

UNIVERZITET U BEOGRADU  
HEMIJSKI FAKULTET



Aleksandra V. Pavlović

**OPTIMIZACIJA ANALITIČKOG POSTUPKA  
ZA KARAKTERIZACIJU I KLASIFIKACIJU  
RAZLIČITIH VRSTA GAJENOG I  
SAMONIKLOG VOĆA**

Doktorska disertacija

Beograd, 2024

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF CHEMISTRY



Aleksandra V. Pavlović

**OPTIMIZATION OF ANALYTICAL  
PROCEDURE FOR CHARACTERIZATION  
AND CLASSIFICATION OF VARIOUS  
CULTIVATED AND WILD FRUIT SPECIES**

Doctoral dissertation

Belgrade, 2024

**Mentor:**

**dr Maja Natić**, redovni profesor  
Univerzitet u Beogradu - Hemijski fakultet

**Članovi komisije:**

**dr Dušanka Milojković-Opsenica**, redovni profesor  
Univerzitet u Beogradu – Hemijski fakultet

**dr Dragana Dabić Zagorac**, viši naučni saradnik  
Inovacioni centar Hemijskog fakulteta u Beogradu

**dr Milica Fotirić-Akšić**, vanredni profesor  
Univerzitet u Beogradu – Poljoprivredni fakultet

**Datum odbrane:**

U Beogradu, \_\_\_\_\_2024.

## ZAHVALNICA

*Ova doktorska disertacija je urađena na Katedri za analitičku hemiju Univerziteta u Beogradu – Hemijskog fakulteta, pod mentorstvom dr Maje Natić, redovnog profesora Univerziteta u Beogradu – Hemijskog fakulteta. Ovom prilikom joj se najiskrenije zahvaljujem na dugogodišnjoj nesebičnoj podršci, izuzetnom razumevanju i strpljenju, uloženoj energiji tokom svih ovih godina, kao i na svestranoj pomoći u svim fazama izrade i pisanja ove doktorske disertacije.*

*Dr Dragani Dabić Zagorac, višem naučnom saradniku Inovacionog centra Hemijskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, koja je bila komentor pri izradi ove disertacije, se od srca zahvaljujem na velikom doprinosu koji je dala u svim fazama ove disertacije, od dizajniranja istraživanja do tumačenja rezultata, kao i na dragocenim sugestijama prilikom pisanja disertacije.*

*Posebno sam zahvalna dr Dušanki Milojković-Opsenici, redovnom profesoru Univerziteta u Beogradu - Hemijskog fakulteta, na ukazanom poverenju, stručnim i korisnim savetima i predlozima koji su doprineli kvalitetu ove disertacije.*

*Veliku zahvalnost dugujem dr Milici Fotirić-Akšić, vanrednom profesoru Univerziteta u Beogradu – Poljoprivrednog fakulteta, na divnoj saradnji, stručnoj pomoći i konstruktivnim sugestijama pri završnoj izradi rada.*

*Beskrajno hvala svim dragim prijateljima i kolegama sa Katedre za analitičku hemiju na neizmernoj podršci, razumevanju i lepoj saradnji, kao i na svim divnim trenucima koje smo delili tokom svih ovih godina.*

*Veliko hvala svim mojim prijateljima koji su uz mene svakodnevno, već godinama, dajući mi vetar u leđa pri svakom napravljenom koraku.*

*Hvala mojim sestrama, Bubi i Maji, na podršci, ljubavi i ohrabrujućim rečima uvek kada je to bilo potrebno.*

*Najveću zahvalnost dugujem mojim roditeljima, mami Vesni, tati, Vladimiru i sestri Ivani na neizmernoj veri, podršci, ljubavi, razumevanju i podstreku. Hvala vam što ste verovali u mene i onda kada ni sama nisam.*

*I naravno, posebnu i ogromnu zahvalnost dugujem svom suprugu Nenadu i našim divnim ćerkicama Andrei i Staši za neprocenjivu ljubav, optimizam, strpljenje i razumevanje. Hvala što ste uz mene, što se iskreno radujete svakom mom uspehu i što znam da u svakom trenutku mogu da računam na vas. Bez vaše podrške, ne bih mogla da istrajem do kraja.*

## OPTIMIZACIJA ANALITIČKOG POSTUPKA ZA KARAKTERIZACIJU I KLASIFIKACIJU RAZLIČITIH VRSTA GAJENOG I SAMONIKLOG VOĆA

Naučni cilj ove doktorske disertacije bio je definisanje optimalnih uslova analitičkih postupaka za ispitivanje fitohemijskog profila ploda i lista gajenih jagodastih i samoniklih voćnih vrsta sa različitih područja Srbije. U cilju dobijanja ekstrakata bogatih polifenolima, ispitivani su i optimizovani uslovi ekstrakcije. Analitički postupci koji su razvijeni u okviru ovog istraživanja, omogućili su identifikaciju brojnih fenolnih jedinjenja, hromatografsko odvajanje i određivanje profila antocijanina, a pojedina jedinjenja iz klase flavonoida su prvi put detektovana. Ispitivanje sekundarnih metabolita uključivalo je određivanje sadržaja ukupnih polifenola i ukupnih antocijanina, sadržaja slobodne i ukupne elaginske kiseline, polifenolnog profila, kao i antioksidativnog kapaciteta. Svi ispitivani ekstrakti pokazali su visok sadržaj elaginske kiseline, koja se izdvojila kao najzastupljenija fenolna kiselina u ovim voćnim vrstama. Pokazano je da je plod samoniklih voćnih vrsta ima značajno veći sadržaj ukupnih polifenola, ukupnih antocijanina i pojedinačnih fenolnih jedinjenja, u poređenju sa plodom gajenih jagodastih vrsta voćaka. Na osnovu karakterističnih polifenolnih profila i različitih antioksidativnih testova ekstrakata plodova samoniklih voćnih vrsta, a upotrebom analize glavnih komponenata definisani su najznačajniji hemijski markeri koji su ukazali na mogućnost njihovog razdvajanja prema biološkom poreklu. Takođe, određen je sadržaj ugljenih hidrata i elementalni sastav u plodu gajenih jagodastih voćnih vrsta, čiji rezultati ukazuju da je plod ovih voćnih vrsta bogat hranljivim supstancama. Ovo istraživanje pokazalo je da, pored ploda ispitivanih biljnih vrsta sa područja Srbije, takođe i list može smatrati jedinstvenim u pogledu sadržaja fitonutrijenata.

**Ključne reči:** antioksidativni kapacitet, polifenolni profil, elaginska kiselina, antocijanini, UV-Vis spektrofotometrija, LC/MS, HPTLC, HPAEC-PAD, ICP-OES/MS

**Naučna oblast:** Hemija

**Uža naučna oblast:** Analitička hemija

**OPTIMIZATION OF ANALYTICAL PROCEDURE FOR CHARACTERIZATION AND CLASSIFICATION OF VARIOUS CULTIVATED AND WILD FRUIT SPECIES**

The scientific goal of this doctoral dissertation was to define the optimal conditions for the analytical procedures to investigate the phytochemical profile of the fruit and leaves of cultivated berry and wild fruit species from different areas of Serbia. In order to obtain extracts rich in polyphenols, extraction conditions were researched and optimized. The analytical procedures developed in this study enabled the identification of numerous phenolic compounds, chromatographic separation, and determination of the anthocyanin profile, with some compounds from the class of flavonoids were detected for the first time. The examination of secondary metabolites included determining the total polyphenol and total anthocyanin contents, levels of free and total ellagic acid, polyphenol profile, and antioxidant capacity. All tested extracts showed a high content of ellagic acid, which stands out as the most abundant phenolic acid in these fruit species. It was shown that wild fruit species have significantly higher total polyphenol and total anthocyanin contents, as well as individual phenolic compounds, compared to cultivated berry fruit species. Based on characteristic polyphenol profiles and various antioxidant tests of extracts from wild fruit species, the most significant chemical markers were defined using Principal Component Analysis (PCA), indicating the potential for differentiation based on biological origin. Additionally, the carbohydrate content and elemental composition were determined in the fruit of cultivated berry fruit species, revealing that these fruit species are rich in nutrients. This research demonstrated that, in addition to the fruit of the examined plant species from Serbia, the leaves could also be considered unique in terms of phytonutrient content.

**Keywords:** antioxidant capacity, phenolic profile, ellagic acid, anthocyanins, UV-Vis spectrophotometry, LC/MS, HPTLC, HPAEC-PAD, ICP-OES/MS

**Scientific field:** Chemistry

**Scientific subfield:** Analytical Chemistry

---

**SADRŽAJ**

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. OPŠTI DEO</b> .....	3
2.1. Značaj gajenih i samoniklih voćnih vrsta u Srbiji.....	3
2.2. Fenolna jedinjenja u gajenim i samoniklim voćnim vrstama.....	4
2.3. Ekstrakcija polifenola.....	11
2.4. Oksidativni stres i antioksidativna sposobnost sekundarnih metabolita .....	13
2.5. Analitičke metode koje se najčešće koriste za karakterizaciju biljnog materijala .....	15
2.5.1. Procena antioksidativnog kapaciteta spektrofotometrijskim metodama .....	16
2.5.2. Hromatografske metode.....	20
2.5.2.1. Tankoslojna hromatografija .....	21
2.5.2.2. Ultra-visokoeфикасна tečna hromatografija sa masenom spektrometrijom.....	21
2.5.2.3. Analiza ugljenih hidrata visokoeфикасном jonskom hromatografijom sa pulsnom amperometrijskom detekcijom.....	23
2.5.3. Analiza makro- i mikroelemenata primenom indukovano spregnute plazme sa optičkom emisionom spektroskopijom (ICP-OES) .....	24
2.6. Značaj statističke obrade rezultata u ispitivanjima biljnog materijala .....	26
<b>3. EKSPERIMENTALNI DEO</b> .....	28
3.1. Uzorci ploda i lista gajenih i samoniklih voćnih vrsta .....	28
3.2. Standardi, hemikalije i reagensi .....	29
3.3. Priprema uzoraka.....	30
3.3.1. Optimizacija izolovanja polifenola iz ploda i lista gajenih i samoniklih voćnih vrsta.....	30
3.4. Određivanje hemijskih karakteristika ploda i lista gajenih i samoniklih voćnih vrsta.....	31
3.4.1. Spektrofotometrijske metode za merenje antioksidativnog kapaciteta .....	31
3.4.1.1. Određivanje sadržaja ukupnih polifenola .....	32
3.4.1.2. Određivanje sadržaja ukupnih antocijanina .....	32
3.4.1.3. Određivanje antioksidativnog kapaciteta .....	33
3.4.2. Optimizacija uslova masene spektrometrije za definisanje polifenolnog profila u plodu i listu gajenih i samoniklih voćnih vrsta.....	37
3.4.3. Određivanje sadržaja slobodne i ukupne elaginske kiseline u plodu gajenih voćnih vrsta .....	41
3.4.4. Ispitivanje antocijaninskog profila u plodu gajenih i samoniklih voćnih vrsta primenom HPTLC i UHPLC-LTQ OrbiTrap XL.....	42
3.4.5. Određivanje sadržaja šećera u plodu gajenih voćnih vrsta primenom jonske hromatografije.....	43
3.4.6. Određivanje sadržaja minerala u plodu gajenih voćnih vrsta primenom ICP-OES .....	44
3.5. Statistička obrada rezultata.....	46

---

<b>4. REZULTATI I DISKUSIJA</b> .....	47
4.1. Analiza bioaktivnih jedinjenja ploda i lista gajenih i samoniklih voćnih vrsta.....	47
4.1.1. Sadržaj ukupnih polifenola i antioksidativni kapacitet u plodu i listu gajenih i samoniklih voćnih vrsta.....	47
4.1.2. Polifenolni profil ploda i lista gajenih i samoniklih voćnih vrsta.....	53
4.1.3. Kvantitativna analiza fenolnih jedinjenja ploda i lista gajenih i samoniklih voćnih vrsta.....	61
4.1.4. Rezultati analize glavnih komponenata primenjene na sadržaj fenolnih jedinjenja i vrednosti antioksidativnih testova određenih u plodu samoniklih voćnih vrsta.....	68
4.1.5. Sadržaj slobodne i ukupne elaginske kiseline u plodu gajenih voćnih vrsta.....	70
4.1.6. Antocijanini u plodu gajenih i samoniklih voćnih vrsta.....	72
4.2. Sadržaj glukoze, fruktoze i saharoze u plodu gajenih voćnih vrsta .....	82
4.3. Elementalni sastav ploda gajenih voćnih vrsta.....	83
<b>5. ZAKLJUČAK</b> .....	86
<b>6. LITERATURA</b> .....	89
<b>7. PRILOG</b> .....	108



## 1. UVOD

Zahvaljujući povoljnim agroekološkim uslovima, Srbija se ističe kao jedan od vodećih proizvođača voća iz familije *Rosaceae*, a takođe se smatra i sekundarnim centrom genetske raznolikosti za pojedine predstavnike te familije. Posebno su zanimljive divlje voćne vrste kao neiscrpan genetski izvor sorti koje daju plodove izvanrednog kvaliteta i visoke nutritivne vrednosti (Bošnjaković *i sar.* 2012). Plodovi različitih biljnih familija, poput *Rosaceae* (familija ruža čiji su predstavnici malina, kupina, jagoda, crni trn i glog), *Moraceae* (familija dudova), *Cornaceae* (familija drenova) i *Sambucaceae* (familija zova), koji su predmet ove doktorske disertacije, imaju značaj i posebno mesto u ljudskoj ishrani, ne samo zbog visoke nutritivne vrednosti, već i zbog svojih antioksidativnih svojstava (Skrovankova *i sar.* 2015, Olas 2018). Ove gajene i samonikle voćne vrste, predstavljaju bogat izvor sekundarnih metabolita, posebno fenolnih jedinjenja koje biljke proizvode tokom svog razvoja. Polifenoli imaju značajnu ulogu u očuvanja zdravlja zbog svojih antioksidativnih svojstava koja pomažu u uklanjanju reaktivnih kiseoničnih vrsta, sprečavajući oksidativni stres. Takođe, fenolna jedinjenja inhibiraju enzime koji doprinose stvaranju oksidativnog stresa i vezuju jone metala koji su odgovorni za proizvodnju reaktivnih kiseoničnih vrsta (Dangles 2012).

S obzirom na značaj fitohemijskih jedinjenja prisutnih u plodu jagodastih voćnih vrsta, poslednjih godina interesovanje za istraživanje ovih voćnih vrsta se ne smanjuje. Prema navodima, fitohemijska ispitivanja ukazuju na strukturu, biosintezu, metabolizam i biološke funkcije organskih jedinjenja koja su prisutna u biljkama (Harborne 1998). Imajući u vidu raznovrsnost primarnih i sekundarnih metabolita biljaka i njihove specifične strukturne karakteristike i kompleksnost uzoraka, hemijska analiza zahteva razvoj i optimizaciju analitičkih postupaka. To uključuje pravilno uzorkovanje, odabir metoda pripreme uzoraka za analizu, odabir odgovarajuće tehnike za hemijsku karakterizaciju i optimizaciju uslova kako bi se postiglo što preciznije profilisanje uzoraka. Za pouzdano određivanje bioaktivnih metabolita različitih biljnih uzoraka, procesi ekstrakcije i prečišćavanja su od ključnog značaja, pri čemu je osnovni cilj izolovanje ovih jedinjenja u optimalnom prinosu, bez narušavanja hemijskog sastava. Postizanje ovih ciljeva zahteva pažljivu selekciju metode ekstrakcije koja odgovara karakteristikama ispitivanih jedinjenja (Chemat *i sar.* 2012). Iz tog razloga, ekstrakcija predstavlja najvažniji korak u analizi metabolita biljnog materijala.

Literatura koja se odnosi na istraživanja ploda jagodastih voćnih vrsta obuhvata rezultate primene uobičajenih spektrofotometrijskih testova, kao što su određivanje sadržaja ukupnih polifenola, ukupnih antocijanina i procene antioksidativnog kapaciteta. Ovi testovi se koriste kao preliminarna analiza metabolita prisutnih u biljnom materijalu i pružaju ključne informacije o kvalitetu ploda, ali ne daju kvantitativne informacije o pojedinačnim jedinjenjima. Stoga su razvijene osetljivije i selektivnije metode zasnovane na hromatografskim i spektroskopskim tehnikama, a koje omogućavaju identifikaciju i kvantifikaciju različitih klasa hemijskih jedinjenja i time hemijsku karakterizaciju biljnog materijala. Ova analiza obuhvata detaljno ispitivanje sastava biljnog materijala radi utvrđivanja prisutnih primarnih (ugljeni hidrati i minerali) i sekundarnih metabolita (polifenoli), kao i drugih jedinjenja od interesa. Konačno, primenom različitih hemometrijskih metoda može se doći do pouzdane procene biološkog porekla voća i mogu se definisati parametri autentičnosti na osnovu određenog hemijskog sastava.

Plodovi jagodastih voćnih vrsta se obično konzumiraju u svežem obliku samo tokom sezone njihovog sazrevanja, s obzirom da su podložni brzom kvarenju i fermentaciji na sobnoj temperaturi zbog visokog sadržaja vode i šećera. Zamrzavanje plodova ovih voćnih vrsta predstavlja efikasan način očuvanja njihovog kvaliteta i hranljive vrednosti za dugoročno skladištenje i pristupačnost tokom cele godine. Prema tome, od suštinskog značaja je istražiti fitohemijski sastav smrznutnog ploda jagodastih voćnih vrsta kako bi se utvrdio sadržaj bioaktivnih jedinjenja. Različita lekovita svojstva pripisuju se ne samo plodu, već i listu istih biljnih vrsta, koje takođe karakteriše visok sadržaj fenolnih jedinjenja (Sobhy *i sar.* 2023).

U okviru ove doktorske disertacije planirano je da se primenom više analitičkih metoda za profilisanje ekstrakata i njihovom kombinacijom ostvari sveobuhvatna hemijska karakterizacija metaboloma ploda i lista različitih vrsta gajenog i samoniklog voća. Optimizacija metoda analize i njihova primena omogućiće ne samo dobijanje podataka o hemijskom sastavu ekstrakata različitih vrsta gajenog i samoniklog voća, već će na osnovu hemijskog profila i specifičnih hemijskih biomarkera biti moguće izvršiti klasifikaciju i međusobnu diferencijaciju ispitivanih voćnih vrsta i identifikovati njihovu biološku pripadnost, što na kraju direktno daje mogućnost definisanja parametara autentičnosti.

## 2. OPŠTI DEO

### 2.1. Značaj gajenih i samoniklih voćnih vrsta u Srbiji

Pravilna ishrana, koja podrazumeva konzumiranje voća i povrća, povoljno utiče na opšte zdravlje ljudi. Od posebnog značaja su gajene (kultivisane) i samonikle vrste jagodastih vrsta voćaka, čiji plodovi predstavljaju važan izvor fitonutrijenata. Plodove jagodastih vrsta voćaka karakterišu nizak sadržaj masti, pri čemu predstavljaju izuzetan izvor ugljenih hidrata, organskih kiselina, flavonoida, antocijanina, karotenoida, tanina, vitamina i minerala (Milivojević *i sar.* 2013). Bioaktivna jedinjenja prisutna u ovim plodovima su povezana sa različitim zdravstvenim efektima (Lavefve *i sar.* 2020), a takođe su od suštinskog značaja za reprodukciju, razvoj i metabolizam biljaka, i zaštitu od biotskog i abiotskog stresa. Sadržaj bioaktivnih jedinjenja u plodovima jagodastih vrsta voćaka značajno zavisi od genetskih karakteristika sorte (Milošević *i sar.* 2016), ali i od načina proizvodnje, karakteristika zemljišta, zrelosti biljke i načina čuvanja (Ponder i Hallmann 2019, Yang *i sar.* 2020). Različiti klimatski faktori tokom rasta i sazrevanja voća, poput temperature, vetra i padavina, mogu značajno uticati na kvalitet ploda (Contreras *i sar.* 2019). Jagodaste voćke iz familije *Rosaceae*, obuhvata biljne vrste koje pripadaju rodu *Rubus* (malina i kupina) i *Fragaria* (jagoda). Pored njih, značajne vrste jagodastog voća uključuju i borovnicu (*Vaccinium* sp.), brusnicu (*Vaccinium vitis-idaea*), ribizlu i ogrozd (*Ribes* sp.), dud (*Morus* sp.), kivi (*Actinidia* sp.), aroniju (*Aronia melanocarpa*) i godži (*Lycium barbarum*).

Zbog specifične klime i pogodnog tla, gajene jagodaste voćne vrste iz Srbije su prepoznatljive po visokom kvalitetu, jedinstvenom ukusu i intenzivnoj boji. Proizvodnja jagodastih vrsta voćaka predstavlja jedan od ključnih sektora u srpskoj poljoprivredi. Od skoro 190 000 hektara voćnjaka, 20% ukupne površine su zasadi jagodastih voćnih vrsta. Srbija je poznata po kupini, jagodi i dudu, ali je malina i dalje dominantna voćna vrsta sa površinama od 25 000 ha i godišnjim prinosom od 128 971 tona (Republički zavod za statistiku, 2020. godina), što našu zemlju svrstava u red vodećih zemalja u svetu. Malina se uglavnom uzgaja u zapadnoj Srbiji, posebno u Arilju, Valjevu i Ivanjici, pri čemu Arilje čini čak 30% ukupne srpske proizvodnje (Kljajic *i sar.* 2017). U poslednjih nekoliko godina, proizvodnja maline se proširila na regione koji tradicionalno nisu bili poznati po ovoj kulturi, posebno u Vojvodini, dok se novi zasadi šire i na delove južne i istočne Srbije. Najzastupljenija sorta maline na teritoriji Srbije je Willamette koja se gaji na 87% ukupne površine pod malinama u Srbiji. Zanimljivo je da se u protekloj deceniji, prema Striku i saradnicima (Strik *i sar.* 2007), Srbija nalazila među četiri vodeća svetska proizvođača kupine, sa udelom od 69% u ukupnoj evropskoj i 18% u ukupnoj svetskoj proizvodnji. Isti autori ukazuju da su, u svetu komercijalne proizvodnje kupine, najzastupljenije sorte Thornfree, Loch Ness i Chester Thornless, koje čine oko 58%, zatim slede Dirksen Thornless, Hull Thornless i Smoothstem sa oko 28%, dok se Čačanska bestrna nalazi sa oko 5% udela. Proizvodnja kupine u Srbiji je pretežno locirana u zapadno-moravskom, podrinjsko-kolubarskom i rasinskom kraju. Sorta kupine Čačanska bestrna, razvijena u Institutu za voćarstvo Čačak, u našoj zemlji je dominantna sorta i pokriva 60% ukupne površine. Osim što se dobro prilagođava, ova sorta se ističe odličnim agronomskim karakteristikama, visokim prinosima i krupnim plodovima sa izuzetnim nutritivnim vrednostima, dok joj je jedna velika mana pojava reverzibilnost boje prilikom čuvanja u hladnjačama (Clark i Finn 2014). Za razliku od maline i kupine, jagode se pretežno gaje u Mačvi, Podunavlju, južnoj Srbiji i delu Pomoravlja. Postoji nekoliko sorti jagode, kao što su jednorodne, stalno rađajuće i sorte jagode koje vode poreklo od šumske jagode (*Fragaria vesca*). Na plantažama jagode najčešće gajene jednorodne sorte su Clery, Joly, Alba, Asia, Arosa i Roxana (Milivojević 2018). Ove sorte imaju veliki ekonomski značaj, dok se stalnoradajuće sorte, od koji je najzastupljenija sorta Zenga Zengana, u Srbiji gaje u veoma malom obimu i uglavnom se koristi u prerađivačkoj industriji. Takođe, korišćenje organskih đubriva pri sadnji jagode pozitivno utiče na hranljivu vrednost voća, što je potvrđeno povećanim sadržajem ukupnih fenolnih kiselina, flavanona i flavonola (Karaklajić-Stajić *i sar.* 2022). S obzirom na veliku

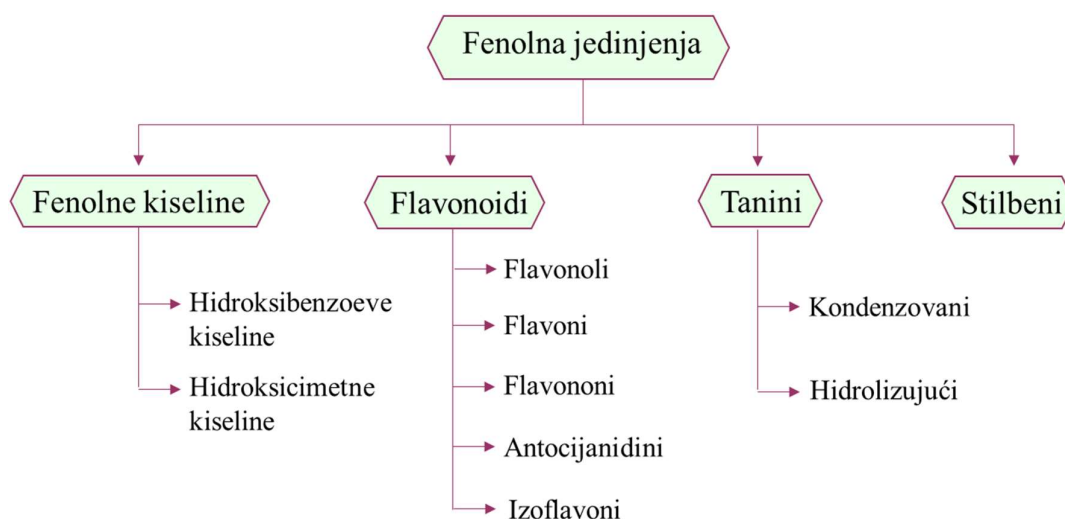
i rastuću potražnju za malinom, kupinom i jagodom tokom cele godine na tržištu EU, ključno je uvođenje novih sorti i primena savremenih tehnologija proizvodnje u zaštićenim uslovima.

Klimatski i drugi prirodni uslovi u Srbiji uticali su na pojavu velikog broja vrsta divljeg voća (samoniklog voća) sa različitim karakteristikama, od kojih su neke posebno značajne za selekciju gajenih vrsta voćaka, uključujući otpornost na bolesti i štetočine, kao i prilagodljivost na različite uslove gajenja. Veći deo Srbije obuhvata brdsko-planinski region sa izrazito raznolikom šumskom florom, koja proizlazi iz specifičnih klimatskih, orografskih i edafskih faktora. Samonikle vrste voćaka, među mnogim šumskim vrstama, privlače posebnu pažnju zbog svojih lekovitih svojstava i visoke nutritivne vrednosti, a istraživanja ukazuju na njihov značaj kao izvora bioaktivnih jedinjenja (Li *i sar.* 2016). U srpskoj flori evidentirane su ukupno 122 vrste divljih voćaka (samoniklih vrsta), koje su klasifikovane u 23 familije i 38 rodova (Ratknić *i sar.* 2005). Među samoniklim vrstama voćaka najčešće se susreću familije *Berberidaceae*, *Cornaceae*, *Corylaceae*, *Cupressaceae*, *Elaeagnaceae*, *Fagaceae*, *Grossulariaceae*, *Juglandaceae*, *Rhamnaceae*, *Rosaceae*, *Sambucaceae*, *Taxaceae*, *Vacciniaceae* i *Vitaceae* (Mratinic i Fotiric-Aksic 2014). Prema Međunarodnoj federaciji pokreta za organsku poljoprivredu (*International Federation of Organic Agriculture Movements*, IFOAM) i Mreži organskih proizvođača Mediterana (*Mediterranean Organic Agriculture Network*, MOAN), plodovi samoniklih voćaka u Srbiji se sakupljaju sa oko 450000 ha, ali je samo na 1550 ha sakupljeno voće sertifikovano kao organsko (Willer i Yussefi 2007). U poslednjih nekoliko godina, u uslovima organske proizvodnje proizvođači su počeli da gaje neke vrste samoniklih voćaka, poput dreva (roda *Cornus*, familije *Cornaceae*), crnog trna (roda *Prunus*, familije *Rosaceae*) i zove (roda *Sambucus*, familije *Sambucaceae*) (Mratinic i Fotiric-Aksic 2014).

Iako je fitohemijski profil ovih biljnih vrsta u velikoj meri sličan, postoje određene specifičnosti. Stoga je od suštinskog značaja detaljno identifikovati i kvantifikovati fitonutrijente prisutne u gajenim i samoniklim voćnim vrstama.

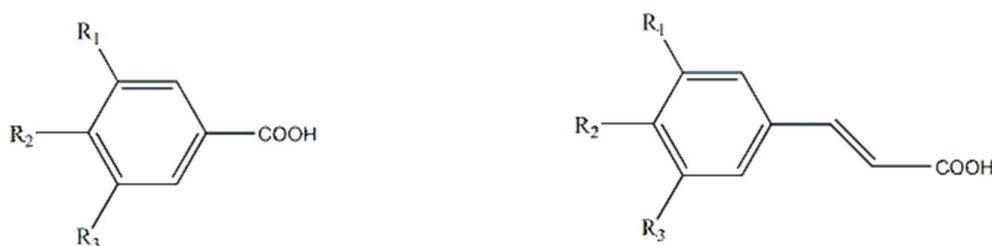
## 2.2. Fenolna jedinjenja u gajenim i samoniklim voćnim vrstama

Zbog svoje raznovrsnosti u strukturi i povoljnog uticaja koje imaju na ljudsko zdravlje, polifenoli su predmet velikog broja istraživanja tokom poslednjih decenija. Više studija je otkrilo da ovi sekundarni metaboliti pokazuju različita biološka svojstva, uključujući antikancerogeno, antimikrobno, antiproliferativno, antiinflamatorno, antivirusno i posebno značajno antioksidativno svojstvo (Leri *i sar.* 2020). Polifenoli su od suštinskog značaja za razvoj i metabolizam biljaka, zaštitu od biotskog i abiotskog stresa, kao i za odbranu od patogenih virusa i infekcija. Preko 8000 fenolnih molekula je identifikovano i klasifikovano na osnovu njihove hemijske strukture, biološke funkcije i porekla. Polifenoli se karakterišu prisustvom aromatičnih prstenova povezanih sa različitim hemijskim grupama. Na osnovu strukture klasifikuju se na fenolne kiseline, flavonoide, tanine i stilbene (**Slika 1**) (Saurina i Sentellas 2015). Ova raznovrsnost fenolnih jedinjenja potiče od različitih biosintetskih puteva u biljkama, gde enzimi katalizuju specifične reakcije koje dovode do formiranja različitih fenolnih struktura. Tako, biosinteza fenolnih kiselina uključuje transformaciju šećera u aromatične prstenove, dok sinteza flavonoida uključuje niz enzimskih koraka koji oblikuju različite podgrupe flavonoida (Di Lorenzo *i sar.* 2021).



Slika 1. Podela polifenola.

**Fenolne kiseline** su važna grupa polifenola, koje se u biljnom materijalu uglavnom javljaju u konjugovanom obliku. Klasifikuju se na hidroksibenzoewe i hidroksicimetne kiseline, s obzirom da predstavljaju hidroksilne derivate aromatičnih karboksilnih kiselina, koji nastaju ili iz grupe benzoewe kiseline ili iz grupe cimetne kiseline (Slika 2). U poređenju sa hidroksibenzoevim kiselinama, hidroksicimetne kiseline su zastupljenije u biljnom materijalu i pokazuju veću antioksidativnu aktivnost, pri čemu antioksidativna sposobnost fenolnih kiselina i njihovih derivata zavisi od broja i položaja hidroksilnih grupa vezanih za aromatični prsten, mesta vezivanja i međusobnog položaja u aromatičnom prstenu, a takođe i od vrste supstituenata (Shamanin *i sar.* 2022).

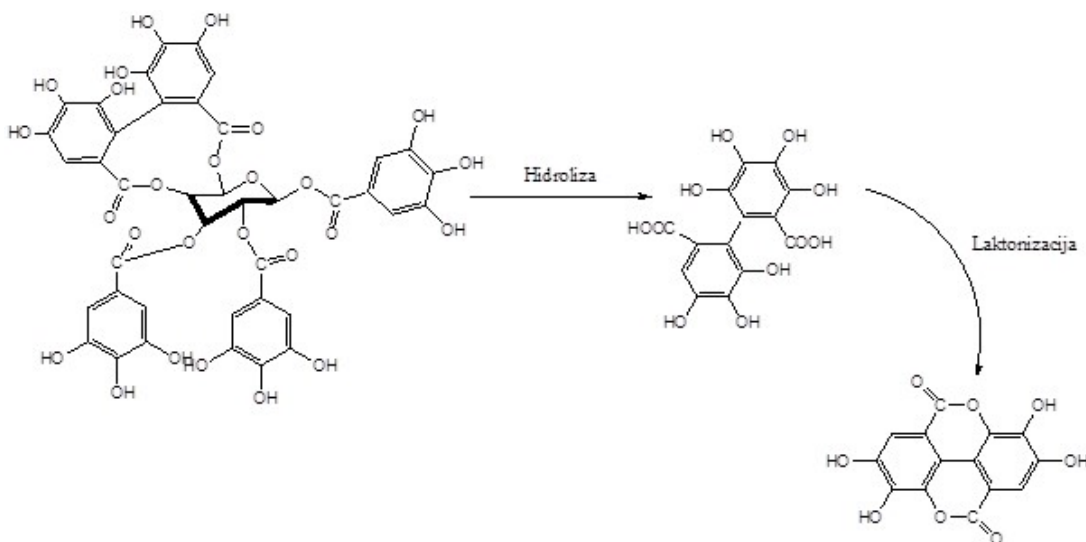


Derivati hidroksibenzoewe kiseline	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	Derivati hidroksicimetne kiseline	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
<i>p</i> -Hidroksibenzoeva kiselina	H	OH	H	<i>p</i> -Kumarinska kiselina	H	OH	H
Protokatehinska kiselina	OH	OH	H	Kofeinska kiselina	OH	OH	H
Vanilinska kiselina	OCH <sub>3</sub>	OH	H	Ferulinska kiselina	OCH <sub>3</sub>	OH	H
Siringiska kiselina	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>	Sinapinska kiselina	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>
Galna kiselina	OH	OH	OH				

Slika 2. Strukture hidroksibenzoevih i hidroksicimetnih kiselina.

Elaginska kiselina je jedna od najzastupljenijih fenolnih kiselina u plodovima jagodastih voćnih vrsta, posebno u malini, i privlači veliku pažnju zbog izraženog antioksidativnog, protivupalnog, antimutagenog, antiproliferativnog, kardioprotektivnog, neuroprotektivnog, antialergijskog, antimikrobnog, antiaterosklerotičnog, hepatoprotektivnog, nefroprotektivnog, antivirusnog i antiparazitskog svojstva (Sharifi-Rad *i sar.* 2022). Elaginska kiselina je bioaktivno fenolno jedinjenje koji se prirodno javlja kao sekundarni metabolit u mnogim biljkama. Strukturno

predstavlja dilakton heksahidroksidifenolne kiseline (HHDP), dimerni derivat galne kiseline (**Slika 3**). U biljnom materijalu, elaginska kiselina se nalazi u slobodnom obliku i u obliku kompleksa, uključujući glikozide i elagitanine koji nastaju metilovanjem, metoksilovanjem, glikolizovanjem i glukuronidizacijom hidroksilnih grupa (Fontaine *i sar.* 2017). Elagitanini su hidrolizujući tanini koji u prirodi postoje kao visokomolekularni polimeri sa molekulskim masama od 300 do 20 000 Da. Hemijske strukture svih elagitanina obuhvataju najmanje jednu HHDP jedinicu, koja je esterifikovana poliolum, obično  $\beta$ -D-glukozom. U prisustvu kiselina, baza, enzima ili tople vode, elagitanini se hidrolizuju do elaginske kiseline (**Slika 3**). Ovo je osnovna reakcija koja se koristi za detekciju i kvantifikaciju elagitanina kao ekvivalenta elaginske kiseline (Natić 2016). Odnos između slobodnih i vezanih oblika elaginske kiseline u biljnim materijalima značajno varira u zavisnosti od biljne vrste.

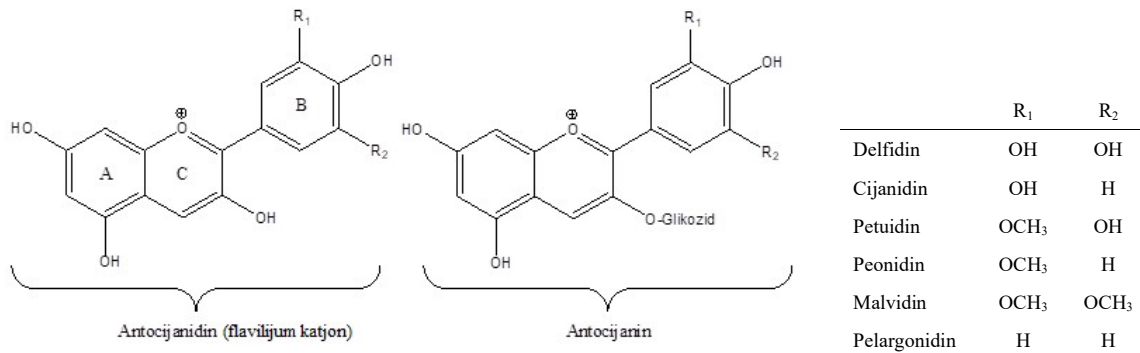


**Slika 3.** Hidroliza elagitanina do elaginske kiseline.

**Flavonoidi** predstavljaju klasu polifenola koja, zajedno sa karotenoidima i hlorofilom, daju boju mnogim vrstama voća i povrća. U biljkama se javljaju pretežno kao glikozidi, u kojima su jedna ili više hidroksilnih grupa fenola kombinovane sa redukovanim šećerima. Kada je reč o biosintezi flavonoida, oni nastaju iz aromatičnih aminokiselina (fenilalanina i tirozina) i poseduju strukturu sa tri prstena (C6-C3-C6), gde su dva fenolna benzenova prstena povezana piranskim prstenom. Na osnovu oksidacionog stanja centralnog prstena C, flavonoidi se dele u šest podgrupa: flavoni, flavonoli, flavanoli, flavanoni, izoflavoni i antocijanidini (Di Lorenzo *i sar.* 2021).

Antocijanini su prirodni pigmenti rastvorljivi u vodi i predstavljaju važna fenolna jedinjenja biljnog materijala. Derivati su 2-fenilbenzopirilijuma, odnosno flavilijum katjona (**Slika 4**). Stabilnost antocijanina zavisi od nekoliko faktora, kao što su pH vrednost, temperatura, svetlost, prisustvo vezanih šećera, organskih kiselina ili metala (Alappat i Alappat 2020). Antocijanini pokazuju najveću stabilnost u kiseloj sredini, obično u opsegu pH vrednosti od 1 do 2, s obzirom na to da je flavilijum katjon njihov najstabilniji oblik. U zavisnosti od pH vrednosti sredine dolazi do promene boje antocijanina, pri čemu u kiselom okruženju postaju crveni, dok pri baznim pH vrednostima imaju plavu boju. Boja antocijanina zavisi i od broja hidroksilnih grupa na B prstenu. Veći broj hidroksilnih grupa u molekulu doprinosi plavoj boji (pelargonidin < cijanidin < delfinidin), dok formiranje glikozida dovodi do pojave crvene boje. U prirodi se nalazi oko 23 aglikonskih oblika antocijanina (antocijanidini), pri čemu su cijanidin, delfinidin, petunidin, peonidin, pelargonidin i malvidin najzastupljeniji u ljudskoj ishrani (Avula *i sar.* 2023). Antocijanini, zbog svoje visoke antioksidativne sposobnosti, mogu sprečiti ili usporiti razvoj bolesti povezanih sa oksidativnim

stresom. Ovo uključuje smanjen rizika od kardiovaskularnih bolesti i koronarne bolesti srca, poboljšanu neurološku funkciju, smanjenje rizik od raka i zaštitnu aktivnost tkiva mozga protiv hipoksično-ishemijskih povreda (Bader Ul Ain *i sar.* 2022).



**Slika 4.** Osnovne hemijske strukture antocijanidina i antocijanina.

U biljnom materijalu, posebno u crvenim plodovima različitih voćnih vrsta, fenolna jedinjenja se mogu naći u značajnim količinama, pri čemu svaka voćna vrsta ima karakterističan fenolni profil. Ova jedinjenja predstavljaju značajne biomarkere biljaka, a imaju važnu ulogu u procesima kontrole kvaliteta, klasifikacije i provere autentičnosti. Njihova količina zavisi od sorte (vrste) voćaka, uslova proizvodnje, zrelosti ploda, agroekoloških uticaja i sastava zemljišta (Lucci *i sar.* 2017).

**Gajene vrste voćaka** se ističu po visokom sadržaju različitih bioaktivnih metabolita. U plodovima jagodastih voćnih vrsta, poput maline, kupine, jagode, duda, koje su predmet našeg istraživanja, najzastupljenije su fenolne kiseline, tanini, antocijanini, dok jedinjenja poput flavonola, flavona, flavanola i proantocijanina čine manji deo (Diaconeasa *i sar.* 2019). Hidrolizujući tanini, poput galotanina i elagitanina, predstavljaju glavnu klasu fenolnih jedinjenja u plodovima gajenih jagodastih vrsta voćaka, dok je profil antocijanina raznovrstan i varira od vrste do vrste. U crvenim plodovima jagodastih vrsta voćaka, antocijanini se pretežno javljaju kao 3-glikozidi antocijanidina, pri čemu su cijanidin 3-*O*-glikozid i pelargonidin 3-*O*-glikozid najzastupljeniji. Visoke koncentracije elaginske kiseline i elagitanina nalaze se u plodovima predstavnika roda *Rubus* (malina i kupina), jagoda, šipka i jezgrastim plodovima (Evyugin *i sar.* 2020). Glavne fenolne kiseline u plodovima jagodastih vrsta voćaka, pored elaginske kiseline, su kofeinska, ferulinska, *p*-kumarinska, vanilinska, hlorogena, neohlorogena, sinapinska i protokatehinska kiselina, kao i β-D-glikozidi *p*-kumarinske i kofeinske kiseline (Zorzi *i sar.* 2020a). Različita terapijska svojstva pripisuju se ne samo plodu, već i semenu i listu jagodastih voćnih vrsta. Semenke ploda jagodastih voćnih vrsta imaju važne benefite, jer su bogate uljem i sadrže esencijalne masne kiseline poput linolne i α-linolenske kiseline (Krstić *i sar.* 2023).

*Malina (Rubus idaeus L.)* je višegodišnja biljka porodice *Rosaceae*, široko rasprostranjena u umerenim klimatskim uslovima. Antocijanini i elagitanini su ključna jedinjenja za antioksidativna svojstva kod maline i drugih vrsta iz roda *Rubus*. U plodu maline kvantifikovane su značajne koncentracije antocijanina, poput cijanidin 3-*O*-soforozida, cijanidin 3-*O*-glukozilrutinozida i cijanidin 3-*O*-glukozida (Mihailović *i sar.* 2019), dok su sanguin H-6 i lambertianin C, ključni elagitanini maline, takođe prisutni u značajnim količinama (oko 80% od ukupnog sadržaja elagitanina) (García-Villalba *i sar.* 2020). Pri poređenju sadržaja kvantifikovanih elagitanina i antocijanina u smrznutim i svežim plodovima maline, pronađene su veće koncentracije u smrznutim uzorcima (Aguilera-Otíz *i sar.* 2011). Sunčeva svetlost takođe utiče na sadržaj antocijanina, pa je u plodu maline pronađena veća količina antocijanina u letnjem periodu kada je sunčeva svetlost intenzivnija, u odnosu na jesenji period (Ponder i Hallmann 2019). Mnoga *in vitro* i *in vivo*

istraživanja pokazala su da plod maline ima antibakterijska, antiinflamatorna, antioksidativna i antikancerogena svojstva (Bader Ul Ain *i sar.* 2022). Istraživanja su takođe pokazala da elaginska kiselina, galna kiselina, katehin i kvercetin pokazuju značajniju korelaciju sa antioksidativnim kapacitetom (Skrovankova *i sar.* 2015).

*Kupina* (*Rubus fruticosus* L.) je višegodišnja biljka, kao i malina, pripada porodici ruža (*Rosaceae*) i predstavlja izvor nutritijenata i fitohemikalija. Među voćnim vrstama, kupina se visoko rangira po antioksidativnoj sposobnosti, što je uglavnom posledica visokog sadržaja polifenola poput antocijanina, hidroksibenzoevih kiselina, tanina i flavonola. Sadržaj antocijanina u kupini, koji su odgovorni za karakterističnu plavo-ljubičastu boju ploda kupine, je viši u odnosu na druge vrste jagodastog voća. Približno 94% prisutnih antocijanina u plodu kupine je u obliku glikozida, od čega su oko 90% monoglikozidi, dok se oko 10% nalazi u obliku diglikozida (Kaume *i sar.* 2012). Najzastupljeniji antocijanin u plodu kupine je cijanidin 3-*O*-glukozid. Takođe, u značajnoj količini zastupljene su i fenolne kiseline i njihovi derivati, pri čemu je elaginska kiselina detektovana u visokim koncentracijama, kako u semenu, tako i u plodu kupine. Pored nje, dominantne su i galna, *p*-kumarinska i ferulinska kiselina. Međutim, fenolne kiseline su više zastupljene u obliku njihovih derivata, najčešće kao elagitanini, od koji su u kupini najznačajniji lambertianin C i smeša sanguin H-6/lambertianin A (Vaillant 2020). U plodu kupine, katehin, epikatehin i njihove polimerizovane forme su najčešći flavanoli, koji čine 24% od ukupnih fenolnih jedinjenja, među kojima su procijanidini najdominantniji sa udelom od 71% (Karaklajic-Stajic *i sar.* 2023).

*Jagoda* (*Fragaria x ananassa* Duch) je član roda *Fragaria*, koja takođe pripada porodici *Rosaceae*. Jagoda predstavlja jednu od najcenjenijih vrsta voćaka i smatra se funkcionalnom hranom zbog potencijalnih zdravstvenih benefita i bogatog sadržaja hranljivih supstanci, sa jedinstvenom bojom, ukusom i aromom. Fenolni profil ploda jagode pretežno obuhvata flavonole, flavanole, antocijanine, fenolne kiseline i tanine. Katehin i epikatehin su najzastupljeniji flavanoli, dok se iz klase flavonola najčešće javljaju kvercetin i kampferol (Wang i Zheng 2001). Najzastupljenija grupa flavonoida prisutna u plodu jagode su antocijanini. Otprilike 70% ukupnog antioksidativnog kapaciteta potiče od antocijanina (Giampieri *i sar.* 2012). Pelargonidin 3-*O*-glukozid je najdominantniji antocijanin identifikovan u plodu jagode, a za njim slede pelargonidin 3-*O*-rutinozid i cijanidin 3-*O*-glukozid. Oni čine više od 95% ukupnog antocijaninskog sadržaja prisutnog u plodu jagode (Amini *i sar.* 2017). Plod jagode se smatra bogatim izvorom elaginske i *p*-kumarske kiseline, koje zajedno čine oko 85% ukupnih fenolnih jedinjenja, zajedno sa antocijaninima. Kao i kod maline predstavnik hidrolizujućih tanina je elagitanin sanguin H-6 (Andrianjaka-Camps *i sar.* 2017). Dodatno, naučna istraživanja ukazuju na to da plod jagode zadržava više antioksidativnih jedinjenja tokom dužeg perioda čuvanja na temperaturi od 0 °C, u poređenju sa uzorcima skladištenim na 5 °C ili 10 °C (Ayala-Zavala *i sar.* 2004).

*Dud* pripada porodici *Moraceae*, konkretno rodu *Morus*. Ovaj rod obuhvata 24 vrste, pri čemu je poznato oko 100 sorti (Natić *i sar.* 2015), a tri najpoznatije vrste su crni dud (*M. nigra*), beli dud (*M. alba*) i crveni dud (*M. rubra*). Plodovi duda su bogati raznovrsnim polifenolima, uključujući flavone, izoflavonole, lignane, tanine, antocijanine, katehine i flavonole. Pored najdominatnijeg flavonola, rutina, u plodu duda se nalaze i kvercetin, miricetin i kampferol, zajedno sa njihovim odgovarajućim derivatima. Flavanoli prisutni u plodu duda uključuju katehin, epikatehin i procijanidine B1 i B2. Najzastupljeniji antocijanini u plodovima duda obuhvataju cijanidin 3-*O*-glukozid, cijanidin 3-*O*-rutinozid, pelargonidin 3-*O*-glukozid i pelargonidin 3-*O*-rutinozid (Li *i sar.* 2023). Fenolne kiseline u plodu duda su pretežno zastupljene u formi derivata hidroksicimetnih kiselina, poput hlorogene, cimetine i kofeinske kiseline, kao i derivata hidroksibenzoevih kiselina, uključujući galnu, elaginsku i vanilnsku kiselinu (Khalifa *i sar.* 2018). Istraživanja, kako *in vitro* tako i *in vivo*, su pokazala da bioaktivni sastojci ploda duda ispoljavaju širok spektar bioaktivnih svojstava, uključujući antioksidativna, neuroprotektivna, antiaterosklerotska, imunomodulatorna, antitumorska, antihiperlipidemiska i hipoglikemijska svojstva (Memete *i sar.* 2022). Prema nedavnim istraživanjima (Sohail 2023), plod crnog duda ima više flavonoida, antocijanina, pa samim tim i veću



antioksidativnu sposobnost u poređenju sa plodom crvenih ili belih vrsta. Količine hlorogene, siringinske, *O*-kumarinske i vanilinske kiseline bile su više u odnosu na *M. alba* i *M. rubra*. Razlike u nivou flavonoida opravdavaju veću antioksidativnu i antikancerogenu aktivnost *M. nigra* u poređenju sa plodom belog i crvenog duda.

*Listovi jagodastih voćnih vrsta* obično se generišu kao nusproizvodi tokom proizvodnje voća i često se odbacuje kao otpad (Arshad *i sar.* 2023). Iako često zanemareno, listovi jagodastih voćnih vrsta predstavljaju značajan izvor lekovitih svojstava, posebno zbog bogatog sadržaja fenolnih jedinjenja. Ispitivanja ukazuju da je sadržaj polifenola u listu jagodastih vrsta voćaka uporediv, pa čak i superiorniji u odnosu na fenolni sadržaj samog ploda (Mirza 2021). U pogledu suve mase, plod maline je pokazao prosečno 5,4 puta niže vrednosti ukupnog fenolnog sadržaja i 4,1 puta niže vrednosti ukupnog flavonoidnog sadržaja u poređenju sa listovima koji su ubrani u isto vreme. Takođe, utvrđeno je da je antioksidativni kapacitet ploda maline bio niži u poređenju sa listom (Lebedev *i sar.* 2022). Naučnici sugerišu da se ove značajne razlike mogu pripisati visokom sadržaju šećera u plodu, što značajno redukuje udeo fenola (Vilkickyte *i sar.* 2020). Listovi voćnih vrsta već dugo se koriste kao biljni čajevi i tradicionalni lekovi. List maline se koristi u borbi protiv groznice, dijabetesa, dijareje i bolova u stomaku, dok se list kupine preporučuje za opuštanje mišića materice, naročito tokom trudnoće, i imaju adstrigentna i antiinflamatorna svojstva (Krzepiľko *i sar.* 2021). Istraživanja su pokazala da polifenoli lista kod vrsta koje pripadaju familiji *Rosaceae* imaju antikancerogene, antioksidativne i antimikrobne osobine (Luo *i sar.* 2020). Takođe, analize su pokazale da je količina ukupnih polifenola i ukupnih flavonoida u listu maline značajno veća u odnosu na list kupine (Varzaru *i sar.* 2023). Karakteristična fenolna jedinjenja detektovana u ekstraktima listova jagodastih vrsta voćaka su elaginska kiselina i njeni derivati, kvercetin i njegovi derivati, kampferol i različiti katehini (Tian *i sar.* 2017).

**Samonikle vrste voćaka** obuhvataju plodove koji spontano rastu u prirodi, bez direktnog ljudskog uticaja. To uključuje raznovrsne vrste voćaka poput drena (*Cornus mas*), gloga (*Crataegus sp.*), zove (*Sambucus sp.*), crnog trna (*Prunus spinosa*), kao i plodove drugih samoniklih vrsta voćaka koji se javljaju u prirodnim ekosistemima. Plodovi samoniklih vrsta voćaka često imaju specifičan ukus i teksturu i bogati su hranljivim sastojcima i bioaktivnim komponentama, kao što su fenolna jedinjenja. Tokom poslednjih godina, samonikle voćne vrste privlače sve veću pažnju, a sprovedena brojna istraživanja o antioksidativnim, antimikrobnim, protivupalnim i antikancerogenim svojstvima njihovih plodova, ukazuju na njihov potencijalni doprinos u prevenciji i lečenju određenih hroničnih bolesti (Li *i sar.* 2016).

Zova (*Sambucus sp.*) je biljka koja pripada familiji *Adoxaceae* (*Caprifoliaceae*), a najznačajnije vrste su *Sambucus nigra* (evropska crna zova) i *Sambucus canadensis* (američka zova). Interes za upotrebom crne zove značajno je porastao poslednjih decenija zbog velike količine fitohemikalija, široke rasprostranjenosti u divljini i jednostavnih uslova proizvodnje (Vujanović *i sar.* 2019). Svi morfološki delovi ove biljke, uključujući cvet, koru, list i plod, predstavljaju bogate izvore dijetetskih fitohemikalija poput ugljenih hidrata, lipida, terpenoida, flavonoida, fenolnih kiselina i alkaloida (Ağalar 2019). Najzastupljeniji polifenoli u plodu crne zove su antocijanini, koji doprinose njihovom visokom antioksidativnom kapacitetu. Ukupan sadržaj antocijanina u plodu zove zavisi od lokaliteta gde biljka raste, što rezultuje varijacijama u hemijskom sastavu ploda zove na kvalitativnom i kvantitativnom nivou. Primećeno je da plod zove određenih sorti ima specifična jedinjenja, poput cijanidin 3-*O*-sambubiozid-5-*O*-glukozid i cijanidin 3,5-*O*-diglukozid, koji se mogu koristiti kao markeri za razlikovanje tih genotipova (Ferreira *i sar.* 2022). Takođe su utvrđeni i tragovi derivata pelargonidina, petunidina i delfinidina u određenim genotipovima *S. nigra*. Osim toga, plod zove je bogat izvor flavanola, kao što su kampferol, astragalin, kvercetin, kvercetin 3-*O*-glukozid, rutin, izokvercitrin i hiperozid (Domínguez *i sar.* 2020). Među identifikovanim fenolnim kiselinama, najzastupljeniji su derivati kofeoilhinske kiseline (hlorogene kiseline) kao što su 5-*O*-*trans*-kofeoilhinska kiselina, 3-*O*-kofeoilhinska kiselina, 4-*O*-kofeoilhinska kiselina, 5-*O*-*cis*-kofeoilhinska kiselina, 3-*O*-feruloilhinska kiselina, 3-*O*-*p*-kumaroilhinska kiselina, 3,5-di-*O*-kofeoilhinska kiselina

i 4,5-di-*O*-kafeoilhinska kiselina (Mikulic-Petkovsek *i sar.* 2015). Terapeutski potencijal ploda zove obuhvata širok spektar benefita, uključujući regulaciju dijabetesa, kontrolisanje krvnog pritiska, poboljšanje kognitivnih funkcija i jačanje imunološkog sistema, uz ublažavanje simptoma gripa i prehlade sa potvrđenim efektima u nekoliko *in vitro* i *in vivo* studija i kliničkih ispitivanja (Zielińska-Wasielica *i sar.* 2019).

*Dren* (*Cornus mas* L.) je lekovita biljka koja pripada familiji *Cornaceae* i u svetu postoji oko 50 sorti drena. S obzirom da uspeva u prirodnim uslovima bez upotrebe pesticida, pogodna je za gajenje u skladu sa principima organske poljoprivrede. Antocijanini, fenolne kiseline, flavonoidi, katehini i tanini su osnovni polifenoli, koji čine 37,76% od ukupnih detektovanih fenolnih jedinjenja (De Biaggi *i sar.* 2018). Koncentracija antocijanina je odlučujuća za boju ploda drena, koja može varirati od žute, preko ružičaste, crvene, do gotovo crne. Antocijanini koji se javljaju u plodu drena su glikozidni derivati cijanidina, delfinidina i pelargonidina. Glikozidni ostatak najčešće sadrži glukozu i galaktozu, dok su ksiloza, arabinoza i ramnoza manje učestali. Dominantni antocijanini u plodu drena su cijanidin 3-*O*-glikozid, cijanidin 3-*O*-rutinozid, peonidin 3-*O*-glikozid, pelargonidin 3-*O*-glikozid, pelargonidin 3-*O*-robinobiozid, pelargonidin 3-*O*-galaktozid, pelargonidin 3-*O*-rutinozid, delfinidin 3-*O*-galaktozid, delfinidin 3-*O*- $\beta$ -glikozid i petunidin 3-*O*-glikozid. Jedna od posebno zanimljivih aktivnih jedinjenja drena iz grupe polifenola jeste elaginska kiselina (Bayram i Arda Ozturkcan 2020). Moldovan i saradnici su dokazali da pored elaginske kiseline, u plodu drena ima i flavonola kvercetin 3-*O*-glikuronid i kampferol 3-*O*-galaktozid (Moldovan *i sar.* 2016). U poslednjih nekoliko godina, plodovi *Cornus mas* L. bili su predmet brojnih studija koje su utvrdile antiinflamatorno, antibakterijsko, antioksidativno, antidijabetsko, antiaterosklerotsko, antiproliferativno, antiparazitsko, antihiperlipidemijsko, nefroprotektivno, hepatoprotektivno i neuroprotektivno dejstvo (Bayram i Arda Ozturkcan 2020). Istraživanja pokazuju da su ne samo plod drena, već i njegova kora, list i semenke bogati polifenolima (Tarko *i sar.* 2014).

*Crni trn* (*Prunus spinosa* L.) je višegodišnja listopadna biljka koja pripada familiji ruža (*Rosaceae*). Plod crnog trna predstavlja značajan izvor hranljivih supstanci, vitamina, minerala, dijetetskih vlakana, fitohemikalija i posebno antioksidativnih jedinjenja. Najvažnije bioaktivne supstance prisutne u plodu crnog trna obuhvataju antocijanine, flavonole, flavanole, tanine i fenolne kiseline. Najčešći flavonoli u plodu ove voćne vrste su kvercetin i njegovi glikozidi, poput rutina, koji se nalaze u većim koncentracijama u pokožici ploda. Takođe su pronađene bioaktivne supstance poput cijanidina, kampferola, katehina, epikatehina, galne, kofeinske, hlorogene, siringinske, vanilinske, ferulinske i *p*-kumarinske kiseline. Plod crnog trna ima adstringentan ukus zbog prisutnih tanina. Visoka koncentracija antocijanina daje plodu crnog trna tamnoplavu boju, pri čemu su cijanidin 3-*O*-glukozid, cijanidin 3-*O*-rutinozid i peonidin 3-*O*-glukozid najzastupljeniji (Negrean *i sar.* 2023). Antocijanini značajno doprinose antioksidativnoj sposobnosti lista crnog trna, što je potvrđeno korelacijama između količina ukupnih fenola, flavonoida i antocijanina i vrednosti dobijenih za antioksidativni kapacitet (Veličković *i sar.* 2021). Velika količina polifenola i drugih antioksidanasa u plodu crnog trna naglašava visok potencijal ovog ploda u prevenciji bolesti povezanih sa oksidativnim stresom. Ova biljka je prepoznatljiva po svojoj diuretičkoj, antimikrobnoj, antiinflamatornoj i antioksidativnoj delotvornosti (Katanić Stanković *i sar.* 2022).

*Glog* (*Crataegus* sp.) je biljka koja je taksonomski klasifikovana unutar familije *Rosaceae*. Trenutno se smatra da rod *Crataegus* L. Obuhvata 200 vrsta, pri čemu je *Crataegus monogyna* (beli glog) najčešća vrsta gloga. Plod roda *Crataegus* sadrži visoke nivoe brojnih sekundarnih metabolita kao što su fenolne kiseline i flavonoidi. Najzastupljenija fenolna kiselina u plodu gloga je hlorogena kiselina, koja čini više od 80% ukupnih fenolnih kiselina, a pored nje su prisutne i gentizinska, sinapinska, protokatehinska, *p*-kumarinska, galna, vanilnska, siringinska, ferulinska, cimetna, kofeinska i elaginska kiselina, kofeoil 3-glukozid i florodizin. Proantocijanidini i ukupni flavonoidi se ističu kao dve ključne kategorije bioaktivnih jedinjenja ploda gloga. Udeo flavonoida u plodu gloga kreće se od 0,1% do 1,0%, dok ih u listu i cvetu ima od 1 do 2%. Proantocijanidini se mogu naći u rasponu od 1% do 3% u plodu i listu gloga, u odnosu na ukupni sadržaj flavonoida. U plodovima

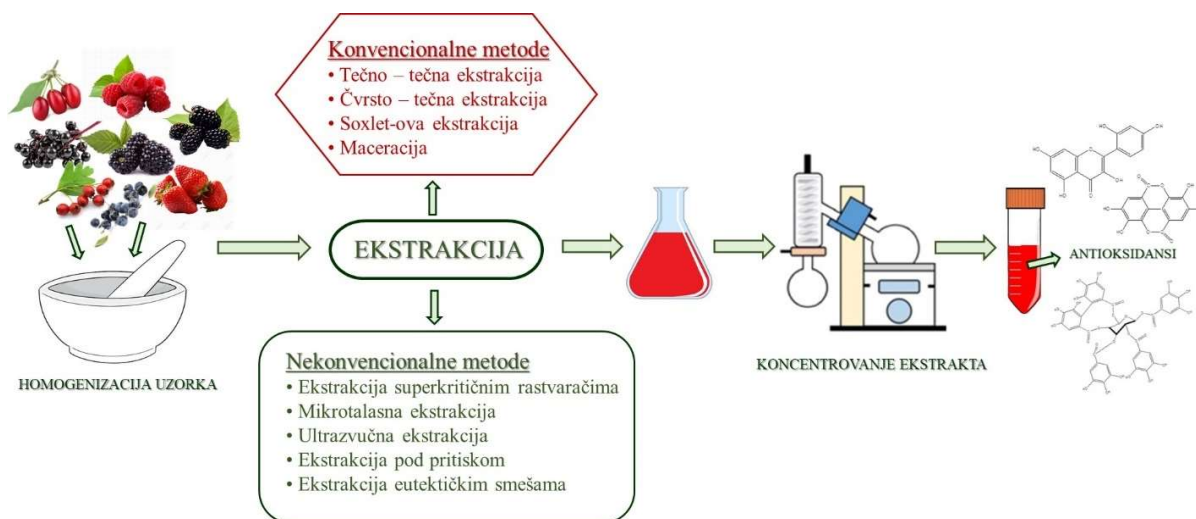
gloga izolovano je više od 60 flavonoida, pri čemu su najzastupljeniji hrizin, rutin, kampferol, kvercetin, apigenin, viteksin, viteksin 2-ramnozid i derivati katehina (Nazhand *i sar.* 2020, Benabderrahmane *i sar.* 2021). Iz plodu gloga, aglikoni fenolnih jedinjenja doprinose sa 35,3–37,8% antioksidativnom kapacitetu, dok nerastvorna konjugovana fenolna jedinjenja imaju udeo od 25 – 27% (Liu *i sar.* 2019). Glog se najčešće koristi u prevenciji i terapiji kardiovaskularnih bolesti, kancera, dijabetesa, astme i upale bubrega (Belabdelli *i sar.* 2022).

