



UNIVERZITET U NIŠU  
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
DEPARTMAN ZA HEMIJU



**Marija D. Ilić**

**Hemijski sastav, antioksidativna, antimikrobna i  
antiholinesterazna aktivnost biljnih vrsta *Seseli  
rigidum* i *Seseli pallasii***

DOKTORSKA DISERTACIJA

Niš, 2016.



UNIVERZITET U NIŠU  
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
DEPARTMAN ZA HEMIJU



**Marija D. Ilić**

**Hemijski sastav, antioksidativna, antimikrobna i antiholinesterazna aktivnost biljnih vrsta *Seseli rigidum* i *Seseli pallasii***

DOKTORSKA DISERTACIJA

Текст ове докторске дисертације ставља се на увид јавности, у складу са чланом 30., став 8. Закона о високом образовању ("Сл. гласник РС", бр. 76/2005, 100/2007 – аутентично тумачење, 97/2008, 44/2010, 93/2012, 89/2013 и 99/2014)

**НАПОМЕНА О АУТОРСКИМ ПРАВИМА:**

Овај текст сматра се рукописом и само се саопштава јавности (члан 7. Закона о ауторским и сродним правима, "Сл. гласник РС", бр. 104/2009, 99/2011 и 119/2012).

**Ниједан део ове докторске дисертације не сме се користити ни у какве сврхе, осим за упознавање са њеним садржајем пре одбране дисертације.**

Niš, 2016.



UNIVERSITY OF NIŠ  
FACULTY OF SCIENCE AND MATHEMATICS  
DEPARTMENT OF CHEMISTRY



**Marija D. Ilić**

**Chemical composition, antioxidant, antimicrobial  
and anticholinesterase activity of plant species *Seseli  
rigidum* and *Seseli pallasii***

DOCTORAL DISERTATION

Niš, 2016.

## Подаци о докторској дисертацији

Ментор: др Весна Станков-Јовановић, редовни професор, Природно-математичког факултета, Универзитета у Нишу

Наслов: Хемијски састав, антиоксидативна, антимикуробна и антихолинестераза активност биљних врста *Seseli rigidum* и *Seseli pallasii*

Резиме: Анализиран је хемијски састав етарских уља, екстраката различите поларности, као и минерални састав биљака *S. rigidum* и *S. pallasii*. За брзу анализу испарљивих једињења надземног дела биљке *S. rigidum*, плода и корена *S. pallasii* може се користити техника HS/GC-MS, док је у свим осталим случајевима потребно изоловање етарског уља и примена GC-MS технике. Анализом главних компонента (PCA) и хијерархијском кластер анализом (HCA) је урађено груписање узорака на основу сличности хемијског састава појединих делова биљака (лист, цвет, плод и корен). PCA и HCA анализом су се издвојиле варијабле па основу доминантних компонената. Испитиване су биолошке активности особине етарских уља и екстраката различите поларности вегетативних делова обе биљке. Антиоксидативне особине су испитиване применом метода ABTS, DPPH, укупна редукциона моћ, укупни флавоноиди и укупни феноли. Према ABTS методи најбоље деловање имају хексански екстракти обе испитиване биљне врсте, према DPPH методи ацетонски екстракт цвета *S. rigidum* док највећу укупну редукциону моћ има метанолни екстракт листа *S. rigidum*. Највећи укупни садржај фенола и флавоноида имају хексански екстракти корена и листа *S. pallasii*. Обе примењене методе статистичке анализе (PCA и HCA) у којима су као варијабле коришћени резултати испитивања антиоксидативне активности јасно издвајају DPPH методу од осталих метода, и издвајају испитиване узорке према врсти (уља и екстракти), и према врсти коришћених растварача у поступку припреме екстраката. Одређивање антимикуробне активности етарских уља и екстраката на различите сојеве Gram (+) i Gram (-) бактерија применом микродилуционе методе, показало је да етарско уље корена *S. rigidum* има најизраженије деловање. У погледу инхибиције ензима холинестеразе, одређиване применом Елманове методе, највећи степен инхибиције је забележен за метанолни екстракт корена *S. pallasii*. Укупно, најбоље особине у погледу тестираних активности су показали секундарни метаболити корена *S. rigidum*, те је због тога извршена идентификација главних компонената овог екстракта, применом метода течне хроматографије у комбинацији са масеном

спектрометријом високе резолуције. Поуздано је утврђено присуство тридесет једињења, од којих већина има кумаринску структуру. У сваком од вегетативних делова обе биљке одређен је садржај макро- и микроелемената као и тешких метала и утврђено је да њихов садржај не премашује дозвољене вредности. Резултати добијени коришћењем обе методе мултиваријантне статистике су у сагласности и издвајају поједине делове испитиваних биљака на основу највишег садржаја микро-, макроелемента или тешког метала.

Научна област:  
Научна  
дисциплина:

Хемија

Аналитичка хемија

Кључне речи:

*Seseli rigidum*, *Seseli pallasii*, етарска уља, екстракти, гасна хроматографија, течна хроматографија, масена спектрометрија, спектрометрија купловане плазме, антиоксидативна активност, антимикуробна активност, антихолинестеразна активност, микроелементи, макроелементи, тешки метали, анализа главне компоненте, кластер анализа

УДК:

582.794.1 : 581.192  
582.794.1 : 579.66  
582.794.1 : 615.217.3

CERIF  
класификација:

P 003 и P 300 Хемија и Аналитичка хемија

Тип лиценце  
Креативне  
заједнице:

**CC BY-NC-ND**

## Data on Doctoral Dissertation

Doctoral  
Supervisor:

Vesna Stankovic-Jovanović Ph.D., full professor, Faculty of Science and Mathematics, University of Nis

Title:

Chemical composition, antioxidant, antimicrobial and anticholinesterase activity of plant species *Seseli rigidum* and *Seseli pallasii*

Abstract:

The chemical composition of essential oils, extracts of different polarity, and mineral composition of plants *Seseli rigidum* and *Seseli pallasii* were analysed. For rapid analysis of volatiles of *S. rigidum* above ground parts, and *S. pallasii* fruits and roots volatiles, HS/GC-MS technique may be used, while in all other cases is necessary to isolate essential oils and apply GC-MS technique. According to principle component analysis (PCA) and hierarchical cluster analysis (HCA) a groupings of the samples were done, based on the similarity of the chemical composition of certain plant parts (leaf, flower, fruit and roots). The variables based on the dominant components were grouped using PCA and HCA analysis. Biological activities and characteristics of essential oils, extracts of different polarity of vegetative parts of both plants were investigated. Antioxidant properties were tested using ABTS, DPPH, total reducing power methods, total flavonoids and total phenols content. According to the ABTS and DPPH methods, the best properties were manifested by hexane extracts of both tested plant species, and flower acetone extract of *S. rigidum*, respectively, while the highest total reducing capacity had the methanol extracts of *S. rigidum*. The highest total phenols and flavonoids were registered for hexane extracts of root and leaf of *S. pallasii*. Both applied methods of statistical analyses (PCA and HCA) in which the results of antioxidant activities were used as variables, clearly distinguished DPPH method from other methods, and tested samples were separated by type (oils and extracts), and according to the type of solvent used in the preparation of extracts. Determination of antimicrobial activity of essential oils and extracts versus different strains of Gram (+) and Gram (-) bacteria, using the microdilution method, showed that the root essential oil of *S. rigidum* had the most pronounced effect. In terms of inhibition of enzyme cholinesterase, estimated using Elman's method, the highest degree of inhibition was recorded for the root methanol extract of *S. pallasii*. Overall, the best characteristics among tested activities, showed secondary metabolites of *S. rigidum* root, and therefore identification of main components of the extract using liquid chromatography

combined with high resolution mass spectrometry was performed. Reliably was established presence of thirty compounds, most of which with coumarin structure. In each of the vegetative parts of both plants content of macro-, microelements and heavy metals were determined and found that their content does not exceed the permissible values. Results obtained using two methods of multivariate statistics are in accordance and grouped certain plants' parts based on the highest content of micro, macroelements or heavy metals.

Scientific  
Field:  
Scientific  
Discipline:

Chemistry

Analytical chemistry

Key Words:

*Seseli rigidum*, *Seseli pallasii*, essential oils, extracts, gas chromatography, liquid chromatography, mass spectrometry, inductively coupled plasma spectrometry, antioxidant activity, antimicrobial activity, anticholinesterase activity, microelements, macroelemets, heavy metals, principle component analysis, cluster analysis

UDC:

582.794.1 : 581.192  
582.794.1 : 579.66  
582.794.1 : 615.217.3

CERIF  
Classification:

P 003 and P 300 Chemistry and Analytical chemistry

Creative  
Commons  
License Type:

**CC BY-NC-ND**


**ПРИРОДНО - МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ**
**НИШ**
**КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАЦИЈА**

Редни број, <b>РБР</b> :	
Идентификациони број, <b>ИБР</b> :	
Тип документације, <b>ТД</b> :	монографска
Тип записа, <b>ТЗ</b> :	текстуални / графички
Врста рада, <b>ВР</b> :	докторска дисертација
Аутор, <b>АУ</b> :	Марија Д. Илић
Ментор, <b>МН</b> :	Весна П. Станков-Јовановић
Наслов рада, <b>НР</b> :	<b>Хемијски састав, антиоксидативна, антимикробна и антихолинестераза активност биљних врста <i>Seseli rigidum</i> и <i>Seseli pallasii</i></b>
Језик публикације, <b>ЈП</b> :	Српски
Језик извода, <b>ЈИ</b> :	Енглески
Земља публикавања, <b>ЗП</b> :	Србија
Уже географско подручје, <b>УГП</b> :	Србија
Година, <b>ГО</b> :	2016
Издавач, <b>ИЗ</b> :	ауторски репринт
Место и адреса, <b>МА</b> :	Ниш, Вишеградска 33.
Физички опис рада, <b>ФО</b> : (поглавља/страна/ цитата/табела/слика/графика/прилога)	9 поглавља, 200 страна, 292 цитата, 36 табела, 36 слика, 2 прилога
Научна област, <b>НО</b> :	Хемија
Научна дисциплина, <b>НД</b> :	Аналитичка хемија
Предметна одредница/Кључне речи, <b>ПО</b> :	<i>Seseli rigidum</i> , <i>Seseli pallasii</i> , етарска уља, екстракти, гасна хроматографија, течна хроматографија, масена спектрометрија, спектрометрија купловане плазме, антиоксидативна активност, антимикробна активност, антихолинестеразна активност, микроелементи, макроелементи, тешки метали, анализа главне компоненте, кластер анализа
<b>УДК</b>	582.794.1 : 581.192 582.794.1 : 579.66 582.794.1 : 615.217.3
Чува се, <b>ЧУ</b> :	Библиотека
Важна напомена, <b>ВН</b> :	Истраживање докторске дисертације је финансирано од стране Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије, у оквиру пројекта "Природни производи биљака и лишјајева: изоловање, идентификација, биолошка активност и примена" (евиденциони број 172047) и Развој нових и побољшање постојећих електрохемијских, пектроскопских и проточних (ФИА) метода за праћење квалитета животне средине (евиденциони број 172051)



**Извод, ИЗ:** Анализиран је хемијски састав етарских уља, екстракта различите поларности, као и минерални састав биљака *S. rigidum* и *S. pallasii*. За брзу анализу испарљивих једињења надземног дела биљке *S. rigidum*, плода и корена *S. pallasii* може се користити техника HS/GC-MS, док је у свим осталим случајевима потребно изоловање етарског уља и примена GC-MS технике. Анализом главних компонента (PCA) и хијерархијском кластер анализом (HCA) је урађено груписање узорака на основу сличности хемијског састава појединих делова биљака (лист, цвет, плод и корен). PCA и HCA анализом су се издвојиле варијабле па основу доминантних компонента. Испитиване су биолошке активности особине етарских уља и екстракта различите поларности вегетативних делова обе биљке. Антиоксидативне особине су испитиване применом метода ABTS, DPPH, укупна редукциона моћ, укупни флавоноиди и укупни феноли. Према ABTS методи најбоље деловање имају хексански екстракти обе испитиване биљне врсте, према DPPH методи ацетонски екстракт цвета *S. rigidum* док највећу укупну редукциону моћ има метанолни екстракт листа *S. rigidum*. Највећи укупни садржај фенола и флавоноида имају хексански екстракти корена и листа *S. pallasii*. Обе примењене методе статистичке анализе (PCA и HCA) у којима су као варијабле коришћени резултати испитивања антиоксидативне активности јасно издвајају DPPH методу од осталих метода, и издвајају испитиване узорке према врсти (уља и екстракти), и према врсти коришћених растварача у поступку припреме екстракта. Одређивање антимикуробне активности етарских уља и екстракта на различите сојеве Gram (+) i Gram (-) бактерија применом микродилуционе методе, показало је да етарско уље корена *S. rigidum* има најизраженије деловање. У погледу инхибиције ензима холинестеразе, одређиване применом Елманове методе, највећи степен инхибиције је забележен за метанолни екстракт корена *S. pallasii*. Укупно, најбоље особине у погледу тестираних активности су показали секундарни метаболити корена *S. rigidum*, те је због тога извршена идентификација главних компонента овог екстракта, применом методе течне хроматографије у комбинацији са масеном спектрометријом високе резолуције. Поуздано је утврђено присуство тридесет једињења, од којих већина има кумаринску структуру. У сваком од вегетативних делова обе биљке одређен је садржај макро- и микроелемената као и тешких метала и утврђено је да њихов садржај не премашује дозвољене вредности. Резултати добијени коришћењем обе методе мултиваријантне статистике су у сагласности и издвајају поједине делове испитиваних биљака на основу највишег садржаја микро-, макроелемента или тешког метала.

Датум прихватања теме, ДП:	10.03.2015.
Датум одбране, ДО:	}
Чланови комисије, КО:	
Председник:	Виолета Д. Митић
Члан:	Олга П. Јовановић
Члан:	Гордана С. Стојновић
Члан:	Снежана Д. Николић-Мандић
Члан, ментор:	Весна П. Станов-Јовановић



## ПРИРОДНО - МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ

НИШ

## KEY WORDS DOCUMENTATION

Accession number, <b>ANO</b> :	
Identification number, <b>INO</b> :	
Document type, <b>DT</b> :	Monograph
Type of record, <b>TR</b> :	textual / graphic
Contents code, <b>CC</b> :	doctoral dissertation
Author, <b>AU</b> :	Marija D. Ilić
Mentor, <b>MN</b> :	Vesna P. Stankov-Jovanović
Title, <b>TI</b> :	<b>Chemical composition, antioxidant, antimicrobial and anticholinesterase activity of plant species <i>Seseli rigidum</i> and <i>Seseli pallasii</i></b>
Language of text, <b>LT</b> :	Serbian
Language of abstract, <b>LA</b> :	English
Country of publication, <b>CP</b> :	Serbia
Locality of publication, <b>LP</b> :	Serbia
Publication year, <b>PY</b> :	2016
Publisher, <b>PB</b> :	author's reprint
Publication place, <b>PP</b> :	Niš, Višegradska 33.
Physical description, <b>PD</b> : (chapters/pages/ref./tables/pictures/graphs/appendixes)	9 chapters, 200 pages, 292 ref., 36 tables, 36 pictures, 2 appendixes
Scientific field, <b>SF</b> :	Chemistry
Scientific discipline, <b>SD</b> :	Analytical chemistry
Subject/Key words, <b>S/KW</b> :	<i>Seseli rigidum</i> , <i>Seseli pallasii</i> , essential oils, extracts, gas chromatography, liquid chromatography, mass spectrometry, inductively coupled plasma spectrometry, antioxidant activity, antimicrobial activity, anticholinesterase activity, microelements, macroelements, heavy metals, principle component analysis, cluster analysis
<b>UC</b>	582.794.1 : 581.192 582.794.1 : 579.66 582.794.1 : 615.217.3
Holding data, <b>HD</b> :	Library
Note, <b>N</b> :	PhD Research was funded by the Ministry of Education, Science and Technological Development of Republic Serbia, within the project "Natural products of plants and lichens: isolation, identification, biological activity and application" (No. 172047) and Development of new and improvement of the existing electrochemical, spectroscopic and flow injection analysis (FIA) methods for monitoring the quality of the environment (No. 172051)

**Abstract, AB:** The chemical composition of essential oils, extracts of different polarity, and mineral composition of plants *Seseli rigidum* and *Seseli pallasii* were analysed. For rapid analysis of volatiles of *S. rigidum* above ground parts, and *S. pallasii* fruits and roots volatiles, HS/GC-MS technique may be used, while in all other cases is necessary to isolate essential oils and apply GC-MS technique. According to principle component analysis (PCA) and hierarchical cluster analysis (HCA) a groupings of the samples were done, based on the similarity of the chemical composition of certain plant parts (leaf, flower, fruit and roots). The variables based on the dominant components were grouped using PCA and HCA analysis. Biological activities and characteristics of essential oils, extracts of different polarity of vegetative parts of both plants were investigated. Antioxidant properties were tested using ABTS, DPPH, total reducing power methods, total flavonoids and total phenols content. According to the ABTS and DPPH methods, the best properties were manifested by hexane extracts of both tested plant species, and flower acetone extract of *S. rigidum*, respectively, while the highest total reducing capacity had the methanol extracts of *S. rigidum*. The highest total phenols and flavonoids were registered for hexane extracts of root and leaf of *S. pallasii*. Both applied methods of statistical analyses (PCA and HCA) in which the results of antioxidant activities were used as variables, clearly distinguished DPPH method from other methods, and tested samples were separated by type (oils and extracts), and according to the type of solvent used in the preparation of extracts. Determination of antimicrobial activity of essential oils and extracts versus different strains of Gram (+) and Gram (-) bacteria, using the microdilution method, showed that the root essential oil of *S. rigidum* had the most pronounced effect. In terms of inhibition of enzyme cholinesterase, estimated using Elman's method, the highest degree of inhibition was recorded for the root methanol extract of *S. pallasii*. Overall, the best characteristics among tested activities, showed secondary metabolites of *S. rigidum* root, and therefore identification of main components of the extract using liquid chromatography combined with high resolution mass spectrometry was performed. Reliably was established presence of thirty compounds, most of which with coumarin structure. In each of the vegetative parts of both plants content of macro-, microelements and heavy metals were determined and found that their content does not exceed the permissible values. Results obtained using two methods of multivariate statistics are in accordance and grouped certain plants' parts based on the highest content of micro, macroelements or heavy metals.

Accepted by the Scientific Board on, **ASB:** 10.03.2015.

Defended on, **DE:**

Defended Board, <b>DB:</b>	President:	Violeta D. Mitić
	Member:	Olga P. Jovanović
	Member:	Gordana S. Stojanović
	Member:	Snežana D. Nikolić-Mandić
	Member, Mentor:	Vesna P. Stankov-Jovanović

*Eksperimentalni deo doktorske disertacije je rađen u laboratorijama za Analitičku i Organsku hemiju, na Departmanu za hemiju (Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Nišu), u okviru projekata Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja „Prirodni proizvodi biljaka i lišajeva: izolovanje, identifikacija, biološka aktivnost i primena“, (evidencioni broj OI 172047) i „Razvoj novih i poboljšanje postojećih elektrohemijskih, pektroskopskih i protočnih (FIA) metoda za praćenje kvaliteta životne sredine“ (evidencioni broj OI 172051).*

*Analize biljnih ekstrakata primenom tačne hromatografije u kombinaciji sa masenom spektrometrijom visoke rezolucije, su urađene u Laboratoriji za masenu spektrometriju pod rukovodstvom prof. Ričarda Kola, Pariskog instituta za molekularnu hemiju (IPMC), Univerziteta „Pjer i Marija Kiri“ u Parizu, na čemu se najsrdačnije zahvaljujem.*

*Najiskrenije se zahvaljujem mentorki, prof. dr Vesni Stankov Jovanović na ukazanom poverenju, nesebičnom zalaganju, pomoći u svim fazama izrade i svakodnevnoj podršci kako tokom izrade ove doktorske disetracije tako i tokom specijalističkih i doktorskih studija.*

*Prof. dr Violeti Mitić dugujem zahvalnost za neizmernu pomoć, korisne sugestije i savete za sve vreme izrade doktorske disetracije.*

*Najsrdačnije se zahvaljujem članovima komisije prof. dr Gordani Stojanović, prof. dr Snežani Nikolić Mandić i prof. dr Olgi Jovanović na korisnim savetima i sugestijama u završnoj fazi izrade koje su doprinele samom kvalitetu disertacije.*

*Veliku zahvalnost dugujem i prof. dr Tatjani Mihajilov-Krstev na pomoći pri ispitivanju antimikrobne aktivnosti i dr Mariji Marković za sakupljanje i identifikovanje biljnog materijala.*

*Takođe se zahvaljujem prof. dr Snežani Tošić i prof. Dr Aleksandri Pavlović na pomoći pri određivanju mineralnog sastava biljaka.*

*Posebnu zahvalnost na nesebičnoj ljubavi, podršci, strpljenju i razumevanju dugujem svojim roditeljima, sestri, bliskim prijateljima i kolegama.*

## Sadržaj

<b>1. Uvod</b> .....	<b>1</b>
<b>2. Opšti deo</b> .....	<b>6</b>
2.1 Botaničke karakteristike roda <i>Seseli</i> .....	6
2.2 Sekundarni metaboliti roda <i>Seseli</i> .....	8
2.2.1 Etarska ulja.....	8
2.2.2 Kumarini .....	12
2.3 Antioksidativna aktivnost.....	17
2.3.1 Slobodni radikali, uzroci i posledice njihovog nastanka i delovanja .....	17
2.3.2 Antioksidansi .....	19
2.3.3 Sekundarni metaboliti biljaka kao prirodni antioksidansi.....	20
2.3.4 Metode određivanja antioksidanasa .....	21
2.3.4.1 DPPH metoda.....	22
2.3.4.2 ABTS metoda.....	23
2.3.5 Određivanje ukupnog sadržaja (poli)fenolnih jedinjenja u biljnim ekstraktima .....	24
2.3.6 Određivanje ukupnog sadržaja flavonoida u biljnim ekstraktima.....	26
2.3.7 Određivanje $Fe^{3+}/Fe^{2+}$ redoks kapaciteta (FRAP) .....	27
2.4 Antimikrobna aktivnost.....	28
2.4.1 Antibakterijska aktivnost .....	28
2.4.2 Antifungalna aktivnost etarskih ulja i ekstrakata .....	31
2.4.3 Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIC, Minimal Inhibition Concentration) i minimalne batericidne koncentracije (MBC, Minimal Bactericidal Concentration) .....	33
2.5 Antiholinesterazna aktivnost.....	34
2.5.1. Značaj i uloga holinesteraze.....	34
2.5.2 Metode za određivanje aktivnosti holinesteraze .....	34
2.6 Metali u biljkama .....	35
2.6.1 Mehanizam usvajanja teških metala.....	36
2.6.2 Uloga teških metala u biljkama.....	37
2.6.3 Toksičnost teških metala.....	38
2.6.4 Uticaj pojedinih teških metala na biljke.....	38
2.7 Instrumentalne metode analize: GC, GC-MS, GC-FID .....	43
2.7.1 Gasna hromatografija.....	43
2.7.2 Statički „head-space“ .....	44
2.7.3 Masena spektrometrija .....	45
2.7.4 Elektrosprej jonizacija (ESI).....	47
2.8 Instrumentalne metode analize: tečna hromatografija sa masenom spektrometrijom visoke rezolucije (Liquid Chromatography- High Resolution Mass Spectrometry, LC-HRMS).....	52
2.8.1 Kombinacija tečni hromatograf-maseni spektrometar (LC-MS) .....	52
2.8.2 LTQ-Orbitrap- hibridni maseni spektrometar sa visokom rezolucionom moći .....	53
2.9 Optička emisiona spektrometrija sa induktivno spregnutom plazmom (Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry- ICP-OES) .....	55

2.9.1 Prednosti ICP-OES spektrometrije .....	56
2.9.2 Taĉnost i osetljivost ICP-OES spektrometrije .....	57
2.9.3. Smetnje u ICP-OES spektrometriji .....	58
2.10 Spektrofotometrija u vidljivoj oblasti .....	59
<b>3. Eksperimentalni deo .....</b>	<b>61</b>
3.1 Biljni materijal .....	62
3.2 Rastvori i reagensi.....	62
3.3 Aparati.....	63
3.4 Pripremanje ekstrakata za antioksidativnu, antimikrobnu i antiholinesteraznu aktivnost .....	65
3.5 Pripremanje uzoraka za GC-MS i HS/GC-MS analizu.....	65
3.6 Priprema metanolnog ekstrakta korena <i>S. rigidum</i> i njegovih frakcija .....	66
3.6.1 Frakcionisanje metanolnog ekstrakta korena <i>S. rigidum</i> .....	66
3.6.1.1 Frakcionisanje heksanske frakcije metanolnog ekstrakta .....	66
3.6.1.2 Kolonska hromatografija frakcije I na koloni sa silikagelom .....	67
3.6.1.3 Kolonska hromatografija frakcije II na koloni sa silikagelom.....	67
3.6.1.4 Kolonska hromatografija frakcija 4 <sub>II</sub> i 5 <sub>II</sub> na koloni sa silikagelom .....	67
3.7 Priprema biljnog materijala za ICP-OES analizu.....	67
3.8 Antioksidativna aktivnost .....	68
3.8.1 Metode za odreĉivanje antioksidativne aktivnosti .....	68
3.8.1.1 Odreĉivanje „scavenging“ antioksidativnog slobodno-radikalnog kapaciteta prema 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikalumu .....	68
3.8.1.2 Odreĉivanje antioksidativne aktivnosti primenom ABTS metode .....	69
3.8.1.3 Odreĉivanje antioksidativne aktivnosti merenjem ukupne redukcione moći (TRP) ....	69
3.8.1.4 Odreĉivanje ukupnog sadrĉaja flavonoida.....	70
3.8.1.5 Odreĉivanje ukupnih fenolnih jedinjenja po Folin-Sjoklto metodi .....	70
3.9 Odreĉivanje antimikrobne aktivnost mikrodilucionom metodom .....	70
3.10 Odreĉivanje antiholinesterazne aktivnosti .....	71
3.10.1 Poreklo i priprema humane holinesteraze za analizu .....	71
3.11 GC-MS i HS/GC-MS analiza.....	72
3.12 HPLC-HRMS analiza .....	72
3.13 Statistiĉka analiza.....	73
3.13.1 Multivarijantna analiza. Metoda analize glavne komponente.....	73
3.13.2 Metoda aglomerativne hijerarhijske klaster analize. Klaster analiza .....	75
<b>4. Rezultati i diskusija.....</b>	<b>78</b>
4.1 Sekundarni metaboliti biljne vrste <i>S. rigidum</i> .....	79
4.1.1 Hemijski sastav etarskih ulja biljne vrste <i>S. rigidum</i> .....	79

4.2 Sekundarni metaboliti biljne vrste <i>S. pallasii</i> .....	86
4.2.1 Hemijski sastav etarskih ulja biljne vrste <i>S. pallasii</i> .....	86
4.3 Multivarijantna analiza sastava etarskih ulja biljnih vrsta <i>Seseli</i> .....	93
4.4 TLC i HPLC analiza heksanskih frakcija metanolnog ekstrakta korena <i>S. rigidum</i> .....	102
4.4.1 Frakcionisanje heksanske frakcije metanolnog ekstrakta .....	103
4.4.2 Kolonska hromatografija frakcije I na koloni silikagela .....	104
4.4.3 Kolonska hromatografija frakcije II na koloni sa silikagelom .....	105
4.5 HPLC-HRMS metanolnog ekstrakta korena <i>S. rigidum</i> .....	109
4.6 Antioksidativna aktivnost ekstrakata i etarskih ulja <i>S. rigidum</i> i <i>S. pallasii</i> .....	115
4.6.1 ABTS .....	117
4.6.2 DPPH .....	118
4.6.3 Ukupna redukciona moć (TRP) .....	118
4.6.4 Sadržaj ukupnih flavonoida .....	119
4.6.5 Sadržaj ukupnih fenola .....	119
4.7 Statistička povezanost antioksidativnih karakteristika ekstrakata različite polarnosti i etarskih ulja <i>S. rigidum</i> i <i>S. pallasii</i> .....	120
4.8 Antimikrobna aktivnost <i>S. rigidum</i> i <i>S. pallasii</i> .....	129
4.9 Antiholinesterazna aktivnost <i>S. rigidum</i> i <i>S. pallasii</i> .....	133
4.10 Mineralni sastav <i>S. rigidum</i> i <i>S. pallasii</i> .....	137
4.10.1 Mikroelementi .....	138
4.10.2 Makroelementi .....	143
4.10.3 Teški metali .....	146
4.11 Statistička povezanost rezultata mineralnog sastava biljaka <i>S. rigidum</i> i <i>S. pallasii</i> .....	148
<b>5. Zaključak .....</b>	<b>160</b>
<b>6. Literatura .....</b>	<b>166</b>
<b>7. Prilozi .....</b>	<b>182</b>
<b>8. Biografija sa bibliografijom .....</b>	<b>186</b>
<b>9. Propratna dokumentacija .....</b>	<b>195</b>

## **1. Uvod**



Primena biljaka za prevenciju i lečenje mnogih bolesti ljudi i životinja ima dugu istoriju u narodnoj medicini, a veoma je rasprostranjena i danas.

Konsumiranje nekultivisanih, samoniklih biljaka igra veliku ulogu u ishrani iako je malo etnofarmakoloških i fitofarmakoloških studija koje su se bavile potencijalnim korišćenjem ovih biljaka u svakodnevnoj ishrani (*Pieroni i sar., 2002*).

Lekovite biljke predstavljaju jedan od glavnih izvora novih lekova i pomoćnih farmaceutskih preparata. Velika uloga biljaka u prevenciji bolesti i održanju dobrog zdravlja pripisuje se antioksidativnim svojstvima prisutnih fenolnih jedinjenja (*Demiray i sar., 2009; Huda-Faujan i sar., 2009; Chahardehi i sar., 2009*), lignana ali i kumarina. Pored uloge antioksidanasa, fenolna jedinjenja pokazuju i lekovita svojstva: antialergijsko, antiinflamatorno, antimikrobno, antitrombocidno, kardioprotektivno i vazodilatatorno (*Djeridane i sar., 2006; Demiray i sar., 2009*). Kumarini mogu ispoljiti antioksidativa, anti-inflamatorna, antimutagena, antimikrobna, blaga adrenergička svojstva, a pojedini kumarinu mogu pomoći u lečenju infekcija izazvanih HIV virusom (*Bhardwaj i sar., 2013*).

Apiaceae Lindl. (Umbelliferae Juss.) su velika i rasprostranjena familija cvetnica, sa 455 rodova i oko 3750 vrsta (*Pimenov i Leonov, 1993*). Više od 50 % vrsta familije Apiaceae je svrstano u mali broj mnogobrojnih rodova (*Angelica, Ferula, Peucedanum, Pimpinella i Seseli*), dok su ostale vrste ove familije razvrstane u veliki broj malobrojnih rodova (*Spalik i sar., 2004*). Familija Apiaceae je na Balkanskom poluostrvu zastupljena sa 82 roda i 334 vrste (*Nikolić 1973*).

Apiaceae su jedana od najviše istraživanih familija. Vrste koje pripadaju ovoj familiji se najčešće koriste u ishrani, kao začini i u medicinske svrhe; karakterističanog su ukusa i mirisa jer sadrže isparljiva jedinjenja u plodovima i listovima. Takođe familija obuhvata široko rasprostranjene korovske i otrovne vrste.

Značajno mesto u tradicionalnoj medicini mnogih naroda zauzimaju biljne vrste roda *Seseli*. Prvi put se naziv ovog roda spominje još kod Hipokrata, koji je naziv *Seseli* upotrebio za određene biljne vrste iz porodice Apiaceae (Umbelliferae) (*Simonović 1959*). Neke vrste ove familije se koriste kao začinsko i ukrasno bilje (*Kupeli i sar., 2006; Tosun 2006*), dok se druge primenjuju u tradicionalnoj medicini zbog svojih antibakterijskih, antimikotičkih, insekticidnih (*Bulatović i sar., 2006; Dogan i sar., 2006; Savikin-Fodulović i sar., 2006; Tosun i sar., 2007; Stojković i sar., 2008; Šiljegović i sar., 2011*), antiinflamatornih, antinociceptivnih (*Kupeli i sar.,*

2006), antitumorskih (Hu i sar., 1990), antireumatskih (Adams i sar., 2009), antihelminthičkih, imunomodulatorskih, antiinflamatornih, emenagognih i antikoagulantnih aktivnosti (Kupeli i sar., 2006), protiv nadimanja (Tosun 2006), kao i zaštitnog efekta na DNK humanih limfocita (Vučković i sar., 2010). Velika farmaceutska primena biljaka roda *Seseli* može se dovesti u vezu sa prisustvom kumarina i njihovih derivata (Nikolić 1973), za koje je dokazano da pokazuju antimikrobnu i citotoksičnu aktivnost, a ponašaju se kao inhibitori enzima acetilholinesteraze i monoamino oksidaze (Yang i sar., 2011).

Do sada je rađeno nekoliko studija na temu fitohemijskih ili bioloških aktivnosti roda *Seseli*. Tradicionalno, plodovi *S. tortuosum* se koriste kao emenagog i kod tretmana oboljenja digestivnog trakta (Carretero Accame i sar., 2011; Kupeli i sar., 2006) dok se listovi *S. libanotis* konzumiraju kao vrsta povrća u istočnoj Turskoj ili se dodaju siru kao konzervansi i aroma (Matejić i sar., 2012; Baytop 1999). Koren *S. mairei* Wolff. koristi se kao biljni lek za upale, otoke, reumatizam, bol i prehladu u nekim delovima Kine (Hu i sar., 1990). Seme indijske vrste *S. indicum*, poseduje antihelmintična i stimulaturna svojstva, a koristi se protiv nadimanja i za jačanje stomaka (Tandan i sar., 1990). Etarska ulja *S. indicum*, *S. libanotis* i *S. montanum* subsp. *tommassinii* su se pokazala efikasnim protiv patogenih mikroorganizama (Adams i sar., 2009; Ozturk i Ercisli, 2006; Šiljegović i sar., 2011; Singh i sar., 2002). Indijski celer (*S. diffusum*) se koristi u Pakistanu za lečenje amenoreje, urinarnog pražnjenja, groznice sa kašljem, reume, bolova u grudima i upala, a njegov plod se koristi kao antispazmotik, za lečenje bronhitisa, astme, kao i opstrukcije jetre, intestinalne slabosti i poremećaja rada slezine (Abbaskhan i sar., 2012). Plod *S. libanotis* se koristi za kontrolu krvnog pritiska (Syed i sar., 1989). Ekstrakti *S. pallasii* pokazuju larvicidalnu aktivnost protiv komaraca *Culex quinquefasciatus* Say (Pavela 2009). *Seseli bocconi* se potencijalno može koristiti kao sredstvo protiv nadimanja, dok je njena upotreba u ishrani rasprostranjenija u nekim delovima Sardinije (Marongiu i sar., 2006).

U Srbiji je zastupljeno deset vrsta roda *Seseli* (Nikolić 1975) koje imaju primenu u tradicionalnoj medicini u vidu čajeva ili tinktura (Marković Koder 1977; Stojković i sar., 2009; Matejić i sar. 2012; Marčetić i sar., 2012). Međutim, rađeno je mali broj fitohemijskih ispitivanja posebno vrsta *S. rigidum* i *S. pallasii*. Ove dve biljne vrste, imaju sličnu morfološku građu i potrebno je adekvatnim analitičkim tehnikama okarakterisati njihov hemijski sastav. Ekološki faktori mogu uticati na hemijski sastav pojedine biljne vrste, a samim tim i na ispoljavanje pojedinih bioloških aktivnosti (Miliauskas i sar., 2004).

Imajući u vidu napred navedeno cilj ove doktorske disertacije bio je:

- Utvrđivanje kvalitativnog i kvantitativnog sastava etarskih ulja i ekstrakata biljnih vrsta *S. rigidum* i *S. pallasii*
- Priprema biljnih ekstrakata različite polarnosti
- Određivanje antioksidativne aktivnosti pripremljenih ekstrakata
- Određivanje antimikrobnih svojstava etarskih ulja i ekstrakata
- Određivanje uticaja na aktivnost enzima holinesteraze različitog porekla (iz humanog i konjskog seruma).
- Identifikovanje glavnih komponenti ekstrakata koji pokazuju najizraženiju biološku aktivnosti
- Određivanje sadržaja makro, mikroelemenata i teških metala.
- Statistička obrada rezultata u cilju utvrđivanja veze između ispitivanih bioloških aktivnosti i hemijskog sastava.

Za ostvarivanje ciljeva doktorske disertacije korišćene su sledeće metode:

- Metode destilacije i ekstrakcije
- Metode gasne hromatografije (GC-MS, GC-FID i HS-GC-MS)
- Metode tečne hromatografije sa masenom spektrometrijom (HPLC-LTQ i HPLC-Orbitrap)
- Spektrofotometrijske metode određivanja antioksidativne aktivnosti (DPPH, ABTS, TRP, sadržaj ukupnih fenola, sadržaj ukupnih flavonoida)
- Određivanje antimikrobne aktivnosti primenom mikrodilucione metode
- Automatizovana spektrofotometrijska metoda za određivanje antiholinesterazne aktivnosti
- Mineralizacija biljnog materijala mokrim putem
- Određivanje sadržaja metala primenom ICP-OES metode
- Statističke metode obrade podataka (multivarijantna analiza: analiza glavnih komponenti i klaster analiza)

## **2. Opšti deo**

## 2.1 Botaničke karakteristike roda *Seseli*

Rod *Seseli* obuhvata oko 55 vrsta, rasprostranjenih uglavnom u Evropi. Ukupan broj *Seseli* taksona širom sveta je 125 do 140, sa 101 vrstom u Aziji i 12 taksona (11 vrsta i 1 podvrsta) u flori Turske (*Primenov i Leonov* 2004). Biljne vrste roda *Seseli* naseljavaju irano-turanska, evrosibirska i istočno mediteranska geografska područja (*Davis i sar.*, 1988; *Dogan i sar.*, 2011; *Nikolić* 1973).

Biljne vrste roda *Seseli* čine uglavnom višegodišnje biljke čiji su cvetovi hermafroditni i muški, a nalaze se u složenom štitu. Krunični listići su beli, ružičasti ili žuti. Plod je obao, jajast ili duguljast sa pet jasno istaknutih rebara, i brazdama sa po jednim do tri kanala u kojima se nalazi etarsko ulje. Obično rastu na velikim nadmorskim visinama, naročito u stenovitim oblastima i na liticama.

*Seseli rigidum* je endemska vrsta koja uglavnom raste na teritoriji Srbije, Bosne i Hercegovine, Crne Gore, Makedonije i Turske i to na kamenjarima i stenovitim terenima, na krečnjačkoj i silikatnoj podlozi. Prisustvo biljne vrste *S. rigidum* zabeleženo je na nekoliko lokacija u Srbiji, uglavnom na višim nadmorskim visinama (*Stjepanović i sar.*, 1970; *Marković i sar.*, 2009; *Marčetić i sar.*, 2012). *Seseli rigidum* je višegodišnja visoka biljka sa jako razvijenim korenim; listovi su čvrsti, sivkasto-zeleni, dvostruko perasti; cvasti su krupne, a cvetovi beli; plodovi su cilindrični sa jako istaknutim rebrima (Slika 1.). Cveti u julu i avgustu. Kao i kod većine višegodišnjih Umbellifera i kod ove vrste se razlikuju vegetativni i generativni stadijum. U vegetativnom stadijumu, koji može da traje više godina, razvijen je koren, stabljika i rozeta listova. U generativnom stadijumu dolazi do razvića ostalih vegetativnih i generativnih organa. Anatomska građa biljnih organa je karakteristična i odnosi se na raspored uljanih rezervoara u različitim delovima biljke. Količina i sastav etarskog ulja uglavnom zavisi od organa i vegetativne faze biljke (*Stjepanović i sar.*, 1970). Neka istraživanja su pokazala da u vegetativnom periodu koren u odnosu na listove rozete sadrži manje etarskog ulja. U generativnom periodu najmanje etarskog ulja takođe ima koren, zatim stablo i listovi, mnogo više cvasti, a najviše plodovi; čak zeleni plodovi sadrže više etarskog ulja od zrelih plodova. Ukupna količina etarskog ulja je, uglavnom, konstantna i ne zavisi od uticaja spoljašnjih faktora.



**Slika 1.** *Seseli rigidum*

*Seseli pallasii* Besser (syn. *S. varium* Trev.) je dvogodišnja zeljasta biljka sa razgranatim vretenastim rizomom na čijem se gornjem delu obično nalaze končasti ostaci ranijih listova. Stablo je visoko, okruglo, uspravno sa sitnim brazdama. Stabiljka je od same osnove razgranata, dok u gornjem delu nema listova (Ball 1968). Listovi su šiljati, goli, dva ili više puta perasto deljeni, sa linearnim reņnjevima. Štitovi su veliki, sa 15-25 golih, nejednakih zrakova. Involukruma nema ili je od listića. Listići involuceluma su brojni, lancetasti, zašiljeni, po obodu opnasti. Krunični listići su mali, okrugli i beli. Plod je izduđ enog ili elipsoidnog oblika, sa oštro istaknutim rebrima i brazdama sa kanalimam sa etarskim uljem (Slika 2).

Ova biljna vrsta raste na suvim, kamenitim pašnjacima i livadama, peskovitim nanosima, u šikarama, pored puteva i na nasipima (Nikolić 1973).



**Slika 2.** *Seseli pallasii*

Rasprostranjena u severnom delu Italije, Češke i Slovačke, na području istočne i centralne Ukrajine (Ball 1968), ali takođe i u istočnoj Srbiji: Đerdapska klisura, Stol, Ozren, Niš (Prosek), Pirot (Bela Palanka, Basara, Vidlič), Suva planina, Vranje (Nikolić 1973).

## 2.2 Sekundarni metaboliti roda *Seseli*

### 2.2.1 Etarska ulja

Etarska ulja predstavljaju vrlo važnu grupu sekundarnih metabolita roda *Seseli*. U Tabeli 1. prikazan je pregled dominantnih komponenti identifikovanih u etarskom ulju biljnih vrsta roda *Seseli*.

**Tabela 1.** Dominantne komponente etarskih ulja roda *Seseli*

Biljka i geografsko poreklo	Deo biljke	Identifikovane komponente (%)	Dominantne komponente (%)	Referenca
<i>S. petraeum</i> M. Bieb. (Turksa)	plod	95,7	karotol (20,7), γ-terpinen (11,3), sabinen (9,5), germakren D (7,8)	Tosun i sar., 2006
<i>S. andronakii</i> Woron. (Turska)	plod	91,5	karotol (52,7), germakren D (8,7)	Tosun i sar., 2006
<i>S. tortuosum</i> (Italija)	nadzemni deo	93,6	mircen (29,2), α-pinen (18,6), β-pinen (13,2), limonen (10,6)	Bader i sar., 2003
<i>S. bocconi</i> Guss. subsp. <i>praecox</i> Sardinia (Italija)	list	97,8	himakalol (4,4), sabinen (20,1), β-felandren (12,5), terpinen-4-ol acetat (4,1), (E)-β-terpineol (6,3)	Marongiu i sar., 2006
<i>S. bocconi</i> Guss. subsp. <i>praecox</i> Sardinia (Italija)	list	95,1	α-pinen (16,7), mircen (5,5), β-felandren (37,9), undekan (8,7)	Marongiu i sar., 2006
<i>S. bocconi</i> Guss. subsp. <i>praecox</i> Sardinia (Italija)	list	97,8	α-humulen (20,1), β-felandren (10,4), biciklogermakren (8,3), α-pinen (4,9), sabinen (4,8)	Marongiu i sar., 2006
<i>S. libanotis</i> (L.) W. D. Koch var. <i>armeniacum</i> Bordz. (Iran)	nadzemni deo	90,6	akorenon (35,5), limonen (7,2), α-pinen (7,1), kariofilen-oksid (6,1)	Masoudi i sar., 2006

<i>S. rigidum</i> (Srbija)	cvet	98,6	$\alpha$ -pinen (48,5), kamfen (4,6), $\beta$ -pinen (4,2), limonen (4,1)	Stojković i sar., 2009
<i>S. annuum</i> (Srbija)	nadzemni deo	96,5	germakren D (29,8), sabinen (10,3), ( <i>Z</i> )- $\beta$ -ocimen (9,8), limonen (8,6)	Milosavljević i sar., 2007
<i>S. libanotis</i> (Turska)	nadzemni deo	99,97	( <i>E</i> )-kariofilen (20,4), spatulenol (11,9), (-)-kariofilen-oksidi (11,5), azaron (10,67), $\delta$ -kadinen (9,2)	Ozturk i Ercisli 2006
<i>S. montanum</i> subsp. <i>tommasinii</i> (Srbija)	nadzemni deo	93,9	$\beta$ -pinen (30,2), germakren D (10,1), sabinen (8,0), $\alpha$ -pinen (7,2), limonen (6,6)	Šiljegović i sar., 2011
<i>S. libanotis</i> subsp. <i>libanotis</i> (Poljska)	plod	95	sabinen (37,4), $\beta$ -felandren (19,0), p-cimen (7,3), $\alpha$ -pinen (3,5)	Skalicka- Wozniak i sar., 2010
<i>S. globiferum</i> (Srbija)	zeleni plod	100,0	sabinen (53,1), $\gamma$ -terpinen (7,7), $\alpha$ -pinen (7,2), $\beta$ -felandren (5,0)	Stojković i sar., 2008
<i>S. globiferum</i> (Srbija)	zreo plod	100,0	sabinen (65,3), $\gamma$ -terpinen (6,6), $\alpha$ -pinen (4,4), $\beta$ -felandren (4,9)	Stojković i sar., 2008
<i>S. peucedanoides</i> (MB) Kos.- Pol. (Srbija)	cela biljka	96,3	$\alpha$ -pinen (69,4), $\beta$ -pinen (4,9), limonen (4,6)	Bulatović i sar., 2006
<i>S. resinosum</i> Freyn et Sint. (Turska)	plod	100,0	$\beta$ -pinen (37,5), 4 $\alpha$ -hidroksigermakra-1(10)- 5-diene (21,7), $\alpha$ -pinen (13,7)	Dogan i sar., 2006
<i>S. tortuosum</i> L. (Turska)	plod	98,3	( <i>E</i> )-seskvilavandulol (37,0), sabinen (19,7), $\alpha$ -pinen (13,5), $\beta$ -felandren (7,8)	Dogan i sar., 2006
<i>S. buchtormense</i> (Fisch. ex Sprengel) W. Koch (Altalska regija, Rusija)	cvet		sabinen (17,7-25,1), $\alpha$ -pinen (5,3-14,6), ( <i>E</i> )-nerolidol (5,5-11,6)	Tkachev i sar., 2006
<i>S. rigidum</i> Waldst. et Kit. var. <i>rigidum</i> (Srbija)	cela biljka	99,2	$\alpha$ -pinen (53,31), limonen (10,04), germakren D (9,32)	Šavikin- Fodulović i sar., 2006
<i>S. globiferum</i> Vis. (Srbija)	nadzemni deo	99,4	sabinen (38,0), $\alpha$ -pinen (21,2), $\beta$ -felandren (13,5)	Janačković i sar., 2011
<i>S. rhodopeum</i> (Bugarska)	cela biljka		sabinen (51,3), $\alpha$ -pinen (11,8), $\alpha$ -felandren (10,3)	Todorova i sar., 2011
<i>S. campestre</i> Besser (Turska)	nadzemni deo	97,1	$\alpha$ -pinen (38,6), $\beta$ -pinen (17,5),	Kaya i sar., 2010



<i>S. gummiferum</i> subsp. <i>corymbosum</i> (Turska)	nadzemni deo	94,7	( <i>E</i> )-seskviilavandulol (10,3) biciklogermakren (11,9), germakren B (14,0), $\alpha$ -pinen (4,5), $\beta$ -mircen (7,1), $\gamma$ -elemen (8,0), satulenol (8,9)	<i>Tosun</i> i sar., 2005
<i>S. gummiferum</i> subsp. <i>gummiferum</i> (Turska)	nadzemni deo	99,8	spatulenol (19,9), terpinen-4-ol (6,8), sabinen (4,4), $\beta$ -eudesmol (3,1)	<i>Tosun</i> i sar., 2005
<i>S. tortuosum</i> L. subsp. <i>Kiabii</i> Akhani (Iran)	nadzemni deo	93,6	$\alpha$ -pinen (21,2), $\beta$ -felandren (14,9), $\beta$ -pinen (14,2), sabinen (13,4)	<i>Habibi</i> i sar., 2003
<i>S. campestre</i> Besser (Turska)	plod	95,0	$\alpha$ -pinen (26,2), ( <i>E</i> )-seskvilavandulol (11,8)	<i>Baser</i> i sar., 2000
<i>S. campestre</i> Besser (Turska)	nadzemni deo	96,0	$\alpha$ -pinen (35,8), ( <i>E</i> )-seskvilavandulol (3,2)	<i>Baser</i> i sar., 2000
<i>S. tortuosum</i> L. (Portugalija)	nadzemni deo	91,0- 92,5	$\alpha$ -pinen (24,8-24,9), $\beta$ -pinen (23,5-23,9), ( <i>Z</i> )- $\delta$ -ocimen (13,3-16,0), mircen (4,9-5,3)	<i>Jose Goncalves</i> i sar., 2012
<i>S. montanum</i> subsp. <i>peixotoanum</i> (Portugalija)	nadzemni deo	91,5- 92,8	$\alpha$ -pinen (36,0-37,1), $\beta$ -pinen (22,5-23,6), limonen (7,7-8,8), $\beta$ -elemen (5,2-5,8)	<i>Jose Goncalves</i> i sar., 2012
<i>S. tortuosum</i> L. (Turska)	nadzemni deo	95,4	$\alpha$ -pinen (35,9), sabinen (8,8), ( <i>E</i> )-seskvilavandulol (8,4), $\beta$ -pinen (7,0)	<i>Kaya</i> i sar., 2003
<i>S. rigidum</i> Waldst. & Kit. (Srbija)	nadzemni deo	99,7	$\alpha$ -pinen (57,4), limonen (6,7), kamfen (5,8), sabinen (5,5)	<i>Marčetić</i> i sar., 2012
<i>S. rigidum</i> Waldst. & Kit. (Srbija)	plod	95,9	$\alpha$ -pinen (23,3), $\beta$ -felandren (17,4), sabinen (12,9)	<i>Marčetić</i> i sar., 2012
<i>S. rigidum</i> Waldst. & Kit. (Srbija)	koren	94,8	falkarinol (88,8)	<i>Marčetić</i> i sar., 2012
<i>S. rigidum</i> Waldst. & Kit. (Srbija)	koren	91,9	falkarinon (2,0), min-max: (0,00-7,4), falkarinol (78,0), min-max: (35,0-94,5), oktanal (1,9), min-max: (0,1- 10,1), $\beta$ -seskvifelandren (1,0), min-max (0,0- 6,3)	<i>Marčetić</i> i sar., 2013
<i>S. rigidum</i> Waldst. & Kit. (Srbija)	cvet	96,3	$\alpha$ -pinen (33,0), germakren D (10,1), sabinen (7,9), limonen (7,1)	<i>Stankov- Jovanović</i> i sar., 2015

<i>S. rigidum</i> Waldst. & Kit. Srbija	list	96,3	$\alpha$ -pinen (26,3), sabinen (7,8), limonen (5,4), trans-verbenol (5)	Stankov- Jovanović i sar., 2015
<i>S. rigidum</i> Waldst. & Kit. Srbija	plod	98,8	$\alpha$ -pinen (33,2), sabinen (18,5), limonen (8,7), $\gamma$ -terpinen (5,5)	Stankov- Jovanović i sar., 2015
<i>S. rigidum</i> Waldst. & Kit. Srbija	koren	93,2	( <i>Z</i> )-falkarinol (14,3), <i>n</i> -oktanal (7,7), terpinen-4-ol (3,9), kadin-1(10)-en-5,11-oksid (3,6), $\alpha$ -pinen (3,3)	Stankov- Jovanović i sar., 2015
<i>S. rigidum</i> Waldst. & Kit. Srbija	plod	94,4	$\alpha$ -pinen (37,8), sabinen (13,5), $\beta$ -pinen (3,3), limonen (3,4), $\beta$ -felandren (5,1)	Ilić i sar., 2015
<i>S. rigidum</i> Waldst. & Kit. Srbija	plod	95,9	$\alpha$ -pinen (36,2), sabinen (14,2), $\beta$ -pinen (2,8), limonen (2,5), $\beta$ -felandren (5,2)	Ilić i sar., 2015
<i>S. rigidum</i> Waldst. (Bugarska)	cvet		$\beta$ -felandren (47,5), sabinen (19,8)	Todorova i sar., 2013
<i>S. rigidum</i> Waldst. (Bugarska)	list		sabinen (39,8)	Todorova i sar., 2013
<i>S. rigidum</i> Waldst. (Bugarska)	stablo		$\beta$ -felandren (63,1), sabinen (6,5)	Todorova i sar., 2013
<i>S. rigidum</i> Waldst. (Bugarska)	koren		( <i>Z</i> )-falkarinol (48,7), sabinen (12,4), elemol (8,7)	Todorova i sar., 2013

## 2.2.2 Kumarini

Najzastupljenija grupa jedinjenja roda *Seseli* su kumarini. U Tabeli 2. dat je pregled kumarina i njihovih derivata, izolovanih i identifikovanih različitim analitičkim metodama u ekstraktima biljnih vrsta roda *Seseli*.

**Tabela 2.** Kumarini i njihovi derivati prisutni u biljnim vrstama roda *Seseli*

Biljna vrsta	Deo biljke	Jedinjenje	Referenca
<i>S. jomuticum</i>	cela biljka	jumutinol	<i>Abyshev</i> 1980
<i>S. tortuosum</i>	koren	kampestrinol, tortuozin, tortuozinin, tortuozinol, tortuozinol, tortuozinol, tortuozinol	<i>Abyshev</i> i <i>Abyshev</i> 1983
<i>S. tortuosum</i>	nadzemni deo	tortuozinol	<i>Ceccherell</i> i sar., 1989
<i>S. tortuosum</i> <i>L.B.S. Eur</i>	nadzemni deo	bergapten, ksantotoksin, imperatorin, oroselol, kolumbianetin, maskvin, dihidroksantiletin, dekurzinol, agasilin, pranferin	<i>Gonzalez</i> i sar., 1982
<i>S. tortuosum</i> <i>L.B.S. Eur</i>	nadzemni deo	herniarin, auraptenol, 7-hidroksi-8-(2'-hidroksi-3'-metil-3'-butenil) kumarin, meranzin hidrat, 7-metoksi-8-(2'-hidroksi-3'-etoksi-3'-metilbutil) kumarin, 7-metoksi-8-(2'-okso-3'-metilbutil) kumarin, 7-metoksi-(2'-formil-2'-metilpropil) kumarin, 7-hidroksi-8-(2',3'-dihidroksi-3'-metilbutil) kumarin, 5,7-dimetoksi-8-(2'-hidroksi-3'-metil-3'-butenil) kumarin, 5-metoksi-7-hidroksi-8-(2'-hidroksi-3'-metil-3'-butenil) kumarin, 5,7-dimetoksi-8-(2'-okso-3'-metilbutil) kumarin, 5,7-dimetoksi-8-(2'-hidroksi-3'-etoksi-3'-metilbutil) kumarin	<i>Gonzalez</i> i sar., 1978.
<i>S. tortuosum</i> <i>L.B.S. Eur</i>	nadzemni deo	bergapten, ksantotoksin, imperatorin, oroselol, kolumbianetin, maskvin, dihidroksantiletin, dekursinol, agasilin, pranferin	<i>Gonzalez</i> i sar., 1982
<i>S. tortuosum</i> L.	nadzemni deo	<i>trans</i> -helakton, <i>cis</i> -helakton, 3'-senecioil- <i>cis</i> -helakton, 3'-senecioil-4'-acetil- <i>cis</i> -helakton, 4'-senecioil- <i>cis</i> -helakton, 3'-acetil-4'-senecioil- <i>cis</i> -helakton, 3',4'-diizovaleril- <i>cis</i> -helakton, 3',4'-disenecioil- <i>cis</i> -helakton, 3'-angeloil-4'-izovaleril- <i>cis</i> -helakton, 3'-izovaleril-4'-angeloil- <i>cis</i> -helakton	<i>Gonzalez</i> i sar., 1979
<i>S. grandivittatum</i>	koren	(-)-(3' <i>R</i> )-dekursinol, dekursinol angelat, gekursin, grandivitin, grandivitinol	<i>Abyshev</i> i sar., 1977
<i>S. grandivittatum</i> Schischk.	koren	rutarin	<i>Abyshev</i> i sar., 1993
<i>S. grandivittatum</i> (Somm. et Lev.) Schischk	koren	ostol, libanotin, anomalin	<i>Turabelidze</i> i <i>Kemertelidze</i> 1976
<i>S. campestre</i> Bess.	koren	kampestrol, kampestrinol, kampestrinozid.	<i>Abyshev</i> i sar., 1982
<i>S. campestre</i> Bess.	koren	kampesenin, kalipteriksin, kampeselol, 3'-acetoksi-4'-senecioil-3',4'-dihidrosezelin	<i>Shagova</i> i sar., 1973
<i>S. peucedanoides</i> (Bieb) K.- Pol	koren	sezeloizid, umbeliprenin, prančimgin, deltoin	<i>Belyi</i> i sar., 1988
<i>S. peucedanoides</i>	koren	dekursinol, prangeferol angelat, kumurain,	<i>Abyshev</i> i <i>Abyshev</i>

(Bieb) K.- Pol		nodakenetin	1984
<i>S. peucedanoides</i>	koren	pračimgin, deltoin, marmezin	<i>Belyi</i> i sar., 1983
(Bieb.) K.-Pol			
<i>S. peucedanoides</i>	koren	sezeloizid	<i>Bagirov</i> i <i>Belyi</i> 1981
<i>S. seseliflorum</i>	cela	sekulin	<i>Aminov</i> i <i>Nikonov</i> 1974
Schrenk	biljka		
<i>S. tschuense</i> E.	koren	anomalin, acilovani čuin, sečulin, sezelin	<i>Aminov</i> i <i>Nikonov</i> 1972
Nik.sp. novo			
<i>S. sibiricum</i>	cvet	sezelinal, sezibirikol, sibirinol, sezibiricin, izosibiricin, ostol, kumurain, sezebrin, sezebrinol, sibiricin, imperatorin, bergapten, ksantotoksin, izopimpinelin, meksoticin	<i>Banerjee</i> i sar., 1980
<i>S. sibiricum</i>	koren	sezebrin, sezebrinol, sibirikol, izobergapten, bergapten, felopterin, sibiricin, kumurain, ostenol, meranzin hidrat	<i>Kumar</i> i sar., 1978
<i>S. sibiricum</i>	cela	ostol, imperatorin, bergapten, sibiricin	<i>Austin</i> i sar., 1968
	biljka		
<i>S. transcaucasica</i>	koren	arhangelicin, edultin, libanotin	<i>Qurbanova</i> i <i>Serkerov</i> 2012
<i>S. transcaucasica</i>	koren	arhangelicin, edultin, libanotin	<i>Qurbanova</i> i <i>Serkerov</i> 2011
(Schischk.) M. Pimen. Sdobina			
<i>S. gracile</i> Waldst. & Kit.	koren	ostol, psoralen, ksantotoksin, bergapten, imperatorin, oksipeucedanin, oksipeucedanin hidrat, izoimperatorin, marmezin, deltoin, prančimgin, angelicin	<i>Kuznetsova</i> i sar., 1981
<i>S. gracile</i> Waldst. & Kit.	nadzemni deo	psoralen, ksantotoksin, bergapten, imperatorin, oksipeucedanin, izoimperatorin, deltoin, angelicin	<i>Kuznetsova</i> i sar., 1981
<i>S. gracile</i> Waldst. & Kit.	nadzemni deo	psoralen, ksantotoksin, bergapten, imperatorin, izoimperatorin, deltoin, angelicin, pranferol, bergapten	<i>Kuznetsova</i> i sar., 1981
<i>S. rigidum</i> Waldst. et Kit.	cela	ostol, suberozin, psoralen, pranferol	<i>Kuznetsova</i> i sar., 1987
	biljka		
<i>S. rigidum</i>	plod	angelicin, imperatorin, izoimperatorin, hidroksipeucedanin, hidroksipeucedanin hidrat	<i>Pavlovic</i> i <i>Kuznetsova</i> 1971
<i>S. libanotis</i> subsp. <i>eu-libanotis</i>	koren	(2'S)-rutaretin-1"-sulfat, (3'R)-lomat-3'-sulfat, (3'R,4'R)- helakton-3'-sulfat	<i>Lemmich</i> i <i>Shabana</i> 1984
<i>S. montanum</i>	koren	(+)-peucedanol, (+)-ulopterol, apterin	<i>Lemmich</i> i <i>Havelund</i> 1978
<i>S. elatum</i> subsp. <i>gouanii</i> and <i>elatum</i>	cela	ksantotoksol, felopterin, sezelin, izoimperatorin, izopimpinelin, ksantotoksin, oksipeucedanin hidrat, allo-izoimperatorin, sfondin	<i>Lokar</i> i <i>Delben</i> 1988
	biljka		
<i>S. praecox</i> (Gamisans) Gamisans	stablo	5-hidroksi-6-(2-Z-butenil-3-hidroksimetil)-7-metoksi-2-metilhromon	<i>Leonti</i> i sar., 2010
<i>S. bocconi</i> subsp. <i>Praecox</i>		bokonin	<i>Bellino</i> i sar., 1986
<i>S. foliosum</i> (Sommier & Levier) Manden.	koren	suberozin, ostol, edultin, skopoletin, umbeliferon	<i>Chubinidze</i> i sar., 1986
<i>S. gummiferum</i> subsp. <i>corymbosum</i>	nadzemni deo	ostol, korimbokumarin	<i>Tosun</i> i sar., 2007
<i>S. gummiferum</i> subsp.	nadzemni deo	korimbokumarin, ostol, (-)-(3'S,4'S)-3'-acetoksi-4'-angeloiloksi-3',4'-dihidrosezelin, d-laserpiti- (+)-(3'	<i>Tosun</i> i sar., 2005

<i>corymbosum</i>		S,4'S)-3'-hidroksi-4'-angeloiloksi-3',4'-dihidrosezelin), (-)-(3'S,4'S)-3'-angeloiloksi-4'-hidroksi-3',4'-dihidrosezelin, 3'-acetoksi-4'-izobutiloksi-3',4'-dihidrosezelin	
<i>S. gummiferum</i> Pall. ex Sm. subsp. <i>corymbosum</i> P. H. Davis	nadzemni deo	ostol, (3'S)-acetoksi-(4'S)-izovaleriloksi-3',4'-dihidrosezelin, (3'S)-acetoksi-(4'S)-angeloiloksi-3',4'-dihidrosezelin, (3'S)-hidroksi-(4'S)-angeloiloksi-3',4'-dihidrosezelin, (3'S)-angeloiloksi-(4'S)-hidroksi-3',4'-dihidrosezelin, 3'-acetoksi-4'-izobutiloksi-3',4'- <i>cis</i> -dihidrosezelin	Davis i sar., 2003
<i>S. gummiferum</i> subsp. <i>gummiferum</i>		lomatina, kapronat, kaprilat, <i>cis</i> -4-oktenoat	Larsen 1972
<i>S. gummiferum</i> subsp. <i>gummiferum</i>	cela biljka	(+)-(3'R)-3'-heksanoiloksi-3',4'-dihidrosezelin, (+)-(3'R)-oktanoiloksi-3',4'-dihidrosezelin, (3'R)- <i>cis</i> -4-oktenoiloksi-3',4'-dihidrosezelin, deltoin	Nielsen i sar., 1970
<i>S. gummiferum</i>	stablo	(3'R,4'R)-3'-izovaleriloksi-4'-angeloiloksi-3',4'-dihidrosezelin, (3'R,4'R)-3'-senecioiloksi-4'-angeloiloksi-3',4'-dihidrosezelin, (3'R,4'R)-3'-acetoksi-4'-senecioiloksi-3',4'-dihidrosezelin, (+)- <i>cis</i> -helakton	Nielsen i sar., 1971
<i>S. giraldii</i> Diels	cela biljka	ostol	Chunli i sar., 2008
<i>S. korovinii</i>	koren	hromon, hamaudol, hamaudol acetat, bergapten	Dukhovlinova i sar., 1975
<i>S. giganteum</i>	koren	2-metil-5-okso-7-metoksihromon (eugenin), bergapten	Dukhovlinova i sar., 1975
<i>S. asperulum</i>	koren	anomalina, deltoin, psoralen, izofloroselin, sezeliflorin, sekordin	Dukhovlinova i sar., 1974
<i>S. mucronatum</i> (Schrenk) M. Pimen et Sdobn.	koren	sekordin, ostrutin, zosimin, kolumbianadin, anomalina, pteriksin	Dukhovlinova i sar., 1979
<i>S. seravschanicum</i>	koren	anomalina, 3'-hidroksi-4'-angeloiloksi-3',4'-dihidrosezelin, izobokonin	Dukhovlinova i sar., 1980
<i>S. petraeum</i>	cela biljka	anomalina	Dukhovlinova i sar., 1976
<i>S. ponticum</i>	cela biljka	ksantogalin, anomalina	Dukhovlinova i sar., 1976
<i>S. dichotomum</i>	cela biljka	bergapten, anomalina, ksantogalin	Dukhovlinova i sar., 1976
<i>S. webbii</i> Cosson	nadzemni deo	umbeliferon, bergapten, ksantotoksin, izoimperatorin, imperatorin, izooksipeucedanin, biakangelicin, oksipeucedanin hidrat, 2,3-metilendioksi-4,5,6-trimetoksialilbenzen, 3,4-metilendioksi-5-metoksialilbenzen	Gonzalez i sar., 1982
<i>S. indicum</i>	plod	sezelin	Tandan i sar., 1990
<i>S. mairei</i> Wolff		izoedultin, peucenin, kolumbianadin, 5-metoksipsoralen, psoralen, acetilumbeliferon, 3'-epidekurzinol	Hu i sar., 1992
<i>S. mairei</i> Wolf	nadzemni deo	sfondin, bergapten, izopimpinelin, umbeliferon, krizosptertin B	Zong i sar., 2007
<i>S. coronatum</i>	koren	psoralen, bergapten, sezelirin, anomalina, sezeliflorin, sekordin, izofloroselin	Dukhovlinova i sar., 1974
<i>S. coronatum</i> Ledeb.	koren	sekordin	Dukhovlinova i sar., 1973

<i>S. cuneifolium</i>	koren	anomalin, pteriksin	<i>Rasulov i Belyi</i> 1987
<i>S. varium</i> Trev.	koren	5,7-dimetoksi-8-isopentanilkumarin	<i>Sagova i sar.</i> , 1980
<i>S. sessiliflorum</i>	koren	floroselin, sezeliflorin, anomalin, sezelirin, trans-8-decen-4,6-diinil- <i>cis</i> -3-metiltoakrilat	<i>Savina i Perlson</i> 1973
<i>S. sessiliflorum</i> Schrenk	cela biljka	floroselin, sezeliflorin, sezelirin	<i>Savina i Pimenov</i> 1972
<i>S. sessiliflorum</i> Schrenk	koren	3'-angeloiloksi-4'-metoksi-2',2'-dimetil-3',4'-dihidropirano-5',6':8,7-kumarin, floroselin	<i>Savina i sar.</i> , 1970
<i>S. strictum</i> Ledeb.	nadzemni deo	manitol, imperatorin, ostol, ksantotoksin, izoimperatorin, oksipeucedanin, kumurain, bergapten, suberozin	<i>Shavarda i sar.</i> , 2002
<i>S. buchtormense</i> (Fisch. ex Spreng.) W. Koch	cela biljka	imperatorin, ostol, ksantotoksin, izoimperatorin, oksipeucedanin, merancinhidrat, meksoticin, psoralen, bergapten, suberozin	<i>Shavarda i sar.</i> , 2001
<i>S. iliense</i>	koren	peucenol, iselin, iliensin	<i>Dukhovlina i sar.</i> , 1974
<i>S. eriocephalum</i>	koren	anomalin, izoimperatorin, sukadorfin, pteriksin	<i>Sokolova i sar.</i> , 1977
<i>S. krylovii</i> Pimenov & Sdobnina	koren	iselin, izoimperatorin, ostrutin, oksipeucedanin, oksipeucedanin hidrat	<i>Sokolova i sar.</i> , 1974
<i>S. saxicolum</i> Pimenov	cela biljka	peucenidin, saksikolon	<i>Sokolova i sar.</i> , 1980
<i>S. yunnanense</i> Franch	cela biljka	bergapten, imperatorin	<i>Yongqing i sar.</i> , 1995
<i>S. tenuisectum</i> Regel & Schmalh.	cela biljka	(+)- <i>cis</i> -metilhelakton, anomalin	<i>Aminov i Nikonov</i> 1970
<i>S. tenuisectum</i> Regel. et Schmalh	cela biljka	anomalin, 3'-angeloiloksi-4'-hidroksi-3',4'-dihidrozezelin, 4'-angeliloksi-3'-hidroksi-3',4'-dihidrozezelin, 4'-angeloiloksi-3'-izovaleriloksi-3',4'-dihidrozezelin	<i>Aminov i Nikonov</i> 1972
<i>S. tenuisectum</i>	koren	hamaudol	<i>Sokolova i sar.</i> , 1970
<i>S. tschuense</i> Nikitina	koren	sečuin, anomalin, čuin, sečulin, sezelirin	<i>Aminov i Nikonov</i> 1972
<i>S. sessiliflorum</i> Schrenk	koren	marmezin, 5'-(1-hidroksi-1-metiletil)-4',5'-dihidrofuro-2',3':7,6-kumarin-floroselin, 5'-[1-metil-1-(trans-3-metiltoacriloloksi)etil]-4',5'-dihidrofuro-2',3':7,6-kumarin, sezeliflorin	<i>Savina i sar.</i> , 1970
<i>S. sessiliflorum</i> Schrenk	koren	sezelirin, 2',2'-dimetil-3'-(3-metiltoakriloloksi)-3',4'-dihidropirano-5',6':6,7-(5-hidroksi-2-metil)	<i>Savina i sar.</i> , 1970
<i>S. tschuense</i>	koren	čuin, nodakenetin, <i>p</i> -hidroksifenilglioksilna kiselina	<i>Aminov i Nikonov</i> 1973
<i>S. annuum</i>	koren	izoimperatorin	<i>Florya i Kuznetsova</i> 1970
<i>S. annuum</i> L.	nadzemni deo	umbeliprenin	<i>Vučković i sar.</i> , 2007
<i>S. annuum</i> L.	koren	felopterin	<i>Vučković i sar.</i> , 2010
<i>S. talassicum</i> (Korov.) M. Pimen. et Sdobn	koren	izoimperatorin, anomalin	<i>Dukhovlina i sar.</i> , 1976
<i>S. unicaula</i>	koren	3'-acetoksi-4'-izovaleriloksi-3',4'-dihidrozezelin	<i>Savina i sar.</i> , 1972,
<i>S. incanum</i> (Steph.) B. Fedtsch	koren	anomalin	<i>Vandyshv i sar.</i> , 1975
<i>S. devenyense</i> Simonkai	plod	dekanski i dodekanski estri (+)-lomatina, dekanoat (+)- <i>cis</i> -helaktone u poziciji 4', dekanoat (+)- <i>cis</i> -helaktone u poziciji 3, deveniol, deveniozid A,	<i>Widelski i sar.</i> , 2005

<i>S. hartvigii</i>	nadzemni deo	deveniozid B, deveniozid C izopteriksin, suberozin, meksoticin	Tosun 2006
<i>S. hartvigii</i>	cela biljka	5-(2'E,6'R)-6'-hidroksi-3',7'-dimetilokta-2',7'-dieniloksipsoralen, 5-(2'E,6'S)-6'-hidroksi-3',7'-dimetilokta-2',7'-dieniloksipsoralen, 6-(3'-metil-2'-okso-3'-butenil)-7-metoksikumarin, tamarin, bergaptol, notoptol	Zhang i sar., 2010
<i>S. resinosum</i> Freyn et Sint.	cela biljka	(-)-anomalin, deltoin	Tosun i sar., 2007
<i>S. resinosum</i>	koren	(+)-samidin, izoimperatorin, kalipteriksin, (-)-anomalin, deltoin	Tosun i sar., 2006
<i>S. resinosum</i> Freyn et Sint.	koren	d-laserpitin, (3'S,4'S)-3'-angeloiloksi-4'-hidroksi-3',4'-dihidrosezelin, (+)-samidin, (3'S,4'S)-3'-acetoksi-4'-angeloiloksi-3',4'-dihidrosezelin, deltoin, kalipteriksin, (3'S,4'S)-3',4'-disenecioiloksi-3',4'-dihidrosezelin, (-)-anomalin	Shehzad i sar., 2013
<i>S. resinosum</i> Freyn et Sint.	nadzemni deo	samidin	Khan i sar., 2014
<i>S. montanum</i> subsp. <i>Tommasinii</i> <i>S. annuum</i> <i>S. campestre</i> Bess.		anomalin, izopteriksin, izolaserpitin, laserpitin, meranzin  felopterin	Rabtti i sar., 2012
		(+)- <i>cis</i> -kelakton, kampestrinol, kampestrizid, (-)- <i>trans</i> -kelakton, 3'-acetoksi-4'-senecioiloksi-3',4'-dihidrosezelin, peuformazin, (3'S,4'S)-(-)- <i>trans</i> -3'-senecioil-4'-angeloiloksi-3',4'-dihidrosecelin, kampestrinol, 3'-angeloiloksi-4'-oksi-3',4'-dihidrosecelin, 3'-senecioil-4'-oksi-3',4'-dihidrosezelin, diangelat kelakton, rutarin, izoimperatorin, marmezin	Rabtti i sar., 2012 Mikailova i Serkerov 2014
<i>S. tortuosum</i> L.		(+)- <i>cis</i> -kelakton, kampestrinol, kampestrizid, (-)- <i>trans</i> -kelakton, 3'-acetoksi-4'-senecioiloksi-3',4'-dihidrosezelin, 3',4'-diizovaleriloksi-3',4'-dihidrosezelin, 3'-senecioil- <i>cis</i> -kelakton, 3'-izovaleriloksi-4'-angeloiloksi-3',4'-dihidrosezelin, 4',5'-dihidroangelizina, 3',4'-dihidroksantiletina	Mikailova i Serkerov 2014
<i>S. campestre</i> Bess	koren	3',4'-dioksi-3',4'-dihidrosezelin	Mikailova i Serkerov 2013

Pored etarskih ulja koja sadrže uglavnom jedinjenja terpenoidne strukture, kumarina i njihovih derivata, u biljkama roda *Seseli* identifikovano je još nekoliko grupa jedinjenja. U Tabeli 3. prikazana su jedinjenja koja nemaju strukturu kumarina i terpena, a identifikovana su u ekstraktima biljnih vrsta roda *Seseli*.

