



Универзитет у Нишу
Технолошки факултет у Лесковцу



Иван М. Савић

**ОПТИМИЗАЦИЈА ТЕХНОЛОШКОГ ПОСТУПКА
ИЗОЛАЦИЈЕ АМИГДАЛИНА И КВЕРЦЕТИНА ИЗ
БИЉНОГ МАТЕРИЈАЛА И ЊИХОВА
ФАРМАКОЛОШКА АКТИВНОСТ**

- докторска дисертација -

Лесковац, 2014.



University of Nis
Faculty of Technology in Leskovac



Ivan M. Savic

**OPTIMIZATION OF THE TECHNOLOGICAL
PROCEDURE FOR ISOLATION OF AMYGDALIN
AND QUERCETIN FROM PLANTS AND THEIR
PHARMACOLOGICAL ACTIVITY**

- Doctoral Disertation -

Leskovac, 2014.

оболелима од рака

МЕНТОР:

проф. др Весна Николић,
Универзитет у Нишу, Технолошки факултет у Лесковцу

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ:

проф. др Љубиша Николић,
Универзитет у Нишу, Технолошки факултет у Лесковцу

др Светлана Ибрић, ванред. проф.
Универзитет у Београду, Фармацеутски факултет

др Татјана Кундаковић, ванред. проф.
Универзитет у Београду, Фармацеутски факултет

проф. др Стево Најман,
Универзитет у Нишу, Медицински факултет

Датум одбране: _____

Захвалница

Експериментални део ове докторске дисертације урађен је у лабораторијама Технолошког факултета Универзитета у Нишу, на пројекту ГР 34012 под називом „Биљни и синтетски биоактивни производи новије генерације”, које финансира Министарство просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије. Валидација методе и микробиолошка испитивања урађена су у лабораторијама ФХИ “Здравље Актавис” у Лесковцу. Испитивања цитотоксичности урађена су на “Институту за онкологију и радиологију Србије” у Београду.

Овом приликом желим да се захвалим:

- Ментору др **Весни Николић**, редовном професору Технолошког факултета Универзитета у Нишу, на пренешеном искуству и знању током научног рада. Посебно јој се захваљујем на драгоцености помоћи при избору теме, реализацији и интерпретацији добијених резултата, као и на корисним сугестијама приликом коначне израде ове докторске дисертације. Њена несебична подршка од почетка сарадње помогла је да превазиђем све препреке, које су се појавиле током докторских студија.
- Др **Љубиши Николићу**, редовном професору Технолошког факултета Универзитета у Нишу, на предлозима и несебичној помоћи током израде докторске дисертације.
- Др **Светлани Ибрић**, ванредном професору Фармацеутског факултета Универзитета у Београду, на стручној помоћи у области моделовања екстракционих поступака експерименталним дизајном и неуронским мрежама, као и на сугестијама и саветима током коначне израде ове докторске дисертације.
- Др **Татјани Кундаковић**, ванредном професору Фармацеутског факултета Универзитета у Београду, на драгоценим саветима и коментарима, који су допринели да ова докторска дисертација добије овај изглед.
- Др **Стеви Најману**, редовном професору Медицинског факултета Универзитета у Нишу, на корисним сугестијама и предлозима у току израде дисертације.

- *Карлу Модеру, редовном професору Универзитета природних ресурса и природних наука у Бечу (Аустрија), и Мајклу Хопкинсу, власнику „Hopkins Research Ltd.” у Севеноаксу (Велика Британија) на несебично пруженом знању и искуству у области експерименталног дизајна и неуронских мрежа.*
- *Захваљујем се породици на разумевању, стрпљењу и моралној подршци током свих година уложених у моје усавршавање. Искрену захвалност дугујем сестри и колегиници **Ивани** на пруженој стручној помоћи у току израде ове дисертације.*

Иван Савић, дипл. инг.

ОПТИМИЗАЦИЈА ТЕХНОЛОШКОГ ПОСТУПКА ИЗОЛАЦИЈЕ АМИГДАЛИНА И КВЕРЦЕТИНА ИЗ БИЉНОГ МАТЕРИЈАЛА И ЊИХОВА ФАРМАКОЛОШКА АКТИВНОСТ

ИЗВОД

Биљни екстракти и једињења изолована из природних извора углавном се користе у превенцији неких хроничних обољења. Ова биоактивна једињења налазе све већу примену у модерној конвенционалној медицини. Упркос великом напретку у лечењу малигнух тумора, ова болест и даље односи велики број живота. Данас се на тржишту могу наћи бројни хемотерапеутици у циљу лечења ове болести. Због своје токсичности већина лекова и лековитих производа не може да се апликује у дозама које у потпуности сузбијају раст ћелија тумора у организму. За третман ове болести данас се примењује велики број фармаколошки активних агенаса изолованих из биљака, међу којима су кверцетин и амигдалин.

Стога је циљ ове дисертације њихова изолација из биљних материјала (листа зеленог чаја и семена шљиве). У раду је испитан утицај времена екстракције, природе растварача и односа биљне сировине и растварача на принос кверцетина, односно укупних флавоноида из листа зеленог чаја применом техника експерименталног дизајна и вештачких неуронских мрежа. Код екстракције амигдалина из семена шљиве поред наведених параметара испитан је и утицај температуре екстракције. Садржај амигдалина и кверцетина у добијеним екстрактима одређен је развијеним HPLC методама. Садржај укупних флавоноида испитан је спектрофотометријском методом, која се заснива на грађењу комплекса са алуминијум хлоридом.

Амигдалин је изолован из етанолног екстракта семена шљиве након додатка диетил-етра. Чистоћа овако добијеног амигдалина је 90% и дефинисана је у односу на расположиви стандард применом HPLC методе. Структурна карактеризација изолованог амигдалина извршена је применом UV, IC и ESI-MS/MS метода.

У циљу одређивања фармаколошких активности екстракта зеленог чаја и семена шљиве, изолованог амигдалина, стандарда кверцетина и амигдалина примењене су одговарајуће методе за одређивање антиоксидативне (DPPH тест), антимикробне (диск дифузиона метода) и антипролиферативне активности (MTT тест).

На основу ових фармаколошких испитивања показано је да стандард кверцетина и екстракт зеленог чаја имају бољу антиоксидативну активност у односу на стандард амигдалина и екстракт семена шљиве. Микробиолошким испитивањима утврђено је да

стандард амигдалина и екстракт семена шљиве показују антимикуробну активност само на сојевима *Pseudomonas aeruginosa* (>23 mm код оба узорка) и *Escherichia coli* (17-19 mm и 20-22 mm, респективно). Стандард кверцетина и екстракта зеленог чаја показују додатно дејство и на сој *Staphylococcus aureus* са зонама инхибиције 20-22 mm и 17-19 mm, респективно.

МТТ тестом утврђено је да су добијене IC₅₀ вредности за изолат и стандард амигдалина (>379,5 μg cm⁻³ и 304,65-333,27 μg cm⁻³, респективно) на испитиваним ћелијским линијама више у поређењу са екстрактом зеленог чаја и стандардом кверцетина (47,41-114,39 μg cm⁻³ и 19,24-44,07 μg cm⁻³, респективно). Вредности за IC₅₀ су очекиване и у складу са литературним подацима. Цитотоксичност амигдалина може да се повећава уз додатак ензима β-D-глюкозидазе.

Кључне речи: оптимизација, екстракција, амигдалин, кверцетин, укупни флавоноиди, семе шљиве, зелени чај, антиоксидативна активност, антимикуробна активност, цитотоксичност.

Научна област: Технолошко инжењерство

Ужа научна област: Хемија и хемијске технологије

УДК број: 547.972.3:615.01

OPTIMIZATION OF THE TECHNOLOGICAL PROCEDURE FOR ISOLATION OF AMYGDALIN AND QUERCETIN FROM PLANTS AND THEIR PHARMACOLOGICAL ACTIVITY

ABSTRACT

The plant extracts and compounds isolated from natural sources are commonly used for prevention of chronic diseases. These bioactive compounds have an increased application in modern conventional medicine. Despite a great progress in the treatment of malignant tumors, this disease still takes many lives. Today, a huge number of chemotherapeutics for tumor treatment can be found in the market. Because of their toxicity most drugs and drug products can not be applied in the doses that completely inhibit the cells growth in organism. Quercetin and amygdalin belong to the most commonly used pharmacological agents for tumor treatment.

Therefore, the subject of this dissertation is isolation of amygdalin and quercetin from two plant materials, *i.e.* green tea leaves and plum seeds. In this study, the effect of extraction time, solvent nature and solid to liquid ratio was investigated for quercetin, *i.e.* total flavonoids from green tea leaves using experimental design and artificial neural network. In addition to these parameters, the impact of extraction temperature was also studied during amygdalin extraction from plum seeds. The content of amygdalin, as well as quercetin in the extracts was determined using the developed HPLC methods. Total flavonoids content was determined by a spectrophotometric method based on the formation of complex with aluminium chloride.

Amygdalin was isolated from the ethanolic extract of plum seeds after addition of diethyl-ether. The obtained amygdalin purity of 90% was defined with regard to the available amygdalin standard using HPLC method. The structural characterization of isolated amygdalin was carried using UV, IR and ESI-MS/MS methods.

Adequate methods for determination of antioxidant activity (DPPH assay), antimicrobial activity (disc diffusion method) and antiproliferative activity (MTT assay) were used in order to define the pharmacological activities of green tea and plum seeds extracts, isolated amygdalin, quercetin and amygdalin standards.

Based on all these pharmacological studies, it was shown that quercetin and green tea extract have better antioxidant activity compared to amygdalin and plum seeds extract. Amygdalin standard and plum seeds extract have antibacterial activity only on the strain of *P. aeruginosa* (>23 mm for both samples) and *E. coli* (17-19 mm and 20-22 mm, respectively).

Quercetin standard and green tea extract have an additional effect on the strain of *S. aureus* with an inhibition zone of 20-22 mm and 17-19 mm, respectively.

IC₅₀ values of isolated amygdalin and its standard (>379.5 µg cm⁻³ and 304.65-333.27 µg cm⁻³, respectively) for the investigated cell lines were higher compared to green tea extract and quercetin standard (47.41-114.39 µg cm⁻³ and 19.24-44.07 µg cm⁻³, respectively). These values were determined using MTT assay and are in accordance with the literature. The cytotoxicity of amygdalin can be increased by addition of β-D-glucosidase enzyme.

Keywords: optimization, extraction, amygdalin, quercetin, total flavonoids, plum seeds, green tea, antioxidant activity, antimicrobial activity, cytotoxicity.

Scientific field: Engineering Technology

Specific scientific field: Chemistry and Chemical Technology

UDC number: 547.972.3:615.01

Листа важнијих скраћеница и ознака

MMP	матрикс металопротеиназе
WHO	светска здравствена организација
ICH	интернационална конференција о хармонизацији
CCD	централни композитни дизајн
ANN	вештачка неуронска мрежа
MLP	вишеслојни перцептрон
RMSE	квадратни корен средње квадратне грешке
MSE	средња квадратна грешка
MAE	средња апсолутна грешка
HPLC	течна хроматографија високе перформансе
ESI	електрон спреј јонизација
MS	масена спектрометрија
UV-VIS	ултраљубичаста-видљива спектроскопија
FT-IC	инфрацрвена спектрографија са Фуријеовом трансформацијом
DPPH	тест за одређивање антиоксидативне активности супстанци
MTT	тест за одређивање антипролиферативне активности супстанци
ANOVA	анализа варијансе
SS	сума квадрата
MS	средњи квадрат
df	број степени слободe
p	вероватноћа појављивања грешке
SD	стандардна девијација
RSD	релативна стандардна девијација
SE	стандардна грешка
LOD	лимит детекције
LOQ	лимит квантификације
c.o.	суви остатак
τ, x_1, X_1	време екстракције
C_e, x_2, X_2	концентрација етанола
ω, x_3, X_3	однос биљне сировине и растварача (солвомодул)
t, x_4, X_4	температура екстракције

САДРЖАЈ

1. УВОД	3
2. ТЕОРИЈСКИ ДЕО	6
2.1. Тумор (канцер)	6
2.1.1. Фактори ризика за настанак тумора	8
2.1.2. Типови канцера	9
2.2. Хемотерапија у лечењу тумора - цитостатици	10
2.3. Лековите биљке у третману тумора	14
2.4. Флавоноиди	15
2.5. Зелени чај	16
2.6. Амигдалин	18
2.7. Шљива	21
2.8. Методе изолације и пречишћавања биоактивних једињења	22
2.9. Експериментални дизајн	25
2.10. Неуронске мреже	32
2.11. Примена експерименталног дизајна и вештачких неуронских мрежа	40
2.12. Фармаколошка испитивања биоактивних једињења	43
2.13. Антиоксидативна активност	44
2.13.1. Антиоксидативна и антирадикална активност полифенола	45
2.13.2. Тестови за одређивање антиоксидативне активности	48
2.14. Антимикробна активност	49
2.14.1. Методе испитивања антимикробне активности	50
2.15. Пролиферативна активност	52
2.16. Екстракција кверцетина и амигдалина и њихова фармаколошка активност	53
2.16.1. Изоловање и одређивање кверцетина	53
2.16.2. Стабилност кверцетина	54
2.16.3. Фармаколошка испитивања кверцетина	55
2.16.4. Изоловање и одређивање амигдалина	56
2.16.5. Стабилност амигдалина	57
2.16.6. Фармаколошка испитивања амигдалина	58
3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО	60
3.1. Реагенси	60
3.2. Биљни материјал	60
3.3. Поступак екстракције кверцетина и укупних флавоноида	60
3.4. Поступак екстракције и изолације амигдалина	62
3.5. ИС анализа	62
3.6. HPLC анализа кверцетина	62
3.6.1. Припрема стандардних раствора	63
3.6.2. Валидација методе	63
3.6.3. Припрема узорка екстракта кверцетина за HPLC анализу	65
3.7. HPLC анализа амигдалина	65
3.7.1. Припрема узорка екстракта семена шљиве за HPLC анализу	66

3.8.	Спектрофотометријска метода за одређивање укупних флавоноида	66
3.9.	ESI-MS/MS анализа.....	67
3.9.1.	Припрема узорка за MS анализу	68
3.10.	Експериментални дизајн	68
3.11.	Вештачке неуронске мреже	70
3.12.	Студије фотостабилности	72
3.13.	Одређивање антиоксидативне активности (DPPH-тест)	72
3.14.	Одређивање антимикуробне активности	73
3.15.	МТТ тест.....	74
4.	РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА	76
4.1.	ВАЛИДАЦИЈА МЕТОДА	76
4.1.1.	HPLC метода за одређивање садржаја кверцетина у екстракту зеленог чаја ...	77
4.1.2.	HPLC метода за одређивање садржаја амигдалина у екстракту семена шљиве ...	83
4.2.	ЕКСТРАКЦИЈА КВЕРЦЕТИНА И АМИГДАЛИНА.....	88
4.2.1.	Оптимизација поступка екстракције кверцетина из листа зеленог чаја.....	88
4.2.2.	Оптимизација поступка екстракције укупних флавоноида	97
4.2.3.	Оптимизација поступка екстракције амигдалина.....	106
4.2.4.	Изолација амигдалина	119
4.3.	ESI-MS/MS анализа екстракта зеленог чаја.....	122
4.4.	ESI-MS/MS анализа екстракта семена шљиве.....	131
4.5.	Студија фотодеградације.....	135
4.5.1.	Фотостабилност кверцетина	136
4.5.2.	Кинетика фотодеградације кверцетина	139
4.5.3.	Фотостабилност амигдалина.....	141
4.5.4.	Кинетика фотодеградације амигдалина.....	143
4.6.	Антиоксидативна активност кверцетина и екстракта зеленог чаја	144
4.7.	Антиоксидативна активност амигдалина и екстракта семена шљиве	146
4.8.	Антимикуробна активност кверцетина и екстракта зеленог чаја.....	148
4.9.	Антимикуробна активност амигдалина и екстракта семена шљиве	149
4.10.	МТТ тест.....	152
5.	ЗАКЉУЧАК	154
6.	ЛИТЕРАТУРА.....	157
	ПРИЛОГ.....	180
	Биографија аутора.....	182
	Изјаве аутора	183

1. УВОД

Трећина познатих болести се данас може ефикасно лечити савременим доступним лековима. Последњих неколико деценија, из ових разлога интензивирани су истраживања у циљу проналажења нових лековитих агенаса и њихових формулација. Посебно место у овим истраживањима имају испитивања везана за изолацију активних принципа из ароматичних, лековитих и осталих биљака са циљем развоја нових, природних фармацеутских формулација са ефикасним дејством на различите болести. Употреба биљака и њихових препарата (екстракта, етарских уља и др.) у облику парафармацеутских и дијететских производа повећала се последњих година у многим земљама широм света. Данас је на тржишту присутан велики број фитофармацеутских производа, који остварују око 50% од укупног промета на тржишту фармацеутских производа (Raskin и сар., 2002; Lalli, 2005). Светска здравствена организација (*World Health Organization*) процењује да се скоро 80% светске популације ослања на традиционалну медицину у којој доминантну улогу има лековито биље (Liu и сар., 2000).

Познато је да се биљни екстракти и једињења изолована из природних извора користе у превенцији неких хроничних обољења, као и кардиоваскуларних болести. Испитивања на животињама показала су да поједини синтетички активни принципи постижу свој терапијски ефекат тек при већим дозама у поређењу са оним који су изоловани из биљног материјала (Rowland, 1999). Из тих разлога, данас биоактивна једињења изолована из биљног материјала, налазе све већу примену у модерној конвенционалној медицини.

Упркос великом напретку у дијагностификовању и лечењу малигнух тумора, ова болест је и даље један од главних узрока смрти код људи. У циљу лечења ове болести на тржишту се данас могу наћи бројни хемотерапеутски препарати. Због своје токсичности, већина препарата се не може апликовати у дозама које у потпуности сузбијају раст ћелија тумора у организму.

У последње време, истраживања су усмерена у правцу примене бројних биљних агенаса за третман ових болести, међу којима су кверцетин (Reza и Ali, 2010; Коо и Нох, 2007) и амигдалин. Различите методе изоловања, пречишћавања и идентификације кверцетина из биљних материјала (*Bobgunnia madagascariensis* (Adeyemi и сар., 2010), *Coriundrum sativum* (Hadjmohammadi и Sharifi, 2009), *Abutilon indicum* (Rajalakshmi и Senthil, 2009), *Butea frondosa* (Dutta и сар., 2007), *Petasites japonicus* (Matsuura и сар., 2002), *Euonymus alatus* (Zhang и сар., 2009), *Prunus*

armeniaca (Williams и Wender, 1953), *Citri bergamiae* (Calabro и сар., 2004а) описане су у литератури.

Познато је да су синтетички молекули јачег фармаколошког дејства са израженијим нежељеним ефектима у поређењу са природним биолошки активним супстанцама. Из тог разлога, истраживачи теже развоју нових биљних лекова стандардног састава и деловања у складу са критеријумима фармацеутске контроле квалитета. Израђују се у формулацијама које омогућују лако дозирање, правилну примену, ефикасно деловање са јасно наглашеним нежељеним ефектима и контраиндикацијама. Познавање хемијског састава лековите биљке и везе између структуре молекула и њиховог дејства, као и физичких карактеристика, омогућује да се погодним технолошким поступком екстракције може добити екстракт обогаћен биоактивном компонентом.

Испитивањима је утврђено да су полифеноли из биљака јаки антиоксиданси (Sabrega и сар., 2006). Међу њима спада зелени чај, који има висок садржај полифенола. Нађено је да се у шољи зеленог чаја налази од 300 до 400 mg полифенола. Један од најактивнијих флавоноида зеленог чаја је кверцетин, који показује јаку антиинфламаторну (Kleemann и сар., 2011) и антиоксидативну активност (Ishisaka и сар., 2011; Murota и Terao, 2003). Постоје подаци да се кверцетин понаша и као антихистаминик, ублажава алергијске реакције и астматичне нападе. Као и већина биофлавоноида, кверцетин има и вазодилататорну функцију, чиме утиче на заштиту крвних судова, јер повећава њихову еластичност и самим тим утиче на нормализацију повишеног крвног притиска (Larson и сар., 2010). Нарочито се истиче његово снажно антиканцерогено дејство на различите врсте малигних болести: леукемије, дојке, јајника, желуца, јетре, дисајних путева и дебелог црева (Zhang и сар., 2012; Russo и сар., 2012).

Амигдалин је природни хемотерапијски агенс који се може наћи у преко 1200 биљака, нарочито у семену коштуњавог воћа као што су кајсије, брескве, шљиве и јабуке (Bolarinwa и сар., 2014; Haque и Bradbury, 2002; Balkon, 1982; Fenselau и сар., 1977). Његово антитуморно дејство познато је још у доба старих Египћана (2500 година п.н.е.). Међутим, систематско проучавање амигдалина у ове сврхе, почело је почетком прве половине прошлог века, од када се и верује да је главни агенс за метаболичку нетоксичну терапију канцерских стања. Амигдалин је цијаногени гликозид који у својој структури садржи два молекула глукозе, бензалдехид (аналгетик) и цијанидну групу (Erdogan-Orhan и Kartal, 2011). Механизам дејства

амигдалина заснива се на његовој разградњи и ослобађању цијановодоничне киселине под дејством ензима β -глюкозидазе, који је у ћелијама канцера заступљен чак 3000 пута више него у здравим ћелијама. Настала цијановодонична киселина убија ћелије канцера, а не штети здравим ћелијама, што је познато као селективна токсичност. Иако у одређеним канцерским обољењима примена амигдалина има ограничења, према подацима из литературе показао је цитотоксичност код карцинома плућа, груди, простате, дебелог црева и лимфома, који се и најчешће јављају код људи (Milazzo и сар., 2007; Park и сар., 2005; Chang и сар., 2006).

Поступак изоловања, препаративног одвајања и пречишћавања амигдалина из семена кајсије, брескве и горког бадема, као и методе његове идентификације описане су у литератури (Thagaard, 1996; Kai и сар., 2010; Dong и сар., 2007; Hwang и сар., 2002a; Kwon и сар., 2010; Yan и сар., 2006). Међутим, поступак изоловања, пречишћавање, идентификација, микробиолошка и антиканцерогена испитивања кверцетина из листа зеленог чаја (*Camelliae sinensis folium*) и амигдалина из семена шљиве (*Pruni domesticae semen*) нису нађени у литератури.

Основни предмет истраживања у оквиру докторске дисертације је развој оптималних поступака добијања амигдалина и кверцетина из наведених биљних материјала. С обзиром да на екстракцију биоактивних принципа утиче већи број параметара (природа растварача, време екстракције, температура, степен уситњености биљног материјала, однос биљне сировине и растварача – солвомодул и рН средине) вршена је оптимизација процеса екстракције. Применом конвенционалних метода приликом оптимизације процеса екстракције прати се утицај само једног фактора током времена, док се утицај осталих фактора изоставља. Овакав приступ може имати негативан утицај на квалитет резултата екстракције. Да би се превазишао наведени проблем, приликом оптимизације поступка екстракције кверцетина из листа зеленог чаја и амигдалина из семена шљиве, примењене су методе математичког моделовања (експериментални дизајн и вештачке неуронске мреже). Ове методе истовремено прате утицај свих параметра на принос екстрахованог једињења. У складу са тим за интерпретацију добијених експерименталних података дефинисани су одговарајући математички модели, централни композитни дизајн и вишеслојни перцептрон (Saim и сар., 1998; Brachet и сар., 2000; Zuloaga и сар., 1999; Wang и сар., 2008; Spanilá и сар., 2005; Marchitan и сар., 2010).

Како у фармакопејама, научној и патентној литератури није прописана осетљива и специфична метода за идентификацију и квантификацију кверцетина и амигдалина у екстрактима листа зеленог чаја и семена шљиве, извршен је избор, оптимизација и валидација одговарајућих метода. Изоловане и пречишћене биоактивне компоненте структурно су окарактерисане применом инструменталних метода.

Одговарајућом методом испитан је садржај укупних флавоноида у екстракту зеленог чаја. У циљу одређивања фармаколошких активности изолованог амигдалина, екстракта зеленог чаја и семена шљиве и стандарда амигдалина и кверцетина, примењене су одговарајуће методе за одређивање антиоксидативне, антимикробне и антитуморске активности.

Стабилност биоактивних једињења је од изузетне важности за израду готових фармацеутских формулација и сигурност њихове примене. Имајући у виду да су у структури кверцетина и амигдалина присутне функционалне групе (хромофоре), које имају способност апсорпције светлости, неопходно је било испитати фотостабилност поменутих супстанци. За квантитативну и квалитативну анализу деградационих производа развијене су одговарајуће методе. На основу добијених резултата утврђене су деградационе реакције.

Основи циљеви истраживања у оквиру теме докторске дисертације били су:

- дефинисање оптималних услова за изоловање амигдалина из семена шљиве (*Pruni domesticae semen*) при различитим оперативним условима применом експерименталног дизајна и вештачких неуронских мрежа;
- дефинисање оптималних услова добијања кверцетина и укупних флавоноида из листа зеленог чаја (*Camelliae sinensis folium*) применом експерименталног дизајна и вештачких неуронских мрежа;
- избор математичке методе која предвиђа најбоље услове за добијање биоактивних једињења и експериментална потврда њене тачности;
- развој, оптимизација и валидација аналитичких метода за квалитативну и квантитативну анализу биоактивних компонента у екстрактима;
- испитивање фотостабилности амигдалина и кверцетина развијеним методама;
- фармаколошка испитивања (антиоксидативна активност, цитотоксичност, микробиолошка активност) изолованог амигдалина, стандарда кверцетина и амигдалина и екстракта добијених при оптималним условима екстракције.

Да би се на наведене циљеве рада могло успешно одговорити, с обзиром на комплексност и ширину самог проблема, неопходна је била примена метода:

- експерименталног дизајна и вештачких неуронских мрежа за моделовање и оптимизацију поступака чврсто-течне екстракције;
- чврсто-течна екстракција за изолацију кверцетина и укупних флавоноида из листа зеленог чаја и амигдалина из семена шљиве;
- течна хроматографија (HPLC) и масена спектрометрија (MS^n) за квалитативна и квантитативна испитивања биоактивних супстанци у екстрактима;
- спектрофотометрије (UV-VIS, FT-IC) за структурну карактеризацију изолованих биоактивних супстанци;
- за одређивање фотостабилности стандарда кверцетина и амигдалина;
- диск-дифузиона за испитивање антимикуробне активности стандарда и екстраката на расположиве микроорганизме;
- DPPH теста за испитивање антиоксидативне активности стандарда и екстраката;
- MTT теста за испитивање цитотоксичности екстраката обогаћених амигдалином и кверцетином, као и њихових стандарда.

2. ТЕОРИЈСКИ ДЕО

2.1. Тумор (канцер)

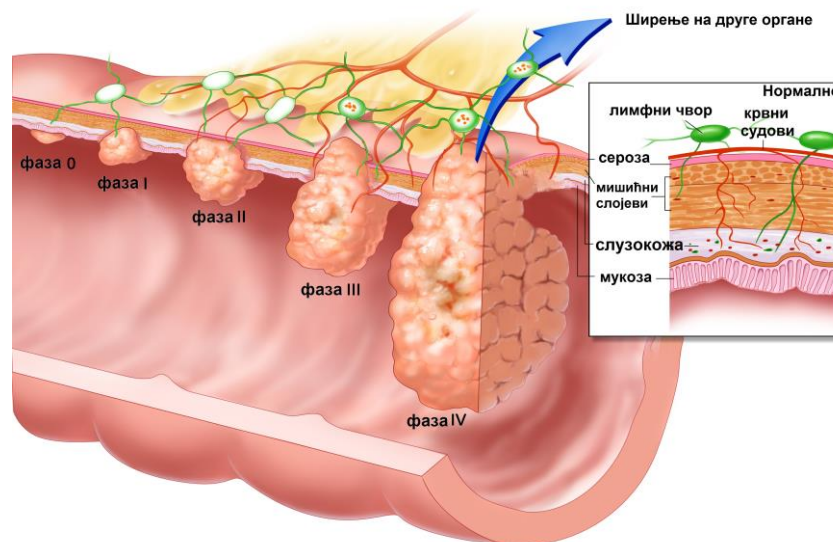
Велико интересовање за изучавање тумора јавило се још у прошлом веку, када је запажено да заразне болести у развијеним земљама више не представљају водећи узрок смрти. Статистички подаци из 2008. године указују да се у свету појави близу 13 милиона оболелих годишње, од којих преко 7,5 милиона умре од неке врсте тумора. Око 23% жена оболелих од тумора, имају тумор дојке, док је код мушкараца најзаступљенији тумор плућа (17% од укупног броја оболелих) (WHO, 2003).

У Србији од тумора годишње умре њих 21069 према подацима из 2009. године (Михајловић и сар., 2013). Како у свету тако и у Србији тумор плућа односи далеко више живота него друге врсте тумора. Тумор дебелог црева је други водећи узрочник смртности у нашој земљи. Код жена је тумор дојке најзаступљенији, а за њим одмах следи тумор грлића материце (Михајловић и сар., 2013; Бранковић-Магић и сар., 2006). Предвиђа се да ће тумор простате код мушкараца у будућности премашити инциденцу тумора плућа.

Ова болест била је позната још у периоду древних Египћана. Термин „карцином”, који води порекло од грчке речи “*karkinos*” што значи тумор први је увео Хипократ. Интензивна изучавања тумора почела су нешто пре краја XVIII века. Вичат (1771-1802) је описао патологију различитих тумора код људи и тумор дефинисао као “случајну” формацију ткива изграђену на исти начин као и цели организам. Неколико деценија касније, Müller (1801-58) и Virchow (1821-1902) су потврдили и проширили Вичат-ове закључке, указујући да је ткиво тумора изграђено од ћелија. Данас, патолози и клиничари под малигним обољењем (рак, канцер, карцином, тумор) подразумевају болест коју карактерише неконтролисана деоба ћелија узрокована мутацијама једарне ДНК (Најду, 2011). Познавањем стадијума развоја тумора могуће је успоставити правилну дијагнозу болести. Фазе развоја тумора код дебелог црева приказане су на слици 1. Фаза 0 представља тумор у најдубљој слузокожи дебелог црева или ректума; фаза I - тумор који се није проширио изван унутрашњег зида дебелог црева; фаза II - тумор који се проширио на мишићни слој дебелог црева; фаза III - тумор који се проширио на један или више лимфних чворова у том подручју; фаза IV - тумор који се проширио на друге делове тела, као што су јетра, плућа или кости.

Познато је да у сваком организму постоји неколико милиона предтуморских ћелија (оних са измењеним генетским материјалом), за које човек има урођене механизме препознавања и изоловања оваквих ћелија. Овај механизам функционише

тако што изазива старење предтуморских ћелија и спречава њихово даље размножавање. Процес се одвија у сваком од нас током целог живота, док код особа оболелих од тумора долази до поремећаја те способности и услед тога ове абнормалне ћелије се несметано развијају и сједињују у групе и ткива и тако почиње развој тумора.



Слика 1. Фазе развоја тумора код дебелог црева

Познато је да у сваком организму постоји неколико милиона предтуморских ћелија (оних са измењеним генетским материјалом), за које човек има урођене механизме препознавања и изоловања оваквих ћелија. Овај механизам функционише тако што изазива старење предтуморских ћелија и спречава њихово даље размножавање. Процес се одвија у сваком од нас током целог живота, док код особа оболелих од тумора долази до поремећаја те способности и услед тога ове абнормалне ћелије се несметано развијају и сједињују у групе и ткива и тако почиње развој тумора.

Развој тумора је сложен вишестепени процес који укључује не само једну генетску промену, већ обично више њих. Тако епигенетски фактори (деловање хормона, вируса и др.), који нису сами по себи узрок тумора, могу да повећавају стопу и разноврсност генских мутација које проузрокују појаву туморских стања. Нормалне ћелије имају гене који спречавају малигну трансформацију, који су названи тумор супресорни гени (антионкогени). Губитак функције (инактивација) ових гена као последица тачкастих мутација или транслокација хромозома, као и због деловања одређених вируса или хемијских карциногена, налази се у основи многих тумора.

Нормалне ћелије разграђују густу међућелијски матрикс и везивно ткиво како би могле да расту. За ту сврху ћелије излучују посебну врсту ензима, који се називају

матрикс металопротеиназе (ММП). Излучивање ММП-а је код здравих особа тачно контролисано, чиме се спречава дуготрајно оштећење колагена. Понекад ћелије неконтролисано расту и деле се чак и онда када то није потребно. С временом се накупљају и стварају туморску масу. Све ћелије тумора без обзира на њихово порекло имају заједничку особину да производе велике количине ензима (ММП-а), које доводе до дуготрајне разградње везивног ткива. Ти ензими потпомажу ћелијама тумора да се одвоје од туморске масе и шире људским телом преко крви и лимфне течности и на тај начин продиру у остале органе.

Туморске ћелије имају следеће карактеристике које их разликују од нормалних ћелија, а то су (Ranjit, 2004):

- неконтролисана пролиферација,
- дедиференцијација и губитак функције,
- инвазивност, и
- метастазирање.

Према облику који формира маса туморских ћелија и њиховом ширењу, тумор може бити бенигни или малигни. Бенигни тумори су правилног облика и јасно ограничени од околног ткива. Њихове ћелије личе на нормалну ћелију од које су настали. Немају особину да се шире на друге органе и лако се могу отклонити у потпуности. Бенигни тумори су толико распрострањени да углавном сваки човек има по неки бенигни тумор. Највећи број бенигну тумора остаје доброћудан током целог живота. Ћелије малигну тумора мање или више личе на матичну ћелију и захваљујући томе лако се може одредити порекло тумора. Уколико малигна ћелија мање личи на матичну, онда је тумор деструктивнији и теже се одређује примарно порекло тумора. Малигна ћелија се аутономно понаша у организму, краће живи од нормалне – матичне ћелије и врло је осетљива. Зрачење и разне хемијске супстанце јако оштећују малигну ћелију, што је искоришћено у лечењу малигне болести. Малигни тумори се разликују од бенигну по дедиференцијацији, инвазивности и способности да метастазирају, тј. шире на друге делове тела. Временом доспевају до лимфних жлезда и крвотока, при чему настају метастазе и болест постаје системска. Међутим, бенигни и малигни тумори имају заједничку особину, неконтролисану пролиферацију.

2.1.1. Фактори ризика за настанак тумора

Посебна пажња посвећена је откривању “узрочника”, тј. “фактора ризика” тумора (Katira и сар., 2012). Данас постоје неколико теорија о факторима који могу

довести до настанка тумора. На списку тих фактора се налазе: хронични механички надражај, хронични топлотни надражај, хронично дејство хладноће, хронично запаљење, бактеријске, гљивичне и паразитске инфекције као узрочници, затим јонизујуће зрачење, хемијске материје, као што су полициклични угљоводоници, бензен, ароматични амини, хлор, азо боје, уретан, неки метали, азбест (повезан са повећаним стварањем полипа на дебелом цреву), пестициди. У настанку тумора могу да учествују и поремећаји ћелијског метаболизма, имуносистема, хормона, присуство вируса и различитих мутација. Међу факторима ризика такође могу бити нездрава животна средина и нездрав стил живота (Anand и сар., 2008), који подразумева неправилну исхрану, недостатак физичких активности, пушење (Ranajit, 2004; Kubik и сар., 2007), дуготрајна професионална изложеност канцерогеним материјама и друго. Ови фактори ризика су утврђени као резултат вишедеценијских проучавања у виду анкета, интервјуа, експеримената, статистичких анализа и слично.

2.1.2. Типови канцера

Наше тело садржи око 60 различитих унутрашњих органа и сваки од њих сачињен је од различитих ткива (Fearon и сар., 2011). Свако ткиво састоји се од одређене врсте ћелија. Како се тумор може развити од било које врсте ћелија, јасно је да сваки орган може развити више врста тумора. На основу истраживања данас је идентификовано преко 200 типова тумора, међу којима су најчешћи тумор плућа, дојке, грлића материце и дебелог црева.

Многи облици малигних обољења су излечиви, а неки и у потпуности, поготово ако се рано открију, због чега је неопходно вршити редовне контроле и праћење било каквих симптома који би указивали на појаву малигног обољења. Уколико се не лечи, већина малигних обољења изазива смрт. Данас је разјашњен начин како једна нормална ћелија постаје туморска и то је искоришћено за развој нових лекова у њиховој терапији. Истраживањима у онкологији може се проценити да ли ће болесник имати користи од предложеног лечења, каква му је прогноза болести, има ли разлога за додатне терапије и слично. Будућа истраживања у онкологији спроводе се у циљу тзв. персоналне медицине, тј. да се сваком болеснику одреди која врста терапије, који лек, у којој дози и на који начин ће за њега бити оптимална. Свакако, велики је напредак остварен у истраживањима која разматрају могућности да се обољевање од канцера спречи, не само раним откривањем, већ одређеним тестовима на нивоу гена. Тако, са великом вероватноћом се може утврдити да ли ће се неко разболети од тумора ако у

својим генима има мутације одређеног гена које је наследио од родитеља. Живимо у најдинамичнијем добу истраживања тумора чији је циљ да се пронађу нови лекови који ће дати бољи терапеутски учинак.

2.2. Хемотерапија у лечењу тумора - цитостатици

Хемотерапија или терапија цитостатикима, која се већ дуги низ година примењује у лечењу малигних обољења, за научнике и даље представља недовољно истражену област (Rixe и Fojo, 2007). Захваљујући сазнањима о делотворности и неопходности хемотерапије у лечењу тумора, онколози је данас по важности изједначавају са операцијом и радиотерапијом. Иначе, у ужем смислу речи појам хемотерапија представља примену лекова (цитостатика, антитуморских лекова, антинеопластика, цитотоксичних лекова), који доспевајући у ћелије рака директно их уништавају или пак инхибирају њихову деобу (митозу) (Kehe и сар., 2009). Након тога, оболели организам такве ћелије уклања. На овај начин могуће је у знатној мери успорити, зауставити раст или чак довести до смањења и регресије тумора. Некад се то дејство постиже локалном применом цитостатика (нпр. на кожи и слузокожи), али се најчешће у хемотерапији користи дејство цитостатика на читаво тело, када се ради о системском дејству (Spraggeboom и сар., 2002).

Већина цитостатика делује на метаболичке процесе који су заједнички нормалним ћелијама и ћелијама тумора. Нажалост, цитостатици још увек немају селективно дејство само на ћелије тумора, већ делују и на друге здраве ћелије организма. Механизам дејства цитостатика најчешће се огледа у поремећају синтезе и функције макромолекула (ДНК, РНК и протеина) или ћелијских органела, које омогућавају деобу ћелија. Код већине здравих ткива, ћелије се деле у оној мери која је довољна за одржавање и обнављање ткива. У ткивима у којима нема деобе ћелија цитостатици не могу да испоље своје дејство. Ћелије брзо растућих тумора се одликују великим бројем деоба, па су стога оне у знатној мери остеељивије на цитостатике него ћелије здравих ткива. Ово нажалост не важи за здрава ткива чије се ћелије брзо деле. У ове ћелије спадају: ћелије слузокоже уста и дигестивног тракта, ћелије корена длаке и крвне ћелије. С обзиром да тумор није само последица убрзане деоба ћелија, заустављање њихове деобе не може се прихватити као једини механизам дејства цитостатика. Зато се данас у свету улажу огромни напори и средства за изучавање ових механизма (Павелић, 1989).

Цитостатици су хемијске супстанце, које по свом пореклу могу бити природне, синтетичке или полусинтетичке. Из тих разлога извршена је подела цитостатика на следеће врсте:

1. Алкилирајући цитостатици. Ови цитостатици садрже алкил групе, које могу стварати ковалентне везе са одређеним нуклеотидним супстанцама у ћелији. Основни корак у деловању ових лекова је стварање карбонијум јона. Овакви јони су веома реактивни и могу да реагују са невезивним електронима амино-, хидроксилне- или сулфхидрилне групе. Већина цитотоксичних алкилирајућих агенаса су бифункционални, тј. са две алкилирајуће групе. Главно дејство настаје у току репликације, када су поједини делови ДНК неупарени и подложнији алкилацији. Сви алкилирајући агенси супримирају функцију коштане сржи и узрокују гастроинтестиналне поремећаје. Дужом применом може доћи до смањене гаметогенезе (посебно код мушкараца), што доводи до стерилитета и повећаног ризика од акутне нелимфоцитне леукемије и других малигнитета. У ову групу спадају следећи лекови:

- азотни иперит (циклофосфамид, ифосфамид, меклоретамин, мелфалан, хлорамбуцил)
- етиленимини и метилмеламини (тиотепа)
- алкилсулфонати (бусулфан)
- деривати нитрозоуреје (кармустин, ломустин, семустин, стрептозоцин)
- триазени (дакарбазин)
- лекови са механизмом деловања сличним алкилирајућим агенсима (комплекси платине).

2. Антиметаболити. Антиметаболити су синтетски лекови, који због своје хемијске сличности са физиолошким материјама блокирају функције фолне киселине која је значајна за синтезу азотних база (ATCG), а који су састојци ДНК. На тај начин спречен је раст ћелија тумора и проузроковано је њихово неповратно оштећење. У ову групу лекова спадају:

- аналози фолне киселине (метотрексат)
- аналози пиримидина (5-флуороурацил, 5-флуородеоксиуридин, цитарабин)
- аналози пурина (меркаптопурин, тиогванин, пентостатин, кладрибин)

3. Антитуморски антибиотик. Током истраживања култура *Streptomyces* врста нађено је да метаболити ових гљивица показују цитотоксично дејство, што је био повод да се започне са употребом антибиотика у третману тумора. За ове намене важни су следећи антибиотици:

- антрациклини (даунорубицин, доксорубицин, епирубицин, идарубицин и митоксантрон). Њихов механизам деловања је вишеструк и компликован. Највише се примењују даунорубицин и доксорубицин, али се њихова употреба избегава због врло изражене кардиотоксичности.
- актиномицин
- блеомицин
- митомицин (механизам деловања испољава алкиловањем ДНК)
- пликамицин.

4. Хормонска терапија малигнух тумора. Сви облици малигнух тумора који су осетљиви на хормоне третирају се хормонским лековима. Овим лековима инхибира се синтеза одговарајућег хормона, а самим тим и ткива која зависе од тих хормона, што се користи у лечењу тумора који воде порекло из тих ткива. Представници ове групе лекова су:

- **гlikокортикoиди** – делују на пролиферацију лимфоцита и користе се у лечењу леукемије и лимфома.
- **естрогени** (фосфестрол) – блокирају учинак андрогена у андроген-зависним туморима простате. Такође, естрогени се могу користити да „привуку“ ћелије тумора дојке које мирују, како би биле доступне деловању цитотоксичних лекова.
- **прогестагени** (мегестрол и медроксипрогестерон) – примењују се у терапији тумора дојки, материце и бубрега.
- **аналози ослобађајућег хормона за гонадотропин** (хормон хипоталамуса) – делују тако што инхибирају ослобађање гонадотропина. Овај лек се користи у терапији тумора дојке жена пре менопаузе и тумора простате.
- **антагонисти хормона** – могу бити ефикасни против многих хормон-зависних тумора. У ову групу лекова спадају:

- **антиестроген** (тамоксифен), који се у организму веже за естрогене рецепторе, блокира их, али их не активира. Користи се за лечење рака дојки, штити липопротеине мале густине од оксидативног стреса и испољава кардиопротективно деловање.
- **антиандрогени** (флутамид, бикалутамид и циспротерон), блокирају деловање тестостерона код мушкараца, а користе се за лечење рака простате.
- **инхибитори ензима** - блокирају одређене ензиме који су важни у биосинтези естрогена у људском организму. Аминоглутетимид блокира коришћење холестерола у синтези естрогена и тиме блокира комплетни биосинтетски пут настајања естрогена. Летрозол, анастрозол и ексеместан су инхибитори ензима ароматазе. Кључни корак у синтези естрогена је претварање хинонског А прстена на стероиду у ароматски прстен (фенол). Тек тада настаје естрогенска стероидна структура. Ту улогу обавља ензим ароматаза. Уколико је она блокирана поменутиим лековима, онда недостаје део у синтези естрогена, па стога концентрација естрогена у организму битно опада.

5. Биљни цитостатици. Биљни цитостатици су изолована једињења из биљака (Nirmala, 2011). Успешност лечења биљним цитостатикима зависи од стадијума и врсте тумора и изнад свега правилне употребе биљног лека. У природи још није откривен лек за тумор, али у групи биљних алкалоида ипак постоји значајан спектар биљних цитостатика чија својства могу да помогну у лечењу онколошких болести. Ови се лекови вежу за деобно вретено и заустављају деобу ћелија у метафази и проузрокују њену смрт (винкристин, винбластин, паклитаксел). Они такође инхибирају све остале функције ћелије везане за микротубуле, као што је фагоцитоза леукоцита, хемотакса и спровођење нервних импулса.

Код многих пацијената оболелих од тумора хемотерапија није терапија избора. У великом броју случајева она је немоћна, па се из тих разлога користе друге терапијске могућности (хируршки захват или зрачење). Типична нежељена дејства многих цитостатика су поремећај настанка и подела крвних ћелија, као и привремено

опадање косе, кожни осип, свраб, тамњење коже и ноктију и умор. Мучнина и повраћање, који такође често прате примену цитостатика, може се успешно спречити употребом додатних лекова у хемотерапији.

2.3. Лековите биљке у третману тумора

Савремени третмани малигних обољења (хемотерапија и радијација) често изазивају „споредан”, односно леталан утицај, како на ћелије тумора, тако и на нормалне ћелије људског организма. Пошто антиканцер третмани изазивају слабљење имунитета, пацијенти постају подложни разним инфекцијама. Међутим, данас фитотерапија све више употпуњује концепте савремене терапеутике, потпомажући лечење различитих врста тумора. Она олакшава морфо-функционалну регенерацију организма и учвршћује његов одбрамбени систем. Из тог разлога, велике светске фармацеутске компаније показују велики интерес за лековите биљке као извор нових водећих биоактивних антиканцерогених супстанци, као и за развој стандардизованих биљних лековитих производа са доказаним антитуморским деловањем. Сматра се да је око 60% комерцијално доступних антиканцерогених средстава изоловано из природних извора, укључујући биљке, морске организме и микроорганизме. Тако, “Центар за борбу против рака *Anderson*” у Тексасу за успешно лечење свих врста рака примењује тзв. ароматерапију, односно коришћење ароматичних уља појединих биљака (лаванда, рузмарин, нана, ловор и др.). Познато је да се ароматерапија користи хиљадама година, али да се данас њоме помаже пацијентима да боље прихвате високо – технолошке и понекад болне методе лечења тумора.

Иначе, употреба лековитих биљака у третману тумора има дугу традицију. Право истраживање антиканцерогених супстанци из биљака почело је тек 1950-тих година са открићем и развојем винбластина и винкрестина, као и изолацијом подофилотоксина. Ова открића започета су на “*United States National Cancer Institute*” на почетку екстензивног сакупљања биљака, фокусираним углавном на умерена климатска поднебља. У свом ревијалном прегледу биљака Hartwell (1982) помиње преко 3000 различитих биљака, као извор природних једињења или њихових деривата са антиканцерским деловањем.

Међу проучаваним биљним врстама издвајају се: бели лук, алоја, бела имела, зелени чај, жен-шен, мачков брк, кантарион, невен, раставић, коприва, мечја шапа, пацифичка тиса и др.

2.4. Флавоноиди

Флавоноиди су заједнички назив за велику групу хемијских једињења, која су широко распрострањена у биљном свету (Ross и Kasum, 2002). Најчешће се могу наћи у корењу, лишћу, семенкама, перикарпу воћа и цвету виших биљака. До данас је изоловано преко 4000 једињења из ове групе. Имају функцију пигмената у биљкама, дајући њиховим цветовима широку палету боја, које флуоресцирају под утицајем UV зрака. Распрострањеност и велика разноликост флавоноида чине их погодним за таксономску класификацију биљака.

Флавоноиди су заправо по хемијској структури полифенолна једињења мале молекулске масе (Ross и Kasum, 2002). У групу флавоноида у ужем смислу убрајају се флавоноли, изофлавоноли, флавоноли, флаванони, флавананоли, а у ширем смислу и нека биогенетски сродна полифенолна једињења, као што су антоцијани, катехини и др. Обично су у биљкама присутни деривати ових једињења типа етара, естара и флавоноидних хетерозида састављених од агликона (флавонол, флавонол) и гликозидно везаних шећерних компоненти. Структура агликона је значајна за фармаколошко деловање флавоноида, док шећерна компонента (гликон) углавном повећава хидросолубилност молекула. У састав шећерне компоненте најчешће улазе глукоза, галактоза и рамноза. Најзаступљенији у природи су флавоноли. Присуство хидроксилних група чини их ефикаснијим у терапији. Као полифенолна једињења, флавоноиди имају киселе особине, у базној средини мењају боју и показују интензивну апсорпцију у UV делу спектра.

Флавоноиди показују широк спектар биолошке активности и често се користе у фитотерапији (Iwasaki и сар., 2010; Cui и сар., 2008; Wang и сар., 2009; Edziri и сар., 2012; Kamiyama и Shibamoto, 2012). По свом начину деловања толико су слични витаминима да се врло често називају “витамином П”. Студије показују да флавоноиди могу бити нутритивно повољног деловања, јер подстичу рад ензима који смањују ризик од појаве неких болести. Изузетно су делотворни у превенцији и третману: атеросклерозе, кардиоваскуларних болести, чира на желуцу инхибирајући раст бактерије *Helicobacter pylori*, здравља костију, посебно остварујући позитиван ефекат на минералну густину костију. Повољно делују и на зидове капилара, тако што повећавајући њихову еластичност и смањују пропустљивост. Неки флавоноиди делују као вазодилататори, док се други користе као антиинфламаторни и антиоксидативни агенси. Показују и диуретични ефекат. Бројна истраживања нарочито последњих

десетак година показују снажно антиканцерогено деловање флавоноида (Iwasaki и сар., 2010; Cui и сар., 2008; Wang и сар., 2009; Edziri и сар., 2012; Kamiyama и Shibamoto, 2012).

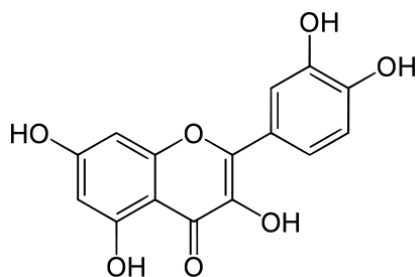
2.5. Зелени чај

Одавно је познато да слободни радикали споља и изнутра врло неповољно делују на људски организам путем дестабилизације мембрана, оштећења ДНК и ћелија ткива (Moskovitz и сар., 2002), као и путем оксидације липопротеина ниске густине (LDL). Резултат њиховог деловања је појава дегенеративних обољења и разних облика канцера. Због тога се као стандардно средство за превенцију препоручују јаки антиоксиданси (витамин Е, витамин Ц, β -каротен). Тек недавно је утврђено да су полифеноли неких биљака јаки антиоксиданси. Иначе, лист зеленог чаја (*Camelliae sinensis folium*) спада у групу биљних дрога са највећим садржајем полифенола (Sabrega и сар., 2006). Фармаколошко дејство полифенола огледа се у инхибицији ензима одговорних за настајање супероксид анјон радикала, као што су ксантин-оксидаза и протеин киназа Ц, али и у инхибицији циклооксигеназе, липооксигеназе, микрозомалне монооксигеназе и глутатион S-трансферазе, митохондријалне сукцин оксидазе, NADH оксидазе, чиме се спречава настајање реактивних врста кисеоника, а самим тим спречава и развој туморних ћелија (Steele и сар., 2000). Путем блокирања ензима урокиназе, зелени чај делује на оба степена карциногенезе тј. на иницијацију и на промоцију. Клиничким испитивањем потврђено је да конзумирањем зеленог чаја долази до смањења ризика од тумора дебелог црева, дојке, јајника, простате и плућа (Zhang и сар., 2010; Shrubsole и сар., 2009; Ogunleye и сар., 2010; Dai и сар., 2010; Nagle и сар., 2010; Kurahashi и сар., 2008; Tang и сар., 2009).

Такође, полифеноли зеленог чаја утичу на смањење нивоа липида, триглицерида и холестерола у крви, чиме се смањује опасност од болести крвног система и артеросклерозе (Larson и сар., 2010). Чај садржи и минерале важне за човеково здравље попут калијума, бакра, гвожђа и мангана. Одавно је познато да делује и диуретично, помаже против стварања целулита, јер ограничава апсорпцију масти и подстиче површинску циркулацију. Екстракт чаја користи се за негу коже, усне шупљине, израслина на кожи, против перути у коси, код опекотина, као и за лечење акни.

Један од најактивнијих хидросолубилних флавоноида зеленог чаја је кверцетин (2-(3,4-дихидроксифенил)-3,5,7-трихидрокси-4Н-1-бензопиран-4-он) (Nurulain, 2006),

чија је структура приказана на слици 2. У табели 1 дат је приказ његових физичко-хемијских својства.



Слика 2. Структура кверцетина

Табела 1. Физичко – хемијска својства кверцетина

молекулска формула	$C_{15}H_{10}O_7$
моларна маса	$302,236 \text{ g mol}^{-1}$
агрегатно стање	жути кристални прах
густина	$1,799 \text{ g cm}^{-3}$
температура топљења	$316 \text{ }^\circ\text{C}$
растворљивост	$0,06 \text{ mg cm}^{-3}$ у води ($16 \text{ }^\circ\text{C}$) 2 mg cm^{-3} у етанолу 30 mg cm^{-3} у DMSO и DMF

Због мале растворљивости у води, ограничена је ресорпција кверцетина у хуманом организму након оралне апликације. Поред тога, термолабилан је у воденом алкалном медијуму (Makris и Rossiter, 2000a), док је у киселој средини заштићен од деградације. Током ресорпције у јетри долази до формирања нових метаболита кверцетина, који имају сасвим другачију биолошку активност од кверцетина (Manach и сар., 1998). Сви ови фактори утичу на смањење његове биорасположивости (Gugler и сар., 1975). У циљу побољшања хемијске стабилности и растворљивости кверцетина у води, истраживачи су синтетисали нове инклузионе комплексе у којима је кверцетин најчешће комплексиран са β -циклодекстрином, као и његовим дериватима (Zheng и сар., 2005). Синтеза ових комплекса отворила је ново поље истраживања у правцу доказивања структуре насталог комплекса применом различитих инструменталних техника (DSC, FT-IC, X-ray, SEM) (Pralhad и Rajendrakumar, 2004; Križ и сар., 2003) и испитивању оперативних услова (температура, време мешања и количина кверцетина) на комплексацију применом метода математичког моделовања (Borghetti и сар., 2009).

Постоје докази да се кверцетин понаша као антихистаминик (Kempuraj и сар., 2005; Min и сар., 2007; Kempuraj и сар., 2006), који ублажава алергијске реакције и астматичне нападе. Као и већина биофлавоноида, кверцетин има и вазодилаторску улогу (Pérez-Vizcaíno и сар., 2002), чиме утиче на заштиту крвних судова, јер повећава њихову еластичност и самим тим утиче на нормализацију повишеног крвног притиска. Такође, показује јаку антиоксидативну (Zhang и сар., 2011) и антиинфламаторну активност (Boots и сар., 2008; Joshi и сар., 2011), нарочито на нивоу заштите ћелијске структуре и крвних судова од разорног дејства слободних радикала. Познато је и његово снажно антиканцерогено својство (Joshi и сар., 2011) на различитим линијама малигних ћелија: леукемије, рака слузокоже уста, дојке, јајника, желуца, јетре, дисајних путева и дебелог црева.

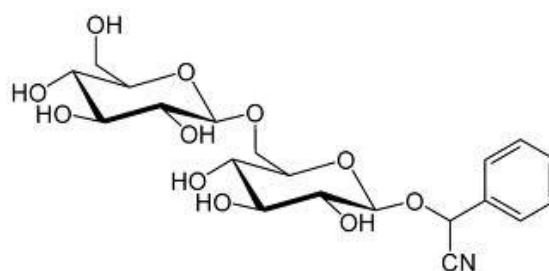
Кверцетин у комбинацији са ултразвуком успешно може да се примени код уништавања ћелија рака коже и рака простате, а да притом нема видљивог оштећења нормалних ћелија (Paliwal и сар., 2005). Такође, терапија хроничног простатитиса и интестиналног циститиса може да се побољша кверцетином, јер он делује као инхибитор мастоцита. На тржишту је кверцетин доступан у облику таблета и капсула и често се налази у комбинацији са витамином Ц и бромелаином, који обезбеђују бољи ефекат.

2.6. Амигдалин

У циљу лечења малигних тумора, на тржишту се могу наћи бројни хемотерапеутски препарати. Већина од њих је токсична, па се не може апликовати у дозама које нису довољне да у потпуности сузбију раст туморских ћелија у организму. Значајно место у терапији канцера заузела је метаболичка терапија, која се показала нетоксичном, а базирана је на употреби амигдалина (витамина Б17), протеолитичких ензима панкреаса, имуностимуланаса, витаминских и минералних додатака.

Амигдалин је први екстраховао биохемичар Ernst Theodore Krebs из семена кајсије (Enculescu, 2009). Последњих година истраживања су усмерена на изолацију амигдалина из биљног материјала и његовој примени у третману туморских стања, јер је ова фармаколошка активност била позната још у доба старих Египћана (2500 година п.н.е.). Међутим, систематско проучавање амигдалина у ове сврхе почело је тек у првој половини прошлог века, од када се и верује да је главни агенс за метаболичку нетоксичну терапију канцерогених стања.

Амигдалин ([[(6-*O*-β-D-глюкопиранозил-β-D-глюкопиранозил)окси]фенил ацетонитрил) је природни хемотерапијски агенс који припада групи диглукозида и садржи цијано групу. Његова структура приказана је на слици 3. Он се може се наћи у преко 1200 биљних врсти, а најзаступљенији је у семену кајсије, брескви, бадема, црних вишњи и јабука (Swain и Poulton, 1994). Такође, његово присуство потврђено је и у семену шљиве (*Pruni domesticae semen*). Садржај амигдалина у овом биљном извору је око 6% рачунато на свежу масу шљиве, док је садржај цијаногеничних гликозида око 0,001-0,01% (Voldřich и Kyzlink, 1992).



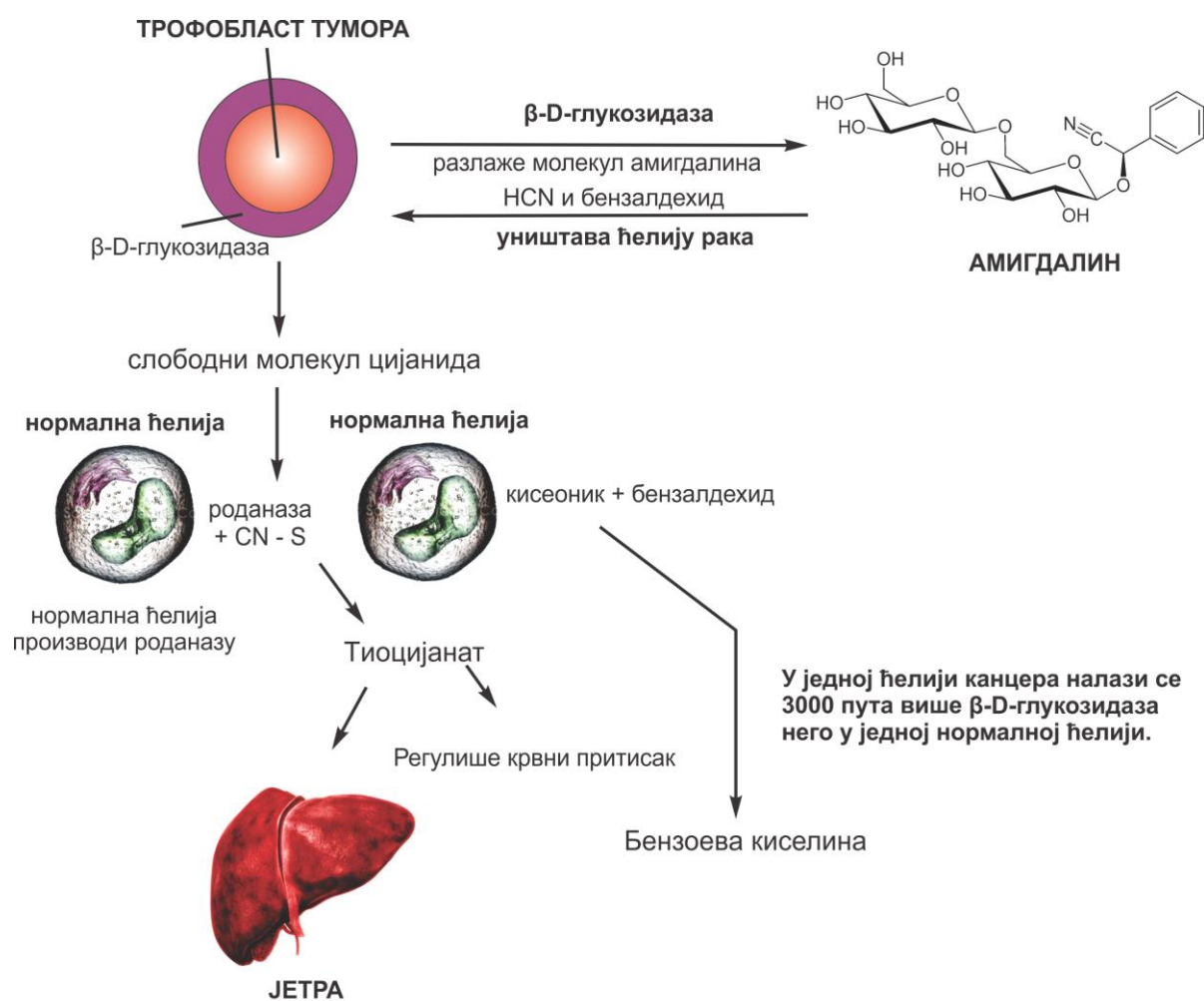
Слика 3. Структура амигдалина

Амигдалин је горког укуса, чија су физичко–хемијска својства приказана у табели 2. У слабо алкалној средини епимеризује због постојања хиралног бензилног угљениковог атома у структури, при чему прелази у свој неактивни *S*-епимер, тзв. неоамигдалин (Hwang и сар., 2002б).

Табела 2. Физичко – хемијска својства амигдалина

молекулска формула	$C_{20}H_{27}NO_{11}$
моларна маса	457,43 g mol ⁻¹
температура кључања	743,3 °C
температура топљења	223-226 °C
угао ротације	-38,5°
температура паљења	403,3 °C
индекс рефракције	-40°
растворљивост	83 mg cm ⁻³ у води (25 °C) 1 mg cm ⁻³ у етанолу (25 °C)
агрегатно стање	бели кристални прах

Ћелије тумора, познате као трофобласти, садрже ензим β -D-глюкозидазу која разлаже амигдалин на два молекула глукозе, један молекул бензалдехида и један молекул цијановодоника (слика 4). За разлику од ћелија тумора, нормалне ћелије не садрже β -D-глюкозидазу, али садрже ензим роданазу који „неутралише” амигдалин. Овај ензим не дозвољава амигдалину да отпусти цијанид, и самим тим онемогућава се уништење нормалних ћелија. Малигне ћелије не садрже овај ензим, при чему амигдалин отпушта молекуле цијанида који доводе до њиховог уништења. Детоксикација од цијанида у нормалном ткиву сисара дешава се кроз дејство роданазе, која у присуству једињења сумпора претвара слободни цијанид у тиоцијанат, потпуно нетоксично једињење. Овако добијено једињење излучује се из организма урином. На основу овога може се закључити да молекул амигдалина спада у групу тумор селективних агенаса, који уништавају само ћелије тумора, док здраве ћелије остају нетакнуте (Enculescu, 2009).



Слика 4. Механизам деловања у туморским ћелијама према Ernest Theodor Krebs-y

Иако код одређених туморских стања постоје ограничења, амигдалин се показао делотворним код третмана тумора плућа, дојке, простате, дебелог црева и лимфома који се и најчешће јављају код људи (Milazzo и сар., 2007). Међу комерцијалним производима, који садрже амигдалин, најзаступљенији су HUNZA Apricot, Mucos Pharma, Немачка (таблета од 300 mg) и Amigdalina, Cytopharma, Мексико (ињекције од 3000 mg и таблете од 500 mg). У складу са “Committee on Toxicity” (COT), семе кајсије садржи око 1450 mg kg⁻¹ цијанида, односно 0,5 mg цијанида по семену. Здравим особама дневни унос је ограничен на 5 семена у току једног сата и не више од 10 по дану (Chaouali и сар., 2013). Према препорукама “Nutrition Almanac USA” унос семена кајсије код особа оболелих од рака треба ограничити на 5 семена у току 90 min и не више од 35 по дану (Fee, 2010).

2.7. Шљива

Шљива (лат. *Prunus domesticae*) је једна од најстаријих воћних врста. Још у древним временима коришћена је у исхрани. Први писани записи о шљиви потичу из Грчке (6. век п.н.е.). Римљани су после освајања Сирије (44. године п.н.е.), сорте племенитих шљива преселили у Италију. Римски император Проб (232–282. године н.е.) и Диоклецијан (243–316. године н.е.) подизали су шљивике у Подравини и Босни. Словени су при насељавању балканског полуострва затекли шљивике подизане за време Римљана. Сматра се да шљива потиче из Западне Азије и да је настала спонтаном хибридизацијом црног трна (*Prunus spinosa*) и џанарике (*Prunus cerasifera*) у шумама на северном Кавказу (Торр и сар., 2012). Шљива се гаји на свим континентима и у воћарству заузима четврто место. На подручју Србије гаји се од давнина и представља највише гајену воћну врсту.



Стабло шљиве нараста од 3 до 10 метара, где се листови и цветови истовремено развијају. Плод шљиве је месната и сочна дугуљаста коштунџа плаве до црвенкасте боје. Перикарп плода је слатко, жућкасте боје са семеном у средини. Постоји више од 6000 врста шљива разних боја (црне, црвене, бледо-љубичасте, жуте) (Торр и сар., 2012). У плоду шљиве има воћних киселина (јабучне, фолне и грожђане киселине), пектина, угљених хидрата, биљних влакана, протеина, масти, фенола, минерала (гвожђа, калцијума, магнезијума, фосфора, калијума, натријума, мангана итд.), витамина А, Б, Ц, Е и ПП. Због овако богатог састава шљива је добро позната као

здрава храна и као таква може се користити у третману многих болести попут хроничне опстипације, обољења јетре, реуматизма, артериосклерозе, анемије, хиперхолестеролемије и др. (Stacewicz-Sapuntzakis и сар., 2001).

