

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ФАКУЛТЕТ ЗА ФИЗИЧКУ ХЕМИЈУ

Милица М. Нешовић

**Полифенолни профил, антиоксидациона
активност и основни физичкохемијски
параметри хељде и меда од хељде**

Докторска дисертација

Београд, 2021

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF PHYSICAL CHEMISTRY

Milica M. Nešović

**Polyphenolic profile, antioxidative activity and
basic physicochemical parameters of buckwheat
and buckwheat honey**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2021

Ментори:

др Љубиша Игњатовић, редовни професор

Универзитет у Београду, Факултет за физичку хемију

др Урош Гашић, виши научни сарадник

Универзитет у Београду, Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“, Одељење за физиологију биљака (Институт од националног значаја за Републику Србију)

Чланови комисије за одбрану докторске дисертације:

др Јасмина Димитрић Марковић, редовни професор

Универзитет у Београду, Факултет за физичку хемију

др Милош Мојовић, редовни професор

Универзитет у Београду, Факултет за физичку хемију

др Небојша Недић, ванредни професор

Универзитет у Београду, Пољопривредни факултет, Институт за зоотехнику

Датум одбране: _____

Захвалница

Захваљујем се својим менторима који су ме прихватили као докторанда и заједно са мном прошли кроз све делове докторске дисертације.

Ментору др Љубиши Игњатовићу, редовном професору Факултета за физичку хемију Унверзитета у Београду, хвала на корисним сугестијама.

Ментору др Урошу Гашићу, вишем научном сараднику Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ Унверзитета у Београду, хвала на сваком одговору на велики број постављених питања.

Посебну захвалност дугујем др Живославу Тешићу, редовном професору (у пензији) Хемијског факултета Унверзитета у Београду, мом првобитном ментору током докторских студија. Изразита ми је част што ми је пружио прилику да са њим радим и што ми је омогућио да учим уз њега и уз његов тим. Пружио ми је велико поверење и несебично преносио знање и искуство. Захвална сам му што је усмеравао моја истраживања и критички разматрао резултате. Бескрајно сам му захвална за сваки разговор и лакоћу сагледавања проблема, јер су ми управо они помогли да пишем и радим у овој области.

Захваљујем се др Небојши Недићу, ванредном професору Пољопривредног факултета Унверзитета у Београду, са којим сам успешно прикупила потребне узорке за ову докторску дисертацију. Такође, његово искуство у области пчеларства је било драгоценост за мој рад.

Захваљујем се др Јасмини Димитрић Марковић и др Милошу Мојовићу, редовним професорима на Факултету за физичку хемију, који су као чланови комисије за одбрану ове докторске дисертације допринели њеном коначном изгледу.

Велику захвалност дугујем и колегама са Института за општу и физичку хемију. Међу њима је првенствено директор др Стеван Благојевић, који је имао разумевања за сваку моју молбу што се тиче потребног слободног времена. Захвална сам и колегама који су ми помагали саветима и који су били уз мене током писања радова (др Дивна Мајсторовић, Бранимир Ковачевић, др Александра Радуловић, др Јелена Сенћански, Радослав Даљевић).

Ова докторска дисертација је, поред лабораторије Института за општу и физичку хемију, рађена и на Катедри за аналитичку хемију Хемијског факултета Унверзитета у Београду, и овом приликом се захваљујем колегама с којима сам делила лабораторије и који су ми пружали помоћ током експерименталног рада (др Томислав Гости, Никола Хорвацки, Александра Драмићанин, др Милица Средојевић).

Хвала!

Наслов докторске дисертације:

Полифенолни профил, антиоксидациона активност и основни физичкохемијски параметри хељде и меда од хељде

Сажетак:

Хељда је једногодишња зељаста биљка која се користи у исхрани људи. Поред зрна, данас се у различите сврхе, употребљавају и други надземни делови биљке. Разоге за то треба тражити у високом садржају биолошки активних полифенолних једињења. Најзад, треба напоменути да и мед биљке хељде спада у веома тражене врсте меда. Овај релативно редак мед, често садржи смањен садржај поленских честица хељде, што понекад не одговара важећим стандардима ботаничког порекла меда.

Имајући у виду све горе речено, у оквиру ове докторске дисертације, са доста детаља проучавани су основни физичкохемијски параметри, антиоксидациона активност као и полифенолни профил биљке хељде, односно њених појединачних надземних делова као што су лист, стабљика, цвет, зрно, затим полен, нектар, и меда хељде. На тај начин су добијени важни подаци о количини и садржају полифенола, важних биолошки активних супстанци. Ови подаци су пре свега корисни за процену квалитета хране, а у нашем случају и за процену ботаничког порекла меда хељде.

Научни допринос ове докторске дисертације, у првом делу, односи се на прикупљање детаљних података о присуству биолошки активних компоненти различитих делова биљке хељде. За ту сврху примењене су савремене аналитичке методе. Добијени подаци пружају нова сазнања о полифенолном профилу од места фотосинтезе као и њиховом транспорту кроз целу биљку. Најзад, у другом делу ове дисертације, корелисањем полифенолног профила нектара, прополиса и полена, развијена је нова метода за процену ботаничког порекла меда хељде са ниским садржајем поленских честица. Ово је веома значајно, не само за испитивани мед, већ и за друге врсте меда са високим садржајем ненектарског полена.

Кључне речи: хељда (лист, стабљика, цвет, зрно, полен, нектар), мед хељде, ботаничко порекло, полифенолна једињења, антиоксидациона активност, шећери, течна хроматографија, физичкохемијски параметри.

Научна област: Физичка хемија

Ужа научна област: Контрола и заштита животне средине

УДК број:

Title:

Polyphenolic profile, antioxidative activity and basic physicochemical parameters of buckwheat and buckwheat honey

Abstract:

Buckwheat is an annual herbaceous plant that is used in human nutrition. In addition to grain, other above-ground parts of the buckwheat are used for various purposes. The reason for this should be sought in the high content of biologically active polyphenolic compounds. Finally, it should be noted that buckwheat honey belongs to the group of the very sought types of honey. This relatively rare honey usually contains a reduced content of buckwheat pollen particles, which sometimes does not follow the current standards of the botanical origin of honey.

Bearing in mind all the above, within this doctoral dissertation, the basic physicochemical parameters, antioxidant activity and the polyphenolic profile of the buckwheat plant, ie its individual aboveground parts such as leaf, stem, flower, grain, then pollen and nectar, as well as buckwheat honey, were studied in great detail. In this way, important data on the amount and content of polyphenols known as important biologically active substances, were obtained. These data are primarily useful for assessing the quality of food, and in our case for assessing the botanical origin of buckwheat honey.

The scientific contribution of this doctoral dissertation, in the first part, refers to the collection of detailed data on the presence of biologically active components of different parts of the buckwheat plant. For this purpose, modern analytical methods have been applied. The obtained data provide new knowledge about the polyphenolic profile from the site of photosynthesis as well as their transport through the whole plant. Finally, in the second part of this dissertation, by correlating the polyphenolic profile of nectar, propolis and pollen, a new method was developed to assess the botanical origin of buckwheat honey with a low content of pollen particles. This is very important, not only for the tested honey, but also for other types of honey with a high content of non-nectar pollen.

Key words: buckwheat (leaf, stem, flower, grain, pollen, nectar), buckwheat honey, botanical origin, polyphenolic compounds, antioxidant activity, sugars, liquid chromatography, physicochemical parameters.

Scientific field: Physical chemistry

Scientific subfield: Environmental control and protection

UDK:

Садржај:

1. Теоријски увод	1
1.1. Функционална храна	1
1.2. Хељда	2
1.2.1. Опште карактеристике хељде.....	2
1.1.2. Хемијски састав и значај хељде	3
1.3. Мед	4
1.3.1. Опште карактеристике меда.....	4
1.3.2. Мед хељде	5
1.4. Полифенолна једињења	7
1.4.1. Подела и значај полифенолних једињења.....	7
1.4.2. Полифенолна једињења у хељди	9
1.4.3. Полифенолна једињења у меду	11
1.4.4. Методе анализе полифенолног профила	11
1.5. Антиоксидациона активност	12
1.5.1. Слободни радикали	12
1.5.2. Антиоксиданси	12
1.5.3. Антиоксидациона активност полифенола.....	13
1.5.4. Антиоксидациона активност хељде и меда хељде	14
1.5.5. Методе одређивања антиоксидационе активности	14
1.6. Угљени хидрати	16
1.6.1. Примарни метаболити биљака	16
1.6.2. Шећери у хељди.....	17
1.6.3. Шећери у меду	17
1.6.4. Методе одређивања садржаја шећера.....	17
2. Циљ рада.....	19
3. Експериментални рад	20
3.1. Хемикалије и стандарди	20
3.2. Узорци	20
3.2.1. Типови узорака	20
3.2.2. Прикупљање и складиштење узорака.....	21
3.3. Припрема узорака	21
3.3.1. Екстракција полифенола.....	21
3.3.2. Припрема узорака за анализу шећера.....	22
3.3.3. Припрема узорака за одређивање антиоксидационе активности	22
3.4. Методе испитивања	23
3.4.1. Хроматографска анализа полифенолног профила испитиваних узорака	23
3.4.1.а) Припрема стандардних раствора.....	23
3.4.1.б). Квалитативна анализа полифенолних једињења применом система <i>UHPLC-LTQ OrbiTrap MS</i>	23
3.4.1.в). Квантитативна анализа полифенолних једињења применом система <i>UHPLC-DAD MS/MS</i>	24
3.4.2. Спектрофотометријско одређивање антиоксидационе активности	26
3.4.2.а) Одређивање садржаја укупних фенола (<i>TPC</i>).....	26

3.4.2.б) Одређивање релативне антиоксидационе активности (<i>RSA</i>)	26
3.4.3. Хроматографска анализа садржаја шећера	27
3.4.3.а) Припрема стандардних раствора.....	27
3.4.3.б) Експериментални услови система <i>HPLC/PAD</i>	27
3.4.4. Одређивање садржаја воде	28
3.4.5. Одређивање електричне проводљивости	28
4. Резултати и дискусија	29
4.1. Хроматографско одређивање полифенолног профила испитиваних узорака	29
4.1.1. Идентификација полифенолних једињења и путеви фрагментације	29
4.1.2. Полифенолни профил хељде	41
4.1.3. Корелација идентификованих полифенолних једињења хељде и меда хељде	45
4.1.3. а) Полифенолна једињења присутна у меду и полену хељде.....	47
4.1.3. б) Полифенолна једињења присутна у меду и нектару хељде	47
4.1.4. Квантификована полифенолна једињења у меду хељде.....	48
4.1.5. Порекло полифенола у меду хељде	52
4.2. Антиоксидациона активност испитиваних узорака	53
4.2.1. Садржај укупних фенола (<i>TPC</i>)	53
4.2.2. Релативна антиоксидациона активност (<i>RSA</i>)	54
4.2.3. Анализа антиоксидационе активности.....	55
4.3. Физикохемијски параметри одређени у испитиваним узорцима	56
4.3.1. Хроматографско одређивање шећера.....	56
4.3.1.а) Шећерни профил хељде	57
4.3.1.б) Шећерни профил меда хељде.....	60
4.3.1.в) Корелација шећерног профила хељде и меда хељде.....	61
4.3.2. Садржај воде у испитиваним узорцима.....	62
4.3.3. Електрична проводљивост испитиваних узорака меда	62
5. Закључак	63
6. Литература	65
7. Додатак.....	76
Биографија аутора.....	87
Библиографија аутора	88
ПРИЛОЗИ.....	91
ПРИЛОГ 1. - Изјава о ауторству	91
ПРИЛОГ 2. - Изјава о истовестности штампане и електронске верзије докторског рада	92
ПРИЛОГ 3. - Изјава о коришћењу	93

1. Теоријски увод

1.1. Функционална храна

Разноврсан биљни свет нуди значајан број јестивих врста, од којих се ипак релативно мали број користи у свакодневној исхрани. Такође, само неколико њих се могу сматрати основним животним намирницама као што су пшеница, пиринач, кукуруз или кромпир. Сходно томе, заступљена је хиперпродукција ових намирница, а потиснута употреба неких традиционалних усева (нпр. хељде) чији се принос не може лако повећати. Лоша страна хиперпродукције је смањење нутритивног значаја ових намирница, као и смањена могућност задржавања биокомпонената у њима. Такође, временом се уочила нужност да намирнице, поред тога што треба да задовољава нутритивне потребе, имају благотворан утицај на здравље људи. Потреба да храна не задовољи само основну функцију исхране човека довела је до прописаних захтева за „нову храну“ која се може увести у свакодневно конзумирање [1]. У Јапану се увео концепт „функционалне хране“ под којим се подразумева храна која има још неку функцију осим да служи за исхрану. Међу дефиницијама се помиње и „храна за одређену здравствену намену“ (*Food for Specified Health Uses, FOSHU*) [2]. Она има за циљ да након конзумирања подстиче физиолошку или биолошку активност организма, тј. да утиче на спречавање прогресије болести или услове за њен настанак. С друге стране, одвојена је категорија оне хране која има потврду о функцији њених хранљивих састојака (као што су суплементи, нпр. витамини, минерали итд.) [3]. Функционална храна има превентиван утицај на многе болести јер садржи нека од тзв. функционалних једињења у које спадају витамини, биљни стероли, полифеноли, каротеоноиди, масне киселине, прехранбена влакна, пребиотици и пробиотици [4]. Због присуства ових фитохемикалија, функционална храна обично испољава висок антиоксидациони капацитет, што је значајно за људски организам у ком се слободни радикали непрекидно стварају, а који је додатно изложен загађењу у својој околини.

Биљке су богате биоактивним једињењима и велики број њих превентивно утиче на здравље људи. Да би се одређена биљка дефинисала као функционална намирница, она мора садржати фитохемикалије у количини која може показати повољне ефекте. Синтеза фитохемикалија се одвија у биљци процесом фотосинтезе која се највећим делом обавља у листовима биљке, где започињу многи физиолошки процеси. Фитохемикалије се распоређују кроз биљку у зависности од функције одређеног дела биљке, као и периода развоја, омогућујући јој тиме раст и развој. Транспортовање фитохемикалија кроз биљку, почевши од листа, проузрокује различито присуство ових једињења, а тако и различиту употребу сваког дела биљке.

Међу многим намирницама, псеудожитарице су препознате као „зрна двадест првог века“ управо због њихове хранљиве вредности [5]. Такође, хељда се према начину гајења и коришћења сврстава у групу алтернативних усева и уочен је раст производње на глобалном нивоу [6]. Истраживања су усмерена на искоришћавање фитохемикалија из хељде, као и комерцијализацију производа од хељде, којим би се повећала њена употреба. Хељда је вишенаменска биљка која због високе хранљиве вредности [7] и повољног хемијског садржаја позитивно утиче на здравље људи [8] представљајући велики потенцијал као функционална храна. Хељдина крупица садржи висок ниво дијететских влакана које садрже више нерастворљивих материја него растворљивих [9] продужавајући осећај ситости. Живковић (*Živković*) са сарадницима [10] је показао да клице ољуштеног зрна хељде могу бити функционална храна и извор фенолних једињења јер имају до два пута више вредности антиоксидационе активности и укупних фенола у односу на вредности добијене за неољуштено зрно.

Лековите биљке садрже велики број биокомпонената, због чега су нашле значајну примену у традиционалној медицини. Ове биљке, које су обично самоникле, најчешће се скупљају током њиховог цветања, када се из њих естрахују и етарска уља. Ароматична етарска уља су значајни метаболити биљака, који поред привлачења инсеката, повећавају употребу лековитих биљака. Имајући ово у виду, као и транспорт фитохемикалија кроз биљку, поменута лековита својства биљке се могу приписати и сваком њеном делу, нпр. стабљици, листу, цвету, зрну, полену, па и нектару. Додатно, полен и нектар су извор хране за пчеле. Све неопходне материје које су потребне пчелама за њихов живот, рад и стварање квалитетних производа, оне налазе или у нектару или у полену (изузетак су пчеле које сакупљају медљику). Сви набројани пчелињи производи се такође користе због лековитих својстава као део традиционалне медицине. Директни производи медоносне пчеле (мед, полен, прополис, перга и матични млеч) се додају исхрани првенствено ради јачања имунитета људи. Конзумирају се засебно или се додају у друге прехранбене производе ради повећања њихове хранљиве вредности. Производи медоносне пчеле су богати протеинима, простим шећерима, есенцијалним аминокиселинама, микроелементима, итд., и због тога се могу сматрати функционалном храном [11]. Полен се због свог садржаја сматра као „природни лек“. Мед, као значајан нутритиван и лако доступан извор енергије и многих биокомпонената, има позитиван утицај на здравље човека. Здравствена својства меда најчешће се заснивају на његовој антиоксидационој активности, на коју знатно утиче порекло нектара [12].

1.2. Хељда

1.2.1. Опште карактеристике хељде

Хељда (лат. *Fagopyrum esculentum* Moench) или тзв. обична хељда је једногодишња зељаста биљка која спада у псеудожитарице, фамилије Полигонацеа (*Polygonaceae*). Овој фамилији припадају и коровске биљке чији је представник трскот, па се често по овој биљци назива цела фамилија (тзв. трскоте). С обзиром да је скрвеносеменица, фамилија је сродна са Арацеае (лат. *Araceae*), Хеноподиацеа (лат. *Chaenopodiaceae*) и Амарантацеа (лат. *Amaranthaceae*). Такође, ове фамилије су, између осталог, познате да имају карактеристичну арому. Због начина узгајања и употребе блиска је житарицама (пшеница, јечам, овас), али због биоактивних једињења која садржи, као што су полисахариди, ближа је воћу [13]. Хељда, за разлику од житарица, припада дикотиледоној групи у које спадају нпр. винова лоза, дуд, мак, итд. Као псеудожитарица, слично амаранту и кинои, хељда не садржи глутен.

Хељда се узгаја на вишој надморској висини (преко 1000 m) где су уобичајене ниже температуре, а и успева и на мање плодном земљишту због способности да усваја тешко доступне минерале [6, 14]. Такође, Романова (*Romanova*) и сарадници [15] су навели различите утицаје које климатски услови, температура, дужина дана или састав земљишта могу имати на морфологију и друге особине хељде. Највећи произвођачи хељде последњих година (до 2019) су Русија и Кина (Табела Д1, Д2 у Додатку) [16]. Такође, током 2016./2017. године, Пољска је била међу првих пет земаља по извозу хељде (Табела Д1, Д2 у Додатку) [16]. За Србију нема статистичких података од стране Организације за храну и пољопривреду (енг. *Food and Agriculture Organization Corporate Statistical Database, FAOSTAT* [16]), док је на основу извештаја Међународне федерације органске производње (енг. *International Federation of Organic Agriculture Movements, IFOAM*) за 2013. годину, у Србији забележен принос хељде од 0,8 - 1,5 t/ha [17], што је слично као и у поменутих замљама.

Хељда има вретенаст корен, а стабљика је зелена и шупља која сазревањем добија црвенкасту боју. Листови су срцоликог облика, наизменично постављени у пар нивоа на стабљици. Цветови су груписани као цвасти и могу бити беле, розе, љубичасте или жуте боје.

Има велики број цветова (од неколико стотина до 2.000), као и дуго и сукцесивно цветање (око два до три месеца). Хељда је високо родна медоносна биљка. Може дати принос од 100 до 400 kg меда хељде по једном хектару [6]. Засејана између воћњака привлачи многобројне инсекте и представља добру пчелињу пашу. Међутим, привлачење инсеката и опрашивање хељде зависе од производње нектара [18]. Као диморфна врста, хељда има две врсте цветова који се разликују по дужини тучка и прашника и који могу лучити различиту количину нектара [19]. Такође, продукција полена може да се разликује, као што је већ примећено за цветове других диморфних врста [20]. Полен хељде садржи релативно низак ниво протеина потребан пчелама (11 %) [21], што може утицати на његово прикупљање од стране пчела, а самим тим и на његову присутност у меду хељде. Једна група аутора је успешно разликовала полен хељде по знатно вишем садржају сирћетне киселине и калцијума [22]. Зрно хељде је пирамидалног (скоро тетраедалног) облика, што га издваја од осталих зрна псеудожитарица и већине житарица. Фазе развоја цвета и зрна се преклапају [23], што отежава одређивање времена жетве.

Употреба хељде је разнолика, преко јестивих делова од којих се праве различити производи заступљени у исхрани, до медицинске употребе. Тако нпр. осушена хељда за исхрану животиња, тзв слама, има хранљиву вредност као и слама житарица, међутим не користи се у великим количинама јер садржи фагопирин [24], алкалоид који може изазвати алергијску реакцију код животиња. За исхрану људи хељда се најчешће користи у виду брашна (од ољуштеног зрна) или као каша (где се могу приметити и зрна са љуском). Зрно хељде се такође користи и за производњу алкохола. Љуска зрна хељде се употребљава за пуњење ортопедских јастука. Поред антибактеријског деловања хељде, карактеристична арома и антиоксидациона активност испарљивих компоненти хељде коју су навели Зао (*Zhao*) и сарадници [25] могу имати додатне позитивне ефекте. У Кини је познат чај од хељдиних листова и цветних делова, а није реткост да се свежи делови хељде користе и као поврће и салата [26]. Примена хељде у медицини заснована је на високом садржају фитохемикалија које показују позитивне ефекте.

1.1.2. Хемијски састав и значај хељде

Хељда садржи нешто виши садржај растворљивих дијететских влакана у односу на житарице [27]. Насупрот житарицама са сличним садржајем скроба, ниво амилазе у скробу хељде је ипак већи [27]. Хељда садржи есенцијалне аминокиселине међу којима су најзаступљенији аргинин и лизин [8], које су у недостатку у житарицама као што су пшеница и јечам. С обзиром да не садржи глутен [7], има предност у односу на друге житарице и значајна је за особе које болују од целијакије. Хељда се сматра храном ниског гликемијског индекса (енг. *Glycemic Index, GI*). У литератури је забележен низак гликемијски индекс хељдине крупице ($GI=34,7$) што указује да не подиже ниво шећера у крви [28]. Зрно хељде се препоручује као пребиотичка храна због повећаног садржаја резистентног скроба [29]. Она садржи и витамине Б1 (*B1*), Б6 (*B6*) и Б12 (*B12*), који су у недостатку у пшеници која се најчешће користи за производњу хлеба. Хељда је корисна у исхрани људи који болују од дијабетеса, гојазности, хипертензије, хиперхолестеролемије [26]. Различити аутори су навели да су главне компоненте дијететских влакана хељде полисахариди ћелијских зидова, целулоза, хемицелулоза и пектин [13,30]. Зрно хељде се најчешће употребљава као брашно или каша, при чему се ољуштено зрно лакше вари. Зрно хељде је препознато по горчини, која по наводима неких аутора потиче од вишег садржаја кверцетина и његових деривата [30].

Хељда садржи аминокиселине, протеине [31], многе минерале, а из њених екстракта је изолован значајан број полифенолних једињења [8,32-40]. Цењена је због присуства фаван-3-

ола, проантоцијанидина, као и флавоноида рутина, кверцетина, кверцитрина (кверцетин 3-О-рамнозид), витексина (апигенин 8-С-глукозид), изовитексина (апигенин 6-С-глукозид), ориентина (лутеолин 8-С-глукозид) и изоориентина (лутеолин 6-С-глукозид) [41]. Значај који хељда има на повећање одбране организма се приписује присуству рутина, првенствено због његовог антиоксидационог потенцијала [26]. Хељда је једина псеудожитарица која садржи проантоцијанидине који су у знатно мањој количини присутни у житарицама јечму и спелти [36]. Проантоцијанидини су једињења која су показала већу антиоксидациону активност од мономерних флаван-3-ола [42]. Према наводима Занга (*Zhang*) и сарадника [43] хељда је једина псеудожитарица која садржи рутин. Конзумирање хељде има позитиван утицај на превенцију многих болести управо због испољавања значајних антиоксидационих, антидијабетских, антиинфламаторних ефеката, као и позитивног утицаја на хипогликемију и хиперхолестеролемију [8,26].

Због благотворног дејства на здравље људи, хељда се са разлогом сматра функционалном храном што је довољан разлог за додатна и свеобухватнија испитивања њеног састава, као и састава њених производа (брашна, каше, меда). Због изузетног значаја који хељда има, у научној литератури је забележено велико интересовање за хељду. Постоји велики број студија које детаљно проучавају како биљку хељду у целини [24,36], тако и поједине делове хељде: семе [24,32,44-46], стабљику [24,41,47,48], лист [24,41,45,47,49-51], цвет [24,41,47,48,52], зрно [10,35,41], љуску од зрна [32,53]. Такође, позната су испитивања и њених продуката као што је брашно [37,53], мекиње [32], мед [33,54-67], чај [24]. Већина ових објављених студија бави се проучавањем фенолних једињења [10,24,32-34,36,37,41,45-49,51-58,62-64], као и антиоксидационе активности [10,33,34,37,41,46,50-53,55,57-59,64-68], Стојилковски (*Stojilkovski*) и сарадници [24] су утврдили већи садржај рутина у цветовима у односу на листове хељде. Холасова (*Holasova*) и сарадници [68] су показали опадајући редослед антиоксидационе активности хељдиних делова почевши од листа, преко ољуштеног зрна, затим целог зрна, љуске и на крају до стабљике. С друге стране, показано је да највећи садржај укупних фенола (енг. *Total Phenolic Content, TPC*) има љуска хељде, а затим хељдине мекиње, док је садржај проантоцијанидина у овим деловима био сличан [32]. Живковић са сарадницима [10] је утврдио да клице ољуштеног зрна садрже до два пута више вредности антиоксидационе активности и укупних фенола, у односу на вредности ољуштеног зрна. Различите групе научника су испитивале садржај α -токоферола [52] и сквалена у хељди [47], као и садржај фагопирина [24], дијететских влакана [48] и шећера [33,34,56,64,67,69]. Такође, постоје и студије које се баве утицајем спољашњих фактора на хељду. Тако су Ма (*Ma*) и сарадници [44] показали на који начин излагање хељде стресу утиче на садржај шећера, а Занг (*Zhang*) и остали [50] су проучавали промене које се дешавају у хељди током ферментације.

Хељда, међутим, садржи и нека токсична једињења. Фагопирин је алкалоид који реагује фототоксично, а највећа му је концентрација после цветања. Стојилковски и сарадници [24] су показали да цветови хељде, поред већег садржаја рутина у поређењу са листовима, садрже и више концентрације фагопирина. Такође, стабљика хељде садржи оксалну киселину и у касној фази развоја очвршћава [30].

1.3. Мед

1.3.1. Опште карактеристике меда

Мед је производ медоносне пчеле (лат. *Apis mellifera*) и представља природну слатку супстанцу. Пчеле сакупљени нектар претварају у мед тако што му додају специфичне материје (ензиме) и одлажу га у ћелије саћа да сазри [70,71].

Мед је раствор различитих угљених хидрата који најчешће представљају око 80 % укупног садржаја меда. Садржај моносахарида најчешће варира у зависности од врсте меда [70,71]. Садржај дисахарида се мање разликује, са изузетком садржаја сахарозе која може бити нешто већа пре свега у случајевима фалсификованог меда [72].

У меду се детектује електрична проводљивост као последица присуства органских киселина и минералних соли. Она је директно везана за ботаничко порекло меда и на основу њене вредности могу се разликовати одређене врсте меда. Вредност испод 0,8 mS/cm је одлика цветног меда, док за разлику од њих, медљиковци имају већу вредност од наведене [70,71].

Мед је веома хидроскопан производ, па је важно избегавати влагу у окружењу током прераде или паковања меда [72]. Садржај воде у њему је најчешће око 17 %, а по прописима не сме прелазити 20 % [70,71].

Најзад, мед у знатно мањој количини, садржи и витамине, ензиме, испарљива једињења, полифенолна једињења, затим восак, пепео. Имајући у виду да мед садржи велики број ензима, активност неког од њих може утицати на присутност рутина у меду. Према резултатима Сузукија (*Suzuki*) и сарадника [45], као и Барбера (*Barber*) и сарадника [73], ензим рутинозидаза катализује хидролизу кверцетин 3-*O*-глукозида који се сматра претечом рутина. Иако је садржај наведених фитохемикалија релативно мали, њихова специфична својства долазе до изражаја пре свега због њихове биолошке активности.

1.3.2. Мед хељде

На основу дефиниције коју је дало европско законодавство [70], монофлорални мед је производ који садржи доминантан полен оне врсте која декларише његово ботаничко порекло. Такође, на основу правилника који је прописала Република Србија [71], монофлорални мед је производ од некатра медоносне биљке одређене врсте који мора имати укус, мирис и боју својствену тој биљци и да садржи доминантан број поленових честица те биљке.

Општеприхваћеном мелисопалинолошком анализом се процењује ботаничко порекло меда, при чему се на основу заступљности појединих врста полена, који треба да износи најчешће 45 % поленових зрна, декларише његово порекло [74]. Неке државе су успоставиле своје критеријуме за одређене врсте монофлоралног меда [75]. У Србији је декларисан садржај поленових зрна за 16 типова меда (Табела Д3 у Додатку) [71]. Међутим, поред мелисопалинолошке анализе, потребне су и друге анализе за прецизнију процену порекла меда, као што су физичкохемијски параметри или садржај фитохемикалија, који могу бити специфични за одређену врсту меда [76].

У Србији, сходно најмањем уделу поленових зрна у нерастворљивом делу меда, није посебно декларисан садржај *Fagopyrum* полена у меду хељде. С друге стране, у Пољској су усвојене препоручене вредности (тј. преко 45 % поленових зрна) и за *Fagopyrum* полен у меду хељде [61]. Познато је да се на тржишту мед хељде са високим садржајем поленових зрна *Fagopyrum esculentum* појављује у Пољској, Русији, Кини, где је производња хељде међу првима у свету (Табела Д2 у Додатку) [16]. Упркос томе, у литератури је забележена варијабилност *Fagopyrum* полена у меду хељде из различитих држава, међу којима је и Пољска (Табела 1) [33,56,59-62,65,66,77].

Табела 1 Литературни подаци о процентуалном садржају *Fagopyrum* полена у узорцима меда декларисаног као мед хељде.

Ботаничко порекло меда	Садржај <i>Fagopyrum</i> полена	Број узорак а	Држава	Референца
Мед хељде	73 %	1	Јапан	[66]
Мед хељде	56 – 72 %	8	Кина	[65]
Мед хељде	40,3 – 56,1 %	11	Пољска	[60]
Мед хељде	33,9 – 48,6 %	4	Пољска	[62]
Мед хељде	27,6 - 52,4 %	5	Пољска	[59]
Мед хељде	24,29 % и 40,83 %	2	Пољска	[33]
Мед хељде	15,9 – 86 %	10	Пољска	[61]
Мед хељде	5 - 42 %	10	Италија и Источна Европа	[56]
Мед хељде	4,5 – 52 %	8	Италија, Пољска	[77]
Мед хељде	4,05 - 10,93 %	4	Србија	[33]

Слично се уочава и за узорке меда хељде који су испитивани у овој докторској дисертацији, а чија је поленска анализа претходно објављена од стране Нешовић (*Nešović*) и сарадника [33] (Табела Д5 у Додатку). Због недовољног садржаја протеина и других састојака у *Fagopyrum* полену [21] који су неопходни пчелама, изражена је присутност и других поленових зрна у меду хељде. Варијабилност *Fagopyrum* полена у меду хељде, у неким државама, може бити и последица непостојања довољно великих површина засејаних овом биљном културом. На пример у Пољској постоји преко 80 000 ha обрадиве површине хељде (Табела Д2 у Додатку) [16], док се с друге стране, у Србији хељда узгаја на знатно мањим површинама [78].

Медоносне пчеле сакупљају полен да би себи обезбедиле неопходне протеине, али га такође покупе додиривањем прашника различитих цветова. Стога би се могао појавити мед са недовољно репрезентативним поленовим прахом који није у корелацији са одговарајућим нектаром и ботаничким пореклом меда. Поред поменуте варијабилности меда хељде, слична запажања забележена су и за мед од боровнице [79]. Према томе, проучавање физичкохемијских параметара [69,80], полифенола [56,57], као и испарљивих једињења [56], се показало као корисно у циљу добијања додатних параметара за процену ботаничког порекла меда.

Мед хељде је производ високог квалитета. Веома је цењен и препознатљив по својој тамној боји, специфичној ароми и оштром укусу. Упркос објављеном нижем садржају *Fagopyrum* полена у меду хељде, овај мед се може тако декларисати због карактеристичних сензорских својстава (боје, мириса и укуса), као и присуства специфичних једињења. Од великог броја детектованих испарљивих једињења, деривати бутанске киселине су предложени као могући маркери за ботаничко порекло меда хељде [31,56], као што су 2- и 3-метилбутанал и фенилацетал-алдехид који доприносе специфичној ароми меда хељде [56]. У меду хељде су идентификовани протеини пореклом из биљке, али и протеини карактеристични за матичну млеч [81]. У литератури је наглашено доминантно присуство *para* (*p*)-кумаринске и *p*-хидроксибензојеве киселине у меду хељде [12,56]. Поред њих мед хељде са другим врстама меда, примећен је већи садржај минерала, шећера, полифенолних једињења

[67], као и већа антиоксидациона и антибактеријска активност [12,67]. Јасика-Мисиак (*Jasicka-Misiak*) и остали [57] су нагласили тамнију боју меда хељде у односу на мед од вреска, као и више концентрације *p*-хидроксибензоје, ферулинске и ванилинске киселине. Испитујући нордијске врсте меда, фински аутори су показали да мед хељде, поред медљиковца и меда од малине, садржи највише вредности антиоксидационе и антибактеријске активности [64]. Кус (*Kuś*) и сарадници [59] су такође истакли високе антиоксидационе активности, које уз тамнију боју, издвајају мед хељде од других врста меда.

1.4. Полифенолна једињења

1.4.1. Подела и значај полифенолних једињења

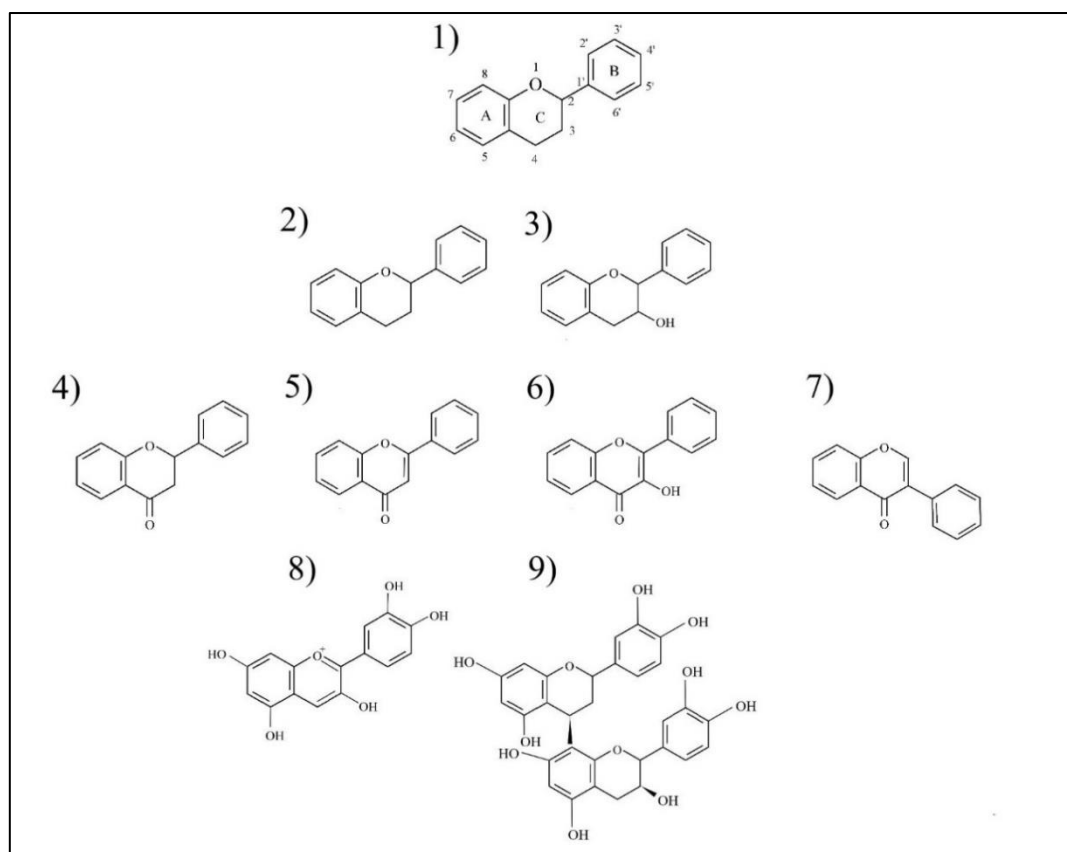
Полифеноли су секундарни метаболити биљака и сматрају се битним фитохемикалијама које могу да утичу на здравље људи. Они имају кључну улогу у физиологији биљака. Најважнија улога полифенолних једињења је побољшање одбрамбеног механизма. Они такође имају способност превенције оксидационог стреса, као и бројне позитивне ефекте на хроничне болести код људи [42,82,83,84]. Синтезу полифенола прати и трансформација приликом транспорта кроз различите биљне органе, а код људи се углавном трансформишу пре апсорпције [82]. Представљају једињења са ароматичним прстеном, чија структура утиче на поделу, улогу и активност полифенола. Постоје различите поделе полифенолних једињења, једна од њих је и подела на флавоноиде и фенолне киселине.

Флавоноиди су веома распрострањена група фенолних једињења који се акумулирају скоро у свим деловима биљке [42,82,85]. Утичу на процес фотосинтезе, делујући као катализатори у светлој фази фотосинтезе [85]. Представљају велику групу биљних пигмената, дајући боју листовима, цветовима, плодовима [86]. Флавоноиди као антиоксиданси утичу на различите активности биљака. Флавоноли и њихови гликозиди, као и други флавоноиди, штите биљке од биотичких и абиотичких стресова, попут ултраљубичасте (енг. *Ultraviolet, UV*) светлости [87]. Приликом прекомерног излагања *UV* зрачењу, биљка синтетише већи број фенолних једињења [86], који теже да уклоне настале слободне радикале.

Структуру флавоноида чини хетероциклични систем флавоноског језгра које се састоји од два бензенова А, Б (*A, B*) и γ -пиронског Ц (*C*) прстена (*C6(A)-C3(C)-C6(B)*) (Слика 1). Подела флавоноида зависи од положаја секундарног ароматичног прстена Б (*B*), као и супституције на неком од бензенових прстена А и Б (*A* и *B*) које укључују оксидацију, гликозилацију, хидроксилацију, конјугацију и степен полимеризације (Слика 1).

У групу флаван-3-ола спадају и мономерне и димерне јединице, као нпр. катехин, епикатехин, затим епикатехин галат, епигалокатехин. У флавононе спадају нарингенин, ериодиктиол, хрисин, апигенин, итд, у групу флавонола кемпферол, кверцетин, мирицетин, а изофлавоноима припада даидзеин, генистеин, итд. Антоцијанидини, гликозиди антоцијана, су једињења чија су сва три прстена ароматична и наелектрисање је позитивно. Процијанидини су једињења која се састоје од јединица (епи)катехина, док је присуство (епи)галокатехина својствено проделфинидинима. У зависности од веза између мономерних јединица, Б тип (*B*) процијанидини се одликују интерфлавоноском везом између катехинске и епикатехинске јединице између 4. и 8. угљениковог атома (димери *B1, B2, B3* и *B4*), или 4. и 6. угљениковог атома (код димера *B5, B6, B7* и *B8*).

Одређени флавоноиди су присутни у биљци у релативно великим количинама у слободним облицима (као агликони), као што је генистеин који је присутан у соји (81,0 mg/100g, [82]) или даидзеин који је присутан у целеру, соји и махунаркама.

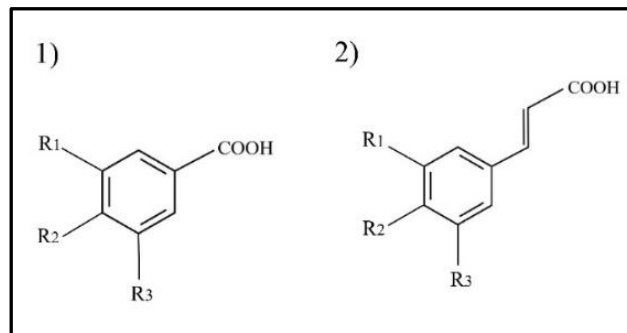


Слика 1 Структура флавоноида: 1) Основна структура флавоноида; 2) Флавани; 3) Флаван-3-оли; 4) Флавонони; 5) Флавоноли; 6) Флавоноли; 7) Изофлавонони; 8) Антоцијанидини; 9) Проантоцијанидин тип B1 (B1).