Tabela 3. Ostala jedinjenja identifikovana u ekstraktima biljnih vrsta roda *Seseli*

Biljna vrsta	Deo biljke	Jedinjenje	Referenca
<i>S. sibiricum</i>	nadzemni deo	cimetna kiselina, sezebrinska kiselina	Banerjee i sar., 1987
<i>S. annuum</i>	koren	sezelinonol, falkarinol, falkarindiol	Vučković i sar., 2010
<i>S. cuneifolium</i>	koren	$\beta$ -sitosterol	Rasulov i Belyi 1987
<i>S. foliosum</i>	nadzemni deo	$\delta$ -manitol, saharoza	Chubinidze i sar., 1986
<i>S. grandivittatum</i>	koren	$\beta$ -sitosterol	Abyshv i sar., 1977
<i>S. tenuisectum</i> Regel. et Schmalh.	nadzemni deo	manitol, $\beta$ -sitosterol	Sokolova i sar., 1970
<i>S. tschuense</i> E. Nik. sp. novo	koren	$\beta$ -sitosterol, manitol	Aminov i Nikonov 1972
<i>S. mucronatum</i> (Schrenk) M. Pimen et Sdobn.	koren	bornil- <i>trans-p</i> -hidroksicinamat	Dukhovlina i sar., 1979
<i>S. mucronatum</i> (Schrenk) M. Pimen et Sdobn.	koren	bornil- <i>trans-p</i> -hidroksicinamat	Dukhovlina i sar., 1975
<i>S. asperulum</i> (Trautv.) Schischk.	koren	bornil- <i>trans-p</i> -hidroksicinamat	Dukhovlina i sar., 1975
<i>S. indicum</i>	plod	indosterol	Gupta i Gupta 1974
<i>S. indicum</i>	cela biljka	indosterol	Gupta i Gupta 1974
<i>S. mairei</i> Wolf	nadzemni deo	krizosptertin B, apin, rutin, kvercetin, ferulinska kiselina, falkarcindiol, dokoanol, $\beta$ -sitosterol, daukosterol	Zong i sar., 2007
<i>S. yunnanense</i> Franch	cela biljka	$\beta$ -sitosterol, palmitinska kiselina, falkarindiol	Yongqing i sar., 1995
<i>S. hartvigii</i>	cela biljka	$\beta$ -sitosterol, stigmasterol	Zhang i sar., 2010
<i>S. tortuosum</i> L.B.S. Eur	nadzemni deo	4-hidroksi-3,5-dimetoksi-benzaldehid, $\beta$ -sitosterol	Gonzalez i sar., 1982
<i>S. yunnanense</i> Franch	nadzemni deo	kvercetin, kvercetin-3- <i>O</i> -glukozid, hiperin, izoramnetin-3- <i>O</i> -glukozid, apin, rutin, ferulinska kiselina, falkarindiol, dokoanol, stearinska kiselina, $\beta$ -sitosterol, daukosterol	Lin i sar., 2007
<i>S. farreynii</i>	list	7-demetilplastohromenol-2, 2-demetilplastohinon-3	Muckensturm i sar., 1997
<i>S. mairei</i> Wolf	koren	selidiol, sezelidiol-diacetat, heptadeka-1,8-( <i>Z</i> )-diene-4,6-diin-3,10-dion, heptadeka-1,8-diol, heptadeka-1,8-dien-4,6-diin-3,10-diol	Hu i sar., 1990

## 2.3 Antioksidativana aktivnost

### 2.3.1 Slobodni radikali, uzroci i posledice njihovog nastanka i delovanja

Slobodni radikali su neutralne intermedijerne čestice koje u svojoj strukturi imaju najmanje jedan nesparen elektron što ih čini vrlo reaktivnim, neselektivnim, nestabilnim, sa visokim energetske potencijalom. Nastaju homolitičkim raskidanjem kovalentnih veza: termolizom,



elektromagnetnom radijacijom, redoks reakcijama, enzimskim procesima i hemijskim procesima (Acworth 2003).

Pored slobodnih radikala kao najreaktivnijih hemijskih vrsta, pro-oksidativno delovanje imaju i neradikalni oblici koji se ponašaju kao oksidansi i lako se prevode u radikale. Zbog svoje reaktivnosti slobodni radikali veoma lako podleću monomolekularnim i bimolekularnim reakcijama razlaganja (Halliwell i Gutteridge 1999), tako da se lako vezuju za biomolekule, posebno za proteine i lipide, što dovodi do lančane reakcije i pokretanja brojnih i nekontrolisanih složenih reakcija koje najčešće mogu dovesti do oštećenja ćelijskih zidova, i/ili drugih delova ćelije. Na taj način, ćelije brže stare i podleću degenerativnim procesima (Mc Cord 2000).

Nespareni elektron se može nalaziti na atomima različitih elemenata, pa se slobodni radikali mogu podeliti na:

1. reaktivne vrste kiseonika (ROS- Reactive Oxygen Species)
2. reaktivne vrste azota (RNS- Reactive Nitrogen Species)
3. reaktivne vrste hlora (RCS- Reactive Chlorine Species)
4. reaktivne vrste broma (RBS- Reactive Bromine Species)
5. reaktivne vrste sumpora (RSS- Reactive Sulphur Species) (Halliwell i Gutteridge 2006).

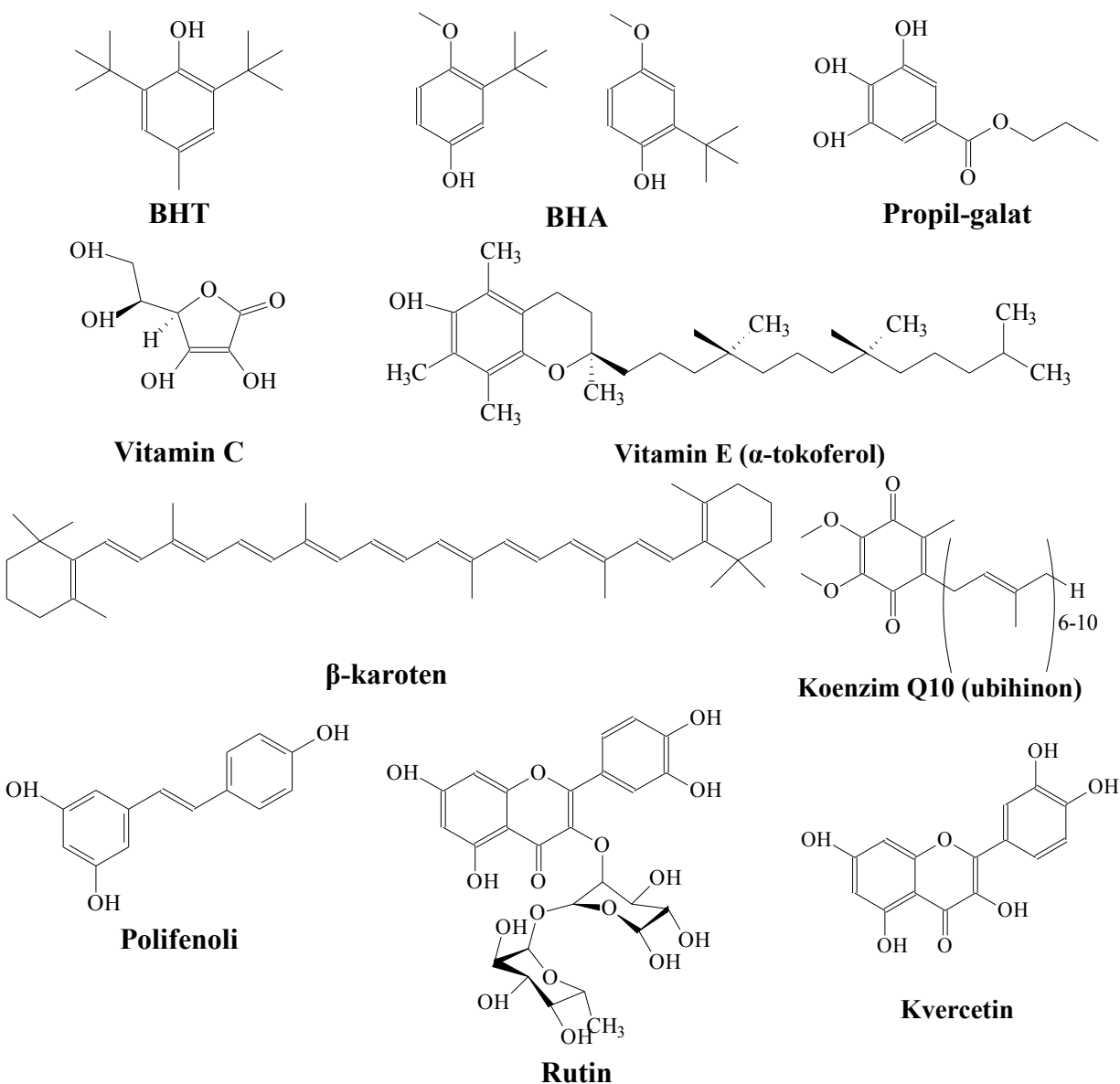
Hemijska jedinjenja koja u organizmu mogu da stvore potencijalno toksične kiseonične vrste nazivaju se pro-oksidansi, dok jedinjenja koja smanjuju štetan uticaj pro-oksidanasa, njihovo stvaranje i reakcije su antioksidansi (NADPH, GSH, vitamin C i vitamin E). U zdravoj ćeliji postoji ravnoteža između antioksidansa i pro-oksidansa. Ova ravnoteža može biti narušena usled hiperprodukcije ROS i RNS i smanjena aktivnost enzimskih i neenzimskih faktora i tom prilikom nastaje oksidativni odnosno nitrozativni stres.

Oksidativni stres je stanje u kome dolazi do poremećaja između produkcije reaktivnih vrsta i sistema zaštite, a može biti posledica smanjenja količine antioksidanasa, negativnog uticaja toksičnih agensa, povećanje produkcije ROS/RNS usled brojnih toksina i spoljnih štetnih uticaja ili od strane ćelija imunog sistema. Oksidativni stres može izazvati oštećenje biomolekula kao što su DNK, proteini i lipidi.

Balans između dobrih i loših efekata slobodnih radikala je jedan od važnih aspekata ćivih organizama, a postiže se mehanizmom koji se naziva „redoks regulacija“. Redoks regulacija štiti ćive organizme od oksidativnog stresa i održava redoks homeostazu kontrolišući redoks status *in vivo* (Droge 2002).

### 2.3.2 Antioksidansi

Antioksidansi su prirodne ili sintetske supstance koje, prisutne u malim količinama u odnosu na supstrat koji je podložan oksidaciji, imaju sposobnost da se suprotstave oksidaciji ili da inhibiraju reakcije koje iniciraju reaktivne vrste (Slika 3.). Ova jedinjenja se razlikuju po hemijskoj strukturi i imaju različite mehanizme delovanja. Ne postoji univerzalni antioksidans, već su različiti antioksidansi potrebni da bi se zaštitila ćelija od raznih biomolekula *in vivo* (Gutteridge i Halliwell 2010).



**Slika 3.** Najpoznatiji sintetski (BHT, BHA, propil-galat) i prirodni antioksidansi (vitamin C, vitamin E, β-karoten, koenzim Q<sub>10</sub>, polifenoli, rutin, kvercetin)

Antioksidansi deluju kao „hvatači“ slobodnih radikala, kompleksiraju jone metala, sprečavajući njihovu katalitičku funkciju u procesima razgradnje lipidnih peroksida i nastanka slobodnih radikala, razgrađuju perokside lipida, sprečavaju dejstvo singletnog kiseonika, inhibiraju neke enzime, pokazuju sinergističke efekte, redukuju neka jedinjenja itd.

Antioksidativna zaštita predstavlja dinamičku ravnotežu dejstava endogenih antioksidanasa (enzima antioksidativne zaštite i neenzimskih antioksidanasa) i produkcije ROS.

Antioksidativna zaštita organizma sa funkcionalnog aspekta obuhvata dva 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 antioksidansi se dele na:

1. enzimске (primarna linija odbrane): superoksid-dizmutaze, katalaza, ksantin-oksidaža, peroksidaze, glutacion-peroksidaza, glutacion-raduktaza, glutacion-S-transferaza
2. neenzimске (sekundarna linija odbrane):
  - a) liposolubilne (vitamin A, vitamin E, β-karoten, koenzim Q, flavonoidi i drugi fenoli, itd.). Deluju u lipidnoj fazi ćelijske membrane i membrana subcelularnih organela, kao i unutar serumskih lipoproteina.
  - b) hidrosolubilne (vitamin C, mokraćna kiselina, ceruloplazmin, glutacion, transferin, i dr.). Deluju u vodenoj fazi, ostvarujući interakciju sa liposolubilnim antioksidantima na graničnoj površini membrana.
3. enzimске antioksidanse 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. (*Dorđević i sar., 2000*). Nivo slobodnih radikala i ostalih reaktivnih vrsta u živim organizmima kontrolisan je od strane kompleksnog sistema antioksidativne odbrane koji smanjuje oštećenje biomolekula.

### ***2.3.3 Sekundarni metaboliti biljaka kao prirodni antioksidansi***

Tokom evolucije biljke su razvile efikasne odbrambene mehanizme protiv štetnih uticaja vidljive, ultraljubičaste svetlosti i zračenja, tako da biljke predstavljaju prirodan izvor različitih antioksidanasa. Sekundarni biomolekula viših biljaka kao što su fenoli, flavonoidi,

fenolkarboksilne kiseline, alkaloidi, terpenoidi i dr., ispoljavaju snažno antioksidativno delovanje (*Mimica-Dukić* 1997; *Wink* 2003).

Sintetski antioksidansi nakon duže upotrebe mogu ispoljiti neželjene efekte, stoga se pribegava upotrebi prirodnih antioksidanasa. Sekundarni metaboliti biljaka ispoljavaju antioksidativnu 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).

#### 2.3.4 Metode određivanja antioksidanasa

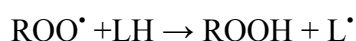
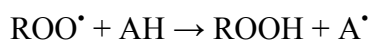
*In vitro* analitičke metode za određivanje antioksidativnog kapaciteta koriste dva različita pristupa: konkurentan i nekonkurentan tip reakcija.

U konkurentnoj reakciji ciljna vrsta tj. meta (biomolekuli koji mogu biti napadnuti *in vivo*) i antioksidansi se „takmiče“ za reaktivno jedinjenje (radikal ili neradikal). Procena antioksidativnog kapaciteta se zasniva na kvantifikaciji, tj. određuje se količina jedinjenja koje olakšava analitičko merenje i definiše se kao proba. Kod konkurentnih testova proba je ciljna vrsta ili oksidovani oblik. Proba može biti i neka vrsta koja se dodaje nakon navedenih reakcija koje prate kvantifikaciju preostalih reaktivnih vrsta ili ciljnih molekula.

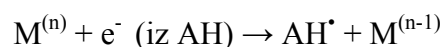
U nekonkurentnim testovima, navedena je reakcija između antioksidansa i reaktivne vrste u odsustvu ciljnih molekula, što u početnoj smeši, uključuje dve komponente, koje takođe mogu biti probe za praćenje reakcije. Preostale reaktivne vrste se mogu meriti dodatkom pogodnog reagensa (*Magalhaes* i sar., 2007).

Metode koje se koriste za određivanje antioksidativnog kapaciteta mogu se podeliti u tri velike grupe:

1. Vodonik transfer metode su: ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity), TRAP (Total Radical trapping Antioxidant Parameter), Crocin test izbeljivanja (Crocin Bleaching Assay), inhibirajuća potrošnja kiseonika (Inhibited Oxygen Uptake, IOU), inhibicija oksidacije linoleinske kiseline i inhibicija oksidacije LDL. Ove metode zasnivaju se na reakcijama:



2. Elektron transfer metode su: ABTS (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina)), DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil), FRAP (Ferric ion Reducing Antioxidant Parameter), CUPRAC (CUPric Reducing Antioxidant Capacity), određivanje ukupnih fenola Folin-Sjoklto reagensom i zasnivuju se na opštoj reakciji:

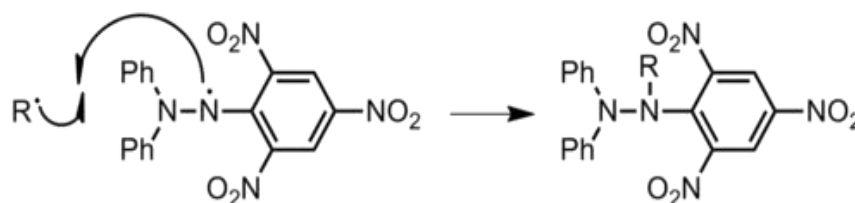


3. Ostale metode: TOSC (Total Oxidant Scavenging Capacity) i hemiluminiscencija (ChemiLuminescence, CL) (Brar i sar., 2013).

#### 2.3.4.1 DPPH metoda

Metoda sa DPPH<sup>•</sup> radikalom se široko primenjuje pri određivanju „scavenging“ aktivnosti prema dugotijevim radikalima. Određivanje „scavenging“ antioksidativnog slobodno-radikalskog kapaciteta prema 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikalom zasniva se na redukciji ljubičastog 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikala (DPPH<sup>•</sup>) odgovarajućim antioksidansima do blede-žuto difenilpikrilhidrazina. Nivo smanjenja inteziteta obojenosti rastvora DPPH<sup>•</sup> radikala ukazuje na „scavenging“ potencijal antioksidativnih jedinjenja (Liu i sar., 2004).

2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal (DPPH<sup>•</sup>) je stabilan i obojen sa maksimumom apsorpcije na 517 nm. Antioksidansi, donori vodonika u reakciji sa DPPH<sup>•</sup> radikalima vrše njihovu redukciju do žuto obojenog difenilpikrilhidrazina, što dovodi do smanjenja apsorpcije na 517 nm (Slika 4.).



**Slika 4.** Mehanizam neutralisanja slobodnog radikala DPPH radikalom

Sterni prilaz DPPH<sup>•</sup> određuje reakciju, jer mali molekuli lakše prilaze ovom radikalom i imaju relativno veći antioksidativni kapacitet. Sa druge strane, veoma veliki antioksidansi, koji brzo reaguju sa peroksi radikalom, u ovom slučaju reaguju sporo ili ne reaguju. Spektrofotometrijska merenja mogu biti ometana uticajem jedinjenja, kao što su karotenoidi koji apsorbuju na talasnoj dužini određivanja kao i zamućenošću uzoraka.

Rezultati ispitivanja antioksidativne aktivnosti ovom metodom se mogu predstaviti kao efikasna koncentracija ( $EC_{50}$ ): količina antioksidansa koja smanjuje koncentraciju DPPH za 50 %. Vreme potrebno da se postigne stabilno stanje sa efikasnom koncentracijom ( $EC_{50}$ ) je izračunato iz kinetičke krive i definiše se kao  $TEC_{50}$ .

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

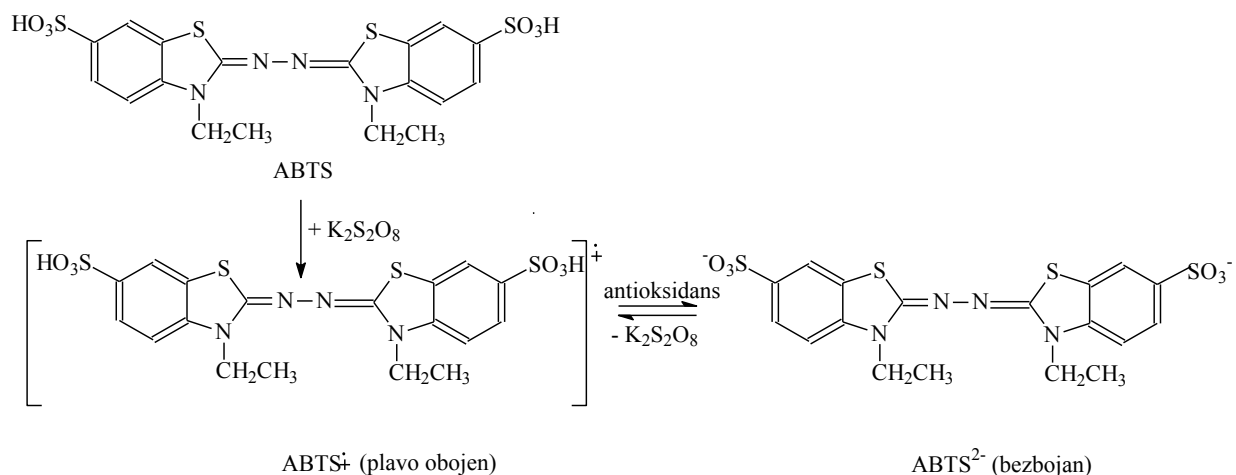
#### **2.3.4.2 ABTS metoda**

Radikalni katjon test je spektrofotometrijska metoda koja se koristi za određivanja antioksidativne aktivnosti lipofilnih i hidrofilnih jedinjenja.

Mehanizam ABTS metode sličan je mehanizmu DPPH metode, ali se ovde kao radikal koristi plavo-zelena obojeni radikal kation 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske) kiseline koji se formira oksidacijom rastvora ABTS. Obe metode zasnovane su na sposobnosti antioksidansa da neutrališe delovanje slobodnog radikala:  $ABTS^{+}$  kod ABTS metode ili DPPH<sup>\*</sup> u DPPH metodi.

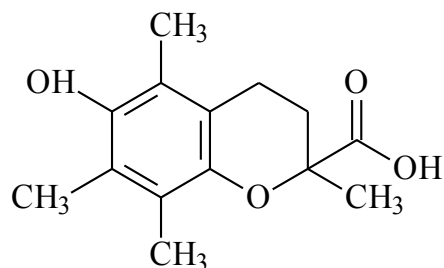
Ispitivanje antioksidativne aktivnosti  $ABTS^{+}$  metodom zasniva se na merenju stepena obezbojavanja  $ABTS^{+}$  radikala u prisustvu antioksidanasa. Dodavanjem antioksidansa,  $ABTS^{+}$  uzorku dolazi do obezbojavanja plavo-zelenog rastvora, a nastala promena se detektuje spektrofotometrijski pri talasnoj dužini od 734 nm (Slika 5.).

2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina), odnosno,  $ABTS^{+}$  radikalni katjon se dobija oksidacijom ABTS kalijum persulfatom pre dodavanja antioksidanasa. Relativno stabilan  $ABTS^{+}$  radikal je zelene boje i kvantifikuje se spektrofotometrijski sa maksimumom apsorpcije na 734 nm. ABTS test je urađen po metodi koju su prvobitno opisali Re i sar., (1999).  $ABTS^{+}$  je dobijen inkubacijom vodenog rastvora ABTS sa  $K_2S_2O_8$ , tokom 16 sati u mraku, na sobnoj temperaturi.



**Slika 5.** Mehanizam delovanja ABTS katjon radikala

Ovako nastali ABTS<sup>•+</sup> reaguje sa antioksidansima pri čemu se obezbojava, a smanjenje intenziteta boje srazmerno je količini prisutnih antioksidanasa. Antioksidansi inhibiraju ovu reakciju oksidacije srazmerno svojoj koncentraciji i onemogućavaju razvijanje boje. Step en inhibicije se poredi sa stepenom inhibicije za sintetski antioksidans 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilroman-2-karboksilnu kiselinu (Troloks) (Slika 6).



**Slika 6.** Troloks

### 2.3.5 Određivanje ukupnog sadržaja (poli)fenolnih jedinjenja u biljnim ekstraktima

Fenolna jedinjenja nalaze se u svim biljnim tkivima i predstavljaju najčešće i najaktivnije biljne antioksidanse. U svojoj strukturi imaju aromatični prsten sa najmanje jednom hidroksilnom grupom i pokazuju aktivnost kako u hidrofilnim, tako i u lipofilnim sistemima. Najčešće se javljaju u obliku glikozida, što im omogućava rastvorljivost u vodi.

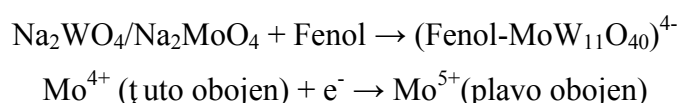
Fenoli pokazuju antioksidativnu aktivnost jer su donori vodonikovih atoma i kao takvi uklanjaju slobodne radikale, uz formiranje fenoksil radikala, koji je stabilizovan rezonancijom, a

samim tim je i 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 proteine i lipide.

Uloga bioloških antioksidanasa može biti ograničena zbog mogućeg citotoksičnog delovanja, pa se reaktivnost fenoksi radikala mora uzeti u obzir u razvoju novih antioksidativnih preparata.

Fenolna jedinjenja mogu reagovati sa lipidima i proteinima iz ćelijske membrane čime se sprečava njeno oštećenje. 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 antioksidansi mogu različitim mehanizmima sprečiti oksidativna oštećenja DNK i nastanak mnogih bolesti (*Hung i sar.*, 2004).

Folin-Sjoklto (Folin-Ciocalteu) metoda za određivanje sadržaja ukupnih rastvornih fenola zasnovana je na redukcionoj sposobnosti fenolnih hidroksilnih grupa. Pri tome dolazi do disocijacije polifenolnih jedinjenja pri čemu nastaje proton i fenoksidni anjon, koji redukuje Folin-Sjoklto reagens do plavo obojenog jona (Fenol-MoW<sub>11</sub>O<sub>40</sub>)<sup>4-</sup>:



Nedostatak metode je njena nedovoljna specifičnost, jer se biljni fenoli detektuju sa različitom osetljivošću. Folin-Sjoklto reagens je nespecifičan za fenolna jedinjenja jer može biti redukovan od strane mnogih drugih jedinjenja kao što su npr.: aromatični amini, sumpor dioksid, vitamin C, Cu<sup>1+</sup> i Fe<sup>2+</sup>. Da bi se uklonile ometajuće supstance potrebno je podestiti pH rastvora (pH≈10). U baznoj sredini najpre dolazi do deprotonovanja fenolnog jedinjenja uz nastajanje fenolatnog jona koji može da redukuje Folin-Sjoklto reagens. Kao posledica redukcije nastaje plavi kompleks, koordinativno vezanih fenolnih jedinjenja za molibden, koji apsorbuje na λ=750-765 nm i može se odrediti spektrofotometrijskim metodama.

Bez obzira na nespecifičnost Folin-Sjoklto reagensa ova metoda je prihvaćena, jednostavna je i reproduktivna, dok je sam reagens komercijalno dostupan, a apsorpcija od strane



komponenta matrice uzoraka je minimalna. Postoji odlična linearna korelacija između Folin-Sjoklto testa i drugih elektron-transfer testova (TEAC, DPPH).

### 2.3.6 Određivanje ukupnog sadržaja flavonoida u biljnim ekstraktima

Flavonoidi čine najveću grupu biljnih fenola. Raznovrsnost i veliki broj flavonoida posledica su 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).

Biološka i farmakološka svojstva flavonoida u vezi su sa inhibicijom određenih enzima i njihovom antioksidativnom aktivnošću.

Brojna istraživanja ukazuju da je antioksidativna aktivnost flavonoida znatno veća od aktivnosti vitamina C i E, kao i od mnogih komercijalnih sintetskih preparata (*Prior* i *Cao* 2000; *Dragović-Uzelac* i sar., 2009).

Antioksidativna svojstva flavonoidi mogu ispoljiti na nekoliko načina:

1. uklanjanjem hidroksil radikala, peroksi radikala, „hvatači“ su superoksid anjon radikala
2. uklanjanjem singletnog kiseonika
3. aktiviranjem antioksidantnih enzima indukujući enzime II faze detoksikacije (NAD(P)H oksidoreduktazu, glutation S-transferazu i UDP-glukuronozil transferazu) koji predstavljaju glavne sisteme odbrane od elektrofilnih toksikanata i oksidativnog stresa (*Nerland* i sar., 2007; *Malbert* 2014)
4. redukciji  $\alpha$ -tokoferol radikal koji je potencijalni prooksidans (*Aziza* i sar., 2010)
5. sprečavanjem Fentonove reakcije, što je uslovljeno rasporedom hidroksilnih grupa u molekulu i omogućavanjem stvaranja stabilnih helatnih kompleksa sa jonima gvožđa i bakra (*Ferrali* i sar., 1997).

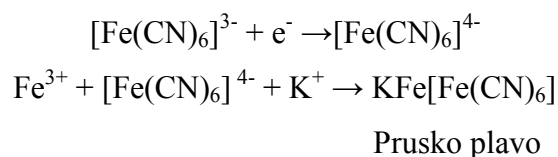
Glikozilacija jedne ili više -OH grupa flavonoida znatno smanjuje antioksidativnu aktivnost. Pored antioksidativne aktivnosti flavonoidi mogu izraziti i svoju prooksidantnu aktivnost koja je direktno proporcionalna ukupnom broju hidroksilnih grupa u molekulu flavonoida (*Hanasaki* i sar., 1994). Takođe, flavonoidi pokazuju antiinflamatornu, antialergijsku, antimikrobnu, hepatoprotektivnu, antiviralnu, kardioprotektivnu, antidijabetsku, antikancerogenu i mnoge druge aktivnosti.

Flavonoidi i njihovi glikozidi imaju osobinu da sa metalima grade odgovarajuće koordinativne komplekse, a posebno je važan  $Al^{3+}$  kompleks.

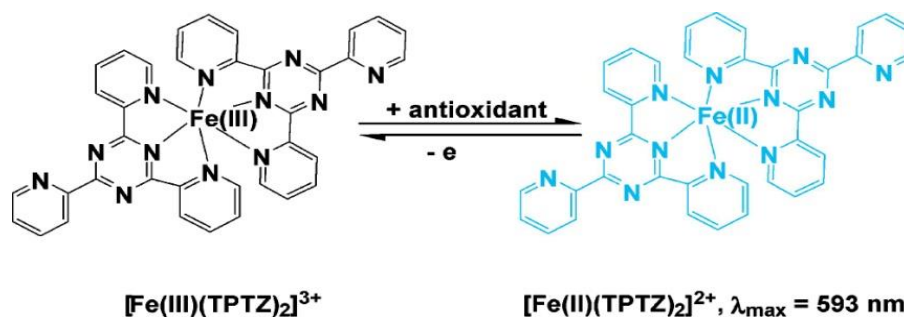
S obzirom na veliku raznovrsnost jedinjenja koja se svrstavaju u klasu flavonoida, i to da se uglavnom javljaju u obliku glikozida, teško je pronaći idealnu metodu za određivanje njihovog ukupnog sadržaja. Ova metoda nije selektivna, jer pozitivnu reakciju daju i jedinjenja koja imaju dostupne *o*-dihidroksifenolne, 3-hidroksihromonske, 5-hidroksihromonske i *o*-hidroksikarbonilne funkcionalne grupe.

### 2.3.7 Određivanje $Fe^{3+}/Fe^{2+}$ redoks kapaciteta (FRAP)

$Fe^{3+}/Fe^{2+}$  redoks kapacitet je pokazatelj sposobnosti antioksidansa da predaje elektron. Određivanje se zasniva na reakciji:



Redoks aktivnost se često koristi u cilju ispitivanja elektron-donorskog kapaciteta antioksidanasa, kao jednog od najznačajnijih mehanizama njihovog delovanja (Yildirim i sar., 2001). Metoda se zasniva se na sposobnosti antioksidanasa da redukuju gvožđ-2,4,6-tripiridil-S-triazin kompleks  $[Fe(III)-(TPTZ)_2]^{3+}$  do intenzivno plavo obojenog kompleksa  $[Fe(II)-(TPTZ)_2]^{2+}$  u kiseloj sredini (Slika 7.). Intenzitet plave boje meren spektrofotometrijski na 700 nm je upravo proporcionalan redukcionalnoj moći.



Slika 7. Redukcija kompleksa  $[Fe(III)-(TPTZ)_2]^{3+}$  do kompleksa  $[Fe(II)-(TPTZ)_2]^{2+}$

Svako jedinjenje sa redoks potencijalom niži od redoks potencijala para  $Fe^{3+}/Fe^{2+}$ , teorijski može redukovati  $Fe^{3+}$  do  $Fe^{2+}$ , pa se korišćenjem ove metode mogu dobiti lažno visoke FRAP-vrednosti. Sa druge strane, mnogi antioksidansi ne mogu dovoljno brzo redukovati  $Fe^{3+}$  kako bi se brzina reakcije mogla meriti u posmatranom vremenskom intervalu (obično 4 minuta). U zavisnosti od vremena analize redosled njihove reaktivnosti se menja. Polifenoli sa takvim ponašanjem su: kvercetin, ferulinska, kofeinska i taninska kiselina.

Antioksidansi koji deluju kao „gasioci“ radikala (transferom H-atoma) ne mogu se određivati ovom metodom.

## **2.4 Antimikrobna aktivnost**

### **2.4.1 Antibakterijska aktivnost**

Patogeni mikroorganizmi u zavisnosti od fizioloških uslova mogu izazivati oboljenja kod ljudi i/ili životinja. U patogene mikroorganizme ubrajaju se bakterije, virusi, gljivice i paraziti. Bakterije su jednoćelijski prokariotski mikroorganizmi, koji žive samostalno ili u raznim grupacijama ili kolonijama. Svoje patogeno dejstvo pojedine vrste bakterija ispoljavaju direktnim uništavanjem ćelije domaćina, a druge (u koje spada najveći broj bakterijskih vrsta) proizvode toksine koji nanose štetu metabolizmu ćelija domaćina.

U ovom istraživanju ispitivano je delovanje etarskih ulja i ekstrakata različite polarnosti biljnih vrsta *Seseli rigidum* i *Seseli pallasii* prema sledećim bakterijskim vrstama: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*.

*Escherichia coli* pripada grupi Gram (-), pokretnih i fakultativno anaerobnih bakterija. Štapičastog je oblika i može se naći pojedinačno, u parovima ili u nepravilnim grupacijama. Raste dobro na većini podloga. Iako je deo normalne flore digestivnog trakta čoveka, ova bakterija se često izoluje kao etiološki agens različitih patogenih infekcija: sepse, meningitisa novorođenčadi, infekcije urinarnog trakta ili teških intrahospitalnih infekcija. *E. coli* je osetljiva na delovanje gentamicina, tetraciklina, polimiksina, hloramfenikola, kolicina, ampicilina i cefalosporina, a otporna na benzil-penicilin. Međutim, *E. coli* vrlo brzo stiče otpornost na antibiotike prema kojima je osetljiva.

*Pseudomonas aeruginosa* pripada grupi Gram (-) bakterija. Izaziva infekcije kod osoba sa oslabljenim imunitetom. Nema kapsulu, ne stvara sporu i veoma je otporna. Na osnovu

mikroskopskog preparata se teško prepoznaje. Pripada nefermentujućim bakterijama i ne razlaže laktozu. Kolonije nisu pigmentisane, ali proizvode dva pigmenta: pijocijanin (plavozelene boje) i fluorescein (zelenožute boje). Oba pigmenta difunduju u podlogu i okružuju kolonije. Otporan je na većinu antibiotika i poseduje prirodnu otpornost prema penicilinu i  $\beta$ -laktamskim antibioticima. Ova otpornost se objašnjava postojanjem specifičnog ćelijskog zida, kao i mogućnošću da izbacuje antibiotik iz ćelije pre nego što on počne da deluje.

*Staphylococcus aureus*, su Gram (+) bakterije loptastog oblika. Ubrajaju se u anaerobne bakterije. Kolonije porasle na agaru na dnevnom svetlu na sobnoj temperaturi mogu imati belu, zelenkastozutu ili zlatnozutu boju. S obzirom da proizvode  $\beta$ -laktamaze i poseduje druge mehanizme rezistencije jedan je od najvažnijih bakterijskih agenasa u humanoj medicini. *S. aureus* je veoma je rasprostranjen u ljudskoj populaciji, dok je medicinski značajan zbog svoje patogenosti i rezistencije usled upotrebe penicilina i drugih antibiotika.

*Bacillus subtilis* pripada grupi Gram (+) bakterija sa sporom i raste na većini hranljivih podloga. Njegove spore su ubikvitarne, nalaze se u slobodnoj prirodi, povrću, mleku, kobasicama i one su deo normalne mikroflore čoveka. Ova vrsta bakterija je čest kontaminant bakterioloških podloga.

Supstance koje ubijaju mikroorganizme ili sprečavaju njihovo razmnožavanje u životnom organizmu, a mogu se koristiti za lečenje i sprečavanje zaraznih bolesti nazivaju se jednim imenom hemioterapijska sredstva (Karakašević 1987). Hemioterapijska sredstva se dele na hemioterapeutike i antibiotike. Hemioterapeutici su antimikrobna jedinjenja za lečenje i sprečavanje zaraznih oboljenja koja se dobijaju sintetskim putem iz raznih neživotnih materija, dok su antibiotici antimikrobna jedinjenja koja se dobijaju iz životnih bića, najčešće iz bakterija i gljiva. Međutim, danas se neki antibiotici sintetišu od hemijskih sirovina, a osnovna antibiotska jedinjenja koja se dobijaju iz životnih bića se hemijski modifikuju.

Hemioterapeutici i antibiotici deluju mikrobiostatički i mikrobiocidno.

Metabolički antagonizam nastaje kada antibiotik, usled hemijske sličnosti sa nekim od esencijanih metabolita mikroorganizma i većeg afiniteta prema enzimu stupa u reakciju sa enzimom pri čemu nastaje nefunkcionalno jedinjenje koje onemogućava bakterijskoj ćeliji sintezu određenih bitnih jedinjenja i stoga ćelija prestaje da raste ili umire.

Bakterijska ćelija koja ne može da sintetiše ćelijski zid ostaje bez mogućnosti da reguliše osmotske procese, ali i bez vrlo važnih jedinjenja koja se nalaze u ćelijskom zidu. Takođe,

hemioterapijska sredstva mogu da inhibiraju pojedina jedinjenja u ćelijskom zidu, a time i sintezu ćelijskog zida, pri čemu dolazi do pucanja ćelijskog zida, citoplazma izlazi iz ćelije i dolazi do smrti bakterije. U grupu antibiotika koji deluju na ovaj način svrstavaju se: penicilini, cefalosporini ( $\beta$ -laktamski antibiotici), vankomicin, bacitracin i cikloserin.

U ovom istraživanju kao referentni antibiotici su korišćeni tetraciklin i nistatin.

Tetraciklin je antibiotik širokog spektra dejstva. Deluje bakteriostatski, a ne baktericidno. Spektar antimikrobnog delovanja tetraciklina veoma je širok i obuhvata Gram (+) bakterije i Gram (-) bakterije. Međutim, mnogi sojevi mikroorganizama postali su rezistentni na ove lekove i to je smanjilo njihovu efikasnost.

Nistatin je polienski antibiotik koji deluje fungistatički i fungicidno na veliki broj gljivica *in vitro*. Zbog karakteristične strukture vezuje se za molekule ergosterola u membrani gljivice i uzrokuje stvaranje šupljina u membrani (do tada nepropusna membrana postaje vrlo propustljiva i gubi svoju funkciju) što uništava integritet i izaziva njeno odumiranje. Nistatin ne deluje na bakterije, protozoe i viruse. Nistatin deluje fungistatski i fungicidno na saprofitske i parazitske kvasnice, naročito na *Candida* spp.

Poslednjih decenija u velikom porastu je rezistencija mikroorganizama na antibiotike. Rezistencija se prenosi uglavnom preko plazmida i pošto plazmidi imaju gene za rezistenciju prema drugim antibioticima, mikroorganizmi mogu postati rezistentni i na druge lekove istovremeno. Prenosjenje plazmida može se obavljati konjugacijom (koja se vrši kod Gram (-) bakterija) i transdukcijom (kod Gram (+) bakterija).

Sintetski antibiotici su značajno uticali na smanjenje rizika od nastanka zaraznih bolesti. Međutim, vremenom bakterijske infekcije su postale sve učestalije usled rezistencije bakterija na sintetske antibiotike (*Russell* 2003), pa je sve veća potreba za prirodnim i neškodljivim antimikrobnim supstancama.

Nove antimikrobne supstance, koje se izoluju ne samo iz mikroorganizama već i iz različitih biljaka su od velikog interesa i značaja, te se stoga poslednjih godina dosta radi se na njihovom ispitivanju. Kao najjeftinija i najefikasnija jedinjenja sa antimikrobnim delovanjem pokazala su se etarska ulja i ekstrakti biljaka i/ili njihove aktivne komponente.

#### 2.4.2 Antifungalna aktivnost etarskih ulja i ekstrakata

Poslednjih godina sintetisan je veliki broj različitih antifungalnih agenasa u cilju tretiranja infektivnih bolesti izazvanih gljivicama. U razvijenijim zemljama brojni sintetski fungicidi su zabranjeni zbog visoke toksičnosti, dugog perioda degradacije, akumulacije u lancima ishrane i neselektivnog delovanja, jer uništavaju i korisne i štetne organizme (*Strange* 1993). Zbog navedenih osobina, ispitivanje antifungalnog dejstva ekstrakata i etarskih ulja od velike je važnosti za suzbijanje uzročnika bolesti biljaka, životinja i čoveka.

U ovom istraživanju ispitivano je delovanje etarskih ulja i ekstrakata odabranih biljnih vrsta roda *Seseli* i upoređivano sa delovanjem referentnih antibiotika na gljivice *Candida albicans* i *Aspergillus niger*.

Rod *Candida* je brojna i vrlo heterogen. Vrste koje pripadaju ovom rodu razmnožavaju se vegetativno - pupljenjem. U procesu analognom pupljenju, mogu da formiraju blastospore. *Candida albicans* je polimorfna vrsta ovalnog oblika, ali može imati više morfoloških formi. Ova gljivica izaziva oboljenja poznata kao kandidijaze. Zajedno sa ostalim vrstama ovoga roda nalazi se u koži, ustima, vagini i crevima kao normalna telesna flora. Infekcije nastaju kada ostala bakterijska kompetitorska flora biva limitirana upotrebom antibiotika koji nemaju fungicidno delovanje (*Matejić* 2013).

Gljivice iz roda *Aspergillus*, kome pripada i *Aspergillus niger* izazivaju plesni na različitim supstratima. Konidiofori su im jednoćelijski, nerazgranati, sa loptastim proširenjima na vrhu zvanim vezikula. Konidijalne glavice *A. niger* su mrke, okrugle i radijalne, ali mogu obrazovati sklerocije krem boje. To je brzo rastuća kolonija na selektivnim mikološkim podlogama. Učestvuje u produkciji enzima (amilaze i amiloglukozidaze), u produkciji oksalne i fumarne kiseline, dok se u industriji koristi za razlaganje plastike i celuloze. Čest je uzročnik kvarenja hrane, inficiranja mesa i jaja, zbog čestog prisustva u zemljištu i raspadajućem biljnom materijalu. Kod ljudi može izazivati infekciju očiju, a usled inhalacije spora pojavu alergijskih reakcija (*Matejić* 2013).

Zahvaljujući hemijskoj strukturi, etarska ulja uništavaju mikroorganizme tako što dovode do oštećenja citoplazmatske membrane, koagulacije intraplazmatskog sadržaja, inhibicije sinteze proteina, kao i kočenja i inhibicije jonskog transporta, što za posledicu ima difuziju intraplazmatskog sadržaja u intercelularni prostor, odnosno spoljnu sredinu.

S obzirom da etarska ulja predstavljaju smešu velikog broja različitih hemijskih komponenti može se pretpostaviti da se njihova aktivnost ne bazira na jednom specifičnom mehanizmu već da postoji nekoliko ciljnih mesta delovanja (*Skandamis i sar.*, 2001; *Carson i sar.*, 2002). Osim toga, pored direktnih efekata koji su posledica delovanja etarskih ulja, javljaju se i mnogobrojni sekundarni efekti. Mehanizam antimikrobnog delovanja zasnovan je na prisustvu hidrofilnih grupa, najčešće OH-grupe vezane za fenolni prsten i/ili lipofilnosti.

Važna osobina etarskih ulja je i njihova hidrofobnost usled koje se ulja rastvaraju u lipidnom dvosloju bakterijskih ćelijskih membrana dovodeći do njihove promene u strukturi i permeabilnosti (*Sikkema i sar.*, 1994), što izaziva izlazak jona i drugih ćelijskih komponenti iz ćelije (*Cox i sar.*, 2001; *Lambert i sar.*, 2001; *Skandamis i sar.*, 2001; *Carson i sar.*, 2002; *Ultee i sar.*, 2002; *Nguefack i sar.*, 2004) usled čega, kao sekundarni efekat, nastupa ćelijska smrt (*Denyer i Hugo*, 1991).

Generalno, etarska ulja poseduju snažnu antimikrobnu aktivnost protiv patogenih bakterija jer sadrže visok procenat fenolnih komponenti. Njihov mehanizam delovanja je sličan delovanju ostalih fenolnih jedinjenja: reaguju sa citoplazmatskom membranom izazivajući njene lezije i promenu permeabilnosti, što rezultuje u promeni membranskog potencijala, intracelularne pH sredine, tj. pH-gradijenta i efluksu Na<sup>+</sup>-jona (*Nguefack i sar.*, 2004). Etarska ulja utiču izmeću ostalog na transport kroz proteinske kanale citoplazmatske membrane (*Knobloch i sar.*, 1989) za šta se pretpostavlja da postoje dva mehanizma:

1. lipofilni molekuli se akumuliraju u lipidnom dvosloju i dovode do distorzije u lipidno-proteinskim interakcijama
2. direktna interakcija lipidnih komponenti sa hidrofobnim delovima proteina (*Sikkema i sar.*, 1995).

Etarska ulja osim što vrše inhibiciju rasta vegetativnih bakterijskih ćelija, dovode i do inhibicije produkcije toksina.

Antifugalnu aktivnost prema sojevima *C. albicans*, *A. flavus*, *C. sphaerospermum*, *P. digitatum* i *P. italicum* pokazuju mnogi flavonoidi izolovani iz raznih biljaka i propolisa (*Cafarchia i sar.*, 1999).

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

U okviru familije Apiaceae, vršena su mnoga ispitivanja kako hemijskog sastava, tako i same biološke aktivnosti različitih ekstrakata. Na osnovu ranijih istraživanja vrsta roda *Seseli*, utvrđeno je da heksanski ekstrakti *S. resinosum* i *S. hartvigii* inhibiraju rast bakterije *S. aureus*, ali ne i rast ostalih ispitivanih bakterija (Tosun i sar., 2004). Metanolni ekstrakt *S. libanotis* sa područja Turske izrađeno inhibira rast 29 od 107 ispitivanih sojeva mikroorganizama (Ozturk i Ercisli 2006). Metanolni ekstrakt vrste *S. pallasii* poseduje toksičan efekat i inhibira rast larvi vrste *Spodoptera littoralis* (Pavela 2011) i *Culex quinquefasciatus* (Pavela 2009). Pokazano je i da se u metanolnim ekstraktima tri ispitivana taksona *Seseli pallasii* Besser, *S. libanotis* (L.) Koch ssp. *libanotis* i *S. libanotis* (L.) Koch ssp. *intermedium* (Rupr.) P. W. Ball, nalaze polifenolna jedinjenja, koja su odgovorna za njihovu dobru antioksidativnu i antimikrobnu aktivnost (Matejić i sar., 2012).

#### **2.4.3 Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIC, Minimal Inhibition Concentration) i minimalne baktericidne koncentracije (MBC, Minimal Bactericidal Concentration)**

Minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) je najniža koncentracija ispitivane supstance koja zaustavlja rast bakterija, dok se najniža koncentracija koja izaziva smrt bakterija označava kao minimalna baktericidna koncentracija (MBC). Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije se primenjuje prilikom ispitivanja antimikrobnih svojstava prirodnih proizvoda, uključujući ekstrakte i pojedinačna izolovana jedinjenja. Metoda je brza, osetljiva, relativno jeftina, pouzdana i pomoću nje je moguće utvrditi minimalne inhibitorne i baktericidne koncentracije antimikrobnih agenasa. Kao indikator ćelijskog rasta, osim u MIC metodi, i u mnogim drugim testovima primenjuje se resazurin. U oksidovanom obliku resazurin je plave boje i nije fluorescentan niti toksičan, što mu omogućava veliku primenu. U uslovima ćelijskog rasta, delovanjem ćelijskih oksidoreduktaza, redukuje se u fluorescentan rezorufin koji je ružičaste boje. Difuzionim metodama je moguće ispitati osetljivost bakterija prema određenoj supstanci, ali je metoda kvalitativna, a ne i kvantitativna. Za razliku od difuzionih, dilucione metode su i kvantitativne, jer je njima moguće utvrditi MIC ispitivanih uzoraka.



## 2.5 Antiholinesterazna aktivnost

### 2.5.1. Značaj i uloga holinesteraze

Funkciju hidrolize acetilholina kod kičmenjaka obavljaju dva enzima: specifična acetilholinesteraza (acetilholin-acetil-hidrolaza, EC.3.1.1.7) i nespecifična, butirilholinesteraza (acil-holin-acil-hidrolaza, EC.3.1.1.8). Aktivnost holinesteraze u serumu potiče uglavnom od butirilholinesteraza, dok je acetilholinesteraza zastupljena u tragovima (Lewis 1981).

Acetilholinesteraza je stabilan enzim, rastvoran u vodi, koji katalizuje hidrolizu neurotransmitera acetil-holina na post-sinaptičkim membranama neuromuskularnih spojeva. Butirilholinesteraza se sintetiše u jetri. Odgovorna je za hidrolizu kako acetil-holina i drugih estara holina. Najveću aktivnost ispoljava prema butirilholinu. Joni  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{Mg}^{2+}$  aktiviraju holinesterazu. Holinesterazu inhibiraju mnoga jedinjenja različite strukture i upotrebe (Tietz 1997), shodno tome ima široku primenu u analitici.

### 2.5.2 Metode za određivanje aktivnosti holinesteraze

Aktivnost enzima holinesteraze se može odrediti elektrometrijski, titrimetrijski, potenciometrijski, manometrijski, kolorimetrijski, konduktometrijski, radiometrijski ili fluorometrijski.

Titrimetrijske metode određivanja aktivnosti holinesteraze se baziraju na merenju količine oslobođenog vodonikovog jona usled hidrolize acetil-holina, direktnim očitavanjem promene pH vrednosti u toku 60-90 minuta ili na osnovu promene boje fenol-crveno indikatora nakon inkubacionog perioda od 30 minuta.

Elektrometrijska procedura zahteva specijalizovanu opremu. U osnovi metode je titracija, kontinuirano dodavanje baze koja neutrališe jone vodonika oslobođenog pri hidrolizi acetilholina. Sistem održava konstantnu pH vrednost enzimske reakcije, tako da je količina dodate baze direktno proporcionalna količini hidrolizovanog acetilholina.

U većini kolorimetrijskih i spektrofotometrijskih metoda za određivanje aktivnosti holinesteraze kao supstrati se koriste butiril-tioholin, benzoil-tioholin, propionil-tioholin ili acetil-tioholin.

Preporučena metoda za određivanje aktivnosti holinesteraze je Elmanova metoda. U ovoj metodi kao supstrat se koristi butiril-tioholin. Princip reakcije se zasniva na hidrolizi butiril-

tioholina do butirata i tioholina pod dejstvom serumske holinesteraze. Oslobođeni tioholin reaguje sa 5,5'-ditio-*bis*-(2-nitrobenzoevom kiselinom) (DTNB) i nastaje ťuto obojeni 5-tio-2-nitrobenzoat, čija se brzina formiranja meri kontinuirano merenjem apsorbancije na 405 nm. Metoda je veoma specifična, jer serumska holinesteraza ima dva puta veći afinitet prema butiril-tioholinu nego prema acetilholinu. Maksimalna enzimska aktivnost se postiťe pri pH 8,5-9 na 37 °C, ali se reakcija izvodi na pH 7,4 kako bi se izbegla neenzimska hidroliza supstrata.

U metodi sa heksacijanoferatom (III) kao supstrat se takođe koristi butiril-tioholin. Pod dejstvom serumske holinesteraze dolazi do hidrolize butiril-tioholina do butirata i tioholina. U sledećoj reakciji oslobođeni tioholin redukuje alkalni rastvor heksacijanoferata (III) koji je ťuto obojen do bezbojnog heksacijanoferata (II).

## **2.6 Metali u biljkama**

Gotovo svi metali prisutni u prirodi se mogu naći i u biljkama. Oni utiču na ťivotne procese, anatomsku i morfološku građu, hemijski sastav, prinos i rasprostranjenost određene biljne vrste. Biljke imaju vaťnu ulogu u kruťenju teških metala u prirodi. Teški metali preko biljaka ulaze u lanac ishrane. Teški, a istovremeno i toksični metali su oni čija je gustina veća od 5 g/cm<sup>3</sup>. Među njima ima neophodnih kao i onih koji pri većim koncentracijama deluju toksično na biljke.

Toksično dejstvo teških metala je rezultat jednog ili većeg broja poremećaja metabolitičkih procesa i/ili hemijskih reakcija:

1. većina metala, pri toksičnim koncentracijama, inhibira aktivnost enzima, a naročito Hg i Cu jer imaju veliki afinitet prema aktivnim mestima enzima. Ovi teški metali sa organskim molekulima grade helate i tako vezani prolaze kroz ćelijske membrane i dospevaju u samu ćeliju. Veliki afinitet prema sulfhidrilnim grupama imaju: Hg, Cd, Pb i Ag
2. mogu da katalizuju razgradnju vaťnih metabolita
3. reaguju sa sastojcima ćelijskih membrana (Ag, Hg, U, Au, Cd, Cu i Fe) i na taj način menjaju njihovu propustljivost kao i druge karakteristike
4. gvođesa anjonima biogenih elemenata kao što su PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> i SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> stvara talog ili moťe da gradi helate sa nekim metabolitom i na taj način onemogući njegovo dalje učešće u ćelijskim procesima.

Elementi se na osnovu zastupljenosti u biljkama mogu podeliti na: makro, mikro i ultramikroelemente. Ovakva podela elemenata ne odražava se na njihovu ulogu u metabolizmu biljaka. U makroelemente se ubrajaju: C, O, H, N, P, K, Ca, Mg, S, Na, Si i Cl. Sadržaj makroelemenata u suvoj materiji biljaka, ukoliko se izuzmu ugljenik, vodonik i kiseonik se kreće od 2-60 mg/g. U mikroelemente se ubrajaju Cu, Zn, B, Mn i dr., i njihov sadržaj u suvoj materiji biljaka je manji od 1 mg/g i/ili veći od 1µg/g. Sadržaj ultramikroelemenata u suvoj materiji biljaka, u koje se ubrajaju I, Se, Mo i dr., je manji od 1µg/g (*Mihaljev i sar.*, 2015).

U zavisnosti od značaja za biljku, elementi se mogu podeliti na: neophodne, korisne i ostale.

U neophodne elemente spadaju Ca, Mg, S, Fe, B, Mn, Cu, Zn, Cl, Mo, Co.

Odgovarajući element je neophodan biljci ukoliko ispunjava uslove:

1. u odsustvu elementa biljka ne može da vrši svoj životni ciklus,
2. omogućava normalan rast i razvoj biljke,
3. simptomi koji nastaju usled nedostatka određenog elementa mogu se ukloniti samo njegovim dodatkom,
4. njegova uloga u metaboličkim funkcijama biljaka je specifična i ne može se zameniti drugim elementom.

Korisni elementi su elementi koji nisu neophodni biljci, ali stimulatивно deluju na njen rast i razvoj.

Ostali elementi su elementi koji u malim koncentracijama ne utiču na rast i razvoj biljke, ali u većim količinama imaju toksično dejstvo. Takvi elementi su: Pb, Hg, Cd, Cr i dr.

Prema zastupljenosti u biljci elementi se mogu podeliti na makroelemente, mikroelemente i ultraelemente. Ovakva podela ne odražava njihov značaj u metabolizmu biljke, jer je važnost ovih elemenata za metabolizam biljke jednaka, samo je njihova uloga različita. Mikroelementi, za razliku od makroelemenata, deluju katalitički, u jako malim koncentracijama i strogo su specifični (*Tuzen* 2003).

### **2.6.1 Mehanizam usvajanja teških metala**

Biljke mogu da akumuliraju značajne količine teških metala, a da se na njima ne uočavaju znaci oštećanja. Tek kada koncentracija teških metala pređe određenu kritičnu granicu dolazi do poremećaja u životnim procesima biljaka a samim tim i do smanjenja produkcije organske materije.

Akumuliranje teških metala u pojedinim organima, pa i tkivima pojedinih vrsta biljaka je različito. Ovo je prvenstveno uslovljeno mehanizmom tolerancije biljaka prema teškim metalima i/ili njihovim neposrednim ili posrednim uključivanju u fiziološke i biohemijske procese. Na primer, Zn i Cu se prvenstveno akumuliraju u ćelijskom zidu ćelija korena i lista, dok neke biljne vrste u većoj meri Zn i Cu nakupljaju u vakuolama, a druge u mitohondrijama. Biljne vrste akumuliraju Pb u ćelijskom zidu, a Cd u zidu ćelija korena.

Na usvajanje, a samim tim i akumuliranje teških metala prvenstveno utiču:

1. ukupna koncentracija metala u zemljištu (sa povećanjem ukupne koncentracije metala povećava se usvajanje)
2. pH vrednost zemljišta (sa smanjenjem pH povećava se usvajanje metala).

### ***2.6.2 Uloga teških metala u biljkama***

Uticaj teških metala na životne procese biljaka je specifičan. Pojedine biljne vrste reaguju različito na prisustvo većih koncentracija teških metala. Teški metali mogu na biljke da deluju posredno ili neposredno i mogu da utiču na mineralnu ishranu biljaka, vodeni režim, disanje, fotosintezu i ostale fiziološko-biohemijske procese biljaka. Kao rezultat toga nastaju anatomske i morfološke promene, dolazi do smanjenja produkcije organske materije i do promene hemijskog sastava biljaka.

Biljke teške metale usvajaju iz zemljišta, a pod određenim uslovima i preko nadzemnih delova. Akumulacija teških metala u zemljištu može biti posledica prirodnih procesa ili/i antropogenih procesa, tj. kao rezultat zagađenja spoljašnje sredine.

Sadržaj organske materije u zemljištu može različito uticati na količinu teških metala u biljci. U zemljištima koja su bogata organskim materijama akumulacija Fe, Mn i Mo je intenzivnija, a u siromašnijim zemljištima značajno se povećava sadržaj Pb, Cd, Cu i Zn.

Tolerancija biljaka prema teškim metalima se može tumačiti na više načina. Prema mestu detoksikacije, mehanizmi tolerancije mogu biti spoljašnji i unutrašnji.

Sadržaj teških metala u biljkama se može koristiti kao indikator kontaminiranosti zemljišta na kome posmatrane biljke rastu. Teški metali su slabo pokretljivi u biljkama, pa je zbog toga njihov sadržaj u korenu biljke veći nego u nadzemnom delu. Ipak, neki teški metali (Cu, Mn, Zn, Mo) pokazuju dobru pokretljivost u biljkama, pa je njihov sadržaj jednak u svim delovima biljke.

### **2.6.3 Toksičnost teških metala**

Teški metali su široko rasprostranjeni u životnoj i radnoj sredini. Veliki značaj za prooksidativni efekat imaju metali kadmijum, olovo, živa, hrom, nikal, ali i biometali, kao što su bakar, gvožđe, zink, mangan, kobalt i selen. Teški metali mogu stimulisati formiranje slobodnih radikala, reaktivnih kiseoničnih vrsta i biomolekula u organizmu što uzrokuje oksidativni stres i dovode do lipidne peroksidacije membrane čime se narušava njena funkcionalnost i selektivnost pri transportu materija. Na ovaj način mogu nastati oštećenja ćelija, funkcije enzima ili genetskog materijala (DNK) (David 2001). Isto tako teški metali mogu predstavljati kontinuiranu opasnost kao karcinogeni za organizam ljudi (Kokilavani i sar., 2005).

### **2.6.4 Uticaj pojedinih teških metala na biljke**

#### **Gvožđe**

U ćelijama lista višak gvožđa je često vezan za jedan od fosfoproteina pri čemu gradi kristale fitoferitina. Gvožđe ima nezamenljivu funkciju u različitim redoks sistemima, zahvaljujući sposobnosti da lako prima ili otpušta elektron, na čemu se i zasniva aktivnost mnogih prenosioca elektrona u mitohondrijama ili hloroplastima. Citohromi sadrže jon gvožđa vezan za hem, a hem se nalazi i u nekim oksidazama, peroksidazi i katalazi. Nezavisno od prenosa elektrona, gvožđe je i aktivator nekih enzima koji učestvuju u sintezi porfirinskog prstena.

#### **Bakar**

Joni bakra ubrajaju se u neophodne mikroelemente čiji su biološki značaj prvi put eksperimentalno utvrdili Hatori i ostali (Hattory i Keith 2001). Bakar ima veoma važnu ulogu u biološkim procesima životnih organizama i to u vezivanju kiseonika, redoks procesima, elektron-transfer procesima i ulazi u sastav više od 15 enzima. Većina enzima (citohrom oksidaza, oksidaza askorbinske kiseline, tirozinaza i polifenol-oksidaza) koji sadrže jon bakra reaguju sa kiseonikom, koji se redukuje u H<sub>2</sub>O ili u H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Jon bakra učestuje u nekim redoks procesima, kao sastavni deo citohrom oksidaze u mitohondrijama i plastocijanima u hloroplastima. Za niže organizme jedinjenja bakra su otrovna. Bakar je vrlo toksičan za gljive, pa se odavno koristi kao

fungicid. Ima baktericidno dejstvo jer je kao tezak metal ireverzibilno taloži proteine. Biljke apsorbuju bakar u jonskom obliku ( $\text{Cu}^{2+}$ ) i helatnoj formi. Na rast viših biljaka bakar utiče povoljno jer stimuliše sintezu hlorofila.

Koncentracija bakra u zemljištu iznosi i do 100 ppm, ali je samo deo tog sadržaja aktivan. Uobičajne koncentracije bakra u biljnim tkivima su između 2-20 ppm (u suvoj supstanci), pa veće količine postaju toksične. Bakar je vezan za organske supstance, okside gvožđa i mangana, zemljišne silikate, glinu i druge minerale. Količina i distribucija ukupnog i pristupačnog bakra zavisi od tipa zemljišta i matičnog supstrata. U zemljištima kisele reakcije i sa visokim sadržajem humusa, bakar vezan za organsku supstancu se ne može mobilisati u dovoljnim količinama i javlja se njegov nedostatak.

Fitotoksičnost bakra ispoljava se morfološkim deformacijama korena. Prvi simptomi trovanja se manifestuju kao hloroze na listovima, a zatim list dobija crvenkasto-mrku boju i dolazi do defloracije. Toksični efekti bakra su izraženiji pri nižim pH (oko 5,5).

### **Cink**

Cink je sastavni deo alkoholne dehidrogenaze i od njega zavisi veza između NAD i apoenzima. Cink je aktivator karbonske anhidraze, koja oslobađa  $\text{CO}_2$  iz bikarbonata. Takođe je značajan aktivator nekih enzima u biosintezi triptofana (Nešković i sar., 2003). Pripisuje mu se uloga stimulatora rasta i aktivnost u povećanju tolerantnosti biljaka na sušu i uzročnike bolesti. Primarna uloga jona cinka ogleda se u procesu ćelijske replikacije i u metabolizmu nukleinskih kiselina (Škrbić i sar., 2002).

Prosečan sadržaj ukupnog cinka u površinskim slojevima raznih zemljišta u svetu je između 17-125 ppm (Kabata-Pendias i Pendias 1989). Ukupan sadržaj ovog elementa u zemljištu u velikoj meri zavisi od matičnog supstrata na kome je obrazovano zemljište, a glavni izvori zagađenja su: rudnici, železare, korišćenje otpadnih muljeva u poljoprivredi, kompostirani materijali, pesticidi i mineralna đubriva. Za dinamiku usvajanja cinka najbitniji faktori su pH-vrednost, sadržaj  $\text{CaCO}_3$  i mehanički sastav zemljišta (Ubavić i Bogdanović, 2001). Cink je u zemljištu zastupljen u obliku primarnih minerala (sulfidi, karbonati i fosfati) i sekundarnih kompleksa (helati). Najznačajniji antropogeni izvori cinka su topionice i rafinerije olovo-cinkanih ruda.

U kompeticiji je sa drugim metalima cink ometa apsorpciju metala, posebno mangana i gvođ Ča

Svoju fitotoksičnost cink ispoljava u vidu morfoloških deformacija (nizak rast, sitni listovi, nerazvijen korenov sistem) kada pređe granicu od 100 ppm (u suvoj supstanci). Povećanje koncentracije cinka u zemljištu inhibira fiksaciju elementarnog azota. MDK (maksimalno dozvoljena koncentracija štetnih supstanci u odgovarajućim sredinama) za cink iznosi 60 mg/kg (*FAO/WHO* 1999). Deficit jona cinka se posebno negativno odražava na ćelije i tkiva koja imaju brz rast. Toksične doze jona cinka vrlo je teško precizirati pošto ovo njegovo dejstvo zavisi od koncentracije i interakcije sa drugim mikroelementima prisutnim u hrani, prvenstveno jona gvođ Ča bakra i kalcijuma.

### ***Olovo***

Povećane količine olova pokazuju toksično dejstvo na biljke, a veoma štetno deluju na zdravlje životinja i ljudi. Prisustvo olova u malim količinama, ne većim od 10 mg/kg suve biljne mase, povoljno utiče na izvesne fiziološke procese u biljkama kao i na kvalitet biljne produkcije. Povoljan ređim fosfora suđava toksično delovanje olova na biljke, što je posledica sposobnosti olova da gradi nerastvorne fosfate u biljnim tkivima i zemljištima. Na dinamiku apsorpcije olova poseban uticaja imaju pH vrednost, sadržaj organske materije i gline u zemljištu.

Osnovni mehanizam toksičnosti jona olova je pre svega njegov uticaj na metabolizam jona kalcijuma i inhibiranje brojnih enzimskih sistema. Osetljivost pojedinih biljnih vrsta na veće koncentracije jona olova je različita kao i akumuliranje olova u tkivima. Olovo se najviše nagomilava u kori drveta i korenu, u listovima, a najmanje u cvetovima i plodovima. S druge strane, zapađeno je da je akumulacija olova veća u plodovima voća nego u plodovima povrća. Isto tako, akumulacija je veća kod divljih nego u plodovima gajenih vrsta (*Filipović-Trajković i sar.*, 2001).

Na apsorpciju olova mođe uticati prisustvo drugih metala u supstratu. Povećanje sadržaja kadmijuma utiče na smanjenje apsorpcije olova. S druge strane, olovo inhibira apsorpciju  $Fe^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  i  $Zn^{2+}$ , verovatno po mehanizmu kompetitivnog vezivanja na mestu transporta kroz membranu.

Olovo ispoljava inhibitorni efekat na procese fotosinteze i transpiracije, vezujući se za SH-grupe cisteinskih ostataka proteina menjajući svojstva hloroplasta i mitohondrija.

### ***Mangan***

Mangan je takođe neophodan za biljke, jer ulazi u sastav manganskog proteina, koji je donor elektrona za fotosistem II, pa na taj način direktno učestvuje u fotolizi vode.

### ***Kadmijum***

Kadmijum je prema geoheмиjskoj klasifikaciji hemijskih elemenata litofilni i halkofilni element. U sredinama čija je pH vrednost manja od 8 uvek je prisutan kao dvovalentno pozitivan jon (pod uslovom da se u sredini ne nalaze fosfati i sulfati koji ga mogu istaložiti), kada se može lako sorbovati na suspendovanim česticama ili nagraditi kompleksna jedinjenja sa organskim ligandima. Tako, sa akvatičnim huminskim supstancama u zemljištu gradi humatne komplekse. Kadmijum je označen kao jedan od 126 najvećih zagađivača životne sredine od strane Agencije za zaštitu životne sredine USA.

U ćelijama biljaka kadmijum može da izazove poremećaj u funkcionisanju elektron-transportnih sistema u fotosintetičkoj i oksidativnoj fosforilaciji, najverovatnije inhibirajući enzimski sistem vezivanjem za cisteinsku SH-grupu.

Joni kadmijuma se intenzivnije usvajaju i translociraju u vegetativne nadzemne organe od jona olova i žive. U brojnim biljnim vrstama intenzitet transporta jona kadmijuma u nadzemnim organima je u pozitivnoj korelaciji sa njegovom koncentracijom u zemljištu. Joni kadmijuma se akumuliraju uglavnom u korenu, dok je njegova količina u vegetativnim nadzemnim organima približno ista. Osnovni uzrok toksičnosti jona kadmijuma je visok afinitet prema tiolnim grupama (SH) brojnih enzima i proteina. Velika koncentracija kadmijuma u biljkama potpuno inhibira metabolizam jona gvožđa, izaziva hlorozu i time smanjuje intenzitet fotosinteze. Isto tako, visoke koncentracije jona kadmijuma inhibiraju disanje i transport elektrona u procesu oksidativne fosforilacije. Aktivnost brojnih enzima, na primer nitrat-reduktaze, direktno zavisi od stepena kontaminacije biljaka jonima kadmijuma. Joni kadmijuma, takođe inhibiraju transpiraciju kao i pokrete ćelija zatvaračica stominog aparata. Različite vrste biljaka imaju različite afinitete u odnosu na apsorpciju, odnosno akumulaciju kadmijuma.



**Hrom**

Osnovni izvor hroma u zemljištu je iz primarnih minerala koji nastaju iz magmatskih stena, koje čine matični supstrat na kome je zemljište formirano. Osim od matičnog supstrata hrom u zemljište dospeva i antropogenim putem (iz poljoprivrednih materijala, atmosfere, iz otpadnih muljeva). On se posebno čvrsto vezuje u zemljištima bogatim glinom i naročito humusom te je njegova pokretljivost u zemljištu mala i apsorbuje se u površinskom sloju dubine 5-10 cm (Raičević 2008).

