TI characterization of *Trifolium pratense* L.

Language of text: Serbian (Latin)
LT

Language of abstract: English / Serbian
LA

Country of publication: Republic of Serbia
CP

Locality of publication: Vojvodina
LP

Publication year: 2014.
PY

Publisher: Author's reprint
PU

Publication place: Trg Dositeja Obradovića 3, 21000 Novi Sad,
PP Republic of Serbia

Physical description: Chapters: 8; Pages: 203; References: 311;
PD Pictures: 34; Tables: 170; Figures: 130; Charts:
30

Scientific field Biochemistry
SF

Scientific discipline Biochemistry of Medical Plants
SD

Subject, Key words *Trifolium pratense* L., free radical species,
SKW secondary metabolites, antioxidant activity,
hepatoprotective effect, LC-MS-MS, GC-MS,
estrogenic activity, antimicrobial activity

UC

Holding data: Library of Department of Chemistry,
HD Biochemistry and Environmental Protection,
Faculty of Sciences, University of Novi Sad,
Trg Dositeja Obradovića 3, 21000 Novi Sad,
Republic of Serbia

Note: -
N

Abstract: The chemical characterization of *T. pratense*
AB extracts was determined by LC-MS-MS, and the
essential oils of the GC-MS analysis, wherein
the various bioactive compounds were
identified. Antioxidant potential of extracts and
essential oils was tested by spectrophotometric
methods. Hepatoprotective effect was
determined in haemolysate and liver
homogenate of laboratory mice. Estrogen,
antiestrogen activity, as well as the cytotoxicity
of the extracts were determined due to the high
content of isoflavones. Antimicrobial activity of
extracts and essential oils was investigated on
six bacterial strains. Essential oils and extracts
were moderately active in terms of biological
activity, except in the case of antimicrobial
activity where none of the extracts were active
against tested bacterial strains.

Accepted on Scientific Board on: 22.05.2013.
AS

Defended: DE

Thesis Defend Board: DB

President: Professor Neda Mimica-Dukić, PhD, Faculty of
Sciences, University of Novi Sad

Member:

Professor Mira Popović, PhD, Faculty of
Sciences, University of Novi Sad

Member:

Professor Milan Popović, PhD, Faculty of
Agriculture, University of Novi Sad

Member:

Assistant Professor Dragoljub Cvetković, PhD,
Faculty of Technology, University of Novi Sad

BIOGRAFIJA



Sanja Vlasisavljević je rođena 15.08.1983. godine u Zagrebu. Osnovnu školu, “Kosta Trifković” i Gimnaziju “Isidora Sekulić”, završila je u Novom Sadu. Diplomске akademske studije upisala je 2002. godine na Prirodno-matematičkom fakultetu, smer diplomirani hemičar-biohemija, u Novom Sadu, a iste završila 2007. godine. Doktorske akademske studije, odsek hemija, smer doktor biohemijskih nauka, na Prirodno-matematičkom fakultetu u Novom Sadu, upisala je 2008. godine, a od tada učestvuje i u realizaciji naučnih projekata u zvanju istraživača-pripravnika, odnosno istraživača-saradnika. Angažovana je bila u radu istraživačkog tima u okviru projekta *Struktura i funkcija redoks i hidrolitičkih enzima: Istraživanje njihovog mehanizma dejstva i nekih aspekata njihove primene u biotehnologiji i medicini* (2006-2010), Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije, zatim na projektu *Testiranje neurotoksikanata vezanih za neurodegenerativne promjene na morskim beskičmenjacima i kičmenjacima* (2008-2011), Ministarstva prosvjete i nauke Republike Crne Gore u saradnji sa Ruskom akademijom nauka i Institutom za biologiju razvića ”Kaljcov” u Moskvi, kao i u realizaciji projekta *Biološki aktivni prirodni proizvodi kao potencijalni izvori novih lekova i dijetetskih suplemenata* (2011-2014), Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije.

Na Katedri za biohemiju i hemiju prirodnih proizvoda, Departmana za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine, Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu, angažovana je u izvođenju praktične nastave i radu sa studentima.

Autor je jednog i koautor šest radova objavljenih u međunarodnim časopisima, kao i autor, odnosno koautor dva saopštenja nacionalnog i osam saopštenja međunarodnog karaktera.

Član je Srpskog hemijskog društva i Društva za proučavanje lekovitog bilja i prirodnih proizvoda - Society for Medicinal Plant and Natural Product Research.