Флавонол кверцетин се у знатаној количини може наћи у луку (149,0 mg/100g, [82], поготово у љубичастом луку). Има га у какаоу (20,1 mg/100g), броколију (1,6-3,2 mg/100g, [82]), цитрусном воћу, црвеном грожду, јабуци и трешњама [85]. За хељду је забележена количина од 0,5-3,6 mg/100g [88], а за различите врсте меда за ред величине мање вредности [88-90]. Апиџенин је присутан у целеру и свежим љутим папричицама (до 19,1 и 10,0 mg/100g редом), наринџенин у грејпфруту (5,0-32,5 mg/100g) [82]. Ниска растворљивост флавоноида у води често представља проблем за његову медицинску примену [42]. Гликозилација омогућује да флавоноиди буду мање реактивни, а више растворљиви у води, па се флавоноидни гликозиди претежно срећу у биљкама [91]. Иако структура агликона има већи антиоксидациони капацитет, прикључком везивања флавоноида са шећером (гликозиди) повећава се биорасположивост полифенола [42]. Тако се на пример, кверцетин јавља као гликозид кверцитрина који хидролизом даје кверцетин и рамнозу.

Флавоноли катехин и епикатехин су у значајној концентрацији присутни у зеленом и црном чају (до 40,0 mg/100g), затим у чоколади (23,0 - 30,5 mg/100g), црвеном вину (8,0 - 30,0 mg/100g), пасуљу (17,5 - 22,5 mg/100g) [92], јабукама (19,16 mg/100g [88]), а знатно мање у јечму (0,4 mg/100g) и хељди (0,3 mg/100g) [88]. Антоцијани су природни биљни пигменти који се налазе као гликозиди антоцијанидина, везујући различите шећере, најчешће глукозу, галактозу и рамнозу. Антоцијани, поред антиоксидационе способности, утичу и на боју стабљике и цвета хељде [30]. У зависности од структуре и рН средине, дају црвену, љубичасту или плаву боју биљним деловима. Антоцијанидини су присутни у црвеном вину, спанаћу (172,05 mg/100g) и воћу као што су купине (100,0 - 400,0 mg/100g), боровнице (25,0 - 500,0 mg/100g), биљци зови (485,5 mg/100g) [82], док су у пшеници знатно мање заступљени (1,1 mg/100g) [88]).

Фенолне киселине су група фенолних једињења које садрже фенолни прстен за који је везан бочни низ са једним угљениковим атомом C₆-C₁ (хидроксибензоеве киселине) и са три угљеникова атома C₆-C₃ (хидроксициметне киселине) (Слика 2). У биљци су фенолне киселине најчешће присутне као везане за протеине или шећере, неком од хемијских веза: естарском, етарском или ацетилном [93]. Издвајају се хлорогенске киселине које представљају естре хининске киселине и неке од хидроксициметних киселина углавном кофеинске, *p*-кумаринске или ферулинске киселине [94], за које је забележен широк спектар биолошких активности [95]. Испољавање антиоксидационе активности ових једињења се најчешће врши уклањањем радикала преко механизма водоника [84].



Слика 2 Фенолне киселине: 1) хидроксибензоеве; 2) хидроксициметне киселине.

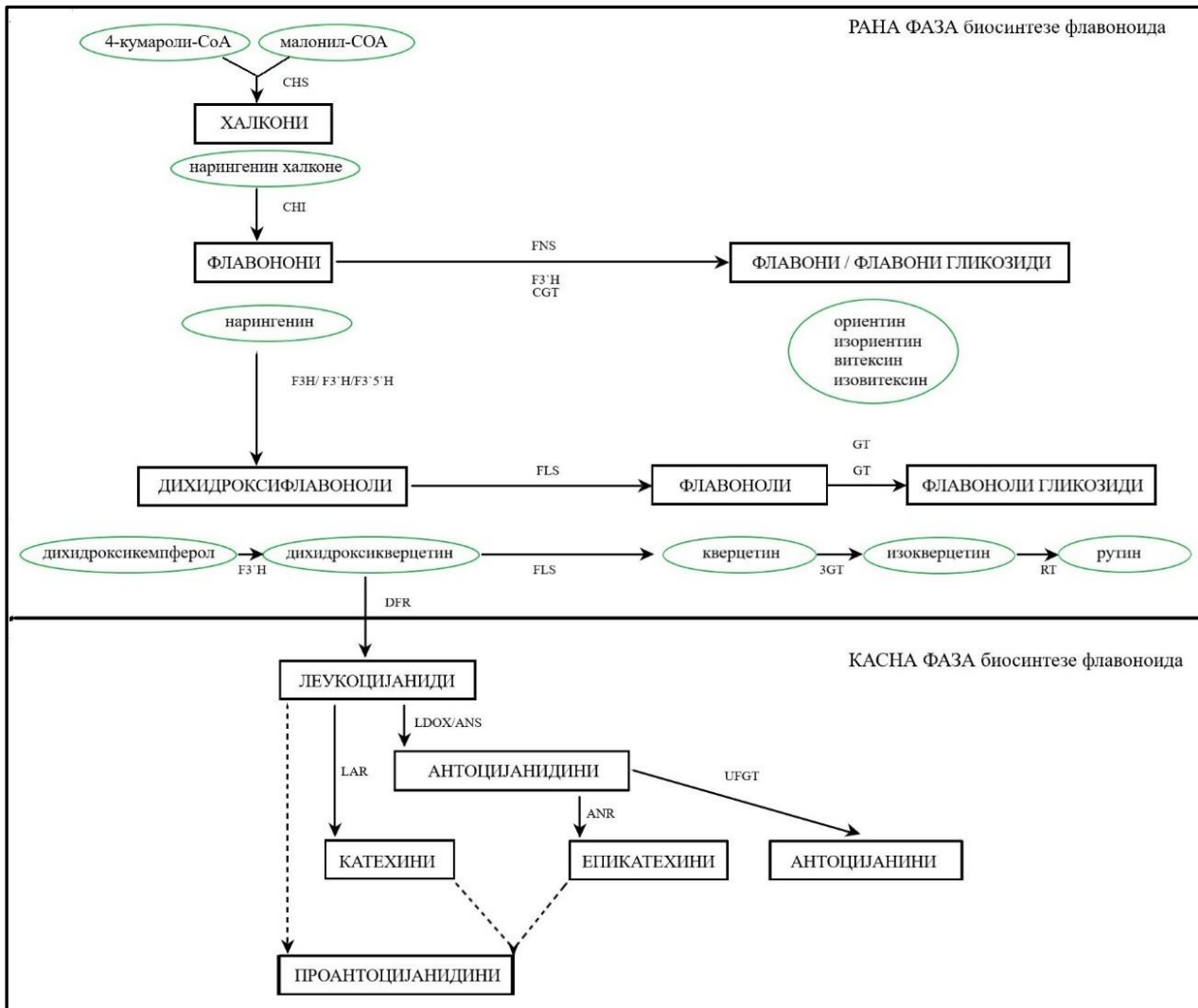
1.4.2. Полифенолна једињења у хељди

Биосинтеза флавоноида у хељди, као и у осталим биљкама, има рану фазу биосинтезе која синтетише флавоне и флавоноле, као и касну фазу у којој настају антоцијани и проантоцијанидини као што су навели Матсуи (*Matsui*) и сарадници [87] (Слика 3).

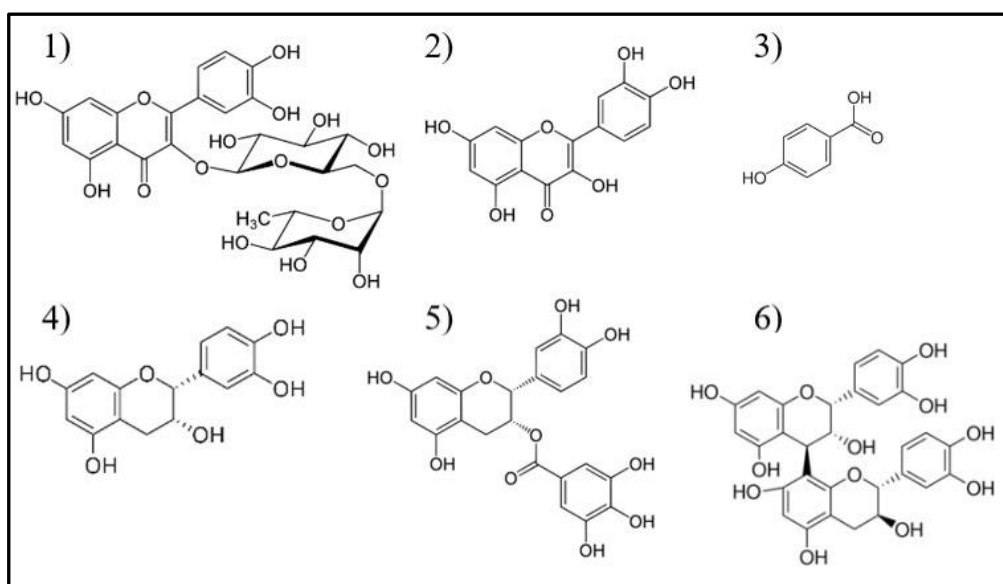
Такође, на основу предложеног механизма од стране Матсуиа и сарадника [87,96], детаљније је објашњена биосинтеза флавоноида у хељди. На основу њиховог модела, флавоноли и флавоногликозиди дају флавононе, који преко дихидрофлавонола и флавонола доводе до настајања флавонол-гликозида који се налазе у вакуолама хељде. Антоцијани и антоцијанидини могу посредством флавонола дати катехин и епикатехин, који се могу полимеризовати и дати проантоцијанидине, који се такође налазе у вакуолама. Предложени механизам биосинтезе је условљен одређеним генима који су потпомогнути различитим ензимима [87,96] (Слика 3).

У хељди су заступљене различите класе полифенолних једињења. Поред кверцетина, рутина, *p*-хидроксибензоеве, *p*-кумаринске, ферулинске киселине, као и деривата 5-О-кофеилхининске киселине, ферулоилхининске киселине и рамнетина (деривата који су настали везивањем ацил, естар и етар групе), присутни су и катехин, епикатехин, проантоцијанидини Б (*B*) типа, као и њихови метил-деривати и галати [32,35-39,46,48,51,53,97].

На основу литературних података, Матсуи и сарадници [87] су сумирали присуство различитих полифенолних једињења у појединим деловима хељде. Примећено је да се у клицама хељде, котиледону, семену и љусци акумулирају флавоноли, гликозидни облици флавоноида (оријентин, изооријентин, витексин, изовитексин). Затим, рутин представља



Слика 3 Предложени пут биосинтезе флавоноида у хељди [87,96].



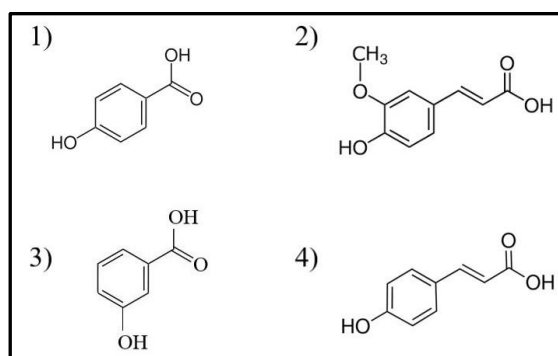
Слика 4 Најчешће присутна фенолна једињења у хељди: 1) рутин; 2) кверцетин; 3) *p*-хидроксибензоева киселина; 4) епикатехин; 5) епикатехин галат; 6) В1 (B1) процијанидин.

главни флавонол гликозид у хељди (Слика 4), присутан у скоро свим њеним деловима [87]. При високом садржају рутина, хељда би могла да изгуби карактеристичну горчину коју има као последицу присуства кверцетина [87]. Флавоноли су присутни у свим деловима хељде са различитом заступљеношћу, флаван-3-оли су детектовани у корену и надземним деловима, док су процијанидини (Слика 4), димерне и тримерне јединице идентификоване у зрну хељде [87]. Антоцијани су заједно са флавонолима (кемпферол, кверцетин и мирицетин) важни за бојење цвета и плода. Забележено је да се антоцијани у хељди акумулирају углавном у основи стабљике која према врху бледи [96]. Оксидацијом процијанидина, као последица скидања љуске, зрно хељде постаје смеђе боје [87].

1.4.3. Полифенолна једињења у меду

Сматра се да су полифеноли меда одговорни за позитивне ефекте на здравље људи. Садржај полифенола у меду варира у зависности од које биљке потиче мед, као и географских и климатских услова околине [98]. С обзиром да полифеноли дају значајан допринос укупној биоактивности меда, идентификација и квантификација фенолних једињења су од великог интереса. У литератури је забележено да садржај флавоноида у полену износи око 0,5 %, у прополису 10 %, а у меду око 0,6 % [99]. Неки флавоноиди се сматрају специфичним за прополис (пиноцембрин, хрисин, пинобанксин, затим генкванин, рамнетин, деривати пинобанксина), док се мирицетин и деривати кверцетина и кемпферола сврставају као полен-нектар флавоноиди [100].

Полифеноли као секундарни метаболити биљака користе се као потенцијални маркери ботаничког порекла меда [101]. У литератури су наведени полифеноли као маркери меда хељде [56,57], али и медљиковца [80], меда кестена [102,103], акације [102-104], лаванде [102,103], вреска [104], сунцокрета [54,103], мануке и кануке [105], итд. На Слици 5 су приказани потенцијални маркери ботаничког порекла меда хељде [56,57].



Слика 5 Идентификована фенолна једињења која су предложена за маркере меда хељде: 1) *meta*-хидроксибензојева киселина [57]; 2) ферулинска киселина [57]; 3) *p*-хидроксибензојева киселина [56]; 4) *p*-кумаринска киселина [56].

1.4.4. Методе анализе полифенолног профила

У циљу успешне карактеризације полифенола посебна пажња се мора посветити припреми узорка и екстракцији. На тај начин се могу добити богатије и чистије фракције ослобођене од других једињења који могу ометати идентификацију. Јибрил (*Jibril*) и сарадници [106] су дали одличан преглед литературе који се односи на примену различитих техника екстракције, растварача као и метода анализе полифенола меда.

Технике одвајања полифенолних једињења засноване на течной хроматографији (енг. *Liquid Chromatography, LC*) [54,89,106] су међу најчешћим аналитичким техникама. Помоћу хроматографије високих перформанси (енг. *High Performace Liquid Chromatography, HPLC*) са детектором диодних низова (енг. *Diode Array Detector, DAD*) је могуће утврдити присутност сваког фитохемијског једињења на основу пика апсорпције одређене групе полифенола, јер већина флавонола и флавонола има апсорпцију у опсегу од 320–385 nm или од 250–285 nm. Функционалне групе везане за флавоноидни скелет такође могу проузроковати промену апсорпције. Тако на пример, код кверцетина је апсорпција на 371 nm, код кемпферола на 367 nm, а у мирицетину и до 374 nm [107]. Метода квантификације биоактивних једињења подразумева упоређивање познатог комерцијалног стандарда са сваким одвојеним једињењем. Комбинација течне хроматографије ултра високих перформанси (енг. *Ultra-High Performace Liquid Chromatography, UHPLC*) са масеном спектрометријом (енг. *Mass Spectrometry, MS*) и детектором са троструким анализатором јона користи се за идентификацију циљних анализата [105]. Коришћењем масеног анализатора са *OrbiTrap*-ом, на основу технике хватања јона омогућава се MS^n анализа којом се олакшава идентификација већег броја полифенолних једињења. Могућност примене високоенергетске дисоцијације изазване сударом (енг. *Collision-Induced Dissociation, CID*) обезбеђује се успешно разликовање, на пример, флавоно-8-С-гликозида од 6-С-гликозида који су склонији губитку воде [91]. Такође, комбиновање технике хроматографије и масене спектрометрије са MS^n фрагментацијама, има значајну примену у карактерисању ботаничког и/или географског порекла меда [101].

1.5. Антиоксидациона активност

1.5.1. Слободни радикали

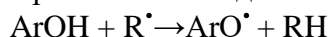
Слободни радикали се стварају у организму кроз различите метаболичке процесе и реакције, а карактерише их један или више неспарених електрона што условљава њихову реактивност. Једињења кисеоника као што су нпр. синглетни кисеоник, озон, водоник-пероксид, као и слободни радикали супероксид, хидроксил, хидропероксид, пероксил, алкосил радикал, представљају реактивне кисеоничне врсте (енг. *Reactive Oxygen Species, ROS*). Ови оксиданси оштећују друге биомолекуле, стварајући нове радикале и тиме негативно утичу на функционисање ћелије. Њихово прекомерно стварање доводи до појаве оксидационог стреса ћелија, који се може сматрати главним узрочником великог броја болести, међу којима се нарочито истичу канцери.

1.5.2. Антиоксиданси

С друге стране, антиоксиданси су једињења која активирају систем одбране и утичу на *ROS* преводећи их у друге врсте. Антиоксиданси су супстанце које у малим концентрацијама у односу на биомолекул, имају способност да спрече или бар да одложе оксидацију тог биомолекула и тиме заштите ћелије [108]. У антиоксидансе спадају ензимски (каталаза, пероксидаза, нуклеаза, гликозилаза и др.) и неензимски молекули (витамин Е, аскорбинска киселина, каротеноиди, фенолне киселине, флавоноиди и др). На основу деловања у биолошким системима, они могу бити превентивни антиоксиданси (спречавају настајање *ROS*), „хватачи“ (енг. *Scavengers*) који брзо делују на већ настале *ROS* и антиоксиданси који покушавају да поврате претходно стање ћелије. Такође, на основу деловања антиоксиданаса током инхибиције *ROS*, антиоксиданси могу бити примарни који предајом атома водоника или електрона редукују оксидант и тако инхибирају оксидацију. Постоје и секундарни антиоксиданси који подстичу примарне антиоксидансе и спречавају настајање продуката оксиданата, тзв. про-оксиданте, који индукују оксидациони стрес [109].

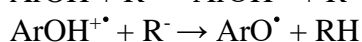
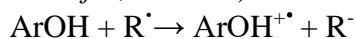
Неутралисање слободних радикала се може вршити преко различитих механизма:

- 1) Пренос атома водоника (енг. *Hydrogen Atom Transfer, HAT*):



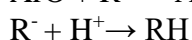
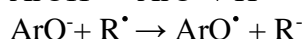
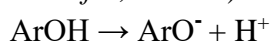
Овај механизам доводи до хомолитичког раскидања О-Н везе, преноса водоника са антиоксиданца на радикал при чему долази до формирања редукованог радикала, RH, и радикала антиоксиданса, ArO[•], који има мању активност од полазног радикала ArOH. Оксидован радикал говори о антиоксидационој активности полазног једињења које се сматра антиоксидансом. Мерењем енергије дисоцијације О-Н везе добија се увид о способности отпуштања водоника, а самим тим и антиоксидационог капацитета једињења (нижа енергија утиче на лакше отпуштање водоника и проузрокује већи антиоксидациони капацитет). Методе које се базирају на механизму преноса атома водоника су капацитет апсорпције кисеоничних врста (енг. *Oxygen Radical Absorbance Capacity, ORAC*) и тест укупне способности хватања радикала (енг. *Total Radical Trapping Antioxidant parameter, TRAP*).

- 2) Пренос једног електрона и пренос протона (енг. *Single Electron Transfer-Proton Transfer, SET-PT*):



Овај механизам се одвија у два корака. У првом кораку долази до преноса електрона и настанка радикал-катјона (ArOH^{•+}) антиоксиданса и ањона (R⁻) радикалске врсте. У другом кораку долази до размене протона између поменутих производа реакције. потенцијални антиоксиданс се сматра дономом електрона. Методе које се базирају на овом механизму су тест редуције 2,2-дифенил-1-пикрилхидразил радикала (*2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, DPPH*), параметар редуције Fe³⁺ јона (енг. *Ferric Ion Reducing Antioxidant Parameter, FRAP*), активност изражена преко тролокс (*Trolox*) еквивалената (енг. *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity, TEAC*), тест 2,2'-аинобил 3-етилбензотиазолин-6-сулфонске киселине (*2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid, ABTS*), затим тест капацитета гвожђе тиоцијаната (енг. *Ferric Thiocyanate, FTC*), као и метода одређивања укупних фенола (*TPC*) са *Folin-Ciocalteu* реагенсом.

- 3) Губитак протона праћен преносом електрона (енг. *Sequential Proton Loss Electron Transfer, SPLET*):



SPLET механизам се такође одвија у два корака, одвајање протона са молекула антиоксиданса и настанак ањона антиоксиданса. Ајнон антиоксиданса у директној реакцији трансформише радикал у радикал-ањон, док сам антиоксиданс прелази у свој радикалски облик. Протоновањем радикал-ањона формира се стабилан молекул RH.

1.5.3. Антиоксидациона активност полифенола

Према литературним подацима полифеноли припадају групи фитохемикалија са израженим антиоксидационим својствима [42,83]. Код људи они доводе до превенције оксидационог стреса изазваног хроничним болестима. Имају антибактеријско, антиинфламаторно, антиалергијско, антитромботичко и вазодилатацијско дејство [83]. Антиоксидационо деловање полифенолна једињења испољвају на различите начине. Флавоноиди су, као добри доноси електрона, познати антиоксиданси. Имају способност да уклањају слободне радикале стварајући мање реактивне врсте. Поред поменутих механизма,

специфично за полифенолна једињења је њихова способност да хелирају метале при чему их спречавају да учествују у реакцијама стварања слободних радикала. Познато је и да се фенолне киселине сматрају „хватачима“ оксиданаса и слободних радикала чиме уклањају реактивне врсте и тако штите ћелије [84]. Антиоксидациона активност фенолних једињења зависи од броја и расподела хидроксилних група. Истичу се флавоноли са својом структуром, који уз више ОН група (нпр. флавоноли кверцетин, кемпферол и мирицетин у односу на хрисин, апигенин) остварују мањи редокс потенцијал и тиме су ефикаснији антиоксиданси. Кверцетин и његови деривати су познати као једињења са различитим функцијама заснованим на њиховом антиоксидационом капацитету [35,45,46,50]. Такође, zasiћеност хетероцикличног С прстена стабилизује радикал, и умањује антиоксидациону активност полифенола (нпр. флавани, флаваноли, флаванони имају нижу антиоксидациону активност у односу на флавоне и флавоноле). Сходно томе, примећено је да су флаван-3-оли одговорни за боље антиоксидационе ефекте него што то показује рутин [53].

1.5.4. Антиоксидациона активност хељде и меда хељде

Велики значај антиоксиданаса у заштити и одбрани ћелија од негативних ефеката и оксидационог стреса, утиче на већу употребу хране богате антиоксидансима. Уносом егзогенних антиоксиданаса, људи лакше спречавају настајање оксидационог стреса ћелија и болести организма.

Хељда садржи велики број полифенолна једињења која имају значајну антиоксидациону активност. На основу литературних података, хељда се издвојила од житарица (јечма, пшенице, пиринча) по садржају укупних фенола (*TPC*) израженог као еквиваленти галне киселине (енг. *Gallic Acid Equivalent, GAE*), као и вредностима *FRAP*, док је активност *DPPH* била знатно мања [110]. Додатно је показано да хељда у односу на овас и јечам има већу антиоксидативну активност [53,68]. Истиче се да садржи рутин познати антиоксиданс, који је одсутан у другим псеудожитарицама [43]. У литератури су забележена карактеристична полифенолна једињења хељде међу којима се највише истичу процијанидини [35-41]. Идентификација, по први пут неких флаванола у хељди или производима хељде, може омогућити њихову примену као потенцијалних нових маркера ботаничког порекла меда хељде. Наглашава се да степен полимеризације повећава ефикасност процијанидина према радикалима. Тако су једињења процијанидина ефикаснији од мономерних флавоноида приликом деловања на радикал супероксидни ањон [42]. У литератури је забележено и да испарљива једињења уља цветова хељде имају антиоксидациону активност (од 6,62 – 57,36 % *DPPH*) [25]. Високе вредности релативне антиоксидационе активности (енг. *Radical Scavenging Activity, RSA*) су показали Горецка (*Górecka*) и сарадници [9] за узорак екстракта хељдине крупице. У литератури су анализирани различити узорци хељде [30,32,39,46], и меда хељде [55-58,66,67] у којима је такође забележена значајна антиоксидациона активност. Богат садржај флавоноида и њихових гликозида у меду [100] иде у прилог антиоксидационом капацитету меда.

1.5.5. Методе одређивања антиоксидационе активности

Постоје различите методе за процену антиоксидационог потенцијала природних производа и углавном се примењује више од једне технике. Методе се заснивају на присуству слободних радикала у реакционој смеси и мерењу релативних ефеката додатог антиоксиданса на нека својства смеше.

У литератури је забележено одређивање антиоксидационог капацитета меда преко различитих метода које примењују реагенсе као што су 2,2'-азобис(2-амидинопропан) дихидрохлорид (*2,2'-Azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride, AAPH*) [12,111],

трипиридилтриазина (2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazine, Fe^{3+} -TPTZ) [112], Folin-Ciocalteu реагенс [89,112], DPPH [12,64,112].

Озбиљан недостатак примене Folin-Ciocalteu реагенса је његово реаговање и са другим оксидансима при чему може доћи до повећања његове вредности, чиме је изражена и његова неселективност. Такође, због слабије стабилности реагенса, додаје се у вишку, при чему се повећава могућност реаговања са свим присутним фенолним једињењима. У базној средини, присутни антиоксиданси отпуштају протоне који даље врше редукцију реагенса дајући почетну жуту боју раствору. Гради се комплекс, који се дисоцијацијом присутних антиоксиданаса, редукује дајући интензивну плаву боју раствора. Одређивање TPC изражава се преко еквивалентна галне киселине (GAE). Гална киселина се сматра веома јаким фенолним антиоксидансом, којој значајно доприноси трећа хидроксилна група на прстену, па се често користи као референтно једињење при одређивању антиоксидационе активности једињења.

Редукција 2,2-дифенил-1-пикрилхидразил-радикала (DPPH•) представља један од основних спектрофотометријских тестова за испитивање антирадикалске активности једињења. DPPH радикал је стабилна азот-центрирана радикалска врста и добро познати "хватач" других слободних радикала. Углавном се користи у праћењу хемијских реакција у којима учествују други слободни радикали или као стандард положаја (тзв. *g*-маркер) и интензитета сигнала у спектрима електронске парамагнетне резонанције (енг. *Electron Paramagnetic Resonance, EPR*). Брзина редукције DPPH радикала се користи као индикатор радикалске природе испитиване реакције и као један од најкомерцијалнијих спектрофотометријских тестова антиоксидативности. Стабилност DPPH радикала је првенствено последица сферних сметњи око двовалентног атома азота и у мањој мери тзв. „*push-pull*“ ефекта између дифениламино (електрон донор) и пикрил-групе (електрон акцептор) на двовалентном атому азота. Делокализација електронске густине је одговорна за интензивну апсорпцију овог радикала у видљивој (енг. *Visible, Vis*) области електромагнетског спектра зрачења. Апсорпциона трака DPPH радикала се налази на око 520 nm што раствору овог молекула даје интензивну љубичасту боју. Редукцијом, у присуству електрон-донорских молекула, који имају способност "давања" својих лабилних Н атома молекулу DPPH, долази до промене структуре молекула што се манифестује хипсохромним померајем апсорпционог максимума у област око 350 nm и променом боје раствора редукованог облика (раствор постаје жуто обојен). Овакве промене омогућавају и визуелно праћење реакције редукције DPPH радикала. Главни квантитативни параметар редукције DPPH радикала је EC50 (енг. *Efficient Concentration*) вредност која представља концентрацију антиоксиданса која може редуковати 50 % присутног радикала у специфичном временском интервалу. Овај временски интервал је најчешће произвољан, али је пожељно да буде што краћи јер ће добри антиоксиданси брзо редуковати радикал. У друге квантитативне параметре редукције спадају антирадикалска снага, реакциона стехиометрија и број молова DPPH редукованих једним молем антиоксиданса. Антирадикалска снага дефинише се као реципрочна вредност антирадикалске активности (1/EC50), а реакциона стехиометрија као теоријска, ефективна, концентрација антиоксиданса потребна за редукцију 100 % DPPH радикала (2xEC50). Број молова DPPH редукован једним молем антиоксиданса израчунава се као реципрочна вредност реакционе стехиометрије.

1.6. Угљени хидрати

1.6.1. Примарни метаболити биљака

Угљени хидрати су, поред нуклеинских киселина, протеина и липида, примарни метаболити биљака. Имају улогу у структурној грађи биљака, у многим процесима, као и у складиштењу енергије. То су полихидроксилна карбонилна једињења која постоје у мономерном (једна јединица), димерном (две), олигомерном (од три до шест) и полимерном (више од шест моносахаридних јединица) облику. Најједноставнији угљени хидрати су шећери.

Шећери су примарни продукти фотосинтезе и доминантан извор енергије. Главни извор шећера у биљци су листови, који се међусобно разликују по садржају и акумулацији шећера. Транслокација шећера из листова преко ксилема до других биљних органа одвија се као последица концентрационог градијента. Посредством осмотског притиска, путем ксилема, допремају се вода и минералне материје од корена до осталих делова биљке. Садржај шећера у сваком органу зависи од фенологије биљке [114] и под великим је утицајем спољашњих фактора [115].

Моносахариди су прости шећери у које спадају алдозе и кетозе. Глукоза је алдохексоза и представља есенцијални шећер у биљном метаболизму. Глукоза је есенцијални шећер у биљном метаболизму због значајне улоге у сазревању плодова, као и у другим структурним, нуклеарним и биохемијским процесима у биљкама [116]. С друге стране, фруктоза је моносахарид кетохексоза који представља најслађи природни шећер.

Поред глукозе и фруктозе, сахароза је такође један од главних шећера у биљкама. Сахароза је нередукујући дисахарид, чијом хидролизом настаје сирова смеша, тзв. инвертни шећер. Током сазревања плодова, сахароза се разлаже на приближно једнаке количине глукозе и фруктозе (чији је однос ~ 1). Битна улога сахарозе је у транслокацији материја кроз флоем [117]. Плодови биљака обично складиште веће количине шећера. На примеру воћних плодова, то је случај са глукозом, фруктозом и сахарозом [118]. Садржај шећера у нектару свакако зависи од фотосинтезе и од резерви шећера које су неопходне код нектарских биљака, али и од брзине стварања нектара, тј. укупне количине нектара коју биљка производи [119]. Код биљака где се лучи велика количина нектара заступљено је складиштење резервног материјала у нектарском паренхиму [119]. Затим се, приликом секреције нектара, складиштени шећери, међу којима је главни скроб, хидролизују, дајући друге шећере. Тако сахароза делимично хидролизује дајући глукозу и фруктозу и додатно тиме одржава градијент концентрације сахарозе, који би у супротном могао нарушити проток нектара према секреторним ћелијама [120].

Од трисахарида издваја се рафиноза која се у малим количинама налазим у великом броју биљака, и која хидролизом помоћу инвертазе даје фруктозу и мелибиозу, а потпуном хидролизом даје глукозу, фруктозу и галактозу [121]. Полисахариди су једињења која настају етарском везом између моно- и дисахарида. Оксидацијом шећера настају шећерни алкохоли. Неки од шећерних алкохола се користе као заслађивачи, као замена за висококалоричну сахарозу. Сорбитол спада у шећерне алкоhole, има око 60 % више слаткоће у односу на сахарозу и често је присутан у фармацеутским производима [122].

Шећери, као градивни елементи утичу и на секундарне метаболите биљака градећи њихове гликозиде. Гликозиди су једињења која настају конdezацијом једног моносахарида или његовог остатка и хидроксилне групе другог једињења (обично агликона). Гликозидна веза је

ацетална веза. Деривати полифенолних једињења, као што су гликозидне форме флавоноида представљају углавном моносахариде хексозе и пентозе везане на положају 3 (В прстена).

1.6.2. Шећери у хељди

На основу навода Пачинија (*Pacini*) и сарадника [119], као и Кејвоја (*Cawoy*) и сарадника [19], код хељде је вишеслојни нектарски паренхим повезан са осталим органима биљке, па уклањање нектара утиче на његово поновно лучење, а тиме и на садржај шећера у флоему. Нектар хељде је у основи састављен од сахарозе, фруктозе и глукозе [19]. Битна улога нектара, тј. његовог лучења, је привлачење инсеката и опрашивање хељде [18].

Скроб је главни шећер биљака. Цело самлевено зрно хељде садржи око 55 % скроба, док се комерцијално бело брашно углавном састоји од 75 % скроба [123]. Међутим, хељда садржи висок ниво резистентног скроба који је лакше сварљив [123]. На нутритивна својства житарица значајно утичу дијететска влакна. Главне компоненте дијететских влакана укључују полисахариде ћелијских зидова [13]. Хељдина крупица показала је низак гликемијски индекс ($GI = 34,7$) што указује да не доводи до скока нивоа шећера у крви [28]. Хромадкова (*Hromádková*) и сарадници [124] су показали да ксилоза и глукоза чине значајан део шећера у узорку хељдине љуске. Садржај шећера утиче и на синтезу рутина [30], битног антиоксиданса. Поред тога што је хељда препозната као храна високе нутритивне вредности, испољава и нутрацеутска својства [7], која се углавном приписују флавоноидним гликозидима, међу којима Зиелинска (*Zielińska*) и сарадници [41] издвајају рутин, оријентин, кверцетин, кверцитрин, хомо-оријентин, витексин и изовитексин.

1.6.3. Шећери у меду

Шећери су главни састојци меда, чинећи око 80 % садржаја. Моносахариди глукоза и фруктоза су доминантни шећери, а поред њих се у знатно мањој количини налазе и олигосахариди [80]. Прописане вредности садржаја збира глукозе и фруктозе за нектарски мед су ≥ 60 % од укупних шећера [70,71]. Порекло глукозе и фруктозе у меду потиче од нектара, слатке супстанце коју пчеле користе, али и од ензимске хидролизе сахарозе која под дејством ензима инвертазе даје смешу глукозе и фруктозе.

Од дисахарида истиче се сахароза чија количина у меду може бити показатељ потенцијалног степена фалсификовања меда. Њена вредност не треба да буде виша од 5 g/100g, изузев меда од багрема, луцерке, вреска, агрума, еукалиптуса који могу садржати до 10 % [70,71]. Повећан садржај сахарозе може указивати на фалсификовање меда, тј. додавање шећерног сирупа. Такође, малтоза и малтотриоза су пронађене у високим концентрацијама у шећерним сирупима [125]. Садржај олигосахарида, поготово мелезитозе, може бити добар индикатор распознавања нектарског меда и медљиковца [80].

1.6.4. Методе одређивања садржаја шећера

Према литераурним подацима велики број аналитичких поступака користи се за одређивање шећера. Течна хроматографија високих перформанси (*HPLC*) показала се као метода избора у многим студијама. Јонска хроматографија високих перформанси заснована на анијонским измењивачима (енг. *High-Performace Anion Exchange Chromatography*, *HPAEC*)

повезана са пулсно амперометријским детектором (енг. *Pulse Amperometric Detector, PAD*) примењена је приликом анализе шећера у биљкама [118,126], као и у меду [33,89]. Кашкониене (*Kaškonienė*) и сарадници [127] су навели примену различитих техника за одређивање шећера у меду. Поред примене течне хроматографије, примењује се и метода гасне хроматографије (енг. *Gas Chromatography, GC*) опремљена са пламенско-јонизационим детектором (енг. *Flame Ionization Detector (FID)*) или масеним спектрометром (*MS*). Метода блиске инфрацрвене спектроскопије (енг. *Near Infra Red Spectroscopy, NIR*) је искоришћена за разликовање медљиковца и нектарског меда [128]. Најзад, садржај шећера се такође може одредити применом једноставне полариметрије.

2. Циљ рада

Основна идеја ове докторске дисертације је проучавање полифенолног профила биљке и меда хељде у циљу проналажења специфичних полифенола карактеристичних за ову биљку. Познато је да су полифенолна једињења биолошки активне фитохемикалије важне како за биљку тако и као нутритивни дадатак људској исхрани. Поред тога, оне као секундарни метаболити могу пружити важне информације за процену ботаничког и/или географског порекла.

Карактерисањем појединачних делова хељде, њених надземних органа као што су лист, стабљика, цвет и зрно хељде, добили би се важни подаци о синтези и транспорту фитохемикалија почевши од листа, места започињања фотосинтезе, па до осталих делова биљке. Затим, даљим испитивањем полена и нектара хељде, добила би се потпуна слика о њиховом садржају.

Декларисани назив меда дефинише се према садржају доминантног полена у њему не узимајући у обзир полен нектарских биљака. Ботанично порекло меда се процењује, пре свега применом поленске анализе, а понекад и у комбинацији са другим техникама. Присуство поленских зрна других биљака, нектарских као и нектарских врста, које пчеле донесу у кошницу последица су случајног додиривања прашника биљака а понекад и потреба различитих полена за квалитетну исхрану пчела. Према томе, процена ботаничког порекла меда применом поленске анализе има недостатке у случајевима меда са ниским садржајем поленових зрна, где се сврстава и мед хељде. С друге стране, полифеноли у меду воде порекло од нектара, прополиса и полена. Сходно томе, циљ овог рада је да се проучи полифенолни профил меда хељде са високим (~ 40 %) и ниским (~ 3 %) садржајем *Fagopyrum* полена да би се утврдиле сличности и разлике. Затим, даљим поређењем са полифенолним профилем нектара и полена хељде, а и општеприхваћеним полифенолним профилем прополиса, циљ је уочити корелацију која може утицати на препознавање потенцијалних маркера ове врсте меда.

Научни допринос ове докторске дисертације је, поред праћења транспорта полифенолних једињења кроз биљку до меда, могућност процене ботаничког порекла меда хељде, као релативно ретко заступљеног монофлораног меда. Ови подаци би пре свега били корисни за откривање нове методе за прецизнију процену ботаничког порекла меда хељде, која би се могла применити и за друге врсте меда са ниским садржајем поленских честица.

3. Експериментални рад

3.1. Хемикалије и стандарди

Хемикалије које су коришћене за екстракцију су хлороводонична киселина (*p.a.* степена чистоће), ацетонитрил (*MS* степена чистоће) и метанол (*HPLC* степена чистоће) произвођача *Sigma Aldrich*, Штајнхајм, Немачка.

При хроматографским анализама поред ацетонитрила, коришћена је мравља киселина (произвођачи *Sigma Aldrich*, Штајнхајм, Немачка). У оквиру ове докторске дисертације коришћено је 30 стандарда полифенолних једињења произвођача *Sigma Aldrich*, Штајнхајм, Немачка. Стандарди који су коришћени за анализу шећера били су глукоза, фруктоза, ксилоза, арабиноза, сахароза, малтоза, трехалоза и малтотриоза (произвођача *Tokyo Chemical Industry, TCI*, Цвајндрехт, Белгија), затим изомалтоза, мелибиоза, гентобиоза, рафиноза, паноза (*Tokyo Chemical Industry, TCI*, Токио, Јапан), као и тураноза, ериотритол, глицерол, сорбитол, галактитол и манитол (*Sigma Aldrich*, Штајнхајм, Немачка).