Biljke za ishranu koriste male količine hroma, ali još nije izučena njegova fiziološka uloga, ali nije ni dokazana njegova neophodnost za život biljaka. Hrom se u zemljištu nalazi u više oksidacionih stanja, a najstabilniji je kao  $\text{Cr}^{3+}$  i  $\text{Cr}^{6+}$ . Šestovalentni hrom je stabilniji u oksidacionim uslovima, pri višoj pH i smatra se toksičnijim od trovalentnog hroma (Mc Grath 1995). Međutim, uticaj hroma na rast i razviće biljaka je drastičan i biljka doživljava stres već pri nižim koncentracijama od 0,01 ppm  $\text{Cr}^{3+}$ , što se ispoljava kroz potpuni gubitak ili smanjenje količine hlorofila (Scoccianti 2006).

Normalna koncentracija teških metala predstavlja koncentraciju metala koja ne utiče na rast i razvoj biljaka tj. biljke održavaju koncentracije teških metala u okviru optimalnih vrednosti. Međutim, kada koncentracije teških metala u biljkama pređu prag kritičnih koncentracija, teški metali ispoljavaju i svoje toksične efekte (Alagić 2014).

U Tabeli 4. je dat sadržaj teških metala (Cd, Pb, Cu i Zn) u biljkama i u zemljištu u normalnim i kritičnim koncentracijama (Radojević 1999).

**Tabela 4.** Sadržaj teških metala u biljkama i u zemljištu u normalnim i kritičnim koncentracijama (ppm)

Metal	Biljke		Zemljište	
	Normalne koncentracije	Kritične koncentracije	Normalne koncentracije	Kritične koncentracije
<b>Cd</b>	0,1-2,4	5-30	0,01-2	3-8
<b>Pb</b>	0,2-20	30-300	2-300	100-400
<b>Cu</b>	5-20	20-100	2-250	60-125
<b>Zn</b>	1-400	100-400	1-900	70-400

## **2.7 Instrumentalne metode analize: GC, GC-MS, GC-FID**

### **2.7.1 Gasna hromatografija**

Hromatografija je analitička metoda koja omogućava razdvajanje hemijskih jedinjenja na osnovu različitih raspodela između dve faze: pokretne (mobilne) i nepokretne (stacionarne).

Uzorci u tečnom i čvrstom stanju koji se analiziraju gasnom hromatografijom moraju biti isparljivi, jer se razdvajanje vrši u gasnoj fazi. Ovo predstavlja glavno ograničenje metode jer komponente koje se analiziraju ovom metodom moraju biti termostabilne na radnoj temperaturi, dok njihova isparljivost mora biti dovoljna u datim uslovima da bi razdvajanje bilo uspešno.

Nepokretna faza je čvrsta ili tečna dok je pokretna faza gasovita i nju čini inertan noseći gas i pare jedinjenja koja se razdvajaju. Čvrsta faza predstavlja nosač za koji je hemijski vezan tanak film tečne faze. Neophodno je da cela površina čvrste faze bude derivatizovana kako ne bi došlo do hemijskih transformacija uzorka prilikom kontakta sa nosačem. S toga je važno da je čvrsta faza inertna, da sadrži čestice ujednačene veličine i oblika, kao i da je mehanički jaka (da se ne bi lomila prilikom punjenja kolone).

Tečna faza takođe mora biti termostabilna i neisparljiva na radnoj temperaturi, hemijski inertna u odnosu na ispitivana jedinjenja, ali istovremeno je potrebno da bude dobar selektivni rastvarač istih. Izbor tečne faze treba da bude takav da obezbedi što bolje razdvajanje jedinjenja, a da zadržavanje ispitivanih komponenti na koloni ne bude predugo, jer to utiče i na celokupno vreme analiziranja. Na osnovu poznavanja polarnosti stacionarnih faza i prirode uzorka moguće je vršiti odabir tečne faze koja će najbolje ispuniti gore navedene uslove.

Retenciono vreme i efikasnost razdvajanja pikova zavise od brzine protoka nosećeg gasa. Vreme zadržavanja je direktno proporcionalna dužini kolone, dok je rezolucija proporcionalna kvadratnom korenu dužine kolone.

Protok se meri na izlazu detektora, dok je kolona na radnoj temperaturi. Linearna brzina nosećeg gasa kroz kolonu je obrnuto proporcionalna kvadratnom korenu unutrašnjeg prečnika kolone za dati protok.

Kao noseći gasovi za pakovane kolone obično se koriste helijum ili azot dok se azot, helijum i vodonik obično koriste kao noseći gasovi pri korišćenju kapilarnih kolona.

Gasni hromatografi mogu biti povezani sa raznim vrstama detektora: detektor termalne provodljivosti (TCD), plameno-jonizacioni detektor (FID), azoto-fosforni detektor (NPD),

detektor sa zahvatom elektrona (ECD) i plameno-fotometrijski detektor (FPD) kao i maseno spektrometrijski detektor (MSD).

### **2.7.2 Statički „head-space“**

Statički „head-space“ gasna hromatografija je tehnika posebno pogodna za odvajanje i određivanje isparljivih jedinjenja prisutnih u čvrstom ili tečnom uzorku. Metoda se zasniva na analizi gasne faze u ravnoteži sa čvrstom ili tečnom fazom.

Sam aparat se sastoji od gasnog hromatografa koji je opremljen uređajem za uvođenje uzorka koji može biti povezan za modul koji automatski kontroliše pritisak i temperaturu. Uzorak se smešta u odgovarajuću vialu sa zapušačem i ventilom koji dozvoljava prolaz nosećeg gasa. Viala se zatim prenosi u termostatisiranu komoru, na temperaturi odabranoj na osnovu karakteristika samog analita. Uzorak se termostatira do uspostavljanja ravnoteže između čvrste ili tečne faze i gasne faze. Noseći gas se uvodi u posudu, a posle propisanog vremena pogodan ventil se otvara tako da se gas uvodi u kolonu noseći sa sobom isparljiva jedinjenja analita.

Umesto korišćenja hromatografa posebno opremljen za uvođenje uzoraka, takođe je moguće koristiti hermetičke špricave i konvencionalni hromatograf. Uravnoteženje pritiska se vrši u posebnoj komori i gasna faza se uvodi u kolonu, uzimajući u obzir sve mere predostrožnosti neophodne da bi izbegli bilo kakve promene u ravnoteži.

Koristeći referentne uzorke, zadaju se odgovarajuće postavke instrumentu da bi se dobio adekvatan odgovor instrumenta.

Priprema uzoraka može u velikoj meri uticati na osetljivost i tačnost merenja zbog fizičko-hemijskih osobina isparljivih organskih jedinjenja-(Volatile organic compounds, VOC). Nekoliko metoda za uvođenje uzoraka kuplovano je sa hromatografskim sistemom čime se povećava kvalitet merenja i određivanja analita (npr. „head-space“ uzorkovanja).

„Head-space“ analiza je tehnika kojom se isparljiva jedinjenja izdvajaju iz različitih matrica uzoraka kao što su voda, čvrste supstance i hrana. Tako, je „head-space“ gasna hromatografija (HS/GC) tehnika gasne ekstrakcije. Postoje statički ili ravnotežni „head-space“ (označen kao statički „head-space“) i kontinuirana ekstrakcija (ili dinamički „head-space“).

U oba režima rada, gasna faza se uzorkuje i ubrizgava direktno u gasni hromatograf, izbegavajući gubitak i kontaminaciju. „Head-space“ (statički ili dinamički režim) i gasna hromatografija su najviše usvojene metode koje se koriste za određivanje VOC iz čvrstih i tečnih

matrica. Takođe direktno ubrizgavanje rastvora (DAI- Direct Aqueous Injection), tečno-tečna ekstrakcija (LLE), membranske tehnike, ekstrakcija čvrstom fazom (SPE), mikroekstrakcija čvrstom fazom (SPME) i destilacija su tehnike koje se koriste za pripremu uzoraka (*Cavalcante i sar.*, 2010).

### **2.7.3 Masena spektrometrija**

Opšti pojam masena spektrometrija označava fizičko-hemijsku metodu koja se zasniva na pretvaranju ispitivanog uzorka u jonski snop i razdvajanju tog snopa na sastavne komponente na osnovu njihovih odnosa mase i naelektrisanja ( $m/z$ ). Maseni spektar je grafička zavisnost količine jona od veličine  $m/z$  i predstavlja karakteristiku analiziranog uzorka.

Maseni spektrometar je instrument sa električnom detekcijom jona i predstavlja osetljiv, specifičan analitički instrument, a ujedno i instrument u kojem se odigravaju različite razgradnje molekula.

Osnove funkcije masenog spektrometra su:

1. jonizacija reprezentativnog dela molekula iz uzorka
2. razdvajanje jona prema odnosu mase i naelektrisanja ( $m/z$ )
3. merenje količine jona određene mase, tj. određenog odnosa  $m/z$ .

Kako se razdvajanja jona odigravaju u uslovima visokog vakuuma, stvaranje odgovarajućih vakuumskih uslova je neophodno za funkcionisanje masenog spektrometra.

Maseni spektrometar se sastoji iz:

1. sistema za injektovanje (uvođenje) uzorka
2. jonskog izvora u kome se proizvodi jonski snop ispitivanog uzorka
3. masenog analizatora koji razdvaja jone prema njihovom odnosu mase i naelektrisanja ( $m/z$ )
4. uređaja za dobijanje i merenje vakuuma, kojima se osiguravaju i stvaraju povoljni uslovi za nesmetano funkcionisanje svih komponenata
5. sistema za detekciju, gde se razdvojeni joni detektiraju a njihov intenzitet meri.

### ***Sistem za uvođenje uzorka***

Uzorci mogu biti u gasovitom tečnom, čvrstom stanju ili u obliku rastvora, što zahteva različite načine za njihovo uvođenje u jonski izvor. Svaki sistem postavlja određene uslove, ali

za sve je zajednički osnovni uslov da omogućí uvoĎenje dovoljne koliĎine uzorka u jonski izvor na takav naĎin da njegov sastav taĎno odgovara polaznom sastavu ispitivanog uzorka.

### ***Injektovanje uzorka***

Direktno injektovanje uzoraka je uobiĎajeni naĎin injektiranja, osim ukoliko sama kompleksnost analiziranog uzorka ne zahteva prethodnu pripremu, preĎišĎavanje i sl. Injektovanje uzorka moĎe biti direktno na kolonu, koristeĎi špric ili injekcioni ventil, ili u komoru za isparavanje koja moĎe biti opremljena spliterom toka. Injektovanje gasne faze moĎe se izvršiti pomoĎu statičkih ili dinamiĎkih sistema za ubrizgavanje „head-space“.

DinamiĎki „head-space“ sistemi za ubrizgavanje ukljuĎuju ureĎaj za raspršivanje kojim isparljive materije iz rastvora dolaze u kolonu koja je napunjena odgovarajuĎim adsorbensom i odrĎava se na niskoj temperaturi. Neadsorbovane supstance se zatim desorbuju u mobilnoj fazi brzim zagrevanjem adsorbenta kolone.

StatiĎki „head-space“ tehnika (SHS) je pogodna za odreĎivanje isparljivih jedinjenja u uzorcima npr. hrane (*del Rosario Brunetto i sar., 2009*). Tehnika SHS podrazumeva da se Ďvrsti uzorak stavljen u zapeĎaćenu vialu, zagreva tokom zadatog vremenskog perioda na odreĎenoj temperaturi tako da isparljiva jedinjenja u Ďvrstoj fazi mogu da postignu ravnoteĎu sa gasnom fazom. Relativnu koncentraciju analita u obe faze odreĎuje koeficijent distribucije ( $K_g$ ), definisan kao odnos koncentracije analita u Ďvrstoj fazi i u gasnoj fazi. Alikvot gasa se odvodi i ubrizgava u kolonu.

Kada su izabrani optimalni uslovi za odreĎenu analizu korišĎenje SHS tehnike poboljšava preciznost i osetljivost same analize. Odnos koliĎine uzorka i gasovite faze u headspace viali moĎe uticati na osetljivost headspace odreĎivanja (*del Rosario Brunetto i sar., 2009*).

StatiĎka „head-space“ tehnika (SHS) ima širok linearni dinamiĎki opseg (sa limitom detekcije (LOD) do 100 mg/L), jednostavnu instrumentaciju, dobru ponovljivost (koeficijent varijacije 4-10 %) i visok „recovery“ (89-110 %).

DinamiĎka „head-space“ tehnika (DHS) ima odreĎene nedostatke kao što je upotreba kompleksnih instrumenata, mešanje vodene pare koje nastala u fazi isparavanja, moguća kontaminacija u trapu (unakrsna kontaminacija), uzak linearni dinamiĎki opseg i dugo trajanje same analize po uzorku. Pored toga, ova tehnika nije primenljiva za uzorke rastvora soli mada u nekim studijama ovo ograniĎenje nije problematiĎno (*Cavalcante i sar., 2010*).

### ***Jonski izvori***

Uloga jonskog izvora je da proizvede jone iz atoma i molekula uzorka, da formira i ubrza jonski snop ka masenom analizatoru. Neutralne čestice mogu se jonizovati na razne načine, a u zavisnosti od toga razvijeni su različiti tipovi jonskih izvora. Ni jedan od njih nema univerzalnu primenu, a koji izvor će se primeniti zavisi od prirode uzorka i od vrste podataka koji se žele dobiti.

Postoji više vrste jonizacije a neke od njih su:

1. jonizacija udarom brzih elektrona
2. hemijska jonizacija
3. jonizacija u električnom polju
4. jonizacija atomima argona, ksenona i drugim
5. jonizacija varnicom
6. jonizacija laserom

#### ***2.7.4 Elektrosprej jonizacija (ESI)***

Elektrosprej jonizacija koristi električnu energiju koja omogućava prevoćenje jona iz rastvora u gasno stanje pre nego što budu podvrgnuti analizi. Na ovaj način joni mogu biti analizirani ESI-MS tehnikom velike osetljivosti. Neutralna jedinjenja mogu se takođe prevesti iz rastvora u jonski oblik ili u gasnu fazu protonacijom ili katjon-jonizacijom (npr, metal katjon-jonizacijom), i na taj način mogu se određivati ESI-MS tehnikom.

Elektrosprej jonizacija podrazumeva stvaranje finog spreja tečnosti u prisustvu jakog električnog polja, pri čemu dolazi do desolvatacije jona analita na atmosferskom pritisku. Analit koji je rastvoren u polarnom i isparljivom rastvaraču se raspršuje u struji azota kroz kapilaru čiji je vrh nalazi pod visokim naponom. Pod dejstvom električnog polja na atmosferskom pritisku, aerosol sastavljen od višestruko naelektrisanih kapljica napušta kapilaru u obliku finog spreja. Kapljice se polako smanjuju usled isparavanja rastvarača, a kada gustina naelektrisanja prevaziđe površinski napon, dolazi do eksplozije kapljica, pri čemu nastaje veliki broj manjih kapljica. Navedeni proces se ponavlja i kao rezultat nastaju desolvatisani joni analita koji kroz jonsku kapilaru stižu do masenog analizatora pod vakuumom.

Dakle, prevoćenje jona iz rastvora u gasnu fazu elektrosprej jonizacijom uključuje tri koraka:

1. stvaranje finih naelektrisanih kapljica
2. isparavanje rastvarača (brzo smanjenje dimenzije kapljica isparavanjem rastvarača, i formiranje naelektrisanih kapljica sa smanjenim dimenzijama)
3. stvaranje jona u gasnoj fazi, nastalih u visoko naelektrisanoj kapilarnoj cevi, koja se nalaze na visokom naponu (npr 2,5- 6,0 kV) u odnosu na zid okolne komore.

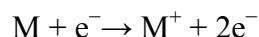
ESI je „meka“ jonizaciona tehnika kojom nastaju protonovani ( $[M+H]^+$ ) ili deprotonovani ( $[M-H]^-$ ) molekuli analita, što zavisi od polarnosti električnog polja. Često dolazi do pojave višestruko naelektrisanih jona ( $[M+nH]^{n+}$ ), kao i adukata molekula analita sa rastvaračem ( $[M+R+H]^+$ , odnosno  $[M+R-H]^-$ ). Zbog stvaranja višestruko naelektrisanih jona, ESI omogućava MS analizu jedinjenja sa velikom molarnom masom (do 4000000 g/mol), jer se njihov signal pojavljuje u masenom spektru na m/z vrednostima.

Faktori koji utiču na nastanak jona elektrosprej jonizacijom su: pH-vrednost rastvora, pKa analita, temperatura, protok i sastav mobilne faze, kao i koncentracija aditiva i analita.

Hemijska jonizacija na atmosferskom pritisku (Atmospheric Pressure Chemical Ionization, APCI) se koristi za analizu jedinjenja srednje i male polarnosti dok se ESI pretežno koristi za analizu polarnih analita, ali se može koristiti i u analizi manje polarnih jedinjenja. ESI tehnika je mnogo osetljivija od APCI jonizacione tehnike.

Jonizacija elektronima izvodi se tako što usijana katoda (sa volframovim vlaknom) emituje brze elektrone koji su privučeni od strane anode. Na svom putu elektroni se sudaraju sa molekulama uzorka, pri čemu dolazi do izbijanja jednog ili više elektrona iz molekula ili atoma uzorka i nastajanja naelektrisanih jona.

Razlika u potencijalima između katode i anode predstavlja energiju jonizacije. Da bi se uklonio jedan elektron, potrebno je oko 12 eV, a snimanje se obično izvodi na 70 eV, što rezultuje velikim viškom energije koju dobija molekul:



Izbijanjem jednog elektrona iz molekula nastaje jon koji ima istu masu kao i ispitivana supstanca, i to je „molekulski jon“. Na taj način molekulski jon prima više energije nego što je potrebno za izbijanje jednog elektrona i tada je posmatrani molekul u pobuđenom stanju. Usled toga dolazi do daljeg cepanja molekulskog jona i raskidanja određenih hemijskih veza, odnosno dolazi do fragmentacije molekulskog jona i stvaranja fragmentnih jona.

Da bi masena spektrometrija imala analitičku primenu bitno je da se ovo cepanje za dati molekul uvek odvija na isti način. Procesi jonizacije kao i fragmentacije odvijaju se u jonskom izvoru vrlo brzo u vremenskom periodu od  $10^{-7}$  sekundi.

Do hemijske jonizacije dolazi usled reagovanja gasa sa jonima. Kao reagujući gasovi mogu se koristiti metan, amonijak, izobutan, voda, a i pojedini inertni gasovi. Uzorak i reagujući gas se istovremeno uvode u komoru gde su izloženi bombardovanju elektronima pri čemu se jonizuju samo molekuli gasa.

### ***Maseni analizatori***

Maseni analizator je osnovni deo masenog spektrometra. Pomoću masenog analizatora se ostvaruje primarna funkcija masene analize- razdvajanje jona pojedinih masa iz jonizovanog uzorka. Uloga masenog analizatora je: da odvoji jone mase  $m$  od jona bliske mase  $m+\Delta m$  i da, zatim, fokusira izdvojeni snop jona. Ove funkcije se ostvaruju delovanjem električnih i magnetnih polja, koja u ovom slučaju preuzimaju ulogu prizmi i sočiva u optičkoj spektroskopiji.

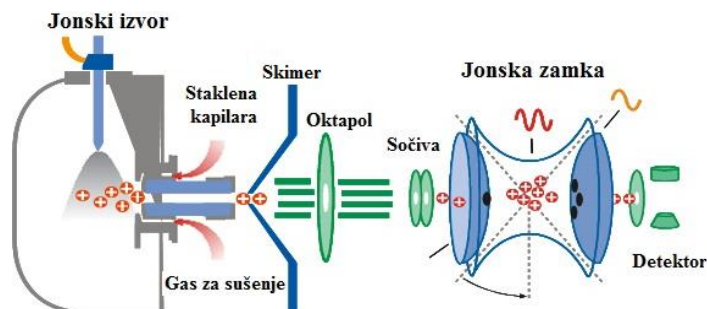
Širu primenu su našli sledeći tipovi analizatora:

1. magnetni analizator sa jednostrukim fokusiranjem
2. analizator sa dvostrukim fokusiranjem
3. kvadripolni analizatori
4. analizatori na bazi vremena preletanja (Time of Flight- TOF).

Za analizu tragova LC-MS tehnikom najčešće se koriste maseni analizatori sa trostrukim kvadrupolom (triple quadrupole, QqQ) i jonska zamka (Ion Trap, IT) (*Hernandez i sar., 2004*). QqQ analizator je znatno osetljiviji i precizniji od jonske zamke, ali visoka cena ovog instrumenta ograničava njegovu dostupnost. Jonska zamka ima mogućnost višestepene masene analize ( $MS^n$ ), zbog čega je veoma selektivan, čime se poboljšava odnos signal/šum. Samim tim granica detekcije jonske zamke je prihvatljivija za kvantifikaciju niskih koncentracija analita (*Plumb i sar., 2001*). Uvočenjem novih vrsta jonskih zamki, npr. linearne jonske zamke, poboljšane su osetljivost i granica detekcije (*Batt i Aga 2005*). Jonska zamka izvodi masenu analizu u vremenu, a QqQ u prostoru (*Reig i Toldra 2008*).

Jonska zamka se sastoji od jedne prstenaste i dve tanjiraste elektrode (Slika 8) koje zatvaraju prsten sa obe strane (*Ardrey 2003*).





**Slika 8.** Shematski prikaz jonske zamke

Pod uticajem radiofrekventnog polja, joni se kreću u zamci po stabilnim putanjama i mogu ostati u njoj od nekoliko milisekundi do nekoliko sati (*Pico i sar., 2004*). Za maksimalnu efikasnost potrebno je fokusirati jone u centru zamke, gde je polje najjače, a to se postiže uvođenjem helijuma. Sudarajući se sa analiziranim jonima, helijum umanjuje njihove oscilacije i stabilizuje ih. Joni analita se šalju iz zamke na detektor povećanjem radiofrekventnog napona, pri čemu se snima maseni spektar.

Kod  $MS^n$  analize, izolovanje jona analita i njegova dalja fragmentacija postiže se povećanjem napona, na taj način se iz zamke udaljavaju svi joni osim ispitivanih sa traženom  $m/z$  vrednošću. Nakon fragmentacije joni dospevaju do detektora koji registruje njihovo prisustvo i relativnu koncentraciju. Praćenjem odgovora masenog detektora u toku vremena dobija se maseni spektar.

### ***Detektori jona i merenje jonskih struja***

Detekcija jona i merenje jonskih struja se vrši električnim putem. Osetljivost maseno-spektrometrijskog merenja i moć razlaganja u znatnoj meri zavisi od same metode detekcije. Pri izboru detektora treba voditi računa o postizanju maksimalne osetljivosti, što većoj moći razlaganja, postizanju određene tačnosti analize, brzini snimanja masenog spektra, vremenskoj stabilnosti i širokom dinamičkom opsegu.

Maseno-spektrometrijski detektor beleži i maseni sken eluata, koji pri potpunom razdvajanju odgovara masenom spektru, a kao odgovor detektora meri se totalna jonska struja (TIC) ili parcijalna jonska struja. Struje su proporcionalne broju svih jona (ili samo jednog jona), koji „padnu” na detektor, nastalih bombardovanjem eluata elektronima.

Snimanje masenih spektara može se vršiti jednom od dve metode:

1. SCAN- podrazumeva snimanje kompletnog masenog spektra
2. SIM (Selected Ion Monitoring)- u kome se prate samo odabrani joni.

SCAN metoda podrazumeva skeniranje mase u zadatom opsegu dok se istovremeno prati odgovarajuće retenciono vreme i na ovaj način omogućena je identifikacija analita.

SIM metoda se koristi za kvantitativno određivanje. Pre upotrebe SIM metode, mora se izvesti analiza SCAN metodom da bi se postigli optimalni uslovi. SIM metodom se detektuju m/z vrednosti samo reprezentativnih ili zadatih jona posmatranog molekula. Vreme praćenja jona je veće pa se samim tim povećava i osetljivost čak od 100 do 1000 puta. Karakteristični joni, vreme početka snimanja (start time) i vreme praćenja jona (dwell time) biraju se na osnovu podataka dobijenih pomoću SCAN metode.

Dobijeni hromatogram predstavlja zavisnost ukupne zastupljenosti jona sabrane tokom analize od vremena, takođe dobijaju se i podaci o kvalitetu (retenciono vreme) i kvantitetu (površina pika) posmatrane komponente.

Pri snimanju masenog spektra visoke rezolucije, postoje računarski programi koji na osnovu mase (m/z) izmerene precizno na šestu decimalu daju podatak o bruto formuli fragmenta ili molekulskog jona, što je posebno pogodno za određivanje strukture prirodnih proizvoda, koji su vrlo malim količinama prisutni u uzorku, samim tim nisu potrebne velike količine uzorka, odnosno njihovo dodatno prečišćavanje i priprema.

Najvažnije karakteristike masenog spektrometra su moć razlaganja i osetljivost.

Sposobnost masenog spektrometra da razloži jone različitih masa naziva se moć razlaganja. Teorijski se moć razlaganja definiše kao najmanja razlika masa koja se još mogu razdvojiti. U praksi se moć razlaganja određuje kao najveća masa za koju instrument zadovoljava određeni kriterijum ili se moć razlaganja često određuje pomoću jednog izolovanog pika u masenom spektru. Ovde se moć razlaganja određuje iz formule:

$$R_z = M/\Delta M$$

gdje je:  $M$ - masa pika u atomskim jedinicama

$\Delta M$ - širina pika kod visine jednake 5 % od njegove ukupne visine kao deo rastojanja između dva susedna pika

Pri izboru instrumenta mora se uvek voditi računa o njegovoj moći razlaganja, pri čemu se polazi od analitičkih problema za čije je rešavanje spektrometar namenjen. Kao opšti kriterijum

može se uzeti da je potrebna takva moć razlaganja koja će omogućiti razdvajanje mase molekulskog jona od prisutnih masa.

Osetljivost masenog spektrometra zavisi od sistema za detekciju i od analitičke metode koja se primenjuje. Postoje različiti načini za izražavanje osetljivosti u zavisnosti od problema koji se rešava.

Pri analize tragova od bitna je granica detekcije instrumenta. Apsolutna granica detekcije definiše se kao najmanja količina nekog elementa ili jedinjenja koje se može detektovati pod datim uslovima snimanja. Koncentracijska granica detekcije je najmanja koncentracija jednog elementa ili jedinjenja koja se može detektovati u matrici drugog materijala.

Dva parametra koji utiču na granicu detekcije su šum instrumenta, tj. signal na detekcionom sistemu koji ne potiče od jona, tj. maseni spektar koji se dobija pod sličnim uslovima rada kao i pri analizi uzorka, s tim što uzorak nije prisutan.

Osetljivost i moć razlaganja su za dati aparat približno obrnuto proporcionalne veličine.

### ***Maseni spektar***

Maseni spektar je analitički prikaz rezultata maseno-spektrometrijskog merenja, koji daje intenzitet pojedinih jona u funkciji  $m/z$  i predstavljen je u grafičkom obliku. Preračunavanjem relativnih intenziteta svih pikova u odnosu na najintenzivniji pik dobija spektar u linijskom obliku. Svako jedinjenje daje karakterističan spektar koji može poslužiti za identifikaciju. Izgled dobijenog spektra zavisi od eksperimentalnih uslova (tipa masenog spektrometra, temperature jonskog izvora, uslova jonizacije i dr.) pa je potrebno uz maseni spektar navesti i uslove snimanja.

## **2.8 Instrumentalne metode analize: tečna hromatografija sa masenom spektrometrijom visoke rezolucije (Liquid Chromatography- High Resolution Mass Spectrometry, LC-HRMS)**

### ***2.8.1 Kombinacija tečni hromatograf-maseni spektrometar (LC-MS)***

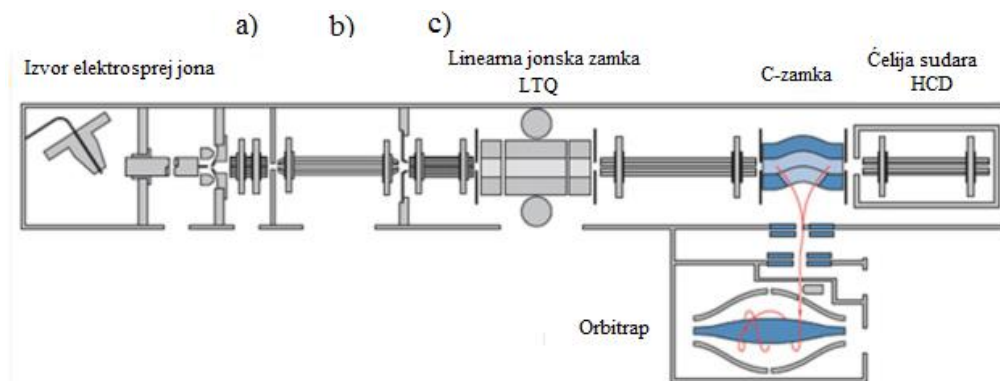
Primena tečne hromatografije (Liquid Chromatography, LC) znatno je povećana u poslednje vreme. Veliki nedostatak kao i ograničenje korišćenja hromatografije ogleda se u nemogućnosti precizne identifikacije svih komponenta smeše. Naime, identifikacija u hromatografiji se

zasniva na upoređivanju retencionih vremena uzoraka i standardnih supstanci analiziranih pod istim eksperimentalnim uslovima. Međutim, kada su retencionna vremena identična, ne znači uvek da se radi o istom jedinjenju. Moć masene spektrometrije ogleda se u tome da su dobijeni maseni spektri većine supstanci dovoljno specifični da bi se omogućila njihova identifikacija sa visokim stepenom sigurnosti. Kombinovanje separacionih mogućnosti hromatografije sa identifikacionim mogućnostima masene spektrometrije omogućava se razdvajanje i razlikovanje supstanci sa istim ili sličnim retencionim vremenima na osnovu njihovih različitih masenih spektara. Međutim, mnogi analiti su izuzetno polarni i termički nestabilni, zbog čega je neophodna njihova prethodna priprema, najčešće derivatizacija pre GC analize. Derivatizacija veoma različitih, kiselih i baznih, jedinjenja tokom analize je veoma teška i zahteva puno vremena, zbog čega se za analizu kompleksnih smeša analita koristi LC-MS tehnika. Prednost ove metode je i mogućnost analize jedinjenja sa velikom molskom masom koja nisu pogodna za GC-MS.

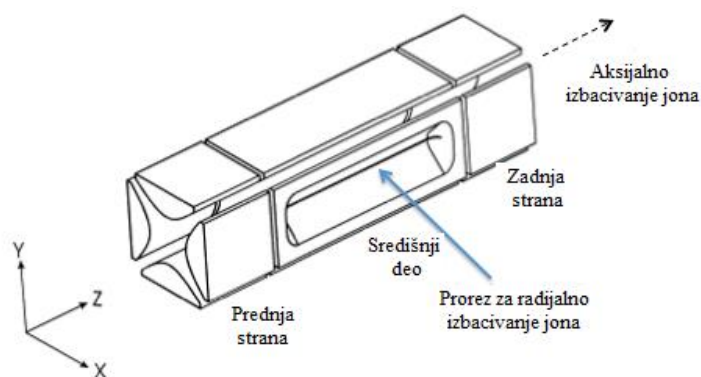
### ***2.8.2 LTQ-Orbitrap- hibridni maseni spektrometar sa visokom rezolucionom moći***

Orbitrap se smatra masenim detektorom, s obzirom da se u njemu ne odvijaju eksperimenti ali služi za merenje masa sa visokom rezolucijom. LTQ-Orbitrap hibridni maseni spektrometar (Slika 9) konstruisali su *Hardman* i *Makarov*, 2003. godine, koji se sastoji od linearne četvrtaste jonske zamke (Linear Quadrupole Trap, LTQ), C-zamke i na kraju orbitrapa.

Agregatni joni, formirani u API izvoru se uvlače u cev za prenos jona i dospevaju do cevastih sočiva u region skimera (Slika 9a), gde se desolvatišu pri sudarima sa preostalim gasom i fokusiraju. U ovom trenutku, joni dospevaju u zonu niže pritiska ( $10^{-3}$  mbar), gde prolaze kroz nekoliko uvećavajućih (Slika 9b) i elektrostatičkih sočiva (Slika 9c) i bivaju zarobljeni u linearnoj četvrtastoj jonskoj zamci ( $10^{-5}$  mbar) (Slika 10).



**Slika 9.** Shematski prikaz LTQ-Orbitrapa XL hibridnog masenog spektrometra: a) desolvaciona regija agregatnih jona, b) regija prenosa jona, c) fokusiranje snopa jona



**Slika 10.** Shematski prikaz linearne četvrtaste jonske zamke

Novi zahtevi u pogledu veće osetljivosti i preciznosti u masenoj spektrometiji su od velikog značaja za globalne tendencije u analitičkoj hemiji i fokusirane su na brzom i jednostavnom pristupu. Za ovu namenu konstruisan je Orbitrap, kao snažan, brz i osetljiv maseni instrument. Ovaj maseni analizator se sastoji od spoljašnje cilindrične elektrode i unutrašnje, centralne elektrode oko koje se kreću joni. Ovakav oblik elektroda konstruisan je da bi se joni kretali oko unutrašnje elektrode što je moguće duže, zahvaljujući visokom vakuumu.

Joni se tangencijalno ubrizgavaju u orbitrap uz kinetičku energiju od nekoliko keV. U elektrostatičkom polju kao u jonskoj zamci, bez radiofrekventnog napona i visokim vakuumom joni se kružno kreću oko centralne elektrode i istovremeno osciluju duž z-ose.

Kružno kretanje jona detektovano je kao slika struje, kada se joni kreću između dve polovine spoljne elektrode. Kao rezultat pojačane struje, prelazni signal se beleži sa spoljašnje

elektrode. Joni različitih masa osciluju različitim frekvencijama, a Furiejovim (Fourier) transformacijama (FT) se konvertuje signal u vremenu u oscilatorni signal i na taj način dolazi do razdvajanja jona po  $m/z$  vrednostima. Rezolucija orbitrapa direktno zavisi od trajanja prelaznog signala. Duži prelazni signal sadrži veći broj podataka, čime se tačnost merenja oscilatorne frekvencije povećava i rezolucija jona je bolja. Za duži prelazni signal sudare jona sa preostalim gasom treba izbegavati ili bar smanjiti na minimum, što se postiže vrlo niskim pritiskom od  $10^{-10}$  mbar. Na kraju, orbitrap može postići moć rezolucije od 100 000 (za  $m/z$  400 FWHM, puna širina sa polu-maksimumom) i tačnost manju od 3 ppm.

Postoji niz prednosti koje poseduje Orbitrap u odnosu na ostale analizatore, a to su:

1. mogućnost preciznog određivanja mase molekula (na 5 decimala)
2. visoka moć rezolucije (preko 200 000)
3. širok dinamički opseg
4. mogućnost određivanja kvantitativne razlike poznatih jedinjenja na osnovu selektivnog  $m/z$  odnosa
5. kombinovanje kvalitativne i kvantitativne analize
6. veoma osetljiv detektor (određuje jako male mase reda veličine ppb, bez dodatka internog standarda)
7. analiza ekstremno složenih smeša.

## **2.9 Optička emisiona spektrometrija sa induktivno spregnutom plazmom (Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry- ICP-OES)**

Optička emisiona spektrometrija sa induktivno spregnutom plazmom svrstava se u grupu atomskih emisionih tehnika i za formiranje pobuđenih atoma i jona koristi induktivno spregnutu plazmu. Na ovaj način pobuđeni atomi i joni emituju elektromagnetno zračenje odgovarajućih talasnih dužina koje su karakteristične za pojedine elemente.

Prednosti ove metode su odlične granice detekcije, niske hemijske interferencije, multielementa mogućnost analize, kao i stabilan i ponovljiv signal.

ICP-OES instrumentacija se sastoji iz dve glavne jedinice: generatora i procesora signala. Generator signala se sastoji iz izvora plazme (plazmeni plamenik, generator radiofrekventnog zračenja) i sistema za unošenje uzorka (različite vrste raspršivača; raspršivačka komora), dok se

procesor signala sastoji od optičkog sistema elektronike i jedinice za prikazivanje podataka. Kontrola funkcija i rad spektrometra vrši se računaram i upotrebom odgovarajućeg softvera (*Todorović i sar.*, 1997).

Kod ICP-OES metode uzorak se uvodi u izvor plazme. To je bezelektrodna argonska (ređe azotna) plazma koja radi na atmosferskom pritisku, a održava se induktivnim sprežanjem sa radiofrekventnim elektromagnetnim poljem.

U plazmi analit isparava i razgrađuje se na slobodne atome i jone, pri čemu se dodatna energija troši na pobuđivanja slobodnih atoma i jona u visoko energetska stanja.

Formirana plazma ima dvostruku ulogu- kao atomizer i kao izvor za pobuđivanje. U isto vreme predstavlja i jonizacioni gas koji ostaje makroskopski neutralan, a dobar je provodnik elektriciteta.

Procesi koji se dešavaju u plazmi, disocijacija analita na atome i jone, pobuđivanje nastalih čestica kao i visoka temperatura plazme, direktna su posledica sudara slobodnih elektrona sa svim prisutnim česticama sistema.

Nastali atomi i/ili joni nalaze u pobuđenom stanju koji lako gube energiju bilo sudarom sa drugim česticama sistema (termalna razmena energije) ili energetskim prelazom na niže energetske nivoe (energija zračenja). Na taj način dolazi do spontane emisije zračenja. Svaki od prisutnih elemenata u plazmi se karakteriše talasnim dužinama emisionih linija. Detekcija zračenja određenih talasnih dužina se primenjuje za kvalitativnu analizu a izmereni intenziteti za kvantitativnu analizu analita (*Todorović i sar.*, 1997).

Visoke temperature plazme omogućavaju da se ICP-OES metoda koristi za određivanje skoro svih elemenata periodnog sistema, osim argona. Hidridna tehnika se upotrebljava za određivanje niskih koncentracija elemenata koji grade hidride (As, Bi, Ge, Sb, Se, Sn i Te).

### ***2.9.1 Prednosti ICP-OES spektrometrije***

Najznačajnije prednosti ICP-OES spektrometrije nad drugim metodama emisijne spektrohemijske analize su:

1. Mogućnost izvođenja multielementne analize: za manje od 2 minuta može da se odredi prisustvo i sadržaj 20-60 elemenata u analitu
2. Široka dinamička oblast: kao posledica malog efekta samoapsorpcije u posmatranoj zoni plamena, analitička kriva je linearna u intervalu koncentracija od nekoliko redova

veliĉine, tako da se podjednako uspešno mogu odreĉivati elementi visoke i niske koncentracije (ispod 1  $\mu\text{g}$ )

3. Analiza uzoraka u obliku rastvora: prevoĉenje analita u rastvor znatno pojednostavljuje analizu, posebno heterogenog materijala, pošto se pri rastvaranju, uz eventualno prethodno topljenje, razaranje i sliĉno, svi elementi prevode u isti hemijski oblik, ĉime se samnjuje uticaj matrice i olakšava priprema standarda
4. Mala koliĉina rastvora dovoljna za analizu: to podrazumeva i malu koliĉinu uzorka, pod odreĉenim uslovima multielementna analiza mođe da se izvede sa utroškom od samo 0,5  $\text{cm}^3$  rastvora, što je veoma važno za rešavanje problema u nekim posebnim sluĉajevima
5. Relativno dugo vreme boravka ĉestica u plazmi: zadržavanje ĉestica u plazmi nekoliko milisekundi i njena inertna atmosfera doprinose efikasnosti atomizacije i pobuĉivanja a time i osetljivosti odreĉivanja

### ***2.9.2 Taĉnost i osetljivost ICP-OES spektrometrije***

Taĉnost metode je istog reda i veliĉine kao i relativna standardna devijacija (RSD) i kreće se od 1-10 % u zavisnosti od koncentracije odreĉivanog elementa. U Tabeli 5. su date najniđe granice detekcije za veći broj elemenata u vodenim rastvorima postignute primenom pneumatskih raspršivaĉa i spektrometara koji se koriste za istraživaĉki rad (*Harvey 2000.*).



**Tabela 5.** Granice detekcije nekih elemenata (ppb) za plamenu emisionu spektrometriju i spektrometriju indukovano spregnute plazme

<b>Element</b>	<b>Ag</b>	<b>Al</b>	<b>As</b>	<b>Au</b>	<b>B</b>	<b>Ba</b>
<b>Emisija u plamenu</b>	2	3	2000	500	50	1
<b>ISP</b>	0,2	0,2	2	0,9	0,1	0,01
<b>Element</b>	<b>Be</b>	<b>Bi</b>	<b>Ca</b>	<b>Cd</b>	<b>Co</b>	<b>Cr</b>
<b>Emisija u plamenu</b>	100	1000	0,1	300	5	1
<b>ISP</b>	0,003	10	0,00001	0,07	0,1	0,08
<b>Element</b>	<b>Cs</b>	<b>Fe</b>	<b>Ga</b>	<b>Ge</b>	<b>Hg</b>	<b>K</b>
<b>Emisija u plamenu</b>	0,02	10	5	400	150	0,01
<b>ISP</b>	-	0,09	0,6	0,5	1	30
<b>Element</b>	<b>Li</b>	<b>Mg</b>	<b>Mn</b>	<b>Mo</b>	<b>Na</b>	<b>Ni</b>
<b>Emisija u plamenu</b>	0,0001	1	1	10	0,01	10
<b>ISP</b>	0,02	0,003	0,01	0,2	0,1	0,2
<b>Element</b>	<b>Pb</b>	<b>Pd</b>	<b>Pt</b>	<b>Sb</b>	<b>Se</b>	<b>Si</b>
<b>Emisija u plamenu</b>	0,2	40	2000	100	-	-
<b>ISP</b>	1	2	0,9	10	1	2
<b>Element</b>	<b>Sn</b>	<b>Sr</b>	<b>Ti</b>	<b>V</b>	<b>Zn</b>	
<b>Emisija u plamenu</b>	100	0,1	30	7	1000	
<b>ISP</b>	3	0,002	0,03	0,06	0,1	

### 2.9.3. Smetnje u ICP-OES spektrometriji

Emisija analita u ICP-OES spektrometriji manje je podložna smetnjama nego u bilo kom drugom izvoru pobuđivanja. Nespecifične smetnje koje nastaju zbog prisustva jedinjenja koje utiču na fizičke osobine rastvora, kao što su gustina, viskoznost, površinski napon, dovode do promene količine raspršivanjem unetog rastvora u plazmu, a time i do promene intenziteta analitičkih linija.

Zbog visoke temperature plazme, samim tim dužeg vremena boravka čestica u plazmi i njene atmosfere, hemijskih interferencija u ICP-OES spektrometriji praktično nema. Takođe su jonizacione smetnje manje izražene nego u drugim izvorima, jer je u plazmi visoka koncentracija elektrona. U plazmama niže snage fizičke i hemijske smetnje su češće i ne mogu se ignorisati u svim slučajevima. Kada se efekti utvrde, treba maksimalno smanjiti njihov uticaj. Najznačajnije

smetnje u ICP-OES spektrometriji su spektralne smetnje, koje se javljaju kao posledica pojave spektara bogatog linijama u UV/VIS oblasti, koje se ne javljaju u drugim izvorima pobuđivanja

Do ovih vrsta smetnji dolazi usled preklapanja linije analita sa linijom prisutnog elementa bliske talasne dužine, koji aparat ne može da razloži; preklapanjem sa krilom proširene susedne linije, preklapanjem sa kontinualnim zračenjem neke komponente matrice ili rasutim zračenjem u aparatu. Očigledno je ovaj tip smetnji povezan sa karakteristikama korišćenog spektrometra, odnosno disperzijom i moći razlaganja samog instrumenta.

Spektralna smetnja može da se otkloni primenom spektrometra veće moći razlaganja; ili pošto su spektralne smetnje aditivne, oduzimanjem prethodno određene veličine signal-interferent ili izborom druge spektralne linije analita.

Efekat matrice- elementi matrice prisutni u visokim koncentracijama mogu emitovati intenzivno zračenje. Same karakteristike optičkog sistema instrumenta mogu biti uzrok pojave, tako da intenzivno zračenje dovede do zasićenja detektora što povećava signal pozadine, a samim tim i šum prilikom merenja. Efekat matrice se može smanjiti upotrebom visoko kvalitetnih optičkih komponenata (*Todorović i sar.*, 1997).

## **2.10 Spektrofotometrija u vidljivoj oblasti**

Spektrofotometrija je apsorpciona metoda koja se zasniva na praćenju zavisnosti apsorpcije ili apsorbiviteta od talasne dužine zračenja pri prolasku kroz supstancu. Apsorpcija se može pratiti u ultraljubičastoj (UV), vidljivoj (VIS), infracrvenoj (IC), mikrotalasnoj i radiofrekventnoj oblasti.

Deo spektra elektromagnetnog zračenja od najvećeg značaja u neorganskoj analitičkoj hemiji podeljen je na 3 podoblasti: bliski UV (185-400 nm), vidljivi (400-700 nm) i bliski IR (700-1100 nm). U organskoj analizi bitniji je deo spektra elektromagnetnog zračenja većih talasnih dužina (IR, mikro i radio talasi).

Spektrofotometrija omogućava kvalitativnu i kvantitativnu analizu.

Kvalitativna analiza se zasniva na činjenici da apsorpcioni spektar supstance zavisi od njenog sastava i strukture. Na osnovu zavisnosti apsorbiviteta od talasne dužine i vrednosti apsorbiviteta na određenoj talasnoj dužini moguće je identifikovati apsorbujuću supstancu.

Kvantitativna analiza sa zasniva na Berovom zakonu:

$$A = abc$$

Apsorbancija nekog rastvora srazmerna je koncentraciji ispitivanog rastvora ( $c$ ), debljini sloja kroz koji svetlost prolazi ( $b$ ) i apsorptivnosti rastvorene supstance ( $a$ ).

Pri konstatnoj debljini kivete apsorbancija zavisi samo od koncentracije i apsorptiviteta. Da bi se navedeni zakon mogao primeniti za odreĎivanje koncentracija rastvora neophodno je pri eksperimentalnom radu primeniti monohromatsku svetlost.

Da bi se postigla maksimalna taĉnost i osetljivost pri merenju apsorbancije bitan je izbor talasne duĝine na pri kojoj se meri. Izabrana talasna duĝina mora ispunjavati sledeće uslove:

1. da se merenjem postiĝe maksimalna osetljivost
2. da male promene talasne duĝine ne utiĉu na reproduktivnost
3. da vaĝi Berov zakon.

Na osnovu navedenih uslova merenje apsorbancije se izvodi na:

1. na talasnoj duĝini gde je apsorbancija maksimalna -  $\lambda_{\max}$
2. na talasnoj duĝini optimalne apsorbance -  $\lambda_{\text{opt}}$  i
3. na talasnoj duĝini izobestne taĉke,  $\lambda_{\text{-izob}}$

Sama priroda supstance najviše utiĉe na  $\lambda_{\max}$ , odnosno razliĉita jedinjenja imaju razliĉite hromofore (molekul ili deo molekula koji je odgovoran za apsorpciju u VIS oblasti).

Pored strukture, na poloĝaj  $\lambda_{\max}$  utiĉu i uslovi sredine.

### **3. Eksperimentalni deo**

### 3.1 Biljni materijal

Biljni materijal *Seseli rigidum* Waldst. & Kit. sakupljen na stenovitim terenima na planini Vidlič u Jugoistočnoj Srbiji u julu (faza cvetanja) i u septembru (faza ploda) 2009, dok je *Seseli pallasii* sakupljen u avgustu 2013. na području sela Kravlje, Srbija. Biljne vrste *S. rigidum* i *S. pallasii* (Apiaceae) je identifikovala dr Marija Marković.

Vaučer broj *S. rigidum* (16447) je deponovan u Herbarijumu Botaničke bašte „Jevremovac“, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu. Vaučer primerak *S. pallasii* je deponovan u Herbarijumu na Departmanu za biologiju i ekologiju, Prirodno-matematičkog fakulteta, Univerziteta u Nišu pod brojem 7211.

Biljni material je osušen na tamnom i dobro provetrenom mestu do konstantne mase u toku sedam dana. Osušeni uzorci su samleveni u blenderu i čuvani u polietilenskim kesama na sobnoj temperaturi.

### 3.2 Rastvori i reagensi

U radu su korišćene sledeće hemikalije i reagensi:

$K_3[Fe(CN)_6]$  (Merck, Nemačka)

$NaH_2PO_4$  (Zorka, Srbija)

$Na_2HPO_4$  (Zorka, Srbija)

$FeCl_3$  (Merck, Nemačka)

$AlCl_3$  (Merck, Nemačka)

Rutin (Fluka, Nemačka)

$Na_2CO_3$  (Merck, Nemačka)

$K_2S_2O_8$  (Ridel-dettaen, Nemačka)

$NaNO_2$  (Merck, Nemačka)

$NaOH$  (Merck, Nemačka)

$NaCl$  (Merck, Nemačka)

$MgSO_4$  (Merck, Nemačka)

6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilhroman-2-karboksilna kiselina (Troloks) (Sigma Co. St. Louis, Missouri, USA)

Galna kiselina (Mallinckrodt, Nemačka)

2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) (ABTS) (Sigma Aldrich, Nemačka)

Askorbinska kiselina (vitamin C) (Seharlau, Nemačka)

Butil hidroksi toluen (BHT) (Zorka, Srbija)

2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) (La Chema, Nemačka)

Trihlorsirćetna kiselina (Merck, Nemačka)

Butiriltioholin jodid, DTNB, (Sigma Co. St. Louis, Missouri, USA)

Neostigmin bromid (Sigma Co. St. Louis, Missouri, USA).

metanol (VWR International S.A.S, Francuska),

etil-acetat (Merck, Darmstadt, Germany.),

aceton (Merck, Darmstadt, Germany.),

etar (VWR International S.A.S, Belgija),

*n*-heksan (VWR International S.A.S, Francuska).

Sve hemikalije i reagensi su bile analitičke čistoće.

Hromatografija na koloni je izvedena na silika-gelu (0,063-0,2 mm/70-230 meša ASTM za hromatografiju na koloni MN) Merck.

Multistandard-Ultra Scientific Analytical Solutions, USA (koncentracije 20,00±0,10 µg/mL za Al, Sb, As, Ba, Be, B, Cd, Ca, Cr, Co, Cu, Fe, Pb, Li, Mg, Mn, Hg, Mo, Ni, Se, Na, Sr, Tl, Sn, V, Zn; 100,0±0,5 µg/mL za P, K i Si; i 5,000±0,025 µg/mL za Ag). Sadržaj elemenata je verifikovan u skladu sa ULTRA's ISO 9001 registrovanim sistemom porećenjem sa standardima za kalibraciju nezavisno pripremljenim korišćenjem NIST SRM-ova („Certified Reference Material from the National Institute of Standards and Technology“) a primenom ICP-MS-a. Matriks multistandarda je 2 % HNO<sub>3</sub> sa tragovima vinske kiseline u dejonizovanoj vodi ( $\mu=0,055 \mu\text{S}/\text{cm}$ ) niske vrednosti TOC-a (ukupni organski ugljenik) <50 ppb; >20,00±0,10 mg/L) koji se koristi za ICP analzu je Ultra Scientific (North Kingstown, RI, USA).

### **3.3 Aparati**

Za analizu etarskih ulja korišćen je GC-MS-MS sa triplkvadrupolom (Agilent Technologies, SAD) koji je opremljen Combi PAL uzorkivačem (semplerom) i Headspace Upgrade dogradnjom za G6501B-G6509B.

Analiza ekstrakata je izvedena na HPLC-u, Agilent 1200, sa C18 kolonom (Zorbax Eclipse XDB-C18; 5  $\mu$ m; 4,6 $\times$ 150 mm), DAD detektorom (Diode Array Detector), softverom Chemstation (Agilent Technologies), kvaternom pumpom, vakuum degazerom, autosemplerom i opcijom za termostatiranje kolone.

Svi antioksidativni testovi raĉeni su spektrofotometrijskim metodama merenjem apsorbance na spektrofotometru Perkin Elmer, tipa Lambda 15.

Inhibicija humanog serum holinesteraze je odreĉivana spektrofotometrijski na Konelab 20 analizatoru (ThermoFisher Scientific) sa protoĉnim termostatiranim ćelijama, duĉine 7 mm (na talasima duĉini 405 nm). Prednost Konelab 20 analizatora, pored znaĉajno smanjenje potrošnje reagensa (200  $\mu$ L), je mogućnost obavljanja do 20 analiza na sat.

Ekstrakti su analizirani masenom spektrometrijom na LTQ Orbitrap XL ThermoFisher Scientific (San Jose, CA, USA).

Za snimanje apsorpcionih spektara ĉistih komponenata i ispitivanih sistema korišćen je UV/VIS spektrofotometar marke Perkin Elmer tip Lambda 15 sa kivetama debljine 1 cm.

Za merenje koncentracije metala u rastvorima uzoraka korišćen je atomski emisijski spektrofotometar sa indukovano kuplovanom plazmom, ISP-OES iCAP 6000, Thermo Scientific.

U Tabelama 6. i 7. dat je prikaz parametara metode.

**Tabela 6.** Parametri ISP-OES metode

Parametri metode	
RF snaga plazme	1150 W
Raspršivaĉki gas	0,7 l/min
Brzina pumpe	50 rpm
Vreme ispiranja	30 s
Ar za hlaĉenje	12 l/min
Ar za obrazovanje plazme	0,5 l/min
Pravac posmatranja plazme	aksijalni

**Tabela 7.** Talasne dužine primenjivane za kvantifikaciju pojedinih elemenata metodom ISP-OES

<b>Metal</b>	<b>Talasna dužina <math>\lambda</math> ( nm)</b>
Al	396,152
B	208,959
Ba	455,403
Ca	422,673 i 317,933
Cd	228,802
Cr	267,716
Cu	224,700
Fe	259,940
K	769,896 i 766,490
Mg	202,583
Mn	259,373 i 257,610
Na	589,592
Ni	231,604
Pb	220,353
V	311,071
Zn	202,548

### **3.4 Pripremanje ekstrakata za antioksidativnu, antimikrobnu i antiholinesteraznu aktivnost**

Za pripremanje ekstrakata korišćeni su suvi delovi biljake *S. rigidum* i *S. pallasii* koren, list, cvet i plod.

Odmeravano je 10 g osušenog biljnog materijala i vršena je ultrazvučna ekstrakcija rastvaračima različite polarnosti: etrom, etil-acetatom, acetonom, metanolom i heksanom u odnosu 1:10 (masa biljnog materijala: zapremina rastvarača). Dobijeni ekstrakti su filtrirani i upareni do suva na rotacionom vakuum uparivaču. Masa suvog ostatka je merena na analitičkoj vagi i od nje su pripremani rastvori određenih koncentracija za određivanje antioksidativne, antimikrobne i antiholinesterazne aktivnosti.

### **3.5 Pripremanje uzoraka za GC-MS i HS/GC-MS analizu**

Sveti cvetovi, listovi, plodovi i koren su odvojeni i sušeni na vazduha. Suvi biljni materijal je samleven i hidrodestilovan tokom 2 sata korišćenjem aparature po Klevendžeru (Clevenger). Etarska ulja su ekstrahovana dietil-etrom i osušena anhidrovanim magnezijum sulfatom.



Za „head-space“ GC-MS metodu pripremljeno je 300 mg mlevenog osušenog biljnog materijala i prebačeno u HS vialu i preliveno sa 2 mL destilovane vode. Uzorak je mešan u gasnom uzorkivaču (sempleru) na 80 °C tokom 20 minuta; 500 µL pare je uzorkovano iz viala koristeći gas-tight špric (90 °C) i zatim odmah ubrizgano u hromatografsku kolonu preko transfer linije (75 °C).

### **3.6 Priprema metanolnog ekstrakta korena *S. rigidum* i njegovih frakcija**

Ekstrakcije sekundarnih metabolita iz biljka bazirana je na ekstrakciji rastvaračima različite polarnosti pojedinačnih vegetativnih delova biljke i sukcesivnoim hromatografijama na koloni pojedinih frakcija, primenjujući različite sisteme eluenata (*Cannell* 1998).

Za ekstrakciju je korišćeno 313,57 g korena *S. rigidum*. Biljni material je usitnjen u blenderu i potopljen u metanolu (800 mL) na sobnoj temperaturi. Nakon maceracije i filtriranja, kroz filter papir (plava traka), ekstrakt je uparen do suva na vakuum uparivaču i dobijen je sirov ekstrakt tamno zelene boje (24,1575 g). Zatim, je ostatak biljnog materijala nakon filtracije preliven sa 200 mL metanola i ekstrakcija nastavljena u ultrazvučnom kupatilu bez zagrevanja 30 min. Nakon filtracije i uparavanja rastvarača pod vakuumom dobijen je suvi ekstrakt takođe tamno zelene boje (5,8311g). Nakon ove dve ekstrakcije, dobijeno je ukupno 29,9886 g metanolnog ekstrakta.

#### **3.6.1 Frakcionisanje metanolnog ekstrakta korena *S. rigidum***

Ekstrakcijom metanolnog ekstrakta korena *n*-heksanom dobijeno je 4,9625 g suvog ekstrakta. Pre početka odvajanja komponenata heksanske frakcije metanolnog ekstrakta na koloni, rađene su probe kombinacijom rastvarača u različitim odnosima na TLC u cilju što boljeg razdvajanja i utvrđeno da se najbolje razdvajanje postiže smešom rastvarača *n*-heksan/etil-acetat.

##### **3.6.1.1 Frakcionisanje heksanske frakcije metanolnog ekstrakta**

Za razdvajanje komponenti heksanske frakcije vršena je hromatografija na koloni silikagela eluiranjem smešom rastvarača *n*-heksan/etil-acetat, stalnim povećanjem polarnosti eluenta i dobijeno je 12 frakcija (frakcija I do XII): frakcija I *n*-heksan; frakcija II *n*-heksan/etil-acetat (90:10); frakcije III-X *n*-heksan/etil-acetat (50:50); frakcije XI i XII *n*-heksan/etil-acetat (40:60).

Frakcije su prikupljene na osnovu različitog obojenja: frakcije I i II - bezbojna, frakcije III - tamno zelena, frakcija IV - svetlo žuta, frakcije V i VI - tamno žuta, VII i XII - bezboja.

### ***3.6.1.2 Kolonska hromatografija frakcije I na koloni sa silikagelom***

Nakon uparavanja do suva na vakuum uparivaču, frakcija I (1,1969 g) je podvrgnuta hromatografiji na silikagelu (32 g) uz eluiranje sa *n*-heksan/etil-acetat povećavajući polarnost eluenta, dobijeno je 10 frakcija po 20 mL: frakcija 1<sub>I</sub>-3<sub>I</sub>, *n*-heksan; 4<sub>I</sub>-6<sub>I</sub>, *n*-heksan/etil-acetat (95:5); 7<sub>I</sub>-10<sub>I</sub>, *n*-heksan/etil-acetat (90:10). Za sve frakcija (1<sub>I</sub> do 10<sub>I</sub>) je rađena tankoslojna hromatografija na silikagelu eluiranjem sa *n*-heksan/etil-acetat (70:30).

### ***3.6.1.3 Kolonska hromatografija frakcije II na koloni sa silikagelom***

Frakcija II (1,3213 g) je nakon uparavanja do suva u vakuumu, podvrgnuta hromatografiji na koloni sa silikagelom (40 g) uz eluiranje smešom *n*-heksan/etil-acetat, pri čemu je uz povećanje polarnost eluenta dobijeno 19 frakcija po 20 mL: frakcije 0<sub>II</sub>, *n*-heksan; 1<sub>II</sub>-2<sub>II</sub>, *n*-heksan/etil-acetat (95:5); 3<sub>II</sub>-4<sub>II</sub>, *n*-heksan/etil-acetat (90:10); 5<sub>II</sub>-10<sub>II</sub> *n*-heksan/etil-acetat (80:20); 11<sub>II</sub>-14<sub>II</sub>, *n*-heksan/etil-acetat (70:30); 15<sub>II</sub>-18<sub>II</sub>, *n*-heksan/etil-acetat (60:40).

### ***3.6.1.4 Kolonska hromatografija frakcija 4<sub>II</sub> i 5<sub>II</sub> na koloni sa silikagelom***

Frakcije 4<sub>II</sub> i 5<sub>II</sub> su spojene i ukupna masa suve frakcije ekstrakta je 1,2598 g, nanešena je na kolonu sa silikagelom (40 g) a eluiranje je vršeno dihlorometanom. Dihlorometan je korišćen umesto *n*-heksana, zbog veće polarnosti, smešom *n*-heksan/etil-acetat komponente se teško mogu razdvojiti, dok rastvaračem više polarnosti razdvajanje može biti bolje. Kolonskom hromatografijom dobijeno je 8 frakcija po 20 mL, eluiranje je vršeno dihlorometanom.

## **3.7 Priprema biljnog materijala za ICP-OES analizu**

Nakon usitnjavanja odmereno je po 1 g suvog biljnog materijala u staklenim čašama i preliveno sa po 10 mL koncentrovane HNO<sub>3</sub>. Uzorci su ostavljeni da stoje preko noći. Zatim je vršeno zagrevanje na peščanom kupatilu do male zapremine, tj. dok nisu nestale crvene pare koje potiču od NO<sub>2</sub>. Nakon hlađenja uzoraka dodato je po 4 mL 70 % HClO<sub>4</sub>. Uzorci su ponovo

zagrevani i uparavani do male zapremine. Nakon toga, izvršeno je filtriranje uzoraka (plava traka) u normalne sudove od 25 mL i dopunjavanje dejonizovanom vodom do crte.

U pripremljenim uzorcima je određivansadržaj: Al, Ba, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni, Pb, V i Zn.

Za pranje laboratorijskog posuđa i pripremanje rastvora korišćena je dejonizovana voda sa specifičnom provodljivošću od 0.05  $\mu\text{S}/\text{cm}$ .

### **3.8 Antioksidativna aktivnost**

Antioksidativne karakteristike su procenjene preko sposobnosti hvatanja slobodnih radikala *in vitro* metodama kao što su DPPH<sup>•</sup> i ABTS<sup>•+</sup> metoda i metodom određivanja ukupne redukcione moći (TRP).

Antioksidativna svojstva biljaka obično su posledica sadržaja fenolnih jedinjenja, pa je u ovom radu određivan ukupan sadržaj fenola (TPC) i ukupan sadržaj flavonoida (TFC).

#### **3.8.1 Metode za određivanje antioksidativne aktivnosti**

##### ***3.8.1.1 Određivanje „scavenging“ antioksidativnog slobodno-radikalskog kapaciteta prema 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikalu***

Svaki od ispitivanih ekstrakata (10  $\mu\text{L}$ ,  $c=1 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) je pomešan sa metanolnim rastvorom DPPH (1 mL,  $c=90 \mu\text{mol}/\text{L}$ ), a zatim je odmerni kvantitet dopunjen metanolom do konačne zapremine od 4,0 mL. Nakon mešanja i inkubacije u mraku 1 h, merena je apsorbancija rastvora na talasnoj dužini od 515 nm.

Kao standard korišćen je komercijalni sintetički antioksidans BHT (butil hidroksi toluen), BHT, askorbinska kiselina, rutin i galna kiselina.

DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) „scavenging“ aktivnost izražavana je kao radikalski „scavenging“ kapacitet primenjujući sledeću jednačinu:

$$DPPH - RSC(\%) = 100 \times \left( \frac{A_0 - A_1}{A_0} \right)$$

gde je:

$A_0$  - apsorbancija slepe probe

$A_I$  - apsorbanacija rastvora u prisustvu aktivne komponente

Rezultati su izraženi kao  $SC_{50}$  vrednosti koja predstavlja koncentraciju ekstrakta u reakcionoj smesi koja smanjuje 50 % početnu koncentraciju DPPH, kao  $SC_{50}$  (mg/mL).

### **3.8.1.2 Određivanje antioksidativne aktivnosti primenom ABTS metode**

Najpre je pripremljen rastvor mešanjem 7 mM rastvora ABTS i 2,45 mM rastvora kalijum-persulfata. Rastvor se ostavi da stoji u mraku najmanje 16 h, a zatim se može koristiti u toku dva dana. Pre upotrebe rastvor se razblažuje pogodnim rastvaračem (u našem slučaju metanolom) tako da pri talasnoj dužini od  $\lambda=734$  nm je apsorbanacija  $0,700\pm 0,0500$ . Zatim se odmerava po 1,9 mL razblaženog ABTS rastvora i dodaje po 50  $\mu$ L analiziranog uzorka ili standarda, ostavi da stoji 6 minuta a zatim se meri apsorbanacija na  $\lambda=734$  nm.

Kao standard korišćen je Troloks, a rezultati su izraženi kao  $\mu$ M Troloks ekvivalenta po mg suvog ekstrakta ( $\mu$ M TE/mg s.e.). Komercijalni standardi korišćeni osim troloksa i BHT, su askorbinska kiselina i galna kiselina.

### **3.8.1.3 Određivanje antioksidativne aktivnosti merenjem ukupne redukcionne moći (TRP)**

Redukciona moć svih ekstrakata je izražena preko redukcionne moći askorbinske kiseline kao pozitivne kontrole (AEAC- Ascorbate Equivalent Antioxidant Capacity).

Reakcione smeše su pripremljene mešanjem 10  $\mu$ L ekstrakta sa 1 mL, 1 % rastvora  $K_3[Fe(CN)_6]$  i 1 mL pufera  $NaH_2PO_4-Na_2HPO_4$  (pH 6,6). Smeše su inkubirane na 50 °C 30 minuta i nakon čega se dodaje 1 mL, 10 % trihlorsirćetne kiseline. Smeše su zatim centrifugirane na 3000 rpm 10 minuta. Nakon centrifugiranja uzima se 1 mL frakcije suplimenata i meša sa 1 mL destilovane vode i 0,2 mL, 0,1 % rastvora  $FeCl_3$ . Apsorbancije tako dobijenih smeša merene su na talasnoj dužini od 700 nm. Povećane apsorbcije reakcionih smeša ukazuju na veću redukcionu moć.

Ukupna redukciona moć ovih ekstrakata je računata prema jednačini:

$$TRP = \frac{c_A \cdot A_s}{A_A}$$

gde je:

$c_A$ - konačna koncentracija askorbinske kiseline u  $\mu$ g/mL

$A_S$ - apsorbanacija uzorka

*A<sub>A</sub>*- apsorbanacija askorbinske kiseline

Kao standardi korišćeni su i troloks, BHT, rutin i galna kiselina.

Rezultati se izražavaju kao mg ekvivalenata askorbinske kiseline po mg suvog ekstrakta, (mg AAE/mg s.e.).

#### **3.8.1.4 Određivanje ukupnog sadržaja flavonoida**

Ukupna sadržaj flavonoida je određen prema metodi po Zišenu (*Zhishen i sar.*, 1999). U ekstrakte (50 µL, c=1 mg/mL) su dodati rastvori sledećim redom H<sub>2</sub>O (2 mL) i NaNO<sub>2</sub> (150 µL, 5 % rastvor), posle stajanja na sobnoj temperaturi, dodat je AlCl<sub>3</sub> (0,75 mL; 2 % rastvor) i nakon 5 minuta je dodat NaOH (1 mL, 1 M), i dopunjen destilovanom vodom u normalnom sudu od 5 mL.

Takođe je snimljena standardna serija rutina (početne koncentracije 0,5 mg/mL) merenjem apsorbanacije rastvora prema vodi na talasnoj dužini od 520 nm.

Sva merenja su ponovljena tri puta. Rezultati su izraženi kao µg ekvivalenata rutina po mg suvog ekstrakta, (µg RuE /mg s.e.).

#### **3.8.1.5 Određivanje ukupnih fenolnih jedinjenja po Folin-Sjoklto metodi**

U rastvor ekstrakata (0,2 mL; c=1 mg/mL) dodaje se 1 mL Folin-Sjoklto reagensa i smeše se mućkaju 1 minut. Zatim je dodato po 4 mL Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> i tako pripremljeni rastvori se ostavljeni su u mraku 30 minuta, nakon čega je apsorbanacija merena na λ=750 nm.

Ukupan sadržaj polifenola se određuje na osnovu kalibracione prave galne kiseline kao standarda (25-150 mg/mL u 80 % metanolu), a rezultati se izražavaju kao µg ekvivalenata galne kiseline po mg suvog ekstrakta (µg GAE /mg s.e.), kao prosečna vrednost tri merenja.

### **3.9 Određivanje antimikrobne aktivnost mikrodilucionom metodom**

Određivanje antimikrobne (antibakterijsko i antifungalno) aktivnosti je izvršeno mikrodilucionom metodom, prema standardima NCCLS (*Nacionalni komitet za kliničke laboratorijske standarde*, 2003). Od šest ispitivanih kultura test-sojeva mikroorganizama uzgajanih na hranljivom agaru je u sterilnom fiziološkom rastvoru napravljena suspenzija turbiditeta 0,5 McFarlanda: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC

27853, *Bacillus cereus* ATCC 10876, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Candida albicans* ATCC 16404 i *Aspergillus niger* ATCC 10231 dobijene iz American Type Culture Collection. Zatim je napravljena serija duplih razrećenja ulja u 10 % DMSO-u, i uneto u svako od 96 udubljenja mikrotitarske ploče tako da je ukupna zapremina u bunariću iznosila 100  $\mu$ L, a gustina suspenzije  $2 \times 10^6$  CFU/mL. Mikrotitarske ploče su inkubirane na 37 °C u trajanju od 24 h. Postupak je izveden u tri ponavljanja i dve kontrole rasta koje se sastoje od hranljivih bujona i medijuma sa rastvaračem.

Hloramfenikol, streptomycin i tetraciklin su korišćeni kao pozitivna kontrola. Mikrobiološki rast je očitavan dodavanjem po 20  $\mu$ L; 0,5 % vodenog rastvora trifenil tetrazolium hlorida (TTC) kojim se porasle kolonije boje u ružičasto (*Sartoratto* i sar., 2004). Koncentracija u kojoj nema vidljivog rasta predstavlja minimalnu inhibitornu koncentraciju- MIC.

Da bi se odredila minimalna baktericidna/fungicidna- MBC/MFC koncentracija sadržaj svih bunarića se inokulira na Mueller Hinton agaru (MHA) u toku 24 h na 37 °C. Nakon inkubacije vršeno je brojanje poraslih kolonija. MBC se definiše kao najniža koncentracija ekstrakata na kojima je ubijeno 99,9 % inokulisanih mikroorganizama.

### **3.10 Određivanje antiholinesterazne aktivnosti**

#### ***3.10.1 Poreklo i priprema humane holinesteraze za analizu***

Uzeta je krv deset zdravih dobrovoljaca (18-65 godina oba pola) u Opštoj bolnici Pirot, uz njihovu pismenu saglasnost. Prema upitniku, niko nije imao ozbiljne zdravstvene poremećaje, niti je koristio droge, cigarete, ili alkohol. Najmanje mesec dana pre davanja krvi, niko od njih nije konzumirao lekove. Svakom od ispitanika, uzeto je 5 mL krvi u Vacutainer epruvete, a zatim su uzorci krvi centrifugirani na 3000 rpm tokom 10 min i supernatant seruma je spojen i korišćen kao izvor enzima za dalju analizu.

Serumska holinesteraza (bez obzira na njeno poreklo) katalizuje hidrolizu butiriltioholina do tioholina, koji reaguje sa hromogenom ditio-nitro benzoevom kiselinom (DTNB). Brzina reakcije se određuje brzinom formiranja 5-tio-2-nitro benzoeve kiseline, merenjem na 405 nm, u šest ciklusa od 28 s. Analizirani rastvori (10  $\mu$ L) su pomešani sa 10  $\mu$ L pulovanog seruma (razblažen sa fosfatnim puferom u odnosu 1:9, V/V), i rastvorom fosfatnog pufera (160  $\mu$ L). Ovako spremljeni uzorci su preinkubirani 10 minuta (na 310 K), nakon čega je dodat DTNB

rastvor (10  $\mu$ L). Posle 60 sekundi, dodat je rastvor supstrata (BuTC, 10  $\mu$ L) (*Stankov-Jovanović i sar.*, 2007). Kao slepe probe korišćeni su odgovarajući rastvarači, a ako pozitivna kontrola rastvor neostigmin bromida koncentracije 200  $\mu$ g/mL.