### 2.3. Ekstrakcija polifenola

Postupci ekstrakcije fenolnih jedinjenja iz biljnog materijala su predmet intenzivnog istraživanja, o čemu svedoče i revijalni radovi koji se redovno objavljuju (Alara *i sar.* 2021, Bitwell *i sar.* 2023). Ekstrakcija bioaktivnih jedinjenja je ključni korak u istraživanju prirodnih proizvoda. Izbor tehnike ekstrakcije zavisi od biljnog materijala, ciljanih fitohemijskih jedinjenja, odnosno hemijskih i fizičkih karakteristika analiziranih jedinjenja (isparljivost, polarnost, rastvorljivost i termalna, oksidativna i hidrolitička stabilnost) (Alara *i sar.* 2021). Takođe, nekoliko faktora može uticati na prinos izolovanih polifenola, uključujući vreme ekstrakcije, vrstu rastvarača, odnos rastvarača i uzorka, temperatura, kao i broj ponovljenih ekstrakcija. Glavni cilj ekstrakcije je postizanje boljih prinosa bioaktivnih jedinjenja, kraćeg vremena ekstrakcije, ekonomske isplativosti i ekološke prihvatljivosti.

Zbog širokog spektra fenolnih jedinjenja u biljnom materijalu, razvijeno je dosta ekstrakcionih metoda, koje se mogu klasifikovati na konvencionalne i nekonvencionalne (**Slika 5**). Najčešće konvencionalne metode, za ekstrakciju fenolnih jedinjenja su tečno – tečno i čvrsto – tečne ekstrakcije, koje se razlikuju po efikasnosti i vrstama rastvarača i zasnivaju se na primeni toplote i/ili mešanju. Ove metode koriste različite organske rastvarače (metanol, etanol, aceton, heksan, etil-acetat, hloroform) i često zahtevaju dodatak različitih količina vode kako bi se ekstrahovala polarna fenolna jedinjenja. Međutim, još uvek postoje sumnje u vezi sa najpogodnijim rastvaračem za ekstrakciju polifenola. U određenim situacijama, aceton se pokazao kao efikasniji rastvarač u izolovanju polifenola u poređenju sa metanolom, vodom i etanolom. Postoje studije koje ističu da je voda bolji rastvarač za ekstrakciju polifenola ili da je upotreba kombinacije vode i organskih rastvarača efikasnija u ekstrakciji fenolnih jedinjenja u poređenju sa čistim organskim rastvaračima (Alara *i sar.* 2021). Očigledno je da još uvek nema jednog univerzalnog rastvarača koji bi se smatrao najboljim za ekstrakciju sekundarnih metabolita. Međutim, poznato je da rastvarači veće polarnosti obično daju najbolje rezultate u ekstrakciji polifenola zbog njihove visoke rastvorljivosti u takvim rastvaračima. Važno je istaći da je struktura fenolnih jedinjenja, kao što su stepen konjugacije i prisustvo višestrukih hidroksilnih grupa, glavni faktor koji utiče na njihovu rastvorljivost u različitim rastvaračima. Stoga se preporučuje prethodno testiranje i prilagođavanje optimalnog rastvarača pre ispitivanja fenolnih jedinjenja. Takođe je važno uzeti u obzir i faktore kao što su polaritet, tačka ključanja, reaktivnost, viskozitet i stabilnost rastvarača (Alara *i sar.* 2021). Pored toga, postoje još dva bitna parametra koja utiču na količinu izolovanih polifenola iz biljnog materijala, a to su temperatura i vreme ekstrakcije. Povećanje temperature i produženo vreme ekstrakcije poboljšavaju rastvorljivost polifenola, međutim potrebno je voditi računa da ne dođe do njihove degradacije koje se dešavaju pri dugom ekstrakcionom procesu i visokim temperaturama. Za fenolna jedinjenja koja se nalaze u vezanom obliku sa ugljenim hidratima ili proteinima, potreban je dodatni korak u pripremi uzoraka, koji uključuje hidrolizu. Hidroliza se može izvesti pre, tokom ili nakon ekstrakcije primenom različitih kiselina, baza ili enzima, radi oslobađanja vezanih polifenola i povećanja prinosa njihovih aglikonskih formi (Domínguez-Rodríguez *i sar.* 2017). Za razliku od drugih polifenola, kao što su fenolne kiseline ili flavonoidi, antocijanini se obično ekstrahuju korišćenjem organskih rastvarača, poput metanola, sa niskim procentom jakih kiselina (HCl), zbog stabilnosti flavilijum-jona na niskim pH vrednostima (Domínguez-Rodríguez *i sar.* 2017).

U većini studija se koriste konvencionalne metode ekstrakcije zbog njihove niske cene i jednostavnosti korišćenja. Međutim, istraživanja su ukazala da konvencionalne metode karakteriše upotreba velikih količina organskih rastvarača, duže vreme trajanja ekstrakcije, niska selektivnost i moguća degradacija toplotno nestabilnih jedinjenja. Zbog ovih nedostataka, poslednjih godina konvencionalne metode se zamenjuju alternativnim metodama ekstrakcije, kao što su ekstrakcija eutektičim smešama, superkritična ekstrakcija, mikrotalasna ekstrakcija, ultrazvučna ekstrakcija i druge. Prednosti nekonvencionalnih tehnika uključuju automatizaciju, poboljšanu selektivnost, smanjenu potrošnju ekstrakcionih rastvarača, kraće vreme i veću efikasnost ekstrakcije (Mondragón *i sar.* 2022).



**Slika 5.** Postupak ekstrakcije polifenola iz biljnog materijala.

Danas je očuvanje životne sredine jedan od najbitnijih ciljeva, te je u fokusu razvoj ekološki prihvatljivijih rastvarača koji odgovaraju tehnološkim i ekonomskim zahtevima. Različite vrste ekološki prihvatljivih rastvarača, poput eutektičkih smeša, superkritičnih rastvarača i jonskih tečnosti, pokazale su visok potencijal u mnogim primenama. Eutektičke smeše su veoma pogodne za ekstrakciju fenolnih jedinjenja iz biljnog materijala, zbog njihove dostupnosti, veoma niske isparljivosti, biorazgradivosti, niske toksičnosti, mogućnosti ponovne upotrebe i niske cene. Mogu se koristiti za ekstrakciju kako hidrofobnih, tako i hidrofилnih jedinjenja. Nedavno su razvijene prirodne eutektičke smeše koje obuhvataju primarne metabolite, poput šećernih alkohola, ugljenih hidrata, aminokiselina i organskih kiselina. Ove smeše su veoma efikasne u ekstrakciji sekundarnih metabolita, zbog formiranja jakih vodoničnih veza između komponenata rastvarača i ekstrahovanih jedinjenja. Ove veze povećavaju prinos procesa ekstrakcije i stabilizuju dobijeni ekstrakt, čime štite molekule od razgradnje. Zamena konvencionalnih rastvarača prirodnim eutektičkim rastvaračima i njihovo korišćenje uz savremene tehnike ekstrakcije visoke energije, poput ultrazvučne i mikrotalasne ekstrakcije, poboljšava prinos ekstrakcije, skraćuje vreme ekstrakcije, razgradnju jedinjenja i negativne ekološke efekte (Koutsoukos *i sar.* 2019).

U superkritičnoj ekstrakciji, kao rastvarač za izolovanje ciljanih jedinjenja koristi se superkritični fluid, obično ugljen-dioksid ( $\text{CO}_2$ ). Superkritični fluid je supstanca koja je izložena temperaturi i pritisku iznad svoje kritične tačke, pri čemu ima osobine i gasa i tečnosti. U superkritičnoj ekstrakciji,  $\text{CO}_2$  deluje kao gas i lako prodire u čvrste materijale, rastvarajući ih poput tečnosti. Male promene u temperaturi i pritisku imaju značajan uticaj na gustinu fluida, što direktno utiče na rastvorljivost jedinjenja. To je ekološki prihvatljiva tehnika koja koristi malu količinu

organskih rastvarača i nudi povećanu selektivnost prema određenim bioaktivnim jedinjenjima (Câmara *i sar.* 2020).

Metode mikrotalasne ekstrakcije se često primenjuju u istraživanjima sekundarnih metabolita biljaka. Princip mikrotalasne ekstrakcije temelji se na upotrebi mikrotalasa određenih frekvencija za zagrevanje uzorka i izdvajanje ciljanih jedinjenja iz ispitivanog materijala. Najčešće korišćeni rastvarači pri mikrotalasnoj ekstrakciji su metanol, etanol, aceton, voda i acetonitril. Polarni rastvarači, u odnosu na nepolarne rastvarače, imaju veću dielektričnu konstantu i mogu apsorbovati više mikrotalasne energije, što može dovesti do većeg prinosa fenolnih jedinjenja. Ovaj postupak često omogućava bržu i efikasniju ekstrakciju u poređenju sa konvencionalnim metodama ekstrakcije (Câmara *i sar.* 2020).

Ultrazvučna ekstrakcija omogućava visok prinos bioaktivnih jedinjenja uz jednostavnu upotrebu, energetsku efikasnost i visoku reproduktivnost. Često se koristi za čvrsto/tečne sisteme, pri čemu dovodi do narušavanja ćelijskih zidova biljnog materijala i poboljšava transfer masa kroz ćelijske membrane. Na taj način, ultrazvuk modifikuje i remeti fizičke i hemijske karakteristike biljnog materijala, ubrzava oslobađanje fitohemijskih supstanci i dodatno pojačava kretanje rastvarača u ćelijama biljaka. U ranijim studijama utvrđeni su povećani prinosi fenolnih jedinjenja pri nižoj frekvenciji od 40 kHz u poređenju sa rezultatima postignutim pri frekvenciji od 120 kHz (González-Centeno *i sar.* 2014). Efikasnost ultrazvučne ekstrakcije potvrđena je studijom koja prikazuje značajno kraće vreme od 30 minuta i mnogo boljem prinosu u poređenju sa metodom maceracije, koja je trajala 120 minuta i davala manje prinose (Zhang *i sar.* 2009). Takođe, pigmenti biljnog porekla, poput antocijanina, karotenoida, betalaina i hlorofila primenom metode ultrazvučne ekstrakcije daju maksimalne prinose u poređenju sa konvencionalnim metodama (Kumar *i sar.* 2021). Ova zapažanja podstiču dalja istraživanja koja se bave analizom ultrazvučnih parametara radi poboljšanja i optimizacije efikasnosti procesa ekstrakcije.

Neka ispitivanja mogu zahtevati kombinaciju različitih metoda ekstrakcije kako bi se poboljšalo izolovanje fitohemikalija. To je obično slučaj kada jedna metoda ekstrakcije nije dovoljna da potpuno izdvoji ciljane fitohemijske jedinjenja iz biljnog materijala. Stoga, primena različitih metoda ekstrakcije može biti adekvatan pristup za ekstrakciju ciljanih bioaktivnih jedinjenja sa većom efikasnošću ekstrakcije (Alara *i sar.* 2021).

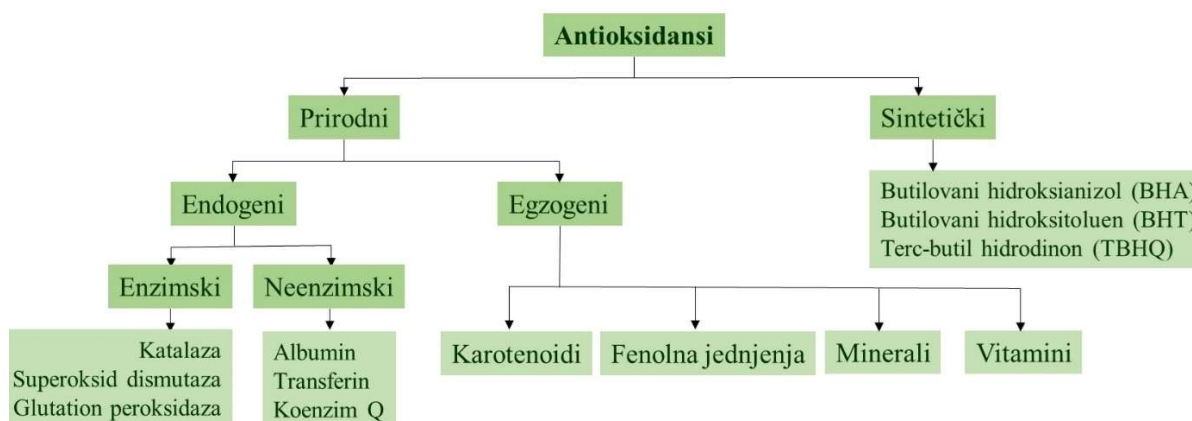
#### 2.4. Oksidativni stres i antioksidativna sposobnost sekundarnih metabolita

Na osnovu velikog broja istraživanja oksidansi se definišu kao štetni, visoko-reaktivni i nestabilni molekuli sa značajnim uticajem na biološki sistem. U normalnim metaboličkim procesima, organizam proizvodi oksidanse (slobodne radikale), ali istovremeno poseduje sopstvene mehanizme za neutralizaciju ovih radikala, koristeći antioksidanse koje proizvodi ili se unose putem ishrane. Antioksidansi su supstance koje sprečavaju ili usporavaju oksidacione procese u našem organizmu do kojih dolazi usled delovanja slobodnih radikala. Postoje mnogi literaturni podaci koji govore o svim aspektima testiranja antioksidanasa i njihovog odnosa prema zdravlju, uključujući njihovu aktivnost, klasifikaciju i primene (Amorati i Valgimigli 2015, Apak *i sar.* 2016, Gulcin 2020). Detaljno se analiziraju *in vitro* metode za određivanje antioksidativnog kapaciteta sastojaka hrane, a velika pažnja se posvećuje i *in vivo* metodama ispitivanja antioksidativne sposobnosti i njihovim eksperimentalnim postupcima. Međutim, zdravstvene koristi mnogih jedinjenja koja su *in vitro* antioksidansi, a pokazuju sličnu *in vivo* aktivnost, i dalje su upitne. To može biti posledica nekoliko faktora, kao što su nedostatak razumevanja mehanizma interakcije antioksidanasa u organizmu, nedostatak usaglašenosti različitih testova za određivanje antioksidativnog kapaciteta, kao i nedostatak specifičnosti ovih testova, što dovodi do nemogućnosti povezivanja određenih antioksidanasa sa zdravstvenim ishodima (Kotha *i sar.* 2022).

Oksidativni stres je prirodni fiziološki proces i može se definisati kao stanje u kojem slobodni radikali u organizmu nadmašuju antioksidativnu odbranu i mogu dovesti do oksidativnog oštećenja. Tada dolazi do neravnoteže u oksido-redukcionim procesima i oslobađa se veća količina slobodnih radikala. Povećani oksidativni stres može imati ozbiljne posledice u biološkim sistemima, uključujući oštećenje molekula (poput nukleinskih kiselina, lipida i proteina), što može ozbiljno uticati na zdravlje. Procenjeno je da je oksidativni stres povezan sa više od 100 bolesti, poput kancera, dijabetesa, hipertenzije, kardiovaskularnih i neurodegenerativnih bolesti (Kotha *i sar.* 2022).

Slobodni radikal (oksidans) može biti definisan kao "atom ili grupa atoma sa jednim ili više nesparenih elektrona koji postoje u slobodnom obliku" (Halliwell 1990). Nastaju homolitičkim raskidanjem kovalentne veze i njihova reaktivnost proističe iz sposobnosti da lako reaguju sa drugim molekulima, pri čemu primaju ili otpuštaju elektrone kako bi postigli svoju stabilnost. Glavne grupe slobodnih radikala su reaktivne vrste kiseonika (*Reactive Oxygen Species*, ROS), azota (*Reactive Nitrogen Species*, RNS) i sumpora (*Reactive Sulfur Species*, RSS). Reaktivne vrste kiseonika i azota mogu biti u obliku radikala i neradikala. Najčešći radikalski oblici ovih vrsta su superoksid anjon radikal ( $O_2^{\bullet-}$ ), hidroksil radikal ( $OH^{\bullet}$ ), hidroperoksil radikal ( $HOO^{\bullet}$ ), peroksil radikal ( $ROO^{\bullet}$ ) i azot-monoksidni radikal ( $NO^{\bullet}$ ), dok su u neradikalnom obliku najzastupljeniji singlet kiseonik ( $^1O_2$ ), vodonik-peroksid ( $H_2O_2$ ) i peroksininitrit anjon ( $ONOO^-$ ). Postoje brojni faktori koji utiču na stvaranje slobodnih radikala u organizmu, a najčešći su zagađenje životne sredine, ultraljubičasto zračenje, stres, upotreba alkohola i cigareta, kontakt sa teškim metalima, pesticidima, određenim lekovima, kao i metabolički procesi u telu (Phaniendra *i sar.* 2015). Na ćelijskom nivou, mitohondrije imaju ključnu ulogu u proizvodnji ROS, gde se generiše više od 90% ćelijskih reaktivnih vrsta kiseonika. Funkcionalne promene mitohondrija povezane su sa pojavom raznih metaboličkih bolesti (Foo *i sar.* 2022). U prisustvu ROS, DNK se oksiduje pri čemu se formira 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin, jedinjenje odgovorno za mutacije DNK u karcinogenezi (Ali Pambuk 2018). Singlet kiseonika reaguje sa organskim jedinjenjima i ima štetnu ulogu u biološkim sistemima, na primer, uključen je u oksidaciju LDL holesterola, što može dovesti do kardiovaskularnih bolesti. Istovremeno, reaktivne vrste kiseonika i azota učestvuju u nizu fizioloških aktivnosti, uključujući imunološku funkciju (npr. zaštitu od štetnih mikroorganizama) i pri umerenim ili niskim nivoima imaju povoljne efekte na organizam. Na primer, superoksid anjon ( $O_2^{\bullet-}$ ) i azot-monoksid ( $NO^{\bullet}$ ) radikali u niskim koncentracijama učestvuju u ćelijskim odgovorima i signalnim putevima. Vodonik-peroksid, nastao dejstvom različitih oksidativnih enzima i delovanjem superoksid-dismutaze (SOD), koristi se kao važan signalni molekul i takođe je supstrat za generisanje daljih reaktivnih vrsta, kao što je hipohlorna kiselina (HClO). Ravnoteža između štetnih i korisnih efekata slobodnih radikala ključan je za životne procese, a antioksidansi igraju veoma značajnu ulogu u postizanju ovog balansa.

Antioksidansi se mogu podeliti u nekoliko različitih kategorija: (I) prirodni i sintetički; (II) polarni i nepolarni; (III) endogeni i egzogeni; (IV) enzimski i neenzimski i (V) po mehanizmima u koje su uključeni (**Slika 6**). Sintetički antioksidansi, uprkos svojoj efikasnosti, pokazali su neke negativne efekte po zdravlje ljudi (Câmara *i sar.* 2020). Stoga je potreba za prirodnim izvorima antioksidanasa sve veća. Prirodni antioksidansi se klasifikuju kao endogeni i egzogeni, pri čemu njihovo zajedničko delovanje u ljudskom organizmu doprinosi efikasnoj neutralizaciji slobodnih radikala. Endogeni antioksidansi se prirodno proizvode u telu i mogu biti enzimski i neenzimski. Endogeni enzimi, poput superoksid-dismutaze (SOD), katalaze (CAT), glutation-reduktaze (GR) i glutation-peroksidaze (GPx) deluju kao antioksidansi prvog reda odbrane, pretvaraju reaktivni superoksid anjon i vodonik-peroksid u vodu i kiseonik (Clower *i sar.* 2022). Neenzimski endogeni antioksidansi mogu delovati kao drugi red odbrane protiv kiseoničnih reaktivnih vrsta, pri čemu brzo neutrališu slobodne radikale. Egzogeni antioksidansi, koji se unose putem hrane, obuhvataju različite klase jedinjenja poput vlakana, vitamina, ugljenih hidrata, minerala i polifenola koji su ključni u zaštiti ćelija od potencijalnih oštećenja izazvanih delovanjem slobodnih radikala (Rashmi i Negi 2020).



**Slika 6.** Klasifikacija antioksidanasa.

Prirodni antioksidansi neutrališu slobodne radikale u biološkim sistemima kroz tri mehanizma, kao što su transfer pojedinačnog elektrona (*Single Electron Transfer*, SET), transfer vodonikovog atoma (*Hydrogen Atom Transfer*, HAT) i heliranje prelaznih metala. Isti antioksidans može proći kroz hemijsku transformaciju ili putem jednog od tri mehanizma, ili kombinacijom dva mehanizma istovremeno, zavisno od strukture jedinjenja, okoline i drugih različitih uslova. Oni pokazuju svoju aktivnost sprečavanjem stvaranja slobodnih radikala i njihovih derivata, prekidom oksidacionih reakcija slobodnih radikala, kao i inaktiviranjem proizvoda reakcija slobodnih radikala i njihovih derivata (Kotha *i sar.* 2022).

Efikasnost fenolnih jedinjenja kao antioksidanasa zavisi od njihove antioksidativne aktivnosti i/ili antioksidativnog kapaciteta. Potrebno je naglasiti da su antioksidativna aktivnost i antioksidativni kapacitet dva različita pojma. Antioksidativna aktivnost opisuje kinetiku (brzinu) reakcije koja se odigrava između antioksidansa i ciljnog radikala. S druge strane, pojam antioksidativnog kapaciteta odnosi se na celokupni antioksidativni status u biološkim uzorcima i meri ukupnu količinu antioksidanasa koji mogu da neutrališu slobodne radikale. Antioksidativna sposobnost fenolnih jedinjenja zavisi od njihove složene hemijske strukture, broja i položaja hidroksilnih grupa, tip veza između atoma ugljenika, broja aromatičnih prstenova i stepena konjugacije unutar molekula. Benzenov prsten odgovoran je za stabilizaciju molekula antioksidansa pri reakciji sa slobodnim radikalima. Broj hidroksilnih grupa na benzeovom prstenu takođe doprinosi antioksidativnoj sposobnosti, gde pri povećanju broja OH grupa, raste i antioksidativni kapacitet. Sa druge strane, metoksi i glikozidne grupe mogu izazvati negativne efekte. Osim toga, stepen polimerizacije takođe može imati uticaj, pre svega pozitivan na antioksidativni kapacitet (Couttolenc *i sar.* 2020). Određeni fizički i hemijski parametri, poput pH vrednosti, temperature, svetlosti, kiseonika, enzima, askorbinske kiseline, šećera i jona metala, koji su česti tokom obrade, skladištenja i varenja, mogu uticati na njihovu stabilnost. Stoga, niska stabilnost polifenola može ometati njihov antioksidativni kapacitet u uobičajenim okolnostima, što predstavlja negativan faktor (Lang *i sar.* 2024).

U *in vitro* uslovima, najčešće korišćene tehnike za ispitivanje antioksidanasa uključuju tehnike zasnovane na emisiji svetlosti, fluorescentne, spektrofotometrijske i hromatografske tehnike.

## 2.5. Analitičke metode koje se najčešće koriste za karakterizaciju biljnog materijala

S obzirom na značaj konzumacije gajenih i samoniklih vrsta voćaka, postoji sve veća potreba za istraživanjima koja se odnose na kvalitet i autentičnost različitih voćnih vrsta. Zbog varijacija u strukturi polifenola, potrebno je optimizovati analitičke postupke kako bi se fenolna jedinjenja precizno identifikovala i kvantifikovala, a u tu svrhu koriste se različite spektroskopske i

hromatografske tehnike. Primena više različitih pristupa istovremeno omogućava sveobuhvatnu analizu biljnog materijala (Carrillo *i sar.* 2023).

### 2.5.1. Procena antioksidativnog kapaciteta spektrofotometrijskim metodama

Spektrofotometrija predstavlja apsorpcionu metodu koja se zasniva na analiziranju elektromagnetnog zračenja koje može da apsorbuje u ultraljubičastoj (UV), vidljivoj (VIS), infracrvenoj (IC), mikrotalasnoj i radiofrekventnoj oblasti (Bachmann i Miller 2020). Ultraljubičasti deo spektra nalazi se u opsegu talasnih dužina od 190 nm do 380 nm, dok je vidljivi deo spektra od 380 nm do 800 nm. Zbog prisustva aromatičnih prstenova, fenolna jedinjenja apsorbuju svetlost u UV-Vis opsegu, pa stoga se UV-Vis spektrofotometrija najčešće koristi za određivanje sadržaja polifenola, antocijanina i flavonoida, kao i za procenu njihovog antioksidativnog kapaciteta primenom različitih testova (Shard *i sar.* 2020). Određivanje sadržaja ukupnih polifenola (*Total Phenolic Content*, TPC) je metoda koja se koristi za procenu antioksidativnih sposobnosti sekundarnih metabolita i obično prethodi hromatografskim tehnikama za određivanje pojedinačnih fenolnih jedinjenja. Sadržaj ukupnih antocijanina (*Total Anthocyanin Content*, TAC) je metoda kojom se antocijanini voćnih vrsta određuju pH diferencijalnom metodom, koja je opšteprihvaćena od strane AOAC INTERNATIONAL (Lee *i sar.* 2005).

U literaturi su prikazane i objašnjene različite analitičke metode za procenu antioksidativnog dejstva fitohemijskih jedinjenja, a koje uključuju i *in vitro* i *in vivo* pristupe (Munteanu i Apetrei 2021). Najčešće korišćene *in vitro* metode za određivanje antioksidativnog kapaciteta polifenola zasnivaju se na spektrofotometrijskim testovima, koji su brzi, jednostavni, reproduktivni i ekonomični. Različiti mehanizmi delovanja antioksidanasa doprinose raznovrsnosti metoda za proučavanje antioksidativnih svojstava jedinjenja (Kotha *i sar.* 2022). Glavno ograničenje ovih testova je nedostatak specifičnosti, pri čemu jedinjenja koja ne pripadaju klasi polifenola mogu takođe reagovati na isti način, što može dovesti do pogrešnog tumačenja rezultata. Pored toga, važno je istaći da je nedostatak usaglašenosti metoda, pri čemu testovi za antioksidativni kapacitet ne pokazuju uvek međusobnu korelaciju (Apak *i sar.* 2016a). AOAC INTERNATIONAL (Association of Official Analytical Collaboration) i IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) su 2013. godine objavili da rezultati različitih metoda za ispitivanje antioksidanasa ne mogu biti direktno upoređeni. Razlog tome je što se metode za određivanje antioksidativnog kapaciteta oslanjaju na različite mehanizme, obuhvataju veoma različite matrikse uzorka i koriste različite eksperimentalne uslove poput pH vrednosti i temperature (Apak *i sar.* 2013). Zbog toga je i zaključak ovih eminentnih organizacija da ne postoji jedinstveni univerzalno prihvaćeni test antioksidativnosti koji precizno određuje antioksidativnu aktivnost ili ukupni antioksidativni kapacitet. Izražavanje rezultata u različitim jedinicama za isti test dodatno komplikuje poređenje podataka (Abramović *i sar.* 2018). Na primer, rezultati za sadržaj ukupnih polifenola mogu biti predstavljeni kao ekvivalenti galne kiseline, askorbinske kiseline ili ferulinske kiseline, što otežava poređenje istraživanja i tumačenje rezultata.

Takođe, antioksidansi mogu da neutrališu dejstvo slobodnih radikala u laboratorijskim uslovima (*in vitro*), ali još uvek nije potpuno dokazana niti standardizovana procedura njihovih efekata u organizmu (*in vivo*) (Laguerre *i sar.* 2007). Idealan pristup za procenu antioksidativne sposobnosti zahteva upotrebu biološki relevantnih izvora radikala, detaljno određivanje hemijskih procesa koji se dešavaju tokom testiranja, primenu metode sa jasno definisanim ciljevima i hemijskim mehanizmom, odabir metode koja je adekvatna za hidrofilne i lipofilne antioksidanse, kao i korišćenje odgovarajućih instrumenata. Ukupno gledano, ostvarivanje svih navedenih preporuka istovremeno nije jednostavno. Ipak, posvećivanje pažnje svakom od ovih koraka doprinosi povećanju pouzdanosti rezultata određivanja antioksidativnog kapaciteta (Kotha *i sar.* 2022).

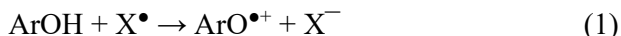
Na osnovu mehanizma delovanja antioksidanasa, antioksidativni testovi se mogu klasifikovati u šest kategorija:



- Testovi zasnovani na transferu pojedinačnog elektrona
- Testovi zasnovani na transferu atoma vodonika
- Testovi zasnovani na transferu elektrona i atoma vodonika
- Testovi zasnovani na heliranju metala
- Testovi zasnovani na oksidaciji lipida i sposobnosti neutralizacije ROS/RNS vrsta
- Određivanje antioksidativnog kapaciteta primenom enzima.

Mehanizmi bazirani na transferu pojedinačnog elektrona i atoma vodonika se skoro uvek javljaju paralelno u svim biološkim sistemima, iako jedan mehanizam može biti dominantan u određenom testu. Koji će mehanizam biti dominantan zavisi od svojstava i strukture antioksidanasa, rastvorljivosti i koeficijenta raspodele, sistema rastvarača i prisustva komponenata u tragovima.

Većina metoda za određivanje antioksidativnog kapaciteta se zasniva na mehanizmu transfera pojedinačnog elektrona. Ove metode omogućavaju procenu antioksidativnih svojstava polifenola merenjem njihove sposobnosti da prenesu elektrone radi redukcije jedinjenja od interesa:



U ovim testovima, termodinamička oksidacija antioksidanasa meri se na kraju redoks reakcije ili tokom određenog perioda. Testovi bazirani na transferu pojedinačnog elektrona zavise od pH vrednosti. U baznim uslovima disocijacija protona se povećava, što dovodi do povećanja redukcionne sposobnosti antioksidanasa. U ovu grupu spadaju testovi za određivanje sposobnosti redukcije bakarnih jona (*Cupric Reducing Antioxidant Capacity*, CUPRAC), sposobnosti redukcije jona gvožđa (*Ferric Reducing Antioxidant Power*, FRAP), sadržaja ukupnih polifenola (*Folin-Ciocalteu* test) i sposobnosti inhibicije ABTS<sup>•+</sup> (2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina)) (Apak *i sar.* 2016a). ABTS i CUPRAC testovi mogu detektovati kako hidrofilne, tako i lipofilne antioksidanasa, dok *Folin-Ciocalteu* i FRAP test isključivo detektuju hidrofilne antioksidanse. CUPRAC reagens je stabilniji i pogodniji za upotrebu u poređenju sa drugim hromogenim reagensima, poput ABTS. CUPRAC test se izvodi pri pH vrednosti od 7,0, što je veoma slično fiziološkoj pH vrednosti (7,4), pri čemu simulira antioksidativno delovanje u prirodnim uslovima. Pored toga, CUPRAC, kao i ABTS test je selektivan jer ima niži redoks potencijal u poređenju sa *Folin-Ciocalteu* i FRAP testovima (Bibi Sadeer *i sar.* 2020).

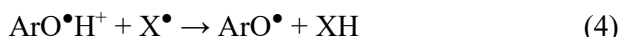
Testovi zasnovani na mehanizmu transfera atoma vodonika procenjuju sposobnost antioksidanasa da neutrališe reaktivne vrste kiseonika u reakciji prenosa atoma vodonika i time prekine radikalsku reakciju.



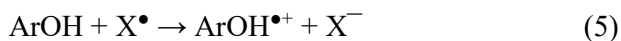
Ovi testovi mere brzinu reakcije, a određivanje se vrši analiziranjem kinetičkih krivih. Testovi koji se baziraju na transferu atoma vodonika nezavisni su od vrste rastvarača i pH vrednosti i obično se brzo izvode. Test za merenje kapaciteta apsorpcije radikala kiseonika (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*, ORAC) i test za određivanje ukupnog antioksidativnog kapaciteta neutralizacije radikala (*Total Radical Trapping Antioxidant Parameter*, TRAP) spadaju u ovu kategoriju (Apak *i sar.* 2016b). Glavna prednost ORAC metode određivanja antioksidacionog kapaciteta je što se merenje odvija pri fiziološkim uslovima (37 °C i pH vrednosti od 7,4), stoga se smatra da navedena hemijska metoda može najbolje predvideti antioksidaciono delovanje ispitivanog uzorka *in vivo*. Takođe, ORAC test može meriti antioksidativni kapacitet lipofilnih i hidrofilnih antioksidanasa. Međutim, sekundarne reakcije antioksidanasa sa metalima mogu dovesti do smanjenja koncentracije antioksidanasa i time uticati na vrednosti ORAC testa (Christodoulou *i sar.* 2022).

U slučaju mehanizma delovanja koji uključuje transfer elektrona i atoma vodonika, transfer atoma vodonika se odvija putem dvostrukog mehanizma. Jedan podrazumeva kuplovani prenos protona i elektrona, dok se kod drugog mehanizma odvija istovremeni prenos protona i elektrona.

a) Kuplovan prenos protona i elektrona (*Proton-coupled electron transfer*, PCET)

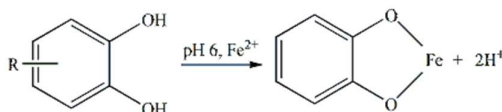


b) Transfer jednog elektrona uz prenos protona (*Single electron transfer-proton transfer*, SET-PT)



Testovi za određivanje sposobnosti neutralizacije 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikala (DPPH<sup>•</sup>) i određivanje antioksidativnog kapaciteta ekvivalenta troloksa (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*, TEAC) slede ovaj mehanizam (Apak *i sar.* 2016b). DPPH test se ističe po svojoj jednostavnosti, ekonomičnosti i brzini, s obzirom da je DPPH<sup>•</sup> stabilan radikal. Pored toga, efikasan je za termički nestabilna jedinjenja. Visoka osetljivost, mogućnost brzog testiranja velikog broja uzoraka i dobra korelacija DPPH vrednosti sa bioaktivnim jedinjenjima, poput polifenola, čini DPPH metodu pouzdanu za proučavanje antioksidativnih svojstava različitih supstanci. DPPH radikal rastvara se isključivo u organskim rastvaračima, što ograničava njegovu primenu na lipofilne supstance. Takođe, DPPH reaguje sa drugim radikalima prisutnim u ispitivanim uzorcima. Pored toga, određena jedinjenja, poput antocijanina i karotenoida, apsorbuju u sličnom opsegu talasnih dužina kao DPPH, što može uticati na tačnost rezultata (Bibi Sadeer *i sar.* 2020).

Proučavanje helatnih svojstava polifenola takođe može poslužiti kao dobar pristup u ispitivanju antioksidativnog kapaciteta. Glavni fokus u istraživanju helatnih svojstava leži u proučavanju načina vezivanja gvožđa (Šema 1). Gvožđe je ključni element za sve žive ćelije i ima važnu ulogu kao sastavni deo metaloproteina. S druge strane, joni Fe<sup>2+</sup> su najefikasniji prooksidansi među različitim vrstama jona metala, kao što su bakar, nikl, cink, molibden, kobalt i drugi. Vezivanjem za različite peptide i proteine smanjuje se dostupnost slobodnih jona gvožđa, a time i njegova toksičnost. Drugi način eliminacije toksičnih metala je građenje helatnih kompleksa (Gülçin 2012). Testovi koji ispituju helatna svojstva sekundarnih metabolita imaju dobru ponovljivost i reproduktivnost. Ovi testovi su nedovoljno specifični jer metali, osim sa fenolnim jedinjenjima, mogu reagovati i sa peptidima i sulfatima koji su prisutni u ispitivanim uzorcima. Takođe, ponekad rezultati koji se odnose na sadržaj ukupnih polifenola ne pokazuju korelaciju sa rezultatima ovih testova, a primećena je i slabija korelacija sa FRAP, CUPRAC, ABTS i DPPH testovima (Bibi Sadeer *i sar.* 2020).



Šema 1. Šematski prikaz heliranja jona metala

Lipidna peroksidacija je pokazatelj oksidativnog stresa u ćelijama, gde polinezasićeni peroksidi masnih kiselina stvaraju toksična jedinjenja poput malondialdehida i 4-hidroksi-2-alkenala. Ova jedinjenja, posebno malondialdehid, mogu doprineti oštećenju DNK i ćelijskih membrana, pri čemu dolazi do nastajanja različitih mutacija. Lipidnu peroksidaciju najčešće uzrokuje hidroksil radikal (OH<sup>•</sup>), međutim i pojedini drugi slobodni radikali mogu pokrenuti proces peroksidacije. U grupu testova koji inhibiraju lipidnu peroksidaciju spadaju testovi za određivanje sposobnosti uklanjanja vodonik-peroksida, sposobnosti neutralizacije radikala azot-monoksida, sposobnosti neutralizacije peroksinitril radikala i sposobnosti neutralizacije superoksid anjon radikala (Apak *i sar.* 2016b). Za razliku od DPPH ili ABTS koji su sintetički radikali, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i radikali poput NO<sup>•</sup>, NOO<sup>•</sup> i

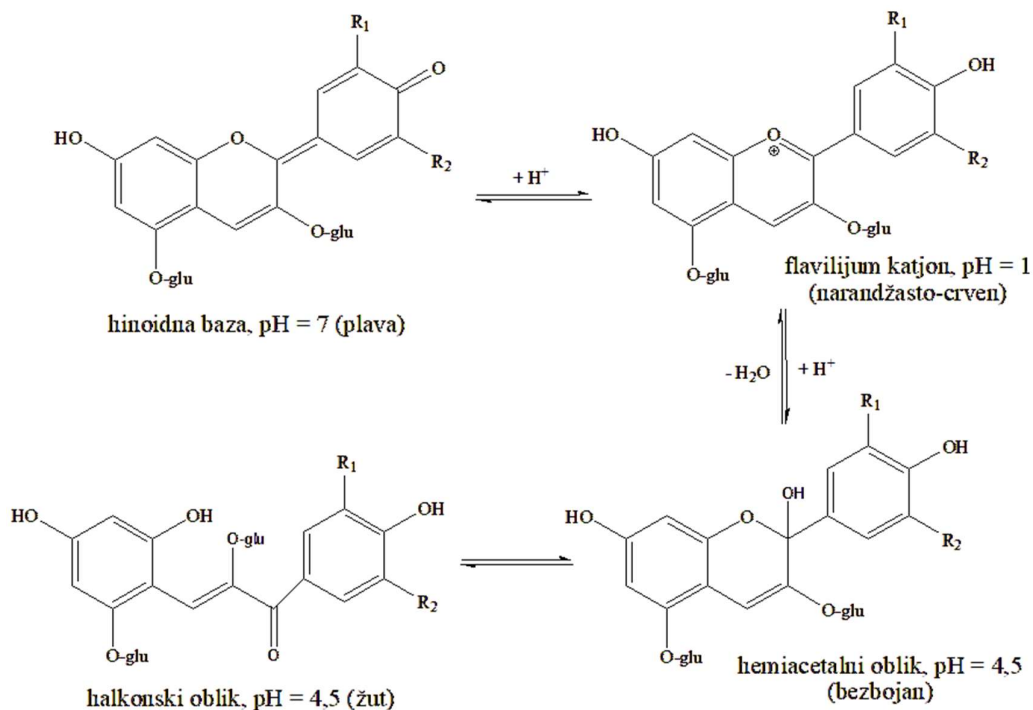
$O_2^{\bullet-}$  su sličniji biološkim sistemima. Takođe, testovi se odvijaju pri pH vrednostima koje su karakteristične za fiziološke uslove bioloških sistema. Kada se navedene metode uporede sa drugim metodama određivanja antioksidativne sposobnosti bioaktivnih jedinjenja, testovi za određivanje sposobnosti neutralizacije  $NO^{\bullet}$ ,  $NOO^{\bullet}$  i  $O_2^{\bullet-}$  nisu jednostavni i zahtevaju upotrebu nekoliko enzimskih reagenasa (Bibi Sadeer *i sar.* 2020).

Enzimski antioksidansi poseduju određene koenzime i obično su visoko specifični za reaktivne vrste supstrata. Neki od važnijih enzima koji se koriste za određivanje antioksidativne sposobnosti polifenola su superoksid-dismutaza, katalaza, glutation-peroksidaza i tirozinaza. Enzimski testovi mogu biti podložni uticaju spoljnih faktora poput temperature, pH vrednosti i prisustva inhibitora, što može uticati na tačnost rezultata (Weydert i Cullen 2010).

Iako određivanje ukupnog sadržaja polifenola (TPC) nije direktna mera antioksidativnog kapaciteta, visoka koncentracija polifenola dovodi se u vezu sa značajnim antioksidativnim svojstvima biljnog materijala. TPC test je kolorimetrijska metoda zasnovana na transferu pojedinačnog elektrona i povezan je sa redukcionom moći fenolnih antioksidanasa. Pokazano je da postoji dobra linearna korelacija između TPC metode i drugih testova koji se zasnivaju na mehanizmu transfera elektrona, poput TEAC i DPPH<sup>•</sup>. Takođe je čest slučaj da su korelacije TPC metode i metoda baziranih na prenosu atoma vodonika, kao što je ORAC zadovoljavajuće (Prior *i sar.* 2005). Ovo potvrđuje da je TPC metoda važna za određivanje ukupnog antioksidativnog kapaciteta. U praksi, sadržaj ukupnih polifenola se najčešće određuje primenom *Folin-Ciocalteu* reagensa, koji predstavlja smešu fosfomolibdenske i fosfovolframove kiseline (Singleton *i sar.* 1999). Ukupan polifenolni sadržaj biljnog materijala određuje se kao ekvivalent galne kiseline ili nekog drugog fenolnog jedinjenja (kofeinske kiseline, katehina, hlorogene kiseline ili ferulinske kiseline). Upotreba *Folin-Ciocalteu* testa za kvantifikaciju sadržaja ukupnih polifenolna ima mnoge prednosti, uključujući jednostavnost, ponovljivost, pouzdanost i direktne korelacije između polifenola i antioksidativne sposobnosti. Međutim, ovaj test ima i značajna ograničenja. Osetljiv je na pH vrednost, temperaturu i vreme trajanja reakcije. Takođe, *Folin-Ciocalteu* test nije dovoljno specifičan za fenolna jedinjenja, budući da druge supstance, kao što su redukujući šećeri, askorbinska kiselina i određene aminokiseline koje su veoma prisutne u biljnom materijalu, mogu redukovati *Folin-Ciocalteu* reagens i uticati na rezultate ispitivanja (Bastola *i sar.* 2017).

Sadržaj ukupnih antocijanina (TAC) je takođe kolorimetrijska metoda, koja se zasniva na primeni UV-Vis spektrofotometrije. Antocijanini, kao i ostala fenolna jedinjenja, imaju sposobnost neutralizacije slobodnih radikala i smanjenja oksidativnog stresa u organizmu (Mattioli *i sar.* 2020). Stoga je određivanje ukupnog sadržaja antocijanina od velike važnosti, jer omogućava procenu antioksidativnog kapaciteta uzorka, pružajući uvide u njegovu stabilnost i moguće zdravstvene benefite. Kao što je već prethodno navedeno, za određivanje koncentracije ukupnih antocijanina često se primenjuje jednostavna i brza pH-diferencijalna metoda (Solovchenko *i sar.* 2001). Ova metoda se zasniva na reverzibilnim strukturnim promenama antocijanina pri različitim pH vrednostima uzorka, a rezultati se manifestuju različitim UV spektrima. Antocijanini postoje u četiri strukturne forme koje su u dinamičkoj ravnoteži pri određenoj pH vrednosti (Slika 7). Flavilijum katjon (narandžasto-crveni oksonijum jon) dominira pri pH 1,0, dok se bezbojni hemiketalni oblik javlja na pH 4,5. Ova metoda se zasniva na pretpostavci da monomerni antocijanini imaju malu apsorbciju u puferu pH 4,5 i da će polimerni antocijanini apsorbovati pri ovoj pH vrednosti. Iako su skoro svi monomerni antocijanini u hemiketalnom obliku pri pH 4,5, mali deo je u hinoidalnom ili flavilijum obliku, što će doprineti niskoj apsorbciji. Stoga je razlika u apsorbciji na talasnoj dužini 520 nm antocijanina proporcionalna njegovoj koncentraciji. Ova metoda omogućava precizno i brzo merenje ukupne količine antocijaninina, čak i u prisustvu drugih pigmenta i ometajućih jedinjenja. Sadržaj ukupnih antocijanina se preračunava na koncentraciju dominantnog antocijanina prisutnog u analiziranom uzorku, pri čemu je u plodovima jagodastih vrsta voćaka to uglavnom cijanidin 3-glukozid (Yan *i sar.* 2023). Validnost ove metode i osnovni principi za određivanje koncentracije antocijanina pH diferencijalnom metodom već godinama su široko prihvaćeni od strane hemičara koji

se bave analizom prirodnih proizvoda. U uporednoj studiji u kojoj je učestvovalo jedanaest komercijalnih laboratorija, akademskih institucija i državnih laboratorija sprovedeno je istraživanje kako bi se odredila koncentracija ukupnih monomernih antocijanina pH diferencijalnom metodom u voćnim sokovima, prirodnim bojama i vinima. Na osnovu dobijenih rezultata pokazano je da se ukupni sadržaj antocijanina u saglasnosti između različitih laboratorija, pri čemu je predloženo da se ova metoda usvoji kao prva zvanična AOAC INTERNATIONAL metoda (Lee *i sar.* 2005). Iako je određivanje ukupnih antocijanina korisno za procenu kvaliteta voćnih sokova i pića, samo po sebi ima ograničenu primenu u istraživanjima autentičnosti. Stoga bi trebalo da se koristi u kombinaciji sa hromatografskim analizama koje omogućavaju identifikaciju i kvantifikaciju pojedinačnih antocijanina.



**Slika 7.** Hemijske karakteristike antocijanina u zavisnosti od pH vrednosti sredine.

### 2.5.2. Hromatografske metode

Pored spektrofotometrijskih metoda koje pružaju informacije o sadržaju ukupnih polifenola, separacione metode omogućavaju detaljnije analiziranje polifenolnih profila. Stoga, primena hromatografskih tehnika predstavlja najbolji izbor za određivanje bioaktivnih komponenti prisutnih u uzorcima. Većina istraživanja koja se odnose na karakterizaciju biljnog materijala, posebno voćnih vrsta, zasnovana su na primeni tačne hromatografije (*Liquid Chromatography*, LC), uključujući tankoslojnu hromatografiju (*Thin-Layer Chromatography*, TLC) i gasne hromatografije (*Gas Chromatography*, GC) (Kurrey *i sar.* 2022). Ipak, do danas nije razvijena univerzalna hromatografska metoda koja je sposobna da efikasno razdvoji različite tipove fenolnih jedinjenja. Optimizacija hromatografskih metoda predstavlja ključni aspekt u postizanju visoke efikasnosti, preciznosti i pouzdanosti analize različitih supstanci. Kako bi se postiglo najbolje moguće odvajanje analita neophodno je optimizovati brojne parametare, poput sastava mobilne faze, vrste i veličine kolone, protoka eluenta, temperature i parametara detekcije. Pored toga, potrebno je uzeti u obzir i stereohemiju, molekulska masu i stepen polimerizacije fenolnih jedinjenja, s obzirom da ovi faktori značajno utiču na njihovo hromatografsko ponašanje (Pyrzynska i Sentkowska 2015). Kako bi se procenio sastav biljnog materijala, hromatografske tehnike u kombinaciji sa odgovarajućim

tehnika detekcije pružaju velike mogućnosti za razdvajanje pojedinačnih fenolnih jedinjenja, kao i njihovu kvantifikaciju.

### 2.5.2.1. Tankoslojna hromatografija

Tankoslojna hromatografija (TLC) se često koristi za brzu analizu ekstrakata biljaka radi identifikacije fenolnih supstanci pre nego što se pristupi detaljnoj analizi. Glavne prednosti TLC-a, u odnosu na ostale hromatografske tehnike, su mogućnost istovremene analize više uzoraka, jednostavna priprema uzorka, brzo skeniranje velikog broja uzoraka i ekonomična analiza. Stoga je TLC metoda postala često korišćena hromatografska tehnika u analizi hrane i prirodnih proizvoda. Tokom poslednjih decenija, razvoj mnogobrojnih visokoefikasnih stacionarnih faza i automatizovanih uređaja, zajedno sa masenim detektorima različitih performansi, značajno je proširio primenu tankoslojne hromatografije u različite industrijske i naučne oblasti (Milojković-Opsenica i Andrić 2014).

Visokoefikasna tankoslojna hromatografija (HPTLC, *High-Performance Thin-Layer Chromatography*) je veoma efikasna instrumentalna tehnika pogodna za kvalitativna i kvantitativna ispitivanja. U poređenju sa klasičnom TLC tehnikom, u HPTLC u upotrebi je adsorpcijski sloj visokih performansi sa manjim prečnikom čestica (5  $\mu\text{m}$ ), što omogućava bolju rezoluciju (Gupta *i sar.* 2022). Dobra reproduktivnost, visoka osetljivost, kao i stalna poboljšanja karakteristika HPTLC analiza dodatno povećavaju primenu planarne hromatografije u razdvajanju biljnih metabolita iz složenih prirodnih smeša (Ristivojević *i sar.* 2019). Kao rezultat, HPTLC hromatogram sadrži veliki broj informacija o polaritetu analita, prisustvu ili odsustvu određenih funkcionalnih grupa (na osnovu selektivne reakcije derivatizacionog reagensa), spektralnim svojstvima, kao i razlikama u strukturama metabolita između uzoraka. Dodatno, derivatizacija reagensima (npr. 2,2-difenil-1-picrilhidrazil, DPPH), enzimima ili živim ćelijama (bakterije, kvasci, gljive) pruža informacije o biološkoj aktivnosti pojedinačnih jedinjenja i njihovom doprinosu ukupnoj biološkoj aktivnosti (Ristivojević *i sar.* 2014). Karakterizacija uzoraka se često zasniva na analizi hemijskog otiska prsta, koji se može definisati kao skup karakterističnih hromatografskih signala koji se mogu koristiti za prepoznavanje uzorka (Krstić *i sar.* 2023). U literaturi se mogu naći brojni primeri primene HPTLC u identifikaciji bioaktivnih jedinjenja u plodu jagodastih voćnih vrsta (Carrillo *i sar.* 2023). Dosadašnja istraživanja su ukazala na to da je HPTLC prikladan za kvantifikaciju antocijanina u plodu zove, a u kombinaciji sa masenom spektrometrijom može biti korisna za dobijanje hromatografskog „otiska prsta” (fingerprinting) ploda zove (Krüger *i sar.* 2015). Slični profili flavanola ispitivanih uzoraka plodova samoniklih vrsta voćaka koji su dobijeni primenom dve metode, HPTLC-MS i UHPLC-LTQ OrbiTrap MS<sup>n</sup>, ukazuju da HPTLC može biti metoda izbora za definisanje polifenolnog profila (Dabić Zagorac *i sar.* 2020). Takođe, HPTLC metoda se često koristi za kontrolu kvaliteta biljnih proizvoda i utvrđivanje njihove autentičnosti (David *i sar.* 2014). S obzirom na sve navedeno, HPTLC tehnika bi mogla biti korišćena kao pouzdana i jednostavna tehnika za neciljanu analizu i efikasno razlikovanje biološkog i geografskog porekla biljnog materijala.

### 2.5.2.2. Ultra-visokoefikasna tečna hromatografija sa masenom spektrometrijom

Za detaljnije istraživanje prisutnih bioaktivnih jedinjenja u različitim biljnim materijalima, primenjuju se napredne i analitičke tehnike visoke rezolucije, kao što su visokoefikasna tečna hromatografija (*High-Performance Liquid Chromatography*, HPLC) i ultra-visokoefikasna tečna hromatografija (*Ultra-High Performance Liquid Chromatography*, UHPLC). Stacionarna faza kod analitičkih kolona koje se koriste za odvajanje polifenola uglavnom je oktadecil-modifikovani silika gel (RP-C18), pri čemu veličina čestica stacionarne faze može varirati od 3-5  $\mu\text{m}$  (HPLC) ili ispod 2  $\mu\text{m}$  (UHPLC). Na ovim analitičkim kolonama fenolna jedinjenja se razdvajaju prema polarnosti uz primenu gradijentnog eluiranja. Mobilna faza obično obuhvata smešu vode i pogodnog organskog

rastvarača, kao što su metanol ili acetonitril. Takođe, koriste se kiseline poput mravlje ili sirćetne u niskim koncentracijama (0,005 – 0,5% (v/v)), radi dobijanja boljih i oštrijih pikova i olakšane jonizacije (Rajauria 2018). Za efikasniju analizu, važno je kontrolisati temperaturu kolone, koja se obično kreće u rasponu od 25 – 40 °C. Povišene temperature utiču na smanjenje pritiska u koloni kada se koriste visoke brzine protoka, što rezultuje skraćanjem vremena analize (Plaza *i sar.* 2018).

U poslednjih nekoliko godina, UHPLC se pokazala kao brza i efikasna tehnika koja se primenjuje u analizi fenolnih komponenti biljnog materijala. Prednosti UHPLC-a u odnosu na HPLC su visoka rezolucija, visoka osetljivost i tačnost, mogućnost upotrebe manjih količina rastvarača i kraće vreme analize. U ovom kontekstu, široko se primenjuju kratke kolone sa malim unutrašnjim prečnicima i veličinama čestica od 1,7 µm do 1,9 µm, pri čemu se omogućava znatno veći protok uzorka bez narušavanja kvaliteta hromatografske analize (Pratima Nikalje *i sar.* 2013). Takođe, koriste se i viši radni pritisci, veći od 15 000 psi, i na taj način se mogu postići veći protoci mobilne faze bez uticaja na performanse kolone. U kombinaciji sa različitim tipovima detektora, poput UV-Vis detektora, detektora sa nizom fotodioda (PDA) i masenog detektora (MS), omogućena je sveobuhvatna analiza fenolnih jedinjenja. Za analizu polifenola iz uzoraka biljnog materijala, često se koristi detektor koji je zasnovan na merenju UV apsorpcije ili UV detektor sa sistemom dioda (*Diode Array Detektor*, DAD). Da bi se povećala osetljivost metode, važno je odabrati odgovarajuće talasne dužine, posebno kada ispitivana jedinjenja imaju specifičnu hromoforu. Nedostatak spektrofotometrijskih detektora je to što ne mogu direktno pružiti informacije o strukturi analita (Kay *i sar.* 2022). Iz ovog razloga, u poslednjih nekoliko godina, istraživanja su usmerena na razvoj HPLC/UHPLC metoda povezanih sa masenim detektorima, čiji se princip zasniva na jonizaciji proučavanih hemijskih supstanci praćenih razdvajanjem jona prema odnosu mase i naelektrisanja ( $m/z$ ). Jonizacija je prvi korak u analizi molekula masenom spektrometrijom. Među različitim metodama jonizacije, elektron-sprej jonizacija (*Electro Spray Ionization*, ESI) se najčešće primenjuje za stvaranje deprotonovanih jona fenolnih jedinjenja, odnosno fragmenata osnovnog molekulskog jona (Lucci *i sar.* 2017). Fragmenti koji se formiraju prilikom analize pružaju informacije o strukturi i mehanizmu fragmentacije ispitivanih jedinjenja, a njihove mase mogu se porediti sa masama fragmenata standardnih jedinjenja koja su ispitivana pod istim uslovima ili literaturnim vrednostima za ta jedinjenja. Elektrosprej jonizacija može raditi u pozitivnom ili negativnom režimu, a savremeniji uređaji mogu brzo prebacivati polaritet, omogućavajući oba režima jonizacije tokom jedne hromatografske analize. ESI detektuje samo one metabolite koji mogu biti jonizovani dodavanjem ili uklanjanjem protona ili dodavanjem drugih vrsta jona. Antocijanini, zbog pozitivnog naelektrisanja u strukturi, analiziraju se u režimu pozitivne jonizacije. Negativni režim jonizacije primenjuje se u većini studija koje se bave identifikacijom i kvantifikacijom ostalih polifenola (Subbiah *i sar.* 2020, Mustafa *i sar.* 2022). Postoje različite konfiguracije masenih spektrometara koji koriste masene analizatore poput kvadrupol (Q), trostruki kvadrupol (QqQ), jonska zamka (Ion trap - OrbiTrap), hibridni analizator mase visoke rezolucije (LTQ OrbiTrap) i Furijeove transformacije (FT) (Ongkowijoyo *i sar.* 2018).

Brojna ispitivanja fenolnih jedinjenja iz biljnog materijala ukazuju na činjenicu da je broj prisutnih metabolita mnogo veći nego što se ranije smatralo i da su postojeće analitičke metode nemoćne u sveobuhvatnoj analizi, naročito ukoliko se zasnivaju na primeni pojedinačnih tehnika. Optimizacija metoda je stoga neophodna, a najčešće obuhvata poboljšanje preciznosti, tačnosti ili efikasnosti analize (kao što su vreme i potrošnja materijala). Ovaj proces obično sledi osnovne principe razvoja metoda, uključujući postavljanje jasnih ciljeva uz prethodno definisana ograničenja i očekivanja, kao i primenu odgovarajuće strategije. Prema prethodnim istraživanjima, dosad su se često primenjivali ciljani (*target*) pristupi za određivanje polifenola u hrani i biološkim uzorcima, ali i neciljani (*non-target*) metabolomski pristupi, koji su sve prisutniji u literaturi. Neciljane analize određuju celokupan sastav metabolita prirodnih proizvoda bez potrebe za identifikacijom pojedinačnih markera (Dasenaki i Thomaidis 2019). Kada se radi o optimizaciji metoda u neciljanim analizama primenom LC-HRMS/MS ključni parametri su rezolucija, brzina skeniranja i interval

akvizicije mase (Sun *i sar.* 2018). Ciljani pristupi u analitičkim istraživanjima predstavljaju metodološke pravce koji su usmereni na identifikaciju očekivanih ili prethodno poznatih analita, pri čemu se karakterišu prisustvom ograničenog broja spektralnih karakteristika. Oni se često koriste u kvantitativnoj analizi podataka, pružajući preciznost i orijentaciju ka analizama sa unapred definisanim ciljevima (Lelli *i sar.* 2021). Ciljani pristupi često koriste QqQ platforme, dok se neciljane analize uglavnom oslanjaju na sisteme masene spektrometrije visoke rezolucije (HRMS) poput TOF i jonske zamke (kao što je OrbiTrap) ili njihove hibride (npr. Triple-TOF, LIT OrbiTrap). Oba pristupa, ciljani i neciljani, mogu se sprovoditi korišćenjem raznovrsnih analitičkih sistema, iako je UHPLC povezan sa HRMS-om najčešće korišćen za metabolomske analize polifenola. Korišćenje masenog spektrometra visoke rezolucije (HRMS) ima prednost u odnosu na maseni spektrometar niske rezolucije QqQ, jer pruža mogućnost identifikacije različitih jedinjenja koji imaju istu molekulsku masu na osnovu karakteristične fragmentacije osnovnog molekuskog jona. To je ključno u neciljanim analizama, gde je verovatnoća prisustva više jedinjenja sa sličnim molekulskim masama mnogo veća nego u ciljanim analizama. Tačna masa fragmenata pruža vredne informacije o strukturnim karakteristikama. HRMS tehnike se mogu koristiti i za kvantitativne pristupe. S obzirom na značajno vreme potrebno za postizanje masene rezolucije u svakom ciklusu, postoji ograničenje u broju analita koji se može detaljno analizirati sa visokom kvantitativnom tačnošću tokom jednog ciklusa. Glavna prednost HRMS tehnike je u tome što može skenirati desetine hiljada signala u okviru jednog ciklusa i u mnogim slučajevima, identifikacija može biti potvrđena bez korišćenja referentnih standarda, posebno ako su dostupni MS<sup>2</sup> ili MS<sup>3</sup> podaci (Piovesana *i sar.* 2020). Stoga se, ciljana i neciljana analiza često primenjuju zajedno radi detekcije i preciznog određivanja različitih klasa jedinjenja i pojedinačnih metabolita u biljnom materijalu, omogućavajući detaljno istraživanje i analizu potencijalnih metaboličkih markera na osnovu kojih se može doći do do višestruko korisnih informacija o sortnoj pripadnosti, biološkom i geografskom poreklu (Gašić *i sar.* 2014, Pantelić *i sar.* 2016, Fotirić Akšić *i sar.* 2019, Natić *i sar.* 2024).

### **2.5.2.3. Analiza ugljenih hidrata visokoefikasnom jonskom hromatografijom sa pulsnom amperometrijskom detekcijom**

Nutritivna vrednost ploda različitih vrsta voća u najvećoj meri se pripisuje visokom sadržaju ugljenih hidrata, koji nastaju kroz proces fotosinteze i čine primarne metabolite u biljaka. Ovo je kompleksna grupa polihidroksilnih aldehida i ketona koji su neophodni za različite biološke funkcije, uključujući izgradnju ćelijskih zidova i skladištenje energije. Nivo šećera u biljnom materijalu varira u zavisnosti od različitih faktora, poput genotipa i zrelosti biljke, kvaliteta zemljišta i uslova okoline (Okan *i sar.* 2018). Ugljeni hidrati su uključeni u razne fundamentalne procese unutar biljnog metabolizma, uključujući embriogenezu, klijanje semena, formiranje i razvoj vegetativnih i reproduktivnih delova. Takođe su od značaja za sintezu organskih kiselina, amino kiselina i pigmenta (Halford *i sar.* 2011). Pored toga, šećeri učestvuju u biosintezi polifenola, pri čemu veći sadržaj šećera u voću podrazumeva i veću koncentraciju polifenola, što je izuzetno važno sa aspekta ishrane obogaćene fitonutrijentima (Milivojević *i sar.* 2013).

Ugljeni hidrati koji su značajni za ljudsku ishranu, uključuju monosaharide (glukoza i fruktozu), disaharide (saharozu, laktozu i maltozu), poliole (manitol i sorbitol) i polisaharide (skrob) (Awuchi i Ikechukwu 2021). U zrelim plodovima jagodastih voćnih vrsta najzastupljeniji šećeri su glukoza, fruktoza i saharoza, a njihova kombinacija doprinosi karakterističnom i prepoznatljivom slatkom ukusu crvenih plodova (Mikulic-Petkovsek *i sar.* 2012). Dobro je poznato da se tokom sazrevanja ploda, saharoza razlaže na glukoza i fruktozu, čije bi količine trebalo da budu ujednačene. Međutim, dešava se da se taj odnos menja što može biti objašnjeno činjenicom da je glukoza esencijalan šećer u biljnom metabolizmu, ne samo za sazrevanje ploda, već i za neke druge strukturne i biohemijske procese u biljkama (Rolland i Sheen 2005). Metabolizam ugljenih hidrata varira zavisno i od voćne vrste, pa tako uzorci ploda dudu u odnosu na plod kupina sadrže više ukupnih i redukujućih šećera, ali niže nivoe saharoze (Vega *i sar.* 2021). Pored navedenih šećera, u jagodastim

voćkama su u manjim količinama detektovani i drugi ugljeni hidrati poput galaktoze, ksiloze, trehaloze, maltoze, rafinoze i manoze (Skrovankova *i sar.* 2022). Takođe, sadržaj šećera varira i u zavisnosti od različitih delova biljke, pri čemu je utvrđeno da plod jagode sadrži značajno veće količine šećera u poređenju sa listom. Konkretno, plod jagode ima znatno više glukoze, fruktoze i saharoze nego list, i to do 12 puta više glukoze, 22 puta više fruktoze i 66 puta više saharoze (Fotirić Akšić *i sar.* 2019).