Применом HPLC-ESI-MS анализе утврђено је да семе шљиве у највећем приносу садржи амигдалин ($3,791 \text{ g kg}^{-1}$), ванилин (102 mg kg^{-1}), неолигнан дехидродикониферил алдехид (52 mg kg^{-1}), 2 изомера гуајацил-глицерин-кониферил алдехида (33 и 54 mg kg^{-1}), ванилил диглукозид (48 mg kg^{-1}), ванилну киселину (29 mg kg^{-1}), 3,4-дихидроксибензоеву киселину (27 mg kg^{-1}), кониферил алдехид (11 mg kg^{-1}) и 3,5-диметоксицинамалдехид (9 mg kg^{-1}). GC-MS анализом извршена је идентификација следећих компонената: бензоева киселина ($1,86 \text{ mg kg}^{-1}$), сиригинска киселина ($0,63 \text{ mg kg}^{-1}$), сиригалдехид ($0,41 \text{ mg kg}^{-1}$), 4-хидроксибензоева киселина ($0,26 \text{ mg kg}^{-1}$), 4-хидроксибензалдехид ($0,15 \text{ mg kg}^{-1}$) и гална киселина ($0,10 \text{ mg kg}^{-1}$) (Khallouki и сар., 2012).

Уље из семена шљиве, за које је познато да се може користити у третману малигнух обољења, богато је антиоксидансима (Hassanein, 1999). Такође, садржи олеинску киселину (60-80%), линолну киселину (15-25%), витамин Е, витамин Б, провитамин Б5 (β -каротен) и β -фитостероле. Утврђено је да семе шљиве показује благотворно дејство на кожу човека. Поседује велика хидратантна својства и доприноси регенерацији коже. Нарочито је корисно за суву, стару и проблематичну кожу. Хладно цеђено уље семена шљиве користи се и у кулинарству за пржење, маринирање и као дресинг за салате. Богато је витамином Е и не садржи *trans* масти. Приликом пржења може да се загреје и до $180 \text{ }^\circ\text{C}$.

2.8. Методе изолације и пречишћавања биоактивних једињења

Поред једноставних и обликованих биљних лековитих производа као смеше активних супстанци, данашња истраживања усмерена су и на изолацију биоактивних једињења из биљака. Сматра се да су екстракти са већим бројем изолованих једињења нерационални, јер жељена компонента није присутна у довољној количини па из тог разлога врло често изостаје учинак добијеног екстракта. Изолација појединачних биоактивних једињења може представљати више или мање сложен проблем у зависности од приноса једињења који желимо постићи. Такође, избор поступка изолације зависи од природе биљног материјала и једињења које се изолује. Процес изоловања биоактивних једињења најчешће обухвата следеће фазе:

- сушење и уситњавање биљног материјала (хомогенизација),
- избор и примена одговарајуће методе изолације: екстракција, дестилација,
- пречишћавање екстракта (декантовање, центрифугирање, филтрирање),
- концентровање (нпр. упаравањем) и сушење екстракта.

Изолација чистих компоненти. Најважнији параметар који се мора узети у обзир пре дизајнирања поступка изолације је физичко-хемијска природа циљане компоненте у екстракту или фракцији. Својства молекула, која помажу процесу изолације су растворљивост (хидрофилност или хидрофобност), кисело-базна својства, наелектрисање, стабилност и величина молекула, густина, напон паре и сл. Приликом изолације познате компоненте из истог или новог природног извора потребно је одабрати најприкладнију методу. Међутим, много је теже дизајнирати процес изолације чврстог екстракта који садржи потпуно непознате компоненте. У овом случају пожељно је направити квалитативни тест на присуство различитих група органских једињења нпр. феноле, стероиде, алкалоиде, флавоноиде и др. Природа екстракта такође може помоћи у избору исправног поступка изолације. Применом различитих аналитичких метода могуће је одредити физичка својства екстракта (Colegate и Molyneux, 2007).

Већина добијених екстракта је сложена због присуства великог броја биоактивних компонената, које често имају слична физичко-хемијска својства или чак исте молекулске формуле, а различите структуре (изомери). Због наведеног, изоловање појединачних компонената из екстракта може представљати озбиљан проблем. Класичне методе одвајања (кристализација, сублимација, екстракција, дестилација) само донекле могу решити проблем одвајања жељене компоненте из смеше. Одвајање циљне биоактивне компоненте таложењем се заснива на разликама у растворљивости компонената, а услове неопходне за раздвајање можемо добити на основу производа растворљивости. Раздвајање компонената таложењем у пракси је знатно лошије и непотпуније него што се теоријски разматра. Ради повећавања ефикасности, таложење је потребно поновити и по неколико пута. Несавршеност изоловања и дужина аналитичких операција (филтрација, прање талоба) разлог су да се изолација таложењем избегава кад год је то могуће и замењује неким другим методама (нпр. екстракцијом). Код раздвајања дестилацијом користе се разлике у испарљивости компоненти, односно разлике у њиховим парцијалним притисцима. Овај вид

раздвајања лакше се спроводи уколико су разлике у испарљивости компоненти веће. У аналитичкој пракси дестилација се користи углавном за раздвајање једноставнијих смеша, у препаративне сврхе, за пречишћавање и добијање чистих супстанци. За одвајање вишекомпонентних система дестилација није довољно селективна. При дестилацији, често се граде азеотропне смеше, односно долази до термичке разградње појединих супстанци. Дестилација обично дуго траје и захтева велике количине узорка (Watson, 1999; Colegate и Molyneux, 2007).

Данас, значајно место у изолацији жељене биоактивне компоненте из добијеног екстракта заузеле су савремене инструменталне методе, које поред аналитичког одвајања омогућавају истовремено и квантитативно одређивање појединих биоактивних компоненти (Sarker и сар., 2005).

Хроматографија је метода која има апсолутну предност при раздвајању сличних биоактивних супстанци. Осим тога, може се применити за квалитативно доказивање и квантитативно одређивање раздвојених супстанци. Приликом анализе екстракта непознатог састава најчешће се примењују тзв. комбиноване хроматографске технике (GC-MS (Ezhilan и Neelamegam, 2012; Abirami и Rajendran, 2012), HPLC-MS (Steinmann и Ganzera, 2011; Pan и сар., 2010), GC-FTIC (Fischböck и сар., 1988)), које имају веће идентификацијске способности. Приликом анализе екстракта, са лако испарљивим једињењима, углавном се користи гасна хроматографија и то у комбинацији са масеном спектрометријом. Међутим, недостатак ове методе је у томе што се могу анализирати само компоненте чији је напон паре већи од 10^{-10} mbar-a, а масени спектри изомерних компоненти се не разликују. Други недостатак се често превазилази хроматографским раздвајањем изомера.

Капиларна електрофореза је такође једна од најчешће примењиваних техника за раздвајање биоактивних супстанци (Ben Hamed и сар., 2006; Rivasseau и сар., 2006), а базирана је на њиховој покретљивости у електромагнетном пољу. Ефикасност, брзина и једноставност у подешавању селективности, основне су предности које је врло често чине одабраном техником одвајања и одређивања чак и у поређењу са HPLC методом.

Метод екстракције. Екстракција је процес потпуног или делимичног одвајања биоактивних супстанци из биљног материјала (Tzia и Liadakis, 2003). Овај процес базиран је на различитој растворљивости супстанци у растварачу у коме се врши екстракција. Екстракција укључује неколико истовремених процеса:

- дифузија растварача у ћелије биљног материјала,

- растварање метаболита у растварачу,
- дифузија растварача са раствореним једињењима изван ћелија,
- испирање.

Познато је да на процес екстракције тј. на изолацију биоактивног принципа, утиче већи број параметара као што су: температура, степен уситњености биљног материјала, однос биљне сировине и растварача – солвомодул, природа растварача и рН средине. Током избора растварача треба водити рачуна о томе да је селективан за једињења које се желе екстраховати, да има велики екстракциони капацитет, да је јефтин, нереактиван са биоактивним једињењима и нешкодљив за људе и опрему. С обзиром да на изолацију биоактивних принципа утиче већи број параметара неопходно је приликом развоја поступка извршити оптимизацију процеса екстракције. Применом конвенционалних метода при оптимизацији процеса прати се утицај само једног фактора на ефикасност екстракције, док се утицај осталих фактора изоставља. Овакав приступ може имати негативан утицај на квалитет резултата екстракције. Да би се превазишао наведени проблем, приликом оптимизације процеса екстракције примењују се методе математичког моделовања (експериментални дизајн и вештачке неуронске мреже). Ове методе истовремено прате утицај свих параметра на принос екстрахованог једињења. У складу са тим за интерпретацију добијених експерименталних података дефинишу се одговарајући математички модели, попут централног композитног дизајна и вишеслојног перцептрона (Sinha и сар., 2012а).

2.9. Експериментални дизајн

Моделовање неког технолошког процеса заснива се на правилном одабиру фактора који утичу на посматрани систем. Ради лакшег разумевања једног таквог посматраног процеса, неопходно је спровести експерименте како би се дефинисао однос између независно и зависно променљивих величина. Један од уобичајених приступа којим се ово постиже јесте “*једна променљива у току времена*” (енг. *one factor at a time*). Код овог приступа посматра се утицај једне променљиве на одзивну величину, док вредности осталих променљивих остају константне. Овај приступ за моделовање процеса захтева већи број урађених експеримената и претходно искуство експериментатора. Овако испланираним експериментима могу се предвидети

неадекватни оптимални услови, при чему се добија нереална слика о целокупном процесу (Freu и сар., 2003; Hafizi и сар., 2013).

Код планирања, извођења, анализирања и интерпретације података важну улогу имају статистичке методе. Уколико већи број параметара утиче на неки процес, онда је најбоље применити технику експерименталног дизајна, како би валидни и стварни закључци могли да се прикажу ефективно, ефикасно и економично. Експерименталним дизајном мењају се симултано вредности улазних променљивих и прати њихов утицај на одзивну величину (Sharif и сар., 2014).

Код дизајнирања експеримената врше се промене улазних величина, а потом прати начин на који оне утичу на одзивну величину. Значајна чињеница је да посматране променљиве немају подједнаке утицаје на излазне перформансе. Међутим, циљ пажљиво планираног дизајнираног експеримента је да утврди које променљиве утичу у највећој мери на целокупни процес. Затим се дефинишу нивои ових променљивих како би се добиле задовољавајуће функционалне перформансе.

У току 1950. године, Вох је са тимом својих сарадника говорио о значају и употреби метода експерименталног дизајна у хемијској индустрији (Parmee, 2001). Последњих 15 година, у индустрији је дошло до повећања примена техника експерименталног дизајна у циљу побољша укупног квалитета производа. Спорији развој техника експерименталног дизајна био је последица недостатка одговарајућих програмских пакета.

Приликом примене техника експерименталног дизајна посебну пажњу неопходно је обратити на:

- избор фактора,
- избор факторских нивоа,
- избор факторског дизајна,
- извођење експеримента,
- статистичка анализа одговора и тумачење резултата.

Одабир фактора и њихових нивоа. Пре почетка дизајнирања неопходно је одабрати факторе који ће утицати на вредности одзивне величине. Одабир нивоа фактора је најважнија фаза, можда значајнија и од одабира самог дизајна. Снага експерименталног дизајна огледа се у добијању информација применом само малог броја нивоа фактора, али то уједно и представља потенцијалну слабост. Сваки ниво мора бити одговарајући и да доводи до корисних информација. Уколико су вредности

преблизу онда оне не дозвољавају да дође до битнијих варијација у одговору. Међутим, тачке које су на екстремној удаљености не могу на прави начин да сагледају посматрани процес. Ова чињеница указује да не могу све комбинације нивоа фактора да буду и од практичног значаја.

Кодирани факторски нивои. Код експерименталног дизајна често се факторски нивои представљају у виду кодираних вредности како би могао да се пратити утицај фактора на упоредивој скали (табела 3). На пример, код дизајна са две вредности променљиве (такозвани дизајни са два нивоа) обично се представља у виду серије +1 и -1. Код дизајна који имају више од два нивоа, вредности нивоа су релативне. На пример, код дво-факторског централног комозитног дизајна вредности кодираних нивоа су $-\sqrt{2}$, -1, 0, +1, $+\sqrt{2}$.

Табела 3. Уобичајени начини обележавања кодираних нивоа за дизајн са два и три нивоа

	два нивоа		три нивоа		
	доњи ниво	горњи ниво	доњи ниво	средњи ниво	горњи ниво
математичко обележавање	-1	+1	-1	0	+1
скраћено обележавање	-	+	-	0	+
обележавање у <i>Taguchi</i> -јевом дизајну	1	2	1	2	3
обележавање у <i>Plackett-Burman</i> -овом дизајну	1	2	1	2	3
комбинаторно обележавање	1	a			

Врсте експерименталног дизајна

Иако постоји много различитих врста дизајна, они се могу разликовати према: моделу који се изводи (линеарни или квадратни, са или без интеракција), ограничењима факторских нивоа и циљу студија (скрининг и оптимизација). Код већине дизајна (ортогонални дизајни) вредности фактора варирају независно један од другог.

Факторијални дизајн. Експерименти код факторијалног дизајна добијају се комбинацијом свих факторских нивоа. Овај дизајн има укупно L^k комбинација, где L представља број нивоа, а k број променљивих. Код пуног факторијалног дизајна (слика 5а и 5б) изводи се сваки експеримент, док се код фракционог факторијалног дизајна

изводи посебан подсет којим се израчунавају сви коефицијенти модела. Дизајн са два нивоа користи се код скрининг студија, при чему даје главне и интеракционе ефекте нижих редова. Фракционисањем се долази до дизајна, који даје само главне ефекте кроз неколико експеримента. Уколико су два нивоа кодирана са +1 и -1, онда се колона +1 и -1 испод сваког фактора множи одговором за сваки експеримент. Производ се сумира и дели половином броја експеримената, што представља главни ефекат фактора. Код интеракционог ефекта креира се колона, која представља производ кодираних нивоа.

Plackett-Burman-ов дизајн. Plackett и Burman су 1946. године развили дизајн који је највише нашао примену за испитивање робусности код валидације метода (Машковић и сар., 2010). Погодан је из разлога што један од експеримената захтева основни ниво сваког фактора. *Plackett-Burman*-ов дизајн захтева извођење укупно $4n$ експеримената како би се испитало максимално $4n-1$ фактора на два нивоа.

Централни композитни дизајн. Линеарни одговор добија се само уколико један дизајн има два нивоа. Његовом применом не могу се добити информације о максимуму или неком нелинеарном односу. Међутим, недостатак пуног факторијалног дизајна са нивоом већим од два је велики број експеримената који мора да се уради. Стога је дефинисан централни композитни дизајн (слика 5в), који је добио назив по томе што је сачињен од факторијалног дизајна са два нивоа, звездастог дизајна и централне тачке. Њиме се добијају валидни подаци, који би се постигли и пуним факторијалним дизајном.

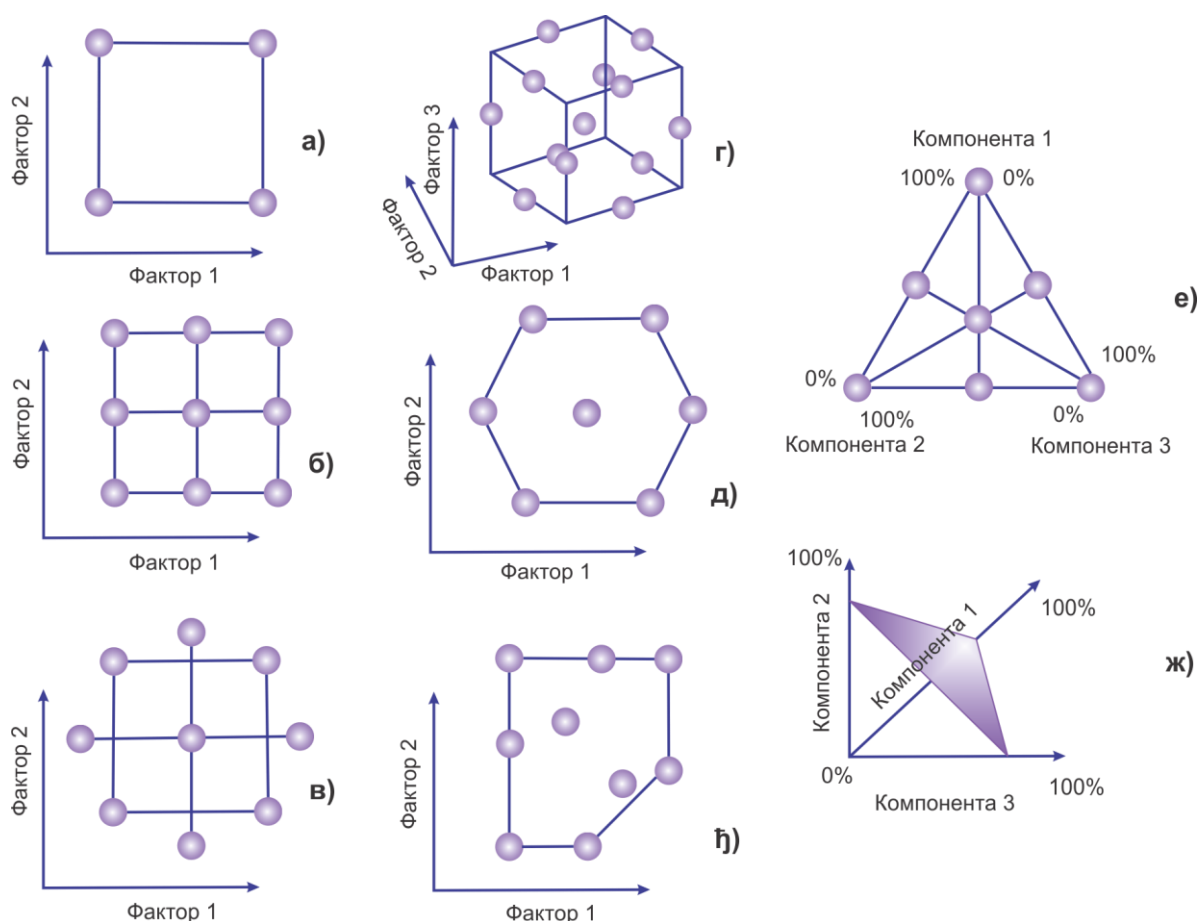
Vox-Behnken-ов дизајн. *Vox-Behnken*-ов дизајн може да има три нивоа (слика 5г) и користи се у случају када се анализира утицај три или више фактора (Lawson, 2010). Овај дизајн захтева укупно $2k \times (2k - 1) + n_c$ експеримената за његово описивање и не садржи факторијалне и екстремне тачке. Број експеримената мањи је него у случају централног композитног дизајна, док је за три фактора исти као код *Doehlert*-овог дизајна. *Vox-Behnken*-ов дизајн се користи за системе са више од два фактора, за које је познато да се оптимум налази у средини факторских опсега.

Doehlert-ов дизајн. *Doehlert*-ов дизајн није ротабилан за разлику од централног композитног дизајна и *Vox-Behnken*-овог дизајна. Дакле, овим дизајном за различите факторе могу да се пруже различите процене. Његов циљ је да се постигне што је могуће више униформнији изглед. Карактеристичан је по томе што фактори могу да

имају различити број нивоа, где се они важнији анализирају на већи број нивоа. *Doehlert*-ов дизајн захтева укупно $k^2 + k + n$ тачака (слика 5д).

D-оптимални дизајн. Такозвани оптимални дизајн временом постаје све популарнији и сматра се посебно корисним када факторски простор није униформно доступан (слика 5ђ). Још један користан аспект овог дизајна је тај што је број експеримената јасно дефинисан. Он се заснива на избору оптималног критеријума и модела који ће бити фитован. Применом овог дизајна могућа је оптимизација неког процеса.

Дизајн смеше. Овај дизајн представља посебну врсту дизајна који се користи када су фактори ограничени неком укупном константном вредношћу (слика 5е). Изглед дизајна у тродимензионалном факторском простору дат је на слици 5ж. На пример, код хроматографије приликом оптимизације састава вишекомпонентне мобилне фазе најбоље је применити дизајн смеше, јер укупни садржај свих компонената мора да буде 100%.



Слика 5. (а) пуни факторијални дизајн на 2 нивоа, и (б) 3 нивоа, (в) централни композитни дизајн, (г) *Box-Behnken*-ов дизајн, (д) *Doehlert*-ов дизајн, (ђ) *D*-оптимални дизајн, (е,ж) дизајн смеше

Статистичка анализа одговора и тумачење резултата. Након примене технике експерименталног дизајна у одговарајућим истраживањима, добијени резултати се најчешће приказују у облику одговарајућих математичких модела.

The diagram illustrates the components of a mathematical model. At the top, three labels are positioned: 'Одговор система' (Response system), 'Фактор' (Factor), and 'Непознати параметар, (коэффициент)' (Unknown parameter, coefficient). Arrows from each label point down to a central box containing the equation $Y = f(x, b)$. Below this box, the variables are defined: $X = x_1, x_2, x_3, \dots, x_n$ and $b = b_0, b_1, b_2, b_3, \dots, b_n$.

Линеарни интеракциони модел – полином другог реда:

$$Y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{12}x_1x_2 + \text{остатак}$$

Квадратни модел са интеракцијама – полином другог реда:

$$Y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{12}x_1x_2 + \text{остатак}$$

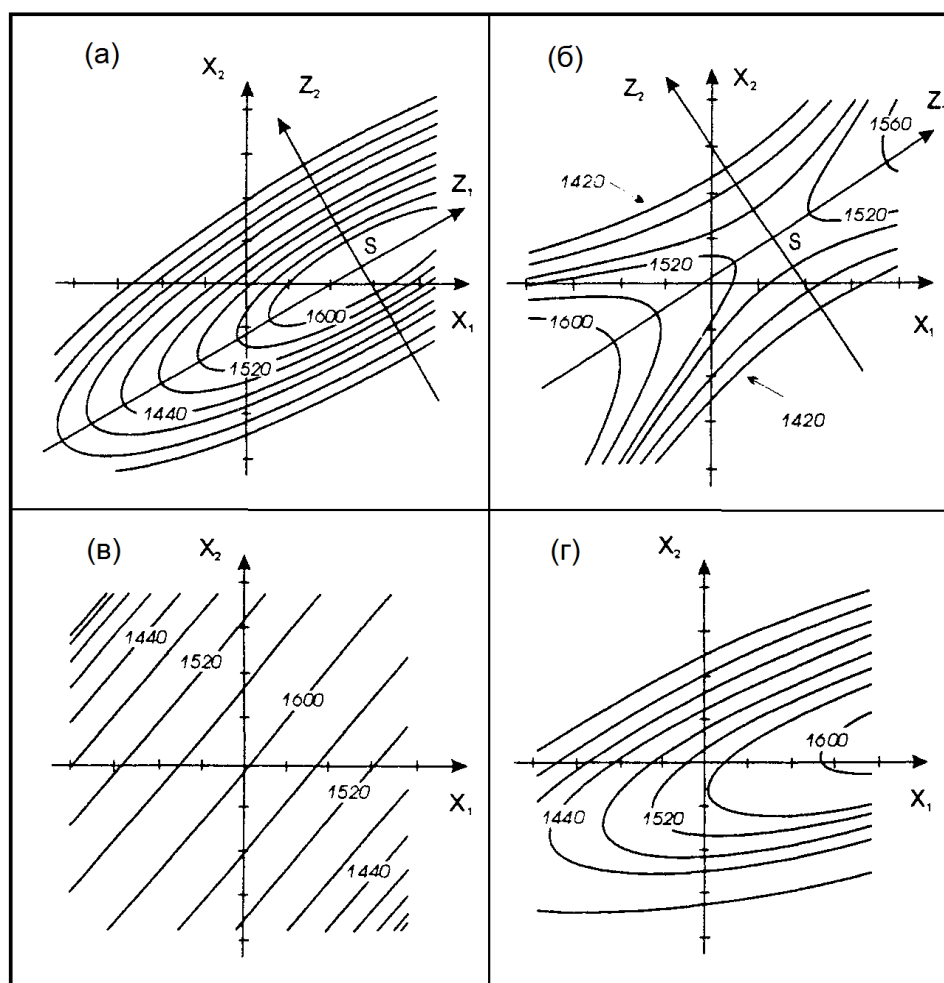
Линеарни чланови (коэффициенти) модела представљају директну везу између испитиваних фактора и одговора система, док су квадратни чланови модела одговорни за закривљеност површине одговора и појаву минимума и максимума. Предзнак коэффициента модела може бити позитиван или негативан што значи да пораст варијабле узрокује пораст или опадање одговора система и то за тачно одређену вредност. Апсолутна вредност коэффициента модела представља интензитет утицаја фактора који се тестира на значајност одређеним статистичким тестовима (нпр. ANOVA тест). Постојање утицаја интеракција може се проценити и преко изгледа површине одговора система (планарна површина указује да нема статистички значајних интеракција у систему) (Hafizi и сар., 2013).

Оптимизација технолошког система

Оптимизација технолошког систем представља крајњи циљ свих анализа технолошког система и представља елемент његове парцијалне анализе. Уколико се прилоком оптимизације неког технолошког поступка посматра утицај двеју променљивих, онда се облик површине одговора може лакше сагледати. Када постоје три или више променљивих проблем постаје много сложенији. Међутим, постоји ограничени број могућих облика површина одговора (Lewis и сар., 1998).

Полиномни модели другог реда су конусне функције, које могу да имају облик елипсе или хиперболе, као што је приказано на слици ба-б.

Функције се могу анализирати конусном анализом, трансформишући моделну једначину тако да облик површине одговора може одмах да се идентификује. Свака функција има своју стационарну тачку S , где је нагиб површине одговора у односу на сваку променљиву једнак нули. Ова тачка може да представља максимум, као за елипсоиду на слици ба. Било која промена вредности фактора, без обзира на правац смањује вредност предвиђеног одговора. Уколико је минимум, онда би облик површине одговора такође требао да буде елипсоидни. Тачка S може да буде и тачка седла, односно изглед површине у облику планинског пролаза (слика бб). Облик површине одговора понекад је доста издуженији, тако да својим обликом подсећа на гребен (слика бв).



Слика 6. Конуси: (а) максимум, (б) седло, (в) гребен и (г) растући гребен

2.10. Неуронске мреже

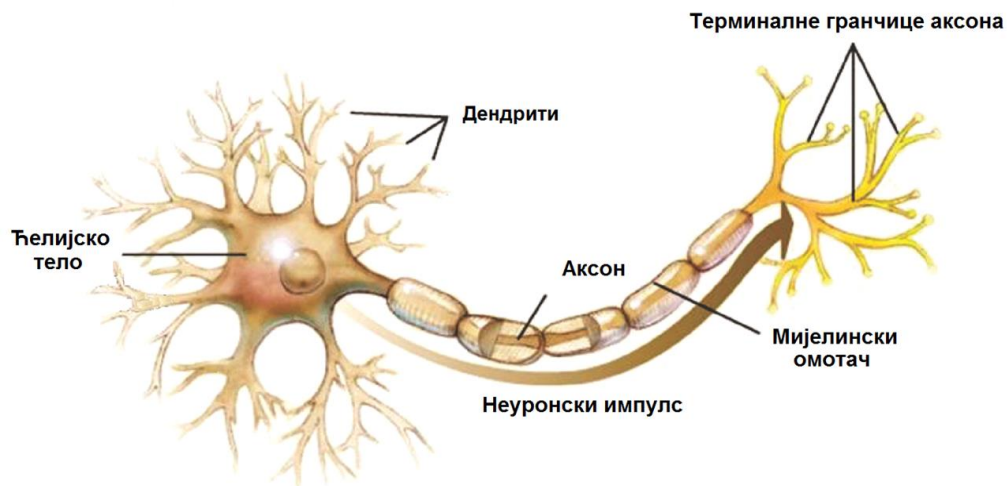
Након појаве, вештачке неуронске мреже наишле су на општу прихваћеност у многим дисциплинама са циљем моделовања сложенијих проблема. Оне се састоје од повезаних једноставних процесирајућих елемената, такозваних вештачких неурона или чворова (Hecht-Nielsen, 1990; Schalkoff, 1997), који омогућавају паралелну обраду података. Основне карактеристике биолошког система, које дају посебну важност неуронским мрежама, јесу нелинеарност, високи паралелизам, робусност, учење, способност да управљају непрецизним и недовољно јасним информацијама, као и способност да генерализују (Jain и сар., 1996). Вештачки модели са таквим карактеристикама су пожељни зато што (1) нелинеарност омогућује боље фитовање података, (2) неосетљивост шума пружа прецизно предвиђање у присуству непоузданих података и грешака приликом мерења, (3) високи паралелизам омогућава брзу обраду података, (4) учење и адаптивност даје могућност систему да ажурира (измени) своју унутрашњу структуру и (5) генерализација која омогућује примену модела на податке који нису учествовали у процесу учења мрежа. Главни циљ вештачких неуронских мрежа базираних на рачунању (неуропроцесуирању) је развој математичких алгорита који ће омогућити мрежама да уче опонашајући обраду информација и стицање знања као код људског мозга. Модели вештачких неуронских мрежа су емпиријски по природи, међутим они могу да дају тачна решења за прецизно и непрецизно формулисане проблеме и за феномене који се само могу објаснити експерименталним путем (Leondes, 2007).

Вештачке и биолошке неуронске мреже

Како је биолошки неурон основни градивни блок нервног система неопходно је поменути његову функцију ради лакшег разумевања рада вештачких неурона и аналогije између вештачких и биолошких неуронских мрежа.

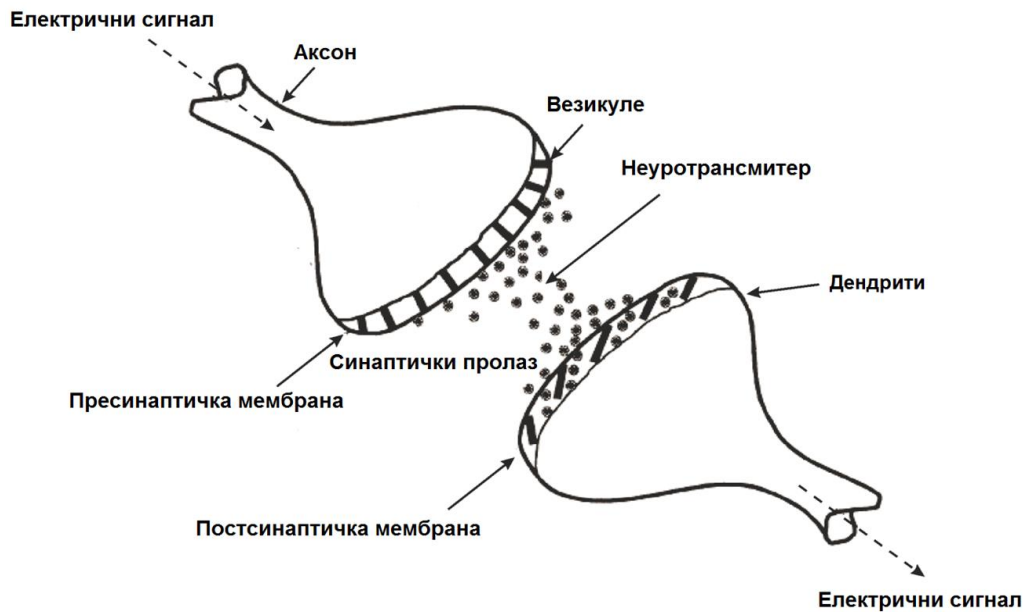
Биолошки неурон

Људски нервни систем састоји се од огромног броја неурона различитих врста и дужина у зависности од њихових положаја у телу (Schalkoff, 1997). На слици 7 дат је поједностављени шематски приказ биолошког неурона са јасно уочљивим главним функционалним јединицама (дендрити, ћелијско тело и аксон).



Слика 7. Шема биолошког неурона

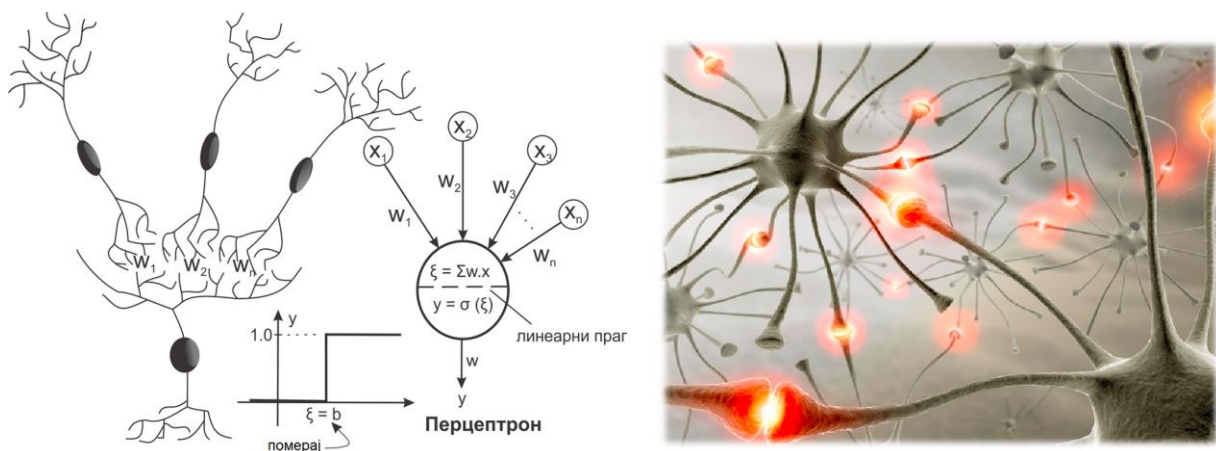
Ћелијско тело поред нуклеуса који садржи информације о наследним својствима има и плазму са свим молекулима за производњу неопходног материјала (Jain и сар., 1996). Дендрити примају сигнале од других неурона, тако да преко њих сигнали доспевају до ћелијског тела. Укупна површина дендрита једног типичног неурона, која може да прими сигнал износи приближно $0,25 \text{ mm}^2$ (Zupan и Gasteiger, 1993). Аксон садржи гране и прима сигнале од ћелијског тела и носи их кроз синапсе (микроскопски међупростор) до дендрита суседних неурона. Шематска илустрација преноса сигнала између два неурона кроз синапсе приказана је на слици 8. Импулс, у облику електричног сигнала, путује унутар дендрита и кроз ћелијско тело према пре-синаптичкој мембрани синапсе. Након доласка у мембрану, неуротрансмитер (хемијски) се ослобађа из везикула у количини пропорционалној јачини улазног сигнала. Неуротрансмитер се осипа у оквиру синаптичког међупростора према пост-мембрани и евентуално у дендритама суседних неурона, тако да их присиљава (зависно од прага пријемног неурона) да генеришу нови електрични сигнал. Генерисани сигнал пролази кроз други неурон на идентичан начин. Количина сигнала која пролази кроз пријемни неурон зависи од интензитета изворног сигнала сваког неурона, њихове синаптичке јачине и прага пријемног неурона. Пренос више сигнала истовремено је могуће из разлога што неурон има велики број дендрита/синапса. Овај поједностављени механизам преноса сигнала подстакао је рани развој неуро-рачунања и операцију грађења јединица вештачких неуронских мрежа (Vedmedenko, 2007).



Слика 8. Механизам преноса сигнала између два биолошка неурона

Аналогија

Аналогија између вештачког и биолошког неурона је та што везе између чворова представљају аксоне и дендрите, тежине веза представљају синапсе, а праг апроксимира активност у телу (Jain и сар., 1996). На слици 9 илустровано је n биолошких неурона са различитим интензитетима сигнала x и синаптичким јачинама w , који улазе у неурон са прагом b , као и еквивалентни вештачки неуронски систем. И биолошке и вештачке неуронске мреже уче постепено подешавањем магнитуда тежина или јачина синапси (Zupan и Gasteiger, 1993).



Слика 9. Интеракција сигнала од n неурона и аналогија сумирања сигнала код вештачког неурона и једнослојног перцептрона

Вештачки неурон

Маханизме вештачког неурона, као и сам перцептрон први је увео Rosenblatt како би решио проблеме са препознавањем знакова (Lingireddy и Brion, 2005). Вештачки неурон заправо добија улазне податке од околине и комбинује их на посебан начин до форме мрежног улаза (ξ). Након тога, подаци пролазе преко линеарног прага и добијени сигнал (излаз, y) се преноси ка другом неурону или околини (слика 9). Када ξ превазиђе неуронски гранични померај (такође познат као биас, b) долази до појаве неуронске ватре. Динамика линеарног неурона често се претпоставља приликом рачунања ξ (Haykin, 1994). Мрежни улаз се рачуна као скаларни производ улазних сигнала (x) без обзира на неурон и њихову јачину (w). За n сигнала, операција неуронског перцептрона изражава се на следећи начин (једначина 1):

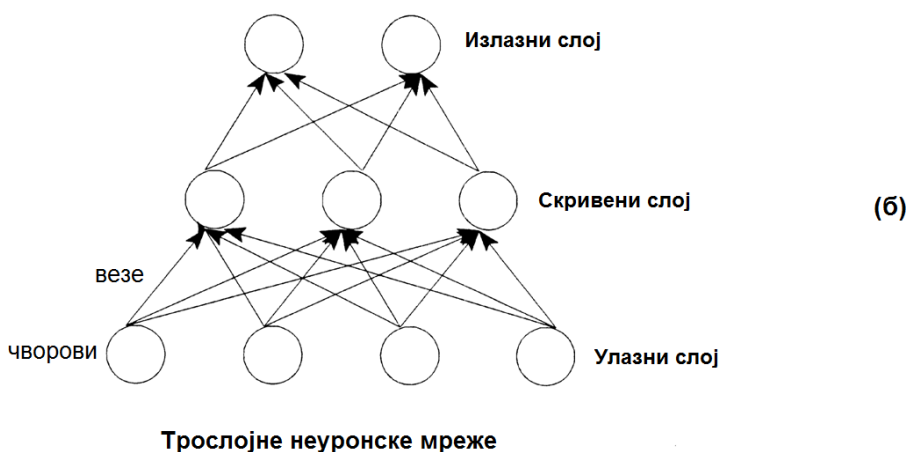
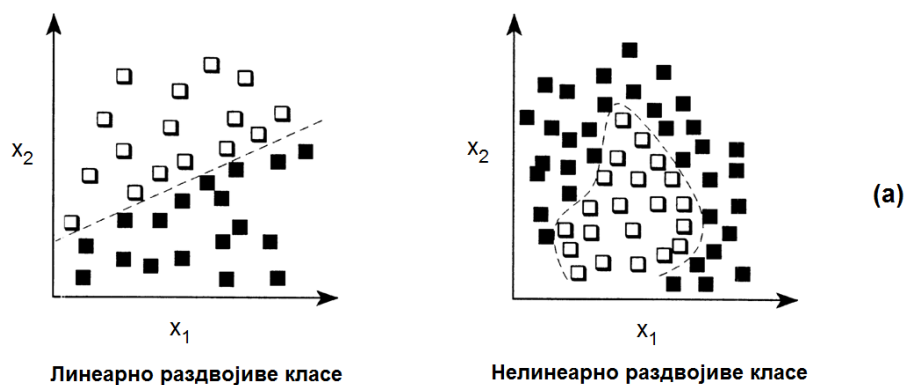
$$y = \begin{cases} 1, & \sum_{i=1}^n w_i x_i \geq b \\ 0, & \sum_{i=1}^n w_i x_i < b \end{cases} \quad (1)$$

при чему 1 представља “on” а 0 “off” (слика 9), или класа А и В, респективно, приликом решавања класификационих проблема. Позитивна тежина ($w_i > 1$) повећава неурон, док негативна тежина смањује ξ и инхибира активност неурона. Систем се састоји од вештачког неурона и улаза као што је дато на слици 9. Он се назива перцептроном који успоставља мапирање између улазне активности (стимуланса) и излазног сигнала. У једначини 1, неуронски праг може да се посматра као додатни улазни чвор чија је вредност увек јединична, а његова тежина конекције једнака b . У таквом случају, сумирање у једначини 1 врши се од 0 до n , а мрежни сигнал ξ је у односу на 0.

Перцептрони

Перцептрон (слика 9) може да се тренира на сету података применом посебног правила учења (Lingireddy и Brion, 2005). Тежински коефицијенти перцептрона (укључујући праг) мењају се пропорционално разлици између циљаног одговора (Y) и перцептронског решења (y) за сваки податак. Иначе, грешка је функција свих тежина и облика нерегуларне вишедимензионалне комплексне хипер-равни са много пикова, тачака седла и минимума. Применом специјалних техника тражења, процес учења тежи да пронађе сет тежина које одговарају глобалном минимуму. Rosenblatt је 1962. године извео перцептронско правило помоћу кога је могуће доћи до оптималног вектора

тежине у коначном броју итерација упркос почетној вредности тежина. Ово правило може да се прецизно примени само на линеарно раздвојивим класама (Hecht-Nielsen, 1990). Код њих линеарна хипер-раван раздваја једну класу објеката на једној страни равни, а другу класу на другој страни. На слици 10а приказани су линеарно и нелинеарно раздвојиви класификациони проблеми.



Слика 10. (а) Линеарно и нелинеарно раздвајање, (б) вишеслојни перцептрон са улазним, скривеним и излазним слојем, чворовима и везама

У циљу да се реши нелинеарно раздвојиви проблем, додатни слојеви неурона убацују се између улазног слоја (који садржи улазне чворове) и излазног неурона при чему се добија архитектура вишеслојног перцептрона (Hecht-Nielsen, 1990), као што је приказано на слици 10б. Како овај средњи слој не може да интерагује са спољашњим окружењем назива се скривени слој, а његови чворови скривеним чворовима. Додатни средњи слојеви оживљавају перцептрон повећањем његове способности да реши нелинеарни класификациони проблем. Применом сличне динамике неурона, скривени слој неурона прима информације од улазних чворова и пролазећи преко њих долазе до излазног слоја. Учење вишеслојног перцептрона није тако директно као код

једноставног перцептрона. Мрежа повратне пропагације (Harris, 1994) је један тип тренираног вишеслојног перцептрона. Међутим, процес учења је надоградња алгоритма једноставног перцептрона у току кога се управља тежинама веза у скривеним чворовима (Hecht-Nielsen, 1990).

Улога активационе функције неурона код скривеног слоја је да омогући мрежи да научи нелинеарне функције. Уколико нема нелинеарности, неурони скривених слојева немају већу могућност од обичне перцептронске мреже која се састоји само од улаза и излаза. Код неурона на излазу најчешће се налази нелинеарна активациона функција, која мрежу са више слојева чини нарочито моћном. Углавном су све нелинеарне функције у употреби, изузев што се код алгоритма повратне пропагације (*backpropagation algorithm*) најчешће примењују сигмоидне функције (логистичка, аркустангенс или гаусова функција). Најчешће коришћене функције попут одскочне, сигмоидне, логистичке, тангенс хиперболичке и друге дате су у табели 4.

Табела 4. Најчешће коришћене активационе функције

функције	дефиниција	опсег
линеарна	x	$(-\infty, +\infty)$
логистичка	$\frac{1}{1 + e^{-x}}$	$(0, +1)$
хиперболичка	$\frac{e^x - e^{-x}}{e^x + e^{-x}}$	$(-1, +1)$
негативна експоненцијална	e^{-x}	$(0, +\infty)$
синусна	$\sin(x)$	$[0, +1]$
одскочна	$0, x < 0$ $1, x \geq 0$	$[0, +1]$
рампна	$-1, x \leq -1$ $x, -1 < x < 1$ $1, x \geq 1$	$[-1, +1]$

За неуроне у излазном слоју могу се бирати активационе функције које одговарају расподели циљних вредности. Логистичка функција је нарочито корисна када су циљне вредности ограничене, а уколико нису онда је боље да се користи активациона функција која није ограничена. У случају да су излазне вредности позитивне, а при том немају горњу границу, онда је најбоље користити

експоненцијалну функцију. Иначе, постоји одређена природна повезаност између излазних активационих функција и различите расподеле шума, који се изучава статистички у контексту генерализације излазног модела.

Поређење биолошке и вештачке мреже

Центар биолошке неуронске мреже код човека је церебрални кортекс (церебрум) дебљине 2-3 mm са доста међусобно повезаних неурона просечне површине 2200 cm^2 и са укупним бројем неурона од око 10^{11} (Jain и сар., 1996). Сваки неурон повезан је са 1000-10000 других неурона (Schalkoff, 1997), чинећи приближно 10^{14} - 10^{15} међусобних веза. Насупрот томе, вештачке неуронске мреже (на пример, повратне пропагације) обично имају од 10 до највише 10000 неурона за најсофистицираније имплементирани мреже са густином веза од 5 до 100 по неурону (Wythoff, 1993). Што се тиче њиховог рада и интерне структуре, вештачке неуронске мреже сматрају се хомогеним и често раде детерминистички, док оне код људског кортекса су екстремно хетерогене и функционишу по мешовитом сложеном детерминистичком и стохастичком начину. У односу на функционалност, није изненађујуће уочити да вештачке неуронске мреже могу грубо речено да се пореде са биолошким мрежама, јер су и развијене да имитирају рачунарске особине мозга (Schalkoff, 1997).

Учење

Способност учења је посебна карактеристика која се односи на интелигентне системе, биолошке и обратно. Код вештачких система, учење се посматра као процес ажурирања унутрашњег распореда система. Ово подразумева модификовање архитектуре мреже, која укључује подешавање тежина веза, одбацивање или стварање неких конекционих линкова (Schalkoff, 1997).

Подела вештачких неуронских мрежа

Вештачке неуронске мреже се могу класификовати на различите начине у складу са једном или више релевантних карактеристика. Велики број подела неуронских мрежа јавља се услед великог броја различитих реализација неуронских мрежа. Оне се деле према врстама веза, односно архитектури мреже на слојевите, потпуно повезане и целуларне. Код слојевитих мрежа, неурони су распоређени тако да формирају слојеве. Код њих се на улазу једног неурона доводе излази свих осталих неурона из претходног слоја, а при том се његов излаз води на улазе свих неурона у наредном слоју. Неурони улазног слоја имају само по један улаз, док излази неурона последњег слоја представљају излазе мреже. Њихов представник је алгоритам повратне

пропагације. Код потпуно повезаних, излаз једног неурона води ка улазу свих неурона у мрежи. Њихов представник је Хопфилдова неуронска мрежа (Calmese, 2008). Суседни неурони су само међусобно повезани код целуларних мрежа. Без обзира на локалну повезаност, сигнали се простиру и на неуроне и ван суседства због индиректног простирања информација. Представник је ћелијска неуронска мрежа (*Cellular Neural Network – CNN*) (Slavova и Mladenov, 2004).

Према смеру простирања информација кроз неуронску мрежу могу се поделити на повратне и неповратне. Виши слојеви неповратних (*Feedforward*) мрежа не враћају информацију у ниже слојеве. Пропагација сигнала врши се у једном смеру и то од улаза према излазу. Као представник ове врсте неуронске мреже је вишеслојни перцептрон, односно мрежа са више слојева. Код повратних или рекурентних (*Feedback*) мрежа виши слојеви враћају информације назад у ниже слојеве. Излаз из неурона враћа се у ниже слојеве или у исти слој. Представници ове врсте мрежа су Кохоненова, Хопфилдова, ћелијска неуронска мрежа (CNN), двоструко асоцијативна мрежа, итд. (Wiess, 2007). Повратне мреже имају много веће процесне способности од неповратних мрежа.

Способност мрежа да могу да уче је главна њихова карактеристика која их чини суштински различитим од осталих мултиваријационих техника (Anbumani и Nedunchezian, 2010). Алгоритми неуронских мрежа се према типу учења деле на оне са надгледаним и ненадгледаним учењем (Priddy и Keller, 2005). Код надгледаног (*supervised*) учења познате су вредности излазних варијабли (мрежа повратне пропагације, радијалне базне функције, пробабилистичка мрежа). Ненадгледано (*unsupervised*) учење нема познате вредности излазних варијабли за сет података који је ушао у учењу мреже (Кохоненова самоорганизирајућа, АРТ мрежа).

Најпримењенији алгоритам је онај са надгледаним учењем где се актуелне вредности пореде са излазним вредностима. Уколико се јави разлика између ове две вредности може се приступити тренирању мреже. Најчешћа форма тренирања је она повратна пропагација, код које се грешка у излазној вредности израчунава и шаље уназад кроз систем неурона, при чему долази до пропорционалних промена вредности тежинских коефицијената, који се повећавају или смањују у зависности од грешке. Након измене ових вредности, улазне вредности поново улазе у систем и процес се понавља са циљем да се процесуира велики број случајева кроз неуронску мрежу у фази тренинга, како би се обезбедио највиши квалитет излазних вредности у односу на постојеће улазне.

Оптимизација неуронских мрежа

Симплекс техника представља неградијентни оптимизациони алгоритам који се користи за максимизацију (или минимизацију) произвољне функције у коначном броју итерација (Braspenning и сар., 1995). Алгоритам је применљив за неки број континуалних променљивих и код њега нема разлике у вези са природом функције која треба да се оптимизује, осим да она сама мора да буде континуална. Алгоритам започиње са почетним решењем и анализира своју оптималност (његова близина до жељене вредности одговора). Уколико је оптималност задовољавајућа, алгоритам се зауставља. Задатак алгоритма је да идентификује и другу оптималну тачку цртајући симплекс. Оптималност новог решења се потом тестира, а шема се понавља све док се не нађе оптимални сет независних променљивих за које модел даје жељени одговор. Када се користи симплекс алгоритам за оптимизовање одговора, препоручљиво је да се ограничи претрага на оне регионе независних променљивих који падају у оквиру граница сета података за које је модел трениран (Parsopoulos и Vrahatis, 2002).

2.11. Примена експерименталног дизајна и вештачких неуронских мрежа

Примена експерименталног дизајна и вештачких неуронских мрежа заступљена је у свим сферама истраживања, а посебно у области фармацеутског инжењерства почевши од оптимизације поступка екстракције активних принципа (Савић и сар., 2012а), преко развоја и валидације одговарајућих аналитичких метода, развоја формулација до примене у испитивању стабилности готових фармацеутских формулација. Предности употребе ових техника у односу на традиционалне огледају се у следећем:

- **Уштеди времена и новца.** Ово је нарочито важно у фази планирања процеса, када је могуће проценити ефекат већег броја променљивих при минималном броју експеримента употребом погодног дизајна.
- **Идентификацији интеракционих ефеката.** Једна од највећих предности је та што се њима могу идентификовати ефекат интеракције између променљивих и утицај самих променљивих. Ово је битно у случају где је ефекат једне променљиве зависан од нивоа друге променљиве.
- **Карактеризацији одзива.** Начин на који процесне променљиве утичу на зависно променљиву величину неопходно је посматрати у оном делу где се процес одиграва.

Примена експерименталног дизајна у процесу екстракције. Имајући у виду да су полифенолна једињења и антиоксиданси од изузетног значаја за човеков организам, пажња истраживача углавном је била усмерена на оптимизацију поступка њихове екстракције из одговарајућег биљног материјала. Тако су Tabaraki и сар. (2012) применом CCD оптимизовали услове ултразвучне екстракције полифенола и антиоксиданаса из плода нара, *Punica granatum*. Током оптимизације као независно променљиве величине посматране су: природа растварача, однос биљног материјала и растварача, концентрација растварача, температура и време екстракције. Оптимизација поступка екстракције полифенола могућа је и применом *Placket-Burman*-овог дизајна (Anastácio и Carvalho, 2013). Поред фенолних једињења и антиоксиданаса, интересантна су и друга биоактивна једињења чији се поступак екстракције оптимизује применом техника експерименталног дизајна. Maran и сар. (2010) су применом *Vox-Behnken*-овог дизајна са три нивоа проучавали утицај три процесних променљивих (температура екстракције, време екстракције и однос биљне сировине и растварача) на принос полисахарида добијеног из кукурузне свиле. Добијени резултати фитовани су полиномном једначином другог реда са високом вредношћу коефицијента корелације. Оптимални услови добијени применом *Derringer*-ове *desirability* функције експериментално су и потврђени. Екстракција пектина из пулпе шећерне репе оптимизована је применом *Vox-Behnken*-овог дизајна са четири процесне променљиве и два одговора (Li и сар., 2012). Дефинисаним моделом објашњена је веза између дефинисаних независно променљивих и одговора. Daneshvand и сар. (2012) применили су технику CCD за упоређивање ефикасности различитих поступка екстракције (суперкритична и ултразвучна екстракција) масних киселина из плода дуње (*Cydonia oblonga*) култивисане у Ирану. Оптимизација поступка суперкритичне екстракције кокаина из листова коке (*Erythroxylum coca*), извршена је применом технике CCD, ради дефинисања интеракција између одабраних фактора: притиска, температуре, природе поларног модификатора и његовог удела (Brachet и сар., 2000). Предвиђене вредности садржаја кокаина поређене су са експерименталним вредностима, а робусност екстракционе методе процењена је конструисањем површине одговора. Sinha и сар. (2012б) применили су CCD у циљу оптимизације поступка екстракције боја из круничних листића цвета папагај-дрвета (*Butea monosperma*) и испитивања утицаја интеракција различитих параметара (време екстракције, температура и маса латице).

У литератури се поред оптимизовања поступка екстракције биоактивних једињења из одговарајућег биљног материјала могу наћи и подаци за оптимизацију

поступка екстракције одређених једињења из биолошких узорака применом техника експерименталног дизајна. Живановић и сар. (2008) применом хеометријског приступа оптимизовали су поступак чврсто-фазне екстракције за пречишћавање микофенолне киселине и њеног метаболита, микофенолно-киселинског глукоронида из биолошких узорака. За утврђивање статистички значајних процесних параметара примењен је фракциони факторијални дизајн, при чему је утврђено да су јонска сила фосфатног пуфера у фази испирања и удео ацетонитрила у фази елуирања значајни фактори за екстракцију микофенолно-киселинског глукоронида, док су удео ацетонитрила и рН раствора за испирање значајни за екстракцију микофенолне киселине. Након тога, значајне променљиве оптимизоване су техником CCD. За изоловање метил живе из биолошких узорака развијен је и оптимизован дериватизациони поступак симултане микроталасне екстракције (Abuin и сар., 2000). Поступак је оптимизован применом 2^{5-1} фракционог факторијалног дизајна. Овим хеометријским приступом утврђено је да температура и њене интеракције са запремином раствора потребних за дериватизацију метил живе имају значајан утицај на процес екстракције. Примена експерименталног дизајна значајна је и приликом изоловања једињења из одговарајућих прехранбених производа. Тако су Careri и сар. (1999) применом CCD пратили утицај времена екстракције, температуре растварача и температуре узорка на приносе масних киселина изолованих из сира симултаном дестилационом екстракцијом. Након тога, предложеном методом дефинисали су најбоље екстракционе услове у циљу добијања максималног приноса посматраних масних киселина.

Примена вештачких неуронских мрежа у процесу екстракције. Поред експерименталног дизајна и вештачке неуронске мреже (ANN) показале су се врло моћном техником за оптимизацију процеса екстракције. Khajeh и сар. (2012) применили су модел трослојне вештачке неуронске мреже за предвиђање приноса етарских уља из *Diplotaenia cachrydifolia*, добијеног поступком суперкритичне екстракције. У овом случају за тренирање неуронске мреже коришћен је *Levenberg–Marquardt*-ов алгоритам. Добијени резултати показали су да мрежа са пет скривена неурона има високу тачност у предвиђању приноса етарског уља екстрахованог из *D. cachrydifolia*. Међутим, данас је све чешћа истовремена примена експерименталног дизајна и ANN за оптимизацију процеса екстракције. У случају симулације и оптимизације микроталасне екстракције боје из семена орлеан-дрвета (*Bixa orellana*)

примењени су CCD и ANN модели (Sinha и сар., 2013). Овим техникама испитан је утицај рН, времена екстракције и количине семена на ефикасност екстракције. Подаци CCD дизајна искоришћени су као сет подаци за тренирање неуронских мрежа. Перформансе модела међусобно су упоређиване на основу вредности коефицијената корелације, квадратног корена средњих квадратних грешака и средњих апсолутних девијација валидационог сета података. Добијени резултати статистичке анализе показали су да ANN има боље перформансе предвиђања у поређењу са CCD моделом. Такође, Sinha и сар. (2012a) користити су и кору плода нара као добар извор природних боја и подвргавали је микроталасној екстракцији. Током рада као независно променљиве величине посматрали су време екстракције, рН раствора и количину биљног материјала. Поступак екстракције оптимизовали су применом техника CCD и ANN.

2.12. Фармаколошка испитивања биоактивних једињења

Биолошка активност неке супстанце зависи од њених структурних, физичких и хемијских особина. Повезаност структуре и активности, односно структуре и особина неког биолошки активног једињења данас се испитује QSAR (анализе односа структуре и активности – *Quantitative Structure–Activity Relationship*), односно QSPR (анализе односа структуре и особина – *Quantitative Structure–Property Relationships*) студијама (Chirico и Gramatica, 2012).

У циљу примене биоактивних једињења изолованих из одговарајућег биљног материјала и добијених екстраката, поред утврђивања корелације између структуре и активности једињења, неопходно је спровести додатна истраживања у следећим правцима:

1. **Хемијске анализе** биљних екстракта, које имају за циљ одређивање активних конституената у биљним екстрактима, изоловање и одређивање структуре биолошки активних једињења, које се базирају на примени савремених инструменталних метода IC, UV-VIS, NMR, MS, HPLC.
2. **Биолошка испитивања:** (а) испитивање и процена антиоксидативних активности биљних екстракта и изолованих једињења у различитим *in vitro* системима и идентификација супстанци одговорних за антиоксидативни ефекат; (б) *in vitro* испитивање цитотоксичне активности биљног екстракта на одговарајуће хумане линије туморских ћелија.

3. **Микробиолошка испитивања:** испитивање антимикуробног и антифугалног деловања биљних екстракта и одговарајућег биоактивног једињења.

2.13. Антиоксидативна активност

Антиоксиданси инхибирају или потпуно спречавају оксидацију супстрата (липидна, протеина, угљених хидрата, ДНК) чак и при ниским концентрацијама. Своју активност могу испољити различитим механизмима захваљујући њиховој способности да делују као: “хватачи” слободних радикала, донори електрона или донори Н-атома, акцептори електрона и акцептори Н-атома. Антиоксидативна активност суспензије зависи од бројних фактора као што су: антиоксидативни механизам, циљни биомолекул, место деловања (екстрацелуларно или интрацелуларно) и концентрације потребне да испољи антиоксидативни ефекат (Vertuani и сар., 2004).

Постоји више начина класификовања антиоксиданаса. Према нивоу и начину деловања у хуманом организму антиоксиданси се деле на превентивне, “скевенцер”, репарационе и адаптивне (Shi и сар., 2001).

- **Превентивни антиоксиданси** спречавају формирање слободних радикала и иницирање ланчаних реакција оксидације: декомпозицијом водоник пероксида и липидних хидропероксида (ензимски антиоксиданси - каталаза, глутатион пероксидаза, глутатион-S-трансфераза), комплексирањем јона метала (протеини – албумин, церулоплазмин, миоглобин, трансферин, итд.) и елиминацијом ROS (супероксид дисмутаза).
- **“Скевенцер” антиоксиданси** поседују способност да “хватају” слободне радикале и тако инхибирају иницијацију и прекидају пропацију реакције липидне оксидације, па се зато називају и “*chainbreaking*” антиоксиданси (Roginsky и Lissi, 2005). “Скевенцер” антиоксиданси према растворљивости се деле на: хидросолубилне антиоксидансе (витамин Ц, мокраћна киселина, билирубин, албумин, глутатион, неки полифеноли) и липосолубилне антиоксидансе (витамин Е, витамин А, каротеноиди, неки полифеноли) (Vaуа и Aviram, 2001).
- **Репарациони антиоксиданси** делују посебним механизмима, обнављајући или уклањајући оштећене биомолекуле који настају у условима оксидативног стреса. У репарационе антиоксидансе убрајају се: фосфолипазе, протеазе, ензими који обнављају ДНК, трансферазе итд.

- **Адаптивни антиоксиданси** су генерисани одговарајући антиоксидативни ензими, у одговарајућем времену и концентрацији, пренети до одговарајућих места деловања.

Према месту настајања антиоксиданси се деле на ендogene и екзогене.

- **Ендогени антиоксиданси** представљају антиоксидансе који настају у људском организму. Деле се на ензимске (супероксид дисмутаза, каталаза, глутатион пероксидаза) и неензимске као што су: мокраћна киселина, билирубин, тиоли, NADPH, NADH, коензим Q10 (убихинон), протеини који поседују способност везивања јона метала (албумин – бакар, церулоплазмин – бакар, феритин – гвожђе, миоглобин – гвожђе, трансферин – гвожђе) (Valko и сар., 2007).
- **Екзогени антиоксиданси** (неензимски) уносе се путем хране или лекова, јер се у хуманом организму не могу синтетисати. Једну од најважнијих група природних екзогенних антиоксиданаса чине фенолна једињења (флавоноиди, фенолне киселине, проантоцијанидини), чија је активност условљена структурним карактеристикама (Ruberto и сар., 2007). У екзогене антиоксидансе такође се убрајају: витамин Ц, витамин Е, каротеноиди, као и есенцијални минерали (коензими) потребни за активно место ензимских антиоксиданаса.

Поред ових подела антиоксидансе је могуће поделити и према механизму деловања на каталитичке системе неутрализације ROS (супероксид дисмутаза, каталаза, глутатион пероксидаза), антиоксидансе који везују јоне метала и тако спречавају настајање ROS *Haber-Weiss*-овом реакцијом (албумин, церулоплазмин, феритин), “скевенцер” антиоксидансе (аутодеструктивне) који прекидају ланчане реакције и деструктивно делују на ROS (витамин Ц, витамин Е, флавоноиди итд.) и антиоксидансе који своје деловање испољавају апсорпцијом енергије, електрона “гасећи” ROS (каротеноиди и антоцијани) (Sen и Chakraborty, 2011).

2.13.1. Антиоксидативна и антирадикална активност полифенола

Полифенолна једињења спадају у групу неензимских антиоксиданаса. Сматра се да је антиоксидативна активност полифенолних једињења резултат њихове способности да буду донатори водоника, након чега настају мање реактивни феноксил радикали. Релативно велика стабилност феноксил радикала се објашњава делокализацијом електрона и формирањем већег броја резонантних облика. Биљни полифеноли се не сматрају увек правим антиоксидансима, али је у многим *in vitro*

истраживањима доказан антиоксидативни потенцијал фенолних материја у воденој фази, “скевенџер” радикала, као и појачање резистентности према оксидацији липопротеина мале густине, који учествују у патогенези у случају коронарних болести (Heinecke, 1998).

Код полифенолних једињења са порастом молекулске масе смањује се антиоксидативна активност. Ова активност испољава се на више начина у биолошким системима и то:

- предајом Н-атома, директним везивањем („хватањем“) слободних кисеоникових и азотних радикала,
- хелирањем прооксидативних металних јона (Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} и Mg^{2+}),
- активирањем антиоксидативних ензима,
- инхибицијом прооксидативних ензима (липооксигеназа, NAD(P)H оксидаза, ксантин-оксидаза, оксидаза, ензими цитохрома P-450).

У последње време флавоноиди су привукли пажњу због изванредне антиоксидативне и антирадикалске активности (Masuoka и сар., 2012). Истраживања су показала да су флавоноиди добри “хватачи” слободних радикала па имају значајну улогу у фармацеутској (Cui и сар., 2008; Wang и сар., 2009) и прехранбеној индустрији (Saeed и сар., 2012). Заштитни ефекат ових једињења доказан је *in vitro* и *ex vivo*. Они инхибирају оксидацију липида, која се у биолошким системима доводи у везу са појавом хроничних обољења и старењем ћелија. Флавоноиди инхибирају неке ензимске системе, реагују са пероксил радикалом попут витамина Е и при томе окончавају аутооксидацију незасићених масних киселина.

Антиоксидативно деловање полифенола, а тиме и флавоноида, зависи од њихове структуре. Флавоноиди инхибирају ензиме одговорне за настајање супероксид анјон радикала као што су ксантин-оксидаза и протеин киназа Ц, али инхибирају и циклооксигеназу, липооксигеназу, микрозомалну монооксигеназу и глутатион-S-трансферазу, митохондријалну сукцин оксидазу, NADH оксидазу, чиме спречавају настајање реактивних врста кисеоника. Флавоноиди показују антиоксидативну активност како у хидрофилним, тако и у липофилним системима. Захваљујући нижем редокс потенцијалу (0,23–0,75 eV) флавоноиди могу редуковати слободне радикале (R^*), који имају већи редокс потенцијал (2,13–1,0 eV) као што су супероксид анјон радикал, пероксил, алкоксил, хидроксил радикал, одавањем атома водоника.

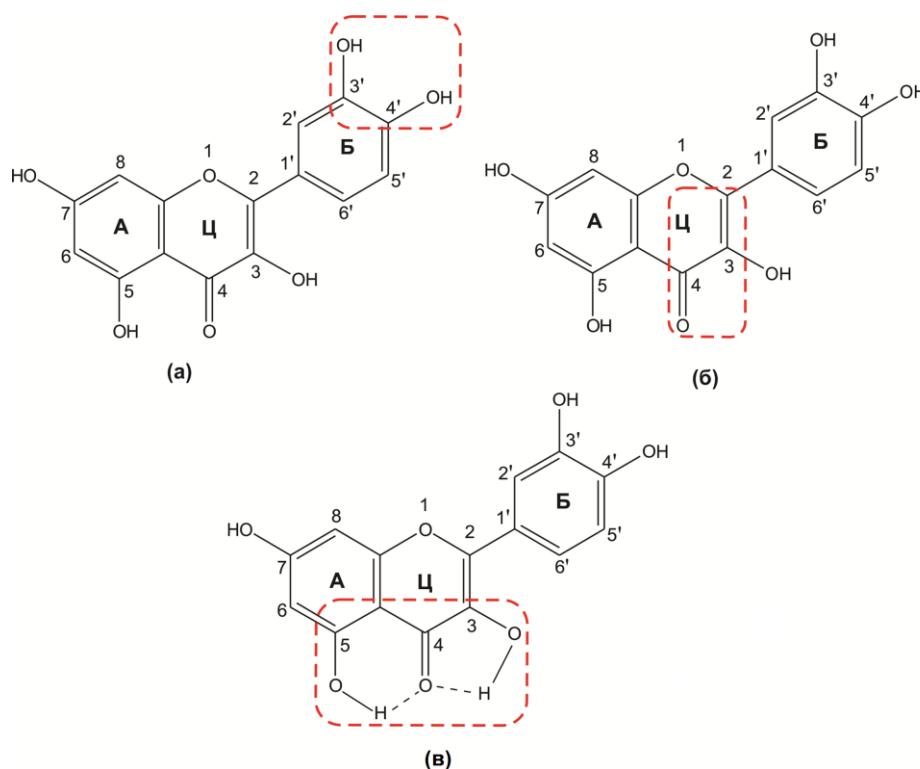
Флавоноиди под условима оксидативног стреса могу деловати прооксидативно, па уместо “хватања”, могу формирати слободне радикале.

