

UNIVERZITET U BEOGRADU
HEMIJSKI FAKULTET



Stefan G. Ivanović

Metabolomički pristup u kontroli kvaliteta lekovitog bilja i biljnih preparata

Doktorska disertacija

Beograd, 2024.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF CHEMISTRY



Stefan G. Ivanović

Metabolomics approach in quality control of medicinal herbs and herbal products

Doctoral dissertation

Belgrade, 2024.

Mentori:

dr Ljubodrag Vujisić, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu – Hemijski fakultet

dr Dejan Gođevac, naučni savetnik
Univerzitet u Beogradu – Institut za hemiju, tehnologiju i metalurgiju – Institut od
nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

Članovi komisije:

dr Vele Tešević, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu – Hemijski fakultet

dr Boban Anđelković, viši naučni saradnik
Univerzitet u Beogradu – Hemijski fakultet

dr Ivana Sofrenić, docent
Univerzitet u Beogradu – Hemijski fakultet

dr Jovana Stanković Jeremić, naučni saradnik
Univerzitet u Beogradu – Institut za hemiju, tehnologiju i metalurgiju – Institut od
nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

dr Mirjana Cvetković, naučni saradnik
Univerzitet u Beogradu – Institut za hemiju, tehnologiju i metalurgiju – Institut od
nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

Datum odbrane: __. __. 2024. godine

Zahvalnica

Ova doktorska disertacija urađena je u laboratorijama Odeljenja za instrumentalnu analizu pri Katerdi za Organsku hemiju Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu i Centra za hemiju Instituta za hemiju, tehnologiju i metalurgiju Univerziteta u Beogradu pod rukovodstvom dr Ljubodraga Vujisića i dr Dejana Gođevca.

Profesoru dr Ljubodragu Vujisiću veoma sam zahvalan na nesebičnom angažovanju tokom izvođenja disertacije kao i svim korisnim sugestijama prilikom izrade i pisanja doktorata.

Dr Dejanu Gođevcu dugujem ogromnu zahvalnost za pomoć, podršku i korisne savete prilikom izrade disertacije. Razmena znanja i ideja koja mi je omogućena pod njegovim mentorstvom bila je od neprocenjivog značaja za moj naučni razvoj. Posebno bih naglasio preneto znanje iz eksperimentalne hemije. Hvala Vam što ste me uveli u svet metabolomike i omogućili slobodu prilikom istraživanja.

Ogromnu zahvalnost dugujem i članovima komisije profesoru dr Veletu Teševiću, dr Bobanu Anđelkoviću, dr Ivani Sofrenić, dr Jovani Stanković Jeremić i dr Mirjani Cvetković za pomoć i sugestije prilikom izrade, a naročito tokom pisanja ove disertacije.

Posebno bih istakao dr Bobana Anđelkovića i dr Ivanu Sofrenić zbog nesebične pomoći i truda koji su uložili u svim fazama izrade ove disertacije od planiranja eksperimenata do diskusije rezultata. Najviše sam zahvalan na prijateljstvu koje smo izgradili tokom mojih doktorskih studija.

Prilikom izrade eksperimenata obuhvaćenih ovom disertacijom imao sam veliku podršku i pomoć od strane zaposlenih na Odeljenju. Na lepom druženju, pomoći i podršci zahvalan sam Marini Todosijević i dr Milki Jadranin kao i kolegama iz laboratorije dr Gordani Krstić, Danici Savić i Stefanu Lekiću. Svim ostalim kolegama iz CIA odeljenja takođe sam zahvalan na prijatnoj atmosferi i pomoći.

Akademiku profesoru dr Slobodanu Milosavljeviću veoma sam zahvalan na korisnim savetima i prenesenom znanju. Velika je čast bila učiti od Vas.

Profesoru dr Marjanu Niketiću i dr Danilu Stojanoviću zahvalan sam na pomoći koja mi je pružena prilikom determinacije biljnog materijala.

Kolegama dr Petru Ristivojeviću, dr Gordani Zdunić i dr Katarini Šavkin zahvaljujem se na pomoći pri izradi dela doktorske disertacije koji se odnosio na adulteraciju aronije.

Mirjani Ristić i Stefanu Lekiću veoma sam zahvalan što su prilikom izrade svojih master radova učestvovali u izvođenju eksperimenata za ovu disertaciju.

Prijateljima Jovani Ljujić, Iris Đorđević, Mariji Šuljagić i Nikoli Horvackom malo je reći da sam zahvalan na podršci i svim provedenim lepim trenucima. Hvala vam što ste bili uvek tu za mene, razumeli me i davali mi snagu i u najizazovnijim trenucima. Veliko hvala za sve trenutke posle posla koji su mi pomogli da skrenem misli kada stvari nisu išle svojim tokom.

Katarini Simić nisam samo zahvalan na trudu, posvećenosti i angažovanju koji su definitivno unapredili ovu disertaciju već i na provedenim zajedničkim trenucima i безусловnoj podršci. Bilo je lakše proći ovim putem uz njenu pomoć. Deljenje radosti uspeha, ali i podrška u teškim trenucima, činili su ovaj put podnošljivijim i vrednijim. Hvala ti, tvoj doprinos će zauvek biti deo ove disertacije.

Zahvaljujem se tetka Malini koja je uvek bila moja podrška i verovala u moje sposobnosti.

Na samom kraju, ali uz najviše poštovanja zahvaljujem se sestri Milici, njenom suprugu Dušanu i baki Julijani. Svaki korak ka ostvarenju mojih ciljeva bio je lakši uz vašu podršku i ljubav. Tata, znam da bi bio ponosan na mene!

Svojoj majci Vesni posvećujem ovu disertaciju u znak zahvalnosti za sve ono što mi je pružila i načinila me osobom na koju sam danas ponosan. Uvek si bila moj oslonac i podrška u životu. Hvala ti za sve.

Autor

Metabolomički pristup u kontroli kvaliteta lekovitog bilja i biljnih preparata

SAŽETAK

Predmet proučavanja ove disertacije bio je ispitivanje biljnih vrsta *Origanum vulgare* (vranilova trava), *O. onites* (kritski origano), *Allium ursinum* (sremuš), *Aronia melanocarpa* (aronija) i *Tribulus terrestris* (babin zub) metabolomičkim pristupom. Identifikovana su jedinjenja koja su potencijalni biomarkeri adulteracije i autentičnosti ovih biljnih vrsta. Optimizovane su i razvijene metode instrumentalne analize uzoraka biljnog porekla, čiji su rezultati statistički obrađeni multivarijantnom analizom podataka. GC-MS metabolomičkom analizom detektovan je sorbitol kao biomarker adulteracije *O. vulgare* i *O. onites* sa maslinom (*Olea europaea*), hininska i šikiminska kiselina su pokazatelji adulteracije sa venecijanskim sumakom (*Cotinus coggygria*), dok različita zastupljenost hininske kiseline i fruktoze ukazuju na adulteraciju sa mirtom (*Mirtus communis*). NMR metabolomičkim otiskom prsta, izoviteksin, vicianin II, azetidin-2-karboksilna kiselina i trigonelin određeni su za biomarkere adulteracije sremuša sa đurđevkom (*Convallaria majalis*), dok je izoviteksin određen i kao biomarker adulteracije sa kozlacem (*Arum maculatum*). Primenom HPTLC metabolomičke analize detektovani su biomarkeri adulteracije ploda aronije. Betain je identifikovan kao marker adulteracije aronije sa vinobojkom (*Phytolacca americana*), petunidin-3-*O*-(*p*-kumaroil)-rutinozid-5-*O*-glukozid aronije sa pomoćnicom (*Solanum nigrum*), cijanidin-3-*O*-sambubiozid-5-*O*-glukozid, cijanidin 3,5-*O*-diglukozid i cijanidin-3-*O*-sambubiozid aronije sa zovom (*Sambucus nigra*). UPLC-MS/MS analizom autentičnih uzoraka biljke babin zub, dobijeni su biomarkeri autentičnosti koji su zatim detektovani i u komercijalnim uzorcima. Rutin i prototribestin su identifikovani kao biomarkeri prisutni u svim analiziranim uzorcima.

Ključne reči: metabolomika, adulteracija, hromatografija, multivarijantna analiza, *Origanum vulgare*, *Allium ursinum*, *Convallaria majalis*, *Arum maculatum*, *Aronia melanocarpa*, *Tribulus terrestris*

Naučna oblast : Hemija

Uža naučna oblast: Organska hemija

UDK broj: 547

Metabolomics approach to quality control of medicinal herbs and herbal products

ABSTRACT

The subject of this dissertation was the examination of the plant species *Origanum vulgare* (wild marjoram), *O. onites* (Cretan oregano), *Allium ursinum* (wild garlic), *Aronia melanocarpa* (chokeberry), and *Tribulus terrestris* (puncture vine) using a metabolomics approach. Compounds that are potential biomarkers of adulteration and the authenticity of these plant species have been identified. Methods for instrumental analysis of plant samples were optimized and developed, the results of which were statistically processed by multivariate data analysis. By GC-MS metabolomic analysis, sorbitol was detected as a biomarker of adulteration with olive (*Olea europea*), quinic and shikimic acids are indicators of adulteration with Venetian sumac (*Cotinus coggygria*), while different levels of quinic acid and fructose indicate adulteration with myrtle (*Mirtus communis*). Isoviteixin, vicenin II, azetidine-2-carboxylic acid, and trigonelline were determined by NMR metabolomic fingerprinting as biomarkers of adulteration of wild garlic with Lily of the valley (*Convallaria majalis*), while isoviteixin as a biomarker of adulteration with Adam and Eve (*Arum maculatum*). HPTLC metabolomic analysis detected biomarkers of adulteration in chokeberry. Betaine was identified as a marker of adulteration of pokeweed (*Phytolacca decandra*), petunidin-3-*O*-(*p*-coumaroyl)-rutinoside-5-*O*-glucoside chokeberry with black night shade (*Solanum nigrum*), cyanidin-3-*O*-sambubioside-5-*O*-glucoside, cyanidin 3,5-*O*-diglucoside, and cyanidin-3-*O*-sambubioside with elderberry (*Sambucus nigra*). Through UPLC-MS/MS analysis of puncture vine samples, biomarkers of authenticity were obtained, which were then detected in commercial samples. Rutin and prototribestin were identified as biomarkers present in all analyzed samples.

Key words: metabolomics, adulteration, chromatography, multivariate data analysis, *Origanum vulgare*, *Allium ursinum*, *Convallaria majalis*, *Arum maculatum*, *Aronia melanocarpa*, *Tribulus terrestris*

Scientific field: Chemistry

Scientific subfield: Organic Chemistry

UDC number: 547

SADRŽAJ

UVOD	1
1. OPŠTI DEO	2
1.1. Problematika adulteracije biljaka i biljnih preparata.....	2
1.1.1. Biljne vrste <i>Origanum vulgare</i> i <i>Origanum onites</i>	6
1.1.2. Biljna vrsta <i>Allium ursinum</i>	9
1.1.3. Biljna vrsta <i>Aronia melanocarpa</i>	11
1.1.4. Biljna vrsta <i>Tribulus terrestris</i>	12
1.2. Metode koje se koriste za utvrđivanje autentičnosti biljnih vrsta, hrane i suplemenata	15
1.2.1. Organoleptičko ocenjivanje	15
1.2.2. Molekularno-biološke metode	16
1.2.2.1. Makroskopska identifikacija.....	16
1.2.2.2. Mikroskopska identifikacija	17
1.2.3. Genetičko testiranje.....	17
1.2.4. Analitičke metode	19
1.2.4.1. Hromatografske tehnike.....	19
1.2.4.2. Spektroskopske tehnike	23
1.3. Hemometrijske metode u metabolomici biljaka.....	27
1.3.1. Primena metabolomike kod biljaka.....	27
1.3.2. Hemometrijski pristupi	28
1.3.3. Priprema i obrada podataka za analizu	30
2. NAŠI RADOVI.....	33
2.1. Primena GC-MS metabolomike u kontroli kvaliteta uzoraka <i>O. vulgare</i> i <i>O. onites</i>	34
2.1.1. Analiza GC-MS hromatograma	34
2.1.2. Multivarijantna analiza	39
2.2. Primena NMR metabolomike u kontroli kvaliteta uzoraka <i>A. ursinum</i>	41
2.2.1. NMR metabolomički otisak prsta	42
2.2.2. Multivarijantna analiza	43
2.2.3. Određivanje strukture biomarkera adulteracije.....	46
2.2.4. Primena PSYCHE NMR pulsne sekvence u metabolomici uzoraka sremuša.....	52
2.3. Primena HPTLC metabolomike u kontroli kvaliteta uzoraka <i>A. melanocarpa</i> (Michx.) Elliott	55
2.3.1. Morfološke karakteristike aronije i njenih čestih adulteranata	55
2.3.2. Identifikacija metabolita	56
2.3.3. Analiza glavnih komponenti	57

2.3.4. OPLS-DA.....	58
2.4. Primena tandemne masene spektrometrije u kontroli kvaliteta uzoraka <i>T. terrestris</i>	62
3. EKSPERIMENTALNI DEO.....	69
3.1. Instrumenti i rastvarači.....	69
3.2. Biljni materijal	70
3.3. Priprema uzoraka za ispitivanje	71
3.3.1. Priprema uzoraka <i>O. vulgare</i> i <i>O. onites</i> za GC-MS analizu	71
3.3.2. Priprema uzoraka <i>A. ursinum</i> za NMR analizu.....	72
3.3.3. Priprema uzoraka <i>A. melanocarpa</i> za HPTLC analizu	72
3.3.4. Priprema uzoraka <i>T. terrestris</i> za UPLC-MS/MS analizu.....	72
3.4. Instrumentalna analiza uzoraka i obrada podataka	73
3.4.1. <i>O. vulgare</i> i <i>O. onites</i>	73
3.4.2. <i>A. ursinum</i>	73
3.4.3. <i>A. melanocarpa</i>	74
3.4.4. <i>T. terrestris</i>	75
3.5. Izolovanje i prečišćavanje biomarkera iz <i>C. majalis</i>	75
3.6. Izolovanje i prečišćavanje biomarkera <i>A. maculatum</i>	77
3.7. LC-DAD-MS analiza biomarkera.....	77
4. ZAKLJUČAK	78
LITERATURA	79
PRILOZI	96
BIOGRAFIJA	113

SPISAK SIMBOLA I SKRAĆENICA

^{13}C NMR	^{13}C nuklearno-magnetna rezonantna spektroskopija (eng. ^{13}C Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy)
^1H NMR	^1H nuklearno-magnetna rezonantna spektroskopija (eng. ^1H Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy)
2D NMR	Dvodimenzionalna nuklearno-magnetna rezonantna spektroskopija (eng. Two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy)
ANOVA	Analiza varijanse (eng. Analysis of variance)
ATR	Metoda prigušene totalne refleksije (eng. Attenuated total reflectance)
BSTFA	<i>N,O</i> -bis(trimetilsilil)trifluoroacetamid
CD_3OD	Deuterisani metanol
COSY	Korelisana spektroskopija (eng. Correlated Spectroscopy)
CV	Krosvalidacija (eng. Cross-Validation)
D_2O	Deuterijum-oksid
DAD	Foto-diodni detektor (eng. Diode Array Detection)
DART	Direktna analiza u realnom vremenu (eng. Direct Analysis in Real Time)
DNK	Dezoksiribonukleinska kiselina
EI	Elektronska jonizacija (eng. Electron Ionization)
ESI	Elektrosprej jonizacija (eng. Electrospray ionization)
FAR	Daleka infracrvena oblast (eng. far infrared)
FID	Plameno-jonizujući detektor (eng. Flame ionization detector)
FT	Furijeova transformacija (eng. Fourier transform)
GC	Gasna hromatografija (eng. Gas Chromatography)
HMBC	Heteronuklearna korelacija višestrukih veza (eng. Heteronuclear Multiple Bond Correlation)
HPLC	Visokoefikasna tečna hromatografija (eng. High-Performance Liquid Chromatography)
HPTLC	Visokoefikasna tankoslojna hromatografija (eng. High-Performance thin layer chromatography)
HRMS	Masena spektrometrija visoke rezolucije (eng. High resolution mass spectrometry)
HSQC	Direktna heteronuklearna korelacija, preko jedne hemijske veze (eng. Heteronuclear Single Quantum Coherence)
IR	Infracrvena spektroskopija (eng. Infrared Spectroscopy)
<i>J</i>	Konstanta sprezanja dva protona
MID	Srednja infracrvena oblast (eng. mid infrared)
MRM	Praćenje više reakcija (eng. Multiple Reaction Monitoring)
MS	Masena spektrometrija (eng. mass spectrometry)
MS/MS	Tandemno masena spektrometrija

NIR	Bliska infracrvena oblast (eng. Near infrared)
NOESY	Dvodimenzionalna NOE spektroskopija (eng. Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy)
NP	Hromatografija normalnih faza (eng. Normal Phase)
NPR	Reagens za prirodne proizvode (eng. Natural product reagent)
OPLS-DA	Diskriminatna analiza ortogonalne parcijalne regresije najmanjih kvadrata skrivenih struktura (eng. Orthogonal partial least squares discriminant analysis)
PC	Glavna komponenta (eng. Principal component)
PCA	Analiza glavnih komponenti (eng. Principal component analysis)
PEG 4000	Polietilenglikol 4000 (eng. Polyethylene glycol 4000)
PLS	Analiza parcijalne regresije najmanjih kvadrata (eng. Partial least squares)
PLS-DA	Diskriminantna analiza parcijalne regresije najmanjih kvadrata (eng. Partial least squares-discriminant analysis)
PSYCHE	eng. Pure Shift Yielded by Chirp Excitation
RAPD	Nasumični umnožak polimorfne DNK (eng. Random Amplified Polymorphic DNA)
RP	Hromatografija obrnutih faza (eng. Reversed Phase)
SCAR-PCR	Umnožen region karakterisane sekvence - reakcija lančane polimerizacije (eng. Sequence Characterized Amplified Region - Polymerase chain reaction)
SIM	Praćenje jednog jona (eng. Selected Ion Monitoring)
SPE	Ekstrakcija na čvrstoj fazi (eng. Solid Phase Extraction)
SPME	Mikroekstrakcija na čvrstoj fazi (eng. solid phase microextraction)
TIC	Ukupna jonska struja (eng. Total Ion Current)
TLC	Tankoslojna hromatografija (Thin Layer Chromatography)
TOCSY	Totalno korelisana spektroskopija (eng. Total Correlated Spectroscopy)
TOF	Analizator vremena preleta (eng. Time of flight)
TSP-<i>d</i>₄	Natrijum-3-trimetilsilil-propionat-2,2,3,3- <i>d</i> ₄
UV/Vis	Ultraljubičasta i vidljiva spektroskopija (eng. Ultraviolet and Visible Spectroscopy)
VIP	Uticaj promenljive na projekciju (eng. Variable influence on projection)
VIPpred	Uticaj promenljive na projekciju prediktivnih komponenti (eng. Variable Influence on Projection of predictive components)
δ	Hemijsko pomeranje u ppm u NMR spektru

UVOD

Upotreba lekovitog bilja i biljnih preparata je u porastu svuda u svetu, što dovodi do povećanog rizika od nenamernih ili namernih prevara na tržištu. Slučajna adulteracija najčešće nastaje kao posledica, nestručnosti ljudi uključenih u postupak prikupljanja biljnog materijala i lošom kontrolom kvaliteta ulaznih sirovina, stvarajući tako proizvode lošijeg kvaliteta. Međutim, namerna adulteracija ima za cilj dodavanje neodgovarajućih sastojaka radi povećanja profita na tržištu. Na ovaj način nanosi se ekonomska šteta potrošačima, a može doći do ugrožavanja njihovog zdravlja, pa je kontrola kvaliteta lekovitog bilja i biljnih preparata izuzetno važna. Često zlonamerni proizvođači pronalaze razne načine da prevare standardne metode analize, pa je zbog toga neophodan razvoj novih, brzih i ekonomičnih analitičkih tehnika za očuvanje autentičnosti i bezbednosti biljnih proizvoda. [1,2]

Glavni cilj ove doktorske disertacije je razvijanje novih spektroskopskih i spektrometrijskih metoda za detekciju adulterisanih proizvoda na bazi lekovitog bilja sa metabolomičkim pristupom i upotrebom savremenih metoda multivarijantne analize podataka. U svrhu pronalaženja adulterisanih biljnih proizvoda, moderne tehnike, u sinergiji sa visokoefikasnim bioinformatičkim alatima (PCA, OPLS), primenjene su u analizi širokog spektra metabolita, s ciljem razumevanja njihovog doprinosa u kontroli kvaliteta lekovitih biljaka i biljnih preparata.

Ova doktorska disertacija sastoji se iz sledećih delova:

U **OPŠTEM DELU** dat je osvrt na problematiku adulteracije lekovitih biljaka, začina i hrane. Opisan je značaj kontrole kvaliteta biljaka i biljnih proizvoda i razvoj novih instrumentalnih tehnika koje bi se za tu svrhu koristile. Posebna pažnja je posvećena tehnikama koje se koriste za procenu autentičnosti i detekciju adulteracije. Opisane su ispitivane biljne vrste.

Poglavlje **NAŠI RADOVI** obuhvata rezultate koji su dobijeni prilikom izrade ove doktorske disertacije. Prikazani su rezultati primene GC-MS metabolomičke analize adulterisanih uzoraka origana (*O. vulgare* i *O. onites*), kao i NMR metabolomičkog otiska prsta za otkrivanje biomarkera adulteracije uzoraka sremuša (*A. ursinum*). Opisani su metaboliti koji ukazuju na adulteraciju crne aronije (*A. melanocarpa*) primenom HPTLC metabolomičkog pristupa i analizirano je prisustvo jedinjenja koja su autentična za biljku babin zub (*T. terrestris*) u komercijalnim uzorcima suplemenata primenom UPLC MS/MS tehnike.

EKSPERIMENTALNI DEO sadrži detaljne informacije o korišćenim rastvaračima, aparatima i računarskim programima, opis prikupljenog biljnog materijala, detaljan opis korišćenih metoda i tehnika, način pripreme uzoraka za metabolomičku analizu i postupak izolovanja jedinjenja.

U poglavlju **ZAKLJUČAK** su sumirani rezultati proizašli iz ove doktorske disertacije.

U poglavlju **PRILOZI** se nalaze 1D i 2D NMR spektri izolovanih jedinjenja, prečišćenih frakcija i ispitivanih ekstrakata. Takođe se nalaze hromatogrami i maseni spektri dobijeni LC-DAD-MS analizom.

U poglavlju **LITERATURA** navedeno je 267 literaturnih izvora koji su korišćene prilikom pisanja ovog rada, koji su navedeni na osnovu redosleda pojavljivanja u tekstu.

1. OPŠTI DEO

1.1. Problematika adulteracije biljaka i biljnih preparata

Upotreba lekovitog bilja i biljnih preparata za sprečavanje ili lečenje bolesti popularna je širom sveta. Duga je istorija korišćenja lekovitog bilja u tradicionalnim medicinama raznih zemalja, kao prirodnih lekova za bolesti, i za očuvanje zdravlja i vitalnosti organizma. Trgovina biljnim materijalom i sirovinama dovela je i do nenamerne ili namerne prodaje proizvoda lošijeg kvaliteta koji se povremeno stavljaju na tržište kao željeni. Kao rezultat adulteracije, dolazi do razlikovanja u samom sastavu, a nekada i u jačini očekivanih terapijskih delovanja. Pored toga što je adulteracija prisutna kod medicinskih biljaka i suplemenata koji se koriste kao dodaci ishrani, može se javiti i kod biljaka koje se koriste u ishrani. Adulteraciji podležu i botanički proizvodi koji se koriste u industriji lične nege, kozmetičkoj i prehrambenoj industriji (kao što su pića i nutricionističke pločice). Organoleptička procena kvaliteta biljaka (procena boje, oblika, mirisa i ukusa) se koristi već stotinama godina i bila je glavni način utvrđivanja identiteta botaničkog materijala. Uvreženo je mišljenje da se mnogi biljni preparati promovišu kao „prirodni”, što se izjednačava sa „bezbednim”. U literaturi se nalaze različite analitičke studije o falsifikatima i kontaminaciji proizvoda biljnog porekla, koje postavljaju pitanje da li su proizvodi uvek zaista originalni kako su označeni i mogu li naštetiti ljudskom zdravlju? [2–7]

Porastom trgovine botaničkih proizvoda, posebno u zapadnim zemljama, u cilju smanjenja transportnih i skladišnih troškova, trgovina sirovim biljkama zamenjena je trgovinom koncentrovanih oblika, kao što su etarska ulja i biljni ekstrakti. Ovo je predstavilo novi izazov kod utvrđivanja identiteta i autentičnosti sastojaka i gotovih proizvoda biljnog porekla. U poslednjih nekoliko decenija, porasla je potražnja i upotreba čajeva na biljnoj bazi, dijetetskih suplemenata i dodataka ishrani. Prema nekim istraživanjima procenjeno je da industrija ovih suplemenata dostiže vrednost od 41 milijarde evra u 2022. godini. Povećana potražnja, koja je praćena porastom cena i ograničenom ponudom određenih sastojaka, idealno je mesto za prevare i prodaju adulterisanih proizvoda. Metodama za hemijsku identifikaciju potvrđeno je da je oko 27% biljnih proizvoda, koji se nalaze na svetskom tržištu, adulterisano. U proseku, čak jedan od četiri ispitivana proizvoda iz 37 različitih zemalja, pokazuju da nisu autentični sa deklarisanim botaničkim poreklom. Adulterisani proizvodi predstavljaju oblik ekonomske prevare, čak i usled pogrešne identifikacije biljnih vrsta, i najčešće oni dostupni na tržištu nisu opasni po zdravlje ljudi. Poseban problem adulteracije predstavlja upotreba jeftinih sastojaka u suplementima visoke cene od strane proizvođača kako bi se ponudile manje cene proizvoda i na taj način negativno uticalo na konkurenciju, koja proizvodi autentične proizvode. [2,8,9]

Usled porasta potražnje proizvoda biljnog porekla na svetskom nivou, raste i njihova cena usled nedostatka sirovina, inflacije i pritiska na proizvođače da ponude manje cene u odnosu na konkurenciju, prisutna finansijski motivisana adulteracija nastavlja da bude stalan problem. Biljke koje se prodaju najčešće su usitnjene ili u prahu, te se lako mogu falsifikovati dodavanjem jeftinijih komponenti (razne hemikalije ili biljke sličnog izgleda) koje služe da povećaju zapreminu početne sirovine. Kao rezultat toga, dobavljači i proizvođači moraju biti svesni rizika za adulteraciju, kao i strategija kojima se koriste nepošteni prodavci sa ciljem da dovedu u zabludu analitičke laboratorije tražeći ograničenja i mane u primenjivim tehnikama koje se sada koriste za kontrolu kvaliteta. Usled toga, neophodno je uspostavljanje novih pristupa u kontroli kvaliteta za potvrdu autentičnosti biljnog materijala. Važno je da primenjene tehnike budu dovoljno precizne kako bi se potvrdio botanički sastojak i identifikovali svi adulteranti. Neretko jedan botanički sastojak može imati više oblika adulteracije, tako da je nemoguće primeniti jednu metodu kontrole kvaliteta za identifikaciju svake prevare.

U idealnom slučaju, ortogonalni pristup testiranju koji uključuje nekoliko komplementarnih analitičkih tehnika treba da se koristi za analizu botaničkih komponenti za koje je dokazano da su adulterisane. [1,8,10]

Kontaminacija hrane može imati ozbiljne posledice po zdravlje ljudi. U osnovi, postoji nekoliko tipova zagađivača kojima se hrana kontaminira: zagađivači iz životne sredine, zagađivači koji se javljaju prilikom prerade hrane, prisutni adulteranti, aditivi koji se dodaju u hranu, i jedinjenja koja migriraju iz ambalaže u kojoj je hrana zapakovana. Pored toga što svi navedeni faktori mogu dovesti do smanjenja kvaliteta hrane, predstavljaju pretnju i rizik po zdravlje ljudi. [11,12] Adulteracija može imati posledice na zdravlje ljudi jer može doći do trenutnog rizika i tokom kratkoročnog izlaganja, dovodeći tako do akutne toksičnosti ili smrti. Takođe, korisnik može na duže staze biti izložen potencijalnim hroničnim efektima. Taj efekat je posebno izražen kod potencijalnih alergija na hranu. Jedan od ekstremnih slučajeva je primer da se protein orašastog proizvoda, koji je jak alergen, našao u kuminu i paprici. Ako je poznato da se kod oko 4 % svetske populacije javljaju alergije na hranu, ovakav tip adulteracije može da ima fatalne posledice. [13,14] Kineski zvezdasti anis se koristi kao čaj za tretman tegoba grčeva kod dece, pa je njegova adulteracija sa japanskim zvezdastim anisom dovela je do intoksikacije. Japanski anis sadrži potentne neurotoksine (anisatin, neoanisatin i pseudoanisatin) koji mogu dovesti do neuroloških i gastrointestinalnih problema. Kako su pomenute vrste anisa vizuelno jako slične, hemijska analiza je neophodna kako bi se ove dve biljne vrste razlikovale. [15]

U poslednjih desetak godina, mnoge nezavisne i neprofitne organizacije, kao što su Američko Botanički Savet (ABC), Američka Biljna Farmakopeja (AHP), Nacionalni Centar za Istraživanje Prirodnih Proizvoda (NCNPR) i drugi, objavile su niz članaka o adulteraciji i prevarama na tržištu biljnih proizvoda i suplemenata. Takođe, pokrenule su program za edukaciju članova industrije biljnih i dijetetskih suplemenata o adulteraciji proizvoda. Prevare u globalnom lancu snabdevanja hranom postaju sve češće, te je neophodno primeniti strateški dobru kombinaciju efikasnih analitičkih alata, dovoljnog kapaciteta i preciznosti za otkrivanje neočekivanih bioloških i hemijskih falsifikata. Poseban izazov predstavlja razvoj specifičnog pristupa koji podrazumeva i veliki broj testiranja usled prisutnih varijacija u sastavu biljnih proizvoda. [12,16]

Identifikacija adulteracije u hrani i začинима predstavlja veliki izazov. Početna analiza obuhvata organoleptičku i makroskopsku procenu, zatim mikroskopsku analizu i na kraju, genetsku i hemijsku identifikaciju. Metode koje se koriste u određivanju autentičnosti dostupne su u zvaničnim Farmakopejama. Otežavajuća okolnost prilikom korišćenja klasičnih metoda se javlja kod usitnjenog biljnog materijala, ili pri analizi smeše začina. Kod aromatičnih biljaka koristi se analiza etarskih ulja, koja je ograničena i ne može se primeniti kod uzoraka gde su dodati nearomatični i inertni adulteranti. Osnovni problem tradicionalnih metoda za otkrivanje prevara u proizvodima biljnog porekla je zasnovanost na pristupu „ciljane liste”, gde je razvijena metodologija za praćenje i analizu skupa unapred poznatih jedinjenja. Iako su takve metode pogodne za rutinsku kontrolu kvaliteta, često ne uspevaju da otkriju pojedine falsifikate. U svetlu ovih saznanja, mnogo je bolje primeniti strategiju neciljane analize, zasnovanu na metabolomičkom pristupu u kombinaciji sa savremenim instrumentalnim tehnikama. Na taj način omogućiće se otkrivanje više neočekivanih slučajeva prevara koje su često i najveća pretnja po zdravstvenu bezbednost. [12,14,17]

Zbog svih navedenih činjenica, razvoj novih instrumentalnih tehnika je jako bitan za ovaj tip analize kako bi se mogla detektovati potencijalna prevara. Tehnike koje se koriste za proveru autentičnosti hrane treba da budu jeftine, brze, robustne, pouzdane i ekološki prihvatljive za kontrolu kvaliteta. Radi sveobuhvatnije analize poželjno je istovremeno primeniti više instrumentalnih tehnika. Statistička analiza nam pomaže da uočimo razlike u uzorcima koje nije moguće uočiti golim okom. [1,2,18–21] Instrumentalne analize od izbora su najčešće spektroskopske i hromatografske tehnike, kao što su UV/Vis spektroskopija, tačna hromatografija visokih performansi (HPLC) sa različitim detektorima, gasna hromatografija sa plameno-jonizacionim (GC-FID) ili masenim detektorom (MS), infracrvena spektroskopija (IR) itd. Dve tehnike koje su se izdvojile kao vodeće za detekciju adulteracije, su tačna hromatografija i infracrvena spektroskopija. Pored toga, vizuelna mikroskopija se često koristi za ispitivanje bilja i začina koji nisu u formi praha. [2]

Prehrambena biljna industrija najčešće je žrtva ekonomski motivisane adulteracije. Neki od najčešćih slučajeva adulteracije medicinskih biljaka i začina prikazani su **Tabeli 1**, gde se uočava da većina navedenih biljaka ima čestu primenu u svakodnevnom životu. Pored toga, primetno je razvijanje nekoliko metoda za detekciju adulteracije za svaku biljnu vrstu. Za čili, origano, kumin i ostale, često je u upotrebi analiza DNK markera koja pruža brzu i jeftinu metodu. Spektroskopske tehnike poput UV/Vis, IR i nuklearno-magnetne rezonantne (NMR) spektroskopije u kombinaciji sa hemometrijskim metodama se sve više koriste u borbi protiv prevara jer su brze i robustne tehnike.

Vinovnici adulteracije su sve više upoznati sa analitičnim pristupima koje se koriste za potvrdu autentičnosti biljnih proizvoda, te na osnovu tih saznanja razvijaju nove načine za prikrivanje adulteracije. Dobar primer koji ovo ilustruje je adulteracija ekstrakta semena grejpfruta koji se prodaje kao prirodni konzervans i antiseptik. Krajem prošlog veka, i početkom ovog pronadjeni su razni adulteranti kao što su parabeni, triklosani, benzetonijum-hlorid, cetrimonijum-bromid i deciltrimetilamonijum-hlorid. Pošto cetrimonium-bromid i deciltrimetilamonijum-hlorid nemaju hromoforu, nije ih moguće detektovati HPLC-UV/Vis tehnikom, koja je najčešće primenjivana instrumentalna tehnika za analizu u najvećem broju laboratorija i široko primenjiva u kontroli kvaliteta ekstrakata semena grejpfruta. Iako su nove analitičke metode poboljšale sposobnost utvrđivanja autentičnosti biljnih sastojaka i određivanja njihovog hemijskog sastava, kao i otkrivanje falsifikata, neki od zlonamernih proizvođača su uspeali da pronađu načine da prevare potencijalne kupce. U određenim slučajevima, pribegavaju i slanju adulterisanih uzoraka na analizu kako bi utvrdili da li se prevara može otkriti. [2,22,23]

Jedan od poznatijih slučajeva trovanja hranom, usled pogrešne identifikacije, imala je 53-godišnja žena iz Japana. Simptomi trovanja su uključivali povraćanje, smanjenje krvnog pritiska i otkucaja srca čak tri i po sata nakon konzumacije kuvane divlje biljke za koju je mislila da je *Hosta montana*, ali je kasnije identifikovana kao toksična *Veratrum album subsp. okisepalum* Hult. Štaviše, Black i saradnici su utvrdili da je od 75 analiziranih uzoraka različitih začina i bilja dobijenih sa tržišta kod 24% pokazano prisustvo kontaminanata. [10,24] Dve osobe iz Iraka slučajno su pojele *Digitalis purpurea* misleći da jedu kuvani kupus ubran u Edinburgu, jer je ličio na istu biljku koju jedu u svojoj domovini. [25] Jedna starija gospođa je na pijaci u Šapcu prodavala pečurke, deklarisanе kao vrganje, što je na kraju dovelo do smrti jedne osobe i trovanja više ljudi koji su hospitalizovani. Gospođa je prodavala više vrsta pečuraka od kojih je jedna bila zelena pupavka (*Amanita phalloides*), izuzetno otrovna vrsta. [26,27] Opšteprihvaćeno je mišljenje da povećanje učestalosti trovanja biljnom hranom usled pogrešne identifikacije potiče od tri glavna uzroka. Prvi uzrok je smanjeno znanje iz botanike usled smanjenog kontakta sa prirodom korisnika koji žive u urbanim sredinama. Drugi uzrok predstavlja loše znanje botaničara koji pogrešno identifikuje otrovne kao jestive biljne vrste. Razlog za to je mala razlika u morfološkim karakteristikama između vrsta. Treći i glavni uzrok je vezan za pojavu novih, neautohtonih vrsta na određenom području, što dovodi do pogrešne identifikacije od strane ljudi bez botaničkog znanja, ali i od strane botaničkih stručnjaka. [28]

Prema SZO oko dve milijardi ljudi je gojazno, pa je i upotreba biljnih suplemenata za smanjenje telesne težine sve više u porastu. Uglavnom se na deklaraciji navodi sastav biljnog porekla, međutim postoje dokazi o čestoj adulteraciji sa lekovima za lečenje gojaznosti, kao i laksativima i diureticima. Antidepresivi fenproporex i fluoksetin su takođe česti adulteranti, kao i sibutramin, diazepam, amfepramon i dr. U Srbiji je zabeležen jedan slučaj adulteracije „zelene kafe za mršavljenje” u kojoj se nalazio sibutramin. Uzorci zelene kafe su prošli ispitivanja nadležnih institucija na komponente koje su se nalazile na deklaraciji, međutim sibutramin nije bio naveden, a pošto zelena kafa spada u dijetetske suplemente ona ne podleže odobravanju za upotrebu od strane Agencije za lekove i medicinska sredstva Srbije. Simptomi koji su korisnici zelene kafe navodili su tahikardija, otežano disanje i nesvestica. [29] Zbog ovakvih slučajeva neophodna je detaljna hemijska analiza suplemenata za smanjenje telesne težine i jasna detekcija svih prisutnih komponenti. [30]

Tabela 1. Primeri biljnih kultura, njihovih čestih adulteranata i metoda detekcije

Biljna kultura	Adulterant	Metoda detekcije	Izvor
Čili, <i>Capsicum spp.</i>	ulje, pirinčano brašno, mekinje, piljevina	PCR-SCAR	[31–33]
Origano, <i>Origanum spp.</i>	listovi mitre, venecijanskog sumaka, listovi masline	SCAR-PCR, LC-MS/MS, FTIR, GC-MS,	[10,17,34–37]
Kumin, <i>Cuminum cyminum</i>	badem, kikiriki, orašasti plodovi, seme komorača, ljuska kikirikija	DNA analiza, analiza antitela, Mikroskopija, MS	[1,13]
Crni biber	čili, heljda, proso, papaja	NIR, FTIR, DNA barkodiranje	[38–41]
Kineski vezdasti anis, <i>Illicium verum</i>	japanski zvezdasti anis	DART-HRMS,	[15,42,43]
Paprika, <i>Capsicum spp.</i>	bela paprika, kurkuma, barijum-sulfat, cigla, odmašćena paprika, ljuska paradajza	ICP-MS	[40,44,45]
Šafran, <i>Crocus sativus</i>	šafran nepoznatog porekla, cvekla, vlakna nara, crveno obojena svilena vlakna, šafranika, vlakna želatina, sandalovina, kurkuma, prah čempresa, skrob	DNK barkodiranje, SCAR-PCR, LC-HRMS, NMR, FTIR,	[46–51]
Kurkuma, <i>Curcuma longa</i>	prah krede, <i>C. malabarica</i> , <i>C. zedoaria</i> , sintetički kurkumin	Terahertz spektroskopija, SCAR-PCR	[2,52,53]
Lišće ginko drveta, <i>Ginkgo biloba</i>	ekstrakti bogati rutinom	HPTLC, HPLC, MS; IR, NIR, Raman, NMR	[2]
Azijski ženšen, <i>Panax ginseng</i>	ekstrakti lišća ženšena, ekstrakti <i>Panax quinquefolius</i>	HPTLC, HPLC, MS	[2]
Brusnica, <i>Vaccinium macrocarpon</i>	ekstrakt crnog pirinča, ekstrakt hibiskusa, ekstrakt semena grožđa, ekstrakt ljuske kikirikija	UV/Vis, HPTLC, HPLC, IR, NIR, NMR, Raman	[2]
Borovnica, <i>Vaccinium myrtillus</i>	ekstrakt crnog pirinča, ekstrakt borovnice, ekstrakt duda	UV/Vis	[2]
Beli luk, <i>Allium sativum</i>	kukurzni skrob	Raman, FTIR	[54]

Med, kao pčelinji proizvod, definiše se kao prirodna slatka supstanca koja se dobija iz nektara. Hemijski sastav meda obuhvata visoku zastupljenost glukoze i fruktoze, pored njih i druge mono- i polisaharide. U medu se nalaze i aminokiseline, organske kiseline, fenolna jedinjenja, proteini, itd. [55] Usled njegove velike potražnje i visoke cene na tržištu, med je proizvod koji je sklon adulteraciji. Nedavnom analizom 25 uzoraka meda na srpskom tržištu, analiziranih pomoću masene spektrometrije odnosa stabilnih izotopa (IRMS) za procenu autentičnosti prehrambenih proizvoda, čak 88% uzoraka meda je bilo adulterisano. Utvrđeno je prisustvo dodatog šećera u različitim procentima u ispitivanim uzorcima. Odnos stabilnih izotopa ugljenika $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ u medu može biti pokazatelj dodatih šećernih sirupa. Moderne instrumentalne tehnike u kombinaciji sa hemometrijskom analizom predstavljaju obećavajući pristup za dokaz autentičnosti meda. [55–58]

Pored meda, prirodni pčelinji vosak predstavlja veliki izvor zarade. Dobija se topljenjem pčelinjeg saća, a njegov hemijski sastav čine razna organska jedinjenja, ugljovodonici, dugolančani alkoholi, i masne kiseline. Glavne komponente voska su estri masnih kiselina (70–75%) i dugolančanih alkohola. Pčelinji vosak se upotrebljava za proizvodnju satnih osnova za košnice pčela, za proizvodnju sveća, u proizvodnji predmeta od kože i kozmetičkoj i prehrambenoj industriji. Zbog njegove velike potražnje, meša se sa jeftinijim supstancama koje liče na vosak, te je često adulterisan parafinom, mikrokristalnim parafinom, lojem i stearinskom kiselinom. Na ovaj način dolazi do finansijski motivisane adulteracije, jer prirodni pčelinji vosak je mnogo skuplji od parafina koji se najčešće dodaje da bi povećala količina. Pošto je parafin bele boje, obično se dodaju i boje kako bi adulterisan vosak izgledao što sličniji prirodnom. [59] Upotreba parafina i drugih naftnih derivata kao adulteranta može imati posledice na ljudsko zdravlje, jer je prilikom gorenja moguće oslobađanje kancerogenih supstanci kao što su poliaromatični ugljovodonici (PAH-ovi). Za analizu voska najčešće se koriste fizičko-hemijske metode određivanja estarskog i saponifikacionog broja, tačke topljenja, permeabilnost, kao i instrumentalne metode poput visokotemperaturne gasne hromatografije (HT-GC) i infracrvene spektroskopije sa Furijeovom transformacijom koristeći prigušenu totalnu refleksiju kao tehniku snimanja (FTIR-ATR). Primenom FTIR-ATR metode moguća je detekcija traka koje potiču od dodate stearinske kiseline ili goveđeg loja, dok karakteristična C=O valenciona traka, koja potiče od estara, može ukazati na čistoću voska. [60–62]

1.1.1. Biljne vrste *Origanum vulgare* i *Origanum onites*

Ime roda *Origanum* potiče od grčkih reči *oros*, što znači planina, i *ganos*, što znači radost, odnosi se na prelep aspekt koji ova biljka daje regionima u kojima se uzgaja. Biljke koje pripadaju rodu *Origanum* su višegodišnje zeljaste biljke i čini ga preko 43 biljne vrste, od kojih većina raste u oblasti Mediterana. Listovi su nazubljeni i jajastog oblika, dok su cvetovi složeni u male klasove koji grade metlice štitastog oblika. [63,64] Postoje četiri grupe origana koje su naziv dobile na osnovu česte upotrebe i ekonomskog značaja:

- ✦ Grčki origano (*Origanum vulgare* subsp. *hirtus* (Link) letswaart)
- ✦ Španski origano (*Coridohymus capitatu* (L.) Hoffmanns and Links)
- ✦ Kritski origano (*Origanum onites* L.)
- ✦ Meksički origano (*Lippia graveolens* Kunth or *Lippia berlandieri*)

Ovi glavni tipovi origana su značajni usled karakteristične arome koja potiče od različitih odnosa timola, karvakrola i *p*-cimena. Pripadnici roda *Origanum* koriste se kao arome u hrani i alkoholnim pićima. Etarsko ulje origana ima dokazano antimikrobno dejstvo prema mnogim patogenim bakterijama, a pokazano je da inhibira i rast određenih gljivica. Nosioci aktivnosti u etarskom ulju su monoterpeni, naročito timol i karvakrol. Zbog svojih antimikrobnih i

antioksidativnih aktivnosti, origano je idealan prirodni konzervans, što je značajno zbog povećane potrebe za pronalaskom alternativa na bazi prirodnih konzervansa. [65,66]

Azevedo i autori odredili su *in vitro* antimikrobnu aktivnost etarskog ulja *O. vulgare* L. protiv gram pozitivnih bakterija *Listeria monocitogenes*, *Aeromonas hydrophila* i *Enterococcus faecalis*, pri čemu je etarsko ulje origana mešano sa hitozanom kako bi se poboljšala njihova antimikrobna aktivnost. [67] Etarsko ulje *O. vulgare* pokazalo je značajnu antimikrobnu aktivnost prema *E. coli*, *S. aureus*, *B. subtilis*, i *S. cerevisiae*, što je detektovano skenirajućom elektronskom mikroskopijom. [68] Ispitivanjem etarskih ulja tri vrste origana: *O. vulgare*, *O. onites* i *O. majorana*, pokazano je da inhibiraju rast sledećih mikroorganizama: *E. coli*, *S. cerevisiae*, *L. anguillarum*, *Vibrio splendidus*, *V. alginolyticus*. [69] Pored antimikrobne, etarsko ulje i ekstrakti origana pokazuju i antioksidativnu aktivnost. Pored timola i karvakrola, značajnu antioksidativnu aktivnost pokazuju fenolna jedinjenja i njihovi glukozidi. Korišćenjem HPLC/MS tehnike u ekstraktu meksičkog origana pronađeno je preko dvadeset flavonoida. Jedinjenja identifikovana kao nosioci aktivnosti su luteolin-7-*O*-glukozid, apigenin-7-*O*-glukozid, taksifolin, kvercetin, naringenin itd. [70]

O. vulgare (Slika 1) ili vranilova trava, zastupljen je na teritoriji Srbije. Višegodišnja je biljka čija stabljika pri osnovi leži na zemlji, dok je ostalim delom uspravna i prilično snažna, visoka od 20 do 50 cm. Listovi su jajastog oblika, dužine od 1-4 cm. *O. vulgare* naseljava obronke sušnih staništa, siromašne livade i svetlije listopadne šume do 2000 metara nadmorske visine. [71]

O. onites je višegodišnja biljka koja raste do 100 cm u visinu. Rasprostranjena je u istočnoj Mediteranskoj oblasti. Zastupljena je na mnogim grčkim ostrvima, kao i južnom i zapadnom delu Turske. [72]



Slika 1. *Origanum vulgare*, preuzeto iz [73]

Najčešće korišćen kulinarski začin za picu i mediteransku kuhinju je origano. [74] Zbog njegove široke upotrebe često je adulterisan sa biljkama koje su jeftinije i predstavlja biljku koja se najviše adulteriše na tržištu. [10,75] Iako u rod *Origanum* spada veliki broj vrsta, samo mali broj je prihvaćen na tržištu. Sve vrste origana, prema ISO 7925:1999, smatraju se tržišnim osim *O. majorana*. Međutim, prema ESA (evropsko udruženje začina) samo se *O. vulgare* i *O. onites* ili njihove mešavine mogu smatrati „pravim” origanom. [76] Da bi se prodavali, *O. vulgare* i *O. onites*, mogu sadržati najviše do 2% nečistoća. [77] Po Evropskoj farmakopeji, pored *O. Onites*, podvrsta *O. vulgare* se smatra kao „pravi” origano, a to je *O. vulgare* subsp. *hirtum* (Link) Ietsw. [78]

Pored prevara koje su karakteristične za prodaju vrsta koje nisu dostupne na tržištu, komercijalno dostupan origano je često pomešan sa mnogim biljkama od kojih se izdvajaju cistus (*Cistus*), listovi masline (*O. europaea*), mirte (*Myrtus*), sumaka, čubrice i lišća bobičastog voća

(*Rubus* spp., Rosaceae). Pored toga, meša se sa biljkama čije etarsko ulje podseća na origano (*S. montana*, *O. majorana*, *P. anisum*, *C. avelana*), kao i sa veštački obojenim pšeničnim mekinjama (*T. aestivum*). U praksi, velike kompanije koje se bave prodajom nabavljaju velike količine origana od trećih lica. Reprezentativan uzorak se analizira, najčešće morfološkom analizom pomoću mikroskopije, da bi mu se utvrdila autentičnost. Ova tehnika je jako spora, a njena preciznost zavisi od osobe koja je sprovodi. Zbog toga je bitno razvijati nove tehnike za analizu u kontroli kvaliteta uzoraka origana. [74,79]

Za procenu autentičnosti i čistoće origana često se primenjuje makroskopska i mikroskopska analiza. Po Evropskoj Farmakopeji, tankoslojna hromatografija se takođe može koristiti. Pored njih, korišćeno je više instrumentalnih tehnika za proveru kvaliteta origana, kao što su: infracrvena spektroskopija sa furijeovom transformacijom (FTIR), tečna hromatografija u kombinaciji sa masenom spektrometrijom visoke rezolucije (LC-HRMS) i nuklearno-magnetno rezonantna spektroskopija (NMR). [36,74]

Primenom GC-MS metode moguća je detekcija adulteracije origana sa lišćem masline. Direktnim injektovanjem sirovih etanolnih ekstrakata, pronađena su dva jedinjenja sa nepoznatom hemijskom strukturom kao markeri adulteracije. [80,81] U većini uzoraka origana koji su pripremljeni po QuEChERS proceduri (eng. Quick Easy Cheap Effective Rugged Safe), a zatim analizirani pomoću gasne i tečne hromatografije sa trostrukim kvadrupolnim (QqQ) masenim analizatorom, detektovani su tragovi pesticida, od kojih je 55 identifikovano. Analizirani su autentični uzorci, kao i adulterisani uzorci origana. U dve grupe uzoraka određen je različit sadržaj i koncentracija pesticida. Dobijeni rezultat može biti posledica različitih tretmana origana i adulteranata, usled čega su adulterisani uzorci origana imali veću učestalost pesticida, sa prosečno 7,5 pesticida po uzorku u poređenju sa 5,1 u pravom origanu. Acetamiprid, difenilamin i hlorspirifos su pronađeni u obe grupe uzoraka, ali su lambda-cihalotrin, deltametrin, ciflutrin, permetrin i metidation bili češći u adulterisanim uzorcima. OPLS-DA metodom pokazano je da se u adulterisanim uzorcima nalazi više od 10% (od normalizovanih koncentracija) ciflutrina, lambda-cihalotrin i piriproksena. Pored toga, pesticid piriproksipofen je detektovan samo u adulterisanim uzorcima, pošto se koristi za prskanje lišća masline, pa njegovo prisustvo ukazuje na adulteraciju. Pored njega, i prisustvo pirotrioda ukazuje na adulteraciju. [75]

Analizirani su uzorci origana i lišće adulteranata (masline, mirte, lešnika, cistusa i sumaka) pomoću FTIR spektroskopije u kombinaciji sa multivarijantnom analizom. Uočene razlike u spektru nalaze se u oblasti „otiska prsta”, od 900 do 1800 cm^{-1} . U oblasti od 1100 do 1400 cm^{-1} nalaze se valencione vibracije C-O veze, od 1400 do 1500 cm^{-1} C-O i C-C valencionih vibracija fenolnih grupa, dok su u oblasti od 1500 do 1600 cm^{-1} aromatične C-C valencione i N-H deformacione vibracije, a oblast od 1600 do 1740 cm^{-1} odgovara N-H deformacionim i C=O valencionim vibracijama. Pokazatelj adulteracije origana sa lišćem masline je porast trake na 1315 cm^{-1} u infracrvenom spektru. Koristeći multivarijantnu analizu, analizu glavnih komponenti (PCA) i diskriminantnu analizu ortogonalne parcijalne regresije najmanjih kvadrata skrivenih struktura (OPLS-DA), pokazano je da je moguće razlikovati adulterisane uzorke od čistih. [10] U jednoj studiji sprovedenoj u Italiji, razmatrane su dve instrumentalne tehnike za detekciju adulteracije origana, sa njegovim čestim matriksom, lišćem masline. Korišćene su FT-NIR (bliska infracrvena spektroskopija sa furijeovom transformacijom) i LPAS (laserska fotoakustična spektroskopija) tehnike. Upotrebnom multivarijantne analize i statističkih modela poput PCA, PLS-R i PLS-DA moguće je klasifikovati autentične uzorke od adulterisanih. FT-NIR tehnika je dala bolje rezultate od LPAS. [82]

Razvijeno je više SCAR metoda (eng. Sequence Characterized Amplified Regions) za detekciju adulteranata u uzorcima origana analizom SCAR markera za identifikaciju sledećih adulteranata: *O. europea* L., *Satureja montana*, *Rhus coriaria* L., *Rubus caesius* L., *Cistus incanus* L. Ova metoda omogućava detekciju lišća masline čija je zastupljenost 1% u uzorcima osušenog origana, na osnovu čega se ova metoda može smatrati pogodnom za kontrolu kvaliteta komercijanih uzoraka origana. [17,36,83] SCAR tehniku odlikuju visoka tačnost i preciznost, bez

uvida u fitohemijska svojstva uzorka. Uzorak origana visokog kvaliteta se sastoji od lišća i brakteja, sa što manje udela stabljike, što upućuje na neophodnu upotrebu dodatnih tehnika poput mikroskopske identifikacije, kako bi se dobila dodatna potvrda o kvalitetu. Važno je napomenuti, da se u nekim biljkama nalaze sekundarni metaboliti karakteristični za određene organe biljke, a njihovo prisustvo je ključno za aromu. U svrhu detekcije tih metabolita najbolje je primeniti hromatografske tehnike, dok SCAR metodom njihova detekcija nije moguća. [84]

U metabolomičkoj studiji koja se zasniva na primeni NMR tehnike u proceni kvaliteta uzoraka origana, uzorci su prikupljeni iz komercijalnih izvora. Morfološka analiza obuhvatala je prvi korak kako bi se jasno razlikovali *O. onites* i *O. vulgare* uzorci. Analizirano je 27 uzoraka origana, 12 *O. vulgare*, 11 *O. onites*, i dva uzorka su sadržala smešu obe vrste. Spektralni podaci, dobijeni nakon ekstrakcije uzoraka smešom CD₃OD i fosfatnog pufera u D₂O (pH 6), podvrgnuti su multivarijantnoj analizi. Rezultati PCA analize su bili u saglasnosti sa morfološkom analizom, sa izuzetkom kod par uzoraka, koji su isključeni iz dalje analize. Analizom OPLS-DA modela, utvrđeni su biomarkeri karakteristični za *O. vulgare* (salvianolična kiselina B) i *O. onites* (apigenin i *p*-cimen). Rozmarinska kiselina i timol su detektovani u oba uzorka i predstavljaju biomarkere koji karakterišu čistoću origana. Pored određivanja karakterističnih jedinjenja za autentičnost i čistoću origana, identifikovana su jedinjenja kao markeri adulteracije sa čestim adulterantima. Identifikovan je pinitol kao biomarker adulteracije sa *C. criticus*. Ovim se demonstrira značaj metabolomike kao važne metode za kontrolu kvaliteta uzoraka origana, koja omogućava istovremeno dobijanje podataka o samim uzorcima origana, kao i o prisutnim adulterantima. Kako bi ovaj pristup postao univerzalan i jednostavan za primenu, potrebno je napraviti biblioteke podataka, koje bi se koristile za kontrolu kvaliteta i svima bile dostupne. Jednom ¹H NMR analizom dobio bi se uvid u hemijski profil najzastupljenijih primarnih i sekundarnih metabolita u biljnom uzorku. Kombinacija literaturnih podataka, 2D NMR spektroskopije i drugih tehnika omogućava identifikaciju biomarkera koji karakterišu čistoću biljnih vrsta, kao i adulteraciju. [74]

1.1.2. Biljna vrsta *Allium ursinum*

Biljka *A. ursinum* L. (poznatija kao sremuš, divlji luk, ramson ili medvedi luk) već vekovima se koristi u tradicionalnoj medicini i kao začini i salata. Pripada porodici *Alliaceae*, a naziv potiče od latinske reči *ursus* što znači medved, zasnovano na narodnim verovanjima da medved ovu biljku konzumira kada se probudi iz hibernacije. Raste na plodnom zemljištu (**Slika 2**), u hladu na vlažnim mestima, a često se može pronaći u šumama na teritoriji Evrope i Severne Azije. Sremuš je tipični predstavnik roda *Allium* kada su u pitanju morfološke karakteristike (**Slika 3**). Javlja se u proleće, lukovica mu je izdužena i veličine do 6 cm, okružena slojevima čiste pokožice sa samo nekoliko vlakana u osnovi. Ponekad se formiraju ćerke lukovice, što je važno za vegetativno razmnožavanje. Veličina nadzemnog dela može biti od 20 do 50 cm koji se sastoji od triketoizne, uspravne cvetne stabljike. Na vrhu stabljike nalazi se poluloptasta cvast u obliku kišobrana koji čini oko dvadesetak snežno belih cvetova. [85,86]



Slika 2. Sremuš, okolina Valjeva, planina Jablanik

Sremuš odlikuje karakterističan miris belog luka usled prisustva sumpornih jedinjenja koja su zaslužna za njegovu karakterističnu aromu – aliin, metiin, izoaliin i proiin. U poslednje vreme, *A. ursinum* je privukao pažnju moderne medicine zbog raznovrsnih zdravstvenih efekata. Mnoge studije su pokazale pozitivan efekat na prevenciju i lečenje kardiovaskularnih oboljenja, potvrđeno je antioksidativno i antiproliferativno dejstvo sremuša. Dobijeni rezultati doveli su do povećane upotrebe sremuša u sirovom obliku, a i njegovu upotrebu kao dodatak ishrani. [86,87]

Lišće *A. ursinum* ima morfološke sličnosti sa mnogim biljnim vrstama što može dovesti do potencijalne adulteracije na tržištu. Zabeleženi su slučajevi trovanja usled pogrešne identifikacije *A. ursinum* sa *Colchicum autumnale*, *Convallaria majalis* i *Vertebratum album* L. Usled sličnosti izduženih listova *C. autumnale* i sremuša otežano je njihovo raspoznavanje. *C. autumnale* sadrži otrovne alkaloidne koji sprečavaju deobu ćelija i inhibiraju mitozu, pa pacijenti dobiju dijareju nekoliko sati nakon unošenja, a konzumiranje većih količina može izazvati mnogo veća oštećenja. [88–92]



Slika 3. Ilustracija biljke *Allium ursinum*, preuzeto iz [93]

C. majalis (đurđevak) i *A. maculatum* (Adam i Eva, kozlac, zmijino grožđe) rastu na istom lokalitetu i periodu kao i *A. ursinum*. Štaviše, sve tri vrste odlikuju morfološke sličnosti, posebno njihovih mladih listova. Đurđevak je otrovna biljka rasprostranjena u umerenoj klimi severne hemisfere, koja sadrži srčane glikozide čija se toksičnost pripisuje inhibiciji enzima Na^+/K^+ -ATP-azne pumpe. Intoksikacija može izazvati sinusnu tahikardiju, srčani blok, fibrilaciju i na kraju srčani zastoј. [94] *A. maculatum* je šumska biljna vrsta rasprostranjena širom pojasa umerene klime severne hemisfere. Iako se listovi *A. maculatum* koriste za pripremu hrane u nekim kulturama, [95] svi delovi biljke mogu izazvati alergijske reakcije kod ljudi pa je neophodno pažljivo rukovanje. [96] Posebno su otrovne bobice, bogate oksalatima i saponinima, koje izazivaju oticanje grla, otežano disanje, jake bolove, peckanje i bol u želucu. [97]

1.1.3. Biljna vrsta *Aronia melanocarpa*

Biljka aronija (*A. melanocarpa* (Michx.) Elliott), u narodu je poznata kao Sibirski borovnica, pripada porodici Rosaceae koju odlikuje tradicionalna upotreba u ishrani i medicini. Obiluje polifenolima, naročito antocijanima, flavanolima, fenolnim kiselinama i protoantocijanidinima koji su značajna biološki aktivna jedinjenja. Pored mnogo korisnih efekata po zdravlje ljudi, ekstrakti aronije i njen sok pokazuju antioksidativnu, antihipertenzivnu i hipolipidemijsku aktivnost. U ishrani se često koriste *A. arbutifolia* (crvena aronija) i *A. melanocarpa* (crna aronija), u narodu se više koristi crna aronija jer sadrži više biološki aktivnih jedinjenja. Plodovi sveže aronije se prerađuju i koriste najčešće u vidu soka, sirupa, vina ili džema. [98]

Potiče sa prostora Kanade i Severne Amerike. Uzgaja se na zemljištu koje ima prosečnu vlažnost, dobro je drenirano i voli da bude izložena suncu. Žbun aronije je otvoren, uspravan i raširen, pomalo zaobljen, i uglavnom visine do jednog metra, sa glatkim listovima i belo-rozastim cvetovima. Naziv roda potiče od grčke reči *aria*, koja je naziv za vrstu *sorbus* čiji plodovi podsećaju na aroniju. Specifičan epitet potiče od reči *melano* što znači „crno” i *carpa* što znači „voće” u odnosu na boju zrelog voća ove vrste. Plodovi su jestivi, oporog i gorkog ukusa, a ukoliko nisu potpuno zreli izuzetno su opori i mogu izazvati gušenje kod nekih ljudi. [99,100]



Slika 4. Plod aronije, preuzeta iz [101]

Hemijski sastav aronije, posebno *A. melanocarpa* (Slika 4.), je bogat i raznolik, što doprinosi njenim zdravstvenim benefitima. Najznačajnija jedinjenja koja ulaze u sastavu aronije su polifenoli, konkretno antocijani i procijanidini, koji najviše doprinose antioksidativnoj aktivnosti. Većinom se nalaze u formi polimera gde je (–)–epikatehin osnovna jedinica. Najzastupljeniji antocijani su cijanidin-3-*O*-galaksozid i cijanidin-3-*O*-arabinozid, dok su najzastupljenije fenolne kiseline hlorogenska i neohlorogenska. Taninini su prisutni u manjoj količini i zaslužni su za opor ukus aronije. U zavisnosti od sorte i uslova gajenja sadržaj fenolnih jedinjenja može da varira od 2 do 8 g/100g suve aronije. Pored fenolnih jedinjenja, aronija je izvor šećera, pektina i sorbitola. [99,102–107]

Polifenoli aronije pokazuju brojne biološke aktivnosti, uključujući antioksidativno, antimutageno, antidijabetičko, kardioprotektivno, gastroprotektivno, hepatoprotektivno, antiinflamatorno, antikancerogeno i geroprotektivno dejstvo. Cijanidin-3-*O*-arabinozid, antocijan, poseduje najveću antioksidativnu aktivnost, uklanjanjem DPPH radikala i afinitetom prema antioksidativnim enzimima, uklanjajući reaktivne kiseonične vrste. Potencijalno sprečava komplikacije povezane sa dijabetesom i poboljšava kardiovaskularne funkcije. [102–104,108]

Iako je aronija vrsta koja se godinama gaji u Srbiji, 2013. godine prijavljen je slučaj moguće prevare kada su bobice toksične biljke *Solanum nigrum* prodate kupcu na pijaci umesto aronije. Srećom, primećena je razlika i slučaj je prijavljen policiji. Takođe, na departmanu za voćarstvo Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu u Srbiji, sprovedena je identifikacija voća otkupljenog kao aronija od strane građana iz različitih delova Srbije, kada je u većini slučajeva zaključeno da se radi o otrovnoj *S. nigrum*. Slična analiza sprovedena je u Institutu za istraživanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić” kada su od pet uzoraka, dva potvrđena kao *Phitolacca americana*, dva kao *S. nigrum*, a jedan kao *Sambucus ebulus*. Važno je napomenuti da plodovi biljke *P. americana* mogu biti toksični. [109] Zbog svega navedenog, kontrola kvaliteta aronije privlači pažnju farmaceuta i analitičara i napravljen je niz laboratorijskih vodiča u kojima visokoefikasna tankoslojna hromatografija (HPTLC) figurira kao jedna od metoda izbora za analizu biljaka bogatih fenolnim jedinjenjima, a posebno antocijanima. [16]

Ekstrakti aronije nekada se koriste kao adulteranti drugim biljkama. U nekim uzorcima ekstrakata borovnice detektovana su jedinjenja koja su karakteristična za aroniju. [110] Fitohemijским otiskom prsta primenom HPTLC, HPLC ili UV/Vis metoda dobijen je najefikasniji pristup za razlikovanje ekstrakta ploda borovnice i njegovih glavnih adulteranata biljnog porekla kao što su *A. melanocarpa* (Michx.) Elliott, *Morus nigra* L., *Prunus avium* (L.) L., *Sambucus nigra* L., *Vaccinium uliginosum* L. [111] Uprkos sve većoj upotrebi proizvoda na bazi bobičastog voća kao funkcionalne hrane u prehrambenoj industriji, postoji ograničen broj studija u vezi sa analitičkim metodama za procenu kvaliteta aronije. Razvijene su metode za analizu DNK markera na osnovu kojih je moguće razlikovanje komercijalnih uzoraka koji sadrže aroniju, borovnicu, brusnicu i jagodu. [112]

1.1.4. Biljna vrsta *Tribulus terrestris*

T. terrestris je zeljasta jednogodišnja biljka koju odlikuje raznovrstan hemijski sastav. Biljka pripada porodici Zygophyllaceae, koja obuhvata oko dvadeset vrsta. Na našim prostorima poznata je pod nazivom babin zub, dok u drugim delovima sveta ima razne nazive poput đavolje trepavice, kozje glave, đavoljeg trna i mačije glave. Ovi nazivi potiču od neobičnog oblika ploda (Slika 5) i dobila je naziv od grčke reči *tris* što znači tri i *bolos* što znači strela. Naziv *terrestris* znači zemljani, jer biljka raste uz samu zemlju. Ova biljka je rasprostranjena u suvim i toplim klimatskim područjima širom sveta, uključujući Evropu, Aziju, Afriku i Australiju. [113–115]



Slika 5. *T. terrestris*, Zemun, Srbija Foto: Prof. dr Vele Tešević

Raste kao korov pored njiva i puteva. Karakteristični izgled *T. terrestris* obuhvata grm niskog rasta sa sitnim listovima i žutim cvetovima. Kao ispružena raste od 10 do 60 cm u obliku žbuna ili „tepiha”. Listovi rastu nasuprot jedan drugom, nejednakog papirnatog oblika, a cvet je žute boje. Plodovi su zvezdastog oblika prekriveni kockicama svetlo žute ili zelenkastožute boje. Koren biljke je vlaknastog oblika, često razgranat, najčešće veličine od 7 do 18 cm. Plodovi biljke su u Kini poznati pod nazivom „Chih-hsing” ili u SAD kao kozja glava. Sferičnog su oblika, i na njima se nalaze bodlje po kojima su prepoznatljivi, pomoću kojih se biljka štiti od predatora. [115,116]