Dobijanje celokupnog profila ugljenih hidrata u plodovima različitih voćnih vrsta predstavlja izazov zbog sličnih hemijskih struktura, nedostatka komercijalnih standarda i male količine određenih šećera u uzorcima. Ipak, ova analiza igra ključnu ulogu u identifikaciji različitih biljnih vrsta i utvrđivanju njihove autentičnosti. Primena visokoeffikasne anjonsko-izmenjivačke hromatografije (*High Performance Anion Exchange Chromatography*, HPAEC) uz pulsno amperometrijsku detekciju (*Pulse Amperometric Detection*, PAD) predstavlja efikasan analitički pristup za precizno razdvajanje i kvantifikaciju različitih ugljenih hidrata. Razdvajanje se zasniva na elektrohemijским oksidativnim procesima koji se dešavaju na elektrodi. Ova tehnika omogućava precizno razdvajanje šećera na visokim pH vrednostima (12-14), pri kojima se šećeri ponašaju kao veoma slabe kiseline (Vennard *i sar.* 2020). Šećeri se najčešće eluiraju vodenim rastvorom natrijum-hidroksida. Na taj način se u visoko alkalnim uslovima, hidroksilne grupe šećera potpuno ili delimično jonizuju i prelaze u oksoanjonski oblik, što omogućava selektivno razdvajanje ovih vrsta pomoću jonoizmenjivačkih stacionarnih faza koje su smeštene unutar kolona. Kolone sa polimernim anjon-izmenjivačkim smolama (CarboPac®) se najčešće koriste za razdvajanje šećera i odlikuju se visokom otpornošću prema visokim i niskim pH vrednostima, dobrom mehaničkom stabilnošću i difuzionim svojstvima (Nesterenko i Paull 2017). Međutim, na razdvajanje može značajno uticati broj hidroksilnih grupa prisutnih u jedinjenju, njihov položaj unutar šećera i stepen polimerizacije (Corradini *i sar.* 2012). Šećeri se detektuju merenjem električne struje dobijene njihovom oksidacijom na površini radne elektrode od zlata pomoću pulsnog amperometrijskog detektora, čijim režimom rada može da se postigne visoka selektivnost različitih elektroaktivnih vrsta (Vennard *i sar.* 2020).

### 2.5.3. Analiza makro- i mikroelemenata primenom indukovano spregnute plazme sa optičkom emisijom spektroskopijom (ICP-OES)

Minerali su mikronutrijenti koji se nalaze u biljnom materijalu i neophodni su za brojne biohemijske procese, uključujući redoks reakcije, metabolizam ugljenih hidrata, proteina, vitamina i masti (Nile i Park 2014). S obzirom da minerali ne mogu prirodno da se sintetišu u ljudskom organizmu, neophodno ih je unositi putem ishrane. Oko 30 esencijalnih elemenata je potrebno za pravilno funkcionisanje ljudskog organizma, pri čemu su gotovo svi prisutni u biljnim materijalima (Popović-Djordjević *i sar.* 2022). Njihovo prisustvo u ishrani doprinosi vitalnim procesima kao što su jačanje kostiju i regulacija srčanih funkcija. Biljke ne sintetišu minerale, već ih putem korena usvajaju iz zemljišta, pri čemu količina akumuliranih elemenata zavisi od biljne vrste, klimatskih uslova, tipa i pH vrednosti zemljišta. Na osnovu zastupljenosti u biljnom materijalu mogu se podeliti na makroelemente, mikroelemente i elemente u tragovima (Khan *i sar.* 2023). Makroelementi (C, O, H, N, K, Mg, Ca, P, Na, S, Si i Cl) se u biljkama javljaju u većim količinama i neophodni su za normalan rast i razvoj živih organizama. Mikroelementi, poput Zn, Fe, Cu, Mn, B, Mo nalaze se u manjim količinama u biljnom materijalu, ali su i dalje ključni za njihov metabolizam. Biljke mogu sadržati značajne količine toksičnih elemenata poput aluminijuma, barijuma, nikla, olova, žive, kadmijuma i arsena, koji se akumuliraju u zemljištu zbog sintetskih đubriva, smoga, kiše i industrijskog otpada. Ovi toksični elementi mogu se akumulirati i u plodu biljaka i pri konzumiranju istih mogu predstavljati rizik po ljudsko zdravlje (Popović-Djordjević *i sar.* 2022).

Jagodaste vrste voćaka se smatraju važnim prirodnim izvorom esencijalnih minerala u ishrani. Plodovi jagodastih voćnih vrsta sadrže važne minerale poput kalijuma, kalcijuma, magnezijuma, gvožđa, cinka i mangana (Akimov *i sar.* 2021). Gvožđe ima ključnu ulogu u metaboličkim procesima



koji uključuju transport i skladištenje kiseonika, oksidativnom metabolizmu i rastu ćelija. Cink i mangan su takođe bitni metali koji se često nalaze u plodovima jagodastih vrsta voćaka i igraju ključnu ulogu u ćelijskom metabolizmu, imunološkom sistemu i zdravlju kostiju. Kvantitativni i kvalitativni profil mineralnih supstanci biljnog materijala zavisi od biljne vrste, sorte, karakteristike zemljišta, klimatskih uslova i načina proizvodnje (Nilova *i sar.* 2018). Na primer, među različitim sortama malina identifikovane su značajne varijacije u sadržaju minerala (Na, K, Ca, Mg, Fe, Cu i Zn) (Akimov *i sar.* 2021). Pri poređenju konvencionalne i organske proizvodnje jagodastih voćnih vrsta, značajno viši nivo mikroelemenata i teških metala detektovani su u zemljištu na kom su biljke uzgajane na konvencionalan način, dok razlika u njihovom sadržaju u plodovima iz različitih sistema gajenja nije utvrđena (Milinković *i sar.* 2021). Takođe, plodovi gajene borovnice i brusnice, imali su veći sadržaj Fe, Mo, dok su plodovi samonikle borovnice i brusnice pokazali više nivoe Ca, Mg, i posebno Mn (Karlsons *i sar.* 2018). Stoga je važno imati uvid u sadržaj elemenata u biljnom materijalu kako bi se utvrdio kvalitet ploda i prerađene hrane koju konzumiramo. To podrazumeva redovno ispitivanje ne samo biljnog materijala, već i zemljišta, kao i primenu mera koje smanjuju izloženost voćaka neželjenim metalima tokom uzgoja i proizvodnje.

Ekstrakcija minerala iz biljnog materijala zahteva složen proces pripreme koji obuhvata razlaganje i disperziju uzorka u zatvorenim ili otvorenim sistemima, primenom termalne energije poput mikrotalasa. Danas je metoda mikrotalase digestije najčešće korišćena metoda za pripremu uzoraka, s obzirom na brzinu izvođenja digestije, direktno zagrevanje uzorka i minimalnu kontaminaciju. Princip ove metode zasniva se na mikrotalasnem zagrevanju uzoraka, gde je optimalna radna temperatura do 260 °C pri pritiscima od 60 do 100 bara. Za ekstrakciju minerala najčešće se koristi kombinacija azotne kiseline i vodonik-peroksida u smeši, pri čemu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pokreće oksidacionu reakciju, ubrzavajući razlaganje organskih supstanci i oslobađanje analita iz uzoraka (Cerveira *i sar.* 2020).

Za kvalitativnu i kvantitativnu analizu metala, određenih nemetala i elemenata u tragovima u biljnim uzorcima najčešće se primenjuje optička emisiona spektroskopija sa induktivno spregnutom plazmom (*Inductively Coupled Plasma – Optical Emission Spectroscopy*, ICP-OES). Osnovni princip leži u emisiji svetlosti od strane jonizovanih atoma, koja se zatim koristi za identifikaciju i kvantifikaciju elemenata. U ovom postupku, uzorci se izlažu ekstremno visokim temperaturama plazme (10 000 K), pri čemu atomi u uzorku postaju jonizovani i emituju karakteristično svetlosno zračenje. Plazma se najčešće generiše korišćenjem argona zbog njegove visoke jonizacije i inertnosti. Pri dovoljnoj količini energije, elektroni se pobuđuju na viši energetski nivo, a zatim pri povratku na osnovni nivo, emituju fotone specifičnih talasnih dužina. Ovi fotoni su karakteristični za svaki element prisutan u uzorku, što omogućava identifikaciju elemenata. Intenzitet emitovane svetlosti proporcionalan je koncentraciji elementa, što omogućava kvantitativno određivanje elemenata u uzorcima (Iti 2020). Priprema uzoraka predstavlja ključnu fazu u analizi, koja obuhvata pretvaranje uzoraka u tečne rastvore, a zatim i njihovu transformaciju u aerosol pomoću nebulizatora. Iako svaki element emituje karakteristične signale, preklapanje tih signala može biti izazov, a izbor aksijalne ili radijalne plazme može uticati na tačnost analize. Za obradu spektralnih informacija i određivanje konačnog sastava uzorka, neophodni su detektori poput fotomultiplikatora ili CCD detektora). Detektor u sistemu beleži emisiju svetlosti, pri čemu se formira emisioni spektar koji sadrži specifične informacije o prisutnim hemijskim elementima. Upotrebom različitih talasnih dužina koje su osetljive na specifične vrste supstanci, postiže se detekcija širokog spektra koncentracija (Khan 2019). ICP-OES tehnika je posebno korisna zbog visoke osetljivosti, širokog linearnog dinamičkog opsega i mogućnosti simultane analize više elemenata, pri čemu pruža informacije o više od 70 elementa u izuzetno kratkom vremenskom periodu. Pored navedenih prednosti, ICP-OES se karakteriše i niskom granicom detekcije, koja se kreće u rasponu 0,01 – 100 ppb. Ova tehnika se često primenjuje u hemijskim, medicinskim i ekološkim analizama, pri čemu se mogu ispitivati uzorci vode za piće, biljnog materijala, hrane, zemljišta, fosilnih goriva, biogoriva i lekova (Usman *i sar.* 2019).

## 2.6. Značaj statističke obrade rezultata u ispitivanjima biljnog materijala

Neprestani tehnološki napredak u analitičkoj hemiji donosi sa sobom formiranje obimnih i složenih hemijskih podataka, a primena statističkih, odnosno hemometrijskih metoda olakšava tumačenje, prikazivanje i razumevanje rezultata. Statistika, kao matematička disciplina, pomaže u razvijanju metoda proučavanja i pristupa podacima koji su usmereni prema postavljenim ciljevima istraživanja, pri čemu se može podeliti na deskriptivnu i inferencijalnu. Deskriptivna statistika često predstavlja inicijalni korak u analizi podataka, pružajući opis i pregled prikupljenih informacija. Iako obično prethodi statističkom zaključivanju, ona može i samostalno predstavljati krajnji cilj statističke analize. U deskriptivnoj statistici, često se koriste osnovne procedure poput grafičkog i tabelarnog prikazivanja podataka, kao i izračunavanje mera centralne tendencije i varijabilnosti. Takođe, neki autori uključuju mere korelacije varijabli (promenljivih) u ovu kategoriju, jer pružaju informacije o vezi između različitih varijabli (Trifković i Andrić 2023).

Inferencijalna statistika, za razliku od deskriptivne statistike, bavi se metodama koje omogućavaju donošenje zaključaka o karakteristikama osnovnog skupa na osnovu informacija prikupljenih iz uzorka. Ova grana statistike obuhvata testiranje hipoteza, izvođenje zaključaka o parametrima populacije na osnovu statističkih uzoraka, procenu tačnosti i pouzdanosti rezultata, kao i izvođenje statističkih zaključaka o uzrocima i efektima u populaciji. Sve ovo se postiže korišćenjem različitih statističkih testova. Statističko zaključivanje uključuje procenu nultih ili alternativnih hipoteza kroz upotrebu statističkih testova, koji se mogu klasifikovati kao parametrijski i neparametrijski. Parametrijski testovi se primenjuju kada podaci u studiji ispunjavaju određene pretpostavke, odnosno kada podaci podležu normalnoj raspodeli ili kada pokazuju homogenost varijabiliteta. Neparametrijski testovi se koriste za analizu podataka kada podaci ne ispunjavaju pretpostavke parametrijskih testova, što ih čini korisnim jer nisu osetljivi na pretpostavke o raspodeli podataka (Trifković i Andrić 2023).

S obzirom na kompleksnost hemijskog sastava biljnog materijala, multivarijantne statističke metode igraju ključnu ulogu u njihovom istraživanju i klasifikaciji. Hemometrija, kao grana statistike u analitičkoj hemiji, sve više dobija na značaju jer pruža mogućnost podataka koji proizilaze iz različitih hemijskih analiza. Ove metode omogućavaju istraživačima da obrade velike količine podataka dobijenih iz različitih istraživanja, identifikuju obrasce, otkriju skrivene veze među podacima i izvuku relevantne informacije iz njih. Hemometrijske metode mogu se klasifikovati u dve osnovne kategorije: kvantitativne i kvalitativne metode. Kvantitativna analiza temelji se na regresionim tehnikama, čiji koncept podrazumeva istraživanje veze (linearne ili nelinearne) između jedne ili više nezavisnih promenljivih i jedne ili više zavisne promenljive. U slučaju jedne zavisne i jedne nezavisne promenljive reč je o jednostavnijem slučaju poznatom kao univarijantna regresija. Međutim, u analitičkoj hemiji često se javljaju složeni setovi podataka, uključujući veći broj zavisnih promenljivih i tada je potrebna multivarijantna analiza. Kvalitativne metode fokusiraju se na klasifikaciju i identifikaciju uzoraka, omogućavajući grupisanje pojedinačnih uzoraka u određene kategorije ili otkrivanje strukturnih obrazaca u osnovnom skupu podataka (Bystrzanowska i Tobiszewski 2020).

Studije zasnovane na različitim hromatografskim tehnikama pokazuju da analiza profila sekundarnih metabolita u kombinaciji sa multivarijantnim analizama može pružiti korisne informacije za autentičnost voća, kako u pogledu identifikacije vrsta, tako i u praćenju geografskog porekla (Salo *i sar.* 2021). Analizom različitih klasa sekundarnih metabolita prisutnih u plodovima jagodastih voćnih vrsta primenom HPLC-DAD i multivarijantne analize, potvrđena je očekivana veza između sadržaja polifenola i genetske varijabilnosti sorte (Mrmošanin *i sar.* 2022). Dodatno, u drugoj studiji uočena je razlika u genotipovima različitih sorti malina primenom LC-MS metode i multivarijantne analize (Renai *i sar.* 2021). Takođe, nedavna istraživanja su pokazala potencijal HPTLC-a u kombinaciji sa multivarijantnom analizom za međusobno razlikovanje semenki jagodastih voćki. U tom smislu, analizirani fenolni profili semenki 45 uzoraka različitih vrsta (maline,

ogrozda, kupine, aronije, godžija, peruanske jagode, borovnica, crne ribizle i jagode) i sorti gajenih vrsta voćaka pokazali su jasno razdvajanje na osnovu botaničkog porekla (Krstić *i sar.* 2023). Metode multivarijantne hemometrijske analize koje se najčešće primenjuju u ispitivanjima autentičnosti hrane su analiza glavnih komponentata (*Principal Component Analysis*, PCA) i klsterska analiza (*Cluster Analysis*, CA). Ove metode često se koriste za smanjenje dimenzija originalnih podataka, otkrivanje unutrašnjih obrazaca i identifikaciju dominantnih faktora u skupu podataka.

Analiza glavnih komponentata ima za osnovni cilj da promeni originalni skup podataka koji može imati veliki broj varijabli u novi skup podataka sa manjim brojem varijabli, zadržavajući što više informacija o varijaciji prisutnoj u originalnom skupu podataka. Ove promene postižu se pronalaskom linearnih kombinacija originalnih varijabli koje povećavaju varijaciju podataka. Glavne komponente (PC) koje proizlaze iz PCA su novi nezavisni vektori koji predstavljaju nove dimenzije podataka, poređane po varijabilnosti, pri čemu prva komponenta objašnjava najveći deo varijabilnosti u podacima (Geladi i Linderholm 2020). U studijama autentičnosti PCA se često koristi kako bi se identifikovali obrasci distribucije među uzorcima i otkrili potencijalno odstupajući uzorci pre nego što se uspostavi model predviđanja. Primena analize glavnih komponentata može biti izazovna u situacijama kada su podaci međusobno korelisani ili kada postoji nelinearna struktura u podacima. Dodatno, interpretacija rezultata može biti kompleksna, posebno ako se radi sa velikim brojem glavnih komponenti.

### 3. EKSPERIMENTALNI DEO

#### 3.1. Uzorci ploda i lista gajenih i samoniklih voćnih vrsta

U okviru ove doktorske disertacije ispitivani su uzorci ploda i lista gajenih jagodastih i samoniklih voćnih vrsta iz različitih područja Srbije (**Tabele 1 i 2**). Plodovi svakog genotipa brani su u fazi pune zrelosti i bili su ujednačene veličine i boje, bez fizičkih oštećenja i znakova bolesti. Do pripreme ekstrakata, uzorci su čuvani u zamrzivaču na -20 °C. Od svake sorte maline i kupine, sa pet pojedinačnih biljaka, u fazi punog sazrijevanja plodova, sakupljeno je po 20 listova. Svi listovi su ubrani sa zdravih biljaka i to sa sredine izdanka. Nakon berbe, listovi su oprani vodom kako bi se uklonila prašina i osušeni na vazduhu na sobnoj temperaturi bez direktnog uticaja svetlosti. Nakon uklanjanja centralnog nerva, suvi materijal je skupljen i samleven u fini prah korišćenjem avana i tučka, a zatim čuvan na sobnoj temperaturi do analiza.

**Tabela 1.** Ispitivani uzorci ploda i lista gajenih jagodastih voćnih vrsta sa različitih lokacija u Srbiji.

	Lokacija	Oznaka uzorka
<b>Plod gajenih jagodastih voćnih vrsta</b>		
Malina ( <i>Rubus ideus</i> L.)		
	Arilje	M1
Willamette	Zlatibor	M2
	Valjevo	M3
Meeker	Arilje	M4
Yellow Meeker	Arilje	M5
Tulameen	Arilje	M6
Kupina ( <i>Rubus fruticosus</i> L.)		
Čačanska bestrna	Arilje	K
Dud ( <i>Morus nigra</i> L.)		
	Beograd	D
Jagoda ( <i>Fragaria</i> × <i>ananassa</i> Duch.)		
Clery	Šabac	J
<b>List gajenih jagodastih voćnih vrsta</b>		
Malina ( <i>Rubus ideus</i> L.)		
Willamette	Arilje	LM1
Meeker	Arilje	LM2
Tulameen	Arilje	LM3
Kupina ( <i>Rubus fruticosus</i> L.)		
Čačanska bestrna	Arilje	LK

**Tabela 2.** Ispitivani uzorci ploda samoniklih voćnih vrsta sa različitih lokacija u Srbiji.

	Lokacija	Oznaka uzorka
<b>Plod samoniklih voćnih vrsta</b>		
Zova ( <i>Sambucus nigra</i> L.)	Deliblatska peščara	ZO1 – ZO4
	Tara	ZO5 – ZO7
	Fruška gora	DR1 – DR4
Dren ( <i>Cornus mas</i> L.)	Stara planina, Radičevac	DR5 – DR7
	Stara planina, Zlot	DR8 – DR10
	Radmilovac	TR1, TR2
Crni trn ( <i>Prunus spinosa</i> L.)	Saranovo	TR3, TR4
	Beograd	TR5
	Radmilovac	GL1, GL2
Glog ( <i>Crataegus monogyna</i> Jacq.)	Gornji Milanovac	GL3
	Stara planina, Radičevac	GL4

### 3.2. Standardi, hemikalije i reagensi

Najveći broj standarda i hemikalija koji su korišćeni u eksperimentima nabavljen je od proizvođača *Sigma-Aldrich* (Steinheim, Nemačka). To su standardi fenolnih kiselina (elaginska, galna, protokatehinska, *p*-hidroksibenzoeva, hlorogena, kofeinska, 5-*O*-kofeoilhininska, *p*-kumarinska, ferulinska, gentizinska, vanilinska, siringinska kiselina i *cis,trans*-apscisinska kiselina), standardi flavonoida (katehin, rutin, naringin, florizin, luteolin, apigenin, naringenin, kampferol, pinocembrin, galangin, arbutin, miricegtin, hrizin, eskulin, kvercetin 3-*O*-galaktozid, apigenin 7-*O*-apioglukozid, kampferol 3-*O*-glukozid, katehin, epikatehin, galokatehin, epigalokatehin, galokatehin galat, katehin galat, epigalokatehin galat) koji su korišćeni za UHPLC-DAD MS/MS i UHPLC-LTQ OrbiTrap XL analizu. Takođe, od istog proizvođača nabavljena je većina standarda i reagenasa za antioksidativne testove: troloks (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilhroman-2-karboksilna kiselina), anhidrovani natrijum-karbonat, ferozin, kalijum-heksacijanoferat(III), gvožđe(II)-hlorid, gvožđe(III)-hlorid, askorbinska kiselina, etilendiamintetrasirćetna kiselina (EDTA), Tris-HCl pufer, nikotinamid-adenin-dinukleotid redukovana dikalijumova so (NADH, C<sub>21</sub>H<sub>27</sub>N<sub>7</sub>O<sub>14</sub>P<sub>2</sub>), nitroplavi tetrazolijum-hlorid (NBT, C<sub>40</sub>H<sub>30</sub>C<sub>12</sub>N<sub>10</sub>O<sub>6</sub>), fenazin-metosulfat (PMS, C<sub>13</sub>H<sub>11</sub>N<sub>2</sub>·CH<sub>3</sub>SO<sub>4</sub>), Griess-ov reagens, natrijum-nitroprusid, tirozinaza, 3,4-dihidroksifenilalanina (L-DOPA), dok su 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal (DPPH<sup>•</sup>) i standardi šećera (glukoza, fruktoza i saharoza) kupljeni od firme *Fluka AG* (Buh, Švajcarska).

Rastvarači metanol, aceton, acetonitril (HPLC i MS čistoće), mravlja kiselina, trifluorosirćetna kiselina, trihlorsirćetna kiselina, etil-acetat, metanol, natrijum-hidroksid, kalijumdihirogen-fosfat, hlorovodonična kiselina, sirćetna kiselina, azotna kiselina, vodonik-peroksid i *Folin-Ciocalteu* reagens nabavljeni su od proizvođača *Merck* (Darmstadt, Nemačka). Od iste firme, za optimizaciju uslova hromatografskog odvajanja antocijanina primenom tankoslojne hromatografije, korišćene su TLC ploče silika gel 60 F<sub>254</sub>, celuloza, oktadecil-modifikovan silika gel RP-18, kao i HPTLC silika gel 60 F<sub>254</sub>. Rastvarači upotrebljeni u TLC ispitivanjima *n*-propanol, izo-propanol, *n*-butanol, butanon, toluen, benzen, piridin i hloroform bili su analitičkog stepena čistoće i nabavljeni su od kompanije *Zorka Pharma* (Šabac, Srbija), dok su kalijum-hlorid i natrijum-acetat kupljeni od firme *Centrohem* (Stara Pazova, Srbija).

Za kalibraciju ISP-OES i određivanje sadržaja makro- i mikroelemetata korišćena su dva standarda, *EPA Method standard I* (10 mg/L Al, Ag, As, Ba, Be, Cd, Co, Cr, Cu, Zn, Mn, Mo, Ni, Pb, Sb, Se, Th, TL, V) i *EPA Method standard II* (5 mg/L Cl, 1 mg/L C, 500 mg/L Al, Ca, Fe, K, Mg, Na, P, S). Ovi standardi nabavljeni su od firme *VHG Labs (Inc-Part of LGC Standards, Mančester, SAD)*, dok je za *Multi-Element Plasma Standard Solution 4, Specpure®* proizvođač *Alfa Aesar GmbH & Co KG* (Nemačka).

Ultračista voda (*Thermo Fisher TKA MicroPure* sistem za prečišćavanje vode, provodljivosti 0,055  $\mu\text{S/cm}$ , Niederelbert, Nemačka) je korišćena za pripremu rastvora standarda, slepe probe i svih razblaženja. Od kompanije *Supelco* (Bellefonte, PA, SAD) nabavljeni su filteri za prečišćavanje ekstrakata (PTFE membrana, 0,45  $\mu\text{m}$ , 13 mm).

### 3.3. Priprema uzoraka

Plod i list jagodastih vrsta voćaka, kako gajenih tako i samoniklih, su bogati fenolnim jedinjenjima. Njihovi polifenolni profili u značajnoj meri variraju između različitih vrsta, zbog čega je veoma važno odabrati odgovarajuće metode ekstrakcije. S obzirom da su istraživanja u oblasti ispitivanja fitohemikalija u prirodnim proizvodima bila u početnoj fazi, ova studija imala je za cilj da se optimizuju uslovi pripreme uzoraka, radi što efikasnijeg izolovanja specifičnih fenolnih jedinjenja karakterističnih za plod i list jagodastih voćnih vrsta, kao i njihovo određivanje. Različiti faktori koji mogu uticati na ekstrakciju analita od interesa, kao što su izbor rastvarača i izbor ekstrakcione metode, kao i vreme ekstrakcije ispitivani su u toku istraživanja.

#### 3.3.1. Optimizacija izolovanja polifenola iz ploda i lista gajenih i samoniklih voćnih vrsta

U cilju što efikasnijeg izolovanja fenolnih jedinjenja iz uzoraka plodova i listova gajenih jagodastih voćnih vrsta, uslovi ekstrakcije su optimizovani u odnosu na postupak opisan u literaturi (Bobinaite *i sar.* 2012). Tokom ovog istraživanja, prvi korak u optimizaciji pripreme uzoraka bio je odabir odgovarajućih rastvarača. Ekstrakcija polifenola uglavnom je zasnovana na upotrebi organskih rastvarača, pri čemu je metanol najčešće korišćen rastvarač. U okviru ove studije, u postupku pripreme ploda gajenih jagodastih vrsta voćaka izabrana su dva različita rastvarača, metanol i aceton koji su zakiseljeni sa 1% HCl. Za plod samoniklih vrsta voćaka i list gajenih jagodastih voćnih vrsta, kao ekstrakciono sredstvo korišćen je 70% metanol. Pri ekstrakciji polifenola iz uzoraka listova gajenih jagodastih voćnih vrsta hlorovodonična kiselina nije korišćena, s obzirom da u listovima nema antocijanina. Takođe, ispitivanje hemijskih svojstava ploda samoniklih vrsta voćaka bilo je tako koncipirano da je akcenat bio na neantocijaninskoj frakciji, te hlorovodonična kiselina nije korišćena. Pored odabira ekstrakcionog sredstva, jedan od ključnih koraka u optimizaciji izolovanja bioaktivnih komponenata iz uzoraka je bio odabir ekstrakcione metode. U cilju optimizacije uslova ekstrakcije, korišćene su dve različite ekstrakcione tehnike, ekstrakcija u ultrazvučnom kupatilu i na magnetnoj mešalici. Vreme ekstrakcije, kao jedan od bitnih faktora koji utiče na efikasnost ekstrakcije, je takođe optimizovano.

#### *Postupak pripreme ploda gajenih jagodastih voćnih vrsta*

Smrznuti uzorci celih plodova homogenizovani su u avanu sa tučkom. Homogenizovani plodovi (1 g) su ekstrahovani sa 10 mL zakiseljenog (1% HCl) organskog rastvarača (metanola ili acetona) u ultrazvučnom kupatilu (Sonic, Niš, Srbija) na sobnoj temperaturi u periodu od sat vremena. Ekstrakcije su izvedene u tri ponavljanja. Ekstrakt je odložen na tamno mesto, na 4 °C tokom 24 h i nakon toga filtriran, a bistri supernatant je odvojen. Frakcije su sakupljene, spojene i uparene do suva rotacionim uparavanjem pod sniženim pritiskom na 40 °C. Ostatak nakon uparavanja razblažen je u odmernom sudu zapremine 10 mL ultračistom vodom.

### *Postupak pripreme ploda samonikolih voćnih vrsta*

Uzorci smrznutih plodova su usitnjeni korišćenjem *Mikro Dismembratorom S* (Sartorius, Getingen, Nemačka), a polifenoli su ekstrahovani sa 70% metanolom (500mg/10mL) na magnetnoj mešalici tokom 10 minuta. Supernatant je sakupljen nakon centrifugiranja na 4000 rpm tokom 5 minuta, a postupak ekstrakcije polifenola je ponovljen još dva puta. Nakon toga, supernatanti su spojeni.

### *Postupak pripreme lista gajenih jagodastih voćnih vrsta*

Ekstrakcija fenolnih jedinjenja iz osušenog lista maline i kupine sprovedena je na način sličan ekstrakciji ploda, s tim što su uslovi ekstrakcije optimizovani i prilagođeni ekstrakciji polifenola iz suvih uzoraka. Uzorci usitnjenih listova (2 g) pomešani su sa 100 mL ekstrakcionog sredstva metanol/voda (70/30, v/v) i ekstrakcija je sprovedena u ultrazvučnom kupatilu tokom 1 h na sobnoj temperaturi. Posle 24 h u mraku na 4 °C filtrat je odvojen, a ekstrakcija je ponovljena još dva puta. Nakon sakupljanja svih supernatanta i uparavanja rastvarača, ostatak je rastvoren u smeši metanol/voda (60:40, v/v).

Svi pripremljeni ekstrakti su čuvani u zamrzivaču na -20 °C do daljih analiza. Neposredno pre svake analize ekstrakti plodova i listova gajenih jagodastih i samoniklih voćnih vrsta filtrirani su kroz 0,45 µm membranski filter (Siringe Filter, PTFE, Supelco). Ovako pripremljeni ekstrakti korišćeni su za dalja ispitivanja, koja su obuhvatila određivanje antioksidativnog kapaciteta primenom različitih testova, određivanje sadržaja ukupnih polifenola (TPC), sadržaja ukupnih antocijanina (TAC) i određivanje polifenolnog profila primenom tečne hromatografije sa masenom detekcijom. Metanolni i acetonski ekstrakti ploda gajenih jagodastih voćnih vrsta upotrebljeni su za analizu sadržaja slobodne i ukupne elaginske kiseline. Efikasnost zakiseljenog acetona u ekstrakciji polifenola u plodu gajenih jagodastih vrsta voćaka procenjenja je na osnovu testova za merenje antioksidativnog kapaciteta. Iako se pokazalo da je aceton efikasnije ekstrakciono sredstvo u ekstrakciji neantocijanina, razlike u efikasnosti za antioksidativni kapacitet i slobodnu elaginsku kiselinu nisu statistički značajne. Shodno tome, metanol je izabran za dalja istraživanja, jer je pogodniji i kompatibilniji za ispitivanja na UHPLC/MS.

## **3.4. Određivanje hemijskih karakteristika ploda i lista gajenih i samoniklih voćnih vrsta**

### **3.4.1. Spektrofotometrijske metode za merenje antioksidativnog kapaciteta**

Da bi se procenila antioksidativna aktivnost prirodnih antioksidanasa preporučljivo je primeniti više od jedne spektrofotometrijske metode, jer to omogućava potpunije razumevanje njihovih svojstava. U ovom istraživanju upotrebljene su različite metode koje pružaju informacije o različitim antioksidativnim dejstvima polifenola, sa ciljem da se pruži sveobuhvatan uvid u antioksidativni kapacitet ekstrakata ploda i lista svih ispitivanih voćnih vrsta. Metode za određivanje antioksidativnog kapaciteta, zasnovane na merenju apsorpcionih spektara, izvedene su na UV-Vis spektrofotometru UV-Visible Cintra 6 (GBC Scientific Equipment Ltd., Dandenong, Australia) (**Slika 8**). Svi uzorci su analizirani u triplikatu, a rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija ili u procentima (%).



Slika 8. UV-Visible Cintra 6 spektrofotometar.

#### 3.4.1.1. Određivanje sadržaja ukupnih polifenola

Sadržaj ukupnih polifenola određen je *Folin-Ciocalteu* metodom (Singleton i Rossi 1965), koja predstavlja antioksidativni test zasnovan na prenosu elektrona koji spektrofotometrijski meri redukcionu kapacitet antioksidansa. Metoda se zasniva na reakciji polifenolnih jedinjenja i *Folin-Ciocalteu* reagensa, koji predstavlja smešu fosfomolibdata i fosfovolframata. Reakcija se odigrava u baznoj sredini (pH = 10), pri čemu disocijacijom polifenola nastaje proton i fenoksidni anjon, koji je odgovoran za redukciju *Folin-Ciocalteu* reagensa. Centralni molibden-jon prihvata jedan elektron od polifenolnog antioksidansa i samim tim dolazi do redukcije  $\text{Mo}^{+6}$  do  $\text{Mo}^{+5}$ . Nakon redukcije, intenzivna žuta boja *Folin-Ciocalteu* reagensa menja se u plavu boju sa maksimumom apsorpcije na 765 nm (Sánchez-Rangel i sar. 2013). Intenzitet boje srazmeran je količini polifenolnih jedinjenja.

Modifikacija određivanja sadržaja ukupnih polifenola u odnosu na Singleton-ovu metodu (Singleton i Rossi 1965) ogledala se u primeni različitih količina uzoraka, ultračiste vode, *Folin-Ciocalteu* reagensa i natrijum-karbonata. Takođe, optimizovani su vreme i temperatura inkubacije uzoraka. Koncentracioni opseg galne kiseline, koja je korišćena kao standard, je optimizovan.

Pri određivanju TPC vrednosti u ekstraktima plodova i listova gajenih jagodastih vrsta voćaka, u 0,1 mL prethodno pripremljenih ekstrakata uzoraka dodavano je 6 mL ultračiste vode i 0,5 mL 10% *Folin-Ciocalteu* reagensa. Smeša je inkubirana 6 minuta na sobnoj temperaturi. Zatim je dodato 3 mL 20% natrijum-karbonata. Nakon inkubacije od 30 minuta na 40 °C, apsorpcija smeše merena je na talasnoj dužini od 765 nm. Galna kiselina je korišćena kao standard u koncentraciji od 100 mg/L do 500 mg/L za plod gajenih jagodastih vrsta voćaka, dok je za ekstrakte listova gajenih jagodastih voćnih vrsta opseg koncentracija bio 20–100 mg/L. Smeša vode i reagensa je korišćena kao slepa proba. Rezultati za ukupan sadržaj polifenola u ispitivanim uzorcima su izraženi kao miligram ekvivalenta galne kiseline (*gallic acid equivalent*, GAE) po gramu smrznutog uzorka ploda ili mg ekvivalenta galne kiseline (GAE) po g uzorka suvog lista.

U uzorcima plodova samoniklih vrsta voćaka, sadržaj ukupnih polifenola određen je dodavanjem 0,5 mL ekstrakta ploda i 2,5 mL *Folin-Ciocalteu* reagensa (10%) u 0,5 mL ultračiste vode, te je nakon 5 minuta dodato 2 mL 7,5%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Nakon 60 min inkubacije u mraku, na sobnoj temperaturi, merena je apsorpcija na 765 nm. Za konstruisanje kalibracione krive korišćeni su standardni rastvori galne kiseline (20–100 mg/L), a rezultati su izraženi u gramima ekvivalenta galne kiseline (GAE) po kilogramu smrznutog uzorka.

#### 3.4.1.2. Određivanje sadržaja ukupnih antocijanina

Kvantitativno određivanje ukupnih antocijanina, zasniva se na činjenici da su antocijanini pH nestabilna jedinjenja, te da pri promeni pH vrednosti sredine dolazi do reverzibilne promene u njihovoj strukturi i apsorpcionom spektru. Stoga se sadržaj ukupnih antocijanina određuje spektrofotometrijski, merenjem razlike u apsorpciji pri pH = 1 i pH = 4,5 na talasnoj dužini od 520 nm, pri čemu je ta razlika u apsorpciji proporcionalna koncentraciji antocijanina.

Ukupan sadržaj antocijanina u plodu gajenih jagodastih i samoniklih vrsta voćaka određen je primenom pH-diferencijalne metode (Giusti i Wrolstad 2001). Pripremljeni metanolni i acetonski



ekstrakti razblaženi su puferima pH = 1,0 (hlorovodonična kiselina/kalijum-hlorid, 0,025 mol/L) i pH = 4,5 (sirćetna kiselina/natrijum-acetat, 0,4 mol/L). Apsorbancije oba rastvora merene su na dve talasne dužine 510 nm i 700 nm u odnosu na slepu probu, nakon 30 minuta inkubacije na sobnoj temperaturi. Kao slepa proba korišćena je ultračista voda. Koncentracija antocijanina (*Total Anthocyanin Content*, TAC) je izračunata i izražena kao miligram ekvivalenta cijanidin 3-glukozida na 100 g smrznutog uzorka primenom formule (7):

$$TAC = ((A \times M \times DF \times 1000)) / ((\epsilon \times 1)) \quad (7)$$

$$A = (A_{510} - A_{700})_{pH1,0} - (A_{510} - A_{700})_{pH4,5} \quad (8)$$

gde je: A apsorbancija izračunata pomoću jednačine (8), M je molekulska masa (M = 449,2 g/mol za cijanidin 3-glukozid), DF je faktor razblaženja, l je dužina optičkog puta kivete u cm,  $\epsilon$  je molarna apsorptivnost ( $\epsilon = 26900$  L/mol·cm za cijanidin 3-glukozid).

### 3.4.1.3. Određivanje antioksidativnog kapaciteta

Antioksidativni kapacitet ispitivanih ekstrakata procenjen je različitim spektrofotometrijskim metodama. U tu svrhu upotrebljeni su testovi koji pokazuju sposobnost neutralizacije slobodnih DPPH radikala (*radical scavenging activity*, RSA), sposobnost neutralizacije superoksid anjon radikala (*superoxide anion radical scavenging activity*, SAS), sposobnost neutralizacije radikala azot-monoksida (NO•). Pored toga, određen je redukcionni potencijal (*reducing power*, RP) ekstrakata, sposobnost heliranja jona gvožđa (*Fe<sup>2+</sup> chelating ability*, FCA) i antitirozinazna aktivnost (AT).

#### *Određivanje sposobnosti neutralizacije DPPH radikala*

Metoda neutralizacije 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikala (DPPH•) jedna je od najčešće korišćenih spektrofotometrijskih metoda za određivanje antioksidativnog kapaciteta. DPPH• je stabilan radikal, zahvaljujući delokalizaciji nesparenog elektrona u celom molekulu čime se sprečava njegova dimerizacija. Metanol, etanol ili njihove smeše sa vodom često se upotrebljavaju za rastvaranje DPPH reagensa, pri čemu optimalan udeo vode ne bi trebalo da prelazi 60% zapreminskog udela, kako bi se očuvala rastvorljivost radikala. Mehanizam reakcije se bazira na reakciji transfera elektrona i uklanjanja vodonika, tokom čega DPPH• prelazi u redukovanu formu (DPPH ili DPPH-H) (Prior *i sar.* 2005). Princip metode se zaniva na merenju redukcionog delovanja antioksidanasa prema DPPH radikalu. Ova sposobnost se procenjuje praćenjem smanjenja apsorpcionog maksimuma DPPH radikala. Rastvor DPPH•, koji ima tamno ljubičastu boju, prilikom reakcije sa antioksidansom prelazi u bledo-žutu boju novonastalog hidrazina, a stepen obezbojavanja je proporcionalan koncentraciji jedinjenja sa antioksidativnim svojstvima, što se određuje merenjem smanjenja intenziteta apsorbcije na 517 nm (Moon i Shibamoto 2009). Kao pozitivna kontrola koja inhibira formiranje radikalnog katjona najčešće se koristi standard 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilhroman-2-karboksilna kiselina (troloks), pri čemu se rezultati izražavaju kao ekvivalent troloksa (TE) (Shivakumar i Yogendra Kumar 2018).

Antioksidativni kapacitet ekstrakata plodova gajenih jagodastih vrsta voćaka je određen korišćenjem DPPH• reagensa prema metodi opisanoj u literaturi (Li *i sar.* 2008). Postupak opisan u literaturi je modifikovan i prilagođen ispitivanim uzorcima. Količina ekstrakta, koncentracija DPPH rastvora i vreme inkubacije su optimizovani. Količina od 0,2 mL ekstrakata (prethodno 10 puta razblaženih) je pomešana sa 4 mL metanolnog rastvora DPPH• (71  $\mu$ M). Smeša je ostavljena da odstoji 60 min na tamnom mestu (dok se ne dobiju stabilne vrednosti apsorbcije). Redukcija DPPH radikala je merena praćenjem smanjenja apsorbcije na 515 nm. Smeša 0,2 mL metanola i 4 mL

rastvora DPPH• iste koncentracije korišćena je kao slepa proba (SP). U uzorcima plodova samoniklih voćnih vrsta sposobnost neutralizacije DPPH radikala testirana je na sličan način kao u plodu gajenih voćnih vrsta, uz dodatne modifikacije koje su podrazumevale prilagođavanje količine uzorka i reagensa, kao i vreme trajanja inkubacije. 500 µL ekstrakta ploda (adekvatno razblazenog) je pomešano sa 0,004% rastvorom DPPH reagensa do konačne zapremine od 1 mL. Posle inkubacije (20 min na sobnoj temperaturi), apsorbancija je merena na 517 nm.

Kao standard, na osnovu kojeg je izražena vrednost antioksidativnog kapaciteta, korišćen je troloks. Od osnovnog rastvora troloksa (1000 µmol/dm<sup>3</sup>) napravljena serija standardnih rastvora koncentracija 100, 200, 300, 400, 500, i 600 µmol/dm<sup>3</sup>. Sposobnost neutralizacije DPPH radikla (RSA) izračunata je kao procenat promene boje DPPH• primenom jednačine (9):

$$RSA = \frac{(A_{SP} - A_{uzorka})}{A_{SP}} \times 100 \quad (9)$$

gde je  $A_{SP}$  apsorbancija metanolnog rastvora DPPH radikala (slepe probe, SP) i  $A_{uzorka}$  je apsorbancija ispitivanog uzorka. Na osnovu kalibracione krive koja predstavlja zavisnost RSA (%) od koncentracije troloksa, izračunat je antioksidativni kapacitet ispitivanih uzoraka. Rezultati su prikazani kao mmol troloks ekvivalenta po kg smrznutog uzorka (mmol TE/kg).

U uzorcima listova gajenih jagodastih voćnih vrsta za određivanje sposobnosti neutralizacije stabilnog obojenog slobodnog DPPH• pomešano je 1950 µL rastvora DPPH• u smeši metanol/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/NaOH pufer (50:50, v/v) i 50 µL ekstrakta lista ili 50 µL KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/NaOH pufera (pH 7,4), koji je korišćen kao kontrolni uzorak. Reakciona smeša je snažno promućkana i nakon 20 minuta inkubacije određeno je smanjenje apsorbancije na 515 nm. Sposobnost neutralizacije DPPH radikala izračunata je primenom jednačine (3). RSA je takođe određena za metanolni rastvor troloksa, koja je ispitana na tri različite koncentracije DPPH• (150 µM DPPH% = 58,37 ± 1,78; 200 µM DPPH% = 73,25 ± 2,15 i 250 µM DPPH% = 74,47 ± 2,89). Sva merenja su urađena u triplikatu i rezultati su izraženi u procentima (%) (Papetti *i sar.* 2006).

#### *Određivanje sposobnosti neutralizacije superoksid anjon radikala (O<sub>2</sub>•<sup>-</sup>)*

Superoksid anjon radikali su prekursori aktivnih slobodnih radikala (<sup>1</sup>O<sub>2</sub> i HO•) koji reaguju sa biološkim makromolekulima, čime uzrokuju oštećenja tkiva. Redukcija molekulskog kiseonika (O<sub>2</sub>) odvija se intracelularno u mitohondrijama pod normalnim fiziološkim uslovima, pri čemu se formira superoksid anjon radikal (O<sub>2</sub>•<sup>-</sup>) (Bibi Sadeer *i sar.* 2020). Superoksid-dismutaza predstavlja antioksidativni enzim koji je odgovoran za neutralizaciju O<sub>2</sub>•<sup>-</sup>. Ovaj enzim prevodi superoksid anjon radikal u vodonik-peroksid, koji se dalje konvertuje u O<sub>2</sub> i vodu pomoću glutathion-peroksidaze i katalaze. Međutim, detekcija i merenje nivoa O<sub>2</sub>•<sup>-</sup> unutar ćelija je komplikovana zbog nestabilnosti ovog radikala u vodenim rastvorima. Metode koje se primenjuju za određivanje superoksid anjon radikala u biološkim sistemima zasnivaju se na reakciji superoksida sa indikatorom koji formira stabilan proizvod oksidacijom, redukcijom ili vezivanjem superoksida za indikator. Sposobnost antioksidanasa da neutrališu superoksid anjon radikal može se odrediti metodom sa fenazin-metosulfatom (*phenazine methosulphate*, PMS), nitroplavim tetrazolijumom (*nitroblue tetrazolium*, NBT) i redukovanom oblikom nikotinamid-adenin-dinukleotida (*nicotinamide-adenine dinucleotide*, NADH). Superoksid anjon radikali nastaju kada se NADH oksiduje u prisustvu fenazin-metosulfata i NBT-a pri pH vrednosti 7,4, što rezultira formiranjem plavog formazana. Reakcija se meri spektrofotometrijski na 560 nm, pri čemu u prisustvu antioksidansa apsorbancija opada, što ukazuje na sposobnost neutralizacije superoksid anjon radikala (Nimse i Pal 2015).

U cilju određivanja sposobnosti neutralizacije superoksid anjon radikala, 50 µL ekstrakta lista (uzorak) ili 50 µL Tris-HCl pufera (slepa proba) dodato je u PMS-NADH sistem. PMS-NADH

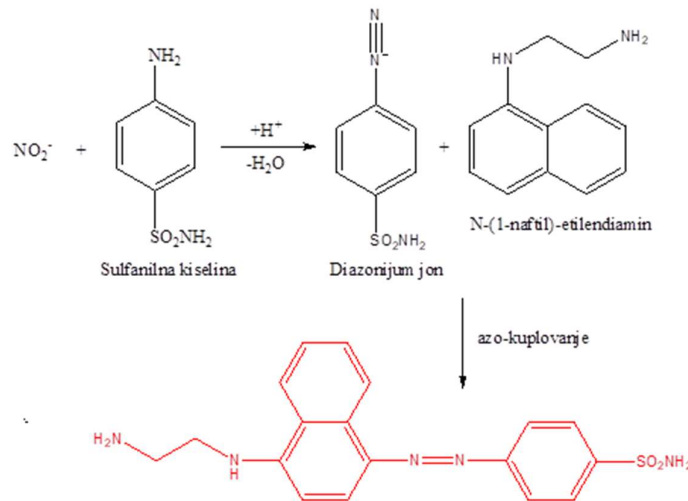
sistem je sadržao 16 mM Tris-HCl pufera (pH 8,0), 338  $\mu$ M NADH, 72  $\mu$ M NBT i 30  $\mu$ M PMS. Ovako pripremljena smeša je inkubirana 5 min pre očitavanja apsorbancije na 560 nm. Sposobnost neutralizacije superoksid anjon radikala izračunata je prema sledećoj jednačini:

$$SAS = \frac{(1 - A_{SP})}{A_{uzorka}} \times 100 \quad (10)$$

gde je  $A_{sp}$  apsorbancija slepe probe i  $A_{uzorka}$  apsorbancija ispitivanog uzorka. Sva merenja su urađena u triplikatu i rezultati su izraženi u procentima (%) (Mohsin *i sar.* 2014).

#### Određivanje potencijala neutralizacije radikala azot-monoksida ( $NO^\bullet$ )

Radikal azot-monoksida ( $NO^\bullet$ ) formira se u biološkim sistemima dejstvom azot-monoksid-sintaze, koja katalizuje prevođenje arginina u cirtulin uz formiranje  $NO^\bullet$  putem oksidacione reakcije. Azot-monoksid radikal igra ključnu ulogu u regulaciji različitih fizioloških i patofizioloških procesa, a jedna od uloga je da opušta glatke mišićne zidove krvnih sudova, što dovodi do smanjenja krvnog pritiska. Kada je ovaj radikal prisutan u prekomernim količinama, može postati toksičan, reagujući direktno sa biomolekulama ili reaguje sa superoksid anjon radikalom ( $O_2^{\bullet-}$ ) kako bi formirao peroksinitrit ( $ONOO^-$ ) (Radi 2018). Određivanje sposobnosti neutralizacije radikala azot-monoksida ( $NO^\bullet$ ) je takođe spektrofotometrijska metoda koja zasniva na Griess-ovoj reakciji (Slika 9) (Griess 1864). Griess-ova reakcija se sastoji od dva koraka i uključuje diazotizaciju, gde nitratni agens nastao iz azotnog oksida reaguje sa sulfanilnom kiselinom stvarajući diazonijum jon. Zatim, diazonijum jon reaguje sa N-(1-naftil)-etilendiaminom, stvarajući crveno obojen azo proizvod koji pokazuje snažnu apsorbanciju na talasnoj dužini od 546 nm, pri čemu je intenzitet crvene boje, proporcionalan koncentraciji azotnog oksida u uzorku. Kao izvor  $NO$  radikala koristi se vodeni rastvor natrijum-nitroprusida. U aerobnim uslovima,  $NO^\bullet$  može reagovati sa kiseonikom pri čemu proizvodi nitrat i nitrit kao stabilne proizvode koji se mogu kvantifikovati pomoću Griess-ovog reagensa. Radi unapređenja reproduktivnosti, osetljivosti i vremena analize, originalna metoda je nadograđena, pa se danas primenjuje komercijalni Griess-ov reagens koji sadrži naftilendiamin dihidrohlorid i sulfanilamid u 5% fosfornoj kiselini. Sposobnost neutralizacije  $NO^\bullet$  se izračunava kao procenat inhibicije, pri čemu se kao standard najčešće koristi askorbinska kiselina (Hetrick i Schoenfisch 2009).



Slika 9. Griess-ova reakcija.

Za određivanje sposobnosti neutralizacije  $\text{NO}^\bullet$  ekstrakata plodova samoniklih vrsta voćaka primenjena je metoda prethodno opisana u literaturi (Sreejayan i Rao 1997). Smeše 25  $\mu\text{L}$  razblaženih ekstrakata uzoraka (1:100, 1:200 i 1:500) i 75  $\mu\text{L}$  sveže pripremljenog natrijum-nitroprusida (5 mM) u fosfatnom puferu (pH 7,4) su inkubirane na 25 °C tokom 150 min, nakon čega je dodato 150  $\mu\text{L}$  Griess-ovog reagensa (0,1% naftiletildiamin dihidrohlorid, 1% sulfanilamid i 2%  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ). Apsorbancija na 546 nm je merena nakon 10 minuta inkubacije. Pripremljena je slepa proba sa ekvivalentnom količinom reagensa. Rezultati su izraženi kao procenat neutralisanog  $\text{NO}^\bullet$  u odnosu na slepu probu. Kao standard korišćena je askorbinska kiselina u opsegu koncentracija od 0,06 do 1,00 mg/mL.

#### *Određivanje redukcionog potencijala*

Bioaktivna jedinjenja koja poseduju antioksidativna svojstva mogu redukovati oksidanse. Princip određivanja redukcionog potencijala zasniva se na sposobnosti antioksidanasa da otpuštaju elektrone i redukuje  $\text{Fe}^{3+}$  u  $\text{Fe}^{2+}$  jon. Antioksidans reaguje sa kalijum-heksacijanoferatom(III) ( $\text{Fe}^{+3}$ ) u prisustvu fosfatnog pufera (pH približno 7), pri čemu se stvara kalijum-heksacijanoferat(II) ( $\text{Fe}^{+2}$ ). Nakon inkubacije na 50 °C tokom 20 minuta, ovaj proizvod dalje reaguje sa  $\text{FeCl}_3$  formirajući tamno plavo obojeni kompleks (*Perl's Prussian blue* kompleks) čiji je maksimum apsorbcije na 700 nm. Svrha zagrevanja dobijenog rastvora jeste smanjenje maksimalne količine kalijum-heksacijanoferata(II). U ovom testu, žuta boja rastvora menja se u različite nijanse zelene i plave, zavisno od redukcionog potencijala uzoraka antioksidanasa. Količina formiranog kompleksa je direktno proporcionalna smanjenju antioksidativne snage ispitivanog uzorka. (Bursal i Gülçin 2011).

Za određivanje redukcionog potencijala uzoraka listova gajenih jagodastih voćnih vrsta, alikvot od 1 mL ekstrakta lista (razblažen 1:1000 mL) je pomešan sa 0,4 mL kalijum-heksacijanoferata(III) (0,02 M), 0,05 mL hlorovodonične kiseline (0,01 M), 0,4 mL gvožđa(III)-hlorida (0,02 M) i 0,7 mL destilovane vode. Posle 15-minutne inkubacije u mraku, očitana je apsorbcija na 720 nm (Daglia i sar. 2008). Rezultati su izraženi kao koncentracija rastvora askorbinske kiseline ( $\mu\text{M/L}$  ekstrakta lista), koji je korišćen kao standard.

U ekstraktima plodova samoniklih vrsta voćaka, redukcionog potencijal određen je modifikovanjem metode prethodno opisane u literaturi (Yıldırım i sar. 2001). 500  $\mu\text{L}$  fosfatnog pufera (0,2 M, pH 6,6) i 400  $\mu\text{L}$  kalijum-heksacijanoferat(III) (10 mg/mL) pomešani su sa 200  $\mu\text{L}$  alikvota ekstrakta ploda razblaženih u metanolu. Posle inkubacije smeše tokom 20 minuta na 50 °C u vodenom kupatilu, dodata je trihlorosirćetna kiselina (500  $\mu\text{L}$ , 10%, v/v) i uzorci su centrifugirani (10 min na 2000  $\times$  g). Alikvoti supernatanta (500  $\mu\text{L}$ ) su zatim pomešani sa 500  $\mu\text{L}$  destilovanom vodom i 100  $\mu\text{L}$   $\text{FeCl}_3$  (1 mg/mL) i ostavljeni 10 minuta na sobnoj temperaturi pre merenja apsorbcije na 700 nm. Kapaciteti redukcije ekstrakata izraženi su kao vrednost apsorbcije na 700 nm.

#### *Određivanje sposobnosti heliranja jona gvožđa*

Slobodni radikali takođe mogu poticati od teških i prelaznih metala, kao što su živa, olovo, arsen i gvožđe. Uprkos svojoj esencijalnoj prirodi, gvožđe može biti potencijalno toksično kada je prisutno kao slobodan jon. Njegova toksičnost može proisteći iz sposobnosti da učestvuje kao katalizator u formiranju hidroksil radikala, vrste koja može indukovati oksidaciju lipida, proteina i DNK i time doprineti oksidativnom stresu (Gülçin 2012). Antioksidativna sposobnost helatora metalnih jona procenjuju se kada se formira kompleks između antioksidansa i metala, pri čemu joni metala više ne mogu delovati kao inicijatori oksidacije lipida. Sposobnosti antioksidansa u kompleksiranju jona metala određuje se metodom u kojoj se koristi ferozin. U blago kiselom sredini (pH = 6), antioksidansi se mogu vezati samo za deo  $\text{Fe}^{2+}$ , dok preostali  $\text{Fe}^{2+}$  joni mogu reagovati sa ferozinom i formirati ferozin- $\text{Fe}^{2+}$  kompleks crvene boje, koji je stabilan i rastvorljiv u vodi. U prisustvu antioksidansa dolazi do razlaganja ovog kompleksa, što dovodi do gubitka crvene boje, pri

čemu se smanjenje intenziteta boje prati spektrofotometrijski na 562 nm. Što je veća vrednost apsorbcije na 562 nm, to je veća koncentracija kompleksa Fe<sup>2+</sup>-ferozin i niža sposobnost vezivanja antioksidanasa. Etilendiamintetrasirćetna kiselina (EDTA) se obično koristi kao standard i u većini slučajeva se sposobnost heliranja jona metala izražava kao EDTA ekvivalenti (Santos *i sar.* 2017).

Sposobnost ekstrakata listova gajenih jagodastih voćnih vrsta i plodova samoniklih vrsta voćaka u kompleksiranju Fe<sup>2+</sup> jona određena je primenom metode koja je opisana u literaturi (Wang *i sar.* 2013). U 20 µL prethodno razblaženih ekstrakata, odnosno metanola (slepa proba), dodato je 50 µL FeCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O (2,0 mM). U smešu je potom dodato 200 µL ferozina (5 mM), a zatim je smeša dopunjena sa 1230 µL metanola do konačne zapremine do 1500 µL. Posle inkubacije od 10 minuta na sobnoj temperaturi, apsorbcija reakcione smeše je očitana na 562 nm u odnosu na kontrolni uzorak. EDTA je korišćen kao standard, a sposobnost heliranja metala je izračunata u skladu sa sledećom jednačinom:

$$FCA = \frac{(A_{SP} - A_{uzorka})}{A_{SP}} \times 100 \quad (11)$$

gde je A<sub>sp</sub> apsorbcija slepe probe i A<sub>uzorka</sub> apsorbcija ispitivanog uzorka. Rezultati su prikazani u procentima i predstavljaju srednju vrednost tri nezavisna merenja.

#### *Određivanje antitirozinazne aktivnosti*

Tirozinaza je multifunkcionalni enzim oksidaze koji sadrži dva dvovalentna bakarna jona okružena sa tri histidinska ostatka koji su odgovorni za katalitičku aktivnost tirozinaze. Ovaj enzim katalizuje hidrosilaciju L-tirozina i L-DOPA (3,4-dihidroksifenilalanina) u dopahinone koji mogu izazvati nakupljanje melanina u spoljašnjem sloju kože. U svrhu sprečavanja hiperpigmentacije melanina koriste se inhibitori tirozinaze poput kojične kiseline, hidrohina i arbutina. Dodatno, nepravilna aktivnost tirozinaze dovodi do dopaminske neurotoksičnosti i neurodegeneracije, što je povezano s Parkinsonovom bolešću (Carballo-Carbajal *i sar.* 2019). Sposobnost antioksidanasa da inhibiraju prekomernu aktivnost enzima tirozinaze procenjuje na osnovu formiranja dopahroma (crveno-narandžasti pigment), spektrofotometrijskim merenjem apsorbcije na maksimumu apsorbcije od 475 nm (Fan *i sar.* 2021).

Određivanje antitirozinazne aktivnosti je izvedeno mešanjem 50 µL ekstrakata ploda samoniklih vrsta voćaka sa 0,9 mL rastvora fosfatnog pufera (0,1 M, pH 6,8) i 0,5 mL L-DOPA (0,03% u fosfatnom puferu 0,1 M, pH 6,8). Na isti način pripremljena je i slepa proba, ali bez dodavanja rastvora enzima. Posle inkubacije smeše tokom 10 minuta na 37 °C, dodato je 50 µL rastvora tirozinaze (1000 U/mL) i smeša je ponovo inkubirana 5 minuta na 37 °C. Nakon toga određena je apsorbcija na 475 nm (Vanni i Gastaldi 1990). Aktivnost inhibicije tirozinaze je izračunata na osnovu razlike apsorbcije uzoraka i slepe probe. Kao standard korišćena je askorbinska kiselina (0,5-2,5 mg/mL). Rezultati su izraženi u procentima.

#### **3.4.2. Optimizacija uslova masene spektrometrije za definisanje polifenolnog profila u plodu i listu gajenih i samoniklih voćnih vrsta**

Određivanje hemijskih profila i identifikacija sekundarnih metabolita biljnog materijala postaju sve važniji radi boljeg razumevanja biohemijskih i farmakoloških svojstava, kao i njihovog potencijalog dejstva u terapiji i prevenciji raznih oboljenja. Razvoj savremenih hromatografskih tehnika doveo je do povećanja preciznosti i tačnosti hromatografskih analiza i masene detekcije, baš kao i osetljivosti ovih analiza. Različiti mehanizmi fragmentacije jona u analizi masene spektrometrije omogućavaju prikaz strukturnih karakteristika fenolnih jedinjenja, što olakšava

njihovu identifikaciju u kompleksnim biljnim materijalima. Ovi novi pristupi mogu biti ključni za analizu polifenola, iako postoje izazovi u identifikaciji i kvantifikaciji tih jedinjenja zbog strukturne raznolikosti i ograničene dostupnosti analitičkih standarda. Tehnike koje se trenutno primenjuju u svrhu identifikacije i kvantifikacije sekundarnih metabolita omogućavaju ciljanu i neciljanu analizu sekundarnih metabolita, a takođe pružaju uvid u složene hemijske profile različitih uzoraka biljnog materijala, čime se obezbeđuje detaljnije određivanje njihovih komponenata.

#### *Identifikacija i kvantifikacija polifenolnog profila primenom UHPLC-LTQ OrbiTrap XL*

Da bi se istražili glavni markeri specifični za svaku vrstu jagodastog voća, u ovom istraživanju razvijena je UHPLC metoda u kombinaciji sa hibridnim masenim spektrometrom, koji kombinuje linearni trap kvadrupol (LTQ) i orbitrap maseni analizator. Za ovu analizu korišćeni su metanolni ekstrakti uzoraka. Svi eksperimenti su izvedeni korišćenjem sistema ultra-visokoefikasne tečne hromatografije (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Nemačka), koji se sastoji od kvaternarne *Accela* 600 pumpe i *Accela* Autosamplera, povezanog sa linearnim hibridnim masenim spektrometrom (LTK-OrbiTrap KSL) sa elektrosprej jonizacijom (ESI) (Slika 10). Za odvajanje polifenola iz uzoraka plodova gajenih jagodastih vrsta voćaka korišćena je kolona *Hipersil Gold C18* (50 × 2,1 mm, 1,9 µm) kompanije *Thermo Fisher Scientific*. Mobilna faza se sastojala od (A) 0,1% mravlje kiseline u vodi i (B) 0,1% mravlje kiseline u acetonitrilu, pri brzini protoka od 0,4 mL/min. Gradijent primenjen prilikom analize bio je: 0-5 min, od 5 do 95% (B); 5-6 min, 95% (B); zatim 5% (B) tokom 3 min. Svi standardi korišćeni u UHPLC-LTQ OrbiTrap XL analizi su rastvoreni u smeši metanol/voda (3:2, v/v). Maseni spektri su snimljeni u negativnom jonizacionom modu, sa sledećim parametrima ESI izvora: napon izvora 4 kV; kapilarni napon -47 V; napon sočiva cevi -159,11 V; temperatura kapilara 275 °C; glavni i pomoćni protok gasa (N<sub>2</sub>) 25 i 8 (proizvoljne jedinice). MS spektri su dobijeni akvizicijom punog opsega pokrivajući *m/z* 100-1000. Za proučavanje fragmentacije, podaci koji zavise od snimanja su dobijeni kolizionom indukovanom disocijacijom (CID), pri čemu je normalizovana energija sudara CID ćelije postavljena na 35 eV.