Да би флавоноид имао функцију квалитетног антиоксиданса, мора да испуни два услова:

- да буде присутан у малој концентрацији у односу на материју подложну оксидацији и да успори или спречи реакцију оксидације;
- да радикал који је настао из флавоноида мора да буде стабилан како не би иницирао ланчану реакцију.

Главне структурне карактеристике флавоноида значајне за способност хватања радикала су:

- о-дихидроксилна (катехолна) структура у Б-прстену, која даје стабилност радикалу и омогућава делокализацију електрона (слика 11а);
- 2,3-двострука веза у коњугацији са 4-кето-групом омогућава делокализацију електрона из Б-прстена (слика 11б);
- хидроксилне групе на положају 3- и 5- осигуравају водоникову везу с кето-групом (слика 11в).



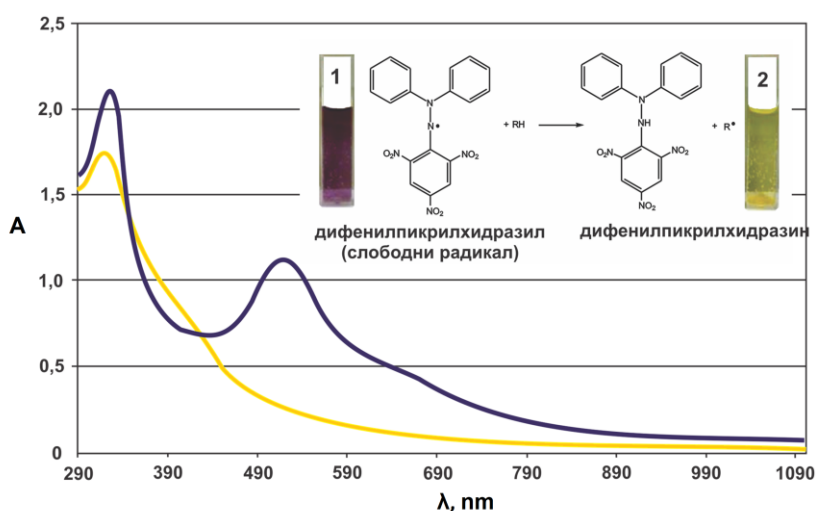
Слика 11. Структурне групе важне за хватање слободних радикала

Познати су и синергијски ефекти код антиоксидативног деловања флавоноида. Позитивни и повећани ефекти антиоксидативног деловања флавоноида могу да буду и резултат њихове интеракције са другим физиолошким антиоксидансима – витамином Ц или витамином Е (Pekkarinen и сар., 1999; Pedrielli и Skibsted, 2002).

2.13.2. Тестови за одређивање антиоксидативне активности

За процену антиоксидативне и антирадикалске активности биљних екстраката и биоактивних једињења немогуће је дефинисати једну методу, јер већина анализираних узорака садржи већи број реактивних хемијских врста са различитим механизмом деловања. Стога је за одређивање антиоксидативне активности потребно изабрати комбинацију више тестова који се заснивају на различитим принципима и показују антиоксидативни потенцијал испитиване супстанце путем различитих механизма деловања. Најчешће употребљавани тестови приликом одређивања антиоксидативне активности биљних екстракта су: DPPH, ABTS, тест уклањања пероксил радикала (ORAC тест) и тест одређивања редукционе способности (FRAP).

DPPH тест. Способност једињења да хватају слободне 1,1-дифенил-2-пикрилхидразил (DPPH) радикале се одређује тзв. DPPH тестом (Espín и сар., 2000). Метода се заснива на праћењу трансформације љубичасто обојеног, стабилног DPPH радикала у редуковани жуто обојен DPPH-Н производ (слика 12). До трансформације долази приликом реаговања са молекулима који показују антиоксидативну активност. С обзиром да се ради о бојеној реакцији, тест се базира на мерењу апсорбанције на 517 nm у погодном растварачу.



Слика 12. Трансформација љубичасто обојеног и стабилног DPPH радикала у редуковани жуто обојен DPPH-Н производ

ABTS тест. Применом ABTS теста испитује се способност неког једињења да неутрализује радикални катјон ABTS*+радикал (Arnao и сар., 2001), настао у реакцији између ABTS (2,2-азино-бис-(3-етил-бензотиазолин-6-сулфонска киселина) диамонијум со) раствора и калијум персулфата. Пре употребе добијена смеша треба да одстоји 12–16 h на собној температури у мраку. Настали радикали су плаве боје са максимумом апсорпције на 734 nm (Re и сар., 1999). У присуству антиоксидативног једињења, плава боја радикалног ABTS катјона прелази у безбојну, што указује на чињеницу да је дошло до хемијске реакције између ова два реактанта при чему се радикални катјон конвертује у неутрални облик. Ова хемијска реакција најчешће се прати спектрофотометријски (Arnao и сар., 2001). Мерење процента неутрализације ABTS*+радикала често се врши применом TEAC теста (*Trolox equivalent antioxidant capacity*), при чему се реактивност ABTS*+радикала упоређује са Trolox-ом, водорастворним аналогом витамина Е (Güçlü и сар., 2006).

FRAP тест. Мерење процента инхибиције редукције Fe³⁺-трипиридилтриазин комплекса врши се применом FRAP теста. Овај тест темељи се на редукцији Fe³⁺ у Fe²⁺ у присуству антиоксиданса. Настали Fe²⁺ у присуству TPTZ реагенса (2,4,6-трис(2-пиридил)-S-триазин) стварају обојени комплекс, који достиже апсорпциони максимум на 593 nm (Benzie и Strain, 1996). Реакција се одвија у киселом медијуму.

ORAC тест. За одређивање капацитета хватања пероксил радикала примењује се ORAC тест, који се базира на мерењу процента инхибиције промене флуоресценције β-фикоеритрина или флуоресцеина у присуству азо-иницијаторних једињења (Priog и сар., 2003). Загревањем азо-иницијатора долази до формирања пероксил радикала, којим се нарушава флуоресцентни молекул (флуоресцеин), што има за последицу губитак флуоресценције. Сматра се да антиоксиданси штите флуоресцентни молекул од оксидативне дегенерације. Током оксидативне дегенерације долази до опадања интензитета флуоресценције, што се обично запажа 35 min након додавања азо-иницијатора (генератора слободних радикала). Један од најчешће употребљаваних генератора слободних радикала је AAPH (2,2'-азобис(2-амидино-пропан) дихидрохлорид).

2.14. Антимикробна активност

У циљу смањења ризика од настанка бактеријских и гљивичних инфекција значајно место заузели су синтетички антибиотици, пеницилин, стрептомицин и

остали. Међутим, последњих година бактеријске инфекције (инфекција респираторног тракта, менингитис, полне болести) су све учестаније, узроковане резистентношћу бактерија на синтетичке антибиотике (Станковић и сар., 2011). Из тог разлога се приликом третмана инфекција повећава доза, што има за последицу појаву бројних нуспојава. Стога је посебна пажња посвећена развоју природног и безбедног начина контроле и заштите људи од бактеријских инфекција. Једињења са јаким антибактеријским и антисептичним својствима, изолована из одговарајућег биљног материјала (невен, коприва, жалфија, нана и др.), данас су заузела значајно место у савременој медицини приликом третмана различитих инфекција. Познато је да и велики број етарских уља поседују антимикуробна својства и да је у многим случајевима ова активност последица присуства различитих класа монотерпена. Антимикуробна активност етарских уља и њихових компонената може варирати од делимичне до потпуне инхибиције раста бактерије, тако да етарска уља испољавају бактериостатичку или бактерицидну активност (Mayaud и сар., 2008; Friedman и сар., 2002).

2.14.1. Методе испитивања антимикуробне активности

Методе испитивања антимикуробне активности могу се поделити на дифузионе и дилуционе методе (Rios и сар., 1998).

Дифузиона метода. Принцип ове методе је да испитивани антимикуробни узорак дифундује у хранљиву подлогу и делује инхибиторно на размножавање микроорганизама (бактерија и гљива) претходно засејаних на ту подлогу. Најчешће примењивана дифузиона метода је диск метода (метода таблете). У том случају користе се дискови или



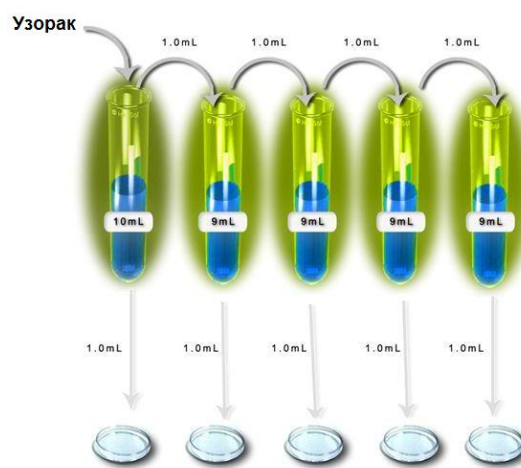
таблете обложени тачно одређеном концентрацијом испитиваног узорка. Хранљива подлога се претходно засеје суспензијом одређене густине чисте културе испитиваног соја (инокулум), а потом се ставе дискови или таблете из којих узорак дифундује у подлогу. Добијени резултат читава се као пречник зоне инхибиције раста микроба након инкубације од 18-24 h на 37 °C. Уколико су сви услови стандардизовани (притисак, температура, рН, време инкубације) онда је пречник зоне инхибиције пропорционалан концентрацији испитиваног антимикуробног узорка. Наиме, ако је засејан микроорганизам осетљив на дејство антимикуробног узорка, он неће порастати у зони његове активности.

На ширину зоне инхибиције могу да утичу следећи фактори:

- особине подлоге,
- величина инокулума,
- фаза размножавања у којој се налази испитивани микроорганизам,
- стабилност антимикробног средства.

Дилуциона метода. Помоћу дилуционе методе одређује се осетљивост изолованих сојева према антимикробним једињењима. Постоје две различите врсте дилуционих метода и то: дилуциона метода у епрувети и агар – дилуциона метода.

Дилуциона метода у епрувети. Метода се заснива на дилуцији (разблаживању) испитиваног антимикробног узорка тако да се све мање концентрације узорка додају епруветама са одговарајућом течном подлогом. Свакој епрувети се додаје једнака количина течне културе испитиваног микробног соја (исти број микроорганизма). Након инкубације 18-24 h на 37 °C резултат се читава на следећи начин: уколико је сој преживео концентрацију антимикробног једињења, у подлози се региструје замућење подлоге, док подлоге у којима је дошло до инхибиције размножавања или смрти испитиваног микроорганизма остају бистре.



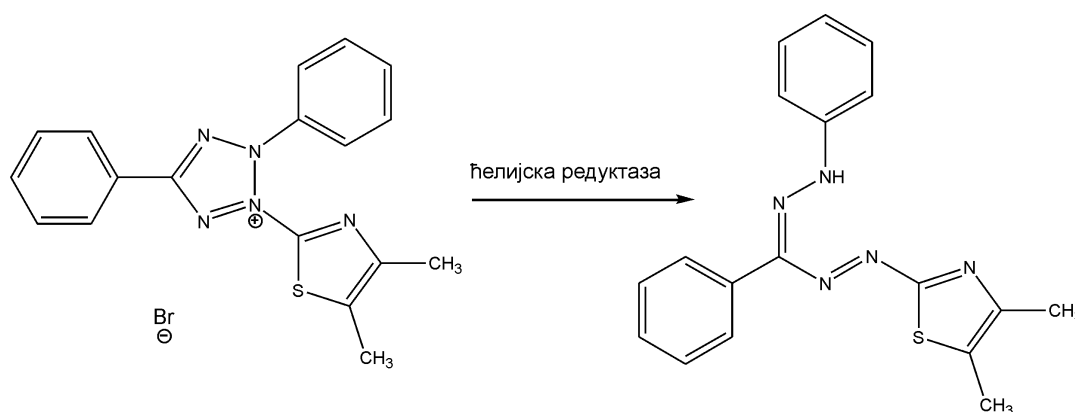
Агар-дилуциона метода. Принцип ове методе је да се одређене количине антимикробног једињења инкорпорирају у чврсту подлогу и засејавају инокулумом одређене густине испитиваних микроорганизама. На овај начин се на истој подлози тестира чак 10-16 различитих сојева микроорганизама. Само оне микробне ћелије које су резистентне на концентрацију антимикробног једињења, које је инкорпорирано у агару, имаће видљив раст.

Упоредјујући обе методе испитивања антимикробне активности неког једињења, дифузионе методе су једноставније за извођење, брже и јефтиније, али су при том дилуционе методе прецизније (Gaudreau и Gilbert, 1997).

2.15. Пролиферативна активност

Разноврсност клиничког испољавања тумора, од споро прогресивних до изразито агресивних облика болести, наметнула је потребу за дефинисањем клиничких и биолошких параметара на основу којих се може предвидети ток болести и одредити начин лечења пацијента. Један од њих је и пролиферативна активност као значајан показатељ биолошког потенцијала малигне ћелије. Испитивање пролиферативне активности може се вршити *in vitro* (на изолованим ћелијским линијама) и *in vivo*, на експерименталним животињама. Најчешће се примењују *in vitro* биолошки тестови за испитивања пролиферативне активности фармаколошки активних принципа, природног или синтетичког порекла и екстраката добијених из одговарајућих биљних материјала. За ове тестове користе се туморске ћелијске линије хуманог порекла (HeLa, LS-174, PC-3, MDA-MB-361, MDA-MB-453) или пореклом од тумора других сисара. Уколико током испитивања, тестирано једињење инхибира раст и дељење ћелија или активира генетски програм за контролисано убијање ћелије у култури (Promega Corporation, 2006; 2007) може се рећи да оно има антипролиферативну активност, тј. цитотоксични (цитотоксични за деобе) ефекат и да се са таквим својством може употребити као потенцијални антитуморски агенс *in vivo* (Lieberman и сар., 2001).

Један од начина за испитивање пролиферативне активности тестираног једињења је примена МТТ теста (Langdon, 2004). МТТ тест (*microculture tetrazolium test*) представља колориметријску методу засновану на редукцији жуте тетразолијумове соли [3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиум бромид] митохондријалном сукцинат дехидрогеназом метаболички активних ћелија, при чему настаје плави формазан (слика 13) (Delhaes и сар., 1999). Одмах након редукције тетразолијумски прстен се отвара и кватернарни амин се конвертује у терцијарни амин. Један од амина се везује за атом водоника.



Слика 13. Основна структура тетразолијумске соли и њена редукција до обојеног формазана

2.16. Екстракција кверцетина и амигдалина и њихова фармаколошка активност

Дуги низ година предмет истраживања била је изолација биоактивних компонената из биљних материјала. Иначе, екстракција представља сепарациону технику издвајања биоактивних компонената из биљних материјала применом одговарајућих селективних растварача по стандардним процедурама. Добијени екстракти представљају релативно сложене смеше и могу да буду у течном или получврстом стању, односно у облику сувог праха. Зависно од тога о каквим се екстрактима ради, они могу да се користе за оралну или спољашњу употребу, као и да се инкорпорирају у одговарајуће дозирне облике (таблете или капсуле). Екстракти садрже смешу многих биоактивних једињења, попут алкалоида, гликозида, терпеноида, флавоноида и лигнана. Да би екстрахована једињења са израженим фармаколошким дејствима могла да се користе као лек, неопходно је екстракт даље фракционисати.

Основни параметри који утичу на квалитет екстракта су полазни биљни материјал, природа растварача, примењени технолошки поступак екстракције и однос биљног материјала и растварача. Приликом одабира оперативних услова неопходно је поседовати претходна искуства о самом поступку екстракције. Од лабораторијског нивоа до пилот постројења, сви примењени технолошки поступци могу се моделовати у циљу успешније производње на индустријском нивоу. Симулација процеса се поред петрохемијске и хемијске индустрије све чешће примењује за биотехнолошке и фитохемијске процесе. Дакле, симулација игра важну улогу у оптимизацији фитохемијских процеса и помаже у развоју напредних процеса. Као резултат симулације, постиже се уштеда у енергији и при том добија максимални принос жељене компоненте.

2.16.1. Изоловање и одређивање кверцетина

У литератури су описане различите методе за екстракцију кверцетина попут ултразвучне (Huang и сар., 2009; Rupasinghe и сар., 2011), микроталасне (Caregi и сар., 2007), чврсто-течне екстракције (Suárez и сар., 1996), течне екстракције под притиском (Zgórka, 2009) и суперкритичне екстракције са угљен диоксидом (Димитриеска-Стојковић и Здравковски, 2003) из различитих биљних материјала (*Bobgunnia madagascariensis* (Adeyemi и сар., 2010), *Coriandrum sativum* (Hadjmohammadi и Sharifi, 2009), *Abutilon indicum* (Rajalakshmi и Senthil, 2009), *Butea frondosa* (Dutta и сар., 2007), *Petasites japonicus* (Matsuura и сар., 2002), *Euonymus alatus* (Zhang и сар., 2009), *Prunus*

armeniaca (Williams и Wender, 1953), *Citrus bergamia succus* (Calabro и сар., 2004а)). За пречишћавање и детекцију екстрахованог кверцетина примењиване су различите аналитичке методе: препаративна TLC (Ligor и сар., 2008), RP-HPLC (Hadjmohammadi и Sharifi, 2009; Rajalakshmi и Senthil, 2009; Димитријеска-Стојковић и Здравковски, 2003; Phani и сар., 2010) MLC (Hadjmohammadi и Nazari, 2010) и GC-MS (Tokuşoğlu и сар., 2003). Према литературном прегледу до сада није развијен поступак изоловања кверцетина у присуству осталих флавоноида из листа зеленог чаја (*Camelliae sinensis folium*). Такође, није сагледан утицај оперативних услова на ефикасност екстракције, док је описана сепарација, карактеризација и квантификација појединих полифенола из зеленог чаја (Finger и сар., 1992). Wang и Helliwell (2001) оптимизовали су услове хидролизе флавонола из лишћа и инфуза зеленог чаја, а применом HPLC методе извршили су његову идентификацију у анализираним узорцима. За раздвајање и идентификацију флавонола, флаван-3-ола и сличних компонената из зеленог и црног чаја развијена је HPLC-MS метода (Del Rio и сар., 2004). Ligor и сар. (2008) применом TLC методе анализирали су узорке екстракта лишћа *Camellia sinensis* L. *Aspalathus linearis*. Horie и Kohata (1998) предложили су капиларну електрофорезу као брзу методу за одређивање флавоноида у зеленом чају. За разлику од HPLC методе, где је време анализе ових једињења око 30 min, време анализе истог узорка капиларном електрофорезом је око 10 min.

2.16.2. Стабилност кверцетина

Поред поступака изоловања, метода идентификације и квантификације кверцетина из биљног материјала, истраживања су била усмерена и на испитивању његове хемијске-стабилности. Разлог томе је присуство три активне функционалне групе у структури кверцетина, које повећавају стабилност делокализацијом електрона и формирањем резонантних структура (Sisa и сар., 2010). Casagrande и сар. (2006) испитивали су функционалну стабилност кверцетина у сировом стању и различитим топикалним формулацијама *in vitro* мерењем антилипопероксидативне активности применом тиобарбитурне киселине. Узорци су чувани 182 дана (6 месеци) на различитим температурама. Добијени резултати током истраживања указују да се топикалне формулације са кверцетином могу користити у превенцији оштећења коже изазваног оксидативним стресом, уколико се чувају на собној температури. Фотохемијска стабилност ове супстанце од суштинског је значаја за његову активност. Фотодеградација овог једињења најчешће се огледа у смањењу ефикасности и појави

нежељених ефеката након апликације лекова који садрже кверцетин (Calabro и сар., 2004б). Из тог разлога, спроведена су бројна истраживања у циљу одређивања стабилности кверцетина као лековите супстанце. Фотостабилност биоактивне компоненте праћена је у раствору (Vicentini и сар., 2007), кремама за сунчање (Scalia и Mezzena, 2010) и микроемулзионим системима (V/U) у којима је инкорпориран кверцетин (Vicentini и сар., 2011). Момић и сар. (2007) проучавали су ефекат UV зрачења на кверцетин при рН 5,00; 7,50 и 10,00. Инкорпорација кверцетина у липозоме представља ефикасну стратегију за повећање његове стабилности приликом употребе у дерматолошким производима (Scalia и Mezzena, 2009). Међутим, у литератури нема података о испитивању фотостабилности кверцетина, као стандарда у чврстом стању. Имајући у виду да се кверцетин може употребити за израду нових антиканцерогених формулација, неопходно је испитати његову фотостабилност у чистом стању у складу са смерницама ICH Q1B регулативе (1996). Такође, у литератури постоје подаци и о испитивању деградације кверцетина услед оксидације, с обзиром да је нашао велику примену као антиоксиданс како у фармацеутским и козметичким производима, тако и у прехранбеним. Makris и Rossiter (2000б) пратили су деградацију кверцетина услед његове оксидације у фосфатном пуферу (рН 8,0 на 97 °C) применом UV-VIS и HPLC методе. Добијени резултати показали су да је кверцетин при датим условима подложен деградацији.

2.16.3. Фармаколошка испитивања кверцетина

Фармаколошка анализа кверцетина и зеленог чаја спроведена је у правцу доказивања њихове антиоксидативне, антимицробне и антипролиферативне активности. Антиоксидативна активност зеленог чаја (Akhavan и сар., 2012), као и корелација између антиоксидативног капацитета и методе екстракције, форме чаја и употребљеног растварача доказана је бројним истраживањима (Rusak и сар., 2008; Lin и сар., 2008). Током испитивања потврђена је и његова антимицробна активност (Cho и сар., 2008). Кверцетин као главни биофлавоноид зеленог чаја, такође показује антиоксидативну (Zhang и сар., 2011), антимицробну, антивиралну и друге активности (Walle, 2004). Pinelo и сар. (2004) пратили су антиоксидативну активност за време деградације кверцетина у различитим растварачима и на различитим температурама. Lamson и Brignall (2000) у свом ревијалном раду приказали су резултате *in vitro* испитивања антипролиферативне активности кверцетина (табела 5).

Табела 5. *In vivo* студије кверцетина

малигне ћелијске линије	IC ₅₀
бешика	Нису дати
дојка (MDA-MB-435)	55 µM, LC ₅₀ = 26 µM
дојка (MDA-MB-468)	21 µM
дојка (MDA-MB-435)	31 µM
дојка (MCF-7)	4,9 µM
дојка (MCF-7)	15 µM
дебело црево (HT29 и Сасо-2)	45-50 µM
дебело црево (HT29 и Сасо-2)	30-40 µM
желудац (HGC-27, NUGC-2, MKN-7 и MKN-28)	32-55 µM
глава и врат (HTB43)	значајна инхибиција изнад 100 µM
глава и врат (HTB43 и CCL135)	значајна инхибиција изнад 100 µM
леукемија (14 AML линија и 4 ALL линија)	средња IC ₅₀ = 2 µM
леукемија (CML линија K562)	59 µM
плућа	0,45 - 2,28 µM
меланом (MNT1, M10, M14)	7 nM, 20 nM, 1-10 µM
јајник (OVCA 433)	10 µM

2.16.4. Изоловање и одређивање амигдалина

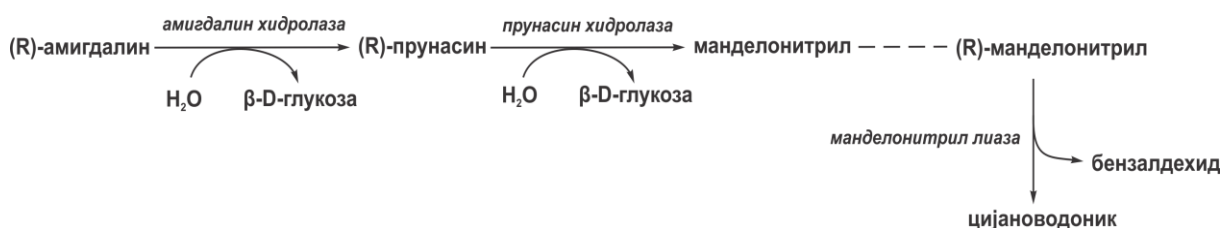
За успешно изоловање и пречишћавање амигдалина из природних извора (семе кајсије, брескве, јабуке и горког бадема) описано је неколико метода (Thagaard, 1996; Hwang и сар., 2002б; Kwon и сар., 2010). Изоловање амигдалина најчешће је вршено поступком чврсто-течне екстракције (лужењем) уз коришћење различитих органских растварача (метанол, етанол итд.) и воде као екстрагенса, а његова детекција је извршена применом хроматографских метода (HPLC, TLC, GC-MS) (Bolarinwa и сар., 2014; Valko, 1982). Познато је да у воденој средини амигдалин прелази у свој епимерни облик неоамигдалин (Hwang и сар., 2002б). Из тог разлога развијене су специфичне методе за анализу епимера амигдалина у природним производима (Kwon и сар., 2010; Hwang и сар., 2002б). Поред семена кајсије (*Prunus armeniaca*) и црне вишње (*Prunus serotina*), присуство амигдалина потврђено је и у семену шљиве (око 6%) (Voldřich и Kyzlink, 1992). Према литературном прегледу до сада није развијен поступак изоловања и пречишћавања амигдалина из семена шљиве (*Pruni domesticae*

semen) и метода његове идентификације у овом природном извору. Такође, није испитан утицај оперативних услова екстракције на укупан принос амигдалина.

2.16.5. Стабилност амигдалина

У својој структури амигдалин садржи ароматичне хромофоре и цијанидну групу, које имају способност апсорпције електромагнетног зрачења у опсегу таласних дужина од 250 до 300 nm (UV област). Излагањем овог једињења дејству светлости може доћи до значајних промена у физичко-хемијским својствима, што има за последицу појаву нежељених реакција. Међутим, у литератури нису нађени подаци о испитивању фотостабилности амигдалина, као стандардне супстанце. Имајући у виду да је амигдалин подложен епимеризацији, испитиван је утицај различитих фактора на степен конверзије амигдалина у његов неактиван епимерни облик – неоамигдалин (Hwang и сар., 2002б). Нађено је да су степени конверзије амигдалина на температури 60–70 °C веома мали, али дужим стајањем при већим температурама он знатно расте. Стајањем 120 min у кључалој води од 30 до 50% амигдалина прелази у неоамигдалин. Такође, испитиван је и утицај киселина на степен конверзије амигдалина. Потврђено је да у воденом раствору лимунске и аскорбинске киселине долази до смањења степена конверзије амигдалина.

Последњих година, интензивирани су истраживања микробиолошке деградације амигдалина, која указују да настали деградациони производи показују антитуморну активност. Овим истраживањима започет је пут у правцу развоја нових антитуморских лекова. На слици 14 приказана је шема хидролитичке деградације амигдалина применом ензима амигдалин хидролазе. Током деградације долази до формирања одговарајућих метаболита, док се као крајњи производ деградације добија цијановодонична киселина, која селективно убија ћелије тумора.



Слика 14. Реакције хидролитичке деградације амигдалина

Деградација амигдалина вршена је и екстрацелуларним ензимима из гљиве *Aspergillus niger* (Chang и Zhang, 2012). Ова каталитичка реакција извођена је у току 4 h

на 37 °C, након чега се амидгалин деградира на четири производа. Добијени производи су након екстракције пречишћени применом колонске хроматографије. Идентификација насталих производа извршена је применом HPLC, ¹H NMR, ¹³C NMR и MS метода. Међу производима дефинисани су манделонитрил, прунасин, бензалдехид и фенил-(3,4,5-трихидрокси-6-метил-тетрахидропиран-2-илокси)-ацетонитрил (PTMT), који представља нови хидроксилни дериват прунасина. Фармаколошким испитивањима нађено је да је након 11 дана третмана са 10 mg kg⁻¹ PTMT значајно спречен раст S-18 ћелија тумора.

Гљивице *Mucor circinelloides* LU M40 и *Penicillium aurantiogriseum* P35 производе ензим β-D-глюкозидазу, који има способност да хидролизује амидгалин (Brimer и сар., 1998). Реакција хидролизе одиграва се у две фазе. У првој фази хидролиза амидгалина до прунасина одиграва се веома брзо, док се друга фаза, у којој се прунасин хидролизује до HCN одиграва доста спорије. Nout и сар. (1995) тестирали су *in situ* могућност разлагања амидгалина изолованог из семена кајсије (*Prunus armeniaca*) одређеним филаментозним гљивама (*Mucor circinelloides*, *Penicillium nalgiovense*) и квасцима (*Hanseniaspora valbyensis*, *Endomyces fibuliger*). Након испитивања потврђено је да квасац *Endomyces fibuliger* најбоље разлаже амидгалин и најбоље врши његову детоксикацију у опсегу од 30 до 1 μmol CN g⁻¹ суве материје при инкубацији од 48 h на 27 °C.

2.16.6. Фармаколошка испитивања амидгалина

Фармаколошка испитивања амидгалина углавном се односе на екстраховани амидгалин и то најчешће из семена кајсије (*Prunus armeniaca*) у коме је присутан 3–4% од укупне масе (Frohne и Pfander, 2005). Hwang и сар. (2008) су предклиничким испитивањима доказали да амидгалин из овог биљног материјала показује антиинфламаторну активност. Поред антиинфламаторне активности код амидгалина екстрахованог из *Prunus armeniaca* потврђена је и антибактеријска активност (Bruneton, 1999). У кинеској традиционалној медицини познато је да семе *Persicae*, које као главну компоненту садржи амидгалин, може да се користи у третману симптома атеросклерозе (Baroni и сар., 2005). Имајући то у виду, Jiagang и сар. (2011) потврдили су антиатеросклеротични ефекат амидгалина *in vivo*, који се огледа у индукцији регулаторних T ћелија које имају критичну улогу у атеросклерози. Недавно, Khallouki и сар. (2012) испитивали су фитохемијски састав и антиоксидативни капацитет семена шљиве Мирабеле (*Rosaceae*) са подручја Француске, Немачке и Луксембурга.

Применом HPLC–MS методе доказано је да се у уљу семена шљиве амигдалин налази око 90% у односу на остала фенолна једињења. У литератури има података о испитивању инхибиторне активности стандарда и изолата амигдалина агар дифузионом методом (Sagdic и сар., 2003). Током примене DPPH, FRAP и ORAC тестова амигдалин из овог биљног материјала није показао антиоксидативну активност. Познато је да је амигдалин врло ефикасан приликом “хватања” хидроксилних радикала. Ово својство омогућило је примену амигдалина као суплемента у програму против старења хуманог организма, па се из тог разлога сматра да поседује и *anti-age* ефекат (South, 2000). Крајем 70-их и почетком 80-их година 20. века потврђено је да амигдалин поред напред наведених ефеката, показује и антитуморску активност. Ово откриће привукло је пажњу и усмерило даља истраживања у циљу испитивања токсичности ослобођене цијано групе након апликације амигдалина, проучавања механизма деловања амигдалина на ћелије канцера и идентификацији његових метаболита у плазми. Jiagang и сар. (2011) активирали су амигдалин β -D-глюкозидазом и пратили његово деловање на Нер G2 пролиферативне ћелије. Својим деловањем амигдалин је спречио раст ових ћелија, чиме је потврђено да активирањем амигдалина он још јаче испољава своју антитуморску активност. Екстракт *Persicae semen*, који као главну биоактивну компоненту садржи амигдалин, испитиван је на пролиферативним ћелијама леукемије (HL-60). Утврђено је да он показује цитотоксично деловање на HL-60 ћелије са IC_{50} од $6,4 \text{ mg cm}^{-3}$ у присуству 250 nM β -D-глюкозидазе (Hee-Young и сар., 2003). Међутим, до данашњег дана још увек нема података о фармаколошким испитивањима (антимикробна, антиоксидативна, антитуморска активност) амигдалина изолованог из семена шљиве (*Pruni domesticae semen*).

3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО

3.1. Реагенси

Стандардна супстанца амигдалина чистоће 97% (Sigma-Aldrich, Минхен, Немачка), стандардна супстанца кверцетина (Merck Chemicals Ltd., Нотингем, Велика Британија), стандардна супстанца рутина, алуминијум хлорид, калијум-ацетат, 2,2-дифенил-1-пикрилхидразил (DPPH), прашкаста подлога RPMI 1640, диметилсулфоксид (DMSO), натријумдодецилсулфат (SDS), 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиум бромид (МТТ), L-глутамин, стрептомицин, пеницилин (Sigma Chemical Company, Свети Луис, САД), фетални говеђи серум (FBS) (Gibco BRL, Њујорк, САД), метанол HPLC чистоће, метанол LC-MS чистоће (Avantor Performance Materials, Inc., Девентер, Холандија), мравља киселина чистоће 99% (Carlo Erba Reagents, Вал де Реј, Француска), 96% (v/v) етанол (Zorka Pharma, Шабац, Србија), апсолутни етанол (Алкалоид АД, Скопље, Македонија), диетил-етар ($\geq 99\%$) (VWR International, Лутерворт, Велика Британија).

3.2. Биљни материјал

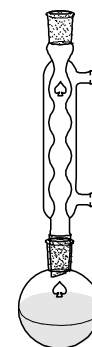
Зелени чај (*Camelliae sinensis*) набављен је од Алева АД (Нови Кнежевац, Србија). Биљни материјал је осушен до садржаја воде од 6% стајањем на тамном месту при собној температури. У електричном млину самлевен је до финог праха са просечном величином честица 0,4 mm.



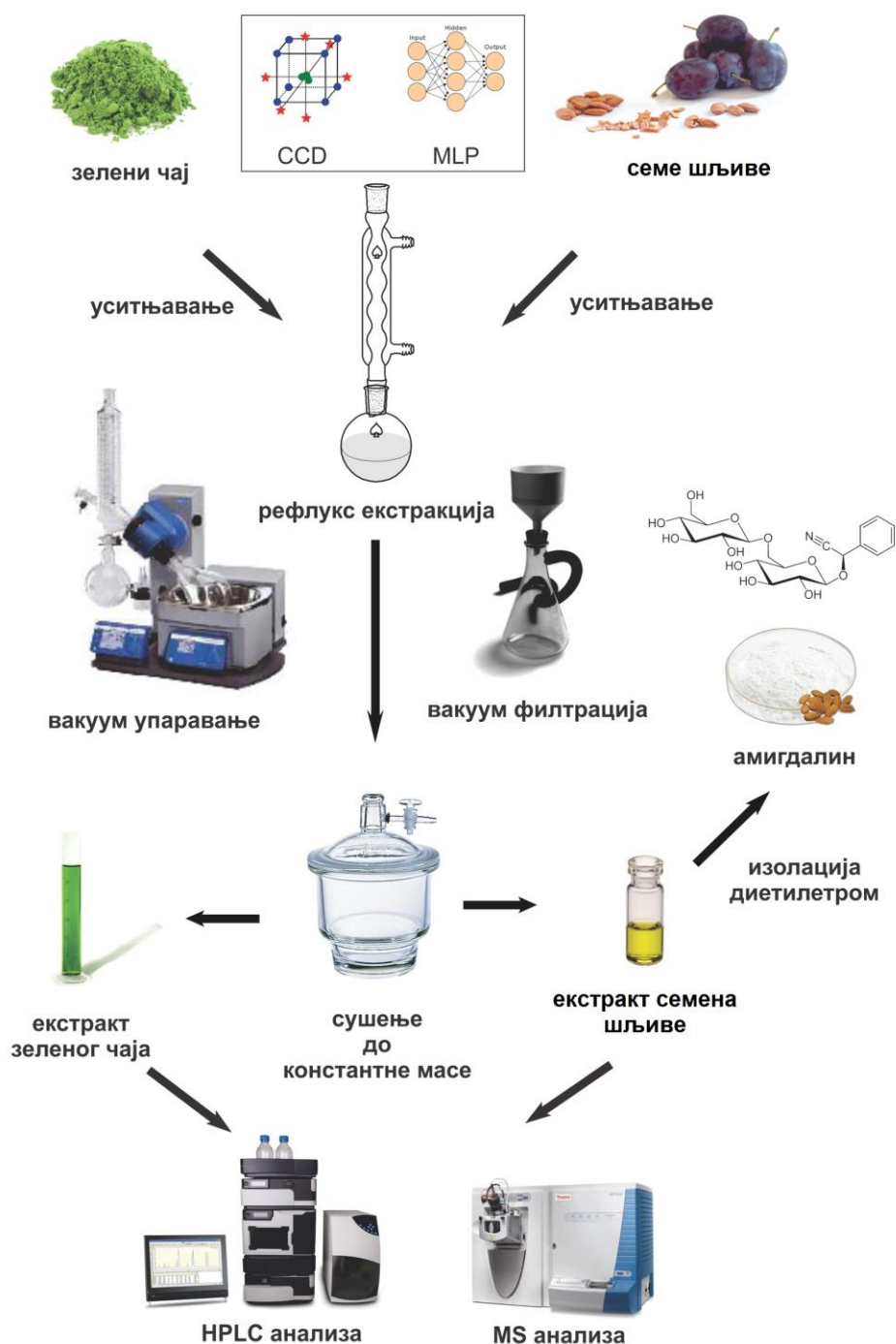
Свеже семе шљиве (*Pruni domesticae semen*) купљено је од ПД Племић-комерц (Осечина, Србија) и осушено на тамном месту до 6% садржаја воде. Биљни материјал самлевен је у електричном млину у циљу добијања финог праха са просечном величином честица 0,3 mm.

3.3. Поступак екстракције кверцетина и укупних флавоноида

Уситњен биљни материјал (2 g) пренешен је у балон од 100 cm³ и преливен са тачно дефинисаном запремином етанола. Екстракција је вршена на воденом купатилу уз рефлукс у току различитих времена екстракције при температури кључања растварача. Екстракт је одвојен од остатака биљне сировине вакуум-филтрацијом и упараван под сниженим притиском на вакуум



упаривачу при температури 50 °C до полуврсте конзистенције. Добијени концентровани екстракти сушени су у ексикатору до константне масе. Овако припремљени суви екстракт подвргаван је даљем квалитативном и квантитативном анализирању применом различитих метода. Шематски приказ свих технолошких операција примењених у циљу добијања биоактивних компонената из поменутог биљног материјала дате су на слици 15.



Слика 15. Шематски приказ технолошких операција приликом добијања биоактивних принципа из биљних материјала

3.4. Поступак екстракције и изолације амигдалина

Биљни материјал (2 g) у балон са округлим дном (100 cm³) преливен је са тачно одређеном запремином етанола. У циљу испитивања утицаја процесних параметара на принос амигдалина из семена шљиве, вариране су вредности посматраних параметара у складу са централним композитним дизајном. Екстракције су извођене уз рефлукс на различитим температурама. Температура система током екстракције одржавана је константном помоћу воденог купатила. Након екстракције, екстракт је одвајан од чврстог матрикса филтрацијом на Бихнеровом левку, а затим упараван до сува на вакуум упаривачу при температури 50 °С. Екстракти су потом држани у ексикатору све до њиховог потпуног сушења, односно до константне масе. Амигдалин је из сировог етанолног екстракта, добијеног при оптималним условима екстракције, исталожен након додатка диетил-етра (10 cm³). Масне компоненте екстракта у потпуности су растворене у диетил-етру. Добијене две фазе раздвојене су једна од друге декантовањем. Чврста фаза је затим сушена на 30 °С у циљу уклањања резидуалних растварача. Степен чистоће добијеног амигдалина одређен је у односу на расположиви стандард амигдалина применом HPLC методе.

3.5. ИС анализа

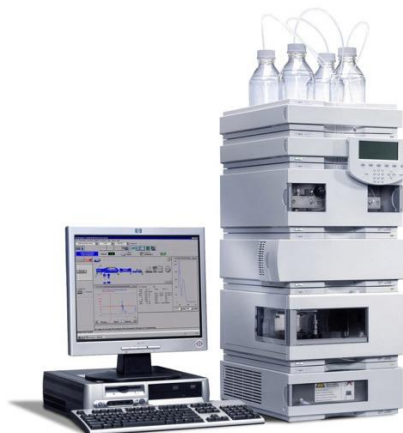
У циљу структурне карактеризације изолованог амигдалина примењена је ИС спектроскопија. Снимања су вршена на Bomem MB-100 (Hartmann&Braun, Канада) FTIR спектрометру (Технолошки факултет, Лесковац) са стандардним DTGS/KBr детектором. Скенирање је спроведено у опсегу таласних бројева од 4000 до 400 cm⁻¹ при резолуцији 2 cm⁻¹. Калијум бромидна диск техника коришћена је код припремања узорка. Количина узорка од 1 mg хомогенизована је са 150 mg спектроскопски чистог калијум бромида. Чврста смеша подвргавана је вакуумирању и пресовању под притиском око 200 МПа, при чему су направљене танке пропусне пастиле. Спектри узорка снимани су непосредно после припремања пастиле.



3.6. HPLC анализа кверцетина

HPLC анализа екстракта зеленог чаја вршена је на Agilent 1100-Series HPLC систему, који садржи Agilent 1100-Series DAD детектор и Agilent 1100-Series ауто-

семплер (Технолошки факултет, Лесковац). Обрада добијених резултата вршена је применом Agilent HPLC Data Analysis софтвера. У току рада вршено је изократско еулирање узорка при протоку мобилне фазе $1 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$. Мобилна фаза (метанол) филтрирана је кроз филтер величине пора $0,45 \text{ }\mu\text{m}$ (Econofilters, Agilent Technologies, Немачка). Инјектирана запремина узорка била је $20 \text{ }\mu\text{l}$, а коришћена таласна дужина 370 nm . Хроматографско раздвајање вршено је на температури $35 \text{ }^\circ\text{C}$ применом ZORBAX Eclipse XDB- C_{18} колоне ($4,6 \times 250 \text{ mm}$, $5 \text{ }\mu\text{m}$) Agilent Technologies, САД.



3.6.1. Припрема стандардних раствора

У одмерним судовима (25 cm^3) припремани су раствори различитих концентрација стандарног раствора кверцетина и допуњавани мобилном фазом до мерне ознаке. За конструисање калибрационе криве припремљена су пет узорка кверцетина у опсегу концентрација од 10 до $100 \text{ }\mu\text{g cm}^{-3}$.

3.6.2. Валидација методе

Валидација је фаза у развоју нових аналитичких метода. У тренутку када се аналитичка метода покаже добром за рутинску употребу потребно је испитати да ли задовољава постављене захтеве корисника за анализом одређене супстанце у облику стандарда или неком другом испитиваном узорку (биљном екстракту) са одређеном тачношћу, прецизношћу, границом детекције итд. Валидација аналитичких метода се тада спроводи са циљем осигурања квалитета, односно управљања квалитетом. Валидација развијене RP-HPLC методе за одређивање кверцетина у екстракту зеленог чаја вршена је у складу са смерницима ICH Q2(R1) регулативе (2005).

Линеарност. Серија стандардних раствора кверцетина у опсегу концентрација $10 - 100 \text{ }\mu\text{g cm}^{-3}$, припремљена је у циљу одређивања линеарности методе. Параметри линеарне зависности између површине пика и концентрације кверцетина одређени су применом методе најмањих квадрата.

Тачност. За процену тачности методе припремљена су три стандардна раствора кверцетина различитих концентрација: ниска (LC, 80%), средња (IC, 100%) и висока (HC, 120%) концентрација ($40, 50$ и $60 \text{ }\mu\text{g cm}^{-3}$) ($n = 10$). Тачност методе процењена је на основу израчунате %recovery вредности, чија је теоријска вредност износи 100% . У

циљу додатне провере тачности методе, примењена је метода стандардног додатка. У том случају различите концентрације раствора кверцетина (5, 10 и 15 $\mu\text{g cm}^{-3}$) додате су раствору кверцетина тачно одређене концентрације (50 $\mu\text{g cm}^{-3}$).

Прецизност. Прецизност развијене HPLC методе процењена је кроз три различита нивоа и то: поновљивости, средње прецизности и репродуктивности. За испитивање поновљивости и средње прецизности коришћени су раствори истих концентрација, као и у случају испитивања тачности методе. Репродуктивност методе тестирана је на другом HPLC Agilent 1100-Series систему (Здравље Актавис, Лесковац) применом истих раствора као и у претходном случају. Предложена метода је задовољавајуће прецизности уколико су вредности RSD приликом тестирања поновљивости и средње прецизности мање од 1%, односно 3% приликом тестирања репродуктивности.

Граница детекције (LOD) и квантификације (LOQ). У циљу одређивања најмање количине анализата (кверцетина) у испитиваном узорку, одређене су вредности границе детекције и квантификације. Њихова вредност рачуна се применом једначина 2 и 3, респективно (Trivedi и сар., 2012; Sarkar и сар., 2006; Ermer, 2001; Thomsen и сар., 2003):

$$LOD = 3,3 \frac{S_0}{b} \quad (2)$$

$$LOQ = 10 \frac{S_0}{b} \quad (3)$$

где је S_0 стандардна девијација калибрационе криве, а b њен нагиб.

Робусност методе. Овај параметар представља отпорност аналитичког поступка на мале намерне промене параметара методе. Код испитивања робусности мењају се радни параметри унутар реалних граница, при чему се прати квантитативна промена резултата. Уколико је утицај промене параметра методе унутар спецификације методе, каже се да је параметар у подручју робусности методе (ICH, 2005).

Ради испитивања робусности предложене RP-HPLC методе, примењена је методологија експерименталног дизајна (Sanz и сар., 2002; Hund и сар., 2002). У том случају експериментални услови рада (температура колоне и проток мобилне фазе) варирану су у одређеним границама. Међусобна интеракција између процесних променљивих и њихов утицај на посматрани одговор (садржај кверцетина) испитана је применом пуног факторијалног дизајна. Укупно је изведено девет експеримената у

складу са изабраним експерименталним дизајном. Посматране температуре колоне биле су 30, 35 и 40 °C, односно проток мобилне фазе 0,8; 1,0 и 1,2 cm³ min⁻¹. Софтвер Statistica 8.0 (StatSoft Inc., Тулса, САД) коришћен је за генерисање експерименталног дизајна, статистичку анализу и израду одговарајућих регресионих модела.

3.6.3. Припрема узорка екстракта кверцетина за HPLC анализу

Тачно одмерена количина сувог екстракта 125 mg пренешена је у одмерни суд од 10 cm³ и преливена мобилном фазом до мерне ознаке. Након 5 min сонификације, раствор (1 cm³) је квантитативно пренешен у суд од 10 cm³ и разблажен мобилном фазом. Узорак је профилиран кроз 0,45 μm целулозни мембрански филтер (Econofilters, Agilent Technologies, Немачка). Аликвот од 20 μl инјектиран је у HPLC систем. Идентификација кверцетина у екстракту зеленог чаја вршена је на основу поређења ретенционих времена и UV спектра са стандардом кверцетина.

3.7. HPLC анализа амигдалина

За анализу амигдалина у биљном екстракту семена шљиве примењена је развијена и валидирана HPLC метода. Анализа је вршена применом Agilent 1100-Series HPLC система, који садржи Agilent 1200-Series DAD детектор и Agilent 1200-Series ауто-семплер (Технолошки факултет, Лесковац). У току рада вршено је изократско елуирање узорка, при протоку мобилне фазе 0,9 cm³ min⁻¹. Мобилна фаза састава вода:ацетонитрил (25:75 v/v), претходно је профилирана кроз филтер величине пора 0,45 μm (Econofilters, Agilent Technologies, Немачка). Инјектирана запремина узорка била је 20 μl, а таласна дужина детекције амигдалина 215 nm. Хроматографско раздвајање вршено је на собној температури применом SUPELCO Analytical HS-C18 колоне (4,6×250 mm, 5 μm).

Валидација развијене методе вршена је у складу са ICH Q2(R1) регулативом (2005). За процену линеарности методе коришћени су исти испитивани узорци, као и у случају конструисања калибрационе криве. Линеарност методе процењена је применом методе најмањих квадрата.

Тачност предложене методе процењена је применом стандардних раствора амигдалина различитих концентрација: ниска (LC, 80%), средња (IC, 100%) и висока (HC, 120%) концентрација (n=10). У циљу додатне провере тачности методе примењена је и метода стандардног додатка, која подразумева додаток различитих

концентрација амигдалина (10, 20 и 30 $\mu\text{g cm}^{-3}$) у раствор познате концентрације (50 $\mu\text{g cm}^{-3}$). Процент *recovery* додатог амигдалина рачуна се према једначини 4:

$$\%recovery = \frac{C_t - C_s}{C_a} \times 100 \quad (4)$$

где је: C_t – укупна концентрација амигдалина након додатка стандарда, C_s – концентрација амигдалина у узорку, C_a – концентрација додатог амигдалина.

Прецизност предложене HPLC методе процењена је кроз три различита нивоа. За испитивање поновљивости и средње прецизности коришћени су раствори истих концентрација, као за случај испитивања тачности методе. Репродуктивност методе тестирана је на другом HPLC Agilent 1100-Series систему (Здравље Актавис, Лесковац) употребом претходно коришћених раствора. Граница детекције (LOD) и квантификације (LOQ) израчунавана је применом једначина 2 и 3.

Ради испитивања робусности методе, посматран је утицај брзине протока мобилне фазе на резолуцију пика. Проток је мењан за 0,2 јединице у интервалу 0,7 – 1,1 $\text{cm}^3 \text{min}^{-1}$, док је састав мобилне фазе у том случају остао непромењен. Утицај температуре колоне на резолуцију пика испитиван је у опсегу 20 – 30 °C. Такође, у овом случају је за испитивање робусности методе примењен 3^2 пуни факторијални дизајн.

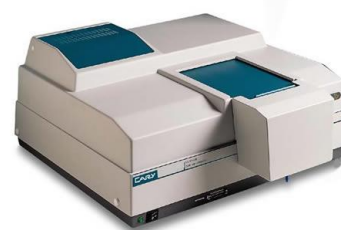
3.7.1. Припрема узорка екстракта семена шљиве за HPLC анализу

Суви екстракт (125 mg) квантитативно се пренесе у одмерни суд од 10 cm^3 и допуни мобилном фазом до мерне ознаке. Узорак се сонификује 5 min, а затим раствор (1 cm^3) квантитативно пренесе у одмерни суд од 10 cm^3 и разблажи мобилном фазом. Узорак се профилира кроз 0,45 μm целулозни мембрански филтер (Econofilters, Agilent Technologies, Немачка) и 20 μl инјектира у HPLC систем. Идентификација амигдалина у екстракту семена шљиве вршена је упоређивањем ретенционих времена и UV спектра са стандардом амигдалина.

3.8. Спектрофотометријска метода за одређивање укупних флавоноида

За праћење садржаја укупних флавоноида у екстрактима зеленог чаја примењена је спектрофотометријска метода са алуминијум-хлоридом, која представља модификован поступак *Woisky*-а и *Salatino*-а (Chang и сар., 2002). Стандард рутина искоришћен је за конструисање калибрационе криве на основу које је одређиван

садржај флавоноида. Основни раствор направљен је растварањем 10 mg рутина у 80% (v/v) етанолу, од кога је припремљена серија раствора у опсегу концентрација од 5 до 100 $\mu\text{g cm}^{-3}$. Разблажени раствори стандарда мешани су са 96% (v/v) раствором етанола (1,5 cm^3), 10% раствором алуминијум-хлорида (0,1 cm^3), 1 mol dm^{-3} раствором калијум-ацетата (0,1 cm^3) и дестилованом водом (2,8 cm^3). Апсорбанција реакционе смеше мерена је на 415 nm, након инкубације од 30 min на собној температури. Сва снимања вршена су на апарату Varian Cary-100 Conc. За снимање узорка коришћене су кварцне кивете 1×1 cm. У узорку слепе пробе уместо 10% раствора алуминијум хлорида додата је еквивалентна количина дестиловане воде.



Након прављења калибрационе криве, раствори екстракта зеленог чаја припремљени су за снимање на спектрофотометру. За грађење алуминијум хлоридних комплекса са флавоноидима из зеленог чаја узимано је по 0,5 cm^3 екстракта раствореног у етанолу.

3.9. ESI-MS/MS анализа

У циљу даљег квалитативног дефинисања добијених екстракта зеленог чаја и семена шљиве при оптималним условима примењена је метода електрон спреј јонизације у комбинацији са масеном спектрометријом. Из екстракта семена шљиве претходно је изолован амигдалин, и као такав подвргнут је јонизацији. Снимања су вршена на MS спектрометру са јонском замком (Thermo Scientific LTQ XL Linear Ion Trap Mass Spectrometer) на Технолошком факултету у Лесковцу. Захваљујући карактеристикама овог уређаја било је могуће идентификовати компоненте у екстрактима, без њиховог претходног HPLC раздвајања, на основу литературних података о присутности компонената у анализираним екстрактима зеленог чаја (Del Rio и сар., 2004) и семена шљиве (Khallouki и сар., 2012). Након јонизације екстракта, молекулски јони жељених компонената изолованих у аналајзеру третирани су одговарајућим порцијама колизионих енергија у циљу добијања њихових MS² спектра. Масени спектри снимани су у негативном и позитивном јонизационом моду у зависности од природе саме анализиране супстанце. Примењени услови анализе били су: напон јонског извора



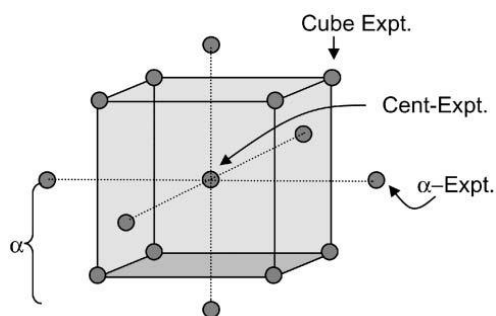
4,95 kV, јонска струја 2,61 μA , температура капиларе 275 $^{\circ}\text{C}$, напон капиларе -50 V, притисак у омотачу 137,14 kPa и притисак помоћног гаса 13,93 kPa. MS методе подешене су употребом стандарда кверцетина приликом анализе екстракта зеленог чаја и стандарда амигдалина код анализе екстракта семена шљиве. За прикупљање и анализу података коришћен је софтвер Xcalibur. Узорци су јонизовани помоћу електронспреј (ESI) технике.

3.9.1. Припрема узорка за MS анализу

Основни раствори стандарда амигдалина и кверцетина, изолованог амигдалина, екстракта зеленог чаја и семена шљиве направљени су растварањем по 25 mg узорка у 25 cm^3 метанола. Након тога, радни раствори припремљени су разблаживањем основног раствора до концентрације 3 $\mu\text{g cm}^{-3}$ и уз додатак мравље киселине. Тако припремљени раствори инјектирани су у MS спектрометар.

3.10. Експериментални дизајн

За процењивање значајности процесних променљивих најпре је коришћен скрининг дизајн, чији је циљ да се са малим бројем експеримената добију релевантни подаци. Идентификоване статистички значајне променљиве изабране су и потом даље оптимизоване применом технике CCD. Овим моделом испитана је интеракција између независно променљивих величина. На слици 16 приказан је изглед експерименталног поља централног композитног дизајна са три променљиве (Montgomery, 2008).



Слика 16. Централни композитни дизајн са три променљиве

Дизајн се састоји од тачака факторијалног дизајна, аксијалних тачака и централних тачака. Код факторијалног дизајна, свака променљива се проучава на два нивоа. Централна тачка представља средње вредности коришћених променљивих факторијалног дизајна. Аксијалне тачке идентичне су централној тачки са том разликом што вредност једног фактора варира изнад и испод средње вредности и то

обично ван њиховог опсега. Вредности кодираних нивоа независно променљивих, дефинисаних код екстракције кверцетина и укупних флавоноида из листа зеленог чаја, приказане су у табели 6, односно у табели 7 за екстракцију амигдалина из семена шљиве. У случају моделовања екстракције биоактивних компонената из листа зеленог чаја, вредност α износила је 1,68 што одговара ротабилном дизајну, док је у случају екстракције амигдалина била 2.

Променљиве x_i кодирани су као X_i на основу једначине 5:

$$X_i = (x_i - x_o) / \Delta x_i \quad (5)$$

где је, X_i – кодирана вредност (- α , -1, 0, +1, + α) независно променљиве величине, x_i – одговарајућа стварна вредност, x_o – права вредност у централној тачки, Δx_i - корак промене вредности.

Табела 6. Нивои независно променљивих величина код екстракција биоактивних компонената из листа зеленог чаја

независно променљиве	некод.	код.	вредности кодираних нивоа				
			-1,68	-1	0	+1	+1,68
време, min	τ	X_1	5,0	16,1	32,5	48,9	60,0
концентрација етанола, % (v/v)	C_e	X_2	20,0	36,2	60,0	83,8	100,0
солвомодул, m/v	ω	X_3	1:10	1:16,1	1:25	1:33,9	1:40

Табела 7. Нивои независно променљивих величина код екстракције амигдалина из семена шљиве

независно променљиве	некод.	код.	вредности кодираних нивоа				
			-2	-1	0	+1	+2
време, min	τ	X_1	10	37,5	65	92,5	120
концентрација етанола, %	C_e	X_2	20	40	60	80	100
солвомодул, m/v	ω	X_3	1:5	1:10	1:15	1:20	1:25
температура, °C	t	X_4	22	36	50	64	78

Укупан број експеримената код овог дизајна одређује се помоћу следеће формуле: $2^f + 2f + C$, где је f број фактора, а C број централних тачака. У случају екстракције кверцетина и укупних флавоноида из листа зеленог чаја, вредности f и C

износиле су 3, односно 2. Посматрано време екстракције било је у рангу 5–65 min, односно концентрација етанола 20–100 % (v/v) и однос биљне сировине и растварача 1:10–1:40 (m/v).

За случај екстракције амигдалина из семена шљиве урађено је укупно 30 експеримената. Број анализираних фактора је 4, док је број централних тачака 6. Посматрано време екстракције било је у опсегу 10–120 min, односно концентрација етанола 20–100% (v/v), солвомодул 1:5–1:25 (m/v) и температура екстракције 22–78 °C. За моделовање и оптимизовања поступака екстракције биоактивних компонената из биљних материјала коришћен је софтвер Statistica 8.0 (StatSoft Inc., Тулса, САД).

У софтверу Statistica 8.0 (StatSoft Inc., Тулса, САД) постоје четири различита ефекта, који могу да се искористе за апроксимацију математичких модела. Применом ових ефеката могуће је моделовати поступак на различите начине. У овом раду поступци екстракције биоактивних компонената из биљних материјала описани су полиномном једначином другог реда. Општа једначина полиномног модела другог реда представља се на следећи начин (једначина 6):

$$Y = a_0 + a_1x_1 + a_2x_2 + a_3x_3 + a_{11}x_1^2 + a_{22}x_2^2 + a_{33}x_3^2 + a_{12}x_1x_2 + a_{13}x_1x_3 + a_{23}x_2x_3 \quad (6)$$

где су: x_1, x_2, x_3 – независне променљиве, a_0 - одсечак, док су $a_1, a_2, a_3, a_{11}, a_{22}, a_{33}, a_{12}, a_{13}, a_{23}$ – регресиони коефицијенти, Y – одговор функције. Коефицијенти полиномног модела другог реда одређују се помоћу једначине најмањих квадрата.

3.11. Вештачке неуронске мреже

Тренирање, тестирање и валидација неуронских мрежа вршена је истим софтверским пакетом као и у случају примене CCD. Код неуронских мрежа за екстракцију биоактивних компонената из листа зеленог чаја као улазне променљиве посматране су време екстракције, концентрација етанола и солвомодул, док је принос кверцетина, односно принос укупних флавоноида искоришћен као излазна променљива. У случају екстракције амигдалина, време екстракције, концентрација етанола, солвомодул и температура екстракције узете су као улазне променљиве код тренирања неуронских мрежа, док је принос амигдалина дефинисан као излазна променљива. Експерименти у складу са CCD моделом искоришћени су за тренирање неуронских мрежа. Због већег броја понављања централних тачака, неопходно је било усредњити њихову вредност приноса екстракције и као такву искористи је у процесу тренирања. Како неуронске мреже захтевају већи број експеримената за тренирање,

тестирање и валидацију, неопходно је било урадити додатни сет експеримената. Укупан број извршених експеримената за екстракцију биоактивних компонената из листа зеленог чаја био је 33, а за екстракцију амигдалина 35. У оба случаја, око 70% од укупног броја експеримената искоришћено је за тренирање мрежа, односно по 15% за тестирање и валидацију.

У овом раду за моделовање поступака екстракције примењен је MLP (вишеслојни перцептрон) модел. Код овог модела, различите активационе функције (линеарна, логистичка, хиперболично-тангентна и експоненцијална функција) биле су укључене у процесу тренирања неуронских мрежа. Тренирање MLP мреже обично се постиже коришћењем алгорита повратне пропагације, који укључује две фазе (Werbos, 1990; Rumelhart и сар., 2002). Прва фаза представља пропагацију улазног сигнала кроз мрежу и завршава се рачунањем сигнала грешке. За време друге фазе, сигнал грешке простире се у повратном правцу. Ова фаза је значајна, зато што је циљ да се минимизује грешка у статистичком смислу. Иначе, тренирање се посматра као проблем фитовања криве у вишедимензионалном простору (Lowe и Broomhead, 1988; Poggio и Girosi, 1990).

Вредности грешака и коефицијената корелације искоришћени су за поређење перформанси CCD и MLP модела. Као мера грешке процеса тренирања и тестирања мреже коришћена је вредност квадратног корена средње квадратне грешке (*RMSE*). Вредност се израчунава применом следеће формуле (једначина 7):

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum (y_i^p - y_i^m)^2}{n}} \quad (7)$$

где су y_i^p - жељени излаз (експерименталне вредности), y_i^m - стварни излаз (предвиђене вредности), n – број експеримената.

Средња квадратна грешка (*MSE*) може да се добије израчунавањем према следећој једначини (једначина 8):

$$MSE = \frac{\sum (y_i^p - y_i^m)^2}{n} \quad (8)$$

Средња апсолутна грешка (*MAE*) је средња вредност апсолутних разлика између предвиђених и експерименталних вредности. Рачуна се помоћу следеће формуле (једначина 9):

$$MAE = \frac{|y_i^p - y_i^m|}{n} \quad (9)$$

Коефицијент корелације унакрсне провере (Q^2) је нижи од нормалног коефицијента корелације и представља меру квалитета предвиђања. Овај коефицијент корелације може да се срачуна на следећи начин (једначина 10):

$$Q^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n (y_i^p - y_i^m)^2}{\sum (y_i^m - \bar{y}_i^m)^2} \quad (10)$$

где је \bar{y}_i^m - средња експериментално добијена вредност. Модел се сматра прихватљивим уколико је вредност Q^2 виша од 0,5.

3.12. Студије фотостабилности

Фотохемијска стабилност стандарда кверцетина и амигдалина у чврстом стању праћена је у комори за испитивање стабилности (Weiss-Gallenkamp PSC 062.AHX.C, Немачка). Узорци упаковани у хемијски инертним и транспарентним контејнерима били су озрачивани UV (254 nm) и VIS (540 nm) зрацима у току 2, 4, 6, 8 и 10 дана на 25 °C. Након тога, озрачени узорци подвргнути су HPLC анализи у циљу утврђивања садржаја кверцетина, односно амигдалина.

3.13. Одређивање антиоксидативне активности (DPPH-тест)

Од основних раствора стандарда кверцетина ($0,8 \text{ mg cm}^{-3}$), амигдалина ($0,8 \text{ mg cm}^{-3}$), екстракта зеленог чаја ($2,0 \text{ mg cm}^{-3}$) и екстракта семена шљиве ($5,0 \text{ mg cm}^{-3}$) припремљена је серија раствора различитих концентрација. Етанолни раствор DPPH радикала концентрације $3 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ (1 cm^3) додат је у растворе различитих концентрација стандарда амигдалина, кверцетина, односно екстраката добијених при оптималним условима екстракције ($2,5 \text{ cm}^3$). Испитиваним узорцима мерена је апсорбанција на 517 nm у односу на 96% етанол одмах на почетку и након 20 min у циљу провере утицаја времена инкубације на ток реакције анализираних компонената са DPPH радикалом. Инкубација је вршена у мраку на собној температури. При истим условима одређена је апсорбанција етанолног раствора DPPH радикала разблаженог у наведеном односу (1 cm^3 радикала дате концентрације уз додатак $2,5 \text{ cm}^3$ етанола).

Капацитет неутрализације слободних радикала одређен је на основу следеће релације (једначина 11):

$$\text{капацитет неутрализације DPPH радикала (\%)} = 100 - \left[(A_U - A_B) \times \left(\frac{100}{A_K} \right) \right] \quad (11)$$

где је, A_U – апсорбанција узорка (етанолни раствор испитиваних компонената, третираних раствором DPPH радикала).

A_B – апсорбанција бланка (етанолни раствор испитиваних компонената, који нису третирани раствором DPPH радикала).

A_K – апсорбанција контроле (разблажени етанолни раствор DPPH радикала) (Aquino и сар., 2002; Choi и сар., 2002).

3.14. Одређивање антимицробне активности

Сојеви микроорганизама који су коришћени у овим испитивањима су Грам негативне (*Escherichia coli* ATCC 8739, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027), Грам позитивне бактерије (*Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 6539), и гљивице (*Candida albicans* ATCC 10231 и *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404). У петри плочама додате су тачно дефинисане запремине (10 cm^3) агара за испитивање антибиотика (pH 6,5) код испитивања на бактеријама и *Sabouraud dextrose agar* (pH 5,6) код гљивица. Отопљени и темперирани медијум претходно је инокулисан са $150 \mu\text{l}$ суспензије испитиваних ћелија. Суспензије су припремљене растварањем сојева култура у 0,9% раствору NaCl до просечног садржаја од 10^8 cfu cm^{-3} . Плоче су остављане на $4 \text{ }^\circ\text{C}$ у току 1 h како би очврснуле. Након тога, стерилни дискови (Schleicher & Schuell, Дасел, Немачка) пречника 12,5 mm натапани су етанолним растворима ($30 \mu\text{l}$) испитиваних екстраката зеленог чаја и семена шљиве, односно растворима стандарда амигдалина и кверцетина. Стандард кверцетина и амигдалина направљени су у концентрацијама од 0,2; 0,8 и $1,6 \text{ mg cm}^{-3}$. Етанолни раствор послужио је као негативна контрола. Осетљивост сојева тестирана је и према гентамицину у циљу поређења његовог антимицробног спектра деловања са испитиваним узорцима. Како би добијени резултати били поредбени, узорци су третирани при истим условима на истим плочама сваког микроорганизама. Бактерије (Грам + и Грам -) су инкубиране на $37 \text{ }^\circ\text{C}$ у току 18–24 h, док су гљивице на $25 \text{ }^\circ\text{C}$ у току 24–48 h при анаеробним условима. Након инкубације, на петри плочама најпре су уочаване зоне инхибиције, а затим мерени њихови пречници у mm. Пречници зона

инхибиција добијени су као средња вредност три одређивања измерених вредности за три различите плоче и као такви су међусобно упоређивани.