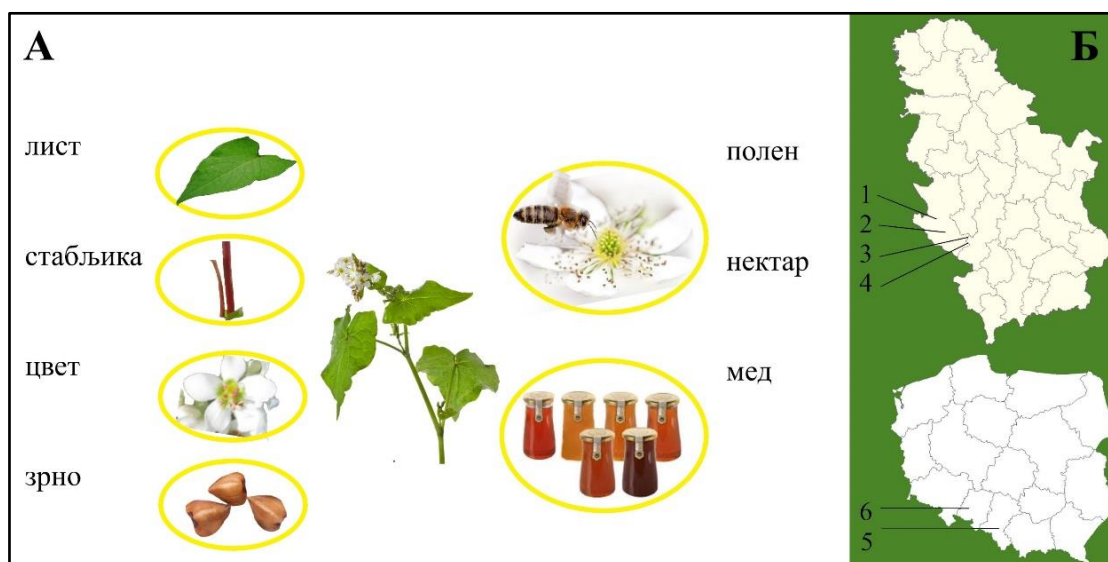
Реагенси који су коришћени за одређивање антиоксидационе активности су *Folin-Ciocalteu* реагенс (смеша фосфомолибденових и фосфоволфрамних соли), гална киселина, 2,2-дифенил-1-пикрилхидразил (*DPPH*), тролокс (*Trolox*) стандард (6-хидрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-карбоксилна киселина) (*Sigma Aldrich*, Штајнхајм, Немачка) и натријум-карбонат (*Merck*, Дармштат, Немачка).

За прављење стандардних раствора, раствора узорака и различита разблажења коришћена је ултрачиста вода добијена уз помоћ апарата *TKA MicroPure water purification system* (*Thermo Fisher TKA*, Нидерелберт, Немачка). Вредност електричне проводљивости добијене ултрачисте воде је $\leq 0,055 \mu\text{S}/\text{cm}$ (18 $\text{M}\Omega\text{cm}$).

3.2. Узорци

3.2.1. Типови узорака

У оквиру ове докторске дисертације са доста детаља испитивани су узорци надземних делова биљке хељде (*Fagopyrum esculentum* Moench) „Новосадске“ сорте узгајане у Србији, као и узорци меда хељде сакупљеног од стране медоносне пчеле (*Apis mellifera*) на подручју Србије и Пољске. Морфолошки делови биљке (лист, стабљика, цвет, зрно), као и хељдин полен и нектар узорковани су са поља хељде која се узгаја у селу Радијевићи у Западној Србији (43°23'31" СГШ, 19°52'20" ИГД) (Слика 6). Узорци меда из Србије (М1-М4) добијени су од локалних пчелара са релативно малог географског подручја које обухвата око 2500 km^2 (Слика 6, ознака бројева од 1 до 4). На основу пчелиње паше на коју су износили пчелиња друштва, пчелари су декларисали узорке (М1-М4) као мед хељде. Узорци меда из Пољске пореклом су из јужног дела, са подручја Шлезације (М5) и Опоља (М6) (Слика 6) и имали су декларацију ботаничког порекла меда од хељде. У циљу потврде ботаничког порекла меда, рађена је поленска анализа узорака меда [33], а резултати су дати у прилогу (Табела Д4, Д5, Слика Д1, у Додатку).



Слика 6 (А) Узорци хељде (лист, стабљика, цвет, зрно, полен, нектар) и меда хељде (четири узорка) пореклом из Србије и меда хељде (два узорка) пореклом из Пољске; **(Б)**. Регионална мапа Србије и Пољске са ознакама места одакле су прикупљени узорци:

1. Радијевићи, Нова Варош, Западна Србија (43°23'31" СГШ; 19°52'20" ИГД);
2. Сјеница, Западна Србија (43°16' 14" СГШ; 19°59'35" ИГД);
3. Теочин, Равна Гора, централна Србија (44°04'03" СГШ; 20°14'02" ИГД);
4. Теочин, Равна Гора, централна Србија (44°03'44" СГШ; 20°14'42" ИГД);
5. Катовице, источни део Шлезације Пољска (50°16'00" СГШ; 19°01'00" ИГД);
6. Старовице, западни део Опоља, Пољска (50°38'36" СГШ; 17°19'40" ИГД).

3.2.2. Прикупљање и складиштење узорака

Узорковање биљке хељде је извршено средином јула 2017. године, у периоду пуног цвета хељде и лучења нектара. Морфолошки надземни делови биљке, лист, стабљика, цвет и зрно хељде, одвојени су директно на месту узорковања. Полен је сакупљен претходним стресањем цветова хељде, док је нектар прикупљен помоћу микрокапилара, директним извлачењем из цветова хељде. Узорци хељде и меда од хељде су заштићени од дневне светлости и чувани на температури од +4 до +8°C до анализирања.

3.3. Припрема узорака

Морфолошки делови хељде сушени су на собној температури без присуства светлости у трајању од 15 дана. Након тога су уједначено смрвљени у авану и чувани су до следеће припреме. Сви експериментални резултати су прерачунати у односу на суву материју узорка.

3.3.1. Екстракција полифенола

Екстракција полифенола из морфолошких делова биљке хељде (листа, стабљике, цвета, зрна) и полена је извршена у систему метанол/вода потпомогнута ултразвуком. Одмерене масе узорака листа, стабљике, цвета, зрна и полена (око 0,1 g) суспендоване су у 10 cm³ воденог раствора метанола у односу метанол/вода (70/30) који је закисељен са 0,1 % раствором хлороводоничне киселине HCl (до pH 2). Припремљени раствори су пропуштени кроз шприц

филтере од 13 mm, са политетрафлуороетиленском (енг. *Polytetrafluoroethylene*, *PTFE*) мембраном од 0,45 μm (*Supelco*, Белефонте, Пенсилванија, САД) и даље коришћени за хроматографско одређивање полифенола.

Припрема нектара хељде и меда хељде за анализу полифенола је подразумевала растварање ових узорака у ултрачистој води. Одмерена количина узорака (~5 g меда, ~0,02 cm^3 нектара) растворена је у (5 cm^3 и 2,2 cm^3 , редом) закисељеној ултрачистој води (додато 0,1 % HCl до pH 2), уз коришћење ултразвучног купатила у трајању од 1 h. Крупније честице из добијеног раствора су уклоњене уз помоћ филтер папира *Whatman No. 1* (*Merck*, Дармштат, Немачка). На овај начин припремљени су раствори узорка нектара и меда хељде који садрже полифенолна једињења и шећере (као и других једињења растворена у води). У циљу раздвајања полифенола из матрикса, процес даље припреме подразумевао је коришћење кертрица за течно-чврсту екстракцију (енг. *Solid Phase Extraction*, *SPE*) (*Strata C18-E* колоне; 55 μm , 70 \AA ; 500 $\text{mg}/3 \text{ cm}^3$; *Phenomenex*, Торанс, Калифорнија). Најпре су *SPE* кертрици кондиционирани са 3 cm^3 ацетонитрила и 9 cm^3 ултрачисте воде (3 пута по 3 cm^3). Након наношења полазног раствора узорака меда пропуштен је први елуат, док је за узорак нектара први елуат прикупљен у циљу каснијег одређивања шећера. Поступак елуирања шећера са *SPE* кертрица је рађено са 4 cm^3 (2 пута по 2 cm^3) закисељене ултрачисте воде (pH 2). Ради потпуног уклањања заосталих неадсорбованих једињења, кертрици су сушени са струјом азота. Адсорбована полифенолна једињења на *SPE* кертрицима су затим елуирана са 1,5 cm^3 ацетонитрила. Добијени раствори узорака меда и нектара су пропуштени кроз поменуте шприц филтере (13 mm, са *PTFE* мембраном од 0,45 μm ; *Supelco*, Белефонте, Пенсилванија) и коришћени за хроматографску анализу полифенола.

3.3.2. Припрема узорака за анализу шећера

Припрема узорака хељде и меда хељде у циљу одређивања шећера подразумевала је растварање узорака у ултрачистој води, потпомогнуто ултразвуком. Одмерене количине морфолошких делова хељде (око 0,1 g) су суспендоване у ултрачистој води, док се одмерена количина меда хељде (око 0,3 g) растворила су ултрачистој води. У циљу раздвајања фаза за узорке хељде коришћена је центрифуга (15 min; 9000 rpm), а у циљу уклањања крупнијих честица из раствора узорака меда, коришћен је филтер папир (*Whatman No. 1*, *Merck*, Дармштат, Немачка). Добијени профилирани раствори су разблажени до концентрације од око 0,2 g/dm^3 . Непосредно пре хроматографске анализе шећера, раствори су пропуштени кроз поменуте најлонске шприц филтере (13 mm, са *PTFE* мембраном од 0,45 μm ; *Supelco*, Белефонте, Пенсилванија, САД).

3.3.3. Припрема узорака за одређивање антиоксидационе активности

Припрема узорака за спектрофотометријско одређивање антиоксидационе активности се своди на поменуту екстракцију морфолошких делова хељде (листа, стабљике, цвета, зрна) системом метанол/вода (закисељеног са HCl до pH 2) и на растварање одмерене масе узорака меда (око 5 g меда) у ултрачистој води (50 cm^3) уз коришћење ултразвука. Добијени раствори екстракта узорака се пре анализе пропуштају кроз најлонске шприц филтере (13 mm, са *PTFE* мембраном од 0,45 μm ; *Supelco*, Белефонте, Пенсилванија).

3.4. Методе испитивања

У оквиру ове докторске дисертације коришћене су експерименталне методе течне хроматографије високих перформанси уз коришћење детектора диодних низова и масеног спектрометра (*UHPLC-DAD MS/MS*), као и *UHPLC-LTQ OrbiTrap*, где је сепарациона техника спрегнута са два наведена масена детектора линерног трап квадруполоа (енг. *Linear Trap Quadrupole, LTQ*) и *OrbiTrap*-а. Коришћена је метода ултраљубичасте-видљиве (енг. *Ultraviolet/Visible, UV/Vis*) спектроскопије, метода јонске хроматографије (*HPLC-PAD*), као и технике рефрактометрије и кондуктометрије. Такође, коришћена је техника микроскопије (Слика Д1 у Додатку) која је послужила као помоћна метода при мелисопалинолошкој анализи узорака меда (Табела Д4, Д5 у Додатку) [33].

3.4.1. Хроматографска анализа полифенолног профила испитиваних узорака

3.4.1.а) Припрема стандардних раствора

Стандардни раствор полифенолних једињења је припремљен растварањем у метанолу до концентрације од око 1 g/dm^3 . За идентификацију једињења у узорцима коришћен је стандардни раствор, при чему су се сви добијени *MS/MS* сигнали из ове смеше полифенолних једињења поредили са онима добијених из узорака. С друге стране, за квантификацију полифенолних једињења коришћени су радни раствори (настали разблаживањем почетног стандардног раствора) концентрација $0,025, 0,050, 0,100, 0,250, 0,500, 0,750$ и $1,000 \text{ mg/dm}^3$. Једначине калибрационе праве са добијеним корелационим фактором (R^2) $0,99$ су показали добру линеарност површине пика једињења и концентрације.

3.4.1.б). Квалитативна анализа полифенолних једињења применом система *UHPLC-LTQ OrbiTrap MS*

Коришћењем система течне хроматографије ултра-високих перформанси (*UHPLC*) постигнуто је раздвајање полифенолних једињења у узорцима хељде и меда хељде уз коришћење аналитичке колоне *Synchronis C18* ($100 \times 2,1 \text{ mm}; 1,7 \mu\text{m}$) (*Thermo Fisher Scientific*, Бремен, Немачка). Систем је повезан са квартерном пумпом (*Acela 600*) која остварује висок притисак, аутосемплером (*Acela*) и 2.1. верзијом софтвера *Xcalibur* (*Thermo Fisher Scientific*, Бремен, Немачка) који служи за контролисање делова инструмента и прикупљање података. Услови рада и градијентски проток концентрација елуената мобилних фаза (А) воде закисељене са $0,1 \%$ мрављом киселином и (Б) ацетонитрила закисељене са $0,1 \%$ мрављом киселином приказани су у Табели 2.

Хроматографски део инструмента је спрегнут са линеарним квадруполом (*LTQ*) масеног анализатора. Коришћена је техника загрејане електроспреј јонизације (енг. *Heated Electrospray Ionisation, HESI*) чији је режим рада у негативном моду. Након небулизације узорка уз помоћ гаса азота у капилари масеног спектрометра, која је подешена на температури од $275 \text{ }^\circ\text{C}$, долази до *MS* фрагментације, тј. настајања молекулског јона $[\text{M-H}]^-$. Вршено је потпуно масено спектрометријско скенирање свих јона (енг. *Full Scan, FS*). Коришћењем енергије (од 35 eV) у колизионој ћелији, где се одиграва дисоцијација јонског судара (*CID*), остварена је фрагментација јона при сударима са гасом азота. Затим је, након добијених тачних маса депротонисаних молекула $[\text{M-H}]^-$, вршена *MS*² фрагментација молекулског јона $[\text{M-H}]^-$ и то коришћењем скенирања у зависности од прикупљених података (енг. *Data Dependent, DD*) на најинтезивнијим јонима. За разградњу наредних одабраних фрагментних јона коришћена

су још два наизменична догађаја скенирања (*DD*) ради добијања MS^3 и MS^4 фрагментације. Систем *UHPLC-LTQ* је повезан са *OrbiTrap*-ом, јонском замком масеног анализатора, око чије сонде (централног дела) осцилују настали m/z фрагменти.

Потврда идентификације полифенолних једињења рађена је уз коришћење доступних стандарда или поређењем са механизмима фрагментације објављеним у литератури [33,34,95]. Механизам фрагментације и карактеристике фрагмената потврђени су коришћењем софтвера *Mass Frontier* верзије 6.0 (*Thermo Fisher Scientific*, Бремен, Немачка). MS/MS спектри су обрађивани уз помоћ *Tox ID Automated Screening Software*, верзије 2.1.1., док је база масених спектрометријских података служила за добијање тачних спектралних маса полифенолних једињења.

Табела 2 Експериментални услови снимања на *UHPLC-LTQ OrbiTrap MS*.

Параметри хроматографског система			
Градијентски проток мобилне фазе:	време	А	Б
	0 – 1 min	95 %	5 %
	1 – 9,9 min	95 – 5 %	5 – 95 %
	9,9 – 10 min	5 – 95 %	95 – 5 %
	10 – 13 min	95 %	5 %
Проток:	0,3 cm ³ /min		
Инјектована запремина:	5 μ dm ³		
Аналитичка колона:	<i>Synchronis C18</i> (100 x 2,1 mm; 1,7 μ m)		
Параметри хибридног масеног спектрометра			
Јонизација:	<i>HESI</i> , негативан мод		
Напон извора:	3 Kv		
Напон капиларе:	-20 V		
Напон сочива цеви:	-150 V		
Температура капиларе:	275°C		
Притисак гаса:	(N ₂) 30 арбитарних јединица		
Притисак помоћног гаса:	(N ₂) 8 арбитарних јединица		
Осцилације поља:	1 MHz		
Колизиона енергија судара <i>CID</i> ћелије:	35 eV		
Опсег снимања масеног спектра:	100 – 900 m/z		
Тип скенирања:	<i>FS/DD</i> scan		

3.4.1.в). Квантитативна анализа полифенолних једињења применом система *UHPLC-DAD MS/MS*

Кванификација полифенолних једињења у узорцима меда рађена је на систему течне хроматографије ултра-високих перформанси (*UHPLC*, *Dionex*, *Thermo Fisher Scientific*, Базел, Немачка) са детектором диодних низова (*DAD*) који је повезан са троструким анализатором масеног спектрометра (*TSQ Quantum Acces Max*, *Thermo Fisher Scientific*, Базел, Немачка). Систем је подржан 2.2. верзијом софтвером *Xcalibur* (*Thermo Fisher Scientific*, Бремен, Немачка) који служи за контролисање инструмента.

Коришћена је бинарна пумпа која остварује притисак ~1000 bar. Примењен је систем реверзне фазе (*R-HPLC*) уз коришћење поларне мобилне фазе која се састојала од (А) воде са 0,1 % мрављом киселином и (Б) ацетонитрилом. Раздвајање полифенолних једињења је

вршено на аналитичкој колони *Synchronis C18* (100 x 2,1 mm; 1,7 μ m) (*Thermo Fisher Scientific*, Бремен, Немачка). Услови градијентног протока, као и остали услови снимања приказани су у Табели 3. Коришћена је *HESI* тип јонизација троструког квадруполног анализатора на температури од 200°C. Примењен је напон капиларе масеног спектрометра од -20 V. Одабрани прекурсор јон (из првог квадруполола) се у колизионој ћелији у другом квадруполу фрагментише при сударима са гасом азота на енергији од 35 eV. Два најинтезивнија новонастала јона (након *MS/MS* фрагментације) се при проласку кроз трећи квадрупол истим принципом (применом радиофреквентног сигнала) усмеравају ка детектору. Троструки квадруполни анализатор пружа спектар неколико најинтезивнијих јона (од којих се бирају два најинтезивнија) насталих фрагментацијом продукт јона одабраном у првом квадруполу. Примењено је вишеструко масено спектрометријско скенирање (енг. *Selective Reaction Monitoring, SRM*) којим је вршено подешавање и фиксирање одређених *m/z* фрагмената у два квадруполола и добијање молекулског јона. За овакву анализу оптимизовали су се услови (преко *tune* опције) у циљу добијања максималних интензитета јона. Квантификација полифенолних једињења је урађена снимањем масених хроматограма молекулског јона и одабиром два најинтезивнија фрагмента из *MS²* фрагментације. Поређењем добијених молекулских јона узорака меда са онима од стандарда и накнадним интеграљењем пикова добијена је концентрација полифенола у узорцима изражена као mg/kg. Узорци су рађени у две пробе.

Табела 3 Експериментални услови снимања на *Ultimate 3000 HPLC-DAD MS/MS*.

Параметри хроматографског система			
Градијентски проток мобилне фазе:	време	А	Б
	0 – 2 min	95 %	5 %
	2 – 12 min	95 – 5 %	5 – 95 %
	12 – 12,2 min	5 – 95 %	95 – 5 %
	12,2 – 15 min	95 %	5 %
Проток:	0,4 cm ³ /min		
Ињектована запремина:	5 μ dm ³		
Аналитичка колона:	<i>Synchronis C18</i> (100 x 2,1 mm; 1,7 μ m)		
Температура колоне:	40°C		
Параметри масеног спектрометра			
Извор јонизације:	HESI, негативан мод		
Напон извора спреја:	5 kV		
Напон капиларе	-20 V		
Температура јонизације:	200°C		
Температура капиларе:	300°C		
Притисак гаса:	(N ₂) 40 арбитарних јединица		
Притисак јонског гаса:	(N ₂) 1 арбитарна јединица		
Притисак помоћног гаса:	(N ₂) 8 арбитарних јединица		
Колизиона енергија судара <i>CID</i> ћелије:	35 eV		
Опсег снимања масеног спектра:	100 – 1000 <i>m/z</i>		
Тип скенирања:	<i>SRM</i>		

3.4.2. Спектрофотометријско одређивање антиоксидационе активности

Принцип спектрофотометријског одређивања антиоксидационог капацитета узорака заснива се на мерењу антирадикалске активности једињења присутних у узорку према коришћеним радикалима као што су реагенс *Folin-Ciocalteu* и *DPPH*. Резултати су изражени преко еквивалента галне киселине и *Trolox* стандарда, редом. Смањењем интензитета апсорбанција на њиховим апсорпционим максимумима у видљивом делу спектра (на таласној дужини 765 nm и 517 nm, редом) мерена је редуција радикала у узорцима.

3.4.2.а) Одређивање садржаја укупних фенола (TPC)

Основни стандардни раствор галне киселине је растворен у ултрачистој води до концентрације од око 1000 mg/dm³. Разблаживањем су направљени калибрациони раствори концентрација 10, 20, 40, 60, 80, 100, 120 и 140 mg/dm³. Помоћу *UV/Vis* спектрофотометра (Cintra6, *GBC Scientific Equipment Ltd.*, Данденонг, Викторија, Аустралија) снимана је апсорбанција у зависности од концентрације галне киселине, на таласној дужини од 765 nm. За нулу инструмента снимана је апсорбанција ултрачисте воде.

Претходно профилирани раствори су, уз потребна разблажења, у реакцији са *Folin-Ciocalteu* реагенсом анализирани на садржај укупних фенола (TPC). Одмерена количина припремљеног раствора екстракта узорака је помешана са 0,5 cm³ ултрачисте воде и 2,5 cm³ 10 % воденог раствора *Folin-Ciocalteu* реагенса и након 5 min додато је 2 cm³ 7,5 % раствора натријум-карбоната. Након 2 h и без присуства светлости раствори су анализирани на садржај TPC снимањем апсорбанције помоћу *UV/Vis* спектрофотометра на таласној дужини од 765 nm. Узорци су припремљени у две пробе, а добијени резултати TPC су изражени преко еквивалената галне киселине (mg GAE/kg за узорке меда и g GAE/kg за узорке хељде). Слепа проба се састојала од 0,5 cm³ ултрачисте воде, 2,5 cm³ 10 % воденог раствора *Folin-Ciocalteu* реагенса и 2 cm³ 7,5 % раствора натријум-карбоната.

3.4.2.б) Одређивање релативне антиоксидационе активности (RSA)

Основни раствор *Trolox* стандарда је припремљен растварањем у метанолу до концентрације од око 1000 μmol/dm³. Разблаживањем је направљена серија калибрационих раствора концентрација 100, 200, 300, 400, 500, 600 μmol/dm³. Одмеравањем 0,1 cm³ калибрационог раствора и 4 cm³ метанолског раствора *DPPH* (~70 μmol/dm³), раствори су остављени 1 h без присуства светлости, након чега је снимана апсорбанција. За нулу инструмента снимана је апсорбанција метанола.

У претходно припремљене растворе узорака (0,1 cm³) је додато по 4 cm³ *DPPH*. Раствори су остављени 1 h без присуства светлости. Снимање апсорбанције раствора је рађено помоћу поменутог спектрофотометра на таласној дужини од 517 nm. Као слепа проба коришћено је 4 cm³ метанолског раствора *DPPH*. Вредност RSA је израчуната на основу формуле:

$$RSA (\%) = \frac{A_{DPPH} - A_{узорка}}{A_{DPPH}} \cdot 100$$

У формули A_{DPPH} представља вредност апсорбанције метанолског раствора *DPPH* радикала мереној на 517 nm. $A_{узорка}$ представља вредност апсорбанције у узорцима раствора меда (уз

присуство $DPPH\cdot$) на 517 nm. Анализе су рађене у две пробе, а резултати су изражени преко тролокс (*Trolox*) еквивалената (mmol TE/ kg) и у процентима (%).

3.4.3. Хроматографска анализа садржаја шећера

3.4.3.а) Припрема стандардних раствора

Почетни раствор за сваки стандард шећера припремљен је растварањем у ултрачистој води до концентрације од око 1 g/ dm³ (за анализу узорак меда) и 1 ng/ dm³ (за анализу узорак хељде). Разблаживани радни раствори су прављени у различитом опсегу у зависности од шећера, како је приказано у Табели 4.

Табела 4 Експериментални услови снимања на *Dionex ICS 3000* (HPLC/PAD).

Параметри хроматографског система				
Градијентски проток мобилне фазе:	време	А	Б	В
	0 – 5 min	15 %	0 %	85 %
	5,1 – 12 min	15 %	2 %	83 %
	12,1 – 20 min	15 %	4 %	81 %
	20,1 – 30 min	20 %	20 %	60 %
Проток:	0,7 cm ³ /min			
Ињекциона запремина:	25 μ dm ³			
Аналитичка колона:	<i>CarboPac PA100</i> ; 4 x 250 mm; PEEK			
Претколона:	<i>CarboPac PA100 Guard</i> ; 4 x 50 mm			
Температура колоне:	30°C			
Припрема стандардних калибрационих раствора за шећере				
Шећери	Узорци меда	Узорци хељде		
Глукоза:	10,0 – 100,0 mg/dm ³	5,0 ng/dm ³		
Фруктоза:	10,0 – 100,0 mg/dm ³	10,0 ng/dm ³		
Сахароза:	1,0 – 10,0 mg/dm ³	25,0 ng/dm ³		
Изомалтоза:	0,5 – 5,0 mg/dm ³	0,05 – 2,0 ng/dm ³		
Сви остали шећери:	0,1 – 1,0 mg/dm ³	0,05 – 2,0 ng/dm ³		

3.4.3.б) Експериментални услови система HPLC/PAD

Одређивање шећерног профила узорак коришћењем система јонске хроматографије (HPLC-PAD) рађено је на инструменту *Dionex ICS 3000* (*Dionex, Thermo Fisher Scientific, Санивејл, Калифорнија, САД*). Систем је повезан са квартерном градијентном пумпом *Dionex ICS DP 3000*. Коришћен је калијум-хидроксидни кертриџ (*Dionex Cartridge KOH*), који уз супресор, ствара одговарајућу средину која од мобилне фазе прави киселине (тј. металне хидроксиде од шећера). Коришћена је аналитичка колона *Carbo Pac PA 100* (4 x 250 mm) и претколона *Carbo Pac PA 100 guard* (4 x 50 mm) (*Dionex, Thermo Fisher Scientific, Санивејл, Калифорнија, САД*). Аналитичка колона је хидрокси-селективна анјонско измењивачка колона од полиетаретар кетона (енг. *Polyether Ether Ketone, PEEK*) коју чине негативно наелектрисна (SO₃⁻) језгра прекривна јоноизмењивачким слојем амонијум (NR₃⁺) група ($\leq 0,1 \mu$ m). Молекули шећера који се везују за колону имају одређено време задржавања. Коришћена су три елуента мобилне фазе са условима градијентског протока приказаним у Табели 4. Да би

се шећери одвојили по принципу анијонске измењивачке хроматографије, захтевају висок рН средине који је остварен уз коришћени (А) 600 mM раствор натријум-хидроксида. Додатком другог јачег елуента (Б) 500 mM раствор натријум-ацетата) шећери су се успешно елуирали са колоне. Као трећи елуент мобилне фазе коришћена је ултрачиста вода (В).

Систем је повезан са електрохемијским детектором *Dionex ICS DC 3000*, који остварује пулсно амперометријску детекцију по принципу рада електрохемијске ћелије (опремљен са радном Au електродом, референтном Ag/AgCl електродом и помоћном електродом). Систем је опремљен и са аутосемплером *Dionex ICS AS-DV 50*, као и софтвером *Chromeleon*, верзија б.8., који је коришћен за контролу инструмента и анализу података.

3.4.4. Одређивање садржаја воде

Одређивање садржаја воде у узорцима хељде (лист, стабљика, цвет, зрно) рађено је методом сушења узорака до константне масе. Одмерена маса узорака (~10 g) је сушена на собној температури без присуства светлости у трајању од око 15 дана. Резултати садржаја воде су изражени као процентуални губитак масе узорка током сушења.

Одређивање садржаја воде у узорцима меда рађено је на основу индиректне методе мерењем индекса рефракције [129] коришћењем Абеовог (*Abbe*) рефрактометра (*Atago RX refractometer, Atago, Јапан*). Добро хомогнеизовани узорци меда су наносени директно на призму рефрактометра на температури од 20 °C. Добијене вредности индекса преламања су помоћу Кетвејових (*Chataway*) таблица кориговане у вредности садржаја воде у процентима (%). Анализа одређивања садржаја воде узорака је рађена у две пробе.

3.4.5. Одређивање електричне проводљивости

За одређивање електричне проводљивости коришћен је 20 % водени раствор меда по процедури коју су објавили Богданов (*Bogdanov*) и сарадници [129]. У односу на претходно добијене резултате садржаја воде у меду, одмерено је ~ 12 g меда и растворено у 50 cm³ ултрачисте воде. Електрична проводљивост је мерена кондуктометром (*WTW Golden lab & engineering, Cond 7110, InoLab, Вајлхајм, Немачка*) опремљеним са кондуктометријском ћелијом константе 0,108 cm⁻¹. Раствор узорака меда је припреман у две пробе.

4. Резултати и дискусија

4.1. Хроматографско одређивање полифенолног профила испитиваних узорака

Изоловање и одвајање полифенолних једињења из екстраката узорака хељде и меда остварено је применом комбинованих техника екстракције. Применом ултразвучне екстракције полифенола системом метанол/вода [48], као и применом *SPE* методе [89], омогућено је изоловање и одвајање полифенолних једињења из комплексног матрикса, како биљке хељде, тако и меда хељде. Услови снимања *LC* система за анализу узорака хељде и меда од хељде, који су описани у Експерименталном делу, су у сагласности са литературним подацима [33,34,89,126,130].

4.1.1. Идентификација полифенолних једињења и путеви фрагментације

Анализом масених хроматограма применом *UHPLC-LTQ Orbitrap MS* система, идентификовано је 81 полифенолно једињење (Табела 5). У прилогу су приказани добијени масени хроматограми листа, стабљике, цвета и зрна хељде (Слика Д2 у Додатку). Међу идентификованим полифенолним једињењима, 32 једињења припадају групи фенолних киселина и деривата, а 49 једињења флавоноидима и дериватима. У Табели 5 су, поред назива једињења и ретенционог времена (t_R) приказане и тачне масе ($[M-H]^-$, m/z), израчунате масе ($[M-H]^-$, m/z), као и грешке (Δ , ppm) добијене при израчунавању масе ($[M-H]^-$, m/z).

Масе депротонованих молекула $[M-H]^-$ добијене су коришћењем анализе скенирања целог спектра (*FS*). Поређењем параметара времена задржавања, тачне и израчунате масе једињења у узорцима (чија је вредност грешке највише износила Δ 4,73 ppm) са добијеним параметрима за коришћене стандарде, идентификовано је 30 полифенолних једињења. На основу вишестепене технике фрагментације предложене су структуре различитих изомера као и позиције интергликозидних веза. Укупни масени спектри за узорке хељде и меда хељде добијени су након три узастопне фрагментације јона изведених од $[M-H]^-$, чији су путеви фрагментације, предложене молекулске и структурне формуле молекулског јона $[M-H]^-$ непознатог једињења приказани у Табели 5. У одсуству стандарда, механизми фрагментације потврђени су поређењем са објављеним подацима у литератури [33,34,95]

У литератури је истакнуто да се фенолне киселине у биљкама ретко срећу у слободном облику, већ да су оне везане за протеине, шећере, неком од веза естарском, естарском или ацетилном [93]. Према раду који су објавили Кечкеш (*Keckeš*) и сарадници [54], могући путеви фрагментације, углавном фенолних киселина, засновани су на губитку функционалних група H_2O (-18 Da), CO (-28 Da), C_2H_2O (-42 Da), CO_2 (-44 Da).

Најчешћи пут фрагментације идентификованих фенолних киселина заснован је на губитку CO_2 групе тј. -44 Da (Табела 5). Добијање депротонованог јона $[M-H]^-$ непознатог једињења, као и јона фрагмента $[M-H-44]^-$ је уочено код хидрокси деривата тј. хидроксибензоєвих киселина (галне, протокатехинске, *p*-хидроксибензоєве) као и хидроксициметних киселина (кофеинске, *p*-кумаринске, циметне) (Табела 5). Такође, добијање фрагмента $[M-H-44]^-$ уочено је и приликом MS^3 фрагментације код већине хексозида фенолних киселина: изомери галоил хексозида (једињење бр. 1 и бр. 3), изомери дихидроксибензоил хексозида (бр. 4 и бр. 5), кумароил хексозид (бр. 16) након претходног губитка хексозе ових једињења (-162 Da), као и код деривата кофеинске киселине (бр. 13, 15, 21, 23, 26, 31) (Табела 5).

Табела 5 Идентификована полифенолна једињења у узорцима хељде и меда хељде: име једињења, ретенционо време t_R , молекуларна формула $[M-H]^-$, израчуната маса, нађена маса, средње одступање маса (ppm), фрагменти MS^2 , MS^3 и MS^4 .

Бр.	t_R , min	Једињење	Формула $[M-H]^-$	Израчуната маса, $[M-H]^-$	Нађена маса, $[M-H]^-$	Δ ppm	Фрагменти MS^2	Фрагменти MS^3	Фрагменти MS^4
<i>Хидроксибензојеве киселине и деривати</i>									
1	1,98	Галоил хексозид (изомер 1)	$C_{13}H_{15}O_{10}^-$	331,06707	331,06707	0,00	125(9), 169 (100), 170(4)	125 (100)	69(1), 79(17), 81 (100), 97(55), 107(13), 163(16)
2	2,39	Гална киселина ¹	$C_7H_5O_5^-$	169,01425	169,01421	0,24	84(3), 123(8), 124(5), 125 (100), 126(8), 131(1), 141(2)	67(8), 69(49), 79(8), 81(93), 83(53), 97 (100), 107(11)	н.д.
3	3,93	Галоил хексозид (изомер 2)	$C_{13}H_{15}O_{10}^-$	331,06707	331,06699	0,25	123(2), 125(5), 167(2), 169 (100), 170(7), 285(3), 313(2)	125 (100), 150(1)	69 (100), 80(50)
4	3,96	Дихидроксибензоил хексозид (изомер 1)	$C_{13}H_{15}O_9^-$	315,07216	315,07211	0,16	108(6), 109(10), 152(28), 153 (100), 154(7), 163(6), 165(9)	108(10), 109 (100)	81 (100)
5	4,42	Дихидроксибензоил хексозид (изомер 2)	$C_{13}H_{15}O_9^-$	315,07216	315,07184	1,00	109(5), 153 (100), 154(4)	109 (100), 123(2)	н.д.
6	4,50	Протокатехинска киселина ¹	$C_7H_5O_4^-$	153,01933	153,01917	1,09	107(3), 109 (100), 110(8), 123(7), 125(2)	65(42), 81 (100), 91(68), 106(17)	н.д.
7	5,50	<i>p</i> -хидроксибензојева киселина ¹	$C_7H_5O_3^-$	137,02442	137,02425	1,25	93 (100), 94(6), 109(3)	176 (100)	н.д.
8	6,64	Галоил-кумароил хексозид	$C_{22}H_{21}O_{12}^-$	477,10385	477,10295	1,88	169(9), 287(4), 307(3), 313(1), 331 (100), 332(12), 433(4)	125(13), 169 (100)	125 (100)
9	7,67	Дихидроксибензоил-кумароил хексозид	$C_{22}H_{21}O_{11}^-$	461,10894	461,10797	2,10	152(1), 153(3), 307(2), 315 (100), 316(8), 417(2)	108(11), 109(11), 152(48), 153 (100), 163(8), 165(13), 225(6)	108(5), 109 (100)
10	7,84	Дихидрокисбензоил-ферулоил хексозид	$C_{23}H_{23}O_{12}^-$	491,11950	491,11908	0,85	153(6), 161(9), 315 (100), 316(11), 323(30), 447(14), 459(22)	108(9), 109(12), 152(38), 153 (100), 163(9), 165(14), 225(7)	108(9), 109 (100)

Табела 5 Наставак

Бр.	t_R , min	Једињење	Формула [M-H] ⁻	Израчуната маса, [M-H] ⁻	Нађена маса, [M-H] ⁻	Δ ppm	Фрагменти MS ²	Фрагменти MS ³	Фрагменти MS ⁴
<i>Хидроксициметне киселине и деривати</i>									
11	4,72	3-О-кофеоилхининска киселина¹	C ₁₆ H ₁₇ O ₉ ⁻	353,08781	353,08614	4,73	135(6), 173(2), 179(29), 180(2), 191 (100), 192(4)	85 (100), 93(62), 109(24), 111(41), 127(95), 171(27), 173(73)	н.д.
12	5,07	Ферулоилхининска киселина-хексозид	C ₂₃ H ₂₉ O ₁₄ ⁻	529,15628	529,15540	1,67	193(1), 367 (100), 368(16)	133(8), 134(2), 135(11), 161 (100), 193(10), 323(2), 335(6)	133 (100)
13	5,26	Кофеоил-хексозид	C ₁₅ H ₁₇ O ₉ ⁻	341,08781	341,08775	0,15	135(10), 153(2), 179 (100), 180(9), 295(1)	135 (100)	107 (100)
14	5,30	3-О-<i>p</i>- кумароилхининска киселина	C ₁₆ H ₁₇ O ₈ ⁻	337,09289	337,09253	1,08	119(6), 163 (100), 164(5), 173(4), 191(7)	119 (100)	н.д.
15	5,36	5-О-кофеоилхининска киселина¹	C ₁₆ H ₁₇ O ₉ ⁻	353,08781	353,08780	0,01	179(3), 191 (100)	85 (100), 93(66), 109(20), 111(37), 127(89), 171(26), 173(70)	57 (100)
16	5,39	Кумароил-хексозид	C ₁₅ H ₁₇ O ₈ ⁻	325,09289	325,09286	0,10	119(9), 163 (100), 164(5), 289(18), 290(2)	119 (100)	н.д.
17	5,62	3-О-ферулоилхининска киселина	C ₁₇ H ₁₉ O ₉ ⁻	367,10346	367,10290	1,50	134(6), 173(2), 191(1), 193 (100), 194(3), 329(2)	117(3), 134 (100), 149(26), 178(1)	106 (100)
18	5,89	Кофеинска киселина¹	C ₉ H ₇ O ₄ ⁻	179,03498	179,03497	0,05	133(2), 134(7), 135 (100), 136(1)	77(5), 78(4), 79(3), 91(56), 93(3), 107 (100), 117(16)	н.д.
19	6,01	5-О-<i>p</i>- кумароилхининска киселина (изомер 1)	C ₁₆ H ₁₇ O ₈ ⁻	337,09289	337,09268	0,64	163(4), 191 (100), 192(3), 289(1)	85 (100), 87(22), 93(58), 111(29), 127(95), 171(24), 173(72)	н.д.

Табела 5 Наставак

Бр.	t_R , min	Једињење	Формула [M-H] ⁻	Израчуната маса, [M-H] ⁻	Нађена маса, [M-H] ⁻	Δ ppm	Фрагменти MS ²	Фрагменти MS ³	Фрагменти MS ⁴
20	6,40	5-O- <i>p</i> - кумароилхнинска киселина (изомер 2)	C ₁₆ H ₁₇ O ₈ ⁻	337,09289	337,09272	0,50	163(3), 191 (100), 192(4)	85 (100), 87(19), 93(55), 111(35), 127(95), 171(28), 173(68)	н.д.
21	6,51	Метил 5-O- кофеоилхинат (изомер 1)	C ₁₇ H ₁₉ O ₉ ⁻	367,10346	367,10203	3,87	134(5), 135(44), 136(3), 161(11), 179 (100), 180(8), 191(20)	135 (100)	79(53), 107 (100), 151(18)
22	6,78	<i>p</i> -кумаринска киселина ¹	C ₉ H ₇ O ₃ ⁻	163,04007	163,03970	2,27	91(1), 119 (100), 120(4)	91(5), 93 (100)	н.д.
23	6,83	Метил 5-O- кофеоилхинат (изомер 2)	C ₁₇ H ₁₉ O ₉ ⁻	367,10346	367,10257	2,42	134(4), 135(44), 136(3), 161(11), 179 (100), 180(7), 191(19)	135 (100)	81(36), 93(11), 106(5), 107 (100)
24	7,01	Циметна киселина	C ₉ H ₇ O ₂ ⁻	147,04515	147,04454	4,16	103 (100), 119(2)	н.д.	н.д.
25	7,06	Метил-елагинска киселина (изомер 1)	C ₁₅ H ₇ O ₈ ⁻	315,01464	315,01363	3,22	151(44), 167(26), 175(31), 179 (100), 209(35), 269(60), 300(26)	151 (100)	н.д.
26	7,24	Дикофеоилхнинска киселина	C ₂₅ H ₂₃ O ₁₂ ⁻	515,11950	515,11895	1,06	191(1), 353 (100), 354(10), 447(5)	135(10), 161(1), 173(4), 179(46), 191 (100)	85(88), 87(22), 93(81), 109(22), 111(49), 127(96), 173 (100)
27	8,22	Ферулинска киселина ¹	C ₁₀ H ₉ O ₄ ⁻	193,05063	193,05036	1,41	129(4), 133(7), 134(34), 147 (100), 149(5), 161(47), 178(15)	57(7), 85(13), 99(6), 101(13), 103(22), 111(8), 129 (100)	55(9), 57(60), 73(3), 85 (100)
28	8,22	Метил-дикофеоилхинат	C ₂₆ H ₂₅ O ₁₂ ⁻	529,13515	529,13304	3,98	161(5), 179(4), 349(6), 367 (100), 368(9)	133(7), 134(6), 135(53), 161(78), 179 (100), 191(21), 193(8)	135 (100)
29	9,19	Метил-елагинска киселина (изомер 2)	C ₁₅ H ₇ O ₈ ⁻	315,01464	315,01434	0,94	179(73), 180(4), 269(16), 271(6), 287(15), 300 (100), 301(18)	243(4), 254(11), 255(54), 271 (100), 272(11)	н.д.
30	11,55	Бензил кофеат	C ₁₆ H ₁₃ O ₄ ⁻	269,08193	269,08163	1,13	134 (100), 135(5), 161(8), 178(44), 179(4), 223(2), 225(8)	106 (100), 108(16), 119(6), 121(6), 150(29)	н.д.