Biljku *T. terrestris* odlikuje bogat fitohemijski sastav. Dosadašnja istraživanja su pokazala da je biljka bogata saponinima, flavonoidima, alkaloidima, glukozidima i taninima. Međutim, najviše pažnje privlače saponini, posebno protodioscin, koji se smatra glavnom aktivnom komponentnom. Hemijski sastav saponina može da varira u zavisnosti od geografskog porekla biljke. Ovi saponini imaju pogodan uticaj na ljudsko zdravlje, posebno na reproduktivno zdravlje i sportske performanse. Pored saponina, u biljci se nalazi značajna količina flavonoidnih jedinjenja. Neki od izolovanih jedinjenja su poput kaempferola, kaempferol-3-glukozida, tribulozida, kaempferol-3-rutinozida. Pored njih, prisutni su i derivati kafeične kiseline, glukozidi kvercetina i rutin. Prisutni su alkaloidi harmin, harman, norharman, β -karbolin, tribulusterin, tribulusamid C, tribulusimid C, terestramid, *N-trans*-kafeoilamin, koji pripadaju uglavnom β -karbolinskim i amidnim alkaloidima. [115,117–121]

Od najzastupljenijih saponina, u ovoj biljci se nalaze saponini furostanskog i spirostanskog tipa kao što su tigogenin, neotigogenin, gitogenin, neogitogenin, hekogenin, neohekogenin, diosgenin, hlorogenin, ruskogenin i sarsasapogenin. Štaviše, identifikovana su četiri sulfatna saponina tipa diosgenin i tigogenin. Protodioscin i protogracilin su najzastupljeniji saponini među furostanskim glikozidima, dok se spirostanski glikozidi nalaze u tragovima. [120,122]

U narodnoj medicini, biljka *T. terrestris* se često koristi kao afrodizijak i podrška seksualnoj funkciji. Istraživanja su ukazala na doprinos u regulaciji nivoa testosterona, što može imati pozitivan uticaj na mišićnu masu i sportske performanse. Protodioscin ima širok spektar potencijalnih benefita po ljudsko zdravlje, a jedan od ključnih je uticaj na regulaciju i proizvodnju testosterona. Takođe,

podstiče lučenje luteinizirajućeg hormona iz hipofize, što dalje stimulise sintezu testosterona u testisima. Povećani nivoi testosterona, zajedno sa povećanim dehidrotestosteronom i dehidroepiandrosteronom (DHEA) nastaju kao posledica konverzije protodioscina u DHEA, sugerisu na aktivnost afrodizijaka. Ovaj benefit može biti od koristi kod ljudi koji se aktivno bave sportom, jer povećan testosteron može dovesti do povećane mišićne mase, veće snage i duže izdržljivosti prilikom treninga. Saponini pozitivno utiču na potenciju kod muškaraca a poseduju i antioksidativnu aktivnost. Od sedamdesetih godina prošlog veka promoviše se korišćenje suplemenata koji u sebi sadrže saponine iz *T. terrestris* kod bodibildera. Najčešće se u organizam unose saponini iz *T. terrestris* putem tinkture (alkoholni rastvori ekstrakta), u obliku kapsula ili tableta kao dodatak ishrani. Komercijalno dostupni suplementi koji sadrže ovaj biljni ekstrakt, čistoću ekstrakta definišu kao procentni sastav ukupnih saponina. [117,123–128]

Geografsko poreklo uzoraka *T. terrestris* ima važan uticaj na koncentraciju i sastav steroidnih saponina prisutnih u biljci, što ukazuje na prisustvo različitih hemotipova. Saponini sa *cis* kofiguracijom A/B prstenova nalaze se isključivo na kineskom području, gde dominiraju i saponini tigogeninskog, gitogeninskog i hekogeninskog tipa, dok saponini gitogeninskog tipa nedostaju kod uzoraka indijskog i bugarskog porekla, a samo su kod *T. terrestris* bugarskog porekla detektovani sulfatni spirostanolni i furostanolni saponini. Sadržaj protodioscina može dosta da varira u uzorcima koji potiču sa područja Kine, Indije i Bugarske. Indijski uzorci su pokazali potpuno drugačiji profil saponina u poređenju sa uzorcima iz Kine i Bugarske. Zbog pomenutih varijacija neophodna je procena kvaliteta uzoraka biljnog porekla i analiza njihovih glavnih komponenti. [129]

Usled sve veće potražnje suplemenata na biljnoj bazi, a smanjene upotrebe sintetičkih jedinjenja i lekova, ostavljen je prostor za pojavu „prirodnih” suplemenata na tržištu, koji imaju neverovatne zdravstvene benefite. FTIR spektroskopija se pokazala kao pogodna tehnika u analizi sirovog materijala *T. terrestris* koji su adulterisani sa PDE-5 inhibitorima (inhibitori fosfodiesteraze tip 5) kao što su sildenafil, vardenafil i tadalafil. Ova jedinjenja se koriste za tretiranje erektilne disfunkcije i često su pronađeni u „prirodnim” suplementima za potenciju muškaraca. Njihova upotreba dovodi do nastanka crvenila i bolova u mišićima kod muškaraca, a kada se upotrebljavaju sa nitratom jedinjenjima mogu drastično smanjiti krvni pritisak. [130] Naciljani otisak prsta u kombinaciji sa UHPLC-HRMS izabran je kao pristup za analizu čeških biljnih proizvoda koji pozitivno utiču na mušku erekciju. Pored *T. terrestris*, analizirani su proizvodi od biljnih vrsta *Panax ginseng*, *Ginkgo biloba*, *Epimedium alpinum*, *Capsicum annuum* i *Cordyceps sinensis* itd. [131] Strategija bazirana na otisku prsta i hemometriji iskorišćena je u analizi belgijskih biljnih vrsta koje se koriste u suplementima. Korišćene su HPLC-DAD i FTIR tehnike za analizu, a podaci su obrađeni multivarijantom analizom. Od pet ispitivanih uzoraka, u četiri nije detektovano prisustvo *T. terrestris*. [132] Analizom proizvoda, koji sadrži mešavinu više biljnih vrsta, DNK barkodiranjem uspešno je potvrđeno prisustvo *T. terrestris*. [133] Analizom anaboličkih steroida i seksualnih stimulansa u 50 dijetetskih suplemenata u Brazilu, u uzorcima gde se po deklaraciji nalazio *T. terrestris* kao adulterant pronađen je tadalafil. [134]

1.2. Metode koje se koriste za utvrđivanje autentičnosti biljnih vrsta, hrane i suplemenata

1.2.1. Organoleptičko ocenjivanje

Organoleptičko ocenjivanje odnosi se na senzorno ocenjivanje nekog proizvoda na osnovu izgleda, arome, ukusa, teksture i kvaliteta koje čovek percipira. Jedno je od bitnih načina za utvrđivanje autentičnosti biljaka. Tehnike makroskopske identifikacije i senzornog ocenjivanja, odnosno organoleptike, se prevashodno primenjuju kod sirovog biljnog materijala ili celih sasušanih biljaka. Farmakopeje i *Materia medicas* pružaju detaljna uputstva o načinima za sprovođenje organoleptičkog ispitivanja lekovitog bilja. Kod organoleptičkih ispitivanja, svi senzorni parametri se smatraju relevantnim i kao što je već ranije rečeno, uključuju boju, teksturu, miris, ukus i osećaj u ustima. [135] Intenziteti boje i ukusa su dobar pokazatelj kvaliteta nekog proizvoda, pa tako aktivna komponenta berberin ima izrazito žutu do zlatno žutu boju i intenzivan gorak ukus. Koren zlatice je bogat ovim jedinjenjem i odsustvo ili slaba obojenost sa primesama zelene, kao i smanjen intenzitet gorčine ukazuju na loš kvalitet sirovine koja nije adekvatno čuvana, ili je dugo skladištena usled čega je došlo do propadanja uzorka. [136] Kvalitet korena se može rangirati određivanjem „indeksa gorčine” koji je opisan u većini farmakopeja. Kao i za bilo koju drugu analitičku tehniku, analitičari moraju biti dobro obučeni za izvođenje i dokumentovanje procene na naučno validan i relevantan način. Da bi se minimizirao subjektivni osećaj ocenjivača koriste se različite skale za primarne ukuse kao što su oštrina (Skovilova skala), skala slatkoće, kiselosti, slanoće, skala fiksnih intervala, kao i već pomenuta gorčina. Uspostavljen je sistem bodovanja i postupak „kalibracije” organoleptičkih procenitelja. [137] Falsifikatori često pokušavaju da imitiraju autentične proizvode i na taj način obmanjuju kupce. Imitacija izgleda i ukusa je jako česta pojava kod praškastih uzoraka. Dodatak veštačkih boja je čest slučaj kako bi se imitirali biljni pigmenti. Boje se u nekim slučajevima dodaju da bi se poboljšao izgled proizvoda i kako bi korisnik imao percepciju o većoj vrednosti proizvoda. Koristi se prirodna ili sintetička boja, a mogu se dodavati i njihove mešavine ili dodatak obojenih ekstrakata bogatih jedinjenjima koja pripadaju istoj klasi. Jedan od najpoznatijih primera je adulteracija šafrana sa crvenom kukuruznom svilom (*Zea mays*, *Poaceae*). [133,138]

Primeri za adulteraciju primenom prehrambenih boja je dodavanje azo-boja paprici ili šafranu, nedeklarisani dodatak olovo-hromata ili dodatak Metanil Yellow boje korenu kurkume. [139,140] Iako neuobičajeno, prodaja voćnog ekstrakta borovnice koji sadrži boju *Amaranth* takođe spada u ovu kategoriju, ova vrsta adulteracije se primenjuje u obmani testova koji određuju ukupan sadržaj antocijanina primenom UV/Vis spektrofotometrije. [141] Pored toga, isti princip adulteracije javlja se kod masnih ulja, kada se dodaju boje radi usklađivanja sa organoleptičkim specifikacijama. Poznat je slučaj dodavanja hlorofila biljnim uljima u uzorak označen kao maslinovo ulje [142] kao i dodatak β -karotena suncokretovom ulju koje se prodaje kao ulje od morske bukovine. [143]

Jedan od najpoznatijih primera imitacije ukusa je vanila, prodaja sintetičkog vanilina često kao prirodne arome vanile ili ekstrakta vanile. [144,145] Adulteracija ovog tipa je postala toliko precizna da se u nekim slučajevima sintetički vanilin obogaćuje izotopom ^{13}C da bi odnos izotopa $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ bio kao u prirodnom vanilinu, određivanjem specifičnih izotopa i dalje se mogu otkriti takve adulteracije. [146] Slični načini falsifikovanja ukusa prijavljeni su sa uljima kore cimeta, zimzelena (*Gaultheria procumbens*, *Ericaceae*) i kore breze (*Betula lenta*, *Betulaceae*). U slučaju cimeta, prah od kore drveta može se adulterisati pripremanjem praha kore bukve (*Fagus* spp., *Fagaceae*) koji je aromatizovan cinamaldehydom, nosiocem arome u cimetu. Ulje od kore cimeta se obično zamenjuje jeftinijim uljem listova cimeta. [147] Poznato je da su ulja zimzelena i breze adulterisana sintetičkim metil-salicilatom. Ova vrsta adulteracije se najčešće otkriva korišćenjem odnosa stabilnih izotopa (npr. $^2\text{H}/^1\text{H}$, $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ili $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$). [148,149]

Adulteracija etarskih ulja ima dugu istoriju, pošto su ta ulja uglavnom skupa, a detekcija dodatih sastojaka otežana. Ovaj tip adulteracije primenjuje se u obmani organoleptičkih testova za mirise i arome. Etarska ulja koja se najčešće adulterišu su ulja kore bergamonta, kore breze, kore cimeta, kore indijske sandalovine, cveta lavande, lista matičnjaka, lista nane, latica ruže i listova

čajevca. [150,151] Često se adulteranti dodaju u koncentracijama koje se smatraju ekonomski isplativim, ali teškim za detekciju. Mogu se koristiti i mirisi botaničkog porekla, a koji nisu etarska ulja, kao što je u slučaju lažnog praha asafetide prijavljenog u Indiji, koji je napravljen od pšeničnog brašna dodatkom vode asafetide i materiala koji sadrži sumpor, što je dalo tipičan miris asafetidi. [152]

1.2.2. Molekularno-biološke metode

1.2.2.1. Makroskopska identifikacija

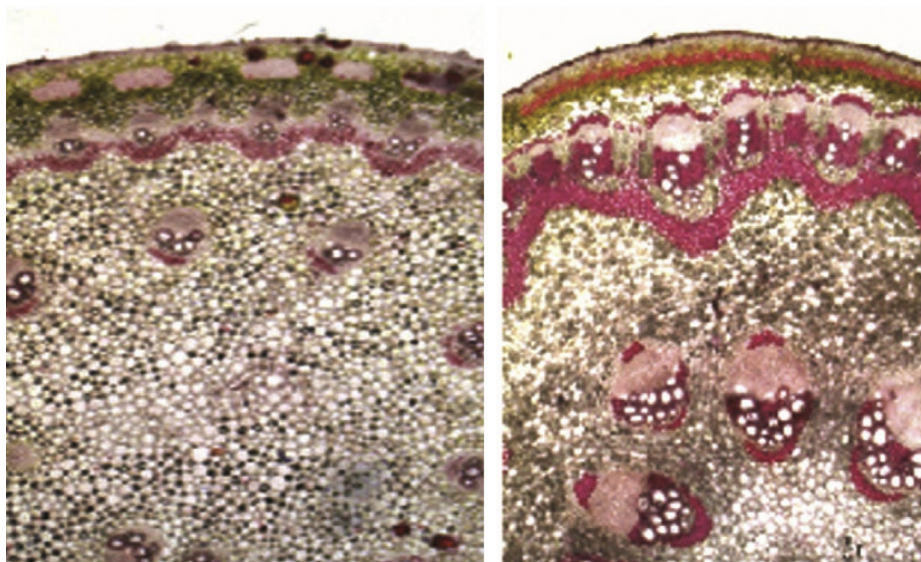
Makroskopska identifikacija bilja i hrane podrazumeva ispitivanje fizičkih karakteristika koji su vidljivi golim okom kako bi se identifikovali i klasifikovali različiti biljni materijali ili prehrambeni proizvodi. Ova metoda se zasniva na posmatranje karakteristika ispitivanog uzorka, kao što su boja, oblik, tekstura, veličina, miris i druge karakteristične osobine, kako bi se uočila razlika između različitih biljaka, začina, voća, povrća i ostalih prehrambenih proizvoda. Na **Slici 6** prikazan je primer markoskopske identifikacije *Curcuma aromatica* i *C. zedoaria*. Za biljke, makroskopska identifikacija može uključivati ispitivanje listova, stabljika, cvetova, semena i korena kako bi se odredila njena vrsta ili sorta, što može biti korisno u oblastima kao što su tradicionalna medicina i botanička istraživanja. U farmakopejama, za različite biljne vrste definisan je oblik, veličina, boja, spoljašnje karakteristike, tekstura, prelomi, unutrašnja boja, a opisani su i miris, ukus i osećaj u ustima. Navedene karakteristike potvrđuju identitet biljke dok intenzitet boje, ukusa i mirisa direktno upućuju na njen kvalitet. Biljka *Arctostaphylos uva-ursi*, komercijalno je dostupna kao osušena cela biljka, dok samo njeni listovi sadrže aktivnu komponentu arbutin. Usled toga, jasno je definisan maksimalni dozvoljeni udeo smeđih i oštećenih listova. Vizuelnom analizom boje cele biljke i listova, moguće je utvrditi udeo oštećenih, međutim kod fino smrvljenih listova vizuelna identifikacija nije moguća i usled toga se javlja prostor za manipulacije sa biljkama lošijeg kvaliteta. [137] Kod prehrambenih proizvoda, makroskopska identifikacija može pomoći u kontroli kvaliteta, analizi svežine i autentičnosti sastojaka. Na primer, vizuelnim pregledom voća i povrća mogu se ustanoviti zrelosti, oštećenja ili pokvarenost. U žitaricama i pahuljicama, makroskopski pregled može detektovati strane supstance, zarazu insektima ili druge zagađivače. Dok makroskopska identifikacija pruža vredne informacije, ona se često dopunjava drugim analitičkim tehnikama kao što su mikroskopija, hemijska analiza ili molekularne metode za precizniju i sveobuhvatniju karakterizaciju biljaka i prehrambenih proizvoda. [153–156]



Slika 6. Varijacije boje rizoma kod *C. aromatica* (levo) i njenog falsifikovanog entiteta *C. zedoaria* (desno), preuzeto iz [153]

1.2.2.2. Mikroskopska identifikacija

Mikroskopija je tradicionalna metoda za identifikaciju biljaka. Mikroskopijom se analizira unutrašnjost tkiva i strukture ćelija kako bi se razlikovale biljne vrste. Često se primenjuje u laboratorijama za kontrolu kvaliteta u cilju određivanja karakteristika tkiva u celim, isečenim ili biljkama koje su usitnjene u prah. Izbor materijala, priprema isečaka i posmatranje su tri glavna koraka uključena u ovu proceduru. Isecci poprečnog ili uzdužnog preseka, prah i dezintegrisana tkiva se pripremaju za mikroskopsko ispitivanje, a informacije za identifikaciju vrste se zasnivaju na razlikama u histološkoj strukturi. Najveći izazov je razlikovanje srodnih vrsta usled sličnih taksonomskih karakteristika, što kao posledicu ima otežanu detekciju adulteracije sa srodnim biljkama. Postoji mnogo slučajeva namerne adulteracije korišćenjem takvog pristupa, odnosno biljkama istog roda. Neki od primera je zamena crnog kohoša (*Actaea racemosa*), biljka koja divlje raste samo u Istočnoj i Severnoj Americi, sa *Actaea* vrstama azijskog porekla. Azijski ženšen (*Panax ginseng*) se često zamenjuje sa američkim ženšenom (*P. quinquefolius*), a sibirski ženšen sa *Eleutherococcus* vrstama. Na **Slici 7** predstavljen je primer varijacije u anatomiji stabljike kod dve vrste bibera *Piper colubrinum* i *P. nigrum*. Nekada adulteracija ne mora biti namerna, može biti usled zabune oko narodnih naziva. Eurofins laboratorije za analizu hrane za ljude i životinje u Nemačkoj, ne samo da obezbeđuju autentičnost biljnih uzorka identifikacijom makroskopskih (pomoću stereomikroskopa) i mikroskopskih (pomoću svetlosnog mikroskopa) svojstava, već omogućavaju i uvid u čistoću proizvoda identifikacijom mogućih stranih materija. [153,157–159]



Slika 7. Varijacije u anatomiji stabljike kod dve vrste bibera. *P. colubrinum* (levo) i *P. nigrum* (desno), preuzeto iz [153]

1.2.3. Genetičko testiranje

Primena DNK metoda u određivanju autentičnosti biljnih vrsta počela je još osamdesetih godina prošlog veka, dok je njena primena za analizu sastojaka dijetetskih suplemenata počela tek 2010. godine. U tom periodu su analitičke laboratorije započele analize autentičnosti koristeći DNK markere, a akademske laboratorije su dobijale rezultate o sastavu komercijalnih biljnih dijetetskih suplemenata koristeći DNK barkodiranje, DNK metabarkodiranje, DNK sekvenciranje i druge metode. Nakon razvijenih metoda, DNK markeri su postali sve popularnija sredstva za identifikaciju i autentifikaciju velikog asortimana prehrambenih proizvoda, kao i lekovitih i aromatičnih biljaka. Prednosti tih analiza u odnosu na fitohemijske su niska cena opreme, mogućnost analiziranja velikog

broja uzoraka za kratko vreme, kao i mnogo efikasnija i preciznija detekcija adulteranata. [1] U **Tabeli 1** predstavljen je značaj DNK analize za detekciju adulterisanog bilja i začina.

Poslednjih godina, metoda umnoženih regiona karakterističnih sekvenci reakcijom lančane polimerizacije (SCAR-PCR metoda) i DNK barkodiranje postaju poželjne metode za otkrivanje prevara u hrani. SCAR-PCR je unapređena RAPD metoda (nasumični umnožak polimorfne DNK) analize markera. Primena RAPD markera predstavljaju brzu i jeftinu analizu, ali imaju lošu ponovljivost rezultata. Zbog toga su razvijeni SCAR prajmeri gde se povećala specifičnost i ponovljivost. SCAR metoda detektuje DNK fragmente koji se umnožavaju PCR tehnikom koristeći specifične prajmere, dizajnirane na osnovu nukleotidnih sekvenci iz kloniranih RAPD fragmenata. [160] SCAR markeri su robustni i veoma efikasni, a za analizu je potrebna mala količina uzorka, nanogramskog reda veličina. Pored toga, mogu se koristiti kao kvalitativni i kvantitativni parametri za identifikaciju biljnih uzoraka. Kada se biljne vrste nalaze u smešama poželjno je analizirati nešto veću količinu uzorka. Primena SCAR markera u kontroli kvaliteta je ključna za obezbeđivanje autentičnosti i efikasnosti biljnih lekova, međutim razvijeni su za samo određene lekovite biljke, što ograničava njihovu primenu. Za eksperimentalno izvođenje ove analize neophodna je posebna obučanost analitičara, posedovanje određenog znanja iz oblasti molekularne biologije i bioinformatike, kao i specifična oprema. [1,160–162]

Mnoge metode genetičkog testiranja je moguće obmanuti, analizom različitih delova biljaka od onih koji su naznačeni (poput lista umesto korena) ili dodatkom inertnih materijala koji u sebi ne sadrže genetički materijal (laktoza i maltodekstin). U praksi, ovakvi pokušaji su vrlo retki, verovatno usled male rasprostranjenosti metoda za utvrđivanje identiteta vrste ili autentičnosti proizvoda zasnovanih na DNK analizi. [163]

Primenom DNK markera otkriveni su adulteranti mediteranskog origana, *O. majorama* i *S. montana*, koji su pripadali drugim biljnim vrstama iste porodice Lamiaceae ili roda *Origanum*. [36] SCAR markeri predstavljaju pogodnu metodu za ispitivanje autentičnosti osušenih komercijalnih uzoraka šafrana. Šafran spada u jedan od najskupljih začina na svetu, pored toga primenu je našao i kao boja i u industriji parfema. Svetsko tržište šafrana vredi oko milijardu dolara, gde se proizvede oko 300 tona godišnje. Zbog velike potražnje i visoke cene, predmet je česte adulteracije. Razvijena je metoda za detekciju sedam čestih reagenasa za povećanje zapremine kod šafrana (*Arnica montana*, *Bixa orellana*, *Calendula officinalis*, *Carthamus tinctorius*, *Crocus vernus*, *Curcuma longa* i *Hemerocallis sp.*). Ova metoda ima sposobnost detekcije od 1 do 5% zastupljenosti navedenih adulteranata. [50,164]

DNK barkodiranje je relativno novija metoda, razvijena početkom ovog veka. Bazira se na promenljivosti unutar standardnog regiona genoma, DNK barkod koji predstavlja kratak deo DNK lanca iz određenog gena. Primenuje se u analizi hrane širokog spektra, čak i visoko procesirane. Omogućava detekciju 0,5% prisutnog adulteranta u uzorcima crnog bibera (*P. nigrum* L., porodica Piperaceae), gde je od devet analiziranih uzoraka, u dva uzorka detektovano prisustvo čilija. [38,165,166]

Metode koje se zasnivaju na primeni DNK analize u detekciji adulteracije u lekovitom bilju i začинима su uglavnom kvalitativne, dok su kvantitativna određivanja ograničene pouzdanosti. Ograničenja ovih metoda su smanjena čistoća DNK, mala efikasnost prilikom ekstrakcije i rizik od slučajne kontaminacije. [167]

1.2.4. Analitičke metode

Za analizu uzoraka biljnog porekla trenutno se koriste analitičke tehnike koje uključuju hromatografske metode kao što su HPTLC, tečna hromatografija visokih performansi (HPLC) u kombinaciji sa tehnikama za određivanje strukture, kao što je masena spektrometrija, gasna hromatografija u kombinaciji sa masenom spektrometrijom (GC-MS). Sve više se koristi i direktna analiza u realnom vremenu (DART) u kombinaciji sa masenim spektrometrom koji meri vreme preleta (TOF). Spektroskopske metode uključuju FTIR, Ramanovu i NMR spektroskopiju. [168]

1.2.4.1. Hromatografske tehnike

U analitičkoj hemiji, hromatografske tehnike predstavljaju ključne metode za razdvajanje, kao i kvalitativna i kvantitativna određivanja različitih jedinjenja u komplikovanim smešama. Gasna hromatografija (GC), tečna hromatografija (LC) i tankoslojna hromatografija (TLC) su najpoznatije tehnike koje se koriste prilikom analize biljnih uzoraka. Svaka od navedenih tehnika ima određenu primenu. GC se koristi za analizu uzoraka koji su lako isparljivi, dok se LC primenjuje za analizu polarnijih jedinjenja većih molekulskih masa. Kuplovanjem sa masenom spektrometrijom (MS) omogućena je direktna identifikacija jedinjenja i povećana osetljivost detekcije. TLC se koristi za brzu analizu manje komplikovanih smeša. [153]

Gasna hromatografija sa masenom spektrometrijom (GC-MS)

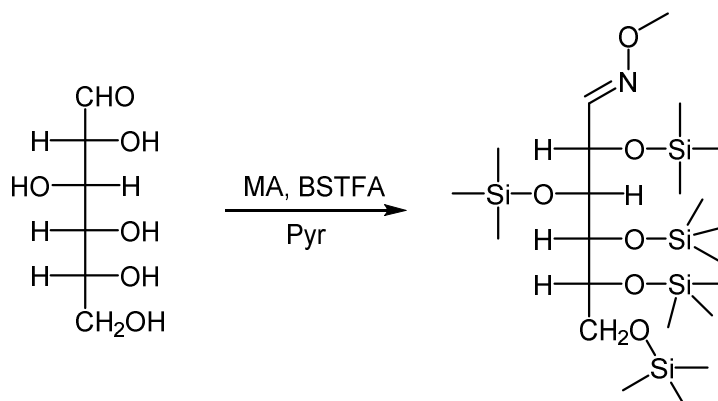
Kuplovanje GC sa EI/MS je jedna od najstarijih hibridnih tehnika u analitičkoj hemiji i smatra se jednom od razvijenijih, rasprostranjenijih i visokoosetljivih instrumentalnih tehnika za metabolomičku analizu. GC-MS poseduje veliku moć hromatografskog razdvajanja, robusna je metoda za kvantifikaciju i može da identifikuje metabolite sa visokom tačnošću. Jedna je od prvih metoda koje su primenjene za metabolomičko profilisanje i ciljanu analizu. Pogodna je tehnika za analizu jedinjenja malih molekulskih masa, koja su isparljiva ili se mogu prevesti u isparljiva, termalno stabilna jedinjenja, putem hemijske derivatizacije pre analize. Ovo se pre svega odnosi na primarne metabolite, kao što su aminokiseline, amini, šećeri, organske kiseline, masne kiseline, dugolančani alkoholi i steroli, dok je za detekciju šireg spektra metabolita, uključujući sekundarne metabolite kao što su alkaloidi, terpeni i flavonoidi, pogodnija LC-MS tehnika. Pomoću GC-MS tehnike moguće je uraditi identifikaciju i kvantifikaciju nekoliko stotina metabolita istovremeno koji se nalaze u jednom biljnom ekstraktu. Na taj način omogućena je analiza centralnog puta u primarnom metabolizmu. Najveću prednost predstavlja dostupnost protokola i velike baze podataka jedinjenja za identifikaciju, što je proizvod duge primene ove tehnike. Iako nijedna analitička tehnika ne može da analizira ceo metabolom, GC-MS može da analizira širok spektar različitih klasa jedinjenja, naročito ako se kombinuje sa reakcijama derivatizacije uzoraka (silanizovanje, metilovanje, acetilovanje). Upotrebom GC-TOF-MS tehnike skraćuje se vreme analize i dobija precizna masa jona, koja može biti od velikog značaja pri rešavanju struktura tokom analize biljnih ekstrakta nepoznatog hemijskog sastava, jer omogućava uvid u izotopski sastav molekuskog i fragmentacionih jona. [168–170]

Gasna hromatografija predstavlja tehniku izbora u analizi masnih kiselina, na osnovu koje se mogu razlikovati profili jestivih biljnih ulja. Biljna ulja se prvo hidrolizuju i nakon toga esterifikuju u isparljivije metil-estre. Od svih biljnih ulja koja se koriste u mediteranskoj ishrani, maslinovo ulje je najzastupljenije, ali je usled pogodnih nutritivnih vrednosti i tehnologije proizvodnje dosta je skuplje od ostalih, pa neretko podleže adulteraciji. U maslinovo ulje najčešće se dodaju druga jeftinija biljna ulja u manjim količinama, usled čega mnoge laboratorije unapređuju metode za detekciju adulteracije u maslinovom ulju. Profil masnih kiselina se uspešno analizira gasnom hromatografijom i u zavisnosti od njihovog procentnog sastava može se odrediti autentičnost. [171,172] U kombinaciji sa mikroekstrakcijom na čvrstoj fazi (SPME) i GC-MS moguće je detektovati adulteraciju

maslinovog sa uljem lešnika do 7%, na osnovu detekcije *R* i *S* izomera fibertona, koji je glavna komponenta arome lešnika. [173]

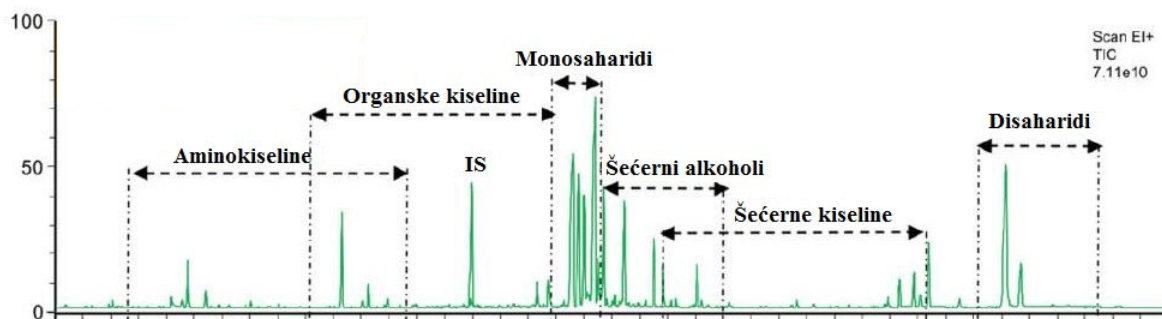
Isparljiva jedinjenja kod biljaka i metaboliti prisutni u etarskim uljima, mogu se ispitivati direktno primenom GC tehnike, bez prethodne pripreme. Ukoliko su metaboliti od interesa slabo isparljivi, neophodan je postupak derivatizacije i prevođenja u isparljive stabilne derivate kako bi mogli da se analiziraju gasnom hromatografijom. U te svrhe se jedinjenja derivatizuju koristeći odgovarajuće reagense. Derivatizacija menja svojstva analita, dovodi do boljeg razdvajanja i može olakšati njegovu identifikaciju, a derivatizacija može povećati osetljivost same metode. Svaka derivatizacija mora da zadovolji uslove, kao što su: velika brzina reakcije, kvantitativan prinos, blagi reakcioni uslovi, minimum sporednih proizvoda, termička stabilnost nagrađenih derivata i jednostavna obrada reakcione smeše. Najčešći tipovi derivatizacije koji se koriste su alkilovanje, arilovanje, sililovanje i oksimovanje. Iako se derivatizacija koristi za poboljšanje hemijske analize, ima za manu primenu više koraka prilikom pripreme uzorka koja može dovesti do dodatnih grešaka. [174–177]

Za metabolomičku simultanu analizu polarnih metabolita biljaka (aminokiseline, organske kiseline, šećere) GC-MS tehnikom, najčešće se koristi dvostepena derivatizacija koja uključuje dva koraka: oksimovanje i silanizaciju. U prvom koraku se dobijaju oksimi sa metoksi-aminom, dok u drugom nastaju silanizovani derivati primenom odgovarajućeg reagensa. Najčešće se koriste *N,O*-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamid (BSTFA) i *N*-tercbutil-dimetilsilil-*N*-metiltrifluoroacetamid (MTBSTFA). Doprinos derivatizacije primenom silanizacije u hromatografiji je smanjenje polarnosti, povećanje stabilnosti i poboljšanje GC razdvajanja. Trimetilsilil grupa (TMS) reaguje i menja vodonikove atome grupa kao što su OH, COOH, NH₂ itd. Svrha oksimovanja je zaštita keto grupa i sprečavanje ciklizacije šećera, čime se onemogućava pojava nekoliko pikova u hromatogramu, koji potiču od istog metabolita. Pored toga, oksimovanje sprečava dekarboksilaciju α -keto kiselina. [178] U reakciji oksimovanja mogu učestvovati i aldehidi i ketoni, i pri tome se javljaju dva pika u hromatogramu, *syn(E)* i *anti (Z)* oblik. Metaboliti koji mogu nagraditi oksime su redukujući šećeri, dok neredukujući ne daju oksime. Nastali oksimski derivati su relativno stabilni i mogu se pripremiti nekoliko dana unapred za razliku od trimetilsilil estara. Preporuka je: ne derivatizovati uzorke za snimanje duže od dan ili dva unapred, jer su derivati isparljivi i degradabilni. Šematski prikaz reakcije dvostepene derivatizacije glukoze sa BSTFA u piridinu prikazan je na **Slici 8** gde je dobijen derivat glukoze. Prednosti dvostepene derivatizacije su: dobijanje užih pikova, bolje hromatografsko razdvajanje, dok mane predstavljaju: nastanak dva izomera, javljanje dva- ili tri-metilsilil derivata aminokiselina, i nedostatak podataka iz biblioteke. [177,179]



Slika 8. Reakcija dvostepene derivatizacije na primeru glukoze

U GC-MS hromatogramu (Slika 9) se polarni proizvodi dvostepene derivatizacije javljaju sledećim redom: aminokiseline (glicin, valin, izoleucin,...), organske kiseline (malonska, limunska, mlečna kiselina,...), monosaharidi (glukoza, fruktoza, manoza, galaktoza...), šećerni alkoholi (sorbitol, manitol...), šećerne kiseline (glukuronska, ribonska, galaktouronska...), disaharidi (saharoza, trehaloza...) i trisaharidi (rafinoza itd.).



Slika 9. Primer GC-MS hromatograma sa označenim oblastima zastupljenosti polarnih derivatizovanih metabolita

U metaboličkoj analizi biljaka uglavnom se identifikuje manji broj pikova. Poređenje sa referentnim standardom može biti korisno kod poznatih primarnih metabolita, ali za specifične sekundarne metabolite kod biljaka standardi često nisu dostupni ili dostupni podaci o molekularnoj težini i elementarnom sastavu nisu dovoljni za identifikaciju. U praksi mnogi primarni metaboliti se identifikuju pomoću MS, kuplovane sa hromatografskim razdvajanjem. Kvalitet metaboličke analize zavisi od broja identifikovanih jedinjenja, a ne od broja detektovanih signala/pikova. Uglavnom se identifikuju jedinjenja značajna za razlikovanje uzoraka. Pikovi od interesa u gasnom hromatogramu se prvenstveno integrale za svaki uzorak pojedinačno. [180]

Obavezan korak predstavlja dodatak internog standarda (IS) na osnovu koga se umanjuju gubici koji nastaju tokom pripreme uzorka. Na osnovu IS se izračunava relevantna koncentracija svih metabolita ili se površina svih deli sa površinom IS. Dobijeni podaci, koji se koriste za multivarijantnu analizu, predstavljaju se tabelarno. Identifikacija metabolita se vrši na osnovu njihovih EI/MS spektara i poređenja sa bibliotekom spektara, vodeći se literaturnim podacima o retencionim indeksima i procentom slaganja MS spektara. Pored toga, uzorak se može snimiti primenom hemijske jonizacije (meki tip jonizacije) da bi se dobio podatak o molekularnoj masi ispitivanih metabolita, što predstavlja još jedan dokaz za identifikaciju. Tokom pozitivne hemijske jonizacije (PCI) najčešće nastaje pseudomolekulski jon $[M+H]^+$, dok negativnom hemijskom jonizacijom (NCI) nastaju joni $[M-H]^-$. Takođe, identifikacija se može izvršiti snimanjem pojedinačnih standarda, gde na osnovu podatka o retencionim vremenima i poklapanju MS spektara možemo utvrditi prisustvo metabolita. Ovaj način identifikacije spada u jedan od najpouzdanijih, ali je ograničenje potreba za upotrebom standarda svakog jedinjenja, što povećava troškove i ukupno vreme analize. Identifikacije polarnih metabolita u metaboličkoj analizi biljaka može biti zahtevna posebno kod šećera, usled velike sličnosti EI/MS spektara monosaharida, pa je u tom slučaju obavezna primena standarda. [19,181]

Tečna hromatografija sa masenom spektrometrijom (LC-MS)

Prilikom korišćenja LC-MS tehnike u metabolomici može se analizirati širok spektar metabolita sa različitim fizičko-hemijskim karakteristikama. Pre MS detekcije neophodna je hromatografska optimizacija, izbor mobilne faze i odgovarajuće kolone da bi se povećao broj metabolita koji se mogu detektovati. Za LC-MS razdvajanje koriste se mobilne faze razne polarnosti kao što su metanol-voda ili acetonitril-voda za revezno-fazni sistem (RP) uz čest dodatak mravlje ili neke druge organske kiseline za bolju jonizaciju i razdvajanje. Većina LC-MS analiza u biljnoj metabolomici obuhvata primenu C18 ili C8 RP kolona. Ovakav sistem je adekvatan za sekundarne

metabolite srednje polarnosti. Mnogi primarni metaboliti, kao što su organske kiseline, nukleotidi, aminokiseline, šećeri i njihovi fosforililovani derivati, mogu biti prisutni u istim ekstraktima, ali se često koeluiraju sa drugim supstancama na početku hromatograma. Prilikom LC-MS metabolomičke analize od velike važnosti je dizajn eksperimenta, kao i sam protokol ekstrakcije, snimanje, obrada i analiza dobijenih podataka. [182,183]

U jednoj studiji u Brazilu ispitivana je adulteracija svežeg kravljeg i bivoljeg sira sa surutkom primenom LC-MS metode. Analizirani su karakteristični peptidi na C18 RF sistemu. Analiza je rađena u Multiple Reaction Monitoring modu (MRM) gde su praćeni karakteristični joni i njihovi prelazi. Ovom metodom se može detektovati do 10% adulteracije. Dobijeni rezultati su poređeni sa referentnom metodom, SDS-PAGE elektroforezom (Natrijum dodecilsulfat poliakrilamidna gel elektroforeza). [184] Takođe, u jednoj studiji u kojoj se koristio nano HPLC-MS/MS sistem, uspešno je detektovana adulteracija mleka sa sojinim proteinom, proteinom graška, hidrolizatom proteina iz surutke i hidrolizatom proteina iz pirinča. [185] Metabolomičko profilisanje je korišćeno u kombinaciji sa LC-QTOF masenom spektrometrijom radi identifikacije markera autentičnosti za pet vrsta nerafinisanih, hladno ceđenih ulja semena: crnog kumina, bundeve, žutog noćurka, konoplje i mlečnog čkalja. Određeno je 36 biomarkera za svako ulje. [186] Analiza suplemenata za potenciju kod muškaraca na turskom tržištu rađena je primenom LC-MS/MS tehnike. U MS/MS modu sa ESI izvorom jonizacije u pozitivnom modu optimizovani su MRM parametri za praćenje prisustva sildenafil i tadalafil. Od ispitivanih 11 uzoraka čak sedam je sadržalo barem jedan od ova dva jedinjenja. [187]

Česti adulteranti šafrana su biljke poput nevena, šafranike i kurkume. [188] Ekstrakcijom zakišljenim 50% metanolom, uzorci šafrana i njegovih čestih adulteranata analizirani su primenom LC/PDA/ESI-MS tehnike. Svaki od biljnih uzoraka imao je karakterističan hemijski profil u hromatogramu. Krocetin glikozidi su karakteristična jedinjenja za šafran. U ekstraktu nevena detektovani su različiti flavanoli, dok kod šafranike boja potiče od najzastupljenijih jedinjenja, kartamina i halkonoida, i oba su detektovana u uzorku šafrana. Izoramnetin-3-O-neohesperidozid je pronađen kao marker šafranike. Za kurkumu su kurkumin i njegovi derivati karakteristična jedinjenja. Ovom HPLC analizom otiska prsta autentičnih uzoraka šafrana i njegovih adulteranata utvrđeni su biomarkeri autentičnosti. Primenom LC-HRMS neciljane metabolomičke analize identifikovani su biomarkeri adulteracije meda sa sirupima od šećerne repe, kukuruza i pšenice. Upotrebom tandemne masene spektrometrije moguća je detekcija markera do 5% nivoa adulteracije. [189]

Visokoefikasna tankoslojna hromatografija (HPTLC)

Iako je doba dominacije hromatografskih tehnika, GC i HPLC, jednostavnost HPTLC tehnike je omogućila adekvatna rešenja za probleme u analizi hrane. Najveća prednost ove tehnike zasniva se na mogućnosti čuvanja razdvojenih komponenti uzorka za buduća ispitivanja. Tankoslojna hromatografija spada u jednostavne tehnike analize i jednostavna je za eksperimentano izvođenje. Sastoji se od stacionarne faze koja može biti različitog hemijskog sastava poput silika-gela (normalno-fazna NP), aluminijum-oksida ili modifikovanih silika-gelova kao što je C18 (RP). Kao mobilna faza se najčešće koriste rastvarači poput metanola, vode, acetonitrila, heksana i toluena. Razvojem robotskih polu-automatizovanih sistema za nanošenje uzoraka, razvijanje i derivatizaciju dosta je ubrzalo i unapredilo ovu tehniku. [189] Hromatografske tehnike na koloni u kombinaciji sa tehnikama za određivanje strukture molekula su skupe, zahtevaju vreme, veće količine rastvarača kao i visoko obučeno osoblje. Za razliku od pomenutih tehnika, HPTLC pruža nekoliko prednosti kao što su jednostavnost, niska cena, fleksibilnost, visok broj analiziranih uzoraka za kratko vreme (više od 70 uzoraka po jednom ciklusu) dvodimenzionalno i gradijentno razvijanje uzoraka. Takođe mogu se primeniti specifični reagensi, biohemijaska i biološka detekcija i vizualizacija direktno na HPTLC hromatogramu. Metabolomički pristup uzima u obzir podatke koje dobija analizom HPTLC slike i

sličnosti ili razlike između uzoraka na osnovu njihovog hemijskog i/ili biološkog profila, kao i identifikaciju karakterističnih markera koji su odgovorni za klasifikaciju. [189]

Upotrebom HPTLC metode urađeno je fitohemijsko profilisanje uzoraka soka od kajsije adulterisanih sa uzorcima bundeve. Pored ispitivanih autentičnih uzoraka, napravljeni su i simulirani adulterisani uzorci dodatkom bundeve u sok od kajsije. Zbog svog specifičnog ukusa, arome i nutritivnog sastava, kajsija je jako traženo voće u svetu, a i dosta je skuplja na tržištu od same bundeve. Usled sličnosti boje i teksture proizvodi od kajsije se adulterišu sa bundevom. Upotrebom HPTLC tehnike, razvijena je metoda za detekciju karakterističnih karotenoida u uzorcima. U kombinaciji sa multivarijantnom analizom uzorci su se grupisali na uzorke kajsije, uzorke bundeve i na uzorke koji su sadržali mešavinu te dve sirovine. Ovim je pokazano da je moguće koristiti jeftiniju metodu za analizu autentičnosti soka od kajsije, pri čemu je moguće detektovati prisustvo bundeve do 2,5%. [189] Razvijena je i HPTLC metoda za analizu dva leka koja se koriste za hipolipidemiju (poremećaj u porastu holesterola i triglicerida sa niskim vrednostima holesterola visoke gustine (HDL) u plazmi). U uzorcima čajeva analizirani su ciprofibrat i benzaifibrat primenom HPTLC metode sa bioautografijom praćenjem odgovora na mikrobnu bioluminiscenciju. [190] U slučaju analize lišća paragvajskog čaja (*Ilex paraguariensis*) koristi se HPTLC metoda za analizu i detekciju karakterističnih jedinjenja kao što su kofein i polifenoli. Kofein je moguće detektovati pod UV lampom na $\lambda=254$ nm, dok je za detekciju polifenola potrebna upotreba reagenasa za derivatizaciju poput reagensa za prirodne proizvode (eng. natural product reagent, NPR), polietilenglikol 4000 (PEG 4000) i posmatranje ploče na $\lambda=366$ nm. [191] HPTLC tehnika se može koristiti za razlikovanje bliskih taksona koji se mogu koristiti za adulteraciju ako postoji dovoljno jasna hemotaksonomska razlika između njih. Moguće je razlikovanje 27 različitih taksoma vrste *Angelica* i vrsta bliskih porodici Apiaceae gde je analizirano korenje biljaka. Pristupom metabolomičkog otiska prsta, HPTLC hromatogrami su pretvoreni u pikove i poređeni sa referentnim materijalom. [192]

1.2.4.2. Spektroskopske tehnike

Metode koje se zasnivaju na spektroskopiji igraju bitnu ulogu u analizi adulteracije bilja i hrane. Najčešće korišćene tehnike su UV/Vis, IR, NIR, Raman i NMR spektroskopija. Mogu se koristiti nezavisno od ostalih tehnika, ali često u kombinaciji sa drugim.

Ultraljubičasta-vidljiva spektroskopija (UV/Vis)

UV/Vis spektroskopija je jedna od najjeftinijih kvantitativnih analitičkih metoda. Predstavlja brzu i nedestruktivnu tehniku za analizu. Obuhvata oblast elektromagnetnog spektra od $\lambda=190$ -800 nm, u kojoj se nalazi apsorpcioni maksimum fenolnih jedinjenja koja su zastupljena u biljnim uzorcima, usled čega je naročito korisna tehnika za analizu uzoraka šafrana i kurkume. Jedinjenja koja daju karakterističnu boju šafranu i kurkumi mogu se detektovati primenom UV/Vis spektroskopije. Pored njih, moguća je i detekcija veštačkih boja (Sudan I i IV) za koje je poznato da se dodaju u pomenute začine. [193]

Česta praksa kod adulteracije je dodavanje jeftinijih obojenih ekstrakata u skuplju biljni ekstrakt. Jedan od primera je adulteracija ekstrakta borovnice sa ekstraktima bogatim antocijanima poput trešnje, crne aronije, crnog pirinača, crne soje itd. Adulteracija ekstrakta bogatih antocijanima je zastupljena i kod brusnice. Određivanje sadržaja ukupnih antocijana UV/Vis tehnikom predstavlja rutinsku analizu i izvodi se primenom diferencijalne pH metode. Međutim, ovom metodom nije moguće razlikovati poreklo antocijana, kao ni njihove strukture. Usled tog nedostatka, bilo koji biljni ekstrakt bogat antocijanima može biti podložan adulteraciji ukoliko postoji profit koji može da se ostvari. Primenom samo UV/Vis metode, teško se može detektovati ovaj vid adulteracije u slučaju kada se dodaju ekstrakti iste klase jedinjenja, pa je neophodna kombinacija sa različitim tehnikama.

[194] UV/Vis metoda je u kombinaciji sa multivarijantnom analizom iskorišćena za potvrdu autentičnosti dve botaničke podvrste propolisa, narandžastog i plavog. Propolis sadrži u velikim količinama fenolne kiseline i flavonoide, što omogućava njihovu detekciju. U spektrima narandžastog tipa propolisa karakteristični su apsorpcioni maksimumi na $\lambda=270$, 290 i 320 nm (koji potiču od flavonoida poput kvercetina, apigenina i kaemferola), dok su kod plavog tipa na $\lambda=290$ i 316 nm (od galangina i kafeične kiseline). [195] UV/Vis spektroskopija se često koristi u kombinaciji sa HPLC tehnikom u cilju detekcije jedinjenja koja poseduju hromoforu. Najčešći tip detektora koji se koriste u te svrhe su DAD (Diode array detektor) i PDA (Photodiode array detektor) detektori, koji su nedestruktivni i omogućavaju detekciju više komponenti sa različitim spektrom apsorpcije u jednoj analizi. [196]

Infracrvena spektroskopija (IR)

FTIR predstavlja brzu i nedestruktivnu tehniku. U kombinaciji sa multivarijantnom analizom koristi se za dobijanje metabolomičkog otiska prsta kao skrining tehnika za detekciju adulteracije u industriji hrane. FTIR spektroskopija postala je zamena za tradicionalne metode jer je odlikuju jednostavna priprema uzoraka, brzina analize i redukovana upotreba toksičnih rastvarača. Navedene prednosti doprinose smanjivanju vremena i cena analize. Aktivno se koristi u industriji začina za kontrolu kvaliteta velikih šarži sirovog biljnog materijala. Pogodna je za analizu lišća, korenja i semena, uz upotrebu autentičnih baza podataka sa referentnim spektrima dostupnim za poređenje. Autentičnost je moguće odrediti na usitnjenim ili sprasanim čistim biljnim materijalima, ali je neophodno da materijal nije ekstrakt ili da ne sadrži neke dodate biljne mešavine. [1,2,81]

Usled potrebe za brzim tehnikama analize, razvijane su FTIR metode i multivarijantne analize. Primenu su našle u analizi voćnih sokova, jestivih ulja i mlečnih proizvoda. U analizi sokova, voćnih pirea i sirupa, najviše se koristi bliska IR spektroskopija (NIR). Pomenuti proizvodi su često pomešani sa jeftinijim sokovima i šećernim sirupima, a jedan čest primer je dodatak jabukovog soka kao jeftinog adulteranta u skuplje sokove od jagode i maline. Primenom NIR i PLS metode moguće je detektovati prisustvo dodatog soka jabuke u koncentracijama većim od 10%. IR spektroskopija se koristi i za određivanje autentičnosti sokova plodova nara, koji je veoma popularan usled velike antioksidativne aktivnosti. Primenjuje se za razlikovanje spektra čistog soka nara i soka koji je adulterisan sa sokom od grožđa. Analizom odgovarajućeg dela IR spektra oko 1700 cm^{-1} , moguće je detektovati prisustvo adulteranta od 2 do 14%. Pored određivanja autentičnosti, srednja IR oblast se može koristiti i za razlikovanje sorti i geografskog porekla. Primenjuje se u analizi adulterisanih uzoraka mleka u prahu, kada je nakon slučaja adulteracije mleka u prahu sa melaminom, razvijena metoda za njegovu detekciju. [81] Tetraciklinski antibiotici, koji se koriste za lečenje bakterijskih infekcija kod životinja, mogu se naći u mleku u tragovima. Uprava za hranu i lekove (FDA) je propisala maksimalnu koncentraciju ukupnih tetraciklina od 300 ppb koja može biti prisutna u mleku. Analizom bliske i srednje IR oblasti uzoraka mleka u kombinaciji sa hemometrijskim modelima moguća je njihova detekcija. [197]

Ramanska spektroskopija, koja je komplementarna infracrvenoj, je takođe našla primenu u analizi uzoraka biljnog porekla. Glavne prednosti kod primene ramanske spektroskopije su: smanjena interferencija vode, mogućnost analize vodenih i neorganskih uzoraka, kao i analiza uzoraka kroz staklenu ili plastičnu ambalažu bez prethodnog otvaranja. Kombinacija rezultata ramanske spektroskopije sa modelima parcijalne regresije najmanjih kvadrata (PLSR) omogućila je detekciju kukuruznog skroba u uzorcima sprasnog luka. [54] Pored toga, primenom ove spektroskopske analize uspešno se mogu detektovati veštačke boje (Sudan-I i Kongo crvena) koje se dodaju kao adulteranti u uzorke paprike u prahu, i omogućava identifikacija karakterističnih pikova za svaku od analiziranih boja. [198]

Nuklearno-magnetna rezonantna spektroskopija (NMR)

NMR spektroskopija ima vodeću primenu u metabolomičkoj analizi otiska prsta određenih uzoraka jer omogućava direktnu analizu biljnih ekstrakata bez primene hromatografskog razdvajanja. Najveća prednost je mogućnost istovremene analize različitih tipova sekundarnih metabolita (terpeni, fenoli, alkaloidi, itd.) i najviše zastupljenih primarnih metabolita poput aminokiselina, šećera i organskih kiselina. Ubraja se u jednostavnu metodu, sa dobrom ponovljivosti i omogućava dobijanje kvantitativne informacije o zastupljenosti jedinjenja, usled proporcionalnosti intenziteta signala i molarne koncentracije jedinjenja od kojih signali potiču. Pomenuta zavisnost otvara mogućnost za poređenje koncentracije ispitivanih jedinjenja bez primene kalibracione krive za svaku detektovanu komponentu. Pored primene u metabolomičkim ispitivanjima, NMR spektroskopija je neizostavna metoda za rešavanje strukture jedinjenja. Usled toga, dominantna je u analizi biljnih ekstrakata nepoznatog hemijskog sastava. U metabolomičkoj studiji važno je identifikovati signale od značaja u statističkim modelima, dok identifikacija preostalih signala nije od suštinske važnosti. U poređenju sa MS tehnikama, kod kojih je dostupan veliki broj biblioteka spektara, NMR spektri metabolita nisu dostupni u toj meri. Međutim, velika ponovljivost ove tehnike i robusnost NMR podataka označavaju ovu tehniku kao dobru za kreiranje metabolomičke baze podataka. [199,200]

Smanjena osetljivost NMR tehnike u odnosu na masenu spektrometriju pre svega smatra se njenim najvećim ograničenjem, pa je identifikacija glavnih komponenti u uzorcima dominantna. Međutim, sa razvojem tehnologije, osetljivost NMR spektroskopije je dosta unapređovala i može se povećati upotrebom jačeg magneta ili primenom mikro i krio proba (3 do 10 puta). Kod krio sistema uzorak je na sobnoj temperaturi, dok se elektronske komponente probe hlade tečnim helijumom na $-253\text{ }^{\circ}\text{C}$ čime se eliminiše većina pozadinskog elektronskog šuma i samim tim pojačava intenzitet signala. U biljnim ekstraktima javlja se mnoštvo signala, pri čemu se veliki broj njih preklapa, što dovodi do otežane identifikacije, pa je upotrebom 2D NMR metoda (COSY, TOCSY, NOESY, HSQC, HMBC) identifikacija dosta olakšana. Prisustvo signala od dominantnih jedinjenja u ekstraktu, mogu uticati na detekciju metabolita u malim koncentracijama. Pored pomenutih NMR metoda upotreba 2D/razloženih NMR spektara pruža dosta dodatnih informacija o signalima jedinjenja koja se nalaze u uzorcima pružajući precizne podatke o obliku signala, konstantama kuplovanja i hemijskim pomeranjima. Ove informacije dovode do lakše identifikacije preklopljenih signala jedinjenja. Optimalno je koristiti spektrofotometar od 500 ili 600 MHz za metabolomičku studiju. [201,202]

Kako bi ponovljivost rezultata bila zadovoljavajuća, optimizacija parametara kao što su vreme relaksacije, širina pulsa i vreme akvizicije je jako bitna. Jedan od ometajućih faktora je pojava signala od nedeuterisane vode u spektru, koji može prekriti deo signala od anomernih signala šećera. Usled toga se primenjuju različiti NMR eksperimenti koji dovode do potiskivanja (suprimovanja). Tehnike supresije signala vode zasnivaju se na ozračivanju (*pre-sat*) slabim RF pulsevima. Zbog jednostavnosti korišćenja, najčešće se koristi presaturacija. Da bi se presaturacija dobro izvela bitno je da temperatura i pH vrednost uzoraka budu konstantni. U poslednje vreme sve su popularnije homodekuplujuće NMR tehnike, poznate po nazivu „Pure Shift”. Njihova namena je povećanje rezolucije spektra na taj način što ne uočava homonuklearno sprežanje protona, pri čemu multipleti postaju singleti. Jedna od tih metoda je PSYCHE, koja sve više nalazi primenu u NMR eksperimentima. Svoju primenu nalazi i u biljnoj metabolomici. Već je uspešno korišćena prva Pure Shift metoda za analizu kompleksnog ekstrakta vrsta *Hypericum*. U kombinaciji sa multivarijantnom analizom PSYCHE eksperiment daje bolju identifikaciju metabolita i kvantitativnost. [203,204]

NMR metabolomički otisak prsta je našao primenu u mnogim poljima, od kojih je jedna za klasifikaciju različitih biljnih vrsta. Do sada, kontrola kvaliteta je ograničena na detekciju određenog broja jedinjenja, uglavnom nosilaca aktivnosti. Međutim, mnoge medicinske biljke i gljive se koriste kao ekstrakti ili prahovi bez uvida u njihov kompletan hemijski sastav ili aktivnu komponentu. U takvim slučajevima se aktivnost pripisuje određenoj grupi organskih jedinjenja što otežava kontrolu kvaliteta i stvara pogodno tlo za prevare. Analiza svih metabolita je ključna radi reproduktivnosti farmakološke efikasnosti. Druga primena ovog pristupa je praćenje odgovora na infekciju, povredu,

herbivore ili stres kod biljaka. Promene koje nastaju kada je biljka izložena nekoj vrsti stresa se mogu pratiti fiziološki, ali je bitno pratiti i promene u metabolomičkom profilu. Treća primena je razlikovanje divljih i transgenih biljaka ili različitih genotipova. Neočekivane promene se mogu detektovati kod transgenih biljaka, gde NMR metabolomička analiza daje dobre rezultate. [200]

NMR metode su široko priznate kao važni alati za analizu hrane, i u kombinaciji sa metabolomičkim pristupom koriste se za ispitivanje autentičnosti hrane. Primenjuju se za karakterizaciju hrane u pogledu kvaliteta, kao i u detekciji adulteranata. Može se koristiti ciljani i neciljani pristup, u zavisnosti od potrebne analize. Ciljani pristup metabolomičke analize identifikuje markere koji su autentični za biljnu vrstu ili markere adulteracije. Na primer, detektovanjem 16-*O*-metilkafestola u prženoj Arabika kafi može se utvrditi adulteracija sa Robusta kafom. Pored toga, prisustvo turanoze u medu, se može detektovati i kvantifikovati analizom ^1H NMR spektra i ukoliko nije detektovana ili se nalazi u jako niskim koncentracijama smatra se da je u med dodat šećerni sirup. [205,206]

Nažalost, identifikovanje nekoliko komponenti obično nije dovoljan pokazatelj autentičnosti ili adulteracije hrane. Kako bi se razlikovali uzorci hrane, potrebno je analizirati više jedinjenja ili ceo metabolomički profil hrane. Neciljana analiza zasnovana na primeni NMR spektroskopije koristi se za karakterizaciju hemijskog sastava složenih smeša i dobijanja informacija o širokom spektru ili skupu odabranih metabolita. [207]

Neciljana metabolomička analiza obuhvata ceo NMR spektar i sve prisutne metabolite, bez posebnog odabira metabolita za analizu. Omogućava uvid u širok spektar metabolita ispitivanog metaboloma, pružajući informacije o metabolomičkim putevima, otkrivanju biomarkera, kao i razumevanju metabolomičkih promena izazvanim nekim događajem. NMR spektroskopija predstavlja odličnu tehniku za analizu kvaliteta maslinovog ulja, njegove autentičnosti i geografskog porekla. Dodavanje jeftinog ulja lešnika u maslinovo ulje detektuje se analizom signala masnih kiselina, skvalena i β -sitosterola u ^1H NMR spektru. ^1H NMR spektroskopija u kombinaciji sa multivarijantnom analizom podataka može se uspešno koristiti za dobijanje informacija o različitim parametrima kvaliteta vina, kao što je njegova autentičnost, sorta, geografsko poreklo i godina proizvodnje. Pored toga, predstavlja pogodnu metodu za analizu uzoraka sireva, adulterisanih biljnim uljima. Kombinacija NMR spektroskopskih podataka sa PCA analizom omogućava razlikovanje uzoraka sireva na osnovu profila masnih kiselina. Pored toga, određeni su markeri razdvajanja karakteristični za različite vrste sireva poput Edam, Gauda, Feta i Emental. [207]

Dostupne su platforme koje se zasnivaju na ciljanoj i neciljanoj NMR analizi, kao što je FoodScreener, koja omogućava istovremenu evaluaciju različitih parametara vezanih za kvalitet i autentičnost. Postoje i moduli za SGF-Profiling koji se koriste za analizu voćnih sokova, Wine-Profiling za vina i Olive oil-Profiling za analizu maslinovog ulja. Brukerov FoodScreener je automatizovan analitički alat dizajniran za sveobuhvatnu analizu hrane i pića, koji zahteva minimalnu pripremu. Pouzdana je tehnika skringa za ciljane i neciljane analize više biomarkera. FoodScreener primenjuje NMR spektroskopiju za identifikaciju i kvantifikaciju različitih komponenti prisutnih u složenim uzorcima hrane, što uključuje kako poznata, tako i nepoznata ili neočekivana jedinjenja koja mogu biti prisutna u uzorku. Od posebnog je značaja u kontroli kvaliteta i testiranju autentičnosti u prehrambenoj industriji. Omogućava otkrivanje adulteracije, kontaminacije i pogrešnog označavanja, pružajući vredne informacije proizvođačima hrane, regulatornim agencijama i potrošačima. Detaljnom analizom sastava, povećava se bezbednost, autentičnost i kvalitet prehrambenih proizvoda. Neki od primera primene ovog alata su: određivanje dodatih šećernih sirupa u medu, ispitivanje autentičnosti zrna kakaa, određivanje tragova laktoze u dostupnim zamenama za mleko. [208]

Rešenje Bruker kompanije za profilisanje vina predstavlja inovativan i moćan način za otkrivanje i sprečavanje prevara sa vinom, primenom ^1H NMR spektroskopske metode za kvantifikaciju šest ključnih jedinjenja u vinu: glukoze, jabučne kiseline, fumarne kiseline, sirćetne

kiseline, šikiminske kiseline i sorbinske kiseline. Pored toga, preko 50 jedinjenja može se kvantifikovati u svrhu kontrole kvaliteta primenom Wine-Profiling platforme. Juice-Profiling je metoda zasnovana na NMR analizi sokova od voća i povrća. Uzorak je moguće analizirati tokom nekoliko minuta, uz mogućnost istovremene kvantifikacije parametara koji ukazuju na autentičnost. Neka od analiziranih jedinjenja su: alanin, arbutin, limunska kiselina, etanol, fruktoza, fumarna kiselina, galakturonska kiselina, glukoza, hidroksimetilfurfural, jabučna kiselina, mlečna kiselina i saharoza. [209,210]

1.3. Hemometrijske metode u metabolomici biljaka

Metabolomika se može definisati kao kvalitativna i kvantitativna analiza svih metabolita u organizmu. A skup svih metabolita, primarnih i sekundarnih, koji se istovremeno analiziraju naziva se metabolom. Suprotno od klasičnog pristupa, gde je fokus bio na jednom metabolitu, ovde se analizira skup malih molekula kao što su lipidi, aminokiseline, šećeri, fenolna jedinjenja. Cilj metabolomičke analize je sveobuhvatno sagledati metabolizam i metabolomičku dinamiku povezanu sa stanjem bolesti ili izloženosti stresu. [180,211]

Metabolomička studija generiše veliku količinu podataka, i to spektara i hromatograma koji sadrže veliki broj informacija. Za analizu toliko podataka koriste se kompjuterske tehnike za prepoznavanje obrazaca. Tehnike koje prepoznaju obrasce primenjuju matematičke i statističke metode da sumiraju podatke i izvuku bitne informacije iz mnoštva podataka. Analiziranje hemijskih podataka sa matematičkim ili statističkim metodama u polju nauke zove se *hemometrija*, koja primenjuje *mutivarijantnu statističku analizu*. [212,213]

Hemometrija nalazi primenu u kontroli kvaliteta, kao na primer u industriji hrane, gde se multivarijantnim metodama dokazuje autentičnost hrane. Jeftini, neautentični proizvodi koji su obeleženi kao skupi brendovi, mogu biti razotkriveni hemometrijskom analizom. Druga upotreba je praćenje serija u procesu hemijske industrije ili automatsko otkrivanje malih promena u hromatografskoj čistoći prilikom praćenja kontrole kvaliteta.

1.3.1. Primena metabolomike kod biljaka

Primena metabolomike u analizi biljnih uzoraka je široko rasprostranjena. Istorijski, metaboličko profilisanje se koristilo za medicinske i dijagnostičke svrhe, kao i za klasifikaciju i karakterizaciju. Metabolička analiza predstavlja važan faktor u funkcionalnoj genomici, gde otkriva uloge gena sveobuhvatnom analizom metaboloma. Na primer, metaboličko profilisanje i ciljane analize se koriste za klasifikovanje molekulskog otiska prsta odgovornog za fenotip tih ili nepoznatih mutacija. U poslednje vreme, metabolomika se razvila kao važna oblast nauke i hemije prirodnih proizvoda. Krajnji cilj metabolomike je kvalitativno i kvantitativno određivanje svih metabolita u organizmu, što daje jasnu metaboličku sliku živih organizama pod određenim uslovima. Ovo može biti izazovno, jer je metabolom biljaka dosta komplikovan. Primer za to je analiza oko 3000 metabolita u jednom delu biljke, kao što je list duvana. U isto vreme ovi metaboliti se razlikuju po svojoj polarnosti, hemijskim svojstvima, stabilnošću, što otežava analizu. [177,180,200,202]

U metabolomici biljaka se najčešće koriste GC-MS, LC-MS i NMR instrumentalne tehnike. Odabir tehnike zavisi od cilja istraživanja, količine dostupnog materijala, kao i dostupnosti opreme. Za analizu aroma različitih lekovitih biljaka i voća, čak i žestokih alkohonih pića koristi se GC-MS [214], dok su za analizu sekundarnih metabolita fenolnog i flavonoidnog tipa pogodnije NMR i LC/MS tehnike. Vrlo često se koristi kombinacija dve ili više instrumentalnih tehnika kako bi se validirali dobijeni rezultati. [215,216] Luis i saradnici su koristili rezultate ^1H NMR i LC-MS analize za dobijanje PLS-DA modela kako bi se utvrdilo uticaj geografskog porekla biljnih vrsta iz roda *Euphorbia* na hemijski sastav lateksa. [217] Razvijeni su i utemeljeni protokoli koji se danas rutinski koriste a tiču se uzorkovanja, čuvanja i pripreme uzoraka za analizu. [200] U određenim slučajevima,

kada eksperimentalni dizajn to zahteva, ovi protokoli se moraju preispitati i dodatno optimizovati, a pre svega optimizacija postupka ekstrakcije. [218]

Dobar primer koji ističe prednosti analize smeša uz uštedu vremena u poređenju NMR metode sa klasičnim metodama je istovremena kvantifikacija L-citrulina i šećera u lubenicama. [219] Cagliani i saradnici [220] su usvojili ovaj pristup za upoređivanje sastava različitih mešavina kafe, dok su Turbit i saradnici [221] poredili suplemente brusnice sa referentnim standardom i prahom dobijenim od voća brusnice. U svom istraživanju su Farag i saradnici [222] uporedili osam komercijalnih Sena preparata prikupljenih iz nekoliko zemalja i predložili ovaj metod zasnovan na metabolomičkom pristupu u kontroli kvaliteta ovog preparata. Iako su senozidi glavna bioaktivna jedinjenja u preparatu, pokazano je da postoje i drugi metaboliti, posebno naftalen glikozidi, koji se mogu koristiti za autentifikaciju preparata na bazi Sena biljke.