3.15. МТТ тест

Ћелијске линије. У овом истраживању коришћене су линије: HeLa ћелија (ћелије хуманог аденокарцинома грлића материце), MDA-MB-361 (естроген-зависне) и MDA-MB-453 (естроген-независне) ћелија (ћелије хуманог карцинома дојке), LS-174 ћелија (ћелије хуманог карцинома дебелог црева) и здравих MRC-5 ћелија (хумани фибробласти плућа).

Храњива подлога. За раст и одржавање HeLa, LS-174, MRC-5 ћелијских линија коришћена је храњива подлога RPMI 1640 са 10% инактивисаним говеђим серумом (FBS) на 56 °C, L-глутамином (3 mmol dm^{-3}), пеницилином (100 IU cm^{-3}), стрептомицином (100 g cm^{-3}) и HEPES-ом (25 mmol dm^{-3}). Бикарбонатним раствором подешен је рН медијума на 7,2. За MDA-MB-361 и MDA-MB-453 ћелијске линије коришћен је исти медијум, али уз додатак глукозе до $1,11 \text{ g cm}^{-3}$. Ћелије су расле у влажној атмосфери (95% ваздуха, 5% CO₂) на 37 °C.

Третман ћелијских линија. Испитивани узорци су најпре растворени у DMSO-у до почетне концентрације $400 \text{ } \mu\text{g cm}^{-3}$. Након тога, узорци су разблаживани у храњивом медијуму до одговарајућих радних концентрација. За одређивање ћелијског преживљавања коришћене су микротитар плоче са 96 рупа (Nunc, Nalgene, Данска). Ћелије су равномерно засејаване у одговарајућој густини. Густина HeLa, MDA-MB-361, MDA-MB-453, LS-174, MRC-5 ћелија била је 2000, 7000, 3000, 7000 и 5000 ћелија по рупи у 100 μl медијума, респективно. Храњиви медијум коришћен је као слепа проба. Након 24 часа од сађења ћелија, у рупама са малигним ћелијама и у одговарајућим слепим пробама додато је пет различитих концентрација испитиваних узорака (50 μl). На контролне ћелије и слепе пробе додато је по 50 μl свежег храњивог медијума. Финалне концентрације испитиваних једињења примењене на циљне малигне ћелије биле су: 400, 200, 100, 50 и $25 \text{ } \mu\text{g cm}^{-3}$, осим за контролне рупе где је ћелијама додат само храњиви медијум. Ћелије су инкубиране 72 h у влажној атмосфери (95% ваздуха, 5% CO₂) на 37 °C.

Одређивање ћелијског преживљавања. Након инкубације, у свакој рупи додато је по 20 μl МТТ раствора ($5 \text{ mg MTT/cm}^3 \text{ PBS}$), док је 100 μl раствора 10% SDS-а додат након 4 h. Следећег дана, апсорбанција је мерена на ELISA читачу на 570 nm. У

експерименту је праћен антипролиферативни ефекат испитиваних стандарда кверцетина и амигдалина, изолованог амигдалина и екстракта зеленог чаја у односу на контролну културу малигних ћелија. Ћелијско преживљавање израчунавано је на следећи начин (једначина 12):

$$S(\%) = \frac{A_t - A_s}{A_k - A_s} \times 100 \quad (12)$$

где је:

A_s – апсорбанција слепе пробе, A_t – апсорбанција узорака са третираним ћелијама и A_k – апсорбанција контроле.

IC₅₀ концентрација се дефинише као концентрација супстанце која за 50% инхибира ћелијско преживљавање у односу на нетретирану контролу.

4. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

4.1. ВАЛИДАЦИЈА МЕТОДА

Познато је да су синтетички молекули јачег фармаколошког дејства, али са израженијим нежељеним дејствима у поређењу са биоактивним супстанцама. Из тог разлога у последње време истраживања су усмерена у правцу развоја нових биљних лекова. Њихов стандардни састав и деловање мора бити усаглашено са строгим критеријумима фармацеутске контроле квалитета. Формулације морају да буду правилно конципиране како би се омогућила правилна примена и лако дозирање са познатим нежељеним ефектима и контраиндикацијама. Када се познаје хемијски састав одређене лековите биљке и веза између структуре и дејства активних састојака, технолошким поступком екстракције могуће је добити екстракт са жељеном компонентом у максималној могућој концентрацији. Производња биљних лекова врши се у складу са смерницама Добре произвођачке праксе, чији је основни захтев спровођење контроле квалитета у циљу повећања безбедности и ефикасности лека. Лабораторијска контрола квалитета се једним делом односи на аналитичко испитивање лека и прописивање поступака, који обезбеђују спровођење свих неопходних и релевантних аналитичких метода испитивања квалитета како полазних супстанци тако и готових лекова. Лабораторијска контрола квалитета је поступак који се врши према прописима Европске, националне и другим признатим фармакопејама, провереним методама анализе или према аналитичким поступцима прихваћеним од стране Агенције за лекове и медицинска средства Србије.

Међутим, како у националној и међународној фармакопеји, научној и патентној литератури нису прописане осетљиве и специфичне методе за одређивање садржаја кверцетина у присуству осталих флавоноида у екстракту зеленог чаја, као и амигдалина у екстракту семена шљиве, јавила се потреба за развојем нових аналитичких метода. Приликом увођења нове методе, основни захтев контроле квалитета је студија валидације која се врши према дефинисаним процедурама. Основни задатак сваке аналитичке лабораторијске анализе јесте постизање брзих, тачних и веродостојних резултата анализе. Најбољи начин избегавања проблема приликом употребе методе јесте спровођење валидације аналитичке методе. Иако се самом валидацијом не могу предвидети сви проблеми који се могу јавити током примене методе, поступци развоја и валидације методе упућују на оне најчешће.

Валидацију треба схватити као проверу поступка аналитичке методе којом је могуће брзо, једноставно и поуздано контролисати квалитет производа. Поступци

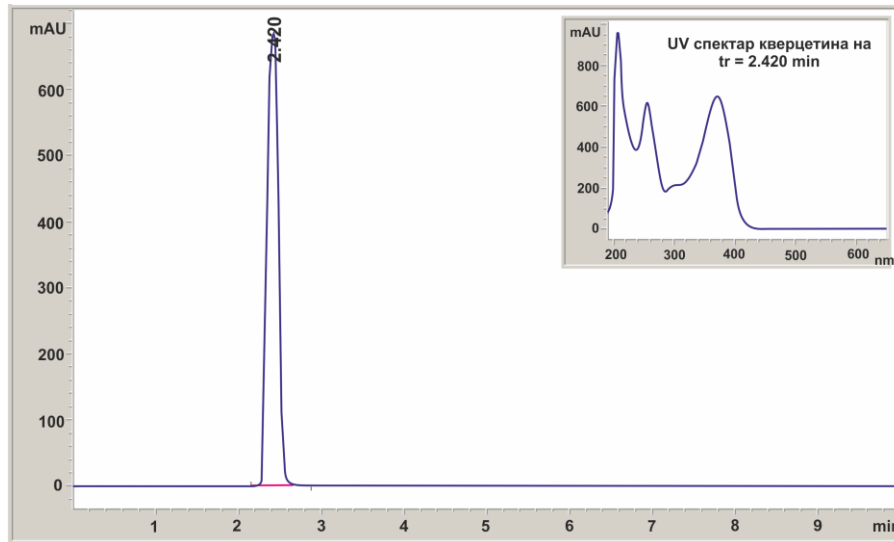
спровођења валидације аналитичких метода прописани су ИСН смерницом *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1)* (2005). Основни валидациони параметри који се спроводе током валидације аналитичке методе су линеарност, тачност, прецизност, селективност, граница детекције и квантификације и робусност.

4.1.1. HPLC метода за одређивање садржаја кверцетина у екстракту зеленог чаја

Ради лакшег хроматографског раздвајања, идентификације и квантификације кверцетина у екстракту зеленог чаја у присуству бројних биоактивних компонената, неопходно је било развити и оптимизовати нову RP-HPLC методу (Савић и сар., 2013а). Развој и оптимизација методе вршена је применом различитих стационарних фаза (C_{18} и C_8 колона), различитих мобилних фаза и органских модификатора мобилне фазе (ацетонитрил). Током развоја и оптимизације потврђено је да применом ZORBAX Eclipse XDB- C_{18} колоне (4,6×250 mm, 5 μ m) долази до адекватног раздвајања пикова. Значајна сепарација пикова постиже се применом метанола као мобилне фазе. Уколико се ацетонитрил користи у комбинацији са метанолом у мобилној фази, раздвајање кверцетина из екстракта зеленог чаја не даје задовољавајућу резолуцију. Због израженог максимума апсорпције кверцетина на 370 nm, ова вредност таласне дужине изабрана је као радна таласна дужина.

При датим условима хроматографије на ретенционом времену 2,420 min (слика 17) идентификовано је присуство кверцетина у стандарном раствору (50 μ g cm⁻³). Да се заиста ради о пику који се односи на кверцетин потврђено је и добијеним UV спектром на датом ретенционом времену.

Хроматографски параметри, као што су ефикасност колоне и асиметрија пика, одређени су за стандардни раствор кверцетина (50 μ g cm⁻³). На основу израчунатог броја теоријских подова ($N = 1568$), потврђена је задовољавајућа ефикасност колоне ($N_{ETP} = 159$). Вредност асиметрије пика (A_s) 1,67 указује да пик није идеално симетричан, тј. да није Гаусов пик. Имајући у виду да је $W_{ab} < W_{bc}$, може се закључити да постоји значајна интеракција између стационарне фазе и испитиване компоненте у систему.



Слика 17. HPLC хроматограм стандардног раствора кверцетина ($50 \mu\text{g cm}^{-3}$)

Линеарност методе. Линеарност методе је могућност методе да унутар одређеног подручја одговора детектора (површина пика) даје резултате који су пропорционални концентрацији анализата (кверцетина) у тестираном узорку. За потврду линеарности методе одабрана су пет раствора различитих концентрација стандарда кверцетина. Линеарност је потврђена у опсегу концентрација $10\text{-}70 \mu\text{g cm}^{-3}$. За сваку тачку линеарности одређена је њена средња вредност, а затим су израчунате вредности параметара једначине праве и коефицијент корелације чије су вредности приказане у табели 8. Добијена вредност коефицијента корелације указује на добро фитовање података. Прецизност фитовања добијених података приликом одређивања линеарности методе додатно је потврђена израчунавањем S.E. вредности за нагиб и одсечак регресионе једначине при интервалу поверења од 95%.

Табела 8. Валидациони параметри HPLC методе

параметри	
регресиона анализа	
нагиб (S.E. ^a)	101,36 (0,455)
одсечак (S.E.) ^a	513,33 (0,112)
коефицијент корелације (<i>r</i>)	0,9980
валидациони параметри	
линеарност ($\mu\text{g cm}^{-3}$)	10-70
граница детекције (LOD) ($\mu\text{g cm}^{-3}$)	1,2
граница квантификације (LOQ) ($\mu\text{g cm}^{-3}$)	3,96

^a Стандардна грешка

Тачност методе. Тачност методе испитивана је са три стандардна раствора кверцетина различитих концентрација (40, 50 и 60 $\mu\text{g cm}^{-3}$). На основу вредности *%recovery*, које су приказане у табели 9, процењена је тачност предложене аналитичке методе.

Табела 9. Тачност HPLC методе за одређивање садржаја кверцетина (n = 10)

ниво ($\mu\text{g cm}^{-3}$)	предвиђене концентрације ($\mu\text{g cm}^{-3}$)		<i>%recovery</i>	одступање (%)
	средња вредност ($\pm\text{SD}$)	RSD (%)		
40	40,53 \pm 0,33	0,79	101,32	1,32
50	49,21 \pm 0,54	0,67	98,42	-1,58
60	58,92 \pm 0,32	0,53	98,20	-1,80

Израчунате *recovery* (%) вредности које износе приближно 100%, и ниска вредност њихове стандардне девијације ($\text{SD} < 1,0$) показале су високу тачност предложене аналитичке методе. Валидност и поузданост HPLC методе додатно је процењена применом методе стандардног додатка. За ова испитивања коришћен је стандардни раствор кверцетина концентрације 50 $\mu\text{g cm}^{-3}$. Израчунате *%recovery* и *%RSD* вредности у овом случају приказане су у табели 10. Добијени резултати указују да и најмања промена концентрације кверцетина у раствору може бити детектована применом развијене HPLC методе.

Табела 10. Метод стандардног додатка кверцетина (n = 10)

концентрација ($\mu\text{g cm}^{-3}$)	концентрација дodatка ($\mu\text{g cm}^{-3}$)	укупна концентрација ($\mu\text{g cm}^{-3}$) ($\pm\text{SD}$)	<i>%recovery</i> \pm RSD (%)
50	0	50,21 \pm 0,34	100,42 \pm 0,67
50	5	54,34 \pm 0,32	98,80 \pm 0,58
50	10	60,35 \pm 0,45	100,58 \pm 0,64
50	15	63,87 \pm 0,42	98,26 \pm 0,53

Прецизност методе. Упоређивањем резултата између низа мерења спроведених из истих хомогених узорака (40, 50 и 60 $\mu\text{g cm}^{-3}$) према аналитичком пропису, који је поновљен неколико пута (n = 10) у току истог дана, испитан је први ниво прецизности

методе (поновљивост). Понављањем истог поступка узастопно неколико дана проверен је други ниво поновљивости методе (средња прецизност). За ова испитивања коришћени су раствори стандарда кверцетина у опсегу концентрација 40-60 $\mu\text{g cm}^{-3}$ (табела 11). Трећи ниво прецизности методе (репродуктивност) испитан је на другом HPLC систему (Здравље Актавис, Лесковац). У свим испитиваним случајевима добијени резултати су приказани као средња вредност испитивања са релативном стандардном девијацијом (RSD) (табела 11). Резултати за поновљивост методе (RSD < 1%) указују на високу прецизност методе под истим радним условима у кратким временским интервалима. Током студије средње прецизности израчунате RSD вредности нису биле веће од 1% у свим испитиваним случајевима. Израчунавањем %RSD вредности за репродуктивност методе, која износи <2%, потврђена је задовољавајућа прецизност развијене HPLC методе.

Табела 11. Студија прецизности (n = 10)

концентрација ($\mu\text{g cm}^{-3}$)	средња прецизност \pm RSD (%), n = 10			репродуктивност \pm RSD (%), n = 10
	дан 1	дан 2	дан 3	
40	38,95 \pm 0,81	40,94 \pm 0,67	40,48 \pm 0,51	39,06 \pm 0,89
50	51,85 \pm 0,05	50,12 \pm 0,21	49,78 \pm 0,08	50,83 \pm 1,41
60	59,55 \pm 0,18	58,51 \pm 0,84	60,15 \pm 0,08	59,34 \pm 1,55

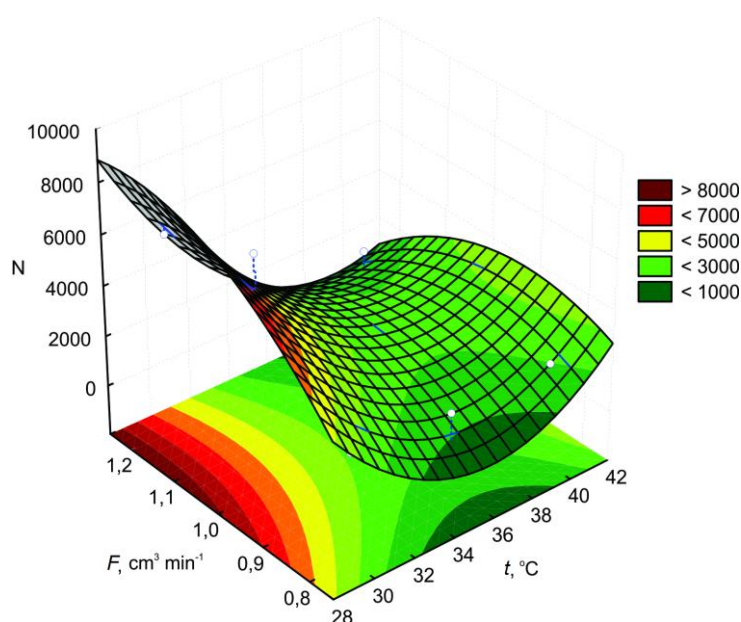
Лимит детекције (LOD) и квантификације (LOQ). У циљу одређивања најмање количине анализата (кверцетина) у узорку, одређене су вредности LOD (1,2 $\mu\text{g cm}^{-3}$) и LOQ (3,96 $\mu\text{g cm}^{-3}$). Њихове ниске вредности указују на микрограмску осетљивост методе.

Стабилност раствора. Стабилност кверцетина у тестираном и стандарном раствору праћена је у току 48 h (табела 12). За праћење стабилности тестираног раствора коришћени су раствори кверцетина различитих концентрација 40, 50 и 60 $\mu\text{g cm}^{-3}$. Почетна концентрација кверцетина упоређивана је са његовом концентрацијом у испитиваним растворима након 24 и 48 h. Тестирани и стандардни раствори током испитивања чувани су у виалама.

Табела 12. Стабилност раствора кверцетина

време	узорак	c ($\mu\text{g cm}^{-3}$)	% <i>recovery</i>
почетна		50,00	100,00
24h	ст	49,31	98,62
48h		51,02	102,04
почетна		40,00	100,00
24h	1	39,21	98,02
48h		41,04	102,60
почетна		50,00	100,00
24h	2	50,84	101,68
48h		48,92	97,84
почетна		60,00	100,00
24h	3	58,65	97,75
48h		60,97	101,62

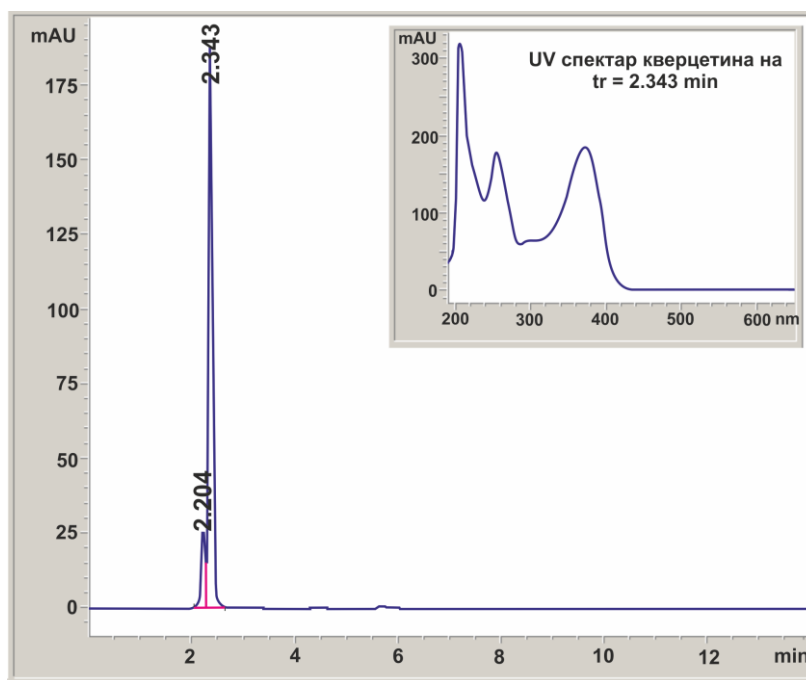
Робусност методе. Потпун факторијални дизајн са две променљиве на три нивоа успешно је примењен за праћење робусности развијене методе. Током ове студије, број теоријских подова посматран је као одзивна величина, док су проток мобилне фазе и температура узете као независно променљиве величине. За фитовање експерименталних података коришћен је полиномни модел другог реда. Током анализе нађено је да међусобна интеракција између независно променљивих има мали утицај на број теоријских подова. Утицај ових параметара приказан је у облику тродимензионалног дијаграма на слици 18.



Слика 18. Утицај протока мобилне фазе и температуре колоне на број теоријских подова

Применом ANOVA теста потврђено је да проток мобилне фазе и температура колоне немају статистички значајан утицај на број теоријских подова, односно на перформансе HPLC система. Дакле, добијени резултати указују да ће систем остати стабилан чак и након промене протока мобилне фазе и температуре у одређеним границама.

Примена предложене методе. Развијена и валидирана RP-HPLC метода успешно је примењена за одређивање садржаја кверцетина у екстракту зеленог чаја. Екстракт је припремљен екстракцијом са 96% (v/v) етанолом уз рефлукс на температури кључања растварача у току 60 min при солвомодулу 1:25 (m/v). Хроматограм екстракта зеленог чаја дат је на слици 19, где је на ретенционом времену од 2,343 min уочен пик који одговара кверцетину. Поређењем UV спектра на датом ретенционом времену са UV спектром стандарда кверцетина извршена је његова идентификација.



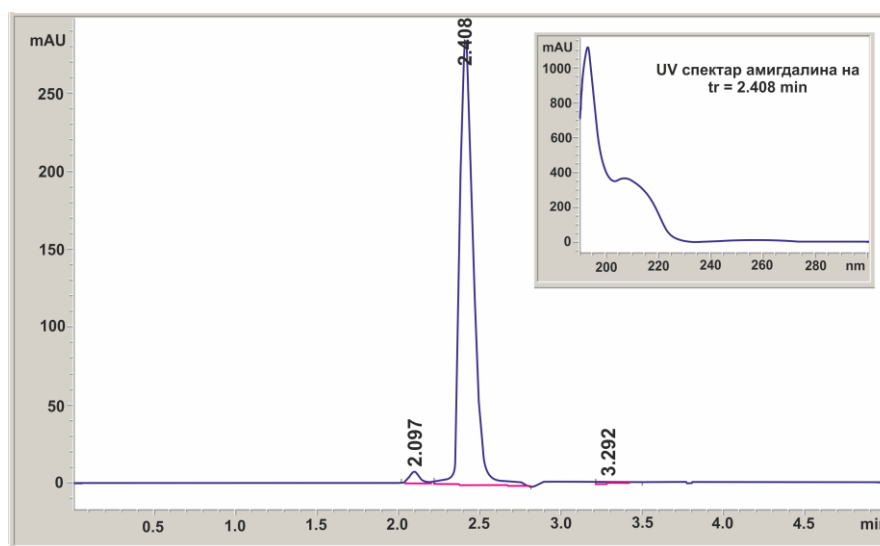
Слика 19. HPLC хроматограм екстракта зеленог чаја

Садржај кверцетина од 0,5 g/100 g сувог остатка (с.о.) у анализираном екстракту одређен је применом регресионе једначине при RSD < 0,39%. Ниска вредност RSD указује на добру прецизност предложене и развијене аналитичке методе, као и на то да је утицај осталих састојака екстракта занемарљив у процени садржаја кверцетина HPLC методом.

4.1.2. HPLC метода за одређивање садржаја амигдалина у екстракту семена шљиве

У циљу одговарајућег хроматографског раздвајања амигдалина из екстракта семена шљиве спроведена је оптимизација хроматографских услова развијене HPLC методе (Савић и сар., 2012б). У току оптимизације испитиван је утицај различитих стационарних фаза (C_{18} и C_8 колона), различитих мобилних фаза и органских модификатора мобилне фазе (метанол). Током оптимизације потврђено је да применом SUPELCO Analytical HS- C_{18} колоне ($4,6 \times 250$ mm, $5 \mu\text{m}$) долази до адекватног раздвајања пикова. Значајна сепарација пикова постиже се применом мобилне фазе вода:ацетонитрил у односу 25:75 (v/v). Заменом ацетонитрила метанолом у мобилној фази, не постиже се адекватно раздвајање амигдалина од осталих присутних компонената у екстракту. Максимум апсорпције амигдалина детектован је на 215 nm, тако да је ова таласна дужина изабрана за даљу анализу.

HPLC хроматограм стандарда амигдалина ($60 \mu\text{g cm}^{-3}$) на 215 nm при температури хроматографисања $25 \text{ }^\circ\text{C}$ приказан је на слици 20. Пик на ретенционом времену 2,408 min одговара стандарду амигдалина, што је и потврђено UV спектром на датом ретенционом времену. Детектовани су и пикови на ретенционом времену 2,097 и 3,292 min, који највероватније потичу од присуства нечистоћа у самој стандардној супстанци, с обзиром да је њен степен чистоће 97%.



Слика 20. HPLC хроматограм стандардног раствора амигдалина ($60 \mu\text{g cm}^{-3}$)

Ефикасност колоне и асиметрија пика одређена је за стандардни раствор амигдалина. Задовољавајућа ефикасност колоне потврђена је на основу израчунатих

параметара, броја теоријских подова ($N = 13189,34$) и висине еквивалентне теоријском поду ($NETP = 0,019$). Вредност асиметрије пика ($1,17$) била је у прихватљивом опсегу $0,8 < A_s < 1,8$. На основу ове вредности може се закључити да постоји слаба интеракција између стационарне фазе и испитиване компоненте у систему.

Линеарност методе. Зависност површине пика од концентрације амигдалина на 215 nm линеарна је у опсегу концентрација $10\text{-}100\ \mu\text{g cm}^{-3}$ (табела 13). Регресиона једначина добијена је методом најмањих квадрата (једначина 13). Коефицијент корелације указује на задовољавајуће слагање података са предложеном једначином праве, која је дата следећим изразом:

$$A_{215} = [26,178 \times C(\mu\text{g cm}^{-3}) + 21,237] \quad (13)$$

Табела 13. Валидациони параметри HPLC методе

Параметри	
Регресиона анализа	
Нагиб (S.E. ^a)	26,178 (0,623)
Одсечак (S.E.) ^a	21,237 (0,047)
Регресиони коефицијент (r)	0,9986
Валидациони параметри	
Линеарност ($\mu\text{g cm}^{-3}$)	10-100
LOD ($\mu\text{g cm}^{-3}$)	1,06
LOQ ($\mu\text{g cm}^{-3}$)	3,49

^a Стандардна грешка

Изабрана метода за одређивање садржаја амигдалина показала се специфичном, јер је вредност израчунатог студентовог t -теста ($t = 1,612$) нижа од теоријске вредности ($t = 2,225$). Прецизност фитовања добијених података приликом одређивања линеарности методе додатно је потврђена израчунавањем S.E. вредности за нагиб и одсечак регресионе једначине при интервалу поверења од 95%.

Тачност методе. Тачност методе процењена је израчунавањем $\%recovery$ вредности. Израчунате $\%recovery$ вредности за стандардне растворе амигдалина концентрације 40 , 50 и $60\ \mu\text{g cm}^{-3}$ приказане су у табели 14.

Табела 14. Тачност HPLC методе за одређивање садржаја амигдалина (n = 10)

Ниво ($\mu\text{g cm}^{-3}$)	Предвиђене концентрације ($\mu\text{g cm}^{-3}$)		%recovery	одступање (%)
	Средња вредност ($\pm\text{SD}$)	RSD (%)		
40	41,12 \pm 0,29	0,83	102,8	2,80
50	48,87 \pm 0,61	0,65	97,74	-2,26
60	59,02 \pm 0,26	0,49	98,36	1,64

На основу израчунатих %recovery вредности које износе приближно 100% и ниске вредности њихове стандардне девијације ($\text{SD} < 1,0$) може се закључити да је предложена аналитичка метода високе тачности. Методом стандардног додатка процењена је валидност и поузданост HPLC методе, при чему је у овом случају коришћен стандардни раствор амигдалина концентрације $50 \mu\text{g cm}^{-3}$. Израчунате %recovery и %RSD вредности у овом случају приказане су у табели 15. Добијени резултати указују да и најмања промена концентрације амигдалина у раствору може бити детектована применом развијене HPLC методе.

Табела 15. Метод стандардног додатка амигдалина (n = 10)

концентрација ($\mu\text{g cm}^{-3}$)	концентрација дodatка ($\mu\text{g cm}^{-3}$)	укупна концентрација ($\mu\text{g cm}^{-3}$) ($\pm\text{SD}$)	%recovery RSD (%)
50	0	49,28 \pm 0,36	98,56 \pm 0,64
50	10	61,04 \pm 0,27	101,73 \pm 0,43
50	20	70,43 \pm 0,41	100,61 \pm 0,65
50	30	78,87 \pm 0,38	98,58 \pm 0,61

Прецизност методе. Прецизност методе процењена је кроз три нивоа и то поновљивости, средње прецизности и репродуктивности. За проверу овог аналитичког параметра коришћени су раствори стандарда амигдалина у опсегу концентрација од 40 до $60 \mu\text{g cm}^{-3}$ (табела 16). Добијени резултати за поновљивост методе ($\text{RSD} < 1\%$) указују на високу прецизност методе при истим радним условима у кратким временским интервалима. Током студије средње прецизности израчунате %RSD нису биле веће од 1% у свим испитиваним случајевима. Задовољавајућа прецизност HPLC

методе потврђена је израчунавањем %RSD (<2%) вредности за репродуктивност методе.

Табела 16. Студија прецизности (n=10)

концентрација ($\mu\text{g cm}^{-3}$)	одређена концентрација			репродуктивност RSD (%), n = 10
	средња прецизност RSD (%), n=10			
	1 дан	2 дан	3 дан	
40	38,66 (0,78)	40,76 (0,51)	39,37 (0,61)	39,28 (0,85)
50	49,05 (0,12)	51,02 (0,34)	50,76 (0,34)	48,77 (1,13)
60	60,86 (0,41)	58,60 (0,73)	60,42 (0,07)	61,29 (1,62)

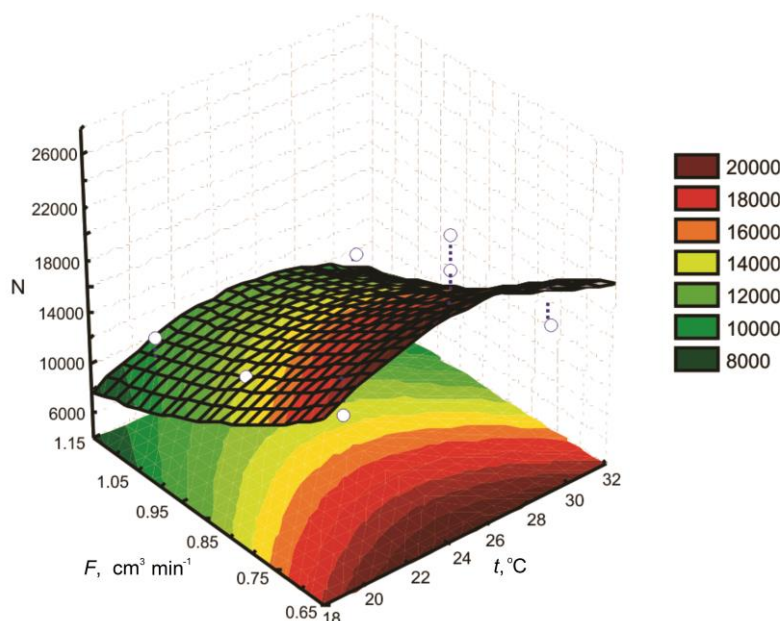
Израчунате ниске вредности LOD и LOQ од 1,06 и 3,49 $\mu\text{g cm}^{-3}$, респективно, за амигдалин (табела 13) указују на микрограмску осетљивост методе.

Стабилност раствора. Стабилност амигдалина у тестираном и стандарном раствору праћена је у току 48 h (табела 17). Раствори амигдалина различитих концентрација (40, 50 и 60 $\mu\text{g cm}^{-3}$) коришћени су за праћење стабилности тестираног раствора. Почетна концентрација амигдалина упоређивана је са његовом концентрацијом у испитиваним растворима након 24 и 48 h. Током испитивања, тестирани и стандардни раствори чувани су у виалама.

Табела 17. Стабилност раствора амигдалина

време	узорак	c ($\mu\text{g cm}^{-3}$)	%recovery
почетна		50,00	100,00
24h	ст	48,59	97,18
48h		51,18	102,36
почетна		40,00	100,00
24h	1	41,21	103,02
48h		39,04	97,60
почетна		50,00	100,00
24h	2	51,04	102,08
48h		48,98	97,96
почетна		60,00	100,00
24h	3	58,83	98,05
48h		61,27	102,11

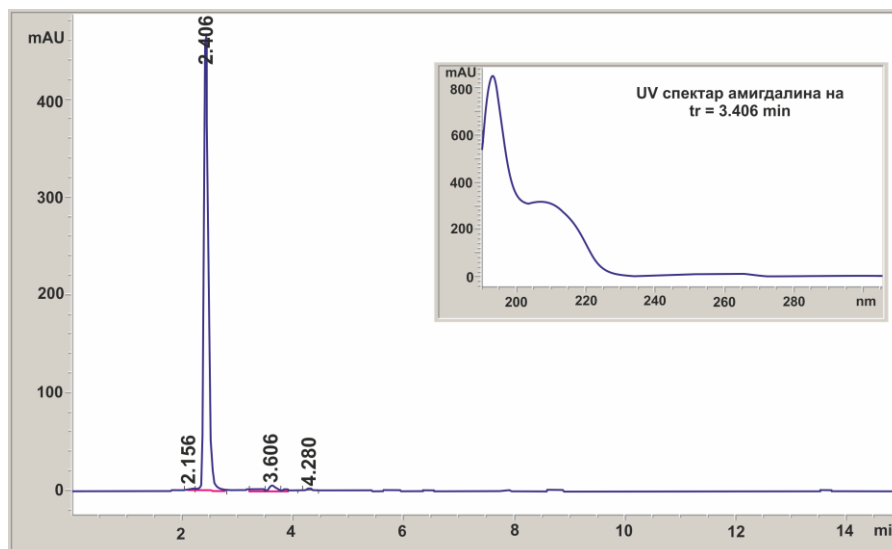
Робусност методе. За разлику од оптимизације методе, где је избором одговарајућег састава мобилне фазе и адекватне колоне, постигнуто задовољавајуће раздвајање активне компоненте, код робусности развијене методе испитивана је могућност методе да сачува тачне резултате при малим променама експерименталних услова. Параметри који су мењани у току рада су проток мобилне фазе и температура колоне, док су остали параметри одржавани константним. Њихов утицај на стабилност система праћен је применом методе пуног факторијалног дизајна. Током ове студије, број теоријских подова узет је као зависно променљива величина. Након испитивања, уочено је да проток мобилне фазе више утиче на промену броја теоријских подова у поређењу са температуром. За фитовање експерименталних података коришћен је полиномни модел другог реда, при чему је добијена функционална зависност између процесних параметара и одговора приказана тродимензионалним дијаграмом (слика 21). Добијени резултати указују да ће систем остати стабилан након промене протока мобилне фазе и температуре у одређеним границама.



Слика 21. Утицај протока мобилне фазе и температуре на број теоријских подова

Примена предложене методе. Развијена и валидирана метода успешно је примењена за одређивање садржаја амигдалина у екстракту семена шљиве. На слици 22 приказан је хроматограм екстракта, где је на ретенционом времену од 2,406 min уочен пик сличан оном на ретенционом времену које одговара стандардном раствору амигдалина. Да се заиста ради о пику амигдалина потврђено је упоређивањем UV спектра стандарда

и екстракта на датом ретенционом времену. На овај начин извршена је његова идентификација у анализираном екстракту семена шљиве.



Слика 22. HPLC хроматограм екстракта семена шљиве

Применом регресионе једначине 4 одређен је садржај амигдалина (3,97 g/100 g с.о.) у анализираном екстракту уз RSD < 0,39%. Ниска вредност RSD указује на добру прецизност предложене и развијене аналитичке методе, као и на то да је утицај осталих састојака екстракта занемарљив у процени садржаја амигдалина HPLC методом.

4.2. ЕКСТРАКЦИЈА КВЕРЦЕТИНА И АМИГДАЛИНА

У овом раду за екстракцију амигдалина из семена шљиве (*Pruni domesticae semen*) (Савић и сар., 2012в), односно кверцетина (Савић и сар., 2011а) и укупних флавоноида из листа зеленог чаја (*Camelliae sinensis folium*) (Савић и сар., 2011б) примењена је техника екстракције уз рефлукс. Применом фракционог факторијалног дизајна одабране су значајне променљиве процеса, које су затим даље узете за разматрање приликом оптимизовања поступка екстракције биоактивних компонената из биљних материјала применом CCD и MLP модела.

4.2.1. Оптимизација поступка екстракције кверцетина из листа зеленог чаја

У циљу испитивања утицаја екстракционих параметара на принос кверцетина из листа зеленог чаја урађено је 16 експеримената и то према експерименталном плану приказаном у табели 18, који је у складу са матрицом CCD. Редослед експеримената у табели дефинисан је софтверски и то насумичним одабиром.

Табела 18. Експерименти за екстракцију кверцетина из листа зеленог чаја према CCD са датим експерименталним и предвиђеним вредностима одговора

бр. експ. ANN	бр. експ. CCD	τ min	Ce %	ω (m/v)	Y_{obs} (g/100 g с.о.)	CCD	MLP
						Y_{pred}	Y_{pred}
							(g/100 g с.о.)
1 ^{train}	9	5,0	60,0	1:25,0	0,210	0,247	0,260
2 ^{train}	2	16,1	36,2	1:33,9	0,330	0,295	0,306
3 ^{train}	7	48,9	83,8	1:16,1	0,920	0,879	0,860
4 ^{train}	5	48,9	36,2	1:16,1	0,360	0,327	0,380
5 ^{train}	11	32,5	20,0	1:25,0	0,320	0,338	0,343
6 ^{train}	16 (C)	32,5	60,0	1:25,0	0,310	0,341	0,302
7 ^{train}	1	16,1	36,2	1:16,1	0,290	0,295	0,258
8 ^{train}	12	32,5	100,0	1:25,0	0,810	0,908	0,886
9 ^{train}	4	16,1	83,8	1:33,9	0,590	0,421	0,517
10 ^{train}	13	32,5	60,0	1:10,0	0,310	0,341	0,293
11 ^{train}	6	48,9	36,2	1:33,9	0,360	0,327	0,312
12 ^{train}	14	32,5	60,0	1:40,0	0,360	0,341	0,404
13 ^{train}	10	60,0	60,0	1:25,0	0,580	0,659	0,658
6 ^{train}	15 (C)	32,5	60,0	1:25,0	0,290	0,341	0,302
14 ^{train}	8	48,9	83,8	1:33,9	0,970	0,879	0,915
15 ^{train}	3	16,1	83,8	1:16,1	0,350	0,421	0,339

train – тренинг подаци;

Y_{obs} – експериментална вредност

Y_{pred} – предвиђена вредност

Принос кверцетина за посматране услове екстракције кретао се у опсегу 0,21-0,97 g/100 g с.о. Добијене вредности фитоване су применом полиномне једначине другог реда. Добијена полиномна једначина, која описује поступак екстракције кверцетина из листа зеленог чаја, дата је у виду кодираних променљивих следећом једначином (једначина 14):

$$Y = 0,341 + 0,123X_1 + 0,040X_1^2 + 0,169X_2 + 0,100X_2^2 + 0,106X_1X_2 \quad (14)$$

У овој једначини приказани су значајни чланови редукованог модела. Значајност чланова регресионог математичког модела анализирана је применом ANOVA теста. Улога ANOVA теста је да упореди варијацију услед одступања података од средње вредности. Значајност чланова једначине процењивана је применом Фишерове дистрибуције (F -тест) и p -вредности. Значајним члановима сматрани су они чланови чија је p -вредност била мања од 0,05. У табели 19, статистички резултати приказани су преко суме квадрата остатка заједно са одговарајућим степеном слободе, F -вредности и p -вредности. Математичке релације које су коришћене код ANOVA теста (SS , MS , F -вредност, R^2 , R^2_{adj}) често су примењиване у литератури (Bezerra и сар., 2008; Montgomery, 2001; Myers и Montgomery, 2002). На основу добијеног коефицијента корелације од 0,920 и статистички незначајне вредности параметра *Lack of Fit*, може се закључити да предложени модел за предвиђање приноса кверцетина има солидне перформансе, а самим тим може се сматрати адекватним за моделовање посматраног екстракционог поступка.

Табела 19. ANOVA тест за модел централног композитног дизајна

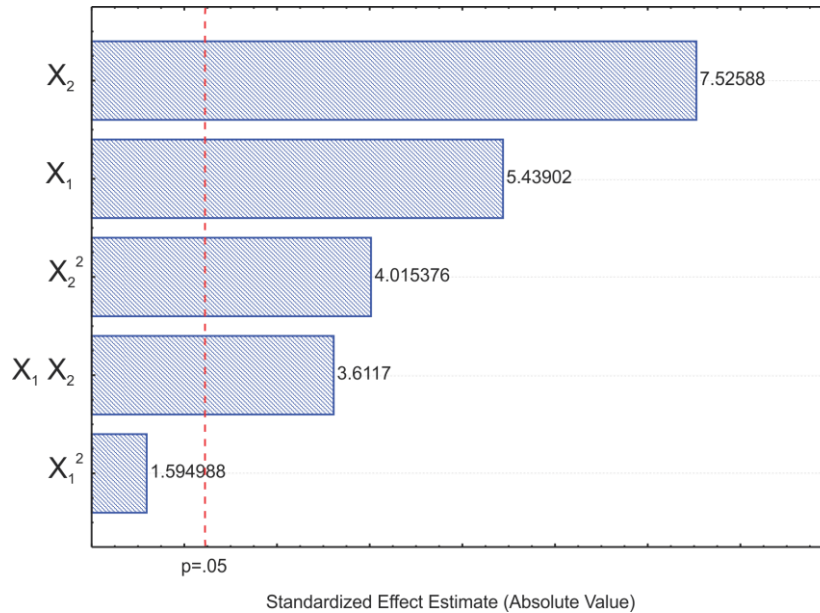
	SS	df	MS	F	p
X₁	0,2048	1	0,2048	29,58	0,0003
X₁²	0,0176	1	0,0176	2,54	0,1418
X₂	0,3921	1	0,3921	56,64	<0,0001
X₂²	0,1116	1	0,1116	16,12	0,0025
X₁ X₂	0,0903	1	0,0903	13,04	0,0048
Lack of Fit	0,0690	9	0,0077	38,35	0,1247
Residual	0,0692	10	0,0069		
Error	0,0002	1	0,0002		
Total SS	0,8694	15			

X₁ – време екстракције

X₂ – концентрација етанола

Парето дијаграм стандардизованих ефеката за екстракцију кверцетина из листа зеленог чаја приказан је на слици 23. Код процесних оптимизационих студија, овај дијаграм помаже да се лакше уоче најважнији факторски и интеракциони ефекти. Њиме се приказују апсолутне вредности ефеката и референтна линија која је важна код сагледавања статистички значајних чланова. Уколико вредности ефеката прелазе дату референтну линију онда се могу сматрати важним члановима у једначини. Дакле,

референтна линија представља праг за дати тест. Што је већа апсолутна вредност стандардизованог ефекта, то одговарајући фактор има већи утицај на одговор система, док знак стандардизованог ефекта говори о томе на који начин промена нивоа фактора утиче на одговор система.



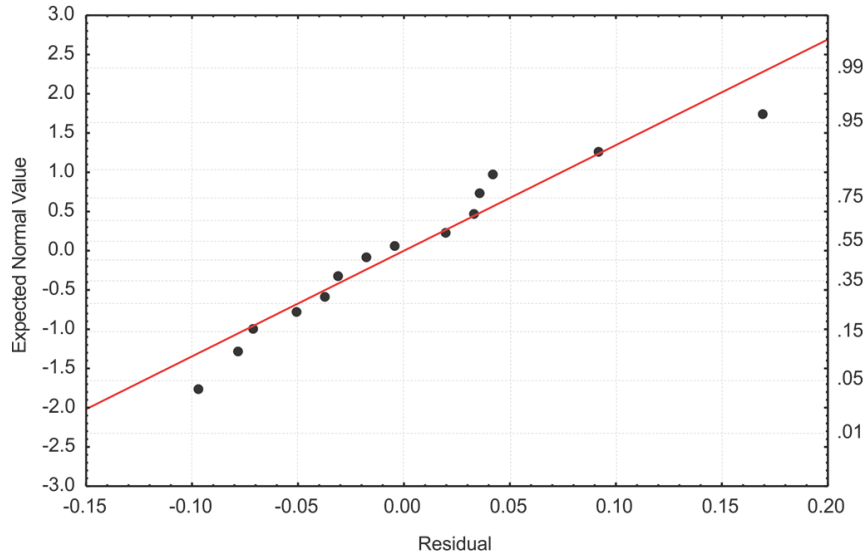
Слика 23. Парето дијаграм стандардизованих ефеката

Са слике се види да су ефекти X_2 , X_1 , X_2^2 и интеракција X_1X_2 статистички значајни чланови у полиномној једначини. Како сви чланови једначине имају позитиван стандардизовани ефекат на одговор модела, онда са повећањем вредности фактора долази до пораста садржаја кверцетина у екстрактима зеленог чаја. Утицај солвомодула изостављен је из једначине, јер p -вредности његових чланова нису биле статистички значајне. На основу овога се може закључити да солвомодул нема значајан допринос повећању количине кверцетина у екстрактима зеленог чаја.

Модел са кодираним вредностима конвертује се у емпиријски модел са стварним променљивама и може се представити следећом једначином (једначина 15):

$$Y = 0,991 - 0,0185\tau + 1,48 \cdot 10^{-4} \tau^2 - 0,023C_e + 1,76 \cdot 10^{-4} C_e^2 + 2,72 \cdot 10^{-4} \tau C_e \quad (15)$$

На слици 24 приказан је график вероватноће нормалне расподеле стандардизованих резидуа. Он представља функцију нормално очекиваних вредности узорака од резидуа. Добијени график указује да резидуе имају нормалну расподелу, јер тачке графика следе праву линију са минималним одступањем од њеног правца. Овакво понашање указује на адекватност предложеног модела за посматрани сет података.



Слика 24. График вероватноће нормалне расподеле стандардизованих резидуа

Када се располаже малим бројем урађених експеримената, примена вештачких неуронских мрежа показала се корисним за решавање проблема. Приликом оптимизације поступка екстракције кверцетина из листа зеленог чаја, трениране су неуронске мреже топологије 3-n-1, где је n број неурона у скривеном слоју. Промена броја чворова и активационих функција вршена је у циљу проналажења најбољег односа између улазних и излазних сигнала и то са минималним вредностима суме квадратне грешке (SSE).

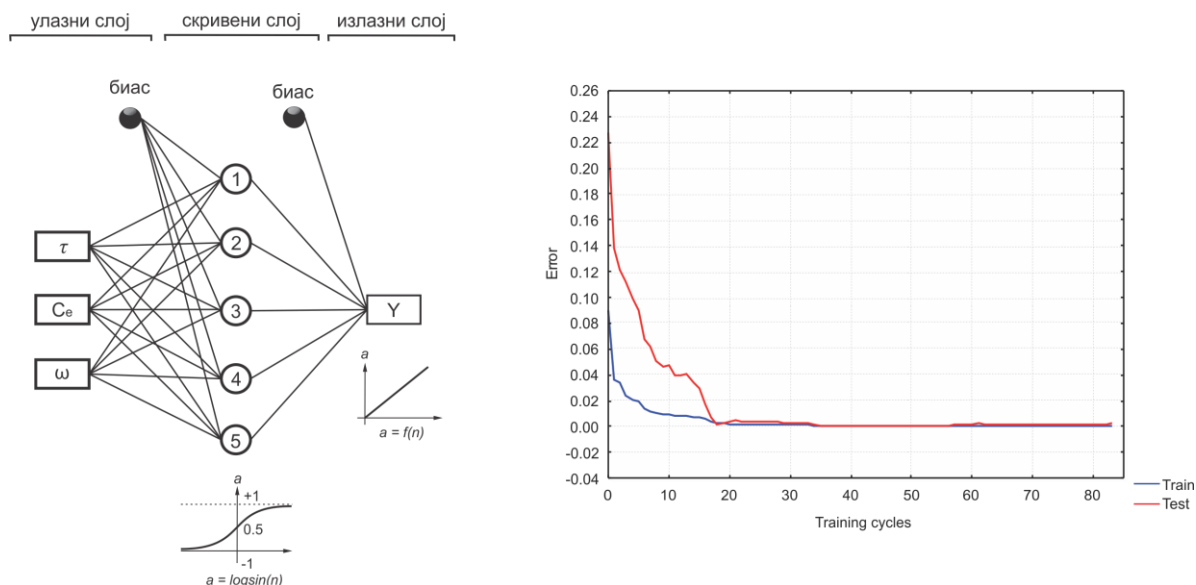
Подаци експерименталног дизајна датих у табели 18 заједно са додатним сетом података приказаних у табели 20 искоришћени су код моделовања поступка екстракције неуронским мрежама. Укупно 33 експеримената искоришћено је за конструкцију ANN модела. Око 70% од укупног броја експерименталних података узето је приликом тренирања мрежа, а по 15% за тестирање и валидацију ANN модела. Подаци за тренирање, тестирање и валидацију модела назначени су у табелама 18 и 20.

Број скривених слојева и неурона утврђен је тренирањем мрежа различитих топологија. Одабир оптималне мреже извршен је на основу вредности параметара RMSE, MSE, R^2 и Q^2 . Оптималном мрежом може се сматрати она која је добијена при минималним вредностима параметара грешке, односно највишим вредностима коефицијената корелације. У овом случају, оптимална архитектура мреже добијена је применом алгоритма повратне пропације након 71. циклуса и то код трослојне мреже (слика 25).

Табела 20. Додатни сет података за конструисање, тестирање и валидацију ANN модела код поступка екстракције кверцетина из листа зеленог чаја

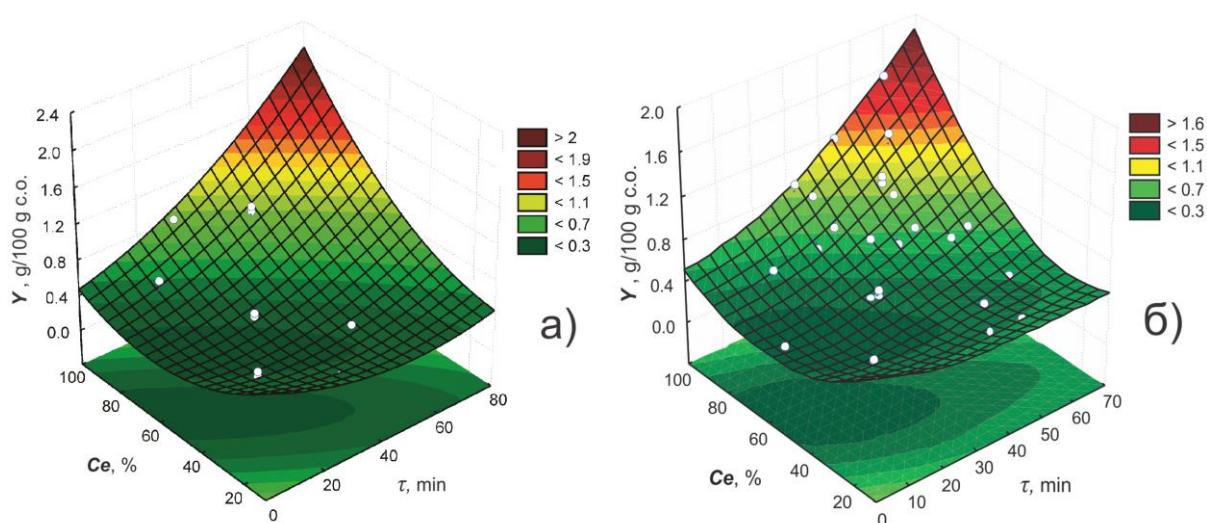
бр. експ. ANN	τ (min)	Ce (%)	ω (m/v)	кверцетин (g/100 g c.o.)	
				Y_{obs}	Y_{pred}
16 ^{train}	35	95	1:10	0,800	0,811
17 ^{train}	55	60	1:35	0,590	0,585
18 ^{train}	30	60	1:35	0,350	0,366
19 ^{train}	60	40	1:35	0,420	0,409
20 ^{train}	35	85	1:25	0,630	0,627
21 ^{train}	45	100	1:25	1,160	1,163
22 ^{train}	10	50	1:20	0,210	0,224
23 ^{test}	45	70	1:20	0,540	0,525
24 ^{test}	20	40	1:20	0,230	0,245
25 ^{test}	60	100	1:15	1,550	1,555
26 ^{test}	30	85	1:15	0,520	0,504
27 ^{test}	15	60	1:10	0,210	0,206
28 ^{validation}	40	75	1:30	0,570	0,580
29 ^{validation}	40	20	1:10	0,460	0,433
30 ^{validation}	50	20	1:15	0,430	0,406
31 ^{validation}	50	70	1:20	0,620	0,615
32 ^{validation}	50	80	1:25	0,800	0,807
33 ^{validation}	55	90	1:30	1,160	1,188

MLP мрежа се састоји од 3 улазне величине, једног скривеног слоја са 5 неурона и излазног слоја са 1 неуроном. Ова мрежа повратне пропагације може да се представи као MLP (3-5-1), где је дат број улазних величина, број неурона у скривеном и излазном слоју, респективно. Неурони скривеног слоја садрже логистичку (сигмоидну) функцију, док неурон излазног слоја садржи линеарну функцију. Скривени и излазни слој садржи још по један градивни елеменат, биас. Након тренирања мрежа следи генерализација неуронских мрежа. Под овим појмом подразумева се провера исправности тренирања предложених неуронских мрежа. Подаци којима се проверавају перформансе модела не улазе у процес тренирања мрежа. На слици 25, поред приказа оптималне архитектуре неуронске мреже дат је и приказ развоја вредности SSE у току тренирања и тестирања вишеслојног перцептрона.



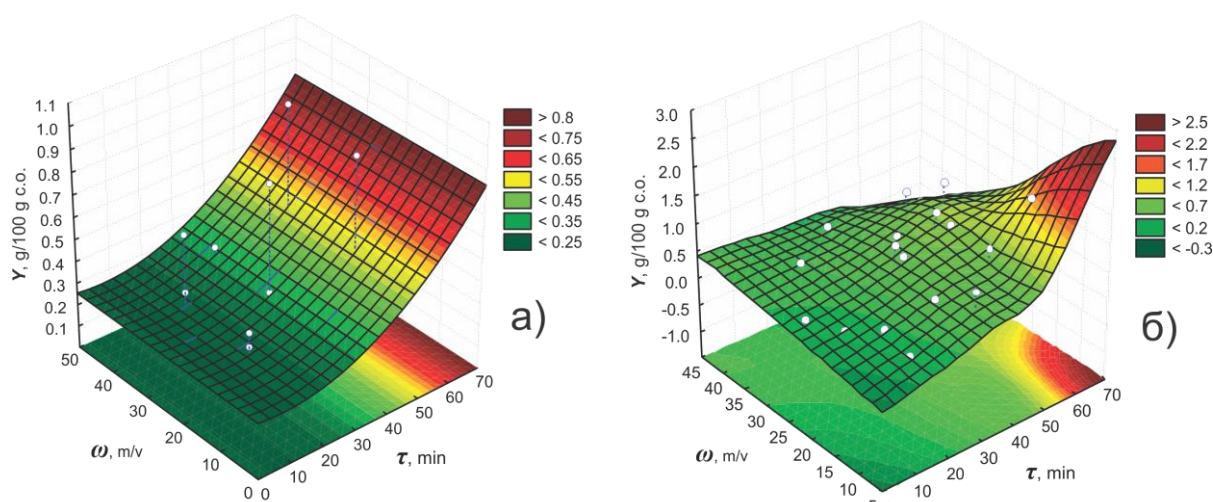
Слика 25. Топологија неуронске мреже MLP (3-5-1) са дијаграмом еволуције SSE

Зависност приноса кверцетина од процесних променљивих приказана је на сликама 26-28. На слици 26 дат је приказ утицаја времена екстракције и концентрације етанола на принос кверцетина при солвомодулу 1:25 (m/v) за моделе CCD и MLP. Облик површине дате зависности указује на јаку интеракцију између ових процесних параметара. Ове променљиве готово да имају подједнаки допринос повећању приноса кверцетина. Позитивни утицај времена екстракције на садржај кверцетина у екстрактима изражен је при вишим концентрацијама етанола, док је при нижим готово занемарљив. Промена концентрације етанола значајније утиче на количину кверцетина у екстрактима тек при дужим временима екстракције. Иначе, повећање концентрације етанола такође показује позитиван ефекат на посматрану одзивну величину.



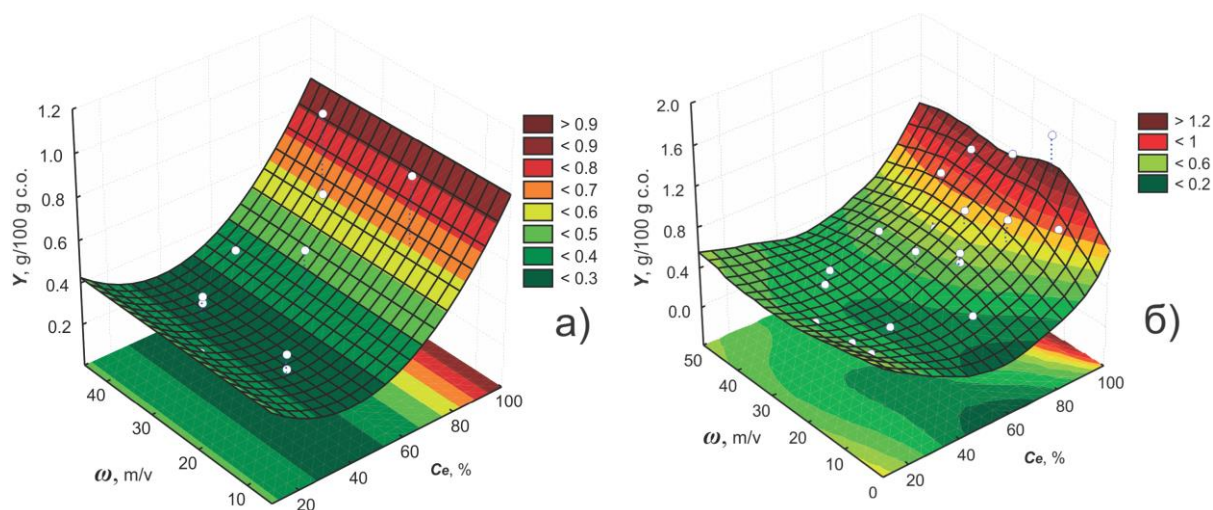
Слика 26. Зависност приноса кверцетина од времена екстракције и концентрације етанола при солвомодулу 1:25 (m/v) за модел: а) CCD; б) MLP

Функционална зависност приноса кверцетина од времена екстракције и солвомодула применом 60% (v/v) етанола за предложене моделе, приказана је у виду тродимензионалног дијаграма на слици 27. Запажа се да солвомодул не показује значајни ефекат на принос кверцетина, што је и претходно показано ANOVA тестом. Код MLP модела значајније повећање садржаја кверцетина у екстрактима дешава се тек при мањим вредностима солвомодула.



Слика 27. Зависност приноса кверцетина од времена екстракције и солвомодула при концентрацији етанола од 60% (v/v) за модел: а) CCD; б) MLP

Утицај концентрације етанола и солвомодула на принос кверцетина при времену екстракције 32,5 min приказан је на слици 28. У оба случаја запажа се да са повећањем солвомодула не долази до значајније промене у приносу кверцетина, док то није случај са повећањем концентрације етанола.



Слика 28. Зависност приноса кверцетина од концентрације етанола и солвомодула за време екстракције 32,5 min за модел: а) CCD; б) MLP

За разлику од зависности добијене MLP моделом, код зависности добијене CCD моделом уочава се значајнији утицај концентрације етанола на промену садржаја кверцетина у екстрактима. Принос кверцетина значајно расте при концентрацијама вишим од 80% (v/v).

Ради поређења ефикасности предложених метода математичког моделовања (CCD и ANN) израчунате су вредности коефицијената корелације и грешака, које су приказане табеларно (табела 21). Добијени резултати показују да су вредности грешака модела мање у случају неуронских мрежа, док су вредности коефицијената корелације мање у случају експерименталног дизајна. Ове вредности грешака и коефицијената корелације указују на то да MLP модел може да се сматра поузданијим моделом, јер приликом моделовања поступака екстракције кверцетина из зеленог чаја неуронским мрежама разматра се већи број експеримената.

Табела 21. Вредности параметара коефицијената корелације и грешака за моделе централног композитног дизајна и вишеслојног перцептрона

Централни композитни дизајн																			
RMSE		MSE		MAE		R ²		Q ²											
0,0658		0,0043		0,0525		0,9204		0,9204											
Вишеслојни перцептрон																			
тренирање					тестирање					валидација					укупно				
RMSE	MSE	MAE	R ²	Q ²	RMSE	MSE	MAE	R ²	Q ²	RMSE	MSE	MAE	R ²	Q ²	RMSE	MSE	MAE	R ²	Q ²
0,0343	0,0012	0,0274	0,9821	0,9821	0,0113	0,0001	0,0101	0,9995	0,9995	0,0208	0,0004	0,0181	0,9998	0,9939	0,0301	0,0009	0,0233	0,9909	0,9907

RMSE – квадратни корен средње квадратне грешке

MSE – средња квадратна грешка

MAE – средња апсолутна грешка

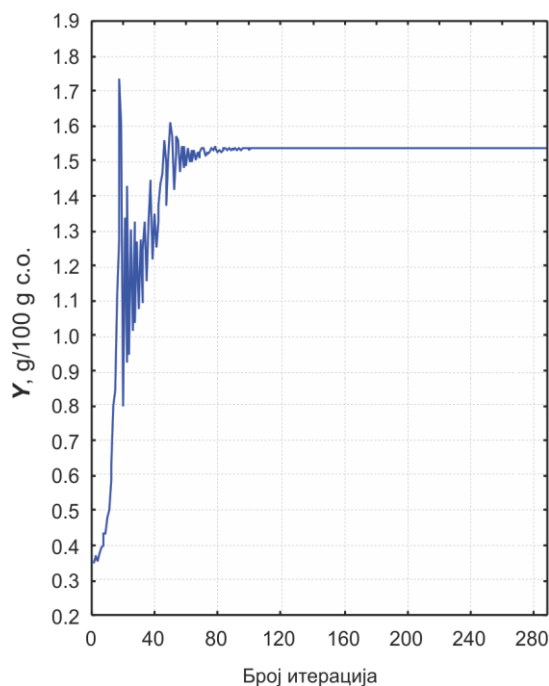
R² – коефицијент корелације

Q² – коефицијент корелације унакрсне провере

Полиномна функција другог реда код CCD модела оптимизована је применом нумеричке оптимизације, при чему су добијени оптимални услови екстракције: време екстракције 58,5 min, концентрација етанола 94,7% (v/v) и однос биљне сировине и растварача 1:19,4 (m/v). Принос који се при томе предвиђа је 1,34 g/100 g с.о., док је експериментално добијена вредност приноса амигдалина 1,36 g/100 g с.о. Овакво добро

подударање предвиђених и експерименталних вредности указује на валидност предложеног модела.

Применом симплекс методе код MLP модела добијени су оптимални услови екстракције кверцетина из листа зеленог чаја. Оптимални услови у овом случају добијени су након 80 итерација (слика 29).



Слика 29. Максимизација приноса кверцетина применом симплекс методе код MLP модела

Предвиђена вредност приноса кверцетина износила је 1,54 g/100 g с.о. за време екстракције 60 min, 100% (v/v) етанол и солвомодул 1:18 (m/v). Исправност предложених оптималних услова успешно је експериментално потврђена, при чему је добијени принос кверцетина износио 1,55 g/100 g с.о. Одлично слагање експериментално добијене вредности приноса кверцетина са предвиђеним приносом још једна је потврда исправности предложеног модела.

4.2.2. Оптимизација поступка екстракције укупних флавоноида

Садржај укупних флавоноида одређен је у екстрактима добијеним приликом оптимизације поступка екстракције кверцетина из листа зеленог чаја (Савић и сар., 2013б). У табели 22 приказан је насумичан редослед урађених експеримента у складу са матрицом CCD дизајна.