Табела 5 Наставак

Бр.	t_R, min	Једињење	Формула [M-H] ⁻	Израчуната маса, [M-H] ⁻	Нађена маса, [M-H] ⁻	Δ ppm	Фрагменти MS ²	Фрагменти MS ³	Фрагменти MS ⁴
31	11,56	Пренил кофеат	C ₁₄ H ₁₅ O ₄ ⁻	247,09758	247,09741	0,69	134(1), 135(17), 136(1), 161(3), 179 (100), 180(5)	135 (100)	65(8), 79(7), 93(2), 100(1), 107 (100), 117(5)
32	12,55	Цинамил кофеат	C ₁₈ H ₁₅ O ₄ ⁻	295,09758	295,09756	0,09	134 (100), 135(7), 178(89), 179(7), 211(46), 251(49), 252(8)	106 (100), 109(12), 121(38)	н.д.
<i>Флаван-3-олни мономери и димери</i>									
33	5,00	Б (В) тип процијанидин димер (изомер 1)	C ₃₀ H ₂₅ O ₁₂ ⁻	577,13515	577,13440	1,31	287(8), 289(26), 407(55), 425 (100), 426(9), 451(26), 559(8)	273(7), 287(2), 299(1), 339(2), 341(1), 381(5), 407 (100)	243(22), 256(19), 281(84), 283(35), 285 (100), 297(30), 389(30)
34	5,17	Б (В) тип процијанидин димер галат	C ₃₇ H ₂₉ O ₁₇ ⁻	745,14102	745,13843	3,48	315(11), 423(12), 441(38), 467(21), 593 (100), 727(19)	289(8), 315(34), 397(5), 423(17), 441 (100), 467(30)	153(36), 287(17), 289(21), 297(8), 315 (100)
35	5,43	Катехин ¹	C ₁₅ H ₁₃ O ₆ ⁻	289,07176	289,07175	0,05	179(13), 203(10), 205(40), 231(7), 245 (100), 246(11), 247(6)	161(19), 175(9), 187(22), 188(13), 203 (100), 217(6), 227(25)	109(7), 157(19), 159(7), 161(33), 175 (100), 185(20), 188(57)
36	5,61	Метил-Б (В) тип проделфинидин димер	C ₃₁ H ₂₇ O ₁₃ ⁻	607,14571	607,14453	1,94	287(45), 405(47), 423(15), 437(58), 449(25), 455 (100), 575(65)	243(30), 261(8), 303(15), 315(8), 405 (100), 423(27), 437(82)	228(2), 243 (100), 283(4), 377(1), 387(2)
37	5,62	Б (В) тип процијанидин димер (изомер 2)	C ₃₀ H ₂₅ O ₁₂ ⁻	577,13515	577,13409	1,84	287(6), 289(18), 407(47), 408(6), 425 (100), 426(8), 451(20)	273(7), 287(1), 339(3), 381(5), 407 (100)	243(23), 255(22), 281(85), 283(41), 285 (100), 297(33), 389(36)
38	5,93	Епикатехин ¹	C ₁₅ H ₁₃ O ₆ ⁻	289,07176	289,07074	3,53	179(9), 203(7), 205(28), 231(4), 245 (100), 246(6), 247(4)	161(19), 175(9), 187(25), 188(13), 203 (100), 217(7), 227(26)	157(10), 159(9), 161(33), 174(8), 175 (100), 185(21), 188(65)
39	5,96	Б (В) тип процијанидин тример	C ₄₅ H ₃₇ O ₁₈ ⁻	865,19854	865,19751	1,19	287(26), 407(40), 425(31), 577(59), 595 (100), 713(41), 739(94)	243(40), 289(24), 405(33), 451(31), 525(37), 543 (100), 677(33)	391(38), 499(8), 525 (100)

Табела 5 Наставак.

Бр.	t_R , min	Једињење	Формула [M-H] ⁻	Израчуната маса, [M-H] ⁻	Нађена маса, [M-H] ⁻	Δ ppm	Фрагменти MS ²	Фрагменти MS ³	Фрагменти MS ⁴
40	6,18	Б (В) тип процијанидин димер галат (изомер 1)	C ₃₇ H ₂₉ O ₁₆ ⁻	729,14611	729,14378	3,19	289(22), 407 (100), 441(38), 451(40), 559(73), 577(63), 603(35)	243(19), 255(21), 256(19), 283(30), 285 (100), 297(29), 389(20)	213(4), 241(4), 257 (100)
41	6,84	(Епи)катехин галат ¹	C ₂₂ H ₁₇ O ₁₀ ⁻	441,08272	441,08198	1,67	169(15), 193(5), 271(8), 289 (100), 303(3), 331(11), 397(2)	179(12), 203(9), 205(34), 231(6), 245 (100), 247(6), 271(4)	161(19), 175(8), 187(20), 188(13), 203 (100), 217(6), 227(30)
42	7,03	Метил-(епи)галокатехин галат	C ₂₃ H ₁₉ O ₁₁ ⁻	471,09329	471,09266	1,34	169(15), 287 (100), 288(10), 303(19), 313(24), 319(34), 439(42)	125 (100), 161(9), 165(1), 243(14), 244(1), 245(3), 259(1)	57 (100)
43	7,19	Б (В) тип процијанидин димер галат (изомер 2)	C ₃₇ H ₂₉ O ₁₆ ⁻	729,14611	729,14435	2,42	407 (100), 408(20), 441(22), 451(21), 559(59), 577(46), 711(33)	243(18), 255(21), 281(22), 283(33), 285 (100), 297(35), 389(19)	213(5), 241(3), 243(1), 255(1), 257 (100)
44	7,41	Метил-(епи)катехин галат	C ₂₃ H ₁₉ O ₁₀ ⁻	455,09837	455,09814	0,50	168(2), 183(15), 271(6), 289 (100), 290(9), 315(3), 345(3)	165(4), 179(12), 203(9), 205(36), 231(6), 245 (100), 247(5)	161(18), 175(9), 187(23), 188(12), 203 (100), 227(29), 230(7)
45	7,49	Диметил-Б (В) тип процијанидин димер галат	C ₃₉ H ₃₃ O ₁₆ ⁻	757,17741	757,17719	0,29	287(7), 407(9), 559(8), 587(41), 605 (100), 631(24), 739(4)	389(29), 437(37), 587 (100)	389(40), 437 (100)
Флавоноли									
46	6,23	Мирицетин ¹	C ₁₅ H ₉ O ₈ ⁻	317,03029	317,03015	0,43	163(14), 191 (100), 207(23), 208(4), 255(6), 273(7), 299(31)	119(2), 135(5), 163 (100)	91(4), 107(24), 119(56), 135 (100)
47	6,51	Кверцетин 3-О-(6''-рамноси)-г-лукозид (рутин) ¹	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₆ ⁻	609,14611	609,14385	3,71	179(3), 255(4), 271(6), 300(31), 301 (100), 302(17), 343(6)	151(75), 179 (100), 255(27), 257(14), 271(47), 272(17), 273(19)	151 (100), 169(1)
48	6,77	Кверцетин 3-О-галактозид (хиперозид) ¹	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₂ ⁻	463,08820	463,08774	1,00	151(1), 300(36), 301 (100), 302(13), 303(2), 343(1)	151(79), 179 (100), 255(25), 257(15), 271(34), 272(11), 273(16)	151 (100)

Табела 5 Наставак.

Бр.	t_R , min	Једињење	Формула [M-H] ⁻	Израчуната маса, [M-H] ⁻	Нађена маса, [M-H] ⁻	Δ ppm	Фрагменти MS ²	Фрагменти MS ³	Фрагменти MS ⁴
49	6,93	Кемпферол 7- <i>O</i> -(6''-рамносил)-хексозид	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₅ ⁻	593,15119	593,14941	3,00	229(3), 255(2), 257(4), 267(1), 285 (100), 286(12), 327(2)	197(21), 213(27), 229(50), 241(36), 256(21), 257 (100), 267(49)	163(69), 185(20), 187(11), 189(11), 213(23), 229 (100), 239(36)
50	6,99	Кверцетин 3- <i>O</i> -пентозид	C ₂₀ H ₁₇ O ₁₁ ⁻	433,07764	433,07755	0,20	300(26), 301 (100), 302(8)	151(76), 179 (100), 255(17), 257(12), 271(19), 273(19), 283(16)	151 (100)
51	7,27	Кверцетин 3- <i>O</i> -рамнозид (кверцитрин) ¹	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁ ⁻	447,09329	447,09261	1,51	300(21), 301 (100), 302(8)	151(83), 179 (100), 255(27), 271(34), 272(14), 273(18), 283(21)	151 (100)
52	7,78	Кемпферол 3- <i>O</i> -рамнозид	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₀ ⁻	431,09837	431,09787	1,17	255(6), 256(2), 283(2), 284(49), 285 (100), 286(15), 327(4)	213(17), 229(30), 241(26), 255 (100), 256(62), 257(80), 267(35)	167(2), 187(2), 210(5), 211(59), 212(4), 213(3), 227 (100)
53	8,30	Кверцетин 3- <i>O</i> -(6''- <i>p</i> -кумароил)-хексозид	C ₃₀ H ₂₅ O ₁₄ ⁻	609,12498	609,12445	0,88	299(3), 300(12), 301 (100), 302(12), 445(12), 463(50), 464(8)	151(90), 179 (100), 229(8), 255(6), 257(21), 271(9), 273(23)	107(1), 151 (100)
54	8,85	Кверцетин ¹	C ₁₅ H ₉ O ₇ ⁻	301,03538	301,03516	0,72	151(82), 179 (100), 180(8), 193(7), 257(12), 271(11), 273(15)	107(1), 151 (100)	63(4), 65(3), 83(13), 107 (100)
55	9,16	Кверцетин 3-метил етер	C ₁₆ H ₁₁ O ₇ ⁻	315,05103	315,05066	1,16	179(1), 300 (100), 301(10)	227(1), 243(3), 254(9), 255(52), 271 (100), 272(6)	199(16), 203(5), 215(18), 227(67), 229(9), 243 (100), 253(3)
56	9,82	Кемпферол ¹	C ₁₅ H ₉ O ₆ ⁻	285,04046	285,04022	0,85	151(71), 185(83), 213(72), 229 (100), 239(78), 255(80), 257(87)	107(17), 141(15), 145(17), 185 (100), 187(41), 201(93), 211(43)	142(91), 157 (100), 167(16)
57	9,82	Хербацетин 8-метил етер	C ₁₆ H ₁₁ O ₇ ⁻	315,05103	315,05089	0,43	181(1), 272(2), 287(1), 298(2), 300 (100), 301(10)	166(33), 202(23), 216(21), 255(59), 256(56), 271(23), 272 (100)	137(24), 138(7), 166(51), 215(5), 216(30), 243(13), 244 (100)

Табела 5 Наставак

Бр.	t_R , min	Једињење	Формула [M-H] ⁻	Израчуната маса, [M-H] ⁻	Нађена маса, [M-H] ⁻	Δ ppm	Фрагменти MS ²	Фрагменти MS ³	Фрагменти MS ⁴
58	10,01	Изорамнетин	C ₁₆ H ₁₁ O ₇ ⁻	315,05103	315,05092	0,33	300(100), 301(11)	151(100), 227(49), 228(21), 255(43), 271(96), 272(76), 283(33)	63(2), 65(2), 83(6), 107(100), 122(2)
59	10,32	Диметил кверцетин	C ₁₇ H ₁₃ O ₇ ⁻	329,06668	329,06650	0,52	314(100), 315(11)	271(3), 299(100)	165(2), 179(2), 183(1), 227(6), 243(5), 255(9), 271(100)
60	10,85	Рамнетин	C ₁₆ H ₁₁ O ₇ ⁻	315,05103	315,05081	0,69	165(100), 166(7), 193(33), 207(8), 256(7), 287(15), 300(44)	65(24), 89(3), 91(15), 97(53), 121(100), 147(6), 150(44)	67(3), 69(6), 89(28), 91(100), 93(20), 106(17)
61	11,97	Галангин ¹	C ₁₅ H ₉ O ₅ ⁻	269,04555	269,04486	2,55	169(53), 197(91), 198(50), 213(100), 223(55), 227(89), 241(51)	141(20), 143(36), 168(17), 169(95), 171(34), 185(100), 195(36)	100(2), 141(100), 143(54), 157(31), 158(4)
62	12,03	Кемпферид ¹	C ₁₆ H ₁₁ O ₆ ⁻	299,05611	299,05597	0,47	165(6), 240(1), 271(5), 284(100), 285(10)	150(17), 151(100), 164(24), 227(17), 228(22), 240(15), 255(20)	63(3), 65(3), 83(12), 107(100), 122(5)
Флаволи									
63	6,15	Лутеолин 6-С-глукозид ¹	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁ ⁻	447,09329	447,09291	0,84	327(100), 328(11), 329(2), 357(33), 358(6), 429(8), 430(2)	255(2), 283(1), 284(6), 297(1), 299(100), 300(7), 309(2)	175(48), 199(34), 213(66), 240(43), 255(100), 257(38), 271(47)
64	6,31	Лутеолин 8-С-глукозид ¹	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁ ⁻	447,09329	447,09177	3,38	327(100), 328(6), 357(35), 358(3), 369(5), 393(3)	133(2), 175(2), 191(3), 255(3), 284(17), 299(100), 300(3)	165(35), 175(41), 199(35), 213(61), 240(43), 255(100), 257(37)
65	6,65	Апигенин 8-С-хексозид (витексин) ¹	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₀ ⁻	431,09837	431,09723	2,64	311(100), 312(11), 341(15), 342(3), 413(2)	283(100), 284(3)	163(34), 183(47), 196(17), 197(17), 211(29), 224(50), 239(100)
66	7,56	Лутеолин 7-О-глукозид ¹	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁ ⁻	447,09329	447,09255	1,64	285(100), 286(8)	151(35), 175(90), 199(85), 217(71), 241(100), 243(60), 257(29)	185(36), 197(96), 198(100), 199(59), 212(12), 213(55), 226(14)

Табела 5 Наставак.

Бр.	t_R , min	Једињење	Формула [M-H] ⁻	Израчуната маса, [M-H] ⁻	Нађена маса, [M-H] ⁻	Δ ppm	Фрагменти MS ²	Фрагменти MS ³	Фрагменти MS ⁴
67	8,79	Лутеолин ¹	C ₁₅ H ₉ O ₆ ⁻	285,04046	285,03970	2,68	151(39), 175(92), 199(86), 201(25), 217(78), 241 (100), 243(60)	185(15), 197 (100), 198(78), 199(80), 212(13), 213(58), 226(12)	66(9), 151(6), 152(16), 155(13), 169 (100), 179(15), 182(15)
68	9,65	Апигенин ¹	C ₁₅ H ₉ O ₅ ⁻	269,04555	269,04480	2,79	149(8), 151(5), 201(6), 207(5), 225 (100), 226(15), 227(3)	169(2), 181(13), 183(5), 196(2), 197(3), 207 (100)	н.д.
69	10,14	Хрисоериол ¹	C ₁₆ H ₁₁ O ₆ ⁻	299,05611	299,05609	0,07	284 (100), 285(13)	227(8), 255 (100), 256(10)	167(5), 183(4), 187(8), 211(92), 213(10), 227 (100), 237(4)
70	10,59	Генкванин ¹	C ₁₆ H ₁₁ O ₅ ⁻	283,06120	283,06111	0,32	211(17), 237(3), 239(82), 240(31), 241(5), 268 (100), 269(16)	211(17), 239 (100), 240(30)	167(1), 195(73), 211 (100), 239(4)
71	11,22	Трицин	C ₁₇ H ₁₃ O ₇ ⁻	329,06668	329,06659	0,28	314(3), 314 (100), 315(11)	269(2), 271(7), 285(3), 299 (100)	227(2), 243(5), 255(4), 271 (100)
72	11,75	Хрисин ¹	C ₁₅ H ₉ O ₄ ⁻	253,05063	253,05056	0,30	165(13), 180(15), 181(18), 207(34), 209 (100), 210(13), 211(16)	139(7), 143(11), 153(12), 165(53), 167(16), 180(88), 181 (100)	139 (100), 152(10), 153(99), 156(6)
73	12,39	Акацетин ¹	C ₁₆ H ₁₁ O ₅ ⁻	283,06120	283,06116	0,11	239(1), 268 (100), 269(10)	211(11), 239 (100), 240(18)	195(62), 211 (100), 239(3)
Флаваноноли									
74	8,01	Аромодедрин	C ₁₅ O ₁₁ O ₆ ⁻	287,05611	287,05603	0,27	97(3), 125(2), 201(4), 243(13), 259 (100), 260(12), 269(5)	125(50), 151(18), 165(11), 172(14), 173(31), 215 (100), 241(20)	158(12), 171(3), 172(30), 173 (100), 197(8), 199(4), 200(16)
75	9,16	Пинобанксин 5-метил етер	C ₁₆ H ₁₃ O ₅ ⁻	285,07685	285,07666	0,66	229(5), 239(23), 241(4), 252(16), 253(5), 267 (100), 268(10)	223(5), 224(8), 239(3), 252 (100)	179(5), 180(12), 207(5), 208(70), 210(8), 223(25), 224 (100)
76	9,94	Пинобанксин	C ₁₅ H ₁₁ O ₅ ⁻	271,06120	271,06064	2,05	151(10), 197(18), 215(17), 225(28), 243(9), 253 (100), 254(15)	165(14), 181(27), 185(20), 197(91), 208(12), 209(61), 225 (100)	157(20), 171(1), 179(2), 181(27), 183(6), 197 (100), 199(1)

Табела 5 Наставак.

Бр.	t_R , min	Једињење	Формула [M-H] ⁻	Израчуната маса, [M-H] ⁻	Нађена маса, [M-H] ⁻	Δ ppm	Фрагменти MS ²	Фрагменти MS ³	Фрагменти MS ⁴
77	12,02	Пинобанксин 3-ацетат	C ₁₇ H ₁₃ O ₆ ⁻	313,07176	313,07169	0,24	253(100), 254(11), 271(13), 272(2)	143(9), 165(12), 180(16), 181(16), 185(10), 209(100), 211(13)	141(10), 143(12), 153(24), 165(80), 167(20), 180(96), 181(100)
78	12,92	Пинобанксин 3-пропаноат	C ₁₈ H ₁₅ O ₆ ⁻	327,08741	327,08705	1,12	183(1), 253(100), 254(11), 271(5), 272(1)	143(9), 165(14), 180(13), 181(17), 185(7), 209(100), 211(11)	65(3), 141(10), 153(10), 165(48), 167(14), 180(47), 181(100)
79	13,78	Пинобанксин 3-бутират	C ₁₉ H ₁₇ O ₆ ⁻	341,10306	341,10263	1,28	183(2), 253(100), 254(11), 271(2)	143(9), 165(10), 180(15), 181(18), 185(9), 209(100), 211(15)	141(5), 143(10), 153(11), 165(32), 167(13), 180(26), 181(100)
80	14,59	Пинобанксин 3-пентаноат	C ₂₀ H ₁₉ O ₆ ⁻	355,11871	355,11838	0,94	253(100), 254(10), 271(1), 291(11), 292(2), 309(4)	143(9), 165(11), 180(15), 181(18), 185(10), 209(100), 211(18)	141(10), 143(8), 153(25), 165(58), 167(18), 180(61), 181(100)
<i>Флаванони</i>									
81	11,87	Пиноцембрин ¹	C ₁₅ H ₁₁ O ₄ ⁻	255,06628	255,06512	4,55	145(11), 151(32), 169(9), 187(14), 211(34), 213(100), 214(11)	141(5), 145(18), 169(23), 171(3), 184(3), 185(100), 195(3)	108(9), 115(19), 117(16), 129(12), 141(87), 143(100), 157(18)

¹Идентификовани на основу доступног стандарда;
„н.д” - није детектовано.

Поред губитка хексозе, код гликозидних деривата се уочава губитак пентозе (-132 Da) [131], примећено за једињење бр. 50 (Табела 5), а могуће је и дихексозе (-324 Da) [131]. Уочен је и губитак рамносил дела (-146 Da) (за једињење бр. 51, 52) и рамноглукозида (-308 Da) (бр. 47, 49, 53) (Табела 5), што су такође пријавили и други аутори [132]. Друга група аутора је пријавила губитак рамносил-хексаурионида (-322 Da) [130], што је уочено за процијанидине (бр. 40 и 43) (Табела 5).

Међу идентификованим фенолним киселинама, доминирају циметне киселине, међу којима преовлађује број деривата кофеинске киселине. Депротоновани јон [М-Н]⁻ кофеинске киселине ([кофеинска киселина-Н]⁻) уочен је на m/z 179 (Табела 5). Његов фрагментни јон (уочен при MS^2 фрагментацији) на m/z 135 настао је губитком CO₂ групе (-44 Da), док је продукт јон MS^3 фрагментације добијен на m/z 107 губитком CO групе (-28 Da) [89]. Кофеинска киселина је присутна као естар везан за хининску киселину (једињење бр. 11, 15 и 26), затим као метилован дериват (једињење бр. 21, 23, 28) (Табела 5). Естерификација кофеинске и хининске киселине уочена је са депротонованим молекулским јоном на m/z 353 на позицијама 3-О- и 5-О-. Ова једињења су у MS/MS масеном хроматограму дала најинтезивнији јон на m/z 191 (што одговара делу хининске киселине), уз пратеће јоне који одговарају продукт јону [кофеинска киселина-Н]⁻ као и продукт јону [кофеинска киселина-Н-44]⁻ (m/z 179 и m/z 135, редом) (Табела 5). Добијен пут фрагментације кофеинске киселине и деривата се слаже са фрагментацијом приказаном у литератури [130]. Примећено је да кофеоил-хексозид даје сличан пут фрагментације. Почевши од молекулског јона на m/z 341 који у MS/MS масеном хроматограму, губитком хексозне групе (-162 Da) даје основни пик на m/z 179, при MS^3 фрагментацији губи CO₂ групу и даје пик на m/z 135, а при MS^4 фрагментацији губи CO групу и издваја пик на m/z 107 (Табела 5). Дериват пренил-кофеат (m/z 247) губитак резидуа [М-Н-пренил јон]⁻ показује на m/z 179, као и губитак CO₂ групе (-44 Da) продукт јона на m/z 135, што је у сагласности са механизмом фрагментације објављеном у литератури [54]. Сличан механизам показују изомери метил 5-О-кофеоилхината са депротонованим јоном на m/z 367. Добијају се пикови јона на m/z 179, m/z 161 и m/z 135 који су примећени и код осталих деривата кофеинске киселине (Табела 5). Добијени пикови јона депротонованих молекула се слажу са предложеним механизмом фрагментације кофеинске киселина и деривата објављеним у литератури [95,130].

Пут фрагментације ферулинске киселине и њених деривата показао је нешто другачији механизам фрагментације од осталих циметних киселина. Уочен је депротоновани јон ферулинске киселине на m/z 193, који је дао интезиван основни пик на m/z 147 настао губитком група са јединицом масе од -18 Da и -28 Da, што одговара продукт јону [ферулинска киселина-Н₂O-CO]⁻. Естар ферулинске и хининске киселине је елуиран на 5,62 min дајући депротонован јон 3-О-ферулоилхининске киселине на m/z 367 (Табела 5). Најинтезивнији фрагмент јон на m/z 193 управо одговара депротонованом јону ферулинске киселине. С друге стране, хексозид ферулоихининске киселине даје депротонован јон на m/z 529, што се подударно са поменутиим метил-дикофеоилхинатом (који је елуиран на 8,22 min) (Табела 5). Њихов MS/MS масени хроматограм у оба сучаја даје најинтезивнији јон на m/z 367, а MS^3 фрагментација даје сличне јоне различитих интезитета. Уочавају се јони m/z 161, m/z 135, заједнички за оба једињења, док разлику прави јон m/z 179, који је присутан само у деривату кофеинске киселине као јон [кофеинска киселина-Н]⁻ (Табела 5), што је у сагласности са наведеним резултатима за поменуто једињење (приказано у претходном поглављу). Такође, појављује се фрагментни јон на m/z 193 (у једињењу бр. 12) који је својствен и осталим дериватима ферулинске киселине (Табела 5).

У испитиваним узорцима, идентификовано је неколико класа флавоноида: флаван-3-оли, флавоноли, флавони, флаваноли, флаванони. Уочен је и значајан број гликозидних деривата, као и метил и ацетил деривата који преовлађују код флаванона. Режим рада

масеног спектрометра у негативном моду уз примењену технику *HESI* јонизације пружа додатне информације о структури молекулског јона $[M-H]^-$ непознатог једињења. Познато је да применом негативног мода, метил и метокси деривати флавоноида губе метил групу (-15 Da) [133], као што је примењено за једињење бр. 55, 57, 58, 59 (Табела 5). С друге стране, главни пут фрагментације полифенолних једињења је путем *retro Diels Alder (rDA)* рекације [134] при чему се добијају јони $[^{i,j}A]^-$ и $[^{i,j}B]^-$, где ознаке *i,j* означавају супституцију прстена А (А) и Б (В). Уочени $[^{1,3}A]^-$ фрагментациони јон на m/z 151 настао је након *rDA* реакције несупституисаних флавоноида [135], што је примењено код MS^2 фрагментације једињења бр. 54, 58, 67, 62, као и при MS^3 фрагментацији једињења бр. 47, 48, 50, 51, 53 (Табела 5).

Кверцетин је идентификован као депротонан молекулски јон на m/z 301. У масеном хроматограму се уочава његов основни пик на m/z 179, као и поменути *rDA* фрагмент јон на m/z 151 (Табела 5). Даљи пут фрагментације даје јон $[^{1,3}A-CO]^-$ што је у сагласности са објављеним подацима о кверцетину [135]. Дериват кверцетин 3-метил етар показује губитак метил групе и даје интезиван јон на m/z 300, поред присутних јона на m/z 301 и m/z 179 (Табела 5). Слично показују и једињења рамнетин и изорамнетин са својим депротонаним молекулским јоном на m/z 315. Међутим, између ова два деривата уочава се разлика при MS^2 фрагментацији (Табела 5) која од рамнетина (кверцетин 7-метил етар) издваја најинтезивнији јон на m/z 165, а у случају изорамнетина (3-метил кверцетин), због разлике у положају метил групе, издваја фрагмент јон $[^{1,3}A]^-$ на m/z 151 [54]. Фрагментни јони на m/z 300 и m/z 301 појављују се код свих осталих деривата кверцетина (Табела 5), што је у сагласности са објављеним подацима [132]. Код кверцетин 3-*O*-галактозида (хиперозид) који је елуиран на 6,77 min уочен је губитак хексозе (-162 Da) (Табела 5), а добијени фрагмент јон одговара депротонаном кверцетин јону, карактеристичном за гликозид кверцетина [91]. Кверцетин 3-*O*-(6"-рамносил)-глукозид (рутин) и кемпферол 7-*O*-(6"-рамносил)-хексозид показују присуство фрагментног јона $[M-H-308]^-$ (Табела 5), што одговара губитку рамносил-хексозида (-308 Da) [132]. Рутин се састоји од агликонског дела кверцетина и дисахарида рутинозе и претпоставља се да се синтетише 3-*O* гликолизацијом кверцетина која је праћена рамносилацијом изокверцитрина (тј. кверцетин 3-*O*-глукозида) како су нагласили други аутори [45,73]. Узимајући у обзир механизам фрагментације рутина уочава се да је губитак групе -308 Da (при MS^2 фрагментацији) једнак губитку шећера хексозе (-162 Da) и рамносил дела (-146 Da) (Табела 5). Такође, добијени фрагментни јони рутина првенствено кореспондирају са карактеристичним фрагментним јонима кверцетин 3-*O*-галактозида, издвајајући исте најинтезивније фрагментне јоне при MS^2 , MS^3 и MS^4 фрагментацији, тј. m/z 301, m/z 179 и m/z 151, редом (Табела 5).

Флавоноиди као што је кемпферол (m/z 285) и кемпферид (m/z 299) поред *rDA* фрагмент јона на m/z 151 дају и јоне m/z 284, m/z 228 [133]. Слично је и са лутеолин 7-*O*-глукозидом, који даје *rDA* фрагмент јон, али и интезиван пик на m/z 285 настао губитком хексозе (-162 Da) [131]. Посматрајући фрагментацију апигенина и лутеолина који имају депротонан молекулски јон на m/z 269 и m/z 285, редом, такође се уочава *rDA* фрагмент јон $[^{1,3}A]^-$ на m/z 151 (Табела 5). Разлика може бити условљена присуством две ОН групе код лутеолина, наспрам једне ОН групе код апигенина [135].

Поред флавоноид 3-*O*-гликозида, који губитком шећерне групе дају основни пик агликона у MS/MS масеном хроматограму, у узорцима су идентификована једињења са уоченом *C*-гликолизацијом (Табела 5). Гликолизовани флавоноиди добијени су применом високе енергије колизионе ћелије на већ депротонан молекул на m/z 447 [91]. Флавоноид 3-*C*-гликозиди, имају карактеристичне механизме фрагментације настале серијом депротонаних јона $[M-H-18]^-$, $[M-H-60]^-$, $[M-H-120]^-$, $[M-H-180]^-$, $[M-H-210]^-$ [136]. Идентификована једињења лутеолин-*C*-глукозида показују губитак -120 Da, дајући карактеристичан основни пик на m/z 327 (Табела 5).

Пинобанксин (једињење елуирано на 9,94 min) даје депротонван молекулски јон на m/z 271. Уочава се фрагмент јон је на m/z 253 који одговра губитку H_2O (-18 Da) и фрагмент јон $[^{13}A]^-$ на m/z 151 (Табела 5). Деривати пинобанксина, једињења бр. 77, 78, 79 и 80 (пинобанксин 3 -ацетат, -пропаноат, -бутират и -пентаноат) идентификовани су са различитим депротонваним молекулским јоном, али са истим инетезивним пиком $[M-ацил\ група-H_2O]^-$ на m/z 253 и јоном $[M-ацил\ група]^-$ на m/z 271 у MS/MS масеном хроматограму, као и осталим фрагмент јонима добијеним при MS^3 и MS^4 фрагментацији (Табела 5), као што је описано у литератури [54].

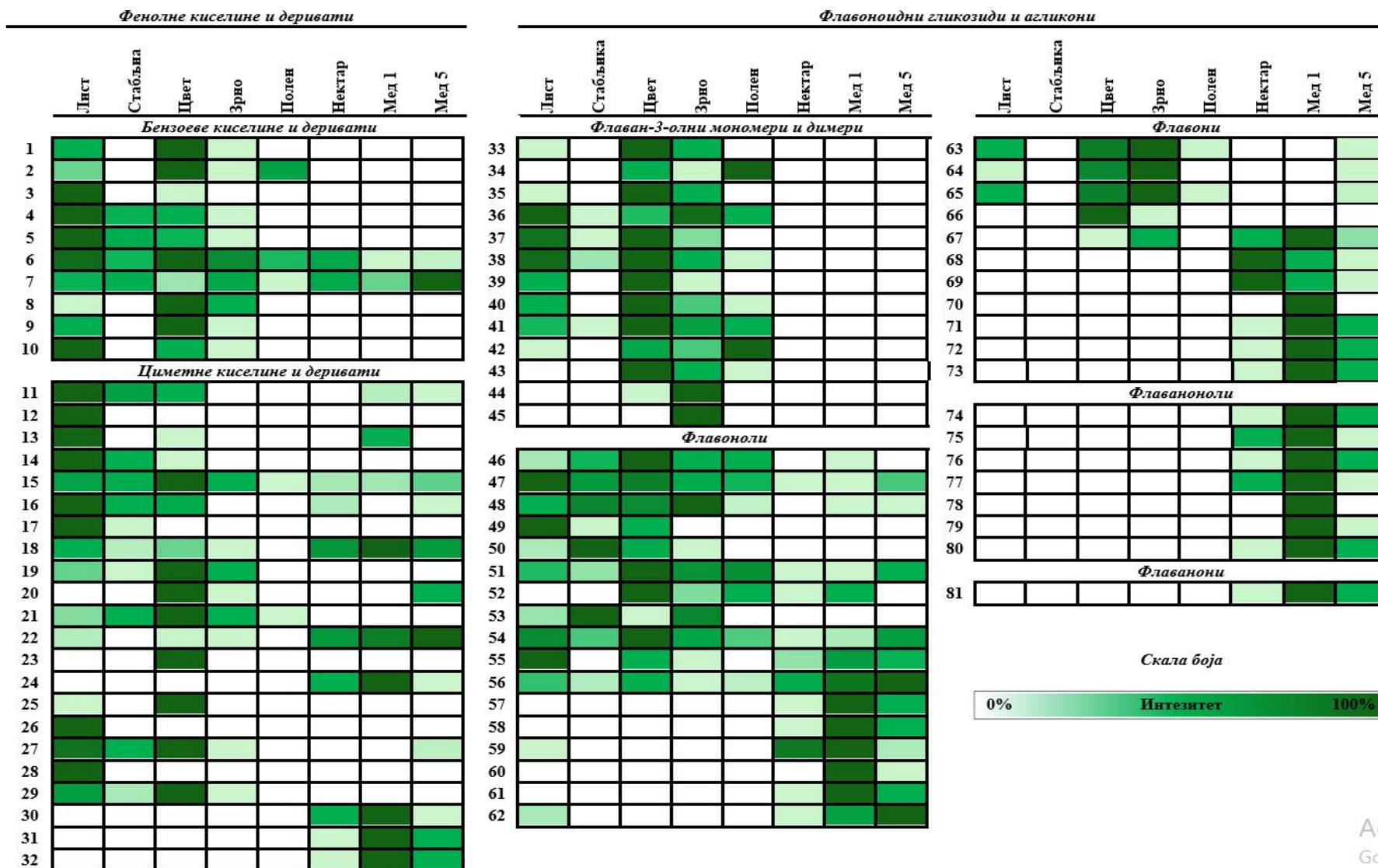
Идентификовани флаван-3-оли обухватају мономерне, димерне јединице катехина и епикатехина, епигалокатехинске јединице и олигомерне флаван-3-оле проантоцијанидине (Табела 5). Идентификован депротонван молекулски јон катехина и епикатехина је пронађен на m/z 289 (Табела 5). Изомери Б (B) типа процијанидин димера са депротонваним јонима на m/z 577, дају интезивне фрагмент јоне на m/z 425, као и пратеће јоне на m/z 289, m/z 407, m/z 271 (Табела 5), што се слаже са механизмом фрагментације коју су објавили Олшлегер (Ölschläger) и сарадници [39] за процијанидин B2 (B2) (епикатехин-(4-8)-епикатехин) и процијанидин B5 (B5) (епикатехин-(4-6)-епикатехин). Ова група аутора је нагласила и да се процијанидини са интерфлаванолским везама -(4-6)- касније елуирају од оних са -(4-8)- везама [39]. У узорцима је идентификован молекулски јон епикатехин галата на m/z 441 и диметил Б (B) типа процијанидин димер галата на m/z 757 (Табела 5), што је такође у сагласности са објављеним подацима [37].

4.1.2. Полифенолни профил хељде

Анализом масених спектра одређени су интетитети добијених сигнала идентификованих полифенола. Заступљеност 81 идентификованог полифенолног једињења представљена је скалом боја (Слика 7) која је дефинисана интетитетом добијеног пика полифенола (на систему *UHPLC-LTQ Orbitrap MS*) за сваки од осам анализираних узорка (лист, стабљика, цвет, зрно, полен, нектар, мед M1 и мед M5).

Са Сlike 7 се може приметити да је већи број идентификованих фенолних киселина и флаван-3-ола пронађено у листу, стабљници, цвету и зрну хељде, док је у меду хељде (M1, M5), заједно са нектаром хељде, број флавоноида био већи. Према броју идентификованих фенолних једињења, анализирани узорци могу бити распоређени на следећи начин: цвет хељде (52 једињења) > лист (50) > зрно (45) > пољски хељдин мед (41) > српски хељдин мед (40) > нектар (33) > стабљика (27) > полен (21). На основу резултата полифенолног профила узорака, уочава се сличност међу хељдиним надземним деловима (листа, стабљике, цвета и зрна хељде) с једне стране, и сличност меда и нектара хељде с друге стране.

У анализираним узорцима хељде примећује се да се флавоноли и гликозиди флавонола и флавона акумулирају у различитим деловима биљке, док флаволи и флаваноноли имају ограничену дистрибуцију (Слика 7). Синтеза фитохемикалија у биљци започиње фотосинтезом, која се првенствено одвија у листовима. Сходно томе, велики број полифенолних једињења је идентификован у листу хељде (50 једињења, Слика 7). Такође, поред великог броја шећера, садржај сахарозе се показао као највиши у узорку листа (Табела 8, накнадно описано у поглављу 4.3.1.), за чији се метаболизам везује стварање полифенола [137].



Слика 7 Учесталост полифенолних једињења у екстрактима узорака хељде и меда хељде (интензитет се односи на добијену површину пика сваког једињења по узорку).

Лутеолин је једињење које се у литератури сматра веома важним флавоноидом који има способност да позитивно утиче на хроничне болести код људи [138]. Лутеолин (бр. 67) је идентификован у анализираном узорку цвета, зрна, нектара и меда хељде, а није у листу (Слика 7). Супротно томе, Џедзич (*Dziedzic*) и сарадници [48] су поред присутности у екстракту цвета, пронашли лутеолин и у узорку листа хељде. На уочено одсуство лутеолина у анализираном листу хељде (Слика 7) може утицати његова тежња да се јавља као гликозид (најчешће везан за глукозу [138]). У прилог томе иде и присуство високог садржаја сахарозе у листу хељде (Табела 8, више о томе у поглављу 4.3.1.). Сахароза, која се разлаже на глукозу и фруктозу, утиче на акумулацију лутеолин гликозида и немогућност детекције лутеолина као агликона. Међутим, поред лутеолина, лутеолин 7-*O*-глукозид (бр. 66) такође није идентификован у листу хељде (Слика 7). Разлог томе се може наћи посматрајући пут фрагментације, на основу које се види да лутеолин 7-*O*-глукозид (на m/z 447) губи хексозу (-162 Da) при чему даје депротонован јон лутеолина (на m/z 285), а даља MS^3 и MS^4 фрагментација се слаже са механизмом фрагментације лутеолина (Табела 5).

Супротно томе, флавоноид *C*-гликозиди не губе везани шећер хексозу. Деривати лутеолин *C*-гликозида (бр. 63 и 64) су једињења који су показали другачији пут фрагментације од лутеолина и лутеолин 7-*O*-глукозида и они се акумулирају у листу (Слика 7). Ови деривати (бр. 63 и 64) дају основни пик на m/z 327 (Табела 5) губитком -120 Da. На основу различите колизионе енергије добијају се и различити поступци фрагментације. Па тако, губитком -120 Da, што одговара постепеном губитку неколико група $HC-OH$ у шећеру (тј. 4($HC-OH$)) добија се пик на m/z 327.

Иако се у листу, као почетном месту одвијања фотосинтезе, очекује акумулација највећег броја полифенолих једињења и њихових деривата, у цвету је идентификовано 52 једињења. Имајући у виду да цветање представља стрес за биљку, том приликом она метаболише велики број полифенолна једињења. Појави великог броја полифенола у цвету иде у прилог и дуг период цветања хељде које је сукцесивно и тиме се омогућава дуготрајна акумулација полифенолних једињења. Између осталог, и лучење нектара утиче на присуство одређених једињења у цветовима. У вези с тим треба истаћи резултате у литератури који се односе на више вредности садржаја флавоноида и антиоксидационе активности цветајућих делова хељде [24] са нагласком на позитиван здравствени ефекат флавоноида [41].