Butiril holinesteraza, EC 3.1.1.8, (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA), poreklom iz konjskog seruma korišćena kao izvor enzima, i pripremana je rastvaranjem u fosfatnom puferu u koncentraciji 4 mg/mL. Aktivnost enzima je merena prema proceduri opisanoj za holinesterazu iz humanog seruma.

### **3.11 GC-MS i HS/GC-MS analiza**

Uzorci su analizirani na 7890/7000B GC-MS-MS triplkvadripolu (Agilent Technologies, SAD) koji je opremljen Combi PAL uzorkivačem i Headspace Upgrade za G6501B-G6509B. Razdvajanje je postignuto korišćenjem HP-5MS kapilarne kolone (5 % fenilmetilsiloksan, dimenzije 30 m x 0,25 mm, debljine filma 0,25  $\mu$ m). Temperaturni režim je programiran od 50-290  $^{\circ}$ C pri brzini zagrevanja 4  $^{\circ}$ C/min koristeći helijum kao noseći gasa sa protokom od 1.0 mL/min. Temperatura injektora je 250  $^{\circ}$ C, dok je injektovana zapremina HS pare 500  $\mu$ L i etarskog ulja rastvorenog u heksanu (1: 100) 1  $\mu$ L, odnos: 1:40. MS je radio pri jonizacionom naponu od 70 eV sa masenim skeniranjem u rasponu 50-650.

Identifikacija komponenata etarskog ulja vršena je porećenjem retencionih indeksa (u odnosu na C<sub>8</sub>-C<sub>44</sub> alkane (*Van den Dool i Kratz* 1963) na koloni HP-5MS) sa literaturnim vrednostima (*National Institute of Standards and Technology* 2005; *Adams* 2007). Dalja identifikacija račena je porećenjem masenih spektara sa spektrima koji su dobijeni snimanjem autentičnih uzoraka, NIST 11, Wiley 6 i pravljenjem MS baze primenom AMDIS ver. 2.1 softvera, i ko-injektovanjem standarda, kada je to bilo moguće moguće.

### **3.12 HPLC-HRMS analiza**

Koncentracija svih pripremljenih ekstrakata za LC-HRMS analizu je 0,2 mg/mL. Uzorak je analiziran tačnom hromatografijom kuplovanom elektrosprej jonizacijom (ESI)- visoke rezolucije masene spektrometrije (LC-HRMS). U tom cilju, 5 mL uzorka je ubrizgano u kolonu sa reversnom fazom C18 Symmetry (2,1 x 150,5 mm) (Waters, Irska). Razdvajanje različitih

jedinjenja je izvedeno u izokratskom režimu upotrebom smeše acetonitril:voda (1:1, V/V) sa 0,1 % mravljom kiselinom pri protoku od 200  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Pouzdana masena merenja su rađena na LTQ Orbitrap XL Thermofisher Scientific (San Jose, CA, USA), sa spoljnom kalibracijom instrumenta, čija je tačnost do 5 ppm (Hu 2005). Parametri za pozitivan mod ESI bili su: napon ESI igle 4 kV, kapilarni napon 20 V, temperatura kapilare 275 °C, gas za raspršivanje  $\text{N}_2$  70 a.u. (arbitrary units pomoćni gas 20 a.u. i napon sočiva (tube lens offset) 80 V. Maseni spektar je u rasponu 145-900 Th. Disocijacija izazvana sudarom (Collision-Induced Dissociation, CID) je rađena u linearnoj zamci koristeći helijum kao gas za sudar u rasponu 100-500 Th, sa 1 Th širine izolacije i 15 % normalizovanom energijom sudara (Lopez 1999). Moć rezolucije masa (puna širina na polovini maksimalne visine) je postavljen na  $6 \times 10^4$  za signal na masi  $m/z$  400 (Liu i sar., 2007).

### **3.13 Statistička analiza**

Hemometrija predstavlja interdisciplinarnu naučnu oblast, koja obuhvata multiparametrijsku statističku analizu, matematičko modelovanje, informatičke metode i analitičku hemiju. Korišćenjem matematičkih, informacionih i statističkih metoda, moguće je efikasno i jednostavno klasifikovanje jedinjenja i uzoraka u neku od kategorija, na osnovu podataka o njihovoj molekulskoj strukturi, fizičko-hemijskim osobinama, (Wold 1995; Gemperline 2006). Za uspostavljanje validnih matematičkih relacija neophodno je sve informacije pretvoriti u numeričke, pa modelovati matematički obrazac pomoću osnovnog skupa ulaznih podataka dobijenih eksperimentalnim putem.

Svi statistički proračuni su rađeni korišćenjem statističkog softverskog paketa (STATISTICA 8.0, StatSoft, Tulsa, Oklahoma, USA).

#### **3.13.1 Multivarijantna analiza. Metoda analize glavne komponente**

Analiza glavnih komponenti (Principal Component Analysis, PCA) vrlo je često primenjivan postupak za analizu podataka pošto je to jedna od najjednostavnih tehnika multivarijantne analize. PCA je tehnika formiranja novih varijabli koje predstavljaju kombinacije izvornih varijabli, čime se omogućava izdvajanje bitnih informacija i podataka iz originalnih skupova podataka. Područja primene PCA analize mogu biti vrlo raznolika.



Glavni aspekti analize glavnih komponenata su sažimanje i analiza linearne povezanosti većeg broja kvantitativnih, međusobno povezanih varijabli, u manji broj novih varijabli, međusobno nekorelisanih. Proces je praćen minimalnim gubitkom informacija. Ona se primenjuje kada je veliki broj varijabli u skupu redundantan, odnosno kada se više varijabli odnosi na istu dimenziju a da pri tom ne pružaju dodatnu informaciju koja već nije obuhvaćena nekom drugom varijablom. Da bi se primenila analiza glavnih komponenti, potrebno je da varijanse većine promenljivih budu gotovo zanemarljive.

Osnovni koraci u analizi glavnih komponenata su:

1. standardizacija varijabli: pošto se veliki broj podataka sastoji iz varijabli različitih redova veličine, često i različitih jedinica mere neophodna je standardizacija varijabli. Taj postupak omogućava da nakon standardizacije sve varijable imaju varijansu jednaku jedinici i na taj način sve imaju isti značaj u analizi. Međutim, u izvesnim slučajevima standardizacija podataka može da ima i neke nedostatke koji se ogledaju u činjenici da varijable za koje se zna da sadrže malu količinu informacija, nakon standardizacije postaju značajne isto kao i varijable koje sadrže značajnije informacije. Sve to ukazuje da PCA ne može da napravi razliku između značajnih i informacija od malog značaja.
2. izračunavanje korelacione matrice između svih standardizovanih varijabli.
3. pronalaženje svojstvene vrednosti (eigenvalues) glavnih komponenata. Eigenvalue određene glavne komponente predstavlja meru varijansi svih varijabla koje su obuhvaćene tim faktorom.
4. eliminacija komponenata koje objašnjavaju proporcionalno mali udeo varijanse (obično prvih nekoliko nose 80-90 % ukupne varijanse). Veličina eigenvalues ukazuje na značaj date glavne komponente prema originalnim varijablama. Ukoliko neka glavna komponenta ima malu eigenvalue vrednost, onda je značenje te glavne komponente za objašnjenje varijanse varijabli minorno, pa se taj faktor eliminiše kao beznačajan.

Analiza glavnih komponenti ima mogućnost prepoznavanja i eliminacije suvišnih podataka iz eksperimentalnih rezultata. Zahvaljujući tome, primenom analize glavnih komponenti broj početnih podataka se redukuje, a kao rezultat se dobijaju nove promenljive tzv. glavne komponente (Principal Components, PC). Glavna komponenta je u stvari linearna kombinacija originalnih promenljivih.

Osnovu za interpretaciju glavnih komponenata čine svojstvene vrednosti- eigenvalues koje su za prvu glavnu komponentu, najčešće, relativno ravnomerno raspoređene po svim originalnim varijablama. U slučaju druge glavne komponente dolazi do njihove veće disproporcije. Svojstvena vrednost veća od 1 ukazuje da PCA uračunava više varijansi nego originalne promenljive. U toku analize se dobija veći broj glavnih komponenti. Prva glavna komponenta, PC1, predstavlja maksimalni udeo ukupnih promenljivih. Druga glavna komponenta, PC2, ne koreliše se sa PC1 a predstavlja maksimalni udeo rezidualne promenljive. PC2 predstavlja pravac normalan na PC1 kojim se opisuje maksimum preostalog varijabiliteta među podacima. Na istom principu se formiraju i ostale glavne komponente, sve dok se ukupna varijansa ne izračuna. Ostale glavne komponente su normalne na prethodne i njihov pravac pokriva varijanse među podacima projektovane na posmatrani pravac. U analizama obično je dovoljno zadržati samo nekoliko glavnih komponenti, čiji zbir obuhvata veliki procenat ukupne promenljive.

Za određivanje potrebnog broja komponenata koje se uzimaju u obzir postoje različiti kriterijumi, a najčešće primenjivani je Kaiser kriterijum prema kojem se odbacuju sve komponente kojima je Eigenvalue manja od 1 (*Kaiser* 1960). Takođe, ukoliko se grafički predstavi zavisnost broja glavnih komponenata od varijanse PCA skorova, tačka u kojoj kriva naglo menja nagib i postaje skoro ravna predstavlja broj glavnih komponenata koje bi trebalo uzeti u obzir za dalju analizu. Preostale glavne komponente sa niskim vrednostima varijansi pružaju informacije koje su od malog značaja za posmatranu analizu. Broj glavnih komponenata koji se koristi za dalja izračunavanja bi trebalo da objašnjava najmanje 80 % ukupne varijanse podataka.

Rezultati primene metode analize glavnih komponenata mogu poslužiti još i:

1. za dalju interpretaciju rezultata grafičkim predstavljanjem
2. kao ulazne varijable u drugim multivarijantnim metodama kao npr. klaster, regresiona i diskriminantna analiza.

### **3.13.2 Metoda aglomerativne hijerarhijske klaster analize. Klaster analiza**

Klaster analiza, Cluster Analysis, (*Sharma* 1996) ili analiza grupisanja je metoda multivarijacione analize koja se koristi za klasifikovanje objekata u grupe, tako da su objekti unutar grupe međusobno slični, dok između grupa postoje znatne razlike. Pri tom se pretpostavlja da se može pronaći prirodan način grupisanja koji je smislen za istraživača.

Geometrijski koncept klaster analize je vrlo jednostavan u dvodimenzionalnom prostoru jer se svaka posmatrana vrednost može prikazati kao jedna tačka. Ova vrsta analize omogućava klasifikovanje tj. klasterovanje varijabli na taj način da su varijable u okviru jednog klastera slične u odnosu na posmatrane vrednosti. Ciljevi ovog tipa klaster analize su postizanje homogenost unutar klastera, (podaci koji pripadaju istom klasteru bi trebalo da su što sličniji), i heterogenost između klastera, (podaci koji pripadaju različitim klasterima bi trebalo da su što je moguće više različiti). Merilo sličnosti pri analizi u dvodimenzionalnom prostoru je udaljenost između dvetačke.

Hijerarhijske metode u osnovi imaju izgradnju hijerarhijske strukture nalik drvetu i baziraju se na algoritmu koji formira klaster po hijerarhiji. To je razlog zbog kojeg se rezultati ove metode analize najčešće prikazuje grafički, dendrogramom.

Polazna osnova metode grupisanja predstavlja meru bliskosti između varijabli. Mera bliskosti najčešće opisuje međusobne razlike između dve varijable. Tada mera sličnosti meri stepen međusobnog rastojanja, pri čemu je najpoznatije Euklidovo rastojanje.

Metode analize grupisanja razlikuju se prema tome kako mere sličnost ili razlike između grupa. Metoda jednostrukog povezivanja popunjava (razređuje) prostor, a metoda potpunog povezivanja, štedi (čuva) prostor. Dok metoda centroida teži da udružuje grupe čiji su centri slični međusobom, dotle Wardova metoda teži da udružuje grupe manje veličine sa istim takvim grupama, iako su znatno udaljenije od prvih. Metoda prosečnog povezivanja, metoda centroida i Wardova metoda se češće koriste u odnosu na metod jednostrukog i potpunog povezivanja, jer su manje osetljive na prisustvo nestandardnih opservacija.

Drugi pristup, nehijerarhijski, vrši raščlanjivanje tako da jedinice mogu da se kreću iz jedne u drugu grupu u različitim fazama analize. Nehijerarhijska metoda ili metoda raščlanjivanja polazi od unapred određenog broja klastera koji istraživač sam definiše na osnovu iskustva, ranijih analiza ili preporuke statističkog softvera. Nakon toga se pristupa razvrstavanju jedinica posmatranja. Postoje dva načina za razvrstavanje jedinica posmatranja. Prvi je da se privremeno, na slučajan način, odrede jedinice koje predstavljaju tačke grupisanja, pa se na osnovu udaljenosti od tih jedinica sve ostale jedinice smeštaju u odgovarajući klaster. Određuje se onoliko tački grupisanja koliko je unapred definisano klastera. Nakon toga računarski program premešta jedinice iz jednog u drugi klaster da bi bili što homogeniji. Taj postupak se ponavlja

nekoliko puta. Drugi način raščlanjivanja je da se razvrstavanje odvija na osnovu nekog a priori zadatog kriterijuma. Tipični algoritam za metodu raščlanjivanja podrazumeva sledeće korake:

1. proizvoljno određivanje privremenih tačaka grupisanja
2. unutar svakog klastera se pronalazi takva tačka u prostoru da su udaljenosti jedinica svedene na minimum, uglavnom tamo gde je najveća gustina jedinica. Takva tačka u prostoru se naziva klasterov centroid
3. centriodi se koriste kao nove tačke grupisanja za nove klastere jer su mnogo relevantniji za formiranje klastera nego inicijalne, proizvoljne tačke
4. vrši se izračunavanje udaljenosti svih jedinica posmatranja u odnosu na centroide radi započinjanja nove iteracije
5. vrši se određivanje novih centroida unutar klastera
6. nastavlja se sa iteracijama sve do trenutka kada preseljavanje jedinica posmatranja iz jednog u drugi klaster više ne doprinosi poboljšanju homogenosti unutar klastera.

Klaster analiza nije tehnika statističkog zaključivanja zasnovana na matematičkoj podlozi, pa zato i ne zahteva normalan raspored podataka, njihovu linearnost i homogenost varijansi. Interpretirati klastere znači znati objasniti njegov sadržaj, tj. biti u mogućnosti klaster opisati rečima.

Klaster analiza je osetljiva na izbor varijabli relevantnih za istraživanje i na one rezultate koji se razlikuju od ostalih (outliers). Ovo sve ukazuje da su od izuzetnog značaja reprezentativnost uzorka. Zbog toga je klaster analiza pod uticajem izbora samog analitičara više nego ostale metode multivarijatne analize.

## **4. Rezultati i diskusija**

## 4.1 Sekundarni metaboliti biljne vrste *S. rigidum*

### 4.1.1 Hemijski sastav etarskih ulja biljne vrste *S. rigidum*

U Tabeli 8. dat je sastav etarskih ulja i isparljivih komponenata delova biljke (koren, list, cvet i plod) *Seseli rigidum* identifikovanih GC-MS i HS/GC-MS tehnikama.

**Table 8.** Sastav (%) etarskih ulja različitih delova (koren, list, cvet, plod) biljne vrste *Seseli rigidum* identifikovanih GC-MS i HS/GC-MS tehnikama

Red. Br.	RL	RI	Jedinjenje*	Koren		List		Cvet		Plod		Id
				GC-MS	HS/GC-MS	GC-MS	HS/GC-MS	GC-MS	HS/GC-MS	GC-MS	HS/GC-MS	
1	762	772	Pentanol	0,8	1,1	-	-	-	-	-	-	a,b
2	765	779	3-Metil-2-buten-1-ol	tr	-	tr	-	0,1	-	0,2	-	a,b
3	778	787	3-Metil-2-butenal	tr	-	-	-	-	-	-	-	a,b
4	801	801	Heksanal	1	8,5	0,1	-	tr	0,8	tr	-	a,b
5	827	829	Izovalerijanska kiselina	-	-	-	-	-	-	tr	-	a,b
6	828	830	Furfural	-	-	-	-	-	-	-	-	a,b
7	846	850	2-(E)-Heksanal	tr	-	-	-	-	-	-	-	a,b
8	863	864	Heksanol	0,3	0,3	tr	-	tr	-	tr	-	a,b
9	880	886	Izopropil-2-metil-butirat	-	-	-	-	-	-	0,1	-	a,b
10	889	890	2-Heptanon	0,1	0,2	tr	-	-	-	-	-	a,b
11	904**	893	Izopropil-izovalerat	-	-	-	-	-	-	0,1	0,7	a,b
12	901	901	Heptanal	0,7	3,9	0,1	-	tr	-	tr	-	a,b
13	921	923	Triciklen	tr	tr	0,1	-	tr	-	tr	-	a,b
14	924	928	$\alpha$ -Tujen	tr	0,1	0,5	0,5	0,1	0,1	0,3	0,4	a,b
15	932	936	$\alpha$ -Pinen	3,3	53,0	26,3	76,7	33,0	57,2	33,2	35,0	a,b,c
16	946	950	Kamfen	0,4	7,0	3,1	7,5	1,5	6,5	1,8	3,7	a,b
17	947	956	(2E)-2-Heptenal	0,3	-	-	-	-	-	-	-	a,b
18	953	956	Tuja-2,4(10)-dien	-	-	0,2	0,1	tr	-	-	-	a,b
19	952	961	Benzaldehid	0,1	0,5	-	-	-	-	-	-	a,b
20	959	968	Heptanol	0,7	0,4	-	-	-	-	-	-	a,b
21	969	976	Sabinen	0,3	tr	7,8	3,3	7,9	7,8	18,5	28,7	a,b,c
22	974	979	$\beta$ -Pinen	1,0	2,3	2,1	1,8	2,4	0,9	2,1	1,1	a,b,c
23	984	991	2-Pentilfuran	1,1	1,3	-	-	-	-	-	-	a,b
24	988	992	Mircen	tr	-	0,9	0,9	2,7	2,8	2,7	1,9	a,b,c
25	998	1004	Oktanal	7,7	12,2	0,3	0,1	0,1	-	0,1	-	a,b
26	1002	1006	$\alpha$ -Felandren	-	-	0,1	-	0,3	0,6	0,7	1,8	a,b
27	1005	1012	(2E,4E)-2,4-Heptadienal	tr	-	-	-	-	-	-	-	a,b
28	1014	1019	$\alpha$ -Terpinen	tr	-	0,4	-	0,3	0,1	0,5	0,2	a,b,c
29	1022	1027	o-Cimen	0,5	1,2	1,2	0,3	0,5	4,3	1,4	5,3	a,b

30	1024	1031	Limonen	1,1	5,6	5,4	6,6	7,1	6,5	8,7	12	a,b,c
31	1026**	1033	5-Etil-1-ciklopenten-1-karbaldehid	0,3	-	-	-	-	-	-	-	a,b
32	1026	1034	Eukaliptol	-	-	0,2	-	0,1	-	tr	-	a,b
33	1032	1039	(Z)- $\beta$ -Ocimen	-	-	0,1	-	0,4	0,1	0,2	0,1	a,b
34	1037	1040	(E)-3-Okten-2-on	0,3	-	-	-	-	-	-	-	a,b
35	1036	1045	Fenilacetaldehid	0,2	-	0,3	-	tr	-	tr	-	a,b
36	1044	1049	(E)- $\beta$ -Ocimen	-	-	0,1	-	1,1	0,4	0,6	0,1	a,b
37	1049	1058	(E)-2-Okten-1-al	1,1	0,1	-	-	-	-	-	-	a,b
38	1054	1061	$\gamma$ -Terpinen	0,3	-	0,7	tr	3,1	5,2	5,5	2,6	a,b,c
39	1065	1069	(Z)-Sabinen hidrat	tr	-	0,6	-	0,1	-	0,2	tr	a,b
40	1065	1070	Oktanol	0,5	tr	-	-	tr	-	-	-	a,b
41	1067	1074	(Z)-Linalool-oksidi	0,2	-	0,1	-	-	-	-	-	a,b
42	1078**	1076	Heptanska kiselina	0,1	-	-	-	-	-	-	-	a,b
43	1086	1091	Terpinolen	-	-	0,3	-	0,3	0,1	0,3	0,1	a,b
44	1087	1092	2-Nonanon	0,9	0,7	-	-	-	-	-	-	a,b
45	1095**	1092	$\alpha$ -Pinen-oksidi	-	-	0,5	0,1	-	-	-	-	a,b
46	1095	1100	Linalool	-	-	1,5	0,1	0,9	0,2	0,4	0,3	a,b
47	1098	1100	(E)-Sabinen hidrat	0,2	-	-	-	-	-	-	-	a,b
48	1100	1101	Nonanal	1,1	0,5	tr	-	tr	-	tr	-	a,b
49	1100	1103	3-Metilbutil-2-metil-butirat	-	-	-	-	0,2	0,1	0,1	0,2	a,b
50	1106**	1104	6-Metil-3,5-heptadien-2-on	-	-	0,2	-	-	-	-	-	a,b
51	1103	1108	2-Metilbutil-izovalerat	-	-	tr	-	0,1	0,1	tr	tr	a,b
52	1113**	1112	Roze-oksidi	-	-	0,1	-	-	-	-	-	a,b
53	1112	1116	3-Metil-3-butenil-3-metil-butirat	-	-	-	-	0,1	0,2	0,1	0,1	a,b
54	1112	1119	(E)-Tujon	tr	-	0,1	-	-	-	-	-	a,b
55	1118	1123	(Z)- <i>p</i> -Ment-2-en-1-ol	-	-	0,5	-	0,1	-	0,2	-	a,b
56	1119	1124	(E)- <i>p</i> -Menta-2,8-dien-1-ol	0,1	-	-	-	-	-	-	-	a,b
57	1122	1128	$\alpha$ -Kamfolenal	1,7	0,2	2,5	0,4	0,2	0,1	0,1	0,1	a,b
58	1134	1132	(E)- $\beta$ -Dihidroterpineol	0,1	-	-	-	-	-	-	-	a,b
59	1133	1137	(Z)- <i>p</i> -Menta-2,8-dien-1-ol	tr	-	0,2	-	-	-	-	-	a,b
60	1135	1142	(E)-Pinokarveol	1,3	-	3,8	0,3	0,3	0,1	0,2	0,1	a,b
61	1137	1144	(Z)-Verbenol	0,3	-	tr	-	-	-	tr	-	a,b
62	1140	1148	(E)-Verbenol	1,9	-	5,0	0,2	0,2	0,1	0,2	-	a,b
63	1147	1149	3-Metil-2-butenil-3-metil-butirat	-	-	-	-	0,1	-	0,1	0,2	a,b
64	1154**	1151	<i>p</i> -Menta-1(7),2-dien-8-ol	0,2	-	0,3	-	tr	-	-	-	a,b
65	1154	1157	$\beta$ -Pinen-oksidi	-	-	-	-	tr	-	-	-	a,b
66	1156	1157	Pentil-cikloheksa-1,3-dien	-	-	-	-	-	-	-	0,1	a,b
67	1158	1158	<i>m</i> -Krezol-acetat	-	-	0,2	-	-	-	-	-	a,b
68	1154	1160	Sabina keton	-	-	1,0	-	-	-	-	-	a,b
69	1157	1160	(E)-2-Nonen-1-al	1,4	-	-	-	0,1	-	0,2	-	a,b
70	1158	1164	(E)-Pinokamfon	0,2	-	0,1	-	-	-	-	-	a,b
71	1160	1166	Pinokarvon	0,5	-	1,5	0,2	0,1	-	0,1	-	a,b,c

72	1166	1169	<i>p</i> -Menta-1,5-dien-8-ol	0,5	-	1,1	-	0,2	-	0,1	-	a,b
73	1167	1173	Oktanska kiselina	1,7	-	-	-	-	-	-	-	a,b
74	1167	1175	Umbelulon	-	-	-	-	-	-	tr	-	a,b
75	1174	1180	Terpinen-4-ol	3,9	-	2,8	tr	1,7	0,1	2,8	0,2	a,b
76	1179	1186	<i>p</i> -Cimen-8-ol	0,4	-	0,7	-	tr	-	tr	-	a,b
77	1183	1189	Kripton	tr	-	0,2	-	tr	-	tr	-	a,b
78	1186	1192	$\alpha$ -Terpineol	0,2	-	0,9	-	0,5	tr	0,2	-	a,b
79	1194	1195	Mirtenol	-	-	0,2	-	-	-	-	-	a,b
80	1196	1196	( <i>E</i> )-4-Decenal	-	-	-	-	-	-	0,1	-	a,b
81	1195	1199	Mirtenal	0,8	-	tr	0,2	-	-	tr	tr	a,b
82	1199	1199	( <i>Z</i> )-7-Decenal	-	-	2,4	-	0,7	0,1	0,4	-	a,b
83	1201	1206	Dekanal	0,2	-	0,1	-	0,1	-	0,1	-	a,b
84	1207	1209	( <i>E</i> )-Piperitol	-	-	tr	-	tr	-	0,1	-	a,b
85	1204	1212	Verbenon	0,6	-	1,9	0,1	tr	-	tr	-	a,b
86	1210	1213	( <i>2E,4E</i> )-2,4-Nonadienal	0,3	-	-	-	-	-	-	-	a,b
87	1215	1220	( <i>E</i> )-Karveol	0,8	-	1,5	-	0,1	-	0,1	-	a,b
88	1223	1228	Citronelol	-	-	0,2	-	0,1	-	0,1	-	a,b
89	1227	1230	( <i>Z</i> )- <i>p</i> -Menta-1(7),8-dien-2-ol	-	-	0,1	tr	-	-	-	-	a,b
90	1226	1233	( <i>Z</i> )-Karveol	-	-	0,1	-	-	-	-	-	a,b
91	1232	1237	( <i>Z</i> )-3-Heksenil 3-metil-butirat	-	-	0,1	tr	0,1	-	0,1	tr	a,b
92	1234	1241	( <i>E</i> )-3-Decen-2-one	0,1	-	-	-	-	-	-	-	a,b
93	1241	1242	Heksil-3-metil-butirat	-	-	-	-	tr	-	tr	tr	a,b
94	1238	1243	Kuminaldehid	tr	-	0,2	-	-	-	-	-	a,b
95	1241	1246	<i>O</i> -Metilkarvakrol	0,5	-	-	-	0,1	tr	0,3	0,2	a,b
96	1239	1247	Karvon	-	-	0,6	tr	-	-	-	-	a,b
97	1249	1257	Piperiton	tr	-	tr	-	tr	-	tr	-	a,b
98	1260	1262	( <i>E</i> )-2-Decenal	1,1	-	0,1	-	-	-	-	-	a,b
99	1259	1266	( <i>E</i> )-4-Decen-1-ol	-	-	0,4	-	-	-	-	-	a,b
100	1263**	1267	9-Decen-1-ol	-	-	-	-	0,2	-	0,1	-	a,b
101	1266**	1267	5-Pentil-3H-furan-2-on	1,1	-	-	-	-	-	-	-	a,b
102	1271**	1271	Nonanska kiselina	0,8	-	-	-	-	-	-	-	a,b
103	1274	1272	6-Undekanon	0,3	-	-	-	-	-	-	-	a,b
104	1269	1277	Perila aldehid	-	-	0,1	-	-	-	-	-	a,b
105	1287	1289	Bornil-acetat	1,6	-	3,1	0,1	1,0	0,4	1,2	tr	a,b
106	1292**	1293	Dihidroedulan	-	-	0,3	-	-	-	-	-	a,b
107	1292	1294	( <i>2E,4Z</i> )-2,4-Dekadienal	0,9	-	-	-	tr	-	tr	-	a,b
108	1294	1301	Perila alkohol	-	-	0,1	-	-	-	-	-	a,b
109	1298	1301	Karvakrol	-	-	-	-	-	-	tr	-	a,b
110	1298**	1303	Teaspiran A	-	-	0,1	-	-	-	-	-	a,b
111	1305	1308	Undekanal	0,1	-	-	-	-	-	-	-	a,b
112	1315	1317	( <i>2E,4E</i> )-2,4-Dekadienal	2,3	-	0,1	-	0,1	-	tr	-	a,b
113	1311**	1321	Teaspiran B	-	-	0,1	-	-	-	-	-	a,b



114	1324	1329	Mirtenil-acetat	-	-	0,1	-	-	-	tr	-	a,b
115	1325	1331	<i>p</i> -Menta-1,4,-dien-7-ol	-	-	0,2	-	-	-	-	-	a,b
116	1335	1342	$\delta$ -Elemen	-	-	-	-	0,2	tr	-	-	a,b
117	1341**	1345	1-Metoksi-4-metilbicyklo[2,2,2]oktan	0,5	-	-	-	-	-	-	-	a,b
118	1345	1354	$\alpha$ -Kubeben	-	-	-	-	tr	-	-	-	a,b
119	1357	1364	( <i>E</i> )-2-Undecenal	0,4	-	tr	-	-	-	-	-	a,b
120	1369	1374	Ciklosativen	-	-	0,1	-	-	-	-	-	a,b
121	1355**	1372	6-Dodekanon	0,4	-	-	-	-	-	-	-	a,b
122	1367**	1375	2-Butil-2-oktenal	0,6	-	-	-	-	-	-	-	a,b
123	1371	1377	4-Metoksi-metil-benzoat	-	-	tr	-	0,1	-	tr	-	a,b
124	1374	1382	$\alpha$ -Kopaen	0,6	-	0,4	tr	0,3	tr	0,1	0,2	a,b
125	1380	1385	Daucen	tr	-	tr	-	0,4	0,3	0,2	1,1	a,b
126	1392**	1389	Benzil-2-metil-butirat	-	-	-	-	0,7	-	-	-	a,b
127	1387	1392	$\beta$ -Burbonen	0,1	-	0,3	0,1	0,1	tr	0,6	0,2	a,b
128	1389	1397	$\beta$ -Elemen	0,2	-	0,5	tr	1,8	0,1	-	-	a,b
129	1396**	1397	Fenil-metil-valerat	-	-	-	-	tr	-	0,8	0,3	a,b
130	1403	1405	Metileugenol	tr	-	0,1	-	0,2	-	tr	-	a,b
131	1408	1409	Dodekanal	-	-	-	-	-	-	tr	-	a,b
132	1415	1421	( <i>2E,4E</i> )-2,4-Undekadienal	0,1	-	-	-	-	-	-	-	a,b
133	1417	1424	( <i>E</i> )-Kariofilen	tr	-	0,2	-	2,3	1,2	1,1	0,3	a,b
134	1424	1426	2,5-Dimetoksi- <i>p</i> -cimen	0,4	-	tr	-	tr	-	tr	0,1	a,b
135	1430	1436	$\beta$ -Kopaen	-	-	-	-	0,1	-	tr	tr	a,b
136	1431	1436	$\beta$ -Gurjunen	tr	-	0,1	-	-	-	tr	-	a,b
137	1432	1437	( <i>E</i> )- $\alpha$ -Bergamoten	-	-	-	-	-	-	0,1	0,2	a,b
138	1434	1439	$\gamma$ -Elemen	0,1	-	0,1	-	0,8	-	0,6	-	a,b
139	1437	1445	$\alpha$ -Guaian	0,7	-	-	-	-	-	-	-	a,b
140	1439	1447	Aromadendren	-	-	-	-	tr	tr	-	-	a,b
141	1440	1452	$\beta$ -Barbaten	0,1	-	-	-	-	-	-	-	a,b
142	1453	1454	Geranilaceton	0,2	-	0,1	-	-	-	-	-	a,b
143	1454	1459	( <i>E</i> )- $\beta$ -Farnezen	-	-	-	-	0,4	0,1	0,2	0,2	a,b
144	1452	1462	$\alpha$ -Humulen	-	-	-	-	0,2	0,1	0,1	tr	a,b
145	1457**	1466	Akora-3,10(14)-diene	-	-	-	-	tr	-	-	-	a,b
146	1482**	1482	$\alpha$ -Amorfen	-	-	tr	-	-	-	-	-	a,b
147	1478	1483	$\gamma$ -Murolen	0,5	-	-	-	0,2	0,1	0,1	0,3	a,b
148	1479	1487	$\alpha$ -Kurkumen	0,1	-	-	-	-	-	-	-	a,b
149	1484	1489	Germakren D	0,1	-	0,8	-	10,1	0,6	3,2	1,4	a,b,c
150	1489	1494	$\beta$ -Selinen	0,3	-	-	-	-	-	-	-	a,b
151	1490	1494	Feniletil-3-metil-butirat	-	-	0,2	-	0,3	-	0,2	-	a,b
152	1492	1498	( <i>Z</i> )- $\beta$ -Guaian	0,3	-	-	-	-	-	-	-	a,b
153	1493	1499	$\alpha$ -Zingiberen	-	-	-	-	0,1	-	0,1	-	a,b
154	1498	1503	$\alpha$ -Selinen	0,5	-	0,3	-	-	-	0,1	tr	a,b
155	1500	1505	Bicyklogermakren	-	-	-	-	1,7	1,0	0,6	0,1	a,b
156	1500	1506	$\alpha$ -Murolen	0,2	-	tr	-	-	-	-	-	a,b

157	1500	1507	(E)-Dauka-8,11-dien	-	-	-	-	-	-	tr	-	a,b
158	1505	1513	$\beta$ -Bisabolen	-	-	-	-	0,1	-	0,1	0,1	a,b
159	1508	1513	Germakren A	-	-	-	-	-	-	-	-	a,b
160	1509	1514	$\alpha$ -Bulnesen	0,6	-	-	-	-	-	-	-	a,b
161	1513	1521	$\gamma$ -Kadinen	0,6	-	-	-	0,1	-	tr	tr	a,b
162	1521	1529	$\beta$ -Seskvifelandren	-	-	-	-	-	-	0,4	-	a,b
163	1522	1530	$\delta$ -Kadinen	1,6	-	0,1	-	0,4	-	tr	tr	a,b
164	1537	1544	$\alpha$ -Kadinen	0,1	-	-	-	-	-	-	-	a,b
165	1544	1551	$\alpha$ -Kalakoren	0,3	-	tr	-	-	-	-	-	a,b
166	1549**	1560	Salviadienol	0,4	-	0,3	-	-	-	-	-	a,b
167	1569**	1564	Marsupelol	-	-	-	-	-	-	0,8	-	a,b
168	1559	1566	Germakren B	-	-	0,2	-	2,4	0,3	2,8	0,1	a,b
169	1565**	1576	Mint-oksidi	-	-	0,2	-	-	-	-	-	a,b
170	1574	1577	$\alpha$ -Cedren-epoksid	0,7	-	-	-	-	-	-	-	a,b
171	1570	1579	1 $\alpha$ ,10 $\alpha$ -Epoksi-amorf-4-en	0,8	-	-	-	-	-	-	-	a,b
172	1574**	1584	Kadin-1(10)-en-5,11-oksidi	3,6	-	-	-	-	-	-	-	a,b
173	1577	1587	Spatulenol	2,1	-	1,9	-	0,6	tr	0,3	-	a,b,c
174	1582	1592	Kariofilen-oksidi	1,2	-	1,3	-	0,6	tr	0,3	-	a,b,c
175	1592	1602	Viridiflorol	1,3	-	-	-	-	-	-	-	a,b
176	1594	1603	Salvial-4(14)-en-1-on	-	-	0,7	-	-	-	-	-	a,b
177	1594	1606	Karotol	-	-	-	-	0,6	-	0,5	0,1	a,b
178	1619**	1607	Alismol	0,7	-	-	-	-	-	-	-	a,b
179	1604**	1619	Torilenol	1,1	-	0,8	-	0,1	-	-	-	a,b
180	1625**	1629	Izogimnomitrol	-	-	0,1	-	-	-	-	-	a,b
181	1635**	1632	4-Okso- $\beta$ -jonon	-	-	0,1	-	-	-	-	-	a,b
182	1630**	1636	Amorfa-4,9-dien-2-ol	-	-	-	-	0,4	-	-	-	a,b
183	1630	1636	Murola-4,10(14)-dien-1- $\beta$ -ol	2,0	-	0,5	-	0,9	-	0,6	-	a,b
184	1639	1637	allo-Aromadendren-epoksid	0,4	-	-	-	-	-	-	-	a,b
185	1640	1646	Izospatulenol	-	-	0,1	-	0,1	-	tr	-	a,b
186	1644	1648	$\alpha$ -Murolol	-	-	-	-	0,1	-	-	-	a,b
187	1643**	1649	Eudezm-4(15)-en-7-ol	0,2	-	-	-	-	-	-	-	a,b
188	1645	1649	Kubenol	-	-	tr	-	-	-	tr	-	a,b
189	1657**	1654	(E)-Izoelemicin	-	-	-	-	0,8	-	-	-	a,b
190	1647	1659	3-Butil-ftalid	0,9	-	-	-	-	-	-	-	a,b
191	1658	1663	neo-Intermedeol	0,3	-	-	-	-	-	-	-	a,b
192	1660	1667	(Z)-Kalamenen-10-ol	0,1	-	-	-	-	-	-	-	a,b
193	1668	1676	(E)-Kalamenen-10-ol	0,5	-	-	-	-	-	-	-	a,b
194	1668	1677	14-Hidroks-9- <i>epi</i> -(E)-kariofilen	-	-	-	-	0,1	-	-	-	a,b
195	1671	1680	3-(Z)-Butiliden-ftalid	0,5	-	-	-	-	-	-	-	a,b
196	1680**	1688	Eudezma-4(15),7-dien-1- $\beta$ -ol	0,3	-	-	-	-	-	-	-	a,b
197	1685	1694	Germakra-4(15),5,10(14)-trien-1 $\alpha$ -ol	0,7	-	0,5	-	0,3	-	0,1	-	a,b
198	1734	1744	(Z)-Ligustilid	0,1	-	-	-	-	-	-	-	a,b

199	1775	1775	2 $\alpha$ -Hidroksiamorfa-4,7(11)-dien	0,2	-	-	-	-	-	-	-	a,b
200	1774**	1781	Izoporsoralen	-	-	-	-	0,2	-	-	-	a,b
201	1828	1826	Izopropil-tetradekanoat	0,4	-	-	-	-	-	-	-	a,b
202	1871**	1871	Izobutil-ftalat	0,2	-	-	-	-	-	-	-	a,b
203	1874	1879	Heksadekanol	0,1	-	-	-	-	-	-	-	a,b
204	2035	2035	(Z)-Falkarinol	14,3	-	-	-	0,1	-	0,2	-	a,b
<b>Ukupno</b>				<b>93,2</b>	<b>99,1</b>	<b>96,3</b>	<b>99,6</b>	<b>96,3</b>	<b>98,7</b>	<b>98,8</b>	<b>99,9</b>	
<b>Monoterpeni</b>				<b>22,9</b>	<b>69,4</b>	<b>80,4</b>	<b>99,4</b>	<b>66,4</b>	<b>93,6</b>	<b>82,8</b>	<b>93,9</b>	
Ugljovodonični				6,9	69,2	49,3	97,7	60,7	92,6	76,5	93	
Oksigenovani				16,0	0,2	31,1	1,7	5,7	1,0	6,3	0,9	
<b>Seskviterpeni</b>				<b>21,6</b>	-	<b>9,0</b>	<b>0,1</b>	<b>24,6</b>	<b>3,8</b>	<b>12,4</b>	<b>4,3</b>	
Ugljovodonični				7,0	-	3,1	0,1	21,7	3,8	10,4	4,2	
Oksigenovani				14,6	-	5,9	-	2,9	tr	2,0	0,1	
<b>Ostalo</b>				<b>48,7</b>	<b>29,7</b>	<b>6,9</b>	<b>0,1</b>	<b>5,3</b>	<b>1,3</b>	<b>3,6</b>	<b>1,7</b>	

\*Jedinjenja navedena po redosledu elucije sa HP-5MS kolone; RL: retencioni indeksi iz literature; RI: eksperimentalno utvrđeni retencioni indeksi na navedenoj koloni ko-injektiranjem homolog niza n-alkana C<sub>8</sub>-C<sub>20</sub> i C<sub>21</sub>-C<sub>44</sub>; a: komponenta identifikovana na osnovu poređenja sa masenim spektrom; b: komponenta identifikovana na osnovu poređenja sa retencionim indeksom; c: komponenta identifikovana na osnovu ko-injektiranja standarda; tr: trag (<0,05 %); -: Nije detektovan. \*\* Identifikacija rađena na osnovu NIST baze (*National Institute of Standards and Technology* 2005) sva ostala jedinjenja, referenca (*Adams* 2007).

**Table 9.** Ukupan broj identifikovanih komponenata u etarskim uljima (list, cvet, plod i koren,) korišćenjem GC-MS i HS/GC-MS tehnika

Etarsko ulje	Ukupan broj komponenti	
	Korišćena tehnika	
Deo biljke <i>S. rigidum</i>	GC-MS	HS/GC-MS
<b>List</b>	108	27
<b>Cvet</b>	98	42
<b>Plod</b>	98	49
<b>Koren</b>	125	22

U etarskom ulju lista *S. rigidum* identifikovano je 108 komponenata metodom injektiranja uzorka etarskog ulja GC-MS tehnikom, a znatno manji broj (27) isparljivih komponenata registrovan je u biljnom materijalu primenom HS/GC-MS tehnike.

Dominantne komponente u etarskom ulju lista *S. rigidum* su:  $\alpha$ -pinen 26,3 %, sabinen 7,8 %, limonen 5,4 % i (*E*)-verbenol 5,0 %, dok su HS/GC-MS tehnikom najzastupljenije komponente:  $\alpha$ -pinen 76,7 %, kamfen 7,5 %, limonen 6,6 % i sabinen 3,3 %.

Ukupan broj identifikovanih komponenata u etarskom ulju cveta *S. rigidum* injektiranjem ulja i GC-MS tehnikom je 98, dok su HS/GC-MS-om identifikovane 42 komponente.

Komponente u etarskom ulju cveta *S. rigidum* koje su zastupljene sa najvećim procentom su:  $\alpha$ -pinen 33,0 %, germakren D 10,1 %, sabinen 7,9 % i limonen 7,1 %, dok su najzastupljenije identifikovane komponente HS/GC-MS tehnikom:  $\alpha$ -pinen 57,2 %, sabinen 7,8 %, kamfen i limonen 6,5 %. Germakren D koji je u etarskom ulju cveta *S. rigidum* primenom GC-MS tehnike određen u količini od 10,1 % , primenom HS/GC-MS tehnike nađen je u vrlo malom procentu od 0,6 %.

Analiza etarskog ulja cveta *S. rigidum* izvršena primenom GC-MS i HS/GC-MS tehnike analize, ukazuje da je dominantna isparljiva komponenta u ulju  $\alpha$ -pinen. Sastav ispitivanih etarskih ulja dobijenih primenom dve različite tehnike ispitivanja je veoma sličan, jer su dominantne komponente prisutne u ulju cveta lako isparljive, pa HS/GC-MS tehnika može poslužiti za bržu, ali ne i precizniju analizu.

U etarskom ulju ploda *S. rigidum* identifikovano je 98 komponenata GC-MS-om i 49 komponenata HS/GC-MS-om.

U etarskom ulju ploda *S. rigidum* najzastupljenije komponente su:  $\alpha$ -pinen 33,2 %, sabinen 18,5 %, limonen 8,7 % i  $\gamma$ -terpinene 5,5 %, dok su dominantne komponente identifikovane primenom HS/GC-MS tehnike:  $\alpha$ -pinen 35,0 %, sabinen 28,7 %, limonen 12 % i *o*-cimen 5,3 %.

Dominantna jedinjenja etarskog ulja ploda i komponente identifikovane HS/GC-MS tehnikom su lako isparljivi monoterpeni, shodno tome za brzu analizu može se koristiti HS/GC-MS tehnika. S obzirom da je za HS/GC-MS potrebna vrlo mala količina uzoraka, ova tehnika je preporučljiva.

Sve komponente koje su identifikovane HS/GC-MS tehnikom identifikovane su u svim uljima *S. rigidum*, osim komponente pentilcikloheksa-1,3-dien (0,1 %) koja je identifikovana samo HS/GC-MS tehnikom u plodu, ali ne i u etarskom ulju ploda.

Etarsko ulje korena *S. rigidum* sadrži 124 komponenti određenih primenom GC-MS tehnike, dok je broj identifikovanih komponenti HS/GC-MS tehnikom je vrlo mali, svega 22 komponente.

Za razliku od etarskog ulja nadzemnog dela biljake *S. rigidum*, etarsko ulje korena ima značajno drugačiji sastav i dominantne komponente su: (*Z*)-falkarinol 14,3 %, *n*-oktanal 7,7 %, terpinen-4-ol 3,9 % i kadin-1(10)-en-5,11-oksid 3,6 %, dok je  $\alpha$ -pinen zastupljen sa samo 3,3 %.  $\alpha$ -Pinen je dominantna komponenta u svim vegetativnim, nadzemnim delovima biljke ali ne i u korenu. Dominantne isparljive komponente korena *S. rigidum* identifikovane HS/GC-MS-om su:

$\alpha$ -pinen 53,0 %, *n*-oktanal 12,0 %, heksanal 8,5 % i kamfen 7,0 %. Najzastupljenije komponente u etarskom ulju korena *S. rigidum*, kao i korenu *S. rigidum* identifikovane HS/GC-MS tehnikom su zasićeni ugljovodonici, dok su u nadzemnim delovima terpeni najzastupljeniji.

Za razliku od etarskog ulja korena *S. rigidum* gde je (*Z*)-falkarinol najzastupljenija komponenta, primenom HS/GC-MS ona nije identifikovana.

Ovo još jednom potvrđuje činjenicu da se lakše isparljive komponente etarskog ulja mogu identifikovati i HS/GC-MS-om, dok se komponente koje su manje isparljive ne nalaze u spektru HS/GC-MS-a, pa je samim tim i procenat sadržaja pojedinih komponenata različit. Na ovom primeru pokazano je da je GC-MS bolja tehnika za identifikaciju i određivanje hemijskog sastava etarskog ulja.

## **4.2 Sekundarni metaboliti biljne vrste *S. pallasii***

### **4.2.1 Hemijski sastav etarskih ulja biljne vrste *S. pallasii***

U Tabeli 10. dat je sastav etarskih ulja i isparljivih komponenata delova biljke (list, cvet, plod i koren) *Seseli pallasii* identifikovanih GC-MS i HS/GC-MS tehnikama.

**Table 10.** Hemijski sastav (%) etarskih ulja/isparljivih komponenata lista, cveta, ploda i korena biljne vrste *Seseli pallasii* identifikovanih GC-MS i HS/GC-MS tehnikama

Red Br.	RL	RI	Jedinjenje*	List		Cvet		Plod		Koren		Id
				GC-MS	HS/GC-MS	GC-MS	HS/GC-MS	GC-MS	HS/GC-MS	GC-MS	HS/GC-MS	
1	770	762	1-Pentanol	0,3	-	tr	-	-	-	-	-	a,b
2	765	773	(Z)-2-Pentanol	0,4	-	tr	-	-	-	-	-	a,b
3	765	777	3-Metil-2-buten-1-ol	0,2	-	tr	-	tr	-	-	0,2	a,b
4	778	785	3-Metil-2-butenal	0,2	-	tr	-	-	-	-	-	a,b
5	801	797	Heksanal	0,4	1,4	0,1	0,7	tr	-	0,1	1,2	a,b
6	806	808	(E)-4-Okten	-	-	tr	-	-	-	-	-	a,b
7	828	828	Furfural	0,4	-	tr	-	-	-	-	-	a,b
8	848	846	(E)-2-Heksanal	0,3	0,3	tr	-	tr	-	-	-	a,b
9	850	850	(Z)-3-Heksanol	1,5	-	tr	-	-	-	-	-	a,b
10	859	861	(Z)-2-Heksanol	0,2	0,2	tr	-	-	-	tr	-	a,b
11	863	863	n-Heksanol	0,5	-	tr	-	tr	-	-	0,3	a,b
12	888	889	2-Heptanon	-	-	tr	-	-	-	-	-	a,b
13	900	900	n-Nonan	-	0,1	tr	-	tr	-	45,2	49,2	a,b
14	901	901	Heptanal	-	-	tr	-	-	-	-	-	a,b
15	908	907	(2E,4E)-2,4-Heksadienal	1,0	-	tr	-	-	-	-	-	a,b
16	921	923	Triciklen	-	-	tr	0,1	-	-	tr	0,1	a,b
17	924	926	$\alpha$ -Tujen	tr	0,2	0,1	0,2	0,1	tr	-	-	a,b
18	933	932	$\alpha$ -Pinen	3,9	76,5	59,2	71,0	84,7	93,7	0,5	0,8	a,b,c
19	948	946	Kamfen	0,2	1,6	2,5	3,5	2,6	2,0	0,5	0,6	a,b
20	954	947	(E)-2-Heptenal	0,3	-	0,2	-	-	-	-	-	a,b
21	953	956	Tuja-2,4(10)-dien	-	0,2	-	0,1	tr	-	-	-	a,b
22	958	952	Benzaldehid	0,2	-	tr	-	-	-	-	-	a,b
23	972	960	Izoamil-propanoat	tr	-	-	-	-	-	-	-	a,b
24	973	969	Sabinen	0,4	2,0	1,9	3,9	0,8	0,3	-	-	a,b,c
25	977	974	$\beta$ -Pinen	0,8	4,7	4,4	4,6	3,5	2,1	tr	0,1	a,b,c
26	977	974	1-Okten-3-ol	tr	-	-	-	-	-	-	-	a,b
27	982	979	3-Oktonon	tr	-	-	-	-	-	-	-	a,b
28	986	981	6-Metil-5-hepten-2-on	0,2	0,1	0,2	-	-	-	-	0,1	a,b
29	990	984	2-Pentilfuran	0,8	-	-	-	-	-	-	-	a,b
30	988	992	Mircen	tr	2,9	2,8	4,8	1,2	0,4	0,7	0,6	a,b,c
31	996	999	(2E,4Z)-2,4-Heptadienal	0,3	-	tr	-	-	-	-	-	a,b
32	1000	1000	n-Dekan	-	-	-	-	-	-	0,1	-	a,b
33	998	1004	n-Oktanal	-	-	tr	-	-	-	0,2	0,4	a,b
34	1004	1002	$\alpha$ -Felandren	0,1	0,5	1,4	1,8	0,5	0,1	-	-	a,b
35	1009	1005	(2E,4E)-2,4-Heptadienal	1,7	-	tr	-	-	-	-	-	a,b

36	1008	1013	$\delta$ -3-Karen	-	1,3	1,1	0,9	0,9	0,4	tr	0,1	a,b
37	1017	1014	$\alpha$ -Terpinen	-	-	0,2	-	-	-	-	-	a,b,c
38	1020	1027	<i>p</i> -Cimen	0,4	0,8	1,6	1,5	tr	-	0,1	0,1	a,b
39	1022	1027	<i>o</i> -Cimen	-	-	-	4,0	0,4	0,1	-	-	a,b
40	1029	1024	Limonen	2,4	5,1	4,3	0,4	2,7	0,8	0,6	0,4	a,b,c
41	1037	1030	( <i>E</i> )-3-Okten-2-on	0,6	-	-	-	-	-	-	-	a,b
42	1032	1039	( <i>Z</i> )- $\beta$ -Ocimen	tr	-	0,4	-	0,1	-	34,5	27,3	a,b
43	1043	1036	Fenilacetaldehid	2,3	-	0,1	-	tr	-	0,1	-	a,b
44	1048	1044	( <i>E</i> )- $\beta$ -Ocimen	0,2	0,2	0,8	0,9	0,1	-	0,4	0,3	a,b
45	1057	1049	( <i>E</i> )-2-Okten-1-al	0,1	-	tr	-	-	-	-	-	a,b
46	1059	1054	$\gamma$ -Terpinen	0,5	0,3	1,0	0,6	0,2	tr	tr	-	a,b,c
47	1067	1060	( <i>E</i> )-2-Okten-1-ol	0,4	-	tr	-	-	-	-	-	a,b
48	1067	1065	( <i>Z</i> )-Sabinen hidrat	tr	-	0,1	-	-	-	-	-	a,b
49	1069	1063	<i>n</i> -Oktanol	0,4	-	0,1	-	tr	-	-	-	a,b
50	1070	1071	3,5-Oktadien-2-on	0,1	-	-	-	-	-	-	-	a,b
51	1073	1067	( <i>Z</i> )-Linalool-oksidi (furanoid)	0,1	-	-	-	-	-	-	-	a,b
52	1089	1086	Terpinolen	tr	0,2	0,7	0,4	0,1	-	tr	-	a,b
53	1099	1088	Izobutil-tiglat	0,1	-	-	-	-	-	-	-	a,b
54	1094	1100	( <i>E</i> )-5-Undecen	-	-	-	-	-	-	0,3	0,4	a,b
55	1099	1095	Linalol	0,6	-	0,1	-	-	-	-	-	a,b
56	1100	1100	<i>n</i> -Undekan	-	-	-	-	-	-	13,3	17,2	a,b
57	1101	1102	Perilen	0,4	-	0,1	-	-	-	-	-	a,b
58	1104	1100	<i>n</i> -Nonanal	0,8	-	-	-	tr	-	0,1	0,1	a,b
59	1112	1108	1,3,8- <i>p</i> -Mentatrien	-	-	tr	-	-	-	-	-	a,b
60	1121	1119	( <i>E</i> )- <i>p</i> -Menta-2,8-dienol	0,7	-	-	-	-	-	-	-	a,b
61	1122	1118	( <i>Z</i> )- <i>p</i> -Ment-2-en-1-ol	-	-	0,2	-	-	-	-	-	a,b
62	1127	1122	$\alpha$ -Kamfolenal	0,5	-	0,2	-	0,1	-	-	-	a,b
63	1130	1128	<i>allo</i> -Ocimen	-	-	-	-	-	-	0,7	0,1	a,b
64	1133	1128	( <i>Z</i> )-epoksi-Ocimen	-	-	-	-	-	-	0,1	0,2	a,b
65	1136	1133	( <i>Z</i> )- <i>p</i> -Menta-2,8-dien-1-ol	0,3	-	0,1	-	-	-	-	-	a,b
66	1141	1135	( <i>E</i> )-Pinokarveol	2,7	0,1	1,6	0,2	0,2	-	-	-	a,b
67	1143	1137	( <i>Z</i> )-Verbenol	0,8	-	-	-	-	-	-	-	a,b
68	1146	1140	( <i>E</i> )-Verbenol	5,6	0,1	0,7	0,1	0,2	-	-	-	a,b
69	1152	1159	Pentilbenzen	-	-	-	-	-	-	0,2	-	a,b
70	1153	1150	(2 <i>E</i> ,6 <i>Z</i> )-2,6-Nonadienal	0,1	-	-	-	-	-	-	-	a,b
71	1156	1160	Pentilcikloheksa-1,3-dien	-	-	-	-	-	-	0,2	-	a,b
72	1157	1154	$\beta$ -Pinen-oksidi	0,2	-	tr	-	-	-	-	-	a,b
73	1159	1154	Sabina keton	0,5	-	0,1	-	-	-	-	-	a,b
74	1165	1160	Pinokarvon	0,5	-	0,7	0,2	0,1	-	0,1	-	a,b,c
75	1168	1166	<i>p</i> -Menta-1,5-dien-8-ol	1,6	-	0,3	-	-	-	-	-	a,b

76	1179	1174	Terpinen-4-ol	1,7	-	0,6	-	0,1	-	-	-	a,b
77	1182	1179	<i>p</i> -Cimen-8-ol	0,9	-	0,4	-	t	-	-	-	a,b
78	1188	1183	Kripton	-	-	0,1	-	-	-	-	-	a,b
79	1189	1187	( <i>E</i> )- <i>p</i> -Menta-1(7),8-dien-2-ol	0,3	-	-	-	-	-	-	-	a,b
80	1192	1186	$\alpha$ -Terpineol	2,0	-	0,3	-	t	-	-	-	a,b
81	1198	1194	Mirtenol	2,0	-	0,4	-	0,1	-	-	-	a,b
82	1198	1195	Mirtenal	-	-	tr	-	t	-	-	-	a,b
83	1205	1201	<i>n</i> -Dekanal	0,3	-	0,1	-	-	-	-	-	a,b
84	1212	1204	Verbenon	2,3	-	0,2	-	t	-	-	-	a,b
85	1213	1210	( <i>2E,4E</i> )-2,4-Nonadienal	-	-	tr	-	-	-	-	-	a,b
86	1220	1215	( <i>E</i> )-Karveol	2,2	-	0,2	-	t	-	-	-	a,b
87	1223	1217	$\beta$ -Ciklocitral	tr	-	-	-	-	-	-	-	a,b
88	1223	1227	( <i>Z</i> )- <i>p</i> -Menta-1(7),8-dien-2-ol	tr	-	0,1	-	-	-	-	-	a,b
89	1128	1224	<i>m</i> -Kumenol	0,6	-	-	-	-	-	-	-	a,b
90	1232	1226	( <i>Z</i> )-Karveol	0,3	-	-	-	-	-	-	-	a,b
91	1232	1229	( <i>Z</i> )-3-Heksenil-2-metil butirat	-	-	tr	-	-	-	-	-	a,b
92	1236	1232	( <i>Z</i> )-3-Heksenil-3-metil butirat	0,1	-	0,1	-	-	-	-	-	a,b
93	1242	1241	Heksil-izovalerat	0,1	-	0,1	-	-	-	-	-	a,b
94	1245	1241	<i>O</i> -Metilkarvakrol	-	-	-	-	t	-	-	-	a,b
95	1246	1239	Karvon	0,6	-	0,1	-	-	-	-	-	a,b
96	1254	1248	( <i>Z</i> )-Krisantenil-acetat	-	-	0,1	-	-	-	-	-	a,b
97	1255	1247	<i>p</i> -Anisaldehyd	0,8	-	-	-	-	-	-	-	a,b
98	1256	1249	Piperiton	-	-	tr	-	-	-	-	-	a,b
99	1261	1260	( <i>E</i> )-2-Decenal	0,2	-	tr	-	-	-	0,1	-	a,b
100	1271	1264	Geranial	0,1	-	-	-	-	-	-	-	a,b
101	1274	1272	Izopiperitenon	tr	-	-	-	-	-	-	-	a,b
102	1292	1284	Dihidroedulan II	0,8	-	-	-	-	-	-	-	a,b
103	1293	1292	( <i>2E,4Z</i> )-2,4-Dekadienal	-	-	tr	-	-	-	-	-	a,b
104	1307	1305	Undekanal	-	-	tr	-	-	-	-	-	a,b
105	1297	1293	Dihidroedulan I	0,4	-	-	-	-	-	-	-	a,b
106	1300	1300	Tridekan	-	-	-	-	-	-	tr	-	a,b
107	1301	1298	Karvakrol	0,2	-	0,1	-	-	-	-	-	a,b
108	1316	1315	( <i>2E,4E</i> )-2,4-Dekadienal	0,9	-	0,1	-	tr	-	0,2	-	a,b
109	1341	1335	$\delta$ -Elemen	-	-	tr	-	-	-	-	-	a,b
110	1330	1325	<i>p</i> -Menta-1,4,-dien-7-ol	0,3	-	-	-	-	-	-	-	a,b
111	1353	1345	$\alpha$ -Kubeben	-	-	tr	-	-	-	-	-	a,b
112	1363	1357	( <i>E</i> )-2-Undecenal	0,3	-	tr	-	-	-	-	-	a,b
113	1376	1373	$\alpha$ -Ilangen	-	-	tr	-	-	-	-	-	a,b
114	1380	1374	$\alpha$ -Kopaen	0,5	-	0,1	-	-	-	-	-	a,b
115	1387	1383	( <i>E</i> )- $\beta$ -Damascenon	0,1	-	tr	-	-	-	-	-	a,b



116	1390	1387	$\beta$ -Bourbonen	tr	-	tr	-	-	-	-	-	a,b
117	1390		$\alpha$ -Kopaen-8-ol	0,6	-	-	-	-	-	-	-	a,b
118	1390	1387	$\beta$ -Bourbonen	-	-	tr	-	t	-	-	-	a,b
119	1394	1387	$\beta$ -Kubeben	-	-	0,1	-	-	-	-	-	a,b
120	1395	1389	$\beta$ -Elemen	-	-	tr	-	-	-	-	-	a,b
121	1401	1392	(Z)-Jasmon	-	-	tr	-	-	-	-	-	a,b
122	1408	1408	Dodekanal	-	-	tr	-	-	-	-	-	a,b
123	1424	1424	2,5-dimetoksi-p-Cimen	-	-	tr	-	-	-	-	-	a,b
124	1425	1417	(E)-Kariofilen	2,6	-	1,0	-	0,2	-	-	-	a,b
125	1432	1440	(E)- $\alpha$ -Bergamoten	-	-	-	-	-	-	0,1	-	a,b
126	1435	1430	$\beta$ -Kopaen	0,3	-	-	-	-	-	-	-	a,b
127	1438*	1436	Oktil-2-metil-butirat	0,1	-	-	-	-	-	-	-	a,b
128	1445	1437	$\alpha$ -Guaien	0,1	-	-	-	-	-	-	-	a,b
129	1454	1453	Geranilaceton	0,6	-	-	-	-	-	-	-	a,b
130	1460	1452	$\alpha$ -Humulen	0,3	-	0,1	-	-	-	-	-	a,b
131	1482	1478	$\gamma$ -Murolen	0,7	-	0,2	-	-	-	-	-	a,b
132	1487	1484	Germakren D	2,4	-	3,1	-	0,4	-	-	-	a,b,c
133	1493	1486	Fenetil-2-metil-butirat	0,9	-	0,2	-	-	-	-	-	a,b
134	1492	1497	$\delta$ -Selinen	-	-	0,2	-	0,1	-	-	-	a,b
135	1496	1498	$\alpha$ -Zingiberen	-	-	-	-	-	-	tr	-	a,b
136	1500	1493	(E)-Murola-4(14),5-dien	tr	-	-	-	-	-	-	-	a,b
137	1502	1500	Biciklogermakren	1,0	-	1,1	-	0,1	-	-	-	a,b
138	1505	1500	$\alpha$ -Murolen	0,5	-	-	-	t	-	-	-	a,b
139	1505	1512	$\beta$ -Bisabolen	-	-	-	-	-	-	0,1	-	a,b
140	1512	1511	$\delta$ -Amorfen	0,1	-	-	-	-	-	-	-	a,b
141	1520	1513	$\gamma$ -Kadinen	0,7	-	0,1	-	-	-	-	-	a,b
142	1521	1528	$\beta$ -Seskvifelandren	-	-	-	-	-	-	tr	-	a,b
143	1528	1522	$\delta$ -Kadinen	2,7	-	0,4	-	tr	-	-	-	a,b
144	1529	1536	(E)- $\gamma$ -Bisabolen	-	-	-	-	-	-	0,1	-	a,b
145	1536	1531	Dihidro-aktinidiolid	tr	-	-	-	-	-	-	-	a,b
146	1538	1533	(E)-Kadina-1,4-diene	0,1	-	-	-	-	-	-	-	a,b
147	1543	1537	$\alpha$ -Kadinen	0,2	-	-	-	-	-	-	-	a,b
148	1549	1544	$\alpha$ -Kalakoren	0,3	-	-	-	-	-	-	-	a,b
149	1560	1549	Salviadienol	0,9	-	-	-	-	-	-	-	a,b
150	1574	1573*	1,5-Epoksi-salvia-4(14)-en	0,2	-	-	-	-	-	-	-	a,b
151	1577	1570	Kariofilenil-alkohol	0,4	-	-	-	-	-	-	-	a,b
152	1577	1571	Kariolan-8-ol	-	-	0,1	-	-	-	-	-	a,b
153	1584	1577	Spatulenol	6,1	-	0,6	-	0,1	-	-	-	a,b,c
154	1591	1582	Kariofilen-oksida	10,5	-	0,7	-	0,1	-	-	-	a,b,c
155	1601	1594	Salvia-4(14)-en-1-on	0,6	-	-	-	0,2	-	-	-	a,b

156	1617	1608	Humulenepoksid II	1,3	-	-	-	-	-	-	-	a,b
157	1626	1624	Selina-6-en-4-ol	0,2	-	0,2	-	-	-	-	-	a,b
158	1632	1643	3-Butilheksahidro-ftalid	-	-	-	-	-	-	0,1	-	a,b
159	1634	1630	Muroła-4,10(14)-dien-1- $\beta$ -ol	0,7	-	0,1	-	-	-	-	-	a,b
160	1644	1639	Kariofila-4(12),8(13)-dien-5- $\alpha$ -ol	0,9	-	0,2	-	-	-	-	-	a,b
161	1647	1640	$\tau$ -Murolol	0,5	-	-	-	-	-	-	-	a,b
162	1660	1652	$\alpha$ -Kadinol	1,2	-	0,2	-	-	-	-	-	a,b
163	1677	1668	14-hidroksi-9- <i>epi</i> -(E)-Kariofilen	0,6	-	-	-	-	-	-	-	a,b
164	1693	1685	Germakra-4(15),5,10(14)-trien-1- $\alpha$ -ol	1,0	-	0,4	-	-	-	-	-	a,b
165	1722	1734	Neoknidilid	-	-	-	-	-	-	1,0	-	a,b
166	1845	1844	6,10,14-Trimetil-2-pentadekanon	1,1	-	-	-	-	-	-	-	a,b
<b>Ukupno</b>				<b>95,6</b>	<b>98,8</b>	<b>99,4</b>	<b>99,9</b>	<b>99,9</b>	<b>99,9</b>	<b>99,7</b>	<b>99,8</b>	
<b>Monoterpeni</b>				<b>37,5</b>	<b>97,0</b>	<b>89,1</b>	<b>99,1</b>	<b>98,7</b>	<b>99,9</b>	<b>38,3</b>	<b>30,6</b>	
Ugljovodonični				9,7	96,7	82,4	98,6	97,9	99,9	38,1	30,4	
Oksigenovani				27,8	0,3	6,7	0,5	0,8	-	0,2	0,2	
<b>Seskviterpeni</b>				<b>38,1</b>	-	<b>8,7</b>	-	<b>1,2</b>	-	<b>0,4</b>	-	
Ugljovodonični				13,2	0-	6,4	-	0,8	-	0,3	-	
Oksigenovani				24,9	0-	2,3	-	0,4	-	0,1	-	
<b>Ostalo</b>				<b>20,0</b>	<b>2,1</b>	<b>1,6</b>	<b>0,7</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>61,0</b>	<b>69,0</b>	

\*Jedinjenja navedena u redosledu elucije sa HP-5MS kolone; RL: retencioni indeksi iz literature; RI: eksperimentalno utvrđeni retencioni indeksi na navedenoj koloni ko-ubrizgavanjem homolog niza n-alkana C<sub>8</sub>-C<sub>20</sub> i C<sub>21</sub>-C<sub>44</sub>; a: komponenta identifikovana na osnovu poređenja sa masenim spektrom; b: komponenta identifikovana na osnovu poređenja sa retencionim indeksom; c: komponenta identifikovana na osnovu ko-ubrizgavanjem autentičnog uzorka (standarda); tr: trag (<0,05%); -: Nije detektovan, \*\* Identifikacija rađena na osnovu NIST baze (*National Institute of Standards and Technology* 2005), a sva ostala jedinjenja, referenca (*Adams* 2007).

**Table 11.** Ukupan broj identifikovanih komponentata u etarskim uljima lista, cveta, ploda i korena *S. pallasii* dobijen korišćenjem GC-MS i HS/GC-MS tehnika

Etarsko ulje	Ukupan broj komponenti	
	Korišćena tehnika	
Deo biljke <i>S. pallasii</i>	GC-MS	HS/GC-MS
<b>List</b>	120	21
<b>Cvet</b>	106	20
<b>Plod</b>	52	19
<b>Koren</b>	119	21

U etarskom ulju lista *Seseli pallasii* identifikovano je ukupno 120 komponenti (95,6 %). Najzastupljenija komponenta u etarskom ulju lista je kariofilen-oksidi sa 10,5 %, zatim slede spatulenol sa 6,1 % i (E)-verbenol sa 5,6 %.

HS/GC-MS tehnikom identifikovana je 21 isparljiva komponenta u listu (99,0 %), pri čemu je dominantna komponenta  $\alpha$ -pinen sa 76,5 %, slede je limonen (5,1 %) i  $\beta$ -pinen (4,7 %).

GC-MS i HS/GC-MS tehnikama identifikovane su iste dominantne komponente lista *S. rigidum*, dok to nije slučaj kod lista *S. pallasii*. Naime, dominantne isparljive komponente *S. pallasii* su lakše isparljivi monoterpeni, dok su u ulju zastupljeniji biciklični seskviterpeni (kariofilen-oksid i spatulenol).

U etarskom ulju ploda *S. pallasii* identifikovano je ukupno 52 komponente (99,9 %), a najzastupljenija komponenta u ulju je  $\alpha$ -pinen sa 84,7 %.

U plodu biljke *S. pallasii*, HS/GC-MS tehnikom identifikovano je samo 19 isparljivih komponenata (99,9 %). Dominantna komponenta je  $\alpha$ -pinen sa 93,7 % zastupljenosti, zatim slede  $\beta$ -pinen (2,1 %) i kamfen (2,0 %), dok se ostale komponente nalaze u znatno manjem procentu.

$\alpha$ -Pinen je dominantna komponenta identifikovana GC-MS i HS/GC-MS tehnikama u plodu *S. pallasii*. Shodno tome, preporučuje se brȃa i u svakom smislu jednostavnija HS/GC-MS tehnika, s obzirom na količinu biljnog materijala ploda, koji je potreban za hidrodestilaciju, bez obzir na veliki prinos ulja.

U etarskom ulju cveta *S. pallasii* identifikovano je 106 komponenti (99,34 %). Dominantna komponenta je  $\alpha$ -pinen sa 59,2 %, a slede je  $\beta$ -pinen i limonen (4,4 i 4,3 %).

Dvadeset isparljivih komponenti identifikovano je u cvetu (99,9 %) HS/GC-MS tehnikom, od kojih je  $\alpha$ -pinen zastupljena u najvećem procentu (71,0 %), a slede je mircen sa 4,8 %,  $\beta$ -pinen sa 4,6 % i *o*-cimen sa 4,0 %. *o*-Cimen je komponenta koja je identifikovana HS/GC-MS tehnikom samo u cvetu, dok u etarskim uljima drugih delova biljke GC-MS i HS/GC-MS tehnikom nije odreĎena.

Sastav ulja cveta *S. pallasii* se znatno razlikuje od sastava isparljivih komponenata te biljke, iako su dominantne komponente monoterpeni sa niskim retencionim vremenima, pa je za analizu bolje koristiti GC-MS iako zahteva veće koliĉine biljnog materijala i duȃ u pripremu uzoraka.

U etarskom ulju korena *S. pallasii* identifikovan je znatno veći broj komponenata (119) GC-MS tehnikom. Primenom HS/GC-MS tehnike identifikovano je 19 isparljivih komponenata u korenu.

Komponente sa najvećom zastupljenošću su etarskom ulju korena su: *n*-nonan, (*Z*)- $\beta$ -ocimen i *n*-undekan (45,2; 34,5 i 13,3 %). Najzastupljenija isparljive komponenta kao i u etarskom ulju korena *S. pallasii* je *n*-nonan sa 49,2 %, a slede je (*Z*)- $\beta$ -ocimen (27,3 %) i *n*-undekan (17,2 %).

Sastav etarskih ulja *S. rigidum* i *S. pallasii* je vrlo različit, iako imaju vrlo sličnu morfološku građu, rastu na istim stenovitim terenima i samim tim mogu se vrlo lako pomešati. Dominantne komponente *S. pallasii* su zasićeni ugljovodonici. U ovom slučaju za brzu analizu isparljivih komponenata, uz značajnu uštedu količine biljnog materijala i vremena pripreme uzoraka može poslužiti HS/GC-MS tehnika.

#### **4.3 Multivarijantna analiza sastava etarskih ulja biljnih vrsta *Seseli***

Analiza glavnih komponenta (PCA) je rađena u cilju klasifikacije uzoraka na osnovu sličnosti njihovih hemijskih osobina. Polazna tačka za izračunavanje PCA je matrica podataka dimenzija broja objekata (redova)×broj varijabli (kolone).