1.3.2. Hemometrijski pristupi

Česta primena hemometrije uključuje proučavanje razlike između različitih vrsta uzoraka i detektovanje promenljivih koje su za to zaslužne. Za različite vrste uzoraka može se smatrati da pripadaju različitim klasama. Kompjuterski program ima sposobnost prepoznavanja različitih klasa i njihovog grupisanja. Ovo se naziva *klasifikacija*, i zasniva se na primeni unapred definisanih šablona prepoznavanja. U metabolomičkim studijama obrađuje se veliki broj podataka, koje je na neki način neophodno sistematizovati. Za razliku od ljudi, računari sa lakoćom pronalaze obrasce prepoznavanja poredeći veliki broj podataka u tabeli. Dok za čoveka hromatogrami predstavljaju geometrijske slike koje se lako mogu porediti, za računarski program je potrebno prevesti ih u formu tabele sa redovima koji predstavljaju pojedinačne uzorke, a kolone pojedinačne tačke ili skupove tačaka na hromatogramu. Prvi red u tabeli sadrži podatke vremenske skale od početka do kraja analize (X-podaci), a svaki sledeći vrednosti intenziteta (Y-podaci) za svako merenje. Podaci koji se koriste za kompjutersku analizu moraju biti predstavljeni u tabelama na način da se svaki od uzoraka nalazi u posebnom redu, pri čemu broj kolona određuje broj tačaka. Svaka tačka predstavlja posebno merenje promenljive. [212]

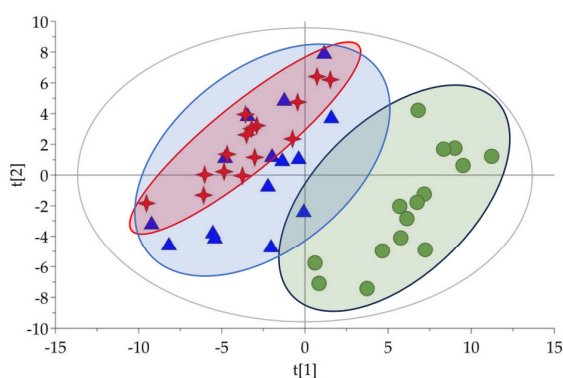
Programski obrasci prepoznavanja porede veliki broj uzoraka, predstavljenim ogromnim tabelama, pri čemu se rezultati predstavljaju formom bliskoj ljudskoj percepciji. Kada je cilj prepoznavanja obrazaca određivanje potencijalne sličnosti, odnosno različitosti, u analizi se ne primenjuju podaci koji mogu uticati na ishod. Takav tip analize se naziva nenadzirna (unsupervised). Ako je pak cilj videti da li uzorci pripadaju nekoj od već unapred definisanih klasa, poznati podaci o uzorku su tada neophodni i takav metod se naziva nadzirna (supervised) analiza. [223] Razlika između unapred nedefinisanih i definisanih modela prepoznavanja je pristup, u kome se kod nedefinisanih, model, ne uzima u obzir prilikom grupisanja informacije (podatke) koje se odnose na dodatne informacije o uzorcima i potencijalnom pripadanju određenoj klasi, dok u drugom slučaju model polazi od unapred predefinisanih razlika između različitih vrsta uzoraka. Suštinski kod unapred definisanih modela prepoznavanja glavni cilj je da klasifikuje uzorke u različite klase ili regresije, da se X koreliše sa Y. [212]

Od metoda unapred nenadzirne analize izdvajaju se Hijerarhijska klaster analiza (HCA) i Analiza glavnih komponenti (PCA). Dok se kod nadzirne analize najčešće koriste: metoda K najbliži susedi (k Nearest neighbours - kNN); Nezavisno fino modelovanje analognih klasa (SIMCA); Parcijalna regresija najmanjih kvadrata – diskriminantna analiza (Partial Least Squares regression Discriminant Analysis – PLS-DA) itd. Postoji veliki broj statističkih i matematičkih modela koji se koriste u cilju proučavanja metabolizma i metabolomike uopšte. Najčešće korišćene metode su, pre svega, analiza glavnih komponenti (PCA), parcijalna regresija najmanjih kvadrata (PLS), diskriminantna parcijalna regresija najmanjih kvadrata (PLS-DA), diskriminantna ortogonalna parcijalna regresija najmanjih kvadrata (OPLS-DA) i diskriminantna dvosmerna ortogonalna

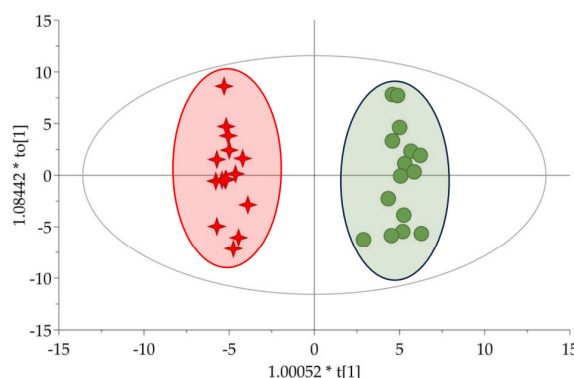
parcijalna regresija najmanjih kvadrata (O2PLS-DA). Na **Slici 10** Prikazan je primer jedne nadzirne i jedne nenadzirne tehnike. [224,225]

PCA je multivarijantna metoda koja se najčešće koristi. Suština analize je redukovanje velikog broja promenljivih svođenjem na samo nekoliko onih koje se najviše razlikuju između ispitivanih uzoraka. PCA se koristi za pronalaženje sličnosti među uzorcima, kao grupe uzoraka na različitim delovima polja nazvanim grafik rezultata (scoreplot). PCA pronalazi korelaciju koja prolazi kroz najveći varijabilitet, pri čemu je razlika najmanjih kvadrata rastojanja od svake tačke minimalna u odnosu na korelisanu pravu. Tako postavljena prava se naziva glavnom komponentom. PCA se koristi za opisivanje podataka koristeći manji broj glavnih komponenti, kako bi se identifikovali preovlađujući obrasci ili strukture u podacima. Ovaj proces ima za cilj maksimiziranje varijabilnosti podataka u novom, redukovanom višedimenzionalnom prostoru. [224,225]

Parcijalna regresija najmanjih kvadrata (PLS) je statistička metoda bazirana na regresiji glavnih komponenti. Suštinski kod PLS analize nalaze se dve tabele (X i Y), od kojih X može da predstavlja spektralne ili hromatografske podatke za seriju uzoraka, dok Y predstavlja pripadnost klasi. PLS-DA se koristi u cilju poboljšanja razdvajanja posmatranih grupa rotiranjem PC komponente zarad dobijanja maksimalnog razdvajanja među klasama, kao i definisanja promenljivih značajnih za razdvajanje. Stoga kod PLS-DA ne postoji druga mogućnost osim pripadnosti određenoj klasi. [224] Diskriminantna analiza ortogonalne parcijalne regresije najmanjih kvadrata skrivenih struktura (OPLS-DA), takođe se oslanja na smanjenje promenljivih. Prednost ovog modela je njegova olakšana interpretacija usled razdvajanja sistematske varijacije varijabli na dva dela: jedan linearno povezan sa informacijama o klasi i jedan ortogonalan na informacije o klasi. [226] Na osnovu svega pomenutog se može zaključiti da je OPLS-DA pogodan za pronalaženje varijabli koje imaju najveću diskriminatornu moć između klasa.



PCA



OPLS-DA

Slika 10. Prikaz jedne metode koja nije unapred definisana (PCA) i jedne koja je unapred definisana (OPLS-DA). PCA metoda ne razdvaja dobro uzorke između klasa, dok OPLS-DA metoda odvaja uzorke po klasama

Kvantifikacija svih metabolita u datom sistemu je trenutno nemoguća, usled nedostatka dovoljno osetljivih analitičkih metoda. Postoji nekoliko metabolomičkih pristupa u analizi:

- Metabolomički otisak prsta
- Metabolomičko profilisanje
- Metabolomička ciljana analiza

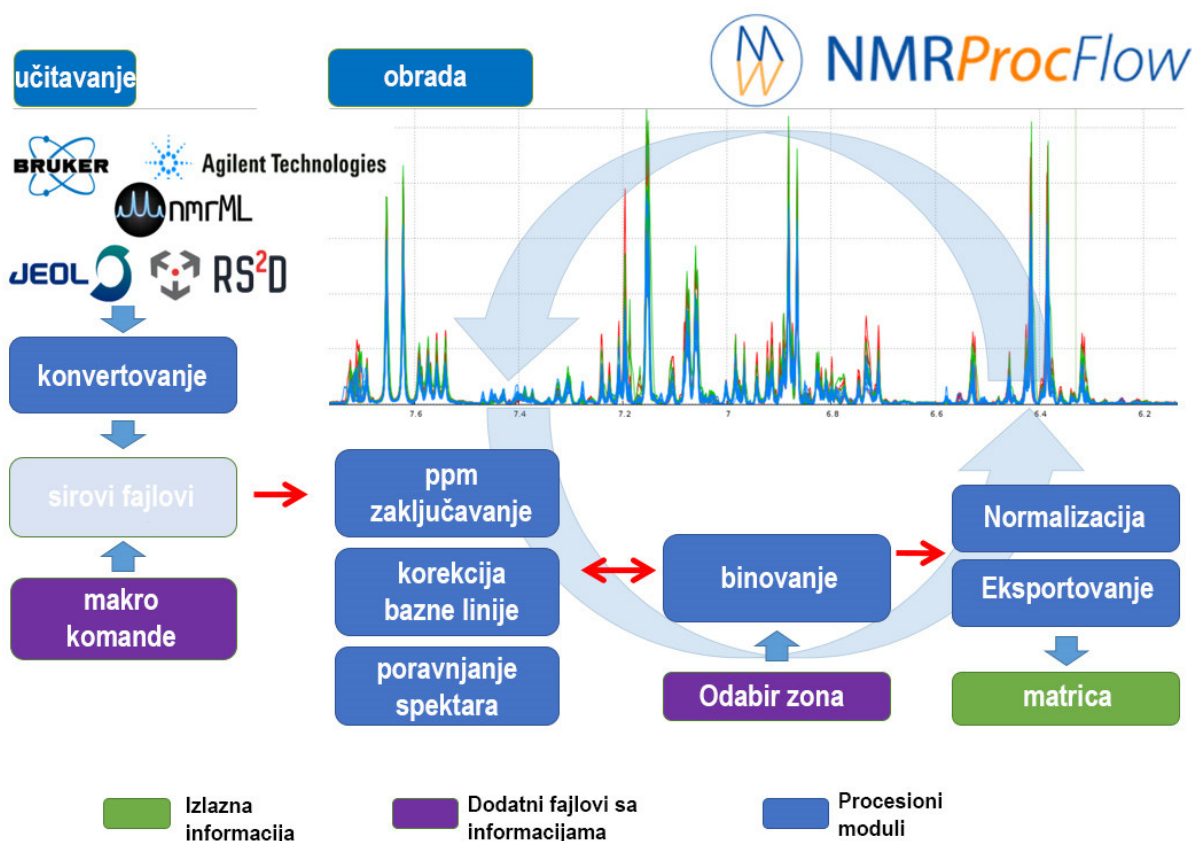
Metabolomički otisak prsta obuhvata brzu analizu svih metabolita koje je moguće detektovati u uzorku. Cilj je naći razlike između uzoraka poredeći njihove spektre bez prethodne identifikacije pikova i klasifikovati ih pomoću multivarijantne analize. Identifikacija se radi u sledećem koraku, i to uglavnom onih metabolita koji su zaslužni za razdvajanje (razlikovanje) grupa uzoraka. Nasuprot tome metaboličko profilisanje je ograničeno na identifikaciju i kvantifikaciju određenog broja unapred određenih metabolita. Kompjuterske metode se koriste za prevođenje spektara i hromatograma u listu metabolita, kao i njihovih koncentracija. Metabolomički otisak prsta je kvalitativna i kvantitativna analiza metabolita. Idealno, rezultati bi trebalo da budu nezavisni od metode primenjene za merenje koncentracije metabolita. Metabolomička ciljana analiza je ograničena na metabolite koji su prethodno odabrani, npr. optimizacija ekstrakcije ili specifično razdvajanje i/ili detekcija. Ciljana analiza u metabolomici može biti velikih razmera i biti bazirana na do sada poznatim rezultatima. Jedno od ograničenja ove analize je potreba za poznavanjem jedinjenja, kao i dostupnost standarda. [227,228]

1.3.3. Priprema i obrada podataka za analizu

Pre hemometrijske analize podaci obično zahtevaju određenu pripremu. Glavni cilj pripreme podataka je da se ukloni šum i sačuvaju za analizu svi važni podaci. Obično se javljaju dva tipa problema, otklanjanjem šuma potencijalno se uklanjaju i važni podaci koji opisuju varijacije među uzorcima. Ukoliko se šum ne ukloni u dovoljnoj meri dovodi do maskiranja ključnih podataka neophodnih za analizu. Pri obradi se najčešće koriste smutovanje, korekcija bazne linije, poravnavanje pikova, binning, normalizacija i transformacije poput centriranja i skaliranja. [224,225]

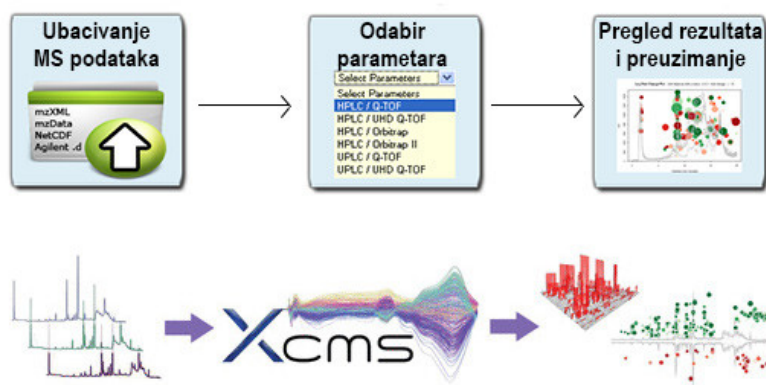
Kod obrade NMR spektralnih podataka za multivarijantnu analizu, neophodno je primeniti nekoliko koraka. Nakon snimljenih spektara, podešava se faza i bazna linija duž celog snimljenog spektra, a zatim zaključavanje spektra na signal referentnog standarda. Nakon toga, primenjuje se poravnavanje pikova jer dolazi do blagih odstupanja u hemijskim pomeranjima signala, usled različitih osetljivosti određenih signala na promene pH ili uticaja matriksa. Nakon toga, treba ukloniti oblasti koje nisu od značaja za dalju analizu, obično one u kojima su prisutni signali nedeuterisanog rastvarača, signal HOD, signal referentnog standarda i oblast bez signala. Preostali spektar sadrži veliki broj tačaka te je potrebno podeliti ga na manje delove (binove) kako bi se mogao analizirati. Obično se za veličinu jednog dela postavlja opseg od 0,04 ppm, ali mogu se uzimati i manji delovi ukoliko ima dosta bliskih signala u određenom delu spektra. Nakon toga, ukupna površina svih binova se normalizuje na 100%. U poslednjem koraku uobičajeno je centriranje i skaliranje podataka. Centriranjem se skupovi podataka pozicioniraju simetrično u odnosu na koordinatni sistem grafika rezultata. Skaliranjem podataka izjednačava se doprinos svake pojedinačne komponente u uzorku u zavisnosti od standardne devijacije njenih koncentracija u analiziranim uzorcima, a nezavisno od njene apsolutne koncentracije. [229]

Platforma dostupna na mreži pod nazivom NMRProcFlow može se primeniti za bržu obradu i pripremu 1D NMR spektara za statističku analizu. Na **Slici 11** prikazani su koraci koji se primenjuju prilikom obrade NMR spektara primenom pomenute platforme. S obzirom na prirodu 1D spektara i izazova koji se javljaju tokom različitih faza obrade, bitno je obraditi spektralne podatke na adekvatan način. Zaključavanje hemijskog pomeranja, korekcija faze i bazne linije mogu se istovremeno uraditi na svim uzorcima, što znatno redukuje vreme obrade kod analize velikog broja uzoraka. Potrebno je spektre ubaciti na sajt platforme i pratiti redom faze obrade u programu. Ono što je drugačije kod ovog softvera, u odnosu na obradu spektara u MestReNova programu, je mogućnost za primenu pametnog binninga. NMRProcFlow posebnim algoritmom vrši odabir mesta u spektru na kome će postaviti granice, izbegavajući podelu pikova granicom paketića. Kod klasičnog binninga često dolazi do podele jednog signala na dva bina, tako da pametni binning ima prednost u ovom domenu. Na kraju obrade podaci se čuvaju u obliku tabele koja se koristiti za statističku obradu. [230]



Slika 11. Pregled koraka prilikom obrade 1D NMR spektara korišćenjem platforme NMRProcFlow.
Preuzeto i prevedeno iz [230]

Takođe i podatke dobijene hromatografskim tehnikama, poput GC-MS ili LC-MS, neophodno je adekvatno pripremiti za multivarijantnu analizu, kao i u slučaju NMR spektralnih podataka. Raniji pristup obrade podataka je zahtevao ručno integraljenje i identifikaciju svakog pika u hromatogramu. Međutim u skorije vreme, dostupne su platforme za analizu masenih hromatograma koje dosta skraćuju vreme obrade podataka. Nastale su usled velikog interesovanja za neciljanu metabolomičku analizu. Platforme koriste intuitivni grafički pristup koji ne zahteva instalaciju ili tehničku ekspertizu. Ove besplatne platforme, najčešće se zasnivaju na besplatnom softverskom jeziku „R”, koji je trenutno najpopularniji i najviše se koristi za statističke proračune. Danas se najviše koriste platforme: XCMS, OpenMS, MS-DIAL, MZmine 3, MSFACTs, MetAlign, AnalyserPro, BinBase i MetaboAnalyst. Šematski prikaz koraka u obradi pomoću XCMS platforme prikazan je na **Slici 12**. Takođe postoje softveri koji su komercijalno dostupni za analizu podataka dobijenih neciljanom analizom kao što su MetaboScape od firme Bruker i Compound Discoverer od firme Thermo Fisher. Ove platforme pomažu u kreiranju hromatograma od ekstrahovanih jona i automatski sprovode poravnanje pikova. Detekcija pikova se radi na osnovu retencionog vremena i jona u masenom spektru, tako da se smanjuje mogućnost za nastanak grešaka ukoliko se u uzorcima nalaze različita jedinjenja na istom retencionom vremenu. Nakon dobijenih rezultata, površine pikova se dele površinom internog standarda i dobijeni odnosi se dalje koriste za multivarijantnu analizu. [231,232]



Slika 12. Šematski prikaz koraka prilikom obrade podataka u spletkompi XCMS.
Preuzeto i modifikovano iz [232]

Prednosti primene platformi i softvera za obradu podataka su velike. Pre svega, smanjuje se uticaj ljudskog faktora i skraćuje se vreme obrade velikog broja spektara/hromatograma. Na kraju dobija se jedan fajl sa tabelom koja se koristi u multivarijantnoj analizi. Kod platformi koje analiziraju masene hromatograme, prednost se ogleda u analizi preklopljenih pikova pošto se detekcija vrši na osnovu analize karakterističnih jona za svako jedinjenje. Nedostaci kod platformi za analizu masenih spektara su problematična analiza pikova malog intenziteta, koji se uglavnom ne detektuju, dok se kod intenzivnijih pikova javlja mnogo jona sa m/z vrednostima u tabeli, koje je potrebno redukovati. Takođe, navedene besplatne platforme nisu povezane sa spektralnom bazom, tako da se identifikacija radi na klasičan način.

2. NAŠI RADOVI

Predmet naučnog istraživanja ove doktorske disertacije obuhvata metabolomičko ispitivanje odabranih vrsta lekovitog bilja i biljnih preparata. U ovom radu identifikovani su biljni metaboliti kao potencijalni biomarkeri autentičnosti biljnih preparata, na osnovu čega su optimizovane i razvijene nove spektroskopske i spektrometrijske metode za kontrolu kvaliteta lekovitog bilja i biljnih preparata.

Cilj ove doktorske disertacije bio je pronalaženje novih spektroskopskih i spektrometrijskih metoda za otkrivanje falsifikovanih proizvoda na bazi lekovitog bilja zasnovanih na metabolomičkom pristupu. U cilju otkrivanja adulterisanih proizvoda biljnog porekla, savremene spektroskopske i spektrometrijske metode u kombinaciji sa bioinformatičkim alatima visokih performansi primenjene su za otkrivanje najšireg mogućeg spektra biljnih metabolita korišćenjem intaktnih ili minimalno tretiranih uzoraka. Na fundamentalnom nivou cilj ove doktorske disertacije je dodatno razumevanje značaja biljnih metabolita u poboljšanju kontrole kvaliteta biljnih proizvoda.

U cilju otkrivanja adulterisanih biljnih proizvoda, korišćena su tri seta uzoraka: autentični, pripremljeni od prikupljenog biljnog materijala poznatog porekla, i to iz gajenih populacija (*A. melanocarpa*), iz pouzdanih komercijalnih izvora (*A. ursinum*, *O. vulgare*, *O. onites*) i iz populacije iz prirode (*T. terrestris*); simulirani falsifikovani proizvodi, koji su pripremljeni od prikupljenog biljnog materijala pomešanog sa poznatim adulterantima iz literature kako bi se imitirali falsifikati; nepouzdati komercijalni proizvodi na bazi lekovitog bilja, koji su dostupni na tržištu. Ukupno je ispitivano pet biljnih vrsta u cilju otkrivanja adulterisanih proizvoda biljnog porekla, razvijene su spektroskopske i spektrometrijske metode u kombinaciji sa multivarijantnom analizom podataka za detekciju širokog spektra metabolita. Za razvijanje metoda autentični biljni uzorci *O. vulgare*, *O. onites*, *A. ursinum* i *A. melanocarpa* mešani su sa njihovim poznatim adulterantima u različitim masenim odnosima. Autentični biljni uzorci *T. terrestris* korišćeni su za određivanje biomarkera autentičnosti, i za njihovo ispitivanje u komercijalnim uzorcima biljnih preparata.

Od spektroskopskih tehnika za analizu korišćene su eksperimenti 1D (^1H i ^{13}C) i 2D NMR spektroskopije poput COSY, HSQC, NOESY, TOCSY, HMBC i 2DJ razložene. Potiskivanje neželjenih signala rastvarača vršeno je primenom ^1H zgpr i ^1H PSYCHE pulsne sekvence. Protonski NMR spektri korišćeni su za kreiranje metabolomičkog otiska prsta, dok su 2D NMR metode služile za određivanje strukture biomarkera adulteracije.

Pored NMR spektroskopije za identifikaciju biomarkera adulteracije korišćena je i GC-MS hromatografska tehnika i analiza prethodno derivatizovanih uzoraka ekstrakata. Polarni biljni metaboliti su derivatizovani primenom pristupa sa dvostepenom derivatizacijom pomoću metoksiamin-hidrohlorida i BSTFA. Slabo isparljiva jedinjenja uspešno su prevedena u isparljive TMS derivate i *N*-metoksi oksime. Identifikacija je vršena na osnovu poređenja sa dostupnim bibliotekama EI masenih spektara.

Visokoefikasna tankoslojna hromatografija HPTLC primenjena je za brzu identifikaciju biomarkera adulteracije tako što su slike razvijenih ploča autentičnih i simulirano-falsifikovanih proizvoda digitalizovane i podvrgnute metabolomičkoj analizi. Za analizu komercijalnih proizvoda na bazi lekovitog bilja korišćena je tandemno masena spektrometrija. Na osnovu poređenja autentičnih biljnih uzoraka određeni su biomarkeri autentičnosti.

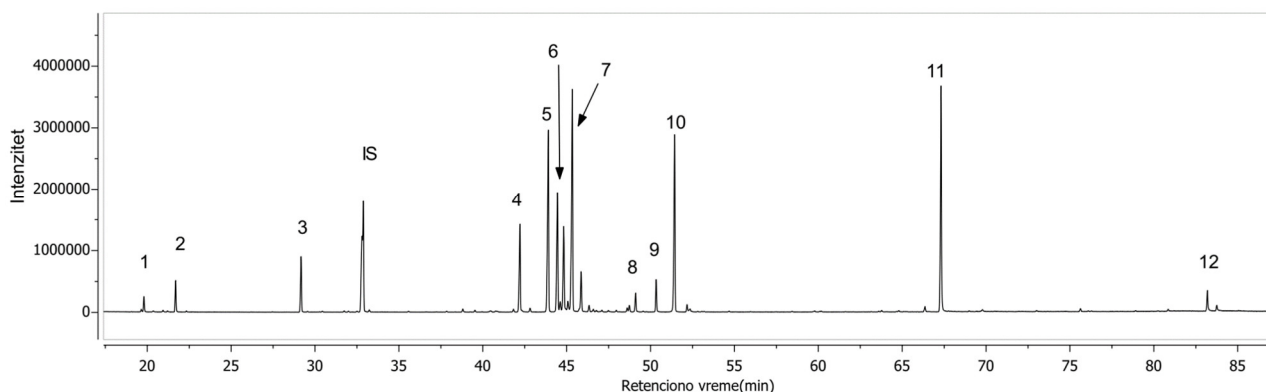
Veliki skupovi podataka dobijeni instrumentalnom analizom, obrađivani su kroz obrasce prepoznavanja, klasifikaciju i regresiju multivarijantnih modela kao što su PCA, OPLS i OPLS-DA. Analizom dobijenih podataka dobijeni su biomarkeri kvaliteta i/ili adulteracije proizvoda biljnog porekla, nakog čega se pristupilo izolovanju i potpunoj identifikaciji tako detektovanih biomarkera.

2.1. Primena GC-MS metabolomike u kontroli kvaliteta uzoraka *O. vulgare* i *O. onites*

U ovom istraživanju, GC-MS tehnika korišćena je za identifikaciju i kvantifikaciju primarnih i sekundarnih metabolita u ukupno 104 uzorka origana, origana adulterisanog sa listovima masline (*O. europaea*), venecijanskog sumaka (*C. coggigria*) i mirte (*M. communis*), u pet različitim koncentracija. Metabolomički profili ekstrakata ispitivanih biljnih mešavina nakon dvostepene derivatizacije, obrađeni su pomoću multivarijantne analize radi otkrivanja markera adulteracije i izrade regresionih modela na osnovu odnosa origana i adulteranata u smeši.

2.1.1. Analiza GC-MS hromatograma

Na osnovu GC-FID hromatograma najzastupljenija jedinjenja u neadulterisanim uzorcima origana (**Slika 13.**) bili su šećeri, prvenstveno disaharid saharoza, kao i monosaharidi kao što su glukoza i fruktoza. Sledeće po zastupljenosti bile su organske kiseline poput hininske, limunske, jabučne, γ -aminobuterne, šikiminske, rosmarinske, kafeinske, sukcinske kiseline, katehol-laktat, kao i fosforna kiselina. Prisutne su i šećerne kiseline kao što su treonska, eritrionska, i saharinska kiselina. Među identifikovanim alkoholima najzastupljeniji su mio-inozitol, sorbitol, ksilitol, glicerol i galaktinol. Monoterpen karvakrol, glavni sastojak arome origana, takođe je detektovan i identifikovan. Reprezentativni TIC MS hromatogrami uzorka origana prikazani su na **Slikama 14-16**. Sva identifikovana jedinjenja u uzorcima origana su prikazana u **Tabeli 2**. Jedinjenja su identifikovana kao trimetilsilil derivati i/ili *N*-metoksi oksimi, poređenjem sa referentnim spektrima iz biblioteke masenih spektara (NIST, Wiley i Adams), kao i spektrima standarda (glukoze, fruktoze, saharoze i sorbitola), retencionih vremena i indeksa koji su izračunati na osnovu *n*-alkana.

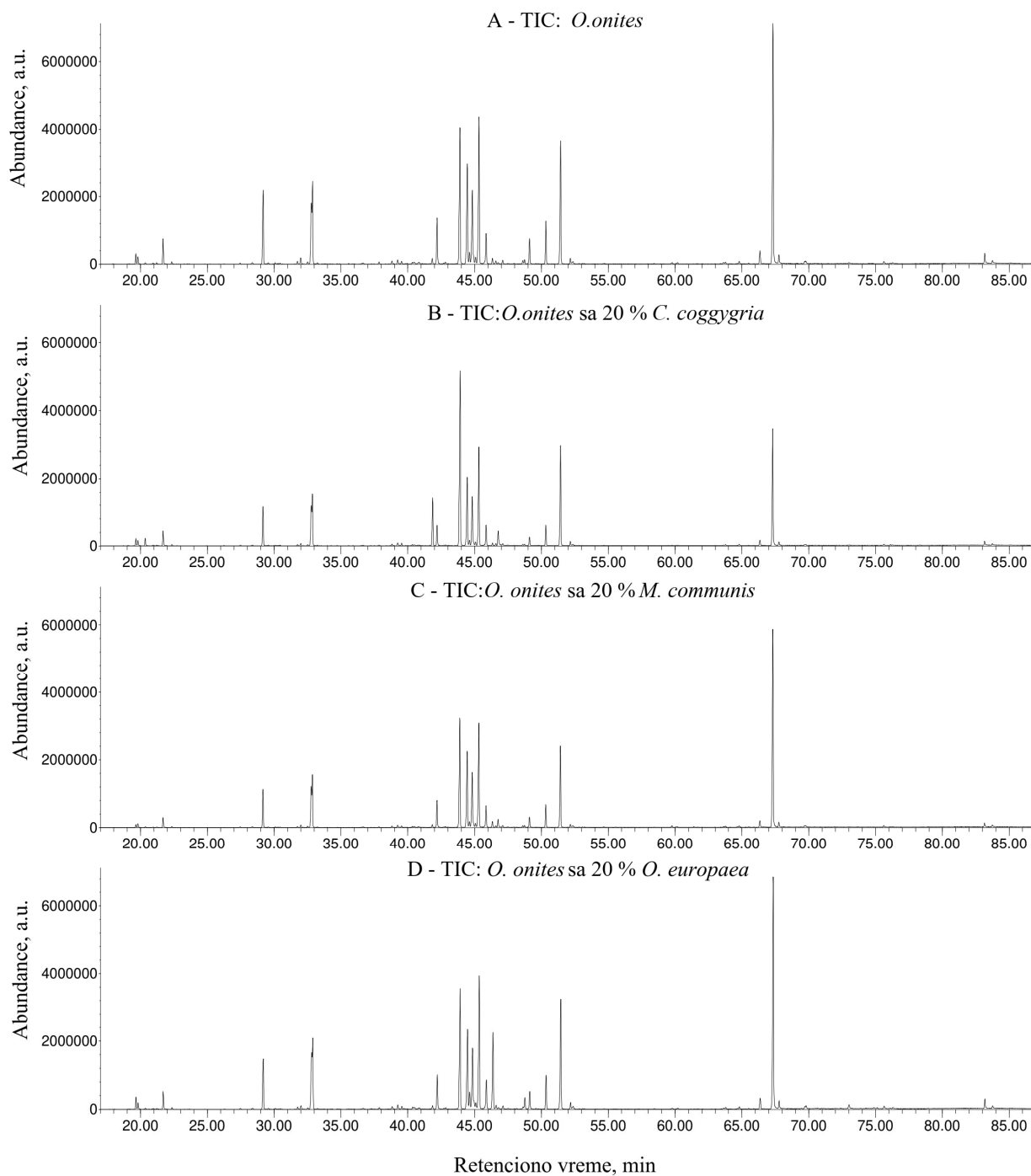


Slika 13. Reprezentativni GC-FID hromatogram derivatizovanog ekstrakta *O. vulgare*: glicerol (1), karvakrol (2), jabučna kiselina (3), limunska kiselina (4), hininska kiselina (5), fruktoza (6), glukoza (7), saharinska kiselina (8), katehol-laktat (9), mioinozitol (10), saharoza (11), rosmarinska kiselina (12) i interni standard 2-dezoksi-riboza (IS).

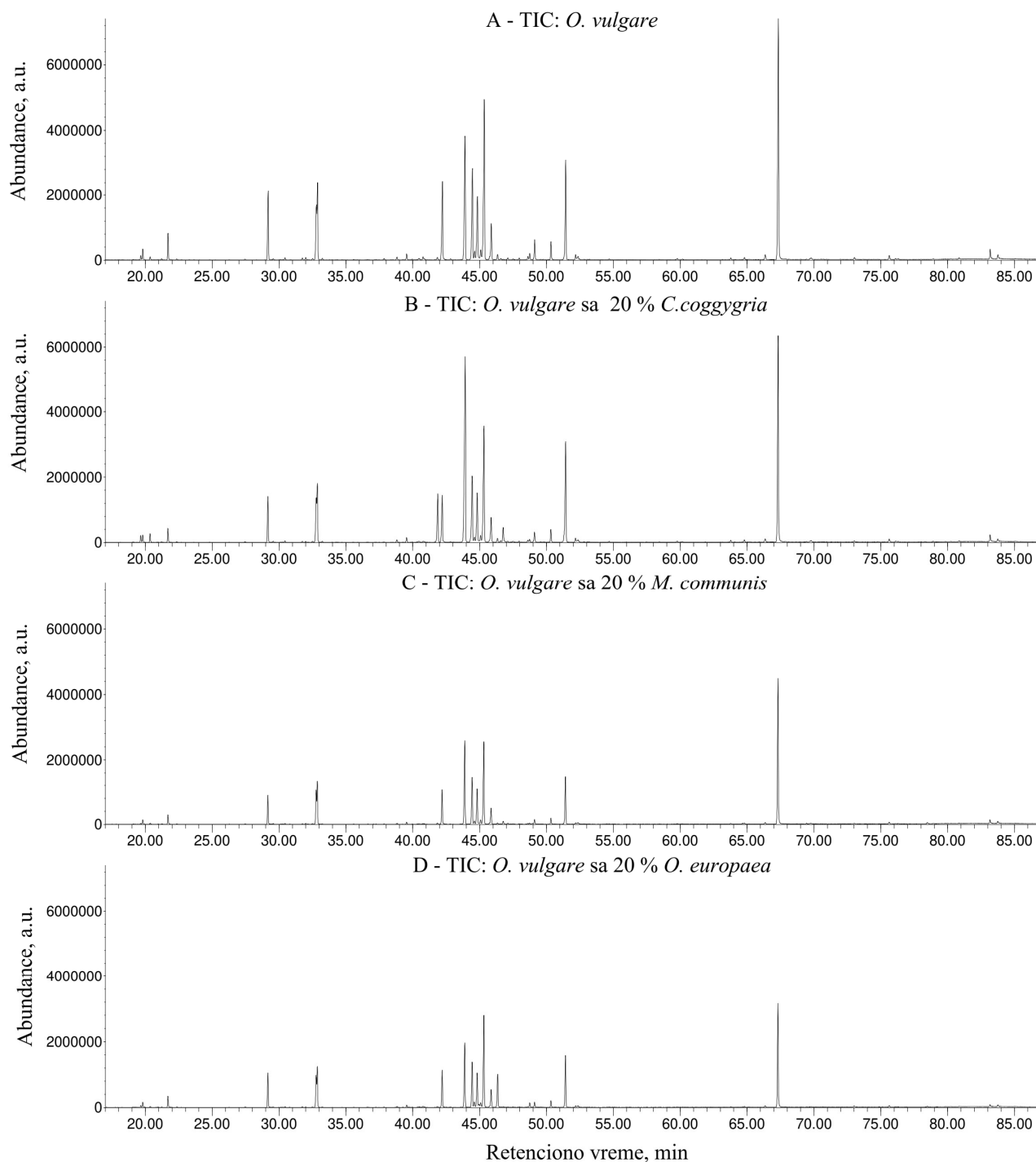
Tabela 2. Detektovana jedinjenja u uzorcima origana GC-MS tehnikom

Redni broj	Retenciono vreme (min)	RI	Naziv jedinjenja
1	19,65	1292	Fosforna kiselina
2	19,80	1300	Glicerol
3	21,20	1314	Ćilibarna kiselina
4	21,68	1339	Karvakrol
5	29,15	1507	Jabučna kiselina
6	30,44	1542	γ -aminobuterna kiselina
7	31,74	1569	Treonska kiselina
8	31,99	1583	NI1
9	32,51	1595	Eritronska kiselina
10	32,91	1603	2-dezoksi-riboza (interni standard)
11	33,25	1614	NI2
12	38,82	1745	Ksilitol
13	39,54	1783	NI4
14	40,52	1805	NI5
15	41,84	1849	Šikiminska kiselina
16	42,19	1853	Limunska kiselina
17	43,91	1877	Hininska kiselina
18	44,48	1925	Fruktoza
19	44,69	1930	NI6
20	45,36	1950	Glukoza
21	46,35	2000	Sorbitol
22	47,11	2002	NI7
23	49,10	2070	Saharinska kiselina
24	50,32	2111	Katehol-laktat
25	51,44	2153	Mioinozitol
26	52,18	2173	Kafeinska kiselina
27	64,82	2620	NI8
28	66,37	2685	NI9
29	67,33	2725	Saharoza
30	75,65	3046	Galaktinol
31	83,20	3451	Rozmarinska kiselina
32	83,78	3479	NI10

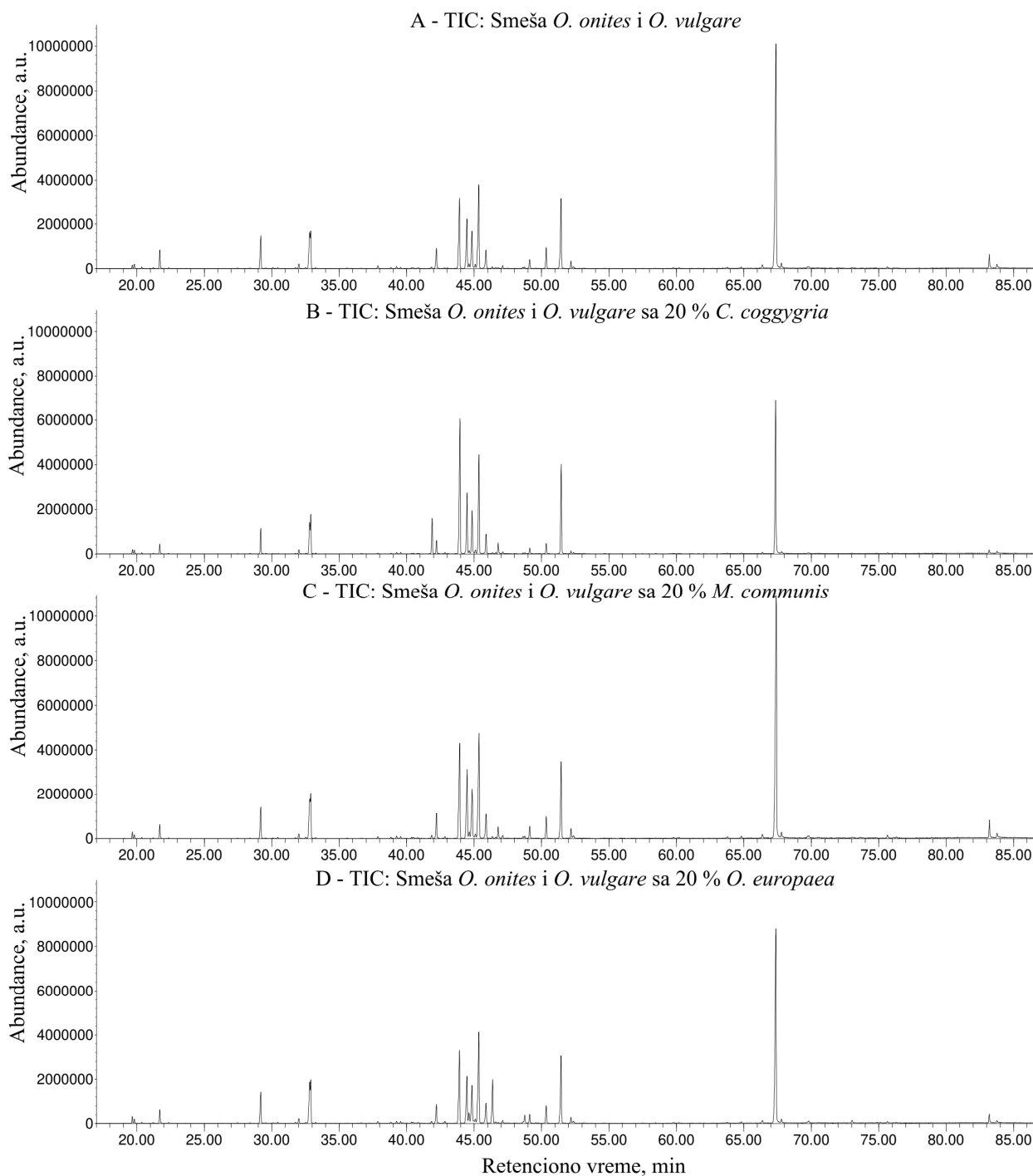
NI – neidentifikovana jedinjenja od 1 do 10



Slika 14. Reprezentativni TIC hromatogrami uzorka *O. onites* sa tri adulteranta: A) čist *O. onites*, B) *O. onites* sa 20% *C. coggygia*, C) *O. onites* sa 20% *M. communis* i D) *O. onites* sa 20% *O. europaea*



Slika 15. Reprezentativni TIC hromatogrami uzorka *O. vulgare* sa tri adulteranta: A) čist *O. vulgare*, B) *O. vulgare* sa 20% *C. coggygia*, C) *O. vulgare* sa 20% *M. communis* i D) *O. vulgare* sa 20% *O. europaea*



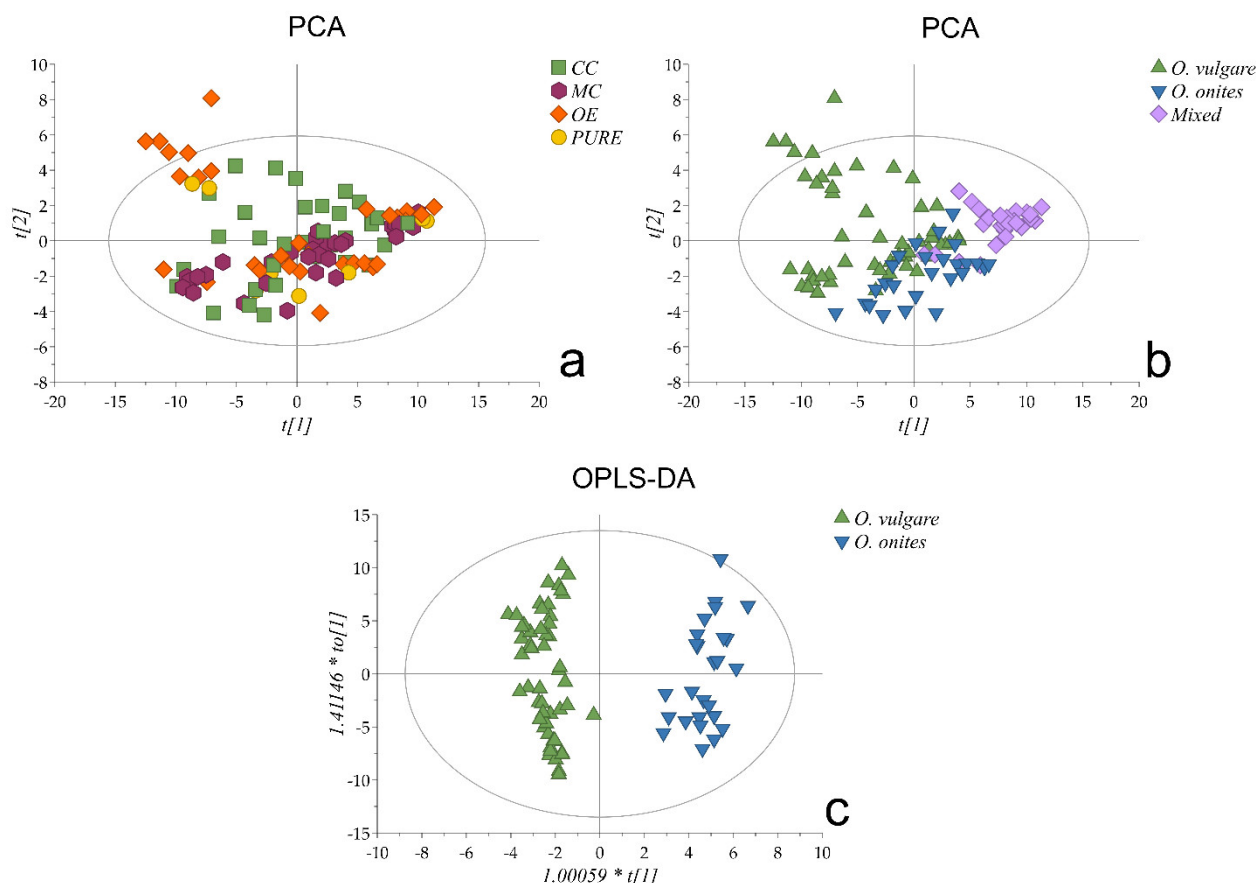
Slika 16. Reprezentativni TIC hromatogrami uzorka smeše *O. onites* i *O. vulgare* sa tri adulteranta:

A) smeša *O. onites* i *O. vulgare*, B) *O. onites* i *O. vulgare* sa 20% *C. coggygia*,
C) *O. onites* i *O. vulgare* sa 20% *M. communis* i D) *O. onites* i *O. vulgare* sa 20% *O. europaea*

2.1.2. Multivarijantna analiza

GC-MS metabolomički profili svih 104 uzorka (8 uzoraka neadulterisanih origana i 96 uzoraka koji su adulterisani lišćem venecijanskog sumaka, mirte, i masline gde su napravljene binarne mešavine u masenim odnosima 1, 5, 10 i 20%) podvrgnuti su multivarijantnoj analizi podataka.

Prvo je urađena analiza glavnih komponenti što je dovelo do smanjenja broja promenljivih i formiranja novih koje objašnjavaju većinu varijacija detektovanih komponenti. To je rezultiralo modelom sa osam glavnih komponenti (PC) koji objašnjava 87,6 % ukupne varijanse podataka. Na osnovu PCA grafika za prve dve PC-a, nije primećeno grupisanje na osnovu adulteracije različitim biljkama (**Slika 17a**). Međutim, može se zapaziti da su uzorci u drugom modelu u određenom stepenu odvojeni u PC1/PC2 prostoru zbog različitog botaničkog porekla origana, iako je stepen adulteracije u nekim uzorcima do 20 % (**Slika 17b**). Zatim je izvedena OPLS-DA kao nadzirna metoda multivarijantne analize. Na ovaj način nove promenljive su uzete u obzir i dobijeno je maksimalno razdvajanje između dve unapred definisane klase. U ovom slučaju analizirane su klasa uzoraka *O. vulgare* i *O. Onites*, kao klase različitog botaničkog porekla origana, dok uzorci mešovito botaničkog porekla nisu dalje analizirani. Tumačenje ortogonalnog modela je olakšano jer je sistematska varijacija promenljivih podeljena na dva dela: jedna je linearno povezana sa informacijom o klasifikaciji, a druga je ortogonalna na nju. Stoga, OPLS-DA je pogodan za pronalaženje promenljivih koje imaju najveću moć razdvajanja između dve unapred definisane klase.



Slika 17. Grafik rezultata analize glavne komponente (PCA) (PC1 naspram PC2) svih proučavanih uzoraka. Ocene su obojene prema (a) dodatim aduterantima: OE – listovi masline (*O. europaea*), CC – listovi venecijanskog sumaka (*C. coggigia*), MC – listovi mirte (*M. communis*) i PURE – uzorci čistog origana; b) vrste origana: *O. vulgare*, *O. onites* i mešavina dve vrste; (c) OPLS-DA grafik rezultata koji sadrži dve vrste origana, *O. vulgare* i *O. onites*.

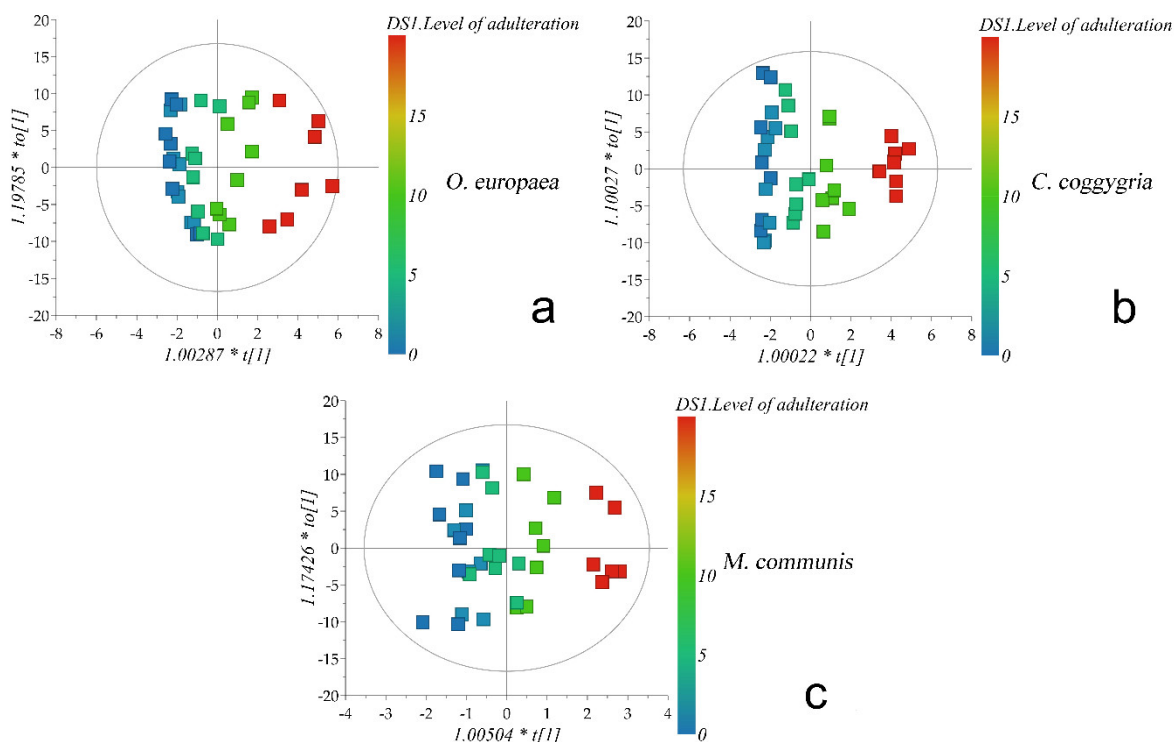
Kvalitet dobijenih modela procenjen je na osnovu parametra R^2 koji pokazuje koliko je dobro objašnjena varijacija promjenljivih korišćenjem prediktivnih komponenti, i na osnovu Q^2 parametra koji pokazuje koliko dobro model predviđa nove podatke, što je procenjeno unakrsnom validacijom. Kada su vrednosti ovih parametara veće od 0,9 ili blizu 1 ukazuju na dobru korelaciju, kao i na prediktivne sposobnosti modela (**Tabela 3**).

OPLS-DA model je validiran permutacionim testom i krosvalidacionim CV-ANOVA testom. U permutacionom testu, vrednosti R^2 i Q^2 originalnih modela su upoređene sa vrednostima serija modela sa nasumično izmenjenim informacijama o klasi nakon čega su kreirani novi modeli i praćene su njihove R^2 i Q^2 vrednosti. Model se smatra zadovoljavajućim ako regresije Q^2 linije prolaze kroz vertikalnu osu ispod nule, a sve vrednosti Q^2 i R^2 permutovanih Y vektora su niže od originalnih. Osim toga, model je statistički značajan prema CV-ANOVA, kada je p vrednost manja od 0,05 (**Tabela 3**).

Tabela 3. Parametri modela dobijeni multivarijatom analizom

Naziv modela	Broj komponenti	R^2	Q^2	p (CV-ANOVA)	F (CV-ANOVA)
PCA	8	0,876	0,682	-	-
OPLS-DA, vrste origana	1+2	0,950	0,926	4×10^{-38}	149
OPLS, adulteracija sa <i>O. europaea</i>	1+2	0,914	0,830	5×10^{-11}	26
OPLS, adulteracija sa <i>C. coggigria</i>	1+5	0,983	0,910	5×10^{-11}	23
OPLS, adulteracija sa <i>M. communis</i>	1+4	0,938	0,753	2×10^{-5}	8

Grafik rezultata OPLS-DA modela pokazao je dobro razdvajanje dve klase origana (**Slika 17c**) dok statistički parametri modela iz **Tabele 3.** potvrđuju da je model validan. Odabir najuticajnijih promjenljivih zasnivao se na njihovom uticaju na projekcijske rezultate prediktivnih komponenti (VIPpred). Promenljive sa VIPpred skorom većim od 1,4 smatrane su značajnim za razdvajanje. Na osnovu toga je utvrđeno da je katehol-laktat diskriminišući metabolit za uzorke *O. onites*.



Slika 18. DSI skala OPLS modela predstavlja uzorke origana pomešanog sa: a) listovima masline (*O. europaea*), b) listovima venecijanskog sumaka (*C. coggigria*), c) listovima mirte (*M. communis*), a skorovi su obojeni u skladu sa nivoom adulteracije.

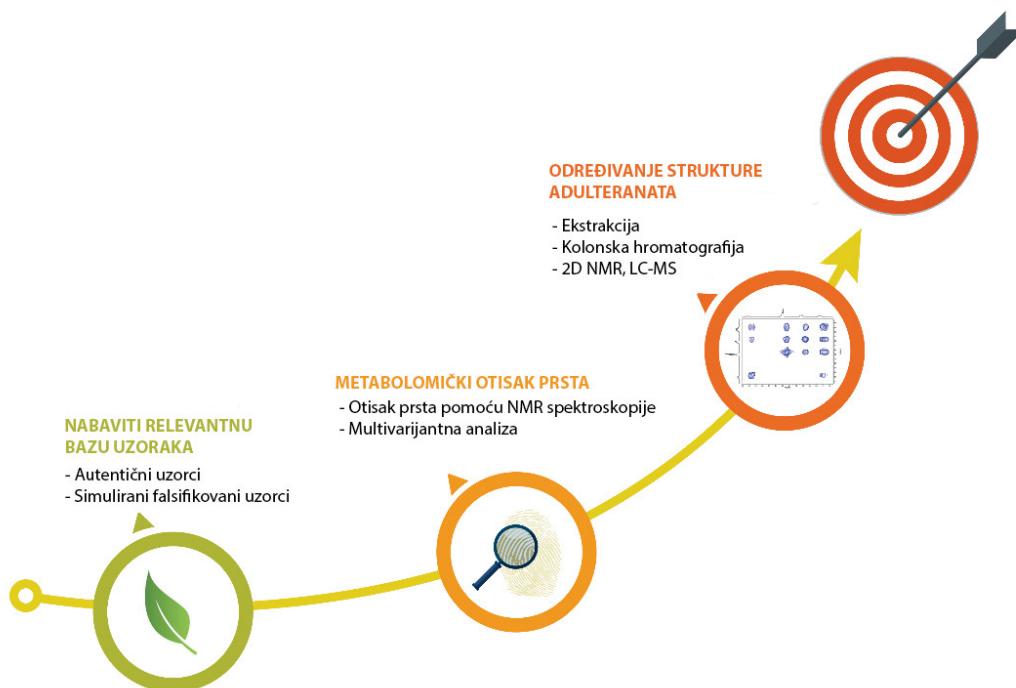
Tri dobijena OPLS modela ukazuju na odgovarajuću adulteraciju origana sa mirtom, venecijanskim sumakom, i listovima masline. Svaki model je sadržao uzorke origana koji su mešani u pet različitih masenih odnosa sa adulterantom (0, 1, 5, 10, i 20%). Na osnovu dobijenih Q^2 i R^2 parametara može se zaključiti da ovi modeli imaju odličnu korelaciju i sposobnost predviđanja.

Prema CV-ANOVA, OPLS modeli su bili statistički značajni sa $p < 0,05$ (Tabela 3), što je u skladu sa rezultatima permutacionog testa. Prema grafiku skorova OPLS modela, uzorci origana sa nižim stepenom adulteracije jasno su odvojeni od onih sa višim (Slika 18). Kriterijum za izbor najuticajnijih promenljivih u OPLS modelima bio je skor sa vrednošću VIPpred većom od 1,4.

Koristeći gore navedene kriterijume, utvrđeno je da je sorbitol najuticajnija promenljiva u modelu falsifikovanja origana sa listovima masline. Adulteracija origana sa venecijanskim sumakom rezultirala je pojavom šikiminske i hininske kiseline kao najuticajnijih promenljivih u modelu, dok su se fruktoza i hininska kiselina pojavile kao markeri u modelu aduteracije origana sa mirtom.

2.2. Primena NMR metabolomike u kontroli kvaliteta uzoraka *A. ursinum*

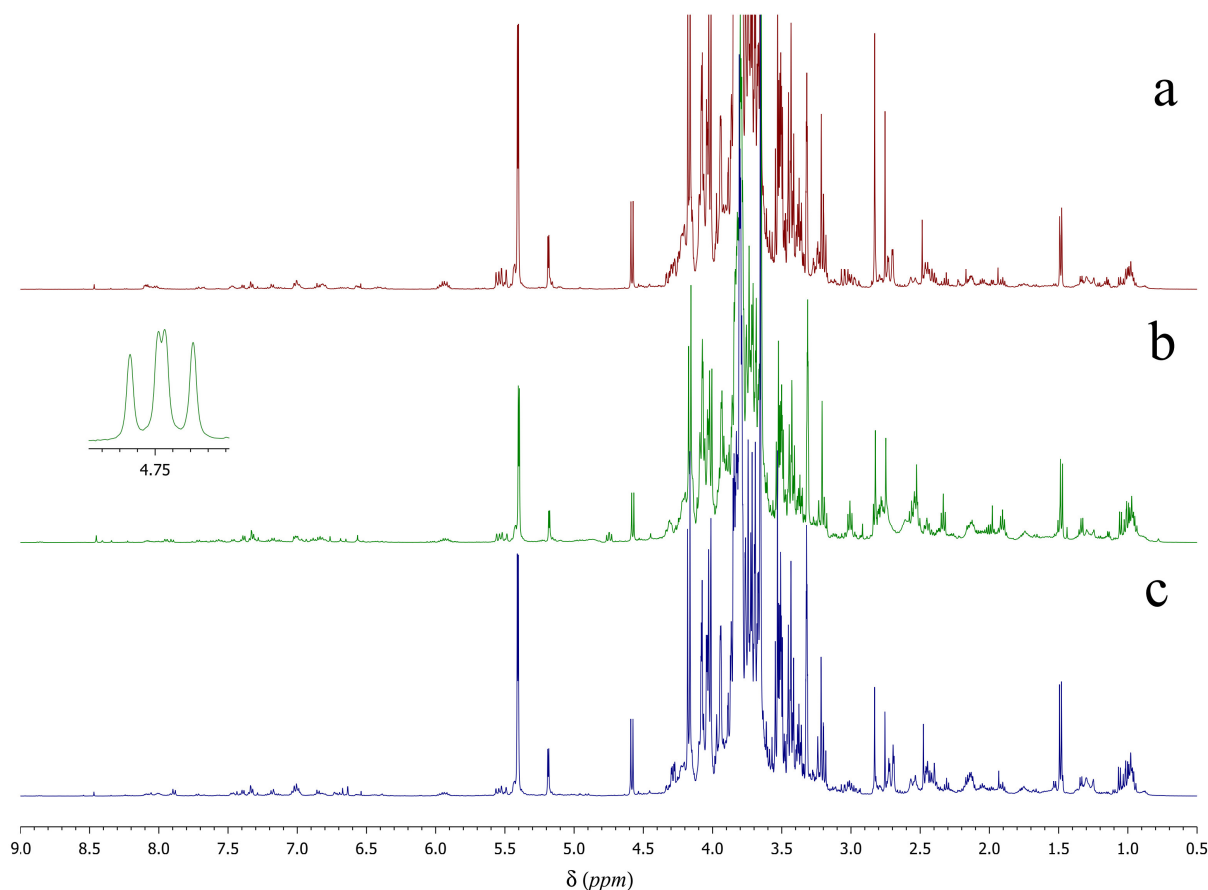
Na primeru *A. ursinum* predložena je strategija detekcije toksičnih adulteranata (Slika 19). U ovom istraživanju postavljena su tri glavna cilja. Prvi cilj je prikupljanje validne grupe autentičnih biljnih uzoraka da bi se napravila dobra baza podataka. Korišćeni su autentični uzorci *A. ursinum* i simulirani adulterisani uzorci dobijeni mešanjem autentičnih biljnih uzoraka *A. ursinum* su *C. majalis* i *A. maculatum*. Sledeći cilj je analiza metabolomičkog otiska prsta dobijenog primenom NMR spektroskopije. Ovom tehnikom može se postići dobar skrining za otkrivanje signala jedinjenja koja ukazuju na adulteraciju. Veliki set podataka koji se dobije posle odrađenog otiska prsta, bio je obrađen kroz multivarijantnu analizu podataka koristeći razne modele koji su omogućili razlikovanje autentičnih od simulirano adulterisanih biljnih uzoraka. Nakon utvrđivanja značajnih promenljivih, kao poslednji cilj, izolovana su jedinjenja od kojih signali promenljivih potiču i određena je njihova struktura primenom instrumentalnih tehnika poput NMR i LC-MS. Sreću je u ovoj studiji iskorišćen kao model sistem jestive biljke za detekciju potencijalno prisutnih toksičnih adulteranata.



Slika 19. Strategija korišćena za detekciju adulteranata u *A. ursinum*

2.2.1. NMR metabolomički otisak prsta

Sastav metabolita u biljnim uzorcima može biti različit u zavisnosti od geografskih i ekoloških faktora zatim, zastupljenosti metabolita u određenim tkivima i organima, pa je potrebno analizirati više botaničkih replika (više uzoraka biljke sa istog lokaliteta) radi poređenja različitosti unutar botaničke populacije. Za potrebe ovog istraživanja, korišćeni su uzorci *A. ursinum* sa šest različitih lokaliteta. Sa svake lokacije, korišćeno je 14 bioloških replika za metabolomički otisak prsta. Dva uzorka, koja su analizirana, predstavljaju grupu autentičnih uzoraka. Simulirani adulterisani uzorci napravljeni su tako što je u šest uzoraka *A. ursinum* dodat *A. Maculatum*, a u preostalih šest *C. majalis*. Simulirani falsifikovani uzorci su napravljeni u tri različit nivoa adulteracije. Ukupno 84 uzorka analizirano je ^1H NMR spektroskopijom. Pošto nenadzirna metabolomika uključuje istovremeno ispitivanje većeg broja metabolita ključni korak je ekstrakcija. Za ekstrakciju ovih uzoraka korišćena je smeša fosfatnog pufera u vodi (pH 6,0) i deuterio metanola u zapreminskom odnosu 1:1 u skladu sa već opisanim protokolom. Smeša ovih rastvarača je idealan odabir za ekstrakciju i primarnih i sekundarnih metabolita. [18] Na **Slici 20** su predstavljeni reprezentativni ^1H NMR spektri autentičnih i simuliranih falsifikata uzoraka *A. ursinum*.



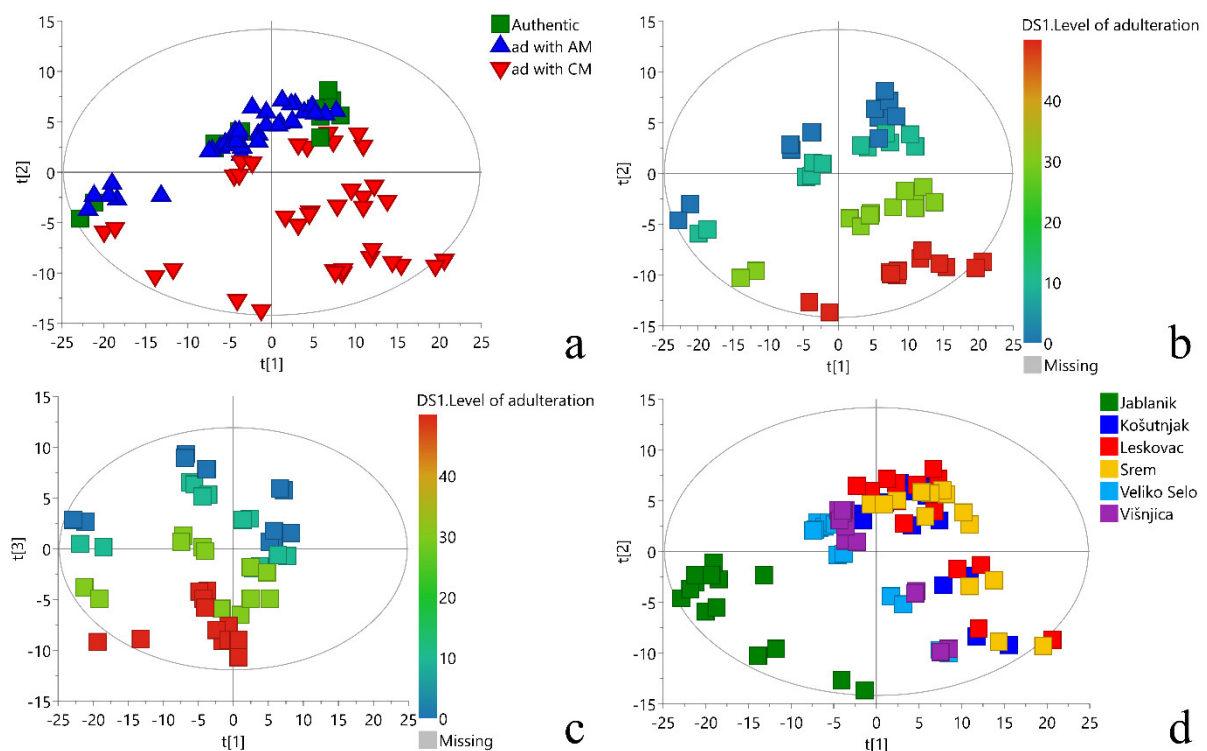
Slika 20. Reprezentativni ^1H NMR spektri ekstrakata *A. ursinum*: (a) autentični uzorak; (b) uzorak spajkovan sa *C. majalis* gde je uvećan signal na $\delta_{\text{H}} 4,75$ i potiče od azetidin-2-karboksilne kiseline; (c) uzorak spajkovan sa *A. maculatum*.

Analizom ^1H NMR spektara, sličan metabolomički šablon se dobija u slučaju autentičnih uzorka i onih koji su spajkovani sa *A. maculatum* i *C. majalis*. Međutim, u slučaju uzoraka falsifikovanih sa *C. majalis* javlja se signal na $\delta_{\text{H}} 4,75$ (dd; $J_1=9,91$ Hz, $J_2=8,05$ Hz). Vizuelni pregled NMR spektara baziran je na urođenoj sposobnosti ljudskog oka za prepoznavanje obrazaca. Međutim, usled složenosti spektara istraživač može da previdi neke signale od interesa. Postoje tri bitna razloga za to: slab odnos signal/šum, multipleti koji se preklapaju i signali koji nisu poravnani. [233] Skup podataka dobijen nakon metabolomičkog otiska prsta podvrgnut je modelima multivarijatne analize

podataka s ciljem pronalaska signala koji mogu razlikovati autentične od uzoraka simuliranih falsifikata.