С обзиром да полифеноли утичу на разне биолошке функције у биљци, њихов транспорт кроз биљку је у сагласности са потребама сваког дела биљке. Полифенолна једињења имају важну улогу у многим биолошким процесима биљке [85]. На присуство полифенола у хељди утиче процес њиховог формирања, њихова стабилност, као и утицај околине [44,47]. С обзиром да се кроз стабљику путем ксилема одвија транспорт воде и минерала од корена ка осталим деловима биљке, за флоемски транспорт (које се одвија од листа ка другим деловима) битна је улога стабљике при повезивању листа са другим деловима биљке. Наиме, стабљика представља значајну карику приликом флоемског транспорта органских материја, које се притом не морају нужно задржавати, управо због активног ксилема. У прилог томе иду добијени резултати полифенолног профила анализираних узорка стабљике хељде, која се показала као најсиромашнија у броју идентификованих фенолних једињења. Углавном због малог броја идентификованих флаван-3-ола (четири од укупно 13 идентификованих) и без садржаја флавона (Слика 7), полифенолни профил стабљике се разликовао од осталих узорака. Ова једињења се могу депоновати на дну стабљике хељде, као што је предложено у литератури за једињења антоцијанина у хељди [139]. У прилог томе иде чињеница да приликом узорковања хељде за ову докторску дисертацију, нису узимани најнижи делови стабљике који су уз саму земљу, што може бити и узрок мањег броја полифенолних једињења у стабљници. Такође, појава малог броја полифенолних једињења у стабљници (Слика 7), као и ниске вредности *TPC* (Табела 7, о чему ће бити више речи у наредном поглављу 4.2.1.) би могле бити последица стварања алкалних реакција кроз

флоремске канале где фенолна једињења формирају реактивне хиноне [137]. Поред тога, ова запажања доприносе функционалности стабљике као битном сегменту приликом транспорта биљних секундарних метаболита.

Уочено је да су идентификовани флаван-3-оли присутни у различитим деловима хељде, док су потпуно одсутни у нектару хељде (Слика 7). Полифенолна једињења епикатехинских јединица, њихови галати и процијанидини су идентификована поређењем са стандардима, као и са објављеним подацима пута фрагментације [51]. Неки од идентификованих флаван-3-ола су, од стране других аутора, предложени као маркери или као доминантна једињења у узорцима хељде [35-40]. Такође, велики број аутора је потврдио присутност флаван-3-ола у узорцима хељде, као што су семе хељде [46,97], зрно [35], љуска [32], лист [48], мекиње од хељде [32], брашно од хељде [32,37,53].

У анализираним зрну хељде потврђено је присуство свих 13 идентификованих флаван-3-ола. Међутим, поредећи њихове интезитете, цвет хељде има већу заступљеност ове групе полифенола (Слика 7). Изузетак је уочен за једињење метил-Б (*B*) тип проделфинидин димер (бр. 36) чија је заступљеност била већа у листу (Слика 7). За флаван-3-оле је објављено да могу имати благотворни утицај на људе, јер, између осталог, имају бољи антиоксидациони капацитет од рутина [53] који је познат антиоксиданс. Њихово присуство у анализираним узорцима хељде, пре свега у зрну хељде, свакако доприноси већем значају хељде. (Епи)катехин као и већина процијанидини Б (*B*) типа су веома значајна једињења за хељду, као псеудожитарицу, јер до сада нису пронађени у житарицама попут јечма или спелте [35,36]. Присуство епикатехина (бр. 38) и (епи)катехин галата (бр. 41) је потврђено у свим анализираним деловима хељде (Слика 7), што је у сагласности са резултатима других аутора који су их пријавили као једињења карактеристична за хељду [35-39]. Катехин (бр. 35) није пронађен у стабљиви хељде (Слика 7) што је у сагласности са резултатима других аутора [47,48].

У анализираним узорцима примећује се акумулација већег броја процијанидина него мономерних флавонола (Табела 5). Сходно томе, значајно је истаћи да је у литератури објављено да процијанидини имају виши антиоксидациони капацитет од мономерних флавоноида [42]. Што се тиче заступљености флавонола по узорцима, уочава се већи интезитет ових једињења у цвету и листу, него у зрну хељде (Слика 7). Изузетак су Б (*B*) тип процијанидин димер галат (бр. 34) и метил-(епи)галокатехин галат (бр. 42) чији су интезитети доминантнији у полену (Слика 7). С обзиром да се наглашава утицај процијанидина из Б (*B*) групе на здравље људи, као и на њихов виши садржај у хељди него у житарицама (као што су јечам и спелта) [36], њихово присуство у анализираним узорцима доприноси значају хељде као функционалне хране, што су уочили и други аутори [32,48]. Потврђена присутност полифенола, углавном флавонола, слаже се са објављеним резултатима анализе хељде „Новосадске“ сорте и од стране друге групе аутора [46] који су додатно истакли висок антиоксидациони капацитет зрна хељде.

Познато је да хлорогене киселине предствљају групу естара насталих између хининске киселине и циметних киселина, најчешће кофеинске, *p*-кумаринске и ферулинске киселине [140]. Хлорогене киселине утичу на разне биолошке активности попут антиоксидационе, антиинфламаторне, антитуморне активности, као што је цитирано од стране Џејсвел (*Jaiswal*) и сарадника [95]. У анализираним узорцима истичу се деривати естра кофеинске и хининске киселине (Табела 5, Слика 7). Поједини деривати естара кофеинске киселине (бр. 23, бр. 26, бр. 28), ферулинске киселине (бр. 12 и 17), присутни су само у неким деловима хељде (најчешће у листу) (Слика 7). У узорцима хељде (од листа до зрна) пронађени су естри кумаринске киселине као што су 5-*O*-*p*-кумароилхининска киселина изомер 1 (бр. 19), затим деривати протокатехинске киселине (једињења бр. 4 и 5), као и изомер метил-елагинске

киселине (бр. 29), док је изомер метил 5-*O*-кофеоилхината (бр. 21) додатно присутан и у полену хељде (Слика 7).

У анализираним узорцима, гална киселина је идентификована у листу, цвету, зрну и полену, а њено одсуство у стабљници се слаже са резултатима Џедзич и сарадника [48]. Гална киселина је пронађена у хељди и од стране других аутора [32,35,97].

Кверцетин 3-*O*-пентозид је пронађен у различитим деловима хељде (попут листа, стабљике и корена) од стране других аутора [141]. У анализираним узорцима кверцетин 3-*O*-пентозид (једињење бр. 50) и кверцетин 3-*O*-(6"-*p*-кумароил)-хексозид (бр. 53) пронађен је само у деловима хељде листу, стабљници, цвету и зрну (Слика 7, Слика Д3 у Додатку).

Анализом полифенолног профила полена хељде уочава се девет идентификованих једињења (једињење бр. 2, 21, и флаван-3-оли бр. 34, 36, 38, 40, 41, 42, 43) која су присутна и у полену и у другим морфолошким деловима хељде (Слика 7), што је у сагласности са транспортом које се одвија кроз биљку. Полифеноли који су присутни у неком од надземних делова хељде и у нектару хељде, су детектовани и у меду хељде (Слика 7). То указује на сличност полифенолног профила нектара и меда. Према томе, полифенолни профил нектара хељде је детаљније описан кроз корелацију са медом хељде (у једном од наредних поглавља).

4.1.3. Корелација идентификованих полифенолних једињења хељде и меда хељде

На основу анализе узорка помоћу система *UHPLC-LTQ OrbiTrap MS*, пре свега уочава се седам полифенолних једињења (бр. 6, 7, 15, 47, 51, 54 и 56) која су идентификована у свим анализираним узорцима хељде (Слика 7).

Фенолне киселине заједничке за све узорке су протокатехинска киселина (једињење бр. 6), *p*-хидроксibenзојева киселина (бр. 7), 5-*O*-кофеоилхининска киселина (бр. 15). Ове фенолне киселине су од стране других аутора препознате као карактеристичне за хељду [97], а и мед хељде [56,65]. Идентификовани флавонол 3-*O*-гликозиди рутин (бр. 47), кверцитрин (бр. 51), и агликони кверцетин (бр. 54) и кемпферол (бр. 56) су такође пронађени у свим анализираним узорцима, почевши од листа хељде до меда хељде (Слика 7).

Кверцетин и његови деривати могу допринети позитивном ефекту код људи, који је заснован на антиоксидационим активностима ових једињења [35,45,46,50]. На основу добијених интезитета, рутин (једињење бр. 47, Слика 7) се показао као најзаступљени у листу, праћен узорком цвета, стабљике, зрна и полена, затим меда М5, а знатно мање у узорку нектара и меда М1 (Слика 7). Ово запажање се слаже са објављеним резултатима о доминантном садржају рутина у листу хељде [45] и у цвету хељде [24]. С друге стране, посматрајући добијене интезитете пикова, кверцетин (бр. 54) је најзаступљенији у цвету, затим листу, зрну, меду (М5), а онда и у осталим узорцима (Слика 7). Слично томе и кверцитрин (бр. 51) је најзаступљенији у цвету, затим у полену, зрну, меду и листу, и онда у осталим узорцима (Слика 7). Присутност кверцетина и рутина у различитим аеробним деловима хељде објавили су и Калинова (*Kalinova*) и сарадници [141], док је кверцитрин од стране друге групе аутора пронађен само у цветовима хељде [41]. Положај гликозилације свих идентификованих флавонол-гликозида (деривати кверцетина и кемпферола за које се сматра да су полен-нектар флавоноиди [100]) потврђен је присуством основног пика у *MS/MS* спектру који одговара маси агликона, као и великим интезитетом његовог радикал јона (m/z 300 за кверцетин и m/z 284 за кемпферол, Табела 5) [91]. Треба истаћи да агликони имају већу антиоксидациону активност од одговарајућих гликозида, али се приликом повезивања агликона са глукозом може побољшати биорасположивост једињења [42]. Посматрајући флавоноид-рамнозиде,

идентификовани кемпферол 3-*O*-рамнозид (бр. 52) се показао као најзаступљенији у цвету хељде, затим меду М1 и полену, а онда у зрну и нектару (Слика 7).

Порекло полифенола у меду потиче од нектара, полена, прополиса и од биљкака са којих је сакупљен нектар и полен. Подразумева се да полифенолна једињења доспевају у мед преко полена и нектара, али се не задржавају увек у истом облику. Транспорт полифенола је динамичан процес што доприноси промени структуре полифенола (губљење метил, ацил групе или формирање гликозида, естра). Такође, одсуство одређеног полифенола у тренутку узорковања не мора нужно значити да није синтетисан у анализираном делу хељде. Према томе, поред корелације полифенолних једињења између нектара и меда хељде, као и полена и меда хељде (о којима је детаљније написано у наредним поглављима), битна су једињења присутна у меду и различитим деловима биљке.

Сходно томе, од идентификованих полифенолних једињења издвајају се пет једињења (бр. 11, 13, 20, 27, 64) која су присутна у меду хељде и хељди, без њиховог присуства у нектару и полену хељде. С обзиром да су у питању и деривати фенолних киселина (бр. 11, 13, 20), за које је познато да се ретко срећу у биљкама у слободном облику [93], истиче се значајност њиховог детектовања у хељди.

Полифенолно једињење 3-*O*-кофеоилхининска киселина (бр. 11) и кофеоил хексозид (бр. 13) су присутни у надземним деловима хељде са највећим интезитетом у листу хељде, без присуства у зрну хељде (Слика 7). Присуство 3-*O*-кофеоилхининске киселине у хељди су потврдили и други аутори [46], који су истакли највишу концентрацију 3-*O*-, као и 5-*O*-кофеоилхининске киселине у семену хељде „Новосадске“ сорте, међу 11 других сорти. Затим, високе вредности 3-*O*-кофеоилхининске киселине квантификоване су у метанолском раствору екстракта цвета, листа, стабљике и корена хељде од стране друге групе аутора [48]. Посматрајући пут фрагментације деривата кофеинске киселине, 5-*O*-кофеоилхининске киселине и 3-*O*-кофеоилхининске киселине, уочава се да оба једињења дају јон на m/z 191 који одговара делу хининске киселине, као и исте карактеристичне фрагменте јоне при MS^3 фрагментацији (Табела 5). Разлика се уочава само при MS^4 фрагментацији, која за 3-*O*-кофеоилхининску киселину није детектована. Неки од деривата кофеинске киселине могу претходити једињењима која су накнадно идентификована у меду хељде. Тако је један од деривата кофеинске киселине (дикофеоилхининска киселина, једињење бр. 26) идентификован само у листу хељде (Слика 7), а у литератури је објављено да је пронађен и у меду хељде [54].

Једињења 5-*O*-пара-кумароилхининска киселина изомер 2 (бр. 20) и ферулинска киселина (бр. 27) су показала најинтезивнији пик у цвету хељде, али је њихов интезитет у меду био виши него у зрну (Слика 7). Идентификација ових једињења је важна ако се има у виду да се у радовима о хељди посебно издваја 3-*O*-кофеоилхининска киселина [46,48], као и ферулинска киселина [48,51,97].

Највећи интезитет ферулинске киселине (бр. 27) је примећен у цвету хељде, затим у листу, стабљници, меду (М5) и зрну (Слика 7). Од стране Гуо (*Guo*) и сарадника [97] је објављено да је ферулинска киселина истакнута фенолна киселина у хељди. Од стране једне групе аутора примећена је доминантна количина ферулинске киселине у корену хељде [48]. Такође, ова група аутора је квантификовала ферулинску киселину и у цвету и листу хељде, док у стабљници није детектована [48]. С друге стране, објављено је да су екстракти листа хељде поседовали највиши садржај ферулинске киселине међу осталим квантификованим полифенолним једињењима [51]. У две студије је, поредећи детектована полифенолна једињења екстракта хељде добијених коришћењем различитих растварача, показано присуство ферулинске киселине у воденим екстрактима хељде, док у екстрактима воденог раствора метанола [48] и етанола [35] ферулинска киселина није детектована.

4.1.3. а) Полифенолна једињења присутна у меду и полену хељде

Полен, иако има најмањи број идентификованих једињења (21 једињење), на основу анализе присутних једињења налази се између поменутих морфолошких делова биљке и пчелиње хране нектара, па и меда као продукта.

Од идентификованих једињења у узорцима издвајају се четири једињења (бр. 46, 48, 63, 65) која су присутна у меду, полену и још неком делу хељде без појављивања у нектару, а само једно једињење (бр. 52) је присутно у меду, полену, нектару и још неком делу хељде.

Мирицетин (бр. 46), познат као полен-нектар флавоноид [100] је, поред надземних органа хељде, идентификован у полену и меду хељде (Слика 7). Други аутори су такође идентификовали мирицетин у хељди [52,141], хељдином брашну (у везаном облику) [38] и меду хељде из Србије [54]. Међутим, треба узети у обзир да је мирицетин, поред мирцетин 3-метил етра и трицетина, предложен као хемијски маркер аутентичности меда од вреска (*Calluna vulgaris*) [57].

Иако се присуство гликозида у меду сматра као последица хидролизе агликона у присуству пчелињих ензима [56], њихово присуство је идентификовано и у узорцима хељде (Слика 7). Кверцетин 3-О галактозид (бр. 48) је присутан у надземним деловима хељде (најинтезивнији у зрну), полену хељде и меду хељде, а само у узорку нектара хељде није детектован (Слика 7). Интересантно је да су Инглет (*Inglett*) и сарадници [37], приликом анализе узорака хељдиног брашна као продукта хељде, пронашли изокверцитрин (кверцетин 3-О-глукозид) само у хељдином брашну добијеног од целог зрна, међу осталим анализираним узорцима брашна.

Поред поменутих О- глукозида, гликозидни флавоноиди као што су лутеолин 6-С-глукозид (бр. 63) и апигенин 8-С-хексозид (бр. 65) су поред полена и меда М5, пронађени у листу, цвету и зрну хељде (Слика 7). У литератури је присутност 6-С-и 8-С-флавоно гликозида потврђена у хељди и то у узорцима клица [142]. Апигенин 8-С-хексозид (бр. 65), присутан је у листу, цвету, зрну, полену и меду М5, са највећим интезитетом у зрну (Слика 7). Битно је истаћи да је ово једињење детектовано и у мекињама добијеним од целе хељде, у слободном и везаном облику [37], а није пронађено у јечму [35].

С обзиром да постоје студије које карактеришу хељду са идентификованим флаван-3-олима и проантоцијанидинима [35-40], веома је важно детектовати једињења која припадају овој групи. Истичу се једињења (епи)катехин (бр. 38), (епи)катехин галат (бр. 41), као и метил-(епи)галокатехин галат (бр. 42) који су потврђени у анализираном полену хељде (Слика 7). Иако ова једињења нису идентификована у анализираном меду хељде у овој докторској дисертацији (Слика 7), једна група аутора је детектовала епигалокатехин и епигалокатехин галат у меду хељде [143].

4.1.3. б) Полифенолна једињења присутна у меду и нектару хељде

Поред поменутих идентификованих једињења описаних у претходним поглављима, пронађен је већи број једињења која потврђују корелацију меда и нектара хељде. Идентификовано је седам једињења (бр. 16, 18, 22, 55, 59, 62, 67) која су присутна у меду хељде, нектару и неком од надземних органа хељде. Затим, пронађено је још 18 једињења (бр. 24, 30-32, 57, 58, 61, 68, 69, 71-77, 80, 81) која су заједничка само за мед хељде и нектар хељде. Такође, треба истаћи да ниједно једињење није идентификовано у нектару, а да није присутно

у меду хељде, што потврђује значајну корелацију меда и нектара хељде. У даљем тексту су описана једињења која су присутна у меду, а нису у полену хељде.

Лутеолин (бр. 67) је пронађен у узорцима меда и нектара, као и цвету и зрну хељде (Слика 7), а потврђено је његово присуство и у узорцима хељде анализираним од стране других аутора [48], што је описано у једном од претходних поглавља. Кемпферид (бр. 62) је идентификован у узорцима меда (M1, M5), нектару и листу хељде. Интезитет кемпфериде је већи у узорку листа него у нектару (Слика 7). Сасвим супротно, једна група аутора [49] није потврдила присутност кемпфериде у листу *Fagopyrum esculentum*, али јесте у лишћу хељде друге сорте, *Fagopyrum tataricum*. Слично кемпфериду, диметил кверцетин (бр. 59) пронађен је у меду и нектару, као и у листу хељде, али знатно мањег интезитета. Супротно томе, кверцетин 3-метил етар (бр. 55), иначе дефинисан као полен-нектар флавоноид [100], је показао највећи интезитет у листу хељде праћен медом, а затим цветом, нектаром и зрном (Слика 7). Мед хељде са биљком хељдом повезују још кофеинска киселина (бр. 18, није идентификована само у полену), *p*-кумаринска киселина (бр. 22, одсутна у полену и стабљници) и кумароил хексозид (бр. 16, који није пронађен у меду из Србије, полену и зрну) (Слика 7). Поред *p*-хидроксибензојеве киселине, идентификована *p*-кумаринска киселина је такође била предложена као маркер за ботаничко порекло меда хељде [56,65], а присуство ових фенолних киселина у меду хељде потврдили су и други аутори [57,66].

У групу полифенолних једињења који су присутни само у меду хељде и нектару хељде спадају циметна киселина (бр. 24), деривати кофеинске киселине као што је бензил кофеат (бр. 30), пренил кофеат (бр. 31), цинамил кофеат (бр. 32), и 14 идентификованих флавоноида (хербацетин 8-метил етар (бр. 57), изорамнетин (бр. 58), галангин (бр. 61), апигенин (бр. 68), хрисоериол (бр. 69), трицин (бр. 71), хрисин (бр. 72), акацетин (бр. 73), пиноцембрин (бр. 81) и већине флаванолола, као што је аромодедрин (бр. 74), пинобанксин (бр. 76) са дериватима пинобанксин 5-метил етар (бр. 75), пинобанксин 3 ацетат (бр. 77) и пинобанксин 3-пентаноат (бр. 80) (Слика 7). Идентификовани полифеноли су, осим једињења бр. 68 и бр. 69, показали највећи интезитет у меду из Србије (M1) (Слика 7). Акацетин (бр. 73) који повезује нектар и мед хељде, није пронађен у листу хељде што је у супротности са резултатима који су објавили Ли (*Li*) и сарадници [49]. Истовремено, акацетин је пронађен и у другим врстама меда као што је нпр. медљиковац [144].

4.1.4. Квантификована полифенолна једињења у меду хељде

С обзиром да је мед производ са преко 80 % шећера и преко 15 % воде, сасвим мали удео се односи на садржај полифенолних једињења и других фитохемикалија. Без обзира на њихов низак садржај, полифеноли су општеприхваћени као маркери ботаничког порекла меда [56,57,80,102-105]. Имајући у виду да сваки мед које пчеле произведу потиче од различитих медоносних биљака, од великог је значаја уочена корелација полифенолних једињења меда са одговарајућом биљком. Ослањајући се на претходно описане резултате полифенолних профила, значајно је упоредити квантификоване вредности полифенола у меду хељде са резултатима објављеним у литератури за мед хељде, као и биљку хељду. Сходно томе, квантификација ових полифенолних једињења може додатно допринети одређивању потенцијалних маркера ботаничког порекла меда хељде.

У испитиваним узорцима меда је помоћу *UHPLC-DAD MS/MS* система, квантификовано 9 фенолних киселина и 21 једињење које припада групи деривата флавоноида. Добијени резултати садржаја циљаних полифенолних једињења присутних у узорцима меда из Србије (M1-M4) и Пољске (M5, M6), као и њихове израчунате средње вредности и стандардне девијације, приказане су у Табели 6.

Табела 6 Квантификоване вредности 31 полифенолног једињења (mg/kg) у узорцима меда хељде из Србије (M1-M4) и Пољске (M5, M6).

Једињење	Србија					Пољска		
	M1	M2	M3	M4	$\bar{X} \pm SD$	M5	M6	$\bar{X} \pm SD$
Кверцетин	2,22	3,23	3,89	1,70	2,76 ± 0,99	26,40	2,96	14,68 ± 16,58
Кемпферол	0,59	0,73	0,71	0,29	0,58 ± 0,20	1,02	0,82	0,92 ± 0,14
Галангин	2,65	3,08	2,20	0,81	2,19 ± 0,98	0,59	0,37	0,48 ± 0,16
Кемпферид	0,08	0,09	0,03	н.д.	0,05 ± 0,04	0,18	0,10	0,14 ± 0,06
Апигенин	0,60	0,89	0,35	0,15	0,50 ± 0,32	0,21	0,19	0,20 ± 0,02
Хрисин	3,78	4,28	3,43	1,70	3,30 ± 1,12	0,79	0,72	0,76 ± 0,05
Акацетин	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	-	0,12	0,08	0,10 ± 0,03
Лутеолин	0,37	0,42	0,11	0,05	0,24 ± 0,19	0,04	0,07	0,06 ± 0,02
Генкванин	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	-	0,14	0,09	0,11 ± 0,03
Пиноцембрин	6,00	6,50	5,09	2,67	5,07 ± 1,70	1,17	0,88	1,02 ± 0,20
Нарингенин	0,12	0,14	0,08	0,04	0,10 ± 0,05	0,20	0,19	0,20 ± 0,01
Ериодиктол	н.д.	0,20	0,10	0,09	0,10 ± 0,08	н.д.	0,09	0,04 ± 0,06
Генистеин	0,22	0,31	н.д.	0,04	0,14 ± 0,15	н.д.	н.д.	-
Укупан садржај флавоноида агликона	16,62	19,88	16,00	7,54	15,01 ± 5,27	30,86	6,56	18,71 ± 17,18
<i>p</i> -хидроксибезоева киселина	3,84	3,99	7,40	2,79	4,51 ± 2,00	31,57	15,97	23,77 ± 11,04
Протокатехинска киселина	0,09	0,08	0,57	0,19	0,23 ± 0,23	н.д.	н.д.	-
Ванилинска киселина	1,42	1,48	0,96	0,43	1,07 ± 0,48	0,87	1,07	0,97 ± 0,14
<i>p</i> -хидроксифенилацетатна киселина	1,03	1,13	0,95	0,41	0,88 ± 0,32	2,76	0,90	1,83 ± 1,31
Кофеинска киселина	5,16	4,77	3,04	1,79	3,69 ± 1,57	1,62	1,48	1,55 ± 0,10
5- <i>O</i> -кофеоилхининска киселина	0,29	0,46	0,11	0,06	0,23 ± 0,18	0,41	0,13	0,29 ± 0,20
<i>p</i> -кумаринска киселина	2,64	2,69	4,03	1,92	2,82 ± 0,88	15,55	11,12	13,34 ± 3,13
Ферулинска киселина	3,73	3,94	2,51	1,38	2,89 ± 1,19	2,76	2,27	2,52 ± 0,35
Синапинска киселина	0	0	0,08	0,03	0,03 ± 0,04	0,06		0,03 ± 0,05
Укупан садржај фенолних киселина	18,21	18,54	19,66	9,01	16,36 ± 4,93	55,62	32,94	44,28 ± 16,03
Апигенин 7- <i>O</i> -глукозид	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	-	н.д.	н.д.	-
Апигенин 8- <i>C</i> -хексозид	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	-	0,08	н.д.	0,04 ± 0,06
Кампферол 7- <i>O</i> -глукозид	0,04	0,07	0,04	н.д.	0,04 ± 0,03	0,04	0,02	0,03 ± 0,01
Изорамнетин 3- <i>O</i> -глукозид	н.д.	0,03	0,02	н.д.	0,01 ± 0,02	н.д.	н.д.	-
Изорамнетин 3- <i>O</i> -рутинозид	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	-	0,02	н.д.	0,01 ± 0,02
Нарингин)	0,05	0,13	н.д.	н.д.	0,05 ± 0,06	0,06	н.д.	0,03 ± 0,04
Рутин	0,05	н.д.	н.д.	н.д.	0,01 ± 0,02	7,99	н.д.	3,99 ± 5,65
Кверцетин 3- <i>O</i> -галактозид	0,04	0,06	0,03	н.д.	0,03 ± 0,03	0,05	н.д.	0,03 ± 0,04
Кверцетин 3- <i>O</i> -рамнозид	0,09	0,15	0,18	0,05	0,12 ± 0,06	1,13	0,06	0,60 ± 0,75
Укупан садржај гликозида	0,28	0,46	0,28	0,05	0,27 ± 0,17	9,37	0,09	4,73 ± 6,56
Укупан садржај полифенолних једињења	35,11	38,87	35,93	16,60	31,63 ± 10,15	95,84	39,59	67,72 ± 39,78

н.д. – није детектовано; \bar{X} – средња вредност; SD – стандардна девијација; „-“ - није рађено.

Међу квантификованим полифенолима у меду хељде (Табела 6) највећу вредност имају управо она једињења која показују корелацију хељде и меда хељде (претходно описану у поглављу 4.1.). Истиче се садржај кверцетина и *p*-хидроксибензоеве киселине (претходно идентификоване у свим анализираним узорцима у овој докторској дисертацији), *p*-кумаринска киселина и кофеинска киселина (одсутне у полену хељде), хрисин, пиноцембрин и галангин (заједничка једињења за нектар и мед хељде), као и ферулинска киселина (Табела 6, Слика 7).

Најпре, међу квантификованим вредностима кверцетина и деривата, истиче се садржај кверцетина и рутина, док су вредности кверцетин 3-*O*-рамнозида биле ниже за два реда величине (Табела 6). Добијене вредности за кверцетин кретале су се од 1,70 до 26,40 mg/kg, што је у сагласности за квантификованим вредностима добијених за мед хељде од стране других аутора [55-58,63,67]. Ове квантификоване вредности кверцетина у меду хељде су такође сличне детектованом садржају у екстрактама хељде [51,141] и хељдином брашну [53]. Поређењем добијених вредности кверцетина у узорцима меда, уочавају се више вредности у меду из Пољске М5 (26,40 mg/kg).

Слично се уочава и за рутин, чији је садржај у узорку М5 износио 7,99 mg/kg (Табела 6). Вредност рутина у узорку М1 је била знатно нижа, 0,05 mg/kg (Табела 6), што се слаже са резултатима других аутора, чије су концентрације рутина у меду хељде износиле 0,04 mg/kg [54] и 0,225 mg/kg [63]. Може се приметити и да је рутин квантификован само у два узорка меда (М1 и М5). Одсуство рутина у неким узорцима меда и није неочекивано. Иако је у литератури рутин пронађен у великим количинама у различитим деловима хељде [30,46-48,97,141], и детектован у продуктима као што је хељдино брашно [37,38,53], његово одсуство у меду хељде је такође пријављено [12,56,98]. Узимајући у обзир утицај ензима на присуство рутина [45,73], као и добијен механизам фрагментације рутина (Табела 5), могућа је деградација рутина у меду (првенствено преко његове гликозидне јединице). Сходно томе, одсуство рутина се може приписати појачаној активности рутиназе у узорцима меда М2-М4 и М6.

Добијене вредности *p*-хидроксибензоеве киселине у испитиваном меду хељде (преко 3,84 mg/kg, Табела 6) су истог реда величине као њен садржај у хељдиним деловима објављеним од стране других аутора [48]. С друге стране, више концентрације *p*-хидроксибензоеве киселине у меду хељде су детектовали други аутори [56-58,65,66].

Концентрације *p*-кумаринске киселине у узорцима меда су сличне њеном садржају у меду хељде [55,56,64,65] и у различитим деловима хељде [48,51] испитиваним од стране других аутора. Посматрајући садржај *p*-хидроксибензоеве киселине и *p*-кумаринске киселине, уочава се њихов доминантан удео, првенствено за узорке меда из Пољске (Табела 6). Ово је веома важно, с обзиром да су други аутори управо *p*-хидроксибензоеву киселину и *p*-кумаринску киселину предложили као маркере меда хељде [56,65].

Доминантан садржај је уочен и за кофеинску киселину, чије су се добијене вредности кретале од 1,48 до 5,16 mg/kg, са средњом вредношћу од 2,62 mg/kg (Табела 6), што је више него што су пријавили други аутори [58,63-66]. Садржај кофеинске киселине у меду хељде (Табела 6) се показао као сличан објављеном садржају кофеинске киселине у зрну хељде [97].

Садржај протокатехинске киселине у меду хељде (0,08 – 1,57 mg/kg, Табела 6) је истог реда величине као код других аутора који су такође испитивали мед хељде [56,63,65,66], а мањи од вредности детектоване у биљци хељди [97]. Такође, протокатехинска киселина није детектована у меду хељде из Пољске (Табела 6).

Квантификоване вредности 5-*O*-кофеоилхининске киселине у меду хељде су за ред величине ниже од детектованог садржаја у биљци хељди различитих сорти [46]. Поред тога, у

литератури је објављена и квантификација хлорогене киселине (3-О-кофеоилхининске киселина) у узорцима хељде [48].

У анализираним узорцима меда из Србије, уочен је доминантан удео прополис-флавоноида (пиноцембрин, хрисин, галангин [100]). Израчунате средње вредности пиноцембрина и хрисина (3,04 mg/kg и 2,03 mg/kg редом, Табела 6) биле су више од вредности које су објавили други аутори који су такође анализирали мед од хељде [55,56,58]. Сличан опсег за поменуте флавоноиде показали су Јасика-Мисиак и сарадници [57] испитивајући мед хељде из Пољске. Што се тиче прополис-флавоноида галангина, квантификоване вредности у анализираним узорцима су сличне садржају галангина у узорцима пољског меда хељде испитиваног од стране других аутора [56,57].

Узимајући у обзир претходну описану корелацију меда и нектара, поред галангина, хрисина, пиноцембрина, квантификована су и друга полифенолна једињења карактеристична за мед и нектар (апигенин, акацетин, нарингенин, кемферид, лутеолин). Поред прополис-флавоноида, добијене вредности апигенина и лутеолина биле су више у узорцима из Србије (Табела 6). Квантификоване вредности лутеолина су истог реда величине као резултати добијени за мед хељде од стране других аутора [54,58].

Поред поменутих фенолних киселина ферулинска киселина се издваја као једињење битно за корелацију меда и хељде, без њеног присуства у нектару и полену (Слика 7). Квантификоване вредности (од 1,38 - 3,94 mg/kg, Табела 6) су истог реда величине као резултати објављени од стране других аутора који су испитивали мед хељде [56,66], као и зрно хељде [48]. Виши садржај ферулинске киселине у меду хељде су детектовали Јасика-Мисиак и сарадници (58,64 mg/kg) [57] и Ченг (*Cheng*) и сарадници (153,42 mg/kg) [66], док су различите групе аутора објавиле знатно нижи садржај [55,58,59,63]. Више концентрације ферулинске киселине су детектоване у екстрактима хељде од стране пољских научника [51]. Јасика-Мисиак и сарадници [57] су поред 3-хидроксибензојеве и розмаринске киселине, издвојили ферулинску киселину као потенцијални маркер ботаничког порекла меда хељде.

На основу квантификованих вредности полифенолних једињења, садржај укупних полифенолних једињења у узорцима меда је био у опсегу од 16,60 до 95,84 mg/kg (Табела 6). Доминантан удео имају фенолне киселине, затим агликони флавоноида, па онда њихови гликозиди. Сличан садржај збира фенолних киселина и флавоноида објавили су и други аутори [55,56], док је садржај групе флавоноида који су они квантификовали био мањи (2,32 mg/kg и 2,14 mg/kg, редом) наспрам квантификованих вредности за амализирани српски мед (15,01 mg/kg) и за пољски мед (18,71 mg/kg) (Табела 6).

На основу идентификације и квантификације полифенола у узорцима (коришћењем *UHPLC-LTQ OrbiTrap MS* и *UHPLC-DAD MS/MS* методе), добијен је детаљан полифенолни профил узорака са знатним бројем једињења који су, поред различитих надземних делова хељде, били присутни и у меду хељде. Међу идентификованим једињењима у испитиваним узорцима уочавају се флаван-3-оли који су раније окарактерисани као маркери хељде [35-40]. Међутим, ова група једињења је присутна само у надземним морфолошким деловима хељде и у полену, који, као што је објашњено у претходном поглављу, има знатно мањи допринос пореклу полифенола у меду.

На основу квантификације једињења заједничких за све анализиране узорке, издвајају се *p*-хидроксибензојева киселина и кверцетин. Разлог томе су значајне квантификоване вредности ових једињења у узорцима меда, као и њихова усаглашеност са резултатима у хељди објављена [48,51,141]. Међу једињењима која су заједничка за мед, нектар и надземне делове хељде издвајају се *p*-кумаринска киселина и кофеинска киселина. Према ранијим истраживањима, *p*-хидроксибензојева киселина и *p*-кумаринска киселина су предложене као

маркери ботаничког порекла меда хељде [56,65], а концентрације су упоредиве са онима детектованим у хељди [48,51]. За кофеинску киселину је карактеристично да су њени различити деривати препознати као значајни за хељду [46,48]. Такође, издваја се и ферулинска киселина, идентификована и у хељди у и меду, која је у литератури предложена као маркер ботаничког порекла меда хељде [57]. Значајно је и што су квантификоване вредности ферулинске киселине у анализираном меду хељде упоредиве са њеним објављеним садржајем детектованим у хељди [48].

Посматрајући резултате полифенолних једињења добијених коришћењем две методе (*UHPLC-LTQ OrbiTrap MS* и *UHPLC-DAD MS/MS*), уочава се неслагање резултата за четири полифенолна једињења. Одсуство полифенола анализираних методом *UHPLC-LTQ OrbiTrap MS* је примећено за генкванин (који није пронађен у пољском меду) и ферулинску киселину (која није потврђена у српском меду) (Слика 7) чије су вредности квантификоване у поменутих узорцима (Табела 6). С друге стране, анализа уз коришћење *UHPLC-DAD MS/MS* методе је показала да претходно идентификоване протокатехинска киселина (у пољском меду) и акацетин (у српском меду) (Слика 7), нису квантификоване (у пољском и српском меду, редом) (Табела 6). Разлог ових неусаглашености може бити последица различитих одговора ових једињења приликом коришћења поменутих метода. Наиме, Верду (*Verdu*) и сарадници [145] су слично уочили за друга једињења објашњавајући утицај ефекта матрикса за одређена једињења, упркос употреби високорезолутивне хроматографске технике као што је *UHPLC*. Такође је могуће да поменута једињења нису присутна у довољном садржају да би биле квантификоване *UHPLC-DAD MS/MS* методом.

4.1.5. Порекло полифенола у меду хељде

Посматрајући присутност полифенолних једињења у анализираним узорцима, уочава се већа сличност полифенолних профила меда и нектара него меда и полена хељде. Ово је веома важно истаћи, јер је општеприхваћена метода процене ботаничког порекла меда управо поленска анализа. Узимајући у обзир велику варијабилност процента поленових зрна *Fagopyrum esculentum* у меду хељде објављеним у литератури (од 0,3 до 86 %, [56,59-62,65,66,77,79]), потребна је примена додатних метода приликом процене ботаничког порекла меда хељде. Поред тога, поредећи полифенолне профиле анализираних меда хељде са релативно ниским садржајем поленових зрна *Fagopyrum esculentum* (4,05 % за мед М1) са медом са знатно вишим садржајем (40,83 % за мед М5) (Табела Д5 у Додатку), уочава се велика сличност (Слика 7). На основу ових резултата уочава се релативно слаб утицај *Fagopyrum* полена на садржај полифенолних једињења.

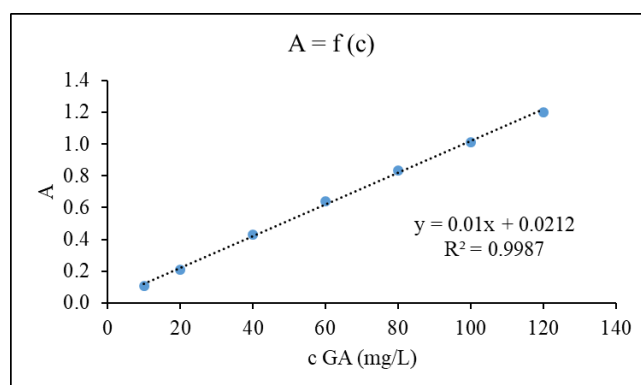
Нектар и полен нису једини извори флавоноида у меду. Порекло полифенола потиче и од прополиса, као што је објављено за хрисин, пиноцембрин, пинобанксин [103], као и галангин [100]. Сагласно томе, ова једињења су, поред меда хељде, идентификовани и у нектару хељде (Слика 7). Такође, предложено је да се деривати кофеинске киселине (од којих су неки такође, поред меда, пронађени и у нектару хељде (Слика 7) сматрају конституентима прополиса [103]. На основу добијених резултата полифенолног профила испитиваних узорака, као и поређењем са објављеним подацима [103], може се претпоставити да порекло полифенола у меду хељде потиче првенствено од нектара, затим од прополиса, а знатно мање од полена. У прилог томе иду и резултати добијени детаљном мелисопалинолошком анализом (Табела Д4 у Додатку), на основу којих мед хељде М1 и М5 садрже 80,4 % и 49,7 % поленових зрна врсте јасена (*Fraxinus americana/pensylvanica*, фамилија *Oleaceae*) која не лучи нектар.

4.2. Антиоксидациона активност испитиваних узорака

4.2.1. Садржај укупних фенола (TPC)

Спектрофотометријско одређивање садржаја укупних фенолних једињења применом колориметријске методе уз коришћење *Folin-Ciocalteu* реагенса је урађено по модификованим процедурама објављеним за узорке меда [146] и за узорке биљке [51].

Снимањем апсорбације у зависности од концентрације галне киселине добијена је калибрациона права ($A = f(c)$), која је са корелационим фактором (R^2) 0,9987 показала добру линеарност (Слика 8).



Слика 8 График зависности апсорбације (A) у функцији од концентрације галне киселине c_{GA} (mg/dm³) при одређивању TPC узорака.

Добијене вредности TPC (Табела 7) прате следећи редослед: цвет > лист > зрно > стабљика > пољски мед (средња вредност) > српски мед (средња вредност). Вредности TPC само за биљку су се кретале од 6,85 до 68,37 g GAE/kg, а за мед од 0,44 до 1,50 g GAE/kg (Табела 7).

Табела 7 Антиоксидациона активност изражена као TPC (g GAE/ kg) и RSA (изражене као mmol/ kg; и као %) у узорцима хељде и меда хељде.