Softver *Xcalibur* (verzija 2.1, Thermo Fisher Scientific, Bremen, Nemačka) je korišćen za kontrolu instrumenta, prikupljanje i analizu podataka. Polifenoli su identifikovani i kvantifikovani u plodu gajenih jagodastih vrsta voćaka prema odgovarajućim spektralnim karakteristikama: masenim spektrima, tačnoj masi, karakterističnoj fragmentaciji i karakterističnom retencionom vremenu. Internet baza podataka masene spektrometrije, ChemSpider ([www.chemspider.com](http://www.chemspider.com)), korišćena je kao referentna biblioteka za identifikaciju jedinjenja od interesa.

Ispitivanjem polifenolnog profila u različim uzorcima u okviru sličnih istraživanja koja su sprovedena (Kečkeš *i sar.* 2013, Gašić *i sar.* 2014, Fotirić Akšić *i sar.* 2015), uslovi analize na OrbiTrap-u dodatno su optimizovani i primenjeni za identifikaciju pojedinačnih polifenola uzoraka lista gajenih jagodastih voćnih vrsta. Kolona *Synchronis C18* (100 × 2,1 mm, veličina čestica 1,7 µm) kompanije *Thermo Fisher Scientific* korišćena je kao analitička kolona za razdvajanje. Mobilna faza se sastojala od (A) 0,1% vodenog rastvora mravlje kiseline i (B) acetonitrila, u sledećem gradijentu koncentracije: 0,0–1,0 min 5% B, 1,0–12,0 min od 5% do 95% (B), 12,0–12,2 min od 95% do 5% (B), zatim 5% (B) za 3 min. Brzina protoka bila je 0,3 mL/min, a injekciona zapremina 5 µL. Za određivanje polifenola, primenjena je elektrosprej jonizacija u negativnom jonizacionom modu, pri temperaturi od 200 °C. Parametri jonskog izvora bili su sledeći: napon izvora 5 kV, napon kapilare -35 V, napon cevno sočiva -110 V, temperatura kapilare 300 °C, protok glavnog i pomoćnog gasa (N<sub>2</sub>) 25 i 5 (proizvoljne jedinice) (Natić *i sar.* 2015). MS spektri su snimljeni akvizicijom u punom opsegu koji pokriva 50–1500 *m/z*. Rezolucija je postavljena na 30 000, a joni od interesa su aktivirani sa 35% koliziono energije. Identifikacija polifenolnih jedinjenja izvršena je na osnovu snimanja tačne mase molekulskog jona nepoznatog jedinjenja [M-H]<sup>-</sup>, dok je za tumačenje njihove strukture korišćena MS<sup>2</sup> fragmentacija, pri čemu su predloženi mehanizmi fragmentacije i karakteristični fragmenti potvrđeni korišćenjem *Mass Frontier 6.0* softvera (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Nemačka).



**Slika 10.** UHPLC-LTQ OrbiTrap XL.

#### *Kvantifikacija polifenola korišćenjem UHPLC-DAD MS/MS*

Za odvajanje i kvantifikaciju polifenolnih jedinjenja u uzorcima listova gajenih jagodastih voćnih vrsta i plodu samoniklih vrsta voćaka korišćen je *Dionex Ultimate 3000 UHPLC* sistem povezan sa detektorom diodnog niza (DAD) i *TSQ Quantum Access Max* trostrukim kvadrupolnim masenim spektrometrom (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Nemačka) (**Slika 11**).

Na analitičkoj koloni *Synchronis C18* ( $100 \times 2,1$  mm, 1,7 m, Thermo Fisher Scientific, Bremen, Nemačka), koja je termostetirana na 40 °C, izvedeno je razdvajanja polifenola. Mobilna faza se sastojala od (A) 0,1% vodenog rastvora mravlje kiseline i (B) acetonitrila, sa gradijentom koncentracije: 0-2,0 min 5% B; 2,0-12,0 min 5-95% B; 12,0–12,2 min 95% - 5% B i 5% B do 15 min. Brzina protoka je podešena na 0,4 mL/min, a talasne dužine detekcije na 254 i 280 nm. Zapremina injektovanog uzorka bila je 5  $\mu$ L.

*TSQ Quantum Access Max* maseni spektrometar opremljen elektrosprej jonskim izvorom je korišćen kao detektor, pri čemu su parametri jonskog izvora opisani u odeljku koji se odnosi na kvalitativnu analizu polifenolnih jedinjenja (*Identifikacija i kvantifikacija polifenolnog profila primenom UHPLC-LTQ OrbiTrap XL*). Snimanje masenih spektara urađeno je u negativnom jonizacionom modu, u opsegu od 100 do 1000  $m/z$ .



**Slika 11.** Dionex Ultimate 3000 UHPLC-DAD-TSQ Quantum Access Max maseni spektrometar.

Za kontrolu instrumenta korišćen je softver Xcalibur 2.2 (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Nemačka). Polifenoli su kvantifikovani direktnim poređenjem sa komercijalnim standardima i za svaki standard je snimljen molekulski jon i najintenzivniji fragment iz MS<sup>2</sup> spektra (**Tabela 3** i **Tabela 4**), pri čemu su tokom snimanja optimizovane kolizionne energije, koje su bile u opsegu od 20 do 60 eV. Ukupan sadržaj svakog fenolnog jedinjenja je metodom najmanjih kvadrata i izražen kao mg fenolnog jedinjenja po kg uzorka suvog lista ili smrznutog ploda samoniklih vrsta voćaka.

**Tabela 3.** Retenciono vreme ( $t_R$ , min), molekulski jon ( $m/z$ ), osnovni MS/MS fragmenti sa specifičnim kolizionim energijama, korelacioni koeficijent ( $R^2$ ), granica detekcije (LOD) i granica kvantifikacije (LOQ) za standarde fenolnih jedinjenja u listu gajenih malina i kupina.

$t_R$ , min	Jedinjenje polifenola	Molekulski jon, $m/z$	MS/MS fragmenti, $m/z$ (Kolizionna energija, eV)	$R^2$	LOD, mg/L	LOQ, mg/L
1,98	Galna kiselina	169,032	79,11 (31); 125,04 (16)	0,9911	0,16	0,55
3,87	Galokatehin	305,120	125,22 (27); 179,19 (17)	0,9996	0,03	0,10
3,98	Protokatehinska kiselina	153,013	108,09 (23); 109,10 (14)	0,9980	0,10	0,34
4,89	Eskulin	339,080	133,09 (44); 177,06 (25)	0,9999	0,01	0,05
5,07	Epigalokatehin	305,110	125,22 (27); 179,19 (17)	0,9999	0,01	0,02
5,08	<i>p</i> -Hidroksibenzoeva kiselina	137,057	93,19 (19); 108,33 (22)	0,9934	0,14	0,48
5,18	Gentizinska kiselina	153,003	108,07 (5); 109,10 (15)	0,9998	0,02	0,06
5,23	5- <i>O</i> -Kofeoilhininska kiselina	353,103	191,28 (25)	0,9980	0,08	0,27
5,25	Katehin	289,094	203,00 (23); 245,03 (31)	0,9953	0,14	0,45
5,51	Kofeinska kiselina	179,004	134,00 (13); 135,00 (16)	0,9951	0,11	0,38
5,82	Galokatehin galat	457,146	161,08 (25); 359,23 (16)	0,9930	0,07	0,22
5,75	Epikatehin	289,084	203,00 (23); 245,03 (31)	0,9991	0,06	0,19
6,04	Rutin	609,197	299,98 (42); 301,20 (32)	0,9976	0,09	0,31
6,07	Elaginska kiselina	300,980	284,00 (32); 300,04 (30)	0,9938	0,11	0,37
6,15	<i>p</i> -Kumarinska kiselina	163,031	93,12 (39); 119,09 (16)	0,9947	0,12	0,41
6,25	Katehin galat	441,189	289,15 (20)	0,9937	0,07	0,24
6,44	Naringin	579,241	151,42 (43); 217,26 (33)	0,9937	0,16	0,53
6,55	Ferulinska kiselina	193,057	134,00 (18); 178,00 (15)	0,9933	0,15	0,50
6,81	Epigalokatehin galat	457,156	161,08 (25); 359,23 (16)	0,9928	0,15	0,51
6,94	Miricetin	317,052	109,31 (45); 150,97 (27)	0,9980	0,06	0,21
7,58	Kvercetin	301,026	151,01 (22); 179,00 (20)	0,9978	0,08	0,27
8,19	Kampferol	285,074	211,00 (32); 227,00 (32)	0,9961	0,04	0,13



**Tabela 4.** Retenciono vreme ( $t_R$ , min), molekularni jon ( $m/z$ ), osnovni MS/MS fragmenti sa specifičnim kolizionim energijama, korelacioni koeficijent ( $R^2$ ), granica detekcije (LOD) i granica kvantifikacije (LOQ) za standarde fenolnih jedinjenja u plodu samoniklih voćnih vrsta.

$t_R$ , min	Jedinjenje	Molekularni jon, $m/z$	MS/MS fragmenti, $m/z$ (Koliziona energija, eV)	$R^2$	LOD, mg/L	LOQ, mg/L
1,77	Arbutin	271,078	108,21 (82)	0,9976	0,10	0,32
2,17	Galna kiselina	169,032	125,04 (16); 97,12 (16)	0,9965	0,15	0,50
4,10	Protokatehinska kiselina	153,003	109,10 (15); 108,07 (5)	0,9976	0,10	0,34
4,86	Eskulin	339,072	177,00 (25); 133,28 (19)	0,9977	0,09	0,31
5,20	<i>p</i> -Hidroksibenzoeva kiselina	137,058	93,19 (19)	0,9953	0,16	0,54
5,31	5- <i>O</i> -Kofeoilhininska kiselina	353,103	191,28 (25)	0,9992	0,06	0,21
5,64	Kofeinska kiselina	179,004	135,06 (18); 107,13 (18)	0,9917	0,18	0,61
5,65	Vanilinska kiselina	167,018	152,02 (15); 108,23 (21)	0,9923	0,27	0,89
5,81	Siringinska kiselina	197,046	182,02 (21); 153,02 (16)	0,9954	0,14	0,48
6,39	<i>p</i> -Kumarinska kiselina	163,031	119,09 (16)	0,9971	0,11	0,37
6,57	Elaginska kiselina	300,980	284,06 (33); 229,03 (27)	0,9922	0,11	0,37
6,75	Ferulinska kiselina	193,035	178,04 (15); 134,06 (19)	0,9923	0,15	0,50
5,21	Katehin	289,050	245,10 (16); 123,08 (34)	0,9943	0,16	0,53
6,23	Rutin	609,197	301,20 (32); 271,04 (58)	0,9982	0,10	0,33
6,40	Kvercetin 3- <i>O</i> -galaktozid	463,002	301,04 (23); 300,02 (29)	0,9930	0,10	0,32
6,73	Apigenin 7- <i>O</i> -apioglukozid	563,056	269,01 (41); 224,93 (62)	0,9984	0,04	0,12
6,74	Naringin	579,241	459,63 (7); 271,36 (33)	0,9944	0,16	0,53
6,83	Kampferol 3- <i>O</i> -glukozid	447,008	284,03 (29); 255,03 (43)	0,9922	0,05	0,16
7,17	Florizin	435,149	273,16 (20); 167,16 (34)	0,9966	0,10	0,33
8,17	Luteolin	285,035	175,04 (27); 133,66 (36)	0,9915	0,25	0,85
8,92	Apigenin	269,032	225,09 (23); 151,00 (26)	0,9964	0,10	0,32
8,92	Naringenin	271,036	151,01 (20); 107,07 (26)	0,9967	0,14	0,46
9,02	Kampferol	285,074	227,07 (33); 211,02 (29)	0,9900	0,25	0,84

### 3.4.3. Određivanje sadržaja slobodne i ukupne elaginske kiseline u plodu gajenih voćnih vrsta

Za određivanje sadržaja slobodne elaginske kiseline korišćeni su prethodno pripremljeni metanolni i acetonski ekstrakti plodova gajenih jagodastih vrsta voćaka. Da bi se odredio sadržaj ukupne elaginske kiseline primenjen je postupak kiselne hidrolize (Vrhovsek *i sar.* 2006). Koncentrovana hlorovodonična kiselina (8,3 mL 37% HCl) je dodata u alikvot (10 mL) ekstrakta ploda i smeša je razblažena do 25 mL sa metanolom (konačna koncentracija HCl = 4 M). Smeša je refluktovana 6 h na 85 °C, uz konstanto mešanje na magnetnoj mešalici. Nakon hidrolize, dodatkom metanola, zapremina rastvora je vraćena na početnu. Alikvot (10 ml) je podešen na pH 2,5 sa 5 M NaOH i razblažen do 10 mL sa metanolom. Pre HPLC analize, svi ekstrakti su filtrirani kroz 0,45 mm PTFE membranski filter i čuvani na -20 °C.

U uzorcima plodova gajenih jagodastih vrsta voćaka određen je sadržaj ukupne i slobodne elaginske kiseline primenom visokoeфикаsne tačne hromatografije, korišćenjem *Waters HPLC* sistema koji se sastoji od binarne pumpe (1525) i *UV-Vis Waters 2487* dvostrukog detektora (**Slika 12**). Razdvajanje je izvedeno na *Waters Symmetry C18* koloni, dimenzija 4,5 × 150 mm, sa prečnikom čestica od 5 μm. Mobilna faza je bila (A) 0,1% trifluorosirćetna kiselina u acetonitrilu i (B) 0,1%

trifluorosirćetna kiselina u vodenom rastvoru. Uzorci su analizirani primenom izokratskog eluiranja sa 20% A i 80% B, pri brzini protoka od 1,2 mL/min. Zapremina injektovanog uzorka je bila 10  $\mu$ L, a vreme trajanja analize 15 minuta. Elaginska kiselina je detektovana i kvantifikovana na talasnoj dužini  $\lambda = 254$  nm. Kvantifikacija elaginske kiseline je izvršena korišćenjem kalibracione krive standarda elaginske kiseline, opsega koncentracije od 10 do 100 ppm, koji je rastvoren je u smeši metanol/voda (3:2, v/v).



**Slika 12.** 1500 Series HPLC, Waters sa UV detektorom 2487 Dual  $\lambda$  Absorbance Detector.

#### 3.4.4. Ispitivanje antocijaninskog profila u plodu gajenih i samoniklih voćnih vrsta primenom HPTLC i UHPLC-LTQ OrbiTrap XL

##### *Visokoefikasna tankoslojna hromatografija, HPTLC*

U cilju određivanja antocijaninskog otiska prsta (finger-print) uzoraka plodova gajenih jagodastih i samoniklih vrsta voćaka primenjena je HPTLC tehnika. Da bi se optimizovali uslovi HPTLC odvajanja primenjen je veliki broj kombinacija stacionarnih i mobilnih faza. Nakon optimizacije uslova odvajanja usledila je analiza profila antocijanina dobijenih primenom visokoefikasne tankoslojne hromatografije. Kao stacionarne faze korišćene su komercijalno dostupne TLC ploče, uključujući silika gel 60 F254, celuloznu i oktadecil-modifikovani silika gel RP-18. Za završne eksperimente korišćene su HPTLC silika gel 60 F254 ploče. Pre nanošenja uzoraka, ploče su oprane smešom metanola i hloroforma u odnosu 1:1, a zatim su sušene u sušnici na 110 °C tokom 30 minuta. Svi rastvarači upotrebljeni u procesu optimizacije mobilnih faza bili su analitičkog stepena čistoće. Na celulozi i RP-18 stacionarnoj fazi korišćene su trokomponentne smeše rastvarača, dok su na silika gelu primenjene tro- i četvorokomponentne smeše rastvarača. Nanošenje uzoraka na stacionarnu fazu predstavlja početni korak prilikom HPTLC analize i u značajnoj meri utiče na preciznost i kvalitet dobijenih rezultata. U zavisnosti od faze optimizacije, aplikacija uzoraka na stacionarnu fazu rađena je ručno ili automatski pomoću CAMAG Linomat 5 (**Slika 13a**). U cilju postizanja boljeg razdvajanja zona i vizualizacije antocijaninskih zona na hromatogramima, primenjene su različite zapremine ekstrakata ploda, od 2  $\mu$ L do 20  $\mu$ L. Ploče su razvijane u vertikalnoj hromatografskoj kadi zasićenoj parama rastvarača odgovarajuće mobilne faze, prilagođavajući vreme razvijanja specifičnostima pojedinačnih hromatografskih sistema, nakon čega su osušene fenom. Dobijeni hromatogrami su skenirani pomoću CAMAG TLC Scanner 3 (**Slika 13b**), pri čemu je snimanje izvedeno na talasnoj dužini od 510 nm koristeći D2W izvor svetlosti (deuterijumova i halogen-volframova lampa).



Slika 13. a) CAMAG Linomat 5 i b) CAMAG TLC Scanner 3.

#### UHPLC-LTQ OrbiTrap XL

U metanolnim ekstraktima plodova gajenih jagodastih i samoniklih vrsta voćaka određen je profil antocijanina primenom tečnog hromatografskog sistema povezanog sa orbitrap hibridnim masenim spektrometrom (UHPLC-LTQ OrbiTrap XL), čije su karakteristike opisane u odeljku 3.4.2. Odvajanje pojedinačnih antocijanina izvršeno je na *Hypersil gold C18* ( $100 \times 2,1$  mm,  $1,9 \mu\text{m}$ ) koloni (Thermo Fisher Scientific), dok se mobilna faza sastojala od (A) 1% vodenog rastvora mravlje kiseline i (B) acetonitrila. Korišćen je linearni gradijent: 0,0–2,0 min 5% B, 2,0–12,0 min od 5% do 95% (B), 12,0–12,2 min od 95% do 5% (B), zatim 5% (B) tokom 3 min. Maseni spektrometar je bio u pozitivnom režimu jonizacije, a parametri jonskog izvora bili su sledeći: izvor napona 4,5 kV, kapilarni napon 40 V, napon sočiva 80 V, temperatura kapilara  $300 \text{ }^\circ\text{C}$ , protok glavnog i pomoćnog gasa ( $\text{N}_2$ ) 25 i 5 (proizvoljne jedinice). Koliziona energija ćelije postavljena je na 30 eV. MS spektri su snimljeni punim opsegom od  $m/z$  opsega 50–1000. Zapremina injektovanja bila je  $5 \mu\text{L}$ , a protok je iznosio  $0,3 \text{ mL/min}$ . Identifikacija jedinjenja u uzorcima obavljena je na osnovu analize njihovih masenih spektara, tačne mase, karakterističnih fragmentacija i specifičnog vremena zadržavanja, uz korišćenje *Xcalibur* softvera (verzija 2.1) za upravljanje instrumentima, akviziciju podataka i analizu.

#### 3.4.5. Određivanje sadržaja šećera u plodu gajenih voćnih vrsta primenom jonske hromatografije

Uzorci smrznutih plodova gajenih jagodastih vrsta voćaka (1 g) pomešani su sa ultračistom vodom do zapremine od 100 mL i homogenizovani u ultrazvučnom kupatilu 30 minuta na  $40 \text{ }^\circ\text{C}$ . Ekstrakti su centrifugirani, a alikvot (1,0 mL) je razblažen do 50 mL sa ultračistom vodom. Nakon toga, ekstrakt je filtriran kroz filter od  $0,45 \mu\text{m}$  i prebačen u viala za autosempler.

Sadržaj šećera (glukoze, fruktoze i saharoze) u plodu gajenih jagodastih vrsta voćaka određen je prema metodi opisanoj u literaturi (Kubola *i sar.* 2011), uz izvesne modifikacije. Imajući u vidu da su karakteristike korišćene kolone i primenjen sistem detekcije bili drugačiji u odnosu na proceduru opisanu u literaturi, bilo je neophodno optimizovati i prilagoditi mobilnu fazu i brzinu protoka mobilne faze. Odvajanje i kvantifikacija ugljenih hidrata prethodno pripremljenih ekstrakata izvršena je korišćenjem jonskog hromatografa *Dionex ICS 3000* (Dionex, Sunnyvale, CA, USA) koji sadrži pumpu sa dvostrukim gradijentom (Slika 14). Razdvajanje ugljenih hidrata je urađeno na *CarboPac PA-100* hidroksid-selektivnoj anjon-izmenjivačkoj koloni ( $4 \times 250$  mm) sa *CarboPac PA-100 GUARD* pretkolonom ( $4 \times 50$  mm), koja dodatno uklanja nečistoće. Uzorci su injektovani primenom *Dionex ICS AS-DV 50* autosamplera. Brzina protoka je bila  $0,7 \text{ mL/min}$ , a ugljeni hidrati su detektovani elektrohemijjskim detektorom sa zlatnom radnom elektrodom i Ag/AgCl referentnom elektrodom. Vreme analize je bilo 30 min. Ugljeni hidrati su eluirani gradijentom pripremljenim od 600 mM natrijum-hidroksida (eluent A), 500 mM natrijum-acetata (eluent B) i ultračiste vode (eluent C). Sistem je, pre analize, bio kondicioniran sa 15% A, 85% C, tokom 15 minuta. Eluent A je bio konstantan (15%) tokom 20 minuta i povećan na 20% za 20 minuta, eluent B se promenio od 0 do

20%, a eluent C se promenio sa 85 na 60% (**Tabela 5**). Tokom hromatografije, eluenti su bili pod strujom He, a mobilna faza je pročišćena He da bi se minimizirala kontaminacija karbonatom, što bi uticalo na vreme zadržavanja i selektivnost odvajanja šećera. Standardni rastvori glukoze, fruktoze i saharoze koji su pripremljeni sa ultračistom vodom, korišćeni su za kvantifikaciju ugljenih hidrata. Za kontrolu instrumenta, akviziciju i analizu podataka korišćen je softverski paket *Chromeleon* (verzija 6.80). Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti triplikata izraženi kao mg šećera po g smrznutog uzorka.



**Slika 14.** DIONEX ICS 3000 DP jonski hromatograf.

**Tabela 5.** Prikaz gradijentnog eluiranja rastvarača (A) 600 mM natrijum-hidroksida, (B) 500 mM natrijum-acetata i (C) ultračiste vode.

Retenciono vreme (min)	Protok (mL/min)	%A	%B	%C
-15,0	0,7	15,0	0,0	85,0
0,0	0,7	15,0	0,0	85,0
5,0	0,7	15,0	0,0	85,0
5,1	0,7	15,0	2,0	83,0
12,0	0,7	15,0	2,0	83,0
12,1	0,7	15,0	4,0	81,0
20,0	0,7	15,0	4,0	81,0
20,1	0,7	20,0	20,0	60,0
30,0	0,7	20,0	20,0	60,0

### 3.4.6. Određivanje sadržaja minerala u plodu gajenih voćnih vrsta primenom ICP-OES

Uzorci smrznutih plodova gajenih jagodastih voćaka pripremljeni su mikrotalasnom digestijom korišćenjem mikrotalasnog sistema *Ethos 1 (Advanced Microwave Digestion Sistem, Milestone, Italija)*, sa rotorom *HRP-1000/10S (Slika 15)*. U mikrotalasn timerne teflonske kivete (politetrafluoroetilen kivete) odmereno je oko 1 g uzorka, 1,0 mL 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i 7,0 mL 65% HNO<sub>3</sub>. Mikrotalasna digestija pripremljene smeše izvedena je na 200 °C tokom 20 minuta, pri čemu je snaga generatora bila 1100 W. Nakon toga, uzorci su ohlađeni na sobnu temperaturu, kvantitativno

prebačeni u normalne sudove od 25 mL, razblaženi sa ultračistom vodom i odloženi u frižider na 4 °C do analize. Na isti način je pripremljena slepa proba. Za pravljenje standardnih rastvora za kalibraciju instrumenta korišćena su tri multielementna standarda, i to: *EPA Method standard I* (10 mg/L Al, Ag, As, Ba, Be, Cd, Co, Cr, Cu, Zn, Mn, Mo, Ni, Pb, Sb, Se, Th, TL, V), *EPA Method standard II* (5 mg/L Cl, 1 mg/L C, 500 mg/L Al, Ca, Fe, K, Mg, Na, P, S) i *Multi-Element Plasma Standard Solution 4, Specpure®*.



**Slika 15.** Mikrotalasna pećnica *Ethos 1* (*Advanced Microwave Digestion Sistem*).

Sastav mikro- i makroelemenata određen je u triplicatu, primenom indukovano spregnute plazme povezane sa optičkim emisionim spektrometrijom ICP-OES (*iCAP 6500 Duo ICP*, Thermo Fisher Scientific, Kembridž, UK). Instrument je opremljen *RACID86 Charge Injector Device* detektorom, kvarcnim injektorom, koncentričnim raspršivačem, ciklonskom sprej komorom i kvarcnim plamenikom (**Slika 16**). Optički sistem očišćen je strujom argona, a *Echelle* polihromator termostatiran na 38 °C. ICP ima mogućnost snimanja istog elementa na više talasnih dužina, te je ova karakteristika iskorišćena i za svaki element odabrana je je po jedna emisiona linija koja je spektroskopski bila najoptimalnija za dati matriks (**Tabela 6**). U istoj Tabeli prikazani su i uslovi rada instrumenta, koji su optimizovani tako da se dobije zadovoljavajuća preciznost i osetljivost. Softver *iTeva* je korišćen za kontrolu instrumenta, snimanje i analizu podataka. Rezultati su izraženi kao mg elementa po kg smrznutog uzorka (mg/kg).



**Slika 16.** ICP-OES, model *iCAP 6500 Duo*.

**Tabela 6.** Uslovi rada instrumenta ICP-OES.

Parametar	Vrednost
Snaga radiofrekventnog generatora (RF)	1150 W
Orijentacija plazme	Aksijalna
Raspršivač	Koncentrični
Komora za raspršivanje	Ciklonska
Centralna keramička cev	2 mm
Noseći gas	Argon
Protok nosećeg gasa za hlađenje	12 L/min
Protok argona u raspršivaču	0,5 L/min
Protok argona za formiranje plazme	0,5 L/min
Vreme ispiranja	30 s
Broj obrtaja pumpe tokom analize	50 rpm
Brzina protoka uzorka	1 mL/min
Izabrane talasne dužine	Al (394,4); As (189,0); Ca (431,9); Cd (214,4); Co (228,6); Cr (283,5); Cu (324,8); Fe (240,5); K (404,7); Li (670,8); Mg (285,2); Mn (257,6); Mo (202,0); Na (818,3); Ni (231,6); P (178,3); Pb (217,0); S (180,7); Sb (206,8); Se (196,1); V (292,4); Zn (213,9)

### 3.5. Statistička obrada rezultata

Svi rezultati u okviru naših istraživanja prikazani su kao srednja vrednost merenja  $\pm$  standardna devijacija (SD). Takijev test (*Tukey's test*) je primenjen za utvrđivanje statistički značajne razlike ( $p \leq 0.05$ ) između ispitivanih uzoraka i urađen je u NCSS programu ([www.ncss.com](http://www.ncss.com)). Takijev test se zasniva na analizi homogenosti varijabiliteta između dva nezavisna skupa podataka, pri čemu zahteva da razlika između njihovih medijana nije značajno velika. Za utvrđivanje sličnosti i razlika između ispitivanih uzoraka, kao i ispitivanje uticaja geografskog i biološkog porekla na hemijski sastav ispitivanih uzoraka, korišćena je analiza glavnih komponentata (*Principal Component Analysis*, PCA). Analiza glavnih komponentata (PCA) urađena je pomoću PLS\_Tool Box softverskog paketa za MATLAB (Version 7.12.0).

## 4. REZULTATI I DISKUSIJA

### 4.1. Analiza bioaktivnih jedinjenja ploda i lista gajenih i samoniklih voćnih vrsta

Proučavanje prirodnih proizvoda predstavlja složenu naučnu oblast koja istražuje biljne materijale na različitim nivoima, od detaljne analize njihovog kvaliteta do razumevanja načina njihovog delovanja u organizmu. Proučavanje bioaktivnih komponenata zahteva razvoj raznovrsnih tehnika i metoda ekstrakcije, koje omogućavaju selektivno izdvajanje i koncentrisanje bioaktivnih supstanci prisutnih u biljkama. Zahvaljujući svojoj specifičnoj raspodeli i ulozi u biljnom materijalu, fenolna jedinjenja su se pokazala kao korisni markeri za identifikaciju biljnih vrsta ili geografskog porekla.

U okviru ove doktorske disertacije, urađena je karakterizacija ploda i lista gajenih i samoniklih voćnih vrsta u cilju ispitivanja bioaktivnih jedinjenja. Analiza bioaktivnih jedinjenja je obuhvatila određivanje polifenolnog profila uzoraka plodova i listova gajenih jagodastih voćnih vrsta, kao i kvantifikaciju fenolnih jedinjenja u svim ispitivanim uzorcima. Takođe, određen je sadržaj ukupnih polifenola, antocijanina i antioksidativni kapacitet.

#### 4.1.1. Sadržaj ukupnih polifenola i antioksidativni kapacitet u plodu i listu gajenih i samoniklih voćnih vrsta

##### *Analiza ploda gajenih jagodastih voćnih vrsta*

Prema ranijim istraživanjima, za ekstrakciju polifenolnih jedinjenja iz jagodastih voćnih vrsta koriste se rastvarači poput vode, metanola, etanola i acetona, kao i njihove smeše sa vodom (Ye i Neilson 2016). S druge strane, preporuka je da se ekstrakcija izvodi u kiseloj sredini zbog veće stabilnosti fenolnih jedinjenja pri niskim pH vrednostima. U cilju razvoja optimalne ekstrakcije bioaktivnih jedinjenja iz uzoraka plodova gajenih jagodastih vrsta voćaka, na početku ovog istraživanja primenjena su dva različita ekstrakciona sredstva, metanol i aceton sa 1% hlorovodoničnom kiselinom. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom primenjena je zbog brojnih prednosti: kraće vreme ekstrakcije, manja količina rastvarača i analiza više uzoraka istovremeno. U analiziranim uzorcima plodova gajenih jagodastih vrsta voćaka, za svaku ekstrakcionu metodu su određeni ukupan sadržaj polifenola (TPC) i sposobnost neutralizacije slobodnih DPPH radikala (RSA). Evidentna razlika između dva primenjena ekstrakciona sistema prikazana je u **Tabeli 7**. Statistička značajnost razlika potvrđena je korišćenjem uporednog  $t$  - testa sa sledećim  $t$  vrednostima: 3,908 i 3,007 za TPC i RSA, redom ( $t_{\text{kritično}} = 2,306$ ,  $p < 0,05$ ). Rezultati za TPC izraženi su kao mg ekvivalenta galne kiseline (GAE) po g smrznutog uzorka, dok su RSA vrednosti izražene kao procenat izreagovalog DPPH radikala (%).

**Tabela 7.** Sadržaj ukupnih polifenola (TPC) i sposobnost neutralizacije DPPH radikala (RSA) u plodu gajenih jagodastih voćnih vrsta.

Uzorak	TPC <sup>a</sup>		RSA <sup>b</sup>	
	Acetonski ekstrakt	Metanolni ekstrakt	Acetonski ekstrakt	Metanolni ekstrakt
<b>Malina</b>				
Willamette (Arilje)	3,25 ± 0,00	2,71 ± 0,05	0,63 ± 0,02	0,62 ± 0,01
Willamette (Zlatibor)	2,90 ± 0,06	2,72 ± 0,82	0,61 ± 0,04	0,65 ± 0,01
Willamette (Valjevo)	2,81 ± 0,01	2,79 ± 0,02	0,65 ± 0,05	0,57 ± 0,01
Meeker	3,34 ± 0,05	2,44 ± 0,11	0,66 ± 0,02	0,63 ± 0,01
Yellow Meeker	3,68 ± 0,04	3,18 ± 0,01	0,37 ± 0,01	0,32 ± 0,01
Tulameen	2,45 ± 0,02	2,43 ± 0,05	0,58 ± 0,01	0,54 ± 0,05
<b>Kupina</b>				
Čačanska bestrna	4,60 ± 0,16	3,75 ± 0,01	0,68 ± 0,00	0,66 ± 0,04
<b>Dud</b>				
<i>Morus nigra</i>	1,77 ± 0,10	1,35 ± 0,01	0,59 ± 0,03	0,54 ± 0,01
<b>Jagoda</b>				
Clery	2,81 ± 0,02	2,48 ± 0,01	0,36 ± 0,01	0,31 ± 0,01

<sup>a</sup>TPC je izražen kao mg GAE/g smrznute mase uzorka. <sup>b</sup>RSA je izražena u procentima.

Pri uporednoj analizi dva organska rastvarača kao ekstrakcionih sredstava, aceton je pokazao bolju efikasnost u ekstrakciji ukupnih polifenola u uzorcima plodova gajenih jagodastih vrsta voćaka. Razmatrajući sve TPC vrednosti dobijene za ekstrakte acetona (**Tabela 7**), očigledno je da je najmanji sadržaj ukupnih polifenola pronađen u plodu duda (1,72 mg GAE/g), dok je ekstrakt ploda kupine imao najveći sadržaj ukupnih polifenola (4,60 mg GAE/g). Količina ukupnih polifenola u plodu maline varirala je od 2,45 (Tulameen) do 3,68 mg GAE/g (Yellow Meeker). Iako je ispitivanje acetonskih ekstrakata ploda maline sorte Willamette prikupljenih sa tri različita područja (Valjevo, Arilje i Zlatibor) pokazalo značajnu razliku u TPC vrednostima, istraživanje većeg broja uzoraka bi moglo da ukaže da li se radi o uticaju geografskog porekla na ukupan sadržaj polifenola. Kafkas i saradnici (Kafkas *i sar.* 2008) su u okviru svojih istraživanja ispitivali sadržaj ukupnih polifenola u tri različite sorte maline (Meeker, Willamette, Tulameen). Primena slične procedure ekstrakcije polifenola iz uzoraka dala nam je mogućnost da njihove rezultate uporedimo sa rezultatima našeg istraživanja. Poredeći TPC vrednosti, najveći sadržaj polifenola u našem istraživanju pronađen je u sorti Meeker, slično kao i u pomenutom radu. Međutim, generalno gledano, nešto veći sadržaj ukupnih polifenola pronađen je u našim uzorcima u odnosu na rezultate Kafkas-a i saradnika. U istraživanju sorte Wilamette (Simonovic *i sar.* 2019) iz zapadne Srbije (Čačak) dobijene vrednosti ukupnih polifenola su nešto niže u poređenju sa našim rezultatima. Uzorci istih sorti jagode i kupine sa područja Srbije, ispitivane u drugim studijama, sadržali su slične količine ukupnih polifenola (Simonovic *i sar.* 2019, Karaklajic-Stajic *i sar.* 2023). Analizirani uzorak ploda duda pokazao je značajno niži sadržaj ukupnih polifenola (TPC) u poređenju sa podacima o sadržaju polifenola iz ploda duda koji su prikupljeni iz različitih regiona širom sveta (Memete *i sar.* 2022).

Vrednosti antioksidativnog kapaciteta (RSA) u ispitivanim uzorcima plodova gajenih jagodastih vrsta voćaka prikazani su u **Tabeli 7**. Svi analizirani ekstrakti plodova jagodastih voćnih vrsta pokazali su snažnu sposobnost neutralizacije DPPH radikala. Kao i kod ukupnog sadržaja



polifenola (TPC), uočene su više vrednosti antioksidativnog kapaciteta (RSA) pri upotrebi acetona kao ekstrakcionog sredstva, u poređenju sa metanolom. Ekstrakti ploda kupine pokazali su najvišu vrednost RSA, što je u skladu sa najvećom količinom ukupnih polifenola pronađenom u plodu kupine. Međutim, nije uočena jasna korelacija između ukupnog sadržaja polifenola (TPC) i sposobnosti neutralizacije DPPH radikala (RSA) kada su upoređene TPC i RSA vrednosti dobijene za sve ispitivane uzorke, pri čemu je koeficijent korelacije za acetonske ekstrakte je 0,099, dok je za metanolne ekstrakte 0,076.

#### *Analiza lista gajenih jagodastih voćnih vrsta*

Primenom spektrofotometrijskih metoda, u metanolnim ekstraktima lista tri sorte maline i jedne sorte kupine, određen je sadržaj ukupnih polifenola i antioksidativni kapacitet. Antioksidativni kapacitet je određen primenom nekoliko različitih testova koji određuju sposobnost neutralizacije DPPH radikala (RSA), sposobnost neutralizacije superoksid anjon radikala (SAS), sposobnost heliranja jona gvožđa (FCA) i određivanje redukcionog potencijala (RP). U **Tabeli 8** prikazane su vrednosti sadržaja ukupnih polifenola, kao i rezultati dobijeni za antioksidativni kapacitet. Rezultati TPC su izraženi kao mg GAE/g suve mase lista, vrednosti antoksidativnog kapaciteta (RSA, SAS i FCA) izražene su u procentima (%), dok je RP izražen kao  $\mu\text{mol}$  askorbinske kiseline (AA)/L ekstrakta lista.

**Tabela 8.** Sadržaj ukupnih polifenola (TPC) i antioksidativni kapacitet (RSA, FCA, RP i SAS) u listu gajene maline i kupine (mg/g).

Uzorak	LM1	LM2	LM3	LK
Sorta	Willamette	Meeker	Tulameen	Čačanska Bestrna
Vrsta	<i>Rubus idaeus</i> L.	<i>Rubus idaeus</i> L.	<i>Rubus idaeus</i> L.	<i>Rubus fruticosus</i> L.
TPC	143,38 ± 4,68 <sup>a</sup>	144,20 ± 1,58 <sup>a</sup>	84,64 ± 2,05 <sup>b</sup>	132,90 ± 3,33 <sup>c</sup>
RSA	66,78 ± 1,98 <sup>c</sup>	72,55 ± 1,13 <sup>b</sup>	38,05 ± 2,51 <sup>d</sup>	83,77 ± 0,91 <sup>a</sup>
FCA	4,08 ± 0,26 <sup>b</sup>	2,76 ± 0,09 <sup>c</sup>	1,55 ± 0,11 <sup>d</sup>	8,86 ± 0,32 <sup>a</sup>
RP	59,74 ± 10,80 <sup>b</sup>	92,80 ± 1,87 <sup>a</sup>	77,14 ± 6,73 <sup>ab</sup>	71,62 ± 11,68 <sup>b</sup>
SAS	39,87 ± 4,02 <sup>a</sup>	39,15 ± 2,65 <sup>a</sup>	28,43 ± 3,05 <sup>b</sup>	36,22 ± 1,98 <sup>a</sup>

Različita slova u istoj koloni ukazuju na značajnu razliku prema Takijevom (Tukey) testu,  $p < 0,05$ .

Na osnovu rezultata može se zapaziti da su najviše vrednosti sadržaja ukupnih polifenola pronađene u listu maline sorte Meeker (144,20 mg GAE/g suve mase) i sorte Willamette (143,38 mg GAE/g suve mase), dok je najniža TPC vrednost određena u sorti Tulameen (84,64 mg GAE/g suve mase). Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa ranije objavljenim istraživanjima (Wang i Lin 2000), ali su značajno viši u odnosu na rezultate novijih istraživanja (Luo *i sar.* 2020). Ispitivanje sadržaja ukupnih polifenola u listu gajenih, organskih i samoniklih genotipova malina sa područja Poljske, pokazala su TPC vrednosti za list gajene i organske maline koje su bile niže u odnosu na naše rezultate, dok su TPC vrednosti za list samonikle maline nešto viši od naših rezultata (96,76 mg GAE/g suve mase) (Kotula *i sar.* 2022). U metanolnom ekstraktu lista gajene kupine, sorte Čačanska bestrna, takođe je zapažen visok sadržaj ukupnih polifenola (132,90 mg GAE/g suve mase), što je značajno više u odnosu na TPC vrednosti dobijene analizom lista iste sorte koju su ispitivali Kolarević i saradnici (Kolarević *i sar.* 2021).

Svi ispitivani ekstrakti listova pokazali su značajnu sposobnost neutralizacije DPPH<sup>•</sup>, pri čemu su najviše vrednosti zabeležene u sorti kupine Čačanska bestrna (RSA = 83,77%). Međutim,

ekstrakti listova svih analiziranih vrsta pokazali su slabu sposobnost heliranja jona gvožđa (FCA), sa vrednostima koje su varirale od 1,55% (sorta maline Tulameen) do 8,86% (sorta kupine Čačanska bestrna). Najviše vrednosti redukcionog potencijala (RP) su zabeležene kod sorti *Rubus idaeus* (Meeker i Tulameen), što odgovara vrednostima 92,80  $\mu\text{mol AA/L}$  i 77,14  $\mu\text{mol AA/L}$ , redom. Takođe, visoke RP vrednosti su određene kod sorte kupine Čačanska bestrna i sorte maline Willamette. Što se tiče sposobnosti neutralizacije superoksid anjon radikala, SAS vrednosti su bile u opsegu od 28,43% (sorta maline Tulameen) do 39,87% (sorta maline Willamette). Najviše vrednosti su zabeležene kod sorti Willamette i Meeker, koje su pokazale najveći potencijal među sortama maline.

Korelacija između TPC, RSA, FCA, RP i SAS vrednosti ispitane su pomoću Pirsonove korelacione analize (**Tabela 9**). Značajna korelacija pronađena između TPC i SAS ( $r = 0,991$ ,  $p < 0,01$ ) ukazuje da polifenoli doprinose neutralisanju superoksid anjon radikala. Međutim, slaba korelacija između TPC i sposobnosti heliranja jona gvožđa (FCA), kao i odsustvo korelacije između TPC i RP, sugerišu da drugi fitohemijski sastojci takođe mogu doprineti antioksidativnom kapacitetu.

**Tabela 9.** Korelacija između TPC, RSA, FCA, RP, i SAS.

	TPC	RSA	FCA	RP	SAS
TPC	1				
RSA	0,856	1			
FCA	0,418	0,789	1		
RP	-0,046	-0,018	-0,344	1	
SAS	<b>0,991*</b>	0,781	0,320	-0,092	1

\* $p < 0,01$

#### *Analiza ploda samoniklih voćnih vrsta*

U metanolnim ekstraktima plodova samoniklih vrsta voćaka, uključujući 7 uzoraka zove (ZO1 - ZO7), 10 uzoraka drena (DR1 - DR10), 5 uzoraka crnog trna (TR1 - TR5) i 4 uzorka gloga (GL1 - GL4), određen je sadržaj ukupnih polifenola (TPC) i antioksidativni kapacitet. Antioksidativna svojstva ispitivanih ekstrakata procenjena su kroz različite spektrofotometrijske testove: RSA (određivanje sposobnosti neutralizacije DPPH radikala), FCA (određivanje sposobnosti heliranja jona gvožđa), RP (određivanje redukcionog potencijala), NO (određivanje sposobnosti neutralizacije NO radikala) i AT (određivanje antitirozinazne aktivnosti). Rezultati TPC su izraženi kao mg GAE/g smrznute mase ploda, RSA kao mM troloks ekvivalent (TE)/mL ekstrakta ploda, RP kao vrednost apsorpcije na 700 nm, dok su rezultati NO, FCA i AT testa izraženi u procentima (%).

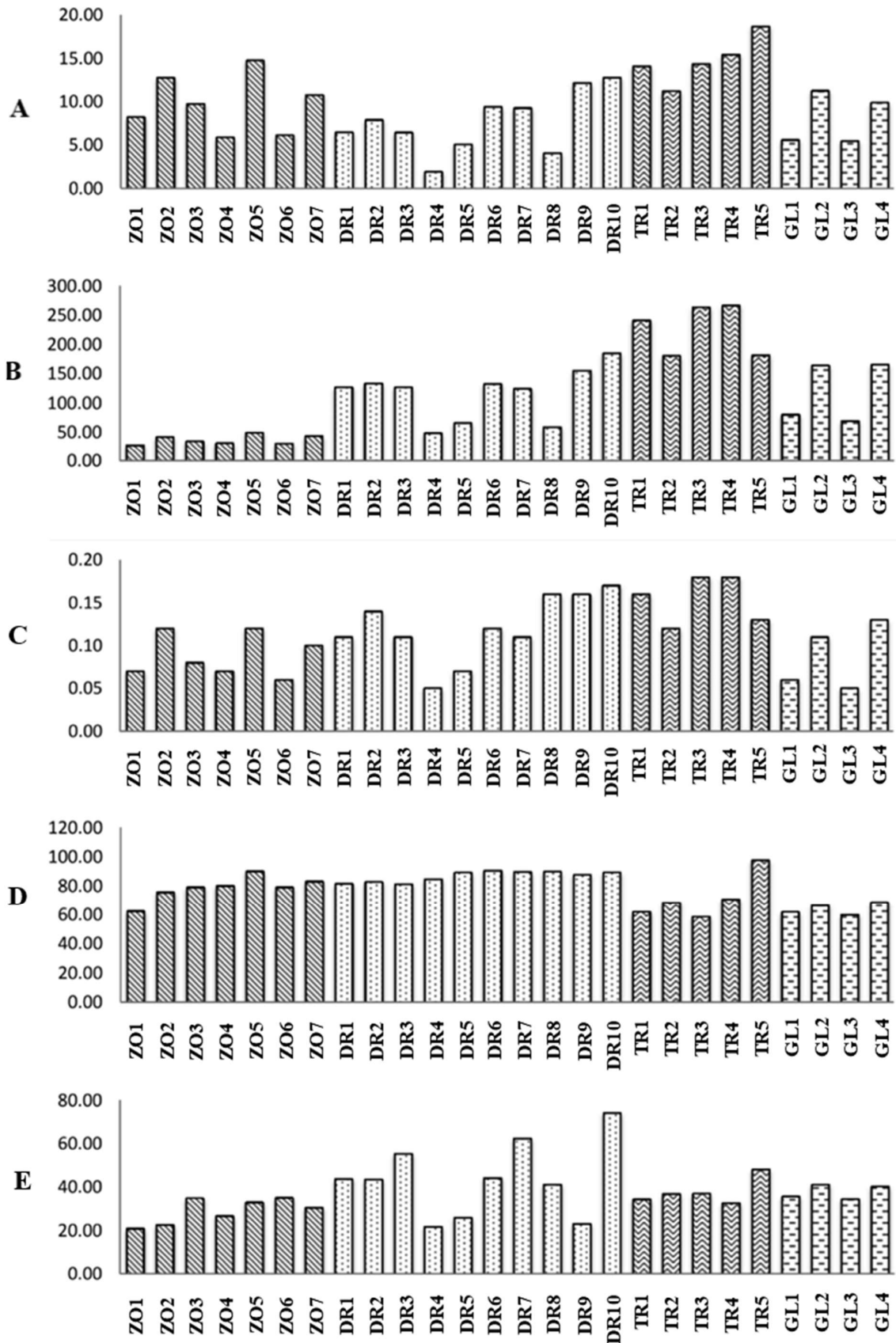
Rezultati sadržaja ukupnih polifenola (TPC) ispitivanih ekstrakata plodova samoniklih voćnih vrsta prikazani su na **Slici 17**. Ekstrakti ploda samoniklog crnog trna imali su najviše TPC vrednosti pokazujući prosečan sadržaj od 14,77 mg GAE/g smrznute mase uzorka, što je znatno više u poređenju sa uzorcima crnog trna iz Turske (Ozzengin *i sar.* 2023). U uzorcima ploda samoniklog drena prosečna TPC vrednost od 7,55 mg GAE/g predstavljala je najniži prosečan sadržaj ukupnih polifenola u četiri vrste ispitivanih uzoraka. Dobijene TPC vrednosti za plod samoniklog drena neznatno su više od onih koji su nađeni u uzorcima sakupljeni sa različitih regiona Irana, Turske i Crne Gore (Hashempour *i sar.* 2010, Güzel 2021, Blagojevic *i sar.* 2023), ali su znatno niže od rezultata dobijenih za uzorke iz Bosne i Hercegovine (Skender *i sar.* 2022). Ova varijabilnost potvrđuje potrebu za daljim istraživanjima među domaćim populacijama samoniklog drena kako bi se izdvojile biljke čiji plodovi imaju najveći antioksidativni potencijal. Plod samoniklog gloga je pokazao TPC vrednosti u rasponu od 5,45 mg GAE/g do 11,27 mg GAE/g, odnosno prosečnu

vrednost veću od one objavljene u istraživanju Rezaei-Golmisheh i saradnika (Rezaei-Golmisheh *i sar.* 2015). Nasuprot našim rezultatima, Šamec i saradnici su detektovali više vrednosti TPC za plod samoniklog gloga nego za plod samoniklog drena (Šamec i Piljac-Žegarac 2011). Dakle, možemo zaključiti da su dobijeni rezultati delimično u saglasnosti sa podacima prikazanim u literaturi za različite plodove samoniklih voćnih vrsta, s obzirom da polifenolni profili zavise od genotipa biljke, biljnog organa (plod, list, koren), uslova životne sredine, kao i od metode ekstrakcije i rastvarača.

Analizirajući antioksidativne testove, ekstrakti ploda crnog trna su se istakli kao najefikasniji u neutralizaciji DPPH radikala, sa prosečnom RSA vrednošću od 227,08 mM TE/mL. Za njima slede ekstrakti ploda samoniklog drena (115,96 mM TE/mL) i gloga (119,89 mM TE/mL), dok su ekstrakti ploda zove pokazali najmanju aktivnost (37,13 mM TE/mL). Izuzetna aktivnost ekstrakta ploda crnog trna u sposobnosti neutralisanja DPPH radikala može se pripisati visokom sadržaju TPC-a, ali i visokim vrednostima redukcionog potencijala (RP). Nasuprot tome, u svim ispitivanim uzorcima plodova samoniklih vrsta voćaka nije detektovana aktivnost u neutralisanju NO radikala, što je suprotno literaturnim podacima za svež plod zove i sok od zove (Vujanović *i sar.* 2020, Radojković *i sar.* 2021).

Ekstrakti plodova samoniklih vrsta voćaka su se pokazali kao dobri inhibitori enzima tirozinaze, čije su vrednosti bile u opsegu od 20,90 do 74,23%. Uzorci ploda drena su imali najveću sposobnost u procesu smanjenja prekomerne aktivnosti tirozinaze, osim ekstrakata DR4, DR5 i DR9 koji su pokazali vrednosti slične onima koji su nađeni u uzorcima ploda zove. Uzorci ploda crnog trna i gloga imali su prosečni inhibitorni potencijal na smanjenje enzimske aktivnosti. Sposobnost inhibicije tirozinaze je značajna, jer tirozinaza igra ključnu ulogu u procesu stvaranja melanina kod ljudi, a takođe je važna i u razvojnim procesima insekata. Stoga bi prirodni inhibitori tirozinaze mogli biti korisni u prehrambenoj industriji kao dodatak hrani i u kozmetičkoj industriji, kao sredstvo za izbeljivanje kože. Na osnovu rezultata inhibicije prekomerne aktivnosti enzima tirozinaze, možemo zaključiti da plodovi samoniklih vrsta voćaka mogu biti korisni kao prirodni inhibitori, što ih čini potencijalnim sastojcima za razvoj novih proizvoda za zaštitu kože. Ispitivani ekstrakti plodova samoniklih vrsta voćaka pokazali su sposobnost heliranja jona gvožđa (FCA) u rasponu od 58,81% do 97,68%, sa sledećim redosledom: DR > ZO > TR > GL (**Slika 17**). U ekstraktima ploda samoniklog drena prosečna vrednost sposobnosti heliranja jona gvožđa bila je 86,75%. U uzorcima ploda drena sa područja Turske nije pronađena sposobnost heliranja metala, dok su isti uzorci pokazali dobar redukcionni potencijal prema jonima gvožđa i bakra (Celep *i sar.* 2012). Na osnovu ovih podataka zaključeno je da ekstrakti sa izraženim redukcionim potencijalom ne moraju nužno imati i dobru sposobnost heliranja jona metala. Međutim, dobijeni rezultati pokazuju da ekstrakti ploda drena imaju dobru sposobnost da heliraju jone metala, ali i sposobnost redukcije jona metala. Važno je istaći da su ekstrakti drena, koji su pokazali najveću sposobnost heliranja jona gvožđa, takođe pokazali najvišu aktivnost tirozinaze. Ovaj rezultat je u saglasnosti sa prethodnim saznanjima o važnosti sposobnosti heliranja jona metala u kontekstu inhibicije tirozinaze (Kubo *i sar.* 2000).

Na osnovu podataka prikazanih na **Slici 17** može se uočiti da ekstrakti iste biljne vrste pokazuju različite antioksidativne aktivnosti, što je često uobičajeno s obzirom na varijacije u fitohemijskim profilima među pojedinačnim uzorcima, a posledica je različitog mikrolokaliteta gde su biljke rasle. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa ranijim istraživanjima (Cosmulescu *i sar.* 2017), gde su prikazane razlike u sadržaju ukupnih polifenola, ukupnih flavonoida, pojedinačnih fenolnih jedinjenja, minerala i vrednostima antioksidativnog kapaciteta ekstrakata plodova sedam samoniklih vrsta (*Crataegus monogyna* Jacq., *Prunus spinosa* L., *Rosa canina* L., *Hippophaë rhamnoides* L., *Rubus fruticosus* L., *Prunus padus* i *Cornus mas* L.).



Slika 17. Grafički prikaz sadržaja ukupnih polifenola (A) i antioksidativnog kapaciteta uzoraka plodova samoniklih voćnih vrsta primenom različitih testova RSA (B), RP (C), FCA (D) i AT (E).

#### 4.1.2. Polifenolni profil ploda i lista gajenih i samoniklih voćnih vrsta

Za analizu polifenolnog profila uzoraka plodova i listova gajenih jagodastih voćnih vrsta korišćeni su metanolni ekstrakti, a za identifikaciju pojedinačnih polifenola korišćen je UHPLC-LTQ OrbiTrap XL u negativnom jonizacionom modu. Nakon tečne hromatografije i detekcije pomoću masene spektrometrije visoke rezolucije, identifikacija pikova zasnivala se na dostupnim standardima ili ranije objavljenim hromatografskim i MS/MS podacima. MS/MS detekcija pruža važne strukturne informacije o molekulskoj masi i molekulskoj formuli fragmenata. Visoka tačnost pri određivanju  $m/z$  vrednosti, koja se ogleda u maloj razlici između posmatranih i teorijskih vrednosti ( $< 3$  ppm), omogućila je predviđanje molekulskih formula ciljanih jedinjenja. Svi ovi podaci, zajedno sa retencionim vremenom ( $t_R$ ) i prethodno objavljenim  $m/z$  vrednostima za fenolne kiseline i flavonoide, bili su dovoljni za pregled i identifikaciju komponenti ekstrakata sa visokim stepenom sigurnosti.

Rezultati UHPLC-LTQ OrbiTrap XL analize uzoraka plodova i listova gajenih jagodastih voćnih vrsta pokazali su značajnu varijabilnost u pogledu polifenolnog profila.

##### *Analiza ploda gajenih jagodastih voćnih vrsta*

Rezultati masene spektrometrije devet uzoraka plodova gajenih jagodastih vrsta voćaka pokazali su prisustvo 35 polifenola. Identifikovane su fenolne kiseline i njihovi derivati, kao i flavonoidi u aglikonskom obliku i obliku glikozida. Jedinjenja identifikovana unutar grupe flavonoida klasifikovana su u tri klase: flavonoli, flavoni i flavanoni. U okviru klase flavonola nađeno je 13 jedinjenja, od čega su četiri pripadala su grupi flavona, a identifikovan je i jedan flavonon. Takođe, identifikovana je i *cis,trans*-apscisinska kiselina, koja predstavlja biljni hormon. Iako ne pripada klasi fenolnih jedinjenja, *cis,trans*-apscisinska kiselina je obuhvaćena u okviru ovog istraživanja jer ima ulogu u metabolizmu polifenola i biosintezi antocijanina (Karppinen *i sar.* 2018). Retenciono vreme ( $t_R$ ), izračunata masa osnovnog jona (dobijena primenom hemijske baze podataka, ChemSpider), nađena masa osnovnog jona, MS/MS fragmenti za svako identifikovano jedinjenje i njihova raspodela u ekstraktima plodova gajenog jagodastih voćnih vrsta prikazani su u **Tabeli 10**. Strukture identifikovanih aglikonskih oblika fenolnih kiselina, flavonoidi i *cis,trans*-apscisinske kiseline prikazane su na **Slici 18**.

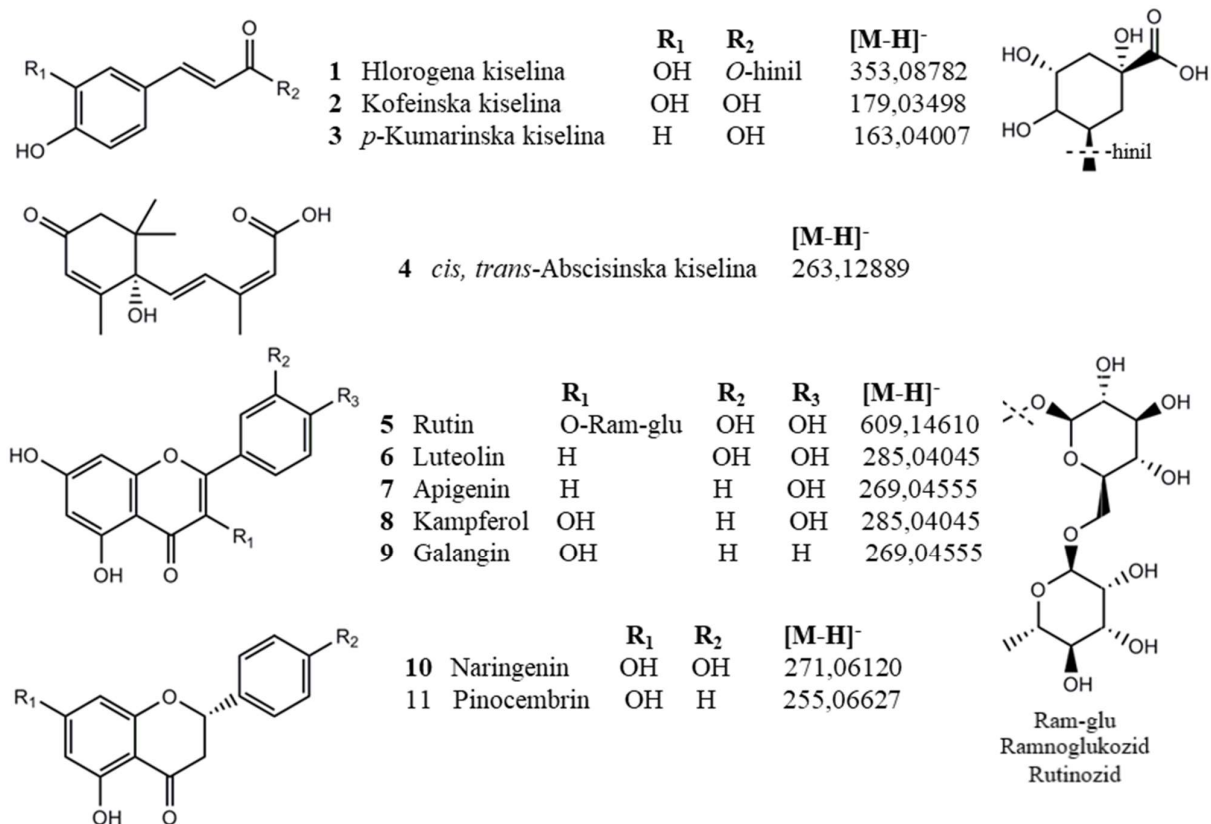
**Tabela 10.** Identifikovana fenolna jedinjenja i *cis,trans*-apscisinska kiselina u plodu gajenih jagodastih voćnih vrsta primenom UHPLC-MS/MS OrbiTrap XL.

Redni broj	Identifikovana jedinjenja	t <sub>R</sub> , min	Izračunata masa, [M-H] <sup>-</sup>	Nadena masa, [M-H] <sup>-</sup>	Fragmenti	Uzorci ploda gajenih jagodastih voćnih vrsta <sup>c</sup>
1	Galna kiselina <sup>a</sup>	0,72	169,0142	169,0136	125,02	Svi uzorci
2	<i>p</i> -Hidroksibenzoil-heksozid <sup>b</sup>	0,94	299,0771	299,0773	137,02; 179,03; 239,09	M1, M2, M3, M4, M5, M6, K, J
3	Protokatehinska kiselina <sup>a</sup>	1,13	153,0192	153,0188	109,03	Svi uzorci
4	Kvercetin 3- <i>O</i> -heksozid <sup>b</sup>	1,43	463,0882	463,0884	179,03	Svi uzorci
5	<i>p</i> -Hidroksibenzoil-heksozid <sup>b</sup>	1,51	299,0771	299,0773	137,02; 179,03; 239,09	M1, M2, M3, M4, M5, M6, K, J
6	Kofeoil-heksozid <sup>b</sup>	1,52	341,0874	341,0877	179,03	Svi uzorci
7	Hlorogena kiselina <sup>a</sup>	1,54	353,0878	353,0876	179,03; 191,02	M2, K, D
8	Kumaroil-heksozid <sup>b</sup>	1,62	325,0929	325,0930	163,04	M1, M2, M3, M4, M5, M6, K, J
9	Kofeinska kiselina <sup>a</sup>	1,67	179,0350	179,0351	161,04	Svi uzorci
10	Kofeoil-heksozid <sup>b</sup>	1,77	341,0874	341,0877	179,03	M1, M2, M3, M4, M6
11	Galoil-bis-HHDP-glukoza <sup>b</sup>	1,88	935,0783	935,0782	301,00; 433,04; 783,07	M1, M2, M3, M4, M5, K, J
12	Elagoil-pentozid <sup>b</sup>	1,94	433,0408	433,0414	301,00	M1, M2, M3, M4, M5, M6, K, J
13	<i>p</i> -Kumarinska kiselina <sup>a</sup>	2,01	163,0401	163,0404	119,00	M1, M2, M3, M4, M5, M6, K, J
14	Rutin <sup>a</sup>	2,04	609,1461	609,1459	301,03	M3, M4, M5, K, D, J
15	Kumaroil-heksozid <sup>b</sup>	2,04	325,0929	325,0930	163,04	M1, M2, M3, M4, M5, M6, S
16	Elaginska kiselina <sup>a</sup>	2,06	300,9984	300,9992	257,01	M1, M3, M4, M5, B, S
17	Kvercetin 3- <i>O</i> -glukuronid <sup>b</sup>	2,10	477,0674	477,0678	301,03	M1, M2, M3, M4, M5, M6, K, J
18	Kvercetin 3- <i>O</i> -heksozid <sup>b</sup>	2,11	463,0882	463,0884	179,03	Svi uzorci
19	Kvercetin 3- <i>O</i> -ksilopiranozid <sup>b</sup>	2,13	433,0772	433,0772	301,03	M1, M2, M3, M6, K, J

Tabela 10. Nastavak.