2.2.2. Multivarijantna analiza

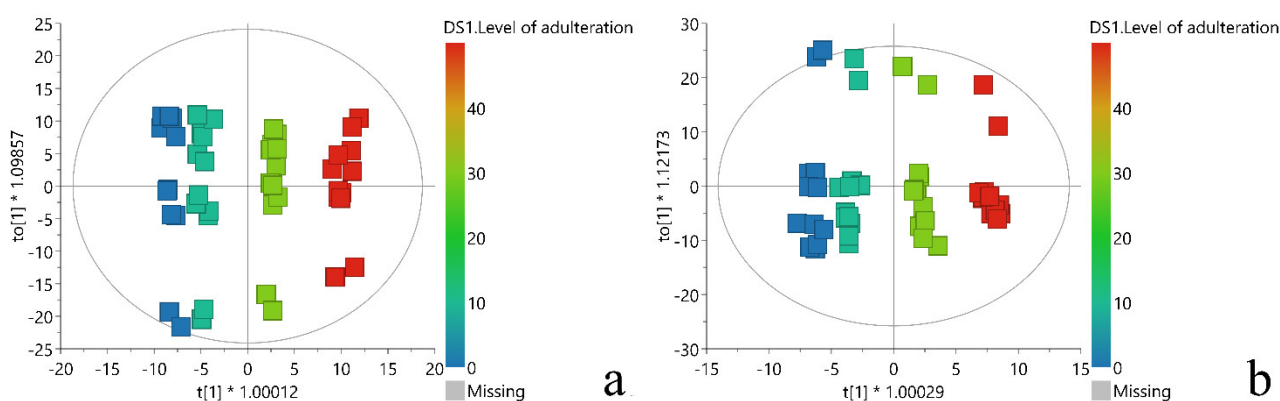
Kao što je već napomenuto, ukupno 84 autentičnih i simuliranih falsifikovanih uzoraka je podvrgnuto analizi glavnih komponenti (PCA). Pošto je PCA tehnika za prepoznavanje obrazaca i nenadzirna tehnika kreiran je model sa manjim brojem novih promenljivih koje sadrže većinu varijacija iz prvobitnih podataka. Kao rezultat ove analize, dobijen je model sa 10 glavnih komponenti, koji objašnjava 91.2% ukupne varijacije podataka. Na osnovu PCA, grafika rezultati prve dve glavne komponente, (Slika 21a) nisu ukazali ni na kakvo grupisanje između autentičnih i simuliranih falsifikovanih uzoraka *A. ursinum* sa *A. maculatum*. U odnosu na to, uzorci, koji su spajkovani sa *C. majalis*, delimično su bili odvojeni od drugih uzoraka. Pri većem stepenu adulteracije, razdvajanje je primetno, što je može videti na Slici 21b. Slično tome, na osnovu nivoa adulteracije, uzorci *A. ursinum* koji su spajkovani sa *A. maculatum* su razdvojeni duž treće glavne komponente (Slika 21c). Prisustvo značajnih autlajera nije uočen u graficima rezultata. Kada se grafici rezultata prikažu u formi zavisnosti geografske lokacije gde su prikupljeni uzorci *A. ursinum*, primećuju se dve grupe uzoraka (Slika 21d). Ovo razdvajanje se može objasniti time što je jedna grupa uzoraka sa Jablanika sakupljena iznad 1000 m nadmorske visine, dok su drugi uzorci prikupljeni ispod 300 metara nadmorske visine. Ovo je u saglasnosti sa ranijim rezultatima koji ukazuju da nadmorska visina utiče na hemijski sastav biljaka. [216,234,235] Ovaj korak analize poslužio je za određivanje varijacija u hemijskom sastavu ispitivanih uzoraka, kako bi naredni multivarijantni modeli bili što verodostojniji.



Slika 21. PCA grafici rezultata: (a) PC1/PC2 uključuju sve ispitivane uzorke, skorovi su obojeni na osnovu dodatih adulteranata. Ad – adulteracija, CM – *C. majalis*, AM – *A. maculatum*; (b) PC1/PC2 uključuje sve autentične uzorke i spajkovanje sa *C. majalis*, skorovi su obojeni na osnovu nivoa adulteracije; (c) PC1/PC3 uključuju autentične uzorke i uzorke spajkovane sa *A. maculatum*, skorovi su obojeni na osnovu nivoa adulteracije; (d) PC1/PC2 uključuju sve ispitivane uzorke, skorovi su obojeni na osnovu geografske lokacije uzoraka *A. ursinum*.

Nakon analize PCA modela, kreirani su OPLS modeli. Suprotno od PCA, u OPLS modelima redukovani broj novih promenljivih uzima u obzir maksimalnu korelaciju između X (NMR metabolomički otisak prsta) i Y-promenljivih (nivoa adulteracije). Predstavljeni ortogonalni modeli olakšavaju interpretaciju rezultata i ukazuju da je OPLS metoda pogodna za otkrivanje promenljivih zaslužnih za najveću korelaciju između NMR otiska prsta ispitivanih uzoraka *A. ursinum* i nivoa njihove adulteracije.

Kreirana su dva OPLS modela: prvi model obuhvata adulteraciju *A. ursinum* sa *C. majalis*, dok drugi modela obuhvata adulteraciju *A. ursinum* sa *A. maculatum* (Slika 22). Kvalitet ovih modela je procenjen na osnovu stepena korelacije (R^2) i prediktivne sposobnosti (Q^2). Prediktivna sposobnost modela je procenjena unakrsnom validacijom (Tabela 4). Međutim, OPLS modeli kreirani iz metabolomičkih podataka mogu lako biti previše korelisani, a njihove prediktivne sposobnosti precenjene. [236] Iz tog razloga, da bi se proverila potencijalno prevelika korelisanost, modeli su provereni na tri različita načina.

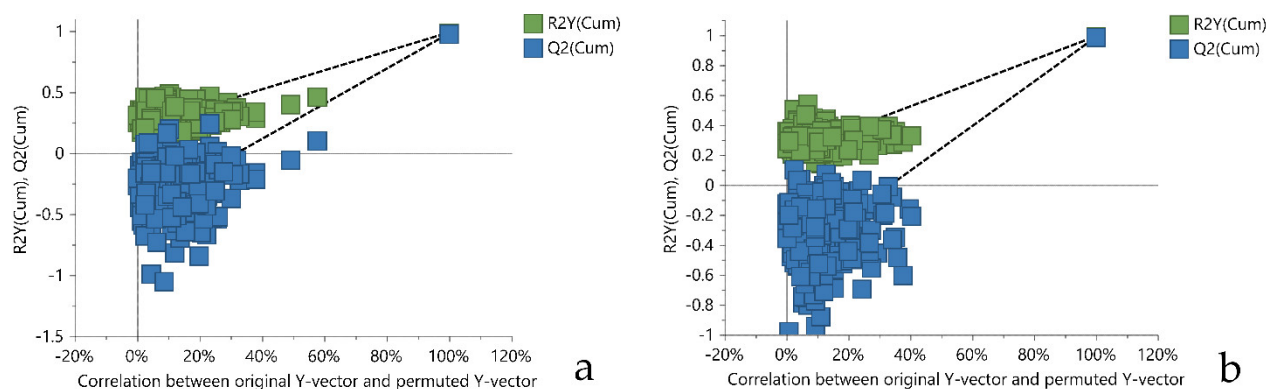


Slika 22. OPLS score plotovi uzoraka *A. ursinum* spajkovanim sa *C. majalis* (a), i *A. maculatum* (b). Rezultati su obojeni na osnovu nivoa adulteracije. t[1] – prva prediktivna komponenta; to[1] – prva ortogonalna komponenta.

Tabela 4. Parametri PCA i OPLS modela

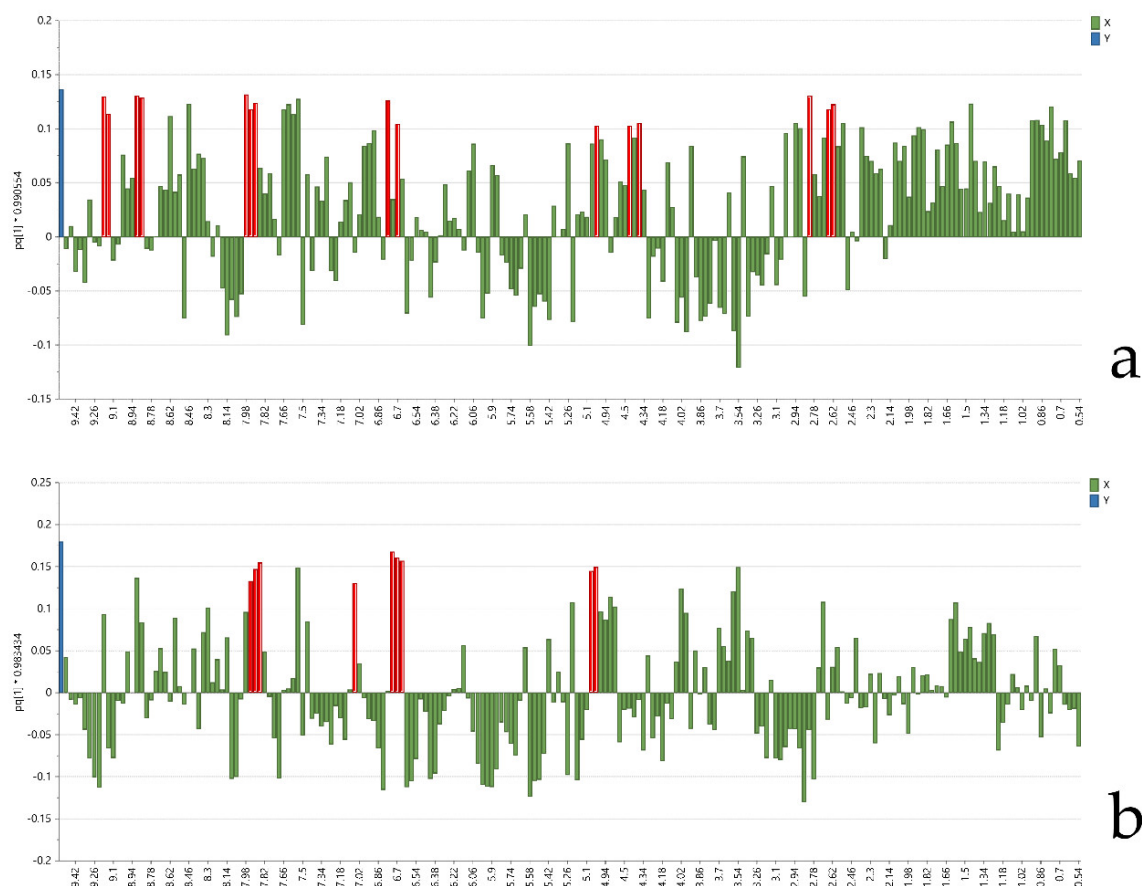
Naziv modela	Broj komponenti	R^2	Q^2	p (CV-ANOVA)	F (CV-ANOVA)
PCA	10	0,925	0,834	-	-
OPLS, adulterisan sa <i>C. majalis</i>	1 + 2	0,992	0,988	2×10^{-37}	543
OPLS, adulterisan sa <i>A. maculatum</i>	1 + 2	0,989	0,981	9×10^{-34}	357

U prvom koraku ispitano je da li postoje značajne razlike između dobijenih R^2 i Q^2 vrednosti, kao i broj komponenti u modelu. Razlika između R^2 i Q^2 parametara je bila manja od 0,01 i modeli su napravljeni sa jednom prediktivnom i dve ortogonalne komponente, ukazujući da nije prisutna prevelika korelisanost. Kao drugi vid kontrole, urađen je permutacioni test koji je validirao OPLS modele što se može videti i na Slici 23. Konačno, kvalitet modela je procenjen korišćenjem CV-ANOVA testa. Prema dobijenim rezultatima, značajnost modela je bila zadovoljavajuća sa p vrednošću daleko ispod 0,05. (Tabela 4)



Slika 23. Permutacioni test (N=200) OPLS modela koji obuhvata uzorke *A. ursinum* adulterisani sa a) *C. majalis* i b) *A. maculatum*.

Uvidom u grafike rezultata OPLS modela, jasno se uočava razdvajanje uzoraka *A. ursinum* sa manjim od uzoraka sa većim nivoom adulteracije. (Slika 22). Za odabir najznačajnijih promenljivih u OPLS modelima, korišćeni su VIPpred parametri. Sve VIPpred vrednosti preko 1,5 smatrane su značajnim za korelaciju sa adulterantom. Primenom gore pomenutog kriterijuma, pronađeni su regioni u loading graficima koji odgovaraju NMR hemijskim pomeranjima biomarkera adulteracije *A. ursinum* sa *C. majalis* i *A. maculatum*. (Slika 24).

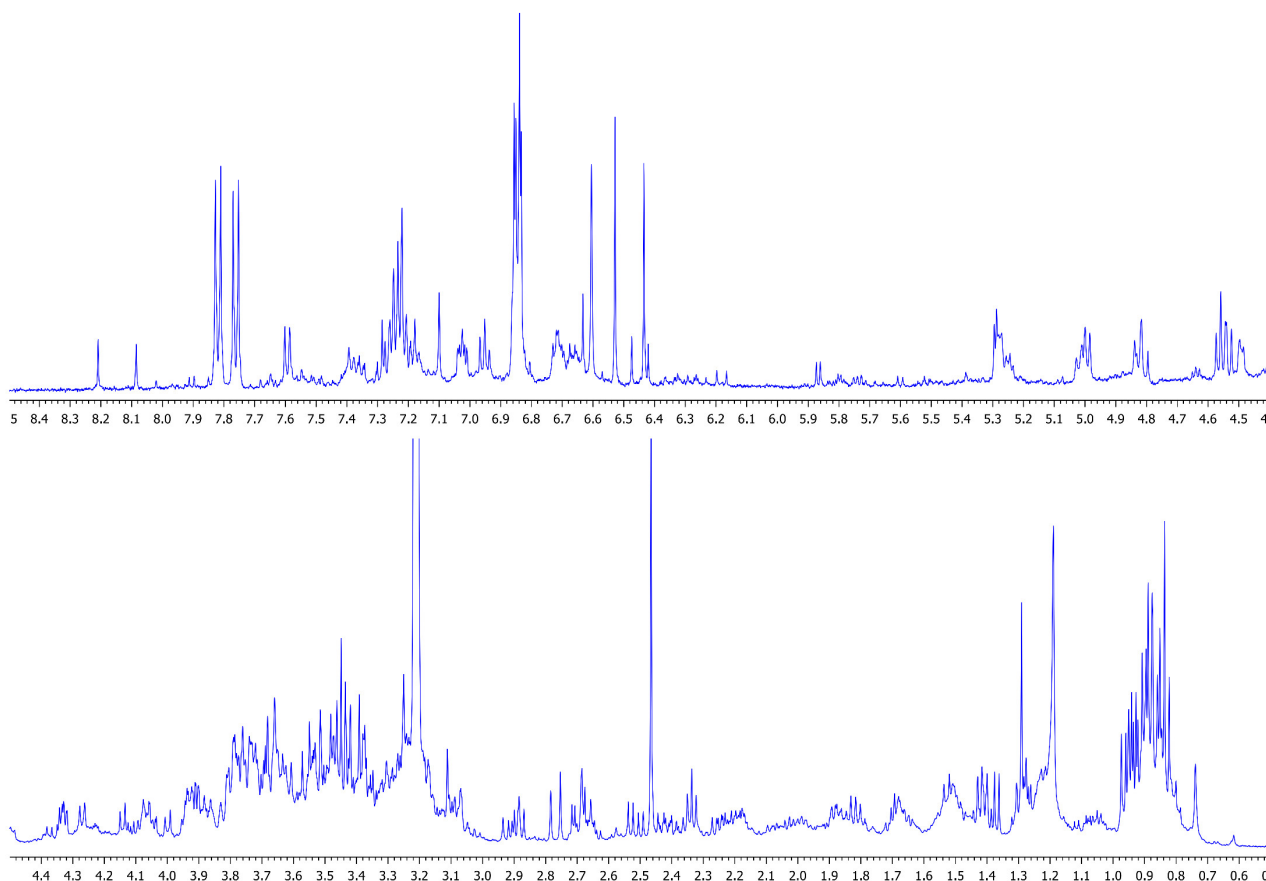


Slika 24. Loading grafici OPLS modela koji se sastoje od *A. ursinum* falsifikovanog sa a) *C. majalis* i b) *A. maculatum*. Najuticajnije varijable sa promenljivim uticajem na projekciju (VIPpred), gde su promenljive sa VIPpred preko 1,5 označeni crvenom bojom.

2.2.3. Određivanje strukture biomarkera adulteracije

Da bi se odredile strukture biomarkera čiji su signali u NMR spektrima bili statistički značajni nakon multivarijantne analize, napravljeni su ekstrakti *C. majalis* i *A. maculatum* koji su grubo prečišćeni tečno-tečnom ekstrakcijom, a zatim fino prečišćeni primenom brze hromatografije na suvoj koloni silika gela (*engl. Dry-Column Flash*). U ovom trenutku, neciljana strategija istraživanja postala je ciljana. Frakcije nisu prečišćene u potpunosti zbog uštede vremena i resursa, već kako bi se obogatile jedinjenima od interesa zarad određivanja struktura analizom NMR spektara.

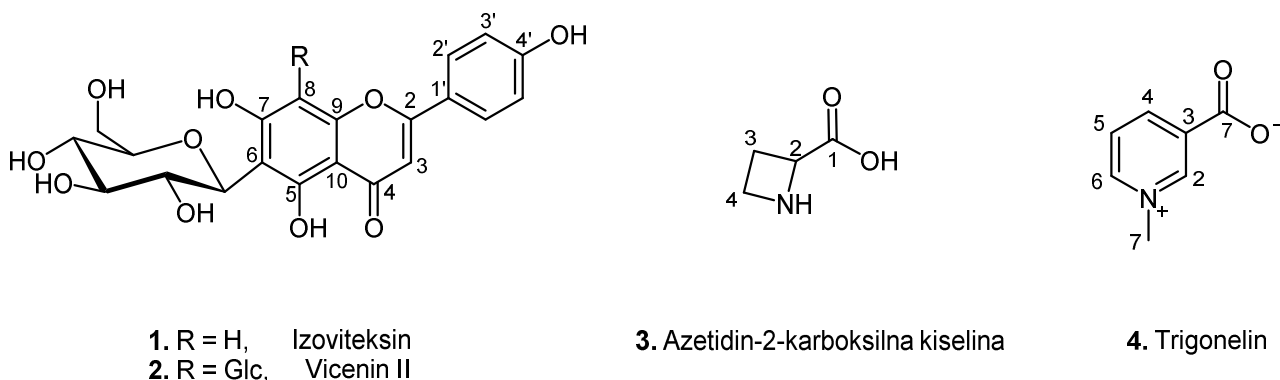
Detaljnou analizom delimično prečišćenih frakcija određeni su biomarkeri adulteracije, analizom rezultata dobijenih iz ^1H NMR i 2D NMR spektara poput COSY, NOESY, 2D *J*-razložen, HSQC i HMBC. Pored NMR tehnike, korišćena je i masena spektrometrija visoke rezolucije (HRMS) i MS fragmentacioni joni (**Prilozi 1 – 27**). Fokus u ^1H NMR spektrima je bio na signalima čije su VIP vrednosti promenljivih bile najviše i prepoznate kao zaslužne za razdvajanje u OPLS modelima. Pažljivom analizom 2D NMR spektara i detaljnom asignacijom je urađena identifikacija jedinjenja kojim ove promenljive pripadaju i predstavljaju biomarkere adulteracije. U slučaju kada je dodatna potvrda strukture bila neophodna, korišćena je LC-DAD-MS analiza ekstrakata i delimično prečišćenih frakcija. Time je izvršena dodatna identifikacija biomarkera na osnovu njihovih retencionih vremena, UV-Vis i MS spektralnih podataka. Svi dobijeni spektralni podaci su poređeni sa literaturom. [237–246]



Slika 25. ^1H NMR spektar *n*-butanolnog ekstrakta *C. majalis* koji sadrži isoviteksin (1) i vinenin II (2). Gore: oblast δ_{H} 4,4–8,5; dole: oblast δ_{H} 0,5–4,5.

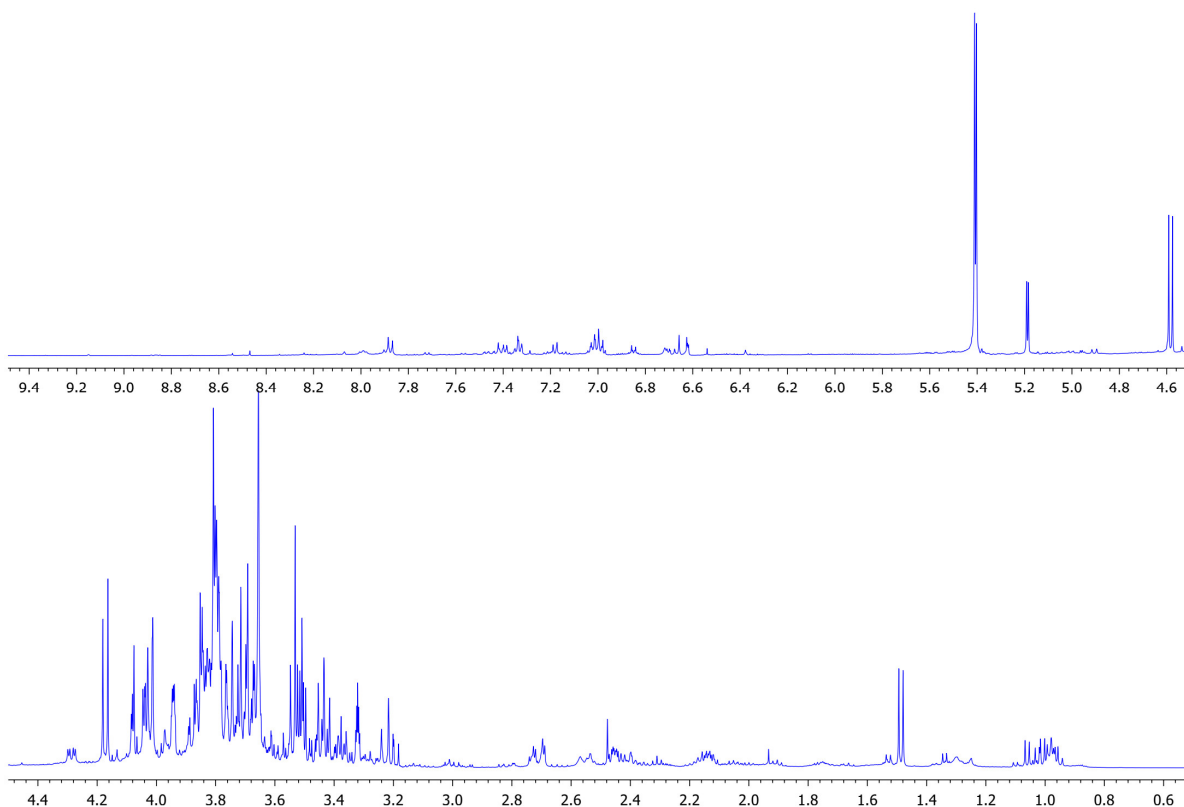
U ^1H NMR spektru *n*-butanolnog ekstrakta *C. majalis* jasno su uočljivi i razvojeni signali na δ_{H} 7,82 (2H, d, $J = 8,6$ Hz) i 7,91 (2H, d, $J = 8,4$ Hz) (**Slika 25**) koji imaju COSY korelaciju sa preklopljenim signalima na δ_{H} 6,84 (2H, d, $J = 8,6$ Hz) i 6,85 (2H, d, $J = 8,5$ Hz), redom, ukazujući

na prisustvo AA'BB' spinskog sistema dve *p*-hidroksifenil grupe. Ovi signali su pripisani prstenu B flavonoidnog *C*-glukozida izoviteksina (**1**) i vicenina II (**2**), čije su strukturne formule prikazane su na **Slici 26**.



Slika 26. Strukturne formule biomarkera adulteracije *A. ursinum* sa *C. majalis* (**1-4**), i *A. maculatum* (**1**).

Pored njih, signal izoviteksina na δ_H 7,82 (H-2') poseduje dve NOESY korelacije sa protonima na δ_H 6,44 (H-8, prsten A) i 6,53 (H-3, prsten C), dok signali vicenina II na δ_H 7,91 ostvaruju jednu NOESY korelaciju sa signalom na δ_H 6,61 (H-3, prsten C). Slično tome, gore pomenuti signali od izoviteksina (**1**) su takođe detektovani u *n*-butanolom ekstraktu *A. maculatum* (**Slika 27**) posle prečišćavanja na Sephadex LH-20 koloni.

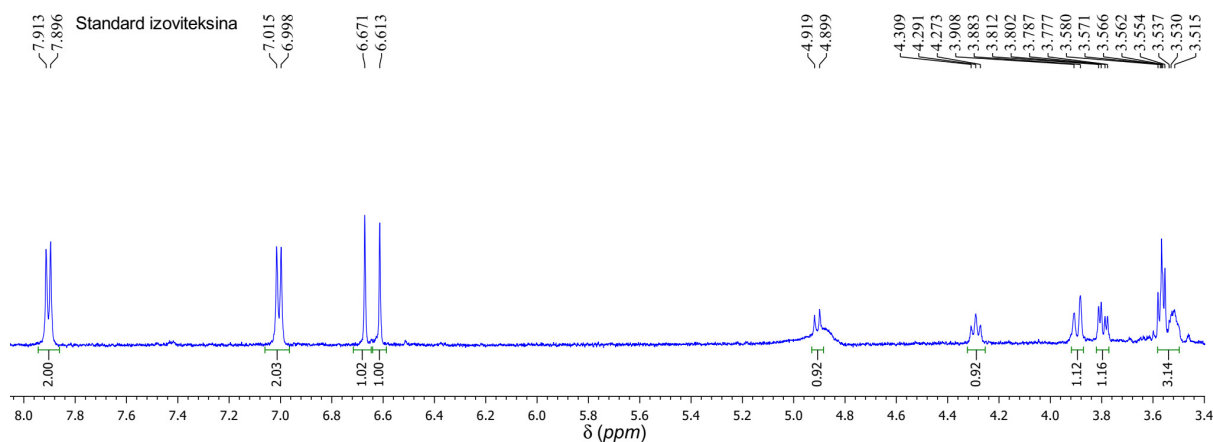


Slika 27. 1H NMR spektar ekstrakta *A. maculatum* koji sadrži isoviteksin (**1**).

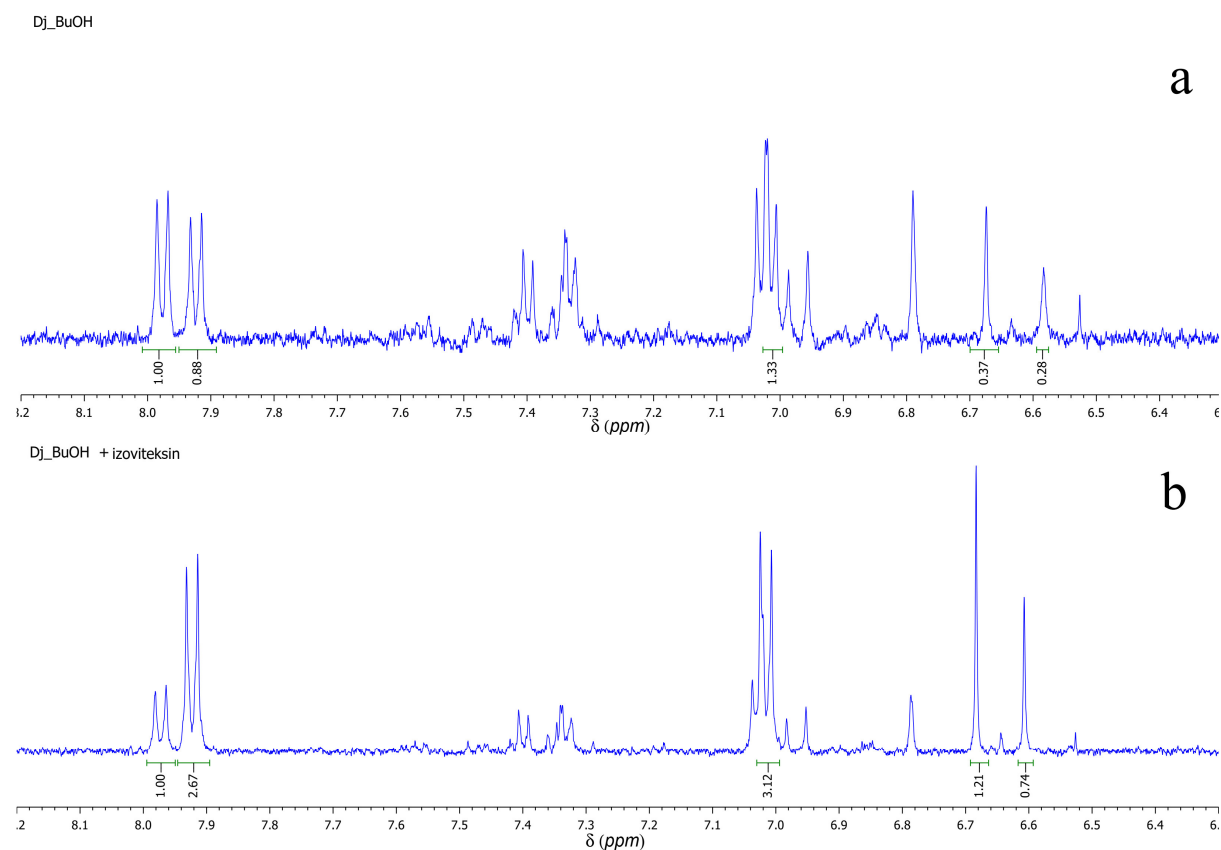
Gore: oblast δ_H 4,5-9,5; dole: oblast δ_H 0,5-4,5.

Na **Slici 28** prikazan je 1H NMR spektar standarda izoviteksina. Standardnim dodatkom izoviteksina u *n*-butanolni ekstrakt *C. majalis* i frakcije *A. maculatum*, potvrđeno je njegovo

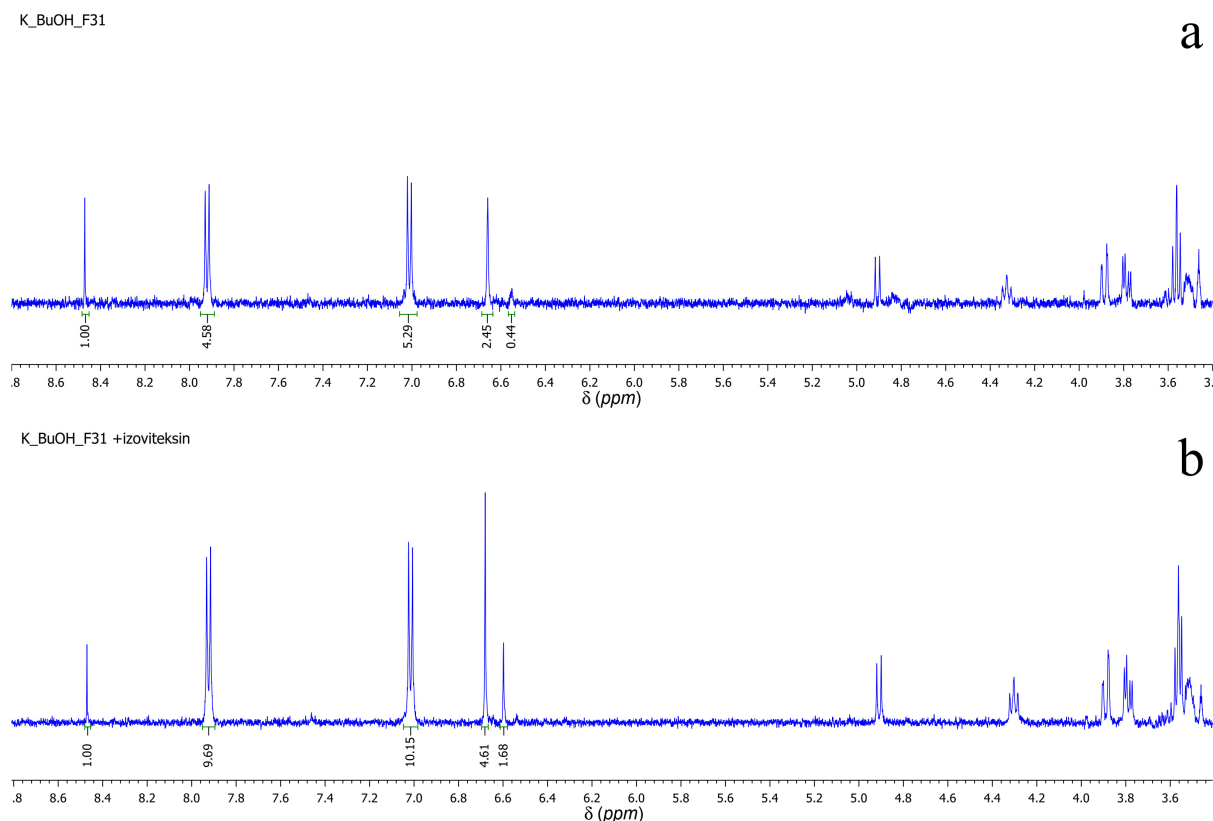
prisustvo, porastom intenziteta signala u ^1H NMR spektru uzorka, koji potiču od izoviteksina (Slike 29 i 30). Na osnovu dobijenog rezultata nedvosmisleno je potvrđeno prisustvo izoviteksina. Razlog za odabir metode standardnog dodatka, a ne samo poređenja hemijskih pomeranja čistog jedinjenja, je blago odstupanje hemijskog pomeranja usled uticaja biljnog matriksa. Svi NMR podaci su bili u saglasnosti sa podacima iz literature. [237,238]



Slika 28. ^1H NMR spektar standarda izoviteksina.



Slika 29. Uvećana regija aromatičnih signala ^1H NMR spektra (a) *n*-butanolnog ekstrakta *C. majalis* i (b) ekstrakta *C. majalis* u koju je dodat izoviteksin.



Slika 30. Uvećana regija aromatičnih i anomernih signala šećera ^1H NMR spektar (a) frakcije ekstrakta *A. maculatum* i (b) frakcije ekstrakta *A. maculatum* u koju je dodat izoviteksin.

Na osnovu LC-DAD-MS analize, u *n*-butanolnom ekstraktu *C. majalis* identifikovana su dva jedinjenja, jedno na $R_t=5,27$ min vicenin II (**2**) i drugo na $R_t=5,69$ min izoviteksin (**1**), dok je u ekstraktu *A. maculatum* dominantno jedno jedinjenje, izoviteksin (**1**) na $R_t=5,69$ min. Karakteristični UV spektri sa maksimumima na $\lambda=336$ i 270 nm ukazuju na flavonsku ili flavonolnu strukturu ovih jedinjenja. [239]

U MS/MS spektrima odgovarajućih jedinjenja javljaju se joni sa neutralnim gubitkom od 90 ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3$), 120 ($\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_4$) i 150 ($\text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}_5$) masenih jedinica. Njihov gubitak karakterističan je za unakrsne fragmentacije veza unutar saharidnih jedinica. Neutralni gubitak jednog od moguća četiri molekula vode ukazuje na strukturu flavonskog C-glikozida. [240]

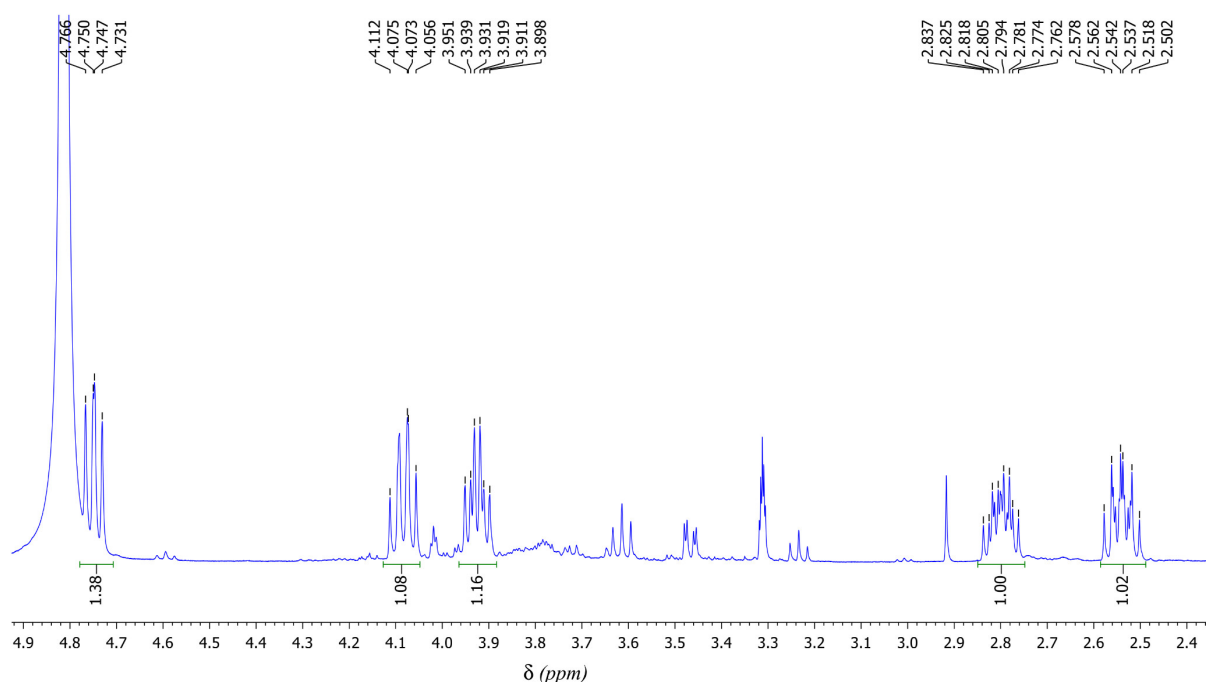
U MS spektru vicenina II, u negativnom modu jonizacije detektovana je m/z vrednost 593,1522 koja odgovara deprotonizovanom pseudomolekulskom jonu $[\text{M}-\text{H}]^-$ (**Prilog 22**). U pozitivnom modu jonizacije prisutni su pseudomolekulski jon $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z vrednosti 595,1656 i jon adukt $[\text{M}+\text{Na}]^+$ m/z vrednosti 617,1476 (**Prilog 23**). Izmerene vrednosti masa odgovaraju bruto molekulskoj formuli $\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{15}$. Primenom tandemne masene spektrometrije (MS/MS) u negativnom modu jonizacije detektovane su sledeće m/z vrednosti fragmenata 503,1204; 473,1108; kao i 431,1003 i 311,0573 (**Prilog 22**) koji odgovaraju m/z vrednostima nastalim kao rezultat istovremene fragmentacije veza jednog i/ili oba ostatka heksoze. Pored navedenih fragmenata u MS/MS spektru uzorka u pozitivnom modu jonizacije prisutni su joni m/z vrednosti: 577,1550 ($[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$); 475,1235; i 455,0942; 437,0843; 433,1129; 415,1022; 397,07916; 397,07918; 397,07918; 337,0706; 313,0706 i 283,0603 (**Prilog 23**) koji nastaju kao rezultat fragmentacije unutar jednog i/ili oba šećerna ostatka. Osnovni jon u MS/MS spektrima, kako u pozitivnom tako i u negativnom modu jonizacije odgovara jedinjenju bruto formule vicenina II, a vrednosti m/z mase fragmentacionih jona dodatno potvrđuju da se radi o di-C-glikozidu. Konačan dokaz da se radi o viceninu II je prisustvo

fragmentacionog jona m/z vrednosti 271,0609 u pozitivnom modu jonizacije koji odgovara pseudomolekulskom jonu apigenina $[M+H]^+$. [241–243]

U oba ekstrakta, *C. majalis* *n*-butanolnog ekstrakta i frakcije *A. maculatum* komponenta koja se eluira u LC-MS hromatogramu na $R_t = 5,78$ min odgovara jedinjenju molekulske formule $C_{21}H_{20}O_{10}$, što je utvrđeno na osnovu jona na pseudo molekulskog jona na m/z vrednosti 431,0999 $[M-H]^-$ u negativnom modu jonizacije (**Prilog 24**), kao i na osnovu m/z vrednostima 433,1125 $[M+H]^+$ i 455,0950 $[M+Na]^+$ u pozitivnom modu (**Prilog 25**).

Glavni fragmentacioni joni uočeni u negativnom modu MS/MS spektra ove komponente bili su na m/z vrednostima 413,1468 ($[M-H-H_2O]^-$; 341,0680; 311,0571 i 283,0620 u *C. majalis* (**Prilog 24**), i na m/z vrednostima 341,0675; 323,0571; 311,0569 ; 283,0620 i 269,0458 u *A. maculatum* (**Prilog 26**). U MS/MS spektru *C. majalis* najintenzivniji fragmentacioni joni imali su m/z vrednosti 337,0708; 313,0710 i 283,0604 u pozitivnom modu (**Prilog 25**). S druge strane, u ekstraktu *A. maculatum*, joni najintenzivnijih fragmenata uočeni u pozitivnom modu MS/MS spektara imali su m/z vrednosti 415,1026 ($[M+H-H_2O]^+$); 397,0913; 367,0809; 337,0704; 313,0706 i 283,0603 (**Prilog 27**). Primetne razlike u MS/MS spektrima izoviteksina u dva ispitivana ekstrakta, se mogu pripisati efektu matriksa. Mogući obrasci fragmentacije, zajedno sa prisustvom jona $[M+H-4H_2O]^+$ na m/z vrednosti 361,0703; jon malog intenziteta na m/z vrednosti 271,0603, kao i odsustvo jona ukazuju na 6-*C*-glikozid apigenin. [241–244]

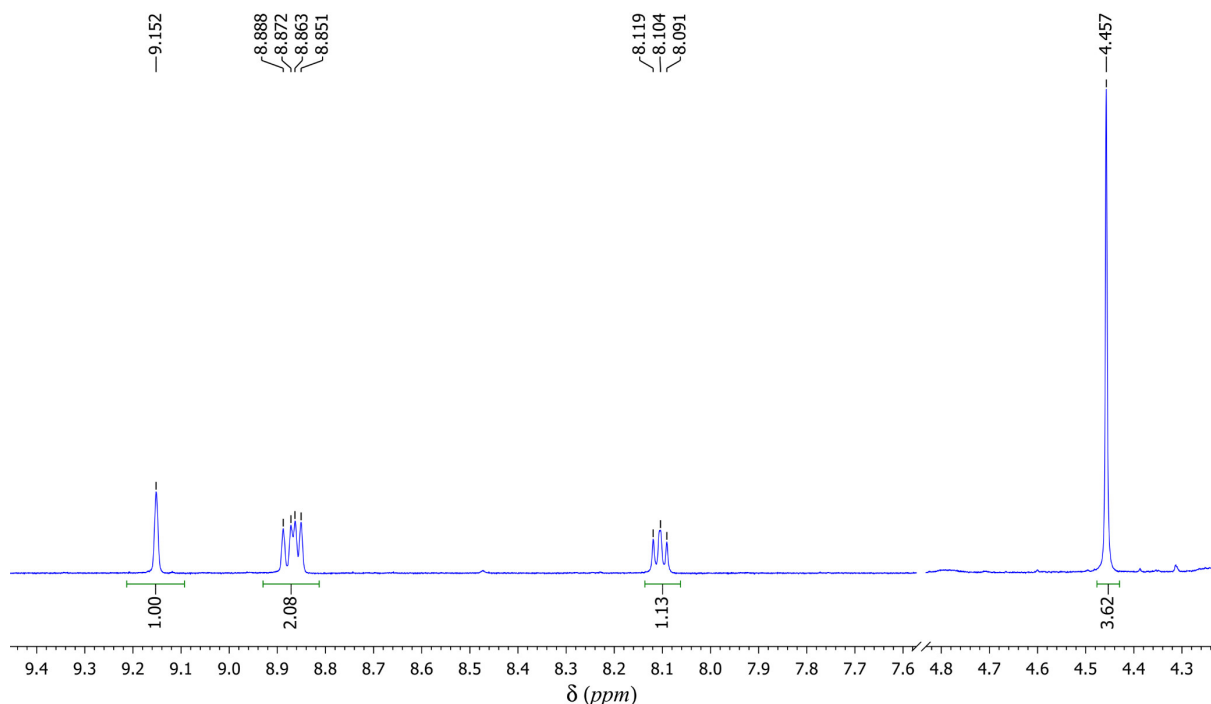
Signal na δ_H 4,75 (dd), jasno uočljiv u 1H NMR spektru uzoraka *A. ursinum* sa dodatkom *C. majalis*, pripisan je α -protonu (H-2) azetidin-2-karboksilne kiseline (**3**) (**Slika 26**). Dva para diastereotopnih metilenskih protona (H-3 i H-4) ove ciklične imino kiseline asignirana su na osnovu korelacija iz COSY i HSQC spektara. Potvrda strukture je dobijena poređenjem NMR podataka sa onima iz literature. [245]



Slika 31. Deo 1H NMR spektra izolovane frakcije DJ_H₂O_F44 u kojoj su obeleženi signali od azetidin-2-karboksilne kiseline (**3**).

Četiri signala na δ_H 8,10 (H-5, dd, $J = 8,0$ 6,2 Hz); 8,86 (H-4, brd, $J = 6,2$ Hz); 8,88 (H-6, brd, $J = 8,0$ Hz) i 9,15 (H-2, brs) u 1H NMR spektrima (**Slika 32**) uzoraka *A. ursinum* sa dodatim *C. majalis* pripisani su aromatičnim protonima piridinskog alkaloida trigonelina (**4**) (**Slika 26**). Singlet metil grupe takođe je primećen u 1H NMR spektru na δ_H 4,46 (H-7) koji pokazuje ključne

HMBC korelacije sa C-2 i C-6. Ovo ukazuje na prisustvo metil grupe vezane za azot i potvrđuje strukturu 3-karboksi-1-metilpiridinijum katjona. [246]



Slika 32. Deo ^1H NMR spektra izolovane frakcije DJ_H₂O_F66 u kojoj se nalazi trigonelin (4).

Flavonoidni C-glukozidi poput izoviteksina i vicenina II pronađeni su u mnogim lekovitim biljkama koje se koriste u tradicionalnoj medicini i smatraju se aktivnim komponentama. Oni pokazuju antiinflamatorno, antioksidativno, antikancerogeno i neuroprotektivno dejstvo. [247] Trigonelin je takođe pronađen u mnogim biljnim vrstama i poseduje čitav dijapazon bioloških aktivnosti kao što su antikancerogeno, antihiperglikemijsko, kardioprotektivno i hepatoprotektivno dejstvo. [248] Dakle, biomarkeri izoviteksin, vicenin II i trigonelin ne predstavljaju toksične komponente u ispitivanim otrovnim adulterantima. S druge strane, azetidin-2-karboksilna kiselina je antagonist prolina. Ugradnja ove ciklične imino kiseline umesto prolina utiče na formiranje sekundarne strukture proteina kao što su hemoglobin, kolagen i keratin, a ova promena utiče na njihovu aktivnost. Takođe je pokazano njegovo teratogeno dejstvo pri čemu dolazi do pojave malformacija pluća i nepca kod životinja. [249] Stoga se azetidin-2-karboksilna kiselina može smatrati toksičnim biomarkerom u *C. majalis*. Ovde treba naglasiti da su srčani glikozidi prisutni u ovoj biljci glavni toksični sastojci. [94] Njihov sadržaj u osušenim listovima *C. majalis* varira od 0,1 do 0,5%. Identifikovano je čak 40 različitih srčanih glikozida, u promenljivim odnosima. Najzastupljeniji među njima je konvalatoksin, sa udelom od 4 do 40%. [250] U našoj studiji, u ^1H NMR spektrima uzoraka *A. ursinum* sa dodacima *C. majalis* nisu detektovani signali srčanih glikozida. Ovo nije iznenađujuće jer postoji 40 različitih struktura, od kojih svaka ima karakteristična hemijska pomeranja. U ovakvim slučajevima NMR tehnika nema sposobnost detekcije signala slabog intenziteta u obilju mnogo intenzivnijih signala drugih metabolita.

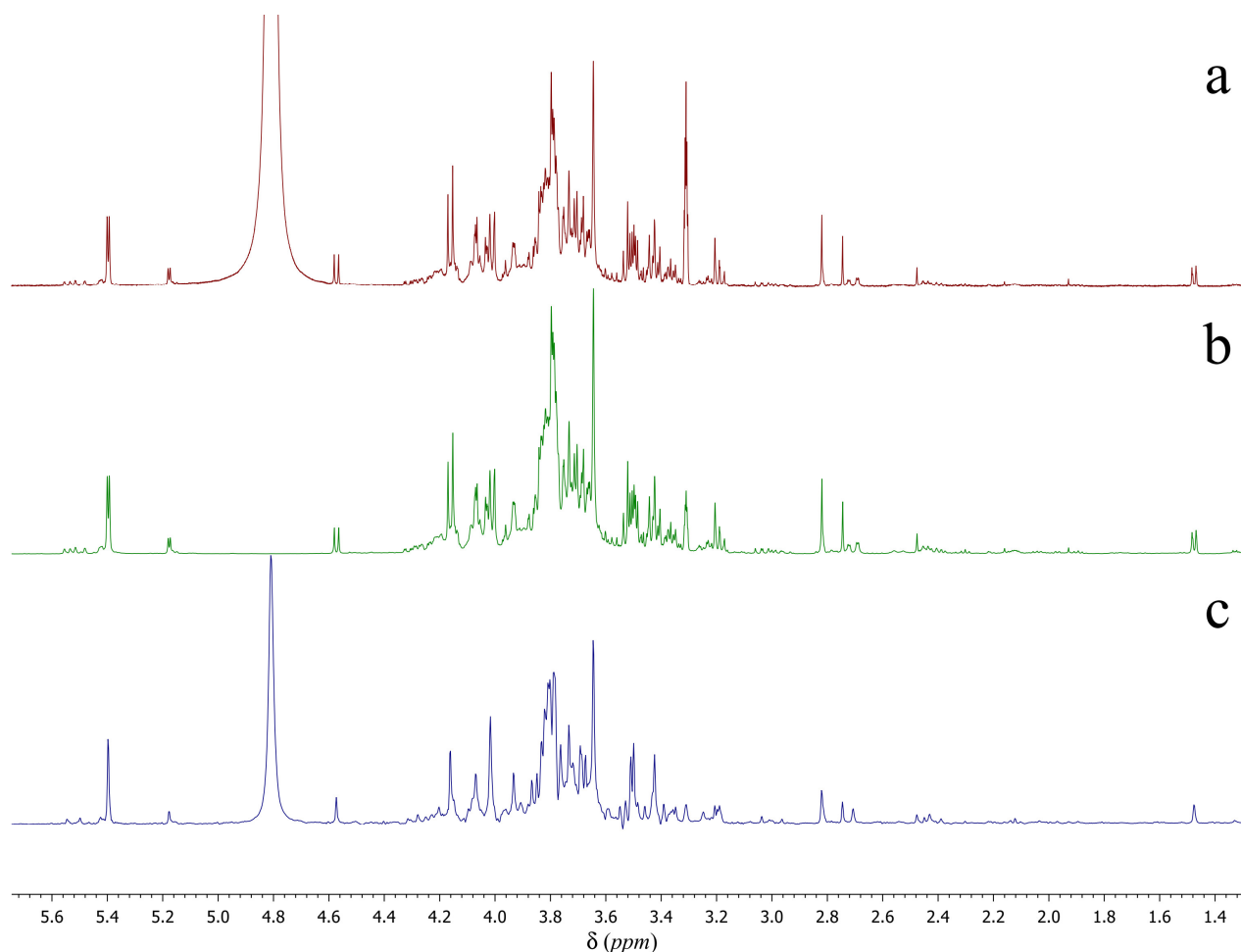
Iako biomarkeri izoviteksin, vicenin II i trigonelin nisu toksični, njihovo prisustvo u uzorcima *A. ursinum* može ukazivati na adulteraciju sa *C. majalis* koji sadrži toksične srčane glikozide. Takođe, izoviteksin u *A. ursinum* može da ukaže na adulteraciju sa *A. maculatum*, čija upotreba može da izazove alergijske reakcije. [96] Princip da prisustvo neotrovnih metabolita ukazuje na prisustvo otrovnih pokazano je u literaturi na primeru detekcije ricina. Molekuli malih molekulskih masa iz semena *Ricinus communis* ukazuju na prisustvo visoko toksičnog proteina ricina. [251]

2.2.4. Primena PSYCHE NMR pulsne sekvence u metabolomici uzoraka sremuša

U odnosu na masenu spektrometriju, ^1H NMR spektroskopija ima izuzetnu ponovljivost i uticaj matriksa nije toliko izražen te se često primenjuje u analizi bioloških uzoraka sa metabolomičkim pristupom. Pored toga što pruža kvantitativne podatke, omogućava i određivanje strukture metabolita koja se nalaze u smešama. Rešavanje spektara smeša prirodnih proizvoda pogotovu ekstrakata koji se najčešće sreću u metabolomici je otežano usled velikog broja zastupljenih jedinjenja, čiji se signali nalaze na istim ili sličnim hemijskim pomeranjima te dolazi do njihovog preklapanja. Pored toga razlike u koncentracijama pojedinačnih jedinjenja značajno variraju. Međusobno sprezanje protona dovodi do usložnjavanja oblika signala i distribucije njegove ukupne površine na širu skalu hemijskih pomeranja. Ovo je slučaj kod svih tipova bioloških uzoraka pa i kod biljnih, gde jedinjenja koja pripadaju istoj klasi imaju preklopljene signale u NMR spektru ili su zbog male koncentracije i složenog oblika u nivou šuma bazne linije. Kako bi se prevazišao ovaj problem razvijene su pulsne sekvence kojima se vrši direktno ili indirektno raspresanje usloženih signala. Jedan od najranijih i najčešće primenjivanih NMR eksperimenata u te svrhe koristi J modulaciju i projekciju iz 2D J -razloženih spektara za uprošćavanje ^1H NMR spektra. Međutim, nedostatak ove pulsne sekvence je zasnovanost na J modulaciji što rezultira nejednakim intenzitetima signala u projektovanim spektrima. U skorije vreme razvijeni su NMR eksperimenti koji se zasnivaju na Pure Shift metodama. Ove metode imaju za cilj da uproste spektre, u kojima izostaju skalarna kuplovanja protona, pa je rezultat ^1H NMR spektar gde su svi multipleti u formi singleta. Iako je moguće dobiti mnogo bolju rezoluciju, u zavisnosti od korišćene metode, Pure Shift se odlikuje smanjenom osetljivošću u poređenju sa standardnim ^1H NMR eksperimentom. [204,252]

U ovoj doktorskoj disertaciji, ukupno je analizirano 12 biljnih uzoraka *A. ursinum* u duplikatu, 6 autentičnih uzoraka prikupljenih na šest lokaliteta u Srbiji i 6 simuliranih adulterisanih uzoraka sa *C. majalis* gde je koncentracija adulteranta bila 50%. Ukupno 24 uzorka analizirano je NMR spektroskopijom. Korišćeni su isti uzorci koji su pripremljeni (Odeljak 3.3.2.) za ^1H NMR otisak prsta (Odeljak 2.2.1.).

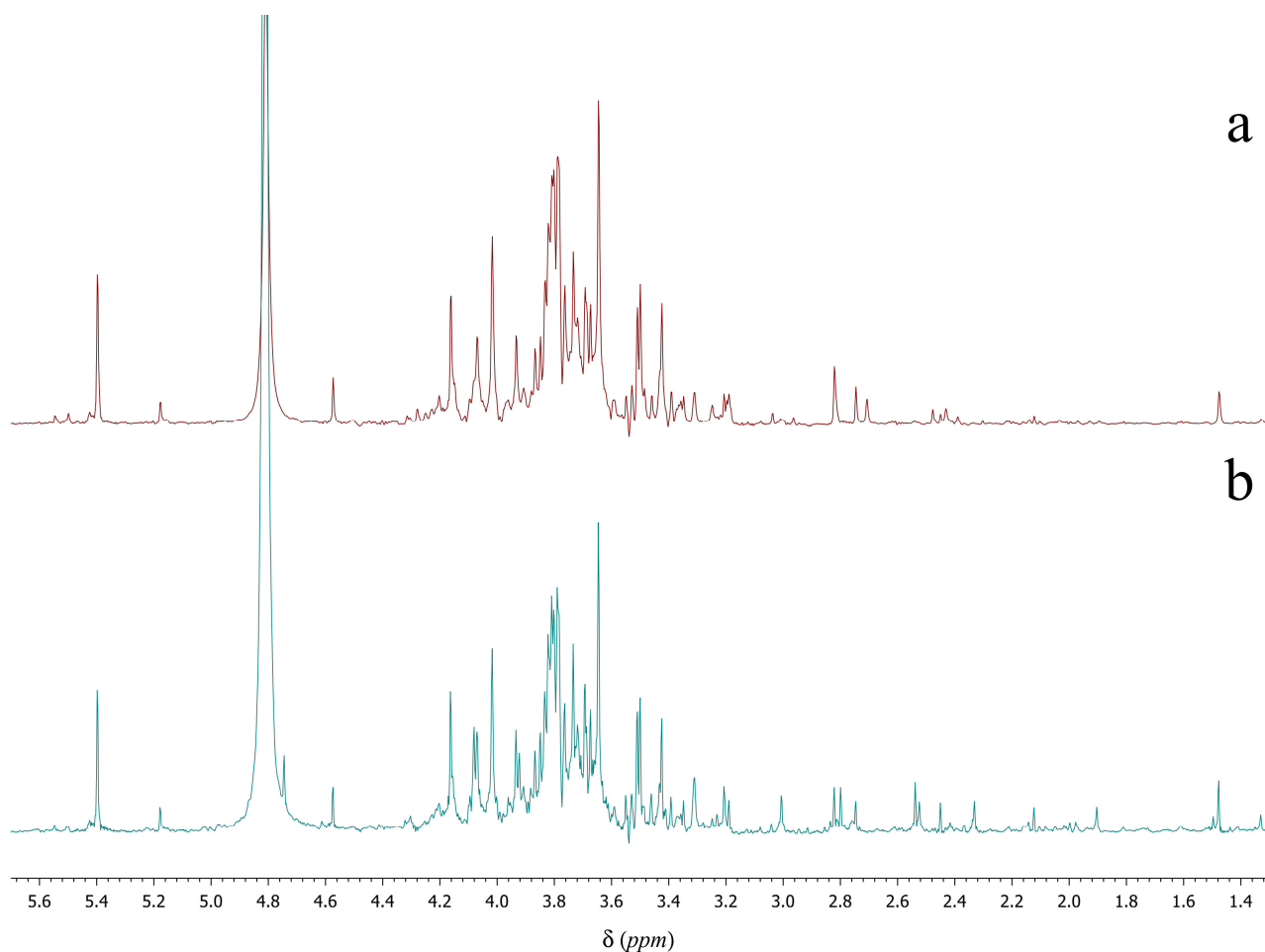
Za sve uzorke snimljeni su ^1H NMR spektri sa tri različite pulsne sekvence: standardni ^1H NMR bez supresije signala rastvarača (zg30), standardni ^1H NMR sa supresijom signala rastvarača (zgpr) i dekuplovani ^1H NMR sa supresijom signala rastvarača (PSYCHE), **Slika 33**. Razlika između spektara dobijenih pulsним sekvencama zg30 i zgpr je u odsustvu signala koji potiče od HOD i javlja se na oko δ_{H} 4,8 kao posledica presaturacije koja je deo zgpr pulsne sekvence, a samim tim povećane snage pojačivača, što dovodi do povećane osetljivosti i detekcije manje zastupljenih jedinjenja. U spektru dobijenim PSYCHE eksperimentom svi signali su singleti, jer je suzbijeno homonuklearno kuplovanje između protona. Na ovaj način, povećana je rezolucija samog spektra i neki preklopljeni multipleti postali su odvojeni singleti.



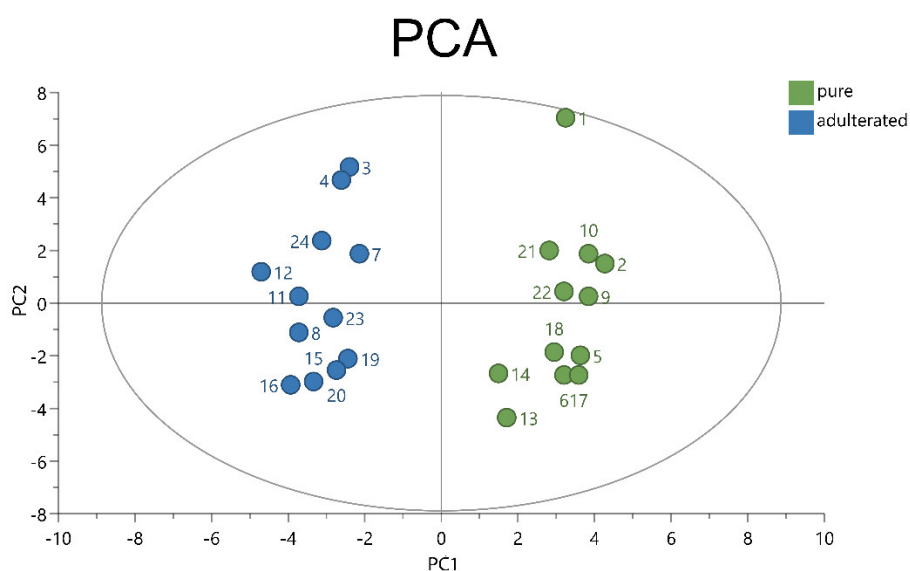
Slika 33. Prikazana su tri NMR spektra ekstrakta uzorka *A. ursinum*: a) standardan ^1H NMR spektar, b) spektar dobijen *zgpr* pulsnom sekvencom sa presaturacijom i c) spektar dobijen PSYCHE pulsnom sekvencom.

Posmatranjem spektara prikazanih na **Slici 34** javlja se sličan metabolomički profil u analiziranim uzorcima, s tim da se u uzorcima koji su adulterisani sa *C. majalis* javlja jedan jasno uočljivi singletni signal δ_{H} 4,75 koji potiče od azetidin-2-karboksilne kiseline, što je u skladu sa dobijenim rezultatima u Odeljku 2.2.1.

Rezultati ^1H NMR spektroskopije za 24 uzorka *A. ursinum* dobijenih Pure Shift metodom, korišćeni su u analizi glavnih komponenti (PCA). Iako ova tehnika multivarijantne analize ne pruža informacije o pripadnosti uzoraka određenoj klasi, ovde je korišćena u cilju prepoznavanja obrazaca i za smanjenje promenljivih. Kreiran je manji broj promenljivih koje opisuju većinu varijacija posmatranih uzoraka. Ovo je rezultiralo dobijanjem PCA modela sa tri glavne komponente, koje objašnjavaju 48,3% ukupne varijacije podataka. Na **Slici 35** prikazan je grafik rezultata PCA analize, i može se primetiti grupisanje između analiziranih uzoraka, kao i odsustvo uzoraka koji drastično odstupaju od modela (eng. outlier). Jednu grupu uzoraka čine autentični biljni uzorci *A. ursinum*, dok drugu uzorci spajkovani sa *C. majalis*. Validnost modela opisana je koeficijentom determinacije R^2 i predikcione sposobnosti i Q^2 . I za analizirani PCA model dobijene, su R^2 0,483 i Q^2 0,166 vrednosti.



Slika 34. Reprezentativni PSYCHE NMR spektri ekstrakata:
(a) autentičnog uzorka i (b) uzorak spajkovan sa *C. majalis*.



Slika 35. PCA grafik rezultata: PC1/PC2 uključuju sve ispitivane uzorke. Uzorci obeleženi pure označavaju autentične biljne uzorke, dok adulterated označavaju uzorke spajkovane sa *C. Majalis*.

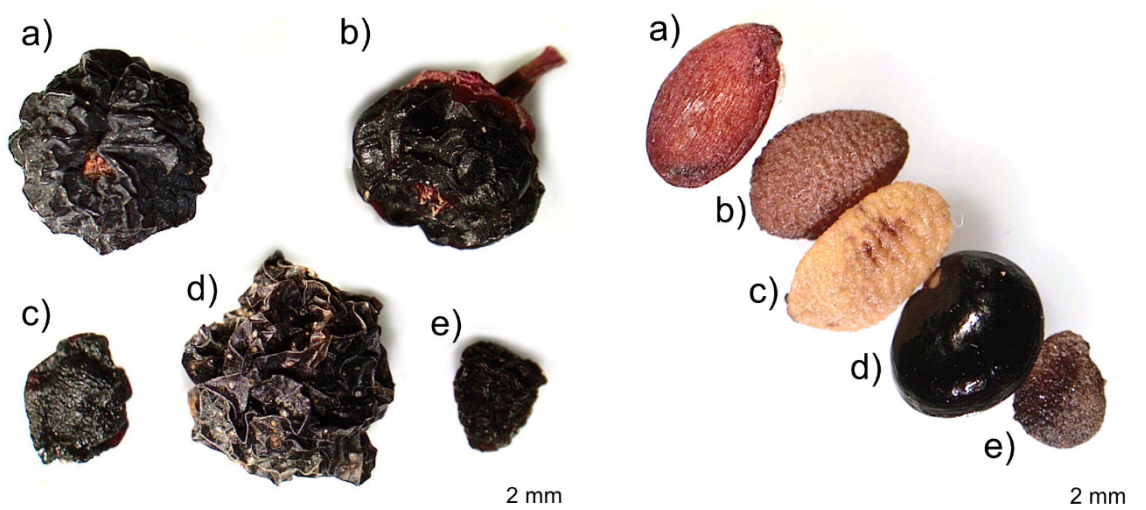
2.3. Primena HPTLC metabolomike u kontroli kvaliteta uzoraka *A. melanocarpa* (Michx.) Elliott

Ciljevi ove studije su podrazumevali ispitivanje HPTLC profila uzoraka bobičastog voća aronije primenom metabolomičkog pristupa, kako bi se utvrdilo botaničko poreklo ispitivanih adulteranata aronije i identifikacija najvažnijih jedinjenja koji su botanički markeri odgovorni za klasifikaciju u statističkim modelima.