Табела 22. Експерименти за екстракцију укупних флавоноида из листа зеленог чаја према CCD са датим експерименталним и предвиђеним вредностима одговора

бр. експ. ANN	бр. експ. CCD	τ min	Ce %	ω (m/v)	Y_{obs} (g/100 g c.o.)	CCD	MLP
						Y_{pred} (g/100 g c.o.)	Y_{pred} (g/100 g c.o.)
1 ^{train}	9	5,0	60,0	1:25,0	0,400	0,421	0,404
2 ^{train}	2	16,1	36,2	1:33,9	0,620	0,567	0,617
3 ^{train}	1	16,1	36,2	1:16,1	0,310	0,342	0,314
4 ^{train}	7	48,9	83,8	1:16,1	1,880	1,902	1,906
5 ^{train}	4	16,1	83,8	1:33,9	1,490	1,513	1,496
6 ^{train}	5	48,9	36,2	1:16,1	1,130	1,176	1,140
7 ^{train}	15 (C)	32,5	60,0	1:25,0	1,840	1,847	1,881
8 ^{train}	6	48,9	36,2	1:33,9	1,600	1,590	1,605
9 ^{train}	10	60,0	60,0	1:25,0	1,840	1,793	1,833
10 ^{train}	12	32,5	100,0	1:25,0	2,290	2,264	2,287
11 ^{train}	11	32,5	20,0	1:25,0	0,860	0,860	0,859
12 ^{train}	3	16,1	83,8	1:16,1	1,310	1,288	1,301
13 ^{train}	13	32,5	60,0	1:10,0	1,200	1,163	1,213
7 ^{train}	16 (C)	32,5	60,0	1:25,0	1,850	1,847	1,881
14 ^{train}	14	32,5	60,0	1:40,0	1,690	1,701	1,674
15 ^{train}	8	48,9	83,8	1:33,9	2,280	2,316	2,295

train – тренинг подаци

Y_{obs} – експериментална вредност

Y_{pred} – предвиђена вредност

Добијени принос укупних флавоноида био је у опсегу 0,342 – 2,316 g/100 g c.o. Вредности добијених приноса неопходних за оптимизацију поступка екстракције укупних флавоноида из листа зеленог чаја применом CCD модела приказани су у табели 22. Подаци су фитовани различитим моделима за које софтвер даје могућност. Поступак је најбоље описан полиномном једначином другог реда. Добијена једначина у облику кодираних вредности може да се прикаже на следећи начин (једначина 16):

$$Y = 1,847 + 0,409X_1 - 0,263X_1^2 + 0,418X_2 - 0,101X_2^2 + 0,160X_3 - 0,146X_3^2 - 0,055X_1X_2 - 0,055X_1X_3 + 0,048X_2X_3 \quad (16)$$

Када се кодиране вредности замене стварним вредностима добија се емпиријска једначина која може да се прикаже на следећи начин (једначина 17):

$$Y = -3,306 + 0,089\tau - 9,8 \cdot 10^{-4} \tau^2 + 0,044C_e - 1,8 \cdot 10^{-4} C_e^2 + 0,100\omega - 1,85 \cdot 10^{-3} \omega^2 - 1,4 \cdot 10^{-4} \tau C_e + 3,3 \cdot 10^{-4} \tau\omega \quad (17)$$

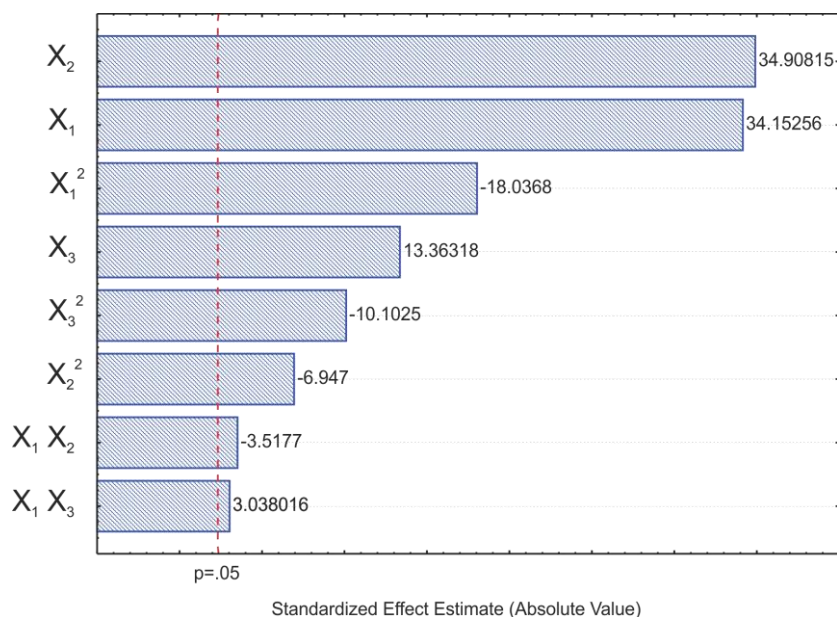
ANOVA тест за модел централног композитног дизајна приказан је у табели 23. На основу p -вредности процењена је значајност чланова једначине. Како су њихове вредности углавном много мање од 0,001, онда је реч о члановима високе значајности. F-Вредност *Lack of Fit*-а 45,47 указује да *Lack of Fit* није значајан у односу на вредност чисте грешке (*pure error*), што указује на адекватност предложеног модела. Из табеле се види да постоји 11,30% шансе да се F-вредност *Lack of Fit*-а јави услед шума. Поред p -вредности дате су и вредности статистичких параметара, који се односе на суму квадрата, степен слободе, средњу вредност квадрата и F-вредност.

Табела 23. ANOVA тест за модел централног композитног дизајна

	SS	df	MS	F	p
X_1	2,2811	1	2,2811	1166,40	<0,0001
X_1^2	0,6362	1	0,6362	325,33	<0,0001
X_2	2,3831	1	2,3831	1218,58	<0,0001
X_2^2	0,0944	1	0,0944	48,26	0,0002
X_3	0,3492	1	0,3492	178,58	<0,0001
X_3^2	0,1996	1	0,1996	102,06	<0,0001
$X_1 X_2$	0,0242	1	0,0242	12,37	0,0098
$X_1 X_3$	0,0181	1	0,0181	9,23	0,0189
Lack of Fit	0,0136	6	0,0023	45,47	0,1130
Pure Error	0,00005	1	0,00005		
Error	0,014	7	0,0019		
Total SS	5,7256	15			

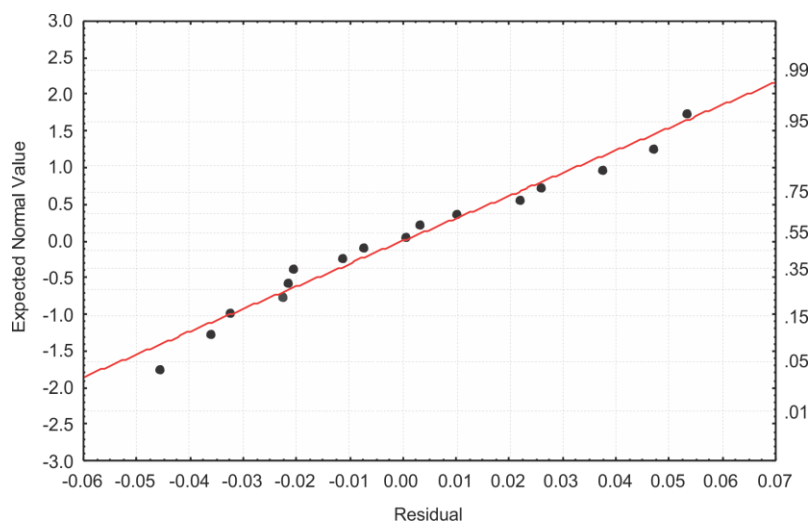
Помоћу Парето дијаграма (слика 30) сагледано је који чланови једначине су статистички значајни у полиномној једначини другог реда. Најзначајнија променљива која утиче на принос флавоноида је концентрација етанола, затим време екстракције и солвомодул. Једини члан који је изузет приликом редуковања полиномне једначине је интеракција X_2X_3 . Сви линеарни чланови једначине имају позитивно деловање на принос флавоноида, што указује да са њиховим повећањем долази до повећања садржаја биоактивних компонената у екстрактима. Квадратни чланови једначине имају негативни предзнак, при чему је вредност стандардизованих ефеката већа у случају

времена екстракције, затим солвомодула и на крају концентрације етанола. Интеракција X_1X_3 је статистички најмање значајна у полиномној једначини, док интеракција X_1X_2 има нешто већи утицај на принос флавоноида из листа зеленог чаја.



Слика 30. Парето дијаграм стандардизованих ефеката

График вероватноће нормалне расподеле стандардизованих резидуа приказан је на слици 31. Како вредности благо одступају од линеарне зависности, онда је реч о подацима са нормалном расподелом. Ови резултати потврђују да је модел полиномне једначине другог реда адекватно постављен, тако да није потребно вршити додатно модификовање модела у циљу побољшања његове способности да предвиђа принос укупних флавоноида из листа зеленог чаја.



Слика 31. График вероватноће нормалне расподеле стандардизованих резидуа

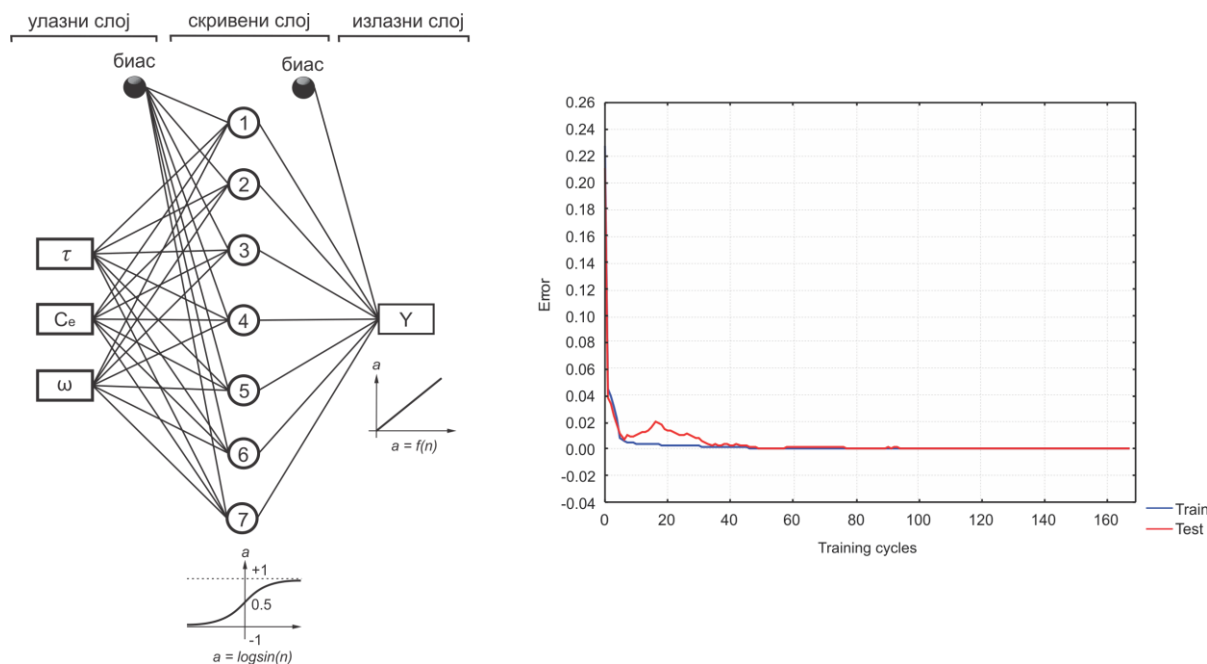
У табели 24 приказан је додатни сет података од 18 експеримената, који су заједно са подацима из табеле 22 искоришћени код моделовања поступка екстракције укупних флавоноида из листа зеленог чаја применом неуронских мрежа. За тренирање мрежа узето је око 70% од укупног броја урађених експеримената, односно по 15% за тестирање и валидацију ANN-модела.

Табела 24. Додатни сет података за конструисање, тестирање и валидацију ANN модела код поступка екстракције укупних флавоноида из листа зеленог чаја

бр. експ. ANN	τ (min)	Ce (%)	ω (m/v)	укупни флавоноиди (g/100 g c.o.)	
				Y_{obs}	Y_{pred}
16 ^{train}	35	95	1:10	1,590	1,595
17 ^{train}	55	60	1:35	1,990	1,988
18 ^{train}	30	60	1:35	1,770	1,761
19 ^{train}	60	40	1:35	1,530	1,543
20 ^{train}	35	85	1:25	2,210	2,235
21 ^{train}	45	100	1:25	2,370	2,362
22 ^{train}	10	50	1:20	0,430	0,420
23 ^{test}	45	70	1:20	2,060	1,997
24 ^{test}	20	40	1:20	0,820	0,758
25 ^{test}	60	100	1:15	1,760	1,825
26 ^{test}	30	85	1:15	1,720	1,739
27 ^{test}	15	60	1:10	0,810	0,785
28 ^{validation}	40	75	1:30	2,260	2,254
29 ^{validation}	40	20	1:10	0,290	0,297
30 ^{validation}	50	20	1:15	0,690	0,658
31 ^{validation}	50	70	1:20	2,000	1,970
32 ^{validation}	50	80	1:25	2,200	2,228
33 ^{validation}	55	90	1:30	2,300	2,274

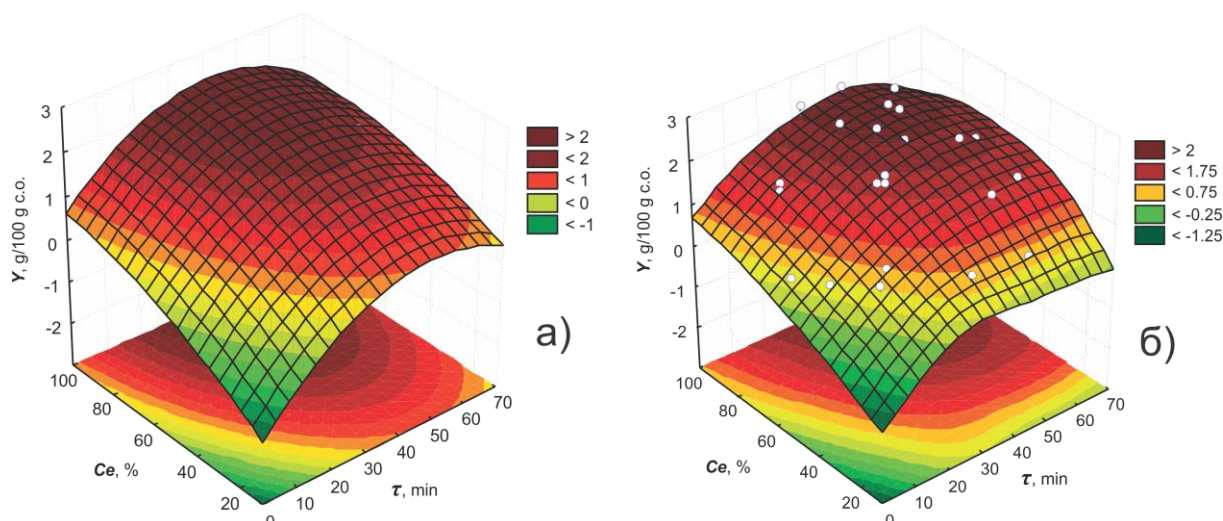
За архитектуру оптималне мреже изабран је вишеслојни перцептрон са три улазне променљиве, седам скривених неурона и једном излазном променљивом. За обраду улазног сигнала у циљу добијања што бољег излазног сигнала као активациона функција код скривеног слоја искоришћена је логистичка (сигмоидна) функција, док је

у излазном слоју примењена линеарна функција. По један биас додат је у улазном и скривеном слоју за обраду сигнала, при чему је применом алгоритма повратне пропације постигнута минимална вредност SSE. Дијаграм развоја параметра SSE у току процеса тренирања и тестирања приказан је на слици 32, при чему се јасно види да је оптимална мрежа добијена након 31 итерације.



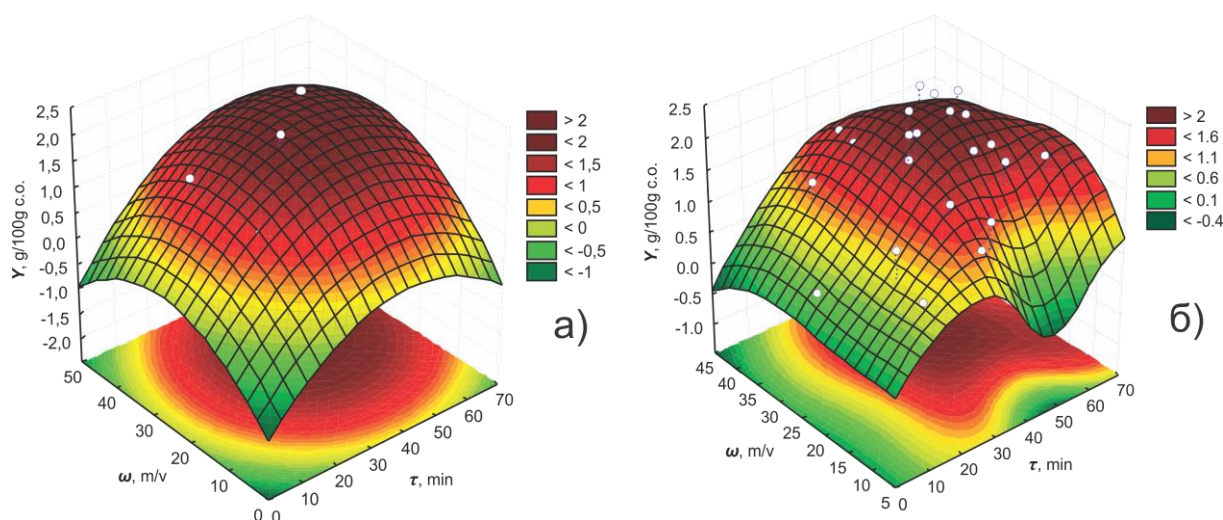
Слика 32. Топологија неуронске мреже MLP (3-7-1) са дијаграмом еволуције SSE

Утицај процесних параметара на принос укупних флавоноида из листа зеленог чаја добијеним за оба модела приказани су функционалним зависностима на сликама 33-35. На слици 33 представљено је на који начин интеракција X_1X_2 , која спада у ред значајних чланова у полиномној једначини другог реда, утиче на принос жељених компонената из листа зеленог чаја. На основу облика зависности може се закључити да између посматраних параметара постоји јака интеракција са израженим максимумом. Дакле, са порастом дужине трајања екстракције долази до повећања садржаја укупних флавоноида у екстрактима без обзира на концентрацију употребљеног растварача. Концентрација етанола такође има позитиван утицај на принос укупних флавоноида, што је и очекивано, јер гликозиди флавоноида и поларнији агликони спадају у групу једињења која имају бољу растворљивост у етанолу у поређењу са водом (Marston и Hostettmann, 2006).



Слика 33. Утицај времена екстракције и концентрације етанола на принос укупних флавоноида при солвомодулу 1:25 (m/v) за модел: **а)** CCD; **б)** MLP

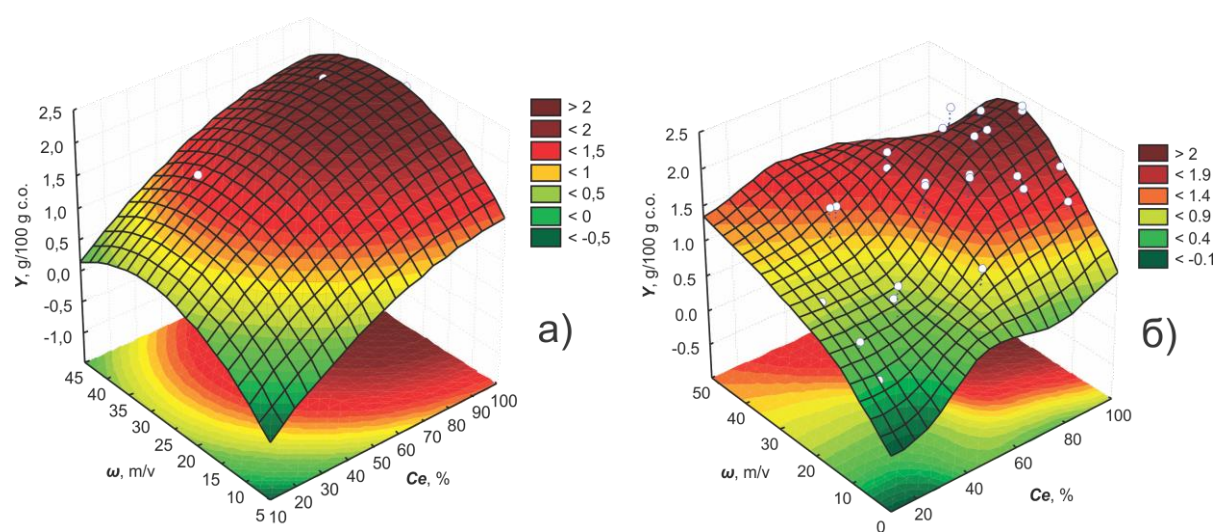
Функционална зависност приноса укупних флавоноида од времена екстракције и солвомодула дата је на слици 34а и 34б за CCD и MLP модел, респективно. Ова интеракција такође има свој изражени максимум. И овде се запажа да са повећањем времена екстракције долази до повећања садржаја биоактивних компонената у екстрактима. Солвомодул на сличан начин утиче на принос, односно са његовим повећањем повећава се садржај укупних флавоноида. Ове зависности дефинисане су у случају 60% (v/v) етанола.



Слика 34. Утицај времена екстракције и солвомодула на принос укупних флавоноида употребом 60% (v/v) етанола за модел: **а)** CCD; **б)** MLP

Утицај концентрације етанола и солвомодула за време екстракције 32,5 min у случају CCD и MLP модела приказани су на слици 35а и 35б, респективно. Између

посматраних процесних променљивих постоји јака интеракција што се примећује на основу облика површине одговора. Утицај солвомодула на принос укупних флавоноида много је израженији при односу већем од 1:20 (m/v). За солвомодул мањи од 1:10 (m/v), садржај биоактивних компонената у екстрактима не мења се битније са променом концентрације етанола. Пораст солвомодула повећава принос флавоноида, јер постоји већа расположива количина растварача која може додатно да раствара жељене компоненте. За разлику од зависности дате CCD моделом, код MLP модела значајан утицај солвомодула изражен је тек при концентрацијама етанола већим од 60% (v/v).



Слика 35. Утицај концентрације етанола и солвомодула на принос укупних флавоноида за време екстракције од 32,5 min: а) CCD; б) MLP

Вредности параметара грешке и коефицијента корелације за оба предложена модела приказана су у табели 25. Вредности RMSE, MSE, MAE за све податке узете приликом моделовања неуронским мрежама имале су ниже вредности од оних добијених за модел експерименталног дизајна. Усаглашеност вредности коефицијената корелације за моделе којима се симулира поступак екстракције указују на поузданост предвиђања приноса флавоноида. Код неуронских мрежа дат је приказ вредности ових параметара за процес тренирања, тестирања и валидације. У свим случајевима вредности грешака биле су мале, а вредности коефицијената корелације високе.

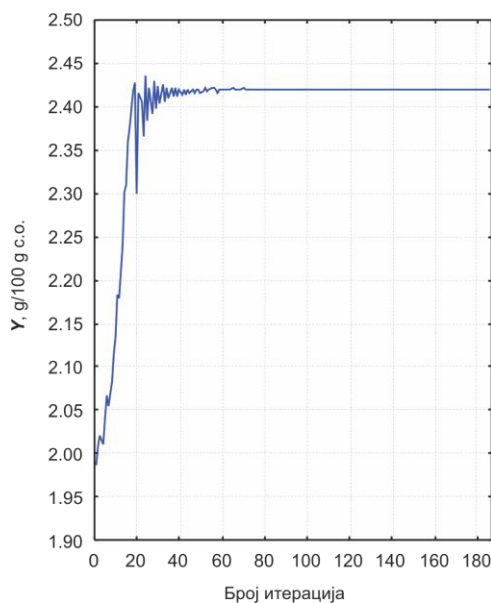
Табела 25. Вредности параметара коефицијената корелације и грешака за моделе централног композитног дизајна и вишеслојног перцептрона

Централни композитни дизајн																			
RMSE		MSE		MAE		R ²		Q ²											
0,0293		0,0009		0,0247		0,9976		0,9976											
Вишеслојни перцептрон																			
тренирање					тестирање					валидација					укупно				
RMSE	MSE	MAE	R ²	Q ²	RMSE	MSE	MAE	R ²	Q ²	RMSE	MSE	MAE	R ²	Q ²	RMSE	MSE	MAE	R ²	Q ²
0,0182	0,0003	0,0126	0,9991	0,9991	0,0426	0,0018	0,0353	0,9969	0,9944	0,0262	0,0007	0,0246	0,9992	0,9990	0,0247	0,0006	0,0179	0,9986	0,9986

Применом нумеричке оптимизације код CCD модела предложени су следећи оптимални услови екстракције: време екстракције 43,1 min, 95,6% (v/v) етанол и солвомодул 1:32,9 (m/v). Моделом се предвиђа принос флавоноида 2,40 g/100 g с.о., док је експериментално добијена вредност при датим условима екстракције била поприлично уједначена и износила је 2,44 g/100 g с.о. Све ове чињенице указују на то да је модел експерименталног дизајна успешно послужио за моделовање поступка екстракције, јер је грешка са којом он предвиђа вредности мања од 2%.

Оптимизовање неуронске мреже симплекс методом добијени су оптимални услови екстракције. За време екстракције 42,6 min, 100% (v/v) етанол и солвомодул 1:30,4 (m/v) предвиђа се принос 2,42 g/100 g с.о., док је експериментално добијена вредност при датим оптималним условима 2,45 g/100 g с.о. Овакво добро слагање наведених вредности указује на адекватност и валидност предложеног MLP модела. Оптимални услови постигнути су након 60 итерација, што се јасно може уочити и са слике 36.

Оптимални услови добијени експерименталним дизајном и вештачким неуронским мрежама добро су усаглашени. Неуронском мрежом предложени су оптимални услови са незнатно краћим временом екстракције и благо нижим солвомодулом. Експериментална вредност приноса већа је код MLP модела, па се услови добијени применом симплекс методе препоручују у циљу добијања екстракта обогаћеног укупним флавоноидима.



Слика 36. Максимизација приноса укупних флавоноида код MLP модела

4.2.3. Оптимизација поступка екстракције амигдалина

Познато је да се амигдалин добро раствара у води (83 g dm^{-3}) и етанолу (1 g dm^{-3}). Међутим, стабилност амигдалина у води је мала, при чему се разлаже на бензалдехид, цијановодоничну киселину и глукозу у присуству емулзина који представља мешавину ензима β -D-глукозидазе и хидроксинитрилазе (Hwang и сар., 2002a). До његове епимеризације долази у кључалој води (Hwang и сар., 2002b), а посебно у базној средини због слабо киселог карактера бензил протона (Kanga и сар., 2000). Релативно висока растворљивост амигдалина у етанолу, његова нешкодљивост за људе и опрему и ниска цена коштања утицали су на одабир овог растварача за екстракцију поменутог биоактивног принципа из семена шљиве. Принос екстрахованог једињења углавном се повећава са повећањем температуре, јер се вискозност система смањује, а са њим и отпор преносу масе. Ниже температуре екстракције примењују се у случају термолабилних једињења и у случају могућности преласка једињења из једног епимерног облика у други. Имајући у виду чињеницу да на високим температурама амигдалин епимеризује, екстракције су вршене на температурама нижим од $100 \text{ }^\circ\text{C}$.

Након разматрања физичко-хемијских својстава амигдалина, техника екстракције уз рефлукс изабрана је за екстракцију амигдалина из семена шљиве због саме природе растварача. За оптимизацију поступка екстракције амигдалина, као независно промелјиве величине изабрани су они параметри екстракције који директно утичу на његов принос и то време екстракције (10-120 min), концентрација етанола (20-

100%, v/v), однос биљне сировине и растварача (1:5-1:25, m/v) и температура екстракције (22-78 °C). Температуре кључања растварача нису посматране приликом сагледавања утицаја температуре екстракције, јер раствори различитих удела етанола имају различите температуре кључања. Зато је за одабир максималне могуће температуре екстракције лимитирајући фактор била температура кључања апсолутног етанола од 78 °C. Као одзивна величина модела изабран је принос амигдалина који се одређује применом развијене HPLC методе, а изражава на 100 g сувог екстракта.

За боље разумевање међусобних интеракција процесних параметара екстракције и дефинисање оптималних услова коришћени су математички модели према софтверу Statistica 8.0. И у овом случају за оптимизацију примењен је модел CCD са четири независно променљиве величине. Добијени експериментални подаци приноса амигдалина (табела 26) апроксимирани су полиномним моделима. Након тога, експерименталне вредности су упоређиване са онима које предвиђа модел и на основу њих израчунати су параметари грешака и вредности коефицијената корелације и процењена је ефикасност предложених модела.

Табела 26. Експерименти за екстракцију амигдалина из семена шљиве према CCD са датим експерименталним и предвиђеним вредностима одговора

бр. експ. ANN	бр. експ. CCD	τ (min)	Ce (%)	ω (m/v)	t (°C)	Y _{obs} (g/100 g c.o.)	CCD	MLP
							Y _{pred}	Y _{pred}
							(g/100 g c.o.)	
1 ^{train}	24	65,0	60	1:15	78	6,510	6,448	6,263
2 ^{train}	7	37,5	80	1:20	36	10,380	10,502	10,581
3 ^{train}	16	92,5	80	1:20	64	12,290	12,255	12,333
4 ^{train}	17	10,0	60	1:15	50	6,850	6,473	6,541
5 ^{train}	19	65,0	20	1:15	50	7,830	7,549	7,643
6 ^{train}	11	92,5	40	1:20	36	11,570	11,219	11,196
7 ^{train}	22	65,0	60	1:25	50	11,090	10,644	10,667
8 ^{train}	6	37,5	80	1:10	64	4,150	4,801	4,840
9 ^{train}	15	92,5	80	1:20	36	14,830	14,927	14,776
10 ^{train}	25 (C)	65,0	60	1:15	50	8,350	8,502	8,147

Табела 26. НАСТАВАК

11 ^{train}	1	37,5	40	1:10	36	9,350	9,270	9,430
12 ^{train}	9	92,5	40	1:10	36	9,650	9,965	9,999
13 ^{train}	5	37,5	80	1:10	36	9,300	8,918	9,300
10 ^{train}	28 (C)	65,0	60	1:15	50	8,420	8,502	8,147
14 ^{train}	4	37,5	40	1:20	64	6,820	6,912	6,771
10 ^{train}	27 (C)	65,0	60	1:15	50	8,260	8,502	8,147
15 ^{train}	3	37,5	40	1:20	36	9,150	9,584	9,484
16 ^{train}	23	65,0	60	1:15	22	13,370	13,238	13,225
17 ^{train}	12	92,5	40	1:20	64	8,270	8,547	8,905
10 ^{train}	26 (C)	65,0	60	1:15	50	8,880	8,502	8,147
18 ^{train}	2	37,5	40	1:10	64	4,940	5,152	4,885
19 ^{train}	10	92,5	40	1:10	64	5,990	5,847	6,228
20 ^{train}	18	120,0	60	1:15	50	11,410	11,593	11,726
21 ^{train}	21	65,0	60	1:5	50	6,660	6,360	6,342
22 ^{train}	14	92,5	80	1:10	64	8,920	8,286	8,258
23 ^{train}	8	37,5	80	1:20	64	7,930	7,830	7,870
24 ^{train}	20	65,0	100	1:15	50	10,820	10,906	11,090
10 ^{train}	29 (C)	65,0	60	1:15	50	8,450	8,502	8,147
25 ^{train}	13	92,5	80	1:10	36	12,100	12,403	12,077

train – тренинг подаци

Y_{obs} – експериментална вредност

Y_{pred} – предвиђена вредност

У табели 27, поред степена слободe, суме квадрата, Фишеровe дистрибуције дате су и p -вредности чланова полиномног модела. p -Вредност мања од 0,05 указује да је члан у једначини значајан, односно веома значајан за вредност мању од 0,01, док за p -вредност мању од 0,001 реч је о члану са високим нивоом значајности. Редукција модела спроведена је искључивањем чланова једначине, који нису статистички значајни, до статистички незначајне вредности *Lack of Fit*-а. F -Вредност *Lack of Fit*-а 2,55 указује на то да постоји 15,40% шансе да се ова вредност јави услед шума.

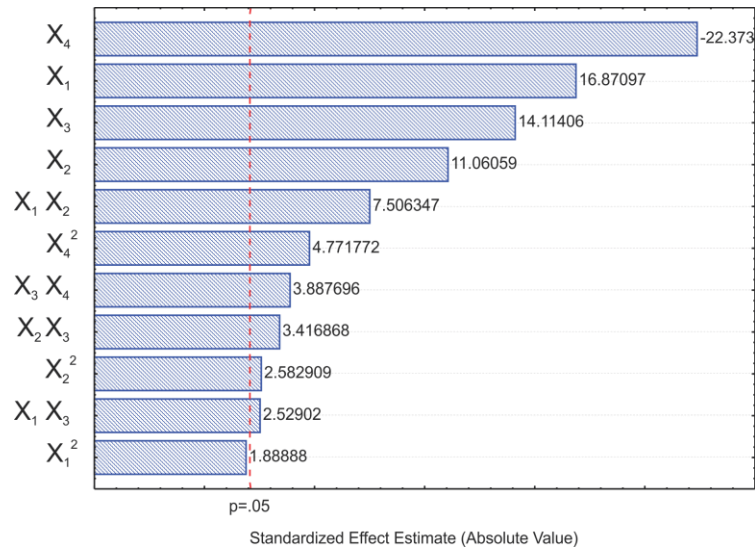
Табела 27. ANOVA тест за централни композитни дизајн

	SS	df	MS	F	p
X_1	39,3216	1	39,32160	268,64	<0,0001
X_1^2	0,4929	1	0,49290	3,37	0,0831
X_2	16,9008	1	16,90082	115,46	<0,0001
X_2^2	0,9217	1	0,92166	6,30	0,0219
X_3	27,5204	1	27,52042	188,02	<0,0001
X_4	69,1562	1	69,15615	472,47	<0,0001
X_4^2	3,1457	1	3,14565	21,49	0,0002
$X_1 X_2$	7,7841	1	7,78410	53,18	<0,0001
$X_1 X_3$	0,8836	1	0,88360	6,04	0,0244
$X_2 X_3$	1,6129	1	1,61290	11,02	0,0038
$X_3 X_4$	2,0880	1	2,08803	14,27	0,0014
Lack of Fit	2,2899	13	0,17615	2,55	0,1540
Pure Error	0,3448	5	0,06896		
Total SS	171,7649	29			

X_1 – време екстракције;
 X_2 – концентрација етанола
 X_3 – солвомодул
 X_4 – температура екстракције

Парето дијаграм стандардизованих ефеката за екстракцију амигдалина из семена шљиве приказан је на слици 37. На дијаграму, ефекти су поређани по опадајућој значајности. Дакле, све посматране процесне променљиве имају значајан утицај на принос амигдалина, међу којима је са највећим ефектом температура. Она једина од свих параметара има негативан ефекат на принос амигдалина. Са повећањем температуре долази до опадања садржаја амигдалина у екстрактима семена шљиве. Након температуре, време екстракције и солвомодул показују значајан допринос повећању садржаја амигдалина у екстрактима. Најмањи ефекат показује концентрација етанола, али свакако не занемарујући, јер је p -вредност за овај члан једначине много мања од 0,05.

Са Парето дијаграма, као и из табеле 27 може се уочити да су поред линеарних чланова процесних параметара статистички значајне и интеракције X_1X_2 , X_3X_4 , X_2X_3 , X_1X_3 , као и чланови X_4^2 и X_2^2 .



Слика 37. Парето дијаграм стандардизованих ефеката

Зависност приноса амигдалина од независно променљивих параметара екстракције за полиномни модел другог реда представљен је у облику једначине са кодираним променљивама на следећи начин (једначина 18):

$$Y = 8,502 + 1,280X_1 + 0,133X_1^2 + 0,839X_2 + 0,181X_2^2 + 1,071X_3 - 1,698X_4 + 0,335X_4^2 + 0,698X_1X_2 + 0,235X_1X_3 + 0,318X_2X_3 + 0,361X_3X_4 \quad (18)$$

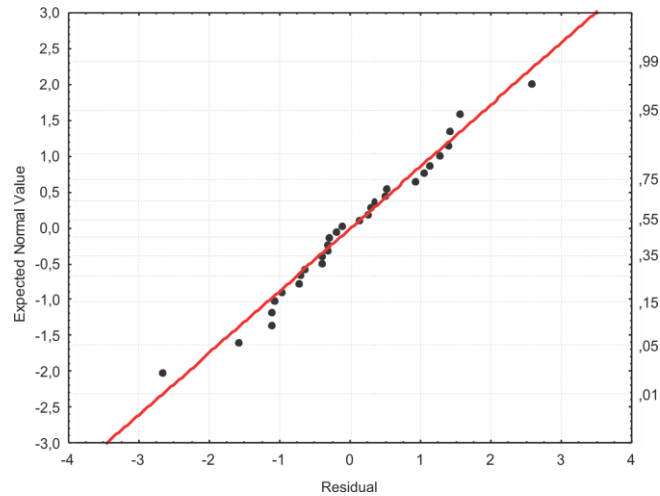
Заменом кодираних вредности стварним вредностима добија се емпиријска једначина у следећем облику (једначина 19):

$$Y = 25,799 - 0,078\tau + 1,84 \cdot 10^{-4} \tau^2 - 0,143Ce + 4,5 \cdot 10^{-4} Ce^2 - 0,345\omega - 0,370t + 1,71 \cdot 10^{-3} t^2 + 1,27 \cdot 10^{-3} \tau Ce + 1,71 \cdot 10^{-3} \tau \omega + 3,17 \cdot 10^{-3} Ce \omega + 5,16 \cdot 10^{-3} \omega t \quad (19)$$

Ознаке из једначине 18 и 19 приказане су у табели 7. Овај модел је изабран као адекватан за описивање поступка екстракције амигдалина, након поређења са претходно анализираним моделима. Поред линеарног модела са квадратним члановима и интеракцијама, анализирана су још три модела за који софтверски пакет даје могућност. Заједничко за све анализиране моделе да је вредност *Lack of Fit* била статистички значајна и поред уклањања оних чланова једначине који нису статистички значајни. Самим тим такви предложени модели сматрани су неадекватним за описивање поступка екстракције.

График вероватноће нормалне расподеле стандардизованих резидуа приказан је на слици 38. С обзиром да на добијеном графику нема битнијих одступања од линеарне

зависности, онда се може закључити да резидуе следе нормалну расподелу и да је предложени модел адекватан за посматрани сет података.



Слика 38. График вероватноће нормалне расподеле стандардизованих резидуа

Након моделовања поступка екстракције применом експерименталног дизајна, прешло се на дораду неопходних експеримената у циљу тренирања, тестирања, односно валидације вештачких неуронских мрежа. Додатни сет експеримената за моделовање поступака екстракције амигдалина приказан је у табели 28.

Табела 28. Додатни сет података за конструисање, тестирање и валидацију ANN модела код поступка екстракције амигдалина из семена шљиве

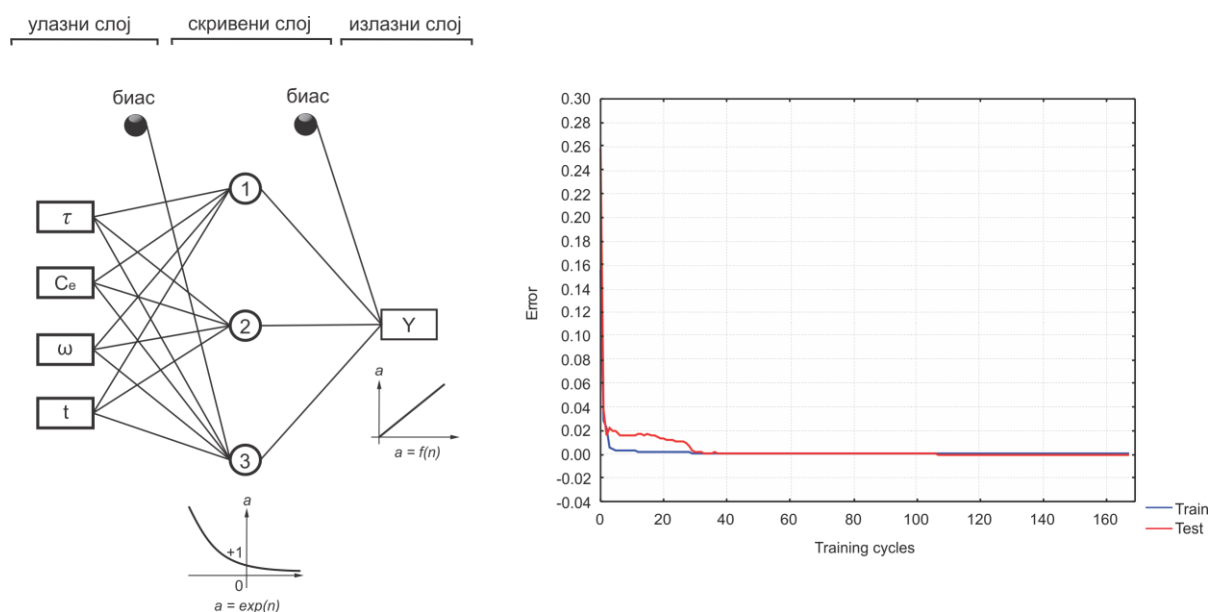
бр. експ. ANN	τ (min)	Ce (%)	ω (m/v)	t (°C)	Y _{obs} (g/100 g c.o.)	MLP
						Y _{pred} (g/100 g c.o.)
26 ^{test}	10	30	1:12	36	9,900	9,808
27 ^{test}	40	60	1:18	45	8,550	8,338
28 ^{test}	50	70	1:20	30	11,790	11,642
29 ^{test}	60	80	1:22	50	11,000	11,005
30 ^{test}	80	90	1:25	60	14,630	14,717
31 ^{validation}	100	96	1:5	25	16,530	16,705
32 ^{validation}	110	100	1:20	30	21,300	21,805
33 ^{validation}	120	100	1:25	40	24,830	24,808
34 ^{validation}	60	40	1:20	70	7,210	7,204
35 ^{validation}	45	80	1:21	22	13,500	13,697

train – тренинг подаци; **test** – тест подаци; **validation** – подаци за валидацију

Y_{obs} – експериментална вредност

Y_{pred} – предвиђена вредност

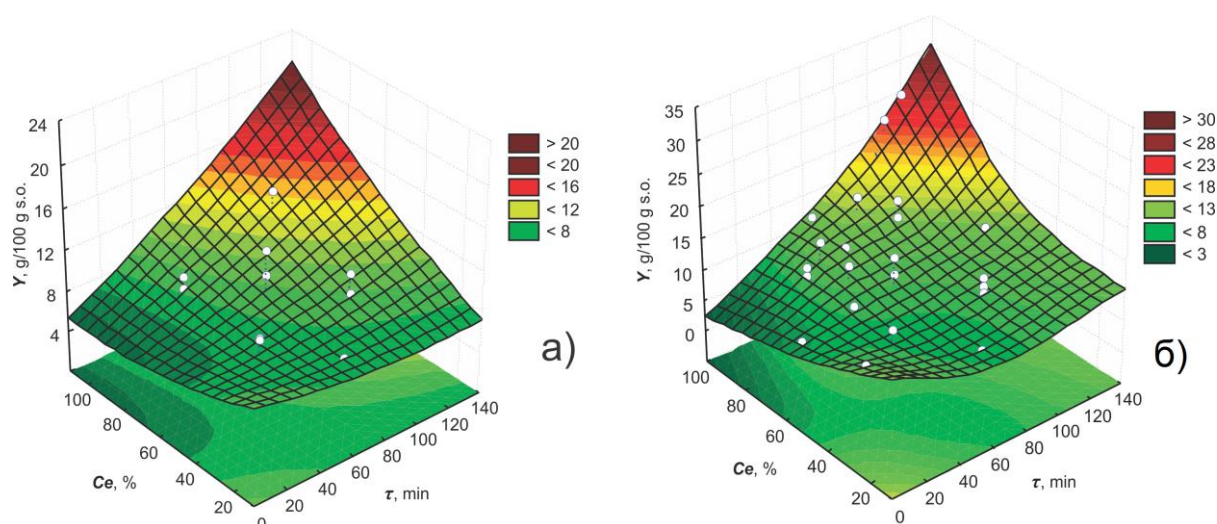
Око 70% укупног броја експеримената искоришћено је за тренирање неуронских мрежа, док је по 15% узето за тестирање и валидацију од укупно 35 расположивих експеримената. Као улазне величине за неуронску мрежу посматране су време екстракције, концентрација етанола, солвомодул и температура екстракције, док је принос амигдалина у добијеним екстрактима дефинисан као излазна променљива. За сваку тренирану мрежу израчунате су вредности грешака и корелационих коефицијената на основу којих је омогућен одабир оптималне топологије. Оптимална неуронска мрежа која је тренирана до минималне вредности SSE грешке, састојала се из три слоја (слика 39). Процес тренирања вршен је све до 138. циклуса и то по алгоритму повратне пропагације. Експоненцијална функција искоришћена је као активациона у скривеном слоју од три неурона, док је линеарна функција изабрана за излазни слој. У оквиру улазног и скривеног слоја налази се још по један градивни елемент, биас. Добијени модел вишеслојног перцептрона може да се прикаже као MLP (4-3-1), где је јасно приказана архитектура оптималне неуронске мреже. Генерализација мреже урађена је одмах након процеса тренирања са циљем провере исправности предложеног модела за предвиђање приноса амигдалина у екстрактима.



Слика 39. Оптимална неуронска мрежа са дијаграмом развоја грешке у току процеса тренирања и тестирања мреже

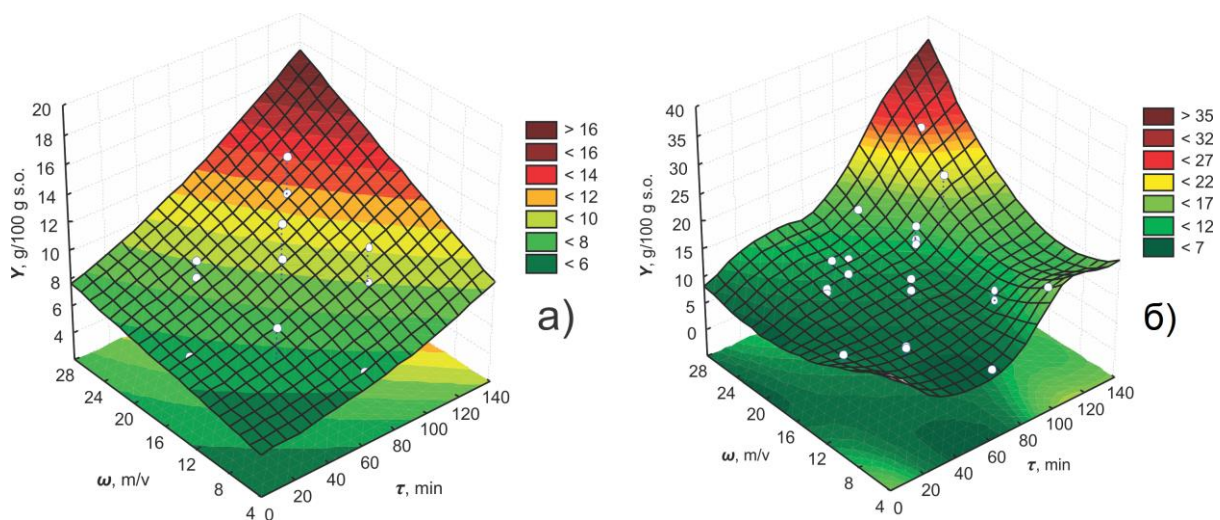
На сликама 40-45 приказано је на који начин процесни параметри утичу на принос амигдалина из семена шљиве у виду тродимензионалних дијаграма за оба модела. Помоћу оваквог начина приказа зависности могуће је сагледати боље промену

одзивне величине. Сликама 40а и 40б приказана је зависност између времена екстракције и концентрације етанола при солвомодулу 1:15 (m/v) на температури 50 °C за CCD и MLP модел, респективно. Изглед површина датих зависности готово да је идентичан за оба модела. ANOVA тест указује да је овај члан у полиномној једначини статистички значајан, тако да постоји јака интеракција између процесних варијабли. Са слике се примећује да време екстракције не утиче значајно на принос амигдалина при нижим концентрацијама етанола, што није случај при вишим вредностима концентрација. Код екстракције растварачима који имају већи садржај етанола, са продужењем времена екстракције долази до наглог повећања садржаја жељене компоненте у екстрактима. Слично се уочава да при краћим временима екстракције промена растварача не игра важну улогу у повећању садржаја амигдалина, док при дужим временима екстракције његов садржај расте са повећањем удела етанола. То је донекле и очекивано с обзиром да је амигдалин у воденим растворима изложен јачем дејству емулзина, а поред тога и конвертовању у његов неактиван епимерни облик, неоамигдалин (L-манделонитрил-β-D-гентобиозид) (Lv и сар., 2005; Коо и сар., 2005). У случају концентрованијих раствора највероватније долази до деактивације ензима, тако да молекула амигдалина остаје у неизмењеном облику. И поред тога што је растворљивост амигдалина већа у води у поређењу са етанолним растворима (табела 2), због дејства ензима његов садржај је мањи у екстрактима добијеним применом овог растварача.



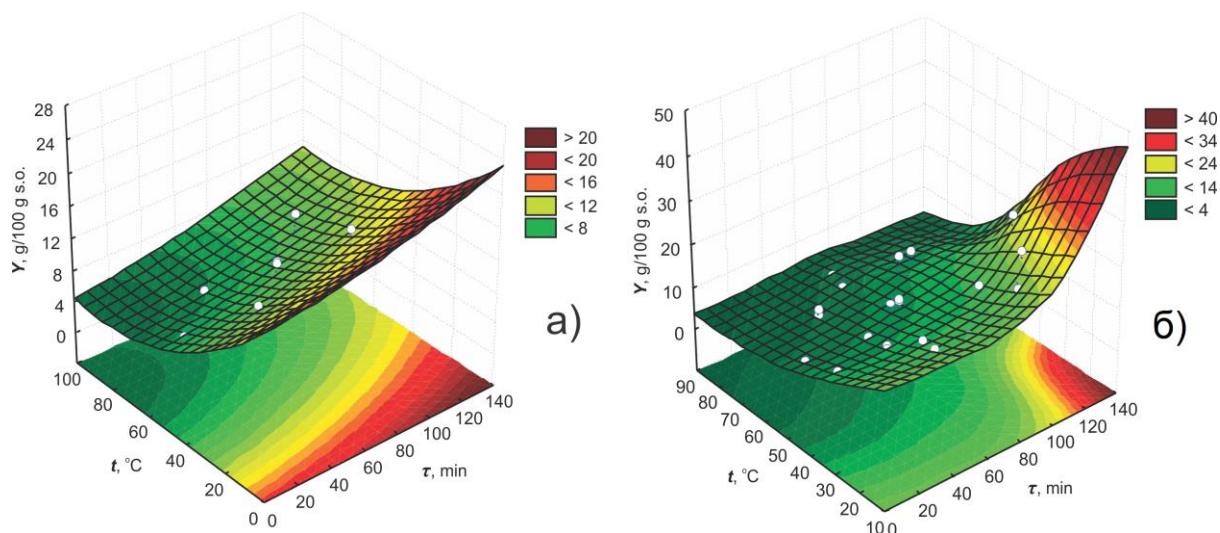
Слика 40. Утицај времена екстракције и концентрације етанола на принос екстрахованог амигдалина при солвомодулу 1:15 (m/v) на температури 50 °C за модел: а) CCD и б) MLP

Зависност приноса амигдалина у функцији од времена екстракције и солвомодула коришћењем 60% (v/v) етанола на температури 50 °C приказан је на слици 41. Утицај посматраних параметара на одзивну величину готово да је идентичан. Са повећањем њихових вредности долази до повећања приноса амигдалина. До већег пораста приноса амигдалина са продужењем времена екстракције долази при већим вредностима солвомодула. Значајан утицај солвомодула изражен је тек при дужим временима екстракције. Дакле, са слике се јасно уочава да је принос амигдалина највећи при солвомодулу већем од 1:15 (m/v) и времену екстракције дужем од 100 min.



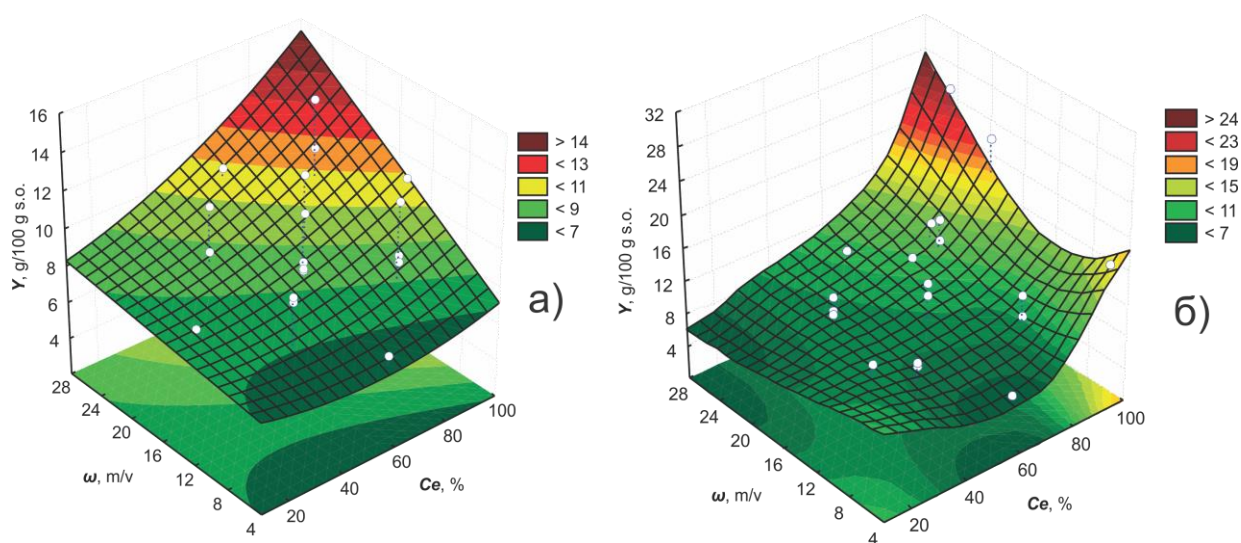
Слика 41. Утицај времена екстракције и солвомодула на принос екстрахованог амигдалина коришћењем 60% (v/v) етанола на температури 50 °C за модел: **а)** CCD и **б)** MLP

На слици 42 приказани су дијаграми зависности приноса амигдалина од времена екстракције и температуре употребом 60% (v/v) етанола при солвомодулу 1:15 (m/v). Количина амигдалина у екстрактима већа је при нижим температурама, док са повећањем температуре садржај амигдалина опада. Стога за екстракцију амигдалина из семена шљиве није препоручљива висока температура екстракције. Време екстракције има значајан допринос на повећање садржаја амигдалина у екстрактима при нижим температурама екстракције, док је при вишим температурама овај утицај занемарљив. Температуре ниже од 50 °C погодују екстракцији амигдалина из одабраног биљног материјала (семена шљиве).



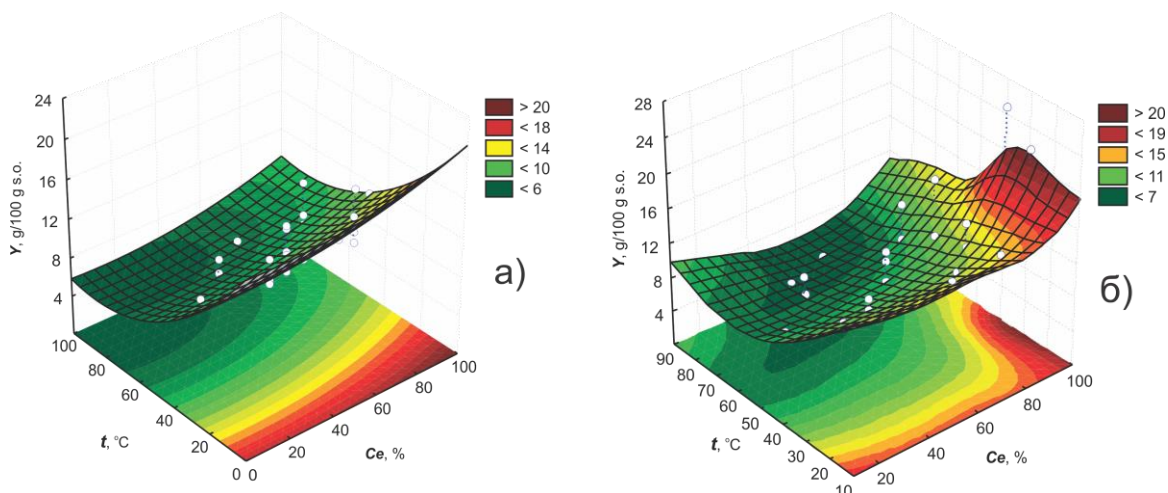
Слика 42. Утицај времена екстракције и температуре на принос екстрахованог амигдалина употребом 60% (v/v) етанола при солвомодулу 1:15 (m/v) за модел: **а)** CCD и **б)** MLP

Утицај концентрације етанола и солвомодула за време екстракције 65 min на температури 50 °C приказан је тродимензионалним дијаграмом за CCD и MLP модел на слици 43а и 43б, респективно. Концентрација етанола има значајан ефекат на садржај амигдалина у екстрактима добијеним при вишим вредностима солвомодула. Слично понашање је и код сагледавања утицаја солвомодула, где је значајан допринос у повећању садржаја амигдалина уочен при концентрацијама етанола већим од 80% (v/v). Дакле, највиши принос је у области солвомодула 1:18–1:25 (m/v) и области концентрација етанола 80–100% (v/v).



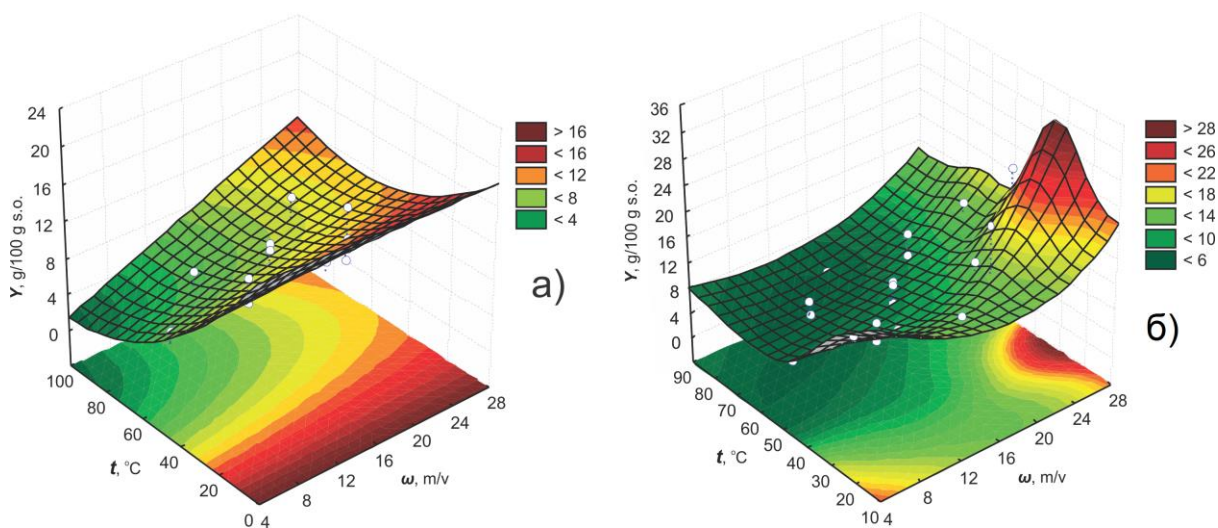
Слика 43. Утицај концентрације етанола и солвомодула на принос екстрахованог амигдалина за време екстракције 65 min на температури 50 °C за модел: **а)** CCD и **б)** MLP

Код интеракције X_2X_4 за време екстракције 65 min и солвомодул 1:15 (m/v) утицај концентрације етанола је слабије изражен (слика 44). Највиша количина екстрахованог амигдалина запажена је применом апсолутног етанола. Са порастом температуре уочава се да садржај амигдалина опада, што је израженије код растварача са већим уделом воде, највероватније због тенденције да епимеризује у воденим медијумима.



Слика 44. Утицај концентрације етанола и температуре на принос екстрахованог амигдалина за време екстракције 65 min при солвомодулу 1:15 (m/v) за модел: а) CCD и б) MLP

Зависност приноса амигдалина у функцији солвомодула и температуре за време екстракције 65 min и 60% (v/v) етанол дата је на слици 45. Ефекат солвомодула на садржај амигдалина може да се занемари за температуре ниже од 30 °C. Код екстракције при вишим температурама, садржај амигдалина повећава се са повећањем солвомодула.



Слика 45. Утицај солвомодула и температуре на принос екстрахованог амигдалина за време екстракције 65 min употребом 60% (v/v) етанола за модел: а) CCD и б) MLP

Поређење ефикасности предложених модела за предвиђање приноса амигдалина приликом поступка екстракције из семена шљиве вршено је на основу вредности грешака и корелационих коефицијената. Код CCD модела постоји добро слагање између вредности коефицијената корелација, што указује на ваљаност предложеног модела. У табели 29 дате су поред вредности за CCD модел и вредности грешака и коефицијената корелација за MLP модел у току процеса тренирања, тестирања и валидације.

Табела 29. Вредности параметара коефицијената корелације и грешака за моделе централног композитног дизајна и вишеслојног перцептрона

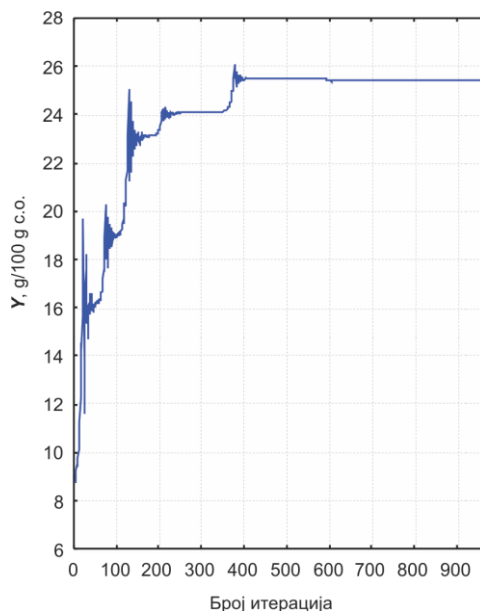
Централни композитни дизајн																			
RMSE		MSE		MAE		R ²		Q ²											
0,2964		0,0878		0,2468		0,9847		0,9847											
Вишеслојни перцептрон																			
тренирање					тестирање					валидација					укупно				
RMSE	MSE	MAE	R ²	Q ²	RMSE	MSE	MAE	R ²	Q ²	RMSE	MSE	MAE	R ²	Q ²	RMSE	MSE	MAE	R ²	Q ²
0,3189	0,1017	0,2530	0,9850	0,9850	0,1289	0,0166	0,1090	0,9991	0,9963	0,2551	0,0651	0,1813	0,9991	0,9983	0,2903	0,0843	0,2221	0,9954	0,9873

Вредности грешака и коефицијената корелација обрачунавани су и на укупном нивоу, односно узимањем у обзир свих података који су ушли у разматрање овог модела. Добијени подаци указују да модел ANN има боље перформансе у поређењу са моделом експерименталног дизајна, јер су вредности грешака мање приликом предвиђања приноса екстрахованог амигдалина.

Нумеричком оптимизацијом добијени су оптимални услови екстракције амигдалина. Оптимално време екстраховања било је 116,3 min применом 100% (v/v) етанола при солвомодулу 1:24,3 (m/v) и температури 32,1 °C. Принос који се предвиђа предложеним моделом је 22,2 g/100 g с.о. У циљу провере перформанси модела, при предложеним оптималним условима извршена је екстракција и утврђено да постоји добро слагање између експерименталне (22,3 g/100 g с.о.) и предложене вредности приноса.

Симплекс методом оптимизован је поступак екстракције који је описан MLP моделом (слика 46). Након 400 итерација добијени су оптимални услови и то време

екстракције 120 min, 100 % (v/v) етанол, однос биљне сировине и растварача 1:25 (m/v) и температура екстракције 34,4 °С. Принос који се предвиђа овим моделом при датим условима је 25,42 g/100 g с.о. и поприлично је усаглашен са експериментално добијеном вредношћу 25,30 g/100 g с.о.



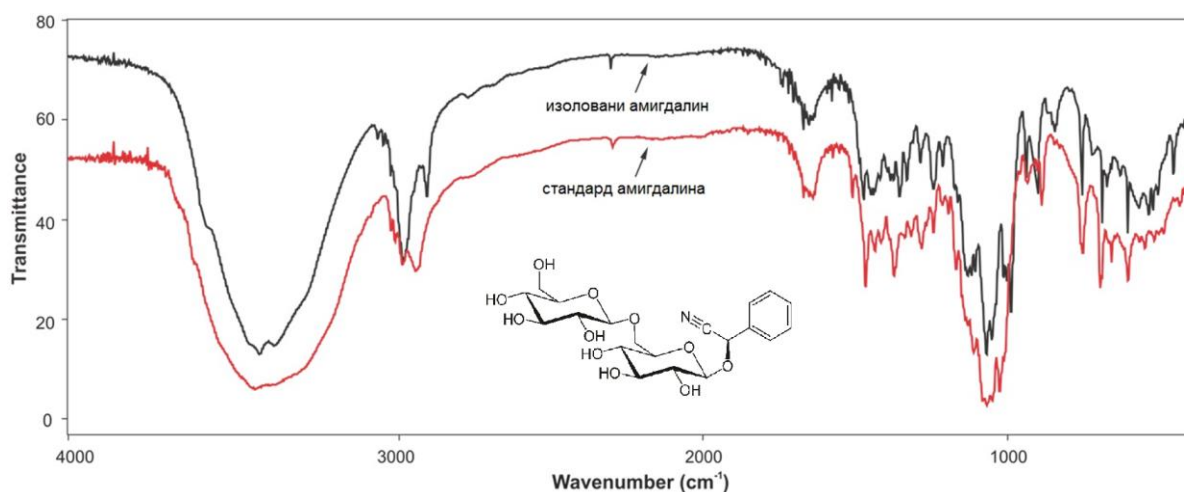
Слика 46. Максимизација приноса амигдалина применом симплекс методе код MLP модела

Оптимални услови без обзира што су добијени потпуно различитим моделима су готово идентични са том разликом што се по CCD моделу примењује краће време екстракције, мањи солвомодул и нижа температура екстракције. Међутим, применом MLP модела добија се већи принос амигдалина у просеку за око 3 g/100 g с.о.

Литературни подаци за екстракцију амигдалина из полена бадема постигнути су ултразвучним третманом од 30 min применом 100% (v/v) етанола при солвомодулу 1:7 (m/v). Време екстракције у овом случају било је 12 h (Zhang и сар., 2007). За екстракцију амигдалина из јапанске мушмуле (*Eriobotrya japonica*) уз рефлукс, оптимални услови су добијени применом 65% (v/v) етанола при солвомодулу 1:10 (m/v) и температури 60 °С након 45 min (Liu и сар., 2012). Заједничко за оптималне услове пронађене у литератури и оне добијене овим истраживањем јесте слична концентрација употребљеног етанола и дужина трајања екстракције упркос различитим изворима амигдалина. За разлику од поступака нађених у литератури, код поступка екстракције амигдалина из семена шљиве примењује се нижа температура, а већи однос биљне сировине и растварача.