Redni broj	Identifikovana jedinjenja	t <sub>R</sub> , min	Izračunata masa, [M-H] <sup>-</sup>	Nadena masa, [M-H] <sup>-</sup>	Fragmenti	Uzorci ploda gajenih jagodastih voćnih vrsta <sup>c</sup>
20	Kampferol-heksozid <sup>b</sup>	2,14	447,0928	447,0928	285,04	M1, M2, M3, M5, M6, K, D, J
21	Kvercetin 3- <i>O</i> -ramnozid <sup>b</sup>	2,15	447,0928	447,0932	301,03	M1, M2, M3, M5, M6, K, D, J
22	Feruloil-heksozid <sup>b</sup>	2,18	355,1030	355,1030	193,05	M1, M2, M3, M4, M5, M6, K
23	Elagoil-deoksiheksozid <sup>b</sup>	2,19	447,0564	447,0572	301,00	M1, M2, M3, M4, M5, M6, K, J
24	Sinapoil-heksozid <sup>b</sup>	2,20	385,1136	385,1136	223,05	M1, M2, M3, M4, M5, M6, K, J
25	Kampferol-heksozid <sup>b</sup>	2,25	447,0928	447,0928	285,04	M1, M2, M5, M6, K, D, J
26	Kampferol 3-malonilheksozid <sup>b</sup>	2,35	533,0928	533,0928	285,04; 489,10	D, J
27	Kampferol 3-kumaroilheksozid <sup>b</sup>	2,69	593,1296	593,1304	285,04; 447,09	M5, J
28	Luteolin <sup>a</sup>	2,71	285,0405	285,0406	133,01; 213,02	M1, M3, K, J
29	<i>cis,trans</i> -Apccisinska kiselina <sup>a</sup>	2,74	263,1289	263,1293	201,02; 219,01	Svi uzorci
30	Kampferol 3-kumaroilheksozid <sup>b</sup>	2,75	593,1296	593,1304	285,04; 447,09	M5, K, J
31	Naringenin <sup>a</sup>	2,76	271,0612	271,0601	177,04	M1, M4, M5, M6, K, D, J
32	Apigenin <sup>a</sup>	2,97	269,0455	269,0459	149,05; 183,00	M1, M2, M3, M4, M6, K, J
33	Kampferol <sup>a</sup>	3,03	285,0405	285,0407	161,05	M1, M3, K, D, J
34	Hrizin <sup>a</sup>	3,40	253,0501	253,0495	181,06; 209,06	M1, M2, M3, M4, M5, M6, K, J
35	Pinoembrin <sup>a</sup>	3,68	255,0663	255,0666	211,00; 213,01	M3, M4, M6, K, D, S
36	Galangin <sup>a</sup>	3,71	269,0455	269,0459	183,00; 197,02; 227,06	M2, M3, M5, M6, K, D, S

<sup>a</sup> Potvrđeno pomoću standarda. <sup>b</sup> Potvrđeno na osnovu literature. <sup>c</sup> M1 - malina (Willamette, Arilje); M2 - malina (Willamette, Zlatibor); M3 - malina (Willamette, Valjevo); M4 - malina (Meeker); M5 - malina (Yellow Meeker); M6 - malina (Tulameen); K - kupina (Čačanska bestrna); D - dud; J - jagoda (Clery).



**Slika 18.** Strukture identifikovanih fenolnih kiselina, *cis,trans*-apscisinske kiseline i flavonoida u plodu gajenih jagodastih voćnih vrsta.

#### Identifikacija fenolnih kiselina i njihovih derivata

Podjednak broj hidroksibenzoevih kiselina i njihovih derivata (jedinjenja **1**, **2**, **3**, **5**, **11**, **12**, **16**, **23**) i hidroksicimetnih kiselina i njihovih derivata (jedinjenja **6**, **7**, **8**, **9**, **10**, **13**, **15**, **22**, **24**) identifikovan je u ekstraktima ispitivanih plodova jagodastih vrsta gajenog voća. Od hidroksibenzoevih kiselina, galna (**1**) i protokatehinska kiselina (**3**) su identifikovane u svim analiziranim uzorcima, dok je elaginska kiselina (**16**) bila najzastupljenija u ekstraktima ploda maline (M1, M3, M4, M5), kupine (K) i jagode (J). Elaginska kiselina, kao i ostale hidroksibenzoeve kiseline su identifikovane pomoću standarda. Derivati elaginske kiseline (jedinjenja **12** i **23**) su veoma zastupljeni u analiziranom plodu jagodastih voćnih vrsta. Detektovani su u svim ispitivanim uzorcima, osim u ekstraktu ploda duda. Kofeinska kiselina, najzastupljenija hidroksicimetna kiselina, i njen derivat kofeoil-heksozid (**6**) nađeni su u svim uzorcima plodova gajenih jagodastih vrsta voćaka. Kofeoil-heksozid je identifikovan na osnovu mase osnovnog jona  $m/z$  341 i karakterističnog MS/MS fragmenta  $m/z$  179, koji odgovara masi deprotonovane kofeinske kiseline. Daljom fragmentacijom kofeinske kiseline, nastaje fragment  $m/z$  161 koji ukazuje na gubitak vode (-18 Da). Kada je reč o drugim hidroksicimetnim kiselinama i njihovim derivatima, *p*-kumarinska kiselina i kumaroil-heksozid ( $m/z$  325) su pronađeni u svim uzorcima sa izuzetkom ekstrakta ploda duda. Deprotonovani molekularni jon  $m/z$  325 (**8**) fragmentacijom je formirao MS/MS jon  $m/z$  163 koji je dalje fragmentisan do  $m/z$  119, što pokazuje gubitak ugljen-dioksida iz deprotonovane *p*-kumarinske kiseline. Masena fragmentacija fenolnih kiselina obično se karakteriše gubitkom vode i ugljen-dioksida, pri čemu nastaju fragmenti  $[M-H-18]^-$  odnosno  $[M-H-44]^-$ , što je potvrđeno fragmentacijom kofeinske i *p*-kumarinske kiseline (Van De Velde *i sar.* 2019).



*Identifikacija flavonoida i njihovih glikozida*

Flavonoidi predstavljaju grupu sekundarnih metabolita koji se nalaze u značajnim količinama u jagodastim voćnim vrstama i odgovorni su za različite antioksidativne aktivnosti u biljkama. U analiziranim uzorcima plodova različitih voćnih vrsta među najzastupljenijim flavonoidima izdvojila se klasa flavonola, u okviru koje su identifikovana 3 aglikona (rutin, kampferol i galangin) i 10 glikozidnih derivata kvercetina i kampferola (jedinjenja **4**, **17**, **18**, **19**, **20**, **21**, **25**, **26**, **27**, **30**), što je u saglasnosti sa nedavnim istraživanjem uzoraka maline iz Italije (Renai *i sar.* 2021).

Aglikoni flavonoida se pretežno formiraju putem hidrolize odgovarajućih glikozida, a ključan mehanizam fragmentacije za strukturnu analizu aglikonskog dela flavonoidnih konjugata je retro–*Dils–Alderova* (RDA) reakcija (Demarque *i sar.* 2016). Fragmentacija derivata kvercetina i kampferola karakteriše se raskidanjem glikozidne veze, pri čemu se dobijaju karakteristični aglikonski joni kvercetina ( $m/z$  301) i kampferola ( $m/z$  285). Od pet identifikovanih glikozida kvercetina, najzastupljeniji je kvercetin 3-*O*-heksozid, koji je detektovan u obliku dva izomera (**4**, **18**) i pronađen je u svim uzorcima plodova gajenih jagodastih vrsta voćaka. Kampferol-heksozid (**25**) je takođe identifikovan u svim analiziranim uzorcima, izuzev u plodu dudu.

U grupi flavona identifikovani su luteolin (**28**), apigenin (**32**), hrizin (**34**) i pinocembrin (**36**). Najzastupljeniji flavon u ispitivanim uzorcima plodova gajenih jagodastih voćnih vrsta je hrizin koji je detektovan u svim ispitivanim uzorcima, osim ekstraktu ploda dudu. Naringenin (**31**), predstavnik klase flavanona, identifikovan je u svim ekstraktima, osim u uzorcima ploda maline (Willamette sa područja Zlatibora i Valjeva) i ploda dudu.

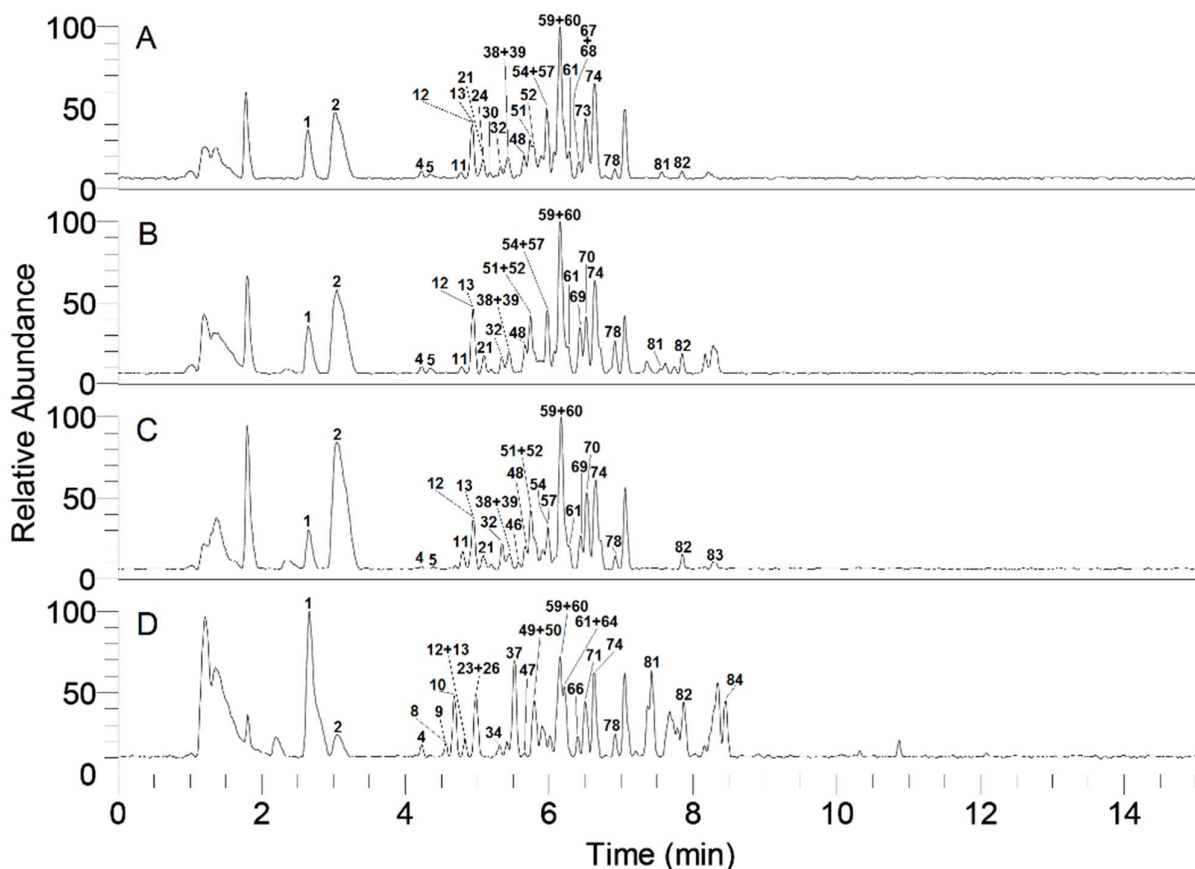
Takođe, *cis,trans*-apscisinska kiselina, pronađena je u svim ispitivanim uzorcima plodova jagodastih vrsta gajenih vrsta voćaka u okviru našeg istraživanja. Ona pripada grupi inhibitornih hormona i još se naziva „hormon stresa“. Ima ključnu ulogu u regulaciji rasta i razvoja biljaka, metabolizmu ćelijskog zida, odgovorima na biotski i abiotski stres (poput štetočina, hladnoće, suše, UV zračenja), promenama u ekspresiji gena, adaptivnim fiziološkim odgovorima, klijanju semena i polena, sazrevanju i starenju ploda, formiranju kvaliteta, metabolizmu šećera i kiselina, kao i metabolizmu fenola (Setha 2012). Takođe, predstavlja i inicijator sazrevanja i ima uticaj na omekšavanje ploda i razvoj arome.

Na osnovu rezultata prikazanih u **Tabeli 10**, može se uočiti da je najveći broj fenolnih jedinjenja pronađen u ekstraktima ploda kupine i jagode (32 polifenola), dok je u plodu dudu detektovan najmanji broj (16 polifenola). Ovi rezultati su u saglasnosti sa rezultatima za TPC i RSA koji su prikazani u **Tabeli 7**. U plodu kupine, u kome je identifikovan najveći broj polifenola, pronađen je i najveći sadržaj ukupnih polifenola, kao i antioksidativni kapacitet. Među uzorcima ploda maline, sa najvećim brojem identifikovanih fenolnih jedinjenja (31) ističe se sorte Willamette sa područja Valjeva, za koju je ustanovljena i najveća TPC vrednost među ispitivanim uzorcima sorti Willamette. Sa druge strane, u plodu dudu je identifikovan najmanji broj polifenola i dobijene su najniže TPC vrednosti. Ovi rezultati potvrđuju da su plodovi gajenih jagodastih voćnih vrsta bogati fenolnim jedinjenjima, kao i da biološko poreklo utiče na polifenolni profil.

*Analiza lista gajenih jagodastih voćnih vrsta*

Detaljna analiza ekstrakata lista gajene maline i kupine bila je usmerena na identifikaciju dve grupe metabolita, fenolne kiseline i njihove derivate, kao i jedinjenja koja pripadaju klasi flavonoida. Analizom masenih spektara ukupno je identifikovano 83 polifenola, od čega su 22 jedinjenja potvrđena pomoću standarda. Među njima je 48 fenolnih kiselina i njihovih glikozidnih derivata, dok su preostalih 35 flavonoidi i njihovi derivati. Podaci o retencionom vremenu ( $t_R$ , min), molekulske formule, izračunatoj i tačnoj masi ( $[M-H]^-$ ,  $m/z$ ), razlici između izračunate i tačne mase ( $\Delta$  ppm) i glavnim MS/MS fragmentima identifikovanih polifenola prikazani su u **Tabeli P1**. Međutim, kompletna identifikacija glikozida, u najvećem broju slučajeva, nije bila moguća, zbog nemogućnosti određivanja tačne prirode šećera i položaja veza između glikozida. Stoga su za neka jedinjenja samo

predložene strukture. Sva polifenolna jedinjenja detektovana u ekstraktima lista maline i kupine data su u **Tabeli P1**, dok su njihovi hromatografski profili prikazani na **Slici 19**. U okviru našeg istraživanja, prvi put je opisan polifenolni sastav lista kupine sorte Čačanska bestrna.



**Slika 19.** Hromatogrami fenolnih jedinjenja u uzorcima lista maline (A) - (C) i kupine (D).

### Fenolne kiseline i njihovi derivati

U listu gajene maline i kupine identifikovano je ukupno 48 različitih fenolnih kiselina i njihovih derivata. Od toga, 14 su hidroksibenzojeve kiseline, dok su preostale 34 hidroksicimetne kiseline.

U svim ekstraktima listova identifikovana je elaginska kiselina kao dominantna hidroksibenzojeva kiselina, dok su derivati elaginske kiseline bili prisutni u obliku pentozida i heksozida i identifikovani su na osnovu literaturnih podataka. Elagoil-heksuronid (**34**,  $t_R = 5,28$  min) sa masenim jonom  $m/z$  477 identifikovan je samo u ekstraktu lista kupine, pri čemu MS/MS glavni fragment  $m/z$  301 odgovara masi deprotonovane elaginske kiseline, što je u saglasnosti sa nedavnim istraživanjima (Krstić *et al.* 2023). U okviru navedenog istraživanja, u uzorcima semena maline (sorte Tulameen) i kupine (sorte Čačanska bestrna) pronađeni su i elagoil-*O*-pentozid i metil-elagoil-pentozid. Ovi derivati elaginske kiseline identifikovani su u svim ispitivanim ekstraktima listova u okviru našeg istraživanja. Elagoil-*O*-pentozid (**50**,  $t_R = 5,80$  min,  $m/z$  433) i elagoil-acetil-pentozid (**70**, 6,47 min, 477  $m/z$ ) imali su sličan put fragmentacije (MS/MS osnovni fragment  $m/z$  301 i drugi po intezitetu jon  $m/z$  300), dok je metil-elagoil-pentozid (**68**, 6,41 min,  $m/z$  447) pokazao MS/MS fragment  $m/z$  315, koji pripada [metil-elagoil-H]<sup>-</sup> jonu (Oszmiański *et al.* 2015).

Glikozidi hidroksibenzojeve kiseline identifikovani su u svim analiziranim uzorcima listova (**Tabela P1**). Dihidroksibenzoil-heksozid (**4**,  $t_R = 4,24$  min,  $m/z$  315) pokazao je karakterističan MS/MS fragment  $m/z$  153 koji pripada deprotonovanoj dihidroksibenzojevoj kiselinu. Jedinjenje na 4,56 min sa molekulskim jonom  $m/z$  447, fragmentacijom daje MS/MS jone  $m/z$  315 [M–H–pentozid]<sup>–</sup> i  $m/z$  153 [dihidroksibenzojeva kiselina–H]<sup>–</sup>, označeno je kao dihidroksibenzoil-pentozilheksozid (**8**). Dihidroksibenzoil-pentozilpentozid (**27**,  $t_R = 5,07$  min,  $m/z$  417) dao je karakterističan MS/MS fragmentacioni jon  $m/z$  241 [M–pentozid–CO<sub>2</sub>]<sup>–</sup> i jone slabijeg intenziteta  $m/z$  153 [dihidroksibenzojeva kiselina–H]<sup>–</sup> i 285 [M–pentozid]<sup>–</sup>. Fragmentacija vanilinske kiseline (**11**,  $t_R = 4,69$  min) sa molekulskim jonom  $m/z$  167 i MS/MS osnovnim fragmentom  $m/z$  152 može se objasniti gubitkom metil grupe [M–H–CH<sub>3</sub>]<sup>–</sup>. Jedinjenje na  $t_R = 3,13$  min sa karakterističnim deprotonovanim [M–H]<sup>–</sup> jonom 331  $m/z$ , označeno kao galoil-heksozid (**2**), pokazalo je MS/MS fragmentacioni jon  $m/z$  313 [M–H–H<sub>2</sub>O]<sup>–</sup> i MS/MS jone karakteristične za aglikonski deo galne kiseline  $m/z$  168 i 125.

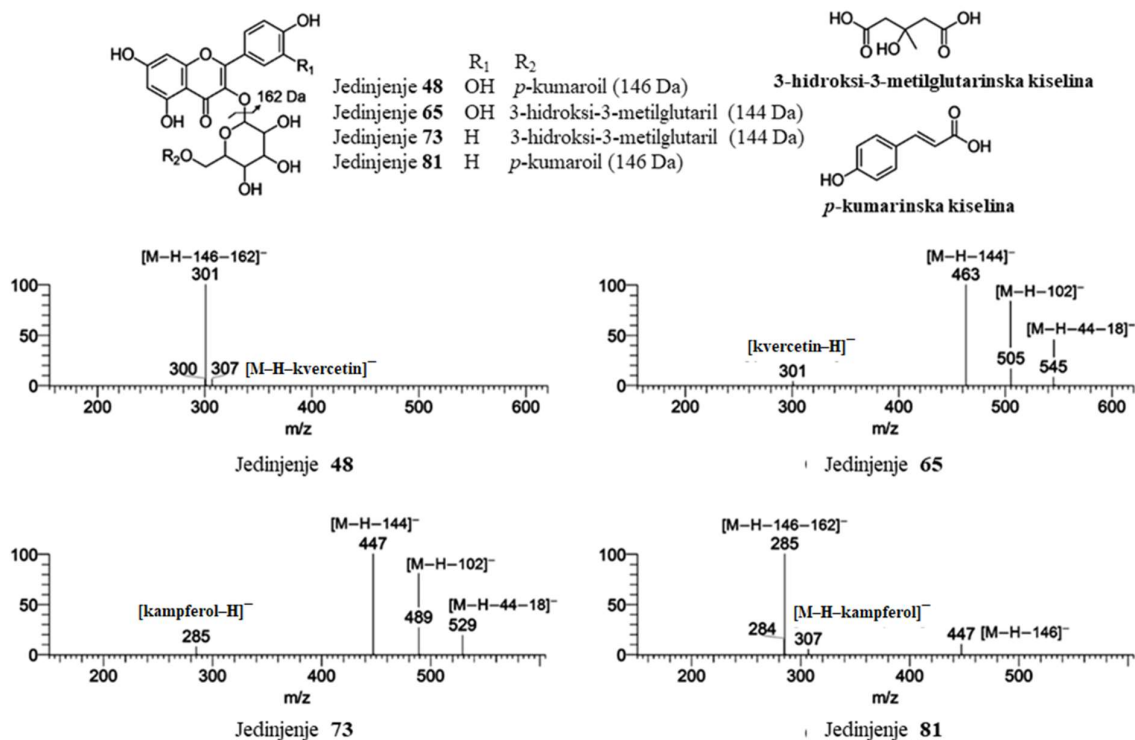
Najzastupljenije fenolne kiseline u ispitivanim uzorcima listova pripadaju klasi hidroksicimetnih kiselina (kofeinska kiselina (**43**), *p*-kumarinska kiselina (**56**) i ferulinska kiselina (**80**)). Ove kiseline identifikovane su poređenjem sa odgovarajućim standardima. Identifikovani su i brojni estri hidroksicimetnih kiselina (sa saharinskom, hininskom, vinskom i treonskom kiselinom) i glikozidi hidroksicimetnih kiselina (**Tabela P1**). Derivati kofeinske kiseline, sa ukupno 18 identifikovanih jedinjenja, preovladavali su u ispitivanim ekstraktima listova. Sva ova jedinjenja pokazala su MS/MS glavne fragmentacione jone  $m/z$  179, 161 i 135, karakteristične za kofeinsku kiselinu. Utvrđeno je prisustvo dve kofeoilhininske kiseline sa masenim jonom  $m/z$  353: 5-*O*-kofeoilhininska kiselina na 5,12 min (**28**, kvantifikovana korišćenjem standarda) i 3-*O*-kofeoilhininska kiselina (**9**) na 4,57 min. Oba izomera imala su MS/MS fragment  $m/z$  191 (što odgovara hininskoj kiselinu) ukazujući da esterifikacija ima mesto na 3-*O* poziciji i 5-*O* poziciji (Jaiswal *i sar.* 2013). Dalje, identifikovana su i tri izomera metil-kofeoilhinata  $m/z$  367 (**37**, **49**, **54**,  $t_R = 5,42$  min, 5,79 min i 5,99 min, redom), pri čemu prva dva daju MS/MS jon  $m/z$  161 [kofeinska kiselina–H<sub>2</sub>O–H]<sup>–</sup> karakterističan za metil-3-*O*-kofeoilhinata i metil-4-*O*-kofeoilhinata. Treći izomer, metil-5-*O*-kofeoilhinat (**54**,  $t_R = 5,99$  min), imao je MS/MS jon  $m/z$  179 što odgovara deprotoniranoj kofeinskoj kiselinu (Natić *i sar.* 2015). Jedinjenje sa molekulskim jonom  $m/z$  529 (**79**, 7,40 min) i sa MS/MS jonom  $m/z$  367 označeno je kao metil-estar dikofeoilhininske kiseline (Jaiswal i Kuhnert 2011). Jedinjenja identifikovana na 5,04, 5,63 i 5,92 min ( $m/z$  337) označena su kao izomeri kumaroilhininske kiseline (**26**, **45**, **52**). Njihova fragmentacija zasnivala se na ranije objavljenim podacima (Jaiswal *i sar.* 2010). U slučaju estara hidroksicimetnih kiselina sa saharinskom kiselinom, zapažena su dva glavna fragmentaciona jona  $m/z$  209 [saharinska kiselina–H]<sup>–</sup> i  $m/z$  191 [saharinska kiselina–H–H<sub>2</sub>O]<sup>–</sup>. Među svim identifikovanim estrima hidroksicimetnih kiselina u ekstraktima lista maline, kofeoil-saharinska kiselina izomer 2 (**7**) i *p*-kumaroil-saharinska kiselina izomer 3 (**24**) identifikovani su samo u sorti Mekeer (**Tabela P1**).

#### *Flavonoidi i njihovi derivati*

Kada je reč o flavonoidima, ukupno je identifikovano 35 jedinjenja: 26 flavonola, 7 flavan-3-ola, jedan flavanon i jedan flavonon. Identifikacija glikozidnih derivata kvercetina, kampferola i izoramenetina, koji su prisutni u samoniklim vrstama *Rubus* L. (Oszmiański *i sar.* 2015), zasnivala se na MS/MS podacima navedenim u **Tabeli P1**. Mesta glikozilacije ovih derivata utvrđena su na osnovu podataka dostupnih iz literature (Cuyckens i Claeys 2005), dok je analiza interglikozidnih veza, u slučaju disaharida vezanih za flavonol, izvršena prema (Ferrerres *i sar.* 2004). Identifikovano je nekoliko različitih derivata: pentozid (gubitak od 132 Da), hidroksi-metil-glutarat (gubitak od 144 Da), heksozid (gubitak od 162 Da), heksuronid (gubitak od 176 Da), ramnozil-heksuronid (gubitak od 322 Da), diheksozid (gubitak od 324 Da), ramnozil-heksozidi, *p*-kumaroil-heksozidi i pentozil-heksuronidi (gubitak od 308 Da).

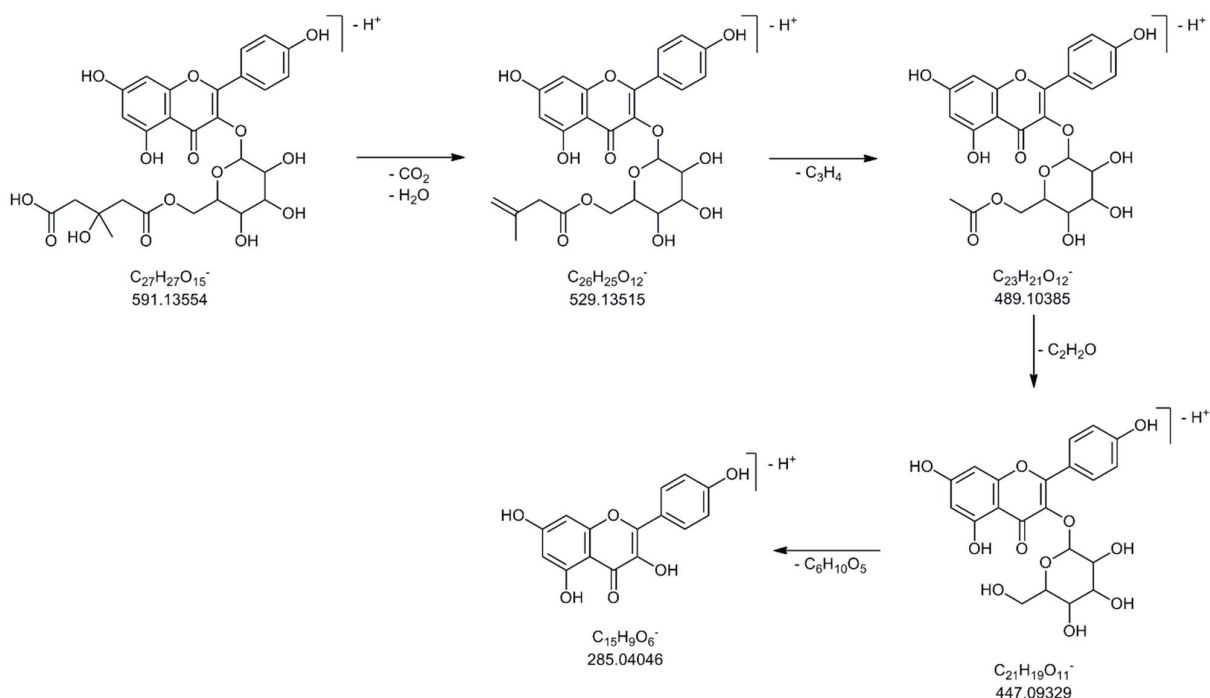
Kvercetin 3-*O*-[6"-*O*-(3-hidroksi-3-metilglutaril)]-heksozid (**65**) i kampferol 3-*O*-[6"-*O*-(3-hidroksi-3-metilglutaril)]-heksozid (**73**) identifikovani su u svim ispitivanim uzorcima listova (**Slika**

20). Oba jedinjenja već su identifikovana u listu kod nekih vrsta *Rosaceae* (Porter *i sar.* 2012). Put fragmentacije derivata kvercetina bio je u skladu sa ranijim saznanjima (Oszmiański *i sar.* 2015). Međutim, nema objavljenih podataka o detekciji kampferol 3-*O*-[6'-*O*-(3-hidroksi-3-metilglutaril)]-heksozida u listu *Rubus fruticosus*. Predloženi put fragmentacije ovog derivata kampferola dobijena je korišćenjem softvera Mass Frontier 6.0 (ThermoFisher Scientific, Bremen, Nemačka) i prikazana je na **Slici 21**. Kampferol 3-*O*-(2'-*O*-pentozil)-heksuronid (**57**), prisutan u crvenom plodu maline (Rommel i Wrolstad 1993), takođe je pronađen u našem istraživanju.



**Slika 20.** Fragmentacija jedinjenja kvercetin 3-*O*-(6''-*O*-*p*-kumaroil)-heksozid (**48**), Kvercetin 3-*O*-[6''-*O*-(3-hidroksi-3-metilglutaril)]-heksozid (**65**), kampferol 3-*O*-[6''-*O*-(3-hidroksi-3-metilglutaril)]-heksozid (**73**) i kampferol 3-*O*-(6''-*O*-*p*-kumaroil)-heksozid (**81**).

Kumaroil-heksozid derivati flavonola prisutni su u vrstama *Rubus ideaus* prema navodima u literaturi (Gudej 2003). U našem istraživanju identifikovana su dva derivata, kvercetin 3-*O*-(6''-*O*-*p*-kumaroil)-heksozid (**48**) i kampferol 3-*O*-(6''-*O*-*p*-kumaroil)-heksozid (**81**) (**Slika 20**). Identifikacija ova dva jedinjenja potvrđena je prisustvom MS/MS osnovnog fragmenta 307 *m/z*, što odgovara [M-H-aglikon]<sup>-</sup> (Felipe *i sar.* 2014).



**Slika 21.** Predloženi put fragmentacije kampferol 3-*O*-[6''-*O*-(3-hidroksi-3-metilglutaril)]-heksozida.

Apigenin 7-*O*-heksuronid (**75**, 6,66 min)  $m/z$  445 imao je MS/MS fragment  $m/z$  269 ([apigenin-H]<sup>-</sup>) i MS<sup>2</sup> fragment 175  $m/z$  ([hekuronska kiselina-H-H<sub>2</sub>O]<sup>-</sup>), što je u saglasnosti sa ranije objavljenim podacima (Oszmianski i sar., 2015). U listu kupine sorte Čačanska Bestrna, otkriveno je prisustvo apigenin 7-*O*-heksuronida (**75**), kampferol-rutinozid (**64**) i izoramnetina-rutinozid (**66**) (Tabela P1).

U okviru ovog dela istraživanja, došlo se do rezultata koji su ukazali na razliku u sadržaju određenih fenolnih jedinjenja u zavisnosti od sorte pripadnosti. U listu maline sorte Meeker, gde je pronađen najveći broj polifenola (80 jedinjenja), utvrđen je i najveći sadržaj ukupnih polifenola i redukcionog potencijala. Uzorak lista kupine, u kome je takođe identifikovan značajan broj fenolnih jedinjenja (73), istakao se sa visokim RSA i FCA vrednostima, koje pokazuju da list kupine ima dobru sposobnost u neutralisanju DPPH radikala i heliranju jona gvožđa. Kao najsiromašniji ekstrakt izdvojio se uzorak lista maline sorte Tulameen u kome je identifikovan najmanji broj polifenola i dobijene su najniže vrednosti TPC, RSA, FCA i SAS.

#### 4.1.3. Kvantitativna analiza fenolnih jedinjenja ploda i lista gajenih i samoniklih voćnih vrsta

Za dalje ispitivanje polifenolnog profila analiziranih uzoraka primenjena je ciljana analiza radi određivanja količine već identifikovanih fenolnih jedinjenja. Ovo istraživanje obuhvatilo je kvantifikaciju fenolnih jedinjenja u uzorcima plodova gajenih jagodastih vrsta voćaka za koju je korišćena UHPLC-LTQ OrbiTrap XL tehnika, dok je za uzorke listova gajenih jagodastih voćnih vrsta i za uzorke plodova samoniklih vrsta voćaka primenjena UHPLC-DAD MS/MS tehnika. Rezultati kvantifikovanih fenolnih jedinjenja izraženi su kao mg/kg smrznute mase ploda ili mg/kg suve mase lista.

## Analiza ploda gajenih jagodastih voćih vrsta

U analiziranim metanolnim ekstraktima plodova gajenih jagodastih vrsta voćaka primenom komercijalnih standarda, kvantifikovana je *cis,trans*-apscisinska kiselina i 14 fenolnih jedinjenja, od toga 5 fenolnih kiselina i 9 flavonoida (**Tabela 11**).

**Tabela 11.** Sadržaj fenolnih jedinjenja i *cis,trans*-apscisinske kiseline u plodu gajenih jagodastih voćnih vrsta izraženih kao mg/kg.

Kvantifikovano jedinjenje	<i>Malina</i>						<i>Kupina</i>	<i>Dud</i>	<i>Jagoda</i>
	M1	M2	M3	M4	M5	M6	K	D	J
<b>Galina kiselina</b>	0,31	0,52	0,41	0,47	0,45	0,45	1,05	0,26	0,41
<b>Protokatehinska kiselina</b>	1,29	1,24	2,23	1,08	0,72	1,76	2,53	2,61	0,79
<b>Hlorogena kiselina</b>	n.d.	0,18	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	7,69	22,60	n.d.
<b>Kofeinska kiselina</b>	10,37	2,45	7,39	4,38	8,82	10,65	6,16	8,99	7,73
<b><i>p</i>-Kumarinska kiselina</b>	5,79	3,26	3,50	9,13	17,92	5,32	0,48	n.d.	17,30
<b>Rutin</b>	n.d.	n.d.	0,50	1,14	3,64	n.d.	27,32	73,53	0,92
<b>Luteolin</b>	0,10	n.d.	1,00	n.d.	n.d.	n.d.	0,10	n.d.	0,25
<b><i>cis,trans</i>-Apscisinska kiselina</b>	0,91	0,45	0,70	0,76	2,40	0,29	1,06	0,47	0,50
<b>Naringenin</b>	1,02	n.d.	n.d.	3,99	0,96	1,81	0,10	0,47	22,09
<b>Apigenin</b>	0,20	0,09	0,10	0,19	n.d.	0,10	0,38	n.d.	0,17
<b>Kampferol</b>	1,12	n.d.	0,20	n.d.	n.d.	n.d.	0,29	1,70	0,67
<b>Hrizin</b>	1,88	0,85	1,06	1,62	0,94	1,25	0,65	n.d.	1,06
<b>Pinocembrin</b>	n.d.	n.d.	0,10	0,19	n.d.	0,10	0,10	0,09	2,10
<b>Galangin</b>	n.d.	0,09	0,10	n.d.	0,29	0,19	n.d.	0,09	0,76

n.d. – nije detektovano. M1 - malina (Willamette, Arilje); M2 - malina (Willamette, Zlatibor); M3 - malina (Willamette, Valjevo); M4 - malina (Meeker); M5 - malina (Yellow Meeker); M6 - malina (Tulameen); K - kupina (Čačanska bestrna); D - dud; J - jagoda (Clery).

Kofeinska kiselina pronađena je u svim uzorcima u opsegu koncentracija od 2,45 mg/kg u plodu maline sorte Willamette sa područja Zlatibora (M2) do 10,65 mg/kg u plodu maline sorte Tulameen (M6). Sadržaj kofeinske kiseline u ispitivanim uzorcima plodova gajenih jagodastih vrsta voćaka je u saglasnosti sa literaturnim podacima (Fotirić Akšić *i sar.* 2022). Takođe, značajna količina *p*-kumarinske kiseline pronađena je u svim uzorcima, osim u ekstraktu ploda duda. U plodu žute maline (Yellow Meeker, M5) i jagode (J) detektovane su najveće količine *p*-kumarinske kiseline, 17,92 i 17,30 mg/kg, redom. U istraživanju koje je obuhvatalo 12 različitih sorti jagoda sa područja Srbije (Milosavljević *i sar.* 2020), utvrđene su znatno niže koncentracije *p*-kumarinske kiseline (1,23 – 6,00 mg/kg), u odnosu na naše rezultate, što može biti posledica različitog biološkog porekla. U ekstraktu ploda duda detektovane su značajne količine hlorogene kiseline (22,60 mg/kg), što je potvrđeno u ispitivanju uzoraka ploda duda sa različitih područja u Srbiji (Natić *i sar.* 2015). Nešto niže količine hlorogene kiseline pronađene su u plodu kupine i maline (Willamette Zlatibor, M2) u odnosu na ekstrakt ploda duda, dok u ostalim uzorcima plodova gajenih jagodastih vrsta voćaka hlorogena kiselina nije detektovana. Koncentracije flavonoida su generalno nađene u nešto nižim vrednostima, osim rutina koji je kvantifikovan u značajnoj količini u ekstraktu ploda duda (73,53 mg/kg) i kupine (27,32 mg/kg). Naringen je pronađen u skoro svim uzorcima, osim u dva ekstrakta ploda maline (M2 i M3), pri čemu je najveći sadržaj kvantifikovan u ekstraktu ploda jagode (22,09 mg/kg). U svim uzorcima plodova gajenih jagodastih vrsta voćaka, osim u plodu duda, utvrđeno je i

prisustvo hrizina (0,65 – 1,88 mg/kg). Prema našem saznanju, hrizin, naringenin, pinocembrin i galangin su po prvi put kvantifikovani u ekstraktima plodova gajenih jagodastih vrsta voćaka baš u ovom istraživanju. U okviru ovog istraživanja, sadržaj *cis,trans*-apscisinske kiseline utvrđen je u svim plodovima gajenih jagodastih voćnih vrsta u opsegu od 0,29 mg/kg u ekstraktu ploda maline sorte Tulameen do 2,40 mg/kg u ekstraktu ploda žute maline sorte Yellow Meeker.

Plodovi gajenih jagodastih voćnih vrsta iz različitih regiona Srbije predstavlja značajan izvor različitih fitohemikalija, koje imaju razne biološke aktivnosti. Kofeinska kiselina, koja je pronađena u svim ekstraktima plodova gajenih jagodastih vrsta voćaka, je biološki aktivno jedinjenje poznato po svojim antioksidativnim, antiinflamatornim, antikarcinogenim, antimikrobnim i stimulišućim svojstvima proizvodnje kolagena. Kao snažan prirodni antioksidans pospešuje razgradnju lipidnih peroksida i sprečava proizvodnju reaktivnih kiseoničnih vrsta, koji su štetni proizvodi oksidacije lipida u ćelijama (Espíndola *i sar.* 2019). Uzorci ploda žute maline (Yellow Meeker) i jagode karakterišu se nešto većim sadržajem *p*-kumarinske kiseline, u odnosu na plodove analiziranih vrsta jagodastog voća, koja ima antioksidativna i antiinflamatorna svojstva. Takođe, *p*-kumarinska kiselina predstavlja inhibitor tirozinaze, a ranijim istraživanjima je utvrđeno da ima jača svojstva u inhibiciji tirozinaze od arbutina i kojične kiseline (Boo 2019). Ova istraživanja sugerišu da *p*-kumarinska kiselina ima dobar potencijal za korišćenje kao aktivni sastojak za posvetljivanje kože u kozmetičkim proizvodima. Uzorak ploda duda se istakao po visokoj količini hlorogene kiseline, koja ima mnoga korisna svojstva, poput antibakterijskog, antiinflamatornog, antivirusnog i antioksidativnog dejstva (Tajik *i sar.* 2017). Efikasnost naringenina, koji je u visokim koncentracijama detektovan u uzorku ploda jagode, zasniva se na njegovim antiinflamatornim, antikancerogenim, antioksidativnim svojstvima, sposobnosti za lečenje kardiovaskularnih bolesti, antivirusnim i imunomodulativnim efektima (Salehi *i sar.* 2019). Rezultati određivanja sadržaja individualnih polifenola u plodu gajenih jagodastih vrsta voćaka pokazali su da su ovi ekstrakti bogati polifenolnim jedinjenjima, te da biološko poreklo i sortna pripadnost imaju značajan uticaj na sadržaj pojedinačnih polifenola.

#### *Analiza lista gajenih jagodastih voćih vrsta*

U ekstraktima lista gajene maline i kupine, ukupno je kvantifikovano 23 polifenola upoređivanjem MS spektara i retencionog vremena komercijalnih standarda (**Tabela 12**). Iako su ispitivani uzorci listova uglavnom sadržali iste tipove polifenola, uočene su razlike u količinama pojedinačnih supstanci između uzoraka lista maline i kupine.

**Tabela 12.** Sadržaj fenolnih jedinjenja u listu gajene maline i kupine (mg/kg), određeni primenom UHPLC-DAD MS/MS.

Kvantifikovano jedinjenje	List maline Willamette (LM1)	List maline Meeker (LM2)	List maline Tulameen (LM3)	List kupine Čačanska bestrna (LK)
<b>Katehin</b>	1691,80 <sup>c</sup>	1913,25 <sup>a</sup>	1746,89 <sup>b</sup>	739,64 <sup>d</sup>
<b>Galokatehin</b>	10,18 <sup>a</sup>	10,68 <sup>a</sup>	n.d.	n.d.
<b>Katehin galat</b>	5,00 <sup>a</sup>	1,79 <sup>b</sup>	1,74 <sup>b</sup>	1,74 <sup>b</sup>
<b>Galokatehin galat</b>	139,03 <sup>a</sup>	42,87 <sup>c</sup>	36,57 <sup>d</sup>	110,51 <sup>b</sup>
<b>Epikatehin</b>	132,97 <sup>a</sup>	31,31 <sup>c</sup>	n.d.	37,36 <sup>b</sup>
<b>Epigalokatehin</b>	15,09 <sup>a</sup>	5,09 <sup>b</sup>	5,92 <sup>b</sup>	5,12 <sup>b</sup>
<b>Epigalokatehin galat</b>	935,25 <sup>a</sup>	417,10 <sup>c</sup>	688,05 <sup>b</sup>	41,10 <sup>d</sup>
<b>Elaginska kiselina</b>	1573,59 <sup>d</sup>	2205,14 <sup>b</sup>	1759,75 <sup>c</sup>	2875,32 <sup>a</sup>
<b>5-O-Kofeoilhininska kiselina</b>	162,86 <sup>a</sup>	169,74 <sup>a</sup>	128,69 <sup>b</sup>	22,74 <sup>c</sup>
<b>p-Hidroksibenzoeva kiselina</b>	63,73 <sup>a</sup>	44,81 <sup>c</sup>	56,53 <sup>b</sup>	5,15 <sup>d</sup>
<b>Gentizinska kiselina</b>	2,04 <sup>b</sup>	1,55 <sup>c</sup>	2,67 <sup>a</sup>	1,33 <sup>c</sup>
<b>Protokatehinska kiselina</b>	29,84 <sup>a</sup>	28,48 <sup>a</sup>	27,86 <sup>a</sup>	26,03 <sup>a</sup>
<b>Kofeinska kiselina</b>	10,38 <sup>b</sup>	8,79 <sup>c</sup>	6,70 <sup>d</sup>	20,35 <sup>a</sup>
<b>p-Kumarinska kiselina</b>	21,00 <sup>a</sup>	9,24 <sup>c</sup>	12,05 <sup>b</sup>	6,06 <sup>d</sup>
<b>Ferulinska kiselina</b>	189,98 <sup>a</sup>	180,37 <sup>ab</sup>	176,36 <sup>b</sup>	29,77 <sup>c</sup>
<b>Galna kiselina</b>	22,60 <sup>b</sup>	26,08 <sup>a</sup>	22,98 <sup>b</sup>	10,64 <sup>c</sup>
<b>Rutin</b>	585,89 <sup>a</sup>	419,41 <sup>b</sup>	572,79 <sup>a</sup>	157,25 <sup>c</sup>
<b>Eskulin</b>	26,77 <sup>b</sup>	21,05 <sup>c</sup>	15,66 <sup>d</sup>	65,62 <sup>a</sup>
<b>Naringin</b>	8,57 <sup>a</sup>	3,49 <sup>c</sup>	5,34 <sup>b</sup>	3,25 <sup>c</sup>
<b>Miricetin</b>	1,06 <sup>b</sup>	n.d.	n.d.	1,45 <sup>a</sup>
<b>Kvercetin</b>	33,54 <sup>a</sup>	17,12 <sup>d</sup>	24,11 <sup>c</sup>	26,75 <sup>b</sup>
<b>Kampferol</b>	7,51 <sup>b</sup>	5,25 <sup>c</sup>	8,97 <sup>a</sup>	4,81 <sup>c</sup>

n.d. – nije detektovano. Različita slova u istom redu označavaju značajnu razliku prema Takijevom (Tukey) testu.,  $p < 0.05$ . LM1 – list maline (Willamette); LM2 – list maline (Meeker); LM3 – list maline (Tulameen) i LK - list kupine (Čačanska bestrna)

Elaginska kiselina je bila dominantna fenolna kiselina u ekstraktima listova, sa najvećom količinom u listu kupine (2875 mg/kg), što je saglasno sa prethodno objavljenim rezultatima (Oszmiański *i sar.* 2015). U listu kupine sorte Čačanska bestrna pronađen je veći sadržaj kofeinske kiseline (20,35 mg/kg) u poređenju sa ekstraktima lista maline (6,70–10,38 mg/kg), dok su sadržaji 5-O-kofoeilhininske kiseline, ferulinske kiseline i p-hidroksibenzoeve kiseline bili veći u uzorcima lista maline u odnosu na list kupine. Eskulin, derivat kumarina, kvantifikovan je u svim ispitivanim uzorcima listova gajenih jagodastih voćnih vrsta, a najveća količina pronađena je u uzorku lista kupine (65,62 mg/kg).

Što se tiče grupe flavonola, u analiziranim uzorcima listova gajenih jagodastih voćnih vrsta kvantifikovani su rutin, kvercetin, miricetin i kampferol. Miricetin je pronađen samo u listu maline



sorte Willamette i listu kupine sorte Čačanska bestrna, dok su preostala tri flavonola kvantifikovana u svim ispitivanim uzorcima. Rutin (kvercetin 3-*O*-(6'-*O*-ramnozil-glukoza)) je bio najzastupljeniji flavonol, sa opsegom koncentracije od 157,25 mg/kg u ekstraktu lista kupine sorte Čačanska bestrna do 585,89 mg/kg u listu maline sorte Willamette.

Među sedam kvantifikovanih flavan-3-ola, najzastupljeniji je bio katehin. Sadržaj katehina bio je veći u listu maline (1691–1913 mg/kg) u poređenju sa sadržajem u listu kupine (739,64 mg/kg), što je saglasno sa literaturnim podacima (Kobori *i sar.* 2019). U uzorcima listova nalazile su se značajne količine epigalokatehin galata, sa vrednostima najmanje deset puta većim u listu maline u odnosu na list kupine. Generalno, ukupan sadržaj flavan-3-ola bio je primetno veći u listu maline sorte Willamette nego u svim ostalim ispitivanim uzorcima listova.

Na osnovu rezultata određivanja sadržaja individualnih polifenola u uzorcima lista gajene maline i kupine iz zapadnog dela Srbije, može se uočiti da je list svih sorti maline veoma bogat elaginskom kiselinom, katehinom, epigalokatehin galatom i rutinom. Elaginska kiselina ima različita biološka svojstva, poput antioksidativnog, antiinflamatornog, antimutagenog, antiproliferativnog, antifibrotičnog, antiaterosklerotičnog, antialergijskog, antiestrogeno, antimikrobnog, antivirusnog i antiparazitskog dejstva, kao i pozitivan efekat pri zaštiti kože i zarastanju rana (Sharifi-Rad *i sar.* 2022). Katehin i njegovi derivati su privukli pažnju zbog antibakterijske, antiinflamatorne i antioksidativne aktivnosti, kao i zbog zaštitnog efekta od ateroskleroze. Štaviše, značajan broj studija je pokazao da katehini takođe mogu imati antikarcinogenu aktivnost (Fan *i sar.* 2017). Ranijim istraživanjima je utvrđeno da rutin ima zaštitnu ulogu kod srčanih problema, dijabetesa, upala i različitih mikrobioloških infekcija (Semwal *i sar.* 2021). Ferulinska kiselina, koja je kvantifikovana u svim uzorcima listova, pokazuje širok spektar terapijskih efekata protiv različitih bolesti poput raka, dijabetesa, kardiovaskularnih i neurodegenerativnih bolesti. Ferulinska kiselina ima i zaštitnu ulogu za glavne strukture kože: keratinocite, fibroblaste, kolagen i elastin. Ferulinska kiselina je jedinjenje koje pomaže u neutralizaciji slobodnih radikala, pri čemu efikasno uklanja superoksid anjon radikale i inhibira peroksidaciju lipida, ali takođe i inhibira enzime koji katalizuju stvaranje slobodnih radikala (Zduńska *i sar.* 2018). Najveća količina ferulinske kiseline pronađena je u ekstraktima lista maline, sorti Willamette i Meeker, koji su pokazali najbolju sposobnost u neutralizaciji superoksid anjon radikala u odnosu na ostale ispitivane uzorke listova. Imajući u vidu da se list maline i kupine koristi za pravljanje čajeva u tradicionalnoj medicini, određivanje sadržaja najzastupljenijih polifenola bilo je od izuzetne važnosti. Rezultati su pokazali da je list maline i kupine bogat izvor fenolnih jedinjenja, te da ovaj biljni materijal ima potencijal kao komponenta dijetetskih suplemenata.

#### *Analiza ploda samoniklih voćnih vrsta*

U 26 uzoraka plodova samoniklih vrsta voćaka identifikovano je ukupno 20 fenolnih jedinjenja, 9 fenolnih kiselina i 11 flavonoida. Poređenjem polifenolnih profila utvrđeno je da postoje značajne varijacije, kako u sastavu tako i u koncentraciji fenolnih kiselina i flavonoida. Svi rezultati kvantifikovanih fenolnih jedinjenja u plodu samoniklih vrsta voćaka prikazani su kao mg fenolnog jedinjenja po kg smrznute mase uzorka i predstavljeni su u **Tabeli 13**. Najzastupljenije fenolne kiseline, poput 5-*O*-kofeoilhininske kiseline (hlorogena kiselina), protokatehinske kiseline, i elaginske kiseline pronađene su u skoro svim ispitivanim uzorcima plodova samoniklih vrsta voćaka. Svi plodovi samoniklih voćih vrsta (izuzev uzorka GL2) sadržali su naringin, koji se pokazao koristan za lečenje nekoliko metaboličkih poremećaja (Alam *i sar.* 2014).

**Tabela 13.** Sadržaj fenolnih jedinjenja (mg/kg) u plodu samoniklih voćnih vrsta određen primenom UHPLC-DAD MS/MS.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
<b>ZO1</b>	23,12	n.d.	7,21	1,71	14,16	5,69	0,38	n.d.	n.d.	2,21	0,60	1,39	n.d.	255,41	14,30	n.d.	0,50	2,42	0,33	0,54	0,63	0,93	0,10
<b>ZO2</b>	n.d.	n.d.	16,25	2,84	3,98	0,56	n.d.	n.d.	n.d.	1,08	0,36	3,73	n.d.	195,66	28,76	n.d.	0,53	2,99	1,15	0,38	0,30	0,48	n.d.
<b>ZO3</b>	30,21	n.d.	25,75	2,42	11,98	46,77	3,41	0,72	n.d.	2,86	0,45	7,27	n.d.	269,70	22,53	n.d.	0,66	3,54	0,38	n.d.	0,08	0,12	n.d.
<b>ZO4</b>	30,77	n.d.	15,35	2,09	12,31	25,36	0,53	n.d.	n.d.	1,22	0,38	4,33	n.d.	325,29	10,56	n.d.	0,46	0,94	0,56	n.d.	0,13	0,20	n.d.
<b>ZO5</b>	26,08	n.d.	21,21	3,28	6,99	155,39	2,38	n.d.	n.d.	2,14	n.d.	4,34	n.d.	471,51	33,13	n.d.	0,64	1,40	1,93	0,36	0,26	0,40	n.d.
<b>ZO6</b>	31,99	n.d.	20,03	3,46	3,13	67,76	2,77	n.d.	n.d.	1,27	0,28	2,26	n.d.	253,26	23,35	0,08	0,89	2,61	0,62	n.d.	0,31	n.d.	0,21
<b>ZO7</b>	n.d.	n.d.	15,19	2,51	8,38	1,18	n.d.	n.d.	n.d.	1,96	0,17	2,68	n.d.	187,30	29,39	n.d.	0,25	2,59	1,52	0,45	0,24	0,42	n.d.
<b>DR1</b>	n.d.	6,56	0,83	1,81	n.d.	16,17	0,85	n.d.	1,11	0,88	15,17	0,18	n.d.	10,62	1,81	n.d.	0,27	n.d.	1,16	n.d.	n.d.	n.d.	0,09
<b>DR2</b>	n.d.	8,51	1,81	2,63	0,76	20,50	n.d.	n.d.	0,55	0,39	25,56	0,17	n.d.	5,78	2,32	n.d.	0,27	n.d.	1,82	n.d.	0,13	n.d.	0,10
<b>DR3</b>	n.d.	5,80	0,73	1,88	0,34	14,79	n.d.	n.d.	1,35	0,58	36,52	n.d.	n.d.	18,13	3,17	n.d.	0,24	n.d.	1,30	n.d.	0,13	n.d.	n.d.
<b>DR4</b>	n.d.	2,54	0,91	2,72	2,98	5,64	1,25	n.d.	n.d.	0,35	15,93	n.d.	2,99	1,27	1,01	n.d.	0,26	n.d.	0,26	n.d.	0,27	0,59	0,49
<b>DR5</b>	n.d.	15,41	3,75	2,70	0,82	20,74	n.d.	n.d.	0,94	0,54	84,92	n.d.	n.d.	2,74	2,40	n.d.	0,31	n.d.	0,96	n.d.	0,10	n.d.	0,09
<b>DR6</b>	n.d.	30,94	1,31	4,76	n.d.	38,37	n.d.	n.d.	1,74	1,17	27,29	0,26	n.d.	3,03	1,25	n.d.	0,37	n.d.	1,29	n.d.	0,10	n.d.	n.d.
<b>DR7</b>	n.d.	13,93	n.d.	2,20	n.d.	4,44	n.d.	n.d.	1,90	1,19	26,07	0,28	n.d.	1,96	0,81	n.d.	0,26	n.d.	0,33	n.d.	0,02	n.d.	n.d.
<b>DR8</b>	n.d.	8,15	2,09	3,34	0,97	2,51	n.d.	n.d.	1,06	0,33	18,91	n.d.	2,45	1,44	2,67	n.d.	0,17	n.d.	0,98	n.d.	0,22	n.d.	0,27
<b>DR9</b>	n.d.	18,88	4,20	2,07	1,14	13,67	n.d.	n.d.	n.d.	0,68	41,08	0,28	n.d.	3,64	3,84	n.d.	0,29	n.d.	n.d.	n.d.	0,33	n.d.	n.d.
<b>DR10</b>	n.d.	111,14	1,40	3,55	0,76	28,60	n.d.	n.d.	1,52	0,75	77,73	0,31	n.d.	3,80	1,83	n.d.	0,21	n.d.	0,89	n.d.	0,15	0,10	0,16
<b>TR1</b>	n.d.	n.d.	1,55	6,44	n.d.	1,27	n.d.	1,87	n.d.	n.d.	1,31	0,25	n.d.	52,56	4,73	n.d.	4,16	6,82	0,04	n.d.	0,05	0,06	n.d.
<b>TR2</b>	n.d.	n.d.	1,77	5,56	n.d.	1,60	0,15	1,67	n.d.	n.d.	0,94	0,24	n.d.	59,02	5,90	n.d.	3,88	7,11	n.d.	n.d.	0,01	0,02	n.d.
<b>TR3</b>	n.d.	n.d.	1,43	5,42	n.d.	1,78	n.d.	1,67	n.d.	n.d.	0,66	0,22	n.d.	n.d.	6,60	0,09	4,05	8,62	n.d.	n.d.	0,03	0,03	n.d.
<b>TR4</b>	n.d.	n.d.	3,02	6,33	n.d.	2,82	n.d.	1,22	n.d.	n.d.	0,66	0,22	n.d.	58,94	7,87	0,09	3,53	7,43	n.d.	n.d.	0,01	n.d.	n.d.
<b>TR5</b>	n.d.	n.d.	1,14	6,67	n.d.	n.d.	n.d.	3,17	n.d.	n.d.	1,87	n.d.	n.d.	33,92	3,30	0,07	1,83	6,16	n.d.	n.d.	0,01	0,01	n.d.
<b>GL1</b>	n.d.	n.d.	1,95	6,24	2,07	23,07	2,37	4,66	0,58	0,95	5,58	0,50	n.d.	16,75	81,17	n.d.	0,35	n.d.	0,98	n.d.	0,24	0,31	1,73
<b>GL2</b>	n.d.	n.d.	0,78	3,79	1,56	4,36	1,35	6,66	n.d.	0,56	2,49	0,52	n.d.	30,92	77,31	0,06	n.d.	n.d.	0,32	n.d.	0,04	0,04	0,59
<b>GL3</b>	12,28	n.d.	n.d.	14,69	n.d.	20,71	0,61	n.d.	n.d.	0,14	0,63	0,11	3,29	66,54	117,35	n.d.	0,41	29,49	3,91	n.d.	0,06	0,09	0,25
<b>GL4</b>	n.d.	n.d.	n.d.	4,84	0,35	9,70	0,37	n.d.	n.d.	n.d.	0,31	0,12	0,05	52,66	95,16	n.d.	0,39	43,86	0,75	n.d.	n.d.	0,02	0,11

1 - Arbutin; 2 - Galna kiselina; 3 - Protokatehinska kiselina; 4 - Eskulin; 5 - *p*-Hidroksibenzoeva kiselina; 6 - 5-*O*-Kofeoilhininska kiselina; 7 - Kofeinska kiselina; 8 - Vanilinska kiselina; 9 - Siringinska kiselina; 10 - *p*-Kumarinska kiselina; 11 - Elaginska kiselina; 12 - Ferulinska kiselina; 13 - Katehin; 14 - Rutin; 15 - Kvercetin 3-*O*-galaktozid; 16 - Apigenin 7-*O*-apioglukozid; 17 - Naringin; 18 - Kampferol 3-*O*-glukozid; 19 - Florizin; 20 - Luteolin; 21 - Apigenin; 22 - Naringenin; 23 - Kampferol; n.d. - nije detektovano

Prema literaturnim podacima, 5-*O*-kofeoilhininska kiselina je najdominantnija hidroksicimetna kiselina u uzorcima ploda samonikle zove (Osman *i sar.* 2023), što je u saglasnosti sa našim rezultatima, s obzirom da je pronađena u svim ispitivanim ekstraktima ploda zove (ZO) sa prosečnom vrednošću od 43,24 mg/kg. Takođe, u ispitivanim uzorcima ploda zove detektovane su značajne količine protokatehinske kiseline, u opsegu koncentracija od 7,21 mg/kg do 25,75 mg/kg, pri čemu su dobijeni rezultati nešto viši u odnosu na rezultate ispitivanja ploda zove sa poručja Rumunije (Haş *i sar.* 2023). U pogledu sadržaja flavonoida, ekstrakti ploda samonikle zove su se izdvojili na osnovu visoke koncentracije rutina (187,30 – 471,51 mg/kg) u poređenju sa uzorcima ploda samoniklog drena, crnog trna i gloga. Pored rutina, kvercetin 3-*O*-galaktozid (hiperozid) je zastupljen u ekstraktima ploda zove. Sadržaji detektovanih flavonoida u plodovima samonikle vrste zove su u saglasnosti sa najnovijim istraživanjima (Osman *i sar.* 2023). U plodu zove *p*-kumarinska kiselina je pronađena u nešto višim koncentracijama u odnosu na ekstrakte ispitivanih plodova samoniklih voćnih vrsta, u opsegu od 1,08 – 2,86 mg/kg.

U ekstraktima ploda drena (DR), najzastupljenije hidroksibenzojeve kiseline su galna kiselina (2,54 – 111,14 mg/kg) i elaginska kiselina (15,17 – 84,92 mg/kg). Galna kiselina je pronađena samo u ekstraktima ploda drena, a zabeležene su i nešto niže koncentracije *p*-kumarinske kiselina (0,33 – 1,19 mg/kg) u odnosu na ostale ispitivane uzorke plodova samoniklih vrsta voćaka. Ekstrakti ploda drena istakli su se po nešto višem sadržaju 5-*O*-kofeoilhininske kiseline, za razliku od uzoraka ploda crnog trna i gloga, sa prosečnom vrednošću od 16,54 mg/kg. Siringinska kiselina, koja je pronađena u svim ekstraktima ploda drena, osim CC4 i CC9, privlači posebnu pažnju jer pokazuje svojstva regulacije nivoa šećera u krvi i dokazano je da inhibira razvoj dijabetске katarakte (Wei *i sar.* 2012). Uzorci ploda samoniklog drena se takođe karakterišu i prisustvom rutina, čija je pronađena količina neznatno viša u odnosu na koncentracije ostalih detektovanih flavonoida u istim ekstraktima.

Ekstrakti ploda crnog trna (TR) pokazali su karakterističan profil sa manjim brojem fenolnih kiselina i flavonoida u poređenju sa ekstraktima plodova ispitivanih samoniklih vrsta voćaka. Sadržaj detektovanih fenolnih kiselina, poput protokatehinske kiseline, 5-*O*-kofeoilhininske kiseline, elaginske kiseline i ferulinske kiseline, pronađen je u nešto nizim koncentracijama u odnosu na ekstrakte ploda zove (ZO). Važno je napomenuti da je vanilinska kiselina po prvi put identifikovana u ispitivanim uzorcima ploda crnog trna u opsegu od 1,22 mg/kg do 3,17 mg/kg. Istovremeno, druge fenolne kiseline, poput galne, *p*-hidroksibenzojeve i *p*-kumarinske kiseline nisu detektovane u ekstraktima ploda crnog trna. Siringinska kiselina takođe nije detektovana u plodu crnog trna, što je u suprotnosti sa ranije objavljenom studijom (Radovanović *i sar.* 2013), u okviru koje je siringinska kiselina identifikovana u uzorcima ploda samoniklog crnog trna i drena iz jugoistočne Srbije. Rutin, kao najzastupljeniji flavonoid, pronađen je u svim ispitivanim ekstraktima ploda crnog trna, osim u uzorku TR3, u opsegu koncentracija 33,92 mg/kg do 59,02 mg/kg. Katehin, luteolin, kampferol i florizin (izuzetak je uzorak TR1) nisu detektovani u ekstraktima ploda crnog trna. Detektovana fenolna jedinjenja u plodovima samoniklog crnog trna u okviru našeg ispitivanja su u saglasnosti sa novim istraživanjima (Negrean *i sar.* 2023).