U matrici, etarsko ulje cveta, lista, korena i ploda korišćeni su kao redovi. Kolone su bili rezultati individualnih komponenata odgovarajućeg etarskog ulja i isparljivih komponenti dobijenih GC-MS i HS/GC-MS tehnikama (Tabela 12). Za statističku analizu korišćene su komponente koje su u ulju zastupljene sa više od 1 %.

Korelaciona matrica pokazuje da svaka varijabla ima bar jedan koeficijent korelacije sa apsolutnom vrednošću većom od 0,3 (*Kinnear* i *Gray* 1994), pa se za dalju analizu u razmatranje uzimaju sve varijable.

**Tabela 12.** Korelaciona matrica komponenata etarskog ulja lista, cveta, ploda i korena *S. rigidum* određene GC-MS i HS/GC-MS tehnikama

	<b>Cvet HS/GC- MS</b>	<b>List HS/GC- MS</b>	<b>Plod HS/GC- MS</b>	<b>Koren HS/GC- MS</b>	<b>Cvet GC-MS</b>	<b>List GC-MS</b>	<b>Plod GC-MS</b>	<b>Koren GC-MS</b>
<b>Cvet HS/GC-MS</b>	1,000							
<b>List HS/GC-MS</b>	0,989	1,000						
<b>Plod HS/GC-MS</b>	0,838	0,779	1,000					
<b>Koren HS/GC-MS</b>	0,944	0,960	0,716	1,000				
<b>Cvet GC- MS</b>	0,944	0,927	0,849	0,869	1,000			
<b>List GC- MS</b>	0,941	0,935	0,864	0,872	0,911	1,000		
<b>Plod GC- MS</b>	0,914	0,869	0,968	0,803	0,936	0,918	1,000	
<b>Koren GC- MS</b>	0,080	0,109	0,017	0,187	0,038	0,076	0,041	1,000

Sledeći korak u statističkoj analizi predstavlja preračunavanje svojstvenih vrednosti (eigenvalues) koje su prikazane u Tabeli 13.

**Tabela 13.** Faktorske koordinate varijabli ispitivanja sastava etarskog ulja lista, cveta, ploda i korena *S. rigidum* određene GC-MS i HS/GC-MS tehnikama

	<b>Glavna komponenta 1</b>	<b>Glavna komponenta 2</b>	<b>Glavna komponenta 3</b>
<b>Cvet HS/GC-MS</b>	0,985	-0,001	0,126
<b>List HS/GC-MS</b>	0,969	0,041	0,221
<b>Plod HS/GC-MS</b>	0,899	-0,117	-0,399
<b>Koren HS/GC-MS</b>	0,926	0,137	0,299
<b>Cvet GC-MS</b>	0,964	-0,060	0,005
<b>List GC-MS</b>	0,966	-0,020	-0,007
<b>Plod GC-MS</b>	0,959	-0,083	-0,252
<b>Koren GC-MS</b>	0,097	0,988	-0,119
<b>Svojstvena vrednost</b>	6,369	1,021	0,391
<b>Varijabilitet (%)</b>	79,615	12,762	4,887
<b>Kumulativna svojstvena vrednost</b>	6,369	7,390	7,781
<b>Ukupan varijabilitet (%)</b>	79,615	92,378	97,265

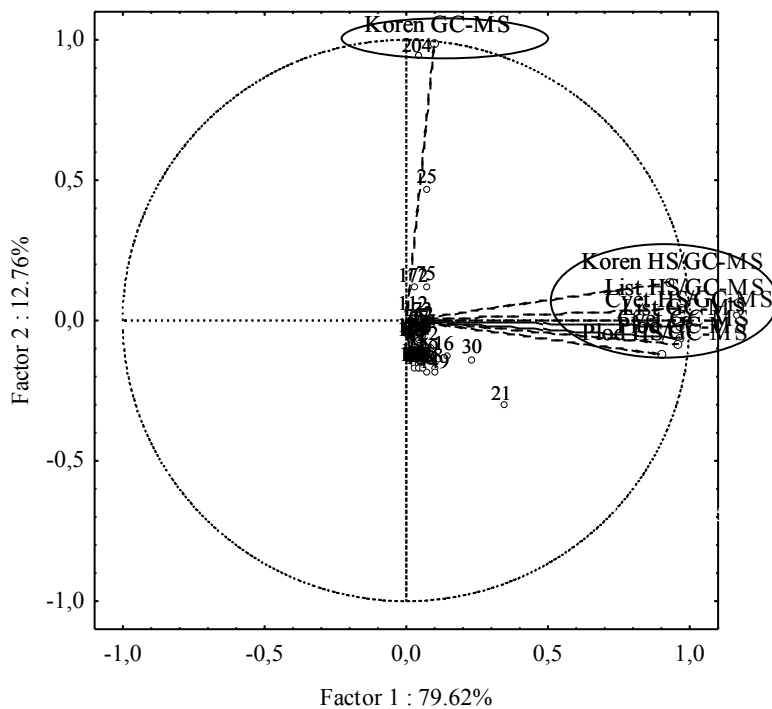
Analiza glavnih komponenata svodi brojne varijable na nekoliko faktora. Matematički gledano, ova analiza daje nekoliko linearnih kombinacija promatranih varijabli, od kojih je svaka linearna kombinacija glavna komponenta. Jedan od glavnih ciljeva PCA analize je da se identifikuju glavne komponente koje imaju suštinski smisao.

Glavne komponente koje imaju svojstvenu vrednost veću od 1 su uzete u obzir (Kaiser-ov kriterijum) (Kaiser 1960). Prva glavna komponenta objašnjava 79,62 % varijanse među varijablama, dok je njena svojstvena vrednost (eigenvalue) 6,37. Druga glavna komponenta objašnjava 12,76 % ukupne varijacije podataka. Zajedno, ove dve komponente objašnjavaju 92,38 % varijanse za sve podatke. Rezultati PCA proračuna ilustrovani su na Slici 8.

U posmatranoj analizi svojstvena vrednost prve glavne komponente je 6,37 što znači da prva glavna komponenta ima 6,37 puta veću varijansu od varijanse originalnih standardizovanih varijabli. Faktorska opterećenja predstavljaju korelaciju svake varijable i glavne komponente pri čemu veća opterećenja čine varijablu boljim reprezentom glavne komponente.

Prva glavna komponenta ima pozitivno faktorsko opterećenje na svim posmatranim varijablama. Najmanju vrednost opterećenja prve glavne komponente pokazuje varijabla Koren GC-MS (0,097), a najveću vrednost ima Cvet HS/GC-MS (0,985). Druga glavna komponenta je u pozitivnoj korelaciji sa svim ispitivanim varijablama, a najveće opterećenje pokazuje varijabla Koren GC-MS (0,988). Na osnovu takvih opterećenja, jasno je da su sva ispitivana etarska ulja u pozitivnom odsečku PCA dijagrama (Slika 8).

(Z)-Farkarinol (204) je dominantna komponenta etarskog ulja korena i nije identifikovana u ostalim uzorcima. Shodno tome, PCA analizom se varijabla Koren GC-MS izdvojila zasebno u odnosu na ostale varijable koje su se grupisale na osnovu sadržaja  $\alpha$ -pinena (15) kao dominantne komponente.



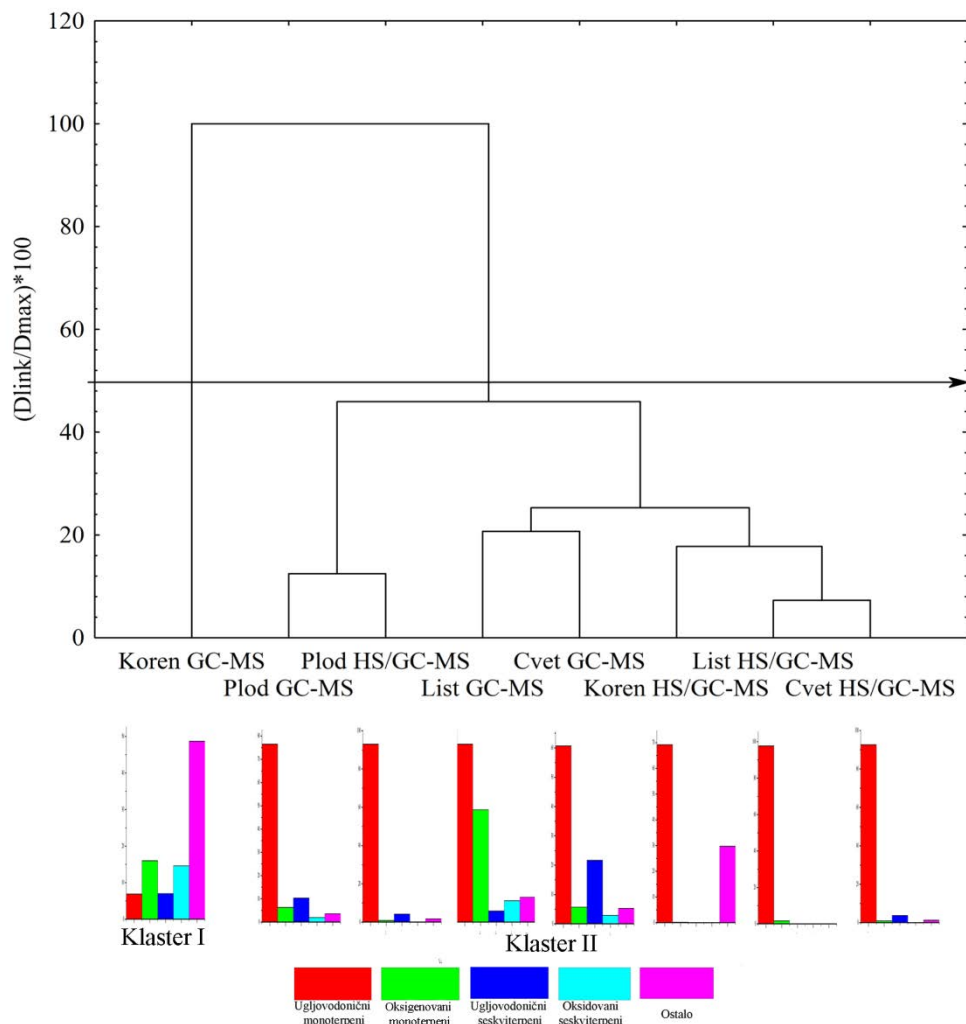
**Slika 8.** PCA dijagram ispitivanja sastava etarskog ulja lista, cveta, ploda i korena biljke *S. rigidum* određeni GC-MS i HS/GC-MS tehnikama

Ukoliko se na matricu podataka korišćenih za PCA analizu primeni HCA analiza, dobijeni rezultati se mogu predstaviti dendrogramom (Slika 9).

Varijable Cvet HS/GC-MS - List-HS/GC-MS su se izdvojile u posebnom potklasteru zbog većeg sadržaja ugljovodoničnih monoterpena u odnosu na ostale identifikovane grupe jedinjenja. Takođe, varijable Plod HS/GC-MS i Plod GC-MS imaju veći sadržaj ugljovodoničnih monoterpena, dok imaju znatno manje oksigenovanih terpena, seskviterpena i Ostalih identifikovanih jedinjenja.

Isparljive komponente korena određene HS/GC-MS tehnikom takođe su uticale da etarsko ulje opisano varijablom Koren HS/GC-MS bude grupisano u ovaj klaster.

Hemijski sastav cveta i lista dobijeni HS/GC-MS tehnikom su veoma slični (pre svega u ukupnom sadržaju monoterpena- 93,6 % u cvetu i 99,4 % u listu) pa to rezultuje najmanjim Euklidovim rastojanjem između svih posmatranih uzoraka. Uzorci Plod GC-MS i Plod HS/GC-MS su bili slični i u sadržaju monoterpena (82,8 i 93,9 %) i sadržaju Ostalih komponenata (3,6 i 1,7 %).



**Slika 9.** Dendrogram ispitivanja sastava etarskog ulja lista, cveta, ploda i korena biljke *S. rigidum* određeni GC-MS i HS/GC-MS tehnikama

Rezultat grupisanja ukazuje na to da je etarsko ulje korena identificovano GC-MS tehnikom i opisano kao Koren GC-MS grupisano u zaseban klaster. Sastav ulja korena se veoma razlikuje od drugih ispitivanih ulja. Sadržaj monoterpena u etarskom ulju korena je relativno nizak (38,3 %), a sa druge strane, ovo ulje je bogato Ostalim komponentama (61 %).

Najmanja sličnost u samom sastavu etarskog ulja korena i isparljivih komponenata ploda karakteriše se i najvećom vrednošću Euklidovog rastojanja, odnosno Koren GC-MS - Plod HS/GC-MS ima Euklidovo rastojanje=9,5.

Statistička analiza sastava komponenata etarskog ulja lista, cveta, ploda i korena biljke *S. pallasii* određeni GC-MS i HS/GC-MS tehnikama u prikazan je u Tabeli 14. Korelaciona matrica



pokazuje da svaka varijabla ima bar jedan koeficijent korelacije sa apsolutnom vrednošću većom od 0,3 (Tabela 14.), što je znači da ispunjava minimalan uslov potreban da bi se varijabla uvrstila u analizu (Kinneear i Gray 1994).

**Tabela 14.** Korelaciona matrica komponenata etarskog ulja lista, cveta, ploda i korena *S. pallasii* određene GC-MS i HS/GC-MS tehnikama

	List GC-MS	List HS/GC- MS	Cvet GC-MS	Cvet HS/GC- MS	Plod GC-MS	Plod HS/GC- MS	Koren GC-MS	Koren HS/GC -MS
List GC-MS	1,000							
List HS/GC-MS	0,157	1,000						
Cvet GC-MS	0,169	0,998	1,000					
Cvet HS/GC-MS	0,132	0,995	0,993	1,000				
Plod GC-MS	0,163	0,998	0,997	0,996	1,000			
Plod HS/GC-MS	0,151	0,998	0,997	0,996	0,999	1,000		
Koren GC-MS	-0,235	-0,049	-0,058	-0,055	-0,046	-0,050	1,000	
Koren HS/GC-MS	-0,234	-0,043	-0,054	-0,049	-0,041	-0,045	0,987	1,000

U daljem toku statističke analize izvršena su preračunavanja svojstvenih vrednosti (eigenvalues) koja su prikazana u Tabeli 15.

**Tabela 15.** Faktorske koordinate varijabli ispitivanja sastava etarskog ulja lista, cveta, ploda i korena *S. pallasii* određene GC-MS i HS/GC-MS tehnikama

	Glavna komponenta 1	Glavna komponenta 2	Glavna komponenta 3
List GC-MS	0,202	0,39	0,898
List HS/GC-MS	0,997	-0,056	-0,026
Cvet GC-MS	0,997	-0,044	-0,017
Cvet HS/GC-MS	0,995	-0,055	-0,054
Plod GC-MS	0,998	-0,057	-0,019
Plod HS/GC-MS	0,997	-0,056	-0,032
Koren GC-MS	-0,099	-0,975	0,184
Koren HS/GC-MS	-0,094	-0,975	0,184
Svojstvena vrednost	5,028	2,067	0,88
Varijabilitet (%)	62,847	25,838	10,997
Kumulativna svojstvena vrednost	5,028	7,095	7,974
Ukupan varijabilitet (%)	62,847	88,684	99,681

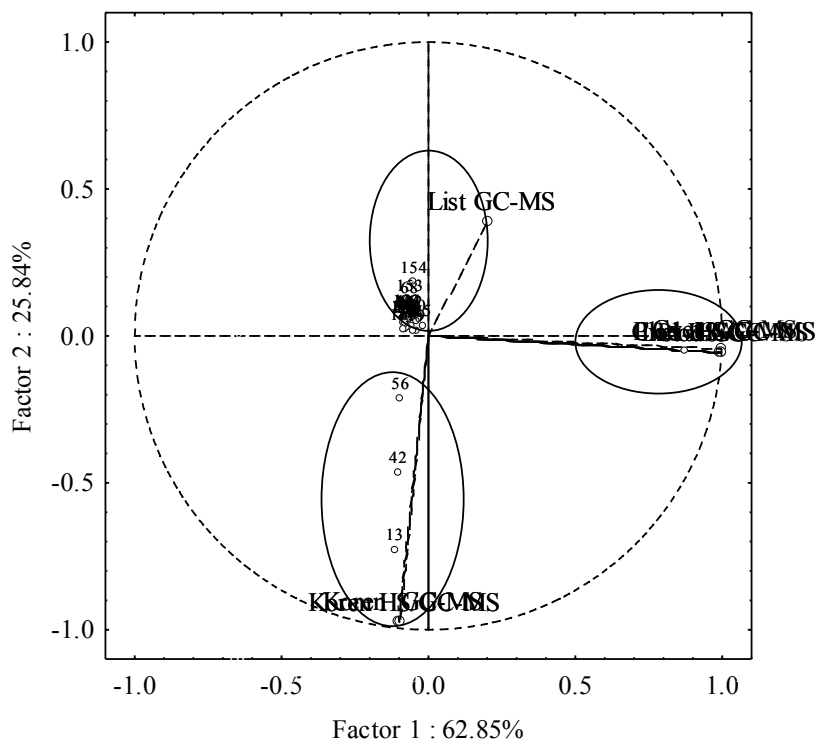
U posmatranoj PCA analizi sastava etarskog ulja lista, cveta, ploda i korena biljke *S. pallasii* drečeni GC-MS i HS/GC-MS tehnikama svojstvena vrednost prve glavne komponente je 5,03 a druge 2,07, što znači da prva glavna komponenta ima 5,03, a druga 2,07 puta veću varijansu od varijanse originalnih standardizovanih varijabli. Zbog toga prva glavna komponenta objašnjava 62,85 % varijanse među varijablama, druga glavna komponenta 25,84 %, a treća 11

% ukupnog varijabiliteta podataka. Prve tri glavne komponente objašnjavaju 99,68 % ukupnog varijabiliteta. Pošto je procenat ukupnog varijabiliteta koji objašnjavaju prve dve glavne komponente visok (88,68 %), za dalja razmatranja se uzimaju samo one.

Prva glavna komponenta ima pozitivno faktorsko opterećenje na svim varijablama izuzev Koren GC-MS i Koren HS/GC-MS sa kojima je u negativnoj korelaciji. Druga glavna komponenta ima negativno opterećenje na svim varijablama, a posebno na varijablama Koren GC-MS i Koren HS/GC-MS. Ovakva opterećenja glavnih komponentata uslovljavaju da se Koren GC-MS i Koren HS/GC-MS nalaze u posebnom odsečku PCA dijagrama (Slika 10.) u odnosu na ostale varijable. Treća glavna komponenta ima visoko pozitivno opterećenje na varijabli List GC-MS (0,898).

$\alpha$ -Pinen je najzastupljenija komponentata u svim delovima biljke sem u korenu i etarskom ulju lista, pa se ovi delovi *S. pallasii* nalaze u donjem desnom odsečku PCA dijagrama, a najveći uticaj od svih identifikovanih komponenti na položaj posmatranih varijabli ima upravo  $\alpha$ -pinen. Komponente *n*-undekan (56), (*Z*)- $\beta$ -ocimen (42) i *n*-nonan (13) su dominantne komponente korena *S. pallasii*. Na osnovu sadržaja ovih komponentata koren je u posebnom odsečku PCA dijagrama nezavisno kojom tehnikom je vršena identifikacija komponentata, GC-MS ili/i HS/GC-MS tehnikom.

(*E*)-Verbenol (68), spatulenol (153) i kariofilen-oksid (154) su jedne od najzastupljenijih komponenti u listu, pa se nalaze u posebnom odsečku PCA dijagrama, gore desno.

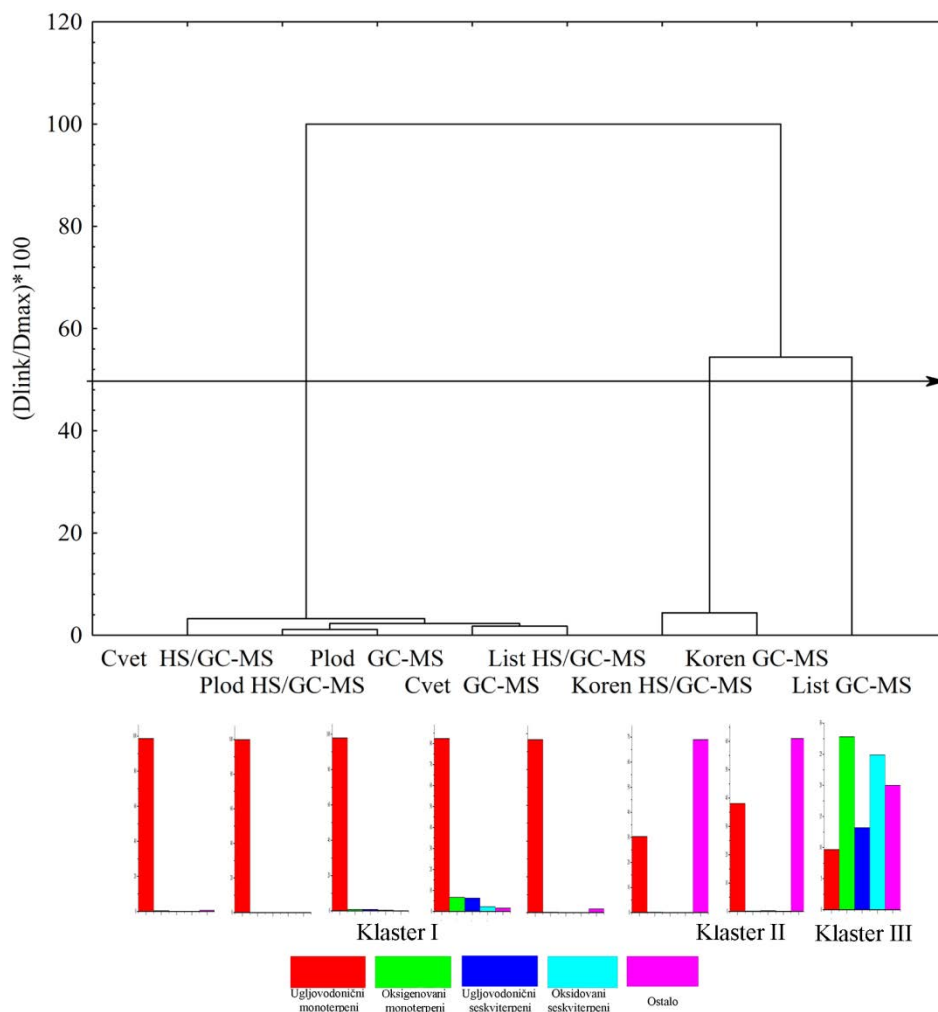


**Slika 10.** PCA dijagram ispitivanja sastava etarskog ulja lista, cveta, ploda i korena biljke *S. pallasii* odreĎeni GC-MS i HS/GC-MS tehnikama

Podaci koji su bili predmet PCA analize bili su podvrgnuti hijerarhijskoj klaster analizi (HCA). Rezultati HCA ispitivanja sastava etarskog ulja lista, cveta, ploda i korena biljke *S. pallasii* odreĎeni GC-MS i HS/GC-MS tehnikama su prikazani su na Slici 11.

Klaster analizom se obraĉunavaju rastojanja (ili korelacije) izmeĉu svih uzoraka pomoću definisanog pokazatelja Euklidovih rastojanja jer se na osnovu njih moĉe videti koji parovi pokazuju najveću sliĉnost. Euklidova rastojanja predstavljena su kao odnos  $D_{link}/D_{max}$ , što predstavlja koliĉnik rastojanja i maksimalnog rastojanja izraĉen u procentima.

Na prikazanom dendrogramu uoĉavaju se tri statistiĉki znaĉajna klastera. Prvi klaster je opisan varijablom List GC-MS, dok drugi klaster ĉine Koren GC-MS - Koren HS/GC-MS (Euklidovo rastojanje=0,98). List GC-MS je na najvećem Euklidovom rastojanju (9,43) od Koren GC-MS i od Koren HS/GC-MS.



**Slika 11.** Dendrogram ispitivanja sastava etarskog ulja lista, cveta, ploda i korena biljke *S. pallasii* određeni GC-MS i HS/GC-MS tehnikama

Treći klaster čine dva potklastera. U okviru prvog potklastera nalaze se dva potpotklastera. Prvi potpotklaster opisan je slučajem List HS/GC-MS - Cvet GC-MS (Euklidovo rastojanje=0,40) i Plod GC-MS - Plod HS/GC-MS sa najmanjim Euklidovim rastojanjem od 0,25. List GC-MS se izdvojio u poseban klaster, jer se hemijski sastav etarskog ulja znatno razlikuje od sastava ostalih ispitivanih delova *S. pallasii*. Naime za razliku od ostalih ispitivanih delova biljke list sadrži mnogo manje ugljovodoničnih monoterpena (9,7 %), znatno više oksigenovanih monoterpena (27,8 %), ali i značajan procenat seskviterpena (38,1 %) i Ostalih jedinjenja (20,0 %).

Klaster analiza korena *S. pallasii* GC-MS i HS/GC-MS tehnikama je u saglasnosti sa rezultatima PCA analize koje ove dve varijable grupišu u poseban klaster ili grupu na dijagramu.

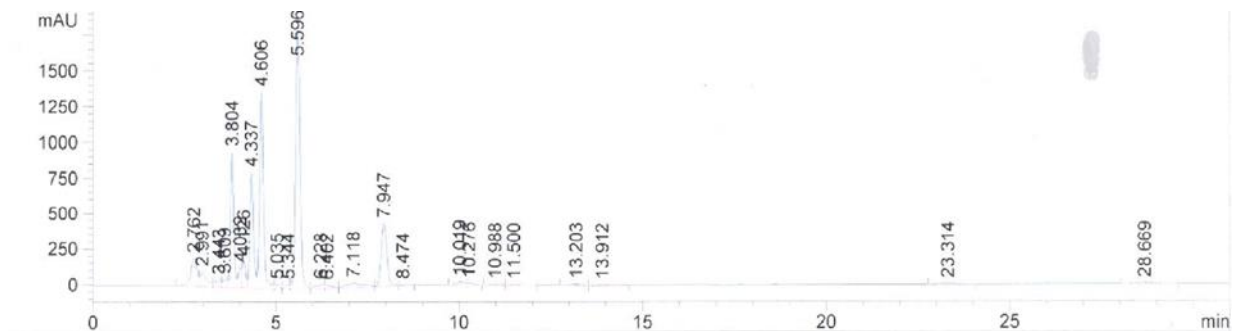
To je uslovljeno činjenicom da imaju znatno različiti sastav od ostalih delova biljke, jer sadrže nezasićene ugljovodonike u najvećem procentu (61,0 i 68,96 %).

*n*-Nonan (13), (*Z*)- $\beta$ -ocimen (42) i *n*-undekan (56) su dominantne komponente korena identifikovane GC-MS i HS/GC-MS tehnikama i karakterišu klaster Koren GC-MS - Koren HS/GC-MS.

Svi ostali ispitivani uzorci koje karakteriše visok sadržaj monoterpena, posebno ugljovodoničnih monoterpena grupisani su u istom klasteru. U okviru ovog klastera nalaze se svi ispitivani uzorci čija je dominantna komponenta  $\alpha$ -pinen. U okviru ovog klastera izdvaja se potklaster koji je opisan varijablom Cvet HS/GC-MS. U cvetu ispitivane biljke, HS/GC-MS tehnikom je identifikovan *o*-cimen u značajnoj količini (4,0 %). Navedeni monoterpen je identifikovan samo još u plodu biljke *S. pallasii* GC-MS i HS/GC-MS tehnikama (0,4 i 0,1 %), dok u ostalim delovima nije određen. Potklaster opisan sa Plod GC-MS i Plod HS/GC-MS je najbliži po sadržaju identifikovanih komponenata i sadržaju monoterpena (98,7 i 99,9 %). Takođe najmanje Euklidovo rastojanje, a najveća sličnost u sastavu komponenata etarskog ulja ploda identifikovanih primenom GC-MS i HS/GC-MS tehnike, potvrđuje da se ove dve analitičke metode mogu koristiti za brzu identifikaciju glavnih komponenata ploda *S. pallasii*.

#### 4.4 TLC i HPLC analiza heksanskih frakcija metanolnog ekstrakta korena *S. rigidum*

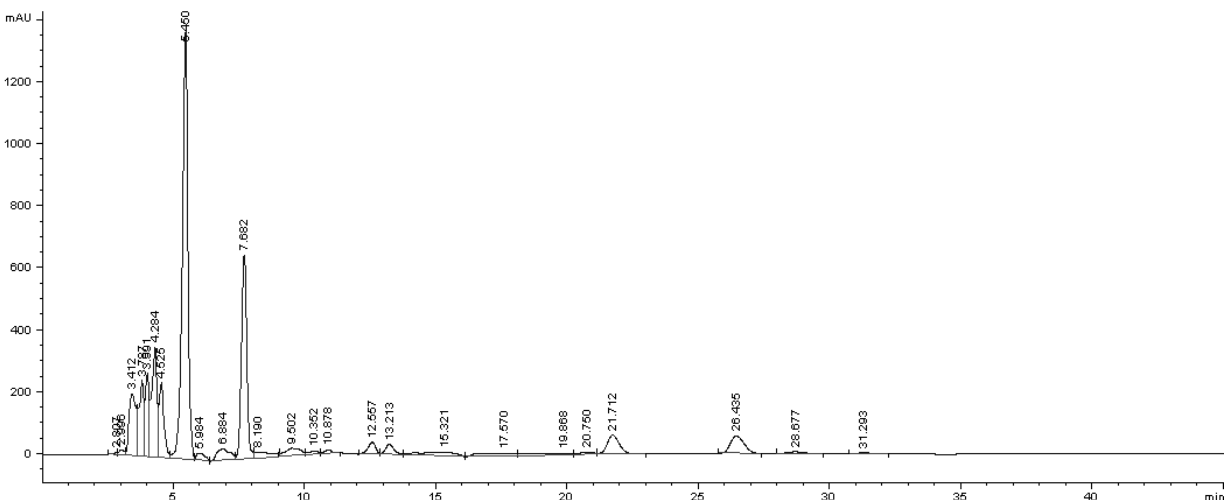
Metanolni ekstrakt korena *S. rigidum* analiziran je na HPLC-u. Dobijeni hromatogram (Slika 12.) sadrži brojne pikove, posebno na nižim retencionim vremenima, što ukazuje na prisustvo velikog broja polarnih jedinjenja u uzorku.



Slika 12. HPLC hromatogram metanolnog ekstrakta ploda *S. rigidum*

#### 4.4.1 Frakcionisanje heksanske frakcije metanolnog ekstrakta

Najpre je uračena HPLC analiza heksanske frakcije metanolnog ekstrakta (Slika 13.).

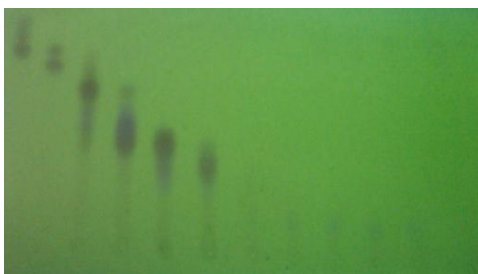


**Slika 13.** HPLC hromatogram heksanske frakcije metanolnog ekstrakta

Za razdvajanje komponenti heksanske frakcije metanolnog ekstrakta korišćena je hromatografija na koloni silikagela eluiranjem smešom rastvarača *n*-heksan/etil-acetat, stalnim povećanjem polarosti eluenta i dobijeno je 12 frakcija (frakcija I do XII): frakcija I *n*-heksan; frakcija II *n*-heksan/etil-acetat (90:10); frakcije III-X *n*-heksan/etil-acetat(50:50); frakcije XI i XII *n*-heksan/etil-acetat (40:60).

Frakcije su prikupljenene na osnovu različitog obojenja: frakcije I i II-bezbojna, frakcije III-tamno zelena, frakcija IV- svetlo žuta, frakcije V i VI- tamno žuta, VII i XII- bezbojna.

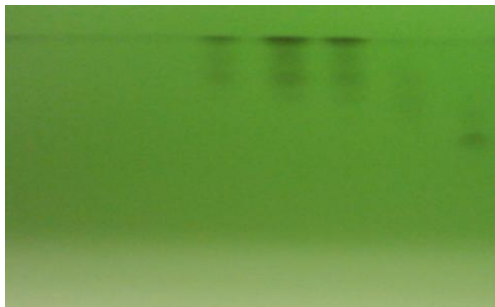
Ovako dobijene frakcije razdvajane su dalje hromatografijom na tankom sloju (TLC) eluiranjem smešom rastvarača *n*-heksan/etil-acetat (70:30) (Slika 14). Ni jedna od ovih frakcija nije sadržala čista jedinjenja te je nastavljena frakcionacija.



**Slika 14.** TLC frakcije od I do XII

#### 4.4.2 Kolonska hromatografija frakcije I na koloni silikagela

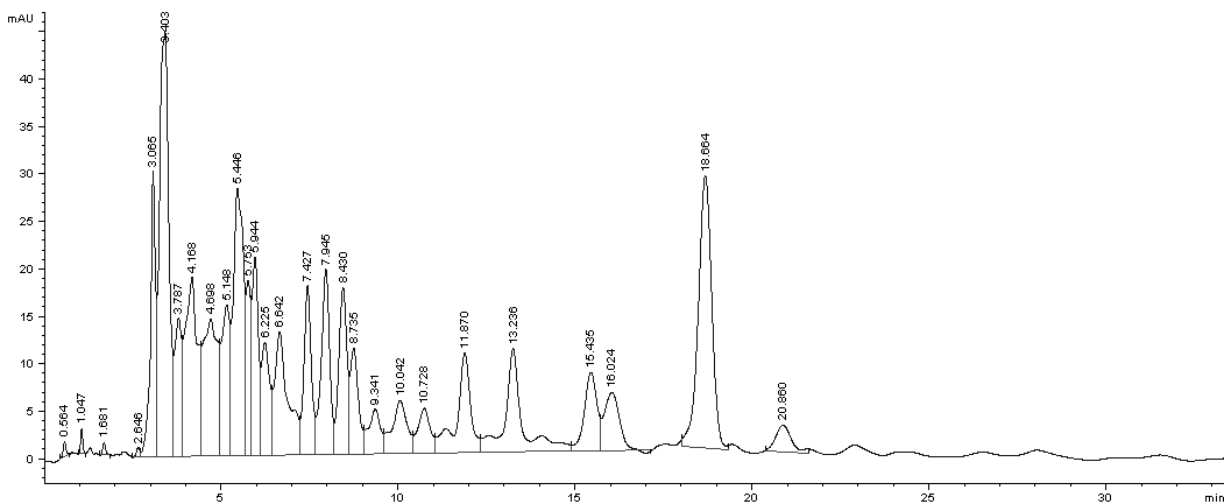
Tankoslojnom hromatografijom (Slika 15) utvrđeno je da frakcije 1<sub>/I</sub> do 3<sub>/I</sub> ne sadrže jedinjenja koja su vidljiva u UV oblasti, dok frakcije 4<sub>/I</sub> do 6<sub>/I</sub> (275,8 mg) sadrže ista jedinjenja, odnosno da su frakcije iste.



Slika 15. TLC frakcija 1<sub>/I</sub>-10<sub>/I</sub>

Frakcija 7<sub>/I</sub> (54,2 mg), kao i frakcija 10<sub>/I</sub> (29,3 mg) moraju da se izoluju ponaosob, dok frakcije 8<sub>/I</sub> i 9<sub>/I</sub> (537,2 mg) mogu da se spoje. Ipak, nijedna od dobijenih frakcija ne sadrži samo po jedno jedinjenje, a dobijene količine su nedovoljne za ponovno odvajanje na koloni.

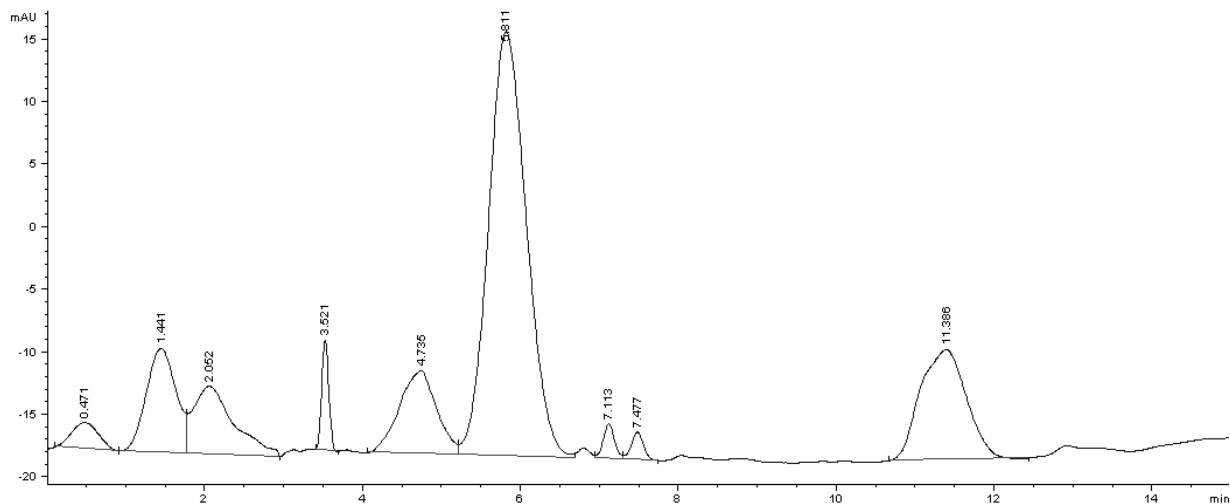
HPLC hromatogram dobijen za frakcije 4-6<sub>/I</sub> (Slika 16) pokazuje veliki broj jedinjenja prisutnih u ovoj frakciji, što je i moglo i da se očekuje imajući u vidu rezultate dobijene TLC razdvajanjem (Slika 15).



Slika 16. HPLC hromatogram frakcije 4-6<sub>/I</sub>

Frakcija 4-6<sub>/I</sub> dobijena je frakcionisanjem na koloni prve frakcije heksanskog ekstrakta, pa je i to nepolarna frakcija. Ova frakcija sadrži nepolarne komponente, ali kao najzastupljenija

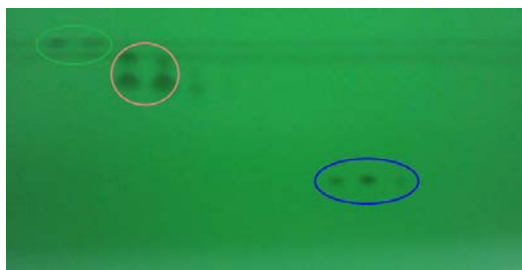
izdvaja se polarna komponenta na retencionom vremenu 18,664 min. Međutim, na hromatogramu (Slika 17) prikazano je da frakcija 8-9<sub>I</sub> sadrži manji broj komponenata koje su manje polarne, nego frakcija 4-6<sub>I</sub>, što je i očekivano kao rezultat nakon TLC (Slika 15.). U frakciji 8-9<sub>I</sub> jedno jedinjenje (retenciono vreme 5,811 min) je prisutno u većoj količini, tako da može biti interesantno izolovanje tog jedinjenja.



**Slika 17.** HPLC hromatogram frakcije 8-9<sub>I</sub>

#### 4.4.3 Kolonska hromatografija frakcije II na koloni sa silikagelom

Sve heksanske frakcije (1<sub>II</sub> do 10<sub>II</sub>) tankoslojnom hromatografijom na silikagelu eluirane su smešom *n*-heksan/etil-acetat (80:20). Uočeno je da se frakcije 2<sub>II</sub> do 3<sub>II</sub>, mogu zajedno dalje posmatrati jer imaju ista retencionna vremena, kao i frakcije 4<sub>II</sub>, 5<sub>II</sub> i frakcije 10<sub>II</sub> do 12<sub>II</sub>. Grubom procenom frakcije 2<sub>II</sub> i 3<sub>II</sub> sadrže tri ili četiri jedinjenja prema TLC (Slika 18.), a posle isparavanja rastvarača pod vakuumom, dobijeno je samo 23,8 mg. Kako je dobijena mala količina proizvoda, kao i činjenica da sadrži više jedinjenja, bilo je beskorisno pokušati dalje razdvajanje.

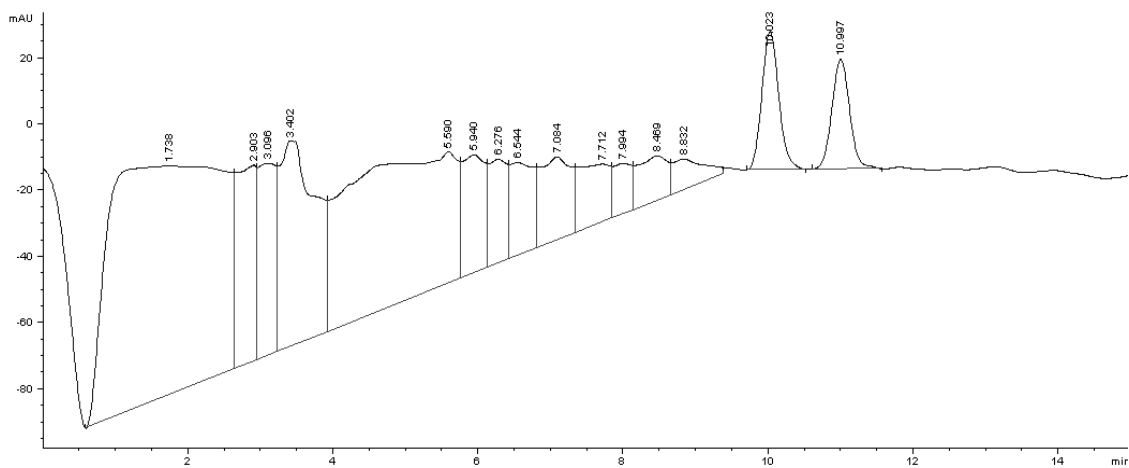


**Slika 18.** TLC frakcija od 0<sub>II</sub> -8<sub>II</sub>



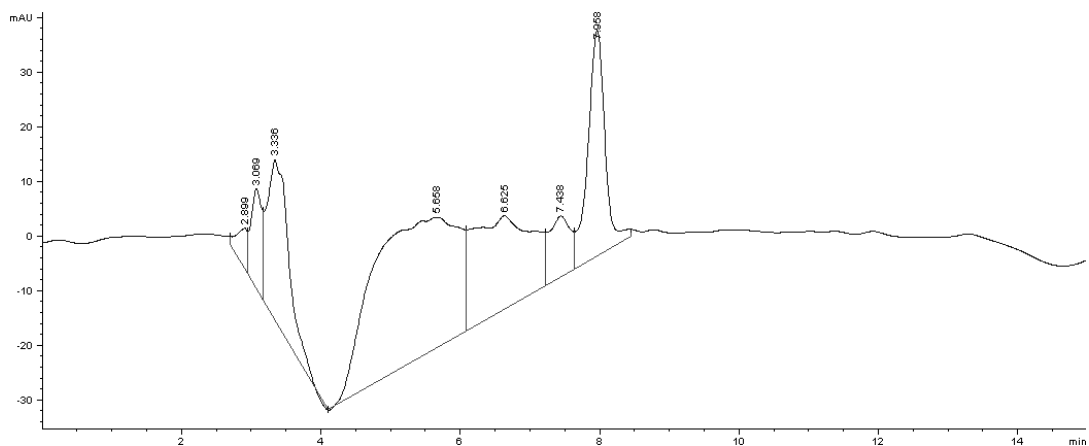
Frakcije 10<sub>II</sub> do 12<sub>II</sub> sadrže jedno jedinjenje, a nakon uparavanja rastvarača, izolovano je 19 mg tog jedinjenja. Frakcije 4<sub>II</sub> i 5<sub>II</sub> sadrže dva jedinjenja, i njihova ukupna masa je 1,2598 g, pa je bilo moguće ponovno hromatografisanje na silikagel koloni u cilju razdvajanja ta dva jedinjenja.

Na slici 13 prikazan je hromatogram nakon TLC heksanske frakcije II metanolnog ekstrakta. Na osnovu pločice izgledalo je da frakcije 10-12<sub>II</sub> sadrže samo jedno čisto jedinjenje. Međutim, posle HPLC analize, pokazalo se da ova frakcija sadrži više jedinjenja. Zaista, na hromatogramu (Slika 19.) jedno jedinjenje bilo je prisutano u većoj količini u odnosu na ostala na niskom retencionom vremenu (< 1 min), dva druga jedinjenja su bili prisutna u manjoj količini i na višim retencionim vremenima (retenciono vreme 10,023-10,997 min). Prema TLC (Slika 18.), očekivalo se da frakcija 10-12<sub>II</sub> sadrži nepolarno jedinjenje (jedinjenje na retencionom vremenu < 1 min u hromatogramu), ali nisu bila očekivana dva znatno polarnija jedinjenja. Na ovom primeru pokazano je da HPLC tehnika preciznija i neophodna kao potvrda izolovanja čistog jedinjenja, za šta TLC tehnika nije dovoljna.



Slika 19. HPLC hromatogram frakcije 10-12<sub>II</sub>

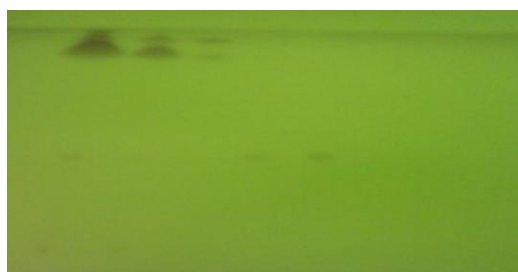
Frakcija 2-3<sub>II</sub> je takođe analizirana pomoću HPLC. Dobijeni hromatogram (Slika 20.) pokazuje prisustvo dva različita jedinjenja u većoj količini (retenciono vreme 4 i 7,958 min).



**Slika 20.** HPLC Hromatogram frakcije 2-3/II

#### 4.4.4 Kolonska hromatografija frakcija 4/II i 5/II na koloni silikagela

Tankoslojnom hromatografijom frakcija 4/II i 5/II, razvijajući smešu *n*-heksan/etil-acetat (80:20), (Slika 21.) dobijene su frakcije 2/4-5/II do 4/4-5/II, koje predstavljaju smešu dva jedinjenja i frakcije 5/4-5/II do 8/4-5/II koje sadrže čisto jedinjenje.



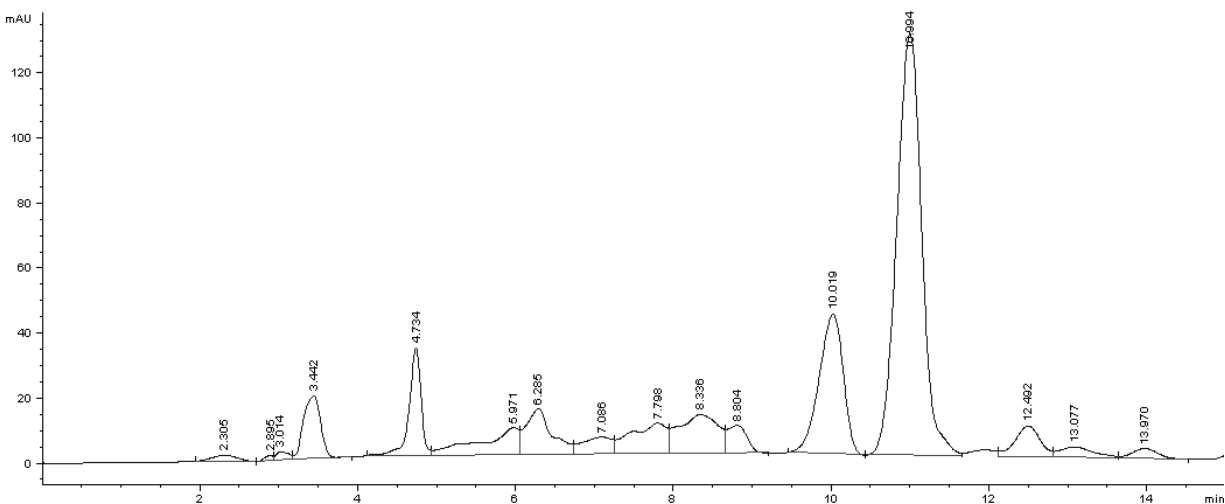
**Slika 21.** TLC frakcija od 1/4-5/II do 8/4-5/II

Poklapanjem dobijenog TLC hromatograma sa prethodno dobijenim hromatogramom (Slika 22.) može se zaključiti da su ista jedinjenja prisutna u frakcijama 5/4-5/II do 8/4-5/II i frakcijama 10/II do 12/II. Vršena je HPLC analiza frakcije 2-4/4-5/II.



**Slika 22.** Poklapanje TLC frakcija od 0/II do 12/II i TLC frakcije od 1/4-5/II do 8/4-5/II

Hromatogram (Slika 23.) ukazuje na prisustvo 4 jedinjenja: dva polarnija (retenciono vreme 3,442 i 4,734 min), i dva nepolarna (10,019 i 10,994 min).



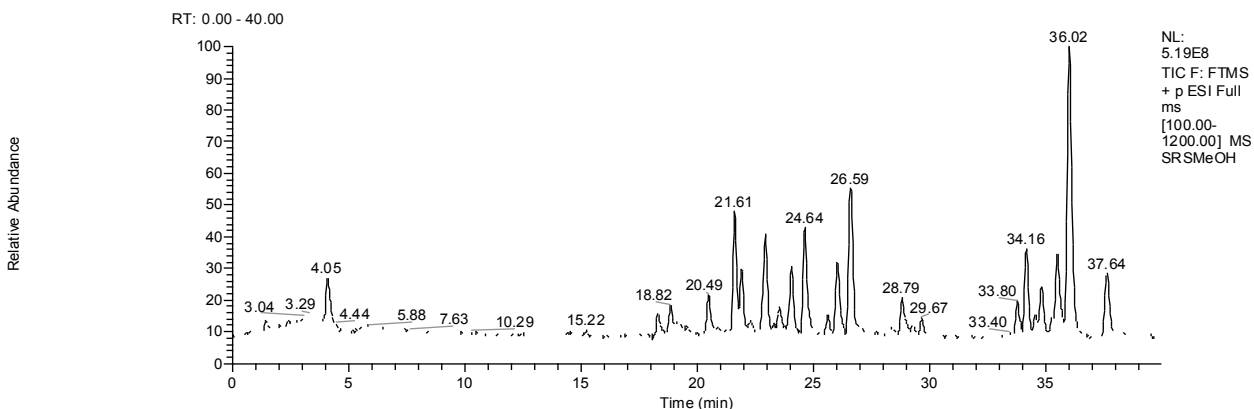
**Slika 23.** HPLC hromatogram frakcije 2-4<sub>4-5/II</sub>

Komponenta sa retencionim vremenom 10,994 min je verovatno ista kao komponenta sa retencionim vremenom 10,997 min na Slici 19.

Izolovanje čistih sekundarnih metabolita iz ispitivanog uzorka pokazalo se vreoma komplikovanim zbog izuzetne složenosti uzorka. Zaista, posle mnogo koraka frakcionacije ni jedna frakcija nije sadržala samo jedno jedinjenje koje bi moglo biti strukturno okarakterisano. S obzirom da je na osnovu literaturnih podaka poznato da su ekstrakti ove biljne vrste izuzetno složeni (oko 350 različitih komponenata) i da je svako jedinjenje prisutno u vrlo maloj količini, preparativno izolovanje i spektrohemijska karakterizacija nisu mogli biti sprovedeni, te je u cilju identifikacije komponenata primenjena tačna hromatografija u kombinaciji sa masenom spektrometrijom visoke rezolucije.

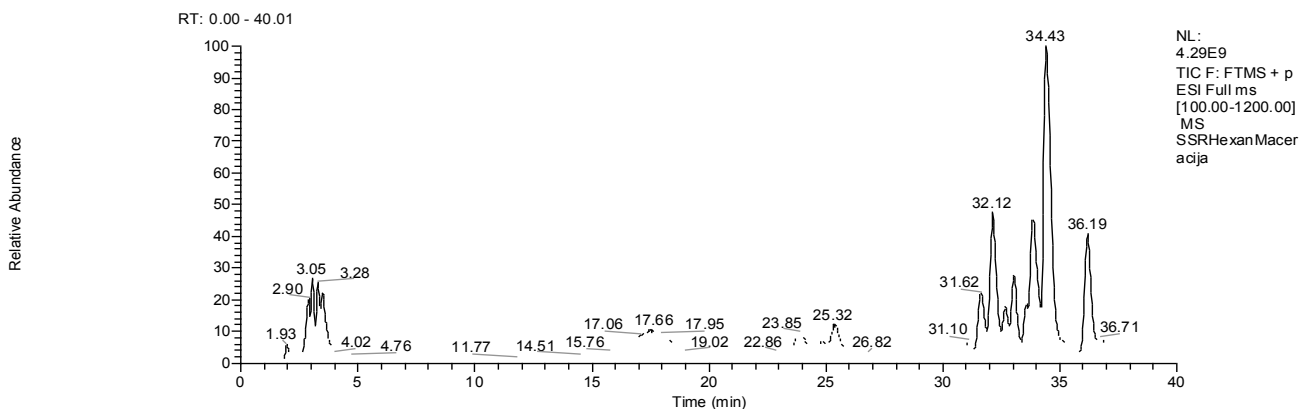
#### 4.5 HPLC-HRMS metanolnog ekstrakta korena *S. rigidum*

Na osnovu rezultata bioloških testova najveću antioksidativnu, antimikrobnu i antiholinesteraznu aktivnost pokazali su ekstrakti korena *S. rigidum*. Shodno tome utvrĉen je sastav ekstrakata različite polarnosti korena *S. rigidum* pomoću HPLC-HRMS. Na Slici 24. prikazan je TIC (engl. Total ion current chromatogram) metanolnog ekstrakta korena *S. rigidum*.



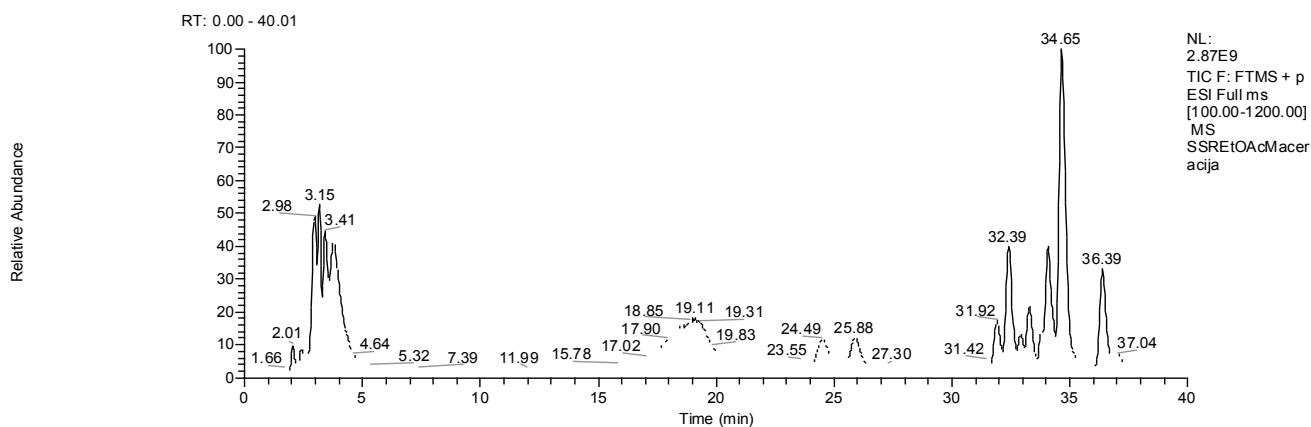
**Slika 24.** TIC (Total Ion current Chromatogram) metanolnog ekstrakta korena *S. rigidum*

Na Slici 25. prikazan je TIC heksanskog ekstrakta *S. rigidum*



**Slika 25.** TIC heksanskog ekstrakta korena *S. rigidum*

Slika 26. prikazuje TIC etil-acetatnog ekstrakta *S. rigidum*

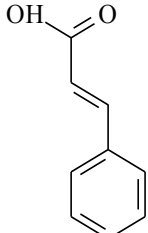
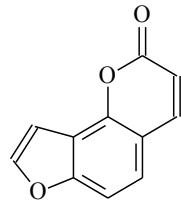
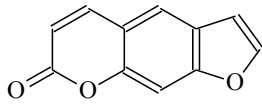
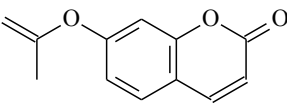
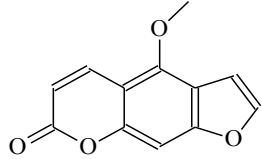
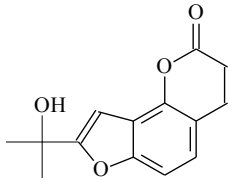
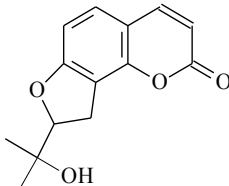


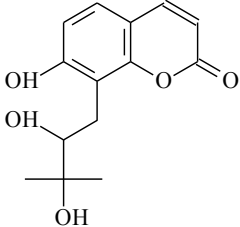
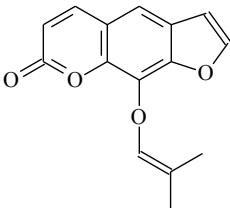
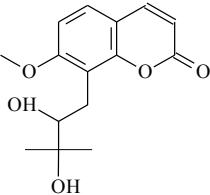
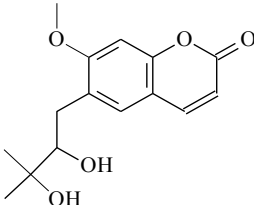
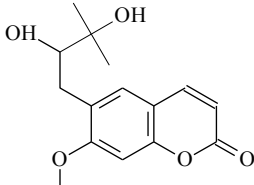
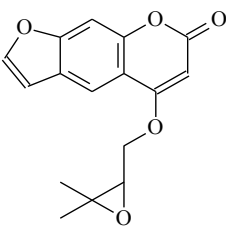
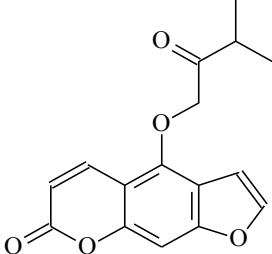
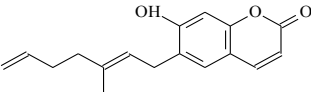
Slika 26. TIC etil-acetatnog ekstrakta korena *S. rigidum*

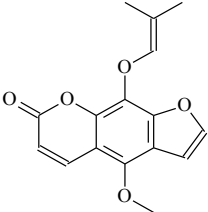
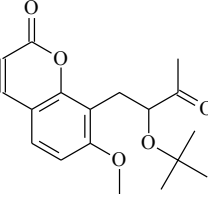
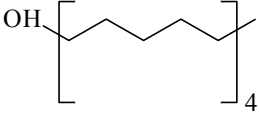
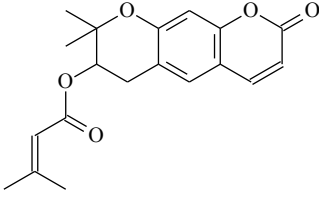
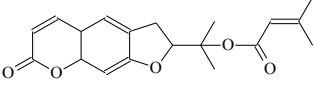
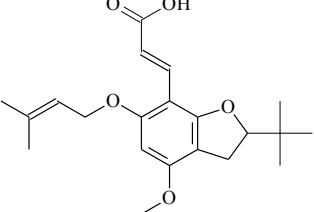
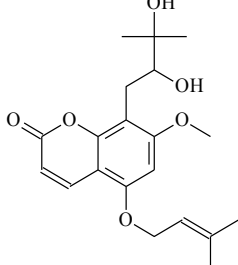
Kako heksanski ekstrakt korena pokazuje najveće antioksidativno i antimikrobno dejstvo, dominantne komponente, potencionalno odgovorne za ove biološke aktivnosti, su identifikovane porećenjem njihovih masenih spektra sa literaturnim podacima. Hemijski sastavi metanolnog, heksanskog i frakcije metanolnog ekstrakta korena su predstavljeni u Tabeli 16.

**Table 16.** Hemijski sastav metanolnog, heksanskog i frakcije metanolnog ekstrakta korena*S. rigidum*

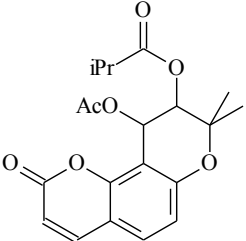
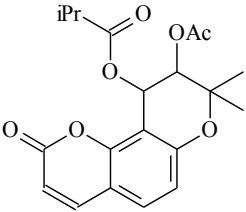
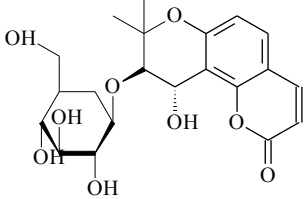
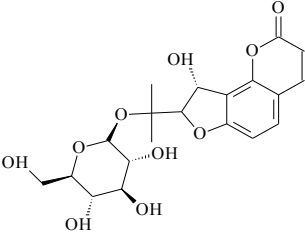
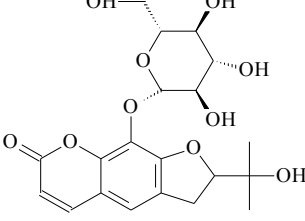
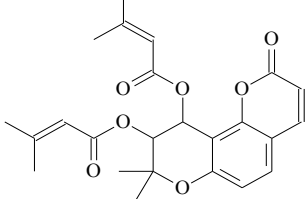
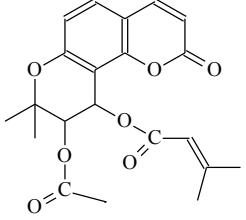
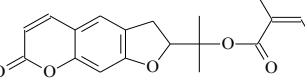
\*RT- retenciono vreme jedinjenja čiji je maseni spektar korišćen za identifikaciju, (a) metanolni ekstrakt, (b) heksan frakcija metanolnog ekstrakta, (c) etil-acetatna frakcija metanolnog ekstrakta, (d) etil-acetatni ekstrakt, (e) heksanski ekstrakt

Jedinjenje	Klasa jedinjenja	Odnos m/z [M+H] <sup>+</sup>	RT*	Formula	Referenca
Cimetna kiselina	Karboksilna kiselina	149	31,42(c) 34,00- 34,23(d) 34,59- 34,92(d) 36,22- 36,69(d) 19,12(a) 20,46(a)		(Orčić i sar., 2014; Liu i sar., 2011)
Angelicin	Angularni furanokumarin	187	19,12(a) 20,46(a) 19,14- 19,53(b) 21,8(b) 22,1- 22,22(b)		(Pavlović i Kuznetsova 1971; Peroutka i sar., 2007)
Psoralen	Linerani furanokumarin	187	19,12(a) 20,46(a) 19,14- 19,53(b) 21,8(b) 22,1- 22,22(b)		(Shavarda i sar., 2001; Zhao i sar., 2005; Shi i sar., 2013)
Acetilumbeliferon	Kumarin	205	36,47- 36,93(b)		(Hu i Lee 1992)
Bergapten	Linearni furanokumarin	217	18,85(a) 20,46(a)		(Shi i sar., 2013; Shavarda i sar., 2002)
Oroselol	Angularni furanokumarin	245	21,58(a) 35,54- 36,04(b) 34,49(e)		(Shavarda i sar., 2002; Gonzalez i sar., 1982; Chang i sar., 2013)
Kolumbianetin	Angularni furanokumarin	247	20,46(a)		

Devenioli	Kumarin	265	21,58(a) 34,13(a)		(Widelski i sar., 2005)
Imperatorin	Linearni furokumarin	271	26,59(a) 26,66(b) 23,56- 23,94(e)		(Shavarda i sar., 2002; Shi i sar., 2013; Shavarda i sar., 2001; Yongqing i sar., 1995)
Meranzin hidrat	Kumarin	279	33,77(a) 33,51- 33,66(b)		(Dugo i sar., 2000)
Ulopterol	Kumarin	279	33,77(a) 33,51- 33,66(b)		(Lemmich i Havelund 1978; Yang i sar., 2009)
Peucedanol	Kumarin	279	33,77(a) 33,51- 33,66(b)		(Jang i sar., 2008)
Oksipeucedanin	Linearni furanokumarin	287	22,92(a)		(Park i sar., 2009)
Izooksipeucedanin	Linearni furanokumarin	287	22,92(a)		(Gonzalez i sar., 1982)
Ostrutin	Kumarin	299	23,49(a) 23,38- 23,50(b)		(Vogl i sar., 2011; Joa i sar., 2011)

Felopterin	Linearni furanokumarin	301	31,42(c) 23,20- 23,94(d)		(Orčić i sar., 2014; Coassini Lokar i Delben 1988; Kumar i sar., 1978)
Pranferin	Kumarin	319	20,46(a)		(Gonzalez i sar., 1982)
Dokozanol	Masni alkohol	327	33,77(a) 32,11(b) 31,30- 31,82(e)		(Zong i sar., 2007)
Agasilin	Kumarin	329	26,01(a) 28,34(a) 33,84- 34,14 (b) 22,43- 22,86(e) 23,56- 23,94(e) 24,54- 24,92(e) 33,87(e) 24,03(a)		(Razavi i sar., 2013)
Tortuozinol C <sub>19</sub> H <sub>20</sub> O <sub>6</sub>	Kumarin	345	24,03(a)		(Abyshev i Abyshev 1983)
Sezebrinska kiselina	Karboksilna kiselina	363	35,8- 35,92(b)		(Banerjee i sar., 1987)
Sezebrinol	5,7-Dioksigenovani kumarin	363	35,8- 35,92(b)		(Banerjee i sar., 1980)



Bokonin	Kumarin	375	35,99-36,17(b)		(Bellino i sar., 1986)
Izobokonin	Kumarin	375	35,99-36,17(b)		(Dukhovlino va i sar., 1980; Lou i sar., 2004)
Kampestrinozid	Glikozidil kumarin, Kumarin	425	26,57-26,75(b)		(Abyshev i sar., 1982)
Apterin	Angularni furanokumarin	425	26,57-26,75(b)		(Lemmich i Havelund 1978; Hisamoto i sar., 2003)
Rutarin	Linerni furanoumarin	425	26,57-26,75(b)		(Lacroix i sar., 2011)
3'-Senecioil-(Z)-helakton	Kumarin	427	33,77(a)		(Gonzalez i sar., 1979)
3',4'-Diizovaleril-(Z)-helakton	Kumarin	431	33,75-33,96(b)		(Gonzalez i sar., 1979)
Tortuozinin C <sub>29</sub> H <sub>20</sub> O <sub>5</sub>	Linearni furanokumarin	449	22,17(b)		(Abyshev i Abyshev 1983)

#### 4.6 Antioksidativna aktivnost ekstrakata i etarskih ulja *S. rigidum* i *S. pallasii*

**Tabela 17.** Antioksidativna svojstva ekstrakata različite polarnosti i etarskih ulja lista, cveta, ploda i korena biljke *S. rigidum* (ABTS, DPPH, TRP, ukupni flavonoidi i fenoli). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost±standardna devijacija

Deo biljke	Rastvarač	ABTS*	DPPH*	TRP*	Ukupni flavonoidi*	Ukupni fenoli*	
		( $\mu\text{g TE/mg s.e.}$ )	(SC50 (mg/mL))	(mg AAE/ mg s.e.)	( $\mu\text{g RE /mg s.e.}$ )	( $\mu\text{g GAE /mg s.e.}$ )	
Ekstrakti	List	heksan	12,57±0,31	230,82±2,58	463,27±1,25	0,00*	56,96±1,68
		etar	6,68±0,16	96,15±1,02	213,62±0,27	0,68±0,01	1,86±0,05
		etil-acetat	2,94±0,07	311,78±8,25	595,85±1,90	0,18±0,01	3,96±0,12
		acetone	3,00±0,07	203,41±3,27	136,88±2,71	0,52±0,01	10,98±0,32
		metanol	1,74±0,04	159,20±1,48	786,85±15,58	3,13±0,06	6,31±0,19
	Cvet	heksan	11,20±0,28	378,00±6,07	191,22±1,81	0,00*	19,22±0,57
		etar	8,81±0,22	187,60±2,19	136,76±0,73	3,10±0,06	1,34±0,04
		etil-acetat	3,10±0,08	426,81±6,11	181,23±1,61	0,08±0,01	3,92±0,12
		acetone	10,14±0,25	78,19±0,85	546,84±14,79	5,78±0,11	87,28±2,58
		metanol	2,14±0,05	112,43±0,98	698,95±19,78	3,73±0,07	21,84±0,65
	Plod	heksan	9,87±0,24	167,20±0,88	556,84±11,03	0,00*	10,94±0,32
		etar	5,74±0,14	106,24±0,39	128,24±2,54	0,76±0,02	12,60±0,37
		etil-acetat	4,37±0,11	127,72±1,05	320,25±6,34	0,15±0,01	10,20±0,30
		acetone	3,22±0,08	180,28±2,25	117,55±0,35	0,98±0,02	3,09±0,09
		metanol	3,00±0,07	116,96±7,98	228,39±4,52	8,27±0,16	63,28±1,87
	Koren	heksan	12,99±0,32	150,72±1,85	555,49±2,11	0,00*	10,09±0,30
		etar	9,82±0,24	135,57±1,54	214,49±4,25	0,64±0,01	23,72±0,70
		etil-acetat	9,02±0,22	195,43±2,01	332,34±2,62	0,57±0,01	64,97±1,92
		acetone	8,02±0,20	111,79±0,98	652,64±12,93	4,01±0,18	151,03±4,47
		metanol	3,67±0,07	189,65±2,06	442,00±8,75	0,76±0,01	14,70±0,43
Etarska ulja	List	/	1,47±0,17	224,00±3,31	31,32±0,52	/	
	Cvet	/	0,74±0,05	257,51±2,45	30,75±0,83	/	
	Plod	/	0,67±0,03	217,84±3,51	47,89±1,02	/	
	Koren	/	2,05±0,19	302,40±8,65	115,25±2,03	/	
Referentni standardi	BHT	metanol	3,45±0,17	16,51±0,36	70,30±0,41	/	/
	Troloks	metanol	/	1,50±0,09	50,04±0,21	/	/
	Askorbinska kiselina	voda	2,78±0,28	0,56±0,02	/	/	/
	Rutin	metanol	3,34±0,14	1,43±0,11	90,71±0,38	/	/
	Galna kiselina	voda	3,02±0,11	0,29±0,01	70,58±0,28	/	/

\* TE-Troloks ekvivalent, TRP-ukupna redukciona moć, AAE-Ekvivalent askorbinske kiseline, RE- Rutinekvivalent, GAE- Ekvivalent galne kiseline, s.e.-suv ekstrakt

Antioksidativna aktivnost ekstrakata različite polarnosti vegetativnih delova (list, cvet, plod i koren) kao i etarskih ulja *S. rigidum* i *S. pallasii* (DPPH, ABTS i ukupna redukciona moć, ukupan sadržaj flavonoida i fenola) prikazana je u Tabelala 17 i 18.