4.2.4. Изолација амигдалина

Иzolовани амигдалин из екстракта семена шљиве је бели прах без мириса, чија је чистоћа (>90%) утврђена поређењем са расположивим стандардом амигдалина применом HPLC методе. У циљу структурне карактеризације изолованог амигдалина примењена је ИС спектроскопска метода, којом је потврђено присуство функционалних група заступљених код стандарда амигдалина. ИС спектри изолованог амигдалина и његовог стандарда приказани су на слици 47. Уочена висока сличност спектра указује на задовољавајућу чистоћу и погодно одабрану методу за изолацију амигдалина.

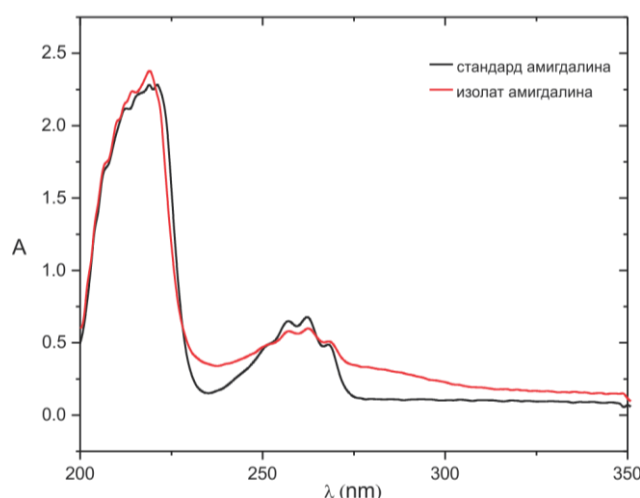


Слика 47. ИС спектри изолованог и стандардног амигдалина

У структури амигдалина присутне су примарне и секундарне хидроксилне групе и то у шећерном делу молекула за које су карактеристичне траке у области од 3640 до 3630 cm^{-1} , респективно. У спектрима стандарда и изолованог амигдалина оне се јављају на истим фреквенцијама у виду интензивних и широких трака са два превоја. Превој ка вишој фреквентној страни одговара валенционим вибрацијама примарне хидроксилне групе, а превој ка нижој фреквентној страни одговара валенционим вибрацијама секундарних хидроксилних група. Валенционе вибрације С-О веза, дају траке на 1050 и 1100 cm^{-1} , респективно, из примарних и секундарних група шећерног дела молекула и оне су такође присутне у спектрима стандарда и изолованог амигдалина. Карактеристично је да у структури амигдалина постоји циклична и ациклична етарска веза. Ова последња С-О-С веза повезује шећерни део са остатком молекула. На једном етарском С атому постоји рачвање које доводи до цепања траке од асиметричних валенционих вибрација етарске групе која се у оба спектра јавља на око 1100 cm^{-1} , а

која се иначе налази у опсегу од 1150 до 1070 cm^{-1} . Постојање цикличне С-О-С, асигнира трака јаког интензитета која се јавља у опсегу од 1300 до 1000 cm^{-1} , а у спектрима је присутна као комплексна трака на 1150 cm^{-1} . На присуство CN групе указује оштра трака средње јачине која пада у област од 2260 до 2210 cm^{-1} , а која се у спектрима стандарда и изолованог амигдалина јавља на 2200 cm^{-1} . Две траке на 1600 и 1400 cm^{-1} су резултат валенционих вибрација С=С групе из прстена бензена. У области од 3100 до 3000 cm^{-1} апсорбују С-Н валенционе вибрације ароматичних једињења и у спектрима у овој области постоји трака средње јачине на око 3000 cm^{-1} , док превој према нижој фреквентној страни одговара валенционим вибрацијама од алифатичних С-Н група присутних у структури амигдалина. Код ароматичних једињења С-Н деформационе вибрације дају интензивне максимуме у области од 900 до 690 cm^{-1} . Положај ових трака зависи од броја и распореда супституената због чега су оне веома важне. Пошто је у овом случају пет суседних Н атома, у спектрима треба очекивати појаву траке на 750 cm^{-1} која би указивала да је бензен моносупституисан. Ова трака од скелетних деформационих вибрација постоји у оба спектра амигдалина и јавља се на око 690 cm^{-1} . Област деформационих С-Н вибрација код ароматичних једињења налази се у опсегу таласних бројева од 1300 до 1000 cm^{-1} и у спектрима у овој области постоји трака на 1450 cm^{-1} која асигнира ове вибрације. На основу добијеног ИС спектра изолованог амигдалина може се закључити да је задовољавајуће чистоће.

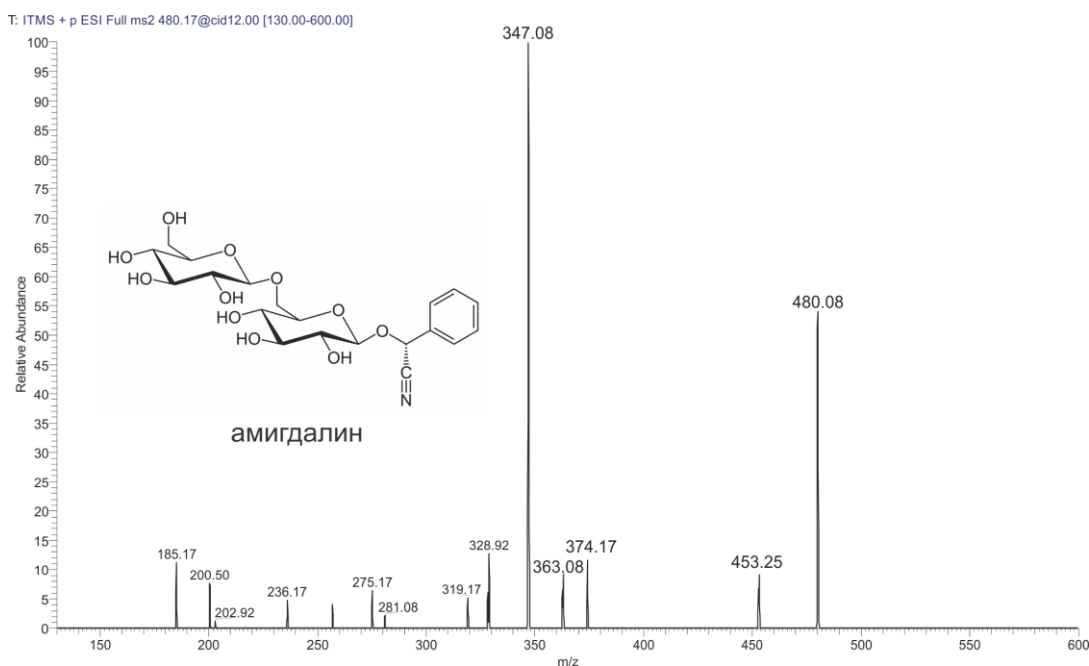
Додатна структурна карактеризација изолованог амигдалина извршена је и применом UV методе. Узорци изолованог амигдалина и стандарда су пре снимања растворени у метанолу до реда истих концентрација и након тога снимани на UV спектрофотометру (слика 48).



Слика 48. UV спектри изолованог и стандардног амигдалина (50 mg dm^{-3}) снимљених у метанолу

С обзиром да молекула амигдалина у својој структури садржи ароматични систем, у UV спектру очекују се апсорпциони максимуми који потичу од $\pi \rightarrow \pi^*$ прелаза и јављају се на 184, 203 и 256 nm. Трака на најмањој таласној дужини потиче од дозвољеног прелаза, а преостале две од забрањених прелаза. Најинтензивнији апсорпциони максимум није од већег значаја за идентификацију ове хромофоре, зато што се у спектрима већина супституисаних бензена налази на сувише малим таласним дужинама – у вакуумској ултраљубичастој области. Преостале две траке, примарна и секундарна, лако се препознају и налазе се у блиској ултраљубичастој области. Секундарна (забрањена) трака јавља се захваљујући деформацији прстена услед вибрација које нарушавају симетрију због које је овај прелаз забрањен. Ово је основни разлог појаве електронско – вибрационе фине структуре секундарне траке у спектрима бензена и других аромата. У случају амигдалина добијени су поменути апсорпциони максимуми на 215 nm, као и између 250-254 nm, 255-259 nm, 261-265 nm и 267-271 nm. Апсорпциони максимум CN групе у анализираном медијуму није уочен на око 300 nm, због његовог слабог интензитета.

Иzolованом амигдалину снимљен је и MS² спектар у циљу његове даље структурне карактеризације. На слици 49 приказан је масени спектар амигдалина снимљен у позитивном моду након дејства колизионе енергије од 12 eV.



Слика 49. Масени спектар изолованог амигдалина (позитиван јонизациони мод)

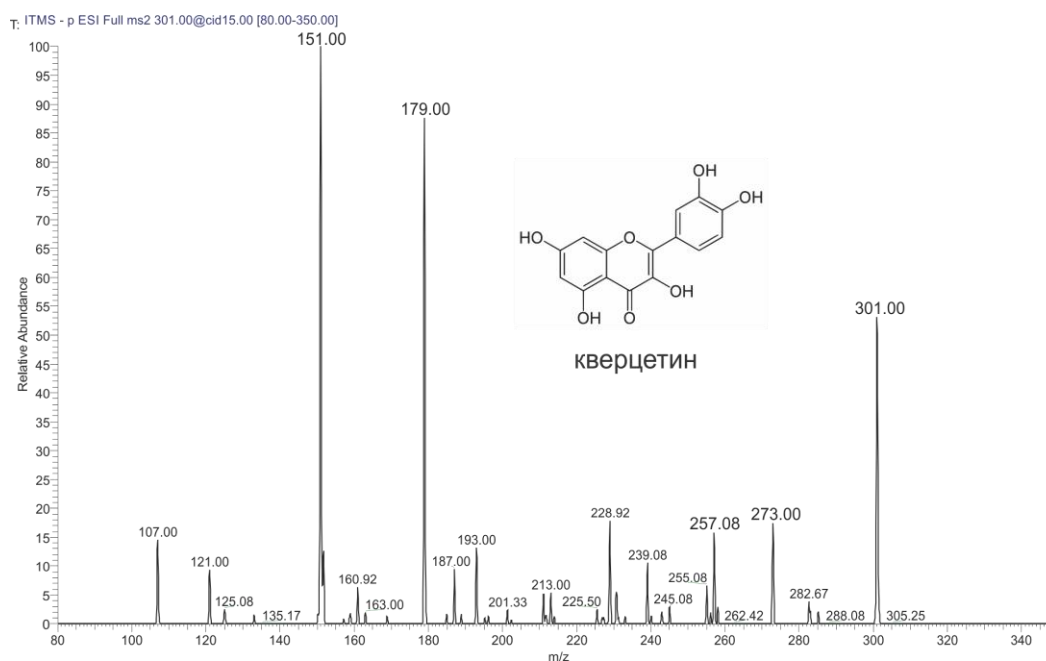
У овом масеном спектру може се уочити молекулски пик на m/z 480, који се јавља након грађења адукта са натријумом $[M+Na-H]^+$. Протоновани молекулски јон на

m/z 458 није уочен у масеном спектру. Фрагментацијом овог основног јона долази до појаве пикова на m/z 453, 374, 363 и 347 (Ge и сар., 2007). Пикови на m/z 453 и 363 настају као последица губитка неутралних фрагмента HCN и C₈H₇N. Најзаступљенији производ на m/z 347 формира се губитком неутралног фрагмента, манделонитрила (C₈H₇NO), од основног јона на m/z 480. Јонски производ на m/z 374 јавља се услед губитка C₇H₈N од основног јона на m/z 480.

4.3. ESI-MS/MS анализа екстракта зеленог чаја

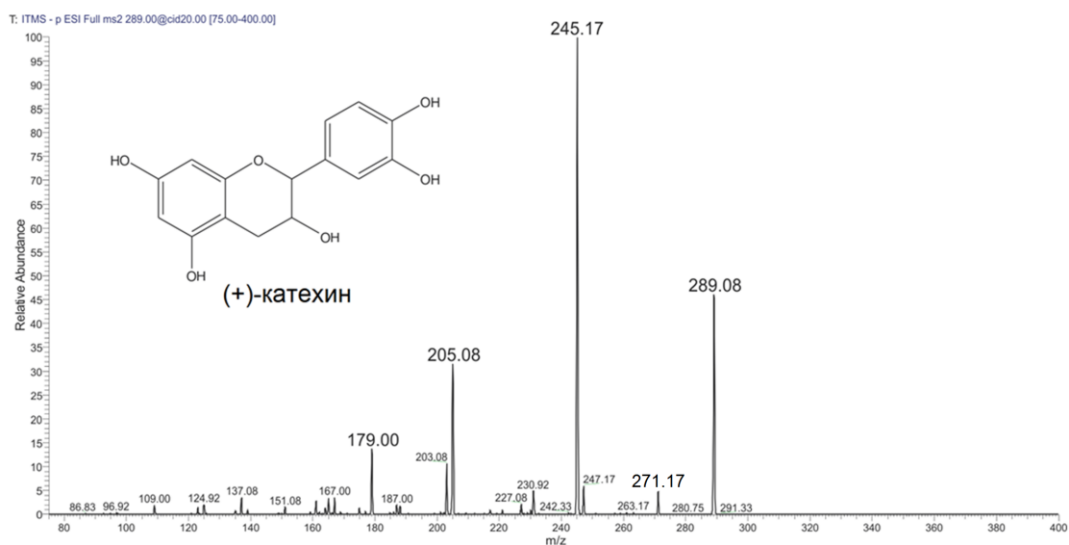
Идентификација главних фенолних компоненти и пуринских алкалоида у екстракту зеленог чаја, добијеног при оптималним условима екстракције, вршено је применом ESI-MS/MS методе. Поред кверцетина у екстракту зеленог чаја, потврђено је присуство 17 фенолних компонента на основу поређења m/z вредности у MS² спектрима са литературним вредностима за стандарде (Bravo и сар., 2006). Приликом снимања примењени су негативан и позитиван јонизациони мод. Позитиван јонизациони мод примењен је за идентификацију теобромина и кофеина, док су остале компоненте одређиване у негативном моду.

Након дејства колизионе енергије од 15 eV и снимања у негативном јонизационом моду добијен је масени спектар кверцетина (слика 50). Пик који се јавља на m/z 301 представља молекулски јон. Његовом даљом фрагментацијом добијају се јони на 273, 257, 179, 151, који су у складу са литературним подацима (Mullen и сар., 2003).



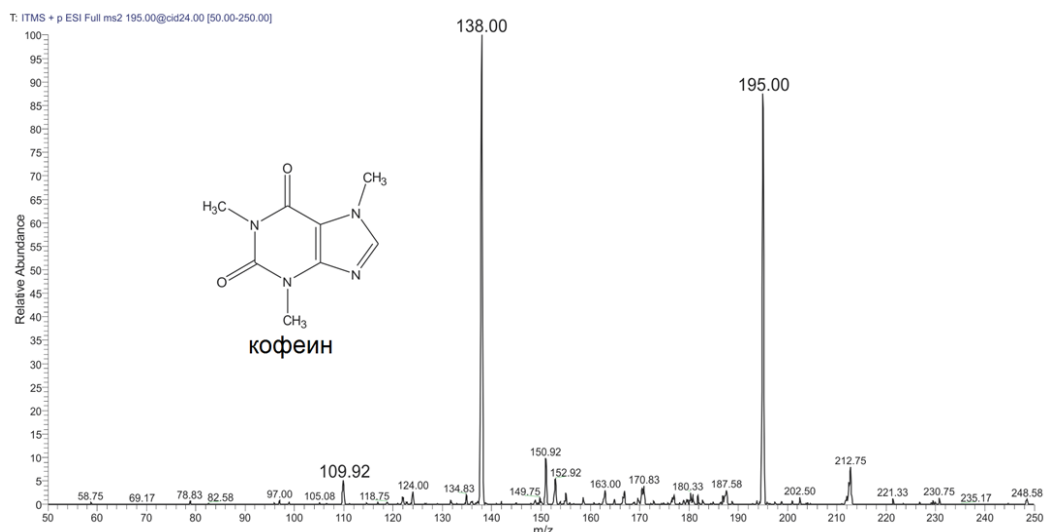
Слика 50. Масени спектар кверцетина (негативан јонизациони мод)

Масени спектар (+)-катехина приказан је на слици 51. Пик депротонваног јона $[M-H]^-$ јавља се на m/z 289. MS^2 анализом јона прекурсора чији се сигнал у спектру јавља на m/z 289 након деловања колизионе енергије од 20 eV, добија се неколико фрагментних јона са сигнаlima у спектру на m/z 271, 245, 205 и 179 (Bravo и сар., 2006). Фрагментни јон на m/z 205 је вероватно настао услед губитка прстена А посматраног флавоноида, док јон на m/z 245 може бити резултат губитка CO_2 групе или губитка двовалентне $-CH_2-CHOH-$ групе. Фрагмент на m/z 271 резултат је губитка молекула воде коме одговара 18 јединица (Stöggli и сар., 2004), а фрагмент на m/z 179 настаје услед губитка Б-прстена из молекула флавоноида.



Слика 51. Масени спектар (+)-катехина (негативан јонизациони мод)

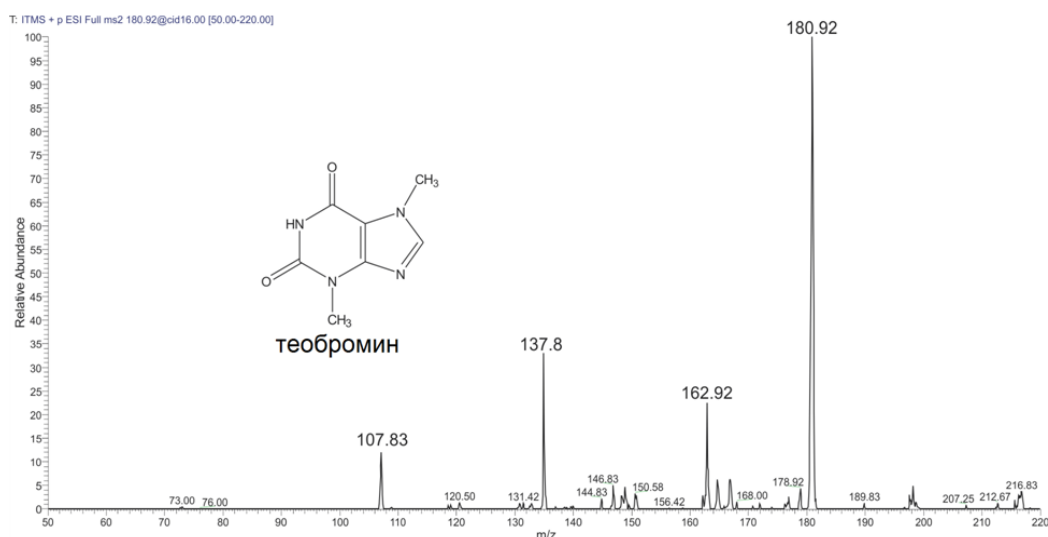
Прекурсор јон који даје сигнал у спектру на m/z 195 и фрагментни јони на m/z 138 и 110 су резултат фрагментације молекула кофеина (слика 52).



Слика 52. Масени спектар кофеина (позитиван јонизациони мод)

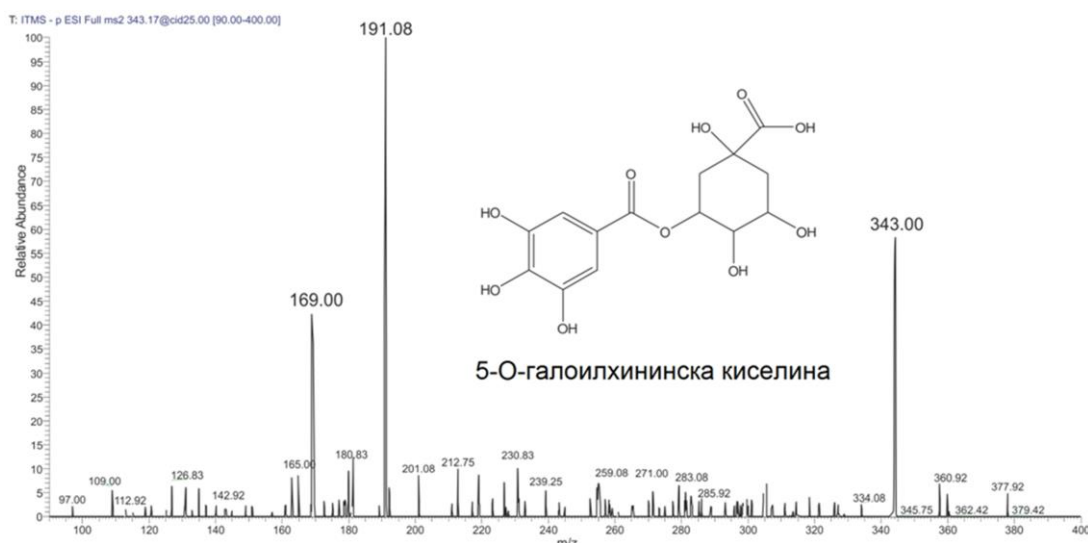
Фрагментни јон на m/z 138 настао је највероватније услед губитка $\text{CH}_3\text{-N}=\text{C}=\text{O}$, чијим даљим губитком CO настаје јон коме одговара сигнал на m/z 110 у масеном спектру (Collings и Romaschin, 2009). Дати масени спектар добијен је након дејства колизионе енергије од 24 eV и снимањем у позитивном јонизационом моду.

Масени спектар теобромина добијен је снимањем у позитивном јонизационом моду након деловања колизионе енергије од 16 eV. Његов спектар има јасно уочљиви основни фрагментни јон на m/z 181 и фрагментне јоне добијене из основног јона чији се сигнали јављају на m/z 163, 138 и 108 (слика 53).



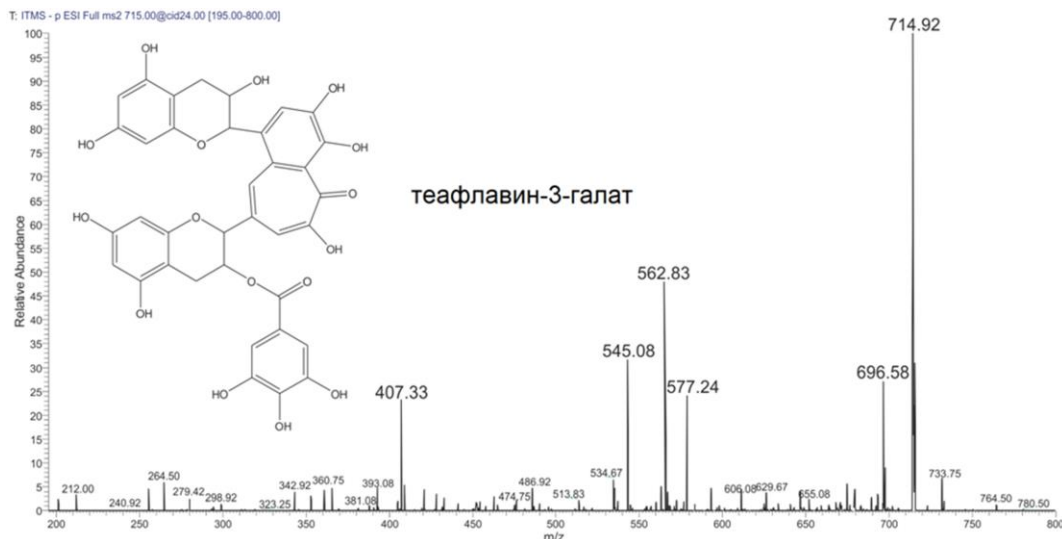
Слика 53. Масени спектар теобромина (позитиван јонизациони мод)

Масени спектар 5-О-галоилхининске киселине сниман је у негативном јонизационом моду (слика 54). Основни депротоновани јон 5-О-галоилхининске киселине јавља се на m/z 343, док се MS^2 фрагментни јони могу запазити на m/z 191 и 169. Настали јони су резултат деловања колизионе енергије од 25 eV.



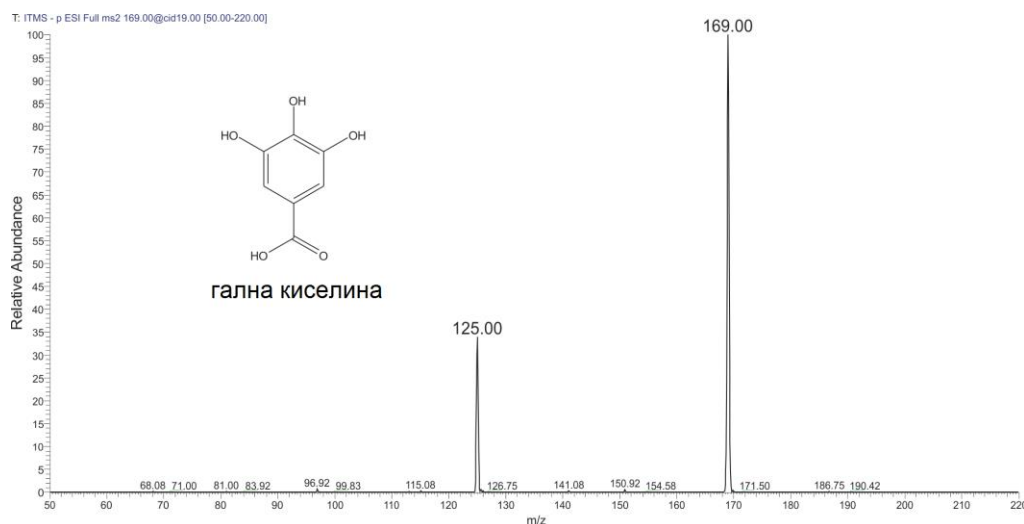
Слика 54. Масени спектар 5-О-галоилхининске киселине (негативан јонизациони мод)

MS² спектар теафлавин-3-галата добијен је снимањем у негативном јонизационом моду и деловањем колизионе енергије од 24 eV. У спектру се јасно уочавају добијени фрагментни јони који дају сигнале на m/z 697, 577, 563, 545 и 407 (слика 55).



Слика 55. Масени спектар теафлавин-3-галата (негативан јонизациони мод)

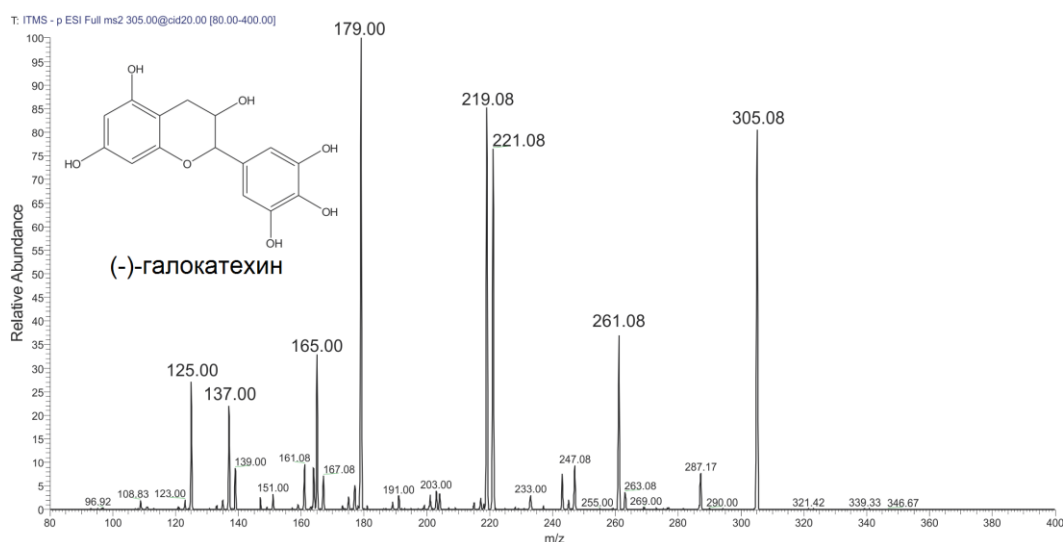
Снимањем у негативном јонизационом моду успешно је идентификовано присуство галне киселине, за коју је карактеристичан сигнал на m/z 169, а који потиче од $[M-H]^-$ јона (слика 56). Даљом фрагментацијом основног јона добија се сигнал на m/z 125, који највероватније настаје губитком угљен-диоксида. За добијање овог спектра примењена је колизиона енергија од 19 eV.



Слика 56. Масени спектар галне киселине (негативан јонизациони мод)

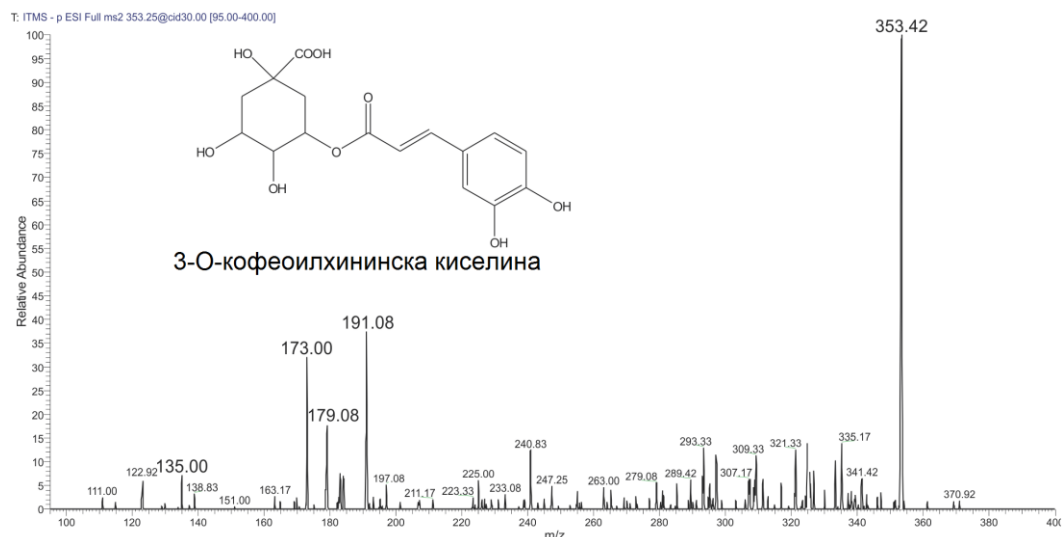
Код масеног спектра (-)-галокатехина добијеног снимањем у негативном јонизационом моду при колизионој енергији од 20 eV, основни фрагмент даје сигнал на

m/z 305 (слика 57). Овај депротоновани јон даје MS^2 фрагментне јоне који се јављају на m/z 261, 221, 219, 179 и 165 услед губитка CO_2 , $C_4H_4O_2$, $C_6H_6O_3$, $C_7H_6O_3$ и $C_7H_8O_3$, респективно (Sun и сар., 2007). Губитак $C_4H_4O_2$ и $C_4H_6O_2$ дешава се услед цепања прстена А флаван-3-ола. Губитак $C_6H_6O_3$ је последица преуређивања у хетероцикличном прстену (Monagas и сар., 2005), док је губитак $C_7H_6O_3$ и $C_7H_8O_3$ резултат ретро-Дилс-Алдеровог преуређивања.



Слика 57. Масени спектар (-)-галокатехина (негативан јонизациони мод)

3-О-Кафеоилхининска киселина даје депротоновани јон у масеном спектру чији се сигнал јавља на m/z 353 (слика 58).

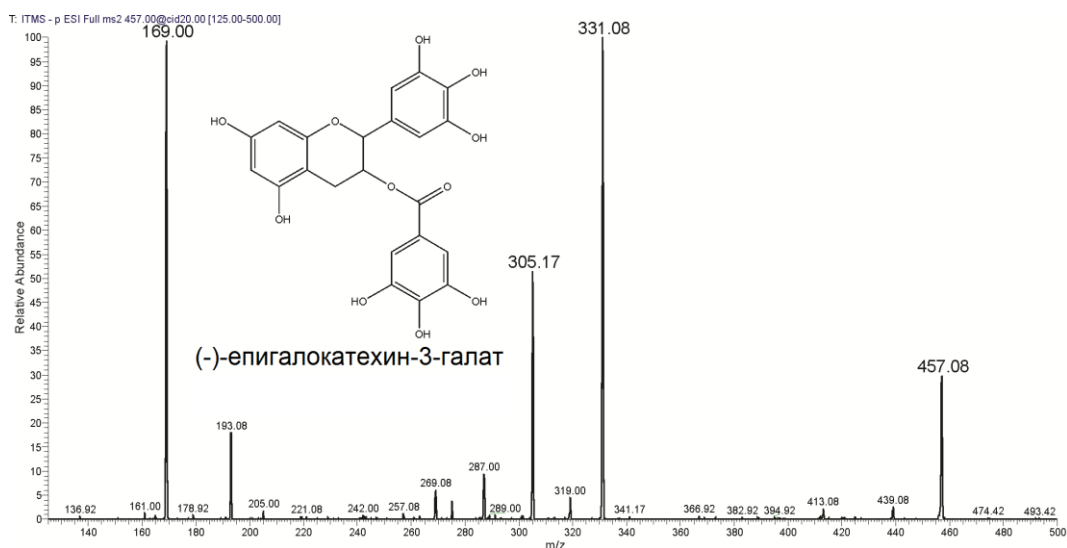


Слика 58. Масени спектар 3-О-кафеоилхининске киселине (негативан јонизациони мод)

Његовом даљом фрагментацијом након деловања колизионе енергије од 30 eV настају фрагментни јони за које су карактеристични пикови у масеном спектру на m/z 191, 179, 173 и 135. Фрагменти јон чији се сигнал јавља на m/z 191 потиче од хининске

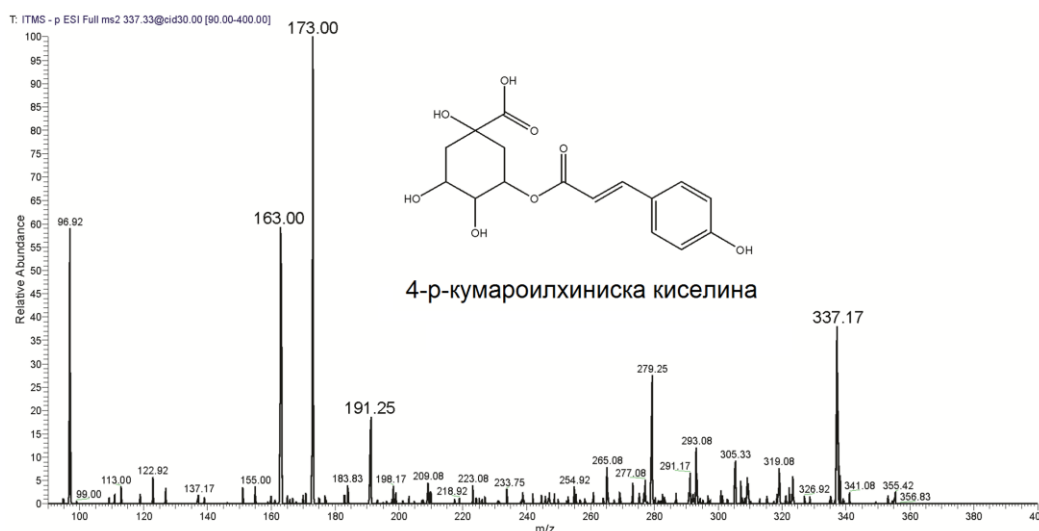
киселине (Varros и сар., 2012), док јон који има сигнал на m/z 179 потиче од кафеинске киселине (Clifford и сар., 2003; Clifford и сар., 2005).

На слици 59 дат је масени спектар (-)-епигалокатехин-3-галата, на коме се уочава пик на m/z 457 који потиче од родитељског јона $[M-H]^-$. MS^2 фрагментни јони са одговарајућим сигналимa на m/z 331, односно на m/z 305 потичу од епигалокатехина, док сигнал на m/z 169 потиче од галне киселине (Kim и сар., 2011).



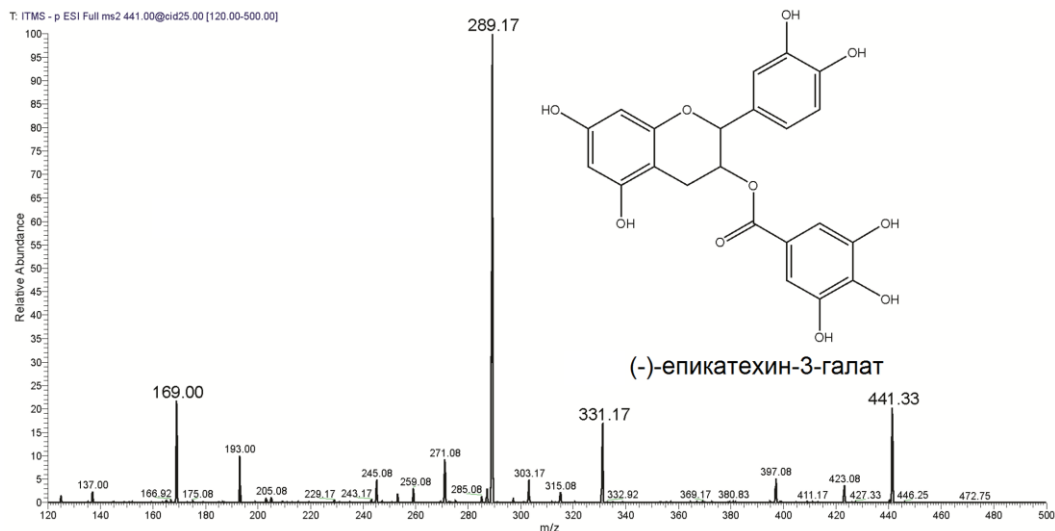
Слика 59. Масени спектар (-)-епигалокатехин-3-галата (негативан јонизациони мод)

4-*p*-Кумароилхининска киселина деопроtonовањем даје пик на m/z 337 (слика 60). MS^2 пик на m/z 191 одговара депроtonованој хининској киселини, као резултат губитка кофеинске киселине. Даљим губитком воде добија се пик на m/z 173 (Nanduti и сар., 2007).



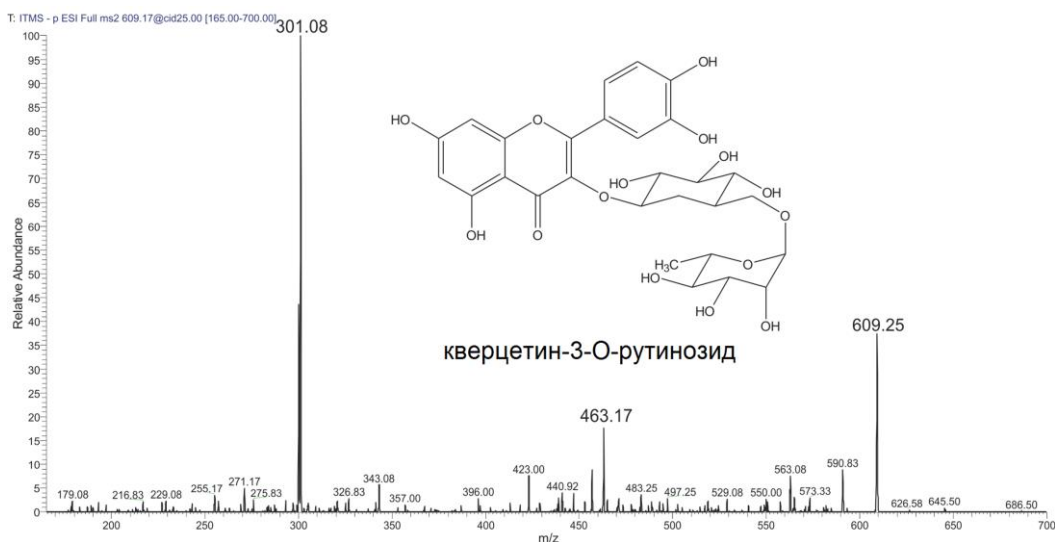
Слика 60. Масени спектар 4-*p*-кумароилхининске киселине (негативан јонизациони мод)

Масени спектар (-)-епикатехин-3-галата поред депротонованог јона $[M-H]^-$ на m/z 441 има и фрагментни јон на m/z 289, који је резултат разлагања естарске везе и одвајања галне киселине (слика 61). Разлагањем естарске везе и губитком (-)-епикатехинске јединице добија се пик у масеном спектру на m/z 169 (Sun и сар., 2007).



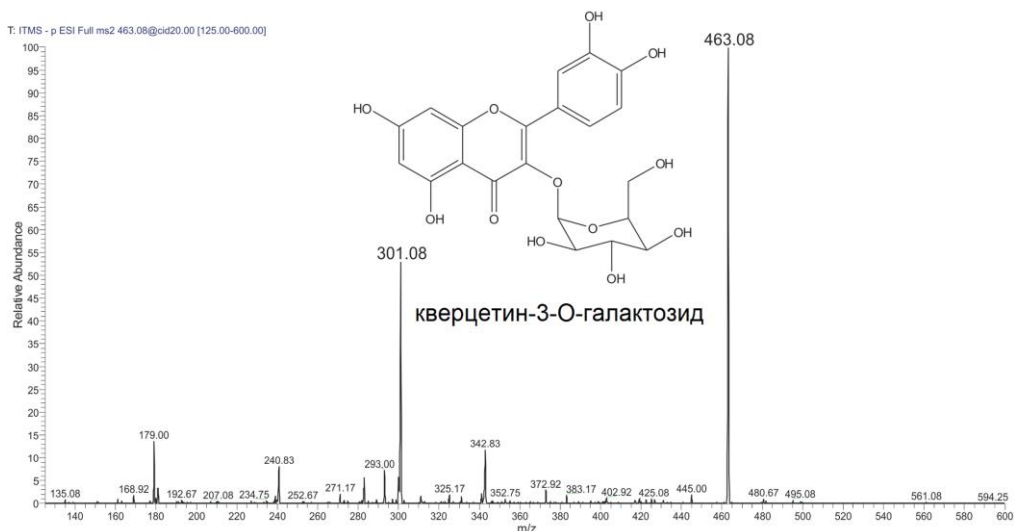
Слика 61. Масени спектар (-)-епикатехин-3-галата (негативан јонизациони мод)

Масени спектар кверцетин-3-О-рутинозида добијен је снимањем у негативном јонизационом моду (слика 62). За кверцетин-3-О-рутинозид основни јон налази се на m/z 609, док се фрагментни јони јављају на m/z 463 као последица губитка рамнозе. Даљим губитком молекула глукозе добија се сигнал на m/z 301.



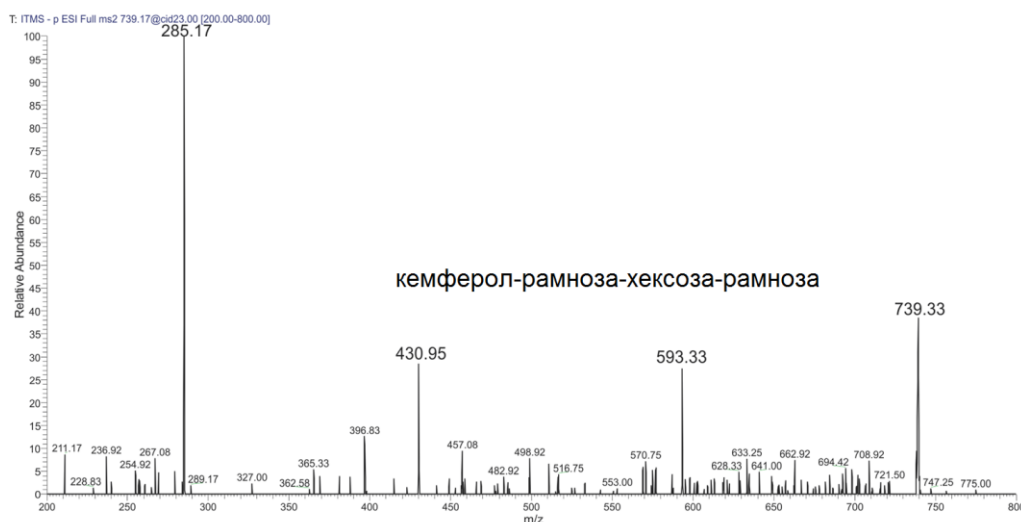
Слика 62. Масени спектар кверцетин-3-О-рутинозида (негативан јонизациони мод)

MS^2 спектар кверцетин-3-О-галактозида добијен је снимањем у негативном јонизационом моду. Основни пик на m/z 463, након деловања колизионе енергије од 20 eV, даје пик на m/z 301 као последица губитка молекула галактозе (слика 63).



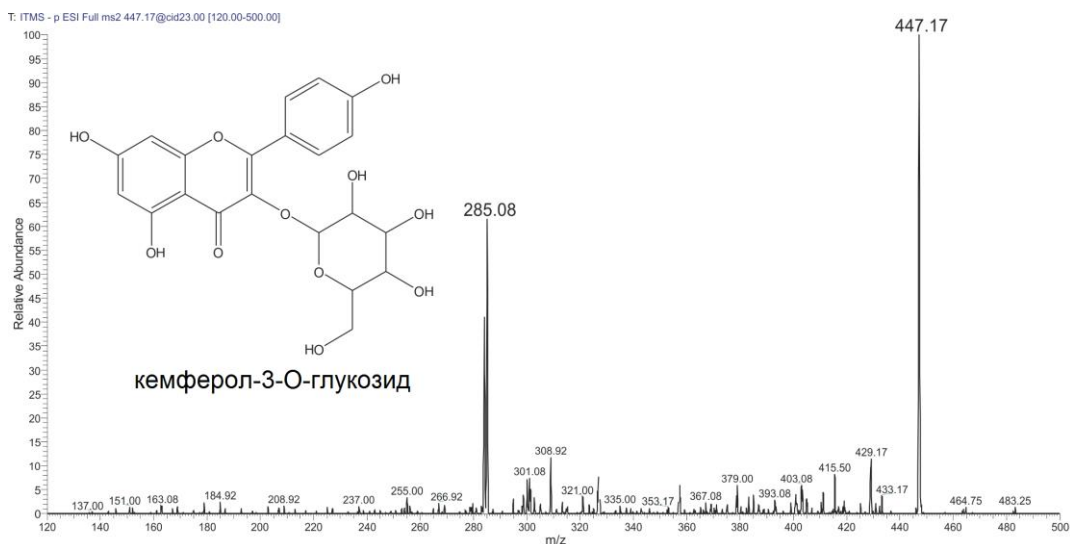
Слика 63. Масени спектар кверцетин-3-О-галактозида (негативан јонизациони мод)

MS² спектар коњугата кемферола-рамнозе-хексозе-рамнозе добијеног након деловања колизионе енергије од 23 eV и снимања у негативном јонизационом моду приказан је на слици 64. Поред депротонаног јона [M-H]⁻, који у масеном спектру има сигнал на m/z 739, јављају се и фрагментни јони на m/z 593 ([M-H]⁻-рамноза) и m/z 431 ([M-H]⁻-рамноза-хексоза). Пик на m/z 285 одговара депротонаном молекулу кемферола (Del Rio и сар., 2004).



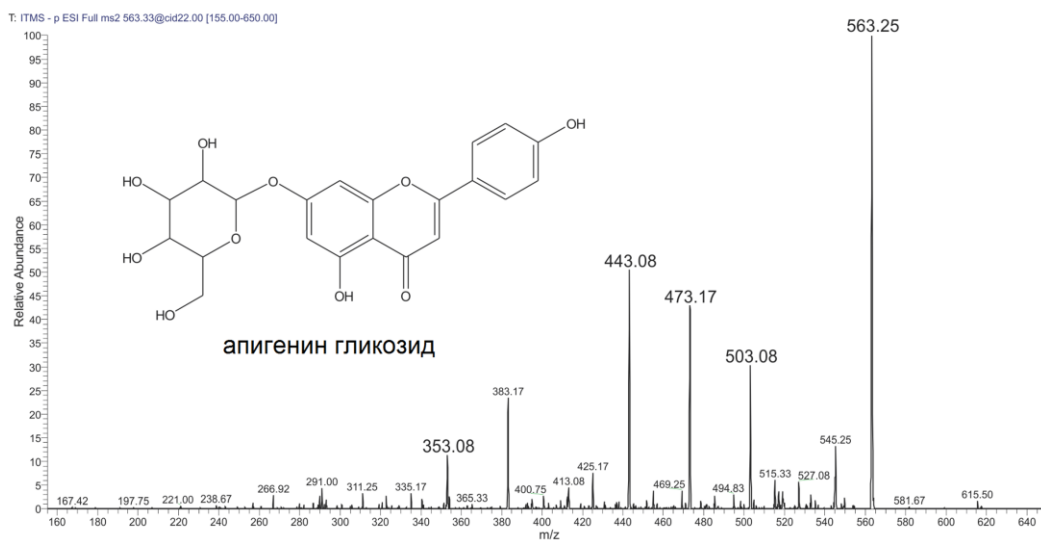
Слика 64. Масени спектар коњугата кемферола-рамнозе-хексозе-рамнозе (негативан јонизациони мод)

На слици 65 је дат масени спектар кемферол-3-О-глукозида добијеног након деловања колизионе енергије од 23 eV. Основни јон даје сигнал на m/z 447, а фрагментни јон услед губитка глукозе даје сигнал на m/z 285 у масеном спектру.



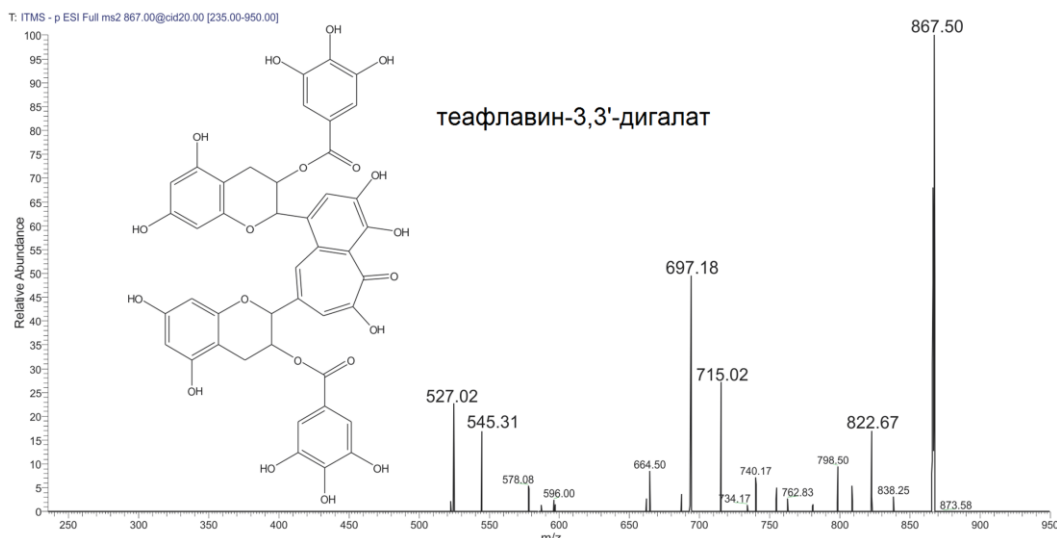
Слика 65. Масени спектар кемферол-3-О-глукозида (негативан јонизациони мод)

Већину агликона гликозилфлавоноида чине апигенин или лутеолин. На основу добијене масене фрагментације, може се закључити да се он може јавити и у облику апигенин гликозилфлавоноида (слика 66). Молекул апигенин гликозида у масеном спектру има основни јон који се јавља на m/z 563 и фрагментне јоне на m/z 503, 473, 443 и 353. Јони на m/z 443, 473 и 503 нарочито указују на присуство супституисане пентозе (Kim и сар., 2011).



Слика 66. Масени спектар апигенин гликозида (негативан јонизациони мод)

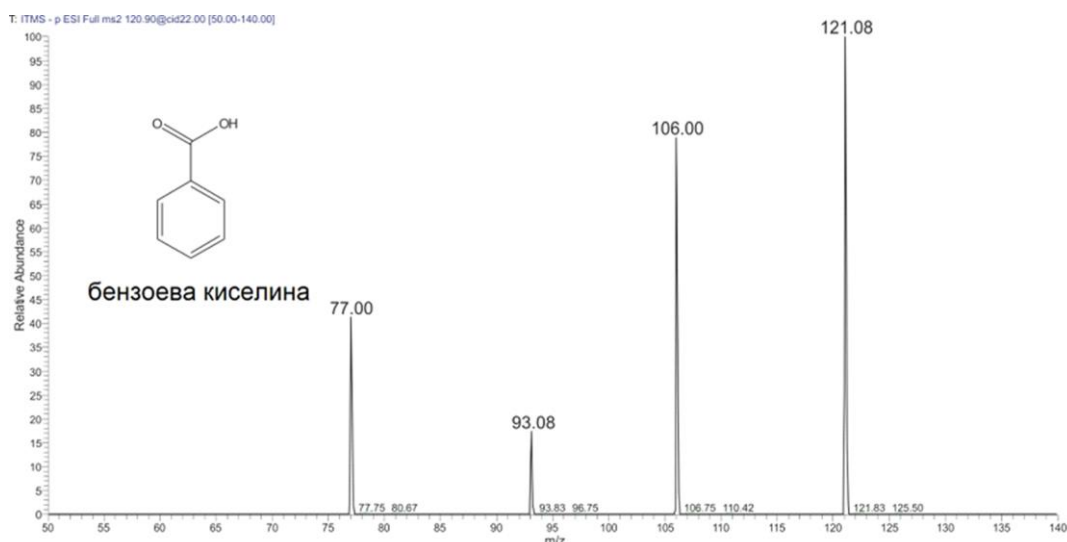
Масени спектар теафлавин-3,3'-дигалата добијен је снимањем у негативном јонизационом моду након деловања колизионе енергије од 20 eV (слика 67). Теафлавин-3,3'-дигалат депротоновањем даје сигнал на m/z 867, односно фрагментне јоне за које су карактеристични сигнали на m/z 823, 715, 697, 545 и 527.



Слика 67. Масени спектар теафлавин-3,3'-дигалата (негативан јонизациони мод)

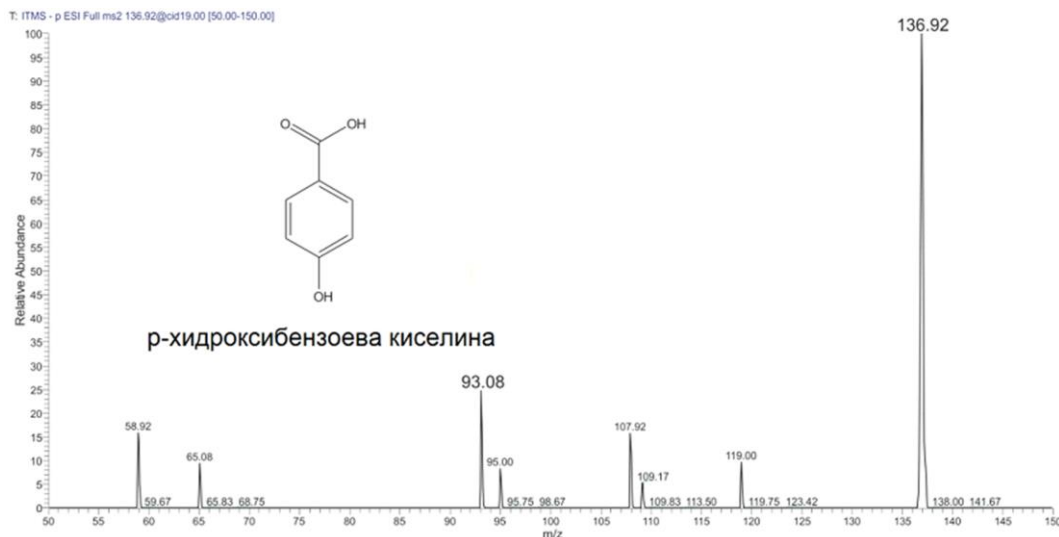
4.4. ESI-MS/MS анализа екстракта семена шљиве

Масеном спектрометријом анализиран је и квалитативни састав етанолног екстракта добијеног из семена шљиве при оптималним условима, након изолације амигдалина. Присуство амигдалина није потврђено, што је још један доказ адекватно оптимизованог поступка изолације амигдалина из етанолног екстракта. На основу масених фрагментација описаних у литератури идентификована су фенолна и флавоноидна једињања. Khallouki и сар. (2012) такође су идентификовали присуство ових једињења у метанолним екстрактима семена шљиве. На слици 68 дат је масени спектар бензоеве киселине снимљеног у негативном јонизационом моду након деловања колизионе енергије од 22 eV. Основни јон даје сигнал на m/z 121, док фрагментни јони имају сигнале на m/z 93 од $[M-H]^- - CO$ и 77 од $[M-H]^- - CO_2$.



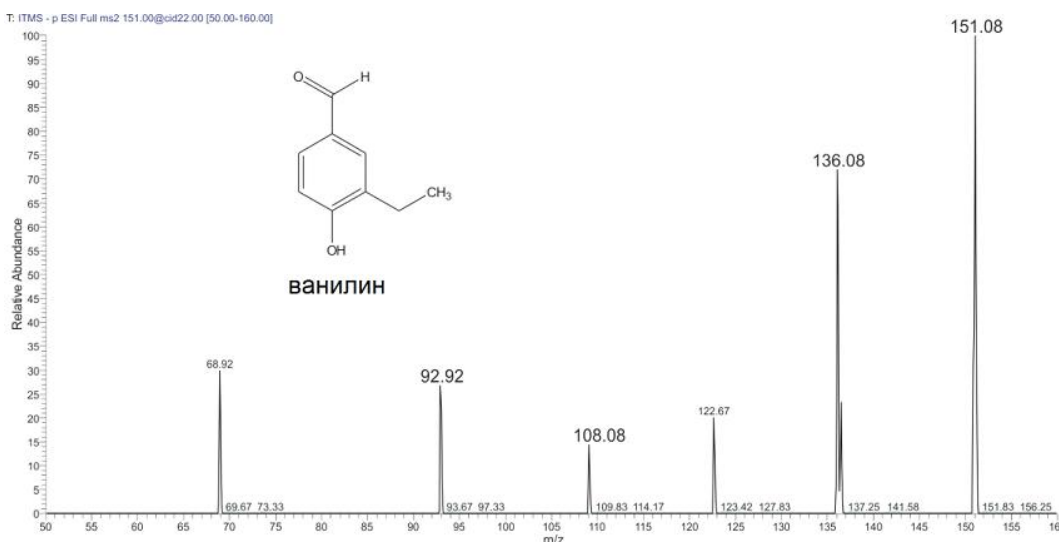
Слика 68. Масени спектар бензоеве киселине (негативан јонизациони мод)

MS^2 спектар *p*-хидроксибензојеве киселине добијен је снимањем у негативном јонизационом моду након деловања колизионе енергије од 19 eV (слика 69). *p*-Хидроксибензојева киселина поред основног јона који даје сигнал на m/z 137 има и фрагментни јон коме одговара сигнал на m/z 93, а потиче од $[M-H]^- - CO_2$.



Слика 69. Масени спектар *p*-хидроксибензојеве киселине (негативан јонизациони мод)

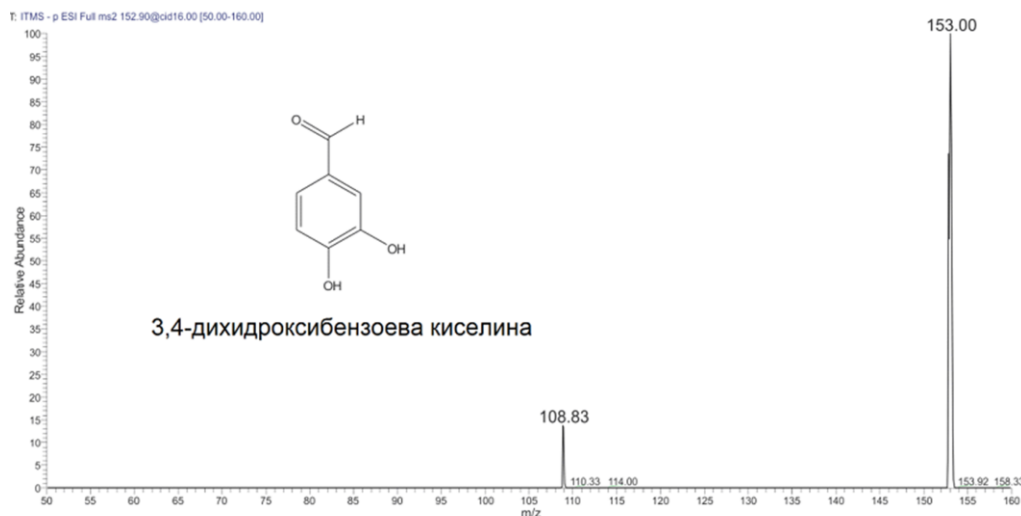
На слици 70 дат је масени спектар ванилина, који је сниман у негативном јонизационом моду. Основни јон ванилина има сигнал на m/z 151, док се његови фрагментни јони јављају на m/z 136 као последица губитка CH_3 групе, односно на m/z 108 губитком $[M-H]^- - CH_3 - CO$ и m/z 92 $[M-H]^- - CH_3 - CO - OH$.



Слика 70. Масени спектар ванилина (негативан јонизациони мод)

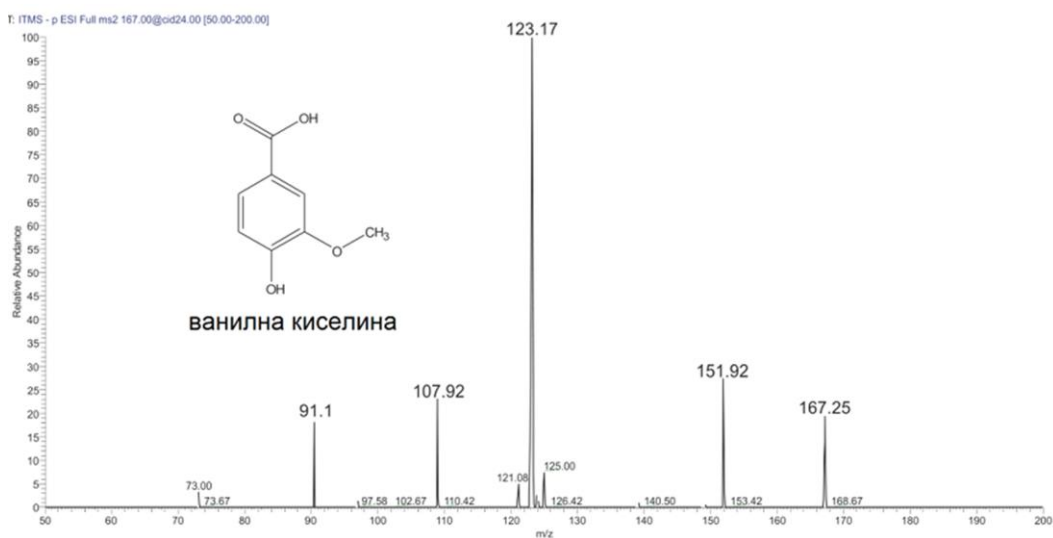
На основу добијеног MS^2 спектра у негативном јонизационом моду потврђено је присуство 3,4-дихидрокси-бензојеве киселине (слика 71). Основни јон у масеном

спектру даје сигнал на m/z 153, док након деловања колизионе енергије од 16 eV долази до појаве пика на m/z 108,83 услед губитка CO_2 .



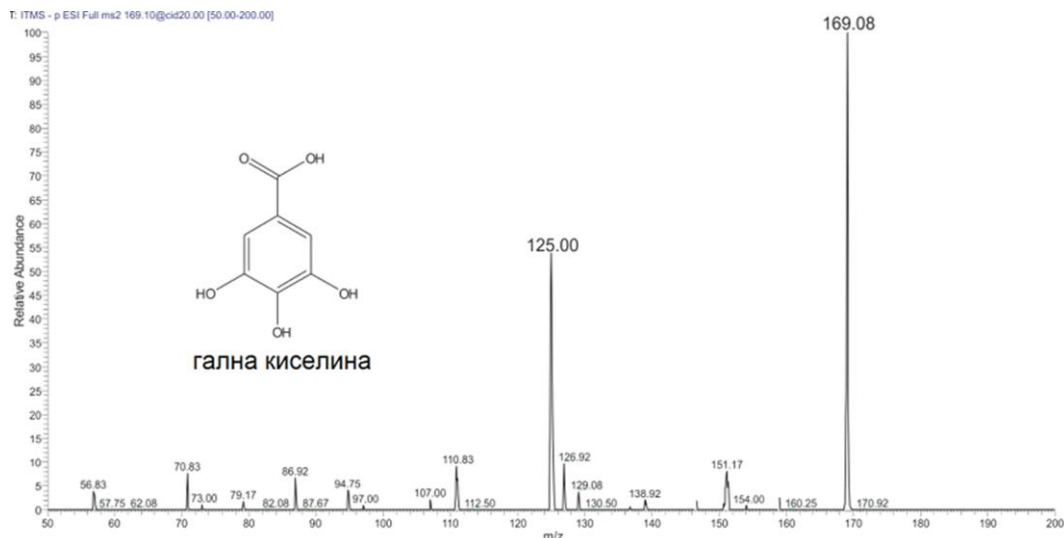
Слика 71. Масени спектар 3,4-дихидрокси-бензоеве киселине (негативан јонизациони мод)

Ванилна киселина чија је молекулска маса 168 при снимању у негативном моду даје пик на m/z 167 (слика 72). Снимањем MS^2 спектра овог једињења, након деловања колизионе енергије од 24 eV, долази до настанка фрагментних јона који дају сигнале на m/z 152, 123, 108 и 91. Фрагментни јон на m/z 152 настаје услед губитка CH_3 групе из основног јона, а сигнал на m/z 123 губитком CO_2 . Губитком CH_3 и CO_2 групе настаје јон који даје пик на m/z 108, а даљом фрагментацијом OH групе настаје јон који даје сигнал на m/z 91 у масеном спектру.