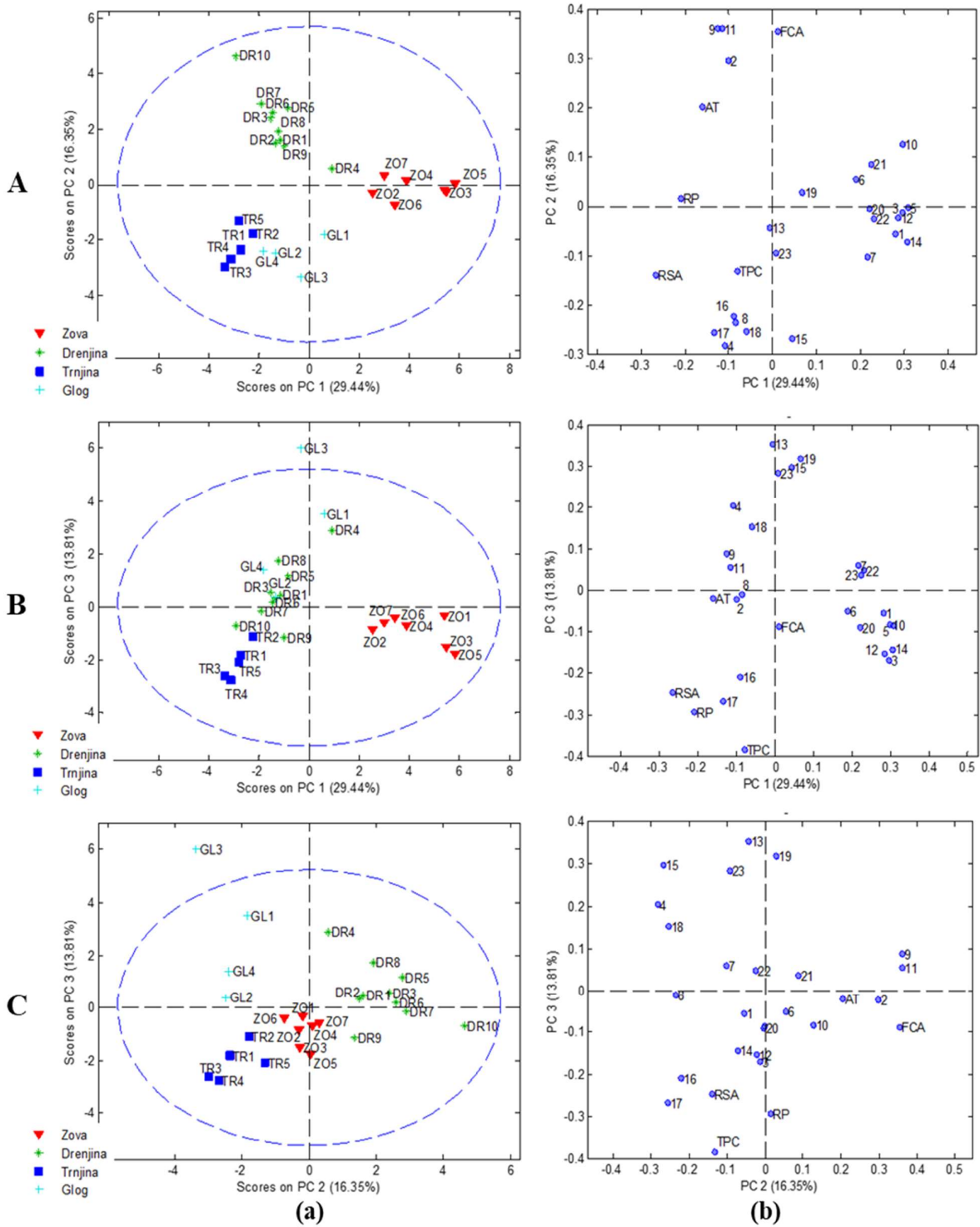
U ekstraktima ploda gloga (GL), kao i u ostalim ispitivanim uzorcima plodova samoniklih vrsta voćaka, pronađena je značajna količina 5-*O*-kofeoilhininske kiseline (4,36 – 23,07 mg/kg). Osim u ekstraktima ploda zove, *p*-kumarinska kiselina je kvantifikovana i u tri uzorka ploda samoniklog gloga (GL1, GL2 i GL3), dok je siringinska kiselina kvantifikovana samo u uzorku ploda gloga GL1, u koncentraciji od 0,58 mg/kg. Prisustvo detektovanih polifenola u plodovima gloga je objavljeno i u ranijim istraživanjima (Han *i sar.* 2016). Plod gloga GL3 se izvaja od ostalih ekstrakata ploda gloga po nešto većem sadržaju arbutina (12,28 mg/kg), eskulina (14,69 mg/kg), rutina (66,54 mg/kg), kvercetin 3-*O*-galaktozida (117,35 mg/kg) i florizina (3,91 mg/kg).

Istraživanje polifenolnog profila ploda samonikle zove, drena, crnog trna i gloga sa područja Srbije pokazalo je da su plodovi ovih voćnih vrsta bogat izvor različitih fenolnih jedinjenja. Opšte je poznato da se fenolna jedinjenja smatraju bioaktivnim komponentama i imaju različita biološka svojstva. Eskulin, prirodno jedinjenje poznato po svojstvima zaštite od sunca, antioksidativnim i

antitumorskim svojstvima (Lee *i sar.* 2007), pronađeno je u svim ispitivanim uzorcima plodova samoniklih vrsta voćaka u koncentracijama koje variraju od 1,71 mg/kg u plodu zove (ZO1) do 14,69 mg/kg u gloga (GL3). U našem istraživanju, po prvi put je utvrđeno prisustvo arbutina u plodu samonikle zove u opsegu koncentracija 23,12 – 31,99 mg/kg. Arbutin, kao inhibitor tirozinaze, široko se koristi u kozmetičkim proizvodima kao sredstvo za smanjenje hiperpigmentacije kože (Boo 2021). Međutim, ekstrakti ploda zove nisu pokazali visoke antioksidativne vrednosti inhibicije tirozinaze (AT), za razliku od ekstrakata ploda samoniklog gloga i drene. Takvi rezultati mogu se objasniti činjenicom da su, pored arbutina, drugi polifenoli poznati kao inhibitori tirozinaze, poput elaginske i vanilinske kiseline, prisutni u većim količinama u plodu drene, doprineli visokoj vrednosti inhibicije tirozinaze ekstrakata ploda drene. Hlorogena kiselina, koja ima mnoga korisna svojstva, poput antibakterijskog, antiinflamatornog, antivirusnog i antioksidativnog (Tajik *i sar.* 2017), kvantifikovana je u značajnim količinama u svim ekstraktima plodova samoniklih vrsta voćaka, osim u uzorku crnog trna TR5. Takođe, u svim analiziranim uzorcima plodova samoniklih vrsta voćaka utvrđeno je prisustvo kvercetin 3-*O*-galaktozida (hiperozida) koji ima antiinflamatorno, antivirusno i antioksidativno dejstvo (Ren *i sar.* 2023). Varijacije u sadržaju kvantifikovanih fenolnih kiselina i flavonoida u različitim vrstama samoniklog voća (zova, dren, crni trn, glog) potvrđuju uticaj biološkog porekla na polifenolni profil ploda samoniklih voćnih vrsta. Imajući u vidu da su u ekstraktima ispitivanih plodova samoniklih vrsta voćaka kvantifikovana i fenolna jedinjenja koja pokazuju svojstva regulacije nivoa šećera u krvi, ovi ekstrakti bi se potencijalno mogli koristiti kao suplementi i dodaci ishrani.

#### 4.1.4. Rezultati analize glavnih komponenata primenjene na sadržaj fenolnih jedinjenja i vrednosti antioksidativnih testova određenih u plodu samoniklih voćnih vrsta

Multivarijantna statistička analiza omogućava grupisanje uzoraka prema sadržaju pojedinačnih flavonoida i fenolnih kiselina i drugih neflavonoidnih jedinjenjima. Grafik skorova prikazuje trendove, grupisanja i spoljne vrednosti. U ovom radu, PCA (analiza glavnih komponenata) je primenjena na sadržaj 23 fenolna jedinjenja i antioksidativne testove u cilju utvrđivanja sličnosti/razlika između ispitivanih uzoraka plodova samoniklih voćnih vrsta. Rezultati PCA ukazuju da model koji uključuje prvih 7 glavnih komponenata (PC1 – PC7) objašnjava 84,37% ukupne varijabilnosti među podacima (PC1, PC2, PC3, PC4, PC5, PC6 i PC7 doprinose sa 29,44%; 16,35%; 13,81%; 8,54%; 7,45%; 5,29% i 3,49%, redom). Grafici skorova i varijabli za prve tri glavne komponente prikazani su na **Slici 22**. Na osnovu grafika skorova (**Slika 22Aa, 22Ba i 22Ca**) uočeno je klasifikovanje uzoraka plodova samoniklih vrsta voćaka u četiri odvojene grupe. Na osnovu grafika varijabli, bilo je moguće delimično izraziti uticaj originalnih promenljivih na odvajanje između uzoraka. Uzorci ploda zove (ZO) formiraju odvojenu grupu duž PC1 zahvaljujući karakterističnom polifenolnom profilu u poređenju sa ostalim ispitivanim uzorcima. Plodovi zove (ZO) su se izdvojili na osnovu većeg sadržaja nekoliko fenolnih kiselina, poput protokatehinske, *p*-hidroksibenzoeva, *p*-kumarinske i ferulinske kiseline (jedinjenja **3, 5, 10 i 12**) i značajno većeg sadržaja rutina (**14**) (**Slika 22Ab, 22Bb i 22Cb**). Galna, siringska i elaginska kiselina (jedinjenja **2, 9 i 11**), kao i antitirozinazna aktivnost (AT), su važne varijable za odvajanje ploda drene (DR) duž PC2. Na kraju, grafik skorova (**Slika 22Ca**) pokazao je odvajanje uzoraka gloga (GL) i crnog trna (TR) duž PC3 ose. Uzorci gloga (GL) su pokazali značajno veći sadržaj kvercetin 3-*O*-galaktozida (jedinjenje **15**) u poređenju sa ostalim uzorcima samoniklih plodova, dok su uzorci ploda crnog trna (TR) imali najvišu sposobnost u neutralizaciji DPPH radikala, najveću koncentraciju ukupnih polifenola (TPC) i naringina (jedinjenje **17**). Na osnovu rezultata PCA analize nije utvrđeno da postoji veza između sadržaja polifenola i antioksidativnog kapaciteta ispitivanih uzoraka i njihovog geografskog porekla.



**Slika 22.** Analiza glavnih komponenta: (a) Grafik skorova prve tri glavne komponente dobijen za polifenolni profil i vrednosti antioksidativnih testova u uzorcima plodova samoniklih voćnih vrsta (zova ZO, dren DR, crni trn TR i glog GL); (b) uzajamne projekcije koeficijenata latentnih varijabli – brojevi na grafiku varijabli odgovaraju detektovanim fenolnim jedinjenjima navedenim u **Tabeli 13**.

#### 4.1.5. Sadržaj slobodne i ukupne elaginske kiseline u plodu gajenih voćnih vrsta

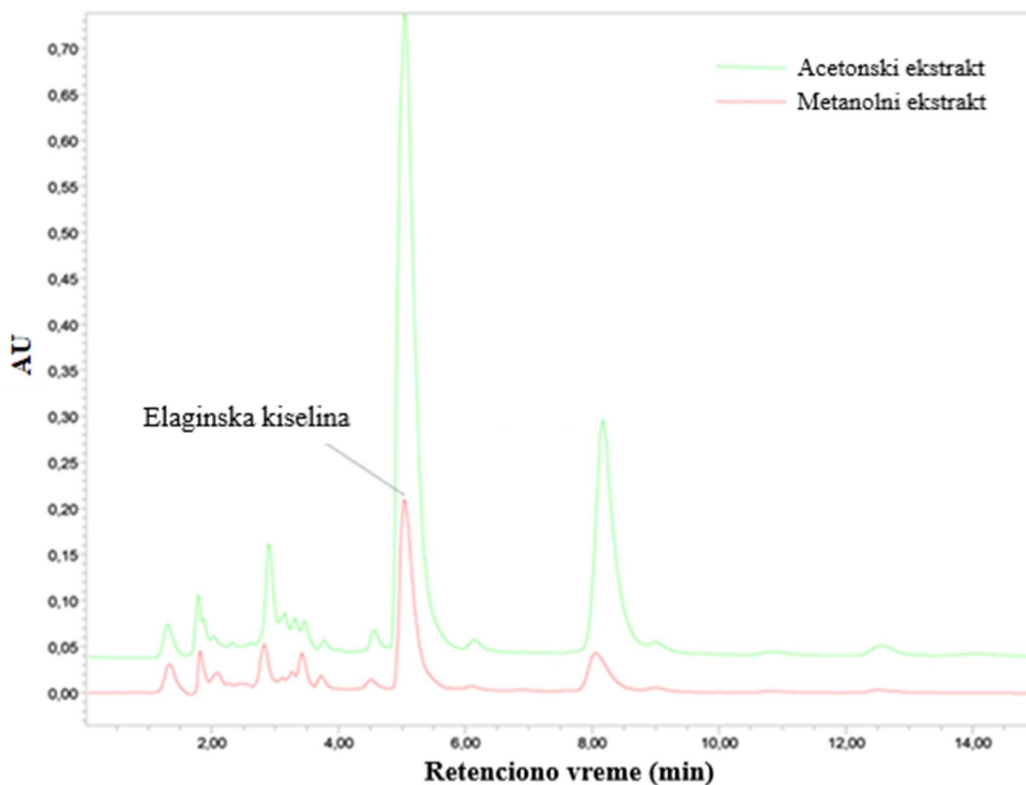
U plodu gajenih jagodastih voćnih vrsta, slobodna i ukupna elaginska kiselina su identifikovane i kvantifikovane primenom HPLC/UV-Vis tehnike. U cilju određivanja sadržaj ukupne elaginske kiseline primenjena je kisela hidroliza, koja omogućava oslobađanje elaginske kiseline iz polimernih struktura (elagitanina), čineći je dostupnom za analizu i kvantifikaciju. Rezultati sadržaja slobodne i ukupne elaginske kiseline izraženi su kao mg/kg smrznutog uzorka ploda.

Količine slobodne i ukupne elaginske kiseline u metanolnim i acetonskim ekstraktima plodova gajenih jagodastih vrsta voćaka prikazane su u **Tabeli 14**. Iz prikazanih rezultata, može se videti da je razlika između sadržaja slobodne i ukupne elaginske kiseline u svim ispitivanim uzorcima plodova evidentna, što je u saglasnosti sa rezultatima prikazanim u literaturi (Golovinskaia i Wang 2021). Osim toga, naše istraživanje jasno pokazuje uticaj ekstrakcionog sredstva na sadržaj ukupne elaginske kiseline, pri čemu je ova statistički značajna razlika potvrđena primenom uporednog  $t$ -testa sa  $t$  vrednošću 3,158 ( $t_{\text{kritično}} = 2,306$ ,  $p < 0,05$ ). U svim analiziranim slučajevima, sadržaj elaginske kiseline bio je značajno veći u acetonskom ekstraktu nego u metanolnom, što se može videti na prikazanom hromatogramu (**Slika 23**). Za sadržaj slobodne elaginske kiseline nije utvrđena statistički značajna razlika ( $t = 0,639$ ).

**Tabela 14.** Sadržaj slobodne i ukupne elaginske kiseline u plodu gajenih jagodastih voćnih vrsta (mg/kg).

	Slobodna elaginska kiselina		Ukupna elaginska kiselina	
	Metanolni ekstrakt	Acetonski ekstrakt	Metanolni ekstrakt	Acetonski ekstrakt
<b>Malina</b>				
Willamette (Arilje)	5,41 ± 0,13	13,40 ± 0,52	339,03 ± 3,04	677,13 ± 2,82
Willamette (Zlatibor)	n.d.	n.d.	221,78 ± 2,43	265,44 ± 5,41
Willamette (Valjevo)	21,09 ± 1,22	19,04 ± 0,23	390,33 ± 2,72	849,59 ± 5,83
Meeker	8,32 ± 0,21	17,23 ± 0,63	417,72 ± 5,31	1817,41 ± 19,20
Yellow Meeker	5,24 ± 0,37	31,87 ± 1,61	998,64 ± 11,44	1459,23 ± 16,14
Tulameen	n.d.	n.d.	128,60 ± 1,41	396,24 ± 13,81
<b>Kupina</b>				
Čačanska bestrna	44,34 ± 0,68	18,44 ± 0,60	602,91 ± 2,14	1185,74 ± 17,12
<b>Dud</b>				
<i>Morus nigra</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<b>Jagoda</b>				
Clery	36,04 ± 2,51	56,04 ± 1,02	217,64 ± 1,42	549,03 ± 7,21

n.d. – nije detektovano



Slika 23. Hromatogram ukupne elaginske kiseline u ekstraktu ploda maline sorte Meeker.

Značajno niži prinos dobijen sa metanolom kao ekstrakcionim sredstvom može se pripisati manjoj rastvorljivosti elagitanina u ovom rastvaraču. U acetonskim ekstraktima plodova gajenih jagodastih vrsta voćaka, količina slobodne elaginske kiseline kretala se od 13,40 mg/kg (u plodu maline sorte Willamette, Arilje) do 56,04 mg/kg smrznute mase (u plodu jagode sorte Clery) i ovi rezultati su uporedivi sa podacima koji su prikazani u literaturi (Williams *i sar.* 2016). Najveći sadržaj ukupne elaginske kiseline pronađen je u acetonskom ekstraktu ploda maline sorte Meeker (1817,41 mg/kg smrznute mase), zatim Yellow Meeker (1459,23 mg/kg smrznute mase) i plodu kupine sorte Čačanska bestrna (1185,74 mg/kg smrznute mase). U ekstraktu ploda dudu nije detektovana elaginska kiselina ni u jednom obliku. Kada se uporede naše vrednosti sa vrednostima objavljenim za ukupnu elaginsku kiselinu pronađene u plodu maline, kupine i jagode sa područja Hrvatske, može se primetiti nešto veći sadržaj ukupne elaginske kiseline u našim uzorcima (Komorsky-Lovrić i Novak 2011). Yang i saradnici (Yang *i sar.* 2020) su istraživali sadržaj elaginske kiseline u zrelih plodovima različitih sorti malina i utvrdili da je sadržaj slobodne elaginske kiseline bio u rasponu od 12,2 mg/kg do 27,4 mg/kg smrznute mase uzorka, a sadržaj ukupne elaginske kiseline iznosio je 526,4 – 619,1 mg/kg smrznute mase, što je u saglasnosti sa našim rezultatima za metanolne ekstrakte. U istom istraživanju, slobodna elaginska kiselina kvantifikovana je u plodu maline sorte Tulameen, što nije u saglasnosti sa našim rezultatima. Sa druge strane, kvantifikovana količina ukupne elaginske kiseline za zreli plod maline sorte Tulameen bila je u saglasnosti sa našim rezultatima. Marić i saradnici (Marić *i sar.* 2022) ispitivali su slobodnu i ukupnu elaginsku kiselinu u etanolnim ekstraktima semena malina (sorte Willamette i Meeker) sa područja Srbije (Kraljevo). Sadržaj slobodne elaginske kiseline u uzorcima varirao je od 430,5 mg/kg u ekstraktu ploda maline sorte Willamette do 467,6 mg/kg u ekstraktu ploda maline sorte Meeker. Količina ukupne elaginske kiseline bila je najveća u plodu maline sorte Meeker (9044,4 mg/kg), a nešto niži sadržaj je pronađen u plodu maline sorte Willamette (8591,1 mg/kg). U pomenutom istraživanju je potvrđeno da se elaginska kiselina najčešće nalazi u semenkama malina (Marić *i sar.* 2022). Sadržaj elaginske kiseline bio je značajno veći u

hidrolizovanim ekstraktima plodova jagodastih vrsta voćaka u poređenju sa etanolnim ekstraktima, što sugerije da je većina elaginske kiseline u plodu ispitivanih voćnih vrsta prisutna u vezanom obliku (Marić *i sar.* 2022). Ovo zapažanje je potpuno u skladu sa našim rezultatima.

Ispitivani uzorci plodova gajenih jagodastih voćnih vrsta iz različitih regiona Srbije su, prema rezultatima našeg istraživanja, bogat izvor elaginske kiseline i elagitanina. Među ispitivanim sortama maline, prema sadržaju slobodne elaginske kiseline, istakla se sorta Yellow Meeker, dok se prema sadržaju ukupne elaginske kiseline izdvojila sorta Meeker. Rezultati ovog ispitivanja mogu biti smernice za odabir odgovarajućih sorti malina koje će se uzgajati u Srbiji i sličnim klimatskim područjima.

#### 4.1.6. Antocijanini u plodu gajenih i samoniklih voćnih vrsta

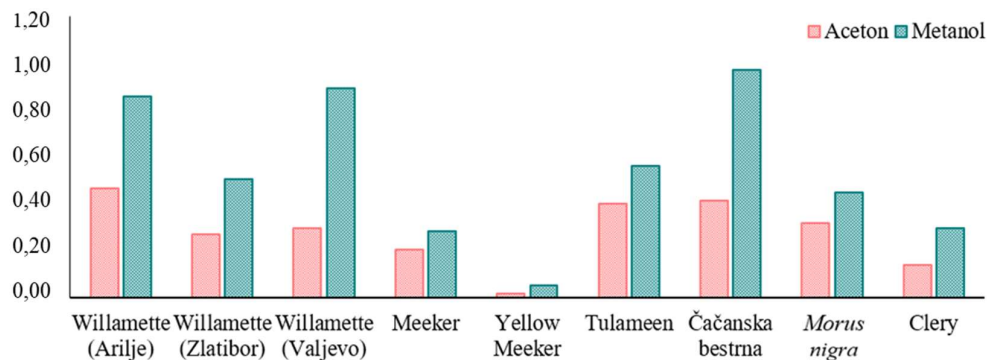
Antocijanini predstavljaju podklasu flavanoida koji su veoma zastupljeni u različitim vrstama voća, koji plodu daju karakterističnu crvenu, plavu ili ljubičastu boju. Za određivanje antocijanina iz biljnog materijala, najčešće se koriste spektroskopske i hromatografske metode. U okviru ovog rada, utvrđen je sadržaj ukupnih antocijanina u 9 uzoraka plodova gajenih jagodastih vrsta voćaka i 26 uzoraka plodova samoniklih vrsta voćaka primenom UV-Vis spektrofotometrije. Takođe, za ispitivanje profila antocijanina, odabran je po jedan reprezentativan uzorak ploda svake vrste gajenog i samoniklog voća i analiza je urađena primenom visokoefikasne tankoslojne hromatografije i UHPLC-LTQ OrbiTrap XL masene spektrometrije. Ove metode često se koriste za analizu bioaktivnih jedinjenja uzoraka različitih voćnih vrsta, kao i za kontrolu kvaliteta i autentičnosti njihovih proizvoda. Za analizu antocijanina korišćeni su prethodno pripremljeni metanolni ekstrakti plodova voćnih vrsta.

##### *Sadržaj ukupnih antocijanina u plodu gajenih jagodastih i samoniklih voćnih vrsta*

U plodu gajenih jagodastih voćnih vrsta, sadržaj ukupnih antocijanina (TAC) određen je u ispitivanim ekstraktima za svaku ekstrakcionu metodu. Evidentna razlika između dva ekstrakcionu rastvarača prikazana je na **Slici 24**, pri čemu je ova statistička razlika potvrđena korišćenjem uporednog  $t$ -testa, gde dobijena  $t$  vrednost iznosi 3,478 ( $t_{\text{kritično}} = 2,306$ ,  $P < 0,05$ ). Koncentracija ukupnih antocijanina u analiziranim ekstraktima plodova gajenih jagodastih i samoniklih voćnih vrsta izražena je kao mg ekvivalenta cijanidin 3-*O*-glukozida po gramu smrznute mase uzorka (mg cij 3-glu/g).

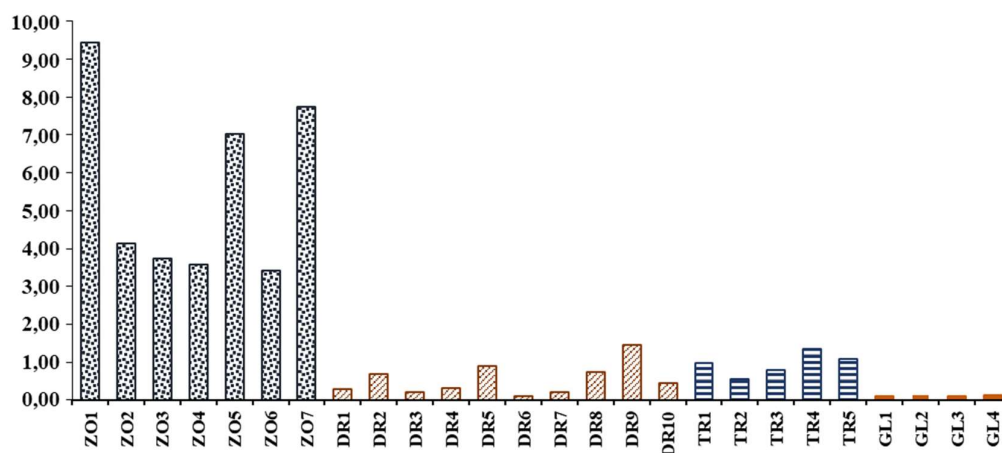
Na osnovu prikazanih rezultata (**Slika 24**), može se zaključiti da je metanol pokazao veću efikasnost u ekstrakciji ukupnih antocijanina u poređenju sa acetonom. TAC u metanolnim ekstraktima kretao se od 0,05 mg cij 3-glu/g smrznute mase u plodu žute maline (Yellow Meeker) do 0,97 mg cij 3-glu/g smrznute mase u plodu kupine (Čačanska bestrna). Kada je reč o uzorcima ploda maline, količina ukupnih antocijanina određena u okviru ovog istraživanja poklapa se sa rezultatima koje su objavili Lebedev i saradnici (Lebedev *i sar.* 2022). U metanolnim ekstraktima ploda maline sorte Willamette sa područja Valjeva i Zlatibora detektovane su najveće količine ukupnih antocijanina, 0,89 i 0,85 mg cij 3-glu/g smrznute mase uzorka, dok su acetonski ekstrakti ploda maline sorte Meeker sadržali najmanje količine antocijanina. Niske TAC vrednosti u ekstraktima ploda žute maline Yellow Meeker (0,02 i 0,05 mg cij 3-glu/g smrznute mase) bile su očekivane s obzirom da je plod ove sorte maline žute boje i u saglasnosti su analizom drugih sorti žutih malina (Lamichhane *i sar.* 2023). Vrednosti TAC određene za uzorke ploda kupine i jagode su slične literaturnim TAC vrednostima (Simonovic *i sar.* 2019). Međutim, sadržaj ukupnih antocijanina utvrđen u ekstraktu ploda duda je niži u poređenju sa podacima iz literature (Natić *i sar.* 2015).





**Slika 24.** Sadržaj ukupnih antocijanina u plodu gajenih jagodastih voćnih vrsta.

Među ispitivanim uzorcima plodova samoniklih vrsta voćaka zapaža se da najveću količinu ukupnih antocijanina imaju plodovi zove, čiji sadržaj je varirao od 3,42 mg do 9,43 mg cij 3-glu/g smrznute mase, dok su se ekstrakti ploda gloga pokazali kao najsiromašniji izvor ukupnih antocijanina sa prosečnom vrednošću od 0,12 mg cij 3-glu/g smrznute mase (**Slika 25**). U poređenju sa ranijim istraživanjima, uzorci ploda zove i gloga sadržali su slične količine ukupnih antocijanina (Česlová *i sar.* 2023). Prosečna vrednosti TAC dobijena za uzorke ploda crnog trna (0,95 mg cij 3-glu/g smrznute mase) je neznatno veća u odnosu na rezultate koje su objavili Ozzengin i saradnici (Ozzengin *i sar.* 2023). U plodu drena sadržaj ukupnih antocijanina je bio od 0,10 mg do 1,46 mg cij 3-glu/g smrznute mase. Ove vrednosti su u skladu sa literaturnim podacima zabeleženim za uzorke ploda drena prikupljene u različitim regionima Bosne i Hercegovine (Skender *i sar.* 2022), ali su niže od rezultata dobijenih za uzorke ploda drena iz Poljske (Szot *i sar.* 2019). Ova zapažanja se mogu objasniti činjenicom da varijacije u vrednostima ukupnih antocijanina mogu biti rezultat različitog geografskog porekla uzoraka, kao i različitog genotipa biljke.



**Slika 25.** Grafički prikaz sadržaja ukupnih antocijanina u plodu samoniklih voćnih vrsta (zova – ZO, dren – DR, crni trn – TR i glog – GL).

#### *Određivanje antocijanina u plodu gajenih jagodastih i samoniklih voćnih vrsta primenom tankoslojne hromatografije*

HPTLC predstavlja hromatografsku tehniku koja se često koristi za preliminarno ispitivanje kompleksnih uzoraka, kao što je biljni materijal. Ova tehnika pruža brze i pouzdane rezultate koji

dalje mogu biti korišćeni za detaljnije analize. Za hromatografsko razdvajanje antocijanina korišćene su tri različite stacionarne faze (celuloza, silika gel i oktadecil-modifikovan silika gel) i nekoliko različitih trokomponentnih i četvorokomponentnih smeša rastvarača kao mobilne faze. Izvedeni su brojni eksperimenti kako bi se odredio najoptimalniji sistem rastvarača i stacionarne faze, a primenjeni hromatografski sistemi su prikazani u **Tabeli 15**.

**Tabela 15.** Karakteristike hromatografskih sistema korišćenih pri razdvajanju antocijanina u ispitivanim uzorcima plodova gajenih jagodastih i samoniklih voćnih vrsta.

Sistem	Stacionarna faza	Mobilna Faza
I	Celuloza	<i>n</i> -Butanol - sirćetna kiselina - voda (4:1:5; v/v/v)
II	Celuloza	HCl (cc) - mravlja kiselina - voda (24:25:51; v/v/v)
III	Celuloza	<i>n</i> -Propanol - voda - sirćetna kiselina (4:2:1; v/v/v)
IV	Celuloza	Aceton - HCl - voda (121:21:57; v/v/v)
V	Celuloza	Mravlja kiselina - HCl - voda (6:1:5; v/v/v)
VI	Celuloza	Etil-acetat - sirćetna kiselina - voda (3:1:1; v/v/v)
VII	Celuloza	Sirćetna kiselina - HCl - voda (15:3:82; v/v/v)
VIII	Celuloza	Etil-acetat - piridin - voda (15:7:5; v/v/v)
IX	Silika gel	<i>n</i> -Butanol - sirćetna kiselina - voda (4:1:2; v/v/v)
X	Silika gel	Etil-acetat - izopropanol - voda (65:25:10; v/v/v)
XI	Silika gel	Etil-acetat - toluen - voda - mravlja kiselina (10:3:0,8:1,1; v/v/v/v)
XII	Silika gel	Etil-acetat - butanon - voda - mravlja kiselina (7:3:0,8:1,2; v/v/v/v)
XIII	Silika gel	Etil-acetat - aceton - voda - mravlja kiselina (7:3:0,8:1,2; v/v/v/v)
XIV	Silika gel	Etil-acetat - acetonitril - voda - mravlja kiselina (7:3:0,8:1,2; v/v/v/v)
XV	Silika gel	Etil-acetat - sirćetna kiselina - mravlja kiselina - voda (110:11:11:25; v/v/v/v)
XVI	Silika gel	Etil-acetat - acetonitril - mravlja kiselina - voda (5:3:1:1; v/v/v/v)
XVII	Silika gel	Etil-acetat - butanon - mravlja kiselina - voda (5:3:1:1; v/v/v/v)
XVIII	Silika gel	Etil-acetat - <i>n</i> -popanol - mravlja kiselina - voda (8,5:8,5:2:3; v/v/v/v)
XIX	Silika gel	<i>n</i> -Propanol - mravlja kiselina - voda (17:2:3; v/v/v)
XX	Silika gel	Benzen - etil-acetat (17:1; v/v)
XXI	Silika gel	Hloroform - mravlja kiselina - sirćetna kiselina (9:1:1; v/v/v)
XXII	Silika gel	Etil-acetat - mravlja kiselina - voda (17:2:5; v/v/v)
XXIII	Silika gel	<i>n</i> -Butanol - sirćetna kiselina - voda (4:1:5; v/v/v)
XXIV	Silika gel	Etil-acetat - mravlja kiselina - voda (17:2:3; v/v/v)
XXV	Silika gel	Izopropanol - mravlja kiselina - voda (17:2:3; v/v/v)
XXVI	Silika gel	Izopropanol - aceton - voda (70:10:20; v/v/v)
XXVII	Silika gel	Etil-acetat - butanon - mravlja kiselina-2M HCl (65:10:6:9; v/v/v/v)
XXVIII	Silika gel	Etil-acetat - voda - mravlja kiselina - HCl (85:8:6:1; v/v/v/v)
XXIX	Silika gel	Etil-acetat - mravlja kiselina - voda (17:2:5; v/v/v)
XXX	RP-18	Metanol - voda - TFA (4:6:0,5; v/v/v)
XXXI	RP-18	Metanol - voda - mravlja kiselina (40:60: 2; v/v/v)
XXXII	RP-18	Voda - <i>n</i> -propanol - mravlja kiselina (10:8:0,2; v/v/v)

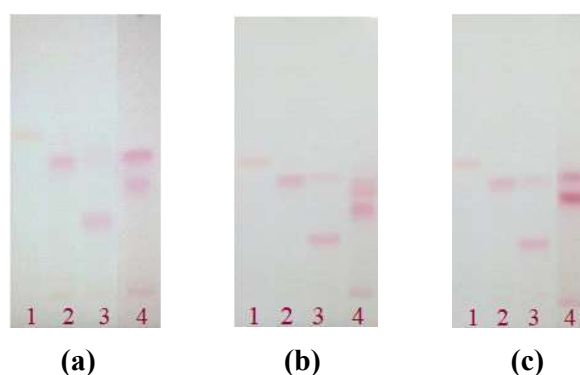
U prvoj fazi optimizacije hromatografskog sistema za razdvajanje antocijanina, na komercijalno dostupne ploče za tankoslojnu hromatografiju, ekstrakti plodova gajenih jagodastih vrsta voćaka su nanošeni ručno pomoću kapilara u vidu tačkastih traka. Prvobitno, razdvajanje antocijanina ispitano je na celulozi primenom osam različitih kombinacija mobilnih faza (**Tabela 15**). Vizuelnim pregledom hromatograma uočeno je da celuloza nije pogodan sorbent za proučavanje profila antocijanina u ekstraktima plodova gajenih jagodastih voćnih vrsta, s obzirom da je u većini sistema primećeno nepravilno kretanje mobilne faze, kao i zadržavanje antocijanina u blizini početnih zona.

U cilju dalje optimizacije hromatografskog ispitivanja antocijaninskog profila, primenjen je silika gel 60 F<sub>254</sub> kao stacionarna faza, uz korišćenje 21 mobilne faze (**Tabela 15**). Ipak, najveći broj primenjenih smeša rastvarača nije doveo do zadovoljavajućeg odvajanja antocijanina u ekstraktima plodova gajenih jagodastih vrsta voćaka. U nekim slučajevima, zone antocijanina su se kretale sa frontom rastvarača, dok u drugim sistemima zone nisu bile dovoljno jasno definisane. Primenom trokomponentne smeše rastvarača *n*-butanol – sirćetna kiselina – voda (4:1:5; v/v/v), uočeno je nešto bolje razdvajanje pojedinih zona antocijanina. Takođe, kao zadovoljavajuće mobilne faze za razdvajanje antocijanina u uzorcima plodova jagodastih vrsta gajenog voća pokazale su se pojedine četvorokomponentne smeše rastvarača, uključujući etil-acetat – aceton – voda – mravlja kiselina (7:3:0,8:1,2; v/v/v/v) i etil-acetat – acetonitril – voda – mravlja kiselina (7:3:0,8:1,2; v/v/v/v). Jasno razdvajanje zona antocijanina postignuto je primenom smeše rastvarača etil-acetat – sirćetna kiselina – mravlja kiselina – voda (110:11:11:25; v/v/v/v). Slično je dobijeno i primenom mobilne faze koja se sastojala od smeše etil-acetat – acetonitril – mravlja kiselina – voda (5:3:1:1; v/v/v/v), gde su zone antocijanina bile još jasnije definisane.

Zadovoljavajuće odvajanje antocijanina je postignuto i na oktadecil-modifikovanom silika gelu (RP-18) primenom trokomponentne smeše rastvarača metanol – voda – trifluorsirćetna kiselina (4:6:0,5; v/v/v). U ostalim hromatogramskim sistemima na RP-18 silika gelu, odvajanje zona nije bilo zadovoljavajuće.

U sledećoj fazi optimizacije, nanošenje uzoraka je vršeno automatski pomoću CAMAG Linomat 5, pri čemu su korišćene različite zapremine ekstrakata (5 – 20 µL), da bi se utvrdilo koje količine ekstrakata su optimalnije kako bi se dobile jasno vidljive zone antocijanina. Najizraženije zone primećene su pri nanošenju 10 µL ekstrakata ploda gajenih jagodastih vrsta voćaka.

Na osnovu dobijenih hromatograma, najbolje razdvajanje antocijanina iz ispitivanih ekstrakata plodova postignuto je primenom stacionarne faze silika gel i mobilne faze koju čini smeša rastvarača etil-acetat – sirćetna kiselina – mravlja kiselina – voda (110:11:11:25; v/v/v/v), (Sistem XV, **Tabela 15**). U cilju poboljšanja međusobnog odvajanja antocijanina i boljeg definisanja zona izvršena je modifikacija ovog hromatografskog sistema, odnosno promenjen je zapreminski udeo sirćetne i mravlje kiseline. U prvom slučaju mobilna faza je bila smeša etil-acetat – sirćetna kiselina – mravlja kiselina – voda (110:20:11:25; v/v/v/v), dok je u drugom slučaju korišćena smeše etil-acetat – sirćetna kiselina – mravlja kiselina – voda (110:11:20:25; v/v/v/v). Oba modifikovana hromatografska sistema su pokazala bolje rezultate u odnosu na Sistem XV (**Tabela 15**), pri čemu se sistem sa četvorokomponentnom smešom rastvarača EtOAc – CH<sub>3</sub>COOH – HCOOH – H<sub>2</sub>O (110:11:20:25; v/v/v/v) pokazao kao najpogodniji za hromatografsko odvajanje antocijanina iz ploda gajenih jagodastih voćnih vrsti, zbog boljeg i jasnijeg razdvajanja zona. Na **Slici 26a i 26b** prikazani su dobijeni hromatogrami, pri čemu su ekstrakti ispitivanih uzoraka nanošeni sledećim redosledom: (1) jagoda, (2) kupina, (3) malina i (4) dud.



**Slika 26.** Hromatogrami antocijaninskih profila ploda gajenih jagodastih voćnih vrsta dobijeni primenom sledećih sistema: (a) EtOAc – CH<sub>3</sub>COOH – HCOOH – H<sub>2</sub>O (110:20:11:25; v/v/v/v) na silika gelu 60 F<sub>254</sub>; (b) EtOAc – CH<sub>3</sub>COOH – HCOOH – H<sub>2</sub>O (110:11:20:25; v/v/v/v) na silika gelu 60 F<sub>254</sub> i (b) EtOAc – CH<sub>3</sub>COOH – HCOOH – H<sub>2</sub>O (110:11:20:25; v/v/v/v) na HPTLC silika gel 60 F<sub>254</sub>.

Nakon odabira optimalnog sistema, analiza antocijanina izvršena je na pločama visoke rezolucije (HPTLC silika gel 60 F<sub>254</sub>). Primenjena mobilna faza je delimično modifikovana u odnosu na mobilnu fazu korišćenu u ispitivanju antocijaninskog profila acai ploda (Rumalla *i sar.* 2012). Hromatogram dobijen primenom ovog sistema prikazan je na **Slici 26c**. Hromatogram pokazuje jasno izražene i definisane zone antocijanina, koje se razlikuju po intezitetu boje.

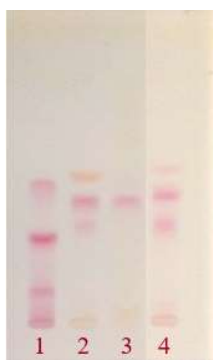
Vizuelnim upoređivanjem hromatograma (**Slika 26c**) uočene su sličnosti i razlike u antocijaninskim profilima u plodovima različitih vrsta gajenog jagodastog voća, koje se manifestuju kroz prisustvo ili odsustvo zona u analiziranim uzorcima. U nedostatku standarda nije bilo moguće uraditi tačnu identifikaciju i kvantifikaciju, ali na osnovu različitih inteziteta boja zona bilo je moguće odrediti antocijaninski profil u ispitivanim uzorcima. Da bi se uporedili antocijaninski profili ploda različitih vrsta gajenog jagodastog voća određeni su retardacioni faktori ( $R_F$  vrednosti), koji predstavljaju odnos pređenog puta, analita od polazne tačke do težišta hromatografske zone, i puta rastvarača, od polazne tačke do fronta rastvarača (**Tabela 16**). Na osnovu dobijenih rezultata ( $R_F$  vrednost i inteziteta boja), možemo zaključiti da ekstrakti ploda kupine, maline i duda najverovatnije sadrže isti antocijanin na  $R_F = 0,56$ . Takođe, na osnovu hromatograma, može se videti da uzorak ploda duda ima najintezivnije roze-ljubičaste zone (traka 4), što ukazuje da ovaj ekstrakt sadrži najveću količinu pojedinačnih antocijanina od svih ispitivanih uzoraka. U plodu jagode (traka 1) i kupine (traka 2) primećuje se prisustvo samo jedne zone, pri čemu je zona u ekstraktu ploda jagode narandžasto-crvene boje i ima najslabiji intezitet. Rezultati našeg istraživanja za uzorke plodova gajenih jagodastih vrsta voćaka su u saglasnosti sa literaturnim podacima (David *i sar.* 2014, Rollando *i sar.* 2019).

**Tabela 16.** Izračunate  $R_F$  vrednosti antocijanina u plodu gajenih jagodastih voćnih vrsta.

Uzorci	$R_F$
1. Jagoda	$R_{F1} = 0,6986$
2. Kupina	$R_{F1} = 0,5616$
3. Malina	$R_{F1} = 0,2877; R_{F2} = 0,5616$
4. Dud	$R_{F1} = 0,4109; R_{F2} = 0,5643$

Najefikasnije razdvajanje antocijanina u plodu samoniklih voćih vrsta postignuto je primenom istog sistema kao kod ekstrakata plodova gajenih jagodastih vrsta voćaka (stacionarna faza - HPTLC

silika gel 60 F<sub>254</sub> i mobilna faza - EtOAc – CH<sub>3</sub>COOH – HCOOH – H<sub>2</sub>O (110:11:20:25; v/v/v/v)). Dobijeni hromatogram prikazan je na **Slici 27**, a izračunate  $R_F$  vrednosti predstavljene su u **Tabeli 17**. Na osnovu analize hromatograma, može se zapaziti da plod zove (traka 1) ima tri najintezivnije zone koje su roze-ljubičaste boje, za kojim sledi plod drena (traka 2) i crnog trna (traka 4) sa istim brojem zona. U plodu gloga uočena je samo jedna zona antocijanina (traka 3), a njen slab intezitet boje ukazuje da plodovi gloga nisu bogat izvor antocijanina, što je potvrđeno i niskim sadržajem ukupnih antocijanina (**Slika 25**). Na osnovu  $R_F$  vrednosti ekstrakata ploda drena i gloga možemo pretpostaviti da ovi uzorci sadrže isti antocijanin ( $R_F = 0,48$ ). Takođe, na osnovu visokog sadržaja ukupnih antocijanina u plodu zove i karakteristikama antocijaninskog profila dobijenog primenom HPTLC tehnike, može se zaključiti da je plod zove bogat antocijaninima, što je očekivano s obzirom na njihovu intezivnu tamno ljubičastu boju.



**Slika 27.** Profil antocijanina u plodu samoniklih voćnih vrsta primenom mobilne faze EtOAc – CH<sub>3</sub>COOH – HCOOH – H<sub>2</sub>O (110:11:20:25; v/v/v/v) na HPTLC silika gel 60 F<sub>254</sub>.

**Tabela 17.** Izračunate  $R_F$  vrednosti antocijanina u plodu samoniklih voćnih vrsta.

Uzorci	$R_F$
1. Zova	$R_{F1} = 0,1408$ ; $R_{F2} = 0,3380$ ; $R_{F3} = 0,5493$
2. Dren	$R_{F1} = 0,3662$ ; $R_{F2} = 0,4789$ ; $R_{F3} = 0,5634$
3. Glog	$R_{F1} = 0,4788$
4. Crni trn	$R_{F1} = 0,4048$ ; $R_{F2} = 0,4930$ ; $R_{F3} = 0,6056$

#### *Određivanje antocijanina u plodu gajenih jagodastih i samoniklih voćnih vrsta primenom UHPLC-LTQ OrbiTrap XL*

U okviru dalje analize antocijanina u uzorcima plodova gajenih i samoniklih voćnih vrsta, identifikacija je urađena primenom UHPLC-LTQ OrbiTrap XL tehnike u pozitivnom režimu jonizacije. Identifikacija antocijanina izvršena je na osnovu  $M^+$  molekulskih jona i poređenjem njihovih fragmenata sa prethodno objavljenim literaturnim podacima.

U metanolnim ekstraktima plodova gajenih jagodastih vrsta voćaka identifikovani su derivati tri antocijanidina, cijanidina ( $m/z$  287), delfinidina ( $m/z$  303) i pelargonidina ( $m/z$  271), dok prisustvo aglikonskih oblika antocinajina nije utvrđeno. U **Tabeli 18** su prikazani podaci o identifikovanim antocijaninima: retenciono vreme ( $t_R$ ), molekulska formula, tačna masa, izračunata masa, odstupanje od tačne mase ( $\Delta$  mDa), MS/MS fragmenti i naziv identifikovanih jedinjenja. Ukupno je identifikovano 18 antocijanina u ekstraktima ploda maline, kupine, duda i jagode sa tačnošću mase do 5 mDa, pri čemu su cijanidin 3-*O*-heksozid i delfinidin 3-*O*-heksozid pronađeni u sva četiri ispitivana uzorka.

**Tabela 18.** Identifikovani antocijanini u plodu gajenih jagodastih voćnih vrsta u pozitivnom režimu jonizacije primenom UHPLC-LTQ OrbiTrap XL analize.

Redni broj	$t_R$ , min	Tačna masa, $M^+$	Molekulska formula	Izračunata masa, $M^+$	$\Delta$ mDa	MS/MS fragmenti	Identifikovana jedinjenja	Uzorci ploda gajenih jagodastih voćnih vrsta <sup>a</sup>
<b>Derivati cijanidina</b>								
1	5,29	757,21454	$C_{33}H_{41}O_{20}^+$	757,21857	4,03	611, 449, 287	Cijanidin 3- <i>O</i> -heks-heks-ram	M
2	5,31	611,15674	$C_{27}H_{31}O_{16}^+$	611,16066	3,92	449, 287	Cijanidin 3- <i>O</i> -heks-heks	M, K, D
3	5,43	581,14795	$C_{26}H_{29}O_{15}^+$	581,15065	2,70	419, 287	Cijanidin 3- <i>O</i> -pent-heks	M, K
4	5,47	595,16229	$C_{27}H_{31}O_{15}^+$	595,16575	3,46	449, 287	Cijanidin 3- <i>O</i> -heks-ram	M, D
5	5,48	741,22101	$C_{33}H_{41}O_{19}^+$	741,22366	2,65	595, 449, 287	Cijanidin 3- <i>O</i> -heks-ram-ram	M
6	5,49	449,10522	$C_{21}H_{21}O_{11}^+$	449,10784	2,62	287	Cijanidin 3- <i>O</i> -heks	Svi uzorci
7	5,65	565,15424	$C_{26}H_{29}O_{14}^+$	565,15518	0,94	419, 287	Cijanidin 3- <i>O</i> -pent-ram	M
8	5,69	433,11044	$C_{21}H_{21}O_{10}^+$	433,11292	2,48	287	Cijanidin 3- <i>O</i> -ram	M, K
9	5,81	419,09537	$C_{20}H_{19}O_{10}^+$	419,09727	1,90	287	Cijanidin 3- <i>O</i> -pent	M, K, D
<b>Derivati definidina</b>								
10	5,66	581,14972	$C_{26}H_{29}O_{15}^+$	581,15065	0,93	435, 303	Delfinidin 3- <i>O</i> -pent-ram	M
11	5,98	627,15198	$C_{27}H_{31}O_{17}^+$	627,15558	3,60	465, 303	Delfinidin 3- <i>O</i> -heks-heks	M, K
12	6,38	611,16003	$C_{27}H_{31}O_{16}^+$	611,16066	0,63	465, 303	Delfinidin 3- <i>O</i> -heks-ram	K, D
13	6,54	465,10049	$C_{21}H_{21}O_{12}^+$	465,10275	2,26	303	Delfinidin 3- <i>O</i> -heks	Svi uzorci
14	6,75	435,08777	$C_{20}H_{19}O_{11}^+$	435,09219	4,42	303	Delfinidin 3- <i>O</i> -pent	M, K
15	6,88	449,10413	$C_{21}H_{21}O_{11}^+$	449,10784	3,71	303	Delfinidin 3- <i>O</i> -ram	M
<b>Derivati pelargonidina</b>								
16	5,70	579,16785	$C_{27}H_{31}O_{14}^+$	579,17083	2,98	433, 271	Pelargonidin 3- <i>O</i> -heks-ram	M, D, J
17	7,48	433,11044	$C_{21}H_{21}O_{10}^+$	433,11292	2,48	271	Pelargonidin 3- <i>O</i> -heks	K, D, J
18	7,89	417,11609	$C_{21}H_{21}O_9^+$	417,11801	1,92	271	Pelargonidin 3- <i>O</i> -ram	M, K

<sup>a</sup> M - Malina; K - Kupina; D - Dud i J - Jagoda. Pent - pentozid, heks -heksozid, i ram - ramnozid

Ispitivanjem antocijaninskih profila ekstrakata plodova gajenih jagodastih vrsta voćaka utvrđene su značajne razlike između proučavanih vrsta. Najveći broj antocijanina, čak 16, identifikovan je u plodu maline sorte Meeker (M). Najzastupljeniji antocijanini u uzorku ploda maline bili su derivati cijanidina (9 derivata). U nedavnom istraživanju Wu-a i saradnika navedeno je prisustvo cijanidin 3-*O*-soforozida ( $m/z$  611,1) i cijanidin 3-*O*-glukozida ( $m/z$  449,1), koji su bili dominantni antocijanini u svim uzorcima ploda maline (Wu *i sar.* 2019). Identifikacija cijanidin 3-*O*-soforozida zasnivala se na fragmetnim jonima  $m/z$  449 i 287, koji su nastali kao rezultat gubitka heksozil grupe (-162,1 Da), pri čemu fragmetni jon na  $m/z$  287 odgovara aglikonskom jonu cijanidinu. Na osnovu ovih rezultata, u našem istraživanju, jedinjenje koje je identifikovano na  $t_R = 5,31$  min, sa istom masom ( $m/z$  611,1) i istim fragmentacionim putem, može se definisati kao cijanidin 3-*O*-soforozid. U istoj studiji (Wu *i sar.* 2019), identifikovan je cijanidin 3-*O*-soforozid-5-*O*-ramnozid ( $m/z$  757,2) sa MS/MS fragmentacionim jonima  $m/z$  644, 449 i 287, što možemo pretpostaviti da odgovara jedinjenju na  $t_R = 5,29$  min u našem istraživanju koje je pronađeno samo u plodu maline Meeker. U okviru našeg istraživanja dokazano je prisustvo još nekih derivata cijanidina, poput cijanidin 3-*O*-pentozil-heksozida ( $m/z$  581,1), cijanidin 3-*O*-heksozil-ramnozida ( $m/z$  595,1), cijanidin 3-*O*-heksozil-ramnozid-ramnozida ( $m/z$  741,1), cijanidin 3-*O*-pentozil-ramamnozida ( $m/z$  565,1), cijanidin 3-*O*-ramnozid ( $m/z$  433,1) i cijanidin 3-*O*-pentozida ( $m/z$  419,1). Na osnovu vrednosti inteziteta struja identifikovanih antocijanina prikazanih u **Tabeli P2**, možemo uočiti da su u plodu maline najdominantniji cijanidin 3-*O*-heksozid ( $t_R = 5,49$ ) i cijanidin 3-*O*-heksozilheksozid ( $t_R = 5,31$ ). Pored derivata cijanidina, u uzorku ploda maline identifikovano je 5 derivata delfinidina i 2 derivata pelargonidina (**Tabela 18**). Prema našim saznanjima, u ekstraktu ploda maline detektovan je samo delfinidin 3-*O*-heksozid, dok ostali derivati delfinidina nisu nađeni (Petruskevicius *i sar.* 2023), što je suprotno našim rezultatima, gde su identifikovani i delfinidin 3-*O*-pentozil-ramnozid, delfinidin 3-*O*-heksozil-heksozid, delfinidin 3-*O*-pentozid i delfinidin 3-*O*-ramnozid.

U ekstraktu ploda kupine (K) detektovano je 10 antocijanina, od toga pet derivata cijanidina, tri derivata delfinidina i dva heksozida pelargonidina. Wu i saradnici su identifikovali cijanidin 3-*O*-glukozid ( $m/z$  449), cijanidin 3-*O*-(6'-*O*-*p*-kumaroil)-glukozid ( $m/z$  593) i cijanidin 3-*O*-arabinozid ( $m/z$  419) kao najzastupljenije derivate cijanidina u plodu različitih sorti kupine (Wu *i sar.* 2022). Jedinjenje na  $m/z$  419,1 ( $t_R = 5,81$  min) identifikovano je na osnovu glavnog MS/MS fragmenta  $m/z$  287, koji pripada aglikonskom jonu cijanidina i može se označiti kao cijanidin 3-*O*-arabinozid s obzirom na isti fragmentacioni put i gubitak šećerne komponente arabinozida (-132 Da) (Wu *i sar.* 2022). Delfinidin 3-*O*-pentozid ( $t_R = 5,98$  min) sa  $m/z$  627,1 je detektovan na osnovu karakterističnih MS/MS fragmentacionih jona  $m/z$  465 i 303 koji su nastali gubitkom heksozil grupe (-162,1 Da). U plodu kupine najzastupljeniji antocijanini su cijanidin 3-*O*-heksozid ( $t_R = 5,49$ ) i cijanidin 3-*O*-pentozida ( $t_R = 5,81$ ), što je utvrđeno na osnovu visokih vrednosti inteziteta struja (**Tabela P2**).

Na osnovu masenih spektara, u ekstraktu ploda duda (D), potvrđeno je prisustvo 8 antocijanina: cijanidin 3-*O*-heksozil-heksozid, cijanidin 3-*O*-heksozil-ramnozid, cijanidin 3-*O*-heksozid, cijanidin 3-*O*-pentozid, delfinidin 3-*O*-heksozil-ramnozid, delfinidin 3-*O*-heksozid, pelargonidin 3-*O*-heksozil-ramnozid i pelargonidin 3-*O*-heksozid. Prisustvo ovih antocijanina potvrđeno je i u novijim istraživanjima u plodu različitih sorti duda (Kim i Lee 2020). Delfinidin 3-*O*-heksozil-ramnozid ( $t_R = 6,38$  min) sa osnovnim molekulskim jonom  $m/z$  611,1 identifikovan je pomoću karakterističnih MS/MS fragmenata  $m/z$  465 i 303, na osnovu kojih može biti definisan kao delfinidin 3-*O*-rutinozid (Kim i Lee 2020).

U plodu jagode (J), najzastupljeniji identifikovani antocijanini bili su derivati pelargonidina, od kojih su pronađeni pelargonidin 3-*O*-heksozid ( $m/z$  433,11) i pelargonidin 3-*O*-heksozil ramnozid ( $m/z$  579,1). Fragmentacijom jona  $m/z$  579,1 nastaju MS/MS fragmenti  $m/z$  433 i  $m/z$  271, što ukazuje na gubitak ramnozid (164,1 Da) i heksozil grupe (162,1 Da). Sličan put fragmentacije ima molekulski jon  $m/z$  433,1, pri čemu se formira intenzivan fragmentacioni jon  $m/z$  271, što odgovara aglikonskom jonu pelargonidina. U ranijim istraživanjima utvrđeno je da je u uzorcima ploda jagode glukoza dominantna heksozna grupa pelargonidina (Enomoto *i sar.* 2018). Na osnovu toga može se pretpostaviti da jon  $m/z$  433,11 pripada pelargonidin 3-*O*-glukozidu. U ekstraktu ploda jagode

identifikovani su i derivati cijanidina i delfinidina,  $m/z$  449,1 (cijanidin 3-*O*-heksozid) i  $m/z$  465,1 (delfinidin 3-*O*-heksozid). Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa literaturnim podacima (Enomoto *i sar.* 2018).

U plodu samoniklih voćnih vrsta, zove (ZO), drena (DR), crnog trna (TR) i gloga (GL), identifikovano je ukupno 16 antocijanina (**Tabela 19**). Najveći broj detektovanih antocijanina su derivati cijanidina (7 derivata), a pored njih utvrđeno je prisustvo po tri derivata delfinidina, pelargonidina i peonidina. Cijanidin 3-*O*-heksozid ( $m/z$  449,1) je identifikovan u svim ispitivanim uzorcima plodova samoniklih vrsta voćaka.

U ekstraktima ploda zove (ZO) identifikovano je 12 jedinjenja, pri čemu nisu detektovani cijanidin 3-*O*-pentozid ( $m/z$  419,1), delfinidin 3-*O*-heksozid ( $m/z$  465,1), peonidin 3-*O*-heksozil-ramnozid ( $m/z$  609,1) i peonidin 3-*O*-pentozid ( $m/z$  433,1). Na osnovu vrednosti inteziteta struja (**Tabela 3P**), najzastupljeniji antocijanini u plodu zove su cijanidin 3-*O*-heksozid ( $m/z$  449,1) i cijanidin 3-*O*-pentozil-heksozid ( $m/z$  581,1). Prema literaturnim podacima, derivati cijanidina su najzastupljeniji antocijanini prisutni u plodu zove (Zorzi *i sar.* 2020b), što je u saglasnosti sa našim rezultatima. Kao najdominatniji derivat delfinidina identifikovan je delfinidin 3-*O*-heksozil-ramnozid ( $m/z$  611,1), sa odgovarajućim karakterističnim MS/MS fragmenatima  $m/z$  465 i 303. U uzorku ploda zove detektovana su sva tri derivata pelargonidina. Nihova identifikacija zasnivala se na fragmetnom jonu  $m/z$  271, koji je karakterističan za aglikonski jon pelargonidina. Takođe, na osnovu vrednosti intenziteta struja, možemo uočiti da je pelargonidin 3-*O*-pentozil-heksozid ( $t_R = 5,80$  min) sa molekulskim jonom  $m/z$  565,1 najzastupljeniji derivat pelargonidina (**Tabela 3P**), što odgovara literaturnim podacima (Zorzi *i sar.* 2020b). Jedinjenje na  $t_R = 5,97$  min sa karakterističnim  $[M+H]^+$  jonom  $m/z$  463,1, označen je kao peonidin 3-*O*-heksozid, koji gubitkom heksozil grupe (- 162 Da) daje MS/MS fragmentacioni jon  $m/z$  301 koji pripada aglikonskom jonu peonidina. Ovo jedinjenje je jedini derivat peonidina koji je identifikovan u plodu zove, što je u saglasnosti sa nedavnim istraživanjem Zorzi-a i saradnika (Zorzi *i sar.* 2020b).

Na osnovu masenih spektara, u ekstraktu ploda drena (DR) pronađen je isti broj antocijanina (12 jedinjenja) kao i u plodu zove (**Tabela 19**). U plodu drena može se uočiti prisustvo 7 derivata cijanidina i 3 derivata delfinidina. Od derivata cijanidina, najzastupljeniji je cijanidin 3-*O*-heksozid ( $t_R = 5,67$  min) sa molekulskim jonom  $m/z$  449,1, što je zaključeno na osnovu vrednosti inteziteta struja (**Tabela 3P**) i u saglasnosti je sa rezultatima u skorijim istraživanjima (Zorzi *i sar.* 2020b). U okviru navedenog istraživanja, cijanidin 3-*O*-pentozid ( $m/z$  419,1), delfinidin 3-*O*-heksozid ( $m/z$  465) i delfinidin 3-*O*-pentozid ( $m/z$  435), detektovani su u manjem procentu u odnosu na najzastupljeniji cijanidin 3-*O*-heksozid ( $m/z$  449,1). Prisustvo prethodno navedenih jedinjenja potvrđeno je i u našem ekstraktu ploda drena, pri čemu je umesto delfinidin 3-*O*-pentozid detektovan delfinidin 3-*O*-heksozil-ramnozid ( $m/z$  611,1). Delfinidin 3-*O*-heksozid ( $t_R = 5,83$  min) sa molekulskim jonom  $m/z$  465 pronađen je samo u plodu drena. Sa aglikonskim jonom  $m/z$  271, jedinjenja na  $t_R = 5,83$  i 5,86 min pronađena u ispitivanom ekstraktu ploda drena, identifikovana su kao derivati pelargonidina. Na osnovu karakterističnih MS/MS fragmenata, definisani su kao pelargonidin 3-*O*-heksozil-ramnozid ( $m/z$  579,1) i pelargonidin 3-*O*-heksozid ( $m/z$  433,1). Derivati peonidina nisu detektovani u plodu drena, što je u saglasnosti sa istraživanjima (Aurori *i sar.* 2023).



**Tabela 19.** Identifikovani antocijanini u plodu samoniklih voćnih vrsta u pozitivnom jonizacionom modu primenom UHPLC-LTQ OrbiTrap XL analize.