Параметар	Хељда				Мед од хељде					
	Лист	Стабљика	Цвет	Зрно	M1	M2	M3	M4	M5	M6
TPC (g GAE/ kg)	52,63	6,85	68,37	12,99	0,63	0,72	0,57	0,44	1,50	0,71
RSA (mmol/ kg)	374,58	319,77	447,96	317,12	0,97	1,17	0,90	0,58	1,42	0,67
RSA (%)	28,92	24,94	34,25	24,74	7,72	8,78	7,39	5,85	10,25	6,43

Посматрајући добијене резултате антиоксидационе активности (Табела 7) уочавају се више TPC вредности за лист и цвет (52,63 и 68,37 g GAE/kg, редом), што је у сагласности са већим бројем идентификованих полифенолних једињења (Табела 5, размотрена у претходном поглављу 4.1.). С обзиром да процес сазревања биљке, цветања и лучења нектара, утиче на садржај укупних фенолних једињења, добијене вредности TPC нису изненађујуће. Вредности TPC листа и цвета хељде биле су више од 7, односно 9 пута веће, него у узорку стабљике хељде (Табела 7). Сходно томе, Зиелинска и сарадници [41] учили су да у листу и цвету хељде долази до повећања садржаја фенолних једињења, почевши од раног цветања до периода пуног

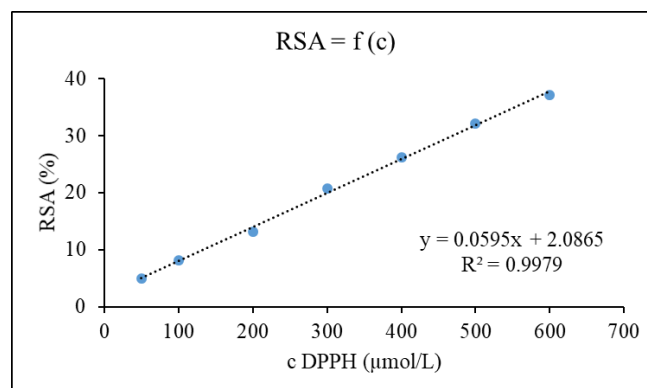
цветања и формирања семена, док се у стабљници тај садржај смањивао. Такође, резултати виших вредности антиоксидационог капацитета и садржаја флавоноида пронађени у цветајућим деловима хељде објављени су и од стране Стојилковске и сарадника [24]. Ниже *TPC* вредности у стабљници хељде (6,85 g *GAE/kg*) могу бити последица узорковања виших делова стабљике хељде, јер је показано да се флаваноли депонују при дну стабљике [139]. Поред тога, треба истаћи да су процијанидини (деривати флаван-3-ола) показали виши антиоксидациони капацитет од мономерних флавоноида [42], па мањи број идентификованих процијанидина (Табела 5) може пре условити ниже вредности *TPC*. Добијене вредности *TPC* за делове биљке биле су истог реда величине као и резултати објављени од других аутора, тј. за цвет хељде [52], лист и семе [68], љуске и мекиње од хељде [32]. Ниже вредности *TPC* су забележене за љуску хељде [63], хељдино брашно [35,37,53], док су више вредности објављене од стране Гуа и сарадника [97] за узорке хељде *Fagopyrum tataricum*, која је позната као супериорнија (по садржају полифенола) од *Fagopyrum esculentum*.

Посматрајући узорке меда од хељде, примећује се да је пољски меда М5 показао од два до три пута више вредности *TPC* у односу на остале узорке меда. Додатно, добијена висока *TPC* вредност (за М5) се слаже са објављеним вредностима *TPC* од стране других аутора који су такође испитивали мед хељде из Пољске [57,59], Кине [58,65] или Јапана [66].

4.2.2. Релативна антиоксидациона активност (RSA)

Релативна антиоксидациона активност је изражена преко стандардне спектрофотометријске методе инхибиције *DPPH* радикала (*DPPH•*). Процедура припрема узорка хељде (лист, стабљика, цвет, семе) за одређивања *RSA* је била у сагласности са процедуром коју су објавили Инглет и сарадници [37], док су узорци меда хељде припремљени по процедури описаној у литератури [33,89].

Након снимања апсорбанције припремљених калибрационих раствора израчунате су вредности *RSA* и добијена је једначина калибрационе праве са корелационим фактором (R^2) 0,998. Са графика ($RSA = f(c)$, Слика 9) се може уочити добра линеарност процента инхибиције *DPPH* радикала (*RSA*) према концентрацији.



Слика 9 График зависности релативне антиоксидационе активности *RSA* (%) у функцији од концентрације *DPPH* (mg/dm^3) при одређивању *RSA* узорка.

Добијене експерименталне вредности *RSA* екстракта узорка су биле у опсегу од 317,12 до 447,96 mmol/kg за узорке хељде, и од 0,58 до 1,42 mmol/kg за узорке меда хељде (Табела 7). Највећу *RSA* вредност има цвет хељде, затим и лист, што је у складу са добијеним вредностима *TPC*. У прилог томе иде и већи број идентификованих хидрокси-циметних киселина у овим узорцима. Оне се издвајају јер постојање резонантног ефекта конјуговане двоструке везе у

бочном лансу ових једињења утиче на бољу стабилност њиховог радикала. Супротно томе, због присуства карбоксилне групе на прстену хидроксидно-бензојевих киселина, долази до тежег отпуштања водониковог атома из хидроксила група и тиме до мање стабилности, а последично, и мање антиоксидационе активности [147].

Добијен редослед *RSA* вредности (цвет > лист > зрно) је у сагласности са запажањима других аутора [41,68]. Зиелинска и сарадници [41] су објавили ниже *RSA* вредности делова хељде, анализираним у различитим периодима (период раног цветања, пуног цвета, као и период стварања зрна). С обзиром да су код хељде уочене велике разлике између периода узорковања [41], додатно треба узети у обзир и дуготрајно цветање хељде, као и њено преклапање са процесом формирања зрна. Стога је тешко утврдити тачан тренутак бербе који ће бити у складу са запажањима других аутора. Слична поређења делова биљке и стабљике уочено је и за друге врсте из фамилије *Polygonaceae* која су објавили Федуреаев (*Feduraev*) и сарадници [137]. Исти ред величине *RSA* вредности забележен је од стране других аутора за узорке цвета хељде [52], брашна од хељде [37], као и узорка хељде врсте *Fagopyrum tataricum* [97].

Посматрајући добијене вредности *RSA* за узорке меда од хељде, уочава се следећи распоред: $M5 < M2 < M1 < M3 < M4 < M6$. Високу вредност *RSA* у узорку $M5$ (Табела 7) може се приписати вишем садржају *p*-хидроксидно-бензојеве и *p*-кумаринске киселине (Табела 5). Нижа *RSA* вредност узорка $M2$ (Табела 7) је могућа и због одсуства ферулинске киселине (на супрот идентификацији у узорку $M5$, Табела 5). Наиме, положај метокси групе ферулинске киселине у *ortho* положају знатно утиче на пораст антиоксидационе активности, која показује супериорност у односу на *p*-кумаринску киселину, слично као ванилинска киселина у односу на *p*-хидроксидно-бензојеву киселину [148]. У прилог томе иде и редослед *RSA* вредности, који показује да након узорка $M2$ следи узорак $M1$, у коме је квантификован виши садржај ванилинске киселине у односу на друге узорке меда. Разлог више антиоксидационе активности је управо због присуства донорске групе у *ortho* положају, тј. хидроксила група која стабилизује фенокси радикал [148]. Сходно томе, узорак меда $M3$ има вишу *RSA* вредност од узорка $M4$ који има мању вредност синапинске киселине. Супротно томе, квантификација рутина није забележена у узорцима меда $M2$, $M3$, $M4$, $M6$, а управо узорак $M2$ је показао највишу вредност антиоксидационе активности (*TPC* и *RSA*) после узорка $M5$. Иако су кверцетин, рутин, и други деривати познати антиоксиданси, утицај других једињења као и појава синергизама, не треба да буду искључени приликом анализе антиоксидационог капацитета.

4.2.3. Анализа антиоксидационе активности

Поредећи резултате антиоксидационе активности (вредности *TPC* и *RSA*) анализираних узорака хељде приказаних у Табели 7, примећује се да су морфолошки делови хељде (лист, стабљика, цвет, зрно) показали више вредности до два реда величине него што је добијено за мед од хељде (спрског $M1$ - $M4$ и пољског меда $M5$, $M6$). Добијени резултат за Пеарсонов (*Pearson*) коефицијент за узорке хељде ($0,95$, $p < 0,05$, Табела Д6 у Додатку) указује на добру линеарну корелацију између активности инхибиције *DPPH* радикала и спектрофотометријски одређеног садржаја фенолних једињења. Добру корелацију су такође показали и други аутори [32] анализирајући хељду. Слично се уочава за узорке меда, који су показали нешто мању корелацију $0,81$ ($p < 0,05$). Ово је било у складу са запажањима других аутора [55,59,65], која указују да су фенолна једињења претежно допринела антиоксидативној активности меда [65]. Додатно, одређен Пеарсонов (*Pearson*) коефицијент за све анализирани узорке хељде износио је $0,83$ ($p < 0,05$, Табела Д6 у Додатку). Супротно већој разлици у броју идентификованих полифенола (претходно поглавље, Табела 5) и разлике међу резултатима *TPC*, вредности *RSA* су се показале као мање променљиве.

Узимајући у обзир састав меда, ови резултати нису изненађујући. Више вредности антиоксидационе активности (*TPC* и *RSA*) хељде су очекивани, јер су ипак биљке главни извор секундарних метаболита, полифенолних једињења, који се сматрају важним антиоксидансима. Поред мање антиоксидационе активности, у узорцима меда је уочен мањи број фенолних киселина. Такође, израженије присуство флавонола у различитим деловима хељде, због незасићеног Б (*B*) прстена додатно доприноси вишем антиоксидационом капацитету биљке.

Хељда је позната по садржају одређених полифенола (као што је рутин, кверцетин) који се сматрају јаким антиоксидансима [35,45,46,50]. У прилог томе иду и вредности интезитета кверцетина који има редослед цвет > лист > зрно > стабљика, што се слаже са редоследом добијених вредности *TPC* и *RSA*. Међутим, другачији редоследи интезитета су уочени за деривате кверцетина као што је хиперозид (зрно > стабљика > цвет > лист), кверцетин 3-*O*-рамнозид (цвет > зрно > лист > стабљика), кверцетин 3-*O*-пентозид (стабљика > цвет > лист > зрно), и рутин (лист > цвет > стабљика > зрно). Појава највиших вредности антиоксидационе активности (*TPC* и *RSA*) у узорку цвета је у сагласности са идентификованим већим бројем полифенолних једињења, као и добијеним вишим интезитетима полифенола. Разлог томе може бити повезан са периодом узорковања. Лучење нектара је најчешће период када биљке акумулирају највишу концентрацију фитохемикалија. Поред биолошке зрелости биљака, технолошка зрелост биљака је разлог њихове специфичније употребе. За велики број лековитих биљака управо је период лучења нектара знак њихове технолошке зрелости. Сам процес цветања и лучења нектара је стрес за биљку, који за последицу има синтезу полифенолних једињења која служе као антиоксиданси. На основу добијених резултата *TPC* и *RSA* (Табела 7), као и на потврђеном присуству великог броја идентификованих полифенолних једињења, антиоксидациони потенцијал анализираних узорака хељде се слаже са објављеним резултатима [46] и додатно наглашава значај хељде (њених делова и производа) као функционалне хране.

На основу литературних података, антиоксидациона активност меда је забележена као довољно изражена да допринесе разним позитивним биолошким активностима [35,36,41,45,46,50,53,95,138]. На вредност антиоксидационе активности (вредности *TPC* и *RSA*) утичу присутни полифеноли који испољавају синергистичко деловање међу собом, као и са другим присутним фитохемикалијама. На биолошку активност полифенолних једињења, а и на антиоксидациону активност, утичу и пептиди, органске киселине, ензими, Маилардови (*Maillard*) производи реакције, чије комбиноване активности и интеракције могу додатно изразити антиоксидациони капацитет [149]. Поред поменутих утицаја на антиоксидациону активност меда, битно је истаћи и утицај биљке хељде која има значајан допринос.

4.3. Физичкохемијски параметри одређени у испитиваним узорцима

4.3.1. Хроматографско одређивање шећера

Припрема стандардних раствора и узорака за анализу шећера, као и услови снимања на систему *HPLC/PAD* (објашњени у Експерименталном делу) су одређени на основу објављених процедура анализе шећера за узорке меда [33,89,90] и за узорке биљке [118,126]. У Табели 8. приказане су квантификоване вредности 21 шећера (пет моносахарида, седам дисахарида, четири трисахарида и пет шећерних алкохола), од којих је девет једињења квантификовано у меду. Пример једног од добијених хроматограма за анализираних шећере, као и расподела шећера по узорцима дати су у Додатку (Слика Д5, Д6 у Додатку).

4.3.1.a) Шећерни профил хељде

Концентрација укупних шећера у екстракту листа, стабљике, цвета и зрна хељде се кретала од 706,13 до 811,21 g/kg, док су екстракти полена и нектара хељде имали двоструко мање вредности (378,97 и 449,15 g/kg, редом) (Табела 8).

Највећи допринос овој разлици имају моносахариди, глукоза и фруктоза, чији је збир такође двоструко мањи у узорцима полена и нектара хељде. Поред глукозе и фруктозе, квантификовани су моносахариди ксилоза, арабиноза и рамноза, чије су вредности биле испод 0,07 g/kg. Вредности збира моносахарида прате редослед стабљика > зрно > цвет > лист (Табела 8, Слика Д6 у Додатку). Запажање да стабљика садржи највећу концентрацију моносахарида су запазили и други аутори [114]. Ова група аутора је напоменула да се нижи шећери акумулирају у стабљници пре периода потпуног отварања цветова [114], што се слаже са дуготрајним и сукцесивним цветањем испитиване хељде. У супротном, да је завршен период цветања и да је постигнуто потпуно сазревање зрна, главни шећери (глукоза, фруктоза и сахароза) би били складиштени у зрну у већим количинама, као што је примећено за плодове воћа [118].

Добијен однос Ф/Г у анализираним узорцима хељде је у опсегу од 1,08 (за лист) до 2,86 (за полен) (Табела 8). Од морфолошких делова хељде (лист, стабљика, цвет, зрно), стабљика је поседовала највећу концентрацију фруктозе (424,70 g/kg), а и највећи однос Ф/Г (1,69) (Табела 8). Сазревањем, сахароза се разлаже на глукозу и фруктозу чији однос треба да буде ~1. Релативно висок Ф/Г однос у зрну хељде (1,49) такође би могао ићи у прилог непотпуног сазревања зрна што је у складу са периодом узорковања испитиване хељде.

У листу је квантификован најнижи садржај моносахарида (Табела 8). Разлог нижег садржаја глукозе у листу него у другим деловима хељде, може бити и акумулација рутина [150], за коју је раније објављено да је доминантнија у листу него у осталим деловима хељде [41,45,47].

У листу је, насупрот садржају моносахарида, детектован највиши садржај дисахарида због присуства високе концентрације сахарозе (270,46 g/kg) (Табела 8). Поред листа, висок садржај дисахарида је пронађен и у нектару (111,84 g/kg) и полену хељде (148,70 g/kg) (Табела 8). Генерално је уочено да је сахароза у свим анализираним узорцима доминантан шећер из групе дисахарида (Табела 8). Сахароза као транспортни шећер одговоран за транслокацију материја кроз флоем [117], доприноси транспорту фитохемикалија до свих осталих делова биљке. Велику улогу сахарозе у транспорту шећера кроз флоем, од листа до других биљних органа, су описали Лемоине (*Lemoine*) и сарадници [115]. Према резултатим објављеним у њиховој студији, транспорт шећера се највећим делом ослања на контролисану расподелу сахарозе кроз биљне органе, праћене и другим шећерима попут рафинозе и шећерних алкохола [115]. Додатно, ова група научника је нагласила зависност доступности сахарозе од услова околине, што може резултирати повећању сахарозе у листу [115].

На знатно вишу концентрацију сахарозе у листу (преко 30 % од укупних шећера), као и низак однос Ф/Г (Табела 8), може утицати и стрес биљке [151]. Стрес изазван ниским температурама утиче на стварање веће количине сахарозе, као на пример код листа краставца [152], која с друге стране може допринети повећању толеранције биљака према оваквом типу стреса [117]. Узимајући у обзир познато узгајање хељде на већим надморским висинама, што је за „Новосадску“ сорту забележено од стране једне групе научника из Србије [78], као и локацију узорковања хељде (Слика 6), појава ниских температура је очекивана, па и могућност утицаја овог фактора.

Табела 8 Садржај шећера (g/kg) у хељдиним узорцима: листу, стабљивици, цвету, зрну, полену и нектару хељде, као и меду хељде (M1-M6).

Параметар	Хељда						Мед од хељде					
	Лист	Стабљика	Цвет	Зрно	Полен	Нектар	M1	M2	M3	M4	M5	M6
Глукоза	255,54	251,23	293,52	264,73	58,86	132,06	259,10	284,70	251,20	245,70	275,10	267,00
Фруктоза	274,87	424,70	359,85	394,01	168,17	204,09	373,90	372,60	390,30	386,10	396,10	393,90
Ксилоза	0,05	0,01	0,04	0,02	0,01	0,03	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.
Арабиноза	0,07	0,01	0,04	0,01	0,03	0,01	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.
Рамноза	0,02	0,01	0,03	0,01	0,03	0,01	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.
Сахароза	270,46	54,51	36,99	48,13	135,07	106,14	13,04	13,01	13,00	12,79	12,86	17,89
Малтоза	4,99	3,24	4,95	2,85	13,44	1,54	6,81	6,33	5,37	5,32	6,76	7,41
Изомалтоза	0,79	0,01	0,02	0,01	0,05	0,05	4,18	5,93	8,04	7,73	6,95	6,06
Трехалоza	0,03	0,02	1,12	0,03	0,03	3,97	1,23	1,51	1,86	1,82	0,78	0,79
Тураноза	0,01	< LOQ	0,01	< LOQ	0,02	0,02	7,21	9,08	9,98	9,48	9,26	9,58
Мелибиоза	0,27	0,01	0,04	0,03	0,04	0,05	2,52	2,13	2,64	2,47	3,53	3,59
Гентобиоза	0,01	0,01	0,03	0,01	0,05	0,06	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.
Мелезитоза	0,02	0,02	0,03	0,01	0,12	0,12	2,09	2,07	2,21	2,52	3,88	5,30
Рафиноза	0,05	0,02	0,02	0,01	0,07	0,07	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.
Малтотриоза	0,30	0,05	0,24	0,02	0,03	0,04	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.
Паноза	0,03	0,12	0,02	0,01	0,09	0,09	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.
Еритритол	2,51	4,73	7,15	18,61	0,36	0,43	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.
Глицерол	0,58	1,55	0,37	2,41	0,60	< LOQ	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.
Сорбитол	0,24	0,32	0,03	0,06	0,07	0,17	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.
Галактитол	< LOQ	0,39	< LOQ	0,01	1,83	0,01	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.
Манитол	0,37	1,18	1,63	0,01	< LOQ	0,19	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.
Однос фруктоза/глукоза	1,08	1,69	1,23	1,49	2,86	1,55	1,44	1,31	1,55	1,57	1,44	1,48
Укупан садржај моносахарида	530,55	675,97	653,48	658,78	227,10	336,19	632,90	657,20	641,60	631,80	671,30	660,90
Укупан садржај дисахарида	276,56	57,81	43,15	51,06	148,70	111,84	35,00	38,00	40,90	39,60	40,10	45,30
Укупан садржај трисахарида	0,40	0,20	0,31	0,05	0,31	0,32	2,09	2,07	2,21	2,52	3,88	5,30
Укупан садржај шећерних алкохола	3,70	8,16	9,19	21,11	2,86	0,80	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.
Укупан садржај шећера	811,21	742,14	706,13	731,00	378,97	449,15	670,00	697,30	684,60	673,90	715,30	711,60
Укупан садржај шећера у хељди и меду ($\bar{X} \pm SD$)	449,15 \pm 177,14						692,12 \pm 19,09					

„н.д.“ - Није детектовано, < LOQ < 0,01; \bar{X} – средња вредност, SD - стандардна девијација.

Имајући у виду да се синтеза полифенола већим делом одвија у листу биљке, на коју знатно утиче метаболизам сахарозе [137], добијене вредности иду у прилог чињеници да у листу започиње процес фотосинтезе. Међутим, не треба занемарити и остале делове хељде у којима се такође одиграва фотосинтеза и који могу допринети стварању примарних и секундарних метаболита.

Од осталих дисахарида, доминантан шећер је и димер глукозе, тј. малтоза (Табела 8), што је такође објављено за псеудожитарице и од стране других аутора [7]. Највиша концентрација малтозе је детектована у полену хељде (13,44 g/kg, Табела 8). У литератури је забележено да стрес биљке такође може утицати и на садржај малтозе, као и арабинозе, мелибиозе и галактотиола [118]. Супротно томе, Ву (*Wu*) и сарадници [153] су показали утицај третмана соли који је довео до опадања садржаја малтозе и манитола у листу јечма, док су вредности глукозе, рафинозе и туранозе биле у порасту.

Садржај збира шећерних алкохола представља 0,2 % (за узорак нектара) до 2,9 % (за узорак зрна хељде) од укупне количине детектованих шећера у анализираним узорцима. Шећерни алкохоли су повезани са резистенцијом биљке на абиотски стрес утицаја соли [115], што је и показанао на примеру јечма [153]. Од шећерних алкохола издваја се еритритол, чије концентрације прате редослед зрно хељде > цвет > стабљика > лист > нектар > полен (Табела 8). Имајући у виду да је еритритол не утиче на ниво шећера у крви, као и његову стабилност у срединима различитих рН вредности и температуре, он се користи за функционалне напитке [42]. Према томе, његова концентрације од 18,61 g/kg у зрну хељду (Табела 8) подстиче употребу овог дела хељде као функционалне хране. Поред еритритола, издваја се и глицерол који је познат градивни елемент липида [117]. Садржај глицерола доприноси збиру шећерних алкохола у зрну, знатно више него што је случај са осталим деловима хељде. Поред сахарозе, сорбитол и манитол се такође могу детектовати у флоему [115]. У листу и стабљници хељде су квантификоване, за један ред величине, више вредности сорбитола него у осталим узорцима (Табела 8). Додатно, добијени резултати више концентрације сорбитола у листу него у зрну, слажу се са резултатима Шен (*Shen*) и сарадника [154] који су то такође приметили испитивајући делове биљке крушке. Квантификован је виши садржај манитола у стабљници него што је у осталим деловима, који је даље праћен садржајем манитола у цвету хељде (Табела 8). Нижи садржај манитола у листу (Табела 8) је примећен и као последица утицаја стреса соли код листа јечма [153].

Највиши садржај трисахарида је детектован у листу хељде, а затим у нектару, цвету и полену (Табела 8). Разлог томе су више концентрације малтотриозе у листу и цвету, као и мелезитозе у нектару и полену (Табела 8). Зрно хељде, поред највишег садржаја шећерних алкохола, има знатно нижи садржај трисахарида него што је квантификовано у осталим узорцима (Табела 8). Рафиноза, која се сматра трисахаридом који учествује у флоемском транспорту [115], има релативно константан садржај у узорцима хељде (Табела 8).

Поређењем шећерног профила нектара и полена хељде, уочен је виши садржај збира шећера у нектару. У полену је квантификована виша концентрација малтозе, сахарозе и доминантан садржај галактитола (Табела 8). Такође, највећи однос Ф/Г (2,86) је добијен за узорак полена (Табела 8). Добијена вредност се слаже са објављеним резултатом Ф/Г односа за полен хељде (2,5433) која се показала као већа од вредности добијене за седам других врста полена [22]. Садржај шећера у нектару хељде (Табела 8) је истог реда величине као код нектара липе [155], с тим што су вредности детектованих шећера у липи виши. Такође, у нектару хељде није идентификована изомалтотриоза, али зато јесте пронађена мелибоза, и вредност трехалозе је виша.

У циљу статистичког испитивања варијабилности профила шећера међу анализираним узорцима хељде, примећења је анализа главних компоненти (*Principal Component Analysis, PCA*), чији су резултати приказани у Додатку (Слика Д7 у Додатку) [34]. Иако је обухваћен релативно мали број узорака, применом *PCA* је потврђено издвајање листа, као и постојање заједничких карактеристика шећерног профила нектара и полена (Слика Д7 у Додатку).

Шећерни профил хељде показује значајан садржај угљених хидрата у анализираним деловима биљке. Квантификоване вредности различитих шећера у узорцима хељде представљају додатни потенцијал хељде као функционалне хране, што је у литератури познато за псеудожитарице [13]. Сходно томе, добијене вредности збира укупних шећера у зрну хељде (731,00 g/kg) слажу се са резултатима које су објавили Худа (*Huda*) и сарадници [139] (72,9 g/100g). Поред тога, истиче се њихово наглашавање нутритивне вредности зрна хељде кад се пореде са зрневљем житарица (пшенице, пиринча, кукуруза) [139]. Шећери такође утичу и на садржај фенолних једињења у хељди (Слика 7), за које је познато да су чешће присутни у везаном облику, тј. најчешће конјуговани са шећерима [93].

Садржај шећера зависи од отпорности биљке на стрес [44,115,152,153], фенологије биљке [114] чиме су дефинисана места за накупљање шећера. Поред тога што је у стабљници хељде, поред највишег садржаја фруктозе (424,70 g/kg) и моносахарида (675,97 g/kg), квантификована и највиша концентрација сорбитола (0,32 g/kg), а и панозе (0,12 g/kg) (Табела 8), стабљику ипак треба посматрати као прелазни медијум транспорта материја. Штавише, као место где је изражен ксилемски транспорт на који знатно утиче адаптација биљке на водени потенцијал, стабљика утиче на различито распоређивање акумулираних компоненти (које укључују и сахарозу и сорбитол) [117]. Према томе, стабљика се првобитно треба сматрати као место где се шећери испоручују (након синтезе у листу) и даље транспортују [115]. Поред утицаја стреса соли који може проузроковати виши садржај фруктозе [44], као и глукозе [153], низак ниво калијума [154] може довести до опадања вредности садржаја сорбитола. С друге стране треба нагласити да висок садржај растворљивих шећера (глукозе, фруктозе и сахарозе) може смањити транспорт продуката фотосинтезе од листа до осталих органа хељде [151].

Физиологија биљке је праћена различитим процесима синтезе и акумулације материја у сваком биљном органу. Припрема за процес цветања, опрашивања или лучење нектара, оплодњу и производњу зрна захтева додатну енергију и сви ти процеси представљају стрес за биљку. На основу анализе шећерног профила различитих делова биљке, као и поређењем са литературом, показано је да, поред објављених утицаја околине на метаболизам шећера [44,115,152,153], шећерни профил кроз различите делове хељде варира. У складу с тим, наглашава се да разумевање утицаја стреса на флоемски транспорт код биљака ипак није у потпуности разјашњен [115].

4.3.1.6) Шећерни профил меда хељде

Садржај моносахарида је доминантан у узорцима меда од хељде (Табела 8, Слика Д6 у Додатку). Поред фруктозе и глукозе, узорци меда садрже и олигосахариде [156]. Детектован садржај збира укупних шећера у меду (од 670,00 до 715,30 g/kg) је нижи него што су објавили други аутори за мед хељде [56,64]. Ниже вредности укупних редукујућих шећера (глукозе, фруктозе, малтозе, изомалтозе, туранозе, мелибиозе) су такође ниже од резултата Попека и сарадника [69]. Међутим, резултати физичкохемијских параметара садржаја шећера (Табела 8) и вредности електричне проводљивости (описане у наредном поглављу, Табела Д7 у Додатку)

узорка меда од хељде улазе у опсег који су предложили Попек (*Popsek*) и сарадници [69] у циљу разликовања меда хељде. На основу њиховог модела класификације, који укључује три физичкохемијска параметра, мед хељде се може разликовати по вредностима електричне проводљивости $\leq 0,45 \mu\text{S}/\text{cm}$, садржаја сахарозе $\leq 3,105 \text{ g}/100\text{g}$ и садржаја редукујућих шећера $\leq 78,585 \text{ g}/100\text{g}$.

Такође треба истаћи да су резултати шећера, збира глукозе и фруктозе (преко $631,80 \text{ g}/\text{kg}$), као и вредности сахарозе (испод $17,89 \text{ g}/\text{kg}$) у сагласности са прописаним вредностима за нектарски мед (минимум $60 \text{ g}/100\text{g}$ и максимално $5 \text{ g}/100\text{g}$, респективно) [70].

4.3.1.в) Корелација шећерног профила хељде и меда хељде

Моносахариди, глукоза и фруктоза, су доминантни шећери у свим анализираним узорцима (Табела 8, Слика Д6 приказана у Додатку). Однос фруктозе и глукозе је у свим узорцима преко 1. С обзиром да фруктоза, супротно од глукозе, показује нижи гликемијски индекс, већи однос фруктоза/глукоза (Ф/Г) такође производи нижи гликемијски индекс екстракта [22]. У литератури је забележено да мед [22], а и хељдина крупица (направљена од љуске хељдиног зрна) [28] имају низак гликемијски индекс. Појава ниског гликемијског индекса производа од хељде повећава значај хељде у погледу функционалне хране. Поред тога што је у биљци хељди пронађено више моносахарида него у меду хељде, квантификоване су сличне концентрације збира моносахарида и у меду и у биљци (Табела 8, Слика Д6 у Додатку).

Сахароза се такође показала као доминантни шећер и у хељди и у меду, са већом концентрацијом и варијабилношћу у биљци (у опсегу од $36,99$ до $270,46 \text{ g}/\text{kg}$), док су вредности у меду хељде биле ниже и без уочљивијих разлика (од $12,79$ до $17,89 \text{ g}/\text{kg}$) (Табела 8, Слика Д6 у Додатку). Поред сахарозе, у свим узорцима су квантификовани и други дисахариди малтоза, измалтоза, трехалоза, тураноза, мелибиоза, а у хељди је детектован и шећер гентобиоза (Табела 8).

Приметна разлика између хељде и меда хељде је уочена код детекције шећерних алкохола. Узорци меда од хељде не садрже шећерне алкохоле, док је њихов садржај у хељди био и до $21,11 \text{ g}/\text{kg}$ (Табела 8). Разлика која се такође може уочити је у квантификацији трисахарида. Иако је у хељди детектован већи број трисахарида (мелезитоза, рафиноза, малтотриоза и паноза), њихова концентрација је за два реда величине виша у узорцима меда од хељде (где је детектована само мелезитоза) (Табела 8, Слика Д6 у Додатку). Детекција мелезитозе у меду од хељде је супротна резултатима других аутора који су испитивали мед хељде [56,64]. Мелезитоза је типичан шећер који синтетишу биљне ваши тзв. лисне уши, па се користи и за разликовање нектарског меда од медљиковца [80]. Међутим, мелезитоза је пронађена и у узорцима полифлорног меда, и то вишег садржаја него у медљиковцу [90]. Иако у знатно мањој концентрацији, мелезитоза је ипак детектована и у узорцима биљке хељде (Табела 8), са нагласком на вишем садржају у полену и нектару, које пчеле прикупљају.

4.3.2. Садржај воде у испитиваним узорцима

Израчунате вредности садржаја воде у анализираном листу, стабљици, цвету и зрну хељде су износиле 10,74, 10,40, 11,35 и 10,02 % (Табела Д7 у Додатку). С обзиром да је узорковање хељде било у периоду пуног цвета и лучења нектара, подрзумева се да процес сазревања зрна није био завршен. Наиме, време бербе зрна (како житарица, тако и псеудожитарица) условљено је најнижим садржајем воде у зрну, које такође утиче и на остале морфолошке делове биљке (листови се суше, стабљике губе своју еластичност, боју). Међутим, наизменично појављивање зрна хељде, поред нових пупољака, као и постојање неопрашених цветова, условљава и виши проток воде путем ксилема. Такође, добијене вредности садржаја воде зрна се могу упоредити са дозвољеним вредностима неких житарица (пшенице, ража, јечма) као и пиринча и сирка, које треба да буду у опсегу од 10-16 % [71].

Рефрактометријски одређен садржај воде у узорцима српског (М1-М5) и пољског меда (М5,М6) није показао значајне разлике. Резултати садржаја воде у узорцима меда (17,10, 17,03, 15,55, 15,50, 15,50, 15,55 %, редом) (Табела Д7 у Додатку) нису показали одступања од европских прописаних вредности за садржај воде меда доброг квалитета, који подразумева вредности испод 20 % [70]. Значајно је нагласити да садржај воде, као параметар квалитета меда, утиче и на физичкохемијска својства меда (вискозитет, кристализацију, однос глукозе и воде [157], самим тим и на процес ферментације меда приликом складиштења. С друге стране, садржај воде нема значајан утицај на карактеризацију различитих врста меда. Релативно низак садржај воде пријављен је и за друге врстае монофлоралног меда [69], као и за медљиковац и полифлорни мед [90].

4.3.3. Електрична проводљивост испитиваних узорка меда

Присуство органских киселина, пепела и минералних соли у меду доводи до појаве електричне проводљивости (к). Сматра се да стварање јона у 20 % раствору меда обезбеђује оптималну концентрацију и покретљивост јона одговорних за прводљивост струје кроз узорак меда.

Добијене вредности електричне проводљивости воденог раствора узорка српског (М1-М4) и пољског меда (М5, М6) су 0,411, 0,429, 0,348, 0,320, 0,279 и 0,212 mS/cm, редом (Табела Д7 у Додатку). Електрична проводљивост за узорке српског меда је између 0,320 и 0,429 mS/cm, што је слично резултатима за мед хељде објављеним од стране других аутора [62,69]. Добијене вредности за узорке пољског меда су занемарљиво ниже (0,212 и 0,279 mS/cm) (Табела Д7 у Додатку). Супротно томе, нешто више вредности (0,40–0,53 mS/cm) су пријављене за мед хељде из Пољске [61], као и за мед хељде из Кине (0,35–0,63 mS/cm) [65].

Узимајући у обзир велику варијабилности садржаја *Fagopyrum* полена у меду хељде (Табела 1), која је такође примећена и од стране других аутора [56,61,77], уочене разлике електричне проводљивости међу узорцима меда хељде ипак нису значајне.

5. Закључак

Проучавање полифенолног профила надземних делова хељде (листа, стабљика, цвета, зрна), затим полена и нектара, као и меда хељде, допринело је прецизнијој процени ботаничког порекла ретког монофлоралног меда хељде. Резултати антиоксидационе активности и физичкохемијских параметара дали су јаснију слику о транспорту фитохемикалија кроз биљку до меда, а самим тим и њихову различиту употребу у исхрани.

Резултати физичкохемијских параметара као што су садржај шећера, електрична проводљивост и садржај воде у испитиваним узорцима меда хељде били су у складу са прописаним вредностима за мед. Поређећи шећерни профил анализираних узорака меда хељде и биљке хељде издваја се присутност већег броја моносахарида (ксилозе, арабинозе и рамнозе), виши садржај сахарозе и присутност шећерних алкохола у хељди. С друге стране, у меду хељде је пронађен виши садржај трисахарида мелезитозе.

На основу почетне идеје ове докторске дисертације праћења транспорта полифенолних једињења од места започињања фотосинтезе до осталих делова биљке, пре свега, показана је сличност полифенолног профила листа и цвета хељде. Затим, уочена је корелација свих надземних делова хељде међусобно са акцентом на присуство мономерних и димерних јединица флаван-3-ола у њима. Добијена антиоксидациона активност узорака хељде (изражена преко *TPC* и *RSA*) пратила је резултате полифенолног профила испитиваних узорака. Показано је да је идентификација већег броја полифенола допринела вишој антиоксидационој активности узорака. Такође, полифенолна једињења који су у литератури позната као јаки антиоксиданси, углавном су идентификовани у сваком делу хељде.

На основу детаљног хроматографског проучавања полифенолног профила (коришћењем *UHPLC-LTQ Orbitrap MS* и *UHPLC-DAD MS/MS* методе) узорака хељде, може се издвојити протокатехинска киселина, *p*-хидроксибензојева киселина, 5-*O*-кофеоилхининска киселина, једињења која се у литератури означавају као карактеристична за хељду, а и за мед хељде. Такође, издвајају се и једињења кверцетин, рутин, кверцитрин и кемпферол, пронађени у свим анализираним узорцима хељде. Ферулинска киселина се истиче због добијене упоредиве концентрације у меду хељде са садржајем у хељди објављеним у литератури. Доминантни садржај је пронађен и за кофеинску киселину, као и за флавоноиде који потичу од прополиса, као што су хрисин, пиноцембрин и галангин, заједнички за мед и нектар хељде.

Поређењем полифенолних профила анализираних узорака, уочена је добра корелација полифенолних једињења хељде и меда хељде. Најпре, уочила се већа сличност полифенолног профила меда и нектара, него меда и полена хељде, која је послужила за процену ботаничког порекла ове врсте меда. Иако су узорци меда хељде показали знатну разлику у садржају поленових зрна *Fagopyrum esculentum* (од 4,05 % до 40,83 %) није уочена значајнија разлика полифенолног профила међу њима. Напротив, добијена је и добра корелација меда хељде са различитим садржајем *Fagopyrum* полена са осталим деловима биљке, првенствено нектаром хељде. Иако је поленска анализа општеприхваћена анализа за процену ботаничког порекла меда, добијени резултати показују одличну корелацију полифенола нектара и меда хељде без обзира на садржај *Fagopyrum* полена. Штавише, показано је да порекло полифенолних једињења у меду хељде потиче првенствено од нектара хељде, затим од прополиса, а знатно мање од полена хељде.

Резултати приказани у овој докторској дисертацији пружају веома важне додатне податке корисне приликом процене ботаничког порекла меда хељде. Поред тога, ово је такође веома важно и за случајеве других врста меда са ниским садржајем поленових зрна. Додатно, добијени резултати истичу хељду као функционалну храну што иде у прилог псеудожитарицама које су препознате као „зрна двадесет првог века“.

6. Литература

- [1] Pravilnik o novoj hrani. (2018). Službeni Glasnik Republike Srbije, 88/2018.
- [2] Iwatani, S., Yamamoto, N. (2019). Functional food products in Japan: A review. *Food Science and Human Wellness*, 8(2), 96-101.
- [3] Ashwell M. (2004). Concepts of functional food, Internation Life Science Institute Europe, *Nutrition & Food Science*, 34(1), 47-47.
- [4] Kapsak, W. R., Rahavi, E. B., Childs, N. M., White, C. (2011). Functional foods: consumer attitudes, perceptions, and behaviors in a growing market. *Journal of the American Dietetic Association*, 111(6), 806.
- [5] The State of Food Insecurity in the World. (2005). Food and Agriculture Organization (FAO), Rome.
- [6] Glamočlija, Đ., Glamočlija, M., Cvijanović, G. (2011). Heljda, Monografija, Poljoprivredni fakultet, Beograd.
- [7] Martínez-Villaluenga, C., Peñas, E., Hernández-Ledesma, B. (2020). Pseudocereal grains: Nutritional value, health benefits and current applications for the development of gluten-free foods. *Food and Chemical Toxicology*, 137, 111178.
- [8] Gimenez-Bastida, J. A., Zielinski, H. (2015). Buckwheat as a functional food and its effects on health. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(36), 7896-7913.
- [9] Górecka, D., Heś, M., Szymandera-Buszka, K., Dziedzic, K. (2009). Contents of selected bioactive components in buckwheat groats. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 8(2), 75-83.
- [10] Živković, A., Polak, T., Cigić, B., Požrl, T. (2021). Germinated Buckwheat: Effects of Dehulling on Phenolics Profile and Antioxidant Activity of Buckwheat Seeds. *Foods*, 10(4), 740.
- [11] Yucel, B., Topal, E., Kosoglu, M. (2017). Bee products as functional food, Chapter two. In: Superfood and Functional Food-An Overview of Their Processing and Utilization, Waisundara v., Shiomi N. IntechOpen.
- [12] Gheldof, N., Wang, X.H., Engeseth, N.J. (2002). Identification and quantification of antioxidant components of honeys from various floral sources. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(21), 5870-5877.
- [13] Zhu, F. (2020). Dietary fiber polysaccharides of amaranth, buckwheat and quinoa grains: A review of chemical structure, biological functions and food uses. *Carbohydrate Polymers*, 248, 116819.
- [14] Germ, M., Gaberščik, A. (2016). The effect of environmental factors on Buckwheat, Chapter twenty one, 273-281. In: Molecular breeding and nutritional aspects of buckwheat, Zhou M., Kreft I., Wieslander G. Academic Press.
- [15] Romanova, O.I., Fesenko, A.N., Fesenko, N.N., Fesenko, I.N., Koshkin, V.A. (2018). Buckwheat resources in the VIR (Russia) collection: the photoperiod response. In: Buckwheat germplasm in the world, 225-234, Academic Press.