**Tabeli 18.** Antioksidativna svojstva ekstrakata različite polarnosti i etarskih ulja lista, cveta, ploda i korena biljke *S. pallasii* (ABTS, DPPH, TRP, ukupni flavonoidi, ukupni fenoli). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost±standardna devijacija

	Deo biljke	Rasvarač	ABTS*	DPPH*	TRP*	Ukupni flavonoidi-*	Ukupni fenoli*
			(µg TE/mg s.e.)	(SC50 (mg/mL))	(mg AAE/ mg s.e.)	(µg RE /mg s.e.)	(µg GAE /mg s.e.)
Ekstrakti	List	heksan	11,06±0,31	203,78±11,67	0,32±0,04	31,04±2,05	63,12±3,17
		etar	7,56±0,14	250,35±2,19	0,37±0,02	27,74±1,96	55,70±4,18
		etil-acetat	2,37±,009	516,26±4,78	0,35±0,08	9,27±0,65	57,18±4,33
		aceton	5,71±0,28	406,50±3,69	0,51±0,09	24,87±1,09	53,87±3,87
		metanol	0,62±0,03	764,23±6,10	1,11±0,12	34,45±1,32	50,90±3,28
	Cvet	heksan	15,10±0,68	120,20±5,64	0,26±0,02	33,98±0,89	61,07±5,28
		etar	5,57±0,19	384,15±19,12	0,33±0,01	20,76±0,58	59,28±4,13
		etil-acetat	6,45±0,18	178,86±6,13	0,19±0,01	2,99±0,48	48,64±3,29
		aceton	3,88±0,11	355,69±10,36	0,37±0,08	18,01±0,45	38,50±3,01
		metanol	1,20±0,18	532,52±18,21	0,44±0,09	0,99±0,09	61,01±4,98
	Plod	heksan	17,27±0,88	150,41±3,81	0,26±0,05	22,35±0,86	59,68±4,15
		etar	6,64±0,21	119,92±5,09	0,30±0,04	18,21±0,54	45,91±3,68
		etil-acetat	8,57±0,19	138,21±8,36	0,29±0,03	7,16±0,18	56,22±3,77
		aceton	5,47±0,17	217,48±6,31	0,37±0,04	11,83±0,69	58,19±3,68
		metanol	1,19±0,11	495,93±19,66	0,36±0,03	3,05±0,17	52,66±4,18
	Koren	heksan	13,82±0,23	154,47±1,15	0,24±0,01	34,47±1,12	35,58±2,47
		etar	5,76±0,14	209,35±1,87	0,26±0,02	29,95±0,98	43,36±2,38
		etil-acetat	11,34±0,25	288,62±2,18	0,24±,0,07	20,96±0,78	48,92±3,11
		aceton	6,65±0,18	229,67±2,17	0,20±0,05	32,74±1,14	45,27±2,78
		metanol	4,28±,015	201,22±1,97	0,23±0,02	13,79±0,77	46,17±2,68
Etarska ulja	List	/	0,71±0,03	263,23±10,15	0,77±0,03	/	/
	Cvet	/	0,96±0,07	165,84±4,02	0,31±0,04	/	/
	Plod	/	1,20±0,12	451,23±18,56	0,32±0,04	/	/
	Koren	/	1,11±0,11	107,1±8,32	0,38±0,05	/	/
Referentni standardi	BHT	metanol	3,45±0,17	16,51±0,36	70,30±0,41	/	/
	Troloks	metanol	/	1,50±0,09	50,04±0,21	/	/
	Askorbin ska kiselina	voda	2,78±0,28	0,56±0,02	/	/	/
	Rutin	metanol	3,34±0,14	1,43±0,11	90,71±0,38	/	/
	Galna kiselina	voda	3,02±0,11	0,29±0,01	70,58±0,28	/	/

\* TE-Troloks ekvivalent, TRP-ukupna redukciona moć, AAE-Ekvivalent askorbinske kiseline, RE- Rutinekvivalent, GAE- Ekvivalent galne kiseline, s.e.-suv ekstrakt

#### 4.6.1 ABTS

Prema rezultatima ispitivanja ekstrakata primenom ABTS metode, najbolju aktivnost pokazali su heksanski ekstrakt svih delova biljke *S. rigidum* (od 12,99-9,87 µg TE/mg s.e.), dok su najnižu aktivnost pokazali metanolni ekstrakti svih delova biljaka, pri čemu ekstrakt lista pokazuje najslabiju aktivnost prema ABTS katjon radikalumu (1,74 µg TE/mg s.e.). U poređenju sa ekstraktima, etarska ulja imaju mnogo nižu aktivnost (u opsegu od 0,67-2,05 µg TE/mg) od aktivnosti svih ekstrakata, sa izuzetkom metanolnih. Od svih analiziranih ulja najbolju aktivnost prema ABTS metodi pokazalo je etarsko ulje korena (2,05 µg TE/mg s.e.), a razlog tome je u činjenici da je dominantna komponenta u ulju (*Z*)-falkarinol (14,3 %) koja ima potencijalno dobar scavenging potencijal zbog prisustva nekoliko trostrukih C-C veza.

Heksanski ekstrakti svih delova biljke *S. pallasii* pokazuju najveću aktivnost prema ABTS katjon radikalumu (11,06-17,27 µg TE/mg s.e.), s tim da heksanski ekstrakt ploda ima najveću aktivnost od 17,27 µg TE/mg s.e.. Najmanju aktivnost prema ABTS katjon radikalumu ispoljavaju svi metanolni ekstrakti (0,62-4,28 µg TE/mg s.e.). Metanolni ekstrakt lista pokazuje najmanju aktivnost 0,62 µg TE/mg s.e..

U odnosu na ekstrakte različite polarnosti, etarska ulja imaju niže vrednosti tj. manje su aktivna prema ABTS katjon radikalumu. Vrednosti aktivnosti etarskih ulja svih delova biljne vrste *S. pallasii* su slične, a najveće su za etarsko ulje ploda i korena *S. pallasii* (1,20 i 1,11 µg TE/mg s.e.). Najslabiju aktivnost pokazuje etarsko ulje lista *S. pallasii* 0,71 µg TE/mg s.e.

Dobijeni rezultati aktivnosti ekstrakata različite polarnosti (list, cvet, polod i koren) biljnih vrsta *S. rigidum* i *S. pallasii*, prema ABTS katjon radikalumu, su uporedivi.

Heksan je pogodan za ekstrakciju nepolarnih jedinjenja, kao što su alifatični ugljovodonici; etrom i etil-acetatom se ekstrahuju polarnija jedinjenja koja sadrže kiseonik, dok se metanolom ekstrahuju najpolarnija jedinjenja. Nezasićeni alifatični ugljovodonici, kao i terpeni ispoljavaju antioksidativne karakteristike i mogu reagovati sa katjon radikalom ABTS. Shodno tome, heksanski ekstrakti obe biljne vrste pokazuju najveću, a metanolni ekstrakti najmanju aktivnost prema ABTS katjon radikalumu. Aktivnost etarskih ulja je takođe slična iako se hemijski sastav ove dve biljne vrste znatno razlikuje. Naime, dominantna komponenta etarskog ulja korena, *S. rigidum* koje ispoljava najveću aktivnost, je (*Z*)-falkarinol (14,3 %), dok su najzastupljenije komponente u etarskom ulju korena *S. pallasii*: *n*-nonan, (*Z*)-β-ocimen (Sitzmann i sar., 2014) i *n*-undekan (45,2 %, 34,5 % i 13,3 %). Linearni ugljovodonici, *n*-nonan i *n*-undekan ne

pokazuju antioksidativne aktivnosti. Međutim, ocimen zbog *bis*-alilnog H-atoma po strukturi podseća na terpene koji imaju antioksidativne aktivnosti, te je upravo ova komponenta glavni nosilac antioksidativnosti etarskog ulja korena *S. pallasii* (Choi i sar., 2000; Grassmann i sar., 2001; Takahashi i sar., 2003; Kim i sar., 2004).

Generalno, etarska ulja svih delova biljke *S. pallasii* su pokazale veoma niske antioksidativne aktivnosti, što nije iznenađujuće, imajući u vidu njihov hemijski sastav u kome uglavnom prevladavaju ugljovodonični monoterpeni, klasa jedinjenja za koju je dokazano da ima veoma niske antioksidativne aktivnosti.

#### **4.6.2 DPPH**

Prema DPPH metodi, čiji su rezultati predstavljeni kao SC<sub>50</sub> vrednosti, najbolju aktivnost pokazuju etarski, acetonski i metanolni ekstrakti *S. rigidum*. Najbolju aktivnost prema DPPH radikalu pokazao je acetonski ekstrakt cveta SC<sub>50</sub>=78,19 mg/mL, dok metanolni i etarski ekstrakti pokazuju slabiju aktivnost. Etil-acetatni ekstrakt cveta pokazuje najmanju aktivnost (SC<sub>50</sub>=426,81 mg/mL) prema ovoj metodi.

Za razliku od ekstrakata, etarska ulja *S. rigidum* pokazuju dosta slabiju aktivnost prema DPPH radikalu (SC<sub>50</sub>=217,84-302,40 mg/mL), pri čemu etarsko ulje ploda pokazuje najbolju aktivnost SC<sub>50</sub>=217,84mg/mL, a najslabiju etarsko ulje korena SC<sub>50</sub>=302,40 mg/mL.

Heksanski ekstrakti korena, lista i cveta *S. pallasii* pokazuju najveću aktivnost prema DPPH radikalu, u poređenju sa ekstraktima polarnijih rastavarača, dok etarski ekstrakt cveta ima najmanju aktivnost (SC<sub>50</sub>=119,92 mg/mL) u odnosu na sve posmatrane ekstrakte. Kao i u slučaju ABTS katjon radikala, metanolni ekstrakt lista ima najmanju aktivnost prema DPPH radikalu, odnosno najveću vrednost SC<sub>50</sub>=764,23 mg/mL.

Etarsko ulje korena *S. pallasii* ima najnižu SC<sub>50</sub> vrednost odnosno, što znači da ispoljava najveću aktivnost prema DPPH radikalu (SC<sub>50</sub>=107,1 mg/mL), etarsko ulje ploda pokazuje najmanju aktivnost i ima najveću vrednost SC<sub>50</sub>=451,23 mg/mL.

#### **4.6.3 Ukupna redukciona moć (TRP)**

Najveća vrednost ukupne redukcionne moći, koja je izražena preko ekvivalenata askorbinske kiseline, određena je u metanolnom ekstraktu lista *S. rigidum* (786,85 µg AAE/mg s.e.), dok najmanju vrednost ukupne redukcionne moći pokazuje acetonski ekstrakt korena (117,55 µg

AAE/mg s.e.). U poređenju sa ekstraktima, etarska ulja *S. rigidum* pokazuju jako slabu ukupnu redukcionu moć (od 30,75 do 115,25 µg AAE/mg s.e.). Etarsko ulje korena pokazalo je najveću vrednost ukupne redukcionne moći, a najmanju etarsko ulje cveta.

Metanolni ekstrakt lista *S. pallasii* pokazuje najveću ukupnu redukcionu moć (1,11 mg AAE/mg s.e.), što je suprotno od očekivog na osnovu prethodnih rezultata za aktivnost prema ABTS katjon radikal i DPPH radikal, dok najmanju ima etil-acetatni ekstrakt cveta (0,19 mg AAE/mg s.e.). Etarsko ulje lista *S. pallasii* ima najveću vrednost ukupne redukcionne moći (0,77 mg AAE/mg s.e.), dok su vrednosti ostalih etarskih ulja međusobno bliske i duplo manje u odnosu na etarsko ulje lista.

#### **4.6.4 Sadržaj ukupnih flavonoida**

Najviše ukupnih flavonoida određeno je u metanolnom ekstraktu ploda *S. rigidum* (8,27 µg RE/mg s.e.) i acetonskom ekstraktu cveta (5,78 µg RE/mg s.e.). U heksanskim ekstraktima svih delova *S. rigidum* nisu određeni flavonoidi.

Najveći sadržaj ukupnih flavonoida određen je u heksanskom ekstraktu korena i lista *S. pallasii* (34,47 i 34,45 µg RE/mg s.e.), dok je najmanji sadržaj određen u etil-acetatnom ekstraktu cveta.

#### **4.6.5 Sadržaj ukupnih fenola**

Najveći sadržaj ukupnih fenola određen je u acetonskim ekstraktu korena *S. rigidum* (151 µg GAE/mg s.e.), dok je u ekstraktima lista naćeno najmanje ukupnih fenola (1,86-10,98 µg GAE/mg s.e.).

Najveći sadržaj fenola određen je u heksanskom ekstraktu lista *S. pallasii* 63,12 µg GAE/mg s.e., a najmanji u acetonskom ekstraktu cveta 38,50 µg GAE /mg s.e..

Najmanju vrednost ukupne redukcionne moći kao i najmanji sadržaj flavonoida, kao i fenola određeni su u etil-acetatnom odnosno u acetonskom ekstraktu cveta što je u korelaciji sa polarnošću korišćenih rastvaraća. Međutim, etil-acetatni i acetonski ekstrakti cveta ne pokazuju najmanju aktivnost prema ABTS katjon radikal i DPPH radikal, što moće ukazati da se u ovim ekstraktima nalaze i jedinjenja koja takoće mogu da reaguju sa reaktivnim vrstama (ABTS katjon radikal i DPPH radikal), pa je aditivni i sinergistićki efekat ovih reaktivnih jedinjenja znaćajan.

Dobijeni rezultati ispitivanja antioksidativne aktivnosti ekstrakata različitih polarnosti se mogu koristiti za dalja istraživanja, u cilju utvrđivanja najboljeg odnosa između potencijalnih bioaktivnih jedinjenja i njihove antioksidativne aktivnosti, i rastvarača kojim bi se najefikasnije izolovala specifična biološki aktivnih jedinjenja (*Bae i sar.*, 2012).

#### **4.7 Statistička povezanost antioksidativnih karakteristika ekstrakata različite polarnosti i etarskih ulja *S. rigidum* i *S. pallasii***

Statistička analiza antioksidativne aktivnosti ekstrakata i etarskih ulja *S. rigidum*, počinje formiranjem korelacione matrice prikazane u Prilogu 1. Korelaciona matrica pokazuje da svaka varijabla ima bar jedan koeficijent korelacije sa apsolutnom vrednošću većom od 0,3 (*Kinnear i Gray* 1994).

Primenom PCA analize preračunate su svojstvene vrednosti (eigenvalues) koje su prikazane u Tabeli 19.

Iz Tabele 19. je uočljivo da prve tri glavne komponente objašnjavaju 82,00 % ukupnog varijabiliteta. Prva glavna komponenta objašnjava 46,66 % ukupnog varijabiliteta, i ima visoko negativno opterećenje varijablama Koren aceton, Cvet aceton i Plod metanol (-3,656; -3,265 i -2,212). Ovakvi rezultati ukazuju da negativno opterećenje prve glavne komponente pokazuju ekstrakti pripremljeni rastvaračima visoke polarnosti. Prva glavna komponenta ima pozitivno opterećenje na varijablama Cvet etil-acetat, Cvet heksan, Etarsko ulje koren, Etarsko ulje list, Etarsko ulje cvet i Etarsko ulje plod (2,221; 1,17; 1,841; 1,624; 1,851 i 1,619; respektivno) (Slika. 27). Pozitivnu korelaciju sa prvom glavnom komponentom imaju nepolarni ekstrakti. Zbog svega navedenog, ekstrakti pripremljeni rastvaračima velike polarnosti (aceton i metanol) su se izdvojili u desnom delu PCA dijagrama, dok su se ekstrakti ekstrahovani nepolarnim rastvaračem (heksan) i etarska ulja izdvojili kao posebne grupacije.

Druga glavna komponenta objašnjava 21,23 % ukupnog varijabiliteta. Najveće negativno opterećenje ima na varijabli Plod metanol (-2,193), dok pozitivno opterećenje ima na varijablama List heksan (2,030), Cvet heksan (1,876), Koren heksan (1,770) i Plod heksan (1,174).

**Tabela 19.** Faktorske kordinate ispitivanja antioksidativne aktivnosti (ABTS, DPPH, ukupna redukciona moć, ukupni flavonoidi i ukupni fenoli) etarskog ulja i ekstrakata različite polarosti vegetativnih delova (list, cvet, plod i koren) biljke *S. rigidum*

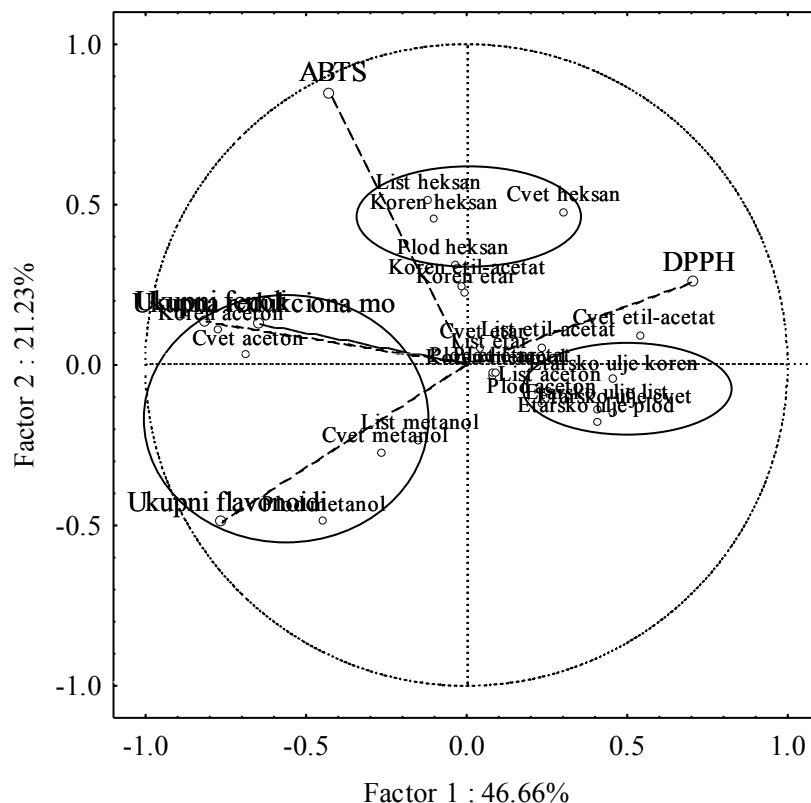
	Glavna komponenta 1	Glavna komponenta 2	Glavna komponenta 3
Koren heksan	-0,652	1,770	-0,691
Koren etar	-0,245	0,798	0,619
Koren etil-acetat	-0,265	0,907	1,283
Koren aceton	-3,656	0,315	0,316
Koren metanol	0,169	-0,263	-0,729
List heksan	-0,727	2,030	-0,051
List etar	0,084	-0,052	0,309
List etil-acetat	0,871	0,099	-1,665
List aceton	0,941	-0,486	0,316
List metanol	-0,889	-1,116	-1,992
Cvet heksan	1,172	1,876	0,349
Cvet etar	-0,001	0,072	0,766
Cvet etil-acetat	2,221	0,256	-0,260
Cvet aceton	-3,265	-0,018	0,432
Cvet metanol	-1,368	-1,286	-1,384
Plod heksan	-0,361	1,174	-0,883
Plod etar	0,179	-0,242	0,670
Plod etil-acetat	0,220	-0,238	-0,230
Plod aceton	0,850	-0,645	0,397
Plod metanol	-2,212	-2,193	1,159
Etarsko ulje koren	1,841	-0,343	0,066
Etarsko ulje list	1,624	-0,727	0,463
Etarsko ulje cvet	1,851	-0,785	0,377
Etarsko ulje plod	1,619	-0,902	0,365
Svojtvena vrednost	2,333	1,061	0,706
Varijabilitet (%)	46,663	21,229	14,113
Kumulativna svojtvena vrednost	2,333	3,395	4,100
Ukupan varijabilitet (%)	46,663	67,892	82,005

Treća glavna komponenta doprinosi sa 14,06 % ukupnoj varijansi, i ima pozitivno opterećenje na varijablama Koren etil-acetat i Plod metanol (1,283 i 1,159), dok negativno opterećenje ima na varijablama List etil-acetat, Cvet metanol i Plod metanol (-1,665; -1,992 i -1,384).

Negativna opterećenja i prve i druge glavne komponente pokazuju Cvet metanol (-1,368, -1,286), List metanol (-0,889, -1,116) i Plod metanol (-2,212, -2,193)

Na grupisanje nepolarnih (heksanskih) ekstrakata biljke *S. rigidum* i etarskih ulja svih delova ispitivane biljke uticali su pre svega rezultati dobijeni ABTS i DPPH testovima. Sadržaj ukupnih fenola i flavonoida, a samim tim i ukupna redukciona moć jasno odvajaju polarne metanolne ekstrakte u posebnu grupu na PCA dijagramu





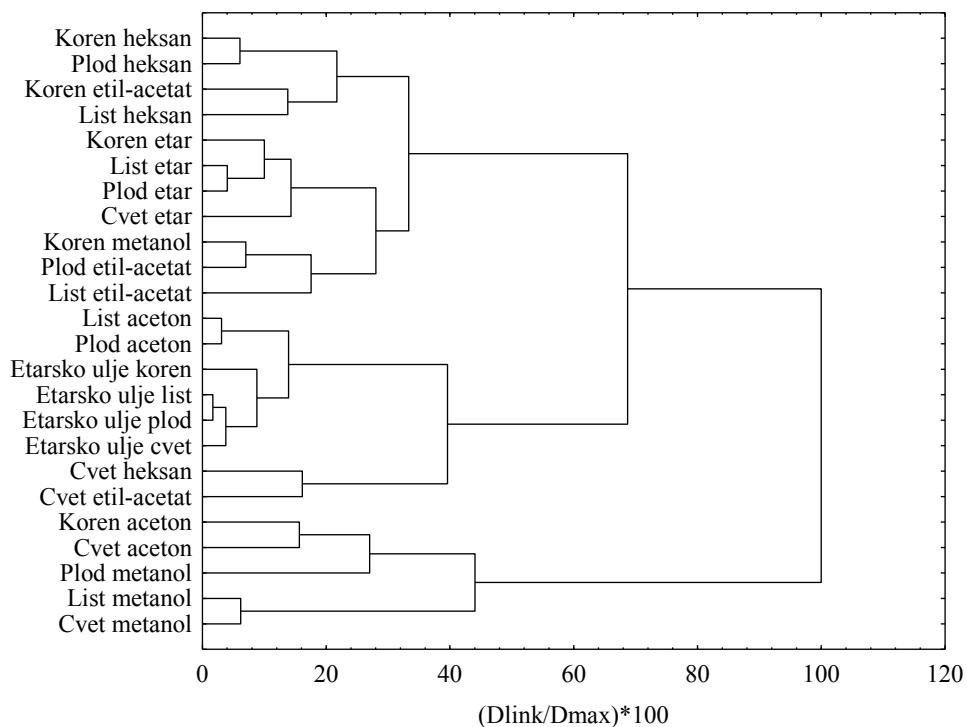
**Slika 27.** PCA dijagram ispitivanja antioksidativne aktivnosti (ABTS, DPPH, Ukupna redukciona moć, Ukupni fenoli i Ukupni flavonoidi) etarskog ulja i ekstrakata različite polarosti vegetativnih delova (list, cvet, plod i koren) biljke *S. rigidum*

Podaci koji su bili predmet PCA analize bili su podvrgnuti hijerarhijskoj klaster analizi (HCA). Rezultati HCA ispitivanja antioksidativne aktivnosti (ABTS, DPPH, Ukupna redukciona moć, ukupni fenoli, ukupni flavonoidi) etarskih ulja i ekstrakata različite polarnosti delova biljke *S. rigidum* u kojoj su kao varijable korišćena analizirana etarska ulja i ekstrakti različite polarnosti delova (list, cvet, plod i koren) *S. rigidum* prikazani su na Slici 28.

HCA analizom izdvojila su se tri klastera u okviru kojih se nalaze po dva potklastera nejednake brojnosti.

U okviru prvog klastera nalaze se dva potklastera. U prvom potklasteru se nalaze ekstrakti nepolarnih rastvarača, odnosno heksanski ekstrakti korena, ploda i lista (Koren heksan, Plod heksan i List heksan) i etil-acetatni ekstrakt korena (Koren etil-acetat). U okviru drugog potklastera izdvojili su se nepolarni etarski ekstrakti korena, lista, cveta i ploda sa jedne strane (opisani varijablama Koren etar, List etar i Cvet etar i Plod etar) i polarniji ekstrakti sa druge

strane, metanolni ekstrakt korena, i etilacetatni ekstrakti ploda i lista (opisani varijablama Koren metanol, Plod etil-acetat i List etil-acetat). Generalno, ovaj klaster se mođe nazvati klasterom preteđno nepolarnih ekstrakata.



**Slika 28.** Dendrogram slućajeva ispitivanja antioksidativne aktivnosti (ABTS, DPPH, ukupna redukciona moć, ukupni flavonoidi i ukupni fenoli) etarskog ulja i ekstrakata različite polarnosti vegetativnih delova (list, cvet, plod i koren) biljke *S. rigidum*

Takoće drugi klaster sadrđi dva potklastera. U okviru prvog potklastera grupisali su se List aceton i Plod aceton (Euklidovo rastojanje=0,41), i etarska ulja korena, lista, ploda i cveta (opisana varijablama Etarsko ulje koren, Etarsko ulje list, Etarsko ulje plod i Etarsko ulje cvet). Najveća slićnost je izmeću Etarsko ulja list i Etarsko ulja plod (Euklidovo rastojanje=0,22). Ovaj potklaster se mođe smatrati potklasterom preteđno etarskih ulja.

Ispitivana etarska ulja svih delova biljke *S. rigidum* imaju visok sadrđaj ugljovodonićnih monoterpena, koji ne pokazuju znaćajnu antioksidativnu aktivnost, pa su ona znatno udaljena od korišćenih metoda za odrećivanje antioksidativne aktivnosti (DPPH, ABTS i Ukupna redukciona moć), ali ne sadrđe ni fenole ni flavonoide.

U drugom potklasteru drugog klastera izdvojili su se Cvet heksan i Cvet etil-acetat (Euklidovo rastojanje=2,16).

I u okviru trećeg klastera nalaze se dva potklastera koji sadrže uzorke ekstrakata polarnijih rastvarača, acetona i metanola. U okviru prvog potklastera grupisali su se Koren acetona i Cvet acetona (Euklidovo rastojanje=2,09) i Plod metanol, dok su u drugom List metanol i Cvet metanol (Euklidovo rastojanje=0,83). Acetonski ekstrakti korena i cveta imaju najveći sadržaj fenola i pokazuju najveću ukupnu redukcionu moć. Metanolni ekstrakti ploda imaju najveći sadržaj flavonoida, što utiče da budu izdvojeni u poseban potpotklaster. Zbog ovakvih rezultata ovaj klaster se može nazvati klasterom ekstrakata pripremljenih polarnim rastvaračima.

Izmeću rezultata dobijenih PCA i HCA analizom postoji veliko slaganje. I PCA i HCA analiza matrice u kojoj se kao varijable koriste metode ispitivanja antioksidativne aktivnosti (ABTS, DPPH, ukupna redukciona moć, ukupni flavonoidi i ukupni fenoli) jasno izdvajaju DPPH metodu od ostalih metoda određivanja antioksidativne aktivnosti. Takvo grupisanje može biti uslovljeno činjenicom da ta metoda predstavlja elektron transfer metodu i da se znatno razlikuje po mehanizmu delovanja od ostalih korišćenih metoda.

ABTS metoda se nalazi sa iste strane PCA dijagrama kao i Ukupna redukciona moć, Ukupni fenoli i Ukupni flavonoidi, ali je ipak malo odvojena od njih zbog specifičnog mehanizma reakcije zasnovanom na reakciji transfera vodonika.

Korelaciona matrica antioksidativnih karakteristika ekstrakata i etarskih ulja *S. pallasii*, kojom započinje multivarijantna statistička analiza prikazana je u Prilogu 2.

Sledeći korak u statističkoj analizi predstavlja preračunavanje svojstvenih vrednosti (eigenvalues) koje su prikazane u Tabeli 20.

Iz Tabele 20. je uočljivo da je svojstvena vrednost prve glavne komponente 2,38 tako da prva glavna komponenta objašnjava 47,60 % varijanse među varijablama, druga glavna komponenta 30,30 %, a treća 13,06 % ukupnog varijabiliteta podataka. Prve dve glavne komponente objašnjavaju 77,90 % ukupnog varijabiliteta.

Prva glavna komponenta ima visoko negativno opterećenje na varijabli List metanol (-2,654), uslovljeno rezultatima testova DPPH i Ukupna redukciona moć. Metanolni ekstrakt lista *S. pallasii* pokazuje najveću aktivnost prema DPPH radikalu i najveću ukupnu redukcionu moć u odnosu na ostale polarne ekstrakte koji takođe doprinose negativnom opterećenju prve glavne komponente Cvet metanol (-1,402) i Plod metanol (-1,574).

Visoko negativno opterećenje prvoj glavnoj komponenti daju i varijable Etarsko ulje koren (-1,538), Etarsko ulje list (-2,761), Etarsko ulje cvet (-1,555) i Etarsko ulje plod (-2,231).

Pozitivno opterećenje prve glavne komponente pokazuju nepolarni ekstrakti opisani varijablama Cvet heksan, Plod heksan i Koren heksan, (2,610; 2,404 i 1,979) (Slika. 29). Heksanski ekstrakt cveta pokazuje najveću aktivnost prema ABTS katjon radikal, shodno tome varijabla Cvet heksan daje najveći doprinos ABTS metodi i nalazi se ABTS u desnom donjem delu PCA dijagrama.

**Tabela 20.** Faktorske kordinate ispitivanja antioksidativne aktivnosti (ABTS, DPPH, ukupna redukciona moć, ukupni flavonoidi i ukupni fenoli) etarskog ulja i ekstrakata različite polarosti vegetativnih delova (list, cvet, plod i koren) biljke *S. pallasii*

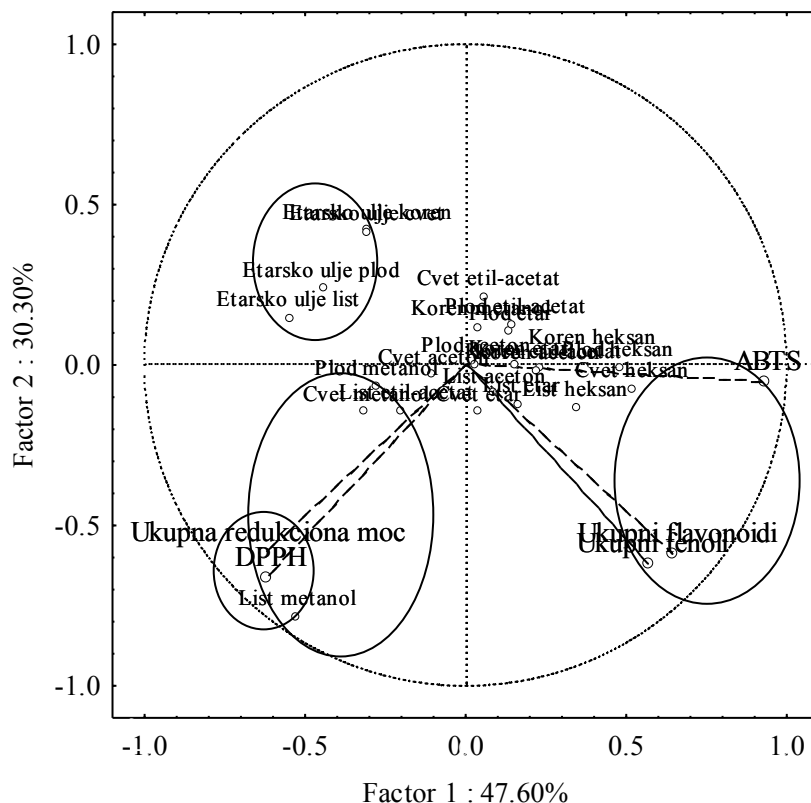
	Glavna komponenta 1	Glavna komponenta 2	Glavna komponenta 3
Koren heksan	1,979	0,145	1,065
Koren etar	0,783	-0,026	0,357
Koren etil-acetat	1,135	-0,077	-0,176
Koren aceton	1,093	-0,105	0,238
Koren metanol	0,198	0,624	-0,443
List heksan	1,719	-0,711	0,173
List etar	0,828	-0,649	0,184
List etil-acetat	-1,000	-0,753	-1,314
List aceton	0,428	-0,492	0,641
List metanol	-2,654	-4,155	1,247
Cvet heksan	2,610	-0,395	0,484
Cvet etar	0,173	-0,790	-0,621
Cvet etil-acetat	0,295	1,119	-0,911
Cvet aceton	-0,505	-0,180	-0,025
Cvet metanol	-1,574	-0,793	-1,570
Plod heksan	2,404	-0,042	0,093
Plod etar	0,687	0,537	0,155
Plod etil-acetat	0,723	0,654	-0,557
Plod aceton	0,168	0,012	-0,488
Plod metanol	-1,402	-0,361	-1,390
Etarsko ulje koren	-1,538	2,213	0,832
Etarsko ulje list	-2,761	0,778	1,523
Etarsko ulje cvet	-1,555	2,194	0,525
Etarsko ulje plod	-2,231	1,250	-0,021
Svojtvena vrednost	2,380	1,515	0,653
Varijabilitet (%)	47,596	30,305	13,061
Kumulativna svojtvena vrednost	2,380	3,895	4,548
Ukupan varijabilitet (%)	47,596	77,901	90,962

Druga glavna komponenta najveću apsolutnu vrednost negativnog opterećenja ima na varijabli List metanol (-4,155).

Etarska ulja svih delova biljke *S. pallasii* pokazuju pozitivno opterećenje druge glavne komponente. Etarska ulja svih delova biljke posebno su se izdvojila u gornjem levom delu PCA dijagrama, jer ne sadrže fenole i flavonoide i ne pokazuju značajnu antioksidativnu aktivnost, zbog toga se etarska ulja u PCA dijagramu i nalaze dijagonalno od varijabli Ukupni fenoli i Ukupni flavonoidi. Zbog negativnih opterećenja i prve i druge glavne komponente koja pokazuju, varijable List metanol (-2,654; -4,155), Cvet metanol (-1,574; -0,793), Plod metanol (-1,402; -0,361) i List etil-acetat (-1,000; -0,753) su zajedno grupisane u donjem levom delu PCA dijagrama. Ovakvo grupisanje nabrojanih varijabli uslovljeno je najviše rezultatima DPPH i Ukupna redukciona moć.

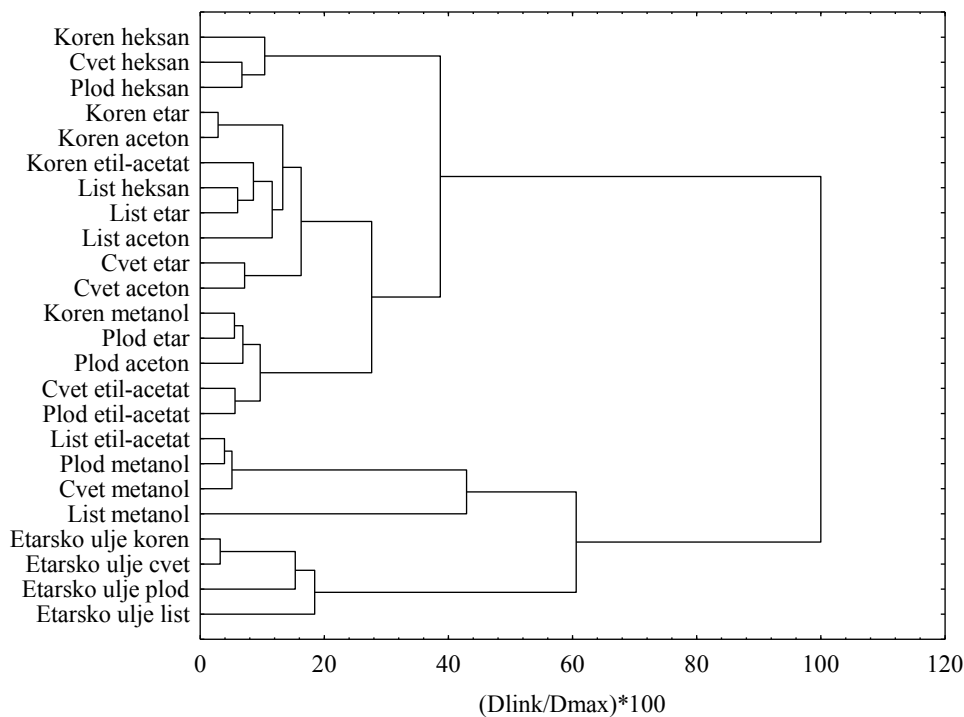
Treća glava komponenta ima doprinos od 13,06 % totalnoj varijansi, sa pozitivnim opterećenjem na varijablama Koren etil-acetat i Plod metanol (1,283 i 1,159) i negativnim opterećenjem na varijablama List etil-acetat, Cvet metanol i Plod metanol (-1,665; -1,992 i -1,384).

Primena klaster analize na rezultate ispitivanja antioksidativne aktivnosti (ABTS, DPPH, ukupna redukciona moć, ukupni fenoli, ukupni flavonoidi) etarskog ulja i ekstrakata različite polarnosti delova (list, cvet, plod i koren) biljke *S. pallasii* prikazana je na Slici 30.



**Slika 29.** PCA dijagram varijabli ispitivanja antioksidativne aktivnosti (ABTS, DPPH, Ukupna redukciona moć, Ukupni flavonoidi i Ukupni fenoli) etarskog ulja i ekstrakata različite polarosti vegetativnih delova (list, cvet, plod i koren) biljke *S. pallasii*

Na dendrogramu je moguće uočiti tri klastera koja sadrže nejednak broj potklastera različite brojnosti. U okviru prvog klastera izdvojila su se dva potklastera. U prvom potklasteru se nalaze nepolarni heksanski ekstrakti korena, cveta i ploda. U okviru drugog potklastera izdvojili su se ekstrakti polarnijih rastvača, pri čemu je najveća sličnost u ispoljavanju antioksidativne aktivnosti između etarskog i heksanskog ekstrakta korena, Koren etar i Koren heksan (Euklidovo rastojanje=0,44); kao i etil-acetatni ekstrakti cveta i ploda, Cvet etil-acetat i Plod etil-acetat (Euklidovo rastojanje=0,86) i heksanskog i etarskog ekstrakta lista, List heksan i List etar (Euklidovo rastojanje=0,93). Ovaj klaster se može smatrati klasterom nepolarnih rastvarača.



**Slika 30.** Dendrogram ispitivanja antioksidativne aktivnosti (ABTS, DPPH, ukupna redukciona moć, ukupni flavonoidi i ukupni fenoli) etarskog ulja i ekstrakata različite polarnosti vegetativnih delova (list, cvet, plod i koren) biljke *S. pallasii*

U potklasteru drugog klastera su se izdvojili ekstrakti najpolarnijeg rastvarača, metanola i etil-acetata, odnosno, List etil-acetat i Plod metanol (Euklidovo rastojanje=0,60), dok su se metanolni ekstrakti cveta i lista grupisali u okviru drugog potklastera. Ovo je klaster polarnih rastvarača.

Etarska ulja svih delova *S. pallasii* izdvojila su se po antioksidativnim karakteristikama u zasebnom, trećem klasteru. Najveća sličnost na osnovu Eklidovog rastojanja (0,50) je između varijabli Etarsko ulje koren i Etarsko ulje cvet. Ovo je klaster etarskih ulja.

Između rezulta dobijenih PCA i HCA analizom postoji veliko slaganje. Obe metode multivarijantne statistike izdvajaju ispitivane rastvore prema vrsti rastvora (ulja i ekstrakti), i prema vrsti korišćenih rastvarača u postupku pripreme ekstrakata. I PCA i HCA metoda omogućavaju izdvajanje etarskih ulja, ekstrakata pripremljenih polarnim i ekstrakata pripremljenih korišćenjem neoplarnih rastvarača u tri grupacije.

#### 4.8 Antimikrobna aktivnost *S. rigidum* i *S. pallasii*

Antimikrobna aktivnost etarskih ulja i ekstrakata različite polarnosti *S. rigidum* i *S. pallasii* (koren, list, cvet i plod) testirani su na sojeve bakterija *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Bacillus cereus* ATCC 10876 i sojeve gljivica *Candida albicans* ATCC 16404 i *Aspergillus niger* ATCC 10231, a rezultati su prikazani u Tabeli 21. i 22. Antimikrobna aktivnost testiranih uzoraka je procenjena koristeći minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) i minimalne biocidalne koncentracije (MBC). Ekstrakti korena pokazuju kako inhibitornu (MIC=0,01-0,66 mg/mL) tako i biocidalnu (MBC=0,02-0,96 mg/mL) aktivnost. Iako je etil-acetatni ekstrakt korena generalno pokazao najbolju aktivnost prema testiranim mikroorganizmima, izuzetno visoku aktivnost pokazuje acetonski ekstrakt ploda na soj *E. coli*. Ekstrakti lista imaju MIC=0,05-1,50 mg/mL i MBC=0,20-3,00 mg/mL na sve testirane mikroorganizame. Heksanski ekstrakt lista pokazuje najbolju aktivnost na *P. aeruginosa* (MIC/MBC=0,05/0,41 mg/mL). Za ekstrakte cveta određene su MIC=0,01-0,86 mg/mL i MBC=0,06-2,40 mg/mL. Heksanski ekstrakt cveta pokazuje najveću aktivnost prema soju *A. niger* (MIC/MBC=0,03/0,06 mg/mL). Aktivne koncentracije ekstrakta ploda su MIC=0,01-0,70 mg/mL i MBC=0,06-1,40 mg/mL. Heksanski ekstrakt ploda je najefikasniji protiv *P. aeruginosa* (MIC/MBC=0,03/0,25 mg/mL) i oba testirana soja gljivica. Generalno govoreći, ekstrakti korena pokazuju najbolju antimikrobnu aktivnost, dok ekstrakti lista najnižu. Konkretno, vrednosti za aktivnost etil-acetatnog ekstrakta korena su MIC=0,04-0,14 mg/mL i MBC=0,07-0,29 mg/mL. Što se tiče antimikrobnog potencijala, najbolji rastvarač za ekstrakciju aktivnih antimikrobnih jedinjenja iz lista i korena je heksan, dok je etil-acetat najbolji za ekstrakciju cveta i korena.

Etarska ulja svih delova biljke *S. rigidum* pokazuju aktivnost na sve ispitivane sojeve u rasponu od 0,01-2,28 mg/mL. Najbolju antimikrobnu aktivnost na sojeve Gram (+) i Gram (-) bakterija pokazuje etarsko ulje korena biljke *S. rigidum*.



**Table 21.** Antimikrobna aktivnost ekstrakata različite polarnosti i etarskog ulja *S. rigidum* (koren, list, cvet i plod) prema različitim sojevima bakterija i gljivica. Rezultati su predstavljeni kao mg/mL uzorka potrebnih za postizanje MIC/MBC

Uzorci		Gram (-) bakterija		Gram (+) bakterija		Gljivica		
Deo biljke	Rastvarač	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Aspergillus niger</i>	
		ATCC 25922 (MIC/MBC) mg /mL	ATCC 27853 (MIC/MBC) mg /mL	ATCC 6538 (MIC/MBC) mg /mL	ATCC 10876 (MIC/MBC) mg /mL	ATCC 16404 (MIC/MBC) mg /mL	ATCC 10231 (MIC/MBC) mg /mL	
Ekstrakti	List	heksan	0,10/>0,41	0,05/0,41	0,20/0,40	0,20/0,40	0,20/0,40	0,20/0,40
		etar	0,20/>0,79	0,10/0,79	0,40/>0,79	0,10/0,20	0,10/0,20	0,10/0,20
		etil-acetat	0,22/0,88	0,22/0,44	0,88/1,76	0,11/0,44	0,11/0,22	0,22/0,44
		acetan	0,43/0,86	0,22/0,22	0,86/1,72	0,86/1,72	0,22/0,44	0,22/0,44
		metanol	0,38/3,00	0,19/0,38	0,09/3,00	0,38/3,00	0,75/1,50	1,50/3,00
	Cvet	heksan	0,25/0,50	0,03/0,25	0,13/0,25	0,13/0,25	0,06/0,06	0,03/0,0
		etar	0,15/0,59	0,07/0,59	0,29/>0,59	0,59/0,59	0,03/0,07	0,15/0,29
		etil-acetat	0,29/0,58	0,01/0,13	0,06/0,06	0,25/0,25	0,04/0,04	0,25/0,50
		acetan	0,43/0,86	0,22/0,22	0,86/1,72	0,86/1,72	0,22/0,44	0,22/0,44
		metanol	0,30/2,40	0,15/2,40	0,13/0,27	0,15/1,20	0,06/0,12	0,30/0,60
	Plod	heksan	0,25/0,50	0,03/0,25	0,13/0,25	0,13/0,25	0,06/0,06	0,03/0,06
		etar	0,70/1,40	0,70/>1,40	0,17/0,35	0,70/1,40	0,17/0,35	0,36/0,36
		etil-acetat	0,29/0,58	0,07/0,15	0,15/0,29	0,46/1,16	0,07/0,07	0,02/0,15
		acetan	0,20/0,40	0,01/0,40	0,10/0,40	0,20/0,40	0,05/0,05	0,05/0,10
		metanol	0,20/0,40	0,10/0,20	0,01/0,20	0,20/0,40	0,03/0,50	0,05/0,10
	Koren	heksan	0,10/0,40	0,03/0,20	0,10/0,20	0,05/0,10	0,12/0,25	0,01/0,02
		etar	0,26/>0,52	0,13/0,26	0,07/0,52	0,26/0,52	0,03/0,07	0,26/0,52
		etil-acetat	0,07/0,14	0,04/0,14	0,14/0,29	0,04/0,07	0,04/0,07	0,07/0,29
		acetan	0,33/0,67	0,02/0,08	0,17/0,33	0,66/0,33	0,04/0,04	0,05/0,10
		metanol	0,48/0,96	0,24/0,48	0,03/0,06	0,24/0,48	0,06/0,12	0,03/0,06
Etarska ulja	List	-	0,08/0,32	0,05/0,16	0,10/0,20	0,07/0,10	0,07/0,12	
	Cvet	-	0,10/0,40	0,02/0,10	0,05/0,08	0,08/0,12	0,02/0,04	
	Plod	-	0,12/1,60	0,12/3,24	0,03/0,03	0,12/0,24	3,24/3,24	
	Koren	-	0,07/0,14	0,02/0,08	0,02/0,05	0,03/0,05	0,02/0,06	
Tetraciklin		2,00/4,00	2,00/4,00	0,70/1,40	1,80/1,80	/	/	
Nstatin		/	/	/	/	8,00/8,00	12,0/12,00	

Ispoljena antimikrobna aktivnost se može smatrati dobrom u odnosu na efekte referentnih antibiotika (tetraciklin je aktivan na sojeve bakterija u rasponu od 0,7-4,0 mg/mL, dok nistatin ispoljava aktivnost na sojeve gljivica u opsegu od 0-12,0 mg/mL).

Takođe je utvrđena ista minimalna inhibitorna i minimalna biocidalna koncentracija etarskog ulja na soj *S. aureus* (0,01 mg/mL), dok su za ostale ispitivane sojeve inhibitorne

koncentracije veće (0,04 mg/mL), kao i minimalne biocidalne koncentracije, u rasponu od 0,07-1,13 mg/mL.

Već je poznato da etarsko ulje cveta *S. rigidum*, koje sadrži veliku količinu  $\alpha$ -pinena (48,5 %) poseduju dobru antimikrobnu aktivnost (Stojković i sar. 2009). To je i očekivani imajući u vidu da je  $\alpha$ -pinen prethodno identifikovan kao antimikrobni agens (Sivropoulou i sar., 1995).

Etarska ulja ploda i korena *S. rigidum* sadrže (0,2 % i 14,3 %) (*Z*)-falkarinola, koji je identifikovan u ulju ploda (3,0 %) i ulju korena (88,8 %) istih biljnih vrsta prikupljenih u zapadnoj Srbiji (Marčetić i sar., 2012). Ovo jedinjenje je dobro poznat antimikrobni agens (Dorman i Deans 2000; Kobaisy i sar. 1997; Christensen i Brandt 2006), pa se može smatrati odgovornim za visoku aktivnost etarskog ulja korena na Gram (+) sojeve, posebno na *S. aureus* (u rasponu od 6,25-50,00 mg/mL) (Marčetić i sar., 2012). Ovako dobra aktivnost ispitivanih ulja može se objasniti visokim sadržajem i povoljnim odnosom dve dominantne komponente  $\alpha$ -pinena (35,0 %) i sabinena (18,5 %).

Boljoj aktivnosti ispitivanih etarskih ulja u odnosu na etarska ulja sa područja Brčanske klisure u zapadnoj Srbiji (Marčetić i sar., 2012), može doprineti prisustvo većeg broja komponenti prisutnih u malim količinama, što je izazvalo mogući sinergistički efekat (Burt 2004). Sinergizam je detektovan kod jedinjenja koja primenjena samostalno nisu aktivna. Poznato je da *p*-cimen, kao hidrofilni prekursor karvakrola uzrokuje širenje citoplazmatske membrane nakon što se ugradi u nju. Takođe  $\gamma$ -terpinen ima tendenciju da se inkorporira u citoplazmu membrane mikroba i time omogući prolaz za druga aktivna jedinjenja (Ultee i sar., 2002).

Od svih jedinjenja identifikovanih LC-MS tehnikom, koja su prisutna u analiziranim ekstraktima, agasilin, imperatorin, psoralin, acetilumeliferon, bergapten, meranzin hidrat, peucedanol i ulopterol su ranije testirani kao antimikrobni agensi. Agasilin, koji je izolovan kao čista komponenta, pokazao je aktivnost na više sojeva bakterija, uključujući *S. aureus* (MIC=32  $\mu$ g/mL) i *P. aeruginosa* (MIC=64  $\mu$ g/mL) (Dincel i sar., 2013), dok meranzin hidrat delovao na *S. aureus*, *B. subtilis* i *E. coli* (Mokbel i Suganuma 2006). Na različite sojeve bakterija i gljivica, imperatorin je aktivan u koncentraciji od MIC= 32-128  $\mu$ g/mL, dok je ulopterol u koncentraciji od 15625-250  $\mu$ g/mL (Rosselli i sar., 2007). Rezultati prethodnih ispitivanja pokazuju da identifikovana jedinjenja prisutna u heksanskom ekstraktu, a i gotovo sva jedinjenja u etil-acetatnom ekstraktu, daju najbolje objašnjenje veoma dobre antimikrobne aktivnosti ova dva

ekstrakta. Etarska ulja korena i ploda vrste *S. pallasii* pokazuju izuzetno antimikrobno dejstvo na sve testirane Gram (+) i Gram (-) bakterije. Najbolji aktivnost ispoljava ulje korena, na soj bakterije *B. cereus* (MIC=21,9 µg/mL, MBC=87,8 µg/mL), dok je najjači efekat ulja ploda na soj *S. aureus* (MIC=27,1 µg/mL, MBC=54,2 µg/mL). Gram (-) bakterija, *E. coli*, je manje osetljiva od *P. aeruginosa* na delovanje etarskih ulja korena i lista, dok su jednako osetljive na ulje ploda i cveta. *B. cereus*, Gram (+) bakterija, osetljivija je na dejstvo etarskog ulja korena, dok je na etarsko ulje ploda najmanje osetljiva. Etarsko ulje cveta pokazuje najbolju aktivnost na sojeve gljivica *C. albicans* i *A. niger* (MIC/MBC=69,1/138,2 µg/mL i 138,2/276,4 µg/mL).

**Table 22.** Antimikrobna aktivnost etarskih ulja različitih delova biljke *S. pallasii* i referentnih antibiotika. Rezultati su predstavljeni kao µg/mL uzorka potrebnih za postizanje MIC/MBC

	Gram (-) bakterije		Gram (+) bakterije		Gljivice		
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Aspergillus niger</i>	
	ATCC 25922 (MIC/MBC) µg/mL	ATCC 27853 (MIC/MBC) µg/mL	ATCC 6538 (MIC/MBC) µg/mL	ATCC 10876 (MIC/MBC) µg/mL	ATCC 16404 (MIC/MBC) µg/mL	ATCC 10231 (MIC/MBC) µg/mL	
Etarska ulja	List	83,2/166,4	104,0/166,4	104,0/208	104,0/208	416,0/644,8	416,0/582,4
	Cvet	138,3/138,3	138,3/276,4	34,6/69,1	69,1/276,4	69,1/138,2	138,2/276,4
	Plod	54,2/216,8	54,2/108,4	27,1/54,2	54,2/216,8	216,8/433,6	216,8/433,6
	Koren	43,9/175,6	35,1/70,2	57,0/228,3	21,9/87,8	87,8/263,4	175,6/245,8
Tetraciklin	2,0/4,0	2,0/4,0	0,7/1,4	1,8/1,8	-	-	
Nistatin	-	-	-	-	8,0/8,0	12,0/12,0	

Ovi rezultati bi se mogu dovesti u vezu sa glavnim komponentama etarskih ulja vegetativnih delova biljaka *Seseli pallasii*. Glavna komponenta etarskog ulja ploda,  $\alpha$ -pinen (84,7 %) pokazuje jako antibakterijsko dejstva na nekoliko mikroorganizama (*Dorman i Deans 2000; Soković i van Griensven 2006; Bakkali i sar., 2008*).

Pored toga, komponente prisutne u manjim količinama, kao što su limonen, kamfen,  $\delta$ -karen,  $\beta$ -pinen i *p*-cimen, takođe mogu doprineti antimikrobnim aktivnostima etarskih ulja biljaka, npr. sinergizmom sa drugim aktivnim komponentama (*Burt 2004*). Takođe je dokazano da tip alkil grupe utiče na aktivnost, favorizujući alkenil nad alkil grupom, čime se može dodatno objasniti veća aktivnost limonena od *p*-cimena (*Ultee i sar., 2012*). S druge strane, prisustvo hidroksilnih grupa u jedinjenju utiče na povećanu antimikrobnu aktivnost (*Knobloch i sar., 1986; Dorman i Deans 2000; Ultee i sar., 2002*). To pokazuje da je aktivnost hidroksil derivata,

identifikovanih u etarskom ulju lista neutralisana pa čak i premašena alkil i alkenil derivatima, koji su pretežno zastupljeni u ulju ploda i korena, što je i rezultovalo boljim antimikrobnim svojstvima ova dva etarska ulja. Mogući mehanizam delovanja je ili akumulacija molekula lipofilnih ugljovodonika u ćelijskom lipidnom dvosloju, čime se narušava interakcija lipid-protein, ili direktna interakcija sa hidrofobnim proteinskim delovima (*Juven i sar.*, 1994; *Sikkema i sar.*, 1995), što omogućava ostalim komponentama etarskog ulja lakši transfer do unutrašnjosti ćelije. S obzirom na veliki broj nepolarnih ugljovodonika u etarskom ulju korena, prethodno razmatrani mehanizmi se mogu primeniti za objašnjenja snažnog delovanja etarskog ulja korena na testirane sojeve bakterija. Ova studija pokazuje da etarska ulja *S. pallasii* pokazuju znatnu antimikrobnu aktivnost i imaju potencijalnu primenu u različitim oblastima, prehrambenoj industriji, u medicinske i farmaceutske svrhe.

Za razliku od etarskih ulja ekstrakti korena, lista, cveta i ploda, različite polarnosti (heksanski, etarski, etil-acetatni, acetonski i metanolni) nisu pokazali aktivnost ni na jednom testiranom soju.

Na osnovu prethodnih istraživanja (*Matejić 2013*) etarsko ulje nadzemnog dela biljke *S. pallasii* pokazuje najbolju aktivnost na soj *B. cereus* (MIC/MBC=1,56/3,13 mg/mL). Antimikrobna aktivnost ekstrakata nadzemnog dela *S. pallasii* je generalno slabija u odnosu na još dve ispitivane vrste roda *Seseli*, *S. libanotis* subsp. *libanotis* i *S. libanotis* subsp. *intermedium*. Većina ekstrakata nije imala baktericidno delovanje ni u najvišoj testiranoj koncentraciji. Acetonski ekstrakt *S. pallasii* je pokazao najbolju aktivnost na bakterijsku vrstu *B. cereus* MIC/MBC=1,56/12,5 mg/mL.

#### **4.9 Antiholinesterazna aktivnost *S. rigidum* i *S. pallasii***

Studija delovanja ekstrakata različite polarnosti i etarskih ulja biljaka *S. rigidum* i *S. pallasii* na butiril holinesterazu iz pulovanog humanog seruma i butiril holinesterazu, koja je izolovana iz konjskog seruma prikazana je u Tabelama 23. i 24. Kao referentni standard korišćen je neostigmin bromid. Rezultati su izračunati kao:

$$\text{Procenat inhibicije/aktivacije} = ((A_x - A_0) / A_0) * 100$$

gde je:

$A_x$ - aktivnost enzima u prisustvu uzorka (etarsko ulje ili ekstrakt),

A<sub>0</sub>-aktivnost enzima u odsustvu uzorka, sa odgovarajućim rastvaračem kao slepom probom.

**Table 23.** Aktivnost butiril holinesteraze iz humanog i konjskog seruma sa ekstraktima različite polarnosti i etarskim uljima *S. rigidum* prikazana je kao procenat inhibicije/aktivacije±standardna devijacija

Uzorci	Deo biljke	Rastvarač	Inhibicija (-) i aktivacija (+) BuChE iz humanog seruma (%)	Inhibicija (-) i aktivacija (+) BuChE iz konjskog seruma (%)
Ekstrakti	Koren	heksan	-40,56±0,95	-50,65±0,61
		etar	8,99±0,11	8,65±0,11
		etil-acetat	-28,07±0,45	-34,16±0,58
		aceton	9,64±0,03	-1,06±0,01
		metanol	-13,65±0,87	-13,29±0,46
	List	heksan	-28,07±0,21	-37,19±0,42
		etar	7,39±0,09	5,37±0,08
		etil-acetat	-26,55±0,38	-29,98±0,56
		aceton	10,84±0,12	-1,01±0,01
		metanol	-7,63±0,06	-2,97±0,03
	Cvet	heksan	-25,30±0,31	-34,26±0,46
		etar	6,24±0,08	5,39±0,08
		etil-acetat	-24,49±0,29	-35,01±0,29
		aceton	14,69±0,13	13,84±0,16
		metanol	-3,61±0,08	-8,02±0,12
	Plod	heksan	-26,02±0,38	-37,06±0,45
		etar	6,26±0,06	5,15±0,07
		etil-acetat	-16,32±0,19	-27,35±0,31
		aceton	2,89±0,05	2,75±0,05
		metanol	-3,56±0,08	-4,15±0,06
Etarska ulja	Koren	-	-38,20±0,67	-48,30±0,53
	List	-	-25,09±0,24	-34,02±0,43
	Cvet	-	-30,21±0,47	-40,78±0,57
	Plod	-	-34,90±0,45	-41,78±0,61
Referentni standard	Neostigmin bromid		-78,56±0,77	-98,10±0,83

\*neostigmin bromid početne koncentracije 200 mg/mL

Etarska ulja svih delova biljne vrste *S. rigidum* pokazuju inhibiciju holinesteraze iz pulovanog humanog i konjskog seruma. Vrednosti inhibicije etarskih ulja, dobijenih iz svih delova biljaka, su bile u relativno uskom rasponu (od 25,09-38,2 % za BuChE iz pulovanog humanog seruma i 34,02-48,3 % za BuChE iz konjskog seruma). Najveći procenat inhibicije pokazuje etarsko ulje korena (38,2 % i 48,3 % u odnosu BuChE iz pulovanog humanog seruma i konjskog seruma), verovatno zbog prisustva terpinen-4-ola, kao jedne od dominantnih komponenti (Mills i sar., 2004; Bonesi i sar., 2010), dok su sva ostala testirana etarska ulja pokazala nešto niži, ali takođe značajan procenat inhibicije, najverovatnije zato što je

najzastupljenija komponenta  $\alpha$ -pinen, koji je takođe poznat inhibitor holinesteraze (Mercier i sar., 2009).

Što se tiče ekstrakata različite polarnosti, heksanski ekstrakti svih delova biljaka su se izdvojili kao najmoćnijih inhibitori kako BuChE iz pulovanog humanog seruma tako i BuChE konjskog seruma. Maksimalnu inhibiciju pokazuje heksanski ekstrakt korena (40,56 i 50,65 % na BuChE iz pulovanog humanog seruma i BuChE konjskog seruma), dok minimalnu inhibiciju pokazuje heksanski ekstrakt cveta (25,30 i 34,26 % na BuChE iz pulovanog humanog seruma i BuChE konjskog seruma).

Etil-acetatni ekstrakti svih delova biljaka su se pokazali kao slabiji inhibitori u odnosu na heksanske ekstrakate, a najjači među njima je opet bio ekstrakt korena (28,07 i 34,16 % BuChE iz pulovanog humanog seruma i BuChE konjskog seruma), dok je najslabiji bio ekstrakt ploda (16,32 i 27,35 % BuChE iz pulovanog humanog seruma i BuChE konjskog seruma).

Metanolni ekstrakti pokazuju najslabiju inhibiciju oba enzima. Najslabiju inhibiciju pokazuje metanolni ekstrakt korena (13,65 i 13,29 % BuChE iz pulovanog humanog seruma i BuChE konjskog seruma), a slede ekstrakt ploda BuChE iz pulovanog humanog seruma (3,56 %) i ekstrakta lista BuChE od konjskog seruma (2,97 %). Etarski i acetonski ekstrakti pokazuju blagu aktivaciju oba ispitivana enzima, ali ona ne prelazi 15 % .

Niži procenat inhibicije pokazuju svi ekstrakti prema BuChE iz pulovanog humanog seruma nego prema BuChE konjskog seruma. Iz BuChE pulovanog humanog serumuma, enzim nije izolovan, i verovatno je došlo do vezivanja pojedinih komponenata ekstrakta za komponente humanog seruma, dok je u drugom slučaju korišćen čist enzim izolovan iz konjskog seruma, i ne postoji mogućnost vezivanja aktivnih jedinjenja za druge komponente.

Prethodnim istraživanjima je pokazano da su inhibitori BuChE- furanokumarin psoralen, bergapten, apterin (Dincel i sar., 2013) i imperatorin (Gonzalez i sar., 1979) čije je prisustvo detektovano u heksanskom ekstraktu *S. rigidum*. Naime ovi kumarini izolovani u obliku čistog jedinjenja u koncentraciji od 200  $\mu\text{g/mL}$ , pokazuju inhibiciju BuChE u procentu od 36,75; 65,01; 89,92 i 83,98 %. Vrednosti inhibicije dobijene u ovom radu su niže, verovatno zbog nižih koncentracija u ispitivanim ekstraktima, kao zbog eventualnih antagonističkih interakcija sa drugim komponentama prisutnim u ekstraktima.

**Table 24.** Aktivnost butiril holinesteraze iz humanog i konjskog seruma sa ekstraktima različite polarnosti i etarskim uljima *S. pallasii* prikazana je kao procenat inhibicije/aktivacije±standardna devijacija

Uzorci	Deo biljke	Rastvarač	Inhibicija (-) i aktivacija (+) BuChE iz humanog seruma (%)	Inhibicija (-) i aktivacija (+) BuChE iz konjskog seruma (%)
Ekstrakti	Koren	heksan	-21,74±0,16	-25,86±0,21
		etil-acetat	-17,34±0,14	-20,28±0,19
		metanol	-46,42±1,05	-53,12±0,54
	List	heksan	8,31±0,08	-10,23±0,15
		etil-acetat	15,31±0,11	-19,35±0,17
		metanol	-24,10±0,18	-30,43±0,24
	Cvet	heksan	-22,21±0,28	-28,95±0,34
		etil-acetat	-20,55±0,32	-25,12±0,20
		metanol	-5,34±0,06	-7,96±0,09
	Plod	heksan	-15,60±0,10	-25,65±0,32
		etil-acetat	-23,28±0,17	-30,92±0,48
		metanol	29,41±0,16	-33,24±0,18
Etarska ulja	Koren	-	-29,71±0,48	-39,50±0,48
	List	-	-18,82±0,26	-26,25±0,25
	Cvet	-	-13,82±0,05	-24,05±0,33
	Plod	-	-21,47±0,24	-29,97±0,54
Referentni standard	Neostigmin bromid		-96,60±0,25	-97,52±0,90

\*neostigmin bromid početne koncentracije 200 mg/mL

Etarska ulja svih delova *S. pallasii* pokazuju inhibiciju holinesteraze iz pulovanog humanog seruma i BuChE iz konjskog seruma. Vrednosti inhibicije svih ispitivanih etarskih ulja, su bile u rasponu od 13,82-29,71 % za BuChE iz pulovanog humanog seruma i od 24,05-39,50 % za BuChE iz konjskog seruma. Najveći procenat inhibicije pokazuje etarsko ulje korena (29,71 % i 39,50 % u odnosu BuChE iz pulovanog humanog seruma i konjskog seruma). (*Z*)- $\beta$ -ocimen je jedna od dominantnih komponenti u etarskom ulju korena (34,5 %) i verovatno odgovorna za inhibiciju holinesteraze (*El-Hela* i *Abdullah* 2010). Sva ostala testirana etarska ulja su pokazala nešto manji, ali takođe značajan procenat inhibicije, jer je najzastupljenija komponenta  $\alpha$ -pinen, od ranije poznat inhibitor holinesteraze (*Mercier* i sar., 2009).

Metanolni ekstrakti korena, lista i ploda su se izdvojili kao najpotentiji inhibitori kako BuChE iz pulovanog humanog seruma tako i BuChE konjskog seruma. Maksimalnu inhibiciju pokazuje metanolni ekstrakt korena (46,42 i 53,12 % na BuChE iz pulovanog humanog seruma i BuChE konjskog seruma), dok minimalnu inhibiciju pokazuje metanolni ekstrakt cveta (5,34 i 7,96 % na BuChE iz pulovanog humanog seruma i BuChE konjskog seruma).

Etil-acetatni ekstrakti svih delova biljaka su se pokazali kao slabiji inhibitori u odnosu na metanolne ekstrakate. Najslabiju inhibiciju pokazuje etil-acetatni ekstrakt lista (15,31 i 19,35 % BuChE iz pulovanog humanog seruma i BuChE konjskog seruma), a najjaču etil-acetatni ekstrakt ploda (23,28 i 30,92 % BuChE iz pulovanog humanog seruma i BuChE konjskog seruma).

Heksanski ekstrakti pokazuju najslabiju inhibiciju oba enzima. Najjači inhibitor među njima je bio ekstrakt cveta (22,21 i 28,95 % BuChE iz pulovanog humanog seruma i BuChE konjskog seruma), dok je najslabiji bio ekstrakt lista (8,31 i 10,23 % BuChE iz pulovanog humanog seruma tako i BuChE konjskog seruma).

Niti procenat inhibicije pokazuju svi ekstrakti prema BuChE iz pulovanog humanog seruma nego prema BuChE konjskog seruma.

#### **4.10 Mineralni sastav *S. rigidum* i *S. pallasii***

Mnogi faktori utiču na rast biljaka: salinitet, alkalitet, deficit kišnice, insekti i štetočine, bolesti i toksični elementi, a posebno teški metali. Pojedini metali su sastavni deo biljaka i od velikog su značaja za njihov rast, ali povećanje koncentracije tih metala iznad optimalnog nivoa, štetno deluje na samu biljku. Kao i druga čiva bića, biljke su veoma osetljive na nedostatak, ali i povećanu koncentraciju nekih teških metala koji se nalaze u tragovima.

Sadržaj teških metala u lekovitim biljkama je različit. Usvajanje teških metala uslovljeno je delovanjem više faktora koji uključuju vrstu same biljke, karakteristike zemljišta, klimatske karakteristike i dr. Teški metali nisu prisutni u istoj količini u svim delovima biljke, najveća koncentracija metala je u korenu, a manja u ostalim vegetativnim tkivima.



#### 4.10.1 Mikroelementi

U Tabeli 25 prikazan je sadržaj Al, B, Ba, Co, Cu, Fe, Mn, V i Zn (ppm) u listu, cvetu, plodu i korenu *S. rigidum*.

**Tabela 25.** Sadržaj mikroelemenata u listu, cvetu, plodu i korenu *S. rigidum*.

Uzorak Element	List (ppm)	Cvet (ppm)	Plod (ppm)	Koren (ppm)
Al	5,409±0,229	4,244±0,070	5,990±0,122	19,978±0,102
B	11,129±0,157	12,439±0,132	13,090±0,073	8,162±0,019
Ba	1,572±0,094	1,269±0,006	0,962±0,034	4,853±0,026
Co	1,640±0,023	1,922±0,049	1,729±0,022	5,546±0,005
Cu	3,993±0,090	5,994±0,067	6,533±0,022	10,983±0,025
Fe	2,304±0,130	2,428±0,014	2,681±0,045	9,519±0,074
Mn	8,246±0,290	5,084±0,052	6,670±0,204	2,728±0,016
V	1,544±0,024	1,565±0,010	1,489±0,019	1,576±0,001
Zn	23,407±0,247	10,260±0,084	22,525±0,194	37,158±0,324

U Tabeli 26 prikazan je sadržaj Al, B, Ba, Co, Cu, Fe, Mn, V i Zn (ppm) u listu, cvetu, plodu i korenu *S. pallasii*

**Tabela 26.** Sadržaj mikroelemenata u listu, cvetu, plodu i korenu *S. pallasii*

Uzorak Element	List (ppm)	Cvet (ppm)	Plod (ppm)	Koren (ppm)
Al	2,644±0,058	8,365±0,325	2,752±0,121	21,181±0,845
B	6,579±0,158	22,024±0,458	12,063±0,584	6,675±0,098
Ba	2,207±0,044	1,717±0,015	0,594±0,012	0,473±0,012
Co	2,650±0,039	3,333±0,075	4,028±0,124	7,136±0,216
Cu	1,833±0,018	7,641±0,217	6,598±0,274	3,337±0,087
Fe	2,167±0,064	5,939±0,124	3,972±0,146	8,826±0,135
Mn	8,233±0,241	7,730±0,318	6,048±0,264	4,101±0,022
V	1,523±0,013	1,629±0,124	1,613±0,035	1,677±0,014
Zn	30,295±1,252	35,247±1,325	31,933±1,125	17,799±0,228

#### Aluminijum

Koncentracija aluminijuma u plodu, cvetu, listu i korenu *S. rigidum* je u rasponu od 4,244-19,978 ppm. Najveći sadržaj aluminijuma određen je u korenu, dok je najmanji u cvetu. Sadržaj aluminijuma u vegetativnim delovima *S. pallasii* je bio u intervalu 2,752-21,181 ppm. Najveća količina aluminijuma određena je u korenu (21,181ppm), dok je koncentracija ovog metala u listu i plodu približno ista (2,644 i 2,572 ppm).

Najveći sadržaj aluminijuma, određen je u korenu obe analizirane biljne vrste, dok se u nadzemnim delovima nalazi u znatno manjoj koncentraciji.

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da biljka apsorbuje aluminijum najviše u korenu. Međutim, u nadzemnim delovima *S. rigidum* određena je približno ista koncentracija aluminijuma, dok je u cvetu *S. pallasii* određeno je tri puta više aluminijuma u odnosu sadržaj tog metala u listu i plodu.

U listu i cvetu *Hypericum perforatum* sa teritorije Turske (Gomez i sar., 2000), određen je sadržaj teških metala. Slična istraživanja radili su Lopez i sar., (2000) sa 72 uzoraka 17 različitih vrsta aromatičnih biljaka koje rastu na teritoriji Španije. Određena količina aluminijuma (Gomez i sar., 2000), uporediva je sa koncentracijom tog metala u *S. pallasii* i *S. rigidum*.

Opseg koncentracija aluminijuma u lekovitim biljkama sa teritorije Srbije (Ražić i sar., 2005; Mihaljev i sar., 2014) je nešto viši nego u analiziranim biljkama roda *Seseli*. Visok sadržaj aluminijuma određen je u uzorcima čajeva iz Turske (Altıntig i sar., 2014) i Španije (Fernandez-Caceres i sar., 2001).

## **Bor**

Najmanja koncentracija bora određena je u korenu *S. rigidum* (8,162 ppm), dok je približno ista koncentracija određena u nadzemnim delovima biljke. Najveća koncentracija bora (13,090 ppm) određena je u plodu te biljke.

Koncentracija bora u analiziranim delovima *S. pallasii* se kretala u rasponu od 6,576-22,024 ppm. Najveća koncentracija bora određena je u cvetu 22,024 ppm, dok je u plodu iznosila 12,063 ppm. Približno ista koncentracija bora određena je u korenu i listu.

Poređenjem srednjih koncentracija sadržaja bora u obe biljne vrste određena je nešto veća koncentracija ovog metala u *S. pallasii*.

Dobijeni rezultati pokazuju da je bor mobilan u biljci i da se akumulira u reproduktivnim delovima.

Koncentracija bora koja je određivana u 26 vrsta lekovitih biljnih vrsta na teritoriji Srbije (Ražić i sar., 2005), kretala se od 5,1-118,7 ppm (*Althea officinalis* L. i *Artostaphylos uva-ursi* L.). Koncentracija bora u analiziranim biljkama iz roda *Seseli* je u ovom opsegu.

## **Barijum**

Najveća koncentracija barijuma određena je u korenu *S. rigidum* (4,85 ppm), dok je najmanja u plodu, 0,962 ppm. Određena koncentracija barijuma kreće se od 0,473 ppm u korenu, do 2,207 ppm u listu *S. pallasii*. Prosečna koncentracija barijuma u *S. pallasii* je duplo niža nego u *S. rigidum*. Dobijeni rezultati se razlikuju u pogledu najvećeg sadržaja barijuma u podzemnom i nadzemnom delu biljaka.