2.3.1. Morfološke karakteristike aronije i njenih čestih adulteranata

Za makroskopsku analizu korišćen je stereo mikroskop Olympus SZ61 povezan sa kamerom. Posmatrani su celi osušeni i smrznuti plodovi, a potom je seme izolovano iz perikarpa i posmatrano. Mikromorfološke karakteristike semena su korišćene za određivanje biološkog porekla (vrste) adulteranata prema Bojňanský i Fargašová. [253]

Aronija, kao značajna funkcionalna hrana, često se adulteriše sa različitim vrstama bobičastog voća. Uobičajeni adulteranti koji su dokumentovani u Srbiji su bobice *S. nigra*, *S. ebulus*, *P. americana* i *S. nigrum*. Kada se osuše i skupe, ove bobice imaju sličan oblik i nisu lako prepoznatljive (Slika 36). Semena, s druge strane, iako sličnih veličina, mogu se lako prepoznati posmatranjem stereomikroskopom na osnovu oblika i teksture omotača semena (Slika 36). Seme *P. americana* je sferično ili bubrežno, ljubičasto do crno, sa glatkom, sjajnom, golom površinom i ističe se u poređenju sa drugim semenima. Semena *A. melanocarpa*, *S. nigrum* i *S. ebulus* su sličnih veličina, izdužena, dok je seme *S. nigrum* diskoidno i sitnije. Presudna odrednica semena aronije je fina uzdužna izbrazdana ljubičasto-braon površina, dok su semena *S. nigra* i *S. ebulus* bledo do tamno braon boje sa poprečno izbrazdanom površinom, a površina *S. nigrum* je fino mrežasto-žbunasto bledo žuta. Ove karakteristike mogu biti dragocene za identifikaciju neoštećenog ili grubo mlevenog biljnog materijala. Ipak, za određivanje falsifikata finih praškastih uzoraka, sokova ili ekstrakata, potrebne su specifičnije i preciznije metode koje se oslanjaju na hemijski sastav. [253]



Slika 36. Osušene bobice (levo) i njihova semena (desno) aronije i njenih čestih adulteranata.
a) aronija (*A. melanocarpa*), b) vinobojka (*P. americana*), c) zova (*S. nigra*),
d) pomoćnica (*S. nigrum*), e) avdika (*S. ebulus*).

2.3.2. Identifikacija metabolita

Identifikacija jedinjenja pronađenih u ekstraktima zasnivala se na analizi njihovih UV spektara i specifične boje pod vidljivim i UV svetlom sa ili bez derivatizacije sa NP/PEG reagensom (smeša aminoetildifenil-borinata i polietilenglikola). R_f vrednosti, boje i UV spektralni podaci identifikovanih jedinjenja su upoređeni sa komercijalno dostupnim standardnima za koje je poznato da se nalaze u ispitivanim bobicama (**Tabela 5**).

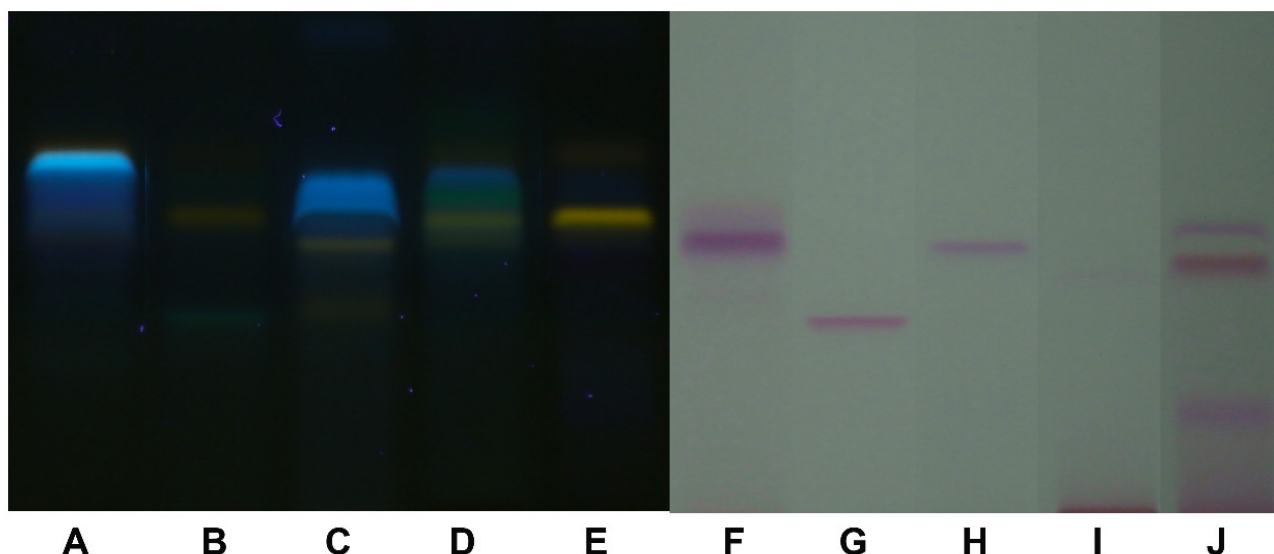
Tabela 5. Identifikovani metaboliti u aroniji i njena četiri česta adulteranta

Redni broj	Naziv jedinjenja	R_f vrednost	Boja	Detekcija
1	Cijanidin 3- <i>O</i> -sambubiozid-5- <i>O</i> -glukozid	0.24	ljubičasta	vidljiva svetlost
2	Cijanidin 3,5- <i>O</i> -diglukozid	0.24	ljubičasta	vidljiva svetlost
3	Betanin	0.37	pink	vidljiva svetlost
4	Cijanidin 3- <i>O</i> -sambubiozid	0.50	ljubičasta	vidljiva svetlost
5	Petunidin 3- <i>O</i> -(<i>p</i> -kumaroil)-rutinozid-5- <i>O</i> -glukozid	0.53	ljubičasta	vidljiva svetlost
6	Rutin	0.58	žuta	$\lambda=366$ nm
7	Cijanidin 3- <i>O</i> -galaktozid	0.56	ljubičasta	vidljiva svetlost
8	Cijanidin 3- <i>O</i> -glukozid	0.56	ljubičasta	vidljiva svetlost
9	Cijanidin 3- <i>O</i> -arabinozid	0.60	ljubičasta	vidljiva svetlost
10	Neohlorogenska kiselina	0.71	Svetlo plava	$\lambda=366$ nm
11	Izokvercetin	0.73	žuta	$\lambda=366$ nm

Dva glavna antocijana aronije, cijanidin 3-*O*-galaktozid i cijanidin 3-*O*-arabinozid, javljaju su se kao trake ljubičaste boje pod vidljivim svetlom na HPTLC ploči ekstrakta aronije. Flavonoidi, rutin i izokvercetin su vidljivi kao žute trake nakon uranjanja HPTLC ploča u NP/PEG reagens. Za vizualizaciju derivata kafeoil-hinske kiseline kao svetloplavih traka, korišćeno je UV svetlo sa $\lambda=366$ nm nakon derivatizacije NP/PEG reagensom (smeša aminoetildifenil-borinata i polietilenglikola). Prisustvo ovih jedinjenja kao glavnih komponenata u ekstraktima aronije je u skladu sa već objavljenim podacima. [254–256] Jedina traka pod vidljivim svetlom u ekstraktu

P. americana (vinobojka) bila je ružičasta i pripisuje se betaninu. [257] U ekstraktu *S. nigrum* zastupljen je složen antocijan, petunidin-3-*O*-(*p*-kumaroil)-rutinozid-5-*O*-glukozid, što je u skladu sa podacima iz literature. [258,259] Ovo jedinjenje se detektuje kao traka ljubičaste boje pod vidljivim svetlom na HPTLC ploči. U ispitivanoj koncentraciji ekstrakta *S. ebulus* (avdika) na HPTLC ploči nije se pojavila jasna traka pod vidljivom svetlošću. U ekstraktima *S. nigra* (zova) identifikovana su četiri cijanidin glikozida. Široka traka na R_f 0,24 pripisana je cijanidin-3-*O*-sambubiozid-5-*O*-glukozidu i cijanidin-3,5-*O*-diglukozidu. Preostale dve trake ljubičaste boje potiču od cijanidin-3-*O*-

sambubiozida i cijanidin-3-*O*-glukozida. Ovakva zastupljenost antocijana je već poznata za bobice zove. [255,260–262] HPTLC hromatogrami aronije i njenih adulteranata predstavljani su na **Slici 37**.



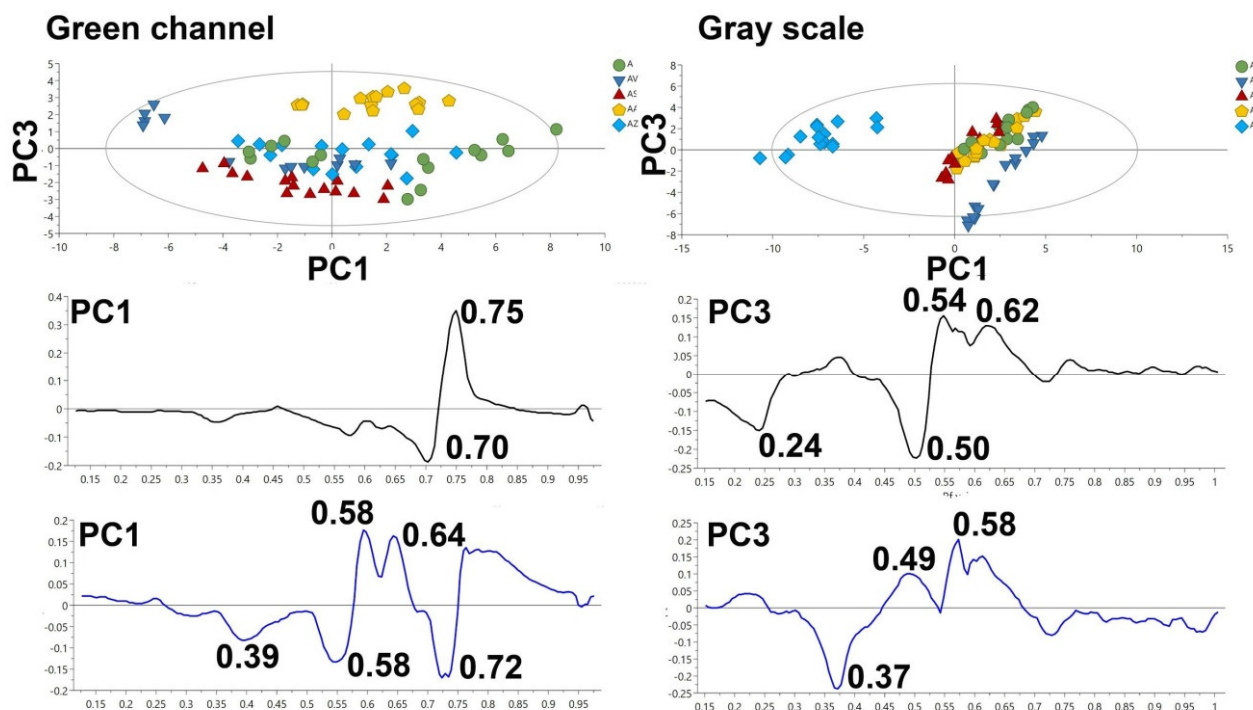
Slika 37. HPTLC hromatogrami aronije i njenih adulteranata. A-E posle derivatizacije sa NP/PEG reagensom, UV lampa na $\lambda=366$ nm; F-J bez derivatizacije, vidljiva svetlost; A,F – aronija; B,G – vinobojka; C,H - zova; D,I - pomoćnica; E,J – avdika.

2.3.3. Analiza glavnih komponenti

Prvo je kreiran PCA model koji je umnogome smanjio broj promenljivih. Da bi se razlikovali uzorci čiste aronije (A) i oni sa spajkovanim adulterantima (AS – spajkovani sa pomoćnicom; AZ – spajkovani sa zovom; AA - spajkovani sa avdikom; AV - spajkovani sa vinobojkom), od dobijenih slika HPTLC hromatograma svih proučavanih uzoraka kreiran je PCA model (**Tabela 5**). Na ovaj način omogućena je klasifikacija ispitivanih uzoraka aronije, identifikacija promenljivih od značaja (fenolna jedinjenja), kao i određivanje uzoraka koji odstupaju.

PCA analiza je primenjena na skup podataka koji je dobijen iz zelenog kanala HPTLC slike hromatograma dobijene nakon derivatizacije sa NP/PEG reagensom pod UV svetlom na $\lambda=366$ nm. To je rezultiralo modelom od tri glavne komponente (PC) koje objašnjavaju 54,05% ukupne varijanse podataka: PC1 čini 28,8% ukupne varijabilnosti podataka, PC2 čini 16,6%, dok PC3 opisuje 8,64% ukupne varijabilnosti podataka. Na **Slici 38**, primećuje se odstupanje jednog uzorka. Prema 2D-PCs skoru, postoji nekoliko grupa uzoraka na osnovu profila metabolita: uzorci aronije adulterisane pomoćnicom, avdikom i deo uzoraka aronije adulterisane sa vinobojkom formirali su tri odvojena klastera, dok se uzorci čiste aronije, aronije adulterisane zovom, i ostali uzorci koji su adulterisani sa vinobojkom preklapaju. Uzorci čiste aronije, zajedno sa uzorcima adulterisanim sa zovom i jedan deo uzoraka adulterisanih sa vinobojkom imali su isti hemijski sastav: rutin je identifikovan kao glavno jedinjenje u svim ovim uzorcima na osnovu hromatograma dobijenih na $\lambda=366$ nm. Grafik loadinga pokazao je uticaj metabolita (karakteristične hR_f vrednosti) na ukupnu varijabilnost, a samim tim i identifikovani su botanički markeri uzoraka aronije, odgovorni za klasifikaciju. Najveći doprinos pokazalo je jedinjenje sa srednjim R_f vrednostima 0,75, dok je traka sa R_f vrednošću od 0,70 imala najveći negativan uticaj duž pravca PC1. Na PC2 veliki doprinos su imali: rutin, neohlorogenska kiselina (i izokvercetin) i jedinjenja sa R_f vrednostima od 0,40 i 0,53. Dalje, pozitivan doprinos na PC3 imali su rutin i jedinjenje sa R_f od 0,64; dok negativno doprinose neohlorogenska kiselina (i izokvercetin) i jedinjenja sa R_f od 0,40 i 0,55 (**Slika 38**).

U sivom kanalu HPTLC slike dobijene pod vidljivim svetlom, nakon obrade, normalizacije i Pareto skaliranja, PCA analizom dobijen je trokomponentni model koji objašnjava 50,60% ukupne varijanse. PC1 čini 27,4%, PC2 12,5%, dok PC3 čini 10,7% ukupne varijanse. Grafik rezultata detektovao je tri različite grupe uzoraka. 2D grafik rezultata PC1 i PC3 (Slika 38b) otkrio je dve različite grupe uzoraka duž pravca PC1 ose: AZ uzorci formirali su jednu grupu na levoj strani PC rezultata, dok su druge grupe (A, AA, AV i AS) formirale klastere na desnoj strani PC rezultata. Nekoliko antocijanina kao što su cijanidin-3-*O*-sambubiozid-5-*O*-glukozid, cijanidin-3,5-*O*-diglukozid, cijanidin-3-*O*-sambubiozid i cijanidin 3-*O*-arabinozid su korelisani sa PC1 osom (Slika 38) odvajajući AZ od drugih botanički različitih vrsta uzoraka aronije. Skoro sve grupe uzoraka sadržale su cijanidin-3-*O*-arabinozid i cijanidin-3-*O*-galaktozid, dok AZ uzorci sadrže cijanidin-3-*O*-sambubiozid-5-*O*-glukozid, cijanidin-3,5-*O*-diglukozid i cijanidin-3-*O*-sambubiozid, što je u skladu sa dobijenim PCA modelom. Betanin je pokazao najveći negativan uticaj duž PC3 ose, dok je cijanidin-3-*O*-sambubiozid imao najveći pozitivan uticaj na PC3 osu.



Slika 38. PCA rezultat (prvi sirov) i grafik loadinga čistih uzoraka aronije (A) ili spajkov sa različitim adulterantima (AS-spajkov sa pomoćnicom; AZ- spajkov sa zovom; AA- spajkov sa avdikom; AV-spajkov sa vinobojkom); levo – zeleni kanal HPTLC slike dobijene nakon derivatizacije sa NP/PEG pod UV svetlom na $\lambda=366$ nm; desno – sivi kanal HPTLC slike dobijen pod vidljivim svetlom.

2.3.4. OPLS-DA

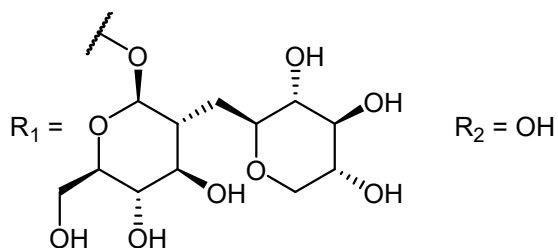
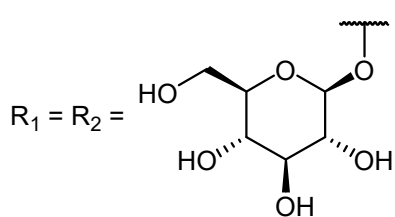
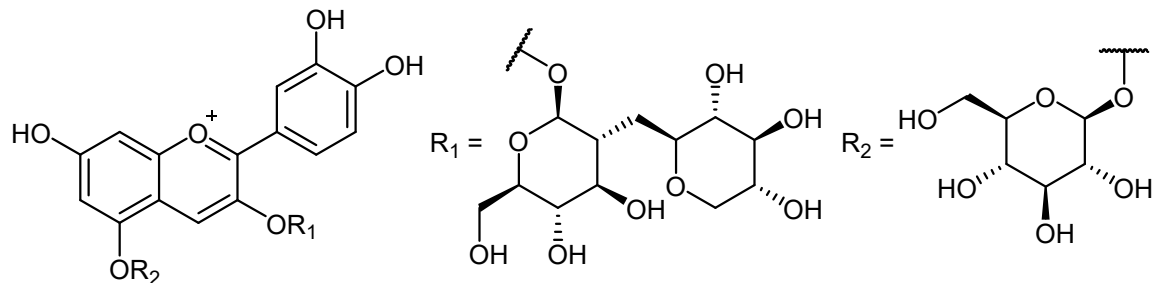
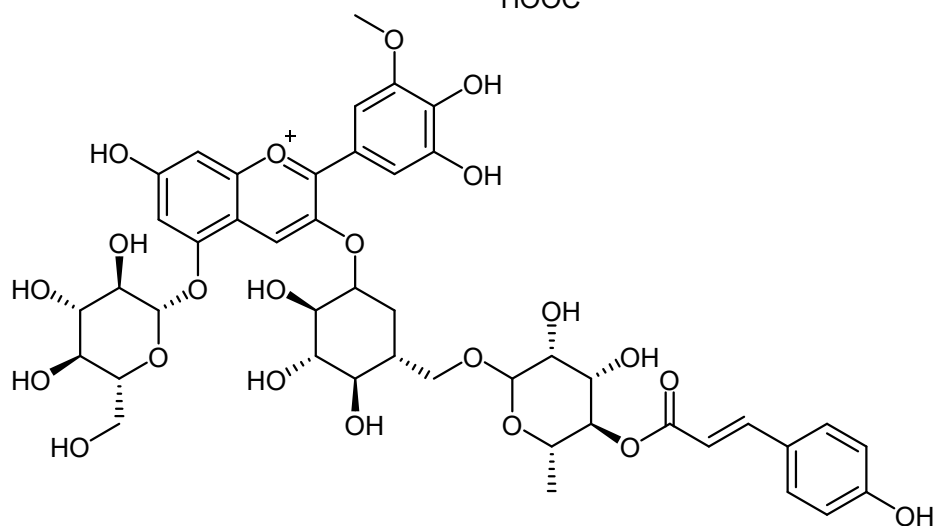
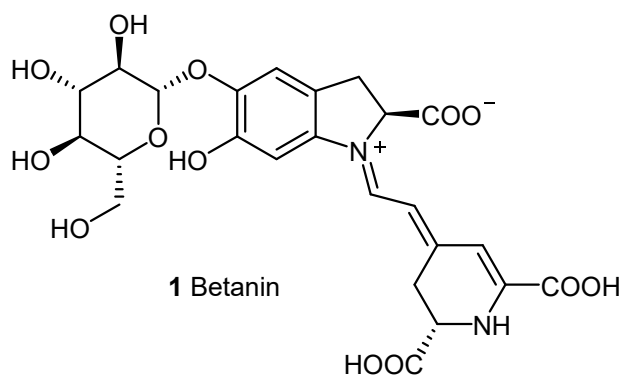
Kreirana su četiri OPLS-DA modela koji sadrže HPTLC podatke za ekstrakte aronije kao jednu klasu, i odgovarajuće podatke o ekstraktima obogaćenim različitim adulterantima kao drugu klasu. Za kreiranje modela u slučajevima adulteracije sa vinobojkom, pomoćnicom i zovom korišćen je sivi kanal slike HPTLC ploča pod vidljivim svetlom. Samo u modelu adulteracije sa avdikom, korišćen je zeleni kanal slike HPTLC ploča pod UV svetlom na $\lambda=366$ nm primenjen nakon derivacije sa NP/PEG reagensom. Urađena je normalizacija na ukupnu površinu HPTLC slika, podaci su srednje centrirani i Pareto skalirani pre multivarijantne analize podataka.

Tabela 6. Parametri OPLS-DA modela

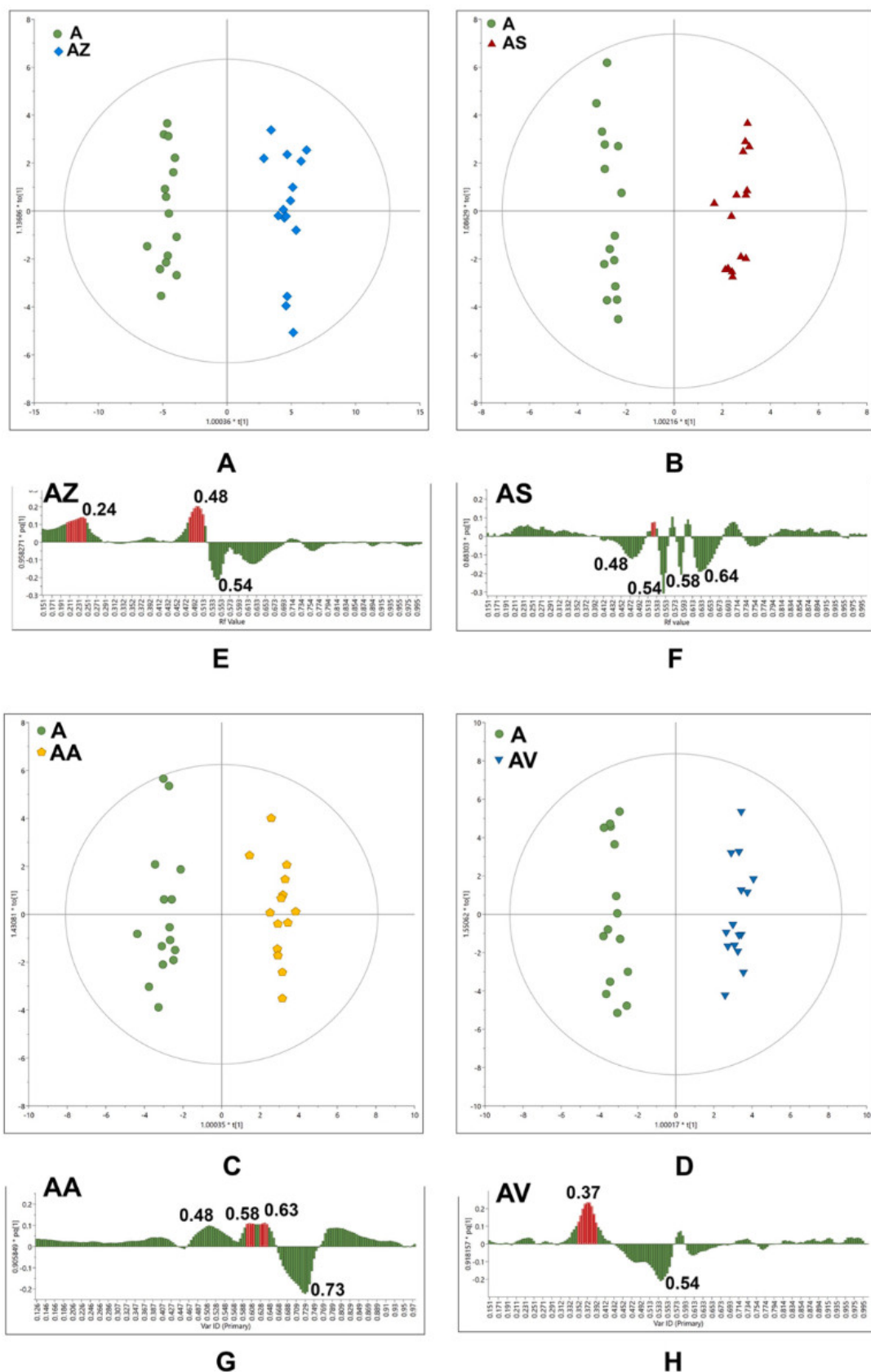
Adulterant	Broj komponenti (prediktivne + ortogonalne)	R^2	Q^2	p (CV-ANOVA)	F (CV-ANOVA)
<i>P. americana</i>	1 + 3	0.985	0.959	$7.63 \cdot 10^{-11}$	61.56
<i>S. nigrum</i>	1 + 2	0.983	0.961	$4.65 \cdot 10^{-15}$	94.95
<i>S. ebulus</i>	1 + 2	0.968	0.955	$2.68 \cdot 10^{-14}$	80.89
<i>S. nigra</i>	1 + 1	0.978	0.972	$4.77 \cdot 10^{-29}$	218.19

U svim kreiranim OPLS-DA modelima, vrednosti R^2 i Q^2 su blizu 1 i ukazuju na visoko uklapanje i dobru prediktivnost (**Tabela 6**). OPLS-DA modeli su prvo potvrđeni permutacionim testovima. Dobijene R^2 i Q^2 vrednosti permutacionih modela upoređene su sa R^2 i Q^2 vrednostima originalnih modela i testirana je njihova valjanost. Dobijeni su dobri rezultati, pošto su regresije Q^2 linija presecale vertikalnu osu ispod nule, a sve vrednosti Q^2 i R^2 permutovanih Y vektora bile su niže od originalnih. Za dodatnu validaciju korišćena je CV-ANOVA. Značajnost modela je jasno prikazana sa p vrednostima koje su daleko manje od 0,05 (**Tabela 6**). Na graphicima rezultata (**Slika 38**) dobijeno je jasno razdvajanje između uzoraka aronije i uzoraka obogaćenih adulterantima zajedno sa prediktivnim komponentama. Ni na jednom grafiku rezultata nije bilo uzoraka koji odstupaju od modela. Odabir najznačajnijih varijabli bio je zasnovan na osnovu dva parametra: uticaja promenljive na predikciju (VIPpred) rezultata prediktivnih komponenti i loadinga skaliranim kao koeficijent korelacije (pcorr). Varijable sa najvišim VIPpred rezultatom (iznad 1,5), i apsolutnim pcorr vrednostima iznad 0,5 smatrane su značajnim za razdvajanje.

Na osnovu gore navedenih kriterijuma, betanin je određen kao najuticajnija promenljiva u modelu adulteracije aronije sa vinobojkom, a petunidin-3-*O*-(*p*-kumaroil)-rutinozid-5-*O*-glukozid u modelu adulteracije aronije sa pomoćnicom. Cijanidin-3-*O*-sambubiozid-5-*O*-glukozid, cijanidin-3,5-*O*-diglukozid i cijanidin-3-*O*-sambubiozid su bili najuticajnije promenljive u modelu adulteracije aronije sa zovom (**Slika 39**). Adulteracija aronije sa avdikom rezultiralo je dve spojene zelene trake na R_f vrednostima na 0,60 i 0,64, koje su bile najznačajnije promenljive u odgovarajućem OPLS-DA modelu (**Slika 40**). Ovi rezultati su u saglasnosti sa prethodno dobijenim rezultatima u kojima je betanin identifikovan kao glavno jedinjenje u vinobojci, dok su cijanidin-3-*O*-sambubiozid-5-*O*-glukozid, cijanidin-3,5-*O*-diglukozid i cijanidin-3-*O*-sambubiozid bili glavni metaboliti u bobici zove identifikovani pomoću HPTLC otiska prsta. Na kraju, petunidin-3-*O*-(*p*-kumaroil)-rutinozid-5-*O*-glukozid je označen kao karakterističan biomarker pomoćnice u ovim testovima.



Slika 39. Hemijske strukture jedinjenja na osnovu kojih je detektovana adulteracija aronije sa vinobojkom (1), pomoćnicom (2) zovom i avdikom (3,4,5).



Slika 40. OPLS-DA grafik rezultata (prvi red) i grafik doprinosa (eng. loading plots) uzoraka čiste aronije (A) ili spajkovane sa različitim adulterantima (AS-spajkovani sa pomoćnicom; AZ-spajkovani sa zovom; AA-spajkovani sa avdikom; AV-spajkovani sa vinobojkom).

2.4. Primena tandemne masene spektrometrije u kontroli kvaliteta uzoraka *T. terrestris*

Masena spektrometrija je veoma zastupljena tehnika u analizi bioaktivnih jedinjenja iz biljaka, posebno je značajna tandemna masena spektrometrija koja se koristi za brzu analizu biljnih ekstrakata. Na osnovu MS/MS analize podataka moguća je detekcija pojedinačnih fragmenata, obrazaca fragmentacije i potencijalno načina vezivanja u molekulu. Ova tehnika se primenjuje i u analizi steroidnih saponina u biljnim uzorcima. Poznato je da saponini grade adukte sa kiselinom koja pospešuje jonizaciju, kao što je mravlja ili sirćetna. [129,263] Nakon identifikacije pseudo molekulskog jona saponina u masenim eksperimentima ukupne jonske struje (eng. Total Ion Chromatogram – TIC), kreiraju se eksperimenti snimanja jona potomaka nakon fragmentacije u kolizionoj ćeliji (eng. daughter scan – DS). Analizom dobijenih tandemnih masenih spektara moguća je tentativna identifikacija pojedinačnih jedinjenja poređenjem njihovih obrazaca fragmentacije sa dostupnim literaturnim podacima. Kako saponini u svojoj strukturi najčešće imaju više od jedne šećerne jedinice, koje daju karakteristične fragmentacije u masenom spektru, moguća je i delimična identifikacija saponina za koje trenutno nema dostupnih literaturnih podataka.

Za potvrdu prisustva deklariranih biljnih ekstrakata *T. terrestris* u komercijalnim suplementima korišćena je tandemna masena spektrometrija u kombinaciji sa visokoeфикаsnom tečnom hromatografijom (UPLC-MS/MS) sa elektrosprej tehnikom jonizacije. Biljni uzorci su prikupljeni sa dva lokaliteta: Zaječaj, Srbija (ZA); Burgas, Bugarska (BU). Komercijalno nabavljeni uzorci različitih proizvođača su deklarirani da sadrže različite količine biljnog ekstrakta *T. terrestris* i procenat ukupnih saponina. Svi suplementi, osim S1, imali su dodate punioce i pomoćne supstance. Suplement 1, 4, 5 i 6 su bili u formi kapsula, dok su suplementi 2 i 3 u obliku tableta. Za ekstrakciju 70% etanolom korišćeno je po 2 g uzorka suplemenata i 4 g biljnog materijala. Dobijeni etanolni ekstrakti su prečišćeni metodom ekstrakcije na čvrstoj fazi (Solidphase extraction – SPE) radi koncentrovanja saponina i pripreme uzoraka za UPLC-MS/MS analizu. Prinosi dobijenih ekstrakata su prikazani u **Tabeli 7** Većina suplemenata je imala sličan prinos, osim suplementa 3, čiji je prinos bio dva do tri puta manji (11,0 mg) u odnosu na ostale, što je u skladu sa njegovom deklaracijom.

Tabela 7. Prinosi dobijenih ekstrakata

Uzorak	Masa etanolonog ekstrakta (mg)	Masa SP ekstrakta (mg)
<i>T. terrestris</i> , lokalitet Srbija	410,0	23,1
<i>T. terrestris</i> , lokalitet Bugarska	399,7	30,2
Suplement 1	1033,1	24,6
Suplement 2	574,9	29,1
Suplement 3	508,1	11,0
Suplement 4	730,8	21,4
Suplement 5	595,5	20,1
Suplement 6	901,0	24,9

Optimizacija MS parametara rađena je na reprezentativnom biljnom uzorku. Uzorak je snimljen prvo u SCAN modu kako bi se detektovali svi pikovi i njihovi pseudo molekularni joni ili joni adukti. U analiziranim TIC hromatogramima, **Slike 41, 42 i 43** identifikovane su m/z vrednosti najintenzivnijih jona za svaki od pikova. Svi odabrani potencijalni pseudomolekularni joni su snimljeni u opsezu retencionih vremena od 2 min (R_t jona ± 1 min) sa različitim kolizionim energijama (10, 17, 25 i 45 eV). Na osnovu dobijenih fragmentacionih spektara izabrana je kolizijska energija od 45 eV za dalju analizu. Ovi podaci su poslužili za generisanje masenih eksperimenata snimanja jona potomaka iz kojih su odabrani osnovni i po dva ili tri najintenzivnija jona u cilju formiranja eksperimenata praćenja više reakcija fragmentacije (eng. – MRM).

Na osnovu optimizovanih parametara, urađena je MRM analiza biljnih uzoraka *T. terrestris* i komercijalnih suplemenata u ESI negativnom modu. Rezultati MRM analize prikazani su u **Tabeli 8**. Praćenjem karakterističnih fragmentacija određeno je kvalitativno prisustvo odabranih jedinjenja u uzorcima, poređenjem sa dostupnim literaturnim MS/MS podacima.

Tabela 8. UPLC-MS/MS prelazi za kvalitativno određivanje jedinjenja u uzorcima *T. terrestris*

Redni broj	Vremenski segment (min)	$[M-H]^-$	m/z vrednosti fragmenata	Praćeni prelazi
1	1,51 – 2,51	609	300, 271, 255, 151	300, 271, 255
2	1,81 – 2,79	623	315, 299, 271, 242	315, 299, 242
3	2,92 – 3,86	1096*	1050; 904; 756,5; 101,8	1050; 904; 756,5
4	2,90 – 3, 90	1331	1198,7; 689; 666; 117; 71	1198,7; 71
5	2,90 – 4,08	981,7	964,6; 97,1	964,6; 97,1
6	4,13 – 5,06	1194	1048; 1031,7; 828; 87	1048; 1031,7; 87
7	4,70 – 5,70	1048	1094; 916; 886; 591,5; 143, 131, 113, 101	591,5; 143, 131, 113, 101
8	4,70 – 5,80	1178	1032, 1015; 869,7; 737,6; 591,4	1032, 1015; 869,7; 737,6; 591,4
9	4,70 – 5,80	1178	1032, 1015; 869,7; 737,6; 591,4	1032, 1015; 869,7; 737,6; 591,4
10	6,21 – 7,21	914*	868; 722; 103	868; 722; 103
11	6,10 – 7,10	916*	870	870
12	6,10 – 7,10	1150	1088; 1018; 723; 886; 669; 83	1018; 723

* $[M-H+HCOOH]^-$

Rezultati identifikacije za svaki od pojedinačnih uzoraka prikazani su u **Tabeli 9**. Kod jedinjenja **3, 10 i 11** javili su se $[M-H]^-$ i $[M-H+HCOOH]^-$ joni na osnovu čega je bilo lako odrediti molekulsku masu tih jedinjenja. Ukupno je identifikovano devet jedinjenja. Potvrđeno je prisustvo dva jedinjenja flavonoidnog tipa, rutin (**1**) i izoramnetin-*O*-rutinozid (**2**), što je u saglasnosti sa pripremom uzoraka, kada su tokom SPE prečišćavanja uklonjeni tanini i šećeri, dok u dobijenom ekstraktu ostaju skoncentrovani saponini i flavonoidi. [129] Pored njih, identifikovano je i sedam saponina, neoprotodioscin (**3**), prototribetin (**5**), ginsenozid $F_2+Rha+Rha+Rha+Xyl-Glc$ (**8**), i njegov izomer (**9**), dioscin (**10**), sarsasapogenin diramnozid-heksozid (**11**) i tribulosin (**12**). Na osnovu molekulskih jona neidentifikovanih jedinjenja utvrđeno je da pripadaju klasi steroidnih saponina.

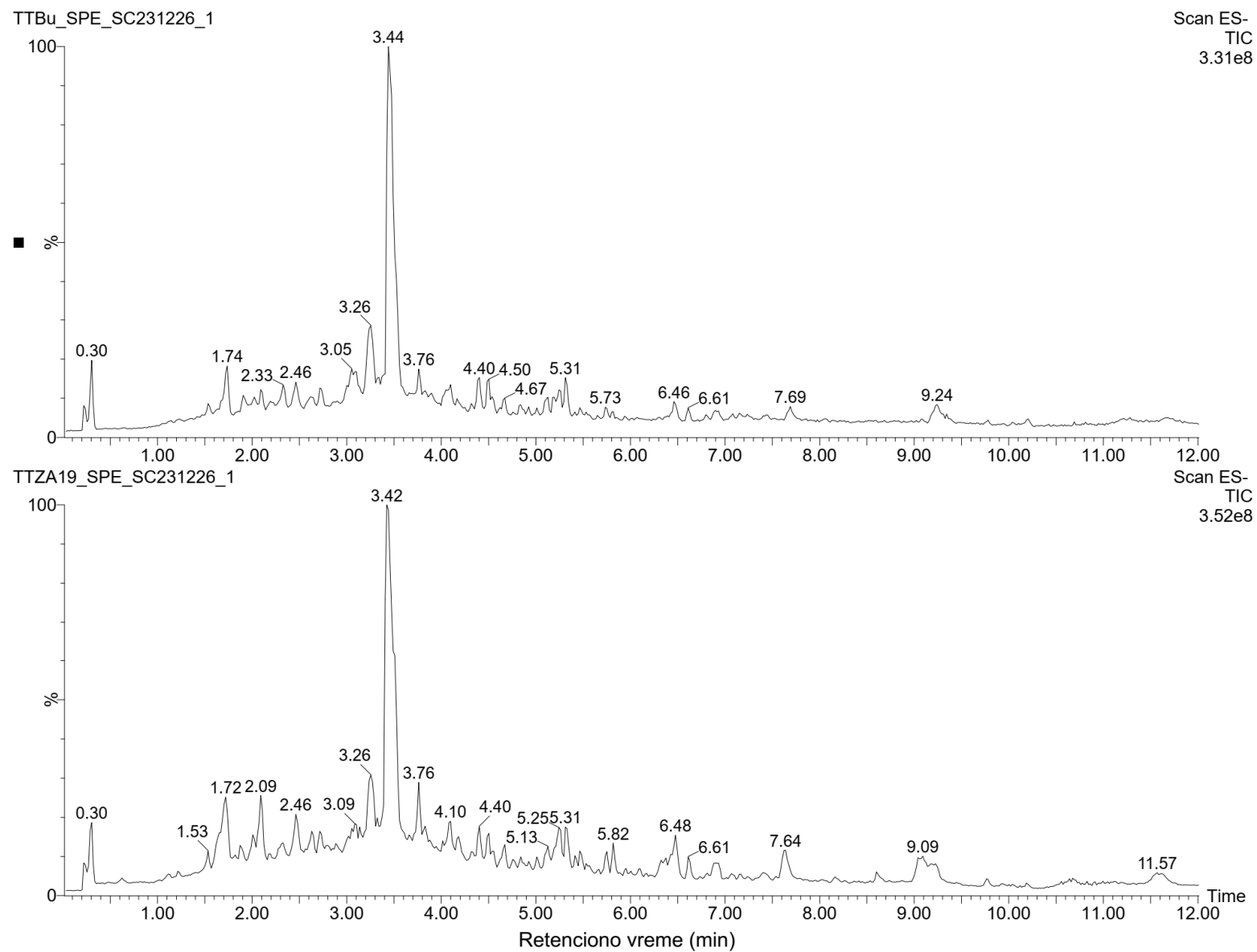
Tabela 9. Identifikovana jedinjenja u autentičnim biljnim i komercijalnim uzorcima suplemenata

Redni broj	Rt (min)	Naziv jedinjenja	Formula	MW (Da)	Biljni uzorci		Suplementi						Izvor
					ZA	BU	1	2	3	4	5	6	
1	1,75	Rutin	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	610	+	+	+	+	+	+	+	+	[129,264]
2	2,09	Izorarnetin- <i>O</i> -rutinozid	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆	624	+	+			+	+	+	+	[264]
3	3,26	Neoprotodioscin	C ₅₁ H ₈₆ O ₂₂	1051	+	+	+						[263,265]
4	3,41	NI	/	/					+	+	+	+	/
5	3,42	Prototribestin	C ₄₅ H ₇₄ O ₂₁ S	983	+	+	+	+	+	+	+	+	[129,264]
6	4,40	NI	/	1049	+	+							/
7	5,23	NI	/	1049	+	+		+	+	+	+	+	/
8	5,24	Ginsenoizid F ₂ + <i>Rha</i> + <i>Rha</i> + <i>Rha</i> + <i>Xyl-Glc</i>	C ₅₈ H ₉₈ O ₂₄	1179	+	+							[263]
9	5,31	Izomer Ginsenoizid F ₂ + <i>Rha</i> + <i>Rha</i> + <i>Rha</i> + <i>Xyl-Glc</i>	C ₅₈ H ₉₈ O ₂₄	1179	+	+							[263]
10	6,47	Dioscin	C ₄₅ H ₇₂ O ₁₆	869	+	+	+				+	+	[129,263,264]
11	6,61	Sarsasapogenin diramnozil-heksozid	C ₄₅ H ₇₄ O ₁₆	871	+	+	+						[264]
12	6,63	Tribulosin	C ₅₅ H ₉₀ O ₂₅	1151					+	+	+	+	[129,263]

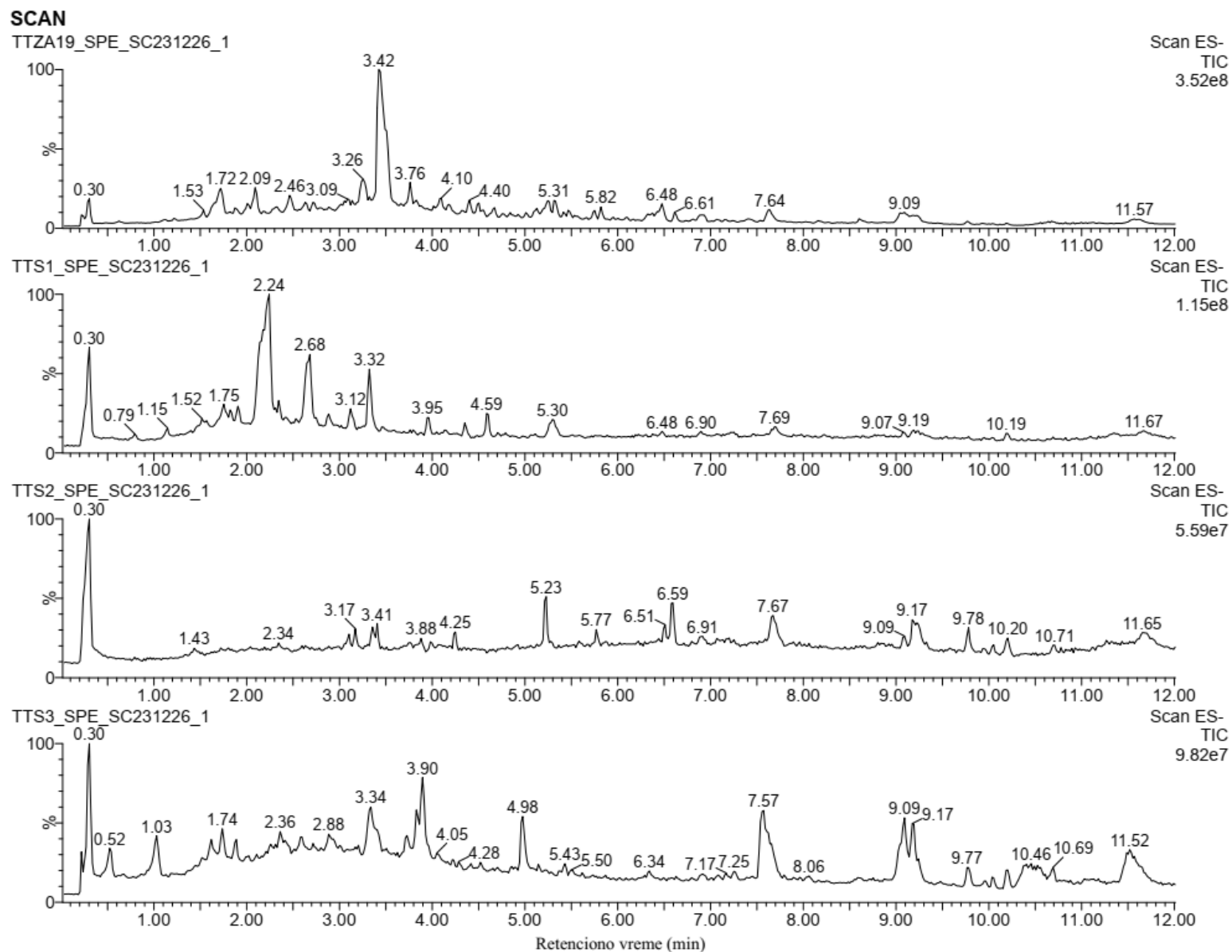
Posmatrajući hromatograme autentičnih biljnih uzoraka, sa lokaliteta iz Srbije i Bugarske, može se primetiti sličnost. U oba uzorka dominantan je saponin prototribestin (**5**), dok su ostali pikovi u dosta nižim koncentracijama. Prototribestin je jedini identifikovan saponin koji sadrži sulfatnu grupu. Saponini koji sadrže sumpor karakteristični su za područja Balkana kao što su Srbija, Bugarska, Severna Makedonija, Grčka, Turska, a nalaze se i u uzorcima iz Irana i Gruzije. [129] MRM analizom prelaza detektovan je prototribestin u svim komercijalnim uzorcima suplemenata, ali u dosta nižim koncentracijama u odnosu na biljne uzorke. Rutin (**1**) je detektovan u svim uzorcima. Flavonoid izorarnetin-*O*-rutinozid (**2**), detektovan je u suplementima 3, 4, 5, 6. Jedinjenja **6**, **8** i **9** bila su karakteristična samo za autentične biljne uzorke. Tribulosin (**12**) i jedinjenje **4** javljaju se samo u suplementima, osim kod suplementa sa oznakom 1. Saponin tribulosin (**12**) je generalno zastupljen u uzorcima različitog geografskog porekla, pri čemu ga slabije ima u uzorcima sa Balkana, a najviše je zastupljen u uzorcima iz Indije i Vijetnama. [129] Neoprotodioscin (**3**) i sarsasapogenin diramnozil-heksozid (**11**) bili su karakteristični samo za suplement 1. Saponin sarsasapogenin diramnozil-heksozid je do sada izolovan u etil-acetatnom i metanolonom ekstraktu uzoraka *T. terrestris* sa područja Turske. [129] Prisustvo spirostanilnog glikozida dioscina (**10**) detektovano

je u tri uzorka suplementa označenih kao 1, 5 i 6. Poređenjem hromatograma suplemenata 2, 4 i 6 može se primetiti sličnost u najzastupljenijim jedinjenjima. Kod sva tri suplementa najdominantnija su dva jedinjenja, saponin (**7**) i tribulosin (**12**), na osnovu čega se može zaključiti da imaju slično poreklo. Profili suplemenata 1, 3 i 5 se razlikuju od ostalih uzoraka.

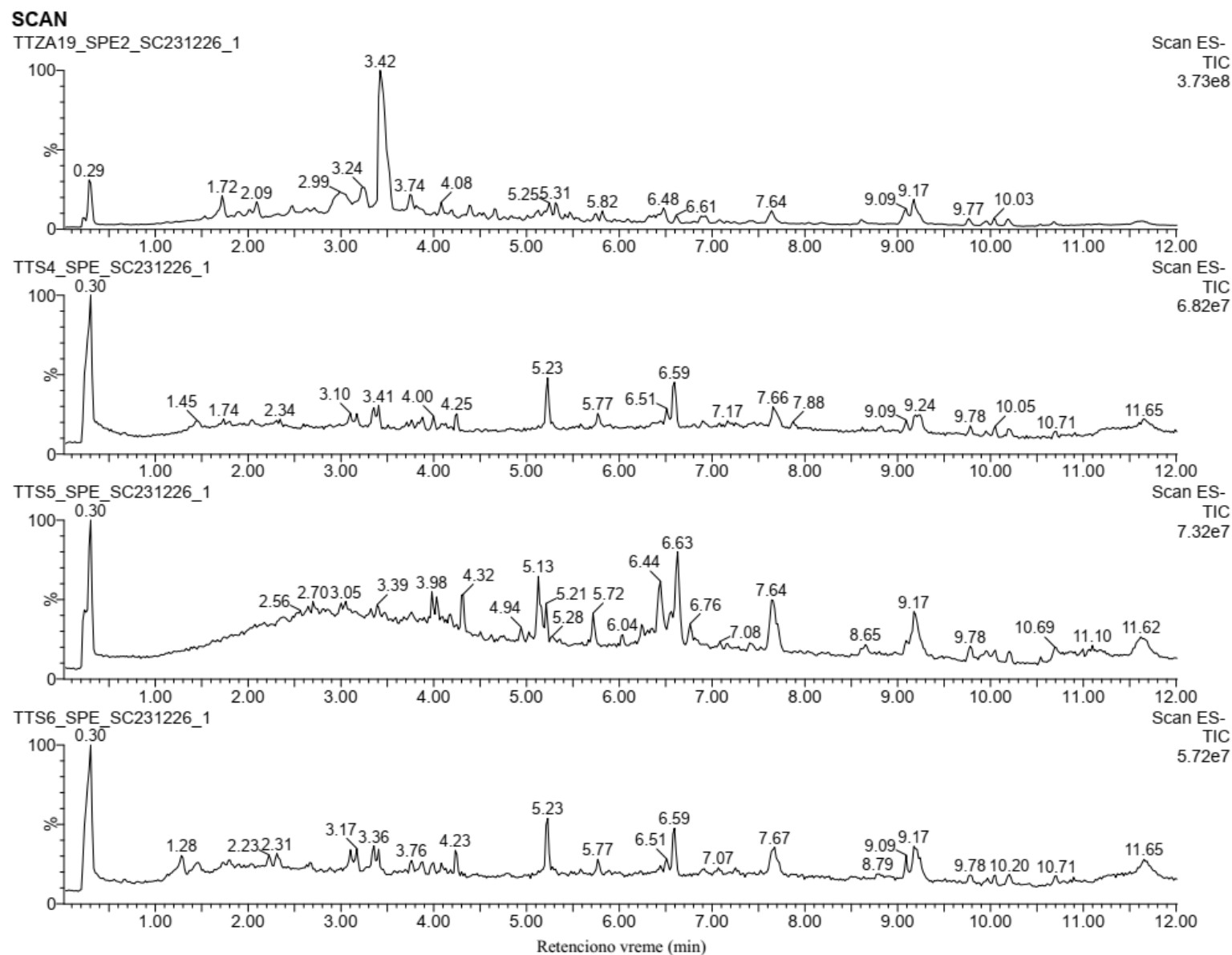
Na osnovu dobijenih rezultata možemo zaključiti da su u svim uzorcima suplemenata detekovana jedinjenja koja potiču iz biljne vrste *T. terrestris*. Identifikovano je sedam saponina, koji su i nosioci aktivnosti ovih ekstrakata. Rutin i prototribestin su dva biomarkera koji su detektovani i u biljnim i u svim komercijalnim uzorcima.



Slika 41. TIC UPLC/MS hromatogram biljnih uzoraka.



Slika 42. TIC UPLC/MSPLC/MS hromatogram reprezentativnog biljnog uzorka i suplementa 1, 2 i 3.



Slika 43. TIC UPLC/MS hromatogram reprezentativnog biljnog uzorka i suplementa 4, 5 i 6.

3. EKSPERIMENTALNI DEO

3.1. Instrumenti i rastvarači

U ovom radu korišćene su tehnička i analitička vaga. Za izolovanje i pripremu ekstrakata korišćeni su rastvarači analitičke čistoće, sveže destilovani i to: metanol, hloroform, metilen-hlorid, destilovana voda i *n*-butanol.

Za HPLC prečišćavanje frakcija korišćena je reverzno fazna visokoefikasna tečna hromatografija na instrumentu Agilent Technologies 1100 Series koji je opremljen sa autosemplerom i DAD detektorom, sa kolonom Zorbax Eclipse XDB-C18 (9,4 mm × 250 mm, 5 µm). Kao mobilne faze korišćeni su acetonitril i miliQ voda, HPLC čistoće.

Za pripremu biljnog materijala za metabolomičke studije korišćeno je:

1. Za usitnjavanje i homogenizaciju, IKA A11 analitički mlin;
2. Za ekstrakciju, ultrazvučno kupatilo Sonorex Super RK 100 Bandelin;
3. Za odvajanje supernatanta od taloga, minicentrifuga MiniSpin Eppendorf sa 15000 rpm;
4. Za uklanjanje vlage i rastvarača iz uzorka, liofilizator Christ Alpha 2-4 LD plus.

Hemikalije korišćene tokom postupka derivatizaciju bile su: 2-dezoksi-riboza (97% Sigma-Aldrich), interni standard; metoksiamin-hidrohlorid (98% Sigma-Aldrich), reagens za oksimovanje; piridin kao rastvarač (analitičke čistoće, sveže predestilovan); i *N,O*-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamid (BSTFA), reagens za silanizaciju. Uzorci su analizirani na gasnom hromatografu Agilent 7890A koji je opremljen robotizovanim auto-injekcioni sistemom CTC PAL druge generacije sa 5975C masenim detektorom sa kvadrupolnim analizatorom, EI jonskim izvorom i plameno-jonizujućim detektorom (GC-FID-MS). Korišćena je HP-5MSI, nepolarna kapilarna kolona (30 m×0,25 µm, debljina filma 0,25 µm). Obrada hromatograma i identifikacija je rađena pomoću softvera Agilent MSD ChemStation verzija E02.02. i NIST AMDIS verzija 2.70 i komercijalno dostupnih biblioteka Wiley07, NIST17, i Adams04. Za multivarijantnu analizu korišćen je softver SIMCA (verzija 17).

Za potrebe izrade ove doktorske disertacije korišćen je NMR spektrofotometar Bruker 500 Avance III sa radnom frekvencijom od 500 MHz za ¹H jezgro i 125 MHz za jezgro ¹³C. Spektrofotometar je opremljen inverznom probom širokog opsega frekvencija (BBI), za kivete prečnika 5 mm, na kojoj su snimani svi spektri. Od deuterisanih rastvarača korišćeni su metanol-*d*₄ i deuterijum-oksidi-*d*₂ (D₂O). Svi spektri snimani su na 298 K. Za zaključavanje spektara kao interni standard korišćen je natrijum-3-trimetilsilil-propionat-2,2,3,3-*d*₄ (TSP-*d*₄). Za obradu i tumačenje NMR spektara korišćeni su programi MestReNova (verzije 6.0.2 i 14.2.1) i TopSpin Bruker Biospin (verzije 3.6.5 i 4.1.4).

Sveže bobice zamrznute su u zamrzivaču sa ultra-niskom temperaturom Artico ULUF 65 na –180 °C, a potom je uklonjena voda u liofilizatoru Martin Christ Beta 2–8 LD plus. Liofilizovani uzorci su čuvani u eksikatoru do dalje analize. Pre ekstrakcije, uzorci su samleveni u prah pomoću mlina IKA MF 10 basic.

Ploče korišćene za HPTLC analizu bile su sa stacionarnom fazom od silika gela 60 F₂₅₄ 20 × 10 cm, zagrevane na TLC Plate Heater 3, CAMAG. Uzorci su automatski naneti koristeći Linomat 5, CAMAG. Za razvijanje ploča i obradu korišćeni su: CAMAG komora, CAMAG TLC skener 3, CAMAG Chromatogram Immersion Device 3. Hromatogrami su obrađeni u programu Image J verzija 1.47q. Multivarijantna analiza urađena je u SIMCA softveru (verzija 15).

Frakcionisanje biljnih ekstrakata rađeno je primenom *Dry-column flash* hromatografijom na silika gelu (< 0,08, Merck). Za prečišćavanje odabranog uzorka korišćena je gravitaciona

hromatografija sa Sephadex (LH-20, Sigma Aldrich) stacionarnom fazom. Za praćenje toka hromatografije korišćene su Al TLC ploče sa silika gelom 60 i UV F₂₅₄ indikatorom. Dobijene zone analizirane su upotrebom 50% sumporne kiseline ili anlizaldehidnog reagensa uz zagrevanje na 110 °C.

Za identifikaciju biomarkera iz adulterisanih uzoraka *A. ursinum*, pripremljeni uzorci su analizirani na tečnom hromatografu (1290 Infinity LC system; Agilent Technologies), opremljenim sa DAD (Diode Array Detector) detektorom i tandemnim kvadrupolnim i TOF masenim detektorom (6550 iFunnel Q-TOF MS, Agilent Technologies). Q-TOF-MS je opremljen sa elektrosprej jonskim izvorom sa dvostrukim raspršivanjem. Razdvajanje je rađeno na koloni Zorbax Eclipse Plus C18 column (100 × 2.1 mm, 1.8 µm, Agilent Technologies). Korišćene hemikalije, acetonitril, voda (18.2 MΩ cm⁻¹) i amonijum-formijat bili su HPLC-MS čistoće. Kao referentni standardi korišćeni su 2,5 mM heksakis(1H,1H,3H-tetrafluoropropoksi)fosfazin, 5 mM purin i 100 mM amonijum-trifluoroacetat (Agilent Technologies). Za prikupljanje i analiziranje podataka korišćen je MassHunter program (verzija B.06.01 i B.07.00, Agilent Technologies).

Prilikom analize uzoraka *T. terrestris* korišćen je Waters ACQUITY UPLC H-Class sistem (WAT-176015007) sa ACQUITY UPLC BEH C18 kolonom (50 mm × 2.1 mm × 1.7 µm) i masenim detektorom (Waters ACQ-TQD (Tandem Quadrupole) sa elektrosprej izvorom jonizacije.

3.2. Biljni materijal

Dva uzorka *O. vulgare*, jedan *O. onites* i jedan uzorak koji je bio mešavina te dve vrste, dobijeni su iz komercijalnih izvora. Odgovarajući vaučeri sirovih, i mlevenih biljaka (BO23ABZOR, BO21ZOR, BO22AAOR i BO6FOR) deponovani su u Centru za farmaciju i biotehnologiju Univerziteta u Bolonji (Via Innerio 42, Bolonja, Italija). Listovi *O. europaea*, *M. communis* i *C. coggigria* ubrani su u Botaničkoj bašti u Bolonji (Italija) u septembru 2019. godine, uzorke je identifikovao prof. Ferruccio Poli, a vaučeri uzoraka (BOLO0602019, BOLO0602020, BOLO0602021) zadržani su u Herbarijumu Univerziteta Alma Mater Studiorum u Bolonji (SMA, Via Innerio 42, 40126, Bolonja, Italija). Morfološka analiza uzoraka origana obavljena je prema identifikaciji koju propisuje 9. Evropska Farmakopeja i korišćenjem taksonomskog ključa origana predstavljenog u Ietswaart-u, kao što je opisano u radu Mandrone i saradnici. [74]

Lišće *A. ursinum* je prikupljeno na šest različitih lokacija u Srbiji (Košutnjak, u martu 2021; Fruška Gora, u martu 2021; Leskovac, u maju 2022; Jablanik, u maju 2022; Veliko Selo, u maju 2022; i Višnjica, u maju 2022. godine). Svaki list *A. ursinum* je ubran sa različite biljke i predstavlja jednu biološku repliku. Listovi *C. majalis* i *A. maculatum* ubrani su u Košutnjaku, u maju 2022. godine. Uzorke je identifikovao prof. Marjan Niketić, a vaučeri (17,827; 17,828; 17,829; 17,830; 17,831; 17,832; 17,828; 17,835; 17,836) su zadržani u Herbarijumu Instituta za botaniku i Botaničke bašte „Jevremovac”, Univerziteta u Beogradu.

Tri uzorka ploda aronije (*A. melanocarpa* (Michx.) Elliott) kupljena su na lokalnoj pijaci u Valjevu, Kraljevu i Beogradu, dok su dva uzorka sakupljena tokom 2019. godine iz lokalnog voćnjaka na planini Suvobor, kod Ljiga (herbarijumski broj 17698), i Ralje (herbarijumski broj 17697), Srbija. *S. nigra* L. (zova), *S. ebulus* L. (avdika) i *P. americana* L. (vinobojka) sakupljene su krajem avgusta 2019. godine na planini Suvobor, Srbija (herbarijumski brojevi 17701, 17700 i 17699), bobice *S. nigrum* L. (pomoćnica) sakupljene su u blizini Prijepolja, Srbija, krajem septembra 2019. godine (herbarijumski broj 17702). Vaučerski primerici divljih biljaka i dva uzorka aronije sakupljeni direktno iz voćnjaka deponovani su u BEOU (Herbarijum Instituta za botaniku Botaničke bašte „Jevremovac”,

Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu). [266] Uzorke je identifikovao botaničar dr Danilo Stojanović, Katedra za botaniku, Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu.

Uzorci biljke *T. terrestris* prikupljeni su na dva lokaliteta. Prvi uzorak je prikupljen u Zaječaru, 2019. godine, a drugi u Bugarskoj, Burgas 2021. godine. Za potrebe ovog istraživanja kupljeno je šest komercijalno dostupnih suplemenata, za koje je deklarirano da u sebi sadrže ekstrakt/biljku *T. terrestris*. U **Tabeli 10.** prikazan je sastav analiziranih suplemenata.

Tabela 10. Sastav analiziranih suplemenata

Redni broj	Specifikacija	Sastav jedne tablete/kapsule	Aktivna supstanca	Pomoćne supstance
1	60 kapsula	1000mg/ 900 mg saponina	Ekstrakt cele biljke <i>T. terrestris</i> , standardizovan na 90% saponina	/
2	90 tableta	2000 mg/ 480 mg saponina	1 tableta sadrži 2000 mg ekstrakta ploda <i>T. terrestris</i> standardizovan na 24% saponina (od toga 480 mg saponina)	Mikrokristalna celuloza, kalcijum-fosfat, silicijum-dioksid, magnezijumove soli masnih kiselina, hidroksipropilmetilceluloza, hidroksipropilceluloza, modifikovani škrob, trigliceridi, polietilenglikol
3	90 tableta	1500 mg/ 600 mg saponina	Suvi ekstrakt ploda <i>T. terrestris</i> , (8:1), 40% saponina.	Maltodekstrin, mikrokristalna celuloza, hidroksipropilmetilceluloza Talk, silicijum-dioksid, magnezijum-stearat
4	120 kapsula	750 mg/ 675 mg saponina	Suvi ekstrakt ploda <i>T. terrestris</i> , standardizovan na 90% saponina.	Magnezijum-stearat
5	110 kapsula	820 mg/ 625 mg saponina	Suvi ekstrakt cele biljke <i>T. terrestris</i> , 40% saponina i sprášeni plod	Dikalcijum-fosfat Magnezijum-stearat
6	90 kapsula	890 mg/ 750 mg saponina	Suvi ekstrakt <i>T. terrestris</i> standardizovan na 90% saponina	Magnezijum-stearat, silicijum-dioksid, titan-dioksid

3.3. Priprema uzoraka za ispitivanje

3.3.1. Priprema uzoraka *O. vulgare* i *O. onites* za GC-MS analizu

Svi uzorci su usitnjeni u analitičkom mlinu. Četiri uzorka origana pomešana su sa osušenim listovima tri adulteranta: mirtom (*M. communis*), venecijanskim sumakom (*C. coggigria*), i maslinom (*O. europaea*) da bi se napravile binarne mešavine u masenim odnosima 1, 5, 10 i 20%. Dva alikvota su uzeta od svakog uzorka, što je rezultiralo sa ukupno 96 falsifikovanih uzoraka i 8 uzoraka čistog origana, koji su svi korišćeni za dalju analizu.

Uzorci su zatim pripremljeni za GC-MS analizu po sledećoj proceduri. Svaki uzorak (20 mg) ekstrahovan je sa 1000 µL 50% metanola uz dodatak 250 µL rastvora 2-dezoksi-riboze kao internog

standarda (1 mg/mL) na ultrazvučnom kupatilu u trajanju od 5 min. Nakon ekstrakcije, uzorci su centrifugirani tokom pet minuta na 15000 *rpm*, zatim je 200 µL supernatanta skoncentrovano pod strujom azota do 100 µL i čuvano u zamrzivaču na -20 °C. Zamrznuti uzorci su liofilizovani tokom 24h, a nakon toga rastvoreni u 100 µL suvog piridina (koji sadrži sveže pripremljen metoksiamin-hidrohlorid, koncentracije 20 mg/mL) i prebačeni u staklenu bočicu. Prvi korak derivatizacije je izveden u peščanom kupatilu tokom 2 h na 40 °C, a u drugom koraku dodato je 100 µL BSTFA. Derivatizacija je trajala 60 minuta na 80 °C u sušnici.

3.3.2. Priprema uzoraka *A. ursinum* za NMR analizu

Ukupno je analizirano 14 bioloških replika, od čega je bilo šest uzoraka *A. ursinum*, kao i uzorci *C. majalis* i *A. maculatum*. Biljni materijal je osušen na vazduhu i usitnjen u mlinu za dalju analizu. Svaki od uzoraka *A. ursinum* je u duplukatu mešan sa *C. majalis* i *A. maculatum* pri čemu su pravljene binarne smeše u tri koncentraciona nivoa (10, 30 i 50% *m/m*). Za metabolomičku analizu je ukupno pripremljeno 72 adulterisana uzorka i 12 uzoraka koji su čisti, i predstavljaju autentične uzorke. Svi uzorci su pripremljeni po sledećoj proceduri: odmereno je 40 mg usitnjenog uzorka, koji je zatim ekstrahovan sa 800 µL smeše koja sadrži jednake količine 90 mM fosfatnog pufera u D₂O sa 0,1% TSP-*d*₄ (pH 6,0) i MeOD-*d*₄. Ekstrakcija je rađena uz pomoć ultrazvučnog kupatila tokom 20 min. Uzorci su centrifugirani u minifugi na 13400 *rpm*, dobijen supernatant je proceđen kroz maramicu i prebačen u NMR kivetu.

3.3.3. Priprema uzoraka *A. melanocarpa* za HPTLC analizu

Suve i mlevene bobice ekstrahovane su 3% mravljom kiselinom u metanolu (odnos rastvarača 1:15 za aroniju i 1:5 za ostale uzorke) tokom 20 minuta na ultrazvučnom vodenom kupatilu. Ekstrakti su centrifugirani tokom pet minuta na 5000 *rpm* i supernatanti su filtrirani kroz regenerisane celulozne filterske membrane, prečnika 25 mm, veličine pora 0,45 µm. Postupak ekstrakcije je nezavisno ponovljen sa tri primerka uzorka aronije sa svih lokacija. Dobijeni ekstrakti su korišćeni za HPTLC analizu.

3.3.4. Priprema uzoraka *T. terrestris* za UPLC-MS/MS analizu

Autentični biljni uzorci, kao i suplementi, homogenizovani su u avanu, a potom je 2 g uzorka ekstrahovano sa po 50 mL 70% etanola uz refluks na vodenom kupatilu u trajanju od 60 minuta. Nakon ekstrakcije, urađene su dve reekstrakcije na isti način. Dobijeni supernatanti su spojeni, proceđeni kroz filter papir i upareni na rotacionom vakuum uparivaču.