Redni broj	t <sub>R</sub> , min	Tačna masa, M <sup>+</sup>	Molekulska formula, M <sup>+</sup>	Izračunata masa, M <sup>+</sup>	Δ mDa	MS/MS Fragmenti (% osnovnog pika)	Identifikovana jedinjenja	Uzorci ploda samoniklih voćnih vrsta <sup>a</sup>
<b>Derivati cijanidina</b>								
1	5,29	611,15582	C <sub>27</sub> H <sub>31</sub> O <sub>16</sub> <sup>+</sup>	611,16066	4,84	449(100), 287(80)	Cijanidin 3- <i>O</i> -heks-heks	ZO, DR, TR
2	5,58	581,14587	C <sub>26</sub> H <sub>29</sub> O <sub>15</sub> <sup>+</sup>	581,15065	4,78	287(100)	Cijanidin 3- <i>O</i> -pent-heks	ZO, DR, TR
3	5,62	595,16205	C <sub>27</sub> H <sub>31</sub> O <sub>15</sub> <sup>+</sup>	595,16575	3,70	449(10), 287(100)	Cijanidin 3- <i>O</i> -heks-ram	ZO, DR, TR
4	5,67	449,10507	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>11</sub> <sup>+</sup>	449,10784	2,77	287(100)	Cijanidin 3- <i>O</i> -heks	Svi uzorci
5	5,91	419,09424	C <sub>20</sub> H <sub>19</sub> O <sub>10</sub> <sup>+</sup>	419,09727	3,03	287(100)	Cijanidin 3- <i>O</i> -pent	DR, TR, GL
6	6,84	595,16217	C <sub>27</sub> H <sub>31</sub> O <sub>15</sub> <sup>+</sup>	595,16575	3,58	449(20), 287(100)	Cijanidin 3- <i>O</i> -heks-ram	ZO, DR, TR
7	7,03	449,10471	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>11</sub> <sup>+</sup>	449,10784	3,13	287(100)	Cijanidin 3- <i>O</i> -heks	Svi uzorci
<b>Derivati delfinidina</b>								
8	5,41	465,09985	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>12</sub> <sup>+</sup>	465,10275	2,90	303(100)	Delfinidin 3- <i>O</i> -heks	DR
9	6,53	611,15698	C <sub>27</sub> H <sub>31</sub> O <sub>16</sub> <sup>+</sup>	611,16066	3,68	465(20), 303(100)	Delfinidin 3- <i>O</i> -heks-ram	ZO, DR, TR
10	6,73	465,09952	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>12</sub> <sup>+</sup>	465,10275	3,23	303(100)	Delfinidin 3- <i>O</i> -heks	ZO, DR, TR
<b>Derivati pelargonidina</b>								
11	5,80	565,15179	C <sub>26</sub> H <sub>29</sub> O <sub>14</sub> <sup>+</sup>	565,15518	3,39	271(100)	Pelargonidin 3- <i>O</i> -pent-heks	ZO, TR
12	5,83	579,16742	C <sub>27</sub> H <sub>31</sub> O <sub>14</sub> <sup>+</sup>	579,17083	3,41	433(10), 271(100)	Pelargonidin 3- <i>O</i> -heks-ram	ZO, DR
13	5,86	433,11026	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>10</sub> <sup>+</sup>	433,11292	2,66	271(100)	Pelargonidin 3- <i>O</i> -heks	ZO, DR, TR
<b>Derivati peonidina</b>								
14	5,94	609,17682	C <sub>28</sub> H <sub>33</sub> O <sub>15</sub> <sup>+</sup>	609,18140	4,58	463(20), 301(100)	Peonidin 3- <i>O</i> -heks-ram	TR
15	5,97	463,12006	C <sub>22</sub> H <sub>23</sub> O <sub>11</sub> <sup>+</sup>	463,12349	3,43	301(100)	Peonidin 3- <i>O</i> -heks	ZO, TR
16	6,28	433,10999	C <sub>20</sub> H <sub>19</sub> O <sub>9</sub> <sup>+</sup>	433,11292	2,93	301(100)	Peonidin 3- <i>O</i> -pent	TR

<sup>a</sup> ZO – Zova; DR – Dren; TR – Crni tm i GL – Glog. Pent – pentozyd, heks -heksozid, i ram – ramnozyd.

Najveći broj identifikovanih antocijanina pronađen je u ekstraktu ploda crnog trna (TR), čak 14 jedinjenja. Detektovani su derivati cijanidina i peonidina, pri čemu je najdominantniji peonidin 3-*O*-heksozil-ramnozid ( $m/z$  609,1) sa najvećom vrednošću inteziteta struje, za kojim sledi cijanidin 3-*O*-heksozil-ramnozid ( $m/z$  595,1) (**Tabela 3P**), što je u saglasnosti sa novijim istraživanjima (Leichtweis *i sar.* 2022). Derivati peonidina, poput peonidin 3-*O*-heksozil-ramnozida ( $t_R = 5,94$  min) i peonidin 3-*O*-pentozida ( $t_R = 6,28$  min) detektovani su samo u plodu crnog trna. Identifikacija ovih derivata peonidina zasnovana je na specifičnom MS/MS fragmentacionom jonu  $m/z$  301, koji pripada aglikonskom jonu peonidina. U ispitivanom uzorku ploda crnog trna nađena su i dva derivata pelargonidina. Jedinjenje na  $t_R = 5,80$  min ( $m/z$  565,1) identifikovano je na osnovu glavnog MS/MS fragmentacionom jona  $m/z$  271, koji je nastao gubitkom pentozil jona (- 132 Da) i heksozil jona (- 162 Da), označeno je kao pelargonidin 3-*O*-pentozil-heksozid. Prisustvo pelargonidin 3-*O*-heksozida ( $m/z$  433,1) u plodu crnog trna već je prijavljeno u ranijim istraživanjima (Mikulic-Petkovsek *i sar.* 2016), što je u saglasnosti sa našim rezultatima. Nistor i saradnici (Nistor *i sar.* 2023), detektovali su delfinidin 3-*O*-heksozid, koji je identifikovan i u našem uzorku ploda crnog trna. Međutim, prema našim saznanjima delfinidin 3-*O*-heksozil-ramnozid ( $t_R = 6,53$  min) sa molekulskim jonom  $m/z$  611,1 je prvi put identifikovan u okviru našeg ispitivanja antocijaninskog profila ploda crnog trna.

Na osnovu rezultata masenih spektara (**Tabele 19 i 3P**), može se uočiti da plod gloga (GL) nije bogat antocijaninima, što se može potvrditi i niskim sadržajem ukupnih antocijanina. U ekstraktu ploda gloga identifikovani su samo derivati cijanidina, poput cijanidin 3-*O*-heksozida ( $m/z$  449,1) i cijanidin 3-*O*-pentozid ( $m/z$  419,1). U radu Mraihi i saradnika (Mraihi *i sar.* 2015), crvena boja ploda gloga povezana je sa identifikacijom dva antocijanina, cijanidin 3-*O*-glukozida ( $m/z$  449) i cijanidin 3-*O*-arabinozida ( $m/z$  419) sa karakterističnim MS/MS fragmentacionim jonom  $m/z$  287, koji odgovara aglikonskom jonu cijanidina. Na osnovu sličnog puta fragmentacije i dobijenih MS/MS fragmentata, možemo pretpostaviti da su i u našem uzorku ploda gloga prisutni cijanidin 3-*O*-glukozid i cijanidin 3-*O*-arabinozid.

Rezultati našeg istraživanja su pokazali da se tankoslojna hromatografija, koja je brža i ekonomičnija metoda u odnosu na UHPLC-LTQ OrbiTrap XL, može koristiti u preliminarnim istraživanjima antocijaninskog profila uzoraka plodova gajenih jagodastih i samoniklih voćnih vrsta. Tankoslojna hromatografija omogućava razdvajanje različitih antocijanina prisutnih u uzorcima plodova, a karakterističan izgled hromatograma može biti od koristi u definisanju biološkog porekla tih uzoraka i određivanju njihove pripadnosti određenoj biljnoj vrsti. S druge strane, za detaljniju analizu i identifikaciju pojedinačnih antocijanina, u nedostatku standarda, UHPLC-LTQ OrbiTrap XL predstavlja superiorniju metodu u odnosu na TLC. Ova metoda omogućava poređenje jedinjenja na osnovu tačne mase i fragmentacije, na osnovu čega je moguće izvršiti identifikaciju mnogo većeg broja jedinjenja. Takođe, maseni spektri dobijeni primenom UHPLC-LTQ OrbiTrap XL metode, mogu se detaljnije porediti na osnovu vrednosti inteziteta struja, gde se može zaključiti koji antocijanini su dominantni u određenom uzorku ploda.

#### 4.2. Sadržaj glukoze, fruktoze i saharoze u plodu gajenih voćnih vrsta

Ukus ploda voćki u velikoj meri zavisi od koncentracije pojedinačnih šećera i njihovog međusobnog odnosa. U okviru našeg istraživanja, primenom HPLC-PAD tehnike identifikovana su i kvantifikovana tri najzastupljenija šećera prisutna u plodovima svake vrste jagodastog voća - fruktoza, glukoza i saharoza. U svim analiziranim plodovima, fruktoza je bila najzastupljeniji šećer, pokazujući kvantitativne vrednosti u opsegu od 25,27 mg/g do 47,91 mg/g, zatim sledi glukoza sa koncentracijama koje se kreću između 20,94 mg/g i 42,87 mg/g (**Tabela 20**), što je u saglasnosti sa objavljenim rezultatima (Martins *i sar.* 2023). Najviši nivo fruktoze i glukoze zabeleženi su u plodu maline sorte Meeker. Redukujući šećeri, poput glukoze i fruktoze, prisutni su u gotovo jednakim koncentracijama, dok su koncentracije saharoze značajno niže. Ovo ukazuje na moguću hemijsku ili enzimsku hidrolizu saharoze u određenim uzorcima. Sadržaj saharoze u ispitivanim uzorcima bio je u opsegu koncentracija od 1,07 mg/g (u plodu jagode sorte Clery) do 18,96 mg/g (u plodu maline

sorte Willamette, Arilje). Takođe, način čuvanja može znatno da utiče na sadržaj saharoze. Prethodna istraživanja su pokazala značajno smanjenje količine saharoze u plodu jagode tokom skladištenja na niskim temperaturama od  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . S obzirom da saharoza nije bila detektovana u plodu kupine i duda, pretpostavlja se da se ovaj trend odnosi i na naše uzorke koji su takođe čuvani na niskim temperaturama (Milosavljević *i sar.* 2023). Najniži sadržaj ukupnih šećera pronađen je u plodu kupine ( $49,87\text{ mg/g}$ ), što je dvostruko niže od vrednosti koje su nađene u plodu maline sorte Meeker ( $99,96\text{ mg/g}$ ). U studiji objavljenoj nekoliko godina kasnije u odnosu na naše istraživanje, u plodu kupine iste sorte (Čačanska bestrna) ispitivan je sadržaj pojedinačnih šećera i dobijene vrednosti su u skladu sa našim rezultatima (Karaklajic-Stajic *i sar.* 2023).

**Tabela 20.** Sadržaj pojedinačnih i ukupnih šećera u plodu gajenih jagodastih voćnih vrsta (mg/g).

	Glukoza	Fruktoza	Saharoza	Ukupni šećeri
<b>Malina</b>				
Willamette (Arilje)	$31,59 \pm 0,15$	$37,54 \pm 0,45$	$18,96 \pm 0,21$	$88,09 \pm 0,52$
Willamette (Zlatibor)	$20,94 \pm 0,20$	$25,27 \pm 0,13$	$9,27 \pm 0,12$	$55,48 \pm 0,27$
Willamette (Valjevo)	$23,32 \pm 0,24$	$32,56 \pm 0,34$	$6,02 \pm 0,13$	$61,90 \pm 0,44$
Meeker	$42,87 \pm 0,26$	$47,91 \pm 0,37$	$9,18 \pm 0,09$	$99,96 \pm 0,46$
Yellow Meeker	$42,52 \pm 0,53$	$46,72 \pm 0,19$	$6,25 \pm 0,11$	$95,49 \pm 0,57$
Tulameen	$22,71 \pm 0,16$	$27,81 \pm 0,27$	$5,71 \pm 0,06$	$56,23 \pm 0,32$
<b>Kupina</b>				
Čačanska bestrna	$23,93 \pm 0,27$	$25,94 \pm 0,20$	n.d.	$49,87 \pm 0,34$
<b>Dud</b>				
<i>Morus nigra</i>	$25,54 \pm 0,10$	$27,45 \pm 0,17$	n.d.	$52,99 \pm 0,20$
<b>Jagoda</b>				
Clery	$30,33 \pm 0,10$	$35,04 \pm 0,35$	$1,07 \pm 0,07$	$66,44 \pm 0,37$

n.d. – nije detektovano

### 4.3. Elementalni sastav ploda gajenih voćnih vrsta

Poznato je da različiti faktori, kao što su tip zemljišta, upotreba đubriva, klimatski uslovi, postupak navodnjavanja, faza zrelosti i biološko poreklo biljke, utiču na varijabilnost u elementarnom sastavu. Biljke apsorbiraju metale iz zemlje tokom svog razvoja. Budući da se metali ne razgrađuju u prirodi, konzumiranje ploda i lista različitih biljnih vrsta može rezultovati povećanim unosom metala kod ljudi, što može izazvati ozbiljne zdravstvene probleme. Cink, bakar, gvožđe, hrom i kobalt su esencijalni elementi koji postaju toksični tek pri visokim koncentracijama, stoga je važno pratiti sastav metala u zemljištu i određenim biljnim organima (plod, list) (Skrovankova *i sar.* 2022).

Sadržaj minerala, u devet uzoraka plodova gajenih jagodastih voćnih vrsta, određen je primenom ICP-OES tehnike, pri čemu je kvantifikovano 18 elemenata, a sadržaj pojedinačnih elemenata je prikazan kao mg elementa po 1 kg smrznutog ploda (**Tabela 21**). Među makronutrijentima, kalijum (K) je imao najvišu koncentraciju u svim ispitivanim plodovima gajenih jagodastih voćnih vrsta sa sadržajem koji se kretao od  $746,336\text{ mg/kg}$  u plodu kupine sorte Čačanska bestrna do  $1702,325\text{ mg/kg}$  u plodu duda sorte *Morus nigra*. U plodu crvene maline sorte Meeker, Tulameen i Willamette, prosečna vrednost K iznosila je  $1167,878\text{ mg/kg}$ , dok je u plodu žute maline (Yellow Meeker) vrednost K bila  $1503,053\text{ mg/kg}$ , što je u skladu sa rezultatima objavljenim u nedavnom istraživanju (Akimov *i sar.* 2021). Literaturni podaci takođe potvrđuju da razlike u

akumulaciji K u plodovima malina zavise od sorte maline, ali i od boje ploda (Motyleva *i sar.* 2022). Imajući u vidu da je kalijum ključan za razvoj biljaka, visok sadržaj ovog esencijalnog makroelementa u plodu jagodastih vrsta voćaka je očekivan. Pored kalijuma, pronađene su i značajne količine kalcijuma (Ca) i magnezijuma (Mg) u svih devet uzoraka polodova jagodastih voćnih vrsta. Sadržaj Ca bio je u opsegu od 182,799 mg/kg do 338,846 mg/kg u plodu maline (Yellow Meeker) i duda (*Morus nigra*), redom. Srednje vrednosti minerala u svim uzorcima ploda maline, prikazane u opadajućem nizu: K > Ca > Mg > Mn > Fe > Na > Zn > Al > B > Cu > Ni > Li > Co > Cr > Pb > Cd > Hg > As, pokazuju sličan trend kao u istraživanjima ploda malina sorte Willamette i Meeker iz južnog dela Srbije (Jevremović *i sar.* 2023).

Mikroelementi su ključni za različite metaboličke procese, enzimske funkcije, hormonalnu regulaciju i održavanje opšteg zdravlja, pri čemu su dovoljni u malim količinama u poređenju sa makroelementima. Nedostatak ili višak određenih mikroelemenata može dovesti do različitih zdravstvenih problema, stoga je važno odrediti njihov sadržaj u biljnim vrstama koje se koriste u ishrani ljudi. U ispitivanim uzorcima plodova gajenih jagodastih voćnih vrsta, najzastupljeniji mikroelementi bili su mangan (Mn), gvožđe (Fe) i cink (Zn). Kao jedan od važnijih mikroelemenata u ishrani ljudi, Fe je u najvećim koncentracijama kvantifikovan u plodu maline sorte Willamette sa područja Valjeva (15,892 mg/kg), dok je najniži sadržaj pronađen u plodu duda iz centralnog dela Beograda (0,150 mg/kg). S obzirom da biljke akumuliraju metale iz okoline, dobijeni rezultati mogu biti dodatni pokazatelj uticaja podneblja na kom je biljka rasla na njen mineralni profil. Pokazano je da plod maline može biti dragocen izvor gvožđa, čiji viši sadržaj pozitivno utiče na sprečavanje anemije i pomaže pri transportu i skladištenju kiseonika.

Toksični elementi (živa, olovo i kadmijum) u analiziranim ekstraktima plodova su detektovani u malim količinama, koje se nalaze unutar dozvoljenih koncentracija (Commission regulation 2001). Jedini izuzetak je bio sadržaj olova u ekstraktu ploda duda, gde je pronađena koncentracija od 0,541 mg/kg, dok je dozvoljena količina 0,2 mg/kg ploda. Ovaj rezultat može biti posledica toga što su uzorci ploda duda ubrani u centru grada. Arsen nije bio prisutan u ispitivanim plodovima gajenih jagodastih voćnih vrsta.

Poređenje naših rezultata sa literaturnim podacima pokazuje da su kvantifikovane količine minerala u saglasnosti sa rezultatima koje su dobili Golovinskaia i saradnici (Golovinskaia i Wang 2021), što ukazuje na to da uzorci plodova gajenih jagodastih vrsta voćaka iz Srbije sadrže značajne količine esencijalnih elemenata.

**Tabela 21.** Količina minerala u plodu gajenih jagodastih voćnih vrsta (mg/kg).

	Al	B	Ca	Cd	Co	Cr	Cu	Fe	K	Li	Mg	Mn	Na	Ni	Pb	Zn	As	Hg
<b>Malina</b>																		
Willamette (Arilje)	1,654	0,267	208,489	0,040	0,185	0,039	0,973	4,228	1242,028	n.d.	170,717	30,652	2,708	0,677	0,006	2,253	n.d.	0,003
Willamette (Zlatibor)	n.d.	1,480	212,950	0,045	0,117	0,047	0,733	3,002	849,787	0,133	148,312	22,585	0,099	0,482	0,038	2,462	n.d.	0,006
Willamette (Valjevo)	3,158	3,742	273,126	0,029	n.d.	0,152	1,584	15,892	1447,460	0,190	340,370	16,168	9,541	0,936	0,021	5,257	n.d.	0,005
Meeker	0,517	0,409	237,755	0,019	0,012	0,019	1,325	4,385	1046,424	n.d.	171,074	6,253	2,285	0,528	0,047	2,284	n.d.	0,002
Yellow Meeker	0,747	n.d.	182,799	0,032	0,035	0,029	1,444	7,453	1503,053	n.d.	246,031	18,852	5,298	0,947	0,030	3,603	n.d.	0,002
Tulameen	5,623	2,055	211,944	0,019	0,087	0,050	1,336	5,995	1253,691	0,002	182,110	26,499	8,334	0,476	0,087	2,767	n.d.	0,002
<b>Kupina</b>																		
Čačanska bestrna	0,525	3,340	301,890	0,011	n.d.	0,072	1,434	6,584	746,336	0,209	189,858	19,934	3,842	0,585	0,020	2,785	n.d.	0,002
<b>Dud</b>																		
<i>Morus nigra</i>	2,630	2,401	338,846	0,014	n.d.	0,040	n.d.	0,150	1702,325	0,005	174,569	2,212	n.d.	0,498	0,541	4,441	n.d.	0,002
<b>Jagoda</b>																		
Clery	5,859	2,316	222,440	0,017	n.d.	0,035	n.d.	0,306	908,940	0,006	150,011	6,358	n.d.	0,159	0,059	0,720	n.d.	0,004

n.d. – nije detektovano

## 5. ZAKLJUČAK

U okviru ove doktorske disertacije, istraživanja su obuhvatila uzorke različitih vrsta i sorti prikupljenih sa više lokaliteta u Srbiji, kako bi se ustanovili optimalni uslovi ekstrakcije i omogućila fitohemijska karakterizacija uzoraka, sa ciljem određivanja važne klase jedinjenja, polifenola. Imajući u vidu da zamrzavanje plodova voćaka predstavlja efikasan način očuvanja njihovog kvaliteta i hranljive vrednosti, okarakterisani su uzorci smrznutog ploda gajene maline, kupine, duda, jagode, i ploda samonikle zove, drena, crnog trna i gloga. S obzirom da se listovi voćnih vrsta već dugo koriste u tradicionalnoj medicini, ispitana su hemijska svojstva lista gajene maline i kupine. Analitički postupci koji su razvijeni u okviru ovog istraživanja, omogućili su da se identifikuje prisustvo brojnih jedinjenja za koje se smatra da poseduju antioksidativni potencijal. Pojedina jedinjenja iz klase flavonoida su prvi put detektovana u okviru prikazanih istraživanja. U cilju dobijanja podataka o antioksidativnom kapacitetu ispitivanih uzoraka primenjeni su *in vitro* antioksidativni testovi zasnovani na različitim mehanizmima neutralizacije slobodnih radikala. Važan deo istraživanja bio je posvećen ispitivanju sadržaja elaginske kiseline, kao dominantne fenolne kiseline, dok je za ispitivane plodove gajenih i samoniklih voćnih vrsta razvijen jedinstven analitički postupak za hromatografsko odvajanje i određivanje profila antocijanina, važne klase biljnih pigmenata.

Prvenstveno su optimizovani uslovi ekstrakcije polifenola, a postupak ekstrakcije je prilagođen tipu uzorka. Očekivano, rezultati su potvrdili uticaj primenjenog ekstrakcionog sredstva na sadržaj ukupnih polifenola, ukupnih antocijanina, elaginske kiseline, kao i na antioksidativni kapacitet. Aceton sa dodatkom 1% HCl se pokazao kao bolje ekstrakciono sredstvo za određivanje sadržaja ukupnih polifenola, ukupne elaginske kiseline i antioksidativnog kapaciteta, dok je zakiseljeni metanol pokazao veću efikasnost u ekstrakciji antocijanina.

Za studije autentičnosti naročito značaj imali su rezultati koji su ukazali na prisustvo fenolnih jedinjenja specifičnih za određenu biljnu vrstu i sortnu pripadnost. Primenom UHPLC-LTQ OrbiTrap XL masene spektrometrije identifikovano je 35 fenolnih jedinjenja u plodu i 83 polifenola u listu gajenih jagodastih voćnih vrsta. Upotrebom UHPLC-DAD MS/MS tehnike kvantifikovano je 14 polifenola u plodu i 23 fenolnih jedinjenja u listu gajenih jagodastih voćnih vrsta, dok je u ekstraktima plodova samoniklih voćnih vrsta određen sadržaj 20 polifenola.

Među ispitivanim ekstraktima plodova gajenih jagodastih voćnih vrsta, u plodu kupine sorte **Čačanska bestrna** utvrđen je najveći sadržaj ukupnih polifenola, ukupnih antocijanina, kao i najveći antioksidativni kapacitet. Ispitivanje sadržaja elaginske kiseline ukazalo je na jedinstvena hemijska svojstva ploda žute maline sorte **Yellow Meeker**, u kojoj je pokazana najveća količina slobodne elaginske kiseline, dok je najveći sadržaj ukupne elaginske kiseline pronađen u plodu crvene maline sorte **Meeker**. Plodovi gajenih jagodastih vrsta voćaka okarakterisani su i sadržajem drugih fenolnih kiselina, pri čemu su kvantifikovane značajne količine galne, hlorogene, protokatehinske, kofeinske i *p*-kumarinske kiseline. U uzorcima plodova gajenih voćnih vrsta su nađene niske koncentracije flavonoida, međutim važno je istaći da su po prvi put detektovani hrizin, galangin, naringenin i pinocembrin. Istovremeno sa detekcijom fenolnih jedinjenja ispitivana je i *cis,trans*-apscisinska kiselina, koja predstavlja inhibitorski hormon sa različitim metaboličkim funkcijama u biljkama. Njeno prisustvo utvrđeno je u svim ekstraktima plodova gajenih voćnih vrsta, pri čemu je najveći sadržaj detektovan u plodu maline sorte **Yellow Meeker**. Pored polifenola i pomenutih sekundarnih metabolita, u okviru ove disertacije, određen je sadržaj glukoze, fruktoze i saharoze u uzorcima plodova gajenih jagodastih vrsta voćaka. Najveća količina ovih šećera kvantifikovana je u plodu maline sorte **Meeker**. Dobijeni rezultati multielementalne analize su bili očekivani i pokazali su da je kalijum najzastupljeniji element u svim ispitivanim uzorcima, a takođe je utvrđeno da je plod gajenih jagodastih voćnih vrsta dobar izvor Ca, Mg, Fe, Mn i Zn.

Rezultati ispitivanja lista gajene maline i kupine ukazali su na najveći sadržaj ukupnih polifenola, kao i najbolju sposobnost u neutralizaciji superoksid anjon radikala i izrazit redukcionni potencijal lista maline sorte **Meeker**. List kupine sorte **Čačanska bestrna** imao je najbolju

sposobnost neutralisanja DPPH radikala i sposobnost heliranja jona gvožđa. Utvrđena je značajna korelacija između sadržaja ukupnih polifenola i sposobnosti neutralizacije superoksid anjon radikala, što ukazuje da polifenoli doprinose neutralisanju ovog radikala. Ipak, na antioksidativni kapacitet mogu uticati i druga fitohemijska jedinjenja, što je potvrđeno slabom korelacijom sadržaja ukupnih polifenola i sposobnosti heliranja jona gvožđa, kao i nepostojanjem korelacije između TPC vrednosti i redukcionog potencijala. Profil kvantifikovanih fenolnih kiselina i flavonoida ekstraktata lista maline i kupine se u velikoj meri poklapa sa profilima određenim u plodu ovih voćnih vrsta. Dodatno, u ekstraktima lista maline i kupine kvantifikovane su značajne količine ferulinske kiseline i jedinjenja iz klase flavan-3-ola, poput katehina i njegovih derivata. Eskulin, jedinjenje koje ima sposobnost apsorpcije ultraljubičastog zračenja, kvantifikovan je u svim ispitivanim ekstraktima, a najveća količina pronađena je u uzorku lista kupine.

Svi ekstrakti plodova samoniklih voćnih vrsta pokazali su dobru sposobnost heliranja jona gvožđa i ispoljili su umeren redukциони potencijal, ali nisu bili efikasni u neutralizaciji NO radikala. Ekstrakt ploda drena, pokazao se kao veoma dobar inhibitor enzima tirozinaze, dok se plod crnog trna istakao sa najvišom prosečnom TPC i RSA vrednošću. Najveći sadržaj ukupnih antocijanina utvrđen je u plodu samonikle zove, među svim ispitivanim ekstraktima plodova samoniklih voćnih vrsta. Analizom polifenolnog profila ploda samoniklih voćnih vrsta utvrđeno je da postoje značajne varijacije u sastavu i koncentraciji fenolnih jedinjenja. Vanilinska kiselina je detektovana samo u plodu samoniklog crnog trna, što je ujedno prvi put publikovano kao rezultat istraživanja. Arbutin, inhibitor enzima tirozinaze, po prvi put je detektovan u plodu samonikle zove. Primenom analize glavnih komponenata na sadržaj fenolnih jedinjenja i rezultate antioksidativnih testova ekstraktata plodova samoniklih voćnih vrsta utvrđeno je grupisanje uzoraka voća prema njihovom biološkom poreklu. Na osnovu ovih rezultata može se zaključiti da su fenolna jedinjenja korisni hemijski markeri za klasifikovanje i razlikovanje ispitivanih biljnih vrsta.

Na osnovu uporedne analize rezultata dobijenih za ekstrakte lista i ploda može se zaključiti da su ekstrakti listova gajenih jagodastih voćnih vrsta bogatiji ukupnim polifenolima od ploda gajenih i samoniklih voćnih vrsta, kao i da plod samoniklih voćnih vrsta ima viši sadržaj ukupnih polifenola u poređenju sa plodom gajenih voćnih vrsta. Sadržaj slobodne elaginske kiseline je znatno veći u listu maline i kupine u odnosu na plod istih voćnih vrsta, dok je u plodu samoniklih vrsta voćaka značajno niži u poređenju sa plodom gajenih voćnih vrsta. Ekstrakti lista maline i kupine imaju raznovrsniji i bogatiji polifenolni profil u poređenju sa plodom istih voćnih vrsta, što se ogleda u gotovo dvostruko većem broju identifikovanih fenolnih jedinjenja. Takođe, razlike u broju i količini fenolnih jedinjenja u različitim vrstama gajenog i samoniklog voća potvrđuju uticaj biološkog porekla na polifenolni profil ispitivanih voćnih vrsta.

Za detaljnije određivanje i identifikovanje antocijanina optimizovani su uslovi za njihovo razdvajanje primenom visokoeffikasne tankoslojne hromatografije (HPTLC). Najefikasnije razdvajanje antocijanina u plodu gajenih jagodastih i samoniklih voćnih vrsta postignuto je primenom sistema koji čine stacionarna faza silika gela i mobilna faza etil-acetat – sirćetna kiselina – mravlja kiselina – voda u zapreminskom odnosu 110:11:20:25. Na osnovu dobijenih rezultata ( $R_F$  vrednost i inteziteta boja), utvrđeno je da ekstrakt ploda duda ima najveću količinu pojedinačnih antocijanina od svih ispitivanih uzoraka plodova gajenih jagodastih vrsta voćaka, ali i da najverovatnije sadrži isti antocijanin kao i ekstrakti ploda kupine i maline. Primenom UHPLC-LTQ OrbiTrap XL masene spektrometrije određen je antocijaninski profil plodova gajenih i samoniklih voćnih vrsta. Semikvantitativni podaci pokazali su da je cijanidin 3-*O*-glukozid najzastupljeniji antocijanin, pri čemu je identifikovan u svim ispitivanim ekstraktima plodova gajenih i samoniklih voćnih vrsta, dok je definidin 3-*O*-heksozil-ramnozid, prema dostupnim literaturnim podacima, po prvi put pronađen u plodu samoniklog crnog trna.

Konačno, na osnovu dostupnih literaturnih podataka zaključeno je da su istraživanja u okviru ove doktorske disertacije dala nove informacije u pogledu prisustva pojedinih fenolnih jedinjenja. Prema saznanjima autora, do sada nije bio detaljno određen polifenolni profil ploda gajene žute maline sorte **Yellow Meeker**. Dobijeni rezultati su pokazali da se, u odsustvu određene klase

jedinjenja, može očekivati da pojedine sorte budu okarakterisane visokim sadržajem drugih sekundarnih metabolita. Naime, odsustvo antocijanina u plodu maline sorte **Yellow Meeker** prati visok sadržaj slobodne i ukupne elaginske, kao i veći sadržaj ukupnih polifenola u odnosu na ostale ispitivane sorte maline. Značajno je istaći i da je prvi put određen sastav polifenolnih jedinjenja lista kupine sorte **Čačanska bestrna**, što ima važnost u studijama autentičnosti, pri čemu je zapažen jedinstven profil koji se značajno razlikovao od profila lista maline. Takođe, istraživanja u okviru postavljenih ciljeva ove disertacije omogućila su da se izdvoje pojedine sorte čiji bi ekstrakti mogli naći primenu kao pomoćna sredstva u prevenciji oksidativnog stresa i degenerativnih bolesti. Takođe, može se zaključiti da svi ispitivani ekstrakti usled jedinstvenog sadržaja pojedinih fenolnih jedinjenja, imaju potencijal kao funkcionalni dodaci u prehrambenoj, kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji.



## 6. LITERATURA

Abramovič H., Grobin B., Poklar Ulrih N. and Cigić B. (2018). Relevance and standardization of *in vitro* antioxidant assays: ABTS, DPPH, and Folin–Ciocalteu, *Journal of Chemistry* 2018, 1–9.

Ağalar H.G. (2019). Elderberry (*Sambucus nigra* L.). *Nonvitamin and Nonmineral Nutritional Supplements*, pp. 211–215. Elsevier.

Aguilera-Otíz M., Reza-Vargas M.D.C., Chew-Madinaveita R.G. and Meza-Velázquez J.A. (2011). Propiedades funcionales de las antocianinas, *Biotecnia* 13, 16.

Akimov M.Y., Koltsov V.A., Zhanova E.V. and Akimova O.M. (2021). Nutritional value of promising raspberry varieties, *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* 640, 022078.

Alam M.A., Subhan N., Rahman M.M., Uddin S.J., Reza H.M. and Sarker S.D. (2014). Effect of citrus flavonoids, naringin and naringenin, on metabolic syndrome and their mechanisms of action, *Advances in Nutrition* 5, 404–417.

Alappat B. and Alappat J. (2020). Anthocyanin pigments: Beyond aesthetics, *Molecules* 25, 5500.

Alara O.R., Abdurahman N.H. and Ukaegbu C.I. (2021). Extraction of phenolic compounds: a review, *Current Research in Food Science* 4, 200–214.

Ali Pambuk C.I. (2018). Free Radicals: The types generated in biological system, *MOJ Cell Science & Report* 5.

Amini A.M., Muzs K., Spencer J.Pe. and Yaqoob P. (2017). Pelargonidin-3-O-glucoside and its metabolites have modest anti-inflammatory effects in human whole blood cultures, *Nutrition Research* 46, 88–95.

Amorati R. and Valgimigli L. (2015). Advantages and limitations of common testing methods for antioxidants, *Free Radical Research* 49, 633–649.

Andrianjaka-Camps Z.-N., Heritier J., Ançay A., Andlauer W. and Carlen C. (2017). Evolution of the taste-related and bioactive compound profiles of the external and internal tissues of strawberry fruits (*Fragaria x ananassa*) cv. ‘Clery’ during ripening, *Journal of Berry Research* 7, 11–22.

Apak R., Gorinstein S., Böhm V., Schaich K.M., Özyürek M. and Güçlü K. (2013). Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity (IUPAC Technical Report), *Pure and Applied Chemistry* 85, 957–998.

Apak R., Özyürek M., Güçlü K. and Çapanoğlu E. (2016). Antioxidant activity/capacity measurement. 3. Reactive oxygen and nitrogen species (ROS/RNS) scavenging assays, oxidative stress biomarkers, and chromatographic/chemometric assays, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 64, 1046–1070.

Apak R., Özyürek M., Güçlü K. and Çapanoğlu E. (2016a). Antioxidant activity/capacity measurement. 1. Classification, physicochemical principles, mechanisms, and electron transfer (ET)-based assays, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 64, 997–1027.

- Apak R., Özyürek M., Güçlü K. and Çapanoğlu E. (2016b). Antioxidant activity/capacity measurement. 2. Hydrogen atom transfer (HAT)-based, mixed-mode (Electron Transfer (ET)/HAT), and lipid peroxidation assays, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 64, 1028–1045.
- Arshad U.T., Hassan A., Shahbaz H.M., Naeem M. and Aadil R.M. (2023). Food and non-food applications of berries' by-products. *Berry Bioactive Compound By-Products*, pp. 135–157. Elsevier.
- Aurori M., Niculae M., Hanganu D., Pall E., Cenariu M., Vodnar D.C., Bunea A., Fiț N. and Andrei S. (2023). Phytochemical profile, antioxidant, antimicrobial and cytoprotective effects of cornelian cherry (*Cornus mas* L.) fruit extracts, *Pharmaceuticals* 16, 420.
- Avula B., Katragunta K., Osman A.G., Ali Z., John Adams S., Chittiboyina A.G. and Khan I.A. (2023). Advances in the chemistry, analysis and adulteration of anthocyanin rich-berries and fruits: 2000–2022, *Molecules* 28, 560.
- Awuchi C. and Ikechukwu A. (2021). Biochemistry and nutrition of carbohydrates, 1, 4–12.
- Ayala-Zavala J.F., Wang S.Y., Wang C.Y. and González-Aguilar G.A. (2004). Effect of storage temperatures on antioxidant capacity and aroma compounds in strawberry fruit, *LWT - Food Science and Technology* 37, 687–695.
- Bachmann L.M. and Miller W.G. (2020). Spectrophotometry. *Contemporary Practice in Clinical Chemistry*, pp. 119–133. Elsevier.
- Bader Ul Ain H., Tufail T., Javed M. *et al.* (2022). Phytochemical profile and pro-healthy properties of berries, *International Journal of Food Properties* 25, 1714–1735.
- Bastola K.P., Guragain Y.N., Bhadriraju V. and Vadlani P.V. (2017). Evaluation of standards and interfering compounds in the determination of phenolics by Folin-Ciocalteu assay method for effective bioprocessing of biomass, *American Journal of Analytical Chemistry* 08, 416–431.
- Bayram H.M. and Arda Ozturkcan S. (2020). Bioactive components and biological properties of cornelian cherry (*Cornus mas* L.): A comprehensive review, *Journal of Functional Foods* 75, 104252.
- Belabdelli F., Bekhti N., Piras A., Benhafsa F.M., Ilham M., Adil S. and Anes L. (2022). Chemical composition, antioxidant and antibacterial activity of *Crataegus monogyna* leaves' extracts, *Natural Product Research* 36, 3234–3239.
- Benabderrahmane W., Lores M., Benaissa O., Lamas J.P., De Miguel T., Amrani A., Benayache F. and Benayache S. (2021). Polyphenolic content and bioactivities of *Crataegus oxyacantha* L. (Rosaceae), *Natural Product Research* 35, 627–632.
- Bibi Sadeer N., Montesano D., Albrizio S., Zengin G. and Mahomoodally M.F. (2020). The versatility of antioxidant assays in food science and safety—chemistry, applications, strengths, and limitations, *Antioxidants* 9, 709.
- Bitwell C., Indra S.S., Luke C. and Kakoma M.K. (2023). A review of modern and conventional extraction techniques and their applications for extracting phytochemicals from plants, *Scientific African* 19, e01585.
- Blagojevic N., Kandic M., Pesic V., Brasanac-Vukanovic S., Tadic V. and Bojovic D. (2023). Antioxidant potential of cornelian cherry (*Cornus Mas* L.) from Montenegro, *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research* 80, 613–626.

- Bobinaitė R., Viškelis P. and Venskutonis P.R. (2012). Variation of total phenolics, anthocyanins, ellagic acid and radical scavenging capacity in various raspberry (*Rubus* spp.) cultivars, *Food Chemistry* 132, 1495–1501.
- Boo Y.C. (2019). p-Coumaric acid as an active ingredient in cosmetics: a review focusing on its antimelanogenic effects, *Antioxidants* 8, 275.
- Boo Y.C. (2021). Arbutin as a skin depigmenting agent with antimelanogenic and antioxidant properties, *Antioxidants* 10, 1129.
- Bošnjaković D., Ognjanov V., Ljubojević M., Barać G., Predojević M., Mladenović J. and Čukanović J. (2012). Biodiversity of wild fruit species of Serbia, *Genetika* 44, 81–90.
- Bursal E. and Gülçin İ. (2011). Polyphenol contents and in vitro antioxidant activities of lyophilised aqueous extract of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*), *Food Research International* 44, 1482–1489.
- Bystrzanowska M. and Tobiszewski M. (2020). Chemometrics for selection, prediction, and classification of sustainable solutions for green chemistry—a review, *Symmetry* 12, 2055.
- Câmara J.S., Albuquerque B.R., Aguiar J., Corrêa R.C.G., Gonçalves J.L., Granato D., Pereira J.A.M., Barros L. and Ferreira I.C.F.R. (2020). Food bioactive compounds and emerging techniques for their extraction: Polyphenols as a case study, *Foods* 10, 37.
- Carballo-Carbajal I., Laguna A., Romero-Giménez J. *et al.* (2019). Brain tyrosinase overexpression implicates age-dependent neuromelanin production in Parkinson's disease pathogenesis, *Nature Communications* 10, 973.
- Carrillo C., Tomasevic I.B., Barba F.J. and Kamiloglu S. (2023). Modern analytical techniques for berry authentication, *Chemosensors* 11, 500.
- Celep E., Aydın A. and Yesilada E. (2012). A comparative study on the in vitro antioxidant potentials of three edible fruits: Cornelian cherry, Japanese persimmon and cherry laurel, *Food and Chemical Toxicology* 50, 3329–3335.
- Cerveira C., Hermann P.R.S., Pereira J.S.F., Pozebon D., Mesko M.F. and Moraes D.P. (2020). Evaluation of microwave-assisted ultraviolet digestion method for rice and wheat for subsequent spectrometric determination of As, Cd, Hg and Pb, *Journal of Food Composition and Analysis* 92, 103585.
- Česlová L., Kalendová P., Dubnová L., Pernica M. and Fischer J. (2023). The effect of sample pretreatment on the anthocyanin content in Czech wild elderberry (*Sambucus nigra* L.), *Molecules* 28, 6690.
- Chemat F., Vian M.A. and Cravotto G. (2012). Green extraction of natural products: concept and principles, *International Journal of Molecular Sciences* 13, 8615–8627.
- Christodoulou M.C., Orellana Palacios J.C., Hesami G., Jafarzadeh S., Lorenzo J.M., Domínguez R., Moreno A. and Hadidi M. (2022). Spectrophotometric methods for measurement of antioxidant activity in food and pharmaceuticals, *Antioxidants* 11, 2213.
- Clark J.R. and Finn C.E. (2014). Blackberry cultivation in the world, *Revista Brasileira de Fruticultura* 36, 46–57.

- Clower L., Fleshman T., Geldenhuys W.J. and Santanam N. (2022). Targeting oxidative stress involved in endometriosis and its pain, *Biomolecules* 12, 1055.
- Commission regulation (2001). Commission regulation (ec) no. 466/2001. Off. J. Eur. Communities 2001, L77, 113.
- Contreras E., Grez J., Alcalde J.A., Neri D. and Gambardella M. (2019). Effect of low temperature in the first development stage for five red raspberry genotypes, *Horticultural Science* 46, 9–16.
- Corradini C., Cavazza A. and Bignardi C. (2012). High-performance anion-exchange chromatography coupled with pulsed electrochemical detection as a powerful tool to evaluate carbohydrates of food interest: principles and applications, *International Journal of Carbohydrate Chemistry* 2012, 1–13.
- Cosmulescu S., Trandafir I. and Nour V. (2017). Phenolic acids and flavonoids profiles of extracts from edible wild fruits and their antioxidant properties, *International Journal of Food Properties* 20, 3124–3134.
- Couttolenc A., Díaz-Porras Á., Espinoza C., Medina M.E. and Trigós Á. (2020). On the primary and secondary antioxidant activity from hydroxy-methylcoumarins: experimental and theoretical studies, *Journal of Physical Organic Chemistry* 33, e4025.
- Cuyckens F. and Claeys M. (2005). Determination of the glycosylation site in flavonoid mono-*O*-glycosides by collision-induced dissociation of electrospray-generated deprotonated and sodiated molecules, *Journal of Mass Spectrometry* 40, 364–372.
- Dabić Zagorac D.Č., Fotirić Akšić M.M., Glavnik V., Gašić U.M., Vovk I., Tešić Ž.Lj. and Natić M.M. (2020). Establishing the chromatographic fingerprints of flavan-3-ols and proanthocyanidins from rose hip (*Rosa* sp.) species, *Journal of Separation Science* 43, 1431–1439.
- Daglia M., Papetti A., Aceti C., Sordelli B., Gregotti C. and Gazzani G. (2008). Isolation of high molecular weight components and contribution to the protective activity of coffee against lipid peroxidation in a rat liver microsome system, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, 11653–11660.
- Dangles O. (2012). Antioxidant activity of plant phenols: Chemical mechanisms and biological significance, *Current Organic Chemistry* 16, 692–714.
- Dasenaki M. and Thomaidis N. (2019). Quality and authenticity control of fruit juices-a review, *Molecules* 24, 1014.
- David L., Hosu A., Moldovan B. and Cimpoi C. (2014). Evaluation and authentication of red fruits teas by high performance thin-layer chromatographic fingerprinting, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 37, 1644–1653.
- De Biaggi M., Donno D., Mellano M.G., Riondato I., Rakotoniaina E.N. and Beccaro G.L. (2018). Cornus mas (L.) fruit as a potential source of natural health-promoting compounds: Physico-chemical characterisation of bioactive components, *Plant Foods for Human Nutrition* 73, 89–94.
- Demarque D.P., Crotti A.E.M., Vessecchi R., Lopes J.L.C. and Lopes N.P. (2016). Fragmentation reactions using electrospray ionization mass spectrometry: an important tool for the structural elucidation and characterization of synthetic and natural products, *Natural Product Reports* 33, 432–455.

- Di Lorenzo C., Colombo F., Biella S., Stockley C. and Restani P. (2021). Polyphenols and human health: the role of bioavailability, *Nutrients* 13, 273.
- Diaconeasa Z., Iuhas C.I., Ayvaz H. *et al.* (2019). Phytochemical characterization of commercial processed blueberry, blackberry, blackcurrant, cranberry, and raspberry and their antioxidant activity, *Antioxidants* 8, 540.
- Domínguez R., Zhang L., Rocchetti G., Lucini L., Pateiro M., Munekata P.E.S. and Lorenzo J.M. (2020). Elderberry (*Sambucus nigra* L.) as potential source of antioxidants. Characterization, optimization of extraction parameters and bioactive properties, *Food Chemistry* 330, 127266.
- Domínguez-Rodríguez G., Marina M.L. and Plaza M. (2017). Strategies for the extraction and analysis of non-extractable polyphenols from plants, *Journal of Chromatography A* 1514, 1–15.
- Enomoto H., Sato K., Miyamoto K., Ohtsuka A. and Yamane H. (2018). Distribution analysis of anthocyanins, sugars, and organic acids in strawberry fruits using matrix-assisted laser desorption/ionization-imaging mass spectrometry, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 66, 4958–4965.
- Espíndola K.M.M., Ferreira R.G., Narvaez L.E.M., Silva Rosario A.C.R., Da Silva A.H.M., Silva A.G.B., Vieira A.P.O. and Monteiro M.C. (2019). Chemical and pharmacological aspects of caffeic acid and its activity in Hepatocarcinoma, *Frontiers in Oncology* 9, 541.
- Evtugin D.D., Magina S. and Evtugin D.V. (2020). Recent advances in the production and applications of ellagic acid and its derivatives. a review, *Molecules* 25, 2745.
- Fan F.-Y., Sang L.-X. and Jiang M. (2017). Catechins and their therapeutic benefits to inflammatory bowel disease, *Molecules* 22, 484.
- Fan Y.-F., Zhu S.-X., Hou F.-B., Zhao D.-F., Pan Q.-S., Xiang Y.-W., Qian X.-K., Ge G.-B. and Wang P. (2021). Spectrophotometric assays for sensing tyrosinase activity and their applications, *Biosensors* 11, 290.
- Felipe D., Brambilla L., Porto C., Pilau E. and Cortez D. (2014). Phytochemical analysis of *Pfaffia glomerata* inflorescences by LC-ESI-MS/MS, *Molecules* 19, 15720–15734.
- Ferreira S.S., Silva A.M. and Nunes F.M. (2022). *Sambucus nigra* L. fruits and flowers: Chemical composition and related bioactivities, *Food Reviews International* 38, 1237–1265.
- Ferreres F., Llorach R. and Gil-Izquierdo A. (2004). Characterization of the interglycosidic linkage in di-, tri-, tetra- and pentaglycosylated flavonoids and differentiation of positional isomers by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry, *Journal of Mass Spectrometry* 39, 312–321.
- Fontaine B.M., Nelson K., Lyles J.T., Jariwala P.B., García-Rodríguez J.M., Quave C.L. and Weinert E.E. (2017). Identification of ellagic acid rhamnoside as a bioactive component of a complex botanical extract with anti-biofilm activity, *Frontiers in Microbiology* 08.
- Foo J., Bellot G., Pervaiz S. and Alonso S. (2022). Mitochondria-mediated oxidative stress during viral infection, *Trends in Microbiology* 30, 679–692.
- Fotirić Akšić M.M., Dabić D.Č., Gašić U.M., Zec G.N., Vulić T.B., Tešić Ž.Lj. and Natić M.M. (2015). Polyphenolic profile of pear leaves with different resistance to pear Psylla (*Cacopsylla pyri*), *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63, 7476–7486.

- Fotirić Akšić M., Dabić Zagorac D., Sredojević M., Milivojević J., Gašić U., Meland M. and Natić M. (2019). Chemometric characterization of strawberries and blueberries according to their phenolic profile: Combined effect of cultivar and cultivation system, *Molecules* 24, 4310.
- Fotirić Akšić M., Nešović M., Ćirić I. *et al.* (2022). Chemical fruit profiles of different raspberry cultivars grown in specific norwegian agroclimatic conditions, *Horticulturae* 8, 765.
- García-Villalba R., Giménez-Bastida J.A., Ávila-Gálvez M.A., Tomás-Barberán F.A., Espín J.C. and González-Sarrías A. (2020). Ellagitannins and their gut microbiota-derived metabolites: Urolithins. *Dietary Polyphenols*, pp. 319–364.
- Gašić U., Šikoparija B., Tosti T., Trifković J., Milojković-Opsenica D., Natić M. and Tešić Ž. (2014). Phytochemical fingerprints of lime honey collected in Serbia, *Journal of Aoac International* 97, 1259–1267.
- Geladi P. and Linderholm J. (2020). Principal component analysis. *Comprehensive Chemometrics*, pp. 17–37. Elsevier.
- Giampieri F., Tulipani S., Alvarez-Suarez J.M., Quiles J.L., Mezzetti B. and Battino M. (2012). The strawberry: Composition, nutritional quality, and impact on human health, *Nutrition* 28, 9–19.
- Giusti M.M. and Wrolstad R.E. (2001). Characterization and measurement of anthocyanins by UV-Visible spectroscopy, *Current Protocols in Food Analytical Chemistry* 00.
- Golovinskaia O. and Wang C.-K. (2021). Review of functional and pharmacological activities of berries, *Molecules* 26, 3904.
- González-Centeno M.R., Knoerzer K., Sabarez H., Simal S., Rosselló C. and Femenia A. (2014). Effect of acoustic frequency and power density on the aqueous ultrasonic-assisted extraction of grape pomace (*Vitis vinifera* L.) – A response surface approach, *Ultrasonics Sonochemistry* 21, 2176–2184.
- Griess P. (1864). On a new series of bodies in which nitrogen substituted for hydrogen, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* 154, 667–731.
- Gudej J. (2003). Kaempferol and quercetin glycosides from *Rubus idaeus* L. leaves, *Acta poloniae pharmaceutica* 60, 313–5.
- Gülçin İ. (2012). Antioxidant activity of food constituents: an overview, *Archives of Toxicology* 86, 345–391.
- Gulcin İ. (2020). Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview, *Archives of Toxicology* 94, 651–715.
- Gupta M.K., Ghuge A., Parab M., Al-Refaei Y., Khandare A., Dand N. and Waghmare N. (2022). A comparative review on High-Performance Liquid Chromatography (HPLC), Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) & High-Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC) with current updates, *Current Issues in Pharmacy and Medical Sciences* 35, 224–228.
- Güzel N. (2021). Morphometric and physico-chemical properties of cornelian cherry (*Cornus mas* L.) grown in Çorum, Turkey, *Akademik Gıda* 19, 373–380.
- Halford N.G., Curtis T.Y., Muttucumaru N., Postles J. and Mottram D.S. (2011). Sugars in crop plants, *Annals of Applied Biology* 158, 1–25.

- Halliwell B. (1990). How to characterize a biological antioxidant, *Free Radical Research Communications* 9, 1–32.
- Han X., Li W., Huang D. and Yang X. (2016). Polyphenols from hawthorn peels and fleshs differently mitigate dyslipidemia, inflammation and oxidative stress in association with modulation of liver injury in high fructose diet-fed mice, *Chemico-Biological Interactions* 257, 132–140.
- Harborne J.B. (1998). Phytochemical methods: a guide to modern techniques of plant analysis, 3rd ed. *Chapman and Hall*, London; New York.
- Haş I.M., Teleky B.-E., Szabo K. *et al.* (2023). Bioactive potential of elderberry (*Sambucus nigra* L.): Antioxidant, antimicrobial activity, bioaccessibility and prebiotic potential, *Molecules* 28, 3099.
- Hashempour A., Fotouhi Ghazvini R., Bakhshi D., Ghasemnezhad M., Sharafti M. and Ahmadian-Moghadam H. (2010). Ascorbic acid, anthocyanins, and phenolics contents and antioxidant activity of ber, azarole, raspberry, and cornelian cherry fruit genotypes growing in Iran, *Hort. Environ. Biotechnol* 51.
- Hetrick E.M. and Schoenfisch M.H. (2009). Analytical chemistry of nitric oxide, *Annual Review of Analytical Chemistry* 2, 409–433.
- Iti S. (2020). ICP-OES: An advance tool in biological research, *Open Journal of Environmental Biology*, 027–033.
- Jaiswal R., Karaköse H., Rühmann S., Goldner K., Neumüller M., Treutter D. and Kuhnert N. (2013). Identification of phenolic compounds in plum fruits (*Prunus salicina* L. and *Prunus domestica* L.) by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry and characterization of varieties by quantitative phenolic fingerprints, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61, 12020–12031.
- Jaiswal R. and Kuhnert N. (2011). How to identify and discriminate between the methyl quinates of chlorogenic acids by liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Journal of Mass Spectrometry* 46, 269–281.
- Jaiswal R., Sovdat T., Vivian F. and Kuhnert N. (2010). Profiling and characterization by LC-MS<sup>n</sup> of the chlorogenic acids and hydroxycinnamoylshikimate esters in Maté (*Ilex paraguariensis*), *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58, 5471–5484.
- Jevremović S., Milivojević J., Katanić Stanković J. and Popović-Djordjević J. (2023). Bioaccumulation potential of ‘Meeker’ and ‘Willamette’ raspberry (*Rubus idaeus* L.) fruits towards macro- and microelements and their nutritional evaluation, 2nd International Conference on Chemo and Bioinformatics, *Institute for Information Technologies, University of Kragujevac*, 152–155
- Kafkas E., Özgen M., Özoğul Y. and Türemiş N. (2008). Phytochemical and fatty acid profile of selected red raspberry cultivars: A comparative study, *Journal of Food Quality* 31, 67–78.
- Karaklajić-Stajić Ž., Pešaković M., Tomić J. and Paunović S. (2022). Recent trends in research and technology of different berry species. *The Balkans Scientific Center of the Russian Academy of Natural Sciences Belgrade, Vrnjačka Banja, Serbia*.
- Karaklajić-Stajić Z., Tomić J., Pešaković M., Paunović S.M., Stampar F., Mikulić-Petkovšek M., Grohar M.C., Hudina M. and Jakopic J. (2023). Black queens of fruits: Chemical composition of blackberry (*Rubus subg. rubus* Watson) and black currant (*Ribes nigrum* L.) cultivars selected in Serbia, *Foods* 12, 2775.

- Karlsons A., Osvalde A., Cekstere G., and J.Pormale (2018). Research on the mineral composition of cultivated and wild blueberries and cranberries, *Agronomy Research* 16, 454–463.
- Karppinen K., Tegelberg P., Häggman H. and Jaakola L. (2018). Abscisic acid regulates anthocyanin biosynthesis and gene expression associated with cell wall modification in ripening bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) fruits, *Frontiers in Plant Science* 9, 1259.
- Katanić Stanković J.S., Mićanović N., Grozdanić N., Kostić A.Ž., Gašić U., Stanojković T. and Popović-Djordjević J.B. (2022). Polyphenolic profile, antioxidant and antidiabetic potential of medlar (*Mespilus germanica* L.), blackthorn (*Prunus spinosa* L.) and common hawthorn (*Crataegus monogyna* Jacq.) fruit extracts from Serbia, *Horticulturae* 8, 1053.
- Kaume L., Howard L.R. and Devareddy L. (2012). The blackberry fruit: A review on its composition and chemistry, metabolism and bioavailability, and health benefits, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60, 5716–5727.
- Kay C.D., Neilson A. and Ferruzzi M. (2022). Chapter 1. Bioactive compounds of berries: Chemistry and analytical methods of detection. In: D. Klimis-Zacas and A. Rodriguez-Mateos (eds) *Food Chemistry, Function and Analysis*, pp. 1–40. Royal Society of Chemistry, Cambridge.
- Kečkeš S., Gašić U., Veličković T.Ć., Milojković-Opsenica D., Natić M. and Tešić Ž. (2013). The determination of phenolic profiles of Serbian unifloral honeys using ultra-high-performance liquid chromatography/high resolution accurate mass spectrometry, *Food Chemistry* 138, 32–40.
- Khalifa I., Zhu W., Li K. and Li C. (2018). Polyphenols of mulberry fruits as multifaceted compounds: Compositions, metabolism, health benefits, and stability—A structural review, *Journal of Functional Foods* 40, 28–43.
- Khan K.F. (2019). Application, principle and operation of ICP-OES in pharmaceutical analysis, 8, 281–282.
- Khan M.I.R., Nazir F., Maheshwari C., Chopra P., Chhillar H. and Sreenivasulu N. (2023). Mineral nutrients in plants under changing environments: A road to future food and nutrition security, *The Plant Genome* 16, e20362.
- Kim I. and Lee J. (2020). Variations in anthocyanin profiles and antioxidant activity of 12 genotypes of mulberry (*Morus* spp.) fruits and their changes during processing, *Antioxidants* 9, 242.
- Kljajic N., Subic J. and Sredojevic Z. (2017). Profitability of raspberry production on holdings in the territory of Arilje, *Ekonomika poljoprivrede* 64, 57–68.
- Kobori R., Hashimoto S., Koshimizu H., Yakami S., Hirai M., Noro K., Kawasaki T. and Saito A. (2019). Flavan-3-ols content in red raspberry leaves increases under blue led-light irradiation, *Metabolites* 9, 56.
- Kolarević T., Milinčić D.D., Vujović T. *et al.* (2021). Phenolic compounds and antioxidant properties of field-grown and in vitro leaves, and calluses in blackberry and blueberry, *Horticulturae* 7, 420.
- Komorsky-Lovrić Š. and Novak I. (2011). Determination of ellagic acid in strawberries, raspberries and blackberries by square-wave voltammetry, *International Journal of Electrochemical Science* 6, 4638–4647.
- Kosmala M., Zduńczyk Z., Juśkiewicz J., Jurgoński A., Karlińska E., Macierzyński J., Jańczak R. and Rój E. (2015). Chemical composition of defatted strawberry and raspberry seeds and the effect



- of these dietary ingredients on polyphenol metabolites, intestinal function, and selected serum parameters in rats, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63, 2989–2996.
- Kotha R.R., Tareq F.S., Yildiz E. and Luthria D.L. (2022). Oxidative stress and antioxidants—A critical review on in vitro antioxidant assays, *Antioxidants* 11, 2388.
- Kotula M., Kapusta-Duch J., Smoleń S. and Doskočil I. (2022). Phytochemical composition of the fruits and leaves of raspberries (*Rubus idaeus* L.)—Conventional vs. organic and those wild grown, *Applied Sciences* 12, 11783.
- Koutsoukos S., Tsiaka T., Tzani A., Zoumpoulakis P. and Detsi A. (2019). Choline chloride and tartaric acid, a natural deep eutectic solvent for the efficient extraction of phenolic and carotenoid compounds, *Journal of Cleaner Production* 241, 118384.
- Krstić Đ.D., Ristivojević P.M., Gašić U.M., Lazović M., Fotirić Akšić M.M., Milivojević J., Morlock G.E., Milojković-Opšenica D.M. and Trifković J.Đ. (2023). Authenticity assessment of cultivated berries via phenolic profiles of seeds, *Food Chemistry* 402, 134184.
- Krüger S., Mirgos M. and Morlock G.E. (2015). Effect-directed analysis of fresh and dried elderberry (*Sambucus nigra* L.) via hyphenated planar chromatography, *Journal of Chromatography A* 1426, 209–219.
- Krzepińko A., Prażak R. and Święciło A. (2021). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity of raspberry, blackberry and raspberry-blackberry hybrid leaf buds, *Molecules* 26, 327.
- Kubo I., Kinoshita H., Chaudhuri S.K., Kubo Y., Sánchez Y. and Ogura T. (2000). Flavonols from heterotheca inuloides: Tyrosinase inhibitory activity and structural criteria, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 8, 1749–1755.
- Kubola J., Siriamornpun S. and Meeso N. (2011). Phytochemicals, vitamin C and sugar content of Thai wild fruits, *Food Chemistry* 126, 972–981.
- Kumar K., Srivastav S. and Sharanagat V.S. (2021). Ultrasound assisted extraction (UAE) of bioactive compounds from fruit and vegetable processing by-products: A review, *Ultrasonics Sonochemistry* 70, 105325.
- Kurrey R., Saha A., Sinha S., Sahu Y., Khute M., Sahu B. and Deb M.K. (2022). Recent advances on analytical methodologies for screening and detection of biophenols and their challenges: A brief review, *Results in Chemistry* 4, 100456.
- Laguerre M., Lecomte J. and Villeneuve P. (2007). Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges, *Progress in Lipid Research* 46, 244–282.
- Lamichhane A., Lamichhane G. and Devkota H.P. (2023). Yellow himalayan raspberry (*Rubus ellipticus* Sm.): Ethnomedicinal, nutraceutical, and pharmacological aspects, *Molecules* 28, 6071.
- Lang Y., Gao N., Zang Z., Meng X., Lin Y., Yang S., Yang Y., Jin Z. and Li B. (2024). Classification and antioxidant assays of polyphenols: a review, *Journal of Future Foods* 4, 193–204.
- Lavefve L., Howard L.R. and Carbonero F. (2020). Berry polyphenols metabolism and impact on human gut microbiota and health, *Food & Function* 11, 45–65.

- Lebedev V.G., Lebedeva T.N., Vidyagina E.O., Sorokopudov V.N., Popova A.A. and Shestibratov K.A. (2022). Relationship between phenolic compounds and antioxidant activity in berries and leaves of raspberry genotypes and their genotyping by SSR markers, *Antioxidants* 11, 1961.
- Lee J., Durst R.W., Wrolstad R.E. *et al.* (2005). Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: Collaborative study, *Journal of AOAC INTERNATIONAL* 88, 1269–1278.
- Lee B.-C., Lee S.Y., Lee H.J. *et al.* (2007). Anti-oxidative and photo-protective effects of coumarins isolated from *Fraxinus chinensis*, *Archives of Pharmacal Research* 30, 1293–1301.
- Leichtweis M.G., Molina A.K., Pereira C., Dias M.I., Ferreira I.C.F.R. and Barros L. (2022). Haskap and blackthorn berries anthocyanin profile. Maringá.
- Lelli V., Belardo A. and Maria Timperio A. (2021). From targeted quantification to untargeted metabolomics. In: X. Zhan (ed) *Metabolomics - Methodology and Applications in Medical Sciences and Life Sciences*. IntechOpen.
- Leri M., Scuto M., Ontario M.L., Calabrese V., Calabrese E.J., Bucciantini M. and Stefani M. (2020). healthy effects of plant polyphenols: Molecular mechanisms, *International Journal of Molecular Sciences* 21, 1250.
- Li Z., Liu Y., Xiang J., Wang C., Johnson J.B. and Beta T. (2023). Diverse polyphenol components contribute to antioxidant activity and hypoglycemic potential of mulberry varieties, *LWT* 173, 114308.
- Li H., Wang X., Li P., Li Y. and Wang H. (2008). Comparative study of antioxidant activity of grape (*Vitis vinifera*) seed powder assessed by different methods, *Journal of Food and Drug Analysis* 16.
- Li Y., Zhang J.-J., Xu D.-P., Zhou T., Zhou Y., Li S. and Li H.-B. (2016). Bioactivities and health benefits of wild fruits, *International Journal of Molecular Sciences* 17, 1258.
- Liu H., Liu J., Lv Z., Yang W., Zhang C., Chen D. and Jiao Z. (2019). Effect of dehydration techniques on bioactive compounds in hawthorn slices and their correlations with antioxidant properties, *Journal of Food Science and Technology* 56, 2446–2457.
- Lucci P., Saurina J. and Núñez O. (2017). Trends in LC-MS and LC-HRMS analysis and characterization of polyphenols in food, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 88, 1–24.
- Luo T., Chen S., Zhang H., Jia S. and Wang J. (2020). Phytochemical composition and potential biological activities assessment of raspberry leaf extracts from nine different raspberry species and raspberry leaf tea, *Journal of Berry Research* 10, 295–309.
- Marić B., Abramović B., Ilić N. *et al.* (2022). UHPLC-Triple-TOF-MS characterization, antioxidant, antimicrobial and antiproliferative activity of raspberry (*Rubus idaeus* L.) seed extracts, *Foods* 12, 161.
- Martins M.S., Gonçalves A.C., Alves G. and Silva L.R. (2023). Blackberries and mulberries: Berries with significant health-promoting properties, *International Journal of Molecular Sciences* 24, 12024.
- Mattioli R., Francioso A., Mosca L. and Silva P. (2020). Anthocyanins: A comprehensive review of their chemical properties and health effects on cardiovascular and neurodegenerative diseases, *Molecules* 25, 3809.