- [16] Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistic database (FAOSTAT). Dostupno: <http://www.fao.org/faostat/en/#data>. Pristupljeno: 29.04.2021.
- [17] The World of Organic Agriculture, Statistics and Emerging Trends (2013), 252. Research Institute of Organic Agriculture & International Federation of Organic Agriculture Movements (FiBL & IFOAM).
- [18] Alekseyeva, E.S., Bureyko, A. L. (2000). Bee visitation, nectar productivity and pollen efficiency of common buckwheat. *Fagopyrum*, 17, 77-80.
- [19] Cawoy, V., Kinet, J.M., Jacquemart, A.L. (2008). Morphology of nectaries and biology of nectar production in the distylous species *Fagopyrum esculentum*. *Annals of botany*, 102(5), 675-684.
- [20] García-Robledo, C., Mora, F. (2007). Pollination biology and the impact of floral display, pollen donors, and distyly on seed production in *Arcytophyllum lavarum* (Rubiaceae). *Plant Biology*, 9(04), 453-461.
- [21] Somerville, D.C. (2001). Nutritional Value of Bee Collected Pollens. A Report for the Rural Industries Research and Development Corporation. *Rural Industries Research and Development Corporation*, Project No DAN-134A.
- [22] Kalaycıoğlu, Z., Kaygusuz, H., Döker, S., Kolaylı, S., Erim, F.B. (2017). Characterization of Turkish honeybee pollens by principal component analysis based on their individual organic acids, sugars, minerals, and antioxidant activities. *LWT-Food Science and Technology*, 84, 402-408.
- [23] Halbrech, B., Ledent, J.F (2004). Evolution of flowering and ripening within inflorescence of buckwheat plants, effect of reduction of sinks and seed setting of the two floral morphs. In: Proceedings of the 9th International Symposium on Buckwheat, 433-440, Prague.
- [24] Stojilkovski, K., Glavač, N.K., Kreft, S., Kreft, I. (2013). Fagopyrin and flavonoid contents in common, Tartary, and cymosum buckwheat. *Journal of Food Composition and Analysis*, 32(2), 126-130.
- [25] Zhao, J., Jiang, L., Tang, X., Peng, L., Li, X., Zhao, G., Zhong, L. (2018). Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the flower volatile oils of *Fagopyrum esculentum*, *Fagopyrum tataricum* and *Fagopyrum cymosum*. *Molecules*, 23(1), 182.
- [26] Kreft, M. (2016). Buckwheat phenolic metabolites in health and disease. *Nutrition Research Reviews*, 29(1), 30-39.
- [27] Krkošková, B., Mrazova, Z. (2005). Prophylactic components of buckwheat. *Food Research International*, 38(5), 561-568.
- [28] Rozanska, D., Mikos, K., Regulska-Ilow, B. (2020). Assessment of the glycemic index of groats available on the Polish food market. *Roczniki Państwowego Zakładu Higieny*, 71(1).
- [29] Skrabanja, V., Kreft, I. (1998). Resistant starch formation following autoclaving of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) groats. An in vitro study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(5), 2020-2023.
- [30] Suzuki, T., Noda, T., Morishita, T., Ishiguro, K., Otsuka, S., Brunori, A. (2020). Present status and future perspectives of breeding for buckwheat quality. *Breeding science*, 19018.

- [31] Verma, K.C. (2018). Biochemical constituents of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) collected from different geographical regions of Himachal Pradesh. *Molecular biology reports*, 45(6), 2681-2687.
- [32] Zhang, W., Zhu, Y., Liu, Q., Bao, J., Liu, Q. (2017). Identification and quantification of polyphenols in hull, bran and endosperm of common buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) seeds. *Journal of Functional Foods*, 38, 363-369.
- [33] Nešović, M., Gašić, U., Tosti, T., Horvacki, N., Šikoparija, B., Nedić, N., Blagojević, S., Ignjatović, Lj., Tešić, Ž. (2020). Polyphenol profile of buckwheat honey, nectar and pollen. *Royal Society Open Science*, 7(12), 201576.
- [34] Nešović, M., Gašić, U., Tosti, T., Horvacki, N., Nedić, N., Sredojević, M., Blagojević, S., Ignjatović, Lj., Tešić, Ž. (2021). Distribution of polyphenolic and sugar compounds in different buckwheat plant parts. *RSC Advances*, 11(42), 25816-25829.
- [35] Aleksenko, S.S. (2013). Antioxidant activity and phenolic compounds of buckwheat and barley by the data of spectrophotometry and HPLC. *Journal of Analytical Chemistry*, 68(5), 458-465.
- [36] Bittner, K., Rzeppa, S., Humpf, H.U. (2013). Distribution and quantification of flavan-3-ols and procyanidins with low degree of polymerization in nuts, cereals, and legumes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(38), 9148-9154.
- [37] Inglett, G.E., Chen, D., Berhow, M., Lee, S. (2011). Antioxidant activity of commercial buckwheat flours and their free and bound phenolic compositions. *Food Chemistry*, 125(3), 923-929.
- [38] Martín-García, B., Pasini, F., Verardo, V., Gómez-Caravaca, A.M., Marconi, E., Caboni, M.F. (2019). Distribution of free and bound phenolic compounds in buckwheat milling fractions. *Foods*, 8(12), 670.
- [39] Ölschläger, C., Regos, I., Zeller, F.J., Treutter, D. (2008). Identification of galloylated propelargonidins and procyanidins in buckwheat grain and quantification of rutin and flavanols from homostylous hybrids originating from *F. esculentum* × *F. homotropicum*. *Phytochemistry*, 69(6), 1389-1397.
- [40] Verardo, V., Gomez-Caravaca, A.M., Segura-Carretero, A., Caboni, M.F., Fernández-Gutiérrez, A. (2011). Development of a CE-ESI-microTOF-MS method for a rapid identification of phenolic compounds in buckwheat. *Electrophoresis*, 32(6-7), 669-673.
- [41] Zielińska, D., Turemko, M., Kwiatkowski, J., Zieliński, H. (2012). Evaluation of flavonoid contents and antioxidant capacity of the aerial parts of common and tartary buckwheat plants. *Molecules*, 17(8), 9668-9682.
- [42] Kumar, S., Pandey, A.K. (2013). Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *The Scientific World Journal*, 2013.
- [43] Zhang, Z.L., Zhou, M.L., Tang, Y., Li, F.L., Tang, Y. X., Shao, J.R., Xue, W.T., Wu, Y. M. (2012). Bioactive compounds in functional buckwheat food. *Food Research International*, 49(1), 389-395.
- [44] Ma, W., Kim, J. K., Jia, C., Yin, F., Kim, H.J., Akram, W., Hu, X., Li, X. (2019). Comparative transcriptome and metabolic profiling analysis of buckwheat (*Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn.) under salinity stress. *Metabolites*, 9(10), 225.

- [45] Suzuki, T., Morishita, T., Kim, S.J., Park, S.U., Woo, S.H., Noda, T., Takigawa, S. (2015). Physiological roles of rutin in the buckwheat plant. *Japan Agricultural Research Quarterly: JARQ*, 49(1), 37-43.
- [46] Kiprovski, B., Mikulic-Petkovsek, M., Slatnar, A., Veberic, R., Stampar, F., Malencic, D., Latkovic, D. (2015). Comparison of phenolic profiles and antioxidant properties of European *Fagopyrum esculentum* cultivars. *Food Chemistry*, 185, 41-47.
- [47] Kalinova, J., Triska, J., Vrchotova, N. (2006). Distribution of vitamin E, squalene, epicatechin, and rutin in common buckwheat plants (*Fagopyrum esculentum* Moench). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(15), 5330-5335.
- [48] Dziedzic, K., Górecka, D., Szwengiel, A., Sulewska, H., Kreft, I., Gujska, E., Walkowiak, J. (2018). The content of dietary fibre and polyphenols in morphological parts of buckwheat (*Fagopyrum tataricum*). *Plant Foods for Human Nutrition*, 73(1), 82-88.
- [49] Li, J., Yang, P., Yang, Q., Gong, X., Ma, H., Dang, K., Feng, B. (2019). Analysis of flavonoid metabolites in buckwheat leaves using UPLC-ESI-MS/MS. *Molecules*, 24(7), 1310.
- [50] Zhang, X.Y., Chen, J., Li, X.L., Yi, K., Ye, Y., Liu, G., Wang, S.F., Hu, H.L., Zou, L., Wang, Z. G. (2017). Dynamic changes in antioxidant activity and biochemical composition of tartary buckwheat leaves during *Aspergillus niger* fermentation. *Journal of Functional Foods*, 32, 375-381.
- [51] Dziadek, K., Kopeć, A., Piątkowska, E., Leszczyńska, T., Pisulewska, E., Witkowicz, R., Bystrowska, B., Francik, R. (2018). Identification of polyphenolic compounds and determination of antioxidant activity in extracts and infusions of buckwheat leaves. *European Food Research and Technology*, 244(2), 333-343.
- [52] Kraujalienė, V., Pukalskas, A., Venskutonis, P.R. (2017). Multi-stage recovery of phytochemicals from buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) flowers by supercritical fluid and pressurized liquid extraction methods. *Industrial Crops and Products*, 107, 271-280.
- [53] Quettier-Deleu, C., Gressier, B., Vasseur, J., Dine, T., Brunet, C., Luyckx, M., Cazin, M., Cazin, J.C., Bailleul, F., Trotin, F. (2000). Phenolic compounds and antioxidant activities of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) hulls and flour. *Journal of Ethnopharmacology*, 72(1-2), 35-42.
- [54] Kečkeš, S., Gašić, U., Veličković, T.Ć., Milojković-Opsenica, D., Natić, M., Tešić, Ž. (2013). The determination of phenolic profiles of Serbian unifloral honeys using ultra-high-performance liquid chromatography/high resolution accurate mass spectrometry. *Food Chemistry*, 138(1), 32-40.
- [55] Socha, R., Juszczak, L., Pietrzyk, S., Gałkowska, D., Fortuna, T., Witczak, T. (2011). Phenolic profile and antioxidant properties of Polish honeys. *International Journal of Food Science & Technology*, 46(3), 528-534.
- [56] Pasini, F., Gardini, S., Marcazzan, G.L., Caboni, M.F. (2013). Buckwheat honeys: screening of composition and properties. *Food Chemistry*, 141(3), 2802-2811.
- [57] Jasicka-Misiak, I., Poliwoda, A., Dereń, M., Kafarski, P. (2012). Phenolic compounds and abscisic acid as potential markers for the floral origin of two Polish unifloral honeys. *Food Chemistry*, 131(4), 1149-1156.

- [58] Shen, S., Wang, J., Chen, X., Liu, T., Zhuo, Q., Zhang, S.Q. (2019). Evaluation of cellular antioxidant components of honeys using UPLC-MS/MS and HPLC-FLD based on the quantitative composition-activity relationship. *Food Chemistry*, 293, 169-177.
- [59] Kuś, P.M., Congiu, F., Teper, D., Sroka, Z., Jerković, I., Tuberoso, C.I.G. (2014). Antioxidant activity, color characteristics, total phenol content and general HPLC fingerprints of six Polish unifloral honey types. *LWT-Food Science and Technology*, 55(1), 124-130.
- [60] Kuś, P. M., van Ruth, S. (2015). Discrimination of Polish unifloral honeys using overall PTR-MS and HPLC fingerprints combined with chemometrics. *LWT-Food Science and Technology*, 62(1), 69-75.
- [61] Semikw, P., Skowronek, W., Teper, D., Skubida, P. (2008). Changes occurring in honey during ripening under controlled conditions based on pollen analysis and electrical conductivity. *Journal Apicultural Science*, 52(2), 45-53.
- [62] Stanek, N., Jasicka-Misiak, I. (2018). HPTLC phenolic profiles as useful tools for the authentication of honey. *Food Analytical Methods*, 11(11), 2979-2989.
- [63] Wen, Y.Q., Zhang, J., Li, Y., Chen, L., Zhao, W., Zhou, J., Jin, Y. (2017). Characterization of Chinese unifloral honeys based on proline and phenolic content as markers of botanical origin, using multivariate analysis. *Molecules*, 22(5), 735.
- [64] Salonen, A., Virjamo, V., Tammela, P., Fauch, L., Julkunen-Tiitto, R. (2017). Screening bioactivity and bioactive constituents of Nordic unifloral honeys. *Food Chemistry*, 237, 214-224.
- [65] Zhou, J., Li, P., Cheng, N., Gao, H., Wang, B., Wei, Y., Cao, W. (2012). Protective effects of buckwheat honey on DNA damage induced by hydroxyl radicals. *Food and Chemical Toxicology*, 50(8), 2766-2773.
- [66] Cheng, N., Wang, Y., Cao, W. (2017). The protective effect of whole honey and phenolic extract on oxidative DNA damage in mice lymphocytes using comet assay. *Plant Foods for Human Nutrition*, 72(4), 388-395.
- [67] Deng, J., Liu, R., Lu, Q., Hao, P., Xu, A., Zhang, J., Tan, J. (2018). Biochemical properties, antibacterial and cellular antioxidant activities of buckwheat honey in comparison to manuka honey. *Food Chemistry*, 252, 243-249.
- [68] Holasova, M., Fiedlerova, V., Smrcinova, H., Orsak, M., Lachman, J., Vavreinova, S. (2002). Buckwheat-the source of antioxidant activity in functional foods. *Food Research International*, 35(2-3), 207-211.
- [69] Popek, S., Halagarda, M., Kurska, K. (2017). A new model to identify botanical origin of Polish honeys based on the physicochemical parameters and chemometric analysis. *LWT-Food Science and Technology*, 77, 482-487.
- [70] Council directive 2001/110/EC relating to honey. Official Journal of the European Communities, 2014, L164.
- [71] Pravilnik o kvalitetu meda i drugih proizvoda pčela. (2015). Službeni Glasnik Republike Srbije, 101/15.
- [72] White Jr J.W. (1978). Honey. *Advances in Food Research*, 24, 287-374.

- [73] Barber, G.A., Behrman, E.J. (1991). The synthesis and characterization of uridine 5'-(β -L-rhamnopyranosyl diphosphate) and its role in the enzymic synthesis of rutin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 288(1), 239-242.
- [74] Von Der Ohe, W., Oddo, L.P., Piana, M.L., Morlot, M., Martin, P. (2004). Harmonized methods of melissopalynology. *Apidologie*, 35(Suppl. 1), S18-S25.
- [75] Thrasyvoulou, A., Tananaki, C., Goras, G., Karazafiris, E., Dimou, M., Liolios, V., Kanelis, D., Gounari, S. (2018). Legislation of honey criteria and standards. *Journal of Apicultural Research*, 57(1), 88-96.
- [76] Anklam, E. (1998). A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey. *Food Chemistry*, 63(4), 549-562.
- [77] Bogdanov, S., Martin, P. (2002). Honey authenticity. *Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene*, 93(3), 232-254.
- [78] Popović, V., Sikora, V., Berenji, J., Filipović, V., Dolijanović, Ž., Ikanović, J., Dončić, D. (2014). Analysis of buckwheat production in the world and Serbia. *Economics of Agriculture*, 61(1).
- [79] Kortensniemi, M., Rosenvald, S., Laaksonen, O., Vanag, A., Ollikka, T., Vene, K., Yang, B. (2018). Sensory and chemical profiles of Finnish honeys of different botanical origins and consumer preferences. *Food Chemistry*, 246, 351-359.
- [80] Pita-Calvo, C., Vázquez, M. (2017). Differences between honeydew and blossom honeys: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 59, 79-87.
- [81] Borutinskaite, V., Treigyte, G., Čeksteryte, V., Kurtinaitiene, B., Navakauskiene, R. (2018). Proteomic identification and enzymatic activity of buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) honey based on different assays. *Journal of Food & Nutrition Research*, 57(1).
- [82] Guven, H., Arici, A., Simsek, O. (2019). Flavonoids in our foods: a short review. *Journal of Basic and Clinical Health Sciences*, 3(2), 96-106.
- [83] Cook, N.C., Samman, S. (1996). Flavonoids-chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 7(2), 66-76.
- [84] Robbins, R.J. (2003). Phenolic acids in foods: An overview of analytical methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(10), 2866-2887.
- [85] Palma-Tenango, M., Soto-Hernández, M., Aguirre-Hernández, E. (2017). Flavonoids in agriculture. In: *Flavonoids-From Biosynthesis to Human Health*, Justino, G.C. IntechOpen.
- [86] Harborne, J. B., Williams, C. A. (2000). Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 55(6), 481-504.
- [87] Matsui, K., Walker, A. R. (2020). Biosynthesis and regulation of flavonoids in buckwheat. *Breeding science*, 70(1), 74-84.
- [88] Haytowitz, D. B., Wu, X., Bhagwat, S. (2018). USDA Database for the Flavonoid Content of Selected Foods, Release 3.3. US Department of Agriculture, Agricultural Research Service.
- [89] Gašić, U., Kečkeš, S., Dabić, D., Trifković, J., Milojković-Opsenica, D., Natić, M., Tešić, Ž. (2014). Phenolic profile and antioxidant activity of Serbian polyfloral honeys. *Food Chemistry*, 145, 599-607

- [90] Nešović, M., Gašić, U., Tosti, T., Trifković, J., Baošić, R., Blagojević, S., Ignjatović, Lj., Tešić, Ž. (2020). Physicochemical analysis and phenolic profile of polyfloral and honeydew honey from Montenegro. *RSC Advances*, 10(5), 2462-2471.
- [91] Cuyckens, F., Claeys, M. (2005). Determination of the glycosylation site in flavonoid mono-*O*-glycosides by collision-induced dissociation of electrospray-generated deprotonated and sodiated molecules. *Journal of Mass Spectrometry*, 40(3), 364-372.
- [92] Manach, C., Hubert, J., Llorach, R., Scalbert, A. (2009). The complex links between dietary phytochemicals and human health deciphered by metabolomics. *Molecular nutrition & food research*, 53(10), 1303-1315.
- [93] Arceusz, A., Wesolowski, M., Konieczynski, P. (2013). Methods for extraction and determination of phenolic acids in medicinal plants: a review. *Natural Product Communications*, 8(12).
- [94] Clifford, M. N. (2000). Chlorogenic acids and other cinnamates—nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(7), 1033-1043.
- [95] Jaiswal, R., Kuhnert, N. (2011). How to identify and discriminate between the methyl quinates of chlorogenic acids by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, 46(3), 269-281.
- [96] Matsui, K., Eguchi, K., Tetsuka, T. (2008). A novel gene that diverts the anthocyanin biosynthetic pathway towards the production of proanthocyanidins in common buckwheat (*Fagopyrum esculentum*). *Breeding Science*, 58(2), 143-148.
- [97] Guo, X.D., Ma, Y.J., Parry, J., Gao, J.M., Yu, L.L., Wang, M. (2011). Phenolics content and antioxidant activity of tartary buckwheat from different locations. *Molecules*, 16(12), 9850-9867.
- [98] Kaškonienė, V., Maruška, A., Kornýšova, O., Charczun, N., Ligor, M., Buszewski, B. (2009). Quantitative and qualitative determination of phenolic compounds in honey. *Cheminé Technologija*, 52(3), 74-80.
- [99] Anklam, E. (1998). A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey. *Food Chemistry*, 63(4), 549-562.
- [100] Tomás-Barberán, F. A., Ferreres, F., García-Vignera, C., Tomás-Lorente, F. (1993). Flavonoids in honey of different geographical origin. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, 196(1), 38-44.
- [101] Gašić, U. M., Milojković-Opsenica, D. M., Tešić, Ž. L. (2017). Polyphenols as Possible Markers of Botanical Origin of Honey. *Journal of AOAC International*, 100(4).
- [102] Dimitrova, B., Gevrenova, R., Anklam, E. (2007). Analysis of phenolic acids in honeys of different floral origin by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. *Phytochemical Analysis*, 18(1), 24-32.
- [103] Tomás-Barberán, F.A., Martos, I., Ferreres, F., Radovic, B.S., Anklam, E. (2001). HPLC flavonoid profiles as markers for the botanical origin of European unifloral honeys. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81(5), 485-496.

- [104] Wang, J., Xue, X., Du, X., Cheng, N., Chen, L., Zhao, J., .Cao, W. (2014). Identification of acacia honey adulteration with rape honey using liquid chromatography–electrochemical detection and chemometrics. *Food Analytical Methods*, 7(10), 2003-2012.
- [105] Stephens, J.M., Schlothauer, R.C., Morris, B.D., Yang, D., Fearnley, L., Greenwood, D.R., Loomes, K.M. (2010). Phenolic compounds and methylglyoxal in some New Zealand manuka and kanuka honeys. *Food Chemistry*, 120(1), 78-86.
- [106] Jibril, F.I., Hilmi, A.B.M., Manivannan, L. (2019). Isolation and characterization of polyphenols in natural honey for the treatment of human diseases. *Bulletin of the National Research Centre*, 43(1), 1-9.
- [107] Yao, L.H., Jiang, Y.M., Shi, J., Tomas-Barberan, F.A., Datta, N., Singanusong, R., Chen, S.S. (2004). Flavonoids in food and their health benefits. *Plant Foods for Human Nutrition*, 59(3), 113-122.
- [108] Huang, D., Ou, B., Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 1841-1856.
- [109] Maisuthisakul, P., Suttajit, M., Pongsawatmanit, R. (2007). Assessment of phenolic content and free radical-scavenging capacity of some Thai indigenous plants. *Food Chemistry*, 100(4), 1409-1418.
- [110] Đorđević, T.M., Šiler-Marinković, S.S., Dimitrijević-Branković, S.I. (2010). Effect of fermentation on antioxidant properties of some cereals and pseudo cereals. *Food Chemistry*, 119(3), 957-963.
- [111] Nagai, T., Sakai, M., Inoue, R., Inoue, H., Suzuki, N. (2001). Antioxidative activities of some commercially honeys, royal jelly, and propolis. *Food Chemistry*, 75(2), 237-240.
- [112] Seraglio, S.K.T., Valesse, A.C., Daguer, H., Bergamo, G., Azevedo, M.S., Nehring, P., Gonzaga, L.V., Fett, R., Costa, A.C.O. (2017). Effect of in vitro gastrointestinal digestion on the bioaccessibility of phenolic compounds, minerals, and antioxidant capacity of *Mimosa scabrella* Bentham honeydew honeys. *Food Research International*, 99, 670-678.
- [113] Leopoldini, M., Russo, N., Toscano, M. (2011). The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chemistry*, 125(2), 288-306.
- [114] Tovignan, T.K., Fonceka, D., Ndoeye, I., Cisse, N., Luquet, D. (2016). The sowing date and post-flowering water status affect the sugar and grain production of photoperiodic, sweet sorghum through the regulation of sink size and leaf area dynamics. *Field Crops Research*, 192, 67-77
- [115] Lemoine, R., La Camera, S., Atanassova, R., Dédaldéchamp, F., Allario, T., Pourtau, N., Bonnemain, J.L., Laloi, M., Coutos-Thévenot, P., Maurousset, L., Faucher, M., Girousse, C., Lemonnier, P., Pamila, J., Durand, M. (2013). Source-to-sink transport of sugar and regulation by environmental factors. *Frontiers in Plant Science*, 4, 272.
- [116] Rolland, F., Sheen, J. (2005). Sugar sensing and signalling networks in plants. In: Nutrient Sensing through the Plasma Membrane of Eukaryotic Cells. Biochemical Society Transactions, 33(Part 1), 269-271.
- [117] Taiz, L., Zeiger, E., (2002). Plant physiology (Ed. 3), Sinauer Associates Incorporated.

- [118] Fotirić Akšić, M., Tosti, T., Sredojević, M., Milivojević, J., Meland, M., Natić, M. (2019). Comparison of sugar profile between leaves and fruits of blueberry and strawberry cultivars grown in organic and integrated production system. *Plants*, 8(7), 205.
- [119] Pacini, E., Nepi, M. (2007). Nectar production and presentation. In: Nectaries and nectar, 167-214. Springer, Dordrecht.
- [120] Fahn, A. (1988). Secretory tissues in vascular plants. *New Phytologist*, 108(3), 229-257.
- [121] Noller C. R. (1961). *Kemija organskih spojeva*, Tehnička knjiga Zagreb. Prevod.
- [122] Vollhardt, K.P.C., Schore, N.E. (2011). *Organic chemistry*, John Wiley & Sons.
- [123] Golijan, J., Kostić, A.Ž., Živanović, L. (2017). Hemijski sastav heljde sa nutritivnog aspekta. *Hrana i ishrana (Beograd)*, 58(2), 10.
- [124] Hromádková, Z., Ebringerová, A. (2003). Ultrasonic extraction of plant materials—investigation of hemicellulose release from buckwheat hulls. *Ultrasonics sonochemistry*, 10(3), 127-133.
- [125] Wang J, Li QX. (2011). Chemical Composition, Characterization, and Differentiation of Honey Botanical and Geographical Origins. *Advances in Food and Nutrition Research*, 62, 89-137.
- [126] Mudrić, S.Ž., Gašić, U.M., Dramićanin, A. M., Ćirić, I.Ž., Milojković-Opsenica, D.M., Popović-Đorđević, J.B., Momirović, N.M., Tešić, Ž.Lj. (2017). The polyphenolics and carbohydrates as indicators of botanical and geographical origin of Serbian autochthonous clones of red spice paprika. *Food Chemistry*, 217, 705-715.
- [127] Kaškonienė, V., Venskutonis, P.R. (2010). Floral markers in honey of various botanical and geographic origins: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9(6), 620-634.
- [128] Chen, L., Wang, J., Ye, Z., Zhao, J., Xue, X., Vander Heyden, Y., Sun, Q. (2012). Classification of Chinese honeys according to their floral origin by near infrared spectroscopy. *Food Chemistry*, 135(2), 338-342.
- [129] Bogdanov, S., Martin, P., Lullmann, C. (2002). Harmonised methods of the international honey commission. *Swiss Bee Research Centre, FAM, Liebfeld*, 5, 1-62.
- [130] Pavlović, A.V., Papetti, A., Zagorac, D.Č.D., Gašić, U M., Mišić, D.M., Tešić, Ž.Lj., Natić, M.M. (2016). Phenolics composition of leaf extracts of raspberry and blackberry cultivars grown in Serbia. *Industrial Crops and Products*, 87, 304-314.
- [131] Ferreres, F., Llorach, R., Gil-Izquierdo, A. (2004). Characterization of the interglycosidic linkage in di-, tri-, tetra- and pentaglycosylated flavonoids and differentiation of positional isomers by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, 39(3), 312-321.
- [132] Oszmiański, J., Wojdyło, A., Nowicka, P., Teleszko, M., Cebulak, T., Wolanin, M. (2015). Determination of phenolic compounds and antioxidant activity in leaves from wild *Rubus* L. species. *Molecules*, 20(3), 4951-4966.
- [133] de Rijke, E., Out, P., Niessen, W. M., Ariese, F., Gooijer, C., Udo, A.T. (2006). Analytical separation and detection methods for flavonoids. *Journal of chromatography A*, 1112(1-2), 31-63.

- [134] Yang, W.Z., Ye, M., Qiao, X., Wang, Q., Bo, T., Guo, D.A. (2012). Collision-induced dissociation of 40 flavonoid aglycones and differentiation of the common flavonoid subtypes using electrospray ionization ion-trap tandem mass spectrometry and quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *European Journal of Mass Spectrometry*, 18(6), 493-503.
- [135] Ma, Y.L., Li, Q.M., Van den Heuvel, H., Claeys, M. (1997). Characterization of flavone and flavonol aglycones by collision-induced dissociation tandem mass spectrometry. *Rapid communications in Mass Spectrometry*, 11(12), 1357-1364.
- [136] Wang, Y., Yang, L., He, Y.Q., Wang, C.H., Welbeck, E.W., Bligh, S.A., Wang, Z.T. (2008). Characterization of fifty-one flavonoids in a Chinese herbal prescription Longdan Xiegan Decoction by high-performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry and photodiode array detection. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 22(12), 1767-1778.
- [137] Feduraev, P., Chupakhina, G., Maslennikov, P., Tacenko, N., Skrypnik, L. (2019). Variation in phenolic compounds content and antioxidant activity of different plant organs from *Rumex crispus* L. and *Rumex obtusifolius* L. at different growth stages. *Antioxidants*, 8(7), 237.
- [138] López-Lázaro, M. (2009). Distribution and biological activities of the flavonoid luteolin. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 9(1), 31-59.
- [139] Huda, M.N., Lu, S., Jahan, T., Ding, M., Jahan, R., Zhang, K., Zhang, W., Georgiev, M. I., Park, S. U., Zhou, M. (2021). Treasure from garden: Bioactive compounds of buckwheat. *Food Chemistry*, 335, 127653.
- [140] Stalmach, A., Mullen, W., Nagai, C., Crozier, A. (2006). On-line HPLC analysis of the antioxidant activity of phenolic compounds in brewed, paper-filtered coffee. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 18, 253-262.
- [141] Kalinova, J., Vrchotova, N. (2009). Level of catechin, myricetin, quercetin and isoquercitrin in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench), changes of their levels during vegetation and their effect on the growth of selected weeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(7), 2719-2725.
- [142] Jang, D., Jung, Y.S., Kim, M.S., Oh, S.E., Nam, T.G., Kim, D.O. (2019). Developing and validating a method for separating flavonoid isomers in common buckwheat sprouts using HPLC-PDA. *Foods*, 8(11), 549.
- [143] Draganescu, M., Dumitru, C., Baroiu, L., Iancu, A., Vizireanu, C., Arbune, M., Benzea, A. (2020) Antioxidant Profile of Buckwheat Honey from the Republic of Moldova. *Revista de Chime*. 71(7), 325-336.
- [144] Vasić, V., Gašić, U., Stanković, D., Lušić, D., Vukić-Lušić, D., Milojković-Opsenica, D., Tešić, Ž., Trifković, J. (2019). Towards better quality criteria of European honeydew honey: Phenolic profile and antioxidant capacity. *Food Chemistry*, 274, 629-641.
- [145] Verdu, C. F., Gatto, J., Freuze, I., Richomme, P., Laurens, F., Guilet, D. (2013). Comparison of two methods, UHPLC-UV and UHPLC-MS/MS, for the quantification of polyphenols in cider apple juices. *Molecules*, 18(9), 10213-10227.
- [146] Singleton, V.L., Rossi, J.A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158.

- [147] Natella, F., Nardini, M., Di Felice, M., Scaccini, C. (1999). Benzoic and cinnamic acid derivatives as antioxidants: Structure–activity relation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(4), 1453-1459.
- [148] Cuvelier, M.E., Richard, H., Berset, C. (1992). Comparison of the antioxidative activity of some acid-phenols: structure-activity relationship. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 56(2), 324-325.
- [149] Combarros-Fuertes, P., Estevinho, L.M., Dias, L.G., Castro, J.M., Tomás-Barberán, F.A., Tornadijo, M.E., Fresno-Baro, J.M. (2018). Bioactive components and antioxidant and antibacterial activities of different varieties of honey: A screening prior to clinical application. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(2), 688-698.
- [150] Li, X., Kim, J.K., Park, S.Y., Zhao, S., Kim, Y.B., Lee, S., Park, S.U. (2014). Comparative analysis of flavonoids and polar metabolite profiling of tanno-original and tanno-high rutin buckwheat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(12), 2701-2708.
- [151] Živanović, B., Milić Komić, S., Tosti, T., Vidović, M., Prokić, L., Veljović Jovanović, S. (2020). Leaf soluble sugars and free amino acids as important components of abscisic acid-mediated drought response in tomato. *Plants*, 9(9), 1147.
- [152] Gu, H., Lu, M., Zhang, Z., Xu, J., Cao, W., Miao, M. (2018). Metabolic process of raffinose family oligosaccharides during cold stress and recovery in cucumber leaves. *Journal of Plant Physiology*, 224, 112-120.
- [153] Wu, D., Cai, S., Chen, M., Ye, L., Chen, Z., Zhang, H., Dai, F., Wu, F. Zhang, G. (2013). Tissue metabolic responses to salt stress in wild and cultivated barley. *PLoS one*, 8(1), e55431.
- [154] Shen, C., Wang, J., Shi, X., Kang, Y., Xie, C., Peng, L., Dong, C., Shen, Q., Xu, Y. (2017). Transcriptome analysis of differentially expressed genes induced by low and high potassium levels provides insight into fruit sugar metabolism of pear. *Frontiers in Plant Science*, 8, 938.
- [155] Gašić, U., Šikoparija, B., Tosti, T., Trifković, J., Milojković-Opsenica, D., Natić, M., Tešić, Ž. (2014). Phytochemical fingerprints of lime honey collected in Serbia. *Journal of AOAC International*, 97(5), 1259-1267.
- [156] Bogdanov, S., Jurendic, T., Sieber, R., Gallmann, P. (2008). Honey for nutrition and health: a review. *Journal of the American college of Nutrition*, 27(6), 677-689.
- [157] Persano Oddo, L., Piro, R., (2004). Main European unifloral honeys: descriptive sheets. *Apidologie*, 35(Suppl. 1), S38-S81.
- [158] Pravilnik o vlagomerima za zrn u žitaricu i semenke uljarica. (2018). Službeni Glasnik Republike Srbije, 96/2018.

7. Додатак

Табела Д1 Редослед држава које су имале највећи извоз хељде током периода од 2016.-.2019.

Редни бр.	2016	2017	2018	2019
1	САД	Кина	Русија	Русија
2	Кина	САД	Кина	САД
3	Литванија	Русија	САД	Кина
4	Русија	Литванија	Пољска	Литванија
5	Пољска	Пољска	Литванија	Летонија
6	Летонија	Летонија	Холандија	Пољска

Подаци преузети са сајта *FAOSTAT*-а [16]. Приступљено 29.04.2021.

Табела Д2 Поређење података обрађене површине, производње и приноса хељде у три од пет држава које имају највећу производњу хељде, током 2016. и 2017. године.

Држава	Година	Обрађена површина под хељдом (ha)	Производња хељде (тона)	Принос хељде (hg/ha)*
Пољска	2016	81468	118562	14553
	2017	78027	113113	14497
Кина	2016	498740	419892	8419
	2017	497185	430166	8652
Русија	2016	1121672	1187267	10585
	2017	1497783	1524879	10181

*hg/ha (хектограм по хектару)=0,1 kg/ha;

Подаци преузети са сајта *FAOSTAT*-а. [16]. Приступљено 29.04.2021.

Табела ДЗ Најмањи дозвољени удео поленових зрна у нерастворљивом делу монофлоралног меда појединих биљних врста [71]

Назив врсте биљака	Латински назив	Удео поленових зрна у нерастворљивом делу	
Питоми кестен	<i>Castanea sativa</i> Mill.	85%	
Уљана репица	<i>Brassica napus</i> L.	60%	
Фацелија	<i>Phacelia tanacetifolia</i> Benth.	60%	
Сунцокрет	<i>Helianthus annuus</i> L.	40%	
Луцерка	<i>Medicago sativa</i> L.	30%	
Липа	<i>Tilia spp.</i>	25%	(10 %)*
Багрем	<i>Robinia pseudoacacia</i> L.	20%	
Метвица, нана	<i>Mentha spp.</i>	20%	
Вресак	<i>Calluna vulgaris</i> L.	20%	
Приморски врес	<i>Satureja montana</i> L.	20%	
Маслачак	<i>Taraxacum officinale</i> Weber	20%	
Рузмарин	<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	20%	
Жалфија	<i>Salvia officinalis</i> L.	15%	(10 %)*
Планика	<i>Arbutus unedo</i> L.	10%	
Агруми	<i>Citrus spp.</i>	10%	(5 %)*
Лаванда	<i>Lavandula spp.</i>	10%	(5 %)*

* уз карактеристична сензорска својства меда за одређену врсту биљака (мирис, укус, боја)

Табела Д4 Мелисопалинолошка анализа присуства нектарских и ненектарских врста у узорцима меда од хељде из Србије (М1-М4) и Пољске (М5, М6) [33].