Za dalju analizu, dobijeni ekstrakti su morali da se dodatno prečiste. Po 100 mg suvog ekstrakta rastvoreno je u 50 mL ultračiste vode i propušteno kroz C18 kertridž (500 mg, 6cc) za UPLC-MS/MS analizu. Kertidž je kondicioniran sa 36 mL ultračiste vode, nakon čega je nanet rastvoren uzorak. Ispiranje je vršeno sa 50 mL miliQ vode kako bi se uklonila polarna jedinjenja koja nisu od interesa, potom su sa 25 mL 70% etanola eluirana jedinjenja od interesa. Sakupljeni etanolni rastvori su upareni do suva, a potom rastvoreni u 50% CH₃CN (2 mg/mL) i analizirani na UPLC-MS/MS.

3.4. Instrumentalna analiza uzoraka i obrada podataka

3.4.1. *O. vulgare* i *O. onites*

Temperaturni program kolone počeo je od 60 °C i rastao brzinom od 3 °C/min do 270 °C, a zatim je temperatura menjana brzinom od 20 °C/min do 310 °C gde je ostala konstantna tokom 8 minuta. Noseći, pomoćni i dopunski gas je bio helijum, ulazni pritisak je bio 20,6 psi (protok 1,0 mL/min na 210 °C), pomoćni pritisak je bio 3,8 psi i protok dopune FID-a je bio 25 mL/min. Maseni spektri su snimani u uslovima elektronske jonizacije sa 70 eV na 200 °C. Temperatura kvadrupola je podešena na 150 °C, a opseg MS je bio 40–900 *m/z*. Temperatura FID-a je bila 300 °C, split je bio 5:1 a injekciona zapremina bila je 1 µL za sve analize.

Svi maseni hromatogrami su konvertovani u AIA format korišćenjem MSD ChemStation softvera. Odabir pikova, nelinearno poravnanje pikova i uparivanje retencionih vremena su zatim sprovedeni korišćenjem XCMS onlajn platforme koja je zasnovana na R programskom jeziku.

Primenjen je CentWave algoritam za detekciju, sa maksimalnim odstupanjem *m/z* vrednosti od 100 ppm za uzastopna skeniranja; 5 s minimalne širine hromatografskog pika; 10 s maksimalne širine hromatografskog pika; 0,01 minimalne razlike u *m/z* vrednostima za pikove bliskih retencionih vremena i vrednost 6 kao odnos signala/šuma. Za poravnanje pika 10 s je korišćeno kao dozvoljeno odstupanje retencionih vremena; 0,5 kao minimalni udeo uzoraka neophodan u najmanje jednoj od grupa uzoraka da bi ona bila važeća grupa i 0,5 kao širina preklapajućih *m/z* vrednosti preseka koje se koriste za kreiranje pikova i grupisanje pikova po uzorcima. Za obradu je korišćeno ukupno 104 hromatograma, što je rezultiralo sa 557 detektovanih karakteristika, koje su sve korišćene u multivarijantnoj analizi.

Podaci u tabeli dobijeni sa XCMS online platforme su normalizovani na sadržaj internog standarda (2-dezoksi-riboza) i podvrgnuti multivarijantnoj analizi podataka. PCA, OPLS i OPLS-DA urađene su korišćenjem SIMCA softvera (verzija 15, Sartorius, Gottingen, Nemačka). Podaci su srednje centrirani i skalirani po unit variance (UV).

3.4.2. *A. ursinum*

Analiza uzoraka sremuša je urađena na NMR spektrofotometru Bruker Avance III 500, opremljen sa 5 mm inverznom probom širokog opsega frekvencija (inverse broad band – BBI) koja je korišćena za snimanje ¹H NMR spektara za metabolomički otisak prsta. Signal koji potiče od TSP-*d*₄ korišten je kao referentni signal. Pulsni program (*zgpr*) korišćen za presaturaciju je sniman sa 128 skanova, gde je spektralna širina bila 11 ppm, a relaksaciono vreme 2 sekunde.

Svi ¹H NMR i 2D NMR eksperimenti, koji su korišćeni za analizu biomarkera adulteracije, su snimljeni na istom uređaju i probi, kao i eksperimenti metabolomičkog otiska prsta. Za snimanje 2D eksperimenata kao što su COSY, NOESY, 2D *J*-razložen, HSQC i HMBC korišćene su standardne pulsne sekvence. Softver koji korišćen za obradu NMR spektara je TopSpin 3.5.5.

Svi NMR rezultati dobijeni primenom *zgpr* pulsne sekvence obrađeni su pre multivarijantne analize i to na sledeći način: spektar je zaključan na referentni signal TSP-*d*₄, urađena je korekcija faze i bazne linije, deo spektra δ_H od 0,54 do 9,50 je korišćen za pravljenje binova gde je svaki iznosio 0,04 ppm. Binovi su napravljeni koristeći softver MestReNova 12. Za multivarijantnu analizu korišćen je softver SIMCA. Binovi dobijeni iz NMR spektara su normalizovani na ukupnu površinu, srednje centrirani i skalirani po unit variance. Regioni od δ_H 3,30 do 3,38 i δ_H od 4,66 do 4,90 nisu uključeni u dalju analizu jer predstavljaju signale od rastvarača (MeOD-*d*₄ i HOD).

Pored *zgpr*, optimizovani su uslovi za snimanje PSYCHE eksperimenta na osnovu literaturnih podataka. [204] Snimljeno je ukupno 24 uzorka *A. ursinum* (autentični biljni uzorci sa šest lokaliteta

i simulirani adulterisani uzorci *A. ursinum* sa 50% *C. majalis*, u duplikatu). Obrada spektara rađena je u MestReNova 12 softveru. Spektri obrađeni sledećim redom: spektri su zaključani na signal na δ_H 3,31 koji potiče od CHD₂OD, urađena je korekcija faze i bazne linije, deo spektra od δ_H 0,91 do 8,50 korišćen je za pravljenje „paketića” (binova) gde je svaki iznosio 0,01 ppm, urađeno je i poravnanje pikova (alignment). Ukupna površina „paketića” normalizovana je koristeći UV skaliranje. Region od δ_H 3,30 do 3,34 i region od δ_H 4,76 do 4,99 isključeni su iz dalje analize usled javljanja signala rezidualnog rastvarača. Multivarijantna analiza urađena je u softveru SIMCA 17.

3.4.3. *A. melanocarpa*

Pre analize, staklene HPTLC ploče su aktivirane predpranjem metanolom, a zatim zagrevanjem na 120°C tokom 20 minuta na TLC Plate Heater 3. Po 2 μ l analiziranih ekstrakata naneto je špricom od 25 mL u obliku trake od 8 mm koristeći Linomat 5. Petnaest uzoraka je naneto na svaku HPTLC ploču: Y pozicija nanošenja bila je 15 mm (udaljenost od donje ivice), prva X pozicija nanošenja bila je 20 mm (udaljenost sa svake strane), a rastojanje između nanetih uzoraka je bilo 11,4 mm. Ukupno 75 uzoraka je razvijeno na 5 ploča, čiji redosled je prikazan u **Tabeli 11**. Ploče su razvijene u prethodno zasićenoj CAMAG komori za automatsko razvijanje sa mobilnom fazom koju je činio etil-acetat/butanon/voda/mravljia kiselina (44:20:19:17, v/v/v/v). Nakon sušenja koje je trajalo 5 minuta, praćenog zagrevanjem ploča na 50 °C tokom 10 minuta, razvijeni hromatogrami su prvo analizirani pod vidljivom svetlošću, a nakon derivatizacije pod monohromatskim svetlom na $\lambda=366$ nm. Posthromatografska derivatizacija je sprovedena potapanjem ploča u NP/PEG reagens (smeša aminoetildifenil-borinata i polietilenglikola), a zatim u PEG 4000 (polietilenglikol 4000) (CAMAG Chromatogram Immersion Device 3). Merenja UV–Vis spektra su obavljena korišćenjem TLC skenere.

Tabela 11. Sekvenca nanetih uzoraka na HPTLC ploče

Pozicija	Ploča 1	Ploča 2	Ploča 3	Ploča 4	Ploča 5
1	A1*	A2	A3	A4	A5
2	A6	A7	A8	A9	A10
3	A11	A12	A13	A14	A15
4	AV1	AV2	AV3	AV4	AV5
5	AV6	AV7	AV8	AV9	AV10
6	AV11	AV12	AV13	AV14	AV15
7	AS1	AS2	AS3	AS4	AS5
8	AS6	AS7	AS8	AS9	AS10
9	AS11	AS12	AS13	AS14	AS15
10	AA1	AA2	AA3	AA4	AA5
11	AA6	AA7	AA8	AA9	AA10
12	AA11	AA12	AA13	AA14	AA15
13	AZ1	AZ2	AZ3	AZ4	AZ5
14	AZ6	AZ7	AZ8	AZ9	AZ10
15	AZ11	AZ12	AZ13	AZ14	AZ15

A - uzorci čiste aronije; AV - aronija spajkovana sa vinobojkom; AS - aronija spajkovana sa pomoćnikom; AA – aronija spajkovana sa avdikom; AZ – aronija spajkovana sa plodom zove

Hromatogrami dobijeni nakon HPTLC analize obrađeni su u programu Image J verzija 1.47q. Dobijene slike hromatograma su isečene i uklonjen je šum koristeći srednji filter (3 piksela). Nakon toga je primenjena funkcija za uklanjanje pozadinskog šuma. U slučaju detekcije vidljive svetlosti, za analizu slike je korišćena crno-bela boja, dok su za UV detekciju nakon derivatizacije sa NP/PEG reagensom na $\lambda=366$ nm korišćena tri kanala za dalju obradu slike. Grafik rezultata je generisan za svaki uzorak i prikazuje dvodimenzionalni grafikon intenziteta piksela duž linije. [267] X-osa predstavljala je udaljenost duž linije, a Y-osa intenzitet piksela. PCA i OPLS-DA metoda su korišćene za obradu podataka u SIMCA softveru (verzija 15). Podaci dobijeni iz HPTLC slike su pretvoreni u brojeve, normalizovani na ukupnu površinu, srednje centrirani i Pareto skalirani.

3.4.4. *T. terrestris*

Svi uzorci analizirani su u negativnom modu elektrosprej jonskog izvora. Temperatura kolone je bila 40 °C. Protok mobilne faze kroz sistem je bio 0,5 mL/min. Kao mobilna faza korišćen je acetonitril (B) i 0,1% mravlja kiselina u ultračistoj vodi (A). Injekciona zapremina svih uzoraka bila je 5 μ L. Optimizovani su parametri jonizacije i utvrđeno je da za detektovanje, kvalitativno određivanje i identifikaciju jedinjenja od interesa optimalni parametri jonskog izvora su: temperatura (150 °C), protok kolizionog gasa (0,15 mL/min), i napon izvora (45 kV). Za svaki analit snimljeni su maseni spektri u opsegu m/z 50–1400. Najintenzivniji joni u masenom spektru su dalje fragmentisani, uz optimizaciju kolizione energije za dobijanje većeg broja fragmentacionih jona. Optimizovana koliziona energija je bila 45 eV u DS modu. Za većinu jedinjenja odabran je deprotonovan molekul, $[M-H]^-$, kao jon prekursor. U slučaju nekih jedinjenja prekursor je bio $[M-H+HCOOH]^-$ jon. Fragmentacije jedinjenja izvršene su pod navedenim uslovima. Kvalitativno određivanje je rađeno praćenjem karakterističnih prelaza molekulskog u fragmentacione jone u MRM modu. Akvizicija je podeljena u dvanaest vremenskih segmenata, pri čemu su u svakom segmentu posmatrane dve do tri fragmentacije za po jedno jedinjenje. Prisustvo ispitivanih jedinjenja je potvrđeno na osnovu karakterističnih MS prelaza.

Hromatografija je pratila sledeći gradijent (Tabela 12.):

Tabela 12. UPLC program za analizu uzoraka *T. terrestris*

Vreme	% A	% B
0	90	10
10	10	90
12	90	10
15	90	10

3.5. Izolovanje i prečišćavanje biomarkera iz *C. majalis*

Da bi se identifikovali metaboliti od interesa, uzorci *C. majalis* su prečišćeni vodeći se NMR tehnikom. Uzorak lišća *C. majalis*, mase 32 g, koji je prethodno osušen i samleven u mlinu, ekstrahovan je tri puta sa po 200 mL metanola na sobnoj temperaturi primenom ultrazvučnog kupatila. Nakon ekstrakcije, ekstrakti su profiltrirani kroz filter papir i spojeni. Metanolni ekstrakt je uparen pod sniženim pritiskom pri čemu je dobijemo 4,97 g suvog ekstrakta. Radi daljeg prečišćavanja, metanolni ekstrakt je suspendovan u 100 mL dejonizovane vode, a zatim ekstrahovan četiri puta sa po 50 mL metilen-hlorida. Vodeni ekstrakt, koji za ostao nakon ekstrakcije, ponovo je ekstrahovan četiri puta sa po 50 mL *n*-butanola. Nakon uklanjanja rastvarača dobijeno je 0,65 g ekstrakta. Uklonjen je rastvarač i iz vodenog ekstrakta, a prinos je iznosio 1,40 g. Primenom 1D i 2D

NMR eksperimenata, podataka iz LC-MS, identifikovani su izoviteksin i vicenin II u butanolonom ekstraktu.

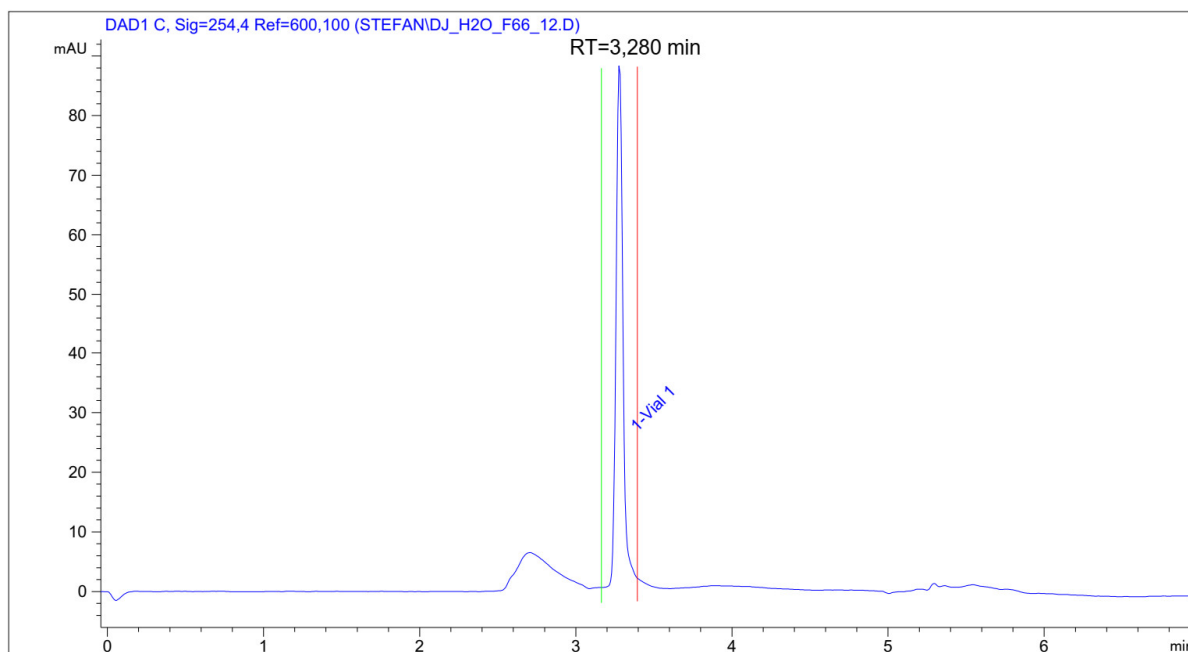
Za prečišćavanje vodenog ekstrakta, 0,70 g ekstrakta je frakcionisano primenom *dry-column flash* hromatografije. Korišćeno je izokratsko i gradijentno eluiranje na koloni visine stuba 21,0 cm i prečnika 3,4 cm. Kolona je ekvilibrisana više puta sa početnom mobilnom fazom. Zapremina svake frakcije je iznosila 20 mL. Tok frakcionisanja je prikazan u **Tabeli 13**.

Tabela 13. Tok frakcionisanja ekstrakta *C. majalis*

Broj frakcije	Mobilna faza (CHCl ₃ /MeOH/H ₂ O = V/V/V)
F1 – F44	60/34/6
F45 – F60	51/42/7
F61 - F66	0/100/0
F67	0/90/10

Prikupljeno je ukupno 67 frakcija, a dobijene frakcije su uporedo analizirane taknoslojnom hromatografijom (TLC). Vizualizacija pločica izvršena je pomoću UV lampe i izazivanjem koristeći anizaldehidni reagens. Za pojedine frakcije je snimljen ¹H NMR spektar, i na osnovu tih spektara utvrđeno je da se u frakciji F48 nalazi jedinjenje od interesa. U toj frakciji identifikovana je azetidin-2-karboksilna kiselina. Spojene su frakcije F64-F66, i uparen je rastvarač. Dobijeno je 53,8 mg suvog ostatka iz kojeg je identifikovan trigonelin.

Frakcija F66 vodenog ekstrakta je prečišćena pomoću RF semi-preparativne tečne hromatografije. Frakcija je rastvorena u metanolu, a razdvajanje je vršeno na C18 koloni (Zorbax Eclipse C18 (250×9,4 mm; 5 μm)) na 25 °C pri konstantnom protoku od 4 mL/min. Detekcija pikova je vršena na λ=254 nm, a kao mobilna faza korišćeni su voda (A) i acetonitril (B) po sledećem programu: 0-20% B (0-10 min), 20-100% B (10-15 min) i 100% B (15-17 min). U LC hromatogramu bio je dominantan jedan pik na Rt=3,280 min (**Slika 44**) i koji je prikupljen. Nakon uparavanja rastvarača dobijeno je 1,8 mg jedinjenja koje je korišćenjem NMR tehnike identifikovano kao trigonelin.



Slika 44. HPLC-DAD hromatogram frakcije F66 vodenog ekstrakta *C. majalis*.

3.6. Izolovanje i prečišćavanje biomarkera *A. maculatum*

Za izolovanje biomarkera iz *A. maculatum*, 5,3 g osušenog i samlevenog lišća, ekstrahovano je tri puta sa po 40 mL metanola. Ekstrakcija je rađena u ultrazvučnom kupatilu i trajala je 30 min. Spojeni su metanolni ekstrakti, zatim procedeni, a rastvarač je uklonjen. Dobijeno je 1,1 g ekstrakta, koji je rastvoren u 20 mL vode, a zatim ekstrahovan četiri puta sa po 10 mL metilen-hlorida. Preostali vodeni rastvor je ekstrahovan četiri puta sa po 10 mL *n*-butanola. Nakon uklanjanja rastvarača pod sniženim pritiskom, dobijeno je 0,82 g *n*-butanolonog i 0,18 g vodenog ekstrakta.

Cela količina butanolnog ekstrakta je rastvorena u metanolu i frakcionisana na Sephadex LH-20 koloni, dimezija 30 cm visine i prečnika 5,5 cm. Kao mobilna faza je korišćen čist metanol, pri čemu je dobijeno ukupno 35 frakcija. Zapremina svake frakcije je iznosila 2 mL. Uporedo sa Sephadex kolonom, korišćena je TLC za praćenje, eluent za razvijanje bio je $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}=60:30:3$. U frakciji F31 identifikovan je izoviteksin primenom 1D i 2D NMR eksperimenata. Struktura izoviteksina je potvrđena metodom standardnog dodatka. Signali izoviteksina su se potpuno preklapali sa signalima u originalnom spektru, i intenzitet njegovih signala se povećao u odnosu na ostale signale.

3.7. LC-DAD-MS analiza biomarkera

Za identifikaciju biomarkera iz *n*-butanolnog ekstrakta *C. majalis* i frakcije *A. maculatum*, pripremljeni uzorci su analizirani visokoefikasnom tečnom hromatografijom sa masenim spektrometrom visoke rezolucije i DAD detektorima. Kao mobilna faza korišćeni su rastvarači A (0,1% mravlja kiselina i 5 mM amonijum-formijat u vodi) i B (0,1% mravlja kiselina u acetonitrilu). Za hromatografsko razdvajanje korišćen je gradijentni program (Tabela 14):

Tabela 14. HPLC program za analizu biomarkera

Vreme (min)	A (%)	B (%)
0	95	5
2	95	5
12	5	95
15	5	95
20	95	5

Protok mobilne faze iznosio je 0,40 mL/min a temperatura kolone bila je 50 °C. Injekcione zapremine bile su 1 i 2 µL za pozitivni odnosno negativni mod. UV spektri na DAD dektoru snimljeni su u opsegu od $\lambda=190\text{--}450$ nm, a hromatogrami na $\lambda=270\text{--}340$ nm. Snimljeni su spektri u pozitivnom i negativnom modu. Opseg snimanih *m/z* vrednosti bio je 100-1500, napon na kapilari 3500 V, napon fragmentora 140 V, napon mlaznice 1000 V, napon na konusu 65 V, oktapolni RF pik 750 V, azot kao gas za desolvataciju zagrejan je na 200 °C pri protoku od 14 L/min, pritisak na sušačima (nebulajzer) je bio 35 psig, azot je korišćen kao kolizioni gas na 350 °C i pri protoku od 11 L/min, i bez primenjene kolizione energije. Dodatno, MS/MS spektri su snimljeni u istom modu koristeći kolizione energije od 20 V i 40 V. Za prikupljanje i analiziranje podataka korišćen je MassHunter program.

4. ZAKLJUČAK

U ovoj doktorskoj disertaciji su za potrebe metabolomičke analize proizvoda biljnog porekla optimizovane su instrumentalne i tehnike multivarijantne analize podataka. Pronađeni su biomarkeri kvaliteta i/ili adulteracije lekovitog bilja i biljnih preparata, pri čemu je urađena i potpuna hemijska karakterizacija pronađenih biomarkera.

Pokazano je da se GC-MS tehnika sa metabolomičkim pristupom može veoma pouzdano koristiti za detekciju adulteracije uzoraka *O. vulgare* (vranilova trava) i *O. onites* (kritski origano). Iako je GC primarno namenjena analizi isparljivih jedinjenja, primenom dvostepene derivatizacije koja uključuje metoksimovanje i silanizaciju omogućena je analiza polarnih metabolita. Primenom PCA i OPLS multivarijantnih modela detektovana je adulteracija uzoraka origana sa lišćem *O. europaea* (maslina), *C. coggygia* (venecijanski sumak) i *M. communis* (mirta). Na osnovu dobijenih rezultata, različiti udeo sorbitola dovodi do razlikovanja uzoraka autentičnog origana i lišća masline, dok su šikiminska i hininska kiselina biomarkeri adulteracije origana sa uzorcima venecijanskog sumaka. Udeli fruktoze i hininske kiseline su pokazatelji adulteracije origana sa lišćem mirte. Dobijeni rezultati pokazuju da kombinacija GC-MS i hemometrijske analize predstavlja pouzdanu metodu u detekciji adulteracije biljnih proizvoda.

Metabolomički otisak prsta zasnovan na primeni ^1H NMR spektroskopije u kombinaciji sa multivarijantnom analizom podataka predstavlja veoma pouzdan alat za detekciju adulteracije biljke *A. ursinum* (sremuš). Na primeru ove biljne vrste predložen je model sistem jedne jestive biljke za identifikaciju biomarkera adulteracije, gde jedinjenja malih molekulskih masa mogu ukazati na prisustvo toksičnih biljnih vrsta. Flavonoidni glikozidi izoviteksin i vicenin II, azetidin-2-karboksilna kiselina i piridinski alkaloid trigonelin su identifikovani kao biomarkeri adulteracije sa *C. majalis* (đurđevak). Izoviteksin je detektovan kao biomarker adulteracije *A. ursinum* i sa *A. maculatum* (kozlac).

Metabolomički pristup zasnovan na HPTLC analizi pokazao se kao veoma pouzdana, brza i jeftina tehnika za otkrivanje adulteracije ploda *A. melanocarpa* (aronija). Korišćenje metoda multivarijantne analize PCA i OPLS-DA na HPTLC podacima dobijenim nakon analize slike, omogućilo je utvrđivanje botaničkog porekla ispitivanih adulteranata aronije. Prema našim rezultatima, betanin je zaslužan za razlikovanje uzoraka aronije od *P. americana* (vinobojka), dok je petunidin-3-*O*-(*p*-kumaroil)-rutinozid-5-*O*-glukozid označen kao značajni biomarker za razlikovanje aronije od *S. nigrum* (pomoćnica). Cijanidin-3-*O*-sambubiozid-5-*O*-glukozid, cijanidin-3,5-*O*-diglukozid i cijanidin-3-*O*-sambubiozid značajni su za detekciju adulterisane aronije sa *S. nigra* (zova). Predloženi tok rada potvrdio je potencijal planarne hromatografije u kombinaciji sa multivarijantnom analizom za otkrivanje falsifikovanja proizvoda na bazi hrane.

Primena tandemne masene spektrometrije u kombinaciji sa tačnom hromatografijom pokazala se kao efikasna tehnika za analizu komercijalnih uzoraka deklariranih biljnih suplemenata na bazi *T. terrestris* (babin zub) na prisustvo ekstrakta ove biljke i potvrdu njihove autentičnosti. Dobijeni su relevantni biomarkeri autentičnosti prikupljenih biljnih uzoraka, koji su kasnije detektovani i u komercijalnim uzorcima suplemenata. Praćenjem karakterističnih fragmentacija uspešno je identifikovano devet jedinjenja, od kojih su dva flavanoidne strukture i sedam steroidnih saponina. Rutin i prototribestin detektovani su kao biomarkeri u biljnim i u svim komercijalnim uzorcima.

Dobijeni rezultati mogu doprineti dodatnom razumevanju hemijskog sastava ispitivanih lekovitih biljnih vrsta koje zbog svoje značajnosti slučajno i/ili namerno podležu adulteraciji. Primenom različitih instrumentalnih tehnika poput GC-MS, NMR, HPTLC i UPLC-MS/MS pokazano je da se različiti analitički izazovi mogu adekvatno prevazići pravilnim odabirom odgovarajuće tehnike. Razvoj novih metoda i pristupa za analizu autentičnosti i detekciju adulteracije je od velikog značaja za zdravlje ljudi, kao i ekonomiju.

LITERATURA

1. Galvin-King, P.; Haughey, S.A.; Elliott, C.T. Herb and Spice Fraud; the Drivers, Challenges and Detection. *Food Control* **2018**, *88*, 85–97, doi:10.1016/j.foodcont.2017.12.031.
2. Gafner, S.; Blumenthal, M.; Foster, S.; Cardellina, J.H.; Khan, I.A.; Upton, R. Botanical Ingredient Forensics: Detection of Attempts to Deceive Commonly Used Analytical Methods for Authenticating Herbal Dietary and Food Ingredients and Supplements. *J. Nat. Prod.* **2023**, *86*, 460–472, doi:10.1021/acs.jnatprod.2c00929.
3. Foster, S. A Brief History of Adulteration of Herbs, Spices, and Botanical Drugs Available online: <https://www.herbalgram.org/resources/herbalgram/issues/92/table-of-contents/feat-hxadulteration/> (accessed on 5 March 2024).
4. Muschietti, L.; Redko, F.; Ulloa, J. Adulterants in Selected Dietary Supplements and Their Detection Methods. *Drug Test. Anal.* **2020**, *12*, 861–886, doi:10.1002/dta.2806.
5. Posadzki, P.; Watson, L.; Ernst, E. Contamination and Adulteration of Herbal Medicinal Products (HMPs): An Overview of Systematic Reviews. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **2013**, *69*, 295–307, doi:10.1007/s00228-012-1353-z.
6. Hachem, R.; Assemet, G.; Martins, N.; Balayssac, S.; Gilard, V.; Martino, R.; Malet-Martino, M. Proton NMR for Detection, Identification and Quantification of Adulterants in 160 Herbal Food Supplements Marketed for Weight Loss. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2016**, *124*, 34–47, doi:10.1016/j.jpba.2016.02.022.
7. Ellis, D.I.; Muhamadali, H.; Allen, D.P.; Elliott, C.T.; Goodacre, R. A Flavour of Omics Approaches for the Detection of Food Fraud. *Curr. Opin. Food Sci.* **2016**, *10*, 7–15, doi:10.1016/j.cofs.2016.07.002.
8. Ichim, M.C.; Booker, A. Chemical Authentication of Botanical Ingredients: A Review of Commercial Herbal Products. *Front. Pharmacol.* **2021**, *12*, doi:10.3389/fphar.2021.666850.
9. Ichim, M.C. The DNA-Based Authentication of Commercial Herbal Products Reveals Their Globally Widespread Adulteration. *Front. Pharmacol.* **2019**, *10*, doi:10.3389/fphar.2019.01227.
10. Black, C.; Haughey, S.A.; Chevallier, O.P.; Galvin-King, P.; Elliott, C.T. A Comprehensive Strategy to Detect the Fraudulent Adulteration of Herbs: The Oregano Approach. *Food Chem.* **2016**, *210*, 551–557, doi:10.1016/j.foodchem.2016.05.004.
11. Rather, I.A.; Koh, W.Y.; Paek, W.K.; Lim, J. The Sources of Chemical Contaminants in Food and Their Health Implications. *Front. Pharmacol.* **2017**, *8*, doi:10.3389/fphar.2017.00830.
12. Genualdi, S.; MacMahon, S.; Robbins, K.; Farris, S.; Shyong, N.; DeJager, L. Method Development and Survey of Sudan I–IV in Palm Oil and Chilli Spices in the Washington, DC, Area. *Food Addit. Contam. Part A* **2016**, 1–9, doi:10.1080/19440049.2016.1147986.
13. Garber, E.A.E.; Parker, C.H.; Handy, S.M.; Cho, C.Y.; Panda, R.; Samadpour, M.; Reynaud, D.H.; Ziobro, G.C. Presence of Undeclared Food Allergens in Cumin: The Need for Multiplex Methods. *J. Agric. Food Chem.* **2016**, *64*, 1202–1211, doi:10.1021/acs.jafc.5b05497.
14. Sicherer, S.; Sampson, H. 9. Food Allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2006**, *117*, S470–S475, doi:10.1016/j.jaci.2005.05.048.
15. Perret, C.; Tabin, R.; Marcoz, J.-P.; Llor, J.; Cheseaux, J.-J. Malaise Du Nourrisson Pensez à Une Intoxication à l’anis Étoilé. *Arch. Pédiatrie* **2011**, *18*, 750–753, doi:10.1016/j.arcped.2011.03.024.
16. American Botanical Council (ABC) Botanical Adulterants Program Content Available online: <http://abc.herbalgram.org/site/PageServer> (accessed on 5 March 2024).
17. Marieschi, M.; Torelli, A.; Bianchi, A.; Bruni, R. Development of a SCAR Marker for the Identification of *Olea Europaea* L.: A Newly Detected Adulterant in Commercial

- Mediterranean Oregano. *Food Chem.* **2011**, *126*, 705–709, doi:10.1016/j.foodchem.2010.11.030.
18. Alonso, A.; Marsal, S.; Juliá, A. Analytical Methods in Untargeted Metabolomics: State of the Art in 2015. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2015**, *3*, doi:10.3389/fbioe.2015.00023.
19. Wolfender, J.-L.; Rudaz, S.; Hae Choi, Y.; Kyong Kim, H. Plant Metabolomics: From Holistic Data to Relevant Biomarkers. *Curr. Med. Chem.* **2013**, *20*, 1056–1090, doi:10.2174/0929867311320080009.
20. van Ruth, S.M.; Luning, P.A.; Silvis, I.C.J.; Yang, Y.; Huisman, W. Differences in Fraud Vulnerability in Various Food Supply Chains and Their Tiers. *Food Control* **2018**, *84*, 375–381, doi:10.1016/j.foodcont.2017.08.020.
21. Lohumi, S.; Lee, S.; Lee, H.; Cho, B.-K. A Review of Vibrational Spectroscopic Techniques for the Detection of Food Authenticity and Adulteration. *Trends Food Sci. Technol.* **2015**, *46*, 85–98, doi:10.1016/j.tifs.2015.08.003.
22. Sakamoto, S.; Sato, K.; Maitani, T.; Yamada, T. Analysis of components in natural food additive “grapefruit seed extract” by HPLC and LC/MS. *Eisei Shikenjo Hokoku.* **1996**, 38–42.
23. von Woedtke, T.; Schlüter, B.; Pflugel, P.; Lindequist, U.; Jülich, W.D. Aspects of the Antimicrobial Efficacy of Grapefruit Seed Extract and Its Relation to Preservative Substances Contained. *Pharmazie* **1999**, *54*, 452–456.
24. Maeda, K.; Idehara, R.; Kusaka, S. Mistaken Identity: Severe Vomiting, Bradycardia and Hypotension after Eating a Wild Herb. *Clin. Toxicol.* **2012**, *50*, 532–533, doi:10.3109/15563650.2012.696201.
25. Mitchell, A. Bitter Pill to Swallow: A Case of Accidental Poisoning with Digitalis Purpurea. *Case Reports* **2010**, *2010*, bcr0120102633–bcr0120102633, doi:10.1136/bcr.01.2010.2633.
26. Blic No Title Available online: <https://www.blic.rs/vesti/hronika/uhapsena-baka-72-iz-sapca-prodavala-otrovne-pecurke-na-pijaci-sestoro-ljudi-zavrsilo/gyds8hd> (accessed on 5 March 2024).
27. Gajić, S. No Title Available online: <https://mondo.rs/Info/Crna-hronika/a1699499/Sapcanin-Dusan-bio-na-tezgi-bake-trovacice.html> (accessed on 5 March 2024).
28. Mezzasalma, V.; Ganopoulos, I.; Galimberti, A.; Cornara, L.; Ferri, E.; Labra, M. Poisonous or Non-Poisonous Plants? DNA-Based Tools and Applications for Accurate Identification. *Int. J. Legal Med.* **2017**, *131*, 1–19, doi:10.1007/s00414-016-1460-y.
29. Zelena Kafa Na Dodatnim Analizama Available online: <https://www.politika.rs/sr/clanak/125836/Medicina/Zelena-kafa-na-dodatnim-analizama> (accessed on 5 March 2024).
30. Satheeshkumar, N.; Paul, D.; Lingesh, A. Liquid Chromatography–Mass Spectrometry (LC–MS): Approaches to Adulterant Detection in Herbal Products. In *Medicinal Plants - Recent Advances in Research and Development*; Springer Singapore: Singapore, 2016; pp. 73–95.
31. The Hindu Four Held on Adulteration Charge Available online: <http://www.thehindu.com/todays-paper/tp-national/tp-otherstates/Four-held-on-adulteration-charge/article15226476.ece> (accessed on 5 March 2024).
32. The Express Tribune Crackdown: 3,000 Kg Adulterated Red Chilli Powder Seized Available online: <https://tribune.com.pk/story/1088806/crackdown-3000-kg-adulterated-red-chili-powder-seized/> (accessed on 5 March 2024).
33. Dhanya, K.; Syamkumar, S.; Siju, S.; Sasikumar, B. SCAR Markers for Adulterant Detection in Ground Chilli. *Br. Food J.* **2011**, *113*, 656–668, doi:10.1108/00070701111131755.
34. Black, C.; Chevallier, O.P.; Elliott, C.T. The Current and Potential Applications of Ambient Mass Spectrometry in Detecting Food Fraud. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2016**, *82*, 268–278, doi:10.1016/j.trac.2016.06.005.

35. Bononi, M.; Tateo, F. LC-ESI-MS/MS Identification of Oleuropein as Marker of *Olea Europaea* L. Leaves Used as a Bulking Agent in Ground Oregano and Sage. *Ital. J. Food Sci.* **2011**, *23*, 245–251.
36. Marieschi, M.; Torelli, A.; Bianchi, A.; Bruni, R. Detecting *Satureja Montana* L. and *Origanum Majorana* L. by Means of SCAR–PCR in Commercial Samples of Mediterranean Oregano. *Food Control* **2011**, *22*, 542–548, doi:10.1016/j.foodcont.2010.10.001.
37. Wielogorska, E.; Chevallier, O.; Black, C.; Galvin-King, P.; Delêtre, M.; Kelleher, C.T.; Haughey, S.A.; Elliott, C.T. Development of a Comprehensive Analytical Platform for the Detection and Quantitation of Food Fraud Using a Biomarker Approach. The Oregano Adulteration Case Study. *Food Chem.* **2018**, *239*, 32–39, doi:10.1016/j.foodchem.2017.06.083.
38. Parvathy, V.A.; Swetha, V.P.; Sheeja, T.E.; Leela, N.K.; Chempakam, B.; Sasikumar, B. DNA Barcoding to Detect Chilli Adulteration in Traded Black Pepper Powder. *Food Biotechnol.* **2014**, *28*, 25–40, doi:10.1080/08905436.2013.870078.
39. McGoverin, C.M.; September, D.J.F.; Geladi, P.; Manley, M. Near Infrared and Mid-Infrared Spectroscopy for the Quantification of Adulterants in Ground Black Pepper. *J. Near Infrared Spectrosc.* **2012**, *20*, 521–528, doi:10.1255/jnirs.1008.
40. ASTA Spice Adulteration- White Paper Available online: <http://docshare04.docshare.tips/files/%0A6810/68105104.pdf%0A> (accessed on 5 March 2024).
41. Agres, T. The Cumin Scandal: Accidental or Fraudulent. Food Quality and Safety Available online: <http://www.foodqualityandsafety.com/%0Aarticle/the-cumin-scandal-accidental-or-fraudulent/%0A> (accessed on 5 March 2024).
42. Schrage, M.; Shen, Y.; Claassen, F.W.; Zuilhof, H.; Nielen, M.W.F.; Chen, B.; van Beek, T.A. Rapid and Simple Neurotoxin-Based Distinction of Chinese and Japanese Star Anise by Direct Plant Spray Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2013**, *1317*, 246–253, doi:10.1016/j.chroma.2013.07.072.
43. Shen, Y.; van Beek, T.A.; Claassen, F.W.; Zuilhof, H.; Chen, B.; Nielen, M.W.F. Rapid Control of Chinese Star Anise Fruits and Teas for Neurotoxic Anisatin by Direct Analysis in Real Time High Resolution Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2012**, *1259*, 179–186, doi:10.1016/j.chroma.2012.03.058.
44. Brunner, M.; Katona, R.; Stefánka, Z.; Prohaska, T. Determination of the Geographical Origin of Processed Spice Using Multielement and Isotopic Pattern on the Example of Szegedi Paprika. *Eur. Food Res. Technol.* **2010**, *231*, 623–634, doi:10.1007/s00217-010-1314-7.
45. Galaxy Scientific Rapid Detection of Paprika Adulteration by FT-NIR Spectroscopy Available online: <https://galaxy-scientific.com/wp-content/uploads/2016/10/GS-A-Paprika-1.1EN.pdf> (accessed on 5 March 2024).
46. Petrakis, E.A.; Polissiou, M.G. Assessing Saffron (*Crocus Sativus* L.) Adulteration with Plant-Derived Adulterants by Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform Spectroscopy Coupled with Chemometrics. *Talanta* **2017**, *162*, 558–566, doi:10.1016/j.talanta.2016.10.072.
47. Heidarbeigi, K.; Mohtasebi, S.S.; Foroughirad, A.; Ghasemi-Varnamkhasti, M.; Rafiee, S.; Rezaei, K. Detection of Adulteration in Saffron Samples Using Electronic Nose. *Int. J. Food Prop.* **2015**, *18*, 1391–1401, doi:10.1080/10942912.2014.915850.
48. Petrakis, E.A.; Cagliani, L.R.; Polissiou, M.G.; Consonni, R. Evaluation of Saffron (*Crocus Sativus* L.) Adulteration with Plant Adulterants by ¹H NMR Metabolite Fingerprinting. *Food Chem.* **2015**, *173*, 890–896, doi:10.1016/j.foodchem.2014.10.107.
49. Huang, W.; Li, F.; Liu, Y.; Long, C. Identification of *Crocus Sativus* and Its Adulterants from Chinese Markets by Using DNA Barcoding Technique. *Iran. J. Biotechnol.* **2015**, *13*, 36–42, doi:10.15171/ijb.1034.

50. Marieschi, M.; Torelli, A.; Bruni, R. Quality Control of Saffron (*Crocus Sativus* L.): Development of SCAR Markers for the Detection of Plant Adulterants Used as Bulking Agents. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 10998–11004, doi:10.1021/jf303106r.
51. Rubert, J.; Lacina, O.; Zachariasova, M.; Hajslova, J. Saffron Authentication Based on Liquid Chromatography High Resolution Tandem Mass Spectrometry and Multivariate Data Analysis. *Food Chem.* **2016**, *204*, 201–209, doi:10.1016/j.foodchem.2016.01.003.
52. Nallappan, K.; Dash, J.; Ray, S.; Pesala, B. Identification of Adulterants in Turmeric Powder Using Terahertz Spectroscopy. In Proceedings of the 2013 38th International Conference on Infrared, Millimeter, and Terahertz Waves (IRMMW-THz); IEEE, September 2013; pp. 1–2.
53. Dhanya, K.; Syamkumar, S.; Siju, S.; Sasikumar, B. Sequence Characterized Amplified Region Markers: A Reliable Tool for Adulterant Detection in Turmeric Powder. *Food Res. Int.* **2011**, *44*, 2889–2895, doi:10.1016/j.foodres.2011.06.040.
54. Lee, S.; Lohumi, S.; Lim, H.; Gotoh, T.; Goto, T.; Cho, B.; Kim, M.S.; Lee, S. Development of a Detection Method for Adulterated Onion Powder Using Raman Spectroscopy. *J. Fac. Agric. Kyushu Univ.* **2015**, *60*, 151–156, doi:10.5109/1526312.
55. Milojković-Opsenica, D.M.; Tešić, Ž.L. Assessment of the Authenticity of Honey. *J. AOAC Int.* **2017**, *100*, 825–826, doi:10.5740/jaoacint.17-0141.
56. *Food Chemistry*; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2009; ISBN 978-3-540-69933-0.
57. Med - Rezultati Ispitivanja Tržišta Available online: <https://potrosacizakvalitet.com/мед-испитивање-тржишта/> (accessed on 5 March 2024).
58. Milojković Opsenica, D.; Lušić, D.; Tešić, Ž. Modern Analytical Techniques in the Assessment of the Authenticity of Serbian Honey / Moderne Analitičke Tehnike u Procjeni Izvornosti Meda Iz Srbije. *Arch. Ind. Hyg. Toxicol.* **2015**, *66*, 233–241, doi:10.1515/aiht-2015-66-2721.
59. Pčelinji Vosak Available online: <https://www.tehnologijahrane.com/enciklopedija/pcelinji-vosak> (accessed on 5 March 2024).
60. El Agrebi, N.; Svečnjak, L.; Horvatinec, J.; Renault, V.; Rortais, A.; Cravedi, J.-P.; Saegerman, C. Adulteration of Beeswax: A First Nationwide Survey from Belgium. *PLoS One* **2021**, *16*, e0252806, doi:10.1371/journal.pone.0252806.
61. Svečnjak, L.; Baranović, G.; Vinceković, M.; Prđun, S.; Bubalo, D.; Tlak Gajger, I. An Approach for Routine Analytical Detection of Beeswax Adulteration Using FTIR-ATR Spectroscopy. *J. Apic. Sci.* **2015**, *59*, 37–49, doi:10.1515/jas-2015-0018.
62. Tulloch, A.P. Factors Affecting Analytical Values of Beeswax and Detection of Adulteration. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1973**, *50*, 269–272, doi:10.1007/BF02641800.
63. J. H. Ietswaart *A Taxonomic Revision of the Genus Origanum (Labiatae)*; Springer Dordrecht, 1980; ISBN 978-90-6021-463-3.
64. Cid-Pérez, T.S.; Nevárez-Moorillón, G.V.; Torres-Muñoz, J.V.; Palou, E.; López-Malo, A. Mexican Oregano (*Lippia Berlandieri* and *Poliomintha Longiflora*) Oils. In *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*; Elsevier, 2016; pp. 551–560.
65. Aligiannis, N.; Kalpoutzakis, E.; Mitaku, S.; Chinou, I.B. Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oils of Two *Origanum* Species. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 4168–4170, doi:10.1021/jf001494m.
66. Veenstra, J.P.; Johnson, J.J. Oregano (*Origanum Vulgare*) Extract for Food Preservation and Improving Gastrointestinal Health. *Int. J. Nutr.* **2019**, *3*, 43–52, doi:10.14302/issn.2379-7835.ijn-19-2703.
67. Azevedo, A.N.; Buarque, P.R.; Cruz, E.M.O.; Blank, A.F.; Alves, P.B.; Nunes, M.L.; Santana, L.C.L. de A. Response Surface Methodology for Optimisation of Edible Chitosan Coating

- Formulations Incorporating Essential Oil against Several Foodborne Pathogenic Bacteria. *Food Control* **2014**, *43*, 1–9, doi:10.1016/j.foodcont.2014.02.033.
68. Castilho, P.C.; Savluchinske-Feio, S.; Weinhold, T.S.; Gouveia, S.C. Evaluation of the Antimicrobial and Antioxidant Activities of Essential Oils, Extracts and Their Main Components from Oregano from Madeira Island, Portugal. *Food Control* **2012**, *23*, 552–558, doi:10.1016/j.foodcont.2011.08.031.
69. Stefanakis, M.K.; Touloupakis, E.; Anastasopoulos, E.; Ghanotakis, D.; Katerinopoulos, H.E.; Makridis, P. Antibacterial Activity of Essential Oils from Plants of the Genus *Origanum*. *Food Control* **2013**, *34*, 539–546, doi:10.1016/j.foodcont.2013.05.024.
70. Lin, L.-Z.; Mukhopadhyay, S.; Robbins, R.J.; Harnly, J.M. Identification and Quantification of Flavonoids of Mexican Oregano (*Lippia Graveolens*) by LC-DAD-ESI/MS Analysis. *J. Food Compos. Anal.* **2007**, *20*, 361–369, doi:10.1016/j.jfca.2006.09.005.
71. Wilson, L. Spices and Flavoring Crops: Leaf and Floral Structures. In *Encyclopedia of Food and Health*; Elsevier, 2016; pp. 84–92.
72. Kokkini, S.; Karousou, R.; Hanlidou, E. HERBS | Herbs of the Labiatae. In *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*; Elsevier, 2003; pp. 3082–3090.
73. Oregano Spice Aromatic Herbs Free Photo Available online: <https://www.needpix.com/photo/1087352/oregano-spice-aromatic-herbs-mediterranean-culinary-herbs-edible> (accessed on 4 March 2024).
74. Mandrone, M.; Marincich, L.; Chiocchio, I.; Petroli, A.; Godevac, D.; Maresca, I.; Poli, F. NMR-Based Metabolomics for Frauds Detection and Quality Control of Oregano Samples. *Food Control* **2021**, *127*, 108141, doi:10.1016/j.foodcont.2021.108141.
75. Drabova, L.; Alvarez-Rivera, G.; Suchanova, M.; Schusterova, D.; Pulkrabova, J.; Tomaniova, M.; Kocourek, V.; Chevallier, O.; Elliott, C.; Hajslova, J. Food Fraud in Oregano: Pesticide Residues as Adulteration Markers. *Food Chem.* **2019**, *276*, 726–734, doi:10.1016/j.foodchem.2018.09.143.
76. List of culinary herbs and spices No Title Available online: <https://www.esa-spices.org/index-esa.html/publications-esa> (accessed on 5 March 2024).
77. European spice association, Quality Minima Document, **2018**.
78. *European Pharmacopoeia*; 9th ed.; 2017;
79. Ivanovic, S.; Mandrone, M.; Simic, K.; Ristic, M.; Todosijevic, M.; Mandic, B.; Godjevac, D. GC-MS-Based Metabolomics for the Detection of Adulteration in Oregano Samples. *J. Serbian Chem. Soc.* **2021**, *86*, 1195–1203, doi:10.2298/JSC210809089I.
80. Bononi, M.; Fiordaliso, I.; Tateo, F. Rapid GC/MS Test for Identification of *Olea Europaea* L. Leaves in Ground Oregano. *Ital. J. Food Sci.* **2010**, *22*, 479–483.
81. Rodriguez-Saona, L.E.; Allendorf, M.E. Use of FTIR for Rapid Authentication and Detection of Adulteration of Food. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* **2011**, *2*, 467–483, doi:10.1146/annurev-food-022510-133750.
82. Sammarco, G.; Alinovi, M.; Fiorani, L.; Rinaldi, M.; Suman, M.; Lai, A.; Puiu, A.; Giardina, I.; Pollastrone, F. Oregano Herb Adulteration Detection through Rapid Spectroscopic Approaches: Fourier Transform-near Infrared and Laser Photoacoustic Spectroscopy Facilities. *J. Food Compos. Anal.* **2023**, *124*, 105672, doi:10.1016/j.jfca.2023.105672.
83. Marieschi, M.; Torelli, A.; Poli, F.; Bianchi, A.; Bruni, R. Quality Control of Commercial Mediterranean Oregano: Development of SCAR Markers for the Detection of the Adulterants *Cistus Incanus* L., *Rubus Caesius* L. and *Rhus Coriaria* L. *Food Control* **2010**, *21*, 998–1003, doi:10.1016/j.foodcont.2009.12.018.
84. Mandrone, M.; Chiocchio, I.; Barbanti, L.; Tomasi, P.; Tacchini, M.; Poli, F. Metabolomic Study of Sorghum (*Sorghum Bicolor*) to Interpret Plant Behavior under Variable Field

- Conditions in View of Smart Agriculture Applications. *J. Agric. Food Chem.* **2021**, *69*, 1132–1145, doi:10.1021/acs.jafc.0c06533.
85. Godevac, D.; Vujisić, L.; Mojović, M.; Ignjatović, A.; Spasojević, I.; Vajs, V. Evaluation of Antioxidant Capacity of *Allium Ursinum* L. Volatile Oil and Its Effect on Membrane Fluidity. *Food Chem.* **2008**, *107*, 1692–1700, doi:10.1016/j.foodchem.2007.10.017.
 86. Sobolewska, D.; Podolak, I.; Makowska-Wąs, J. *Allium Ursinum*: Botanical, Phytochemical and Pharmacological Overview. *Phytochem. Rev.* **2015**, *14*, 81–97, doi:10.1007/s11101-013-9334-0.
 87. Stanisavljević, N.; Soković Bajić, S.; Jovanović, Ž.; Matić, I.; Tolinački, M.; Popović, D.; Popović, N.; Terzić-Vidojević, A.; Golić, N.; Beškoski, V.; et al. Antioxidant and Antiproliferative Activity of *Allium Ursinum* and Their Associated Microbiota During Simulated in Vitro Digestion in the Presence of Food Matrix. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*, doi:10.3389/fmicb.2020.601616.
 88. Vončina, M.; Baričević, D.; Brvar, M. Adverse Effects and Intoxications Related to Medicinal/Harmful Plants. *Acta Agric. Slov.* **2015**, *103*, doi:10.14720/aas.2014.103.2.10.
 89. Focke, F.; Haase, I.; Fischer, M. DNA-Based Identification of Spices: DNA Isolation, Whole Genome Amplification, and Polymerase Chain Reaction. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 513–520, doi:10.1021/jf103702s.
 90. Rousseau, G.; Clément, J.; Fezard, J.B.; Laribi, S. Intoxication Au Colchique Par Confusion Avec l'ail Des Ours. *La Rev. Médecine Interne* **2022**, *43*, 559–561, doi:10.1016/j.revmed.2022.04.022.
 91. Touiti, N.; Houssaini, T.S.; Achour, S. Overview on Pharmacovigilance of Nephrotoxic Herbal Medicines Used Worldwide. *Clin. Phytoscience* **2021**, *7*, 9, doi:10.1186/s40816-021-00248-6.
 92. Senizza, B.; Rocchetti, G.; Okur, M.A.; Zengin, G.; Yıldızıtugay, E.; Ak, G.; Montesano, D.; Lucini, L. Phytochemical Profile and Biological Properties of *Colchicum Triphyllum* (Meadow Saffron). *Foods* **2020**, *9*, 457, doi:10.3390/foods9040457.
 93. FreePik Wild Leek Available online: <https://www.freepik.com/> (accessed on 4 March 2024).
 94. Zoltani, C.K. Cardiovascular Toxicity. In *Veterinary Toxicology*; Elsevier, 2018; pp. 227–238.
 95. Ceylan, F.; Akar Sahingoz, S. Using Ethnobotanical Plants in Food Preparation: Cuckoo Pint (*Arum Maculatum* L.). *Int. J. Gastron. Food Sci.* **2022**, *29*, 100529, doi:10.1016/j.ijgfs.2022.100529.
 96. Prakash Raju, K.J.; Goel, K.; Anandhi, D.; Pandit, V.; Surendar, R.; Sasikumar, M. Wild Tuber Poisoning: *Arum Maculatum* – A Rare Case Report. *Int. J. Crit. Illn. Inj. Sci.* **2018**, *8*, 111, doi:10.4103/IJCIIS.IJCIIS_9_18.
 97. Erbil, N.; Arslan, M.; Tugba Murathan, Z. Antioxidant, Antimicrobial, and Antimutagenic Effects and Biochemical Contents of *Arum Maculatum* L. That Is a Medical Plant from Turkish Flora. *Fresenius Environ. Bull.* **2018**, *27*, 8709–8714.
 98. Ćujić, N. Optimization of Chokeberry (*Aronia Melanocarpa* (Michx.) Elliott) Extraction, Microencapsulation of Extract by Electrostatic Extrusion and Spray Drying Methods, University of Belgrade - Faculty of Pharmacy, 2017.
 99. Kokotkiewicz, A.; Jaremicz, Z.; Luczkiewicz, M. *Aronia* Plants: A Review of Traditional Use, Biological Activities, and Perspectives for Modern Medicine. *J. Med. Food* **2010**, *13*, 255–269, doi:10.1089/jmf.2009.0062.
 100. *Aronia Melanocarpa* Available online: <https://www.missouribotanicalgarden.org/PlantFinder/PlantFinderDetails.aspx?kempercode=j420> (accessed on 4 March 2024).
 101. Needpix *Aronia Garden Green Free Photo* Available online: <https://www.needpix.com/photo/477209/aronia-garden> (accessed on 5 March 2024).

102. Benvenuti, S.; Pellati, F.; Melegari, M.; Bertelli, D. Polyphenols, Anthocyanins, Ascorbic Acid, and Radical Scavenging Activity of Rubus, Ribes, and Aronia. *J. Food Sci.* **2004**, *69*, doi:10.1111/j.1365-2621.2004.tb13352.x.
103. Kaloudi, T.; Tsimogiannis, D.; Oreopoulou, V. Aronia Melanocarpa: Identification and Exploitation of Its Phenolic Components. *Molecules* **2022**, *27*, 4375, doi:10.3390/molecules27144375.
104. Kulling, S.; Rawel, H. Chokeberry (Aronia Melanocarpa) – A Review on the Characteristic Components and Potential Health Effects. *Planta Med.* **2008**, *74*, 1625–1634, doi:10.1055/s-0028-1088306.
105. Olas, B.; Kedzierska, M.; Wachowicz, B.; Stochmal, A.; Oleszek, W. Effects of Polyphenol-Rich Extract from Berries of Aronia Melanocarpa on the Markers of Oxidative Stress and Blood Platelet Activation. *Platelets* **2010**, *21*, 274–281, doi:10.3109/09537101003612821.
106. Tolić, M.-T.; Landeka Jurčević, I.; Panjkota Krbavčić, I.; Marković, K.; Vahčić, N. Phenolic Content, Antioxidant Capacity and Quality of Chokeberry (Aronia Melanocarpa) Products. *Food Technol. Biotechnol.* **2015**, *53*, doi:10.17113/ftb.53.02.15.3833.
107. Zielińska, A.; Siudem, P.; Paradowska, K.; Gralec, M.; Kaźmierski, S.; Wawer, I. Aronia Melanocarpa Fruits as a Rich Dietary Source of Chlorogenic Acids and Anthocyanins: ¹H-NMR, HPLC-DAD, and Chemometric Studies. *Molecules* **2020**, *25*, 3234, doi:10.3390/molecules25143234.
108. Bräunlich, M.; Slimestad, R.; Wangensteen, H.; Brede, C.; Malterud, K.; Barsett, H. Extracts, Anthocyanins and Procyanidins from Aronia Melanocarpa as Radical Scavengers and Enzyme Inhibitors. *Nutrients* **2013**, *5*, 663–678, doi:10.3390/nu5030663.
109. Hodgson, E. Toxins and Venoms. In; 2012; pp. 373–415.
110. Gardana, C.; Ciappellano, S.; Marinoni, L.; Fachechi, C.; Simonetti, P. Bilberry Adulteration: Identification and Chemical Profiling of Anthocyanins by Different Analytical Methods. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 10998–11004, doi:10.1021/jf504078v.
111. Gafner, S. Bilberry Fruit Extract Laboratory Guidance Document Available online: <http://cms.herbalgram.org/BAP/LGD/BilberryLabGuidanceDocument.html?ts=1588166917&signature=36fa423f3dcc4ee7a100056291907f4d> (accessed on 25 April 2020).
112. An, J.; Moon, J.-C.; Kim, J.H.; Kim, G.S.; Jang, C.S. Development of DNA-Based Species-Specific Real-Time PCR Markers for Four Berry Fruits and Their Application in Commercial Berry Fruit Foods. *Appl. Biol. Chem.* **2019**, *62*, 10, doi:10.1186/s13765-019-0413-9.
113. Botanical dermatology database Zygophyllaceae Available online: <https://www.botanical-dermatology-database.info/BotDermFolder/ZYGOPHYLLACEAE.html#Tribulus terrestris> (accessed on 5 March 2024).
114. CABI Tribulus Terrestris (Puncture Vine) Available online: <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/10.1079/cabicompendium.54447> (accessed on 5 March 2024).
115. Chhatre, S.; Nesari, T.; Kanchan, D.; Somani, G.; Sathaye, S. Phytopharmacological Overview of Tribulus Terrestris. *Pharmacogn. Rev.* **2014**, *8*, 45, doi:10.4103/0973-7847.125530.
116. Babin Zub, Tribulus Terrestris Available online: <https://www.plantea.com.hr/babin-zub/> (accessed on 5 February 2024).
117. Zhu, W.; Du, Y.; Meng, H.; Dong, Y.; Li, L. A Review of Traditional Pharmacological Uses, Phytochemistry, and Pharmacological Activities of Tribulus Terrestris. *Chem. Cent. J.* **2017**, *11*, 60, doi:10.1186/s13065-017-0289-x.
118. Bhutani, S.P.; Chibber, S.S.; Seshadri, T.R. Flavonoids of the Fruits and Leaves of Tribulus Terrestris: Constitution of Tribuloside. *Phytochemistry* **1969**, *8*, 299–303, doi:10.1016/S0031-9422(00)85828-8.

119. Wu, T.-S.; Shi, L.-S.; Kuo, S.-C. Alkaloids and Other Constituents from *Tribulus Terrestris*. *Phytochemistry* **1999**, *50*, 1411–1415, doi:10.1016/S0031-9422(97)01086-8.
120. Kostova, I.; Dinchev, D. Saponins in *Tribulus Terrestris* – Chemistry and Bioactivity. *Phytochem. Rev.* **2005**, *4*, 111–137, doi:10.1007/s11101-005-2833-x.
121. Usman, H.; Abdulrahman, F.I.; A.A, L. Phytochemical and Antimicrobial Evaluation of *Tribulus Terrestris* L. (Zygophyllaceae). Growing in Nigeria. *Res. J. Biol. Sci.* **2007**, *2*.
122. Xu, Y.-J.; Xu, T.-H.; Zhou, H.-O.; Li, B.; Xie, S.-X.; Si, Y.-S.; Liu, Y.; Liu, T.-H.; Xu, D.-M. Two New Furostanol Saponins from *Tribulus Terrestris*. *J. Asian Nat. Prod. Res.* **2010**, *12*, 349–354, doi:10.1080/10286021003747458.
123. Adaikan, P.G.; Gauthaman, K.; Prasad, R.N.; Ng, S.C. Proerectile Pharmacological Effects of *Tribulus Terrestris* Extract on the Rabbit Corpus Cavernosum. *Ann. Acad. Med. Singapore* **2000**, *29*, 22–26.
124. Rogerson, S.; Riches, C.J.; Jennings, C.; Weatherby, R.P.; Meir, R.A.; Marshall-Gradisnik, S.M. The Effect of Five Weeks of *Tribulus Terrestris* Supplementation on Muscle Strength and Body Composition During Preseason Training in Elite Rugby League Players. *J. Strength Cond. Res.* **2007**, *21*, 348, doi:10.1519/R-18395.1.
125. Pokrywka, A.; Morawin, B.; Krzywański, J.; Zembroń-Lacny, A. An Overview on *Tribulus Terrestris* in Sports Nutrition and Energy Regulation. In *Sustained Energy for Enhanced Human Functions and Activity*; Elsevier, 2017; pp. 155–165.
126. Neychev, V.; Mitev, V. Pro-Sexual and Androgen Enhancing Effects of *Tribulus Terrestris* L.: Fact or Fiction. *J. Ethnopharmacol.* **2016**, *179*, 345–355, doi:10.1016/j.jep.2015.12.055.
127. Gauthaman, K.; Ganesan, A.P. The Hormonal Effects of *Tribulus Terrestris* and Its Role in the Management of Male Erectile Dysfunction – an Evaluation Using Primates, Rabbit and Rat. *Phytomedicine* **2008**, *15*, 44–54, doi:10.1016/j.phymed.2007.11.011.
128. Fernández-Lázaro, D.; Fernandez-Lazaro, C.; Seco-Calvo, J.; Garrosa, E.; Adams, D.; Mielgo-Ayuso, J. Effects of *Tribulus Terrestris* L. on Sport and Health Biomarkers in Physically Active Adult Males: A Systematic Review. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2022**, *19*, 9533, doi:10.3390/ijerph19159533.
129. Dinchev, D.; Janda, B.; Evstatieva, L.; Oleszek, W.; Aslani, M.R.; Kostova, I. Distribution of Steroidal Saponins in *Tribulus Terrestris* from Different Geographical Regions. *Phytochemistry* **2008**, *69*, 176–186, doi:10.1016/j.phytochem.2007.07.003.
130. Champagne, A.B.; Emmel, K. V. Rapid Screening Test for Adulteration in Raw Materials of Dietary Supplements. *Vib. Spectrosc.* **2011**, *55*, 216–223, doi:10.1016/j.vibspec.2010.11.009.
131. Jiru, M.; Stranska-Zachariasova, M.; Dzuman, Z.; Hurkova, K.; Tomaniova, M.; Stepan, R.; Cuhra, P.; Hajslova, J. Analysis of Phosphodiesterase Type 5 Inhibitors as Possible Adulterants of Botanical-Based Dietary Supplements: Extensive Survey of Preparations Available at the Czech Market. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2019**, *164*, 713–724, doi:10.1016/j.jpba.2018.11.007.
132. Deconinck, E.; Vanhamme, M.; Bothy, J.L.; Courselle, P. A Strategy Based on Fingerprinting and Chemometrics for the Detection of Regulated Plants in Plant Food Supplements from the Belgian Market: Two Case Studies. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2019**, *166*, 189–196, doi:10.1016/j.jpba.2019.01.015.
133. Pandit, R.; Travadi, T.; Sharma, S.; Joshi, C.; Joshi, M. DNA Meta-barcoding Using RbcL Based Mini-barcode Revealed Presence of Unspecified Plant Species in Ayurvedic Polyherbal Formulations. *Phytochem. Anal.* **2021**, *32*, 804–810, doi:10.1002/pca.3026.
134. Viana, C.; Marcon, G.Z.; Dal Molin, T.R.; Bohrer, D.; do Nascimento, P.C.; de Carvalho, L.M. Simultaneous Analysis of Sexual Stimulants and Anabolic Steroids as Adulterants in Dietary Supplements by High Performance Liquid Chromatography with Photodiode Array Detection. *Curr. Pharm. Anal.* **2021**, *17*, 767–773, doi:10.2174/1573412916999200415175325.

135. Cooper, J.W.; Denston, T.C. *A Textbook of Pharmacognosy*; Sir I. Pitman & sons, Limited, 1931;
136. Upton, R. Goldenseal Root Monograph and Therapeutic Compendium. *Am. Herb. Pharmacopoeia* **2001**, 36.
137. Upton, R.; David, B.; Gafner, S.; Glasl, S. Botanical Ingredient Identification and Quality Assessment: Strengths and Limitations of Analytical Techniques. *Phytochem. Rev.* **2020**, *19*, 1157–1177, doi:10.1007/s11101-019-09625-z.
138. American Botanical Council (ABC) Bulletin on Adulteration of Saffron and Saffron Extracts Published by ABC-AHP-NCNPR Botanical Adulterants Prevention Program Available online: <https://www.herbalgram.org/news/press-releases/2022/bulletin-on-saffron-published-by-botanical-adulterants-prevention-program/%0A10.1255/mrfs.3%0A> (accessed on 5 March 2024).
139. Alain, M.; Antoon, L.; Valentina, P.; Georgios, K.; Linda, G.; Sergej, P.; Danilo, P.; Tereza, Z.; Ana, B.; et al. Results of an EU Wide Coordinated Control Plan to Establish the Prevalence of Fraudulent Practices in the Marketing of Herbs and Spices. **2021**, doi:10.2760/309557 (online).
140. Bejar, E. Adulteration of Turmeric (*Curcuma Longa*) Root and Rhizome, and Root and Rhizome Extracts. **2018**.
141. Penman, K.G.; Halstead, C.W.; Matthias, A.; De Voss, J.J.; Stuthe, J.M.U.; Bone, K.M.; Lehmann, R.P. Bilberry Adulteration Using the Food Dye Amaranth. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 7378–7382, doi:10.1021/jf061387d.
142. Mailer, R.; Gafner, S. Adulteration of Olive (*Olea Europaea*) Oil. **2020**.
143. Hurkova, K.; Rubert, J.; Stranska-Zachariasova, M.; Hajslova, J. Strategies to Document Adulteration of Food Supplement Based on Sea Buckthorn Oil: A Case Study. *Food Anal. Methods* **2017**, *10*, 1317–1327, doi:10.1007/s12161-016-0674-4.
144. Jiménez-Carvelo, A.M.; Tonolini, M.; McAleer, O.; Cuadros-Rodríguez, L.; Granato, D.; Koidis, A. Multivariate Approach for the Authentication of Vanilla Using Infrared and Raman Spectroscopy. *Food Res. Int.* **2021**, *141*, 110196, doi:10.1016/j.foodres.2021.110196.
145. Schipilliti, L.; Bonaccorsi, I.L.; Mondello, L. Characterization of Natural Vanilla Flavour in Foodstuff by HS-SPME and GC-C-IRMS. *Flavour Fragr. J.* **2017**, *32*, 85–91, doi:10.1002/ffj.3364.
146. Geißler, K.; Greule, M.; Schäfer, U.; Hans, J.; Geißler, T.; Meier, L.; Keppler, F.; Krammer, G. Vanilla Authenticity Control by DNA Barcoding and Isotope Data Aggregation. *Flavour Fragr. J.* **2017**, *32*, 228–237, doi:10.1002/ffj.3379.
147. Thomas, J.; Kuruvilla, K.M. Cinnamon. In *Handbook of Herbs and Spices*; Elsevier, 2012; pp. 182–196.
148. Murphy, B.J.; Carlson, R.E.; Howa, J.D.; Wilson, T.M.; Buch, R.M. Determining the Authenticity of Methyl Salicylate in *Gaultheria Procumbens* L. and *Betula Lenta* L. Essential Oils Using Isotope Ratio Mass Spectrometry. *J. Essent. Oil Res.* **2021**, *33*, 442–451, doi:10.1080/10412905.2021.1925362.
149. Cuchet, A.; Jame, P.; Anchisi, A.; Schiets, F.; Oberlin, C.; Lefèvre, J.-C.; Carénini, E.; Casabianca, H. Authentication of the Naturalness of Wintergreen (*Gaultheria* Genus) Essential Oils by Gas Chromatography, Isotope Ratio Mass Spectrometry and Radiocarbon Assessment. *Ind. Crops Prod.* **2019**, *142*, 111873, doi:10.1016/j.indcrop.2019.111873.
150. Do, T.K.T.; Hadji-Minaglou, F.; Antoniotti, S.; Fernandez, X. Authenticity of Essential Oils. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2015**, *66*, 146–157, doi:10.1016/j.trac.2014.10.007.
151. *Handbook of Essential Oils*; Baser, K.H.C., Buchbauer, G., Eds.; CRC Press, 2015; ISBN 9780429155666.