- Memete A.R., Timar A.V., Vuscan A.N., Miere (Groza) F., Venter A.C. and Vicas S.I. (2022). Phytochemical composition of different botanical parts of morus species, health benefits and application in food industry, *Plants* 11, 152.
- Mihailović N.R., Mihailović V.B., Ćirić A.R., Srećković N.Z., Cvijović M.R. and Joksović L.G. (2019). Analysis of Wild Raspberries (*Rubus idaeus* L.): Optimization of the ultrasonic-assisted extraction of phenolics and a new insight in phenolics bioaccessibility, *Plant Foods for Human Nutrition* 74, 399–404.
- Mikulic-Petkovsek M., Ivancic A., Todorovic B., Veberic R. and Stampar F. (2015). Fruit phenolic composition of different elderberry species and hybrids, *Journal of Food Science* 80.
- Mikulic-Petkovsek M., Schmitzer V., Slatnar A., Stampar F. and Veberic R. (2012). Composition of sugars, organic acids, and total phenolics in 25 wild or cultivated berry species, *Journal of Food Science* 77.
- Mikulic-Petkovsek M., Stampar F., Veberic R. and Sircelj H. (2016). Wild *Prunus* fruit species as a rich source of bioactive compounds, *Journal of Food Science* 81.
- Milinković M., Vranić D., Đurić M. and Paunović S. (2021). Chemical composition of organically and conventionally grown fruits of raspberry (*Rubus idaeus* L.) cv. Willamette, *Acta agriculturae Serbica* 26, 83–88.
- Milivojević J. (2018). *Posebno voćarstvo. 3, Jagodaste voćke*. Univerzitet u Beogradu - Poljoprivredni fakultet, Beograd.
- Milivojević J., Rakonjac V., Akšić M.F., Pristov J.B. and Maksimović V. (2013). Classification and fingerprinting of different berries based on biochemical profiling and antioxidant capacity, *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 48, 1285–1294.
- Miljković-Opsenica D. and Andrić F. (2014). High Performance Thin-Layer Chromatography. In: Dr. Inamuddin and A. Mohammad (eds) *Green Chromatographic Techniques*, pp. 81–101. Springer Netherlands, Dordrecht.
- Milosavljević D., Maksimović V., Milivojević J., Djekić I., Wolf B., Zuber J., Vogt C. and Dragišić Maksimović J. (2023). Sugars and organic acids in 25 strawberry cultivars: Qualitative and quantitative evaluation, *Plants* 12, 2238.
- Milosavljević D.M., Mutavdžić D.R., Radotić K., Milivojević J.M., Maksimović V.M. and Dragišić Maksimović J.J. (2020). Phenolic profiling of 12 strawberry cultivars using different spectroscopic methods, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 68, 4346–4354.
- Milošević T., Milošević N. and Mladenović J. (2016). Soluble solids, acidity, phenolic content and antioxidant capacity of fruits and berries cultivated in Serbia, *Fruits* 71, 239–248.
- Mirza A. (2021). Antioxidant activity of leaf and fruit extracts from *Rubus fruticosus*, *Rubus idaeus* and *Rubus loganobaccus* growing in the conditions of the republic of Moldova, *Economic Engineering in Agriculture and Rural Development* 21.
- Mohsin S., Mahadevan R. and Muraleedhara Kurup G. (2014). Free-radical-scavenging activity and antioxidant effect of ascophyllan from marine brown algae *Padina tetrastratica*, *Biomedicine & Preventive Nutrition* 4, 75–79.

- Moldovan B., Filip A., Clichici S., Suharoschi R., Bolfa P. and David L. (2016). Antioxidant activity of cornelian cherry (*Cornus mas* L.) fruits extract and the in vivo evaluation of its anti-inflammatory effects, *Journal of Functional Foods* 26, 77–87.
- Mondragón M., Elizalde L.E. and Rejón V. (2022). Biominerals in the leaves of *Agave karwinskii* Zucc, *Results in Chemistry* 4, 100309.
- Moon J.-K. and Shibamoto T. (2009). Antioxidant assays for plant and food components, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57, 1655–1666.
- Motyleva S.M., Evdokimenko S.N., Podgaetsky M.A., Tumaeva T.A., Burmenko Y.V., Svistunova N.Y., Panischeva D.V. and Kulikov I.M. (2022). Mineral composition of repair raspberry (*Rubus idaeus* L.) fruits, *Vavilov Journal of Genetics and Breeding* 26, 622–629.
- Mraih F., Hidalgo M., De Pascual-Teresa S., Trabelsi-Ayadi M. and Chérif J.-K. (2015). Wild grown red and yellow hawthorn fruits from Tunisia as source of antioxidants, *Arabian Journal of Chemistry* 8, 570–578.
- Mratinic E. and Fotiric-Aksic M. (2014). Indigenous fruit species as a significant resource for sustainable development, *Glasnik Sumarskog fakulteta*, 181–193.
- Mrmošanin J., Nikolić M., Mitić M., Tošić S., Pavlović A. (2022). Polyphenolic profile of selected varieties of Serbian berries, *Chemia Naissensis* 5, 24–42.
- Munteanu I.G. and Apetrei C. (2021). Analytical methods used in determining antioxidant activity: A review, *International Journal of Molecular Sciences* 22, 3380.
- Mustafa A.M., Angeloni S., Abouelenein D., Acquaticci L., Xiao J., Sagratini G., Maggi F., Vittori S. and Caprioli G. (2022). A new HPLC-MS/MS method for the simultaneous determination of 36 polyphenols in blueberry, strawberry and their commercial products and determination of antioxidant activity, *Food Chemistry* 367, 130743.
- Natić M. (2016). Extraction and analysis of ellagic acid and ellagitannins from various food sources. *Ellagic Acid: Food Sources, Potential Role in Human Health and Antioxidant Effects*. Nova Publishers, New York.
- Natić M.M., Dabić D.Č., Papetti A., Fotirić Akšić M.M., Ognjanov V., Ljubojević M. and Tešić Ž.Lj. (2015). Analysis and characterisation of phytochemicals in mulberry (*Morus alba* L.) fruits grown in Vojvodina, North Serbia, *Food Chemistry* 171, 128–136.
- Natić M., Dabić Zagorac D., Jakanovski M., Smailagić A., Čolić S., Meland M. and Fotirić Akšić M. (2024). Fruit quality attributes of organically grown norwegian apples are affected by cultivar and location, *Plants* 13, 147.
- Nazhand A., Lucarini M., Durazzo A. *et al.* (2020). Hawthorn (*Crataegus* spp.): An updated overview on its beneficial properties, *Forests* 11, 564.
- Negrean O.-R., Farcas A.C., Pop O.L. and Socaci S.A. (2023). Blackthorn—A valuable source of phenolic antioxidants with potential health benefits, *Molecules* 28, 3456.
- Nesterenko P.N. and Paull B. (2017). Chapter 9 - Ion chromatography. In: S. Fanali, P.R. Haddad, C.F. Poole, and M.-L. Riekkola (eds) *Liquid Chromatography (Second Edition)*, pp. 205–244. Elsevier.

- Nile S.H. and Park S.W. (2014). Edible berries: Bioactive components and their effect on human health, *Nutrition* 30, 134–144.
- Nilova L.P., Ikramov R.A., Malyutenkova S.M. and Veryaskina A.S. (2018). Investigation of mineral composition during processing of wild berries, *Proceedings of the Voronezh State University of Engineering Technologies* 80, 151–156.
- Nimse S.B. and Pal D. (2015). Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms, *RSC Advances* 5, 27986–28006.
- Nistor O.V., Milea Ștefania A., Păcularu-Burada B., Andronoiu D.G., Râpeanu G. and Stănciuc N. (2023). Technologically driven approaches for the integrative use of wild blackthorn (*Prunus spinosa* L.) fruits in foods and nutraceuticals, *Antioxidants* 12, 1637.
- Okan O.T., Deniz İ., Yayli N., Şat İ.G., Öz M. and HatiPoğlu Serdar G. (2018). Antioxidant activity, sugar content and phenolic profiling of blueberries cultivars: A comprehensive comparison, *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* 46, 639–652.
- Olas B. (2018). Berry phenolic antioxidants – Implications for human health?, *Frontiers in Pharmacology* 9, 78.
- Ongkowijoyo P., Luna-Vital D.A. and Gonzalez De Mejia E. (2018). Extraction techniques and analysis of anthocyanins from food sources by mass spectrometry: An update, *Food Chemistry* 250, 113–126.
- Osman A.G., Avula B., Katragunta K., Ali Z., Chittiboyina A.G. and Khan I.A. (2023). Elderberry extracts: Characterization of the polyphenolic chemical composition, quality consistency, safety, adulteration, and attenuation of oxidative stress and inflammation-induced health disorders, *Molecules* 28, 3148.
- Oszmiański J., Wojdyło A., Nowicka P., Teleszko M., Cebulak T. and Wolanin M. (2015). Determination of phenolic compounds and antioxidant activity in leaves from wild *Rubus* L. species, *Molecules* 20, 4951–4966.
- Ozzengin B., Zannou O. and Koca I. (2023). Quality attributes and antioxidant activity of three wild plums from *Prunus spinosa* and *Prunus domestica* species, *Measurement: Food* 10, 100079.
- Pantelić M.M., Dabić Zagorac D.Č., Davidović S.M., Todić S.R., Bešlić Z.S., Gašić U.M., Tešić Ž.Lj. and Natić M.M. (2016). Identification and quantification of phenolic compounds in berry skin, pulp, and seeds in 13 grapevine varieties grown in Serbia, *Food Chemistry* 211, 243–252.
- Papetti A., Daglia M., Aceti C., Quaglia M., Gregotti C. and Gazzani G. (2006). Isolation of an in vitro and ex vivo antiradical melanoidin from Roasted Barley, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 1209–1216.
- Petruskevicius A., Viskelis J., Urbonaviciene D. and Viskelis P. (2023). Anthocyanin accumulation in berry fruits and their antimicrobial and antiviral properties: An overview, *Horticulturae* 9, 288.
- Phaniendra A., Jestadi D.B. and Periyasamy L. (2015). Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases, *Indian journal of clinical biochemistry: IJCB* 30, 11–26.
- Piovesana S., Cavaliere C., Cerrato A., Montone C.M., Laganà A. and Capriotti A.L. (2020). Developments and pitfalls in the characterization of phenolic compounds in food: From targeted analysis to metabolomics-based approaches, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 133, 116083.

- Plaza M., Domínguez-Rodríguez G., Castro-Puyana M. and Marina M.L. (2018). Polyphenols analysis and related challenges. *Polyphenols: Properties, Recovery, and Applications*, pp. 177–232. Elsevier.
- Ponder A. and Hallmann E. (2019). The effects of organic and conventional farm management and harvest time on the polyphenol content in different raspberry cultivars, *Food Chemistry* 301, 125295.
- Popović-Djordjević J.B., Kostić A.Ž., Rajković M.B., Miljković I., Krstić Đ., Caruso G., Siavash Moghaddam S. and Brčeski I. (2022). organically vs. conventionally grown vegetables: Multi-elemental analysis and nutritional evaluation, *Biological Trace Element Research* 200, 426–436.
- Porter E.A., van den Bos A.A., Kite G.C., Veitch N.C. and Simmonds M.S.J. (2012). Flavonol glycosides acylated with 3-hydroxy-3-methylglutaric acid as systematic characters in *Rosa*, *Phytochemistry* 81, 90–96.
- Pratima Nikalje A., Shraddha B. and Zibran S. (2013). Review of ultra performance liquid chromatography and its applications, *International Journal of Research in Pharmacy and Science* 3, 19–40.
- Prior R.L., Wu X. and Schaich K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 4290–4302.
- Pyrzynska K. and Sentkowska A. (2015). Recent developments in the HPLC separation of phenolic food compounds, *Critical Reviews in Analytical Chemistry* 45, 41–51.
- Radi R. (2018). Oxygen radicals, nitric oxide, and peroxynitrite: Redox pathways in molecular medicine, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115, 5839–5848.
- Radojković M., Vujanović M., Majkić T., Zengin G., Beara I., Catauro M. and Montesano D. (2021). Evaluation of *Sambucus nigra* L. biopotential as an unused natural resource, *Applied Sciences* 11, 11207.
- Radovanović B., Anđelković S., Radovanović A. and Anđelković M. (2013). Antioxidant and antimicrobial activity of polyphenol extracts from wild berry fruits grown in southeast Serbia, *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 12, 813–819.
- Rajauria G. (2018). Optimization and validation of reverse phase HPLC method for qualitative and quantitative assessment of polyphenols in seaweed, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 148, 230–237.
- Rashmi H.B. and Negi P.S. (2020). Phenolic acids from vegetables: A review on processing stability and health benefits, *Food Research International* 136, 109298.
- Ratknić M., Rakonjac Lj., Nikolić B. *et al.* (2005). Očuvanje, unapređenje i održivo korišćenje genofonda samoniklih šumskih voćkarica na području Srbije.
- Ren J., Barton C.D. and Zhan J. (2023). Engineered production of bioactive polyphenolic O-glycosides, *Biotechnology Advances* 65, 108146.
- Renai L., Scordo C.V.A., Chiuminatto U., Ulaszewska M., Giordani E., Petrucci W.A., Tozzi F., Nin S. and Del Bubba M. (2021). Liquid chromatographic Quadrupole time-of-flight mass spectrometric untargeted profiling of (poly)phenolic compounds in *Rubus idaeus* L. and *Rubus occidentalis* L. fruits and their comparative evaluation, *Antioxidants* 10, 704.

- Republički zavod za statistiku. Dostupan na: <https://www.stat.gov.rs/>.
- Rezaei-Golmisheh A., Malekinejad H., Asri-Rezaei S., Farshid A.A. and Akbari P. (2015). Hawthorn ethanolic extracts with triterpenoids and flavonoids exert hepatoprotective effects and suppress the hypercholesterolemia-induced oxidative stress in rats, *Iranian Journal of Basic Medical Sciences* 18, 691–699.
- Ristivojević P., Andrić F.Lj., Trifković J.Đ., Vovk I., Stanisavljević L.Ž., Tešić Ž.Lj. and Milojković-Opsenica D.M. (2014). Pattern recognition methods and multivariate image analysis in HPTLC fingerprinting of propolis extracts, *Journal of Chemometrics* 28, 301–310.
- Ristivojević P.M., Tahir A., Malfent F., Opsenica D.M. and Rollinger J.M. (2019). High-performance thin-layer chromatography/bioautography and liquid chromatography-mass spectrometry hyphenated with chemometrics for the quality assessment of *Morus alba* samples, *Journal of Chromatography A* 1594, 190–198.
- Rolland F. and Sheen J. (2005). Sugar sensing and signalling networks in plants, *Biochemical Society Transactions* 33, 269–271.
- Rollando R., Kurniawan C., Nurdiani R., Timur S. and Moza P. (2019). Simple and rapid method for isolating anthocyanin from wild mulberry (*Morus nigra* L.), 16.
- Rommel Angelika. and Wrolstad R.E. (1993). Composition of flavonols in red raspberry juice as influenced by cultivar, processing, and environmental factors, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 41, 1941–1950.
- Rumalla C., Avula B., Wang Y.-H., Smillie T. and Khan I. (2012). Densitometric-HPTLC method development and analysis of anthocyanins from acai (*Euterpe oleracea* Mart.) berries and commercial products, *Journal of Planar Chromatography – Modern TLC* 25, 409–414.
- Salehi B., Fokou P., Sharifi-Rad M., Zucca P., Pezzani R., Martins N. and Sharifi-Rad J. (2019). The therapeutic potential of naringenin: A review of clinical trials, *Pharmaceuticals* 12, 11.
- Salo H.M., Nguyen N., Alakärppä E., Klavins L., Hykkerud A.L., Karppinen K., Jaakola L., Klavins M. and Häggman H. (2021). Authentication of berries and berry-based food products, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 20, 5197–5225.
- Šamec D. and Piljac-Žegarac J. (2011). Postharvest stability of antioxidant compounds in hawthorn and cornelian cherries at room and refrigerator temperatures—Comparison with blackberries, white and red grapes, *Scientia Horticulturae* 131, 15–21.
- Sánchez-Rangel J.C., Benavides J., Heredia J.B., Cisneros-Zevallos L. and Jacobo-Velázquez D.A. (2013). The Folin–Ciocalteu assay revisited: improvement of its specificity for total phenolic content determination, *Analytical Methods* 5, 5990.
- Santos J.S., Alvarenga Brizola V.R. and Granato D. (2017). High-throughput assay comparison and standardization for metal chelating capacity screening: A proposal and application, *Food Chemistry* 214, 515–522.
- Saurina J. and Sentellas S. (2015). Determination of phenolic compounds in food matrices: Application to characterization and authentication. *Fast Liquid Chromatography–Mass Spectrometry Methods in Food and Environmental Analysis*, pp. 517–547. IMPERIAL COLLEGE PRESS.

- Semwal R., Joshi S.K., Semwal R.B. and Semwal D.K. (2021). Health benefits and limitations of rutin - A natural flavonoid with high nutraceutical value, *Phytochemistry Letters* 46, 119–128.
- Setha S. (2012). Roles of abscisic acid in fruit ripening, *Walailak Journal of Science and Technology* 9, 297–308.
- Shamanin V.P., Tekin-Cakmak Z.H., Gordeeva E.I. *et al.* (2022). Antioxidant capacity and profiles of phenolic acids in various genotypes of purple wheat, *Foods* 11, 2515.
- Shard A.G., Schofield R.C. and Minelli C. (2020). Ultraviolet–visible spectrophotometry. *Characterization of Nanoparticles*, pp. 185–196. Elsevier.
- Sharifi-Rad J., Quispe C., Castillo C.M.S. *et al.* (2022). Ellagic acid: A review on its natural sources, chemical stability, and therapeutic potential, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2022, 1–24.
- Shivakumar A. and Yogendra Kumar M.S. (2018). Critical review on the analytical mechanistic steps in the evaluation of antioxidant activity, *Critical Reviews in Analytical Chemistry* 48, 214–236.
- Simonovic M., Simonovic B.R., Ostojic S., Pezo L., Micic D., Stanisavljevic N. and Pejcin B. (2019). A contribution to the estimation of berry fruits quality, *Scientia Horticulturae* 258, 108776.
- Singleton V.L., Orthofer R. and Lamuela-Raventós R.M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, pp. 152–178. Elsevier.
- Singleton V.L. and Rossi J.A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents, *American Journal of Enology and Viticulture* 16, 144–158.
- Skender A., Hadžiabulić S., Ercisli S., Hasanbegović J., Dedić S., Almeer R., Sayed A.A., Ullah R. and Assouguem A. (2022). morphological and biochemical properties in fruits of naturally grown cornelian cherry (*Cornus mas* L.) genotypes in northwest Bosnia and Herzegovina, *Sustainability* 14, 4579.
- Skrovankova S., Ercisli S., Ozkan G., Ilhan G., Sagbas H.I., Karatas N., Jurikova T. and Mlcek J. (2022). Diversity of phytochemical and antioxidant characteristics of black mulberry (*Morus nigra* L.) fruits from Turkey, *Antioxidants* 11, 1339.
- Skrovankova S., Sumczynski D., Mlcek J., Jurikova T. and Sochor J. (2015). Bioactive compounds and antioxidant activity in different types of berries, *International Journal of Molecular Sciences* 16, 24673–24706.
- Sobhy R., Öz F., Lorenzo J.M., Bakry A.M. and Mohamed A. (2023). Bioactive components and health promoting effect of berry by-products. *Berry Bioactive Compound By-Products*, pp. 73–95. Elsevier.
- Sohail Z. (2023). Mulberry. In: N. Ebru Yaşa Kafkas and H. Çelik (eds) *Edible berries - New Insights*. IntechOpen.
- Solovchenko A.E., Chivkunova O.B., Merzlyak M.N. and Reshetnikova I.V. (2001). A spectrophotometric analysis of pigments in apples, *Russian Journal of Plant Physiology* 48, 693–700.
- Sreejayan and Rao M.N.A. (1997). Nitric oxide scavenging by curcuminoids, *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 49, 105–107.



- Strik B.C., Clark J.R., Finn C.E. and Bañados M.P. (2007). Worldwide blackberry production, *HortTechnology* 17, 205–213.
- Subbiah V., Zhong B., Nawaz M.A., Barrow C.J., Dunshea F.R. and Suleria H.A.R. (2020). Screening of phenolic compounds in australian grown berries by LC-ESI-QTOF-MS/MS and determination of their antioxidant potential, *Antioxidants* 10, 26.
- Sun Y., Li L., Liao M., Su M., Wan C., Zhang L. and Zhang H. (2018). A systematic data acquisition and mining strategy for chemical profiling of *Aster tataricus* rhizoma (Ziwan) by UHPLC-Q-TOF-MS and the corresponding anti-depressive activity screening, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 154, 216–226.
- Szot I., Lipa T. and Sosnowska B. (2019). Evaluation of yield and fruit quality of several ecotypes of cornelian cherry (*Cornus mas* L.) in Polish conditions, *Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus* 18, 139–148.
- Tajik N., Tajik M., Mack I. and Enck P. (2017). The potential effects of chlorogenic acid, the main phenolic components in coffee, on health: a comprehensive review of the literature, *European Journal of Nutrition* 56, 2215–2244.
- Tarko T., Duda-Chodak A., Satora P., Sroka P., Pogoń P. and Machalica J. (2014). *Chaenomeles japonica*, *Cornus mas*, *Morus nigra* fruits characteristics and their processing potential, *Journal of Food Science and Technology* 51, 3934–3941.
- Tian Y., Liimatainen J., Alanne A.-L., Lindstedt A., Liu P., Sinkkonen J., Kallio H. and Yang B. (2017). Phenolic compounds extracted by acidic aqueous ethanol from berries and leaves of different berry plants, *Food Chemistry* 220, 266–281.
- Trifković J. and Andrić F. (2023). *Osnove obrade podataka u hemiji*. Univerzitet u Beogradu - Hemijski fakultet, Beograd.
- Usman K., Al-Ghouti M.A. and Abu-Dieyeh M.H. (2019). The assessment of cadmium, chromium, copper, and nickel tolerance and bioaccumulation by shrub plant *Tetraena qataranse*, *Scientific Reports* 9, 5658.
- Vaillant F. (2020). Blackberries. *Nutritional Composition and Antioxidant Properties of Fruits and Vegetables*, pp. 407–422. Elsevier.
- Van De Velde F., Esposito D., Grace M.H., Pirovani M.E. and Lila M.A. (2019). Anti-inflammatory and wound healing properties of polyphenolic extracts from strawberry and blackberry fruits, *Food Research International* 121, 453–462.
- Vanni A. and Gastaldi D. (1990). Kinetic investigations on the double enzymatic activity of the tyrosinase mushroom, *Anal Chim* 80, 35–60.
- Varzaru I., Oancea A.G., Vlaicu P.A., Saracila M. and Untea A.E. (2023). Exploring the antioxidant potential of blackberry and raspberry leaves: phytochemical analysis, scavenging activity, and in vitro polyphenol bioaccessibility, *Antioxidants* 12, 2125.
- Vega E.N., Molina A.K., Pereira C. *et al.* (2021). Anthocyanins from *Rubus fruticosus* L. and *Morus nigra* L. applied as food colorants: A natural alternative, *Plants* 10, 1181.

- Veličković I., Žižak Ž., Rajčević N., Ivanov M., Soković M., Marin P.D. and Grujić S. (2021). *Prunus spinosa* L. leaf extracts: polyphenol profile and bioactivities, *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* 49, 12137.
- Vennard T.R., Ruosch A.J., Wejrowski S.M. and Ellingson D.J. (2020). Sugar profile method by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection in food, dietary supplements, pet food, and animal feeds: First Action 2018.16, *Journal of AOAC INTERNATIONAL* 103, 89–102.
- Vilkickyte G., Raudone L. and Petrikaite V. (2020). Phenolic fractions from *Vaccinium vitis-idaea* L. and their antioxidant and anticancer activities assessment, *Antioxidants* 9, 1261.
- Vrhovsek U., Palchetti A., Reniero F., Guillou C., Masuero D. and Mattivi F. (2006). Concentration and mean degree of polymerization of *rubus* ellagitannins evaluated by optimized acid methanolysis, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 4469–4475.
- Vujanović M., Majkić T., Zengin G., Beara I., Cvetanović A., Mahomoodally Fawz M. and Radojković M. (2019). Advantages of contemporary extraction techniques for the extraction of bioactive constituents from black elderberry (*Sambucus nigra* L.) flowers, *Industrial Crops and Products* 136, 93–101.
- Vujanović M., Majkić T., Zengin G., Beara I., Tomović V., Šojić B., Đurović S. and Radojković M. (2020). Elderberry (*Sambucus nigra* L.) juice as a novel functional product rich in health-promoting compounds, *RSC Advances* 10, 44805–44814.
- Wang S.Y. and Lin H.-S. (2000). Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and developmental stage, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 140–146.
- Wang Y., Liu Y., Huo J., Zhao T., Ren J. and Wei X. (2013). Effect of different drying methods on chemical composition and bioactivity of tea polysaccharides, *International Journal of Biological Macromolecules* 62, 714–719.
- Wang S.Y. and Zheng W. (2001). Effect of plant growth temperature on antioxidant capacity in strawberry, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49, 4977–4982.
- Wei X., Chen D., Yi Y., Qi H., Gao X., Fang H., Gu Q., Wang L. and Gu L. (2012). Syringic acid extracted from *Herba Dendrobii* prevents diabetic cataract pathogenesis by inhibiting aldose reductase activity, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2012, 1–13.
- Weydert C.J. and Cullen J.J. (2010). Measurement of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue, *Nature Protocols* 5, 51–66.
- Willer H. and Yussefi Y. (2007). The world of organic agriculture - Statistics and emerging trend 2007, International Federation of Organic Agriculture Movements (IFOAM)
- Williams D.J., Edwards D., Chaliha M. and Sultanbawa Y. (2016). Measuring the three forms of ellagic acid: suitability of extraction solvents, *Chemical Papers* 70.
- Wu H., Di Q.-R., Zhong L., Zhou J.-Z., Shan C.-J., Liu X.-L. and Ma A.-M. (2022). Enhancement on antioxidant, anti-hyperglycemic and antibacterial activities of blackberry anthocyanins by processes optimization involving extraction and purification, *Frontiers in Nutrition* 9, 1007691.

- Wu X., Sun J., Ahuja J., Haytowitz D.B., Chen P., Burton-Freeman B. and Pehrsson P.R. (2019). Anthocyanins in processed red raspberries on the US market<sup>1,2</sup>, *Journal of Berry Research* 9, 603–613.
- Yan S., Li Y., Liu J., Si D. and Zhang X. (2023). Guideline for extraction, qualitative, quantitative, and stability analysis of anthocyanins, *eFood* 4, e59.
- Yang J., Cui J., Chen J., Yao J., Hao Y., Fan Y. and Liu Y. (2020). Evaluation of physicochemical properties in three raspberries (*Rubus idaeus*) at five ripening stages in northern China, *Scientia Horticulturae* 263, 109146.
- Ye L. and Neilson A. (2016). Comparison of A-type proanthocyanidins in cranberry and peanut skin extracts using matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry, *Journal of Molecular and Genetic Medicine* 10.
- Yıldırım A., Mavi A. and Kara A.A. (2001). Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49, 4083–4089.
- Zduńska K., Dana A., Kolodziejczak A. and Rotsztein H. (2018). Antioxidant properties of ferulic acid and its possible application, *Skin Pharmacology and Physiology* 31, 332–336.
- Zhang L., Shan Y., Tang K. and Putheti R. (2009). Ultrasound-assisted extraction flavonoids from Lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn) leaf and evaluation of its anti-fatigue activity, *International Journal of Physical Sciences* 4.
- Zielińska-Wasielica J., Olejnik A., Kowalska K., Olkiewicz M. and Dembczyński R. (2019). Elderberry (*Sambucus nigra* L.) Fruit extract alleviates oxidative stress, insulin resistance, and inflammation in hypertrophied 3T3-L1 adipocytes and activated RAW 264.7 macrophages, *Foods* 8, 326.
- Zorzi M., Gai F., Medana C., Aigotti R., Morello S. and Peiretti P.G. (2020a). Bioactive compounds and antioxidant capacity of small berries, *Foods* 9, 623.
- Zorzi M., Gai F., Medana C., Aigotti R. and Peiretti P.G. (2020b). Identification of polyphenolic compounds in edible wild fruits grown in the north-west of Italy by means of HPLC-DAD-ESI HRMS, *Plant Foods for Human Nutrition* 75, 420–426.

## 7. PRILOG

**Tabela P1.** Identifikovana fenolna jedinjenja u listu gajene maline i kupine primenom UHPLC-LTQ OrbiTrap XL.

Redni broj	$t_R$ , min	Molekulska formula, $[M-H]^-$	Izračunata masa, $[M-H]^-$ , $m/z$	Nađena masa, $[M-H]^-$ , $m/z$	$\Delta$ ppm	MS/MS Fragmenti (% osnovnog pika)	Identifikovana jedinjenja	Uzorci lista maline i kupine
1	2,60	$C_7H_5O_5^-$	169.01425	169,01395	1,77	125(100)	Galna kiselina <sup>a</sup>	Svi
2	3,13	$C_{13}H_{15}O_{10}^-$	331.06707	331,06616	2,75	313(100); 211(10); 168(80); 150(10); 125(20)	Galoil <i>O</i> -heksosid	Svi
3	4,16	$C_{15}H_{13}O_7^-$	305.06668	305,06583	2,79	287(10); 261(40); 247(20); 221(90); 219(80); 179(100)	Galokatehin <sup>a</sup>	LM2, LM1
4	4,24	$C_{13}H_{15}O_9^-$	315.07216	315,07123	2,95	153(100); 152(30); 135(25); 109(10)	Dihidroksibenzoil <i>O</i> -heksozid	Svi
5	4,39	$C_{13}H_{15}O_{11}^-$	371.06198	371,06110	2,37	353(10); 209(100); 191(15)	Kofoilsaharinska kiselina izomer 1	Svi
6	4,40	$C_7H_5O_4^-$	153.01933	153,01906	1,76	125(5); 109(100)	Protokatehinska kiselina <sup>a</sup>	Svi
7	4,55	$C_{13}H_{15}O_{11}^-$	371.06198	371,06116	2,21	353(10); 209(100); 191(10)	Kofoilsaharinska kiselina izomer 2	LM2, LK
8	4,56	$C_{18}H_{23}O_{13}^-$	447.11441	447,11359	1,83	315(100); 153(70)	Dihidrosibenzoil <i>O</i> -heksozilpentozid	Svi
9	4,57	$C_{16}H_{17}O_9^-$	353.08726	353,08676	1,42	191(100); 179(50); 173(5); 161(5); 135(10)	3- <i>O</i> -Kofoilhininska kiselina	Svi
10	4,68	$C_{15}H_{17}O_9^-$	341.08781	341,08701	2,35	281(5); 251(5); 203(10); 179(100); 161(40); 135(10)	Kofoil <i>O</i> -heksozid izomer 1	Svi
11	4,69	$C_8H_7O_4^-$	167.03498	167,03462	2,16	152(100); 123(90); 108(20)	Vanilinska kiselina	Svi
12	4,71	$C_{13}H_{15}O_{10}^-$	355.06707	355,06625	2,31	337(10); 209(40); 191(100)	<i>p</i> -Kumaroilsaharinska kiselina izomer 1	Svi
13	4,76	$C_{13}H_{13}O_8^-$	297.06159	297,06079	2,69	179(15); 135(100)	Kofoiltreonilska kiselina izomer 1	Svi
14	4,79	$C_{15}H_{15}O_9^-$	339.07216	339,07184	0,94	177(100)	Eskulin <sup>a</sup>	Svi
15	4,82	$C_{15}H_{13}O_7^-$	305.06668	305,06589	2,59	287(10); 261(40); 247(20); 221(90); 219(80); 179(100)	Epigalokatehin <sup>a</sup>	Svi
16	4,83	$C_{15}H_{17}O_9^-$	341.08781	341,08679	2,99	323(10); 281(100); 251(80); 233(5); 221(20); 179(25)	Kofoil <i>O</i> -heksozid izomer 2	LM1, LM2, LM3
17	4,84	$C_{13}H_{11}O_9^-$	311.04031	311,04001	0,97	179(50); 149(100)	Kofoilvinska kiselina	Svi
18	4,86	$C_{15}H_{13}O_6^-$	289.07176	289,07114	2,14	245(100); 231(10); 205(40); 179(20)	Katehin <sup>a</sup>	Svi
19	4,89	$C_{27}H_{29}O_{17}^-$	625.14102	625,14056	0,74	301(30); 463(100)	Kvercetin <i>O</i> -heksozilheksozid izomer 1	Svi
20	4,90	$C_{13}H_{15}O_{10}^-$	355.06707	355,06647	1,69	337(5); 209(20); 191(100)	<i>p</i> -Kumaroilsaharinska kiselina izomer 2	Svi
21	4,94	$C_{13}H_{13}O_8^-$	297.06159	297,06079	2,69	179(15); 135(100)	Kofoiltreoninska kiselina izomer 2	Svi
22	4,96	$C_{28}H_{31}O_{17}^-$	639.15667	639,15619	0,75	624(15); 519(15); 477(20); 459(65); 315(100); 314(50)	Izorametnin <i>O</i> -heksosilheksozide	Svi

Tabela P1. Nastavak.

Redni broj	$t_R$ , min	Molekulska formula, $[M-H]^-$	Izračunata masa, $[M-H]^-$ , $m/z$	Nađena masa, $[M-H]^-$ , $m/z$	$\Delta$ ppm	MS/MS Fragmenti (% osnovnog pika)	Identifikovana jedinjenja	Uzorci lista maline i kupine
23	4,98	$C_{15}H_{17}O_9^-$	341.08781	341,08688	2,73	323(15); 281(40); 251(100); 233(5); 221(25); 179(35)	Kofeioil <i>O</i> -heksozid isomer 3	Svi
24	5,02	$C_{15}H_{15}O_{10}^-$	355.06707	355,06625	2,31	337(10); 209(60); 191(100)	<i>p</i> -Kumaroilhsaharinska kiselina izomer 3	LM2
25	5,03	$C_{27}H_{29}O_{16}^-$	609.14611	609,14587	0,39	489(10); 447(30); 429(100); 285(10)	Kampferol <i>O</i> -heksosilheksozid izomer 1	LM1, LM2, LM3
26	5,04	$C_{16}H_{17}O_8^-$	337.09289	337,09207	2,43	191(10); 173(10); 163(100); 119(10)	3- <i>O-p</i> -Kumaroilhininska kiselina	LK
27	5,07	$C_{17}H_{21}O_{12}^-$	417.10385	417,10324	1,46	285(40); 241(100); 153(60)	Dihidroksibenzoil <i>O</i> -pentozilpentozid	Svi
28	5,12	$C_{16}H_{17}O_9^-$	353.08726	353,08670	1,59	191(100); 179(20); 173(40); 135(5)	5- <i>O</i> -Kofeoilhininska kiselina <sup>a</sup>	Svi
29	5,13	$C_{27}H_{29}O_{16}^-$	609.14611	609,14508	1,69	489(10); 447(100); 285(20)	Kampferol <i>O</i> -heksosilheksozid izomer 2	Svi
30	5,17	$C_{22}H_{21}O_{12}^-$	477.10385	477,10366	0,40	449(5); 357(15); 315(30); 314(100)	Izorametin <i>O</i> -heksosid	LM2
31	5,19	$C_7H_5O_3^-$	137.02442	137,02428	1,02	93(100)	<i>p</i> -Hidroksibenzoeva kiselina <sup>a</sup>	Svi
32	5,20	$C_{26}H_{17}O_{11}^-$	385.07763	385,07690	1,90	367(10); 353(90); 223(60); 209(15); 191(100)	Feruloilheksariinska kiselina	LM1, LM2, LM3
33	5,28	$C_{15}H_{13}O_6^-$	289.07176	289,07114	2,14	245(100); 231(10); 205(40); 179(20)	Epikatehin <sup>a</sup>	LM1, LM2, LK
34	5,28	$C_{20}H_{13}O_{14}^-$	477.03108	477,03024	1,76	301(100)	Elagoil <i>O</i> -heksuronid	LK
35	5,38	$C_{13}H_{11}O_8^-$	295.04594	295,04520	2,51	163(100); 149(45); 119(5)	<i>p</i> -Kumaroilvinska kiselina	Svi
36	5,41	$C_{22}H_{17}O_{11}^-$	457.07763	457,07675	1,93	331(50); 305(25); 287(10); 269(5); 193(5); 169(100)	Galokatehin galat <sup>a</sup>	Svi
37	5,42	$C_{17}H_{19}O_9^-$	367.10346	367,10251	2,59	335(5); 193(10); 179(5); 161(100); 149(5); 135(10)	Metil 3- <i>O</i> -kofeoilhinat	Svi
38	5,43	$C_{13}H_{13}O_8^-$	297.06159	297,06094	2,19	179(15); 135(100)	Cafeoiltreoninska kiselina izomer 3	Svi
39	5,45	$C_{13}H_{13}O_7^-$	281.06668	281,06604	2,28	163(100)	<i>p</i> -Kumaroiltreoninska kiselina	Svi
40	5,50	$C_7H_5O_4^-$	153.01933	153,01898	2,29	125(5); 109(100)	Gentizinska kiselina <sup>a</sup>	Svi
41	5,51	$C_{22}H_{17}O_{11}^-$	457.07763	457,07690	1,60	331(50); 305(25); 287(10); 269(5); 193(5); 169(100)	Epigalokatehin galat <sup>a</sup>	Svi
42	5,53	$C_{27}H_{29}O_{17}^-$	625.14102	625,13965	2,19	607(5); 505(15); 463(15); 445(50); 301(50); 300(100)	Kvercetin <i>O</i> -heksosilheksozid izomer 2	LM1, LM2, LK
43	5,55	$C_9H_7O_4^-$	179.03498	179,03460	2,12	135(100)	Kofeinska kiselina <sup>a</sup>	Svi

Tabela P1. Nastavak.

Redni broj	$t_R$ , min	Molekulska formula, [M-H] <sup>-</sup>	Izračunata masa, [M-H] <sup>-</sup> , $m/z$	Nađena masa, [M-H] <sup>-</sup> , $m/z$	$\Delta$ ppm	MS/MS Fragmenti (% osnovnog pika)	Identifikovana jedinjenja	Uzorci lista maline i kupine
44	5,62	C <sub>14</sub> H <sub>13</sub> O <sub>9</sub> <sup>-</sup>	325.05651	325,05582	2,12	193(100); 149(10)	Feruloilvinska kiselina	LM1, LM2, LM3
45	5,63	C <sub>16</sub> H <sub>17</sub> O <sub>8</sub> <sup>-</sup>	337.09289	337,09192	2,88	191(5); 173(100); 163(10)	4- <i>O-p</i> -Kumaroilhininska kiselina	Svi
46	5,66	C <sub>14</sub> H <sub>15</sub> O <sub>8</sub> <sup>-</sup>	311.07669	311,07648	0,68	279(100); 193(35); 179(55); 161(5); 135(5)	Kofeioil <i>O</i> -pentozid izomer 1	Svi
47	5,66	C <sub>16</sub> H <sub>19</sub> O <sub>9</sub> <sup>-</sup>	355.10346	355,10281	1,83	295(5); 217(60); 193(100); 175(40); 160(5); 134(5)	Feruloil <i>O</i> -heksozid	LM1, LM2, LK
48	5,74	C <sub>26</sub> H <sub>25</sub> O <sub>17</sub> <sup>-</sup>	609.10972	609,10883	1,46	307(10); 301(100); 300(10)	Kvercetin <i>O-p</i> -kumaroilheksosid	Svi
49	5,79	C <sub>17</sub> H <sub>19</sub> O <sub>9</sub> <sup>-</sup>	367.10346	367,10263	2,26	335(10); 193(10); 179(10); 161(100); 135(30)	Metil 4- <i>O</i> -kofeoilhinat	Svi
50	5,80	C <sub>19</sub> H <sub>13</sub> O <sub>12</sub> <sup>-</sup>	433.04125	433,04037	2,03	301(100); 300(50)	Elagoil <i>O</i> -pentozid	Svi
51	5,86	C <sub>14</sub> H <sub>15</sub> O <sub>8</sub> <sup>-</sup>	311.07669	311,07648	0,68	279(100); 251(10); 179(10); 161(10); 135(5)	Kofeoil <i>O</i> -pentozid izomer 2	Svi
52	5,92	C <sub>16</sub> H <sub>17</sub> O <sub>8</sub> <sup>-</sup>	337.09289	337,09238	1,51	191(100); 163(10)	5- <i>O-p</i> -Kumaroilhininska kiselina	LM1, LM2, LM3
53	5,95	C <sub>27</sub> H <sub>29</sub> O <sub>16</sub> <sup>-</sup>	609.14611	609,14484	2,08	343(10); 300(30); 301(100); 271(10); 255(5)	Rutin <sup>a</sup>	Svi
54	5,99	C <sub>17</sub> H <sub>19</sub> O <sub>9</sub> <sup>-</sup>	367.10346	367,10266	2,18	193(15); 191(20); 179(100); 173(5); 161(10); 135(30)	Metil 5- <i>O</i> -kofeoilhinat	Svi
55	5,99	C <sub>12</sub> H <sub>17</sub> O <sub>10</sub> <sup>-</sup>	441.08272	441,08209	1,43	331(15); 289(100); 271(10); 193(5); 169(25)	Katehin galat <sup>a</sup>	Svi
56	6,00	C <sub>9</sub> H <sub>7</sub> O <sub>3</sub> <sup>-</sup>	163.04007	163,03984	1,41	119(100)	<i>p</i> -Kumarinska kiselina <sup>a</sup>	Svi
57	6,04	C <sub>26</sub> H <sub>25</sub> O <sub>16</sub> <sup>-</sup>	593.11481	593,11414	1,13	307(10); 285(100)	Kampferol <i>O</i> -pentozilheksuronid	LM1, LM2, LM3
58	6,08	C <sub>14</sub> H <sub>15</sub> O <sub>8</sub> <sup>-</sup>	311.07669	311,07657	0,39	221(60); 193(25); 179(60); 161(30); 135(100)	Kofeoil <i>O</i> -pentozid izomer 3	Svi
59	6,15	C <sub>21</sub> H <sub>19</sub> O <sub>12</sub> <sup>-</sup>	463.08820	463,08737	1,79	301(100); 300(40)	Kvercetin <i>O</i> -heksozid	Svi
60	6,15	C <sub>21</sub> H <sub>17</sub> O <sub>13</sub> <sup>-</sup>	477.06746	477,06726	0,42	301(100); 300(10)	Kvercetin <i>O</i> -heksuronid	Svi
61	6,23	C <sub>14</sub> H <sub>5</sub> O <sub>8</sub> <sup>-</sup>	300.99899	300,99829	2,33	301(50); 284(30); 257(100); 229(70); 185(40)	Elaginska kiselina <sup>a</sup>	Svi
62	6,24	C <sub>27</sub> H <sub>31</sub> O <sub>14</sub> <sup>-</sup>	579.17193	579,17133	1,04	459(100); 357(5); 313(25); 271(45); 235(10)	Naringin <sup>a</sup>	Svi
63	6,26	C <sub>27</sub> H <sub>27</sub> O <sub>17</sub> <sup>-</sup>	623.12537	623,12433	1,67	315(40); 301(50); 300(100); 299(20); 271(30)	Kvercetin <i>O</i> -ramnozil-heksuronid	LM1, LM2, LM3
64	6,27	C <sub>27</sub> H <sub>29</sub> O <sub>15</sub> <sup>-</sup>	593.15119	593,15063	0,94	285(100)	Kampferol <i>O</i> -rutinozid	LK

Tabela P1. Nastavak.

Redni broj	$t_R$ , min	Molekulska formula, [M-H] <sup>-</sup>	Izračunata masa, [M-H] <sup>-</sup> , $m/z$	Nađena masa, [M-H] <sup>-</sup> , $m/z$	$\Delta$ ppm	MS/MS Fragmenti (% osnovnog pika)	Identifikovana jedinjenja	Uzorci lista maline i kupine
65	6,29	C <sub>27</sub> H <sub>27</sub> O <sub>16</sub> <sup>-</sup>	607.13046	607,12933	1,86	545(10); 505(20); 463(100); 301(5)	Kvercetin <i>O</i> -hidroksi metil glutaroilheksozid	Svi
66	6,34	C <sub>28</sub> H <sub>31</sub> O <sub>16</sub> <sup>-</sup>	623.16176	623,16107	1,11	315(100); 301(50); 300(100); 299(20); 271(30)	Izorametin <i>O</i> -rutinozid	LK
67	6,41	C <sub>21</sub> H <sub>19</sub> O <sub>11</sub> <sup>-</sup>	447.09329	447,09305	0,54	327(20); 285(80); 284(100); 255(10)	Kampferol <i>O</i> -heksosid izomer 1	Svi
68	6,41	C <sub>20</sub> H <sub>15</sub> O <sub>12</sub> <sup>-</sup>	447.05690	447,05640	1,12	315(100); 300(5); 285(5); 284(10)	Metil elagoil <i>O</i> -pentozid	Svi
69	6,43	C <sub>20</sub> H <sub>17</sub> O <sub>11</sub> <sup>-</sup>	433.07763	433,07703	1,39	343(5); 301(90); 300(100)	Kvercetin <i>O</i> -pentozid	Svi
70	6,47	C <sub>21</sub> H <sub>15</sub> O <sub>13</sub> <sup>-</sup>	475.05181	475,05115	1,39	301(100); 300(60)	Elagoil <i>O</i> -acetil pentozid	Svi
71	6,51	C <sub>21</sub> H <sub>19</sub> O <sub>11</sub> <sup>-</sup>	447.09329	447,09268	1,36	327(15); 285(100); 284(95); 255(10)	Kampferol <i>O</i> -heksosid izomer 2	Svi
72	6,52	C <sub>21</sub> H <sub>17</sub> O <sub>12</sub> <sup>-</sup>	461.07255	461,07196	1,28	285(100)	Kampferol <i>O</i> -heksuronid	Svi
73	6,55	C <sub>27</sub> H <sub>27</sub> O <sub>15</sub> <sup>-</sup>	591.13554	591,13477	1,30	529(20); 489(30); 447(100); 285(10)	Kampferol <i>O</i> -hidroksi metil glutaroilheksozid	Svi
74	6,64	C <sub>22</sub> H <sub>19</sub> O <sub>13</sub> <sup>-</sup>	491.08311	491,08221	1,83	473(10); 315(70); 301(100); 300(60)	Izorametin <i>O</i> -hekuuronid	Svi
75	6,66	C <sub>21</sub> H <sub>17</sub> O <sub>11</sub> <sup>-</sup>	445.07763	445,07697	1,48	269(100); 175(15)	Apigenin <i>O</i> -heksuronid	LK
76	6,74	C <sub>20</sub> H <sub>17</sub> O <sub>10</sub> <sup>-</sup>	417.08272	417,08221	1,22	327(10); 285(40); 284(100); 255(5)	Kampferol <i>O</i> -pentozid	Svi
77	6,82	C <sub>15</sub> H <sub>9</sub> O <sub>8</sub> <sup>-</sup>	317.03029	317,02942	2,74	179(100); 151(30); 137(10)	Miricetin <sup>a</sup>	LM1, LK
78	6,85	C <sub>22</sub> H <sub>19</sub> O <sub>11</sub> <sup>-</sup>	459.09329	459,09262	1,46	297(100); 279(5); 179(5); 135(5)	Dikoferoiltreoninska kiselina	Svi
79	7,40	C <sub>26</sub> H <sub>25</sub> O <sub>12</sub> <sup>-</sup>	529.13515	529,13422	1,76	367(100); 349(5); 179(10); 161(5)	Metil dikofeolhinat	Svi
80	7,42	C <sub>10</sub> H <sub>9</sub> O <sub>4</sub> <sup>-</sup>	193.05063	193,05013	2,59	178(30); 149(40); 134(100)	Ferulinska kiselina <sup>a</sup>	Svi
81	7,50	C <sub>30</sub> H <sub>25</sub> O <sub>13</sub> <sup>-</sup>	593.13006	593,12964	0,71	447(10); 307(5); 285(100); 284(10)	Kampferol <i>O</i> - <i>p</i> -kumaroilheksozid	Svi
82	7,86	C <sub>15</sub> H <sub>9</sub> O <sub>7</sub> <sup>-</sup>	301.03538	301,03458	2,66	273(20); 257(20); 179(100); 151(70)	Kvercetin <sup>a</sup>	Svi
83	8,39	C <sub>15</sub> H <sub>9</sub> O <sub>6</sub> <sup>-</sup>	285.04046	285,03970	2,67	285(100); 229(50); 185(50); 151(65)	Kampferol <sup>a</sup>	Svi

<sup>a</sup> Potvrđeni pomoću dostupnih standarda, dok su sva ostala jedinjenja identifikovana na osnovu MS/MS podataka. Brojevi identifikovanih jedinjenja odgovaraju pikovima na Slici 18.

**Tabela P2.** Identifikovani antocijanini sa intezitetima struja u plodu gajenih jagodastih voćnih vrsta.

Redni broj	$t_R$ , min	Tačna mass, $M^+$	Molekulska formula, $M^+$	Izračunata masa, $M^+$	$\Delta$ mDa	MS/MS fragmenti	Identifikovana jedinjenja	Intezitet struje (V)			
								Malina (M)	Kupina (K)	Dud (D)	Jagoda (J)
<b>Derivati cijanidina</b>											
1	5,29	757,21454	$C_{33}H_{41}O_{20}^+$	757,21857	4,03	611, 449, 287	Cijanidin 3- <i>O</i> -heks-heks-ram	105634	0	0	0
2	5,31	611,15674	$C_{27}H_{31}O_{16}^+$	611,16066	3,92	449, 287	Cijanidin 3- <i>O</i> -heks-heks	8026089	7127	16317	0
3	5,43	581,14795	$C_{26}H_{29}O_{15}^+$	581,15065	2,70	419, 287	Cijanidin 3- <i>O</i> -pent-heks	55684	9944	0	0
4	5,47	595,16229	$C_{27}H_{31}O_{15}^+$	595,16575	3,46	449, 287	Cijanidin 3- <i>O</i> -heks-ram	612216	0	356197	17157
5	5,48	741,22101	$C_{33}H_{41}O_{19}^+$	741,22366	2,65	595, 449, 287	Cijanidin 3- <i>O</i> -heks-ram-ram	7387	0	0	0
6	5,49	449,10522	$C_{21}H_{21}O_{11}^+$	449,10784	2,62	287	Cijanidin 3- <i>O</i> -heks	8256479	12714511	13862841	751157
7	5,65	565,15424	$C_{26}H_{29}O_{14}^+$	565,15518	0,94	419, 287	Cijanidin 3- <i>O</i> -pent-ram	2445	0	0	0
8	5,69	433,11044	$C_{21}H_{21}O_{10}^+$	433,11292	2,48	287	Cijanidin 3- <i>O</i> -ram	1586262	333486	0	0
9	5,81	419,09537	$C_{20}H_{19}O_{10}^+$	419,09727	1,90	287	Cijanidin 3- <i>O</i> -pent	1362	937267	7692	0
<b>Derivati definidina</b>											
10	5,66	581,14972	$C_{26}H_{29}O_{15}^+$	581,15065	0,93	435, 303	Delfinidin 3- <i>O</i> -pent-ram	6414	0	0	0
11	5,98	627,15198	$C_{27}H_{31}O_{17}^+$	627,15558	3,60	465, 303	Delfinidin 3- <i>O</i> -heks-heks	21654	4847	0	0
12	6,38	611,16003	$C_{27}H_{31}O_{16}^+$	611,16066	0,63	465, 303	Delfinidin 3- <i>O</i> -heks-ram	0	93081	87264	0
13	6,54	465,10049	$C_{21}H_{21}O_{12}^+$	465,10275	2,26	303	Delfinidin 3- <i>O</i> -heks	44893	406411	56534	0
14	6,75	435,08777	$C_{20}H_{19}O_{11}^+$	435,09219	4,42	303	Delfinidin 3- <i>O</i> -pent	4288	31248	0	0
15	6,88	449,10413	$C_{21}H_{21}O_{11}^+$	449,10784	3,71	303	Delfinidin 3- <i>O</i> -ram	19250	0	0	0
<b>Derivati pelargonidina</b>											
16	5,70	579,16785	$C_{27}H_{31}O_{14}^+$	579,17083	2,98	433, 271	Pelargonidin 3- <i>O</i> -heks-ram	14622	0	5248	9273
17	7,48	433,11044	$C_{21}H_{21}O_{10}^+$	433,11292	2,48	271	Pelargonidin 3- <i>O</i> -heks-ram	0	56913	37549	8617
18	7,89	417,11609	$C_{21}H_{21}O_9^+$	417,11801	1,92	271	Pelargonidin 3- <i>O</i> -ram	2871	31074	0	0

Pent – pentozid, heks -heksozid, i ram - ramnozid



**Tabela P3.** Identifikovani antocijanini sa vrednostima intezitetima struja u plodu samoniklih voćnih vrsta.

Redni broj	t <sub>R</sub> , min	Tačna masa, M <sup>+</sup>	Molekulska formula, M <sup>+</sup>	Izračunata masa, M <sup>+</sup>	Δ mDa	MS/MS Fragmenti (% osnovnog pika)	Identifikovana jedinjenja	Intezitet struje (V)			
								Zova (ZO)	Dren (DR)	Crni trn (TR)	Glog (GL)
<b>Derivati cijanidina</b>											
2	5,29	611,15582	C <sub>27</sub> H <sub>31</sub> O <sub>16</sub> <sup>+</sup>	611,16066	4,84	449(100), 287(80)	Cijanidin 3- <i>O</i> -heks-heks	1185876	13968	141520	0
5	5,58	581,14587	C <sub>26</sub> H <sub>29</sub> O <sub>15</sub> <sup>+</sup>	581,15065	4,78	287(100)	Cijanidin 3- <i>O</i> -pent-heks	32260380	6996	158950	0
6	5,62	595,16205	C <sub>27</sub> H <sub>31</sub> O <sub>15</sub> <sup>+</sup>	595,16575	3,70	449(10), 287(100)	Cijanidin 3- <i>O</i> -heks-ram	278025	2389730	5032890	0
7	5,67	449,10507	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>11</sub> <sup>+</sup>	449,10784	2,77	287(100)	Cijanidin 3- <i>O</i> -heks	21464772	45975456	4575867	7449
11	5,91	419,09424	C <sub>20</sub> H <sub>19</sub> O <sub>10</sub> <sup>+</sup>	419,09727	3,03	287(100)	Cijanidin 3- <i>O</i> -pent	0	189145	297268	3716
19	6,84	595,16217	C <sub>27</sub> H <sub>31</sub> O <sub>15</sub> <sup>+</sup>	595,16575	3,58	449(20), 287(100)	Cijanidin 3- <i>O</i> -heks-ram	259695	14208	8855	0
21	7,03	449,10471	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>11</sub> <sup>+</sup>	449,10784	3,13	287(100)	Cijanidin 3- <i>O</i> -heks	13994	1070077	386477	2598
<b>Derivati delfinidina</b>											
3	5,41	465,09985	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>12</sub> <sup>+</sup>	465,10275	2,90	303(100)	Delfinidin 3- <i>O</i> -heks	0	415866	0	0
16	6,53	611,15698	C <sub>27</sub> H <sub>31</sub> O <sub>16</sub> <sup>+</sup>	611,16066	3,68	465(20), 303(100)	Delfinidin 3- <i>O</i> -heks-ram	5671077	70974	335477	0
18	6,73	465,09952	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>12</sub> <sup>+</sup>	465,10275	3,23	303(100)	Delfinidin 3- <i>O</i> -heks	854921	480335	291089	0
<b>Derivati pelargonidina</b>											
8	5,80	565,15179	C <sub>26</sub> H <sub>29</sub> O <sub>14</sub> <sup>+</sup>	565,15518	3,39	271(100)	Pelargonidin 3- <i>O</i> -pent-heks	678842	0	66749	0
9	5,83	579,16742	C <sub>27</sub> H <sub>31</sub> O <sub>14</sub> <sup>+</sup>	579,17083	3,41	433(10), 271(100)	Pelargonidin 3- <i>O</i> -heks-ram	14551	259182	0	0
10	5,86	433,11026	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>10</sub> <sup>+</sup>	433,11292	2,66	271(100)	Pelargonidin 3- <i>O</i> -heks	268346	21139832	21061	0
<b>Derivati peonidina</b>											
12	5,94	609,17682	C <sub>28</sub> H <sub>33</sub> O <sub>15</sub> <sup>+</sup>	609,18140	4,58	463(20), 301(100)	Peonidin 3- <i>O</i> -heks-ram	0	0	11292980	0
13	5,97	463,12006	C <sub>22</sub> H <sub>23</sub> O <sub>11</sub> <sup>+</sup>	463,12349	3,43	301(100)	Peonidin 3- <i>O</i> -heks	20035	0	3798472	0
15	6,28	433,10999	C <sub>20</sub> H <sub>19</sub> O <sub>9</sub> <sup>+</sup>	433,11292	2,93	301(100)	Peonidin 3- <i>O</i> -pent	0	0	144154	0

Pent – pentozid, heks -heksozid, i ram - ramnozid

## BIOGRAFIJA

Aleksandra Pavlović (rođena Lazić) rođena je 08.07.1982. godine u Beogradu, Republika Srbija. Osnovnu školu i gimnaziju završila je u Beogradu. Osnovne akademske studije na studijskom programu "Diplomirani hemičar" na Univerzitetu u Beogradu – Hemijskom fakultetu upisala je školske 2001/02. godine, a diplomirala je 2008. godine, pri Katedri za analitičku hemiju, sa prosečnom ocenom 7,40 (sedam i 40/100) i ocenom 10 na završnom radu. Master akademske studije na studijskom programu "Hemija" na Univerzitetu u Beogradu - Hemijskom fakultetu pri Katedri za analitičku hemiju upisala je školske 2008/09. godine. Master rad pod naslovom: "Određivanje sadržaja ukupne elaginske kiseline u malini primenom tankoslojne hromatografije" odbranila je u 17.02.2011. godine, sa ocenom 10 i stekla zvanje master hemičar. Doktorske akademske studije na studijskom programu "Hemija" pri Katedri za analitičku hemiju Univerziteta u Beogradu – Hemijskog fakulteta upisala je školske 2012/13. godine.

U periodu od januara 2009. godine do avgusta 2019. godine bila je zaposlena kao stručno-tehnički saradnik za rad u laboratorijama na Katedri za analitičku hemiju Univerziteta u Beogradu - Hemijskog fakulteta, a od avgusta 2019. godine kao samostalni stručno-tehnički saradnik za rad u laboratorijama. Od aprila 2018. je kao analitičar angažovana u InovaLab – akreditovanoj laboratoriji Inovacionog centra Hemijskog fakulteta u Beogradu.

Od juna 2021. godine Aleksandra Pavlović je angažovana kao saradnik na Evropskom projektu "Inovativna analitička platforma za istraživanje efekta i toksičnosti mikro i nano plastika u kombinaciji sa zagađivačima životne sredine na rizik od alergijske bolesti u prekliničkoj i kliničkoj studiji" – IMPTOX (No. 965173), Horizont 2020. Takođe, Aleksandra Pavlović je kao član tima učestvovala u realizaciji nekoliko inovacionih vaučera finansiranih od Fonda za inovacionu delatnost.

Aleksandra Pavlović je koautor pet naučnih radova objavljena u međunarodnim časopisima i to dva rada publikovana u časopisima izuzetnih vrednosti (M21a) i tri rada u istaknutim međunarodnim časopisima (M22), kao i jedanaest naučnih saopštenja na međunarodnim naučnim skupovima i na skupovima nacionalnog značaja. Rezultati istraživanja, proistekli iz ove doktorske disertacije, prikazani su u tri naučna rada. Dva rada štampana su u međunarodnim časopisima izuzetnih vrednosti (M21a), dok je jedan rad publikovan u časopisu vrhunskih vrednosti (M22).

**Naučni radovi:**

1. Sofija Đorđević, Nebojša Nedić, Aleksandra Pavlović, Dušanka Milojković-Opsenica, Živoslav Tešić, Uroš Gašić (2022). Honey with added value – enriched with rutin and quercetin from Sophora flower, *Journal of Herbal Medicine*, 34, 100580.
2. **Maja Natić, Aleksandra Pavlović, Fabrizia Lo Bosco, Nemanja Stanisavljević, Dragana Dabić Zagorac, Milica Fotirić Akšić, Adele Papetti (2019). Nutraceutical properties and phytochemical characterization of wild Serbian fruits, *European Food Research and Technology*, 245, 469–478.**
3. **Aleksandra V. Pavlović, Adele Papetti, Dragana Č. Dabić Zagorac, Uroš M. Gašić, Danijela M. Mišić, Živoslav LJ. Tešić, Maja M. Natić (2016). Phenolics composition of leaf extracts of raspberry and blackberry cultivars grown in Serbia, *Industrial Crops and Products*, 87, 304-314.**
4. Danica S. Perušković, Branka Darić, Anita Blagus, Nikola R. Stevanović, Aleksandra V. Pavlović, Aleksandar Đ. Lolić, Rada M. Baošić (2015). Influence of organic modifiers on RP-TLC determination of lipophilicity of some polydentate Schiff bases, *Monatshefte Fur Chemie*, 146 (1), 1–6.
5. **Aleksandra V. Pavlović, Dragana Č. Dabić, Nebojša M. Momirović, Biljana P. Dojčinović, Dušanka M. Milojković-Opsenica, Živoslav LJ. Tešić, and Maja M. Natić (2013). Chemical Composition of Two Different Extracts of Berries Harvested in Serbia, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61 (17), 4188–4194.**

**Изјава о ауторству**

Име и презиме аутора **Александра Павловић**

Број индекса **ДХ43/2012**

**Изјављујем**

да је докторска дисертација под насловом

**Оптимизација аналитичког поступка за карактеризацију и класификацију различитих врста гајеног и самониклог воћа**

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

У Београду, \_\_\_\_\_

**Потпис аутора**

\_\_\_\_\_

**Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада**

Име и презиме аутора	<b>Александра Павловић</b>
Број индекса	<b>ДХ43/2012</b>
Студијски програм	<b>Хемија</b>
Наслов рада	<b>Оптимизација аналитичког поступка за карактеризацију и класификацију различитих врста гајеног и самониклог воћа</b>
Ментор	<b>др Маја Натић</b>

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

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

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

У Београду, \_\_\_\_\_

**Потпис аутора**

\_\_\_\_\_

## Изјава о коришћењу

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

### **Оптимизација аналитичког поступка за карактеризацију и класификацију различитих врста гајеног и самониклог воћа**

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

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

У Београду, \_\_\_\_\_

**Потпис аутора**

\_\_\_\_\_

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