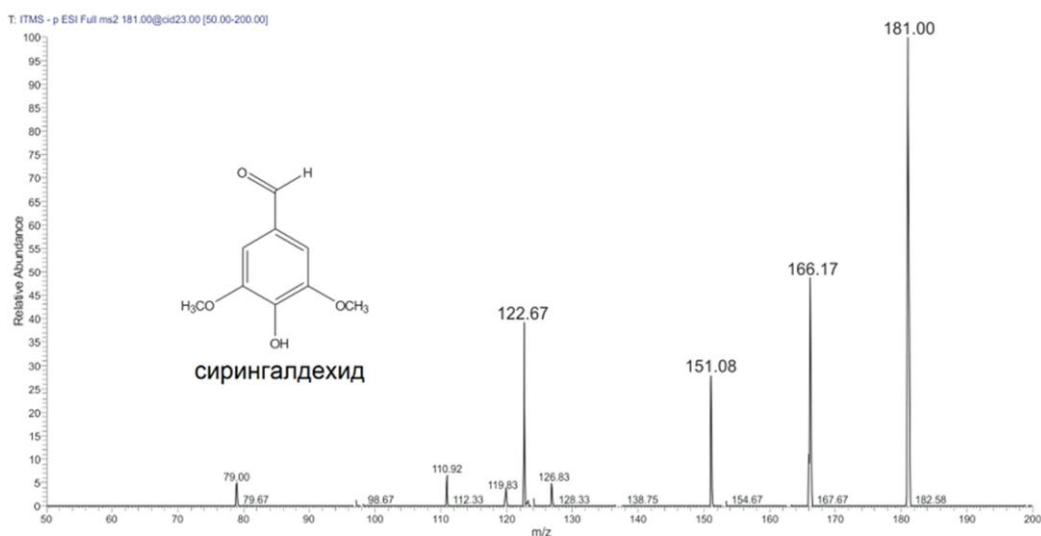
Слика 72. Масени спектар ванилне киселине (негативан јонизациони мод)

Масени спектар галне киселине снимљен је у негативном јонизационом моду након деловања колизионе енергије од 20 eV (слика 73). Гална киселина у свом масеном спектру поред основног јона на m/z 169 има и пик од фрагментног јона на m/z 125 услед губитка CO_2 .



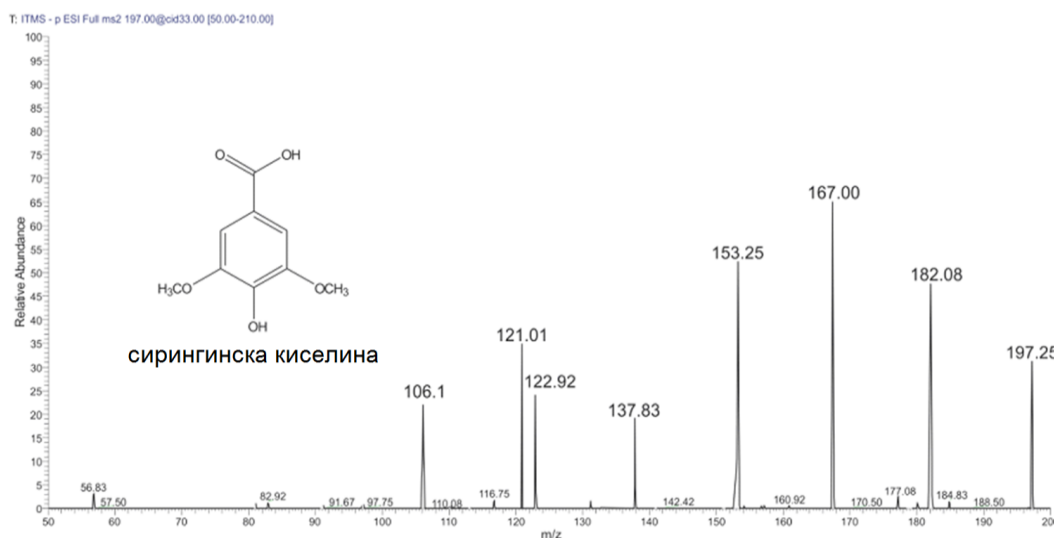
Слика 73. Масени спектар галне киселине (негативан јонизациони мод)

Снимањем у негативном јонизационом моду и деловањем колизионе енергије од 23 eV добијен је MS^2 спектар сириггалдехида (слика 74). Губитком једне CH_3 групе код сириггалдехида од основног пика на m/z 181 добија се пик на m/z 166, док са губитком две CH_3 групе настаје нови јон на m/z 151. Даљим губитком CO групе добија се јон на m/z 123.



Слика 74. Масени спектар сириггалдехида (негативан јонизациони мод)

За разлику од претходна два једињења, синрингинска киселина поред основног јона на m/z 197 има велики број фрагментних јона на m/z 182 од $[M-H]^- - CH_3$, m/z 167 од $[M-H]^- - 2CH_3$, m/z 153 од $[M-H]^- - CO_2$, m/z 138 од $[M-H]^- - CH_3 - CO_2$, m/z 123 од $[M-H]^- - 2CH_3 - CO_2$, m/z 121 од $[M-H]^- - CH_3 - CO_2 - H_2O$ и m/z 106 од $[M-H]^- - 2CH_3 - CO_2 - H_2O$ (слика 75). За фрагментацију основног јона примењена је колизиона енергија од 33 eV.



Слика 75. Масени спектар синрингинске киселине (негативан јонизациони мод)

4.5. Студија фотодеградације

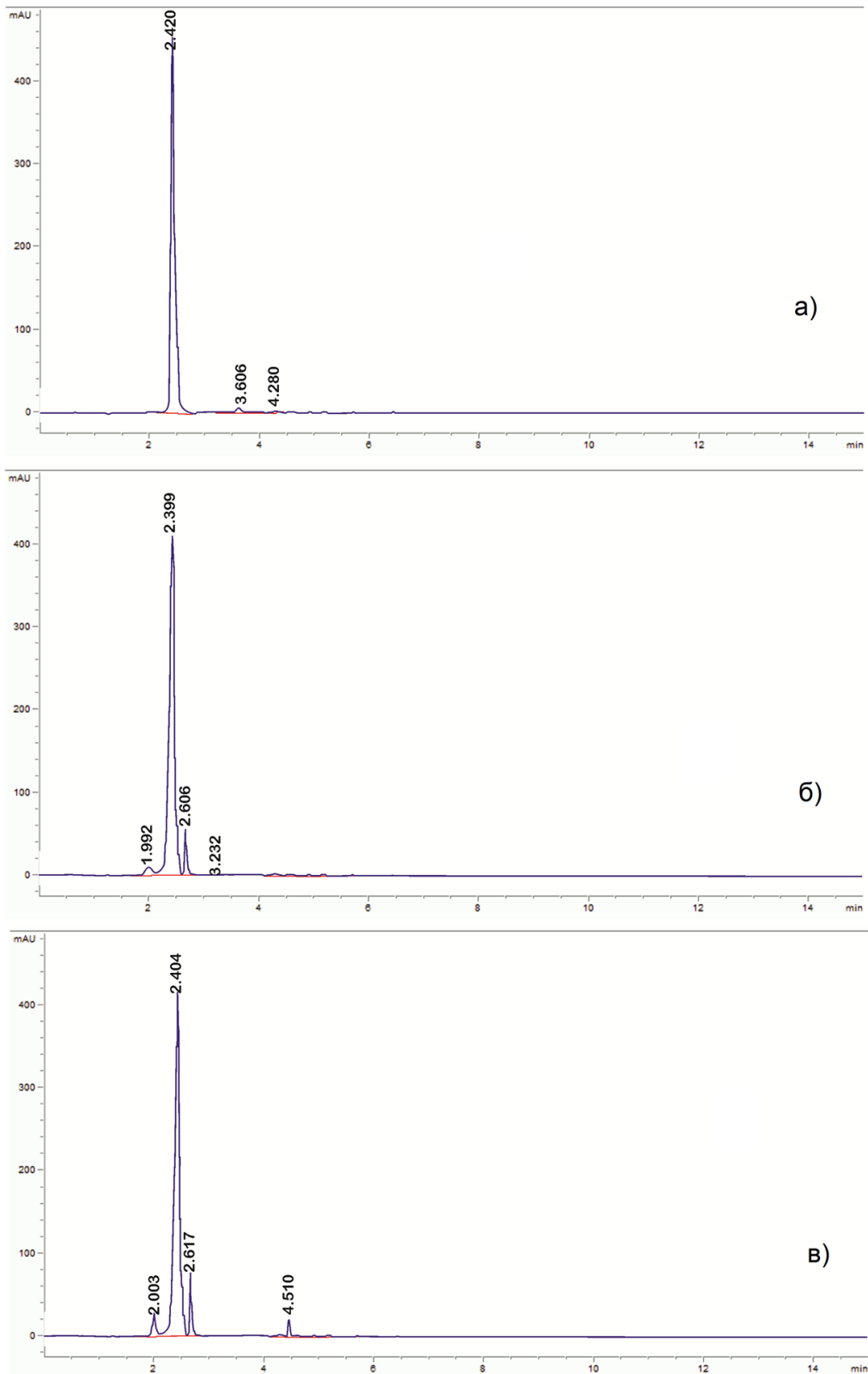
ICH Q1B регулатива (1996), која се односи на испитивање стабилности активних супстанци, као саставни део обухвата и тестирање супстанце на дејство светлости. Испитивање фотостабилности активне супстанце неопходно је спровести, како би се проверило да ли ће приликом излагања лека светлости доћи до губитака његовог садржаја и фармаколошке активности. Такође, користи се и за идентификацију и квантификацију свих токсичних производа који се могу формирати под јасно дефинисаним условима фотодеградације. Испитивање фотостабилности лековите супстанце је важно, јер се на тај начин долази до информација које су битне приликом руковања, паковања, мерења и употребе лека као супстанци или лека као производа. За процену фотостабилности лековите супстанце и производа примењују се студије у року трајања, студије убрзаног старења и „стресне“ студије стабилности. Испитивање фотостабилности у условима складиштења у предвиђеном року трајања представља дуг процес. Да би се превазишао овај проблем, а у кратком временском периоду дошло до података о фотостабилности користе се студије убрзаног старења и „стресне“

студије. Избор услова којима се узорак подвргава зависи од физичко-хемијске природе супстанце и од услова којима ће бити подвргнута за време транспорта, чувања и употребе.

4.5.1. Фотостабилност кверцетина

Познато је да кверцетин у својој структури има ароматичне хромофоре, које могу апсорбовати UV зраке у области око 250 nm. У том случају у молекулу кверцетина долази до $\pi \rightarrow \pi^*$ ексцитације електрона. Због присуства карбонилних хромофора, хидроксилних група и двоструких веза у структури кверцетина, овај флавоноид може апсорбовати светлост у опсегу таласних дужина око 300 nm. У том случају у молекулу долази до $n \rightarrow \pi^*$ прелаза. Апсорпциони максимум на 350 nm јавља се услед коњугације 2,3-двоструке везе и 4-карбонилне групе на Ц прстену, која омогућава делокализацију електрона из фенокси радикала са Б прстена на Ц прстен. Последица ове апсорпције је појава $n \rightarrow \pi^*$ и $\pi \rightarrow \pi^*$ прелаза. Такође, поред апсорпције у UV области кверцетин има способност апсорпције зрачења у VIS области што је и очекивано због његове обојености. Излагањем светлости могу се изазвати значајне промене у физичким и хемијским својствима кверцетина, које могу смањити његову ефикасност и проузроковати нежељене реакције. Из тог разлога је у овом раду испитана фотостабилност кверцетина у чврстом стању под стресним условима (Савић и сар., 2013в). Фотодеградациони профил кверцетина праћен је при UV и VIS зрачењу за различите временске периоде. Тестирани узорци били су упаковани у хемијски инертним и транспарентним контејнерима.

Као погодна аналитичка техника за праћење квалитативних и квантитативних промена насталих током фотодеградације стандарда кверцетина одабрана је валидирана HPLC метода. Одговарајући HPLC хроматограм неозраченог кверцетина концентрације $50 \mu\text{g cm}^{-3}$ ($165 \mu\text{mol dm}^{-3}$), добијеног након хроматографије на 35°C и таласној дужини 370 nm, приказан је на слици 76а. У HPLC хроматограму присуство кверцетина потврђено је на основу ретенционог времена (2,420 min) и UV спектра. Такође, присуство додатних пикова слабог интензитета потврђено је на ретенционом времену од 3,606 и 4,280 min, респективно. Присуство ових пикова указује на потенцијалне нечистоће у самој стандардној супстанци, с обзиром да је њен степен чистоће био мањи од 100%.



Слика 76. Хроматограм стандарда кверцетина (а), узорка након 240 h VIS зрачења (б) и узорка након 240 h UV зрачења (в)

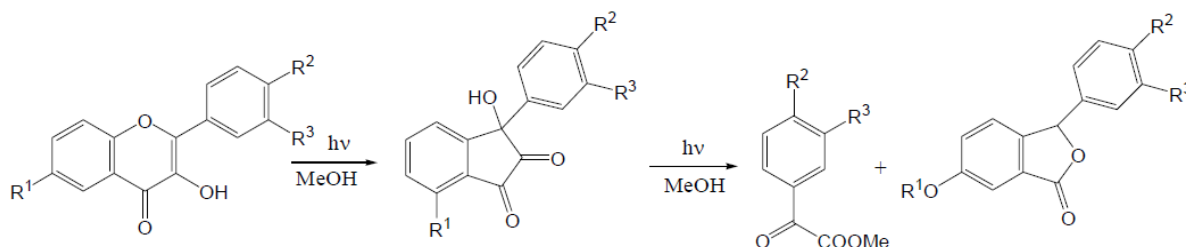
Хроматограми озрачених узорка стандарда кверцетина приказани су на слици 76б и 76в. Добијени хроматограми показују сличне елуиране профиле. Присуство пика

на 3,606 min уочено је само након VIS зрачења, док је пик на 4,280 min запажен након UV зрачења. За разлику од неозраченог узорка, на хроматограму озрачених узорка могу се видети и пикови на ретенционим временима од 2,000 и 2,600 min. Они су највероватније последица фотодеградације стандарда кверцетина. Смањење површине пика на ретенционом времену од 2,420 min указује да је у току фотодеградације дошло да смањења садржаја кверцетина. Промена садржаја кверцетина у функцији времена зрачења приказана је у табели 30.

Табела 30. Промена садржаја кверцетина у функцији времена зрачења

t, h	UV $\mu\text{mol dm}^{-3}$	VIS $\mu\text{mol dm}^{-3}$
0	165	165
48	136,1	148
96	111,7	132,9
144	99,2	118,9
192	76,1	106,5
240	62,7	96,0

Добијени резултати указују да је смањење садржаја кверцетина при дејству UV зрачења веће у поређењу са VIS зрачењем. Након десетог дана зрачења UV и VIS зрацима смањење садржаја кверцетина било је 35,74% и 31,76%, респективно. На основу ових података може се рећи да је кверцетин у чврстом стању нестабилан. Смањење садржаја кверцетина је највероватније последица формирања нових деградационих производа који предложеном HPLC методом не могу да се идентификују. Формирани производи су вероватно резултат фото-преуређивања молекула кверцетина по механизму који су предложили Јокое и сар. (1981) у метанолу (слика 77):



Слика 77. Фото-преуређивање молекула кверцетина

Vicentini и сар. (2007) током свог истраживања показали су да је пропиленгликолни раствор кверцетина отпоран на форсирану деградацију UV

зрачењем. Smith и сар. (2000) потврдили су да је кверцетин подложен фотодеградацији након 15 h излагања UV зрачењу (интезитет зрачења од 90 mW cm^{-2} , таласна дужина у рангу 300–400 nm са ксенон лампом 500 W). Истраживања у овом раду показују да је кверцетин фотонестабилан, јер подвргавањем UV зрачењу долази до његове деградације, односно структурне промене, што може имати за последицу смањење фармаколошке активности.

4.5.2. Кинетика фотодеградације кверцетина

Фотодеградација кверцетина под дејством UV и VIS зрачења испитивана је праћењем промене концентрације кверцетина у току времена. Концентрација кверцетина у испитиваним узорцима успешно је одређивана HPLC методом, која је развијена за праћење садржаја овог биофлавоноида у екстрактима зеленог чаја. Узорци су озрачивани 48, 96, 144, 192 и 240 h, а затим је садржај кверцетина у њима упоређиван са почетном концентрацијом кверцетина од $165 \mu\text{mol dm}^{-3}$. Добијени подаци промене концентрације са временом анализирани су кинетиком нултог и првог реда, при чему је уочено да се они најбоље поковавају кинетици првог реда. Диференцијални облик једначине првог реда може се приказати на следећи начин (једначина 20):

$$-\frac{dc}{dt} = k c \quad (20)$$

Након сређивања и интегралне исте једначине могуће је добити њен интегрални облик, који се даје у виду експоненцијалне зависности (једначина 21):

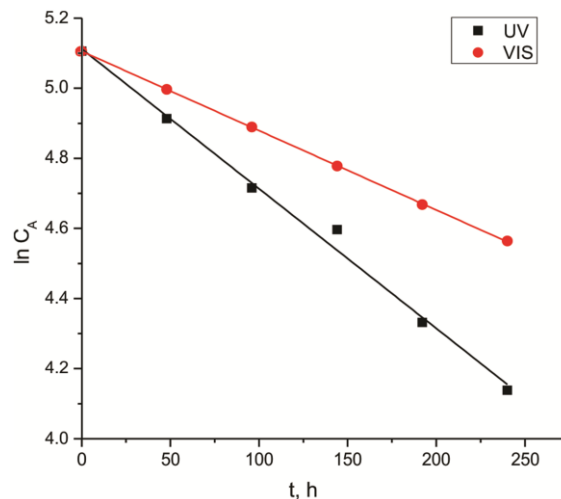
$$c_t = c_o \exp(-kt) \quad (21)$$

где c_o представља почетну концентрацију за време $t = 0$, док се c_t односи на концентрацију након времена t од почетка излагања зрачењу. Како оба облика једначине нису погодна за одређивање кинетичких параметара, онда се дата функционална зависност линеаризује логаритмовањем вредности концентрација. Овако добијена функционална зависност представља други интегрални облик једначине првог реда и представља се једначином (једначина 22):

$$\ln c_t = \ln c_o - kt \quad (22)$$

Нагиб добијене линеарне зависности дефинише константу брзине фотодеградације (k), док њен одсечак даје вредност $\ln c_o$.

Графичка зависност концентрације кверцетина од времена зрачења приказана је на слици 78. Са добијеног графика може се видети да је након 240 h степен конверзије кверцетина око 62% за UV зрачење, односно 42% за VIS зрачење. При одабраним условима, процес фотодеградације кверцетина може се описати кинетиком првог реда. Коефицијенти корелације (r) за UV и VIS зрачење били су 0,9999 и 0,9999, респективно.



Слика 78. Деградациони профил кверцетина на (■) 254 nm и (●) 540 nm

Кинетички модели првог реда процеса деградације кверцетина на експоненцијалном сегменту приказани су у облику следећих једначина (једначине 23 и 24):

$$C_t = 5,122 \exp(-3,92 \times 10^{-3} t) \quad \text{за UV зрачење} \quad (23)$$

$$C_t = 5,106 \exp(-2,27 \times 10^{-3} t) \quad \text{за VIS зрачење} \quad (24)$$

Из нагиба линеарне зависности профила фотодеградације кверцетина израчунате су константе брзина процеса фотодеградације кверцетина, k , $t_{1/2}$ и t_{90} (табела 31). Резултати показују да је вредност константе брзине фотодеградације кверцетина при VIS зрачењу ($2,27 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$) нижа од вредности добијене за UV зрачење ($3,92 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$). Ово указује на чињеницу да је време полураспада ($t_{1/2}$) и стабилност (t_{90}) кверцетина под дејством UV зрачења (177 h и 26 h, респективно) краће у поређењу са истим вредностима при VIS зрачењу (305 h и 46 h, респективно). На основу ових параметара може се констатовати да је при UV зрачењу кверцетин много брже подложен деградацији у поређењу са VIS зрачењем.

Табела 31. Константа брзине деградације (k), време полуживота ($t_{1/2}$) и рока трајања или стабилности (t_{90}) кверцетина током фотодеградације

тип зрачења	константа брзине деградације (k), (S.E.), (h^{-1})	полуживот ($t_{1/2}$), (h)	рок трајања (t_{90}), (h)
UV	$3,92 \times 10^{-3} \pm 1,63 \times 10^{-4}$	177	26
VIS	$2,27 \times 10^{-3} \pm 9,86 \times 10^{-6}$	305	46

4.5.3. Фотостабилност амигдалина

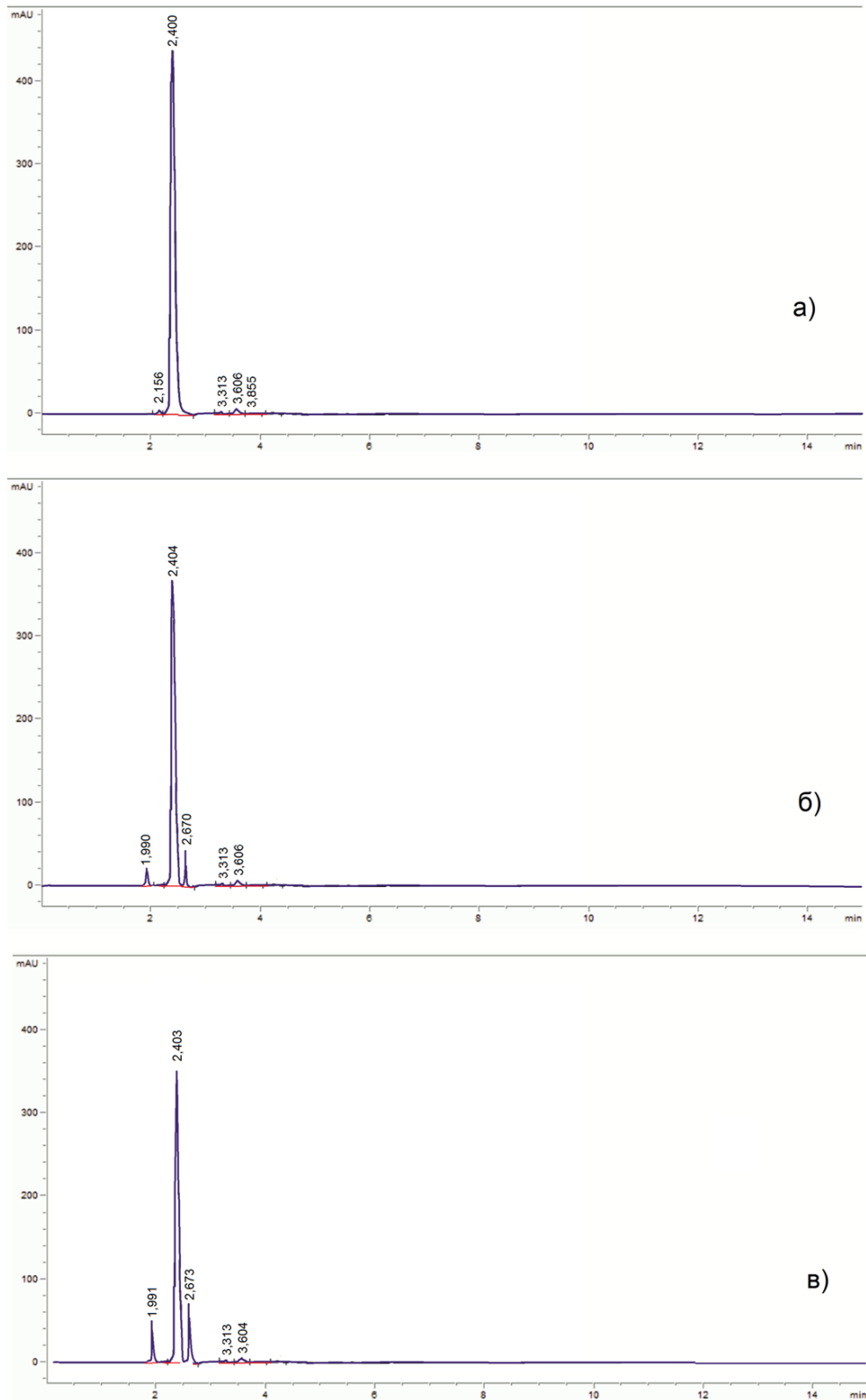
Амигдалин у својој структури има ароматичне хромофоре, које имају способност апсорпције електромагнетних зрака у области таласних дужина око 250 nm (UV област) при чему долази до $\pi \rightarrow \pi^*$ прелаза електрона. Такође, садржи и цијанидну групу која апсорпцијом електромагнетног зрачења у области око 300 nm проузрокује $n \rightarrow \pi^*$ и $\pi \rightarrow \pi^*$ прелазе електрона. Под дејством светлости, присуство ове две функционалне групе у структури амигдалина могу проузроковати повећање резонантне нестабилности делокализованих електрона кроз читав молекул. Из тих разлога, студије стресне фотодеградације спроведене су на стандарду амигдалина у чврстом стању. За време деградације узорци су били упаковани у хемијски инертним и транспарентним контејнерима.

У циљу праћења квалитативних и квантитативних промена насталих током фотодеградације амигдалина изабрана је развијена HPLC метода за потребе одређивања његовог садржаја у екстрактима семена шљиве. Промена концентрације амигдалина у зависности од времена зрачења приказана је у табели 32. Почетна концентрација амигдалина износила је $50 \mu\text{g cm}^{-3}$, односно $109 \mu\text{mol dm}^{-3}$.

Табела 32. Промена садржаја амигдалина у функцији времена зрачења

t, h	UV $\mu\text{mol dm}^{-3}$	VIS $\mu\text{mol dm}^{-3}$
0	109	109
48	98,6	102,1
96	89,2	95,8
144	81,5	89,4
192	73,2	83,9
240	66,5	78,5

Одговарајући HPLC хроматограми озраченог узорка амигдалина приказан су на слици 79. Упоредјујући хроматограм неозраченог (слика 79а) и озраченог (слика 79б) амигдалина запажа се да оба хроматограма имају сличне елуационе профиле.

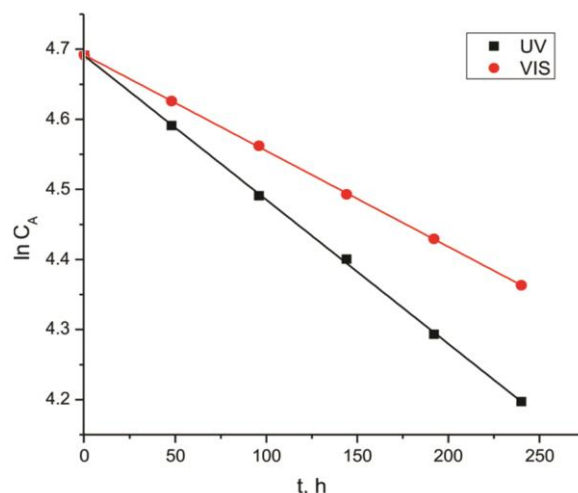


Слика 79. Хроматограм стандарда амигдалина (а), узорка након 240 h VIS зрачења (б) и узорка након 240 h UV зрачења (в)

На ретенционом времену 2,400 min код оба хроматограма уочава се главни пик који потиче од стандарда амигдалина. Потврда пика од амигдалина извршена је на основу поређења UV спектра на датим ретенционим временима. Површина овог пика знатно је мања код озрачених узорака, јер се концентрација амигдалина смањује са временом услед деловања електромагнетног зрачења. Значајније смањење концентрације амигдалина запажа се при излагању узорка UV зрачењу. Након треће дозе зрачења садржај амигдалина под дејством UV и VIS зрачења смањен је за 72,5% и 54,36%, респективно. У току зрачења долазило је до пораста садржаја квантификованих деградационих производа, што се може потврдити порастом висина пикова на ретенционим временима 1,990 и 2,670 min (слика 79). На основу добијених резултата може се закључити да је при стресним условима амигдалин у чврстом стању фотоосетљива супстанца.

4.5.4. Кинетика фотодеградације амигдалина

У циљу испитивања кинетике процеса фотодеградације амигдалина при стресним условима, праћена је промена његове концентрације са временом (0, 48, 96, 144, 192 и 240 h). Добијени подаци испитивани су кинетиком нултог и првог реда, при чему је уочено да се посматрана реакција покорава кинетици првог реда. На основу графичког приказа профила деградације амигдалина добијеног након линеаризације експерименталних података, дефинисани су кинетички параметри реакције фотодеградације (слика 80).



Слика 80. Деградациони профил амигдалина на (■) 254 nm и (●) 540 nm

Добијене кинетичке једначине првог реда за различите типове зрачења приказане су следећим једначинама:

$$C_t = 4,691 \exp(-2,06 \times 10^{-3} t) \quad \text{за UV зрачење} \quad (25)$$

$$C_t = 4,691 \exp(-1,37 \times 10^{-3} t) \quad \text{за VIS зрачење} \quad (26)$$

Вредности коефицијената корелације (r) за UV и VIS зрачење износиле су 0,9996 и 0,9999, респективно. Константа брзине реакције фотодеградације амигдалина, време полураспада и рок трајања директно су одређени са фотодеградационог профила, фитованог по одговарајућем експоненцијалном моделу (моделу кинетике првог реда). Израчунате вредности приказане су табеларно (табела 33).

Табела 33. Константа брзине деградације (k), време полуживота ($t_{1/2}$) и рока трајања (t_{90}) амигдалина током фотодеградације

тип зрачења	константа брзине деградације (k), (S.E.) (h^{-1})	полуживот ($t_{1/2}$), (h)	рок трајања (t_{90}), (h)
UV	$2,06 \times 10^{-3} \pm 1,77 \times 10^{-5}$	336	50
VIS	$1,37 \times 10^{-3} \pm 6,41 \times 10^{-6}$	505	76

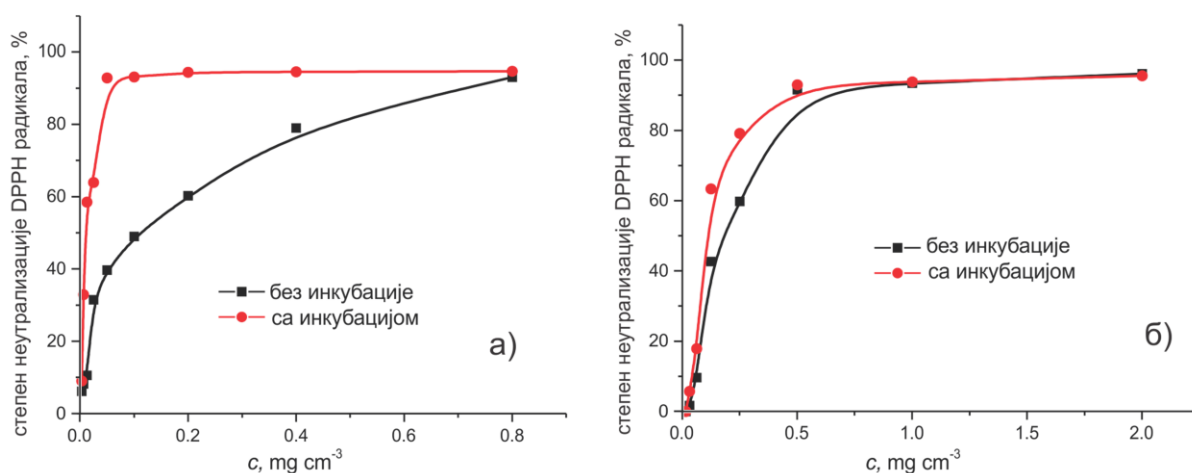
Резултати показују да је вредност константе брзине фотодеградације амигдалина при VIS зрачењу ($1,37 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$) нижа од вредности добијене за UV зрачење ($2,06 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$). С обзиром да је константа брзине реакције фотодеградације била нижа при VIS зрачењу, онда је било очекивано да време полураспада и рок трајања амигдалина у чврстом стању под дејством VIS зрачења (505 и 76 h, респективно) буде веће у поређењу са UV зрачењем (336 и 50 h, респективно). На основу овога може се закључити да је амигдалин, као потенцијални антитуморски агенс, фотонестабилан приликом излагања стресним условима зрачења.

4.6. Антиоксидативна активност кверцетина и екстракта зеленог чаја

Испитивањем корелације између структуре и активности потврђено је да кверцетин спада у групу биофлавоноида са најјачом антиоксидативном активношћу. За његову способност “хватања” DPPH радикала одговорне су три функционалне групе присутне у његовој структури и то: (1) орто-катехолна група у Б прстену, која даје високу стабилност формираним радикалима, (2) коњугација у Б-прстену са 4-оксо групом и 2,3-двоструком везом која обезбеђује делокализацију електрона из Б прстена и (3) 3- и 5-ОН групе са 4-оксо групом, које омогућавају да се електрони са 4-оксо

групе делокализују на оба супституента. Све ове функционалне групе функционишу заједно омогућавајући већу делокализацију електрона, који дају већу стабилност ароксил радикалима.

За испитивање антиоксидативне активности кверцетина и екстракта зеленог чаја, добијеног при оптималним условима екстракције које предвиђа вештачка неуронска мрежа, примењен је DPPH тест заснован на неутрализацији DPPH• радикала. Главни разлог примене овог теста (одређивање капацитета неутрализације DPPH• радикала) је услед комерцијалне доступности DPPH реагенса, тачности и брзине саме методе. Способност стандарда кверцетина и екстракта зеленог чаја да “хватају” слободне DPPH радикале приказана је графичком зависношћу степена неутрализације DPPH радикала (%) од концентрације испитиваног раствора (слика 81).



Слика 81. Антиоксидативна активност стандарда кверцетина (а) и екстракта зеленог чаја (б)

До повећања капацитета неутрализације DPPH радикала како код инкубираних тако и код неинкубираних узорка долази услед повећања концентрације стандардног раствора кверцетина (0,003 – 0,800 mg cm⁻³) и екстракта зеленог чаја (0,016 – 2,000 mg cm⁻³). Са графика се може запазити да са повећањем времена инкубације долази до благог раста вредности капацитета неутрализације DPPH радикала, тако да је неопходно инкубирати узорке пре самог мерења апсорбанције. Вредност капацитета неутрализације DPPH радикала 92,83% за стандард кверцетина, односно 92,99% за раствор екстракта зеленог чаја постиже се при концентрацијама 0,05 mg cm⁻³ и 0,5 mg cm⁻³, респективно. Добијене вредности капацитета неутрализације DPPH радикала (преко 90%) за стандард кверцетина и екстракт зеленог чаја указују на то да ова два испитивана узорка имају високу антиоксидативну активност.

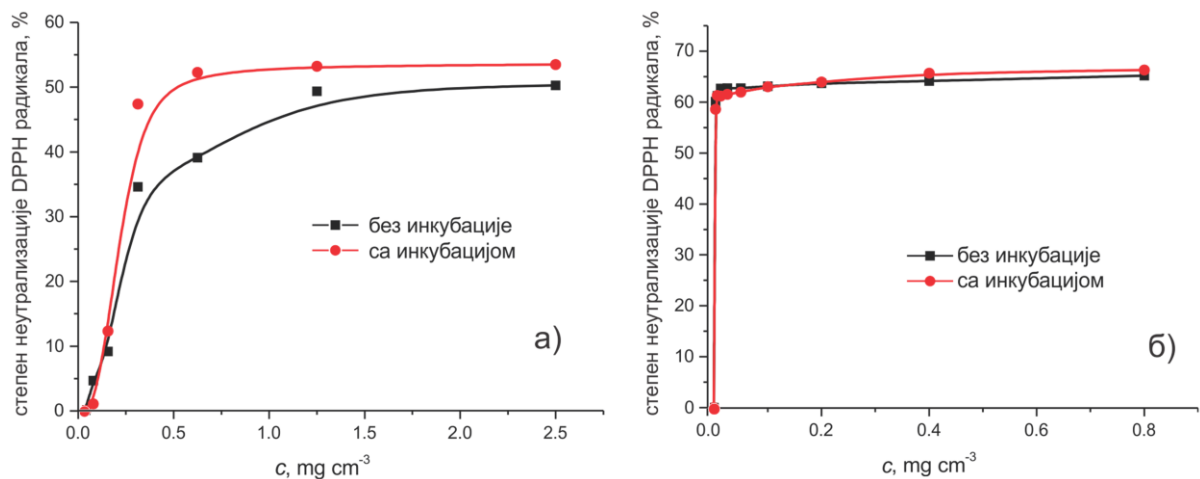
Концентрација антиоксиданса потребна за смањење 50% почетне концентрације DPPH радикала (EC_{50}) је параметер који се врло често користи за процену антиоксидативне активности испитиваног узорка. Што је вредност EC_{50} нижа, онда је способност антиоксидативног једињења да “хвата” слободне DPPH радикале већа. Вредност EC_{50} за стандард кверцетина ($EC_{50} = 10,4 \mu\text{g cm}^{-3}$) нижа је у односу на вредност добијену за екстракт зеленог чаја ($EC_{50} = 106,6 \mu\text{g cm}^{-3}$). Ово указује да стандард кверцетина има вишу активност “хватања” DPPH радикала у поређењу са екстрактом. Добијени резултати донекле су очекивани, с обзиром да су у екстракту поред кверцетина заступљена и једињења која немају изражена антиоксидативна својства. Али може се закључити да највероватније антиоксидативни ефекат екстракта потиче највише од кверцетина, чији је садржај 1,55 g на 100 g екстракта.

Yilmaz и Toledo (2004) испитали су антиоксидативну активност катехина, епикатехина и галне киселине ORAC методом. Установили су да ова активност опада од катехина, преко епикатехина до галне киселине. Stewart и сар. (2005) проценили су антиоксидативни потенцијал катехина, 3-О-кафеоилхининске киселине, флавонола и теафлавина. Помоћу TEAC методе (*Trolox equivalent antioxidant capacity*) утврђено је да око 30% активности екстракта зеленог чаја потиче од (-)-епигалокатехин-3-галата. Теафлавини задржавају антиоксидативни капацитет сличан мономерима (-)-епикатехина, док кођуговани флавоноли немају значајан антиоксидативни капацитет. Seeram и сар. (2006) поред антиоксидативних својстава катехина утврдили су и антиоксидативна својства кофеина применом ORAC и TEAC метода. Такође, алкалоид кофеин и његови метаболички производи теобромин и ксантин показују антиоксидативна својства (Azam и сар., 2003). Ioku и сар. (1995) утврдили су да таква својства поседују и кверцетин и његови моноглукозиди са том разликом што је кверцетин много ефикаснији.

4.7. Антиоксидативна активност амигдалина и екстракта семена шљиве

DPPH тест је примењен и код испитивања антиоксидативне активности стандарда амигдалина и екстракта семена шљиве добијеног при оптималним условима екстракције применом неуронских мрежа. Зависност капацитета неутрализације слободних DPPH радикала од концентрације испитиваних узорака приказана је на слици 82. Са добијеног графика може се запазити да са повећањем концентрације инкубираних и неинкубираних раствора стандарда амигдалина ($0,019 - 2,5 \text{ mg cm}^{-3}$)

долази до повећања капацитета неутрализације DPPH радикала. С обзиром да време инкубације има утицаја на капацитет неутрализације DPPH радикала и да се самим тим боље уочава антиоксидативна активност, препоручљиво је да се узорци инкубирају 20 min пре мерења апсорбанције. Максимална вредност капацитета неутрализације DPPH радикала од 52,30% постигнута је при концентрацији раствора амигдалина од $0,625 \text{ mg cm}^{-3}$ након 20 min инкубације. За разлику од стандарда амигдалина који при вишим концентрацијама раствора показује задовољавајућу антиоксидативну активност, раствор екстракта семена шљиве приближно исту активност показује при нижим концентрацијама ($0,0031 - 0,8 \text{ mg cm}^{-3}$) (слика 82б). Највиша вредност капацитета неутрализације DPPH радикала екстракта семена шљиве 61,30% постигнута је при концентрацији $0,0063 \text{ mg cm}^{-3}$.



Слика 82. Антиоксидативна активност стандарда амигдалина (а) и екстракта семена шљиве (б)

EC_{50} вредност стандарда амигдалина ($EC_{50} = 0,4778 \text{ mg cm}^{-3}$) већа је од вредности добијене за екстракт семена шљиве ($EC_{50} = 2,67 \text{ } \mu\text{g cm}^{-3}$). На основу ових резултата може се закључити да стандард амигдалина има нижу способност уклањања DPPH радикала у односу на испитивани екстракт. Способност екстракта да боље “хвата” DPPH радикале од стандарда амигдалина последица је присуства додатних компонената које имају антиоксидативну активност. У групу ових једињења обично спадају флавоноиди и фенолне киселине. Khallouki и сар. (2012) су испитивали антиоксидативну активност метанолних екстракта различитих делова плода шљиве рода *Rosaceae* (Мирабела) са подручја Француске, Немачке и Луксембурга. Применом DPPH, FRAP и ORAC теста показало се да је амигдалин, као главна фенолна компонента метанолног екстракта семена шљива, остао неактиван током испитивања тј. није поседовао антиоксидативну активност. За разлику од рада Khallouki и сар.

(2012), добијени резултати указују да стандард амигдалина и екстракт семена шљиве рода Стенлеј имају бољу активност “хватања” DPPH радикала.

Natella и сар. (1999) испитали су утицај ароматичне супституције на антиоксидативну активност. Истраживањима је потврђено да антиоксидативна активност постепено расте у низу р-хидроксибензоева киселина < ванилна киселина < сиригинска киселина. Brand-Williams и сар. (1995) је показао да гална киселина поседује јак антиоксидативни капацитет, док ванилин има доста слабији. Вредност EC₅₀ за сиригалдехид је неколико пута мања од вредности EC₅₀ за ванилин (Ао и сар., 2008).

4.8. Антимикробна активност кверцетина и екстракта зеленог чаја

Применом диск дифузионе методе испитана је антимикробна активност на шест различитих сојева микроорганизама (четири бактерије и две гљивице) раствора стандарда кверцетина различитих концентрација (C1 = 0,2 mg cm⁻³; C2 = 0,8 mg cm⁻³ и C3 = 1,6 mg cm⁻³) и екстракта зеленог чаја, добијеног при оптималним условима екстракције са највећим садржајем кверцетина применом неуронских мрежа. У циљу провере антимикробног деловања растварача, у коме су растварани узорци пре самог наношења на диск, као контролни узорак узет је 96% (v/v) етанол. У циљу провере осетљивости тестираних сојева и поређења антимикробног деловања познатог антибиотика, као референтна супстанца коришћен је гентамицин. Сви тестирани узорци показали су различиту селективност према испитиваним микроорганизмима (табела 34). У прилогу I приказани су третирани сојеви микроорганизама са јасно израженим зонама инхибиције.

На основу добијених података приказаних у табели 34 може се видети да су сојеви гљивица (*C. albicans* и *A. brasiliensis*) остали резистентни на дејство стандарда, екстракта, антибиотика и растварача. Растварач није показао дејство на Грам (-) бактерије (*E. coli* и *P. aeruginosa*) током испитивања антимикробне активности узорака. Инхибиторно деловање антибиотика једино није уочено на сој *P. aeruginosa*. Раствор стандарда кверцетина концентрације 1,6 mg cm⁻³ показао је већу антимикробну активност на сој *E. coli* у поређењу са екстрактом. Приближно исту активност код бактерије *P. aeruginosa* показали су стандард кверцетина и екстракт. Инхибиторно дејство на Грам (+) бактерију *B. subtilis* показали су само екстракт зеленог чаја и антибиотик. Највећу активност у овом случају показао је узорак стандарда кверцетина концентрације 1,6 mg cm⁻³. Gatto и сар. (2002) нису потврдили антимикробну активност

кверцетина до концентрације $100 \mu\text{g cm}^{-3}$ на сојевима *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli* и *C. albicans*. Зелени чај показао се ефикасним на сојеве *S. aureus*, *P. aeruginosa* (Aroga и сар., 2009; Radji и сар., 2013), *C. albicans* (Kim и сар., 2013) и *E. coli* (Chou и сар., 1999).

Табела 34. Антимикробна активност стандарда кверцетина, екстракта зеленог чаја, антибиотика и чистог растварача

микроорганизам	стандард кверцетина			екстракт зеленог чаја	гентамицин	етанол
	C1	C2	C3			
<i>E. coli</i> ATCC 8739	++	+++	++++	+++	++	-
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	+	++	++	++	-	-
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	-	-	-	+	+++	-
<i>S. aureus</i> ATCC 6539	++	++	+++	++	++	-
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	-	-	-	-	-	-
<i>A. brasiliensis</i> ATCC 16404	-	-	-	-	-	-

Не показује антимикробну активност (-), зона инхибиције <15 mm. Слаба антимикробна активност (+), зона инхибиције од 15–16 mm. Умерена антимикробна активност (++) , зона инхибиције од 17–19 mm. Висока антимикробна активност (+++), зона инхибиције од 20–22 mm. Јака антимикробна активност (++++), зона инхибиције >23 mm. Стандардна девијација $\pm 0,5$ mm.

За компоненте које су идентификоване MS методом у екстракту зеленог чаја добијеном при оптималним условима постоје подаци да поседују антимикробно деловање. Истраживања су показала да су галокатехини и њихови галати директно одговорни за антибактеријску активност екстракта зеленог чаја (Yam и сар., 1997; Toda и сар., 1990). Полифенолни катехини, нарочито (-)-епигалокатехин-3-галат и (-)-епикатехин-3-галат показали су широки спектар деловања на Грам (+) и Грам (-) бактеријама (Yam и сар., 1997; Taylor и сар., 2005). Антимикробно деловање теафлавина испитали су Friedman и сар. (2006). У свом ревијалном раду Friedman је напоменуо да алкалоиди (кофеин и теобромин) поред познатих полифенолних компонената чаја показују активност против различитих патогена укључујући инсекте, бактерије, гљиве и вирусе (Friedman и сар., 2007).

4.9. Антимикробна активност амигдалина и екстракта семена шљиве

Антимикробна активност етанолних раствора стандарда амигдалина ($C1 = 0,2 \text{ mg cm}^{-3}$; $C2 = 0,8 \text{ mg cm}^{-3}$ и $C3 = 1,6 \text{ mg cm}^{-3}$) и екстракта семена шљиве са највећим садржајем амигдалина добијеног при оптималним условима, испитана је на истим сојевима микроорганизама као и у случају одређивања антимикробне активности

кверцетина и екстракта зеленог чаја. Резултати селективности узорака према испитиваним сојевима микроорганизама приказани су у табели 35, са видљивим зонама инхибиције у прилогу II.

Највећу осетљивост на дејство стандарда амигдалина показале су Грам (-) бактерије, док су Грам (+) бактерије и гљивице остале резистентне на њихово дејство. Према Грам (-) бактеријама најмању ефикасност показао је раствор стандарда амигдалина најниже концентрације. Међу тестираним Грам (-) бактеријама, *P. aeruginosa* спада у ред најосетљивијих на дејство стандарда амигдалина, односно амигдалин према овом соју показује најјачу антимикуробну активност. Екстракт семена шљиве показао је активност само према Грам (-) бактеријама, формирајући при том зоне инхибиције различитог пречника. У поређењу са стандардом, екстракт је показао бољу антимикуробну активност према истим сојевима. Разлог овоме је присуство неколико различитих класа једињења (флавоноиди, полифенолне киселине и њихови естри) поред амигдалина као главне компоненте, при чему је највероватније дошло до њиховог синергистичког дејства.

Табела 35. Антимикуробна активност стандарда амигдалина и екстракта семена шљиве

Микроорганизам	стандард амигдалина			екстракт семена шљиве
	C1	C2	C3	
<i>E. Coli</i> ATCC 8739	-	++	++	+++
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	++	+++	++++	++++
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	-	-	-	-
<i>S. aureus</i> ATCC 6539	-	-	-	-
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	-	-	-	-
<i>A. brasiliensis</i> ATCC 16404	-	-	-	-

Не показује антимикуробну активност (-), зона инхибиције <15 mm. Слаба антимикуробна активност (+), зона инхибиције од 15–16 mm. Умерена антимикуробна активност (++) , зона инхибиције од 17–19 mm. Висока антимикуробна активност (+++), зона инхибиције од 20–22 mm. Јака антимикуробна активност (++++), зона инхибиције >23 mm. Стандардна девијација ±0,5 mm.

У литератури постоји потврда да идентификоване компоненте у екстракту семена шљиве показују антимикуробно деловање. Тако су Yurdugül и Bozoglul (2009) потврдили да бензоева киселина представља главну компоненту у лиофилизованом узорку дивље шљиве, која је одговорна за добро инхибиторно деловање на сојеве *Klebsiella pneumonia*, *Acinoto iwofii* ATCC 19002, *Enterobacter faecium* ATCC 6057 и *E.*

coli 0157:H7-933. Бензоева киселина је иначе заступљена у готово сваком воћу укључујући брусницу, шљиве, малине, каранфилић, цимет и друго воће и поврће (Wiley, 1994). Антимикробно дејство фенолних компонената и то р-хидроксибензоеве, ванилне, сиригинске киселине и кверцетина потврђено је у литератури (Aziz и сар., 1997). Chanwitheesuk и сар. (2007) потврдили су дејство галне киселине на неким хуманим патогеним бактеријама. Пошто су све претходно поменуте компоненте потврђене MS методом и у оптималном екстракту семена шљиве, тиме се може објаснити антимикробно деловање екстракта на испитиваним сојевима микроорганизама.

Познато је да Грам (-) бактерије (*P. aeruginosa* и *E. coli*) у хуманом организму могу бити узрочници различитих болести (Munford, 2008; Haffajee и Socransky, 2000) и озбиљних инфекција (Li и сар., 2000; Wisplinghoff и сар., 2004). *P. aeruginosa* код људи се налази у малом броју као део физиолошке микрофлоре црева, а може се наћи и на кожи. У случајевима поремећене равнотеже у бактеријској флори црева, може да изазове ентероколитис. Такође, има способност стварања великог броја токсичних протеина који не само да изазивају оштећење ткива, већ проузрокују и имунолошку инсуфицијенцију (Winsor и сар., 2011). Код особа оболелих од рака веома су честе инфекције изазване овим микроорганизмом. Данас се у лечење инфекција проузроковане *P. aeruginosa* примењује антибиотска терапија, јер је овај микроорганизам осетљив на цефалоспоринске антибиотике (цефотаксим, цефтриаксон, цефоперазон) и новије аминогликозидне антибиотике (амикацин).

E. coli је главна компонента нормалне цревне флоре, где помаже у варењу хране. Патогени облици *E. coli* одговорни су за широки спектар људских болести (Kärpeli и сар., 2011; Samins и сар., 2011). До данас задржала је статус бактеријске врсте као узрочника инфекције готово свих ткива и органских састава. Познато је да је *E. coli* одговорна за чак 90% уринарних инфекција које могу довести и до упале бубрега. Такође, узрочник је колитиса и хемолитичног уремичног синдрома људи. За третман инфекција проузроковане *E. coli* углавном се примењује антибиотска терапија.

Међутим, овим истраживањем потврђено је да екстракти зеленог чаја и семена шљиве већим делом имају способност да спрече раст Грам (-) бактерија (*P. aeruginosa* и *E. coli*). Добијени резултати указују да се екстракти зеленог чаја и семена шљиве са максималним садржајем кверцетина и амигдалина, респективно, могу употребити за израду нових формулација са антибактеријским или антиинфективним дејством. Као такве, формулације би се могле успешно применити за лечење инфекција и других

болести изазиване Грам (-) бактеријама, као што су *P. aeruginosa* и *E. coli* које су резистентне на многе конвенционалне антибиотике.

4.10. МТТ тест

Туморске ћелијске линије (MDA-MB-361, MDA-MB-453, HeLa, LS-174) третиране су различитим концентрацијама стандарда кверцетина и амигдалина, изолованог амигдалина из семена шљиве и екстракта зеленог чаја, добијеног при оптималним условима екстракције, ради испитивања антипролиферативног ефекта. Упоредо са овим ћелијским линијама, испитивања су спроведена и на здравим MRC-5 ћелијама. За ово истраживање примењен је колориметријски тест који се заснива на примени тетразолијумске соли. Тест открива живе, али не и мртве ћелије и његов генерисани сигнал зависи од степена активације ћелија. Иначе се овај метод успешно примењује за мерење цитотоксичности, као и пролиферације и активације. Резултати могу да се читају на ELISA читачу и задовољавајуће су прецизни. Предност оваквог теста је та што је брз и прецизан, а при том се избегава употреба радиоизотопа. Вредности концентрација испитиваних узорача, које делују 50 % инхибиторно на раст и преживљавање ћелија хуманих ћелијских линија пореклом од различитих тумора дате су табеларно (табела 36).

Табела 36. IC₅₀ вредности стандарда кверцетина и амигдалина, екстракта зеленог чаја и изолованог амигдалина из семена шљиве

Једињење	IC ₅₀ (µg cm ⁻³)				
	MDA-MB-361	MDA-MB-453	HeLa	LS-174	MRC-5
екстракт зеленог чаја					
кверцетин	114,39±0,13	95,48±2,53	47,41±0,03	78,12±0,02	>200
изоловани амигдалин	>400	379,5±10,23	>400	>400	>400
амигдалин	>400	304,65±29,17	333,27±22,35	333,17±71,59	>400

IC₅₀ вредности су изражене као средња вредност±SD одређена преко резултата МТТ теста у три независна експеримента.

Активност изолованог амигдалина и његовог стандарда није уочена при концентрацијама нижим од 400 µg cm⁻³ на MDA-MB-361 ћелијској линији, док је на MDA-MB-453 постигнуто IC₅₀ деловање при концентрацијама 304,65 µg cm⁻³ (стандард

амигдалина) и $379,5 \mu\text{g cm}^{-3}$ (изоловани амигдалин). Виша вредност IC_{50} за изоловани амигдалин може се објаснити тиме што је изолат био ниже чистоће од расположивог стандарда. Изолат амигдалина није показао антипролиферативну активност на осталим ћелијским линијама за разлику од стандарда, код кога је одређена активност на HeLa и LS-174 ћелијским линијама при концентрацијама $333,27$ и $333,17 \mu\text{g cm}^{-3}$. Добијени резултати за стандард и изолат амигдалина донекле су и очекивани, с обзиром да су Syrigos и сар. (1998) одредили високу IC_{50} вредност амигдалина од $40,4 \text{ mmol dm}^{-3}$ на плеоморфним прелазним ћелијама тумора (HT1376). Овај проблем решили су додатком ензима β -D-глукозидазе, при чему је цитотоксичност амигдалина повећана 25 пута. Запажено је да кверцетин и екстракт зеленог чаја показују значајну цитотоксичну активност на естроген зависним (MDA-MB-361) и естроген независним (MDA-MB-453) ћелијским линијама тумора дојке. Добијене вредности цитотоксичности кверцетина за ове ћелијске линије усаглашене су са литературним вредностима датим у табели 5. Екстракт зеленог чаја показао је активност и на HeLa и LS-174 ћелијским линијама при концентрацијама од $47,41$ и $78,12 \mu\text{g cm}^{-3}$, респективно. У овом случају концентрације кверцетина које су показале IC_{50} активност износиле су $44,07 \mu\text{mol dm}^{-3}$ за HeLa ћелије и $24,28 \mu\text{mol dm}^{-3}$ за LS-174 ћелије. Дакле, за разлику од антипролиферативне активности кверцетина, активност екстракта била је већа код ћелија хуманог аденокарцинома грлића материце у поређењу са ћелијама хуманог карцинома дебелог црева. Антипролиферативно дејство екстракта и кверцетина једино није уочено на ћелијама MRC-5 ћелијским линијама при концентрацијама нижим од $200 \mu\text{g cm}^{-3}$, односно $60 \mu\text{g cm}^{-3}$.

Ниједан од тестираних узорака није показао цитотоксичност на здраве MRC-5 ћелије, што представља значајан резултат ових испитивања и могућност примене добијених екстраката и изолованог амигдалина као антиканцерских агенаса.

Даља истраживања биће усмерена на повећање цитотоксичности амигдалина додатком ензима β -D-глукозидазе, као што је то урађено на другим ћелијским линијама. Циљ је да се додатком овог ензима повећа хидролиза амигдалина и тиме повећа проценат ослобођене цијановодоничне киселине, која је директно одговорна за антипролиферативну активност амигдалина. На овај начин би највероватније дошло до повећања цитотоксичности и смањења вредности IC_{50} за испитиване ћелијске линије.

5. ЗАКЉУЧАК

За одређивање садржаја кверцетина у екстракту зеленог чаја развијена је и валидирана RP-HPLC метода. Предност методе је краће време анализе и једноставнији састав мобилне фазе.

Развијена је и валидирана нова RP-HPLC метода за идентификацију и квантификацију амигдалина у екстракту семена шљиве. Применом мобилне фазе вода:ацетонитрил (25:75 v/v) постигнута је значајна сепарација пикова.

Поступак екстракције кверцетина из листа зеленог чаја успешно је моделован и оптимизован применом CCD и MLP модела. Применом CCD одређени су оптимални услови екстракције: време екстракције 58,5 min, концентрација етанола 94,7% (v/v) и однос биљне сировине и растварача 1:19,4 (m/v). На основу доброг слагања предвиђеног приноса кверцетина (1,34 g/100 g с.о.) и експериментално добијене вредности (1,36 g/100 g с.о.) закључено је да је модел експерименталног дизајна адекватан и валидан.

Мрежа топологије MLP 3-5-1 са логистичком функцијом у скривеном слоју и линеарном функцијом у излазном слоју, изабрана је као оптимална за моделовање поступка екстракције кверцетина. MLP модел има боље перформансе приликом предвиђања приноса кверцетина у односу на модел CCD. Предвиђена вредност приноса кверцетина износила је 1,54 g/100 g с.о. при условима: време екстракције 60 min, 100% (v/v) етанол, солвомодул 1:18 (m/v). Одређена експериментална вредност приноса кверцетина (1,55 g/100 g с.о.) у сагласности је са предвиђеном вредношћу.

Садржај укупних флавоноида одређен је у екстрактима добијеним приликом оптимизације поступка екстракције кверцетина. На основу ових података оптимизован је поступак екстракције укупних флавоноида применом модела експерименталног дизајна и вештачке неуронске мреже. За време екстракције 43,1 min и концентрације етанола 95,6% (v/v) при солвомодулу 1:32,9 (m/v) употребом CCD модела предвиђа се оптимални принос укупних флавоноида 2,40 g/100 g с.о., док је експериментално добијена вредност при датим условима 2,44 g/100 g с.о.

MLP модел са три улазне променљиве и седам скривених неурона, применом логистичке функције у скривеном слоју и линеарне функције у излазном слоју показао се оптималном мрежом за предвиђање приноса укупних флавоноида. Оптимизовањем неуронске мреже симплекс методом добијени су оптимални услови екстракције: време екстракције 42,6 min, 100% (v/v) етанол и солвомодул 1:30,4 (m/v). Предвиђени принос (2,42 g/100 g с.о.) за оптималне услове усаглашен је са експериментално добијеном

вредношћу (2,45 g/100 g с.о.). На овај начин потврђена је валидност предложеног модела.

Оптимизација поступка екстракције амигдалина из семена шљиве извршена је применом CCD са четири независне променљиве (време екстракције, концентрација етанола, однос биљне сировине и растварача, температура екстракције). Као одзивна величина посматран је принос амигдалина. Оптимални услови екстракције амигдалина су: време екстракције 116,3 min, 100% (v/v) етанол, солвомодул 1:24,3 (m/v) и температура 32,1 °C. Принос амигдалина (22,2 g/100 g с.о.) предвиђен предложеним моделом потврђен је и експериментално (22,3 g/100 g с.о.).

Оптимална неуронска мрежа за предвиђање приноса амигдалина је MLP (4-3-1) са експоненцијалном функцијом у скривеном слоју и линеарном функцијом у излазном слоју. Након 400 итерација добијени су оптимални услови: време екстракције 120 min, 100% (v/v) етанол, однос биљне сировине и растварача 1:25 (m/v) и температура 34,4 °C. Предвиђени принос амигдалина (25,42 g/100 g с.о.) за оптималне услове екстракције у сагласности је са експериментално добијеном вредношћу (25,30 g/100 g с.о.).

За екстракцију биоактивних једињења (кверцетина, укупних флавоноида, амигдалина) усвојени су оптимални услови добијени неуронским мрежама, због већих приноса. У екстракту зеленог чаја поред кверцетина идентификовани су и (+)-катехин, кофеин, теобромин, 5-О-галоилхининска киселина, теафлавин-3-галат, гална киселина, (-)-галокатехин, 3-О-кофеоилхининска киселина, (-)-епигалокатехин-3-галат, 4-р-кумароилхининска киселина, (-)-епикатехин-3-галат, кверцетин-3-О-рутинозид, кверцетин-3-О-галактозид, коњугат кемферола-рамнозе-хексозе-рамнозе, кемферол-3-О-глукозид, апигенин гликозид, теафлавин-3,3'-дигалат.

Применом ESI-MS/MS методе у екстракту семена шљиве идентификована је бензоева киселина, *p*-хидроксibenзоева киселина, ванилин, 3,4-дихидрокси-бензоева киселина, ванилна киселина, гална киселина, сирингалдехид и сирингинска киселина.

Амигдалин је изолован из етанолног екстракта семена шљиве у виду талога након додатка диетил-етра. Чистоћа тако добијеног амигдалина била је већа од 90% и одређена је HPLC методом у односу на расположиви стандард. Изоловани амигдалин структурно је окарактерисан IC, UV-VIS, ESI-MS/MS методама.

Добијени резултати фотостабилности указују да су амигдалин и кверцетин у чврстом стању нестабилни на дејство UV зрачења и то више него на дневну светлост. Фотодеградација амигдалина и кверцетина прати кинетику првог реда.

Вредности капацитета неутрализације DPPH радикала за кверцетин и екстракт зеленог чаја су преко 90%, што указује на врло високу антиоксидативну активност. Амигдалин је показао слабију антиоксидативну активност (52,3%) у односу на активност екстракта семена шљиве (61,3%).

Микробиолошка испитивања показују да су сојеви гљивица (*C. albicans* и *A. brasiliensis*) резистентни на дејство свих испитиваних узорака. Стандард амигдалина и екстракт семена шљиве испољавају антимикуробну активност само на сојеве *P. aeruginosa* (>23 mm код оба узорка) и *E. coli* (17-19 mm и 20-22 mm, респективно). Стандард кверцетина и екстракт зеленог чаја имају додатно дејство и на сој *S. aureus* са зонама инхибиције 20-22 mm и 17-19 mm, респективно.

Најмању IC₅₀ вредност (24,24 µg cm⁻³) показао је кверцетин на туморским ћелијама LS-174, док је највећа вредност запажена код амигдалина (>400 µg cm⁻³) на туморским ћелијама MDA-MB-361. На основу добијених IC₅₀ вредности, кверцетин испољава најбољу активност на свим испитиваним ћелијама тумора (MDA-MB-361, MDA-MB-453, HeLa, LS-174).

6. ЛІТЕРАТУРА

- Abirami P, Rajendran A, GC-MS analysis of methanol extracts of *Vernonia cinerea*, *Eur J Exp Biol*, 2(1), 2012, 9–12.
- Abuin M, Carro AM, Lorenzo RA, Experimental design of a microwave-assisted extraction–derivatization method for the analysis of methylmercury, *J Chromatogr A*, 889(1), 2000, 185–193.
- Adeyemi MM, Adebote DA, Amupitan JO, Oyewale AO, Agbaji AS, Antifeedant activity of quercetin isolated from the stem bark of *Bobgunnia madagascariensis* (Desv.) JH Kirkbr & Wiersema (*Caesalpinaceae*), *Aust J Basic Appl Sci*, 4, 2010, 3238–3243.
- Akhavan O, Kalae M, Alavi ZS, Ghiasi SMA, Esfandiar A, Increasing the antioxidant activity of green tea polyphenols in the presence of iron for the reduction of graphene oxide, *Carbon*, 50(8), 2012, 3015–3025.
- Anand P, Kunnumakkara AB, Sundaram C, Harikumar KB, Tharakan ST, Lai OS, Sung B, Aggarwal BB, Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes, *Pharm Res*, 25(9), 2008, 2097–2116.
- Anastácio A, Carvalho IS, Phenolics extraction from sweet potato peels: Key factors screening through a Placket–Burman design, *Ind Crop Prod*, 43, 2013, 99–105.
- Anbumani K, Nedunchezian R, *Soft Computing Applications for Database Technologies: Techniques and Issues*, Idea Group Inc (IGI), Hershey, USA, 2010, pp 80.
- Ao C, Li A, Elzaawely AA, Xuan TD, Tawata S, Evaluation of antioxidant and antibacterial activities of *Ficus microcarpa* L. fil. extract, *Food Control*, 19(10), 2008, 940-948.
- Aquino R, Morelli S, Tomaino A, Pellegrino M, Saija A, Grumetto L, Pugli C, Ventura D, Bonina F, Antioxidant and photoprotective activity of a crude extract of *Culcitium reflexum* H.B.K. leaves and their major flavonoids, *J Ethnopharmacol*, 79(2), 2002, 183-191.
- Arnao MB, Cano A, Acosta M, The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity, *Food Chem*, 73(2), 2001, 239–244.
- Arora DS, Kaur GJ, Kaur H, Antibacterial activity of tea and coffee: Their extracts and preparations, *Int J Food Prop*, 12(2), 2009, 286-294.
- Azam S, Hadi N, Khan NU, Hadi SM, Antioxidant and prooxidant properties of caffeine, theobromine and xanthine, *Med Sci Monit*, 9(9), 2003, BR325-330.
- Aziz NH, Farag SE, Mousa LA, Abo-Zaid MA, Comparative antibacterial and antifungal effects of some phenolic compounds, *Microbios*, 93(374), 1997, 43-54.

- Balkon J, Methodology for the detection and measurement of amygdalin in tissues and fluids, *J Anal Toxicol*, 6(5), 1982, 244–249.
- Baroni A, Paoletti I, Greco R, Satriano RA, Ruocco E, Tufano MA, Perez JJ, Immunomodulatory effects of a set of amygdalin analogues on human keratinocyte cells, *Exp Dermatol*, 14(11), 2005, 854–859.
- Barros L, Dueñas M, Carvalho AM, Ferreira IC, Santos-Buelga C, Characterization of phenolic compounds in flowers of wild medicinal plants from Northeastern Portugal, *Food Chem Toxicol*, 50(5), 2012, 1576–1582.
- Ben Hameda A, Gajdošová D, Havel J, Analysis of *Salvia officinalis* plant extracts by capillary electrophoresis, *J Sep Sci*, 29(8), 2006, 1188–1192.
- Benzie IF, Strain JJ, The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay, *Anal Biochem*, 239(1), 1996, 70–76.
- Bezerra MA, Santelli RE, Oliveira EP, Villar LS, Escalera LA, Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry, *Talanta*, 76(5), 2008, 965–977.
- Bolarinwa IF, Orfila C, Morgan MR, Amygdalin content of seeds, kernels and food products commercially-available in the UK, *Food Chem*, 152, 2014, 133-139.
- Boots AW, Wilms LC, Swennen EL, Kleinjans J, Bast A, Haenen GR, *In vitro* and *ex vivo* anti-inflammatory activity of quercetin in healthy volunteers, *Nutrition*, 24(7), 2008, 703–710.
- Borghetti GS, Lula IS, Sinisterra RD, Bassani VL, Quercetin/ β -cyclodextrin solid complexes prepared in aqueous solution followed by spray-drying or by physical mixture, *AAPS Pharm Sci Tech*, 10(1), 2009, 235–242.
- Brachet A, Christen P, Gauvrit JY, Longerey R, Lantéri P, Veuthey JL, Experimental design in supercritical fluid extraction of cocaine from coca leaves, *J Biochem Bioph Meth*, 43(1), 2000, 353–366.
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C, Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, *LWT-Food Sci Technol*, 28(1), 1995, 25-30.
- Branković-Magić M, Dobričić J, Janković R, Konstantopoulou I, Yannoukakos D, Radulović S, Identifying and testing for hereditary susceptibility to breast/ovarian cancer in Serbia: Where are we now?, *Arch Oncol*, 14(3-4), 2006, 131–135.
- Braspenning PJ, Thuijsman F, Weijters AJMM, Artificial neural networks: an introduction to ANN theory and practice, Vol. 931, Springer, 1995, pp 157.