152. MP: Factory Making Fake Asafoetida Busted in Indore Available online: <https://theprint.in/india/mp-factory-making-fake-asafoetida-busted-in-indore/821951/> (accessed on 5 March 2024).
153. Sasikumar, B.; Swetha, V.P.; Parvathy, V.A.; Sheeja, T.E. Advances in Adulteration and Authenticity Testing of Herbs and Spices. In *Advances in Food Authenticity Testing*; Elsevier, 2016; pp. 585–624.
154. Simmler, C.; Graham, J.G.; Chen, S.-N.; Pauli, G.F. Integrated Analytical Assets Aid Botanical Authenticity and Adulteration Management. *Fitoterapia* **2018**, *129*, 401–414, doi:10.1016/j.fitote.2017.11.017.
155. Zhao, Z.; Liang, Z.; Ping, G. Macroscopic Identification of Chinese Medicinal Materials: Traditional Experiences and Modern Understanding. *J. Ethnopharmacol.* **2011**, *134*, 556–564, doi:10.1016/j.jep.2011.01.018.
156. Kadam, P. V; Yadav, K.N.; Patel, F.A.; Karjekar, F.A.; Patil, M.J. pharmacognostic, phytochemical and physicochemical studies of piper nigrum linn. Fruit (piperaceae). *Int. Res. J. Pharm.* **2013**, *4*, 189–193, doi:10.7897/2230-8407.04538.
157. Jürges, G.; Beyerle, K.; Tossenberger, M.; Häser, A.; Nick, P. Development and Validation of Microscopical Diagnostics for ‘Tulsi’ (*Ocimum Tenuiflorum* L.) in Ayurvedic Preparations. *Eur. Food Res. Technol.* **2009**, *229*, 99–106, doi:10.1007/s00217-009-1030-3.
158. Ichim, M.C.; Häser, A.; Nick, P. Microscopic Authentication of Commercial Herbal Products in the Globalized Market: Potential and Limitations. *Front. Pharmacol.* **2020**, *11*, doi:10.3389/fphar.2020.00876.
159. Microscopic Authenticity and Purity of Herbs and Spices Available online: <https://www.eurofins.de/food-analysis/food-news/food-testing-news/microscopic-authenticity-and-purity-of-herbs-and-spices/> (accessed on 5 February 2024).
160. Kiran, U.; Khan, S.; Mirza, K.J.; Ram, M.; Abdin, M.Z. SCAR Markers: A Potential Tool for Authentication of Herbal Drugs. *Fitoterapia* **2010**, *81*, 969–976, doi:10.1016/j.fitote.2010.08.002.
161. Paran, I.; Michelmores, R.W. Development of Reliable PCR-Based Markers Linked to Downy Mildew Resistance Genes in Lettuce. *Theor. Appl. Genet.* **1993**, *85*, 985–993, doi:10.1007/BF00215038.
162. El-Haggag, M.A.; Mahgoub, Y.A.; Aly, H.M.; Ghazy, N.M.; El-Fiky, F.K.; El-Hawiet, A.M. DNA Barcodes, ISSR, RAPD and SCAR Markers as Potential Quality Control Tools for Molecular Authentication of Black and White Mulberry. *Food Control* **2023**, *152*, 109821, doi:10.1016/j.foodcont.2023.109821.
163. Muzila, M.; Werlemark, G.; Ortiz, R.; Sehic, J.; Fatih, M.; Setshogo, M.; Mpoloka, W.; Nybom, H. Assessment of Diversity in Harpagophytum with RAPD and ISSR Markers Provides Evidence of Introgression. *Heredity* **2014**, *151*, 91–101, doi:10.1111/hrd2.00052.
164. Gresta, F.; Lombardo, G.M.; Siracusa, L.; Ruberto, G. Saffron, an Alternative Crop for Sustainable Agricultural Systems. A Review. *Agron. Sustain. Dev.* **2008**, *28*, 95–112, doi:10.1051/agro:2007030.
165. Hebert, P.D.N.; Cywinska, A.; Ball, S.L.; DeWaard, J.R. Biological Identifications through DNA Barcodes. *Proc. R. Soc. London. Ser. B Biol. Sci.* **2003**, *270*, 313–321, doi:10.1098/rspb.2002.2218.
166. Galimberti, A.; De Mattia, F.; Losa, A.; Bruni, I.; Federici, S.; Casiraghi, M.; Martellos, S.; Labra, M. DNA Barcoding as a New Tool for Food Traceability. *Food Res. Int.* **2013**, *50*, 55–63, doi:10.1016/j.foodres.2012.09.036.
167. Burns, M.; Wiseman, G.; Knight, A.; Bramley, P.; Foster, L.; Rollinson, S.; Damant, A.; Primrose, S. Measurement Issues Associated with Quantitative Molecular Biology Analysis of Complex Food Matrices for the Detection of Food Fraud. *Analyst* **2016**, *141*, 45–61,

doi:10.1039/C5AN01392E.

168. Osman, A.G.; Raman, V.; Haider, S.; Ali, Z.; Chittiboyina, A.G.; Khan, I.A. Overview of Analytical Tools for the Identification of Adulterants in Commonly Traded Herbs and Spices. *J. AOAC Int.* **2019**, *102*, 376–385, doi:10.5740/jaoacint.18-0389.
169. Wagner, C.; Sefkow, M.; Kopka, J. Construction and Application of a Mass Spectral and Retention Time Index Database Generated from Plant GC/EI-TOF-MS Metabolite Profiles. *Phytochemistry* **2003**, *62*, 887–900, doi:10.1016/S0031-9422(02)00703-3.
170. Fiehn, O.; Kopka, J.; Trethewey, R.N.; Willmitzer, L. Identification of Uncommon Plant Metabolites Based on Calculation of Elemental Compositions Using Gas Chromatography and Quadrupole Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 3573–3580, doi:10.1021/ac991142i.
171. Siano, F.; Vasca, E. GC-FID Analysis to Evaluate the Possible Adulteration of Extra Virgin Olive Oil with Different Vegetable Oils. *J. Chem. Educ.* **2020**, *97*, 4108–4116, doi:10.1021/acs.jchemed.0c00278.
172. Pravilnik o Kvalitetu i Drugim Zahtevima Za Jestivo Maslinovo Ulje i Jestivo Ulje Komine Masline Available online: <https://www.tehnologijahrane.com/pravilnik/pravilnik-o-kvalitetu-za-maslinovo-ulje> (accessed on 5 March 2024).
173. Flores, G.; Ruiz del Castillo, M.L.; Blanch, G.P.; Herraiz, M. Detection of the Adulteration of Olive Oils by Solid Phase Microextraction and Multidimensional Gas Chromatography. *Food Chem.* **2006**, *97*, 336–342, doi:10.1016/j.foodchem.2005.04.021.
174. Milosavljević, S. *Strukturne Instrumentalne Metode*; Univerzitet u Beogradu - Hemijski fakultet, 2014; ISBN 978-66-7220-066-9.
175. C. Moldoveanu, S.; David, V. Derivatization Methods in GC and GC/MS. In *Gas Chromatography - Derivatization, Sample Preparation, Application*; IntechOpen, 2019.
176. Krishnan, P. Metabolite Fingerprinting and Profiling in Plants Using NMR. *J. Exp. Bot.* **2004**, *56*, 255–265, doi:10.1093/jxb/eri010.
177. Shuman, J.L.; Cortes, D.F.; Armenta, J.M.; Pokrzywa, R.M.; Mendes, P.; Shulaev, V. Plant Metabolomics by GC-MS and Differential Analysis. In; 2011; pp. 229–246.
178. Miyagawa, H.; Bamba, T. Comparison of Sequential Derivatization with Concurrent Methods for GC/MS-Based Metabolomics. *J. Biosci. Bioeng.* **2019**, *127*, 160–168, doi:10.1016/j.jbiosc.2018.07.015.
179. Ruiz-Matute, A.I.; Hernández-Hernández, O.; Rodríguez-Sánchez, S.; Sanz, M.L.; Martínez-Castro, I. Derivatization of Carbohydrates for GC and GC–MS Analyses. *J. Chromatogr. B* **2011**, *879*, 1226–1240, doi:10.1016/j.jchromb.2010.11.013.
180. Verpoorte, R.; Choi, Y.H.; Mustafa, N.R.; Kim, H.K. Metabolomics: Back to Basics. *Phytochem. Rev.* **2008**, *7*, 525–537, doi:10.1007/s11101-008-9091-7.
181. Lisec, J.; Schauer, N.; Kopka, J.; Willmitzer, L.; Fernie, A.R. Gas Chromatography Mass Spectrometry–Based Metabolite Profiling in Plants. *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 387–396, doi:10.1038/nprot.2006.59.
182. Wolfender, J.-L. HPLC in Natural Product Analysis: The Detection Issue. *Planta Med.* **2009**, *75*, 719–734, doi:10.1055/s-0028-1088393.
183. De Vos, R.C.; Moco, S.; Lommen, A.; Keurentjes, J.J.; Bino, R.J.; Hall, R.D. Untargeted Large-Scale Plant Metabolomics Using Liquid Chromatography Coupled to Mass Spectrometry. *Nat. Protoc.* **2007**, *2*, 778–791, doi:10.1038/nprot.2007.95.
184. Valdemiro Alves de Oliveira, L.; Rafael Kleemann, C.; Molognoni, L.; Daguer, H.; Barcellos Hoff, R.; Schwinden Prudencio, E. Reference LC-MS/MS Method to Detect Fresh Cheeses Adulteration with Whey. *Food Res. Int.* **2022**, *156*, 111140, doi:10.1016/j.foodres.2022.111140.
185. Yang, J.; Zheng, N.; Soyeurt, H.; Yang, Y.; Wang, J. Detection of Plant Protein in Adulterated

- Milk Using Nontargeted Nano-high-performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectroscopy Combined with Principal Component Analysis. *Food Sci. Nutr.* **2019**, *7*, 56–64, doi:10.1002/fsn3.791.
186. Sumara, A.; Stachniuk, A.; Trzpil, A.; Bartoszek, A.; Montowska, M.; Fornal, E. LC–MS Metabolomic Profiling of Five Types of Unrefined, Cold-Pressed Seed Oils to Identify Markers to Determine Oil Authenticity and to Test for Oil Adulteration. *Molecules* **2023**, *28*, 4754, doi:10.3390/molecules28124754.
187. Oltulu, Ç.; Çelik, S.; Duman, M. Determination of Sildenafil and Tadalafil Adulteration by LC-MS/MS and 23 Elements by ICP-MS in Food Supplements. *İstanbul J. Pharm.* **2023**, *53*, 219–228, doi:10.26650/IstanbulJPharm.2023.1206425.
188. *Saffron (Crocus Sativus)*; Kafi, M., Koocheki, A., Rashed, M.H., Nassiri, M., Eds.; CRC Press, 2006; ISBN 9781482280463.
189. Martinello, M.; Stella, R.; Baggio, A.; Biancotto, G.; Mutinelli, F. LC-HRMS-Based Non-Targeted Metabolomics for the Assessment of Honey Adulteration with Sugar Syrups: A Preliminary Study. *Metabolites* **2022**, *12*, 985, doi:10.3390/metabo12100985.
190. Wang, Y.; Xi, X.; Wang, L.; Chen, Y. HPTLC-Bioluminescent Bioautography Screening of Herbal Teas for Adulteration with Hypolipidemic Drugs. *Biosensors* **2023**, *13*, 392, doi:10.3390/bios13030392.
191. Heck, C.I.; De Mejia, E.G. Yerba Mate Tea (*Ilex Paraguariensis*): A Comprehensive Review on Chemistry, Health Implications, and Technological Considerations. *J. Food Sci.* **2007**, *72*, doi:10.1111/j.1750-3841.2007.00535.x.
192. Frommenwiler, D.; Kim, J.; Yook, C.-S.; Tran, T.; Cañigueral, S.; Reich, E. Comprehensive HPTLC Fingerprinting for Quality Control of an Herbal Drug – The Case of Angelica Gigas Root. *Planta Med.* **2018**, *84*, 465–474, doi:10.1055/a-0575-4425.
193. Negi, A.; Pare, A.; Meenatchi, R. Emerging Techniques for Adulterant Authentication in Spices and Spice Products. *Food Control* **2021**, *127*, 108113, doi:10.1016/j.foodcont.2021.108113.
194. Gafner, S. Bilberry Fruit Extract Botanical Adulterants Bulletin. *Bot. adulterants Bull.* **2016**.
195. Ristivojević, P.; Trifković, J.; Stanković, D.M.; Radoičić, A.; Manojlović, D.; Milojković-Opsenica, D. Cyclic Voltammetry and UV/Vis Spectroscopy in Combination with Multivariate Data Analysis for the Assessment of Authenticity of Poplar Type Propolis. *J. Apic. Res.* **2017**, *56*, 559–568, doi:10.1080/00218839.2017.1357217.
196. Power, A.C.; Chapman, J.; Chandra, S.; Cozzolino, D. Ultraviolet-Visible Spectroscopy for Food Quality Analysis. In *Evaluation Technologies for Food Quality*; Elsevier, 2019; pp. 91–104.
197. Sivakesava, S.; Irudayaraj, J. Rapid Determination of Tetracycline in Milk by FT-MIR and FT-NIR Spectroscopy. *J. Dairy Sci.* **2002**, *85*, 487–493, doi:10.3168/jds.S0022-0302(02)74099-X.
198. Lohumi, S.; Lee, H.; Kim, M.; Qin, J.; Cho, B.-K. Raman Imaging for the Detection of Adulterants in Paprika Powder: A Comparison of Data Analysis Methods. *Appl. Sci.* **2018**, *8*, 485, doi:10.3390/app8040485.
199. Choi, Y.H.; Kim, H.K.; Linthorst, H.J.M.; Hollander, J.G.; Lefeber, A.W.M.; Erkelens, C.; Nuzillard, J.-M.; Verpoorte, R. NMR Metabolomics to Revisit the Tobacco Mosaic Virus Infection in *Nicotiana glauca* Leaves. *J. Nat. Prod.* **2006**, *69*, 742–748, doi:10.1021/np050535b.
200. Kim, H.K.; Choi, Y.H.; Verpoorte, R. NMR-Based Metabolomic Analysis of Plants. *Nat. Protoc.* **2010**, *5*, 536–549, doi:10.1038/nprot.2009.237.
201. Kovacs, H.; Moskau, D.; Spraul, M. Cryogenically Cooled Probes—a Leap in NMR

- Technology. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2005**, *46*, 131–155, doi:10.1016/j.pnmrs.2005.03.001.
202. Verpoorte, R.; Choi, Y.H.; Kim, H.K. NMR-Based Metabolomics at Work in Phytochemistry. *Phytochem. Rev.* **2007**, *6*, 3–14, doi:10.1007/s11101-006-9031-3.
203. McKay, R.T. Chapter 2 Recent Advances in Solvent Suppression for Solution NMR: A Practical Reference. In; 2009; pp. 33–76.
204. Stark, P.; Zab, C.; Porzel, A.; Franke, K.; Rizzo, P.; Wessjohann, L.A. PSYCHE—A Valuable Experiment in Plant NMR-Metabolomics. *Molecules* **2020**, *25*, 5125, doi:10.3390/molecules25215125.
205. Spiteri, M.; Rogers, K.M.; Jamin, E.; Thomas, F.; Guyader, S.; Lees, M.; Rutledge, D.N. Combination of ¹H NMR and Chemometrics to Discriminate Manuka Honey from Other Floral Honey Types from Oceania. *Food Chem.* **2017**, *217*, 766–772, doi:10.1016/j.foodchem.2016.09.027.
206. Monakhova, Y.B.; Ruge, W.; Kuballa, T.; Ilse, M.; Winkelmann, O.; Diehl, B.; Thomas, F.; Lachenmeier, D.W. Rapid Approach to Identify the Presence of Arabica and Robusta Species in Coffee Using ¹H NMR Spectroscopy. *Food Chem.* **2015**, *182*, 178–184, doi:10.1016/j.foodchem.2015.02.132.
207. Sobolev, A.P.; Thomas, F.; Donarski, J.; Ingallina, C.; Circi, S.; Cesare Marincola, F.; Capitani, D.; Mannina, L. Use of NMR Applications to Tackle Future Food Fraud Issues. *Trends Food Sci. Technol.* **2019**, *91*, 347–353, doi:10.1016/j.tifs.2019.07.035.
208. Bruker Using NMR to Assist in Identifying Food Adulteration and Contamination Available online: <https://www.bruker.com/en/resources/library/application-notes-mr/using-nmr-to-assist-in-identifying-food-adulteration-and-contamination.html> (accessed on 5 March 2024).
209. Juice-Profiling (NMR) Available online: <https://www.bruker.com/en/products-and-solutions/mr/nmr-food-solutions/juice-profiling1.html> (accessed on 5 March 2024).
210. Wine Profiling Available online: <https://www.bruker.com/en/products-and-solutions/mr/nmr-food-solutions/wine-profiling0.html> (accessed on 5 March 2024).
211. Nicholson, J.K.; Connelly, J.; Lindon, J.C.; Holmes, E. Metabonomics: A Platform for Studying Drug Toxicity and Gene Function. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2002**, *1*, 153–161, doi:10.1038/nrd728.
212. Slutsky, B. Chemometrics: A Practical Guide By Kenneth R. Beebe, Randy J. Pell, and Mary Beth Seasholtz. Wiley-Interscience Series on Laboratory Automation. John Wiley & Sons: New York, 1998. Xi + 348 Pp. ISBN 0-471-12451-6. \$69.95. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **1998**, *38*, 1254–1254, doi:10.1021/ci980426l.
213. Robertson, D.G. Metabonomics in Toxicology: A Review. *Toxicol. Sci.* **2005**, *85*, 809–822, doi:10.1093/toxsci/kfi102.
214. Ivanović, S.; Simić, K.; Tešević, V.; Vujisić, L.; Ljekočević, M.; Gođevac, D. GC-FID-MS Based Metabolomics to Assess Plum Brandy Quality. *Molecules* **2021**, *26*, 1391, doi:10.3390/molecules26051391.
215. Gođevac, D.; Ivanović, S.; Simić, K.; Anđelković, B.; Jovanović, Ž.; Rakić, T. Metabolomics Study of the Desiccation and Recovery Process in the Resurrection Plants <sc> *Ramonda Serbica* </Sc> and <sc> *R. Nathaliae* </Sc>. *Phytochem. Anal.* **2022**, *33*, 961–970, doi:10.1002/pca.3151.
216. Anđelković, B.; Vujisić, L.; Vučković, I.; Tešević, V.; Vajs, V.; Gođevac, D. Metabolomics Study of Populus Type Propolis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2017**, *135*, 217–226, doi:10.1016/j.jpba.2016.12.003.
217. Salomé-Abarca, L.F.; Gođevac, D.; Kim, M.S.; Hwang, G.-S.; Park, S.C.; Jang, Y.P.; Van Den Hondel, C.A.M.J.J.; Verpoorte, R.; Klinkhamer, P.G.L.; Choi, Y.H. Latex Metabolome of

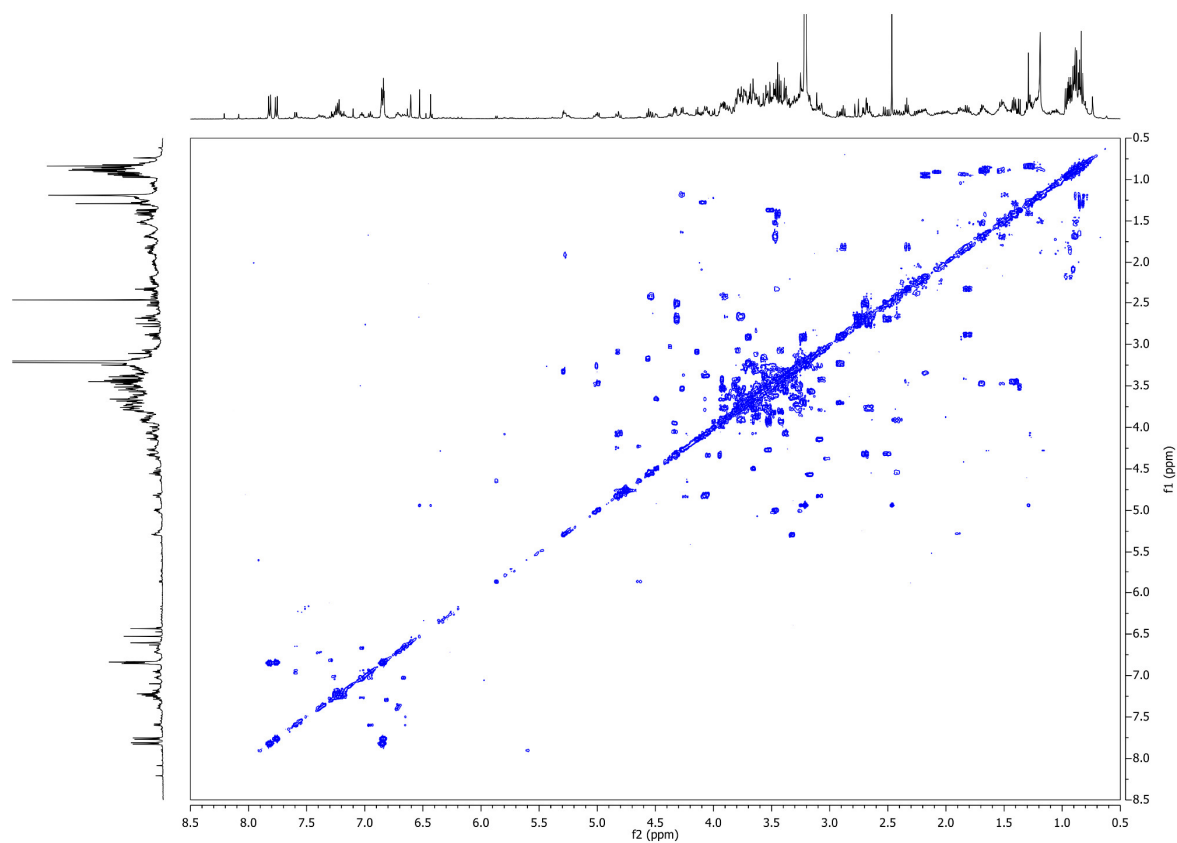
- Euphorbia Species: Geographical and Inter-Species Variation and Its Proposed Role in Plant Defense against Herbivores and Pathogens. *J. Chem. Ecol.* **2021**, *47*, 564–576, doi:10.1007/s10886-021-01274-x.
218. Sofrenić, I.; Anđelković, B.; Gođevac, D.; Ivanović, S.; Simić, K.; Ljujić, J.; Tešević, V.; Milosavljević, S. Metabolomics as a Potential Chemotaxonomical Tool: Application on the Selected Euphorbia Species Growing Wild in Serbia. *Plants* **2023**, *12*, 262, doi:10.3390/plants12020262.
219. Jayaprakasha, G.K.; Patil, B.S. A Metabolomics Approach to Identify and Quantify the Phytochemicals in Watermelons by Quantitative ¹H-NMR. *Talanta* **2016**, *153*, 268–277, doi:10.1016/j.talanta.2016.02.060.
220. Cagliani, L.R.; Pellegrino, G.; Giugno, G.; Consonni, R. Quantification of Coffea Arabica and Coffea Canephora Var. Robusta in Roasted and Ground Coffee Blends. *Talanta* **2013**, *106*, 169–173, doi:10.1016/j.talanta.2012.12.003.
221. Turbitt, J.R.; Colson, K.L.; Killday, K.B.; Milstead, A.; Neto, C.C. Application of ¹H-NMR-based Metabolomics to the Analysis of Cranberry (Vaccinium Macrocarpon) Supplements. *Phytochem. Anal.* **2020**, *31*, 68–80, doi:10.1002/pca.2867.
222. Farag, M.A.; El Senousy, A.S.; El-Ahmady, S.H.; Porzel, A.; Wessjohann, L.A. Comparative Metabolome-Based Classification of Senna Drugs: A Prospect for Phyto-Equivalency of Its Different Commercial Products. *Metabolomics* **2019**, *15*, 80, doi:10.1007/s11306-019-1538-x.
223. Slutsky, B. Chemometrics: A Practical Guide By Kenneth R. Beebe, Randy J. Pell, and Mary Beth Seasholtz. Wiley-Interscience Series on Laboratory Automation. John Wiley & Sons: New York, 1998. Xi + 348 Pp. ISBN 0-471-12451-6. \$69.95. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **1998**, *38*, 1254, doi:10.1021/ci980426l.
224. Anđelković, B. Primena Rezultata NMR i FTIR Spektroskopskih Tehnika u Multivarijantnoj Analizi Za Klasifikaciju Propolisa, Univerzitet u Beogradu, 2017.
225. Ljekočević, M. Optimizacija Tehnološkog Procesa Proizvodnje Prepečenice Od Šljivovog Vina Tipa Pruvina, Univerzitet u Beogradu, 2019.
226. Wiklund, S.; Johansson, E.; Sjöström, L.; Mellerowicz, E.J.; Edlund, U.; Shockcor, J.P.; Gottfries, J.; Moritz, T.; Trygg, J. Visualization of GC/TOF-MS-Based Metabolomics Data for Identification of Biochemically Interesting Compounds Using OPLS Class Models. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 115–122, doi:10.1021/ac0713510.
227. Fiehn, O. Combining Genomics, Metabolome Analysis, and Biochemical Modelling to Understand Metabolic Networks. *Comp. Funct. Genomics* **2001**, *2*, 155–168, doi:10.1002/cfg.82.
228. Viant, M.R.; Ludwig, C.; Günther, U.L. 1D and 2D NMR Spectroscopy: From Metabolic Fingerprinting to Profiling. In *Metabolomics, Metabonomics and Metabolite Profiling*; The Royal Society of Chemistry, 2007; pp. 44–70.
229. Pathmasiri, W.; Kay, K.; McRitchie, S.; Sumner, S. Analysis of NMR Metabolomics Data. In; 2020; pp. 61–97.
230. Jacob, D.; Deborde, C.; Lefebvre, M.; Maucourt, M.; Moing, A. NMRProcFlow: A Graphical and Interactive Tool Dedicated to 1D Spectra Processing for NMR-Based Metabolomics. *Metabolomics* **2017**, *13*, 36, doi:10.1007/s11306-017-1178-y.
231. Hemmer, S.; Manier, S.K.; Fischmann, S.; Westphal, F.; Wagmann, L.; Meyer, M.R. Comparison of Three Untargeted Data Processing Workflows for Evaluating LC-HRMS Metabolomics Data. *Metabolites* **2020**, *10*, 378, doi:10.3390/metabo10090378.
232. Tautenhahn, R.; Patti, G.J.; Rinehart, D.; Siuzdak, G. XCMS Online: A Web-Based Platform to Process Untargeted Metabolomic Data. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 5035–5039, doi:10.1021/ac300698c.

233. Zhu, C.; Vitali, B.; Donders, G.; Parolin, C.; Li, Y.; Laghi, L. Univariate Statistical Analysis as a Guide to ¹H-NMR Spectra Signal Assignment by Visual Inspection. *Metabolites* **2019**, *9*, 15, doi:10.3390/metabo9010015.
234. Mansour, G.; Ghanem, C.; Mercenaro, L.; Nassif, N.; Hassoun, G.; Del Caro, A. Effects of Altitude on the Chemical Composition of Grapes and Wine: A Review. *OENO One* **2022**, *56*, 227–239, doi:10.20870/oeno-one.2022.56.1.4895.
235. Owuor, P.O.; Obaga, S.O.; Othieno, C.O. The Effects of Altitude on the Chemical Composition of Black Tea. *J. Sci. Food Agric.* **1990**, *50*, 9–17, doi:10.1002/jsfa.2740500103.
236. Triba, M.N.; Le Moyec, L.; Amathieu, R.; Goossens, C.; Bouchemal, N.; Nahon, P.; Rutledge, D.N.; Savarin, P. PLS/OPLS Models in Metabolomics: The Impact of Permutation of Dataset Rows on the K-Fold Cross-Validation Quality Parameters. *Mol. Biosyst.* **2015**, *11*, 13–19, doi:10.1039/C4MB00414K.
237. Tchoumtchoua, J.; Mathiron, D.; Pontarin, N.; Gagneul, D.; van Bohemen, A.-I.; Ootogo N'ang, E.; Mesnard, F.; Petit, E.; Fontaine, J.-X.; Molinié, R.; et al. Phenolic Profiling of Flax Highlights Contrasting Patterns in Winter and Spring Varieties. *Molecules* **2019**, *24*, 4303, doi:10.3390/molecules24234303.
238. Shie, J.-J.; Chen, C.-A.; Lin, C.-C.; Ku, A.F.; Cheng, T.-J.R.; Fang, J.-M.; Wong, C.-H. Regioselective Synthesis of Di-C-Glycosylflavones Possessing Anti-Inflammation Activities. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 4451, doi:10.1039/c0ob00011f.
239. Mabry, T.J.; Markham, K.R.; Thomas, M.B. *The Systematic Identification of Flavonoids*; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 1970; ISBN 978-3-642-88460-3.
240. Abad-García, B.; Garmón-Lobato, S.; Berrueta, L.A.; Gallo, B.; Vicente, F. On Line Characterization of 58 Phenolic Compounds in Citrus Fruit Juices from Spanish Cultivars by High-Performance Liquid Chromatography with Photodiode-Array Detection Coupled to Electrospray Ionization Triple Quadrupole Mass Spectrometry. *Talanta* **2012**, *99*, 213–224, doi:10.1016/j.talanta.2012.05.042.
241. Abu-Reidah, I.M.; Ali-Shtayeh, M.S.; Jamous, R.M.; Arráez-Román, D.; Segura-Carretero, A. Comprehensive Metabolite Profiling of Arum Palaestinum (Araceae) Leaves by Using Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *Food Res. Int.* **2015**, *70*, 74–86, doi:10.1016/j.foodres.2015.01.023.
242. Brito, A.; Ramirez, J.; Areche, C.; Sepúlveda, B.; Simirgiotis, M. HPLC-UV-MS Profiles of Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Fruits from Three Citrus Species Consumed in Northern Chile. *Molecules* **2014**, *19*, 17400–17421, doi:10.3390/molecules191117400.
243. Silva, D.B.; Turatti, I.C.C.; Gouveia, D.R.; Ernst, M.; Teixeira, S.P.; Lopes, N.P. Mass Spectrometry of Flavonoid Vicenin-2, Based Sunlight Barriers in *Lychnophora* Species. *Sci. Rep.* **2014**, *4*, 4309, doi:10.1038/srep04309.
244. Meng, C.; Liu, R.; Wang, W.; Guo, W.; Ma, H.; Xie, S.; Liu, Y.; Wang, C. Metabolic Profiling Comparison of Isoviteixin in Normal and Kidney Stone Model Rats by Ultra-high-performance Liquid Chromatography Coupled to Quadrupole Time-of-flight Mass Spectrometry. *J. Sep. Sci.* **2020**, *43*, 2363–2379, doi:10.1002/jssc.201901169.
245. FUTAMURA, Y.; KUROKAWA, M.; OBATA, R.; NISHIYAMA, S.; SUGAI, T. Efficient Route to (S)-Azetidine-2-Carboxylic Acid. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2005**, *69*, 1892–1897, doi:10.1271/bbb.69.1892.
246. Farag, M.A.; Porzel, A.; Wessjohann, L.A. Unraveling the Active Hypoglycemic Agent Trigonelline in *Balanites Aegyptiaca* Date Fruit Using Metabolite Fingerprinting by NMR. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2015**, *115*, 383–387, doi:10.1016/j.jpba.2015.08.003.
247. He, M.; Min, J.-W.; Kong, W.-L.; He, X.-H.; Li, J.-X.; Peng, B.-W. A Review on the Pharmacological Effects of Vitexin and Isoviteixin. *Fitoterapia* **2016**, *115*, 74–85, doi:10.1016/j.fitote.2016.09.011.

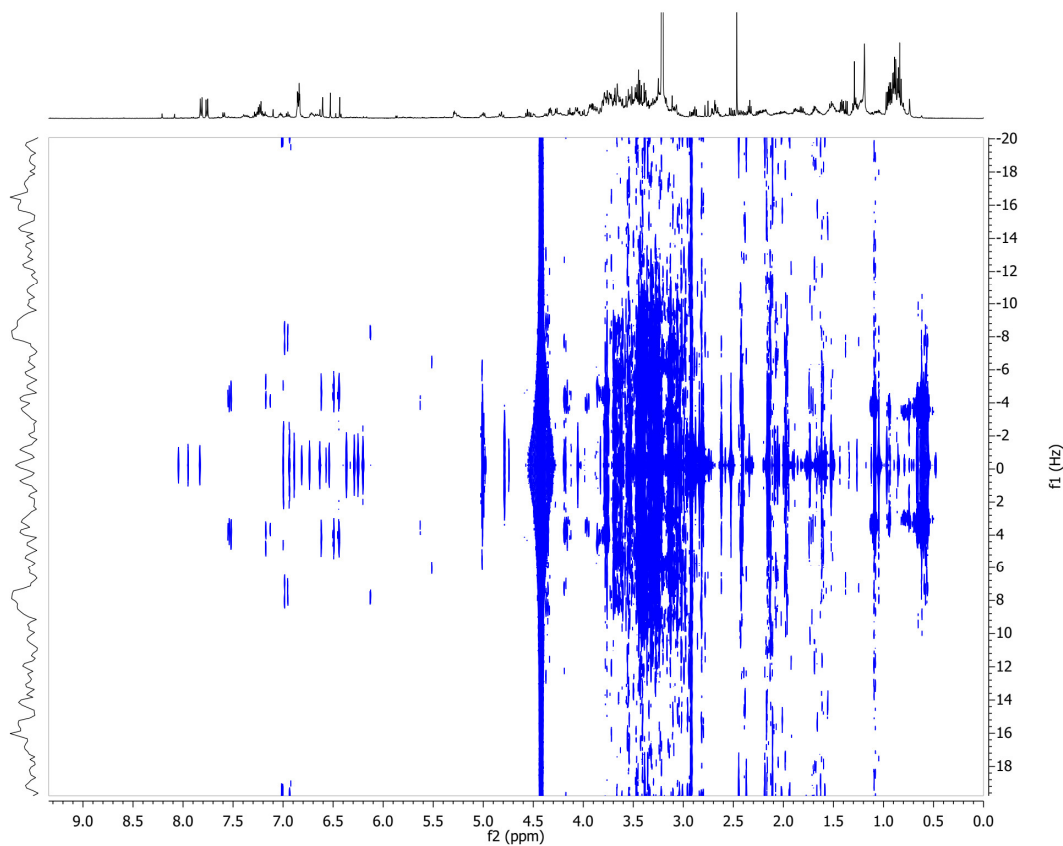
248. Mohamadi, N.; Sharififar, F.; Pournamdari, M.; Ansari, M. A Review on Biosynthesis, Analytical Techniques, and Pharmacological Activities of Trigonelline as a Plant Alkaloid. *J. Diet. Suppl.* **2018**, *15*, 207–222, doi:10.1080/19390211.2017.1329244.
249. Couty, F.; Evano, G. Azetidine-2-Carboxylic Acid. From Lily of the Valley to Key Pharmaceuticals. A Jubilee Review. *Org. Prep. Proced. Int.* **2006**, *38*, 427–465, doi:10.1080/00304940609356436.
250. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products Committee for Veterinary Medicinal Products Convallaria Majalis Summary Report Available online: https://ema.europa.eu/documents/mrl-report/convallaria-majalis-summary-report-committee-veterinary-medicinal-products_en.pdf (accessed on 5 March 2024).
251. Vučković, I.; Rapinoja, M.; Vaismaa, M.; Vanninen, P.; Koskela, H. Application of Comprehensive NMR-based Analysis Strategy in Annotation, Isolation and Structure Elucidation of Low Molecular Weight Metabolites of Ricinus Communis Seeds. *Phytochem. Anal.* **2016**, *27*, 64–72, doi:10.1002/pca.2600.
252. Lopez, J.M.; Leyva, V.; Maruenda, H. Pure Shift Nuclear Magnetic Resonance: A New Tool for Plant Metabolomics. *J. Vis. Exp.* **2021**, doi:10.3791/62719.
253. Bojňanský, V.; Fargašová, A. *Atlas of Seeds and Fruits of Central and East-European Flora*; Springer Netherlands: Dordrecht, 2007; ISBN 978-1-4020-5361-0.
254. Čujić, N.; Šavikin, K.; Janković, T.; Pljevljakušić, D.; Zdunić, G.; Ibrić, S. Optimization of Polyphenols Extraction from Dried Chokeberry Using Maceration as Traditional Technique. *Food Chem.* **2016**, *194*, 135–142, doi:10.1016/j.foodchem.2015.08.008.
255. Wu, X.; Gu, L.; Prior, R.L.; McKay, S. Characterization of Anthocyanins and Proanthocyanidins in Some Cultivars of Ribes, Aronia, and Sambucus and Their Antioxidant Capacity. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 7846–7856, doi:10.1021/jf0486850.
256. Denev, P.; Kratchanova, M.; Petrova, I.; Klisurova, D.; Georgiev, Y.; Ognyanov, M.; Yanakieva, I. Black Chokeberry (Aronia Melanocarpa (Michx.) Elliot) Fruits and Functional Drinks Differ Significantly in Their Chemical Composition and Antioxidant Activity. *J. Chem.* **2018**, *2018*, 1–11, doi:10.1155/2018/9574587.
257. Jerz, G.; Skotzki, T.; Fiege, K.; Winterhalter, P.; Wybraniec, S. Separation of Betalains from Berries of Phytolacca Americana by Ion-Pair High-Speed Counter-Current Chromatography. *J. Chromatogr. A* **2008**, *1190*, 63–73, doi:10.1016/j.chroma.2008.02.093.
258. Meng, X.; Li, Y.; Lu, C.; Zhao, M.; Li, M.; Wang, S.; Zhao, C.; Lin, B.; Shang, L.; Chu, Z.; et al. Purification and Antioxidant Capacity Analysis of Anthocyanin Glucoside Cinnamic Ester Isomers from Solanum Nigrum Fruits. *J. Sep. Sci.* **2020**, *43*, 2311–2320, doi:10.1002/jssc.201901289.
259. Wang, S.; Chu, Z.; Ren, M.; Jia, R.; Zhao, C.; Fei, D.; Su, H.; Fan, X.; Zhang, X.; Li, Y.; et al. Identification of Anthocyanin Composition and Functional Analysis of an Anthocyanin Activator in Solanum Nigrum Fruits. *Molecules* **2017**, *22*, 876, doi:10.3390/molecules22060876.
260. da Silva, R.F.R.; Barreira, J.C.M.; Heleno, S.A.; Barros, L.; Calhella, R.C.; Ferreira, I.C.F.R. Anthocyanin Profile of Elderberry Juice: A Natural-Based Bioactive Colouring Ingredient with Potential Food Application. *Molecules* **2019**, *24*, 2359, doi:10.3390/molecules24132359.
261. Krüger, S.; Mirgos, M.; Morlock, G.E. Effect-Directed Analysis of Fresh and Dried Elderberry (Sambucus Nigra L.) via Hyphenated Planar Chromatography. *J. Chromatogr. A* **2015**, *1426*, 209–219, doi:10.1016/j.chroma.2015.11.021.
262. Szalóki-Dorkó, L.; Stéger-Máté, M.; Abrankó, L. Evaluation of Colouring Ability of Main European Elderberry (Sambucus Nigra L.) Varieties as Potential Resources of Natural Food Colourants. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2015**, *50*, 1317–1323, doi:10.1111/ijfs.12773.
263. Zheng, W.; Wang, F.; Zhao, Y.; Sun, X.; Kang, L.; Fan, Z.; Qiao, L.; Yan, R.; Liu, S.; Ma, B.

- Rapid Characterization of Constituents in Tribulus Terrestris from Different Habitats by UHPLC/Q-TOF MS. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2017**, 28, 2302–2318, doi:10.1007/s13361-017-1761-5.
264. Uysal, S.; Senkardes, I.; Jekő, J.; Cziáky, Z.; Zengin, G. Chemical Characterization and Pharmacological Profile of Tribulus Terrestris Extracts: A Novel Source of Cosmeceuticals and Pharmaceuticals. *Biochem. Syst. Ecol.* **2023**, 107, 104600, doi:10.1016/j.bse.2023.104600.
265. De Combarieu, E.; Fuzzati, N.; Lovati, M.; Mercalli, E. Furostanol Saponins from Tribulus Terrestris. *Fitoterapia* **2003**, 74, 583–591, doi:10.1016/S0367-326X(03)00152-7.
266. Thiers, B. Index Herbariorum: A Global Directory of Public Herbaria and Associated Staff.
267. Ristivojević, P.; Andrić, F.L.; Trifković, J.Đ.; Vovk, I.; Stanisavljević, L.Ž.; Tešić, Ž.L.; Milojković-Opsenica, D.M. Pattern Recognition Methods and Multivariate Image Analysis in HPTLC Fingerprinting of Propolis Extracts. *J. Chemom.* **2014**, 28, 301–310, doi:10.1002/cem.2592.

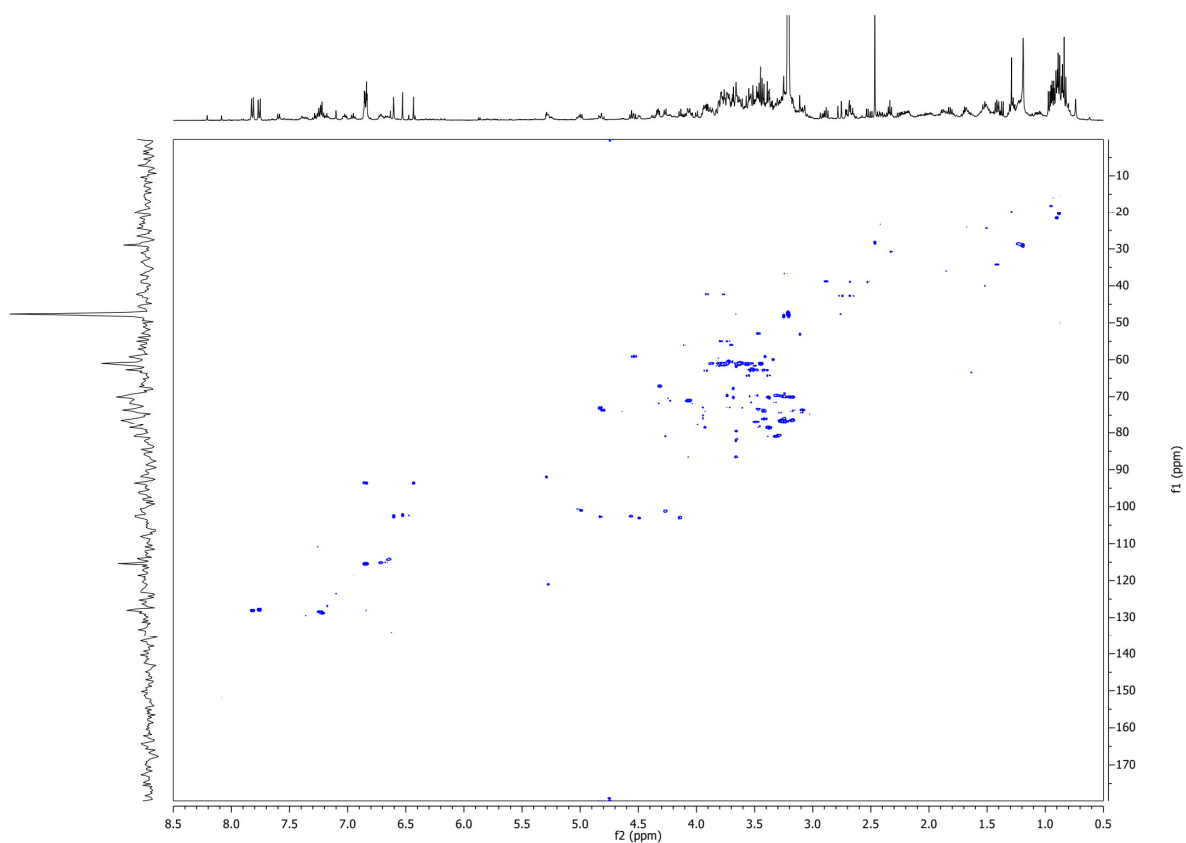
PRILOZI



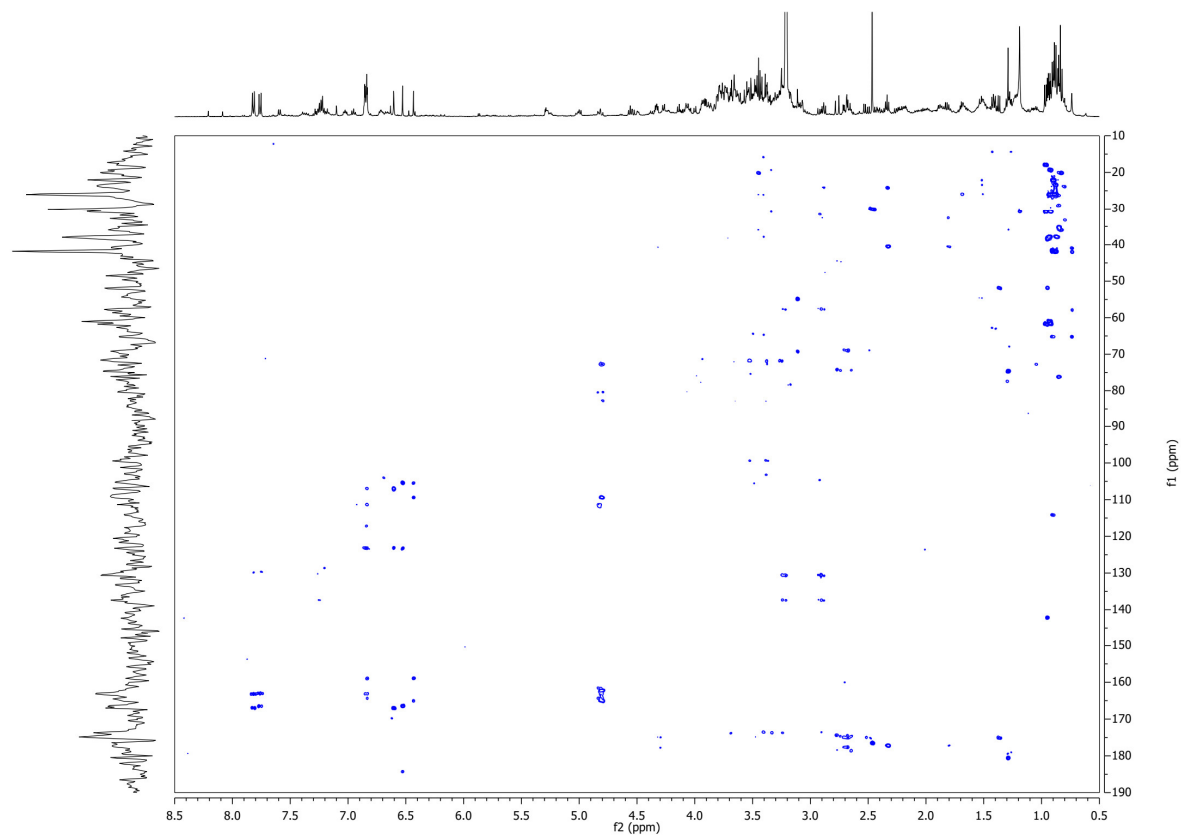
Prilog 1. COSY spektar (metanol-*d*₄) *n*-butanolnog ekstrakta *C. majalis*



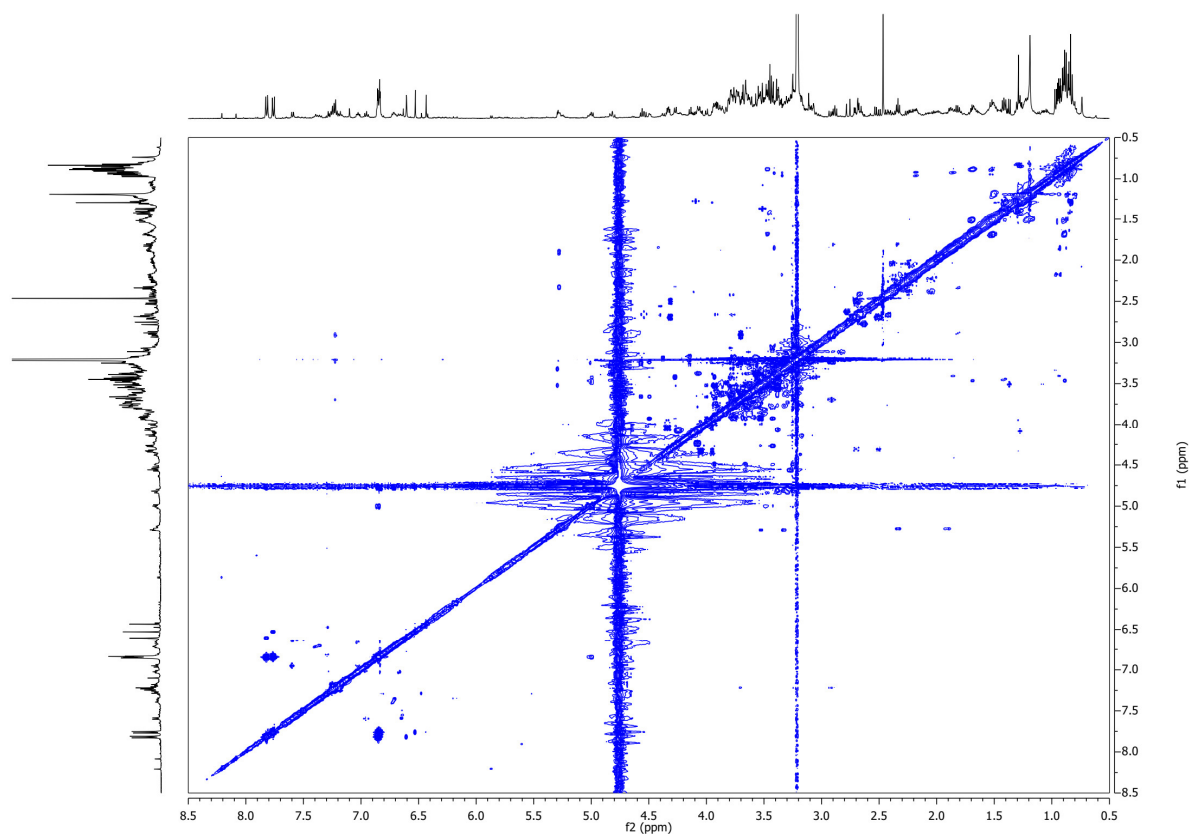
Prilog 2. 2DJ-razložen spektar (metanol-*d*₄) *n*-butanolnog ekstrakta *C. majalis*



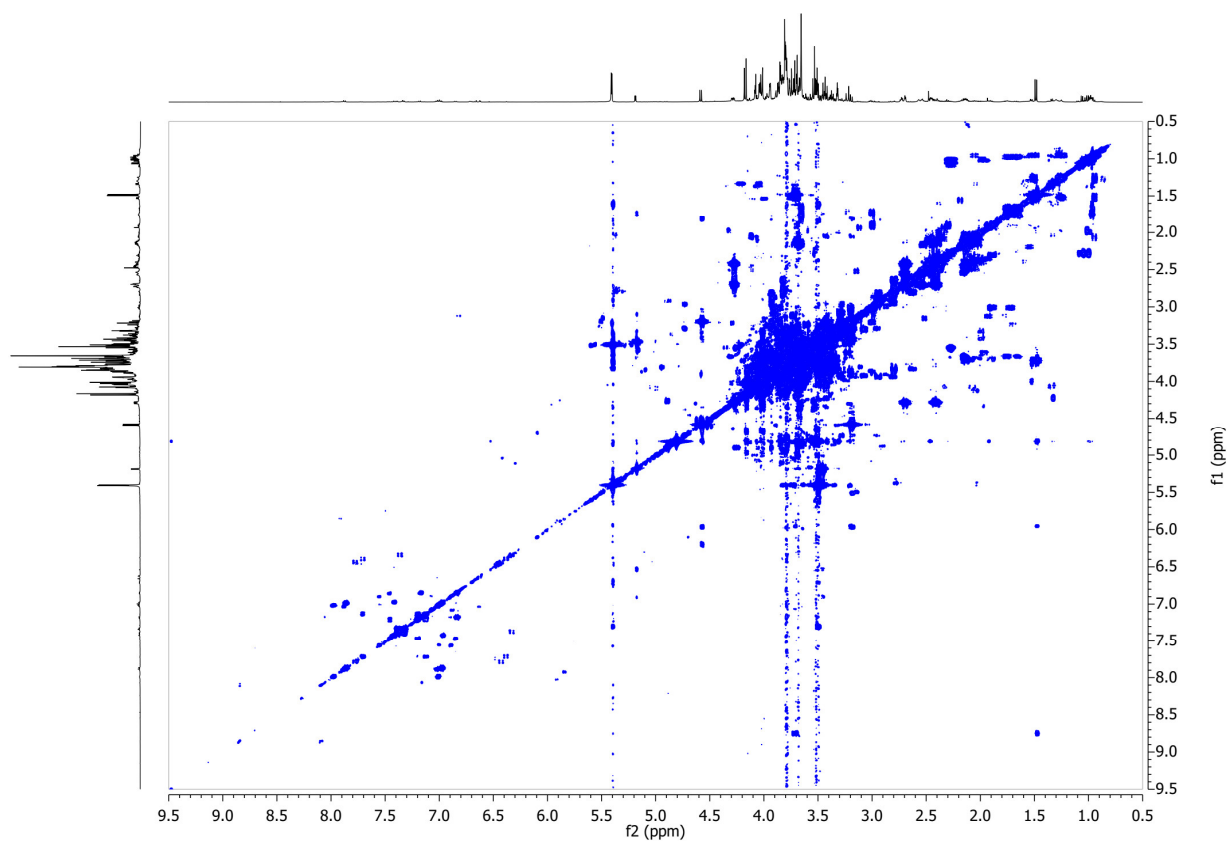
Prilog 3. HSQC spektar (metanol-*d*₄) *n*-butanolnog ekstrakta *C. majalis*



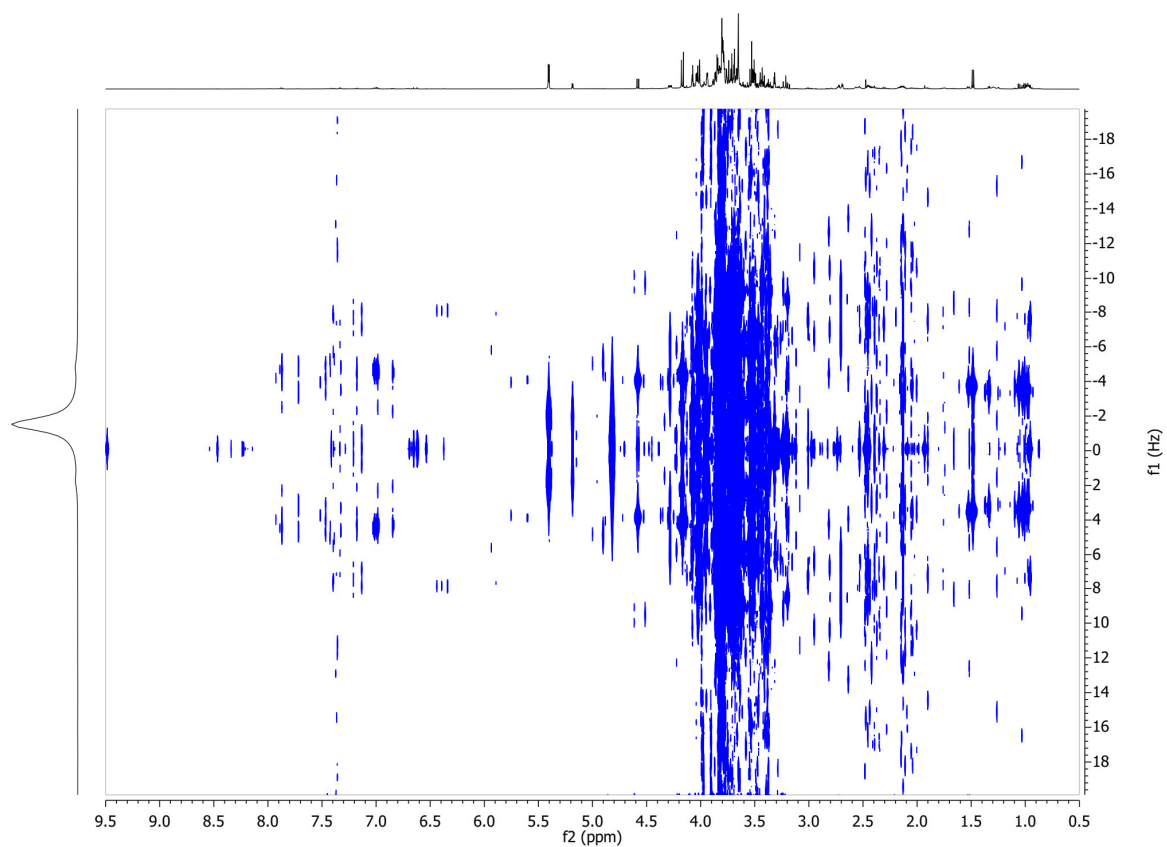
Prilog 4. HMBC spektar (metanol-*d*₄) *n*-butanolnog ekstrakta *C. majalis*



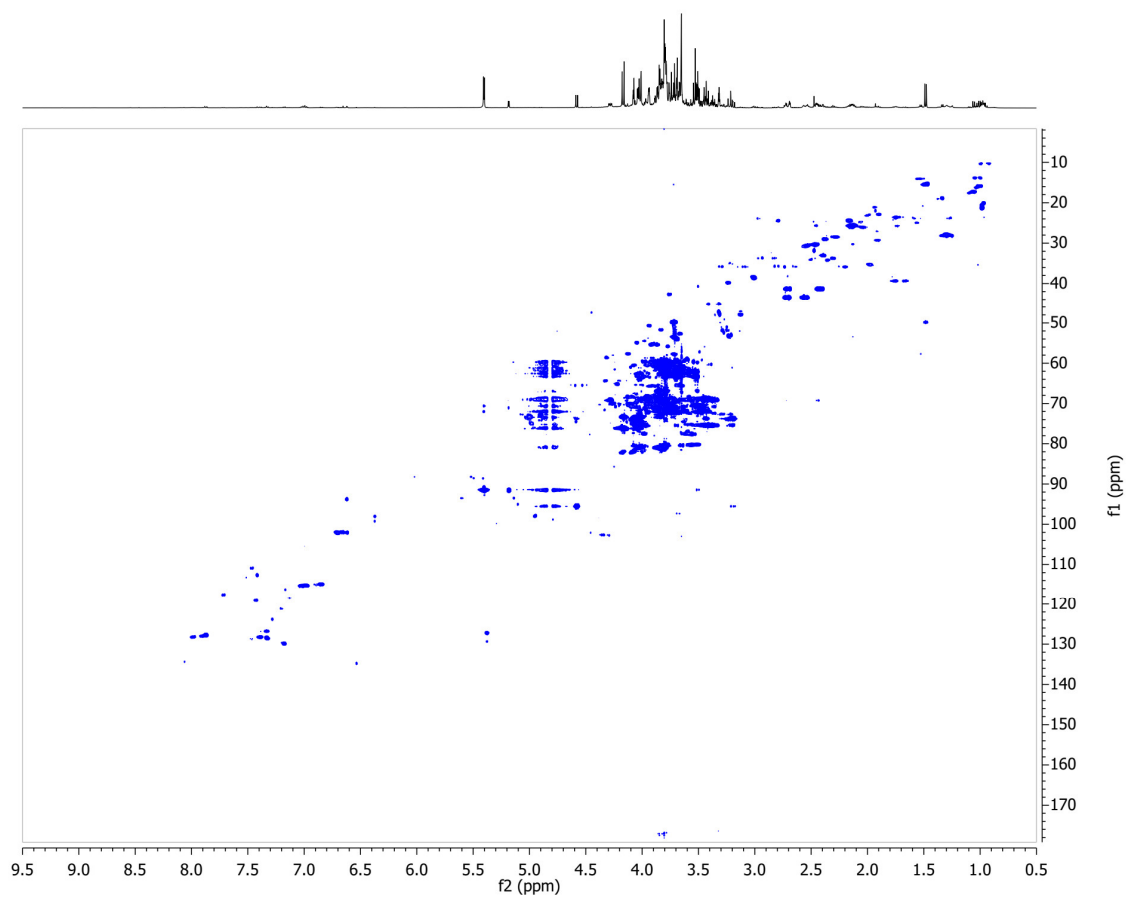
Prilog 5. NOESY spektar (metanol- d_4) *n*-butanolnog ekstrakta *C. majalis*



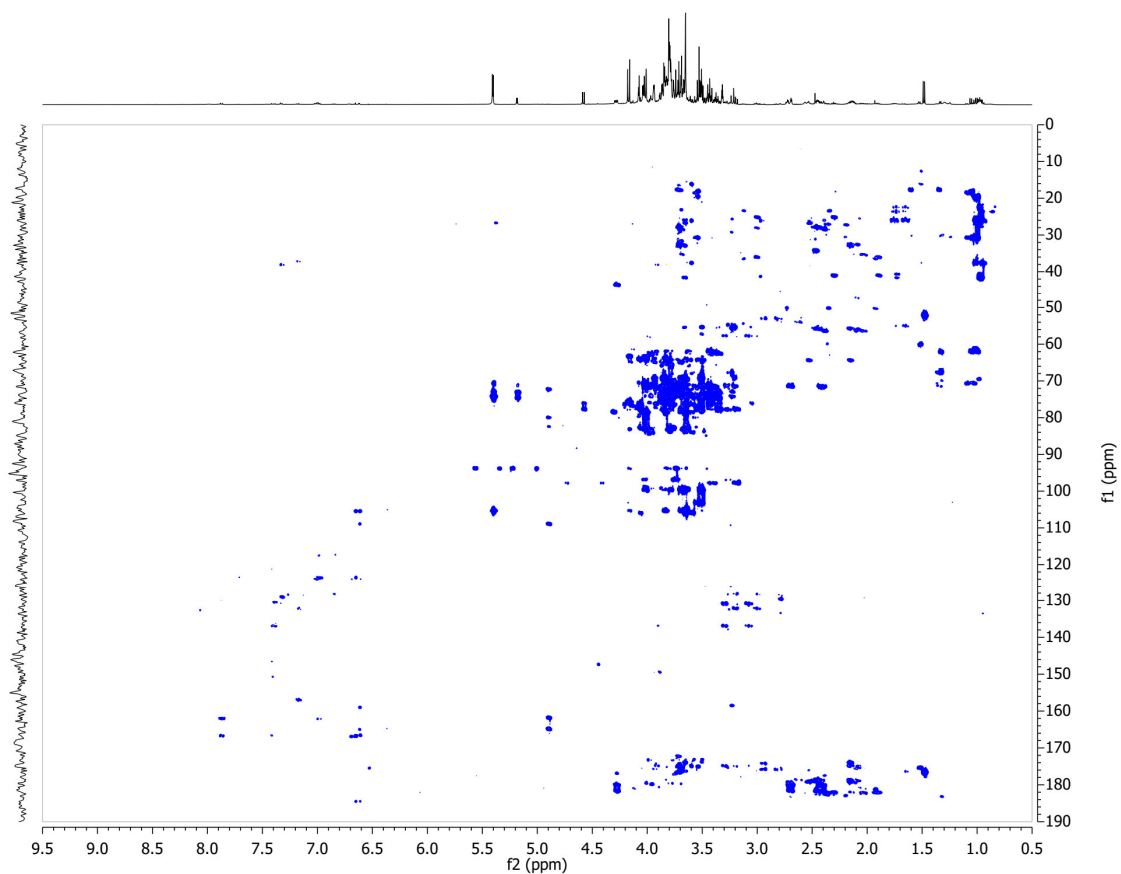
Prilog 6. COSY spektar (metanol- d_4 /D $_2$ O fosfatni pufer pH 6.0) ekstrakta *A. maculatum*



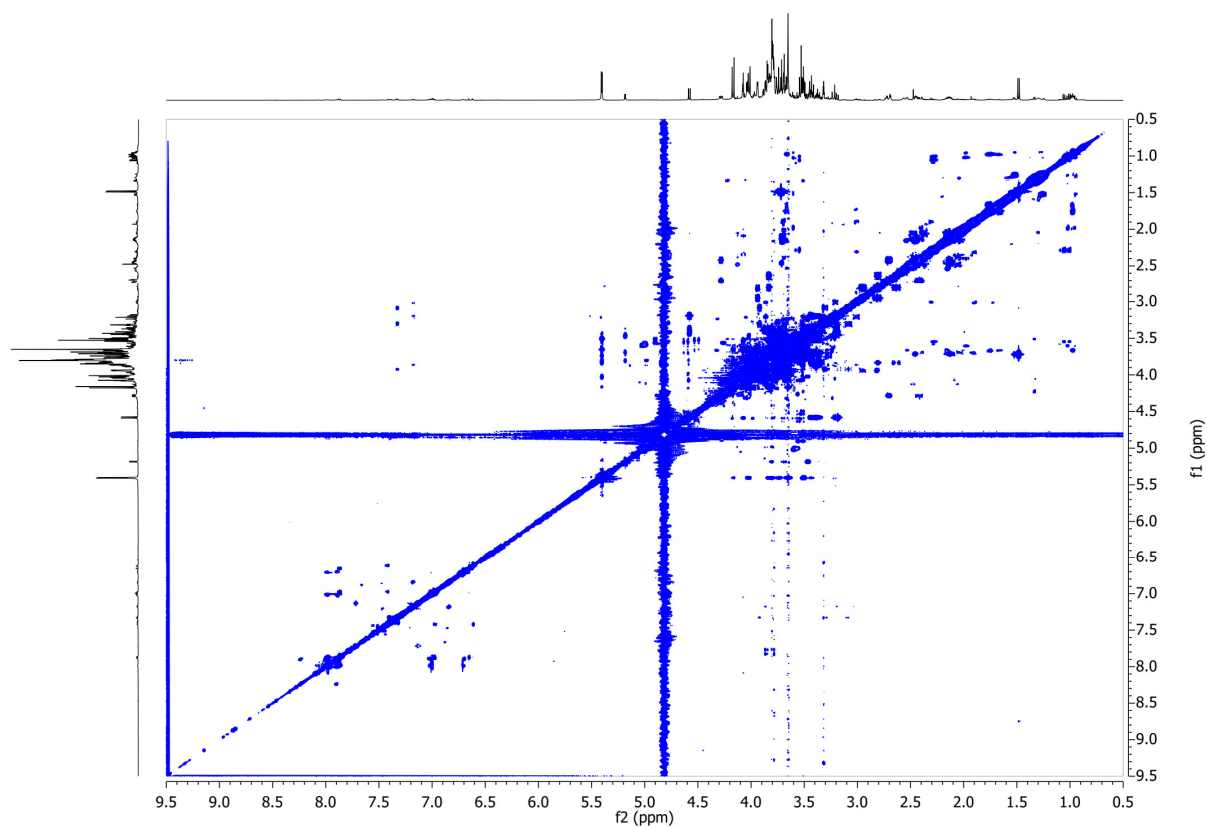
Prilog 7. 2D J-razložen spektar (metanol-*d*₄/D₂O fosfatni pufer pH 6.0) ekstrakta *A. maculatum*