Sadržaj barijuma u biljkama roda *Seseli* je u nižem opsegu koncentracije nego u prethodnim istraživanjima lekovitog bilja sa teritorije Srbije (Ražić i sar., 2005), Turske (Altıntig i sar., 2014), Španije (Fernandez-Caceres i sar., 2001), Afrike i Azije (Moreda-Pineiroa i sar., 2003), kao i u listu *Mentha piperitae* iz Poljske (Lozak i sar. 2002).

## **Kobalt, bakar i gvožđe**

Kobalt, bakar i gvožđe su važni biogeni elementi odgovorni za rast i razvoj biljke. Najveća koncentracija ovih elemenata određena je u korenu *S. rigidum* (5,546; 10,983 i 9,519 ppm), dok se najmanja koncentracija nalazi u listu (1,640; 3,993 i 2,304 ppm).

Kobalt je u najvećoj količini određen u korenu *S. pallasii* (7,136 ppm), dok se količina u ostalim delovima biljke kretala od 2,650 ppm u listu do 4,028 ppm u plodu.

Prosečna koncentracija kobalta u *S. pallasii* je niža nego u *S. rigidum*, ali je najveća koncentracija kobalta u obe biljne vrste određena u korenu, a najmanja u listu.

Koncentracije kobalta u biljkama *S. pallasii* i *S. rigidum* su iznad normalnih koncentracija (0,05-0,5 ppm) (Stanojković-Sebić i sar., 2015), ali njegova koncentracija ne ulazi u opseg koncentracija kritičnih po biljku (30-40 ppm).

Po Kabata Pendias i Pendias (2001) najviša dozvoljena količina kobalta u biljkama treba biti manja od 0,1 ppm. Međutim, u mnogim istraživanjima pokazano je da je sadržaj kobalta povišen (Lozak i sar. 2002; Basgel i Erdemoglu 2006; Gomez i sar., 2007; Brudzinka-Kosior i sar., 2012; Mihaljev i sar., 2014), dok se sadržaj kobalta u 17 vrsta crnog čaja (4,5- 17,4 ppm) (Ashraf i Mian 2008) može porediti sa sadržajem kobalta u *S. pallasii* i *S. rigidum*.

Najveća količina Fe određena je u korenu *S. pallasii* 8,826 ppm dok je najniža koncentracija u listu 2,167 ppm. S obzirom da je gvožđe jedan od najzastupljenijih elemenata u Zemljinoj kori dobijeni rezultati potvrđuju da analizirane biljke u najvećoj količini usvajaju gvožđe putem korena.

Opseg normalnih koncentracija gvođĀa u biljkama je od 50-250 ppm, dok su koncentracije iznad 500 ppm toksiĀne (*Stanojković-Sebić i sar., 2015*). GvođĀe se u analiziranim biljnim vrstama nalazi u normalnim koncentracijama.

Koncentracija gvođĀa u *S. rigidum* sa silikatne podloge je veća nego u istoj biljci sa kreĀnjaĀke podloge, ali je u korenu obe biljke sa razliĀitih lokaliteta najveća koncentracija gvođĀa (570 i 340 ppm) u poreĀenju sa koncentracijom tog metala u drugim delovima biljke. Ukupna koncentracija gvođĀa u *S. rigidum* sa silikatne podloge je 740 ppm, a sa kreĀnjaĀke podloge 470 ppm (*Dudić i sar., 2007*) ŀto je znatno viŀe u poreĀenju sa *S. rigidum* iz istoĀne Srbije.

U mnogim lekovitim i aromatiĀnim biljkama, kao i u zelenom i crnom Āaju odreĀen je veći sadrđaj gvođĀa u poreĀenju sa ispitivanim vrstama roda *Seseli* (*Fernandez-Caceres i sar., 2001; Moreda-Pineiroa i sar., 2003; Rađić i sar., 2005; Basgel i Erdemoglu 2006; Gomez i sar., 2007; Tokalioglu 2012; Brudzinka-Kosior i sar., 2012; Rađić i Kuntić 2013; Altintig i sar., 2014; Mihaljev i sar., 2014*).

### **Bakar**

Najveća koliĀina bakra odreĀena je u reproduktivnim delovima biljke *S. pallasii*, i to u cvetu (7,641 ppm) i plodu (6,598 ppm), dok je u korenu i listu odreĀena znatno manja koliĀina (3,337 i 1,833 ppm), ŀto je u suprotnosti sa sadrđajem bakra u odgovarajućim delovima biljne vrste *S. rigidum*.

Normalne koncentracije bakra u biljnom materijalu su od 3-15 ppm, dok je toksiĀna koncentracija 20 ppm (*Stanojković-Sebić i sar., 2015*). Na osnovu dobijenih rezultata za *S. pallasii* i *S. rigidum* zakljuĀuje se da je sadrđaj bakra u normalnim koncentracijama, ŀto je u skladu sa prethodnim istrađivanjima lekovitih biljaka i Āajeva na sadrđaj ovog metala (*Lozak i sar. 2002; Basgel i Erdemoglu 2006; Tokalioglu 2012; Rađić i Kuntić 2013; Altintig i sar., 2014; Mihaljev i sar., 2014*).

### **Mangan**

Mangan je u najvećoj koncentraciji zatupljen u listu *S. rigidum* (8,246 ppm) kao i u ostalim nadzemnim delovima biljke, dok se u korenu nalazi u znatno manjoj koncentraciji (2,728 ppm).

Najveća količina mangana u *S. pallasii* određena je u listu (8,233 ppm), dok je gotovo duplo manja koncentracija određena u korenu (4,101 ppm).

Sadržaj mangana u vegetativnim i reproduktivnim delovima obe ispitivane biljne vrste ima približne vrednosti.

Normalnim koncentracijama mangana u biljkama se smatraju one u intervalu 15-100 ppm, dok su koncentracije preko 400 ppm toksične po biljku (*Stanojković-Sebić i sar.*, 2015). Koncentracije određene u analiziranim biljkama su u intervalu od 2,728 ppm u korenu *S. rigidum* do 8,233 ppm u listu *S. pallasii* odnosno 8,246 ppm u listu *S. rigidum*, što ih čini bezbednim za ljudsku upotrebu.

### **Vanadijum**

Pored fiziološkog značaja vanadijuma, eksperimentalni podaci ističu farmakološki značaj ovog elementa, naročito u prevenciji i lečenju šećerne bolesti. Ipak, vanadijum se smatra toksičnim metalom i u katjonskom i anjonskom obliku, iako u anjonskom obliku može imati ozbiljne neželjene efekte.

Vanadijum je u približno istoj koncentraciji zastupljen u svim delovima biljke *S. rigidum*, s tim što je najveći sadržaj određen u korenu (1,576 ppm), a najmanji u plodu (1,489 ppm). U svim delovima biljke *S. pallasii* koncentracija vanadijuma ima približne vrednosti i kreće se u opsegu od 1,523 ppm u listu do 1,677 ppm u korenu.

Sadržaj vanadijuma u obe ispitivane biljne vrste određen je u približno istim količinama. Biološka značaj vanadijuma koji se nalazi u tragovima je trostruki: nutritivni, farmakološki i toksikološki, shodno tome od velikog je značaja odrediti njegov sadržaj u lekovitom bilju.

U radu *Costea i sar.* (2013) prosečan sadržaj vanadijuma u lekovitim biljkama je 0,502 ppm. Najveći sadržaj određen je, u fazi cvetanja biljka, u listu 0,682 ppm, zatim u korenu 0,600 ppm, cvetu 0,352 ppm i plodu 0,112 ppm.

Koncentracija vanadijuma u podzemnim i nadzemnim delovima *S. rigidum* i *S. pallasii* je tri puta viša nego u lekovitom bilju sa teritorije Rumunije *Costea i sar.* (2013), neznatno viša od sadržaja u nadzemnom delu *Centauria erythraea* (*Brudzinka-Kosior i sar.*, 2012) i listu *Mentha piperitae* (*Lozak i sar.* 2002), a približnih vrednosti sa sadržajem u listu i cvetu *Hypericum perforatum* (od <0,01-2,23 ppm) (*Gomez i sar.*, 2007).

## Cink

Cink je esencijalni element koji ulazi u sastav mnogih enzima, posebno onih važnih za sintezu ribonukleinskih kiselina.

U poređenju sa ostalim posmatranim metalima u *S. pallasii* cink je zastupljen visokoj koncentraciji, odnosno u opsegu 35,247-17,799 ppm. Najmanja količina cinka određena je u korenu, dok je u ostalim delovima u približno istoj koncentraciji.

Kao i u slučaju *S. pallasii*, tako se i u *S. rigidum* cink nalazi u znatno višoj koncentraciji u odnosu na ostale posmatrane bioelemente, ali je njegova dostupnost iz podloge veća. Najveća koncentracija Zn određena je u korenu 37,158 ppm, a najmanja u cvetu 10,260 ppm.

Koncentracija cinka u korenu obe biljne vrste je približno ista, dok je u nadzemnim delovima niža (posebno u cvetu *S. rigidum*).

Koncentracija cinka u biljkama se nalazi u intervalu od 15-150 ppm, dok se koncentracije više od 200 ppm smatraju toksičnim (Stanojković-Sebić i sar., 2015). Sadržaj cinka u analiziranom biljnom materijalu je u normalnom opsegu koncentracija, uzimajući u obzir rezultate prethodnih istraživanja lekovitih biljaka i čajeva (Lozak i sar. 2002; Basgel i Erdemoglu 2006; Tokalioglu 2012; Altintig i sar., 2014). Cvet biljke *S. pallasii* u poređenju sa ostalim delovima te biljke sadrži najveće koncentracije gotovo svih određivanih elemenata, dok je u slučaju biljke *S. rigidum* situacija drugačija- najveće koncentracije određivanih metala zabeleđene su u korenu.

### 4.10.2 Makroelementi

U Tabeli 27. prikazan je sadržaj Ca, K, Mg i Na (ppm) u listu, cvetu, plodu i korenu *S. rigidum*, dok su podaci za *S. pallasii* prikazani u Tabeli 28.

**Tabela 27.** Sadržaj makroelemenata u listu, cvetu, plodu i korenu *S. rigidum*

Element	Uzorak	List (ppm)	Cvet (ppm)	Plod (ppm)	Koren (ppm)
Ca		942,679±22,590	646,700±8,257	740,533±19,233	467,776±0,460
K		1607,640±59,814	2249,459±26,279	2949,094±10,104	775,387±10,930
Mg		2284,741±26,030	1601,411±13,072	1876,898±0,829	958,897±0,150
Na		52,509±2,503	53,159±0,737	85,469±2,759	81,094±0,113

**Tabela 28.** Sadržaj makroelemenata u listu, cvetu, plodu i korenu *S. pallasii*

Element \ Uzorak	Plod (ppm)	List (ppm)	Koren (ppm)	Cvet (ppm)
Ca	707,086±5,234	840,809±7,124	460,414±3,576	1189,860±9,147
K	2279,258±18,156	677,857±4,125	895,230±6,547	2199,102±11,586
Mg	1687,427±14,157	2219,046±17,547	573,093±3,154	15975,981±50,254
Na	47,812±2,847	38,771±1,874	32,147±1,121	172,300±5,748

Na i K su od velikog značaja za regulaciju mnogih sistema u telu. Biljni čajevi, voće, povrće i kafa su dobri izvori K i Na.

Kalijum je jedan od najzastupljenijih elemenata u ljudskom telu, i igra važnu ulogu u mnogim metaboličkim procesima, pošto je glavni intracelularni katjon i ima ulogu u regulisanju membranskog potencijala i električne ekscitacije nervnih i mišićnih ćelija, sintezi aminokiselina i proteina.

Natrijum je najzastupljeniji katjon u plazmi i telesnim tečnostima. Doprinosi održavanju i regulaciji: osmotskog pritiska krvne plazme, električnog naelektrisanja ćelijske membrane, regulaciji kiselo-bazne ravnoteže i bilansa vode u organizmu. Natrijum nije značajan u pogledu razvoja biljaka, mada povoljno utiče na biohemijske procese i povećanje prinosa poljoprivrednih kultura (Nikolić i Dorđević 2009).

Magnezijum je interćelijski dvovalentni katjon, kofaktor je velikog broja enzimskih reakcija koje su važne za proizvodnju energije iz ATP i za fiziološke procese, uključujući neuromuskularnu funkciju i održavanje kardiovaskularnog tonusa (Rahmatollah i Mahbobeh 2010). Takođe učestvuje u metabolizmu proteina, ugljenih hidrata, nukleinskih i masnih kiselina. U ćelijama biljaka magnezijum ulazi u sastav hlorofila *a* i *b*.

Kalcijum je glavna komponenta kosti i zuba, utiče na ćelijske membrane i na mišiće, regulisanje endo, egzoenzima i krvnog pritiska a takođe ima ulogu u funkciji srca (Ozcan i Akbulut 2007).

Najveća količina kalcijuma određena je u listu *S. rigidum* (942,679 ppm), dok je duplo manja količina određena u korenu (467,776 ppm).

Koren biljne vrste *S. rigidum*, u poređenju sa ostalim delovima biljke, sadrži vrlo male koncentracije kalijuma i magnezijuma (775,387 i 958,897 ppm). U poređenju sa ostalim delovima biljke, znatno veća količina kalijuma određena je u plodu (2949 ppm). Najveća koncentracija magnezijuma određena je u listu (2284,741 ppm). Sadržaj natrijuma je znatno niži

u porećenju sa drugim odrećivanim makroelementima. Najveća kolićina natrijuma odrećena je u plodu i korenu (85,469 i 81,094 ppm) dok list i cvet sadręe skoro istu koncentraciju ovog elemeta (52,509 i 53,159 ppm).

*Dudić i sar.*, (2007) odrećivali su sadręaj Mg, Ca, Fe, Cr i Ni u korenu, stablu i listu *S. rigidum* sa razlićitih lokaliteta, sa serpentnina (silikat) Vranjak-Zaovina, sa podrućja planine Tare i sa krećnjaćkih podloga sa lokaliteta Jelen Do u Ovćarsko-Kablarskoj klisuri u zapadnoj Srbiji. Ukupan sadręaj Mg je bio 14150 i 11280 ppm (silikat i krećnjak), dok je koncentracija Ca bila 13500 i 21110 ppm (silikati i krećnjak). Ovako velika kolićina Ca i Mg objašnjena je ćinjenicom da je biljka *S. rigidum* tolerantna na visoke koncentracije ovih metala u podlozi, odnosno da apsorbuje kalcijum kao hranljivu materiju, neophodnu za rast i razvoj same biljke.

Ovo istraęivanje potvrćuje ćinjenicu da mineralni sastav biljaka zavisi od morfoloćke graće lista i korena, ali u mnogome i od same strukture i sastava podloge, pa su rezultati ovog istraęivanja neuporedivi sa *S. rigidum* iz istoćne Srbije, jer su biljke sakupljane sa razlićitih geografskih podrućja.

Pored toga, koncentracije Ca i Mg su najmanje u korenu, a najveće u listu *S. rigidum* iz istoćne Srbije, dok se u istoj biljci sa razlićitih lokaliteta zapadne Srbije u korenu nalazi najveća koncentracija Ca i Mg, a u listu najmanja (*Dudić i sar.*, 2007).

Najveći sadręaj kalijuma odrećen je u plodu *S. pallasii* 2279,258 ppm, dok je nešto manja kolićina odrećena u cvetu 2199,102 ppm. List *S. pallasii* ima njamanji sadręaj kalijuma 677,857 ppm.

Najveća koncentracija natrijuma odrećena je u listu *S. pallasii* 172,300 ppm, dok je u ostalim delovima biljke odrećena znatno nića koncentracija, pri ćemu natrijuma ima najmanje (32,147 ppm) u korenu.

Najnića koncentracija magnezijuma odrećena je u korenu *S. pallasii* dok je u cvetu te biljke odrećena ćak 3 puta veća kolićina 15975,981 ppm.

Najvića koncentracija kalcijuma odrećena je u cvetu 1189,860 ppm, dok koren sadręi najmanju kolićinu 460,414 ppm.

Najveća koncentracija kalijuma odrećena je u plodu *S. pallasii* i *S. rigidum*, dok je najmanja koncentracija odrećena u listu *S. pallasii* i korenu *S. rigidum*.

U listu *S. pallasii* odrećena je 3,5 puta veća koncentracija natrijuma nego u listu *S. rigidum*, dok je u korenu iste biljke odrećen znatno nići sadręaj ovog metala u porećenju sa *S. rigidum*.



Koncentracija Ca i Mg određena u *S. pallasii* i *S. rigidum* se kreću u približno istom opsegu koncentracija, s tim što je u obe biljne vrste najmanja količina Ca i Mg određena u korenu, dok je najveća koncentracija ovih metala određena u nadzemnim delovima, listu i cvetu. Na osnovu određenih količina magnezijuma i kalcijuma može se zaključiti da su oni vrlo pokretljivi pa je najniža koncentracija ovih metala u korenu, dok se u znatno većim količinama akumuliraju u cvetu.

Za razliku od crnog i zelenog čaja koji sadrži i znatne količine natrijuma (*Szymczycha-Madeja* i sar. 2015), *S. rigidum* i *S. pallasii* sadrže natrijum u najmanjoj koncentraciji u odnosu na ostale određivanemakroelemente.

U svim prethodnim istraživanjima koncentracija kalcijuma je znatno viša nego u vrstama roda *Seseli* (*Nookabkaew* i sar. 2006; *Moreda-Pineiro* i sar., 2003), dok su koncentracije Mg uporedive (*Basgel* i *Erdemoglu* 2006; *Nookabkaew* i sar., 2006; *Moreda-Pineiro* i sar.2003) sa onima iz ispitivanih biljaka.

#### 4.10.3 Teški metali

U Tabeli 29. prikazan je sadržaj Cd, Cr, Ni i Pb (ppm) u listu, cvetu, plodu i korenu *Seseli rigidum*, dok su podaci za *S. pallasii* prikazani u Tabeli 30.

**Tabela 29.** Sadržaj teških metala u listu, cvetu, plodu i korenu *Seseli rigidum*

Uzorak Element	List (ppm)	Cvet (ppm)	Plod (ppm)	Koren (ppm)
Cd	0,087±0,001	0,059±0,001	0,095±0,002	0,375±0,001
Cr	0,401±0,027	0,517±0,012	0,758±0,017	0,445±0,004
Ni	0,971±0,030	1,057±0,022	1,364±0,008	0,660±0,002
Pb	1,943±0,029	1,866±0,023	2,1738±0,029	3,112±0,003

**Tabela 30.** Sadržaj teških metala u listu, cvetu, plodu i korenu *Seseli pallasii*

Uzorak Element	List (ppm)	Cvet (ppm)	Plod (ppm)	Koren (ppm)
Cd	0,161±0,009	0,245±0,018	0,231±0,019	0,109±0,011
Cr	0,216±0,015	0,821±0,045	0,259±0,017	0,288±0,026
Ni	0,618±0,027	1,108±0,085	2,224±0,177	0,676±0,047
Pb	1,420±0,058	3,142±0,124	2,374±0,167	2,149±0,066

Olovo i kadmijum su elementi koji se u nalaze u tragovima, nisu esencijalni, ali mogu se akumulirati u biološkim sistemima i na taj način postaju potencijalni zagađivači putem lanca ishrane. Toksični su za ljude čak i pri niskim dozama. Ovi metali se češće detektuju u biljkama kao rezultat povećane industrijalizacija i zagađene biosfere. Shodno tome je potrebno pratiti njihove čak i vrlo niske koncentracije u potencijalnim izvorima pa samim tim i lekovitom bilju.

Najveći sadržaj kadmijuma određen je u korenu *S. rigidum* (0,375 ppm), dok je najmanja količina određena u cvetu 0,059 ppm, dok su u listu i plodu prisutne približno iste koncentracije (0,087 i 0,095). Koncentracija kadmijuma u *S. pallasii* kreće se u opsegu od 0,109-0,245 ppm. Količina ovog toksičnog metala u cvetu i plodu su bliskih vrednosti (0,245 i 0,231 ppm), dok je najmanja količina ovog metala određena u korenu, 0,109 ppm. Određena koncentracija kadmijuma u pojedinim delovima *S. rigidum* je manja nego u istim delovima *S. pallasii*. Najveća koncentracija kadmijuma određena je u korenu *S. rigidum*, dok je u ostalim delovima koncentracija ovog teškog metala znatno niža. Sadržaj kadmijuma u plodu *S. pallasii* gotovo dva i po puta veći nego u plodu *S. rigidum*.

Najveći sadržaj olova je u korenu (3,112 ppm), a najniži u cvetu *S. rigidum* (1,866 ppm). Koncentracija olova u *S. pallasii* je u opsegu od 1,420-3,142 ppm. U ovoj biljci, najveća koncentracija olova prisutna je u cvetu (3,142 ppm), dok je najniža u listu (1,42 ppm). U korenu i plodu određena je približno ista koncentracija olova (2,149 i 2,374 ppm).

Količina određenog olova u *S. rigidum* i *S. pallasii* je u sličnom opsegu koncentracija, s tim što je različit sadržaj u pojedinim delovima biljke. Takođe poređenjem dobijenih rezultata za sadržaj teških metala, kadmijuma i olova, sa propisanim vrednostima WHO (*Szymczycha-Madeja i sar., 2015*) može se zaključiti da je biljka rasla u nezagađenoj sredini, i da nema povećan sadržaj ovih teških metala.

Određena količina kadmijuma i olova u *S. pallasii* je uporediva sa sadržajem tih metala u lekovitim biljkama sa teritorije Srbije (*Ražić i Kuntić 2013*).

Hrom je neophodan metal čije je prisustvo u tragovima potrebno za normalan metabolizam i njegov nedostatak može izazvati razne poremećaje kako kod same biljke tako i kod konzumenata. Poznato je da hrom pojačava insulinsku aktivnost.

Koncentracija hroma u svim delovima *S. rigidum* je približno ista i kreće se u opsegu 0,401-0,758 ppm. Najveća koncentracija određena je u plodu, a najmanja u korenu.

Najveća koncentracija hroma određena je u cvetu *S. pallasii* (0,821 ppm), dok je u ostalim delovima biljke znatno manja, 0,216 ppm u listu i 0,288 ppm u korenu.

U poređenju sa dobijenim rezultatima količina određenog hroma u *S. rigidum* i *S. pallasii* je približno ista, s tim što je različit sadržaj u pojedinim delovima biljke što može biti u direktnoj korelaciji sa različitim lokalitetima na kojima su biljke sakupljane i samog sastava podlog.

Koncentracija hroma u *S. rigidum* i *S. pallasii* je u granicama normalne koncentracije tog elementa (Stanojković-Sebić i sar., 2015), iako je viša u poređenju sa sadržajem hroma u lekovitim biljkama: *Matricaria chamomilla* L., *Melissa officinalis* L., *Mentha piperita* L. i *Foeniculum vulgare* Mill. koje se tradicionalno koriste u alternativnoj medicini u Srbiji (Stanojković-Sebić i sar., 2015).

Količine nikla u tragovima mogu biti korisne za organizam, naročito za aktivaciju enzima, ali pri višim koncentracijama, može biti toksičan. Takođe, izlaganje većim koncentracijama nikla izaziva oksidativni stres.

Sadržaj nikla je najveći u plodu *S. rigidum* (1,364 ppm), a najniži u korenu (0,660 ppm). Koncentracije nikla u odnosu na druge metala su relativno niske i kreću se u opsegu od 0,618 ppm u listu do 2,224 ppm u plodu *S. pallasii*. Sadržaj nikla u posmatranim biljnim vrstama je sličan, s tim što je određena količina Ni u plodu *S. rigidum* gotovo duplo veća nego u plodu *S. pallasii*, dok je sadržaj Ni u korenu obe biljne vrste gotovo isti.

Prema Kabata-Pendias i Pendias (2001), toksična koncentracija nikla varira između biljnih vrsta i kreće se od 40 do 246 ppm.

Dobijeni rezultati za obe biljne vrste pokazuju da je sadržaj nikla u normalnim koncentracijama (Stanojković-Sebić i sar., 2015) i uporediv sa rezultatima analiziranih čajeva iz Srbije (Mihaljev i sar., 2014; Stanojković-Sebić i sar., 2015).

#### **4.11 Statistička povezanost rezultata mineralnog sastava biljaka *S. rigidum* i *S. pallasii***

Multivarijantna analiza koja je primenjena na podatke o mineralnom sastavu biljaka *S. rigidum* i *S. pallasii* obuhvata analizu glavnih komponenti (PCA) i hijerarhijsku klaster analizu (HCA). Na početku statističke analize, izračunata je korelaciona matrica (Tabela 31.), koja prikazuje koeficijente korelacije između svakog para metala. ( $p \leq 0,05$ ).

**Tabela 31.** Korelaciona matrica sadrži a mikroelemenata (Al, B, Ba, V, Co, Fe, Cu, Mn i Zn) u listu, cvetu, plodu i korenu biljnih vrsta *S. rigidum* i *S. pallasii*

	<i>S. pallasii</i> List	<i>S. pallasii</i> Cvet	<i>S. pallasii</i> Plod	<i>S. pallasii</i> Koren	<i>S. rigidum</i> List	<i>S. rigidum</i> Cvet	<i>S. rigidum</i> Plod	<i>S. rigidum</i> Koren
<i>S. pallasii</i> List	1,000							
<i>S. pallasii</i> Cvet	0,893	1,000						
<i>S. pallasii</i> Plod	0,964	0,959	1,000					
<i>S. pallasii</i> Koren	0,495	0,547	0,489	1,000				
<i>S. rigidum</i> List	0,956	0,970	0,966	0,539	1,000			
<i>S. rigidum</i> Cvet	0,614	0,879	0,750	0,340	0,806	1,000		
<i>S. rigidum</i> Plod	0,904	0,990	0,960	0,539	0,983	0,880	1,000	
<i>S. rigidum</i> Koren	0,816	0,805	0,829	0,816	0,806	0,520	0,809	1,000

Sledeći korak u statističkoj analizi predstavlja preračunavanje svojstvenih vrednosti (eigenvalues) koje su prikazane u Tabeli 32.

**Tabela 32.** Faktorske kordinate sadrži a mikroelemenata (Al, B, Ba, V, Co, Fe, Cu, Mn i Zn) u listu, cvetu, plodu i korenu biljnih vrsta *S. rigidum* i *S. pallasii*

	Glavna komponenta 1	Glavna komponenta 2	Glavna komponenta 3
<i>S. pallasii</i> List	-0,932	-0,028	0,347
<i>S. pallasii</i> Cvet	-0,984	-0,133	-0,072
<i>S. pallasii</i> Plod	-0,970	-0,108	0,183
<i>S. pallasii</i> Koren	-0,636	0,719	-0,255
<i>S. rigidum</i> List	-0,983	-0,109	0,072
<i>S. rigidum</i> Cvet	-0,810	-0,393	-0,434
<i>S. rigidum</i> Plod	-0,987	-0,140	-0,057
<i>S. rigidum</i> Koren	-0,880	0,419	0,078
Svojstvena vrednost	6,553	0,909	0,426
Varijabilitet (%)	81,910	11,357	5,329
Kumulativna svojstvena vrednost	6,553	7,461	7,888
Ukupan varijabilitet (%)	81,910	93,267	98,596

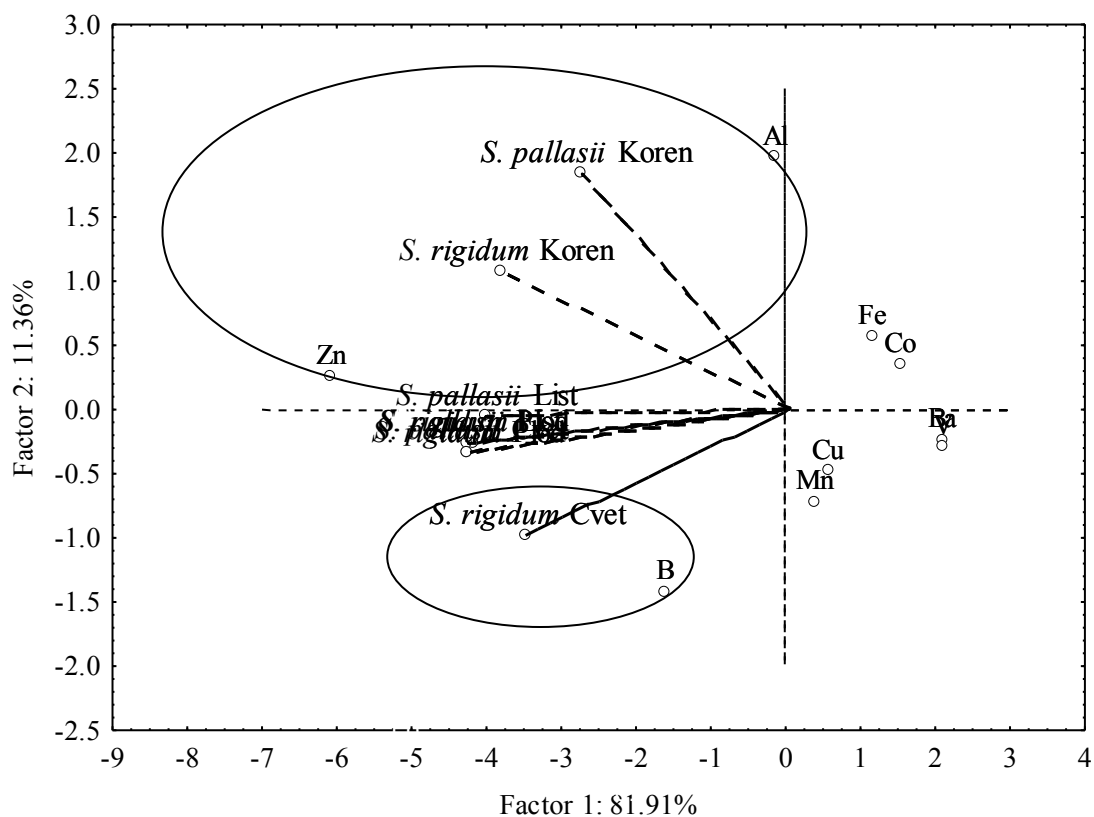
PCA analizom su originalne varijable pretvorene u nove korelacione varijable, koje se nazivaju glavne komponente pri čemu prva glavna komponenta objašnjava 81,91 % ukupnog varijabiliteta mineralnog sastava *S. rigidum* i *S. pallasii*. Druga glavna komponenta objašnjava 11,36 %, dok je trećom komponentom obuhvaćeno 5,33 % ukupnog varijabiliteta.

Prva glavna komponenta ima negativno opterećenje na svim posmatranim varijablama. Najveće negativno opterećenje opisano je varijablom *S. rigidum* Plod (-0,987), što je uslovljeno pre svega sadržajem bora.

Druga glavna komponenta ima pozitivno opterećenje na varijablama opisanim sa *S. pallasii* Koren (0,719) i *S. rigidum* Koren (0,419). Koren obe biljne vrste sadrži najveću količinu aluminijuma i cinka, ali najmanju količinu bakra, mangana, vanadijuma i barijuma. U cvetu *S. rigidum* određen je povećan sadržaj bora i cinka, ali niži sadržaj gvožđa i kobalta. Shodno tome, PCA analizom varijable *S. pallasii* Koren i *S. rigidum* Koren su se izdvojile u odnosu na ostale varijable, čije je grupisanje uslovljeno pre svega sadržajem aluminijuma i cinka, dok se *S. rigidum* Plod grupisao na osnovu sadržaja bora.

Podaci koji su bili predmet PCA analize su podvrgnuti hijerarhijskoj klaster analizi (HCA).

Primena HCA analize na rezultate ispitivanja sadržaja mikroelemenata u listu, cvetu, plodu i korenu biljnih vrsta *S. rigidum* i *S. pallasii* u odnosu na sadržaj mikroelemenata (Al, B, Ba, V, Co, Fe, Cu, Mn i Zn) u pojedinim delovima (list, cvet, plod i koren) biljaka prikazani su na Slici 31.



**Slika 31.** PCA dijagram varijabli ispitivanja sadržaja mikroelemenata (Al, B, Ba, V, Co, Fe, Cu, Mn i Zn) u listu, cvetu, plodu i korenu biljnih vrsta *S. rigidum* i *S. pallasii*

Na osnovu klaster analize pojedinih delova biljaka *S. rigidum* i *S. pallasii* dobijena su dva statistički značajna klastera (Slika 32.).

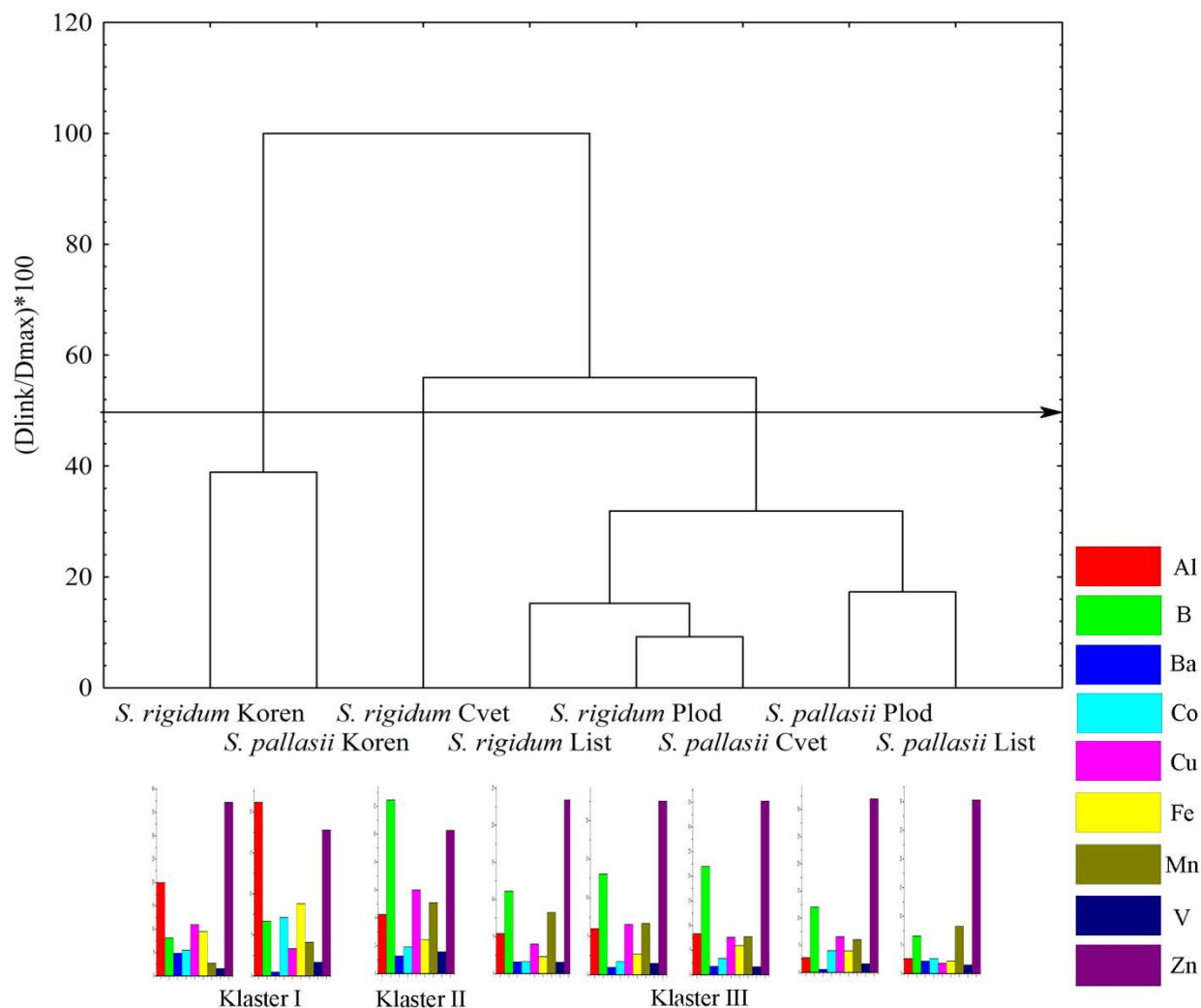
Prvi klaster čine *S. rigidum* Koren i *S. pallasii* Koren (Euklidovo rastojanje=21,5). Koren obe ispitivane biljne vrste izdvojen je u poseban klaster zbog najvećeg sadržaja aluminijuma i cinka. Generalno, ovaj klaster se može nazvati klasterom aluminijuma.

Drugi klaster čini varijabla opisana sa *S. rigidum* Cvet jer sadrži povećan sadržaj bora, pa se ovaj klaster može nazvati klasterom bora.

Nadzemni delovi *S. rigidum* i *S. pallasii* nalaze se u trećem klasteru jer imaju znatno veći sadržaj bora nego koren obe biljne vrste. U okviru trećeg klastera nalaze se dva potklastera. Varijable opisane sa *S. pallasii* List i *S. pallasii* Plod grupisane su u jedan potklaster, dok se u drugom nalaze varijable opisane sa *S. rigidum* List i *S. rigidum* Plod i *S. pallasii* Cvet. Varijabla *S. rigidum* List grupisana je zasebno u okviru drugog potklastera jer ima povećan sadržaj cinka. Najveća sličnost u okviru prvog potklastera je između *S. rigidum* List i *S. rigidum* Plod (Euklidovo rastojanje=3,8).

Nadzemni delovi obe biljne vrste su zajedno grupisani jer imaju znatno veći sadržaj bora nego koren *S. rigidum* i *S. pallasii*, shodno tome drugi klaster se može nazvati klasterom bora.

Klaster analizom razdvojeni su podzemni delovi biljaka roda *Seseli* od nadzemnih delova na osnovu sadržaja mikroelenenata, što potvrđuje činjenicu da se mikroelementi nalaze u višim koncentracijama u korenu nego u nadzemnim delovima biljaka.



**Slika 32.** Dendrogram ispitivanja sadržaja mikroelemenata (Al, B, Ba, V, Co, Fe, Cu, Mn i Zn) u listu, cvetu, plodu i korenu biljnih vrsta *S. rigidum* i *S. pallasii*

Korelaciona matrica (Tabela 33.), koja daje koeficijente korelacije između svakog od pojedinih delova (list, cvet, plod i koren) biljnih vrsta *S. rigidum* i *S. pallasii* na osnovu sadržaja makroelemenata (Na, Mg, Ca i K) je izračunata na početku statističke analize. Sve varijable su uzete u obzir za dalja izračunavanja.

**Tabela 33.** Korelaciona matrica za sadržaj makroelemenata (Na, Mg, Ca i K) u listu, cvetu, plodu i korenu u *S. rigidum* i *S. pallasii*

	<i>S. pallasii</i> List	<i>S. pallasii</i> Cvet	<i>S. pallasii</i> Plod	<i>S. pallasii</i> Koren	<i>S. pallasii</i> List	<i>S. rigidum</i> Cvet	<i>S. rigidum</i> Plod	<i>S. rigidum</i> Koren
<i>S. pallasii</i> List	1,000							
<i>S. pallasii</i> Cvet	0,952	1,000						
<i>S. pallasii</i> Plod	0,521	0,439	1,000					
<i>S. pallasii</i> Koren	0,423	0,264	0,958	1,000				
<i>S. rigidum</i> List	0,892	0,813	0,850	0,773	1,000			
<i>S. rigidum</i> Cvet	0,493	0,416	0,999	0,956	0,833	1,000		
<i>S. rigidum</i> Plod	0,418	0,346	0,993	0,953	0,782	0,996	1,000	
<i>S. rigidum</i> Koren	0,845	0,751	0,893	0,833	0,995	0,878	0,833	1,000

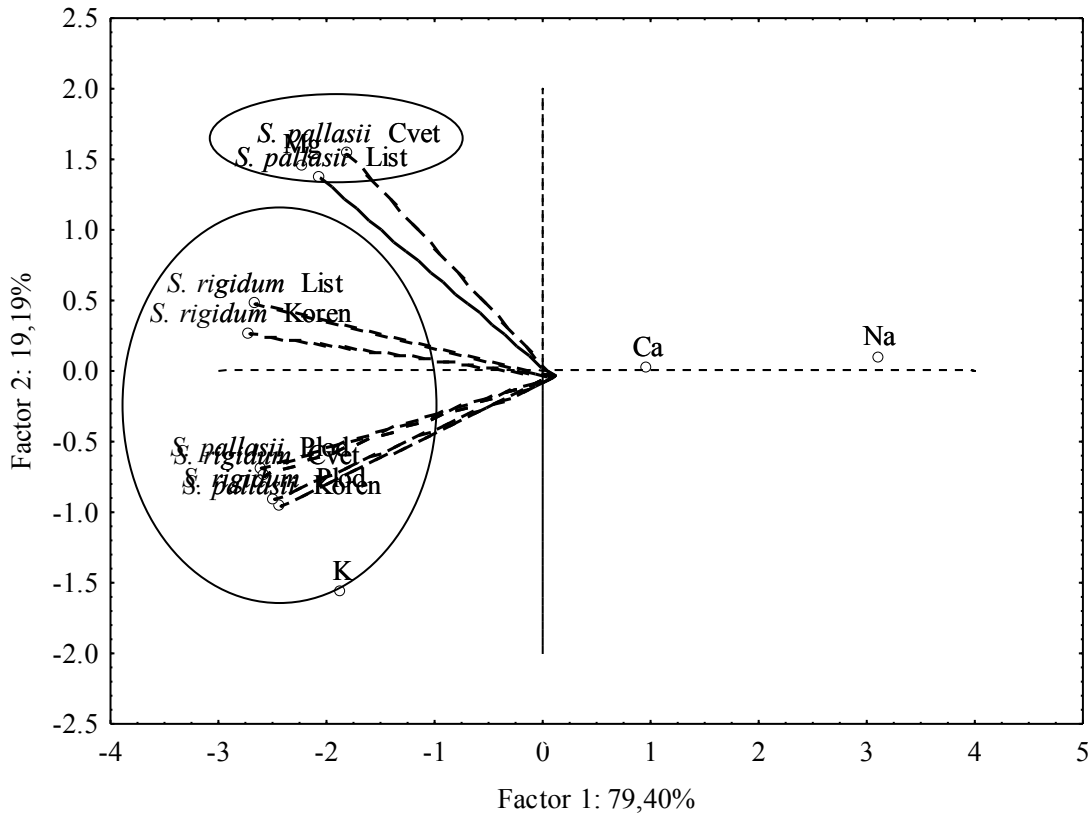
Zatim je vršeno preračunavanje svojstvenih vrednosti (eigenvalues), koje su prikazane u Tabeli 34.

**Tabela 34.** Faktorske koordinate varijabli ispitivanja sadržaja makroelemenata (Na, Mg, Ca i K) u listu, cvetu, plodu i korenu biljnih vrsta *S. rigidum* i *S. pallasii*

	Glavna komponenta 1	Glavna komponenta 2
<i>S. pallasii</i> List	-0,758	0,641
<i>S. pallasii</i> Cvet	-0,675	0,718
<i>S. pallasii</i> Plod	-0,951	-0,299
<i>S. pallasii</i> Koren	-0,887	-0,423
<i>S. rigidum</i> List	-0,971	0,233
<i>S. rigidum</i> Cvet	-0,941	-0,326
<i>S. rigidum</i> Plod	-0,908	-0,400
<i>S. rigidum</i> Koren	-0,988	0,136
Svojstvena vrednost	6,352	1,535
Varijabilitet (%)	79,396	19,185
Kumulativna svojstvena vrednost	6,352	7,886
Ukupan varijabilitet (%)	79,396	98,581

Prva glavna komponenta objašnjava 79,40 % ukupne varijanse među varijablama, dok je njena svojstvena vrednost (eigenvalue) 6,35. Druga glavna komponenta objašnjava 19,19 % ukupne varijanse podataka. Zajedno, ove dve komponente objašnjavaju 98,58 % varijanse za sve podatke. Rezultati PCA proračuna ilustrovani su na Slici 33.





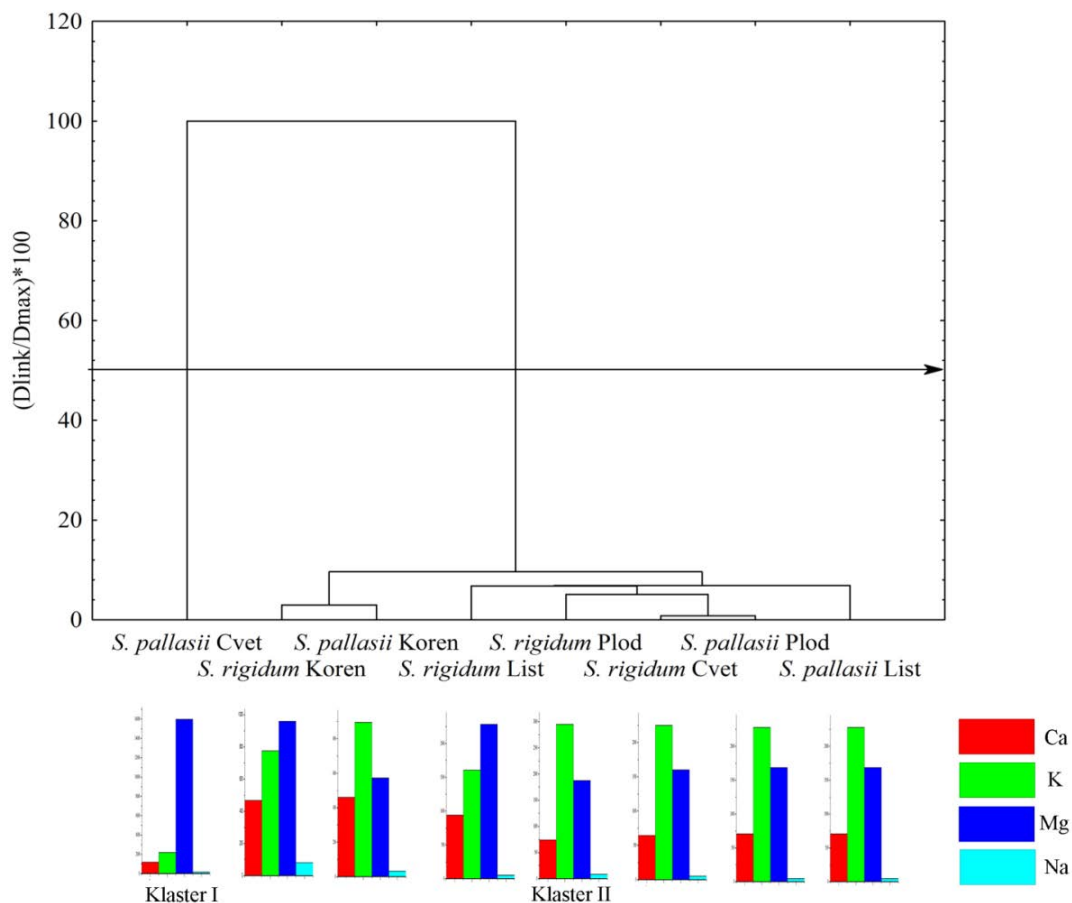
**Slika 33.** PCA dijagram varijabli ispitivanja sadržaja makroelemenata (Na, Mg, Ca i K) u listu, cvetu, plodu i korenu biljnih vrsta *S. rigidum* i *S. pallasii*

Prva glavna komponenta ima negativno faktorsko opterećenje na svim varijablama svih ispitivanih delova biljaka *S. rigidum* i *S. pallasii*. Najmanje apsolutne vrednosti faktorskog opterećenja su na varijablama *S. pallasii* List (-0,758) i *S. pallasii* Cvet (-0,675), dok ostali delovi biljaka imaju približno negativne vrednosti opterećenja.

Druga glavna komponenta ima pozitivno faktorsko opterećenje na varijablama *S. pallasii* List (0,641) i *S. pallasii* Cvet (0,718). Na osnovu ovakvih opterećenja list i cvet *S. pallasii* su se zasebno izdvojili u PCA dijagramu zbog veće koncentracije magnezijuma u odnosu na ostale ispitivane uzorke koji su se zajedno grupisali zbog većeg sadržaja kalijuma.

Podaci koji su bili predmet PCA analize bili su podvrgnuti hijerarhijskoj klaster analizi (HCA).

Na Slici 34. prikazan je dendrogram kojim se klasifikuje sadržaj makroelemenata (Mg, Ca, Na i K) u delovima biljaka (list, cvet, plod i koren) *S. rigidum* i *S. pallasii*.



**Slika 34.** Dendrogram ispitivanja sadržaja makroelemenata (Mg, Ca, Na i K) u listu, cvetu, plodu i korenu biljnih vrsta *S. rigidum* i *S. pallasii*

Klaster analizom dobijena su dva klastera. *S. pallasii* cvet se zasebno izdvojio i predstavlja prvi klaster, što je u skladu sa najvećim sadržajem magnezijuma, pa se prvi klaster može nazvati klasterom magnezijuma. U okviru drugog klastera nalaze se dva potklastera. Prvi potklaster čine dva potpotklastera, jedan čine *S. pallasii* List i *S. rigidum* List (Euklidovo rastojanje=938), a drugi *S. pallasii* Koren i *S. rigidum* Koren (Euklidovo rastojanje=407). U drugom potklasteru si izdvojenji reproduktivni delovi biljaka, odnosno *S. pallasii* Plod i *S. rigidum* Cvet (Euklidovo rastojanje=109), koji su i najslićniji po sadržaju makroelemenata. Prvi potklaster karakterišu vegetativni delovi biljaka *S. pallasii* i *S. rigidum* koji imaju povećan sadržaj magnezijuma i kalijuma, ali i veći sadržaj kalcijuma, nego reproduktivni delovi biljaka izdvojeni u drugom potklasteru koje karakteriše veći sadržaj kalijuma. Generalno ovaj klaster se može nazvati klasterom kalijuma.

Korelaciona matrica sadrži aza teških metala (Cd, Cr, Ni i Pb) u listu, cvetu, plodu i korenu biljnih vrsta *S. rigidum* i *S. pallasii* data je u Tabeli 35.

**Tabela 35.** Korelaciona matrica sadrži aza teških metala (Cd, Cr, Ni i Pb) u pojedinim delovima (list, cvet, plod i koren) *S. rigidum* i *S. pallasii*

	<i>S. pallasii</i> List	<i>S. pallasii</i> Cvet	<i>S. pallasii</i> Plod	<i>S. pallasii</i> Koren	<i>S. rigidum</i> List	<i>S. rigidum</i> Cvet	<i>S. rigidum</i> Plod	<i>S. rigidum</i> Koren
<i>S. pallasii</i> List	1,000							
<i>S. pallasii</i> Cvet	0,980	1,000						
<i>S. pallasii</i> Plod	0,854	0,764	1,000					
<i>S. pallasii</i> Koren	0,993	0,994	0,790	1,000				
<i>S. rigidum</i> List	0,989	0,976	0,885	0,978	1,000			
<i>S. rigidum</i> Cvet	0,969	0,961	0,895	0,955	0,995	1,000		
<i>S. rigidum</i> Plod	0,945	0,941	0,897	0,929	0,982	0,997	1,000	
<i>S. rigidum</i> Koren	0,965	0,978	0,687	0,986	0,931	0,894	0,859	1,000

Zatim su predstavljena (Tabela 36.) preračunavanja svojstvenih vrednosti (eigenvalues) varijabli ispitivanja sadrži aza teških metala (Cd, Cr, Ni i Pb) u pojedinim delovima (list, cvet, plod i koren) *S. rigidum* i *S. pallasii*.

**Tabela 36.** Faktorske koordinate slučajeva teških metala (Cd, Cr, Ni i Pb) u listu, cvetu, plodu i korenu biljnih vrsta *S. rigidum* i *S. pallasii*

	Glavna komponenta 1	Glavna komponenta 2
<i>S. pallasii</i> List	-0,994	0,055
<i>S. pallasii</i> Cvet	-0,982	0,178
<i>S. pallasii</i> Plod	-0,872	-0,47
<i>S. pallasii</i> Koren	-0,986	0,162
<i>S. rigidum</i> List	-0,999	-0,035
<i>S. rigidum</i> Cvet	-0,990	-0,099
<i>S. rigidum</i> Plod	-0,975	-0,149
<i>S. rigidum</i> Koren	-0,944	0,317
Svojstvena vrednost	7,504	0,415
Varijabilitet (%)	93,805	5,189
Kumulativna svojstvena vrednost	7,504	7,920
Ukupan varijabilitet (%)	93,805	98,994

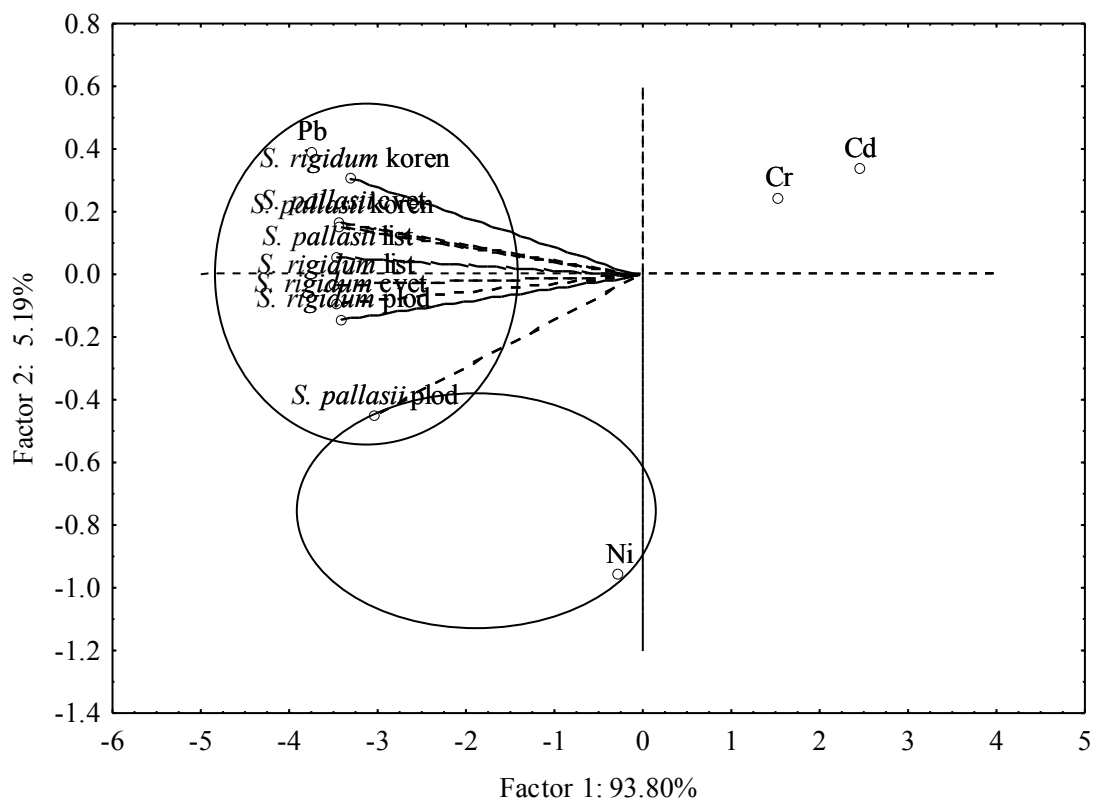
U posmatranoj analizi svojstvena vrednost prve glavne komponente je 7,50 što znači da prva glavna komponenta ima 7,50 puta veću varijansu od varijanse originalnih standardizovanih varijabli. Rezultati PCA proračuna ilustrovani su na Slici 35.

Prva glavna komponenta ima veliki doprinos i objašnjava 93,80 % ukupnog varijabiliteta i ima negativno opterećenje na svim varijablama opisanih sa svim ispitivanim delovima biljaka *S. rigidum* i *S. pallasii*. Posebno se izdvajaju *S. rigidum* List (-0,999) i *S. pallasii* List (-0,994).

Druga glavna komponenta objašnjava 5,19 % ukupnog varijabiliteta. Druga glavna komponenta, nema značajnija opterećenja na varijablama, sem na varijabli opisanoj sa *S. rigidum* Koren koja ima malo pozitivno opterećenje (0,317). Na osnovu takvih opterećenja, jasno je da su svi ispitivani delovi biljaka *S. rigidum* i *S. pallasii* u negativnom odsečku PCA dijagrama Slika 35.

Ukoliko se na matricu podataka korišćenih za PCA analizu primeni HCA analiza, dobijeni rezultati se mogu predstaviti dendrogramom (Slika 36).

Rezultati HCA ispitivanja sastava sadrži teških metala (Cd, Cr, Ni i Pb) u listu, cvetu, plodu i korenu biljnih vrsta *S. rigidum* i *S. pallasii* su prikazani su na Slici 36.

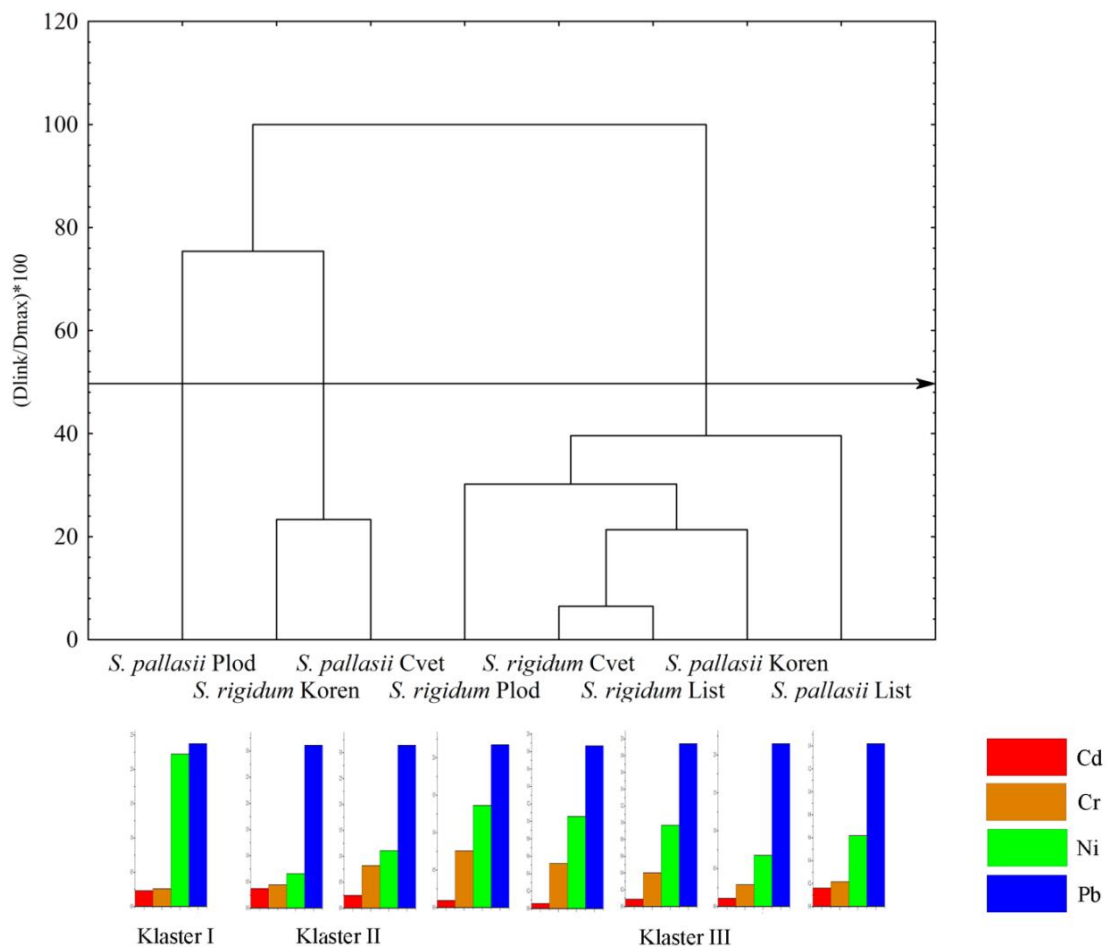


**Slika 35.C** PCA dijagram varijabli ispitivanja sadrži teških metala (Cd, Cr, Ni i Pb) u listu, cvetu, plodu i korenu biljnih vrsta *S. rigidum* i *S. pallasii*

Na osnovu klaster analize dobijena su tri statistički značajna klastera. U okviru prvog klastera izdvojila su se dva potklastera. U okviru prvog potklastera grupisala se varijabla *S. pallasii* List, dok su u okviru drugog varijable *S. pallasii* Koren, *S. rigidum* List, *S. rigidum* Cvet i *S. rigidum* Plod. Varijable *S. rigidum* List i *S. rigidum* Cvet su najbližnije po sadržaju teških metala (Euklidovo rastojanje=0,17). U plodu *S. rigidum* određena je najveća količina hroma u odnosu na ostale varijable u okviru prvog klastera.

U drugom klasteru izdvojili su se *S. pallasii* Cvet i *S. rigidum* Koren (Euklidovo rastojanje=0,60), koji su grupisani na osnovu najvećeg sadržaja olova, ali i približno istog sadržaja kadmijuma, hroma i nikla. U trećem klasteru izdvaja se *S. pallasii* Plod zbog većeg sadržaja nikla i olova u odnosu na sadržaj u ostalim ispitivanim delovima biljaka *S. rigidum* i *S. pallasii*.

Izmeću rezulta dobijenih PCA i HCA analizom postoji veliko slaganje. U PCA analizi *S. rigidum* Koren se izdvaja jer ima najveći sadržaj olova, dok se sa suprotne strane dijagrama nalazi *S. pallasii* Plod jer ima povećan sadržaj nikla (što ga i izdvaja od ostalih delova biljaka), ali i znatno nižeg sadržaja hroma i kadmijuma koji se nalaze dijagonalno u PCA dijagramu. U klaster analizi *S. rigidum* Koren i *S. pallasii* Cvet se nalaze u istom potklasteru zbog najvećeg sadržaja olova, dok se *S. pallasii* Plod izdvaja kao poseban klaster zbog većeg sadržaja nikla nego u ostalim ispitivanim delovima biljaka *S. rigidum* i *S. pallasii*.



**Slika 36 .** Dendrogram ispitivanja sadržaja teških metala (Cd, Cr, Ni i Pb) u listu, cvetu, plodu i korenu biljnih vrsta *S. rigidum* i *S. pallasii*

## **5. Zaključak**

Cilj ove doktorske disertacije je bio utvrđivanje kvalitativnog i kvantitativnog sastava etarskih ulja i ekstrakata biljnih vrsta *S. rigidum* i *S. pallasii*, priprema biljnih ekstrakata različite polarnosti i određivanje antioksidativne i antimikrobne aktivnosti, zatim njihovo delovanje na aktivnost enzima holinesteraze različitog porekla, kao i sadržaja mikro-, makroelemenata i teških metala. Na osnovu prezentovanih rezultata može se zaključiti sledeće:

Dominantne komponente u etarskom ulju lista *S. rigidum* su  $\alpha$ -pinen, sabinen, limonen i (*E*)-verbenol; u etarskom ulju cveta  $\alpha$ -pinen, germakren D, sabinen i limonen, a u etarskom ulju ploda  $\alpha$ -pinen, sabinen, limonen i  $\gamma$ -terpinene, dok su u etarskom ulju korena (*Z*)-falcariinol, *n*-oktanal, terpinen-4-ol i kadin-1(10)-en-5,11-oksid.

Najzastupljenije komponente identifikovane HS/GC-MS tehnikom u listu *S. rigidum* su  $\alpha$ -pinen, kamfen, limonen i sabinen; u cvetu  $\alpha$ -pinen, sabinen, kamfen i limonen; u plodu  $\alpha$ -pinen, sabinen, limonen i *o*-cimen, dok su u korenu  $\alpha$ -pinen, *n*-oktanal, heksanal i kamfen.

Dominantna jedinjenja etarskog ulja nadzemnih delova *S. rigidum* i komponente identifikovane HS/GC-MS tehnikom su lako isparljivi monoterpeni, shodno tome za brzu analizu može se koristiti HS/GC-MS tehnika. S obzirom da je za HS/GC-MS potrebna vrlo mala količina uzoraka, ova tehnika je preporučljiva za brzu, ali ne i precizniju analizu nadzemnih delova *S. rigidum*.

$\alpha$ -Pinen je dominantna komponenta u svim etarskim uljima nadzemnih delova biljke *S. rigidum* ali ne i u korenu. Etarsko ulje korena *S. rigidum* ima značajno drugačiji sastav. Najzastupljenije komponente u etarskom ulju korena *S. rigidum*, kao i korenu *S. rigidum* identifikovane HS/GC-MS tehnikom su zasićeni ugljovodonici. Ovo još jednom potvrđuje činjenicu da se lakše isparljive komponente etarskog ulja mogu identifikovati i HS/GC-MS-om, dok se komponente, koje su manje isparljive, ne nalaze u spektru HS/GC-MS-a. Za analizu korena *S. rigidum* pokazano je da je GC-MS bolja tehnika za identifikaciju i određivanje hemijskog sastava etarskog ulja.

Najzastupljenije komponente u etarskom ulju lista *S. pallasii* su kariofilen-oksidi, spatulenol i (*E*)-verbenol, u etarskom ulju ploda  $\alpha$ -pinen, u etarskom ulju cveta  $\alpha$ -pinen,  $\beta$ -pinen i limonen dok u etarskom ulju korena *n*-nonan, (*Z*)- $\beta$ -ocimen i *n*-undekan.

Najzastupljenije komponente identifikovane HS/GC-MS tehnikom u listu su  $\alpha$ -pinen, limonen i  $\beta$ -pinen, u plodu  $\alpha$ -pinen,  $\beta$ -pinen i kamfen, u cvetu  $\alpha$ -pinen, mircen,  $\beta$ -pinen i *o*-cimen, dok su u korenu *n*-nonan, (*Z*)- $\beta$ -ocimen i *n*-undekan.



GC-MS i HS/GC-MS tehnikama nisu identifikovane iste dominantne komponente u listu *S. pallasii*. Dominantne isparljive komponente lista *S. pallasii* su lakše isparljivi monoterpeni, dok su u etarskom ulju zastupljeniji biciklični seskviterpeni. Sastav ulja cveta *S. pallasii* se znatno razlikuje od sastava isparljivih komponenata te biljke, iako su dominantne komponente monoterpeni, za analizu bolje je koristiti GC-MS tehnika koja zahteva veće količine biljnog materijala i duž u pripremu uzoraka. Za brzu analizu isparljivih komponenata ploda i korena *S. pallasii*, uz značajnu uštedu količine biljnog materijala i vremena pripreme uzoraka može poslužiti HS/GC-MS tehnika.

Analizom glavnih komponenta (PCA) je izvršeno grupisanje pojedinih delova biljke (list, cvet, plod i koren) *S. rigidum* na osnovu sličnosti njihovog hemijskih sastava. PCA analizom se varijabla opisana sa Koren GC-MS izdvojila zasebno, jer je (*Z*)-farkarinol dominantna komponenta etarskog ulja korena, u odnosu na ostale varijable koje su se grupisale na osnovu sadržaja  $\alpha$ -pinena kao dominantne komponente.

PCA analiza je, uzimajući u obzir konstituente etarskog ulja i isparljive komponente pojedinih delova biljaka *S. rigidum* kao varijable, ukazala na izdvajanje etarskog ulja korena, prvenstveno zbog sadržaja (*Z*)-farkarinola, dok su ostali uzorci (ulje lista, cveta i ploda) blisko grupisani na osnovu sadržaja  $\alpha$ -pinena kao dominantne komponente.

Primenom HCA analize je etarsko ulje korena *S. rigidum* izdvojeno u zaseban klaster. Sastav ulja korena se veoma razlikuje od drugih ispitivanih ulja. Sadržaj monoterpena u etarskom ulju korena je relativno nizak, a sa druge strane, ovo ulje je bogato Ostalim komponentama.

$\alpha$ -Pinen je najzastupljenija komponenta u svim delovima biljke sem u korenu i etarskom ulju lista, pa su ovi uzorci *S. pallasii* analizom glavnih komponenta pozicionirani odvojeno u odnosu na ostale uzorke, a najveći uticaj od svih identifikovanih komponenti na položaj posmatranih varijabli ima upravo  $\alpha$ -pinen. Na osnovu sadržaja dominantnih komponenata (*n*-undekan, (*Z*)- $\beta$ -ocimen i *n*-nonan) korena *S. pallasii* je u posebnom odsečku PCA dijagrama nezavisno kojom tehnikom je vršena identifikacija komponenata, GC-MS ili/i HS/GC-MS tehnikom. (*E*)-verbenol, spatulenol i kariofilen-oksid su neke od najzastupljenijih komponenti u listu, pa se nalaze u posebnom odsečku PCA dijagrama. Klaster analiza korena *S. pallasii* GC-MS i HS/GC-MS tehnikama je u saglasnosti sa rezultatima PCA anlyze.

Izolovanje čistih sekundarnih metabolita iz metanolnog ekstrakta korena *S. rigidum* se pokazalo veoma komplikovanim zbog izuzetne složenosti uzorka. Nakon mnogo koraka frakcionacije ni jedna frakcija nije sadržala samo jedno jedinjenje koje je moglo biti izolovano u čistom obliku i strukturno okarakterisano.

U cilju identifikacije komponenata primenjena je tačna hromatografija u kombinaciji sa masenom spektrometrijom visoke rezolucije. Identifikovan je značajan broj sekundarnih metabolita vrste *S. rigidum* i utvrđeno da veliki broj njih predstavlja jedinjenja kumarinske strukture.

Ekstrakti različite polarnosti svih delova biljaka *S. rigidum* i *S. pallasii*, imaju slične aktivnosti prema ABTS katjon radikal. Heksanski ekstrakti obe biljne vrste pokazuju najveću, a metanolni ekstrakti najmanju aktivnost prema ABTS katjon radikal. Aktivnost etarskih ulja prema ABTS radikal je takođe slična, iako se hemijski sastav ove dve biljne vrste znatno razlikuje.

Najbolju aktivnost prema DPPH radikal pokazuju etarski, acetonski i metanolni ekstrakti *S. rigidum*. Heksanski ekstrakti korena, lista i cveta *S. pallasii* pokazuju najveću aktivnost prema DPPH radikal, dok etarski ekstrakt cveta ima najmanju aktivnost. Za razliku od ekstrakata, etarska ulja *S. rigidum* i *S. pallasii* pokazuju dosta slabu aktivnost prema DPPH radikal.

Najveća vrednost ukupne redukcionne moći određena je za metanolni ekstrakt lista *S. rigidum*, a najmanja za acetonski ekstrakt korena. Metanolni ekstrakt lista *S. pallasii* pokazuje najveću ukupnu redukcionnu moć, dok najmanju ima etil-acetatni ekstrakt cveta. U poređenju sa ekstraktima, etarska ulja *S. rigidum* i *S. pallasii* pokazuju veoma slabu ukupnu redukcionnu moć.

Najviše ukupnih flavonoida određeno je u metanolnom ekstraktu ploda *S. rigidum* dok u heksanskim ekstraktima svih delova nisu određeni flavonoidi. Najveći sadržaj ukupnih flavonoida određen je u heksanskom ekstraktu korena i lista *S. pallasii*, dok je najmanji sadržaj određen u etil-acetatnom ekstraktu cveta iste biljke.

Najveći sadržaj ukupnih fenola određen je u acetonskim ekstraktu korena *S. rigidum*, dok je u ekstraktima lista nađeno najmanje ukupnih fenola. Najveći sadržaj fenola određen je u heksanskom ekstraktu lista *S. pallasii*, a najmanji u acetonskom ekstraktu cveta.

Dobijeni rezultati ispitivanja antioksidativne aktivnosti ekstrakata različitih polarnosti obe biljne vrste se mogu koristiti za dalja istraživanja, u cilju utvrđivanja najboljeg odnosa između

potencijalnih bioaktivnih jedinjenja i njihove antioksidantne aktivnosti, i rastvarača kojim bi se najefikasnije izolovala specifična biološki aktivnih jedinjenja

Između rezultata dobijenih za antioksidativnu aktivnost ekstrakata različite polarnosti i etarskih ulja primenom PCA i HCA analiza postoji veliko slaganje. PCA i HCA analize u kojima se kao varijable koriste metode ispitivanja antioksidativne aktivnosti (ABTS, DPPH, ukupna redukciona moć, ukupni flavonoidi i ukupni fenoli) jasno izdvajaju DPPH metodu od ostalih metoda određivanja antioksidativne aktivnosti jer se znatno razlikuje po mehanizmu delovanja od ostalih korišćenih metoda. Obe metode multivarijantne statistike izdvajaju ispitivane uzorke prema vrsti izolata (etarska ulja i ekstrakti), i prema vrsti korišćenih rastvarača u postupku ekstrakcije, odnosno omogućavaju izdvajanje etarskih ulja, ekstrakata pripremljenih polarnim i neoplarnim rastvaračima u tri grupacije.