- Bravo MN, Silva S, Coelho AV, Boas LV, Bronze MR, Analysis of phenolic compounds in Muscatel wines produced in Portugal, *Anal Chim Acta*, 563(1), 2006, 84–92.
- Brimer L, Cicalini AR, Federici F, Petruccioli M, Amygdalin degradation by *Mucor circinelloides* and *Penicillium aurantiogriseum*: mechanisms of hydrolysis, *Arch Microbiol*, 169(2), 1998, 106-112.
- Bruneton J, Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plant, Intercept, Lavoisier, UK, 1999.
- Cabrera C, Artacho R, Giménez R, Beneficial effects of green tea – A review, *J Am Coll Nutr*, 25(2), 2006, 79–99.
- Calabro ML, Galtieri V, Cutroneo P, Tommasini S, Ficarra P, Ficarra P, Study of the extraction procedure by experimental design and validation of a LC method for determination of flavonoids in *Citrus bergamia* juice, *J Pharm Biomed Anal*, 35(2), 2004a, 349–363.
- Calabro ML, Tommasini S, Raneri D, Donato P, Ficarra P, Ficarra R, Selective reversed-phase liquid chromatography method for the kinetic investigation of 3-hydroxyflavone photostability, *J Chromatogr B*, 800(1), 2004b, 245-251.
- Calmese ID, The Proteretic Hopfield Neural Network Analog to Digital Converter, ProQuest, USA, 2008, pp 3.
- Camins BC, Marschall J, De Vader SR, Maker DE, Hoffman MW, Fraser VJ, The clinical impact of fluoroquinolone resistance in patients with *E. coli* bacteremia, *J Hosp Med*, 6(6), 2011, 344-349.
- Careri M, Corradini C, Elviri L, Mangia A, Optimization of a rapid microwave assisted extraction method for the liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry determination of isoflavonoid aglycones in soybeans, *J Chromatogr A*, 1152(1), 2007, 274-279.
- Careri M, Mangia A, Mori G, Musci M, A new multivariate approach for the optimisation of the simultaneous distillation-extraction technique for free fatty acids using a face centred cube experimental design: application to Parmigiano-Reggiano cheese, *Anal Chim Acta*, 386(1), 1999, 169-180.
- Casagrande R, Georgetti SR, Verri WA, Jabor JR, Santos AC, Fonseca MJ, Evaluation of functional stability of quercetin as a raw material and in different topical formulations by its antilipoperoxidative activity, *AAPS Pharm Sci Tech*, 7(1), 2006, E64-E78.

- Chang CC, Yang MH, Wen HM, Chern JC, Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods, *J Food Drug Anal*, 10(3), 2002, 178–182.
- Chang HK, Shin MS, Yang HY, Lee JW, Kim YS, Lee MH, Kim J, Kim KH, Kim CJ, Amygdalin induces apoptosis through regulation of bax and bcl-2 expressions in human DU145 and LNCaP prostate, *Cancer Cells: Biol Pharm Bull*, 29(8), 2006, 1597–1602.
- Chang J, Zhang Y, Catalytic degradation of amygdalin by extracellular enzymes from *Aspergillus niger*, *Process Biochem*, 47(2), 2012, 195–200.
- Chanwitheesuk A, Teerawutgulrag A, Kilburn JD, Rakariyatham N, Antimicrobial gallic acid from *Caesalpinia mimosoides* Lamk, *Food Chem*, 100(3), 2007, 1044-1048.
- Chaouali N, Gana I, Dorra A, Khelifi F, Nouioui A, Masri W, Belwaer I, Ghorbel H, Hedhili A, Potential Toxic Levels of Cyanide in Almonds (*Prunus amygdalus*), Apricot Kernels (*Prunus armeniaca*), and Almond Syrup, *ISRN Toxicology*, 2013, 2013, 1-6.
- Chirico N, Gramatica P, Real external predictivity of QSAR models. Part 2. New intercomparable thresholds for different validation criteria and the need for scatter plot inspection, *J Chem Inf Model*, 52(8), 2012, 2044–2058.
- Cho YS, Schiller NL, Oh KH, Antibacterial effects of green tea polyphenols on clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Curr Microbiol*, 57(6), 2008, 542-546.
- Choi CW, Kim SC, Hwang SS, Choi BK, Ahn HJ, Lee MY, Park SH, Kim SK, Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison, *Plant Sci*, 163(6), 2002, 1161-1168.
- Chou CC, Lin LL, Chung KT, Antimicrobial activity of tea as affected by the degree of fermentation and manufacturing season, *Int J Food Microbiol*, 48(2), 1999, 125-130.
- Clifford MN, Johnston KL, Knight S, Kuhnert N, Hierarchical scheme for LC–MSⁿ identification of chlorogenic acids, *J Agric Food Chem*, 51(10), 2003, 2900–2911.
- Clifford MN, Knight S, Kuhnert N, Discriminating between the six isomers of dicaffeoylquinic acid by LC–MSⁿ, *J Agric Food Chem*, 53(10), 2005, 3821–3832.
- Colegate SM, Molyneux, RJ, Bioactive natural products: detection, isolation, and structural determination, 2nd Edition, CRC press, 2007.
- Collings BA, Romaschin MA, MS/MS of Ions in a low pressure linear ion trap using a pulsed gas, *J Am Soc Mass Spectr*, 20(9), 2009, 1714-1717.

- Cui Y, Morgenstern H, Greenland S, Tashkin DP, Mao JT, Cai L, Cozen W, Mack TM, Lu QY, Zhang ZF, Dietary flavonoid intake and lung cancer—a population-based case-control study, *Cancer*, 112(10), 2008, 2241–2248.
- Dai Q, Shu XO, Li H, Yang G, Shrubsole MJ, Cai H, Ji B, Wen W, Franke A, Gao YT, Zheng W, Is green tea drinking associated with a later onset of breast cancer?, *Ann Epidemiol*, 20(1), 2010, 74–81.
- Daneshvand B, Ara KM, Raofie F, Comparison of supercritical fluid extraction and ultrasound-assisted extraction of fatty acids from quince (*Cydonia oblonga* Miller) seed using response surface methodology and central composite design, *J Chromatogr A*, 1252, 2012, 1–7.
- Del Rio D, Stewart AJ, Mullen W, Burns J, Lean ME, Brighenti F, Crozier A, HPLC-MSⁿ analysis of phenolic compounds and purine alkaloids in green and black tea, *J Agr Food Chem*, 52(10), 2004, 2807-2815.
- Delhaes L, Lazaro JE, Gay F, Thellier M, Danis M, The microculture tetrazolium assay (MTA): another colorimetric method of testing *Plasmodium falciparum* chemosensitivity, *Ann Trop Med Parasitol*, 93(1), 1999, 31-40.
- Dimitrieska-Stojković E, Zdravkovski Z, Supercritical fluid extraction of quercetin and rutin from *Hyperici Herba*, *J Liq Chromatogr RT*, 26(15), 2003, 2517-2533.
- Dong J, Yin C, Zang HC, Lee CY, Chen CL, Research on antioxidative activities of amygdalin from Almond pollen, *Food Science*, 8, 2007, 011.
- Dutta NK, Mazumdar K, Mishra US, Dastidar SG, Park JH, Isolation and identification of a flavonone from *Butea frondosa*, *Pharmaceut Chem J*, 41(5), 2007, 99–101.
- Edziri H, Mastouri M, Mahjoub MA, Mighri Z, Mahjoub A, Verschaeve L, Antibacterial, antifungal and cytotoxic activities of two flavonoids from *Retama raetam* flowers, *Molecules*, 17(6), 2012, 7284–7293.
- Enculescu M, Vitamin B17/Laetrile/Amygdalin – A review, *Bulletin UASVM Animal Science and Biotechnologies*, 2009, 66(1-2), 20-25.
- Erdogan-Orhan I, Kartal M, Insights into research on phytochemistry and biological activities of *Prunus armeniaca* L. (apricot), *Food Res Int*, 44(5), 2011, 1238–1243.
- Ermer J, Validation in pharmaceutical analysis. Part I: an integrated approach, *J Pharm Biomed Anal*, 24(5), 2001, 755-767.
- Espín JC, Soler-Rivas C, Wichers HJ, Characterization of total free radical scavenger capacity of vegetable oils and oil fractions using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical, *J Agr Food Chem*, 48(3), 2000, 648-656.

- Ezhilan BP, Neelamegam R, GC-MS analysis of phytocomponents in the ethanol extract of *Polygonum chinense* L, *Pharmacognosy Res*, 4(1), 2012, 11–14.
- Fearon K, Strasser F, Anker SD, Bosaeus I, Bruera E, Fainsinger RL, Jatoi A, Loprinzi C, MacDonald N, Mantovani G, Davis M, Muscaritoli M, Ottery F, Radbruch L, Ravasco P, Walsh D, Wilcock A, Kaasa S, Baracos VE, Definition and classification of cancer cachexia: an international consensus, *Lancet Oncol*, 12(5), 2011, 489–495.
- Fee J, *The Anaemic Leukaemic: A Message of Hope*, AuthorHouse, UK, 2010, pp 194.
- Fenselau C, Pallante S, Batzinger RP, Benson WR, Barron RP, Sheinin, Maienthal M, Mandelonitrile beta-glucuronide: synthesis and characterization, *Science*, 198(4317), 1977, 625–627.
- Finger A, Kuhr S, Engelhardt UH, Chromatography of tea constituents, *J Chromatogr A*, 624(1), 1992, 293-315.
- Fischböck G, Pfannhauser W, Kellner R, GC-FTIR as a powerful tool for the characterization of flavor components in Kiwi, *Microchimica Acta*, 96(1-6), 1988, 249–257.
- Frey DD, Engelhardt F, Greitzer EM, A role for "one-factor-at-a-time" experimentation in parameter design, *Res Eng Des*, 14(2), 2003, 65-74.
- Friedman M, Henika PR, Levin CE, Mandrell RE, Kozukue N, Antimicrobial activities of tea catechins and theaflavins and tea extracts against *Bacillus cereus*, *J Food Protect*, 69(2), 2006, 354-361.
- Friedman M, Henika PR, Mandrell RE, Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*, *J Food Prot*, 65(10), 2002, 1545-1560.
- Friedman M, Overview of antibacterial, antitoxin, antiviral, and antifungal activities of tea flavonoids and teas, *Mol Nutr Food Res*, 51(1), 2007, 116-134.
- Frohne D, Pfander HJ, *Poisonous plants: A handbook for doctors, pharmacists, toxicologists, biologists, and veterinarians*, 2nd Edition, Timber Press, London, 2005, pp 338.
- Gatto MT, Falcocchio S, Grippa E, Mazzanti G, Battinelli L, Nicolosi G, Lambusta D, Saso L, Antimicrobial and anti-lipase activity of quercetin and its C2-C16 3-O-acyl-esters. *Bioorgan Med Chem*, 10(2), 2002, 269-272.
- Gaudreau C, Gilbert H, Comparison of disc diffusion and agar dilution methods for antibiotic susceptibility testing of *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* and *Campylobacter coli*, *J Antimicrob Chemoth*, 39(6), 1997, 707-712.

- Ge BY, Chen HX, Han FM, Chen Y, Identification of amygdalin and its major metabolites in rat urine by LC–MS/MS, *J Chromatogr B*, 857(2), 2007, 281-286.
- Güçlü K, Altun M, Özyürek M, Karademir SE, Apak R, Antioxidant capacity of fresh, sun-and sulphited-dried Malatya apricot (*Prunus armeniaca*) assayed by CUPRAC, ABTS/TEAC and folin methods, *Int J Food Sci Tech*, 41(suppl 1), 2006, 76-85.
- Gugler R, Leschik M, Dengler HJ, Disposition of quercetin in man after single oral and intravenous doses, *Eur J Clin Pharmacol*, 9(2-3), 1975, 229–234.
- Hadjmohammadi M, Sharifi V, Investigation of optimum extraction conditions for determination of quercetin and kaempferol in coriander (*Coriandrum sativum* L.) by using experimental design and HPLC, *J Food Drug Anal*, 17(4), 2009, 293–299.
- Hadjmohammadi MR, Nazari SS, Separation optimization of quercetin, hesperetin and chrysin in honey by micellar liquid chromatography and experimental design, *J Sep Sci*, 33(20), 2010, 3144-3151.
- Haffajee AD, Socransky SS, Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases, *Periodontol*, 5(1), 2000, 78–111.
- Hafizi A, Ahmadpour A, Koolivand-Salooki M, Heravi MM, Bamoharram FF, Comparison of RSM and ANN for the investigation of linear alkylbenzene synthesis over $H_{14}[NaP_5W_{30}O_{110}]/SiO_2$ catalyst, *J Ind Eng Chem*, 19, 2013, 1981–1989.
- Hajdu SI, A note from history: landmarks in history of cancer, part 1, *Cancer*, 117(5), 2011, 1097–1102.
- Haque MR, Bradbury JH, Total cyanide determination of plants and foods using the picrate and acid hydrolysis methods, *Food Chem*, 77(1), 2002, 107-114.
- Harris CJ, *Advances In Intelligent Control*, CRC Press, UK, 1994, pp 185.
- Hartwell JL, *Plants used against cancer*, Quarterman Publications, Lawrence, 1982.
- Hassanein MM, Studies on non-traditional oils: Detailed studies on different lipid profiles of some *Rosaceae* kernel oils, *Grasasy Aceites*, 50(5), 1999, 379–384.
- Haykin S, *Neural Networks: a comprehensive foundation*, Prentice Hall PTR, New York, 1994.
- Hecht-Nielsen R, *Neurocomputing*, Addison-Wesley, Reading, MA, 1990.
- Hee-Young K, Seon-Pyo H, Dong-Hoon H, Hee KJ, Apoptosis induction of *Persicae* semen extract in human Promyelocytic Leukemia (HL-60) cells, *Arch Pharm Res*, 26(2), 2003, 157-161.

- Heinecke JW, Oxidants and antioxidants in the pathogenesis of atherosclerosis: implications for the oxidized low density lipoprotein hypothesis, *Atherosclerosis*, 141(1), 1998, 1-15.
- Horie H, Kohata K, Application of capillary electrophoresis to tea quality estimation, *J Chromatogr A*, 802(1), 1998, 219-223.
- Huang W, Xue A, Niu H, Jia Z, Wang J, Optimised ultrasonic-assisted extraction of flavonoids from *Folium eucommiae* and evaluation of antioxidant activity in multi-test systems *in vitro*, *Food Chem*, 114(3), 2009, 1147-1154.
- Hund E, Massart DL, Smeyers-Verbeke J, Robust regression and outlier detection in the evaluation of robustness tests with different experimental designs, *Anal Chim Acta*, 463(1), 2002, 53-73.
- Hwang EY, Lee JH, Lee YM, Hong SP, Reverse-phase HPLC separation of D-amygdalin and neoamygdalin and optimum conditions for inhibition of racemization of amygdalin, *Chem Pharm Bull*, 50(10), 2002, 1373-1375.
- Hwang EY, Lee SS, Lee JH, Hong SP, Development of quantitative extraction method of amygdalin without enzymatic hydrolysis from tōnin (*Persicae semen*) by high performance liquid chromatography, *Arch Pharm Res*, 25(4), 2002a, 453-456.
- Hwang HJ, Kim P, Kim CJ, Lee HJ, Shim I, Yin CS, Yang Y, Hahm DH, Antinociceptive effect of amygdalin isolated from *Prunus armeniaca* on formalin-induced pain in rats, *Biol Pharm Bull*, 31(8), 2008, 1559-1564.
- ICH, Topic Q1B: Stability testing: Photostability testing of new drug substances and products, 1996, <http://www.ich.org>.
- ICH, Topic Q2(R1): Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, 2005, <http://www.ich.org>.
- Ioku K, Tsushida T, Takei Y, Nakatani N, Terao J, Antioxidative activity of quercetin and quercetin monoglucosides in solution and phospholipid bilayers, *BBA-Biomembranes*, 1234(1), 1995, 99-104.
- Ishisaka A, Ichikawa S, Sakakibara H, Piskula MK, Nakamura T, Kato Y, Ito M, Miyamoto K, Tsuji A, Kawai Y, Terao J, Accumulation of orally administered quercetin in brain tissue and its antioxidative effects in rats, *Free Radical Bio Med*, 51(7), 2011, 1329-1336.
- Iwasaki M, Inoue M, Sasazuki S, Miura T, Sawada N, Yamaji T, Shimazu T, Willett WC, Tsugane S, Plasma tea polyphenol levels and subsequent risk of breast cancer among

- Japanese women: a nested case-control study, *Breast Cancer Res RT*, 124(3), 2010, 827–834.
- Jain AK, Mao J, Mohiuddin KM, Artificial neural networks: a tutorial, *IEEE Computer*, 29(3), 1996, 31–44.
- Jiagan D, Li C, Wang H, Hao E, Du Z, Bao C, Lv J, Wang Y, Amygdalin mediates relieved atherosclerosis in apolipoprotein E deficient mice through the induction of regulatory T cells, *Biochem Biophys Res Commun*, 411(3), 2011, 523-529.
- Joshi UJ, Gadge AS, D’Mello P, Sinha R, Srivastava S, Govil G, Anti-inflammatory, antioxidant and anticancer activity of quercetin and its analogues, *Int J Res Pharm Biomed Sci*, 2(4), 2011,1757–1766.
- Kai C, Jing J, Jia Y, Ming-qiang X, Huan-rong LI, Optimization of amygdalin extraction from apricot-kernel using response surface methodology, *Xinjiang Agricultural Sciences*, 5(27), 2010.
- Kamiyama M, Shibamoto T, Flavonoids with potent antioxidant activity found in young green barley leaves, *J Agric Food Chem*, 60(25), 2012, 6260–6267.
- Kanga SH, Jung H, Kim N, Shin DH, Chung DS, Micellar electrokinetic chromatography for the analysis of D-amygdalin and its epimer in apricot kernel, *J Chromatogr A*, 866(2), 2000, 253-259.
- Käppeli U, Hächler H, Giezendanner N, Beutin L, Stephan R, Human infections with non-O157 shiga toxin-producing *Escherichia coli*, *Emerg Infect Dis*, 17(2), 2011, 180-185.
- Katira P, Zaman MH, Bonnacaze RT, How changes in cell mechanical properties induce cancerous behavior, *Phys Rev Lett*, 108(2), 2012, 028103.
- Kehe K, Balszuweit F, Steinritz D, Thiermann H, Molecular toxicology of sulfur mustard-induced cutaneous inflammation and blistering, *Toxicology*, 263(1), 2009, 12-19.
- Kempuraj D, Castellani ML, Petrarca C, Frydas S, Conti P, Theoharides TC, Vecchiet J, Inhibitory effect of quercetin on tryptase and interleukin-6 release, and histidine decarboxylase mRNA transcription by human mast cell-1 cell line, *Clin Exp Med*, 6(4), 2006, 150–156.
- Kempuraj D, Madhappan B, Christodoulou S, Boucher W, Cao J, Papadopoulou N, Cetrulo CL, Theoharides TC, Flavonols inhibit proinflammatory mediator release, intracellular calcium ion levels and protein kinase C theta phosphorylation in human mast cells, *Br J Pharmacol*, 145(7), 2005, 934–944.

- Khajeh M, Moghaddam MG, Shakeri M, Application of artificial neural network in predicting the extraction yield of essential oils of *Diplotaenia cachrydifolia* by supercritical fluid extraction, *J Supercritical Fluids*, 69, 2012, 91–96.
- Khallouki F, Haubner R, Erben G, Ulrich CM, Owen RW, Phytochemical composition and antioxidant capacity of various botanical parts of the fruits of *Prunus domestica* L. from the Lorraine region of Europe, *Food Chem*, 133(3), 2012, 697–706.
- Kim Y, Goodner KL, Park JD, Choi J, Talcott ST, Changes in antioxidant phytochemicals and volatile composition of *Camellia sinensis* by oxidation during tea fermentation, *Food Chem*, 129(4), 2011, 1331–1342.
- Kim YW, Chun HJ, Kim IW, Liu HB, Ahn WS, Antimicrobial and antifungal effects of green tea extracts against microorganisms causing vaginitis, *Food Sci Biotechnol*, 22(3), 2013, 713-719.
- Kleemann R, Verschuren L, Morrison M, Zadelaar S, van Erk MJ, Wielinga, Kooistra T, Anti-inflammatory, anti-proliferative and anti-atherosclerotic effects of quercetin in human *in vitro* and *in vivo* models, *Atherosclerosis*, 218(1), 2011, 44–52.
- Koo JY, Hwang EY, Cho S, Lee JH, Lee YM, Hong SP, Quantitative determination of amygdalin epimers from armeniacaee semen by liquid chromatography, *J Chromatogr B*, 814(1), 2005, 69–73.
- Koo SI, Noh SK, Green tea as inhibitor of the intestinal absorption of lipids: potential mechanism for its lipid-lowering effect, *J Nutr Biochem*, 18(3), 2007, 179–183.
- Križ Z, Koča J, Imberty A, Charlot A, Auzély-Velty R, Investigation of the complexation of (+)-catechin by β -cyclodextrin by a combination of NMR, microcalorimetry and molecular modeling techniques, *Org Biomol Chem*, 1(14), 2003, 2590–2595.
- Kubik A, Zatloukal P, Tomasek L, Pauk N, Havel L, Dolezal J, Plesko I, Interactions between smoking and other exposures associated with lung cancer risk in women: Diet and physical activity, *Neoplasma*, 54(1), 2007, 83–88.
- Kurahashi N, Sasazuki S, Iwasaki M, Inoue M, Tsugane S, Green tea consumption and prostate cancer risk in Japanese men: a prospective study, *Am J Epidemiol*, 167(1), 2008, 71–77.
- Kwon HJ, Lee JH, Hong SP, Improvement of the extraction efficiency of d-amygdalin from *Armeniacaee semen* powder through inactivating emulsin and suppressing the epimerization of d-amygdalin, *Arch Pharm Res*, 33(1), 2010, 81-86.

- Lalli JYY, *In vitro* pharmacological properties and composition of leaf essential oils and extracts of selected indigenous *Pelargonium* (*Geraniaceae*) species, PhD Thesis, University of the Witwatersrand, Johannesburg, 2005.
- Lamson DW, Brignall MS, Antioxidants and cancer, part 3: quercetin, *Altern Med Rev*, 5(3), 2000, 196.
- Langdon SP (ed.), *Cancer Cell Culture: Methods and Protocols*, Springer, Vol. 88, 2004, pp 165.
- Larson A, Symons D, Jalili T, Quercetin: A Treatment for Hypertension? –A Review of Efficacy and Mechanisms, *Pharmaceuticals*, 3(1), 2010, 237–250.
- Lawson J, *Design and Analysis of Experiments with SAS*, CRC Press, USA, 2010, pp 388.
- Leondes CT, *Biomechanical Systems Technology (Set)*, World Scientific, 2007, pp 220.
- Lewis GA, Mathieu D, Phan-Tan-Luu R, *Pharmaceutical Experimental Design*, CRC Press, USA, 1998.
- Li DQ, Jia X, Wei Z, Liu Z, Box–Behnken experimental design for investigation of microwave-assisted extracted sugar beet pulp pectin, *Carbohydr Polym*, 88(1), 2012, 342–346.
- Li X, Kolltveit KM, Tronstad L, Olsen I, Systemic diseases caused by oral infection, *Clin Microbiol Rev*, 13(4), 2000, 547-558.
- Lieberman MM, Patterson GM, Moore RE, *In vitro* bioassays for anticancer drug screening: effects of cell concentration and other assay parameters on growth inhibitory activity, *Cancer Lett*, 173(1), 2001, 21-29.
- Ligor M, Kornýšova O, Maruška A, Buszewski B, Determination of flavonoids in tea and Rooibos extracts by TLC and HPLC, *J Planar Chromatogr - Mod TLC*, 21(5), 2008, 355-360.
- Lin SD, Liu E, Mau JL, Effect of different brewing methods on antioxidant properties of steaming green tea, *LWT-Food Sci Technol*, 41(9), 2008, 1616-1623.
- Lingireddy S, Brion GM (eds.), *Artificial neural networks in water supply engineering*, ASCE Publications, USA, 2005, pp 11.
- Liu FF, Ang CY, Springer D, Optimization of extraction conditions for active components in *Hypericum perforatum* using response surface methodology, *J Agric Food Chem*, 48(8), 2000, 3364–3371.
- Liu W, Huang DS, Yi P, Fan AP, Yang J, Min Y, Gao MF, Study on extraction of amygdalin by ethanol refluxing from waste *Loquat* kernel, *Advanced Materials Res*, 361, 2012, 820-823.

- Lowe D, Broomhead D, Multivariable functional interpolation and adaptive networks, *Complex Systems*, 2, 1988, 321–355.
- Lv WF, Ding MY, Zheng R, Isolation and Quantitation of Amygdalin in apricot-kernel and *Prunus Tomentosa Thunb.* by HPLC with solid-phase extraction, *J Chromatogr Sci*, 43(7), 2005, 383-387.
- Makris DP, Rossiter JT, Heat-induced, metal-catalyzed oxidative degradation of quercetin and rutin (quercetin 3-O-rhamnosylglucoside) in aqueous model systems, *J Agr Food Chem*, 48(9), 2000, 3830-3838.
- Makris DP, Rossiter JT, Quercetin and rutin (quercetin 3-O-rhamnosylglucoside) thermal degradation in aqueous media under alkaline conditions, In: Buttriss J, Saltmarsh M, *Functional foods II: Claims and evidence*, UK: Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2000a, pp 216–238.
- Manach C, Morand C, Crespy V, Demigné C, Taxier O, Régéat F, Rémésy C, Quercetin is recovered in human plasma as conjugated derivatives which retain antioxidant properties, *FEBS Lett*, 426(3), 1998, 331–336.
- Maran JP, Manikandan S, Thirugnanasambandham K, Nivetha CV, Dinesh R, Box-Behnken design based statistical modeling for ultrasound-assisted extraction of corn silk polysaccharide, *Carbohydr Polym*, 92(1), 2010, 604-611.
- Marchitan N, Cojocar C, Mereuta A, Duca G, Cretescu I, Gonta M, Modeling and optimization of tartaric acid reactive extraction from aqueous solutions: A comparison between response surface methodology and artificial neural network, *Sep Purif Technol*, 75(3), 2010, 273–285.
- Marston A, Hostettmann K, Separation and Quantification of Flavonoids, In: Andersen OM, Markham KR, *Flavonoids-Chemistry, Biochemistry and Applications*, Taylor & Francis Group, London, 2006, pp 2-3.
- Masuoka N, Matsuda M, Kubo I, Characterisation of the antioxidant activity of flavonoids, *Food Chem*, 131(2), 2012, 541–545.
- Mašković M, Jančić-Stojanović B, Malenović A, Ivanović D, Medenica M, Assessment of liquid chromatographic method robustness by use of Plackett-Burman design, *Acta Chromatogr*, 22(2), 2010, 281-296.
- Matsuura H, Amano M, Kawabata J, Mizutani J, Isolation and measurement of quercetin glucosides in flower buds of Japanese butterbur (*Petasites japonicus* subsp. *gigantea* Kitam.), *Biosci Biotechnol Biochem*, 66(7), 2002, 1571–1575.

- Mayaud L, Carricajo A, Zhiri A, Aubert G, Comparison of bacteriostatic and bactericidal activity of 13 essential oils against strains with varying sensitivity to antibiotics, *Lett Appl Microbiol*, 47(3), 2008, 167-173.
- Mihajlović J, Pechlivanoglou P, Miladinov-Mikov M, Živković S, Postma MJ, Cancer incidence and mortality in Serbia 1999–2009, *BMC cancer*, 13(1), 2013, 1-11.
- Milazzo S, Lejeune S, Ernst E, Laetrile for cancer: a systematic review of the clinical evidence, *Support Care Cancer*, 15(6), 2007, 583–595.
- Min YD, Choi CH, Bark H, Son HY, Park HH, Lee S, Park JW, Park EK, Shin HI, Kim SH, Quercetin inhibits expression of inflammatory cytokines through attenuation of NF- γ B and p38 MAPK in HMC-1 human mast cell line, *Inflamm Res*, 56, 2007, 210–215.
- Momić T, Savić J, Černigoj U, Trebše P, Vasić V, Protolytic equilibria and photodegradation of quercetin in aqueous solution, *Collect Czech Chem C*, 72(11), 2007, 1447-1460.
- Monagas M, Suárez R, Gómez-Cordovés C, Bartolomé B, Simultaneous determination of nonanthocyanins in phenolic compounds in wines by HPLC-DAD/ESI-MS, *Am J Enol Vitic*, 56(2), 2005, 139-147.
- Montgomery DC, Design and analysis of experiments, 5th Edition, John Wiley & Sons, New York, 2001.
- Montgomery DC, Design and Analysis of Experiments, John Wiley & Sons, 7th Edition, New York, 2008.
- Moskovitz J, Yim KA, Chock PB, Free radicals and disease, *Arch Biochem Biophys*, 397(2), 2002, 354–359.
- Mullen W, Yokota T, Lean ME, Crozier A, Analysis of ellagitannins and conjugates of ellagic acid and quercetin in raspberry fruits by LC–MSⁿ, *Phytochemistry*, 64(2), 2003, 617-624.
- Munford R, Sensing gram-negative bacterial lipopolysaccharides: a human disease determinant?, *Infect Immun*, 76(2), 2008, 454-465.
- Murota K, Terao J, Antioxidative flavonoid quercetin: implication of its intestinal absorption and metabolism, *Arch Biochem Biophys*, 417(1), 2003, 12–17.
- Myers RH, Montgomery DC, Response Surface Methodology: Process and product optimization using designed experiments, 2nd Edition, John Wiley & Sons, New York, 2002.
- Nagle CM, Olsen CM, Bain CJ, Whiteman DC, Green AC, Webb PM, Tea consumption and risk of ovarian cancer, *Cancer Cause Control*, 21(9), 2010, 1485–1491.

- Nandutu AM, Clifford M, Howell NK, Analysis of phenolic compounds in Ugandan sweet potato varieties (NSP, SPK AND TZ), *African J Biochem Res*, 1(3), 2007, 29-36.
- Natella F, Nardini M, Di Felice M, Scaccini C, Benzoic and cinnamic acid derivatives as antioxidants: structure-activity relation, *J Agr Food Chem*, 47(4), 1999, 1453-1459.
- Nirmala MJ, Samundeeswari A, Sankar PD, Natural plant resources in anti-cancer therapy – A review, *Res Plant Biol*, 1(3), 2011, 1–14.
- Nout MJR, Tuncel G, Brimer L, Microbial degradation of amygdalin of bitter apricot seeds (*Prunus armeniaca*), *Int J Food Microbiol*, 24(3), 1995, 407–412.
- Nurulain TZ, Green tea and its polyphenolic catechins: Medicinal uses in cancer and noncancer applications, *Life Sciences*, 78, 2006, 2073–2080.
- Ogunleye AA, Xue F, Michels KB, Green tea consumption and breast cancer risk or recurrence: A meta-analysis, *Breast Cancer TR*, 119(2), 2010, 477–484.
- Paliwal S, Sundaram J, Mitragotri S, Induction of cancer-specific cytotoxicity towards human prostate and skin cells using quercetin and ultrasound, *Brit J Cancer*, 92(3), 2005, 499–502.
- Pan X, Welti R, Wang X, Quantitative analysis of major plant hormones in crude plant extracts by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry, *Nat Protoc*, 5(6), 2010, 986–992.
- Park HJ, Yoon SH, Han LS, Zheng LT, Jung KH, Uhm YK, Lee JH, Jeong JS, Joo WS, Yim SV, Chung JH, Hong SP, Amygdalin inhibits genes related to cell cycle in SNU-C4 humancolon cancer cells, *World J Gastroenterol*, 11(33), 2005, 5156–5161.
- Parmee IC, *Evolutionary and Adaptive Computing in Engineering Design*, Springer, UK, 2001, pp 18.
- Parsopoulos KE, Vrahatis MN, Initializing the particle swarm optimizer using the nonlinear simplex method, In: Grmela A and Mostarakis, NE (eds.), *Advances in intelligent systems, fuzzy systems, evolutionary computation*, WSEAS press, 2002, pp 216-221.
- Pavelić K, *Kako pobjediti rak*, Globus, Zagreb, 1989.
- Pedrielli P, Skibsted LH, Antioxidant synergy and regeneration effect of quercetin,(-)-epicatechin, and (+)-catechin on α -tocopherol in homogeneous solutions of peroxidating methyl linoleate, *J Agr Food Chem*, 50(24), 2002, 7138-7144.
- Pekkarinen SS, Heinonen IM, Hopia AI, Flavonoids quercetin, myricetin, kaemferol and (+)-catechin as antioxidants in methyl linoleate, *J Sci Food Agr*, 79(4), 1999, 499-506.

- Pérez-Vizcaíno F, Ibarra M, Cogolludo AL, Duarte J, Zaragoza-Arnáez F, Moreno L, López-López G, Tamargo J, Endothelium-independent vasodilator effects of the flavonoid quercetin and its methylated metabolites in rat conductance and resistance arteries, *J Pharmacol Exp Ther*, 302(1), 2002, 66–72.
- Phani ChRS, Vinaykumar Ch, Umamaheswara rao K, Sindhuja G, Quantitative analysis of quercetin in natural sources by RP-HPLC, *Int J Res Pharmaceut Biomed Sci*, 1(1), 2010, 19-22.
- Pinelo M, Manzocco L, Nuñez MJ, Nicoli MC, Solvent effect on quercetin antioxidant capacity, *Food Chem*, 88(2), 2004, 201-207.
- Poggio T, Girosi F, Networks for approximation and learning, *Proc IEEE*, 78(9), 1990, 1481–1497.
- Pralhad T, Rajendrakumar K, Study of freeze-dried quercetin-cyclodextrin binary systems by DSC, FT-IR, X-ray diffraction and SEM analysis, *J Pharm Biomed Anal*, 34(2), 2004, 333–339.
- Priddy KL, Keller PE, Artificial neural networks: An introduction, Vol. 68, SPIE Press, Washington, USA, 2005, pp 13.
- Prior RL, Hoang H, Gu L, Wu X, Bacchiocca M, Howard L, Hampsch-Woodill M, Huang D, Ou B, Jacob R, Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORACFL)) of plasma and other biological and food samples, *J Agr Food Chem*, 51(11), 2003, 3273–3279.
- Promega Corporation, Protocols and Applications Guide, Apoptosis, 2007.
- Promega Corporation, Protocols and Applications Guide, Cell Viability, 2006.
- Radji M, Agustama RA, Elya B, Tjampakasari CR, Antimicrobial activity of green tea extract against isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa*, *Asian Pac J Trop Biomed*, 3(8), 2013, 663-667.
- Rajalakshmi PV, Senthil KK, Direct HPLC analysis of quercetin in exudates of *Abutilon indicum* (Linn). *Malvaceae*, *J Pharmaceut Sci Tech*, 1(2), 2009, 80–83.
- Ranajit S, Principles and management of cancer. A practical guide, BI Publication Pvt. Ltd., New Delhi, 2004.
- Raskin I, Ribnicky DM, Komarnytsky S, Ilic N, Poulev A, Borisjuk N, Brinker A, Moreno DA, Ripoll C, Yakoby N, O'Neal JM, Cornwell T, Pastor I, Fridlender B, Plants and human health in the twenty-first century, *Trends Biotechnol*, 20(12), 2002, 522–531.

- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Rice-Evans C, Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, *Free Radi Bio Med*, 26(9), 1999, 1231–1237.
- Reza SR, Ali D, Solubility of quercetin in water+ methanol and water+ ethanol from (292.8 to 333.8) K, *J Chem Eng Data*, 55(9), 2010, 3934–3936.
- Rios JL, Recio MC, Villar A, Screening methods for natural products with antimicrobial activity: A review of the literature, *J Ethnopharmacol*, 23(2), 1998, 127-149.
- Rivasseau C, Boisson AM, Mongélard G, Couram G, Bastien O, Bligny R, Rapid analysis of organic acids in plant extracts by capillary electrophoresis with indirect UV detection Directed metabolic analyses during metal stress, *J Chromatogr A*, 1129(2), 2006, 283–290.
- Rixe O, Fojo T, Is cell death a critical end point for anticancer therapies or is cytostasis sufficient?, *Clin Cancer Res*, 13(24), 2007, 7280–7287.
- Roginsky V, Lissi EA, Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food, *Food Chem*, 92(2), 2005, 235–254.
- Ross JA, Kasum CM, Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety, *Annu Rev Nutr*, 22(1), 2002, 19–34.
- Rowland I, Optimal nutrition: fibre and phytochemicals, *Proc Nutr Soc*, 58(2), 1999, 415–419.
- Ruberto G, Renda A, Daquino C, Amico V, Spatafora C, Tringali C, Tommasi ND, Polyphenol constituents and antioxidant activity of grape pomace extracts from five Sicilian red grape cultivars, *Food Chem*, 100(1), 2007, 203-210.
- Rumelhart DE, Hinton GE, Williams RJ, Learning representations by back-propagating errors, *Cognitive modeling*, 1, 2002, 213.
- Rupasinghe HPV, Kathirvel P, Huber GM, Ultrasonication-assisted solvent extraction of quercetin glycosides from ‘Idared’ apple peels, *Molecules*, 16(12), 2011, 9783-9791.
- Rusak G, Komes D, Likić S, Horžić D, Kovač M, Phenolic content and antioxidative capacity of green and white tea extracts depending on extraction conditions and the solvent used, *Food Chem*, 110, 2008, 852–858.
- Russo M, Spagnuolo C, Tedesco I, Bilotto S, Russo GL, The flavonoid quercetin in disease prevention and therapy: facts and fancies, *Biochem Pharmacol*, 83(1), 2012, 6–15.
- Saeed N, Khan MR, Shabbir M, Antioxidant activity, total phenolic and total flavonoid contents of whole plant extracts *Torilis leptophyll* L, *BMC Complem Altern M*, 12(1), 2012, 221.

- Sagdic O, Karahan AG, Ozcan M, Ozkan G, Note: effect of some spice extracts on bacterial inhibition, *Food Sci Technol Int*, 9(5), 2003, 353–356.
- Saim N, Dean JR, Abdullah MP, Zakaria Z, An experimental design approach for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons from highly contaminated soil using accelerated solvent extraction, *Anal Chem*, 70(2), 1998, 420–424.
- Sanz MB, Sarabia LA, Herrero A, Ortiz MC, A study of robustness with multivariate calibration. Application to the polarographic determination of benzaldehyde, *Talanta*, 56(6), 2002, 1039-1048.
- Sarkar M, Khandavilli S, Panchagnula R, Development and validation of RP-HPLC and ultraviolet spectrophotometric methods of analysis for the quantitative estimation of antiretroviral drugs in pharmaceutical dosage forms, *J Chromatogr B*, 830(2), 2006, 349-354.
- Sarker SD, Latif Z, Gray AI, Natural products isolation, Vol. 20, Springer, 2005.
- Savic I, Marinkovic V, Tasic Lj, Krajnovic D, Savic I, From experimental design to quality by design in pharmaceutical legislation, *Accredit Quali Assur*, 17(6), 2012a, 627–633.
- Savic I, Nikolic V, Savic I, Nikolic Lj, Stankovic M, Development and validation of a new RP-HPLC method for determination of quercetin in green tea, *J Anal Chem*, 68(10), 2013a, 906-911.
- Savic I, Nikolic V, Savic I, Nikolic Lj, Stankovic M, Development and validation of HPLC method for the determination of amygdalin in the plant extract of plum kernel, *Res J Chem Environ*, 16(4), 2012b, 80-86.
- Savic I, Nikolic V, Savic I, Nikolic Lj, Stankovic M, Mathematical modeling of amygdalin isolation from plum kernel using response surface methodology, 21st International Symposium on Mathematical Programming (ISMP), 19-24 August 2012b, Berlin, Germany, Book of Abstracts 2012, MA 376, 231.
- Savic I, Nikolic V, Savic I, Nikolic Lj, Stankovic M, Optimization of the process of quercetin isolation from green tea using mathematical modeling, 12th Mediterranean Congress of Chemical Engineering, 15.-18.11.2011a, Barcelona, Spain, CD: abs_12_027_P.
- Savic I, Nikolic V, Savic I, Nikolic Lj, Stankovic M, Optimization of the extraction conditions for polyphenolic compounds from green tea, 12th Mediterranean Congress of Chemical Engineering, 15.-18.11.2011b, Barcelona, Spain, CD: abs_12_026_P.
- Savić I, Nikolić V, Nikolić Lj, Stojanović S, Došić A, Savić I, Stress photodegradation study of quercetin, „3rd International congress „Engineering, materials and management in the processing industry”, 4-6 march 2013b, Jahorina, Republika Srpska, 599-607.

- Savić I, Nikolić V, Savić I, Nikolić Lj, Stanković M, Moder K, Optimization of total flavonoid compound extraction from *Camellia sinensis* using the artificial neural network and response surface methodology, *Hem Ind*, 67(2), 2013б, 249-259.
- Scalia S, Mezzena M, Incorporation of quercetin in lipid microparticles: effect on photo- and chemical-stability, *J Pharm Biomed Anal*, 49(1), 2009, 90-94.
- Scalia S, Mezzena M, Photostabilization effect of quercetin on the UV filter combination, butyl methoxydibenzoylmethane-octyl methoxycinnamate, *Photochem Photobiol*, 86(2), 2010, 273-278.
- Schalkoff RJ, Artificial Neural Networks, McGraw-Hill, New York, 1997.
- Seeram NP, Henning SM, Niu Y, Lee R, Scheuller HS, Heber D, Catechin and caffeine content of green tea dietary supplements and correlation with antioxidant capacity, *J Agr Food Chem*, 54(5), 2006, 1599-1603.
- Sen S, Chakraborty R, The Role of Antioxidants in Human Health, In: Andreescu S, Hepel M, Oxidative Stress: Diagnostics, Prevention, and Therapy, Chapter 1, OUP USA, 2011, pp 1–37.
- Sharif KM, Rahman MM, Azmir J, Mohamed A, Jahurul MHA, Sahena F, Zaidul ISM, Experimental design of supercritical fluid extraction – A review, *J Food Eng*, 124, 2014, 105-116.
- Shi H, Noguchi N, Niki E, Introducing natural antioxidants, In: Yanishlieva N, Pokorný J, Gordon MH, Antioxidants in food: Practical applications, CRC Press, 2001, pp 22-70.
- Shrubsole MJ, Lu W, Chen Z, Shu XO, Zheng Y, Dai Q, Cai Q, Gu K, Ruan ZX, Gao YT, Zheng W, Drinking green tea modestly reduces breast cancer risk, *J Nutr*, 139(2), 2009, 310–316.
- Sinha K, Chowdhury S, Saha PD, Datta S, Modeling of microwave-assisted extraction of natural dye from seeds of *Bixa orellana* (Annatto) using response surface methodology (RSM) and artificial neural network (ANN), *Ind Crop Prod*, 41, 2013, 165–171.
- Sinha K, Saha PD, Datta S, Extraction of natural dye from petals of Flame of forest (*Butea monosperma*) flower: Process optimization using response surface methodology (RSM), *Dyes Pigments*, 94(2), 2012б, 212-216.
- Sinha K, Saha PD, Datta S, Response surface optimization and artificial neural network modeling of microwave assisted natural dye extraction from pomegranate rind, *Ind Crop Prod*, 37(1), 2012a, 408–414.

- Sisa M, Bonnet SL, Ferreira D, Van der Westhuizen JH, Photochemistry of Flavonoids, *Molecules*, 15(8), 2010, 5196-5245.
- Slavova A, Mladenov V, Cellular Neural Networks: Theory and Applications, Nova Publishers, New York, USA, 2004.
- Smith GJ, Thomsen SJ, Markham KR, Andary C, Cardon D, The photostabilities of naturally occurring 5-hydroxyflavones, flavonols, their glycosides and their aluminium complexes, *J Photoch Photobio A*, 136(1-2), 2000, 87-91.
- South J, Laetrile, the answer to cancer, *IAS Anti-Aging Bull*, 4(7), 2000, 10-20.
- Spanilá M, Pazourek J, Farková M, Havel J, Optimization of solid-phase extraction using artificial neural networks in combination with experimental design for determination of resveratrol by capillary zone electrophoresis in wines. *J Chromatogr A*, 1084(1), 2005, 180-185.
- Sparreboom A, de Jonge MJA, Verweij J, The use of oral cytotoxic and cytostatic drugs in cancer treatment, *Eur J Cancer*, 38(1), 2002, 18-22.
- Stacewicz-Sapuntzakis M, Bowen PE, Hussain EA, Damayanti-Wood BI, Farnsworth NR, Chemical composition and potential health effects of prunes: a functional food?, *Crit Rev Food Sci*, 41(4), 2001, 251-286.
- Stanković N, Čomić Lj, Kocić B, Nikolić D, Mihajilov-Krstev T, Ilić B, Miladinović D, Odnos antibakterijske aktivnosti i hemijskog sastava etarskih ulja gajenih biljaka iz Srbije, *Hem ind*, 65(5), 2011, 583-589.
- Steele VE, Kelloff GJ, Balentine D, Boone CW, Mehta R, Bagheri D, Sigman CC, Zhu S, Sharma S, Comparative chemopreventive mechanisms of green tea, black tea and selected polyphenol extracts measured by *in vitro* bioassays, *Carcinogenesis*, 21(1), 2000, 63-67.
- Steinmann D, Ganzera M, Recent advances on HPLC/MS in medicinal plant analysis, *J Pharm Biomed Anal*, 55(4), 2011, 744-757.
- Stewart AJ, Mullen W, Crozier A, On-line high-performance liquid chromatography analysis of the antioxidant activity of phenolic compounds in green and black tea, *Mol Nutr Food Res*, 49(1), 2005, 52-60.
- Stöggli WM, Huck CW, Bonn GK, Structural elucidation of catechin and epicatechin in sorrel leaf extracts using liquid-chromatography coupled to diode array-, fluorescence-, and mass spectrometric detection, *J Sep Sci*, 27(7-8), 2004, 524-528.

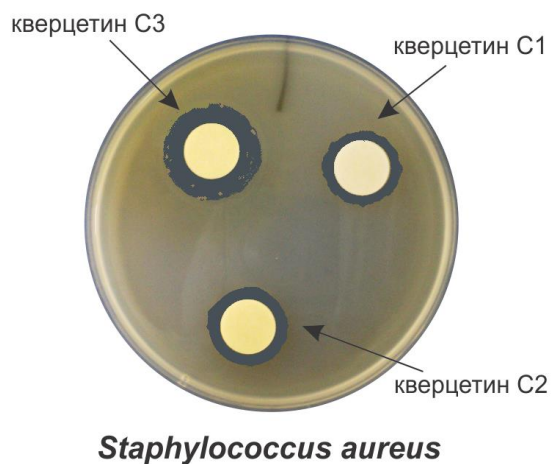
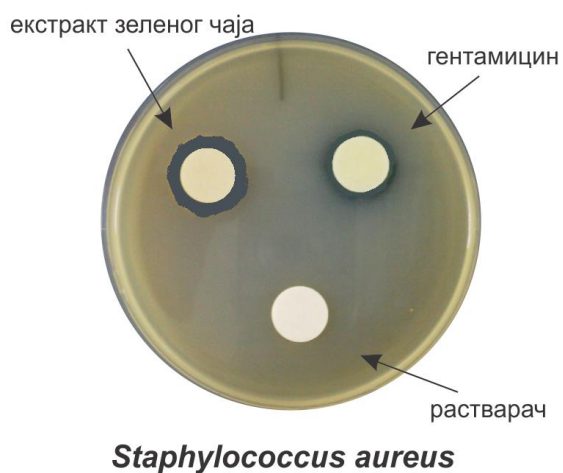
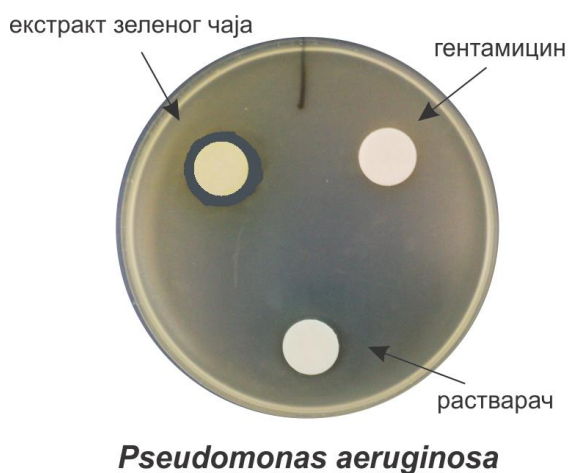
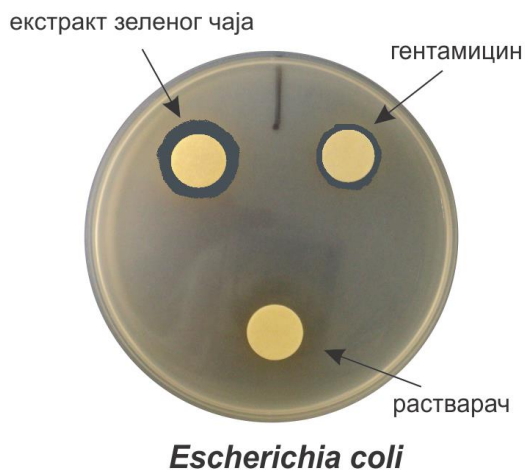
- Suárez B, Picinelli A, Mangas JJ, Solid-phase extraction and high-performance liquid chromatographic determination of polyphenols in apple musts and ciders, *J Chromatogr A*, 727(2), 1996, 203-209.
- Sun J, Liang F, Bin Y, Li P, Duan C, Screening non-colored phenolics in red wines using liquid chromatography/ultraviolet and mass spectrometry/mass spectrometry libraries, *Molecules*, 12(3), 2007, 679-693.
- Swain E, Poulton JE, Utilization of amygdalin during seedling development of *Prunus serotina*, *Plant Physiol*, 106(2), 1994, 437-445.
- Syrigos KN, Rowlinson-Busza G, Epenetos AA, *In vitro* cytotoxicity following specific activation of amygdalin by β -glucosidase conjugated to a bladder cancer-associated monoclonal antibody, *Int J Cancer*, 78(6), 1998, 712-719.
- Tabaraki R, Heidarizadi E, Benvidi A, Optimization of ultrasonic-assisted extraction of pomegranate (*Punica granatum* L.) peel antioxidants by response surface methodology, *Sep Purif Technol*, 98, 2012, 16-23.
- Tang N, Wu Y, Zhou B, Wang B, Yu R, Green tea, black tea consumption and risk of lung cancer: a meta-analysis, *Lung Cancer*, 65(3), 2009, 274-283.
- Taylor PW, Hamilton-Miller JM, Stapleton PD, Antimicrobial properties of green tea catechins, *Food Sci Technol Bull*, 2, 2005, 71.
- Thagaard N, Extraction of amygdalin from fruit kernels, WIPO Patent Application WO/1996/020716, 1996.
- Thomsen V, Schatzlein D, Mercurio D, Limits of detection in spectroscopy, *Spectroscopy*, 18(12), 2003, 112-114.
- Toda M, Okubo S, Ikigai H, Shimamura T, Antibacterial and anti-hemolysin activities of tea catechins and their structural relatives, *Nihon Saikingaku Zasshi*, 45(2), 1990, 561-566.
- Tokuşoğlu Ö, Ünal MK, Yildirim Z, HPLC-UV and GC-MS characterization of the flavonol aglycons quercetin, kaempferol, and myricetin in tomato pastes and other tomato-based products, *Acta Chromatogr*, 13, 2003, 196-207.
- Topp BL, Russell DM, Neumüller M, Dalbó MA, Liu W, Plum, In: Badenens ML, Byrne DH, Fruit Breeding, Springer US, 2012, pp 571-621.
- Trivedi KJ, Chokshi PV, Patel NS, Development and validation of RP-HPLC method for analysis of cefixime trihydrate and sulbactam sodium in their combination tablet dosage form, *Development*, 4(4), 2012, 1628-1632.
- Tzia C, Liadakis G, Extraction optimization in food engineering, CRC Press, 2003.

- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J, Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease, *Int J Biochem Cell Biol*, 39(1), 2007, 44-84.
- Vaya J, Aviram M, Nutritional antioxidants mechanisms of action, analyses of activities and medical applications, *Curr Medic Chem-Immun, Endocrine Metab Agents*, 1(1), 2001, 99-117.
- Vedmedenko E, Competing interactions and pattern formation in nanoworld, John Wiley & Sons, Weinheim, Germany, 2007, pp 92.
- Vertuani S, Angusti A, Manfredini S, The antioxidants and pro-antioxidants network: An overview, *Curr Pharm Design*, 10(14), 2004, 1677–1694.
- Vicentini F, Georgetti SR, Jabor JR, Caris JA, Bentley MVL, Fonseca MJ, Photostability of quercetin under exposure to UV irradiation, *Lat Am J Pharm*, 26(1), 2007, 119-124.
- Vicentini FT, Vaz MM, Fonseca YM, Bentley MVL, Fonseca MJ, Characterization and stability study of a water-in-oil microemulsion incorporating quercetin, *Drug Dev Ind Pharm*, 37(1), 2011, 47-55.
- Voldřich M, Kyzlink V, Cyanogenesis in canned stone fruits, *J Food Sci*, 57(1), 1992, 161–162.
- Walle T, Absorption and metabolism of flavonoids, *Free Rad Biol Med*, 36(7), 2004, 829-837.
- Wang H, Helliwell K, Determination of flavonols in green and black tea leaves and green tea infusions by high-performance liquid chromatography, *Food Res Int*, 34(2), 2001, 223-227.
- Wang L, Lee IM, Zhang SM, Blumberg JB, Buring JE, Sesso HD, Dietary intake of selected flavonols, flavones, and flavonoid-rich foods and risk of cancer in middle-aged and older women, *Am J Clin Nutr*, 89(3), 2009, 905–912.
- Wang L, Yang B, Wang R, Du X, Extraction of pepsin-soluble collagen from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) skin using an artificial neural network, *Food Chem*, 111(3), 2008, 683–686.
- Watson J, Separation methods for waste and environmental applications, CRC Press, 1999, pp 457.
- Werbos PJ, Backpropagation through time: What it does and how to do it, *Proc IEEE*, 78(10), 1990, 1550–1560.
- WHO, Global cancer rate could increase by 50% to 15 million by 2020, World Cancer Report, Geneva, 2003.

- Wiess ML, Neuronal Network Research Horizons, Nova Publishers, New York, USA, 2007.
- Wiley RC (Ed.), Minimally processed refrigerated fruits and vegetables, Chapman & Hall, 1994.
- Williams BL, Wender SH, Isolation and identification of quercetin and isoquercitrin from apricots (*Prunus armeniaca*), *Arch Biochem Biophys*, 43(2), 1953, 319–323.
- Winsor GL, Lam DK, Fleming L, Lo R, Whiteside MD, Yu NY, Hancock RE, Brinkman FS, *Pseudomonas* Genome Database: improved comparative analysis and population genomics capability for *Pseudomonas* genomes, *Nucleic Acids Res*, 39(suppl 1), 2011, D596-D600.
- Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB, Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study, *Clin Infect Dis*, 39(3), 2004, 309-317.
- Wythoff BJ, Backpropagation neural networks: a tutorial, *Chemometr Intell Lab Syst*, 18(2), 1993, 115–155.
- Yam TS, Shah S, Hamilton-Miller JM, Microbiological activity of whole and fractionated crude extracts of tea (*Camellia sinensis*), and of tea components, *FEMS Microbiol Lett*, 152(1), 1997, 169-174.
- Yan J, Tong S, Li J, Lou J, Preparative isolation and purification of amygdalin from *Prunus armeniaca* L with high recovery by high-speed countercurrent chromatography, *J Liq Chromatogr RT*, 29(9), 2006, 1271–1279.
- Yilmaz Y, Toledo RT, Major flavonoids in grape seeds and skins: antioxidant capacity of catechin, epicatechin, and gallic acid, *J Agr Food Chem*, 52(2), 2004, 255-260.
- Yokoe I, Higushi K, Shirataki Y, Komatsu M, Photochemistry of Flavonoids. III. Photorearrangement of Flavonols, *Chem Pharm Bull*, 29(3), 1981, 894-898.
- Yurdugül S, Bozoglu F, Studies on antimicrobial activity and certain chemical parameters of freeze-dried wild plums (*Prunus* Spp.), *Pakistan J Nutr*, 8(9), 2009, 1434-1441.
- Zgórká G, Pressurized liquid extraction versus other extraction techniques in micropreparative isolation of pharmacologically active isoflavones from *Trifolium* L. species, *Talanta*, 79(1), 2009, 46-53.
- Zhang F, Yang Y, Su P, Guo Z, Microwave-assisted extraction of rutin and quercetin from the stalks of *Euonymus alatus* (Thunb.) Sieb, *Phytochem Anal*, 20(1), 2009, 33–37.
- Zhang H, Zhang M, Yu L, Zhao Y, He N, Yang X, Antitumor activities of quercetin and quercetin-5',8-disulfonate in human colon and breast cancer cell lines, *Food Chem Toxicol*, 50(5), 2012, 1589–1599.

- Zhang HC, Yin C, Dong J, Li CY, Cheng CL, Study on extracting process of amygdalin from *Almond Pollen*, *Food Sci*, 7, 2007, 057.
- Zhang M, Swarts SG, Yin L, Liu C, Tian Y, Cao Y, Swarts M, Yang S, Zhang SB, Zhang K, Ju S, Olek DJ, Schwartz L, Keng PC, Howell R, Zhang L, Okunieff P, Antioxidant properties of quercetin, *Adv Exp Med Biol*, 701, 2011, 283–289.
- Zhang X, Albanes D, Beeson WL, van den Brandt PA, Buring JE, Flood A, Freudenheim JL, Giovannucci EL, Goldbohm RA, Jaceldo-Siegl K, Jacobs EJ, Krogh V, Larsson SC, Marshall JR, McCullough ML, Miller AB, Robien K, Rohan TE, Schatzkin A, Sieri S, Spiegelman D, Virtamo J, Wolk A, Willett WC, Zhang SM, Smith-Warner SA, Risk of colon cancer and coffee, tea, and sugar-sweetened soft drink intake: Pooled analysis of prospective cohort studies, *J Natl Cancer I*, 102(11), 2010, 771–783.
- Zheng Y, Haworth IS, Zuo Z, Chow MS, Chow AH, Physicochemical and structural characterization of quercetin- β -cyclodextrin complexes, *J Pharm Sci*, 94(5), 2005, 1079–1089.
- Zivanovic Lj, Licanski A, Zecevic M, Jovic B, Kostic M, Application of experimental design in optimization of solid phase extraction of mycophenolic acid and mycophenolic acid glucuronide from human urine and plasma and SPE-RP-HPLC method validation, *J Pharmaceut Biomed*, 47(3), 2008, 575–585.
- Zuloaga O, Etxebarria N, Fernández LA, Madariaga JM, Optimisation and comparison of microwave-assisted extraction and Soxhlet extraction for the determination of polychlorinated biphenyls in soil samples using an experimental design approach, *Talanta* 50(2), 1999, 345–357.
- Zupan J, Gasteiger J, *Neural Networks for chemists: an introduction*, John Wiley & Sons, New York, 1993.

ПРИЛОГ



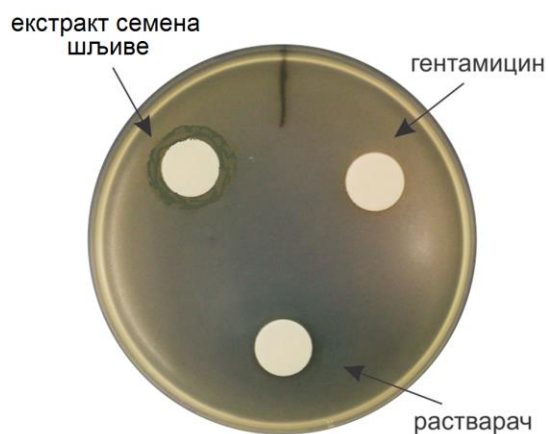
Прилог I. Сојеви микроорганизама третирани стандардом кверцетина и екстрактом зеленог чаја са израженим зонама инхибиције



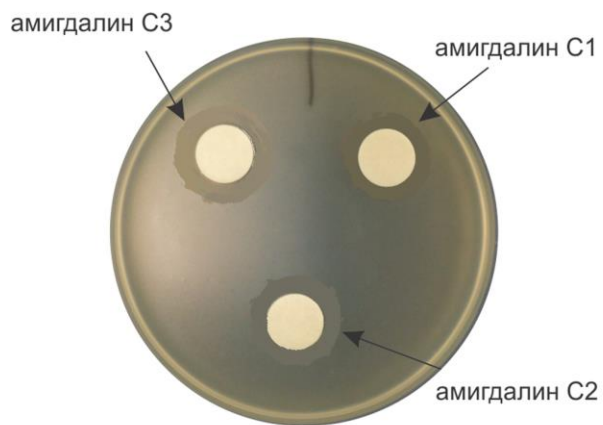
Escherichia coli



Escherichia coli



Pseudomonas aeruginosa



Pseudomonas aeruginosa

Прилог II. Сојеви микроорганизама третирани стандардом амигдалина и екстрактом семена шљиве са израженим зонама инхибиције

Биографија аутора

Иван Савић рођен је 26.06.1986. у Лесковцу. Основну и средњу Хемијско-технолошку школу у Лесковцу завршио је као ученик генерације. Добитник је Вукове дипломе за постигнут успех.



Основне академске студије на Технолошком факултету у Лесковцу уписао је 2005. год. Студије завршава у року са просечном оценом 9,85. Дипломски рад одбранио је на истом Факултету са оценом 10. Добитник је признања „11. Јануар” града Ниша као најбољи студент Факултета за 2007. и 2009. год. Универзитет у Нишу доделио му је повељу као најбољем дипломираном студенту за школску 2008/09. год. Носилац је специјалног признања Српског хемијског друштва за 2010. год. За време студирања био је стипендиста Фонда за младе таленте, Министарства просвете и Фонда за доделу стипендија и награда на подручју града Лесковца. Захвалницу за значајан допринос развоју Факултета добио је 2009. год.

Докторске студије уписао је 2009. год. на Технолошком факултету у Лесковцу. Службени гласник додељује му признање као најбољем студенту докторских студија, 2010. год. Добитник је финансијске подршке младим талентима на подручју града Лесковца у 2013. год. Био је стипендиста Министарства просвете, науке и технолошког развоја (МНТР) на докторским студијама. Члан је Српског хемијског друштва и Савеза хемијских инжењера Србије.

Објавио је поглавља у међународним књигама (2), радове у водећим часописима међународног значаја (2), часописима међународног значаја (21), водећим часописима националног значаја (2), часописима националног значаја (2), радове у целини на скуповима међународног (5) и националног (2) значаја, радове на скуповима међународног (11) и националног (10) значаја штампана у изводу. Коаутор је 11 техничких решења (5 нова поступка, 6 нове методе). Био је рецензент научних радова у међународним часописима. Као истраживач-стипендиста учествовао је у реализацији два национална пројекта финансирана од стране МНТР.

Као студент докторских студија био је ангажован у настави на извођењу лабораторијских вежби (2010-2013). Од 2013. год. изабран је у наставно звање асистент на Технолошком факултету у Лесковцу.

Изјаве аутора



Прилог 1.

ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Изјављујем да је докторска дисертација, под насловом

Оптимизација технолошког поступка изолације амигдалина и кверцетина

из биљног материјала и њихова фармаколошка активност

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

У Нишу, 07.03.2014. год.

Аутор дисертације: Иван Савић

Потпис докторанда:

Иван Савић



Прилог 2.

**ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНЕ И ЕЛЕКТРОНСКЕ ВЕРЗИЈЕ
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Име и презиме аутора: Иван Савић

Студијски програм: Технолошко инжењерство

Оптимизација технолошког поступка изолације амигдалина и кверцетина

Наслов рада: из биљног материјала и њихова фармаколошка активност

Ментор: проф. др Весна Николић

Изјављујем да је штампана верзија моје докторске дисертације истоветна електронској верзији, коју сам предао/ла за уношење у **Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци, који су у вези са добијањем академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада, и то у каталогу Библиотеке, Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Нишу, као и у публикацијама Универзитета у Нишу.

У Нишу, 07.03.2014. год.

Аутор дисертације: Иван Савић

Потпис докторанда:

Иван Савић



Прилог 3.

ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Никола Тесла“ да, у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, унесе моју докторску дисертацију, под насловом:

Оптимизација технолошког поступка изолације амигдалина и кверцетина
из биљног материјала и њихова фармаколошка активност

која је моје ауторско дело.

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

Моју докторску дисертацију, унету у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, могу користити сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons), за коју сам се одлучио/ла.

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

(Молимо да подвучете само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци је у наставку текста).

У Нишу, 07.03.2014. год.

Аутор дисертације: Иван Савић

Потпис докторанда:

Иван Савић

ТИПОВИ ЛИЦЕНЦИ

1. Ауторство. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора, на начин одређен од аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци (CC BY 3.0).

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора, на начин одређен од аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела (CC BY-NC 3.0).

3. Ауторство – некомерцијално – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе вашег дела у делима других аутора, ако се наведе име аутора, на начин одређен од аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела (CC BY-NC-ND 3.0).

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 аутора или даваоца лиценце, и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прераде (CC BY-NC-SA 3.0).

5. Ауторство – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе вашег дела у делима других аутора, ако се наведе име аутора, на начин одређен од аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела (CC BY-ND 3.0).

6. Ауторство – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора, на начин одређен од аутора или даваоца лиценце, и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода (CC BY-SA 3.0).