Тип нектарске/ненектарске врсте		Мед из Србије				Мед из Пољске	
Ген	Фамилија	М1	М2	М3	М4	М5	М6
<i>Achilea</i> тип	Asteraceae	0,9	0	1,1	0,3	0,7	1,5
<i>Ailanthus</i>	Simaroubaceae	0	0	0,2	0	0	0
<i>Alnus</i> *	Betulaceae	0	0,1	0,2	0,9	0,1	0
<i>Amorpha</i> тип	Fabaceae	0	0,7	19,2	3,1	0	0
<i>Apiaceae</i>	Apiaceae	0	0,1	0,7	0,9	0	0
<i>Artemisia</i> *	Asteraceae	0	0	0	0,6	2,6	0,9
<i>Astertype</i>	Asteraceae	0,9	0,1	0	0	0,2	0
<i>Astragalus</i> тип	Fabaceae	4,5	6,6	2,8	6,2	0,5	3,1
<i>Betula</i>	Betulaceae	0	0	0,7	1,2	0	0
<i>Brassica napus</i>	Brassicaceae	0	0	0	0	11,2	0
<i>Brassicaceae</i>	Brassicaceae	0,1	0,5	0,2	0,9	0	27,3
<i>Carduus</i>	Asteraceae	0	0	1,1	0,3	0	0
<i>Cariophilaceae</i>	Cariophilaceae	0	0	0	0	0	0
<i>Centaurea cyans</i>	Asteraceae	0	0	0	0	1,8	0,4
<i>Centaurea jacea</i>	Asteraceae	0,1	0,4	0	0	0	0
<i>Chenopodiaceae</i> *	Amaranthaceae	0	0	0	0	0,4	4,4
<i>Clematis</i>	Ranunculaceae	0	0	5,0	0	0	0
<i>Convolvulus</i>	Convolvulaceae	0	0	0	0	0	0,2

<i>Corylus*</i>	Betulaceae	0	0	0	0,6	0	0
<i>Cupressaceae*</i>	Cupressaceae	0	0	1,8	0,9	0	0
<i>Echium</i>	Boraginaceae	7,0	0,3	0	0	0	0
<i>Epilobium</i>	Onagraceae	0,3	0	0,2	0	0	0
<i>Euphorbia</i>	Euphorbiaceae	0	0	0,2	0	0	0
<i>Fagopyrum</i>	Polygonaceae	0,8	1,1	10,3	4,0	18,7	20,5
<i>Fenestrata</i>	Asteraceae	0,3	0,1	1,1	3,1	0,6	7,2
<i>Filipendula</i>	Rosaceae	1,4	0,5	18,1	29,9	0,1	0,7
<i>Fraxinus americana/pensylvanica*</i>	Oleaceae	80,4	86,6	0,2	0	49,7	6,8
<i>Fraxinus ornus*</i>	Oleaceae	0,1	0	0	0	0	0
<i>Gleditschia</i>	Fabaceae	0	0	1,3	0	0	0
<i>Hedera</i>	Araliaceae	0	0	0	0,6	0	0
<i>Helianthus</i>	Asteraceae	0	0	0,2	0,6	0,6	0,2
<i>Hypericum</i>	Hypericaceae	0,3	0,6	0	0,3	0,1	0,2
<i>Juniperus*</i>	Cupressaceae	0,1	0,7	0	0	0,6	0,2
<i>Lamiaceae S тип</i>	Lamiaceae	0,5	0,5	0,4	0,3	0	0
<i>Ligustrum</i>	Oleaceae	0	0	0	0,3	0	0
<i>Loranthus тип</i>	Loranthaceae	0	0	0	0,9	0	0
<i>Lotus</i>	Fabaceae	0,5	0,1	0	0,9	0	0
<i>Ostrya*</i>	Betulaceae	0,1	0	0,7	0	0	0
<i>Phacelia</i>	Boraginaceae	0	0	0	0	4,6	0
<i>Plantago*</i>	Plantaginaceae	0	0,1	2,0	2,8	0,2	1,1
<i>Poaceae*</i>	Poaceae	0	0	0,7	0,6	0	0,7
<i>Polygonum</i>	Polygonaceae	0	0	0	0	0	0,4
<i>Populus*</i>	Salicaceae	0	0	0	0,3	0	0
<i>Rhamnus тип</i>	Rhamnaceae	0	0	2,4	4,9	0	0
<i>Robinia</i>	Fabaceae	0	0	1,8	2,8	0	0
<i>Rosaceae (Prunus тип)</i>	Rosaceae	0,5	0	2,4	7,1	1,3	1,3
<i>Rubus</i>	Rosaceae	0,4	0,1	14,9	10,8	0,7	17,7
<i>Rumex*</i>	Polygonaceae	0	0	0	2,2	0,5	1,5
<i>Salix</i>	Salicaceae	0	0	0,4	0,6	0	0
<i>Sambucus nigra</i>	Capryfoliaceae	0	0	0,2	0,3	0	0
<i>Senecio</i>	Asteraceae	0	0	0,4	0	2,3	1,8
<i>Teucrium</i>	Lamiaceae	0	0	6,8	3,7	0	0
<i>Tilia</i>	Malvaceae	0	0	0,7	2,8	0,1	0,2
<i>Trifolium pratense</i>	Fabaceae	0,4	0,4	2,0	4,0	1,5	1,5
<i>Ulmus*</i>	Ulmaceae	0	0	0	0,3	0	0
<i>Urtica*</i>	Urticaceae	0,1	0	0	0	0	0
<i>Vicia</i>	Fabaceae	0	0,2	0	0	0,7	0
<i>Viola</i>	Violaceae	0,3	0	0	0	0	0,2
<i>Zea*</i>	Poaceae	0	0	0	0	0,1	0

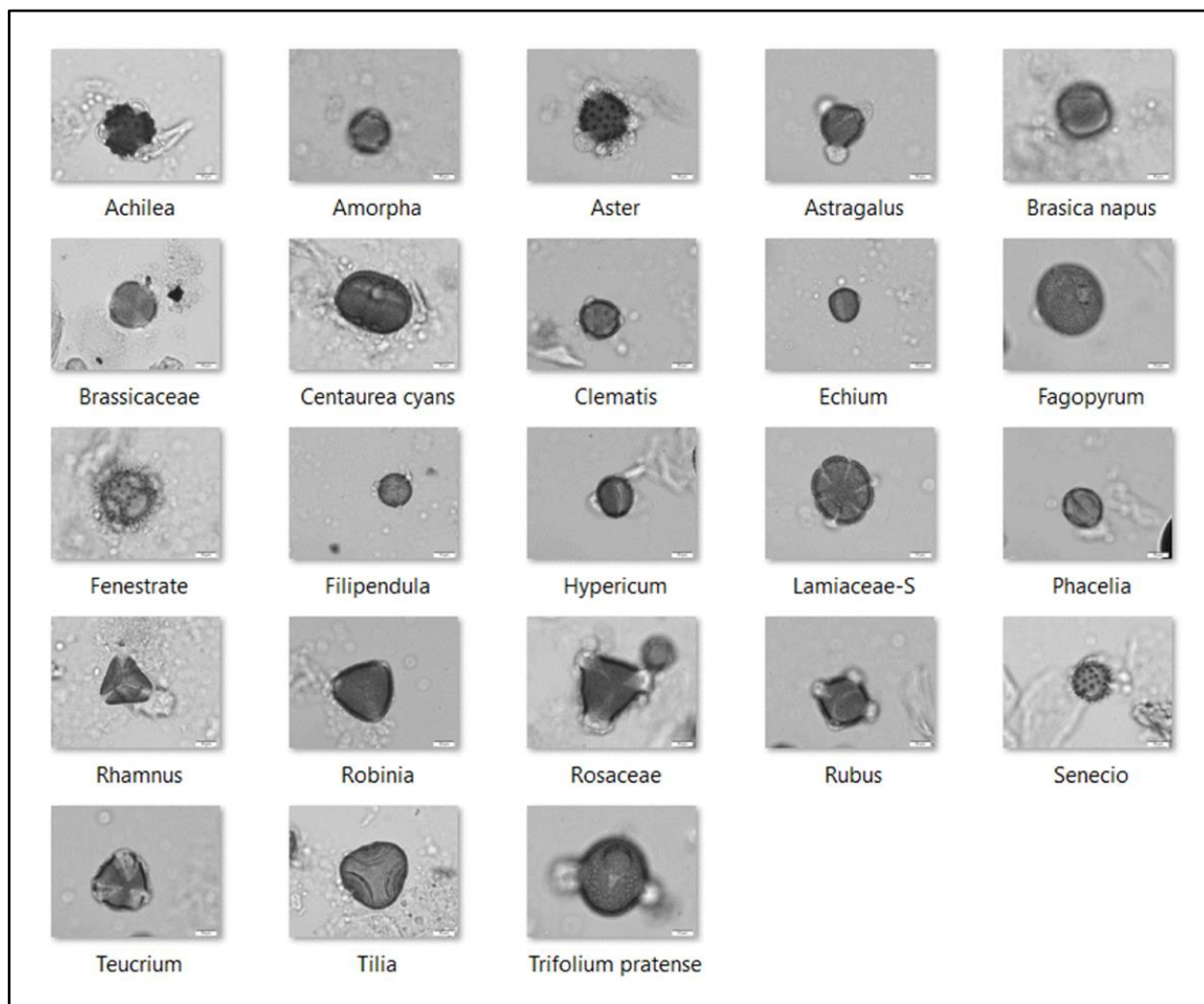
Класе учесталости полена: П-, „преовлађујући полен“ (пребројано је више од 45 зрна полена), С-, „секундарни полен“ (16-45%); И-, „битан полен“ (3-15); М-, „мање битан полен“ (мање од 3%).

* Врсте без нектара

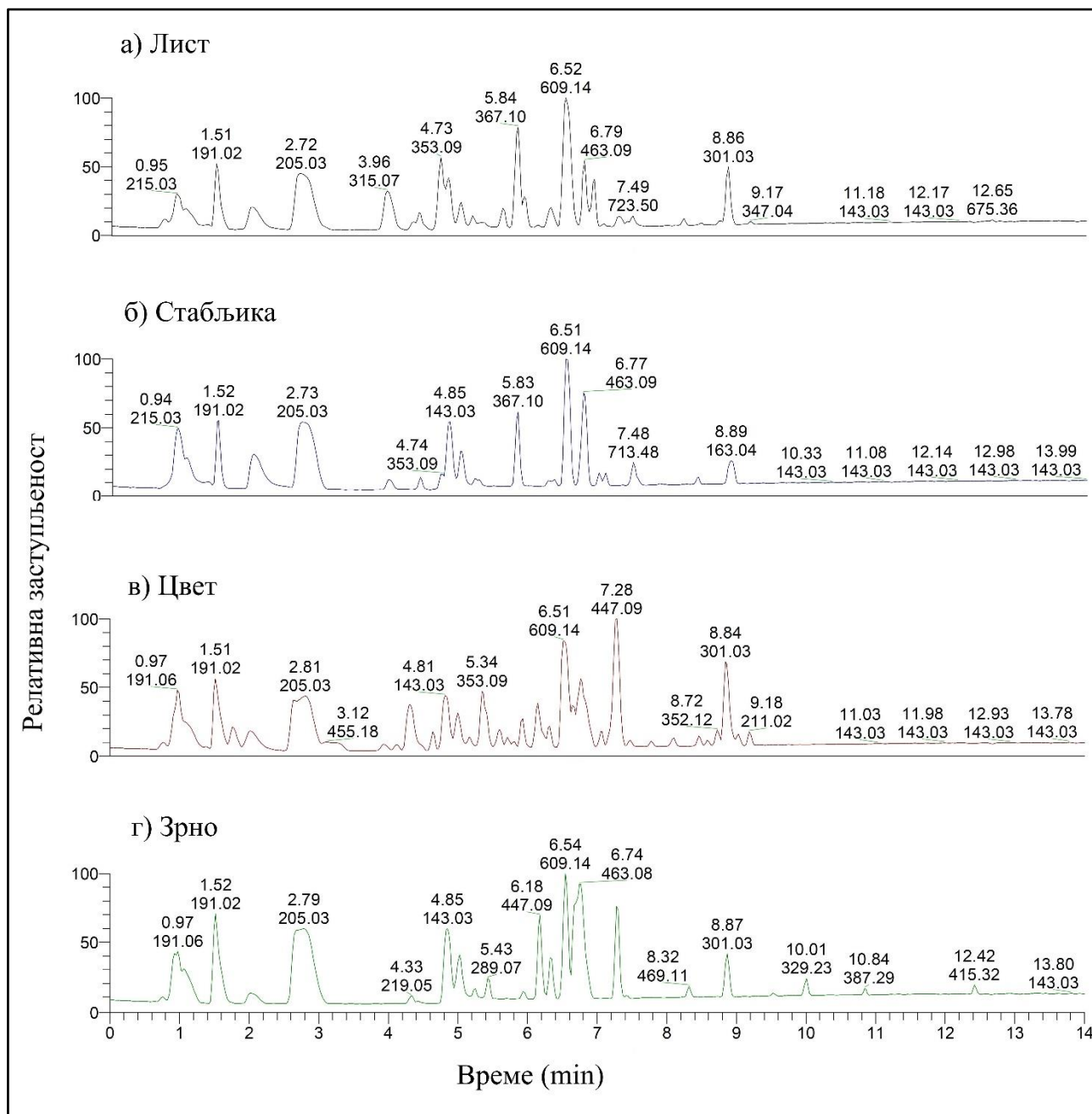
Табела Д5 Мелисопалинолошка анализа узорака меда (М1-М6), након што је уклоњен садржај полена ненектарских врста [33].

Узорци	Локација	Садржај <i>Fagopyrum</i> полена (%)	Секундарни полен (16-45 %)	Битан полен (3-15 %)
М1	Србија	4,05	<i>Echium</i> , <i>Astragalus</i> тип	<i>Fagopyrum</i> , <i>Achilea</i> тип, <i>Aster</i> тип, <i>Filipendula</i>
М2	Србија	8,91	<i>Astragalus</i> тип	<i>Fagopyrum</i> , <i>Filipendula</i> , <i>Lamiaceae</i> тип, <i>Hypericum</i> , <i>Brassicaceae</i> , <i>Amorpha</i> тип,
М3	Србија	10,93	<i>Filipendula</i> , <i>Amorpha</i> тип	<i>Fagopyrum</i> , <i>Astragalus</i> тип, <i>Rubus</i> , <i>Teucrium</i> , <i>Clematis</i>
М4	Србија	4,47	<i>Filipendula</i>	<i>Fagopyrum</i> , <i>Rosaceae</i> (<i>Prunus</i> тип), <i>Rubus</i> , <i>Astragalus</i> тип, <i>Trifolium pratense</i> , <i>Fenestrata</i> , <i>Amorpha</i> тип, <i>Tilia</i> , <i>Robinia</i> , <i>Teucrium</i> , <i>Rhamnus</i> тип
М5	Пољска	40,83	<i>Fagopyrum</i> , <i>Brassica napus</i>	<i>Trifolium pratense</i> , <i>Phacelia</i> , <i>Centaurea cyanus</i> , <i>Senecio</i> тип
М6	Пољска	24,29	<i>Fagopyrum</i> , <i>Rubus</i> , <i>Brassicaceae</i>	<i>Astragalus</i> тип, <i>Fenestrata</i>

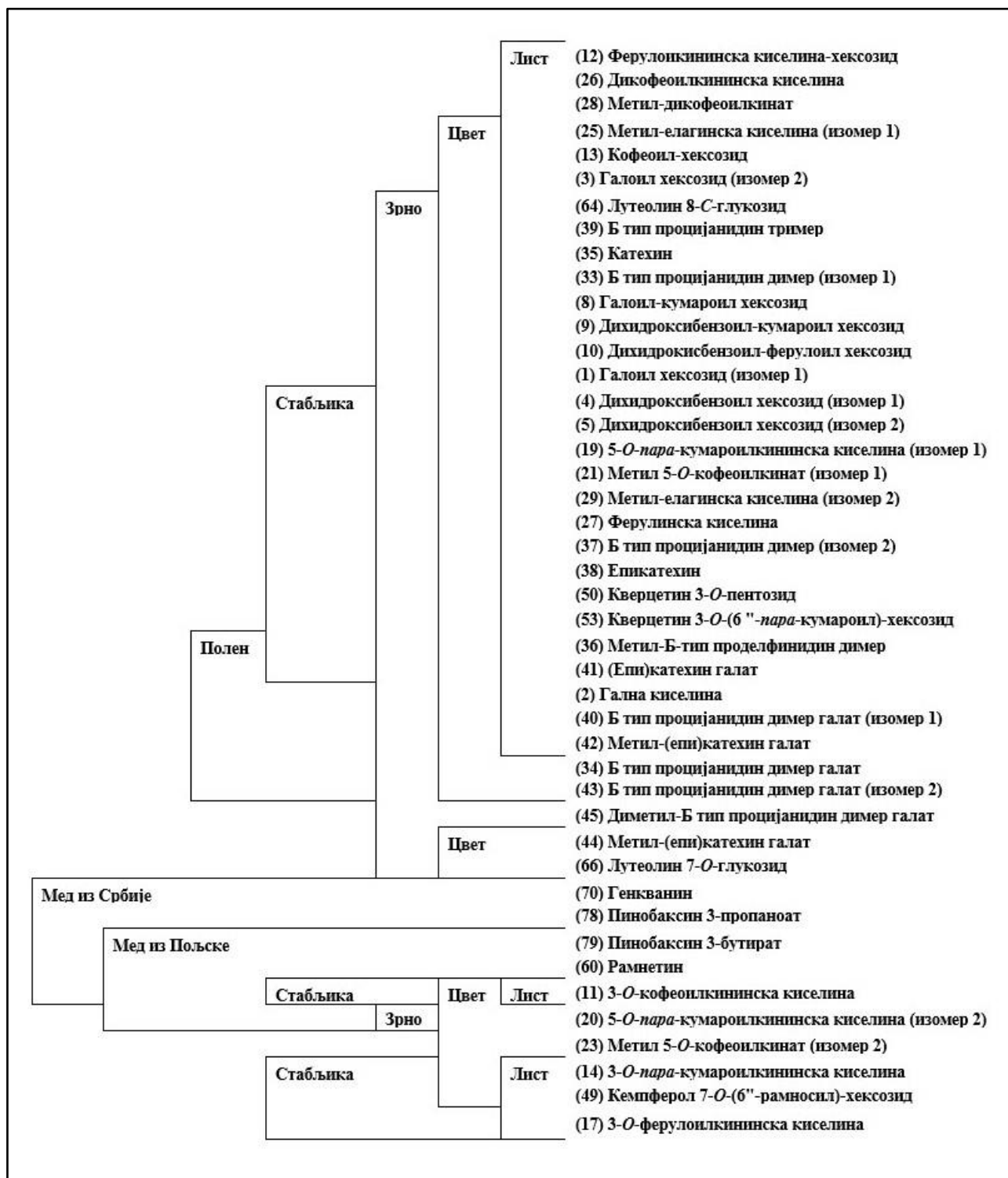
Класе учесталости полена: П-, „преовлађујући полен“ (пребројано је више од 45% зрна полена), С- „секундарни полен“ (16-45%); И-, „битан полен“ (3-15%); М- „мање битан полен“ (мање од 3%).



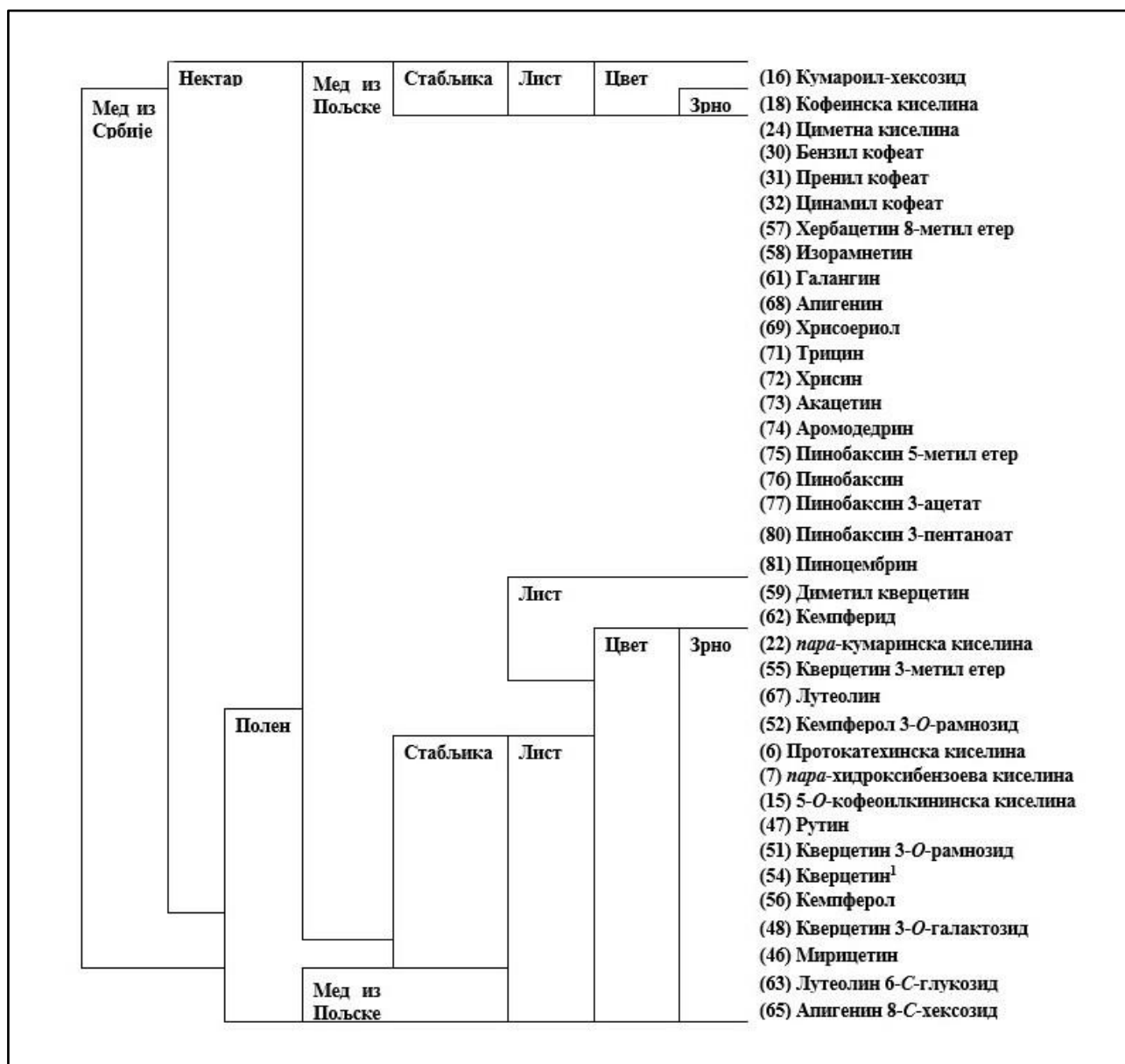
Слика Д1 Микрографија поленских честица заступљених у узорцима меда након што је уклоњен полен ненектарских врста [33].



Слика Д2 Масени хроматограм идентификованих полифенолних једињења у испитиваном листу, стабљики, цвету и зрну хељде (ретенционо време и тачне масе за све пикове наведени су у Табели 5, а на овој слици су приказани неки најинтензивнији).



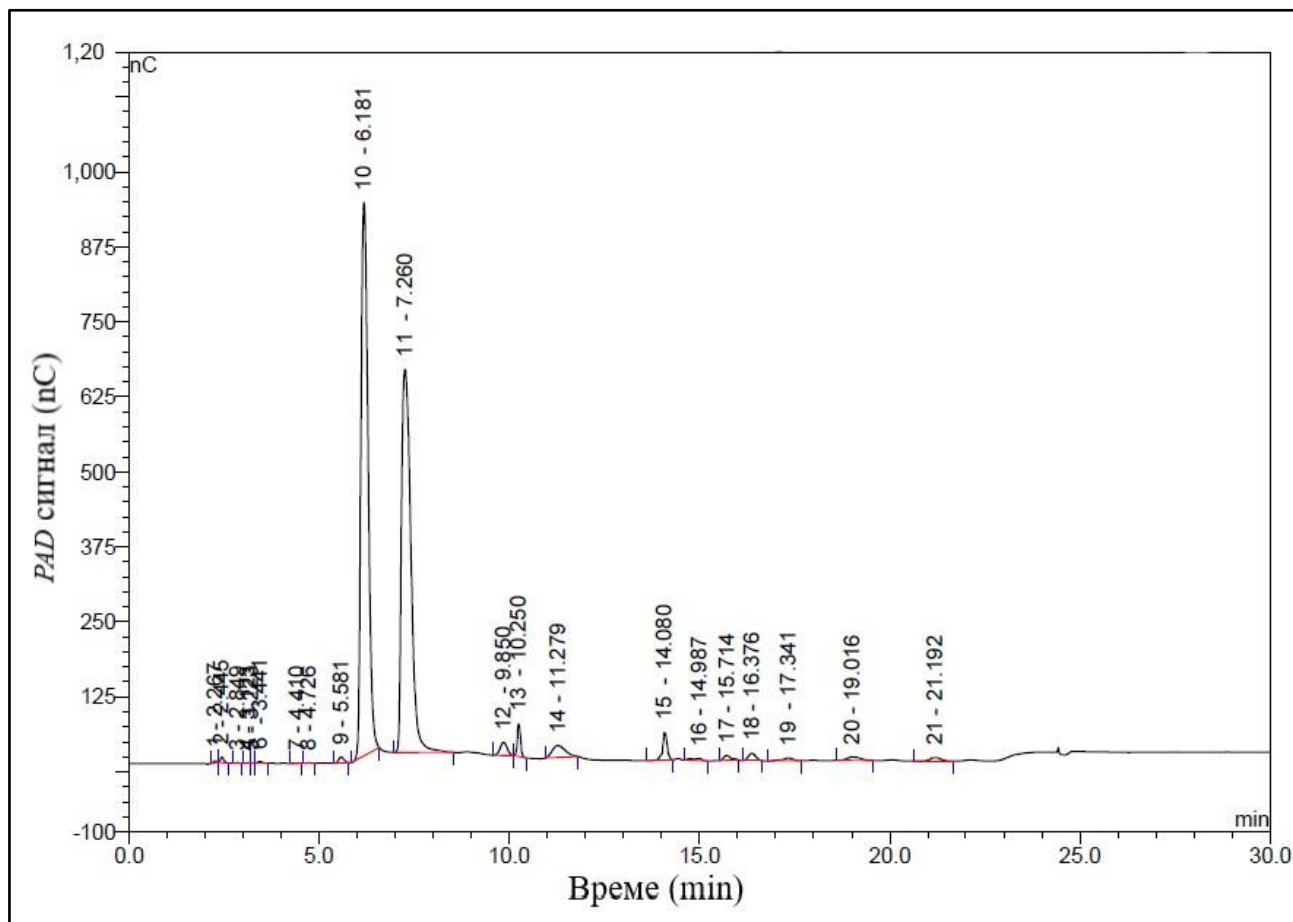
Слика Д3 Идентификована 44 полифенолна једињења која су првенствено заступљена у деловима хељде.



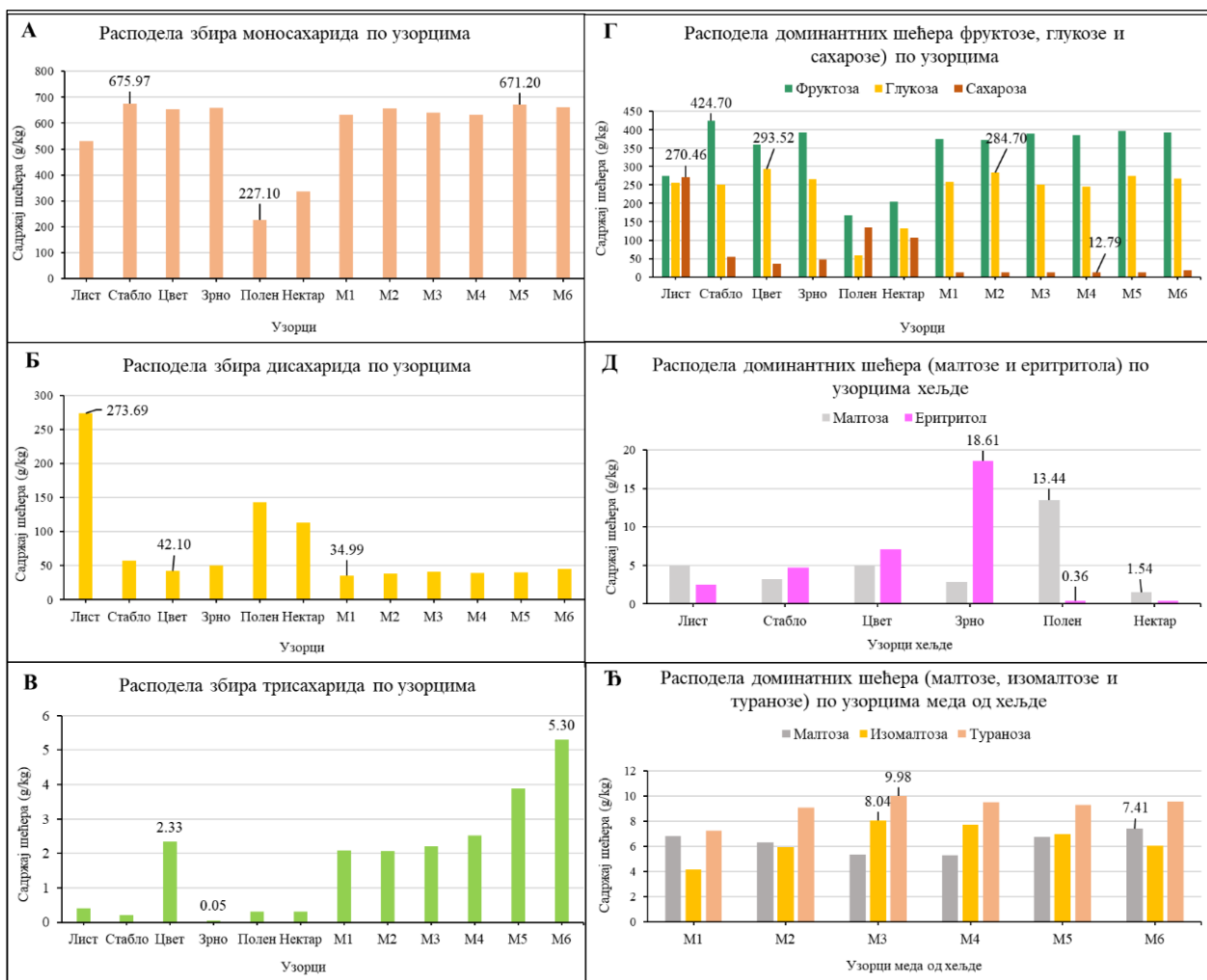
Слика Д4 Идентификована 37 полифенолна једињења која повезују мед од хељде и хељду, преко нектара и/или полена.

Табела Д6 Корелација антиоксидационе активности (изражене као *TPC* и *RSA*) за узорке хељде и меда хељде (одређивање Пеарсоновог кофицијента).

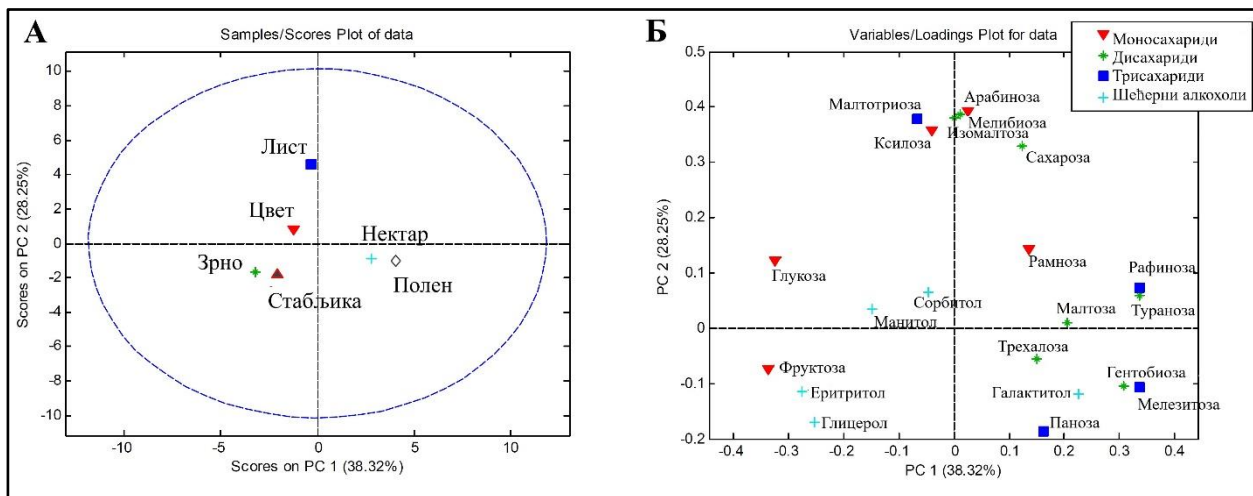
	Хељда (лист, стабљика, цвет, зрно)		Мед хељде		Хељда и мед хељде	
	<i>TPC</i>	<i>RSA</i>	<i>TPC</i>	<i>RSA</i>	<i>TPC</i>	<i>RSA</i>
<i>TPC</i>	1		1		1	
<i>RSA</i>	0.95	1	0.81	1	0.83	1



Слика Д5 Хроматограм екстракта цвета хељде са квантификованим шећерима: 1. еритритол; 2. глицерол; 3. сорбитол; 4. галактитол; 5. манитол; 6. трехалоза; 7. рамноза; 8. арабиноза; 9. ксилоза; 10. глукоза; 11. фруктоза; 12. мелибиоза; 13. изомалтоза; 14. сахароза; 15. мелезитоза; 16. гентобиоза; 17. тураноза; 18. рафиноза; 19. малтоза; 20. паноза; 21. малтотриоза.



Слика Д6 Распoдела квантификованих шећера по узорцима. Распoдела (А) збира моносахарида, (Б) збира дисахарида, (В) збира трисахардиа, (Г) доминантних шећера фруктоза, глюкозе и сахарозе, (Д) доминантних шећера малтозе и ериотритола, (Е) доминантних шећера малтозе, и зомалтозе и туранозе.



Слика Д7 Дифернцијација узорака хељде (листа, стбљике, цвета, зрна, полена и нектара) на бази садржаја шећера добијена применом *PCA*. (А) Оцене главних компоненти. (Б) Графикон читавања [34].

Табела Д7 Садржај воде (%) у хељдиним узорцима: листу, стаблу, цвету и зрну хељде, као и меду хељде (М1-М6) и електрична проводљивост (mS/cm) меда хељде (М1-М6).

Параметар	Хељда				Мед од хељде					
	Лист	Стабло	Цвет	Зрно	М1	М2	М3	М4	М5	М6
Садржај воде (%)	10,74	10,40	11,35	10,02	17,10	17,03	15,55	15,50	15,50	15,55
Ел. проводљивост (mS/cm)	-	-	-	-	0,411	0,429	0,348	0,320	0,279	0,212

„-“ - није рађено

Биографија аутора

Милица (Миломир) Нешовић је рођена 18. маја 1988. године у Београду. Основне студије Факултета за физичку хемију Универзитета у Београду је уписала школске 2007/2008. и дипломирала 2015. године са просечном оценом 8,05. Исте године уписала је мастер академске студије на матичном факултету и завршила их 2016. године, са просечном оценом 9,50. Докторске академске студије на Факултету за физичку хемију Универзитета у Београду је уписала школске 2016/2017. године и положила је све испите предвиђене планом и програмом, са просечном оценом 8,50.

Кандидат је волонтирала на Институту за општу и физичку хемију, у периоду од марта 2016. до марта 2017. године. Запослена је од марта 2017. године као истраживач-приправник, а од 06. јула 2020. године као истраживач-сарадник на Институту за општу и физичку хемију. Ангажована је на пројекту Министарства науке и технолошког развоја под насловом “Литијум-јонске батерије и горивне ћелије”, са евиденционим бројем Ш45014. Пројектом руководи др Славко Ментус, редовни професор у пензији Факултета за физичку хемију Универзитета у Београду и редовни члан САНУ. Пројекат је тренутно документован као уговор са бројем: 451-03-68/2020-14/200051.

У току радног односа на Институту за општу и физичку хемију, истичу се њене активности у експерименталном раду на методама хроматографије и у другим дневним анализама које обавља за потребе Института.

Кандидат је аутор је научних радова и саопштења. Има објављених пет радова и десет саопштења.

Библиографија аутора

Објављени научни радови и саопштења проистекли из докторске дисертације

Из ове докторске дисертације проистекло је два рада (категорије М22) и четири саопштења (категорије М33 и М34).

Радови у истакнутом међународном часопису (М22):

1. Milica Nešović, Uroš Gašić, Tomislav Tosti, Nikola Horvacki, Milica Sredojević, Nebojša Nedić, Stevan Blagojević, Ljubiša Ignjatović, Živoslav Tešić. (2021). Distribution of polyphenolic and sugar compounds in different buckwheat plant parts. *RSC Advances*, 11, 25816-25829, DOI: 10.1039/D1RA04250E.
2. Milica Nešović, Uroš Gašić, Tomislav Tosti, Nikola Horvacki, Branko Šikoparija, Nebojša Nedić, Stevan Blagojević, Ljubiša Ignjatović and Živoslav Tešić. (2020). Polyphenolic profile of buckwheat honey, nectar and pollen. *The Royal Society Open Science*, 7(12), 201756, DOI: 10.1098/rsos.201576.

Саопштења са скупова међународног значаја штампана у целини (М33):

1. Živoslav Tešić, Milica Nešović, Fatjon Hoxha, Stevan Blagojević. (2021). Polyphenols as a possible markers of botanical origin of buckwheat honey. *Proceeding 3rd International Conference on Agriculture and Life Sciences ICOALS-3*, Agricultural University of Tirana, Albania, November 1st-3rd, 2021.
2. Milica M. Nešović, Adrian B. Douglas, Tomislav B. Tosti, Jelena Trifković, Evaraldo Attard, Živoslav Lj. Tešić, Uroš M. Gašić. (2021). Composition of buckwheat extracts determined by UHPLC-LTQ OrbiTrap MS. *Proceeding Physical Chemistry 2021 - The 15th International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry*, Belgrade, Serbia, September 20th-28th, 2021.

Саопштења са скупова међународног значаја штампана у изводу (М34):

1. Milica M. Nešović, Uroš M. Gašić, Tomislav B. Tosti, Stevan N. Blagojević, Nebojša M. Nedić, Ljubiša M. Ignjatović, Živoslav Lj. Tešić. (2021). UHPLC OrbiTrap MS analysis of buckwheat honey, nectar and pollen polyphenols. *Proceeding 2nd UNIFood Conference*, Belgrade, Serbia, September 24th-25th, 2021.
2. Milica Nešović, Radoslav Daljević, Tomislav Tosti, Uroš Gašić, Živoslav Tešić. (2018). Polyphenol and sugar profile of buckwheat honey. *Proceeding 1st UNIFood Conference, University of Belgrade, 210th Anniversary*, Belgrade, Serbia, October 5th-6th, 2018.

Додатни објављени научни радови и саопштења

Кандидат је објавио додатне научне радове и саопштења од којих су неки везани за испитивање меда, а нису уско везани за тему докторске дисертације.

Радови у истакнутом међународном часопису (M22):

1. Milica Nešović, Uroš Gašić, Tomislav Tošti, Jelena Trifković, Rada Baošić, Stevan Blagojević, Ljubiša Ignjatović, Živoslav Tešić (2020). Physicochemical analysis and phenolic profile of polyfloral and honeydew honey from Montenegro. *RSC Advances*, 10, 2462-2471, DOI: 10.1039/C9RA08783D.
2. Milan Žižić, Joana Zakrzewska, Kristina Tešanović, Eleonora Bošković, Milica Nešović, Maja Karaman. (2018). Effect of vanadate on the mycelium of edible fungus *Coprinus Comatus*. *Journal of Trace Element in Medicine and Biology*, 50, 320-326. DOI: 10.1016/j.jtemb.2018.07.017.

Радови у међународном часопису (M23):

1. Slavica M. Blagojević, Nataša Erić, Milica Nešović, Stevan N. Blagojević. (2019). Micellization and Foamability of Sodium Laureth Sulphate and polysorbate Surfactant Mixtures. *Russian Journal of Physical Chemistry A*, 93, 228-235, DOI: 10.1134/S0036024419130053.

Саопштења са скупова међународног значаја штампана у целини (M33):

1. S. M. Blagojević, N. Erić, M. Nešović, S.N. Blagojević. (2018). Foamability of mixture containing anionic and different polysorbate surfactants. *Proceeding Physical Chemistry 2018 - The 14th International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry*, Belgrade, Serbia, September 24th -28th, 2018.

Саопштења са скупова међународног значаја штампана у изводу (M34):

1. Milica M. Nešović, Adrian B. Douglas, Tomislav B. Tosti, Jelena Trifković, Evaraldo Attard, Živoslav Lj. Tešić, Uroš M. Gašić. (2021). Characterization of Maltese honey harvested in different seasons by using physicochemical parameters and applied multivariate data analysis. *Proceedings 2nd UNIFood Conference, University of Belgrade*, Belgrade, Serbia, September 24th-25th, 2021.

2. Milica M. Nešović, Uroš M. Gašić, Živoslav Lj. Tešić. (2019). Polyphenol profile of honeydew and polyfloral honey from northern part of Montenegro. *Proceeding 1st International Conference on Advanced Production and Processing, ICAPP 2019*, Faculty of Technology, University of Novi Sad, October 10th-11th, 2019.
3. Jelena V. Senčanski, Ivana B. Stojković Simatović, Stevan N. Blagojević, Milica M. Nešović, Milica J. Vujković. (2019). Re-synthesizing cathode material from spent Li-ion batteries and its examination in an aqueous solution of NaNO₃. *Proceedings 1st International Conference on Advanced Production and Processing, ICAPP 2019*, Faculty of Technology, University of Novi Sad, October 10th-11th, 2019.
4. Milica Nešović, Uroš Gašić, Živoslav Tešić, Dušanka Milojković-Opsenica. (2018). UHPLC-LTQ OrbiTrap analysis of polyphenols in honey. *Proceeding 24th International Symposium on Separation Sciences, ISSS 2018, combined with 21st International Conference Analytical Methods and Human Health, AMHH*, Jasna, Slovakia, June 17th-20th, 2018.
5. Milica Nešović, Tomislav Tosti, Živoslav Tešić, Dušanka Milojković-Opsenica. (2018). HPAEC/PAD determination of sugar profile in honey. *Proceeding 24th International Symposium on Separation Sciences, ISSS 2018, combined with 21st International Conference Analytical Methods and Human Health, AMHH*, Jasna, Slovakia, June 17th-20th, 2018.

ПРИЛОЗИ

ПРИЛОГ 1. - Изјава о ауторству

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Милица Нешовић

Број индекса 2016/0313

Изјављујем да је докторска дисертација под насловом

Полифенолни профил, антиоксидациона активност и основни физичкохемијски

параметри хељде и меда од хељде

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

Потпис аутора

У Београду, 03.11.2021.

ПРИЛОГ 2. - Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Образац 6.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора _____ Милица Нешовић _____

Број индекса _____ 2016/0313 _____

Студијски програм _____ докторске студије физичке хемије _____

Наслов рада _____ Полифенолни профил, антиоксидациона активност и основни
_____ физичкохемијски параметри хељде и меда од хељде _____

Ментор _____ др Љубиша Игњатовић, редовни професор _____

_____ др Урош Гашић, виши научни сарадник _____

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

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

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

Потпис аутора

У Београду, 03.11.2021. _____

ПРИЛОГ 3. - Изјава о коришћењу

Образац 7.

Изјава о коришћењу

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

Полифенолни профил, антиоксидациона активност и основни физичкохемијски

параметри хељде и меда од хељде

која је моје ауторско дело.

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

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

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

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

Потпис аутора

У Београду, 03.11.2021.

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