Ekstrakti korena *S. rigidum* pokazuju najbolju, dok ekstrakti lista pokazuju najnižu antimikrobnu aktivnost. Najbolju antimikrobnu aktivnost na sojeve Gram (+) i Gram (-) bakterija pokazuje etarsko ulje korena biljke *S. rigidum*.

Etarska ulja korena i ploda vrste *S. pallasii* pokazuju izuzetno antimikrobno dejstvo na sve testirane Gram (+) i Gram (-) bakterije. Za razliku od etarskih ulja ekstrakti korena, lista, cveta i ploda, različite polarnosti (heksanski, etarski, etil-acetatni, acetonski i metanolni) nisu pokazali aktivnost ni na jednom testiranom soju.

Ekstrakti korena *S. rigidum* i etarska ulja svih delova biljke *S. pallasii* pokazuju generalno najveću kako inhibitornu tako i bicidalnu aktivnost i mogu imati potencijalnu primenu u različitim oblastima, prehrambenoj industriji, u medicinske i farmaceutske svrhe.

Etarska ulja svih delova biljnih vrsta *S. rigidum* i *S. pallasii* pokazuju inhibiciju holinesteraze iz pulovanog humanog seruma i BuChE iz konjskog seruma. Niži procenat inhibicije pokazuju svi ekstrakti biljnih vrste *S. rigidum* i *S. pallasii* prema BuChE iz pulovanog humanog seruma nego prema BuChE konjskog seruma.

Cvet biljke *S. pallasii* u poređenju sa ostalim delovima te biljke sadrži najveće koncentracije gotovo svih određenih metala, dok je u slučaju biljke *S. rigidum* situacija drugačija- najveće koncentracije određenih metala su zabeležene u korenu. Dobijeni rezultati za obe biljne vrste pokazuju da je sadržaj određenih metala u normalnim koncentracijama i uporediv sa rezultatima iz literature.

PCA analizom rezultata ispitivanja sadržaja mikroelemenata (Al, B, Ba, V, Co, Fe, Cu, Mn i Zn) u listu, cvetu, plodu i korenu biljnih vrsta *S. rigidum* i *S. pallasii*, varijable koren *S. pallasii* i koren *S. rigidum* su se izdvojile u odnosu na ostale ispitivane varijable, čije je grupisanje uslovljeno pre svega sadržajem aluminijuma i cinka, dok je plod *S. rigidum* grupisan na osnovu sadržaja bora. Klaster analizom razdvojeni su podzemni delovi biljaka roda *Seseli* od nadzemnih delova na osnovu sadržaja mikroelemenata, što potvrđuje činjenicu da se mikroelementi apsorbuju više u korenu nego u nadzemnim delovima biljaka.

Na osnovu PCA analize rezultata određivanja sadržaja makroelemenata (Mg, Ca, Na i K) u listu, cvetu, plodu i korenu biljnih vrsta *S. rigidum* i *S. pallasii*, list i cvet *S. pallasii* su se zasebno izdvojili u PCA dijagramu zbog veće koncentracije magnezijuma u odnosu na ostale ispitivane uzorke koji su se zajedno grupisali zbog većeg sadržaja kalijuma. Rezultati dobijeni klaster analizom su u saglasnosti sa rezultatima PCA analize. Cvet *S. pallasii* se izdvojio i predstavlja zaseban klaster, što je u skladu sa najvećim sadržajem magnezijuma. U okviru drugog klastera nalaze se dva potklastera. Prvi potklaster čine vegetativni delovi biljaka *S. pallasii* i *S. rigidum* koji imaju povećan sadržaj magnezijuma i kalijuma, ali i veći sadržaj kalcijuma, nego reproduktivni delovi biljaka izdvojeni u drugom potklasteru koje karakteriše veći sadržaj kalijuma.

Između rezultata dobijenih PCA i HCA analizom ispitivanja sadržaja teških metala (Cd, Cr, Ni i Pb) u listu, cvetu, plodu i korenu biljnih vrsta *S. rigidum* i *S. pallasii* postoji veliko slaganje. U PCA analizi koren *S. rigidum* se izdvaja jer ima najveći sadržaj olova, dok se sa suprotne strane dijagrama nalazi plod *S. pallasii* jer ima povećan sadržaj nikla (što ga i izdvaja od ostalih delova biljaka), ali i znatno niži sadržaj hroma i kadmijuma koji se nalaze dijagonalno u PCA dijagramu. U klaster analizi koren *S. rigidum* i cvet *S. pallasii* se nalaze u istom potklasteru zbog najvećeg sadržaja olova, dok se plod *S. pallasii* izdvaja kao poseban klaster zbog većeg sadržaja nikla nego u ostalim ispitivanim delovima biljaka.

## **6. Literatura**

- Abbaskhan A., Choudhary M.I., Ghayur M.N., Parween Z., Shaheen F., Gilani A.-ul-H., Maruyama T., Iqbal K., Tsuda Y. (2012). *Phytother. Res.* 26,783.
- Abyshev A., Jumutinol Z. (1980). *Chem. Nat. Compd.* 2, 250.
- Abyshev A.Z., Abyshev D.Z. (1983). *Chem. Nat. Compd.* 19(6), 668.
- Abyshev A.Z., Abyshev D.Z. (1984). *Chem. Nat. Compd.* 2, 248.
- Abyshev A.Z., Abyshev D.Z. (1984). *Chem. Nat. Compd.* 20(2), 230.
- Abyshev A.Z., Agaev E.M., Balabudkin M.A. (1993). *Chem. Nat. Compd.* 2, 298.
- Abyshev A.Z., Denisenko P.P., Abyshev D.Z., Kerimov Yu.B. (1977). *Chem. Nat. Compd.* 5, 640.
- Abyshev A.Z., Sidorova I.P., Abyshev D.Z., Florya V.N., Zmeikov V.P., Kerimov Yu. B. (1982). *Chem. Nat. Compd.* 4,434.
- Acworth I.N. (2003). *The Handbook of Redox Biochemistry*, Eds. ESA, Inc., Chelmsford, USA.
- Adams M., Berset C., Kessler M., Hamburger M. (2009). *J. Ethnopharmacol.* 121, 343
- Adams R.P. (2007). *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography-Mass Spectroscopy*. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, Illinois.
- Alagić S.Ć. (2014). *Zaštita Materijala* 55(3), 57.
- Altintig E., Altundag H., Tuzen M. (2014). *Bull. Chem. Soc. Ethiop.* 28(1), 9.
- Aminov A.M., Nikonov G.K. (1970). *Chem. Nat. Compd.* 6(6), 759.
- Aminov A.M., Nikonov G.K. (1972). *Chem. Nat. Compd.* 8(1), 33.
- Aminov A.M., Nikonov G.K. (1972). *Chem. Nat. Compd.* 8(6), 779.
- Aminov A.M., Nikonov G.K. (1973). *Chem. Nat. Compd.* 9(4), 487.
- Aminov A.M., Nikonov G.K. (1974). *Chem. Nat. Compd.* 10(2), 152.
- Ardrey, R. E. (2003). *Liquid Chromatography- Mass Spectrometry: An Introduction.*, Wiley, England.
- Ashraf W., Mian A.A. (2008). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 81, 101.
- Austin P.W., Seshadri T.R., Sood M.S. (1968). *Tetrahedron* 24(8), 3247.
- Aziza A.E., Quezada N., Cherian G. (2010). *Poult. Sci.* 89(12), 2711.
- Bader A., Caponi C., Cioni P.L., Flamini G., Morelli I. (2003). *Flavour Fragr. J.* 18, 57.
- Bae H., Jayaprakasha G.K., Jifon J., Patil B.S. (2012). *Food Chem.* 134, 1912.

- Bagirov V.Yu., Belyi M.B. (1981). *Chem. Nat. Compd.* 17(6), 586.
- Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., Idaomar M. (2008). *Food Chem. Toxicol.* 46, 446.
- Ball P.W. (1968). In: Tutin T.G., Heywood V.H., Burges N.A., Moore D.M., Valentine D.H., Walters S.M., Webb D.A. (Ed.). *Flora Europaea 2*. Cambridge University Press, London, UK.
- Banerjee S.K., Gupta B.D., Kumar R., Atal C.K. (1980). *Phytochemistry* 19(2), 281.
- Banerjee S.K., Mukhopadhyay S., Gupta B.D., Singh K., Raj S. (1987). *Phytochemistry* 26(6), 1817.
- Baser K.H.C., Ozek T., Kurkcuoglu M., Aytac Z. (2000). *J. Essen. Oil Res.* 12(1), 105.
- Basgel S., Erdemoglu S.B. (2006). *Sci. Total Environ.* 359(1-3), 82.
- Batt A.L., Aga D.S. (2005). *Anal. Chem.* 77(9), 2940.
- Baytop T. (1999). *Therapy with Plants in Turkey (Past and Present)*, Nobel Medical Book House, Istanbul.
- Bellino A., Venturella P., Marino M.L., Servettaz O., Venturella G. (1986). *Phytochemistry* 25(5), 1195.
- Belyi M.B., Bagirov V.Yu., Rasulov F.A. (1983). *Chem. Nat. Compd.* 6, 782.
- Belyi M.B., Ismailov N.M., Rasulov F.A. (1988). *Izv. Akad. Nauk. Biol.* 1, 40.
- Bhardwaj Y.R., Chauhan M., Pareek A., Kishore D. (2013) *Int. Res. J. Pure Appl. Chem.* 3(3), 250.
- Bonesi M., Menichini F., Tundis R., Loizzo M.R., Conforti F., Passalacqua N.G., Statti G.A., Menichini F. (2010). *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 25(5), 622.
- Brar S.K., Dhillon G.S., Soccol C.R. (2013). *Biotransformation of Waste Biomass into High Value Biochemicals*, New York, NY: Springer.
- Brudzinka-Kosior A., Kosior G., Samecka-Cymerman A., Kolon K., Mroz L., Kempers A.J. (2012). *Ecotox. Environ. Safe.* 80, 349.
- Bulatović V., Savikin-Fodulović K., Zdunić G., Popović M. (2006). *J. Essent. Oil Res.* 18, 286.
- Burt S. (2004). *Int. J. Food Microbiol.* 94, 223.
- Cafarchia C., De Laurentis N., Milillo M.A., Losacco V., Puccini V. (1999). *Parassitologia.* 41(4), 587.

- Cannell R. (1998). *Natural Product Isolation*, Humana Press Totowa, New Jersey.
- Carretero Accame M.E., Gomez-Serranillos Cuadrado M.P., Ortega Rouessac-Agero, M.T., Palomino Ruiz-Poveda, O.M. (2011). In: Rai M., Acharya D., Rios J.L. (Ed.). *Ethnomedicinal Plants- Revitalizing of Traditional Knowledge of Herbs.*, Taylor and Francis Group, LLC.
- Carson C.F., Mee B.J., Riley T.V. (2002). *Antimicrob. Agents Ch.* 46(6), 1914.
- Cavalcante R.M., de Andrade M.V.F., Marins R.V., Oliveira L.D.M. (2010). *Microchem. J.* 96, 337.
- Chahardehi A.M., Ibrahim D., Sulaiman S.F. (2009). *J. Appl Biol. Sci.* 3(2), 25.
- Chang Y.X., Zhang Q.H., Li J., Zhang L., Guo X.R., He J., Zhang P., Ma L., Deng Y.R., Zhang B.L., Gao X.M. (2013). *J. Pharmaceut. Biomed.* 77, 71.
- Choi H.S., Song H.S., Ukeda H., Sawamura M. (2000). *J. Agric. Food Chem.* 48, 4156.
- Christensen L.P., Brandt K. (2006). *J. Pharmaceut. Biomed.* 41, 683.
- Chubinidze G.D., Turabelidze D.G., Kemertelidze E.P. (1986). *Chem. Nat. Compd.* 3, 367.
- Chunli C., Zhishu T., Min W., Huawei Z., Xiao S. (2008). *Xiandai Zhongyiyao* 28(4), 70.
- Coassini Lokar L.R., Delben S. (1988). *Phytochemistry* 27, 1073.
- Costea T., Istudor V., Fierascu R., Fierascu I., Botez A. (2013). *Farmacia* 61(1), 162.
- Cox S.D., Mann C.M., Markham J.L., Gustafson J.E., Warmington J.R., Wyllie S.G. (2001). *Molecules* 6(1), 87.
- Cushnie T.P., Lamb A.J. (2005). *Int. J. Antimicrob. Agents.* 26(5), 343.
- David J.F. (2001). *J. American Med. Asso.* 260, 1523.
- Davis P.H., Mill R.R., Tan K. (1988). *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*, Suppl.1. Edinburgh University Press.
- del Rosario Brunetto M., Delgado Cayama Y., Gutierrez L., Clavijo Roa S., Contreras Mendez Y., Galignani M., Zambrano A., Gomez A., Ramos G. (2009). *Food Chem.* 112, 253.
- Demiray S., Pintado M.E., Castro P.M.L. (2009). *Proc. Wrld. Acad. Sci.E.* 30, 312.
- Denyer S.P., Hugo W.B. (1991). In: Denyer S.P., Hugo W.B. (Ed.), *Mechanisms of Action of Chemical Biocides*. Blackwell, Oxford.



- Dincel D., Hatipoglu S.D., Goren A.C., Topcü G. (2013). Turk. J. Chem. 37(4), 675.
- Djeridane A., Yousfi M., Nadjemi B., Boutassouna D., Stocker P., Vidal N. (2006) Food Chem. 97 654.
- Dogan E., Duman H., Tosun A., Kurkcuoglu M., Baser K.H.C. (2006). J. Essent. Oil Res. 18, 57.
- Dogan G.E., Duman H., Pinar N.M. (2011). Turk. J. Bot. 35, 175.
- Dorman H.J., Deans S.G. (2000). J. Appl. Microbiol. 88(2), 308.
- Dragović-Uzelac V., Bursać Kovačević D., Levaj B., Pedisić S., Mezak M., Tomljenović A. (2009). Agric. Conspec. Sci. 74(3), 75.
- Droge W. (2002). Physiol. Rev. 82, 47.
- Dudić B., Rakić T., Šinić arar-Sekukulić J., Atanacković V., Stevanović B. (2007). Arch. Biol. Sci., Belgrade, 59 (4), 341.
- Dugo P., Mondello L., Dugo L., Stancanelli R., Dugo G. (2000). J. Pharmaceut. Biomed. 24, 147.
- Dukhovlina L.I., Avramenko L.G., Sklyar Yu.E., Pimenov M.G. (1975). Chem. Nat. Compd. 11(4), 512.
- Dukhovlina L.I., Avramenko L.G., Sklyar Yu.E., Pimenov M.G. (1976). Chem. Nat. Compd. 6, 811.
- Dukhovlina L.I., Perelson M.E., Sklyar Yu.E., Pimenov M.G. (1974). Chem. Nat. Compd. 3, 308.
- Dukhovlina L.I., Sklyar Yu.E., Perelson M.E. (1973). Chem. Nat. Compd. 9(5), 626.
- Dukhovlina L.I., Sklyar Yu.E., Pimenov M.G. (1974). Chem. Nat. Compd. 6, 785.
- Dukhovlina L.I., Sklyar Yu.E., Pimenov M.G. (1974). Chem. Nat. Compd. 6, 782.
- Dukhovlina L.I., Sklyar Yu.E., Pimenov M.G. (1976). Chem. Nat. Compd. 6, 810.
- Dukhovlina L.I., Sklyar Yu.E., Pimenov M.G. (1980). Chem. Nat. Compd. 6, 832.
- Dukhovlina L.I., Sklyar Yu.E., Sdobnina L.I. (1975). Chem. Nat. Compd. 11(1), 109.
- Dukhovlina L.I., Sklyar Yu.E., Sdobnina L.I., Pimenov M.G. (1979). Chem. Nat. Compd. 5, 721.
- Đorđević V.B., Pavlović D.D., Kocić G.M. (2000). Biohemija Slobodnih Radikala. Niš: Medicinski fakultet.

- FAO/WHO (1999). Joint Expert Committee on Food Additives, “Summary and Conclusions”, in proceedings of the 53<sup>rd</sup> Meeting of Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, Rome, Italy.
- Fernandez-Caceres P.L., Martin M.J., Pablos F., Gonzalez A.G. (2001). *J. Agric. Food Chem.* 49(10), 4775.
- Ferrali M., Signorini C., Caciotti B., Sugherini L., Ciccoli L., Giachetti D., Comporti M. (1997). *FEBS Lett.* 416, 123.
- Filipović-Trajković R., M. Jablanović, Ilić Z. (2001). *Savremena poljoprivreda* 50(1-2), 37.
- Florya V.N., Kuznetsova G.A. (1970). *Plant Resour. (Rastitel'nye Resursy)* 6(4), 571.
- Gemperline, P. J. (2006). *Practical Guide to Chemometrics*, Taylor & Francis Group, London.
- Gomez M.R., Cerutti S., Sombra L.L., Silva M.F., Martinez L.D. (2000). *Sci. Total Environ.* 257, 191.
- Gomez M.R., Cerutti S., Sombra L.L., Silva M.F., Martinez L.D. (2007). *Food Chem. Toxicol.* 45(6), 1060.
- Gonzalez A.G., Barroso J.T., Lopez Dorta H., Luis J.R., Rodriguez Luis F. (1982). *An. Quim. C-Org. Bioq.* 78(3), 407.
- Gonzalez A.G., Barroso J.T., Lopez Dorta H., Luis J.R., Rodriguez Luis F. (1978). *Eur. Anal. Quim.* 74, 979.
- Gonzalez A.G., Barroso J.T., Lopez-Dorta H., Luis J.R., Rodriguez-Luis F. (1979). *Phytochemistry* 18(6), 1021.
- Gonzalez A.G., Lopez Dorta H., Luis J.R., Rodriguez Luis F. (1982). *An. Quim. C-Org. Bioq.* 78(2), 184.
- Gonzalez A.G., Lopez Dorta H., Martin Hierro I., Medina Medina M.C., Rodriguez L.F. (1982). *An. Quim. C-Org. Bioq.* 78(2), 274.
- Grassmann J., Schneider D., Weiser D., Elstner, E.F. (2001). *Arzneim. Forsch. (Drug Res.)* 51, 799.
- Gupta G.S., Gupta N.L. (1974). *Tetrahedron Lett.* 13, 1221.
- Gutteridge J.M.C., Halliwell B. (2010). *Biochem. Biophys. Res. Co.* 393(4), 561.

- Habibi Z., Masoudi S., Rustaiyan A. (2003). *J. Essen. Oil Res.* 15(6), 412.
- Halliwell B., Gutteridge J.M.C. (1999). *Free Radicals in Biology and Medicine*. Clarendon Press, Oxford.
- Halliwell B., Gutteridge J.M.C. (2006). *Free Radicals in Biology and Medicine*, Ed 4. Clarendon Press, Oxford.
- Hanasaki, Y., Ogawa, S., Fukui, S. (1994). *Free Radical Bio. Med.* 16, 845.
- Harvey D. (2000). *Modern Analytical Chemistry*, McGraw Hill Higher Education, USA.
- Hattory K.H., Keith J.D. (2001). *Miner. Deposita.* 36, 799.
- Hernandez F., Ibanez M., Sancho J.V., Pozo O.J. (2004). *Anal. Chem.* 76, 4349.
- Hisamoto M., Kikuzaki H., Ohigashi H., Nakatani N. (2003). *J. Agr. Food Chem.* 51, 5255.
- Hu C., Lee K. (1992). *Nat. Prod. Res. Dev.* 4(1), 6.
- Hu C., Lee K. (1992). *Tianran Chanwu Yanjiu Yu Kaifa* 4(1), 6.
- Hu C.-Q., Chang J.-J., Le K.-H. (1990). *J. Nat. Prod.* 53(4), 932.
- Hu C.Q., Chang J.J., Le K.H. (1990). *J. Nat. Prod.* 53, 932.
- Hu C.Q., Chang J.J., Lee K.H. (1990). *J. Nat. Prod.* 53, 932.
- Hu Q., Noll R.J., Li H., Makarov A., Hardman M., Graham Cooks R. (2005). *J. Mass. Spectrom.* 40(4), 430.
- Huda-Faujan N., Noriham A., Norrakiah A. S., Babji, A.S. (2009). *Afr. J. Biotechnol.* 8(3), 484.
- 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). *J. Natl. Cancer. Inst.* 96(21), 1577.
- Jang K.C., Kim S.C., Song E.Y., Um Y.C., Kim S.C., Lee Y.J. (2008). *Acta Hort.* 765, 49.
- Joa H., Vogl S., Atanasov A.G., Zehl M., Nakel T., Fakhrudin N., Heiss E.H., Picker P., Urban E., Wawrosch C., Saukel J., Reznicek G., Kopp B., Dirsch V.M. (2011). *J. Nat. Prod.* 74, 1513.
- Jose Goncalves M., Tavares A.C., Cavaleiro C., Cruz M.T., Lopes M.C., Canhoto J., Salgueiro L. (2012). *Ind. Crop. Prod.* 39, 204.
- Juven B.J., Kanner J., Schved F., Weisslowicz H. (1994). *J. Appl. Bacteriol.* 76, 626.

- Kabata-Pendias A., Pendias H. (2001). Trace Elements in Soils. Boca Raton, London, New York, CRC Press.
- Kabata-Pendias A., Pendias H. (1989). Mikroelementi v počvah i rastenijah. "Mir", Moskva.
- Kaiser H.F. (1960). Educ. Psychol. Meas. 20, 141.
- Karakašević B. (1987). Mikrobiologija i Parazitologija, Beograd; Zagreb: Medicinska knjiga.
- Kaya A., Demirci B., Baser K.H.C. (2003). Flavour Fragr. J. 18, 159.
- Kaya A., Demirci B., Baser K.H.C. (2010). Turk J. Pharm. Sci. 7, 161.
- Khan S., Shehzad O., Lee K.J., Tosun A., Kim Y.S. (2014). Arch. Pharm. Res. 37, 1496.
- Kim H.J., Chen F., Wu C., Wang X., Chung H.Y., Jin Z. (2004). J. Agric. Food Chem., 52, 2849.
- Kinnear P., Gray C.D. (1994). SPSS for Windows made simple. Hove, UK: Lawrence Erlbaum Associates Publishers.
- Knobloch K., Pauli A., Iberl B., Weigand H., Weis, N. (1989). J. Essent Oil Res. 1, 119.
- Knobloch K., Weigand H., Weis N., Schwarm H.-M., Vigenschow H. (1986). In: Brunke E.J. (Ed). Progress in Essential Oil Research, 16<sup>th</sup> International Symposium on Essential Oils; Germany. Berlin: Walter de Gruyter.
- Kobaisy M., Abramowski Z., Lermer L., Saxena G., Hancock R.E.W., Towers G.H.N., Dooze D., Stokes R.W. (1997). J. Nat. Prod. 60, 1210.
- Kokilavani V., Devi M.A., Sivarajan K., Panneerselvam C. (2005). Toxicol. Lett. 160, 1.
- Kumar R., Gupta B.D., Banerjee S.K., Atal C.K. (1978). Phytochemistry 17(12), 2111.
- Kupeli E., Tosun A., Yesilada E. (2006). J. Ethnopharmacol, 104, 310.
- Kuznetsova G.A., Medvedev V.N., Pavlovic S., Jancic R. (1987). Acta Biologiae et Medicinae Experimentalis 12(2), 93.
- Kuznetsova G.A., Medvedev V.N., Pavlovich S.D., Jancic R. (1981). Chem. Nat. Compd. 5, 659.
- Lacroix D., Prado S., Kamoga D., Kasenene J., Bodo B. (2011). J. Nat. Prod. 74, 2286.
- Lambert R.J.W., Skandamis P.J., Coote G., Nychas J.E. (2001). J. Appl. Microbiol. 91(3), 453.

- Larsen P.K. (1972). *Dansk. Kemi* 53(1), 11
- Lemmich J., Havelund S. (1978). *Phytochemistry* 17(1), 139.
- Lemmich J., Havelund S. (1978). *Phytochemistry*, 17 139-141.
- Lemmich J., Shabana M. (1984). *Phytochemistry* 23(4), 863.
- Leonti M., Casu L., Solinas M.N., Cottiglia F., Caboni P., Floris C., Gertsch J., Saba A.R. (2010). *Nat. Prod. Com.* 5(4), 551.
- Lewis P.J., Lowing R.K., Gomperitz D. (1981). *Clin. Chem.* 27, 926.
- Lin Yu-P., Zong Ya-L., He H., Ding Q.-E., Rao G.-X. (2007). *Nat. Prod. Res. DevTianran Chanwu Yanjiu Yu Kaifa- Natural Product Research & Development* 19(5), 798.
- Liu J.K., Hu L., Dong Z.J., Hu Q. (2004). *Chem. Biodivers.*1, 601.
- Liu N., Yu N.J., Li J., Yang Y., Guo J.F., Zhao Y.M. (2011). *Chromatographia* 73, 1121.
- Liu T., Belov M., Jaitly N., Qian W.-J., Smith R. (2007). *Chem. Rev.* 107(8), 3621.
- Lokar L.R.C., Delben S. (1988). *Phytochemistry* 27(4), 1073.
- Lopez F.F., Cabrera C., Lorenzo M.L., Lopez M.C. (2000). *Sci. Total. Environ.* 257, 191.
- Lopez L.L., Tiller P., Senco M., Schwartz J. (1999). *Rapid. Commun. Mass Sp.* 13(8), 663.
- Lou H.X., Sun L.R., Yu W.T., Fan P.H., Cui L., Gao Y.H., Ma B., Ren D.M., Ji M. (2004). *J. Asian Nat. Prod. Res.* 6, 177.
- Lozak A., Soltys K., Ostapczuk P., Fijalek Z. (2002). *Sci. Total Environ.* 289, 33.
- Magalhaes J., Ferreira R., Marques F., Olivera E., Soares J., Ascensao A. (2007). *Med. Sci. Sports Exerc.* 39, 955.
- Malbert Y. (2014). *Flavonoid lucodiversification with engineered sucrose-active enzymes Biotechnology.* INSA de Toulouse, Doktorska disertacija
- Marčetić M., Božić D., Milenković M., Lakušić B. Kovačević N. (2012). *Nat. Prod. Commun.* 7(8), 1091.
- Marčetić M., Lakušić B., Lakušić D., Kovačević N. (2013). *Chem. Biodivers.* 10, 1653.
- Marković Koder D. (1977). *Devesilje. History of literature*, IX 36, Belgrade.
- Marongiu B., Piras A., Porcedda S., Tuveri E., Maxia A. (2006). *Nat. Prod. Res.* 20(9), 820.

- Masoudi S., Esmaeili A., Khalilzadeh M.A., Rustaiyan A., Moazami N., Akhgar M.R., Varavipoor M. (2006). *Flavour Fragr. J.* 21, 801.
- Matejić J.S. (2013). *Biološka Aktivnost etarskih ulja i ekstrakata odabranih vrsta iz familije Apiaceae*, Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet, Doktorska disertacija.
- Matejić J.S., Džamić A.M., Mihajilov-Krstev T., Rančdović V.N., Krivošej Z.Đ., Marin P.D. (2012). *Cent. Eur. J. Biol.* 7(6), 1116.
- Mc Grath S.P. (1995). In Alloway B.J. (Ed.), *Heavy metals in soils*. Blackie Academic and Professional. Glasgow, U.K.
- Mc Cord J.M. (2000). *Am. J. Med.* 108(8), 652.
- Mercier B., Prost J., Prost M. (2009). *Int. J. Occup. Med. Env.* 22(4), 331.
- Mihaljev T., Tivkov-Baloš M., Cupic Z., Jakšić S. (2014). *Acta Pol. Pharm.* 71(3) 385.
- Mihaljev T.A., Čupić T.N., Tivkov-Baloš M.M., Jakšić S.M. (2015). *Hem. Ind.* 69(2) 143.
- Mikailova N.Kh., Serkerov S.V. (2014). *Proceedings / Azerbaijan National Academy of Sciences, Biological Sciences* 69(1), 16.
- Mikailova, N.Kh., Serkerov, S.V. (2013). *Azerbaijan Pharmaceutical and Pharmacotherapy Journal* 13(2), 18.
- Miliauskas G., Venskutonis P.R., van Beek T.A. (2004). *Food Chem.* 85 2317.
- Mills C., Cleary B.J., Gilmer J.F., Walsh J.J. (2004). *J. Pharm. Pharmacol.* 56(3), 375.
- Milosavljević S., Tešević V., Vučković I., Jadranin M., Vajs V., Soković M., Janačković P., Jovanović A. (2007). *Fitoterapia* 78, 319.
- Mimica-Dukić N. (1997). *Arch. Pharm.* 5, 475.
- Mokbel M.S., Sukanuma T. (2006). *Eur. Food Res. Technol.* 224, 39.
- Moreda-Pineiroa A., Fisherb A., Hill S.J. (2003). *J. Food Compos. Anal.* 16(2), 195.
- Muckensturm B., Diyani F., Reduron J.-P., Hildenbrand M. (1997). *Phytochemistry* 45(3), 549.
- Marković M., Pavlović-Muratspahić D., Matović M., Marković A., Stankov-Jovanović V. (2009). *Biotech. Biotechnol. Eq.* 23, 1225.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (2003). *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing*. Wayne, M100-S14.PA:NCCLS

- National Institute of Standards and Technology. (2005). NIST Chemistry WebBook, Nist Standard Reference database, <http://webbook.nist.gov/chemistry/>
- Nerland D.E. (2007). *Drug Metab. Rev.* 39, 235.
- Nešković M., Konjević R., Čulafić Lj. (2003). *Fiziologija biljaka*. NNK International Beograd, Institut za botaniku i botanička bašta „Jevremovac“- biološki fakultet, Beograd
- Nguefack J., Budde B.B., Jakobsen M. (2004). *Lett. Appl. Microbiol.* 29, 395.
- Nielsen B.E., Larsen P.K., Lemmich J. (1970). *Acta Chem. Scand.* 24(8), 2863.
- Nielsen B.E., Larsen P.K., Lemmich J. (1971). *Acta Chem. Scand.* 25(2), 529.
- Nikolić R., Đorđević M. (2009). *Hemijski pregled* 50(6), 150.
- Nikolić V. (1973). In: M. Josifović (Ed.), *Apiaceae*. Serbian Academy of Science and Art, Belgrade.
- Nikolić V. (1975). In: Josifović M. (Ed.). *The Flora of FR Serbia V*, Serbian Academy of Sciences and Arts: Belgrade.
- Nookabkaew S., Rangkadilok N., Satayavivad J. (2006). *J. Agric. Food Chem.* 54(18), 6939.
- Orčić D., Francišković M., Bekvalac K., Svirčev E., Beara I., Lesjak M., Mimica-Dukić N. (2014). *Food Chem.* 143, 48.
- Ozcan M.M., Akbulut M. (2007). *Food Chem.* 106, 852.
- Ozturk S., Ercisli S. (2006). *World J. Microb. Biot.* 22, 261.
- Park A.Y., Park S.Y., Lee J., Jung M., Kim J., Kang S.S., Youma J.R., Hana S.B. (2009). *Biomed. Chromatogr.* 23, 1034.
- Pavela R. (2009). *Parasitol. Res.* 105, 887.
- Pavela R. (2011). *Afr. J. Agr. Res.* 6(12), 2895.
- Pavlovic S.D., Kuznetsova G.A. (1971). *Plant Resour. (Rastitel'nye Resursy)* 7(3), 400.
- Peroutka R., Schulzov V., Botek P., Hajslova J. (2007). *J. Sci. Food Agr.* 87, 2152.
- Pico Y., Blasco C., Font G. (2004). *Mass Spectrom. Rev.* 23, 45.
- Pieroni A., Janiak V., Durr C.M., Ludeke S., Trachsel E., Heinrich M. (2002). *Phyther. Res.* 16, 467.
- Pimenov M.G., Leonov M.V. (1993). *The Genera of the Umbelliferae: A Nomenclator*. Royal Botanic Gardens: Kew.

- Plumb R.S., Dear G.J., Mallett D.N., Higton D.M., Pleasance S., Biddlecombe R.A. (2001). *Xenobiotica*. 31(8-9), 599.
- Primiano T., Sutter T.R., Kensler T.W. (1997). *Adv. Pharmacol.* 38, 293.
- Prior R.L., Cao G. (2000). *Hortic. Sci.* 35(4), 588.
- Qurbanova F.Q., Serkerov S.V. (2011). *Azerbaijan Pharmaceutical and Pharmacotherapy Journal* 11(1), 31.
- Qurbanova F.Q., Serkerov S.V. (2012). *Plant Resour. (Rastitel'nye Resursy)* 48(2), 228.
- Rabtti El H.M.A., Natić M.M., Milojković-Opsenica D.M., Trifković J.Đ., Tosti T., Vučković I.M., Vajs V., Tešić T.Lj. (2012). *J. Serb. Chem. Soc.* 77(10), 1443.
- Radojević M., Bashin V. (1999). *Praktical Environmental Analysis*, RSC, Cambridge.
- Rahmatollah R., Mahbobeh R. (2010). *Pharmacognosy Res.* 2(4), 267.
- Raičević P. (2008). *Vrednovanje zemljišta kao prirodnog resursa Pivske planine i predlog mera za racionalno korišćenje*, Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, Magistarska teza.
- Rasulov F.A., Belyi M.B. (1987). *Chem. Nat. Compd.* 3, 448.
- Razavi S.M., Imanzadeh G., Jahed F.S., Zarrini G. (2013). *Russ. J. Bioorg. Chem.* 39, 215.
- Račić S., Onjia A., Đogo S., Slavković L., Popović A. (2005). *Talanta* 67, 233.
- Račić S., Kuntić V. (2013). *Int. J. Food Prop.* 16(1), 1.
- Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C. (1999). *Free Radic. Bio. Med.* 26(9-10), 1231.
- Reig M., Toldra F. (2008). *Food Anal. Methods* 1, 2.
- Rosselli S., Maggio A., Bellone G., Formosan C., Basile A., Cicala C., Alfieri A., Bruno M. (2007). *Planta Med.* 73(2), 116.
- Russell A.D. (2003). *LANCET Infect. Dis.* 3(12), 794
- Sagova L.I., Kuznjecova G.A., Pavlovic S.D., Nikolic R.T. (1980). *Acta Pharm. Jugosl.* 30(2), 93.
- Sartoratto A., Machado A.L.M., Delarmelina C., Figueira G.M., Dusrte M.C.T., Rehder V.L.G. (2004). *Braz. J. Microb.* 35, 275.
- Savikin-Fodulović K., Zdunić G., Tasić S. (2006). *J. Essent. Oil Res.* 18, 156.



- Savina A.A., Bandyshev V.V., Pimenov M.G. (1972). *Chem. Nat. Compd.* 8(5), 651.
- Savina A.A., Nikonov G. K., Bankovskii A.I. (1970). *Chem. Nat. Compd.* 6(5), 540.
- Savina A.A., Perelson M.E., Bankovskii A.I., Nikonov G. K. (1970). *Chem. Nat. Compd.* 6(4), 412.
- Savina A.A., Perelson M.E., Nikonov G. K., Bankovskii A.I. (1970). *Chem. Nat. Compd.* 6(5), 536.
- Savina A.A., Perlson M.E. (1973). *Chem. Nat. Compd.* 2, 286.
- Savina A.A., Pimenov M.G. (1972). *Plant Resour. (Rastitel'nye Resursy)* 8(3), 361.
- Scocciati C. (2006). *Acta Herpetol.* 1, 77.
- Shagova L.I., Florya V.N., Kuznetsova G.A., Perelson M.E. (1973). *Chem. Nat. Compd.* 9(5), 631.
- Sharma S. (1996). *Applied Multivariate Techniques*, Wiley & Sons, New York.
- Shavarda A.L., Danchul T.Yu., Shagova L.I., Bukreeva T.V., Medvedeva N.A. (2002). *Plant Resour. (Rastitel'nye Resursy)* 38(3), 65.
- Shavarda A.L., Danchul T.Yu., Shagova L.I., Bukreeva T.V., Medvedeva N.A. (2001). *Plant Resour. (Rastitel'nye Resursy)* 37(4), 62.
- Shehzad O., Khan S., Ha I.J., Park Y., Tosun A., Kim Y.S. (2013). *J. Chromatography A* 1310, 66.
- Shi X., Liu M., Zhang M., Zhang K., Liu S., Qiao S., Shi R., Jiang X., Wanga Q. (2013). *Food Chem.* 141, 357.
- Sikkema J., De Bont J.A.M., Poolman B. (1994). *J. Biol. Chem.* 269(11), 8022.
- Sikkema J., De Bont J.A.M., Poolman B. (1995). *Microbiol. Rev.* 59(2), 201.
- Simonović D. (1959). *Botanical Dictionary*. Serbian Academy of Sciences and Arts, Belgrade.
- Singh G., Kapoor P.S., Pandey S.K., Singh U.K., Singh R. K. (2002). *Phytother. Res.* 16, 680.
- Sitzmann J., Habegger R., Schnitzlera W.H., Grassmann J. (2014), *Chem. Biodivers.* 11(12), 1978.
- Skalicka-Wozniaka K., Losb R., Glowniaka K., Malm A. (2010). *Nat. Prod. Commun.* 5(9), 1427.

- Skandamis P., Koutsoumanis K., Fasseas K., Nychas G.J.E. (2001). *Ital. J. Food Sci.* 13(1), 65.
- Sokolova A.I., Bankovskii A.I., Pimenov M.G., Blokhina T.A. (1970). *Chem. Nat. Compd.* 6(6), 768.
- Sokolova A.I., Sklyar Yu.E., Pimenov M.G. (1977). *Khim. Farm. Zh.* 11(8), 53.
- Sokolova A.I., Sklyar Yu.E., Pimenov M.G. (1980). *Chem. Nat. Compd.* 5, 715.
- Sokolova A.I., Sklyar Yu.E., Sdobnina L.I. (1974). *Chem. Nat. Compd.* 6, 784.
- Soković M., van Griensven L.J.L.D. (2006). *Eur. J. Plant Pathol.* 116, 211.
- Spalik K., Reduron J.P., Downie S.R. (2004). *Plant Syst. Evol.* 243, 189.
- Stankov-Jovanović V., Nikolić-Mandić S., Mandić Lj., Mitić V. (2007). *J. Clin. Lab. Anal.* 21, 124.
- Stankov-Jovanović V.P., Ilić M.D., Mitić V.D., Mihajilov-Krstev T.M., Simonović S.R., Nikolić Mandić S.D., Tabete J.C., Cole R.B. (2015). *J. Pharmaceut. Biomed.* 111, 78.
- Stanojković-Sebić A., Pivić R., Josić D., Dinić Z., Stanojković A. (2015). *Tarim Bilim. Derg.* 21, 317.
- Stein S.E. (1990). National Institute of Standards and Technology (NIST) Mass Spectral Database and Software, Version 3.02.
- Stjepanović L., Ćorović M., Pavlović S. (1970). *Bull. Bot. Inst. University Belgrade* 1-4, 115.
- Stojković D., Glamoclija J., Soković M., Grubišić D., Petrović S., Kukić J., Ristić M. (2008). *Nat. Prod. Commun.* 3, 1935.
- Stojković S., Petrović S., Kukić J., Dzamić A., Ristić M., Milenković M., Glamoclija J., Soković M., Stojković D. (2009). *Chem. Nat. Compd.* 45, 253.
- Strange R.N. (1993). *Plant Disease Control Towards Environmentally Acceptable Methods.* London: Chapman & Hall.
- Syed M., Chaudhary F.M., Bhatti, M.K. (1989). *Pak. J. Sci. Ind. Res.*, 32(5), 316.
- Szymczycha-Madeja A., Welna M., Pohl P. (2015). *Microchem. J.* 121, 122.
- Šiljegović J., Glamoclija J., Soković M., Vučković I., Tešević V., Milosavljević S., Stešević D. (2011). *Nat. Prod. Commun.* 6(2), 263.
- Škrbić B., Ćupić S., Cvejanov J. (2002). *Physiology* 12, 12.

- Takahashi Y., Inaba N., Kuwahara S., Kuki. (2003). *Biosci. Biotech. Biochem.* 67, 195.
- Tandan S.K., Chandra S., Tripathi H.C., Lal J. (1990). *Fitoterapia* 61(4), 360.
- Tietz N. W. (1997). *Osnovi Kliničke Hemije, Velarta, Beograd.*
- Tkachev A.V., Korolyuk E.A., Konig W., Kuleshova Y.V., Letchamo W. (2006). *J. Essen. Oil Res.* 18(1), 100.
- Todorović M., ĐurČević P., Antonijević V. (1997). *Optičke Metode Instrumentalne Analize, Hemijski fakultet, Beograd.*
- Tokalioglu S. (2012). *Food Chem.* 134, 2504.
- Tosun A. (2006). *Chem. Nat. Compd.* 42(5), 489.
- Tosun A., Baba M., Bahadır O., Okuyama T. (2006). *Pharm.Biol.* 44(7), 528.
- Tosun A., Baba M., Okuyama T. (2007). *J. Nat. Med.* 61, 402.
- Tosun A., Baba M., Ozkal N., Okuyama T. (2003). *Natural Medicines (Tokyo, Japan)* 57(3), 117.
- Tosun A., Bahadır O., Dinc E. (2007). *Chromatographia* 66, 677.
- Tosun A., Kodama T., Nakanishi H., Baba M., Okuyama T. (2005). *Nat. Med.* 59(2), 85.
- Tosun A., Kurkcuoglu M., Dogan E., Duman H., Basr K.H.C. (2006). *Flavour Fragr. J.* 21, 257.
- Tosun A., Ozkal N., Baba M., Okuyama T. (2005). *Turk. J. Chem.* 29, 327.
- Tosun A., Ozkal N., Yildiz S. (2004). *J. Fac. Pharm, Ankara* 33(3), 151.
- Turabelidze D.G., Kemertelidze E.P. (1976). *Chem. Nat. Compd.* 4, 536.
- Tuzen M. (2003). *Microchem. J.* 74, 289.
- Ubavić M., Bogdanović D. (2001). *Agrohemija. Institut za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad.*
- Ultee A., Bennink M.H.J., Moezelaar R. (2002). *Appl. Environ. Microbiol.* 68(4), 1561.
- Van den Dool H., Kratz P.D. (1963). *J. Chromatogr. A* 11, 463.
- Vandyshv V.V., Sklyar Yu. E., Dukhovlina L. I., Pimenov M. G. (1975). *Chem. Nat. Compd.* 11(4), 530.
- Verstraeten S.V., Hammerstone J.F., Keen C.I., Fragac G., Oteiza P.I. (2005). *J. Agr. Food Chem.*, 53, 5041.

- Vogl S., Zehl M., Picker P., Urban E., Wawrosch C., Reznicek G., Saukel J., Kopp B. (2011). *J. Agr. Food Chem.* 59, 4371.
- Vučković I., Trajković V., Macura S., Tešević V., Janačković P., Milosavljević S. (2007). *Phytother. Res.* 21, 790.
- Vučković I., Vajs V., Stanković M., Tešević V., Milosavljević S. (2010). *Chem. Biodivers.* 7, 698.
- Widelski J., Melliou E., Fokialakis N., Magiatis P., Glowniak K., Chinou I. (2005). *J. Nat. Prod.* 68, 1637.
- Wink M. (2003). *Phytochemistry* 64(1), 3.
- Wold, S. (1995). *Chemometr. Intell. Lab.* 30(1), 109.
- Xiao Y., Yang L., Cui S., Liu X., Liu D., Ma T.J., Gukou Y. (1995). *China J. Chin. Mater. Med.*, (*Zhongguo Zhongyao Zazhi*) 20(5), 294.
- Yang S.P., Han L.J., Chen X.Y., Gao Z. (2011). *Acta Crystallogr. Sect. E: Struct. Rep. Online* 67 (12), o3253.
- Yang X.W., Zhang C.Y., Zhang B.G., Lu Y., Luan J.W., Zheng Q.T. (2009). *J. Asian Nat. Prod. Res.* 11, 698.
- Yildirim A., Mavi A., Kara A. (2001). *J. Agric. Food Chem.* 49, 4083.
- Zhang L., Tosun A., Baba M., Okada Y., Wu L., Okuyama T. (2010). *Nat. Prod. Commun.* 5(7), 1067.
- Zhao L., Huang C., Shan Z., Xiang B., Mei L. (2005). *J. Chromatogr. B* 821, 67.
- Zhishen J. Mengcheng T. Jianming W. (1999). *Food Chem.* 64, 555.
- Zong Y.L, Lin Y.P., Ding Q.E., He H., Rao G.X. (2007). *J. Chin. Med. Mater. (Zhong Yao Cai)* 30, 42.

## **7. Prilozi**

**Prilog 1.** Korelaciona matrica rezultata ispitivanja antioksidativne aktivnosti (ABTS, DPPH, ukupna redukciona moć, ukupni fenoli, ukupni flavonoidi) etarskog ulja i ekstrakata različite polarnosti vegetativnih delova (list, cvet, plod i koren) biljke *S. rigidum*

**Prilog 2.** Korelaciona matrica rezultata ispitivanja antioksidativne aktivnosti (ABTS, DPPH, ukupna redukciona moć, ukupni fenoli, ukupni flavonoidi) etarskog ulja i ekstrakata različite polarnosti vegetativnih delova (list, cvet, plod i koren) biljke *S. pallasii*







## **8. Biografija sa bibliografijom**

**Marija (Dragoslav) Ilić** je rođena 17. maja 1983. godine u Aleksincu. Osnovnu školu i Gimnaziju je završila u Aleksincu sa odličnim uspehom. Prirodno-matematički fakultet u Nišu (Univerzitet u Nišu), Odsek za hemiju, je upisala školske 2001/02. godine. Diplomirala je jula 2007. godine sa prosečnom ocenom 7,96 i ocenom 10 na diplomskom ispitu i stekla zvanje diplomirani hemičar. Tema diplomskog rada bila je „Hemijski sastav i analiza etarskog ulja biljne vrste *Centaurium erytrea*“, Univerzitet u Nišu, Srbija, 2007.

Školske 2007/08. godine je upisala specijalističke akademske studije na Prirodno-matematičkom fakultetu u Nišu (Univerzitet u Nišu), Departman za hemiju, Katedra za analitičku hemiju i položila sve planom i programom predviđene ispite sa prosečnom ocenom 9,00 i stekla zvanje diplomirani hemičar- specijalista. Tema specijalističkog rada bila je „Sadržaj teških metala u biljnim vrstama i zemljištu sa poštarišta i van njega na planini Vidlič“. Školske 2010/11. godine je upisala doktorske akademske studije na Prirodno-matematičkom fakultetu u Nišu (Univerzitet u Nišu), Departman za hemiju, Katedra za analitičku hemiju i položila sve planom i programom predviđene ispite, sa prosečnom ocenom 10.

Nakon što je 2011. godine stekla zvanje istraživač-saradnik, zasnovala je radni odnos na Prirodno-matematičkom fakultetu (Univerzitet u Nišu) u navedenom svojstvu i započela istraživanja u okviru projekata Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije („Prirodni proizvodi biljaka i lišajeva: izolovanje, identifikacija, biološka aktivnost i primena“, evidencioni broj 172047 i „Razvoj novih i poboljšanje postojećih elektrohemijskih, spektroskopskih i protočnih (FIA) metoda za praćenje kvaliteta životne sredine“, evidencioni broj 172051).

U toku doktorskih studija, Marija Ilić je kao saradnik u nastavi bila angažovana u izvođenju eksperimentalnih vežbi iz predmeta Analitička hemija 2, Analitička hemija 3 i Odabrana poglavlja volumetrijske analize, i kao stručni saradnik, magacioner. Učestvovala je na nučnim skupovima u zemlji i inostranstvu i kao autor i koautor je publikovala rezultate istraživanja u međunarodnim i nacionalnim časopisima.

Marija Ilić je objavila dva rada u vrhunskim međunarodnim časopisima (M21), četiri radova u istaknutim međunarodnim časopisima (M22), devet radova u časopisima međunarodnog značaja (M23), jedan rad u časopisu međunarodnog značaja (M24),

sedam radova u časopisima nacionalnog značaja (M53), jedno poglavlje u knjizi međunarodnog značaja (M14), 33 rada saopštenih na međunarodnim simpozijumima štampanim u izvodu (M34). Zvezdicom su označeni radovi iz doktorske disertacije.

### ***Bibliografija***

#### **Radovi objavljeni u naučnim časopisima:**

##### **M21**

1. \*V.P. Stankov-Jovanović, M.D. Ilić, V.D. Mitić, T.M. Mihajilov-Krstev, S.R. Simonović, S.D. Nikolić Mandić, J.C. Tabet, R.B. Cole, **Secondary metabolites of *Seseli rigidum*: Chemical composition plus antioxidant, antimicrobial and cholinesterase inhibition activity**, (2015), *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 111, 78–90.
2. V.P. Stankov Jovanovic, M.D. Ilic, M.S. Markovic, V.D. Mitic, S.D. Nikolic Mandic and G.S. Stojanovic, **Wild fire impact on copper, zinc, lead and cadmium distribution in soil and relation with abundance in selected plants of Lamiaceae family from Vidlic Mountain (Serbia)**, (2011), *Chemosphere*, 84(11), 1584-1591.

##### **M22**

1. \*Marija D. Ilić, Vesna P. Stankov Jovanović, Violeta D. Mitić, Olga P. Jovanović, Tatjana M. Mihajilov-Krstev, Marija S. Marković, Gordana S. Stojanović, **Comparison of chemical composition and biological activities of *Seseli rigidum* fruit essential oils from Serbia**, (2015), *Central European Journal of Chemistry (Open Chemistry)*, 13(1), 42-51.
2. Violeta D. Mitic, Vesna P. Stankov Jovanovic, Marija D. Ilic, Snezana D. Nikolic Mandic, **Impact of wild fire on soil characteristics and some metal content in selected plants species of Geraniaceae family**, (2015), *Environmental Earth Sciences*, 73(8), 4581-4594.
3. Violeta Mitic, Marija Ilic, Marija Dimitrijevic, Jelena Cvetkovic, Slobodan Ciric, Vesna Stankov Jovanovic, **Chemometric characterization of peach, nectarine and plum cultivars according to fruit phenolic content and antioxidant activity**, (2016), *Fruits*, 71(1), 57-66.
4. Violeta Mitić, Vesna Stankov Jovanović, Marija Ilić, Olga Jovanovic, Aleksandra Djordjevic, Gordana Stojanović, ***Dittrichia graveolens* (L.) Greuter essential oil-chemical composition, multivariate analysis, and antimicrobial activity**, 2016, *Chemistry and Biodiversity*, 13(1), 85-90.

##### **M23**

1. \*Vesna Stankov Jovanović, Strahinja Simonović, Marija Ilić, Marija Marković, Violeta Mitić, Aleksandra Djordjević, Snežana Nikolić-Mandić, **Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Seseli pallasii* Besser. (syn *Seseli varium* Trev.) essential oils**, (2016), *Records of Natural Products*, 10(3), 277-286.

2. Stankov-Jovanović Vesna P., Mitić Violeta D., Ilić Marija D., Mandić Ljuba M., Nikolić-Mandić Snežana D., **Enzymatic kinetic method for determination of propranolol hydrochloride in pharmaceuticals based on its inhibitory effect on cholinesterase**, (2012), *Hemijska industrija*, 66, 677-684.
3. Gordana S. Stojanović, Violeta D. Mitić, Vesna P. Stankov-Jovanović, Marija D. Ilić, Olga P. Jovanović, Goran M. Petrović, **The antioxidant characteristics of the selected plant species growing under post fire environmental conditions**, (2013), *Oxidation Communications*, 36(1), 26-32.
4. T. Mihajilov-Krstev, B. Zlatkovic, V. Stankov Jovanovic, M. Ilic, V. Mitic, G. Stojanovic, **Antioxidant and antimicrobial activities of almond-leaved pear (*Pyrus spinosa forssk.*) fruits**, (2013), *Oxidation Communications*, 36(4), 1079-1089.
5. Mitić Violeta D., Stankov-Jovanović Vesna P., Ilić Marija D., Vasiljević Perica J., Zabar Andrea Lj., Stojanović Gordana S., **The antioxidant, hemolytic and cholinesterase inhibition properties of *Galium verum L.* and *Tragopogon pratensis subsp pratensis***, (2014), *Bulgarian Chemical Communications*, 46(2), 269-276.
6. Simonović Strahinja R., Stankov-Jovanović Vesna P., Mitić Violeta D., Ilić Marija D., Petrović Goran M., Stojanović Gordana S., **Chemical Composition of *Angelica panicii* Essential Oil Determined by Liquid and Headspace GC-MS Techniques**, (2014), *Natural Product Communications*, 9(2), 271-272.
7. V. D. Mitić, V. P. Stankov-Jovanović, M. D. Ilić, J. S. Cvetković, M. V. Dimitrijević and G. S. Stojanović, **In vitro Antioxidant Activity of Methanol Extract of *Allium scorodoprasum***, (2014), *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 20: 1130-1136.
8. Mitić Violeta, Stankov-Jovanović Vesna, Cvetković Jelena, Dimitrijević Marija, Ilić Marija, Nikolić-Mandić Snežana, **Application of multivariate statistical approach to identify element sources in parsley (*Petroselinum crispum*)**, (2015), *Toxicological and Environmental Chemistry*, 97(6), 754-765.
9. Violeta Mitić, Vesna Stankov-Jovanović, Aleksandra Djordjević, Marija Ilić, Strahinja Simonović, Gordana Stojanović, **Chemical Composition of the Essential oil of *Laserpitium latifolium* from Serbia**, (2015), *Natural Product Communications*, 10(4), 649-651.

#### **M24**

1. Violeta D. Mitić, Vesna P. Stankov-Jovanović, Marija D. Ilić, Snežana Č. Jovanović, Snežana D. Nikolić-Mandić, **Uticaj požara na sadržaj teških metala u biljkama i zemljištu**, (2013), *Zaštita materijala*, 54, Broj 1, 75-82.

#### **M53**

1. \*Marija Ilić, Vesna Stankov Jovanović, Violeta Mitić, Marija Dimitrijević, Jelena Cvetković, Snežana Tošić, **Toxic metals content and safe use of *Seseli pallasii* herb**, (2016), *Safety Engineering*, 6(1), 1-5.

2. Nešić M, Marković M, Trajković R, Pavlović D, Stankov-Jovanović V, Ilić M, **Content of total organic acids in plants from fire affected forest**, (2010), *Biologica Nyssana*, 1(1-2), 65-69.
3. Marija Ilić, Ljubica Svilar, Snežana Jovanović, Aleksandra Đorčević, Violeta Mitić, Snežana Nikolić-Mandić, Vesna Stankov-Jovanović, **Determination of selected pesticides in honey by LC-MS-IT: Effects of sample preparation**, (2012), *Safety Engineering*, 2(4), 195-200.
4. Marković S. Marija, Stankov Jovanović Vesna, Mitić Violeta, Stamenković Slaviša, Ilić Marija, Pešić Dušica, **Study of oak forests and scrubs of hornbeam vegetation, metals content of *Teucrium chamedrys* and soils the first year after wildfire on Vidlic Mountain**, (2015), *Safety Engineering*, 5(2) 61-68.
5. Stamenković Slaviša, Marković Marija, Stankov Jovanović Vesna, Mitić Violeta, Marija Ilić, **Total content of organic acid in plants collected second year after the wild fire**, (2016), *Safety Engineering*, 6(1), 7-11.
6. Vesna Stankov Jovanović, Violeta Mitić, Jelena Cvetković, Marija Ilić, Slobodan Ćirić, Snežana Nikolić-Mandić, Gordana Stojanović, **An innovative approach to environmental sample preparation for determination of polycyclic aromatic hydrocarbons by GC-MS using new sorbents in QuEChERS technique**, *Safety Engineering* (2015), 5(1) 1-7.
7. Tatjana Mihajilov-Krstev, Bojan Zlatković, Marija Ilić, Vesna Stankov-Jovanović, Violeta Mitić, **Antimicrobial and antioxidant potential of wild growing *Silene baccifera* (L.) Roth. (Caryophyllaceae) fruits juice**, (2015), *Biologica Nyssana* 6(2), 55-58.

**Poglavlje u knjizi:**

**M14**

1. Vesna Stankov Jovanovic, Violeta Mitic, Snezana Nikolic-Mandic, Marija Ilic, Strahinja Simonovic, **Heavy Metals in the Post-catastrophic Soils, Heavy Metal Contamination of Soils: Monitoring and Remediation**, eds. Irena Sherameti and Ajit Varma, Soil Biology Series, Chapter 1, (Vol. 44; DOI 10.1007/978-3-319-14526-6), Springer International Publishing Switzerland, 2015.

**Međunarodne konferencije:**

**M34**

1. Ilić M, Marković M, Mitić V, Mandić S, Stankov-Jovanović V, **Sadržaj teških metala u biljkama porodice Lamiaceae i zemljištu sa požarišta i van njega na planini Vidlič**, 10<sup>th</sup> Symposium on the Flora of Southeastern Serbia and Neighbouring Regions, Vlasinsko jezero, Serbia (Jun 2010)
2. Cvetković J, Dimitrijević M, Ilić M, Stankov-Jovanović V, Petrović G, **Antioksidaciona aktivnost metanolnih ekstrakatamaline, kupine, višnje i ribizle**, 10<sup>th</sup> Symposium on the Flora of Southeastern Serbia and Neighbouring Regions, Vlasinsko jezero, Serbia (Jun 2010)
3. Dimitrijević M, Cvetković J, Mitić V, Marković M, Ilić M, Stankov-Jovanović V, **Antioksidativne osobine nekih biljnih vrata sa požarišta na planini Vidlič**,

- 10<sup>th</sup> Symposium on the Flora of Southeastern Serbia and Neighbouring Regions, Vlasinsko jezero, Serbia (Jun 2010)
4. Radojković I, Ćirić I, Mitić V, Ilić M, Đurić V, Stankov-Jovanović V, **Antioksidativne osobine pojedinih vrsta povrća**, 10<sup>th</sup> Symposium on the Flora of Southeastern Serbia and Neighbouring Regions, Vlasinsko jezero, Serbia (Jun 2010)
  5. Marković M, Ilić M, Pavlović-Muratspahić D, Đorđević A, Palić i, Mitić V, Stankov-Jovanović V, **Uticaj nekontrolisanog požara na antioksidantnu i antimikrobnu aktivnost nekih biljnih vrsta iz familije Lamiaceae**, 10<sup>th</sup> Symposium on the Flora of Southeastern Serbia and Neighbouring Regions, Vlasinsko jezero, Serbia (Jun 2010)
  6. Nešić M, Marković M, Trajković R, Pavlović D, Stankov-Jovanović V, Ilić M, **Content of total organic acids in plants from fire affected forest**, 10<sup>th</sup> Symposium on the Flora of Southeastern Serbia and Neighbouring Regions, Vlasinsko jezero, Serbia (Jun 2010)
  7. M. Ilić, V. Mitić, S. Nikolić Mandić, V. Đurić, V. Stankov Jovanović, Determination of heavy metals in horseradish (*Armoratica rusticana*) and carrot (*Daucus carota*) from different locations, **16<sup>th</sup> EUROanalysis, European Conference on Analytical Chemistry**, Challenges in Modern Analytical Chemistry, Belgrade, Serbia (Septembar 2011)
  8. M. Ilić, Lj. Svilar, V. Mitić, S. Nikolić-Mandić, V. Stankov-Jovanović, Tandem liquid chromatography/ion trap mass spectrometry validated method to quantify propranolol in human plasma, **16<sup>th</sup> EUROanalysis, European Conference on Analytical Chemistry**, Challenges in Modern Analytical Chemistry, Belgrade, Serbia (Septembar 2011)
  9. Marija Ilić, Violeta Mitić, Marija Marković, Vesna Stankov-Jovanović, **Heavy metals determination in species of Geraniaceae and corresponding soils after wild fire**, Medicinal and aromatic plants in generating of new values in 21<sup>st</sup> century, Sarajevo, Bosnia and Herzegovina, (Novembar 2011)
  10. Strahinja Simonović, Vesna Stankov Jovanović, Violeta Mitić, Gordana Stojanović, Marija Ilić, **Screening of biological activities of *Trollius europaeus* L. extracts: antioxidant and anticholinesterase properties**, Medicinal and aromatic plants in generating of new values in 21<sup>st</sup> century, Sarajevo, Bosnia and Herzegovina, (Novembar 2011)
  11. T. Mihajilov-Krstev, B. Zlatković, M. Ilić, V. Stankov-Jovanović, V. Mitić, **Comparative study of antibacterial and antioxidant activities of wild growing fruits juices**, Medicinal and aromatic plants in generating of new values in 21<sup>st</sup> century, Sarajevo, Bosnia and Herzegovina, (Novembar 2011)
  12. Budimir S. Ilić, Dragoljub I. Miladinović, Nikola D. Nikolić, Dejan M. Nikolić, Marija D. Ilić, **Minerals and antioxidants in *Oxytropis pilosa* (L.) DC.**, Medicinal and aromatic plants in generating of new values in 21<sup>st</sup> century, Sarajevo, Bosnia and Herzegovina, (Novembar 2011)
  13. Marija Ilić, Marija Marković, Violeta Mitić, Vesna Stankov-Jovanović, **Antioxidant properties of *Seseli rigidum* Waldst. & Kit. extracts of different polarity**, Medicinal and aromatic plants in generating of new values in 21<sup>st</sup> century Sarajevo, Bosnia and Herzegovina, (Novembar 2011)

14. Dragoljub I. Miladinović, Budimir S. Ilić, Nikola D. Nikolić, Dejan M. Nikolić, Marija D. Ilić, **Antioxidant profile of *Astragalus onobrychis* L. subsp. *chlorocarpus* (Griseb) S. Kozuharov et D. K. Pavlova**, Medicinal and aromatic plants in generating of new values in 21<sup>st</sup> century, Sarajevo, Bosnia and Herzegovina, (Novembar 2011)
15. Gordana S. Stojanović, Violeta D. Mitić, Vesna P. Stankov-Jovanović and Marija D. Ilić, **Antioxidant activity of selected plant species growing under normal and post fire conditions on Vidlic mountain (Serbia)**, 10<sup>th</sup> Indo-Italian Workshop on Chemistry and Biology of Antioxidants, Rome, Italy, (Novembar 2011)
16. Ilić M., Stankov-Jovanović V, Jovanović O, Mitić V, Mihajilov-Krstev T, Stojanović G, **Chemical composition and biological activities of *Seseli rigidum* Waldst. & Kit. fruit essential oils**, 43<sup>rd</sup> International Symposium on Essential Oils (ISEO2012), Lisbon, Portugal, (Septembar 2012)
17. Snežana Jovanović, Marija Marković, Strahinja Simonović, Marija Ilić, Vesna Stankov-Jovanović, Violeta Mitić, Snežana Nikolić-Mandić, **Distribution of iron, zinc, copper, cadmium and lead in *Aegopodium podagraria*, *Chelidonium majus* and *Hypericum perforatum* from Vidlic Mountain (Serbia)**, XXII Congress of Chemists and Technologists of Macedonia, Ohrid, Macedonia, (Septembar 2012)
18. V. Mitić, M. Ilić, S. Simonović, S. Nikolić-Mandić, V. Stankov Jovanović, **Does wildfire affect heavy metals content in herbs used in traditional medicine?**, XXII Congress of Chemists and Technologists of Macedonia, Ohrid, Macedonia, (Septembar 2012)
19. Snežana Jovanović, Marija Marković, Strahinja Simonović, Marija Ilić, Vesna Stankov-Jovanović, Violeta Mitić, Gordana Stojanović, **Relation of different concentrations of *Allium flavum* bulb extract and its antioxidant characteristics**, XXII Congress of Chemists and Technologists of Macedonia, Ohrid, Macedonia, (Septembar 2012)
20. V. Mitić, M. Ilić, S. Nikolić Mandić, S. Tošić, A. Pavlović, V. Stankov Jovanović, **Using ICP instrumentation for fast and accurate determination of Cr, Mn, Zn, Cu, Pb and Cd in some vegetables**, XXII Congress of Chemists and Technologists of Macedonia, Ohrid, Macedonia, (Septembar 2012)
21. Marija Ilić, Snežana Jovanović, Strahinja Simonović, Aleksandra Đorđević, Violeta Mitić, Snežana Nikolić-Mandić, Vesna Stankov-Jovanović, **Application of ANOVA single-factor analysis on toxic elements content in *Daucus carota* from south-east Serbia**, Belgrade Food International Conference, Belgrade, Serbia, (Novembar 2012)
22. Marija Ilić, Ljubica Svilar, Snežana Jovanović, Aleksandra Đorđević, Violeta Mitić, Snežana Nikolić-Mandić, Vesna Stankov-Jovanović, **Effects of honey sample preparation on the determination of selected pesticides applying LC-MS-IT method**, Belgrade Food International Conference, Belgrade, Serbia, (Novembar 2012)
23. Marija Ilić, Snežana Jovanović, Strahinja Simonović, Violeta Mitić, Vesna Stankov-Jovanović, Snežana Nikolić-Mandić, **Antioxidant characteristics of the**

- plant extracts from traffic polluted and unpolluted areas**, 15<sup>th</sup> Frühjahrssymposium, Berlin, Germany, (Mart 2013)
24. Snezana Jovanovic, Goran Petrovic, Bojan Zlatkovic, Aleksandra Djordjevic, Olga Jovanovic, Vesna Stankov-Jovanovic, Violeta Mitic, Marija Ilic, Gordana Stojanovic, **HPLC screening and evaluation of antioxidative capacity of *Hylotelephium spectabile* (Boreau) H. Ohba x *telephium* (L.) H. Ohba leaf and flower extracts, fractions and their Hydrolysates**, 15<sup>th</sup> Frühjahrssymposium, Berlin, Germany, (Mart 2013)
25. Jelenković Lj., Palić I., Mitić V., Ilić M., Simonović S., Stankov Jovanović V., **Screening of amylase inhibition by selected essential oils components as potential agents in diabetes prevention**, 11. Simpozijum o flori jugoistočne Srbije i susednih regiona, Vlasinsko jezero, Srbija, (Jun 2013)
26. Cvetković J., Dimitrijević M., Mitić V., Stankov-Jovanović V., Ilić M., Petrović G., Stojanović G., **Uticaoj termičke obrade na sadržaj pigmenata u zelenom lisnatom povrću**, 11. Simpozijum o flori jugoistočne Srbije i susednih regiona, Vlasinsko jezero, Srbija, (Jun 2013)
27. Dimitrijević M., Cvetković J., Mitić V., Stankov-Jovanović V., Ilić M., Simonović S., Stojanović G., **Korelacija različitih metoda za određivanje antioksidacione aktivnosti odabranih vrsta voća**, 11. Simpozijum o flori jugoistočne Srbije i susednih regiona, Vlasinsko jezero, Srbija, (Jun 2013)
28. Strahinja R. Simonović, Marija D. Ilić, Marija S. Marković, Violeta D. Mitić, Aleksandra S. Djordević, Vesna P. Stankov-Jovanović, Ivan R. Palić, Jovana Lj. Pavlović, Gordana S. Stojanović, **Chemical composition and antimicrobial activities of essential oils of *Seseli varium* Trev. (*Seseli palasii*)**, 45<sup>th</sup> International Symposium of Essential Oils (ISEO 2014), Istanbul, Turkey (Septembar 2014)
29. Marija Ilić, Strahinja Simonović, Jelena Cvetković, Marija Dimitrijević, Violeta Mitić, Vesna Stankov Jovanović, **Essential Oil Composition of *Laserpitium latifolium* L.**, Congress of Chemists and Chemical Engineers of Bosnia and Herzegovina, Sarajevo (Oktobar 2014)
30. Jelena S. Cvetković, Marija V. Dimitrijević, Marija D. Ilić, Strahinja R. Simonović, Vesna P. Stankov-Jovanović, Violeta D. Mitić, Gordana S. Stojanović, **Antioxidant activity of *Achillea clypeolata***, Congress of Chemists and Chemical Engineers of Bosnia and Herzegovina, Sarajevo (Oktobar 2014)
31. Marija V. Dimitrijevic, Jelena S. Cvetkovic, Marija D. Ilic, Strahinja R. Simonovic, Vesna P. Stankov-Jovanovic, Violeta D. Mitic, Snezana D. Nikolic-Mandic, **Content of As, Cd, Pb and Sn in parsley (*Petroselinum crispum*) from different districts in Serbia**, Congress of Chemists and Chemical Engineers of Bosnia and Herzegovina, Sarajevo (Oktobar 2014)
32. Marković M., Tošić S., Stankov-Jovanović V., Stamenković S., Mitić V., Gnjatović I., Ilić M, **Stress impact of fire on chloroplasts pigments content in post fire grown plants**, 12<sup>th</sup> Symposium on the Flora of Southeastern Serbia and Neighboring Regions, Kopaonik Mt. ( Jun 2016)
33. Stojanović, G., Jovanović O., Zlatković B., Jovanović, S., Zrnzević, I., Ilić, M. **GC-MS profile of volatiles obtained from fresh root of *Peucedanum***



*longifolium* Waldst. & Kit. 12<sup>th</sup> Symposium on the Flora of Southeastern Serbia and Neighboring Regions, Kopaonik Mt. ( Jun 2016)

**Evropska akreditovana škola:**

- Marija Ilić, **Isolation, separation, characterisation and biological activities of secondary metabolites from plant *Seseli rigidum* Waldst. & Kit.**, 33<sup>rd</sup> European School of Medicinal Chemistry (ESMEC), Urbino, Campus Scientifico „E. Mattei”, Italija, Jul 2013.

## **9. Propratna dokumentacija**

1. Izjava o autorstvu
2. Izjava o istovetnosti elektronskog i štampanog oblika doktorske disertacije
3. Izjava o korišćenju
4. Tipovi licenci kreativne zajednice



## ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Изјављујем да је докторска дисертација, под насловом:

ХЕМИЈСКИ САСТАВ, АНТИОКСИДАТИВНА, АНТИМИКРОБНА И АНТИХОЛИНЕСТЕРАЗА АКТИВНОСТ БИЉНИХ ВРСТА *Seseli rigidum* И *Seseli pallasii*

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да ову дисертацију, ни у целини, нити у деловима, нисам пријављивао/ла на другим факултетима, нити универзитетима;
- да нисам повредио/ла ауторска права, нити злоупотребио/ла интелектуалну својину других лица.

У Нишу, 06.11.2016.

Аутор дисертације:

Марија Д. Илић

Потпис аутора дисертације:

Марија Илић



---

**ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ЕЛЕКТРОНСКОГ И ШТАМПАНОГ ОБЛИКА  
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Наслов дисертације:

ХЕМИЈСКИ САСТАВ, АНТИОКСИДАТИВНА, АНТИМИКРОБНА И  
АНТИХОЛИНЕСТЕРАЗА АКТИВНОСТ БИЉНИХ ВРСТА *Seseli rigidum* И *Seseli  
pallasii*

Изјављујем да је електронски облик моје докторске дисертације, коју сам предао/ла за уношење у **Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу**, истоветан штампаном облику.

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

У Нишу, 06. 11. 2016.

Аутор дисертације:

Марија Д. Илић

Потпис аутора дисертације:

Марија Илић



## ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Никола Тесла“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу унесе моју докторску дисертацију, под насловом:

ХЕМИЈСКИ САСТАВ, АНТИОКСИДАТИВНА, АНТИМИКРОБНА И АНТИХОЛИНЕСТЕРАЗНА АКТИВНОСТ БИЉНИХ ВРСТА *Seseli rigidum* И *Seseli pallasii*

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

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

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

У Нишу, 06. 11. 2016.

**Аутор дисертације:**

Марија Д. Илић

Потпис аутора дисертације:

Марија Илић



---

## ТИПОВИ ЛИЦЕНЦИ КРЕАТИВНЕ ЗАЈЕДНИЦЕ

### **1. Ауторство (CC BY)**

Дозвољава умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора, на начин одређен од аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

### **2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)**

Дозвољава умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора, на начин одређен од аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

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

Дозвољава умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора, на начин одређен од аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

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

Дозвољава умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора, на начин одређен од аутора или даваоца лиценце, и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада

### **5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)**

Дозвољава умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора, на начин одређен од аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

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

Дозвољава умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора, на начин одређен од аутора или даваоца лиценце, и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.