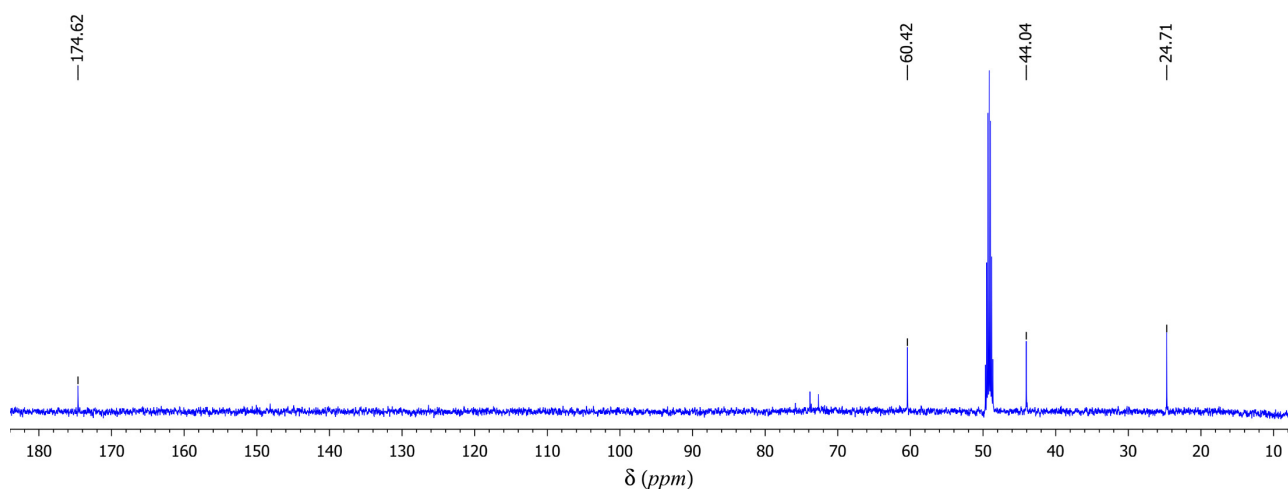
Prilog 8. HSQC spektar (metanol-*d*₄/D₂O fosfatni pufer pH 6.0) ekstrakta *A. maculatum*



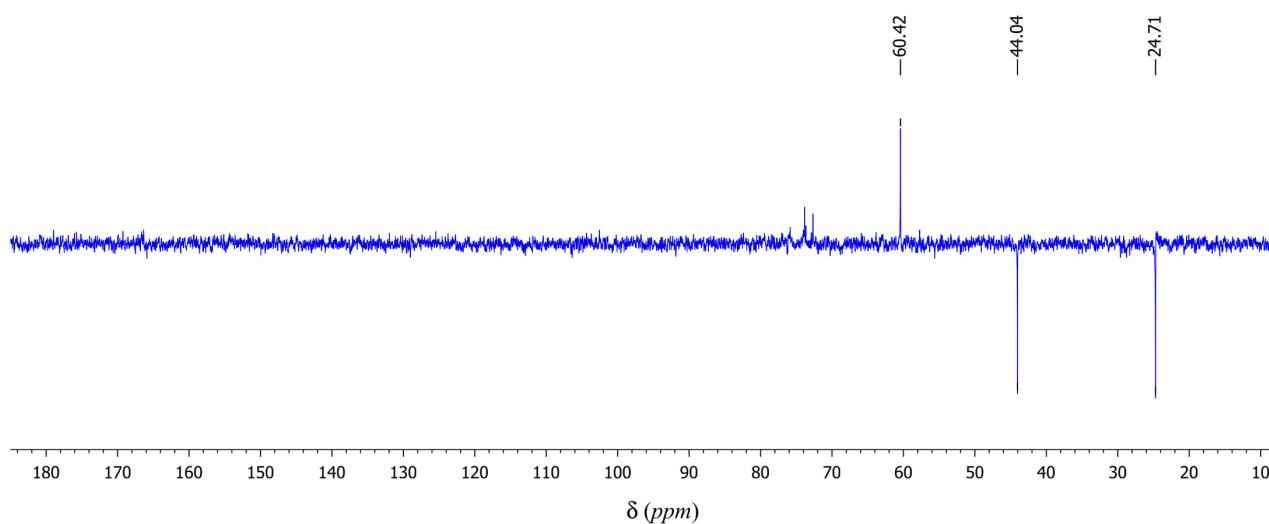
Prilog 9. HMBC spektar (metanol-*d*₄/D₂O fosfatni pufer pH 6.0) ekstrakta *A. maculatum*



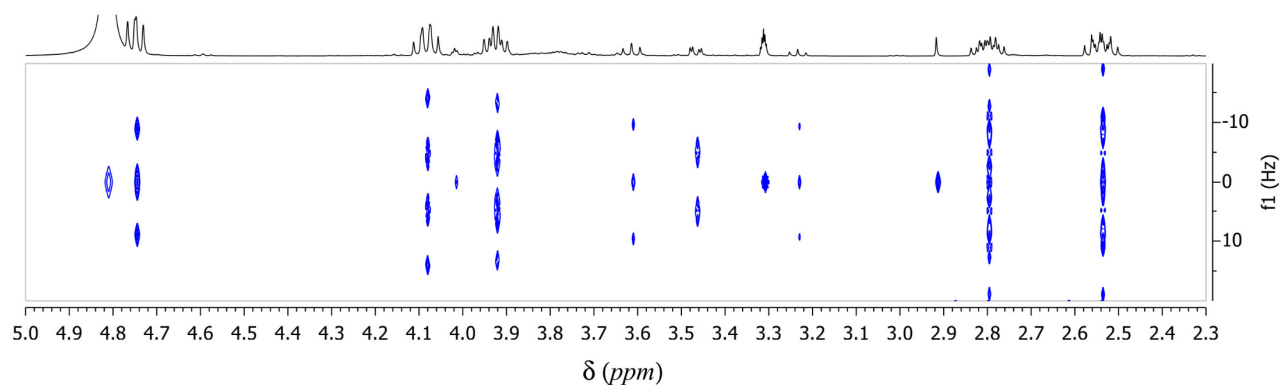
Prilog 10. NOESY spektar (metanol-*d*₄/D₂O fosfatni pufer pH 6.0) ekstrakta *A. maculatum*



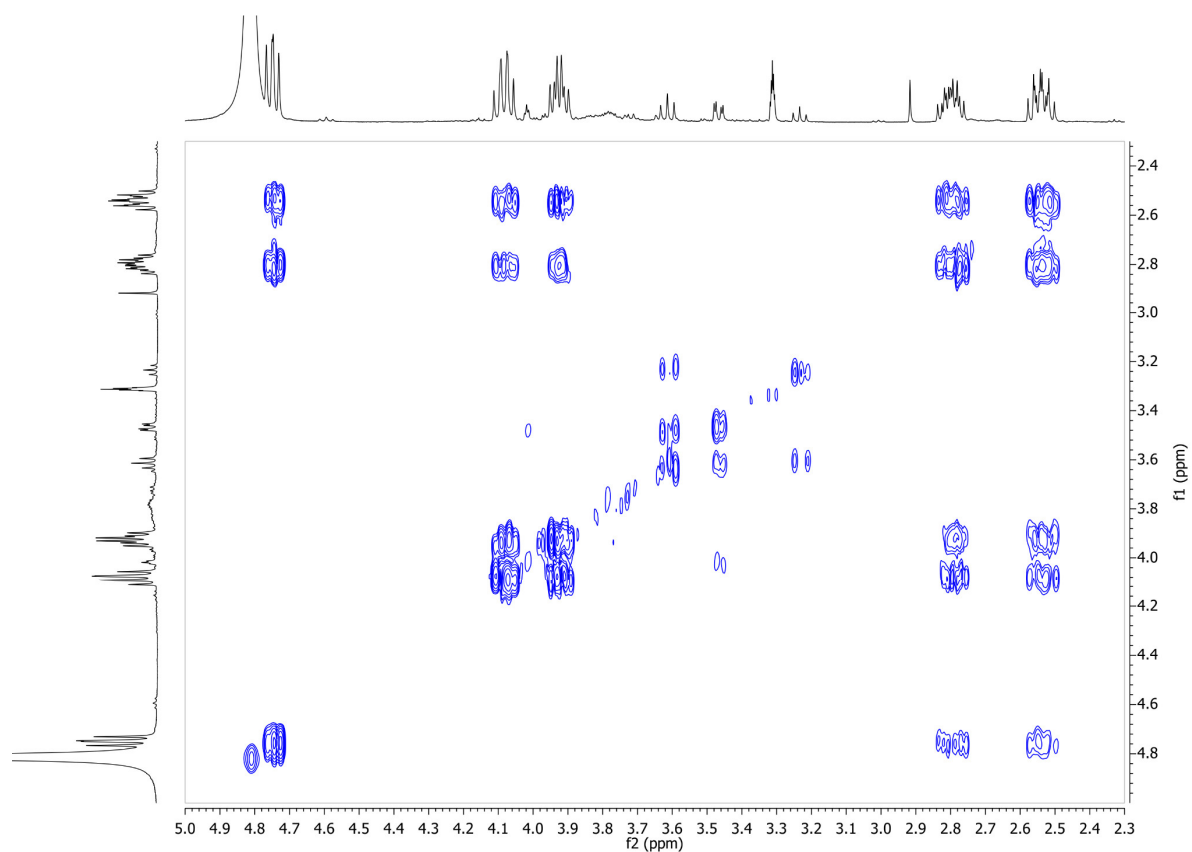
Prilog 11. ^{13}C NMR spektar (metanol- d_4 /D $_2$ O fosfatni pufer pH 6.0) frakcije *C. majalis* koja sadrži azetidin-2-karboksilnu kiselinu



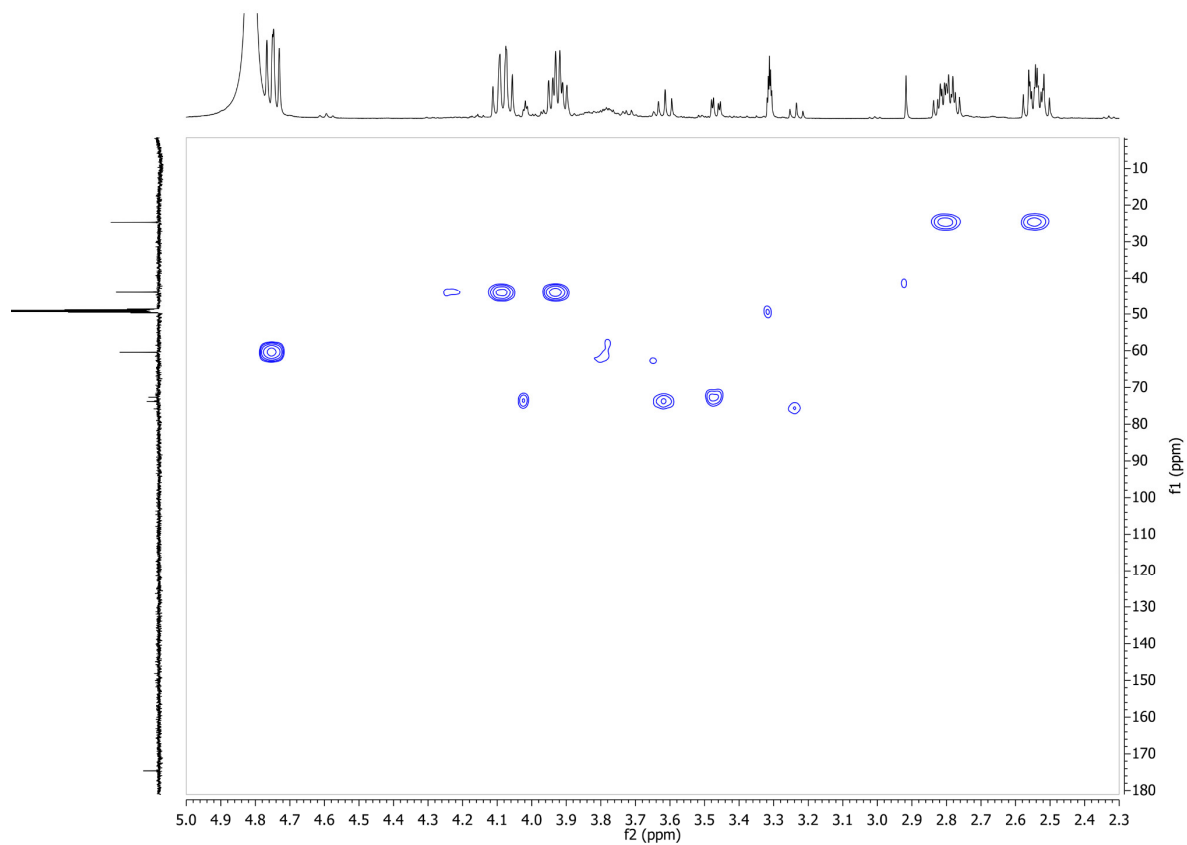
Prilog 12. DEPT 135 NMR spektar (metanol- d_4 /D $_2$ O fosfatni pufer pH 6.0) frakcije *C. majalis* koja sadrži azetidin-2-karboksilnu kiselinu



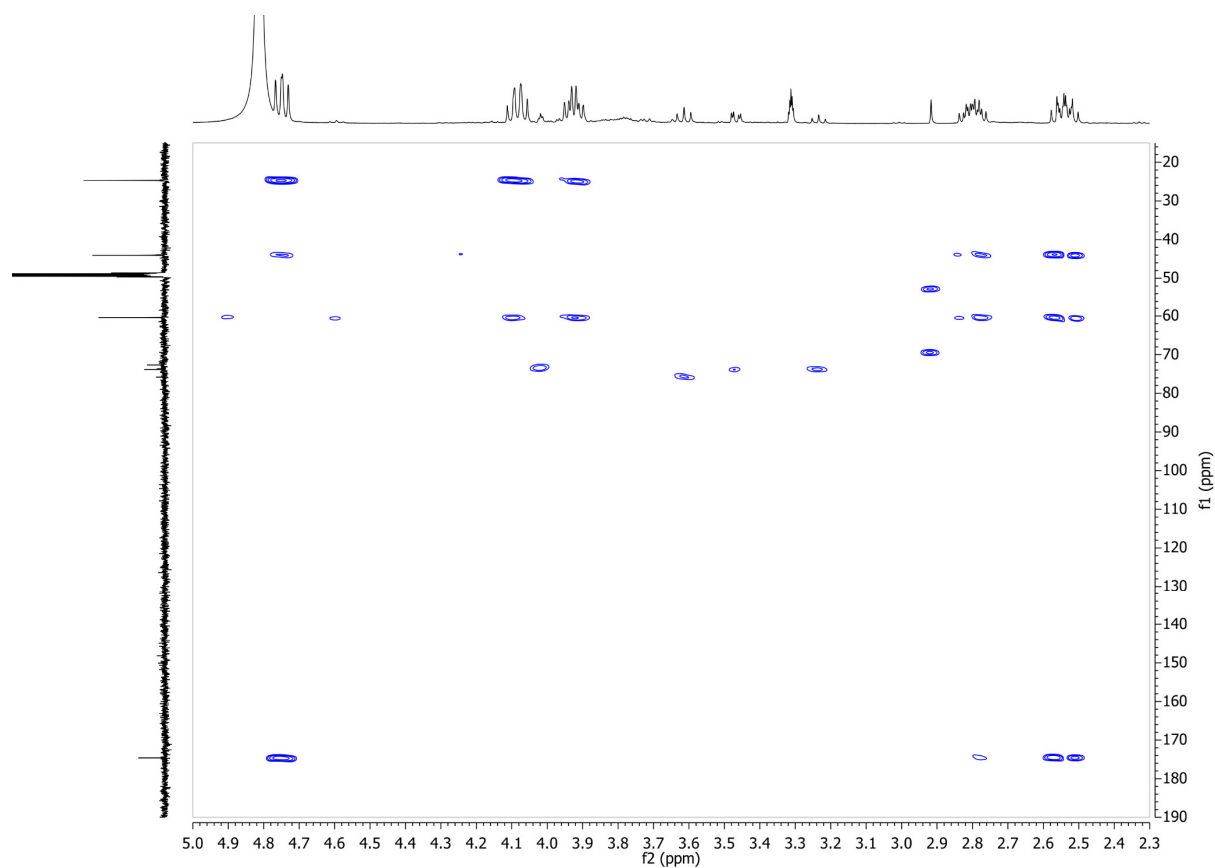
Prilog 13. 2DJ razložen NMR spektar (metanol- d_4 /D $_2$ O fosfatni pufer pH 6.0) frakcije *C. majalis* koja sadrži azetidin-2-karboksilnu kiselinu



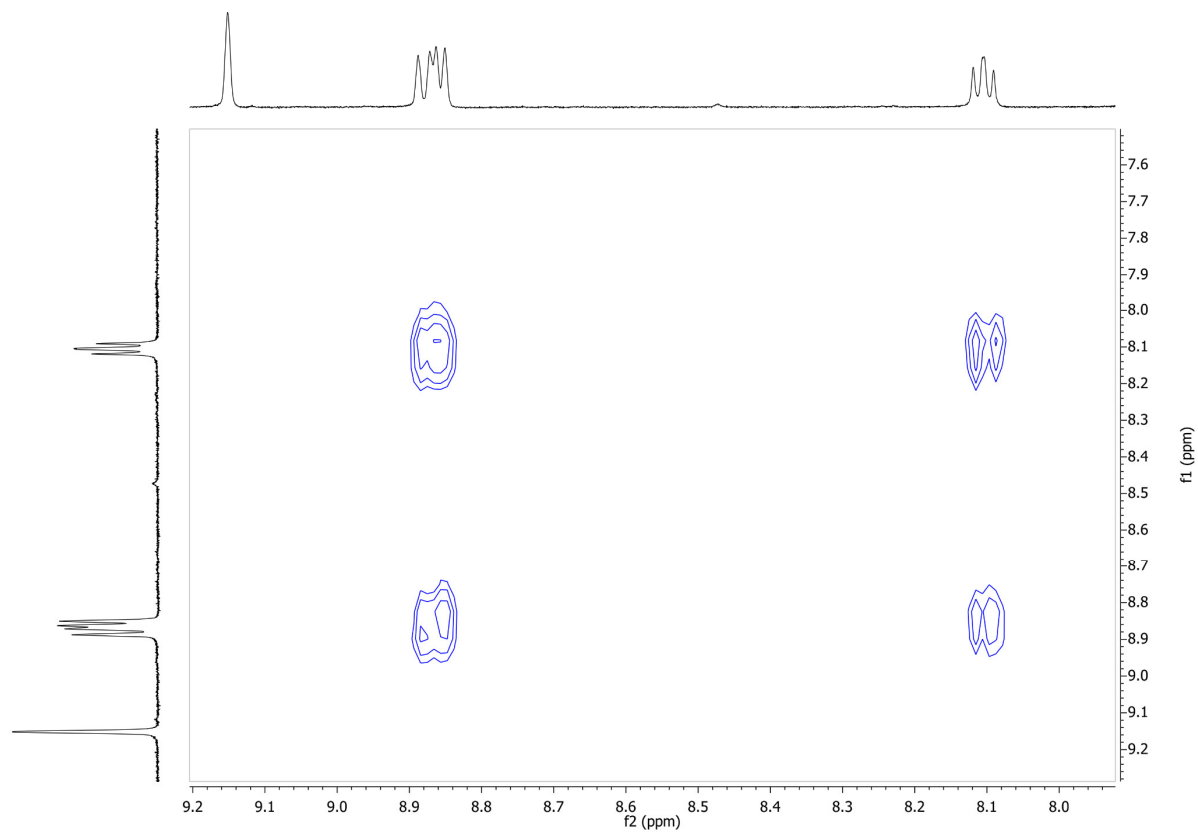
Prilog 14. COSY NMR spektar (metanol- d_4 /D₂O fosfatni pufer pH 6.0) frakcije *C. majalis* koja sadrži azetidin-2-karboksilnu kiselinu



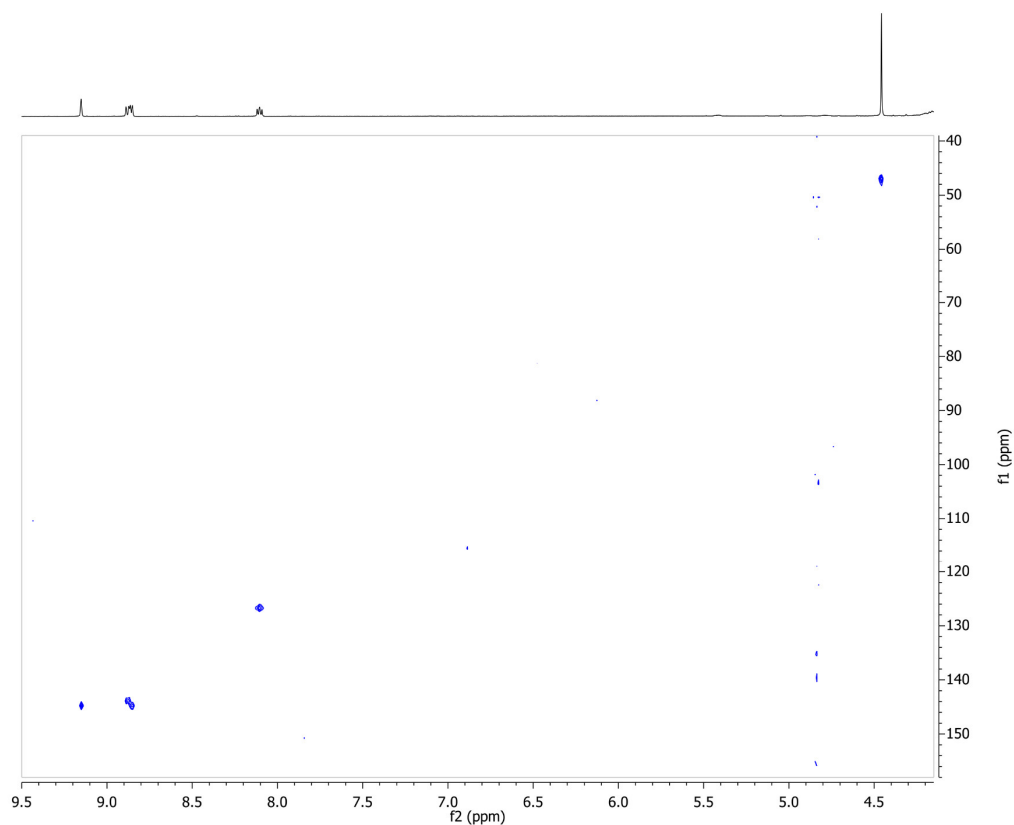
Prilog 15. HSQC NMR spektar (metanol- d_4 /D₂O fosfatni pufer pH 6.0) frakcije *C. majalis* koja sadrži azetidin-2-karboksilnu kiselinu



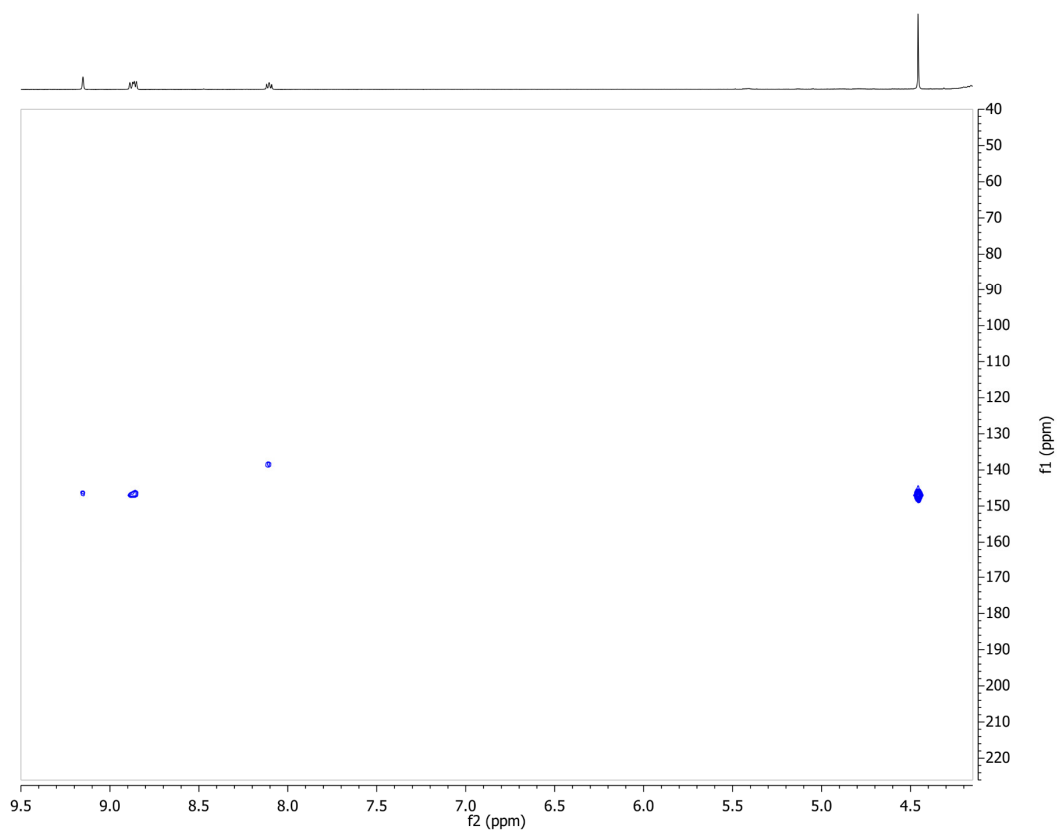
Prilog 16. HMBC NMR spektar (metanol-*d*₄/D₂O fosfatni pufer pH 6.0) frakcije *C. majalis* koja sadrži azetidin-2-karboksilnu kiselinu



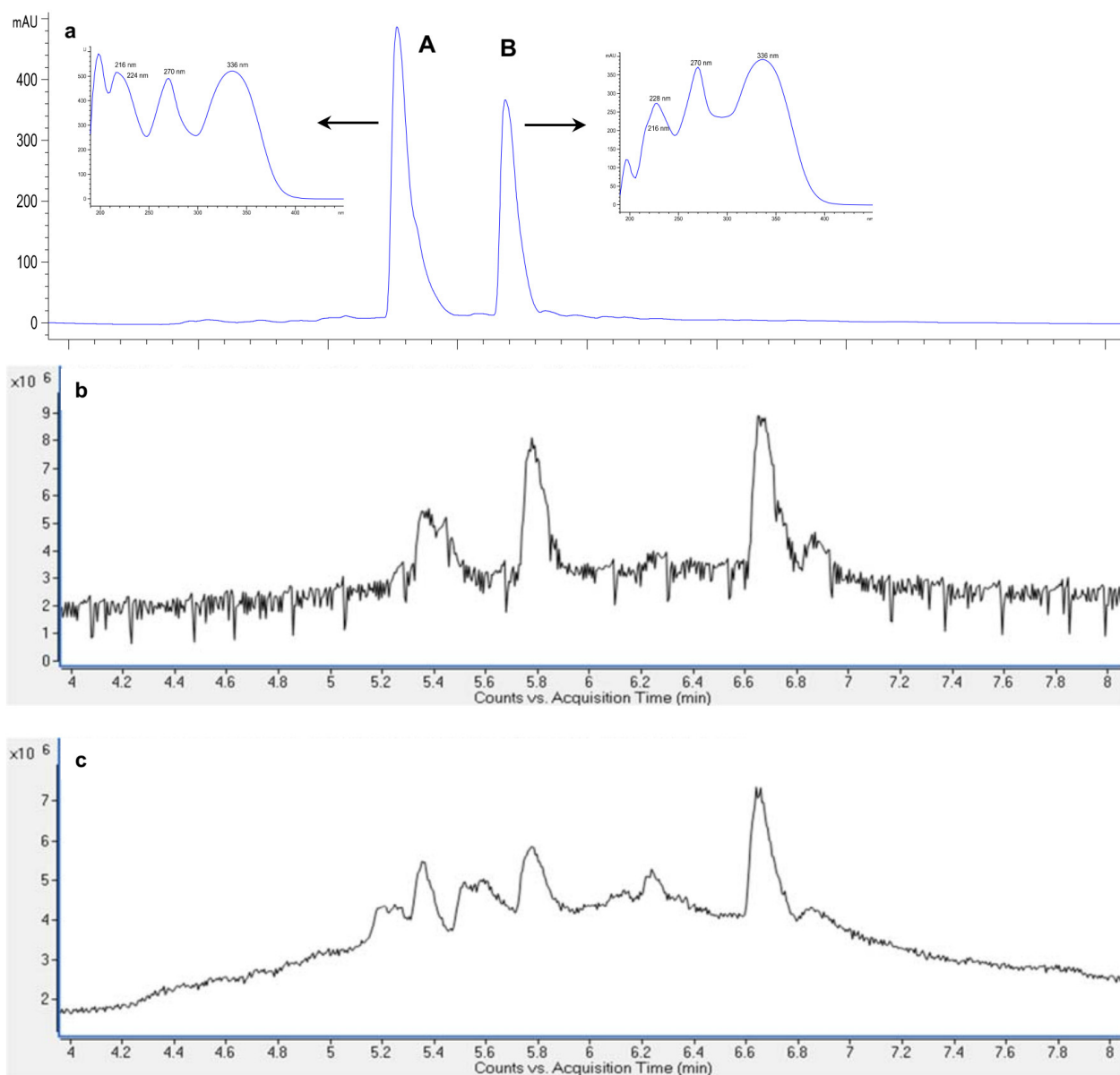
Prilog 17. COSY NMR spektar (metanol-*d*₄/D₂O fosfatni pufer pH 6.0) frakcije *C. majalis* koja sadrži trigonelin



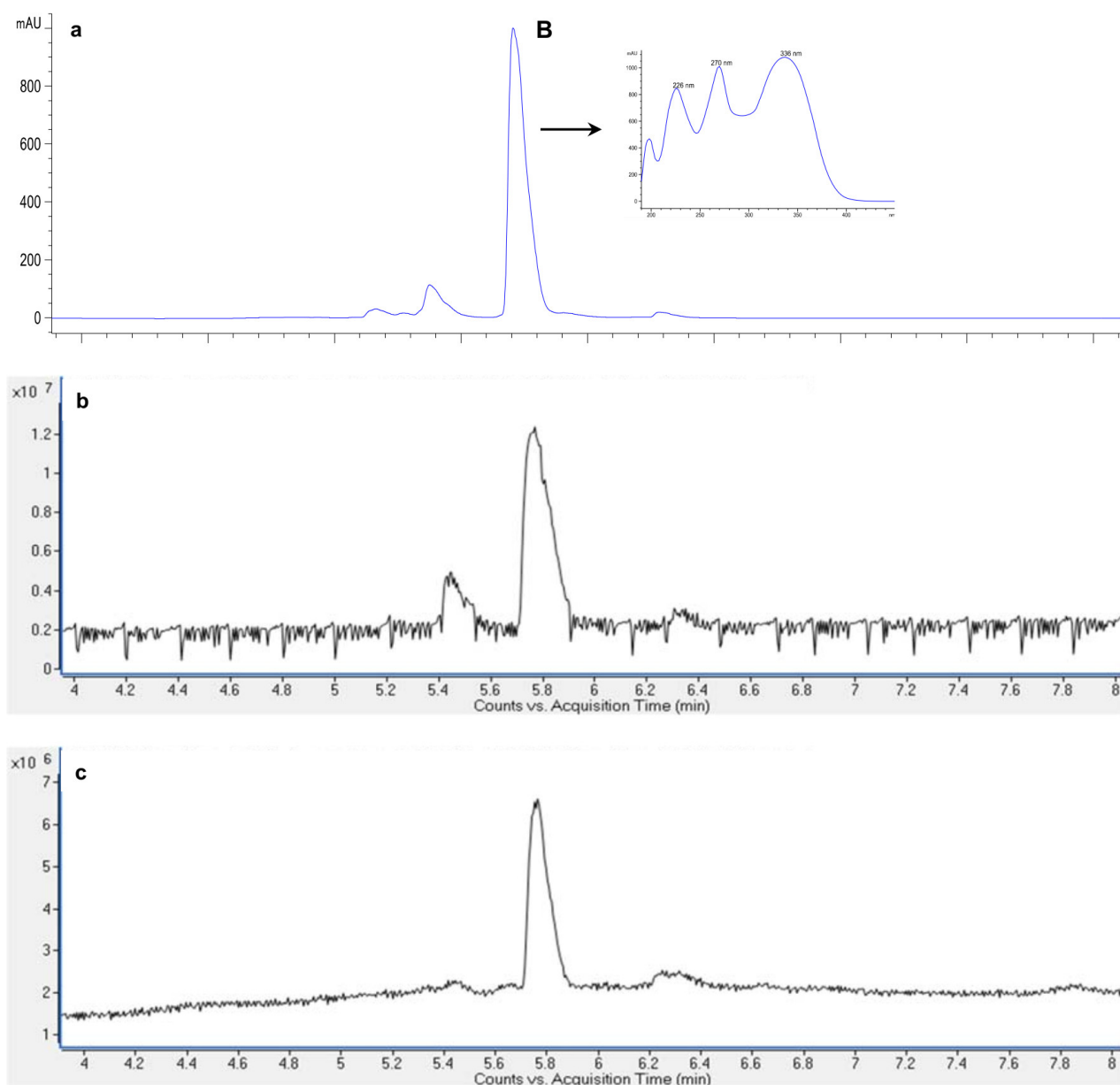
Prilog 18. HSQC NMR spektar (metanol- d_4 /D $_2$ O fosfatni pufer pH 6.0) frakcije *C. majalis* koja sadrži trigonelin



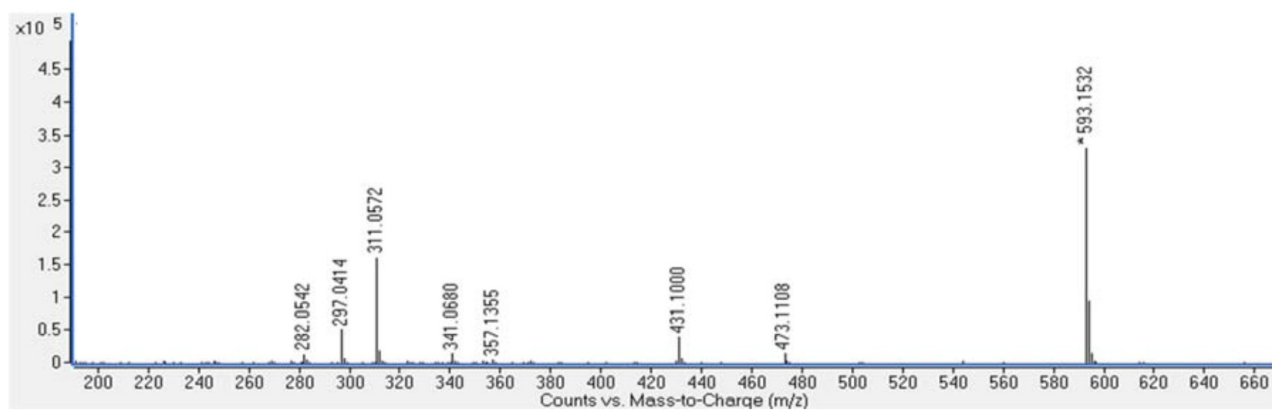
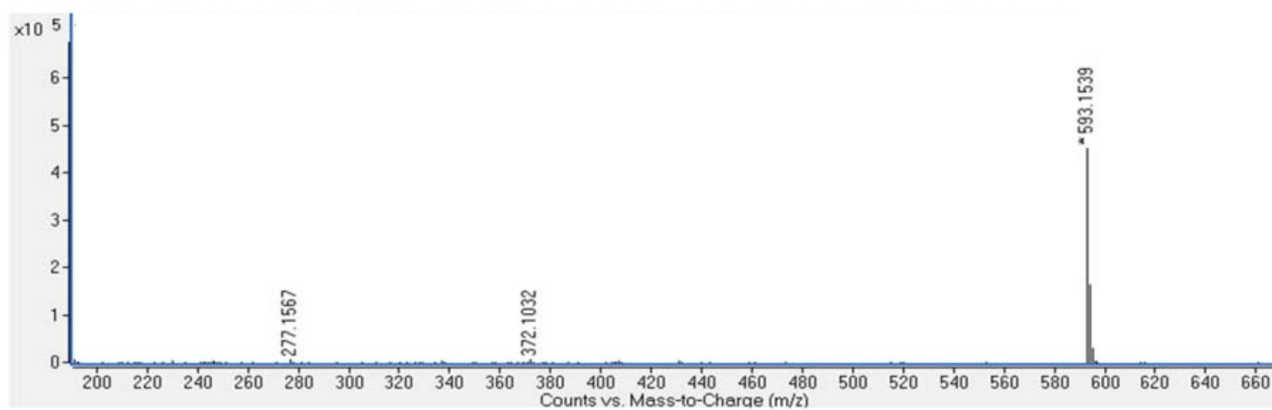
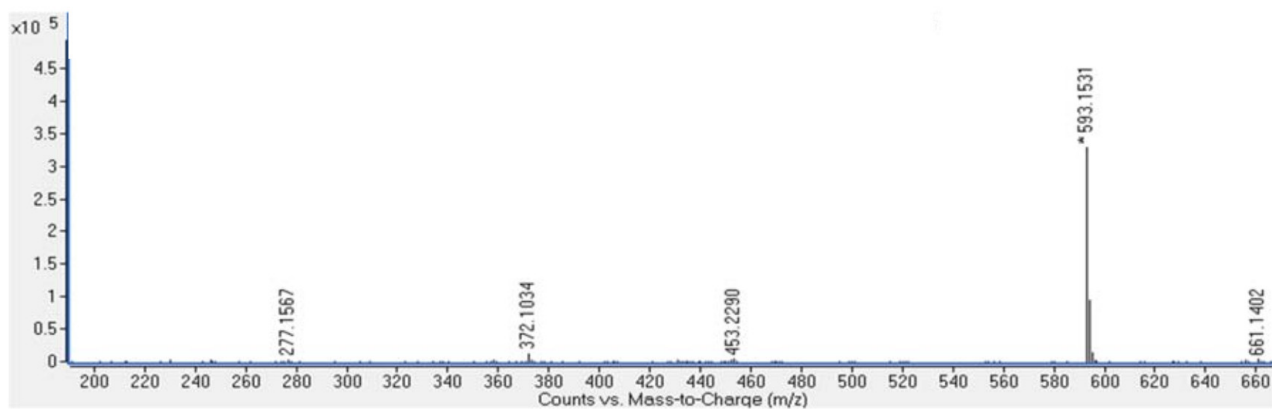
Prilog 19. HMBC NMR spektar (metanol- d_4 /D $_2$ O fosfatni pufer pH 6.0) frakcije *C. majalis* koja sadrži trigonelin



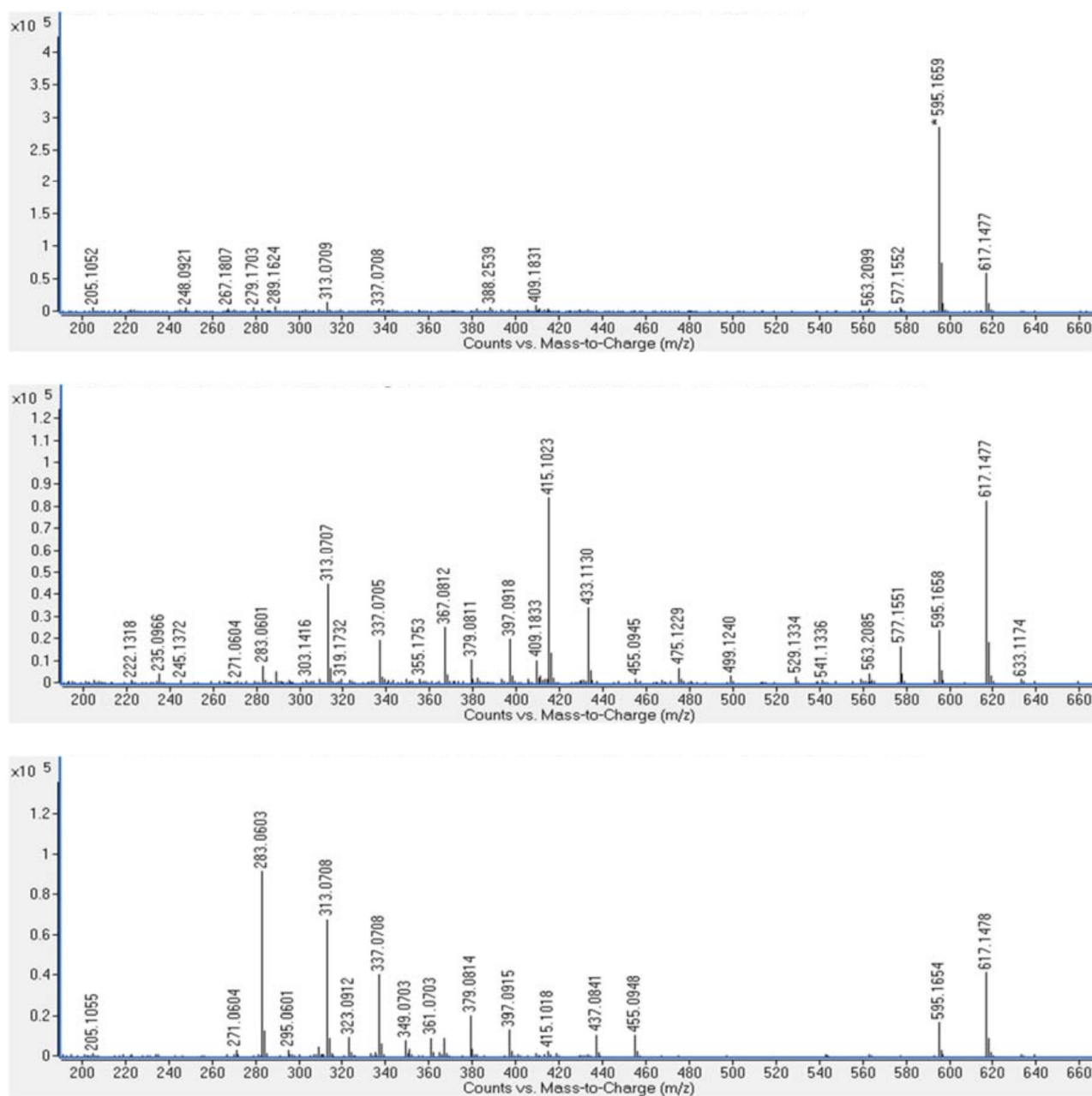
Prilog 20. LC-DAD-MS analiza ekstrakta *C. majalis*: a LC-DAD ($\lambda=270$ nm) hromatogram (4-8 min) i UV spektri jedinjenja A i B; b i c LC-ESI-MS TIC hromatogrami (4-8 min) u negativnom i pozitivnom modu, redom



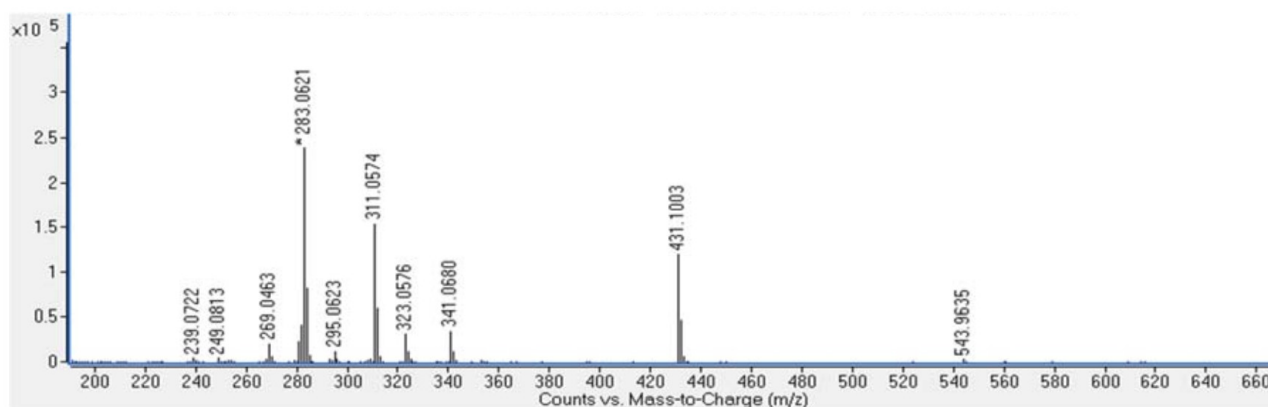
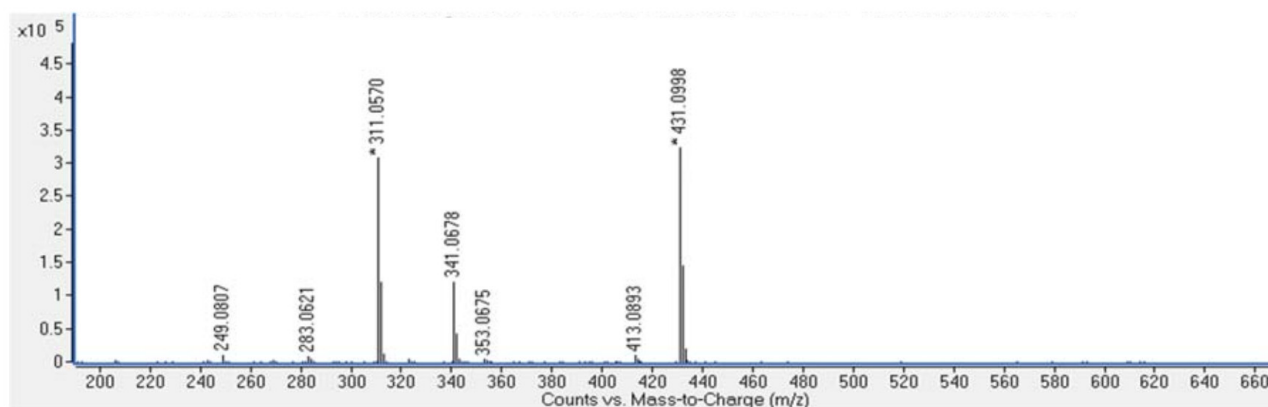
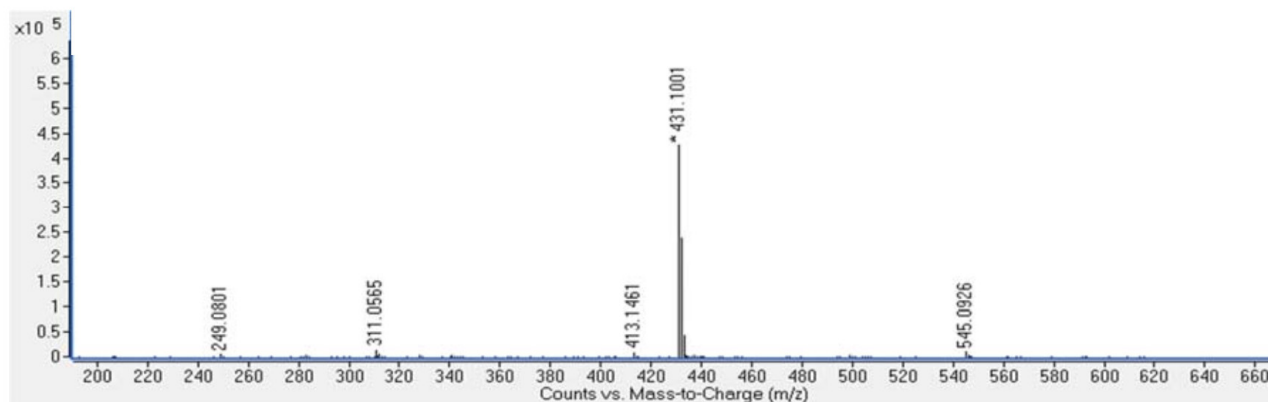
Prilog 21. LC-DAD-MS analiza ekstrakta *A. maculatum*: a LC-DAD ($\lambda=270$ nm) hromatogram (4-8 min) i UV spektri jedinjenja B; b i c LC-ESI-MS TIC hromatogrami (4-8 min) u negativnom i pozitivnom modu, redom



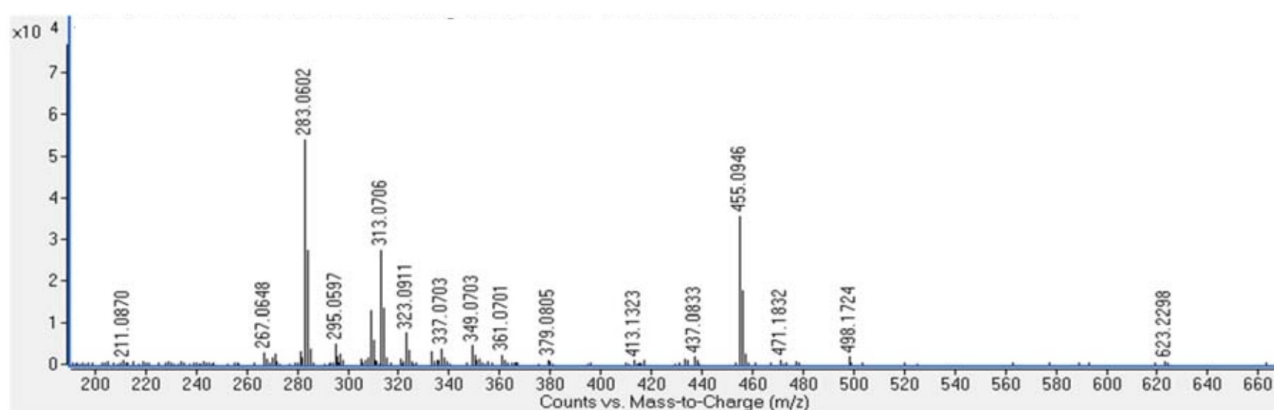
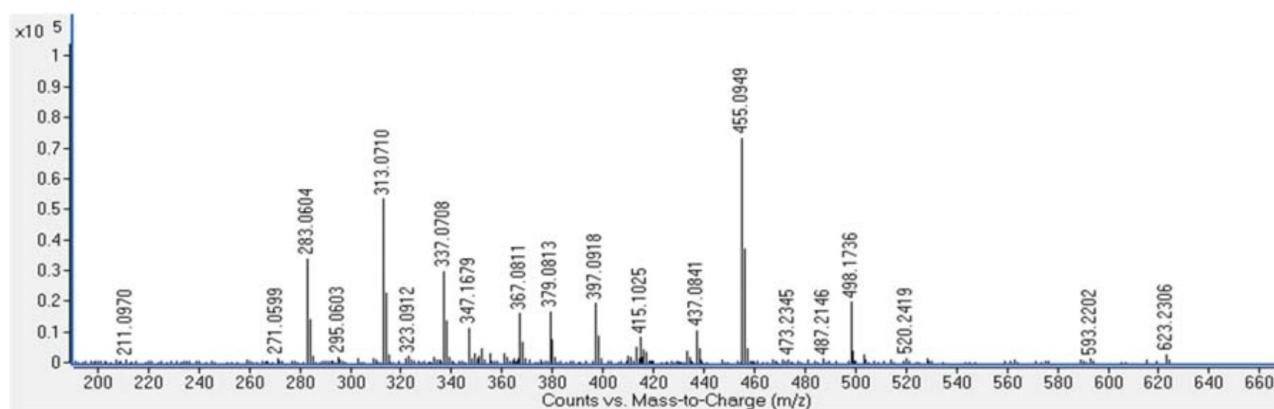
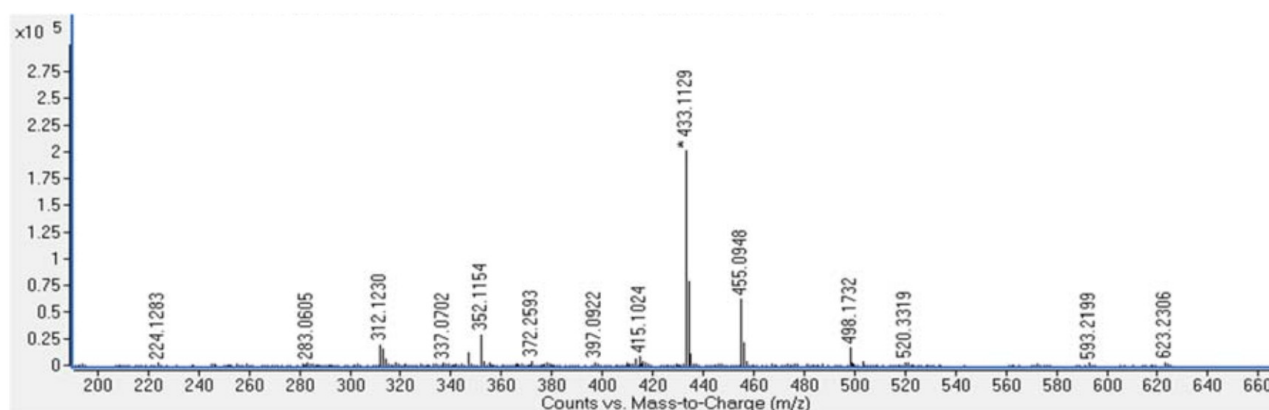
Prilog 22. Maseni spektri snimani u negativnom modu (m/z 200-660) jedinjenja A na CE = 0, 20 i 40 eV, redom (odozgo na dole) u TIC hromatogramima ekstrakta *C. majalis*



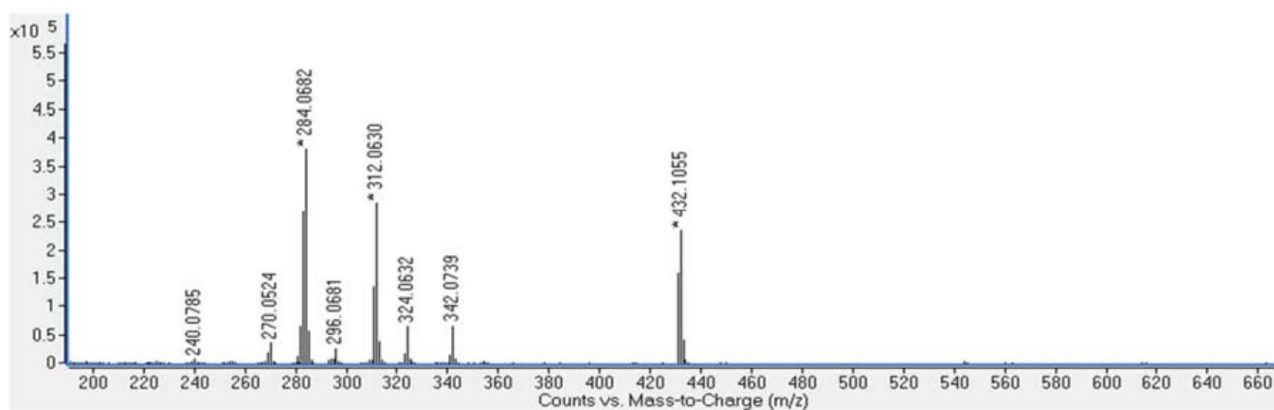
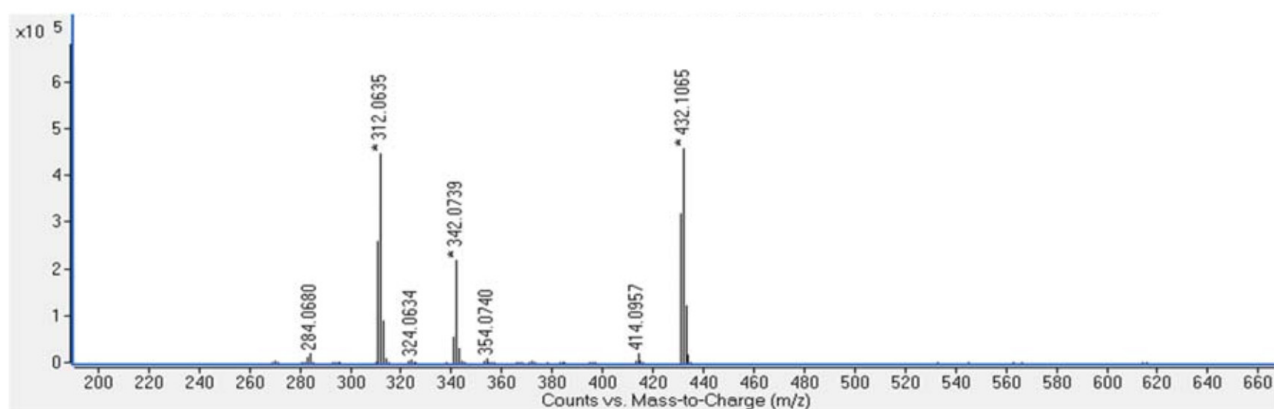
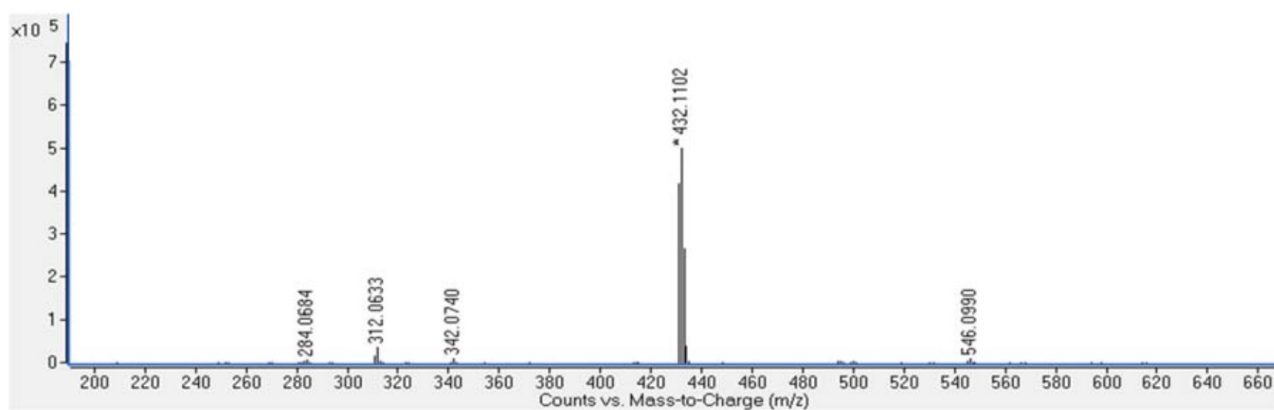
Prilog 23. Maseni spektri snimani u pozitivnom modu (m/z 200-660) jedinjenja A na CE = 0, 20 i 40 eV, redom (odozgo na dole) u TIC hromatogramima ekstrakta *C. majalis*



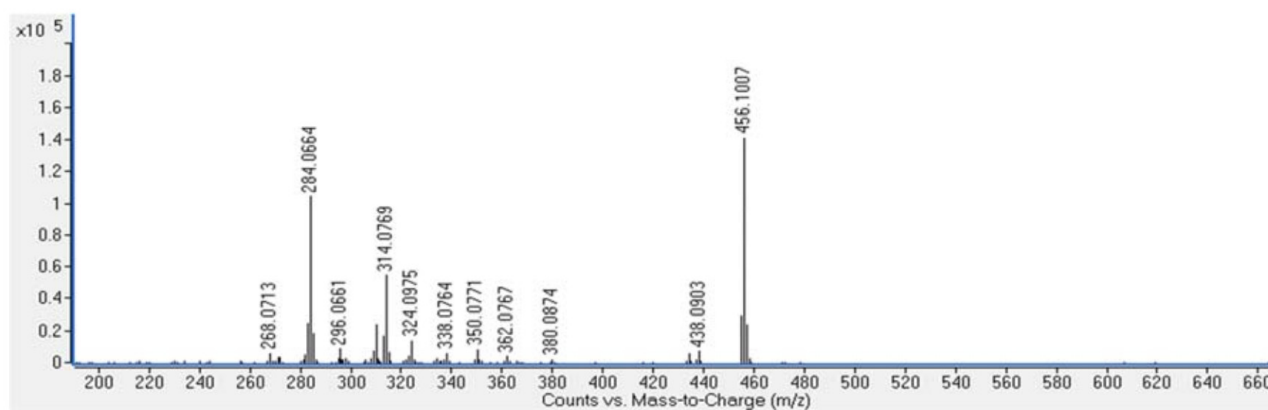
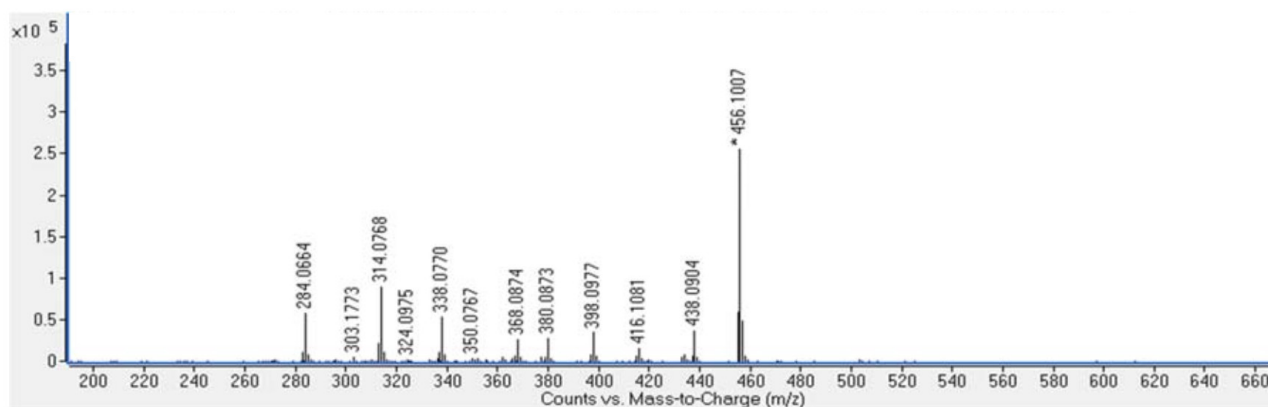
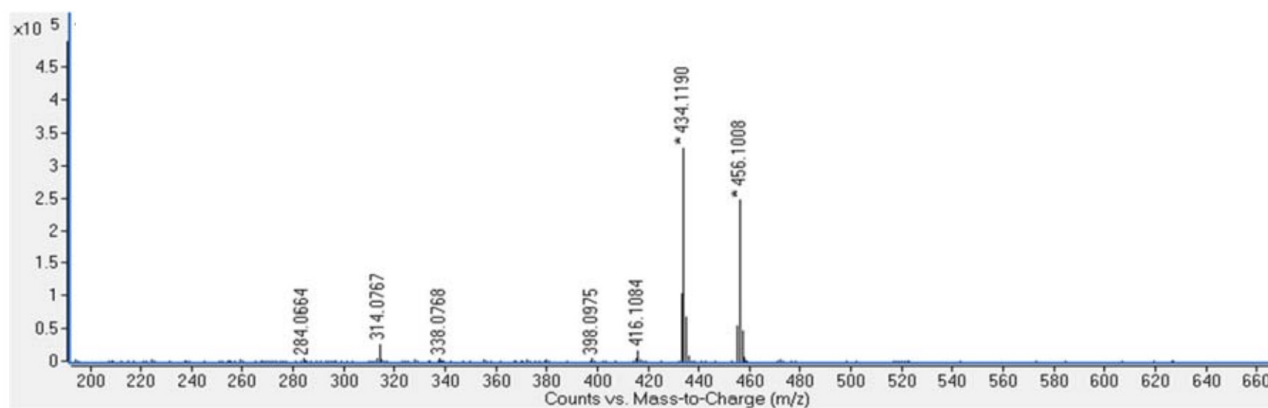
Prilog 24. Maseni spektri snimani u negativnom modu (m/z 200-660) jedinjenja B na CE = 0, 20 i 40 eV, redom (odozgo na dole) u TIC hromatogramima ekstrakta *C. majalis*



Prilog 25. Maseni spektri snimani u pozitivnom modu (m/z 200-660) jedinjenja B na CE = 0, 20 i 40 eV, redom (odozgo na dole) u TIC hromatogramima ekstrakta *C. majalis*



Prilog 26. Maseni spektri snimani u negativnom modu (m/z 200-660) jedinjenja A na CE = 0, 20 i 40 eV, redom (odozgo na dole) u TIC hromatogramima ekstrakta *A. maculatum*



Prilog 27. Maseni spektri snimani u pozitivnom modu (m/z 200-660) jedinjenja B na CE = 0, 20 i 40 eV, redom (odozgo na dole) u TIC hromatogramima ekstrakta *A. maculatum*

BIOGRAFIJA

Stefan G. Ivanović je rođen 19.08.1994. godine u Kragujevcu. Osnovnu školu i srednju školu završio je u Topoli. Diplomirao je na Univerzitetu u Beogradu – Hemijskom fakultetu pri Katedri za organsku hemiju 2017. godine sa prosečnom ocenom na osnovnim studijama 9,44 i ocenom 10 na završnom radu. Kandidatu je dodeljena diploma za najboljeg studenta na studijskom programu „Hemija životne sredine” u školskoj 2016/2017. Master akademske studije na Univerzitetu u Beogradu – Hemijskom fakultetu upisao je 2017. godine i završio iste 2018. godine sa prosečnom ocenom 9,75 i ocenom 10 na master radu pod naslovom „Izolovanje i određivanje strukture triterpenskih kiselina iz gljive *Fomitopsis betulina*“ rađenom pri Katedri za organsku hemiju. Doktorske akademske studije upisao je školske 2018/19 na Univerzitetu u Beogradu – Hemijskom fakultetu. Od 2018. godine zaposlen je kao istraživač pripravnik na Univerzitetu u Beogradu – Institutu za hemiju, tehnologiju i metalurgiju, Centar za hemiju, a od oktobra 2021. godine zaposlen je kao istraživač saradnik. Bio je angažovan na projektu „Bioaktivni prirodni proizvodi samoniklih, gajenih i jestivih biljaka: određivanje i struktura aktivnosti”, finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije (projekat broj 172053). Učestvovao je na više projekta OPCW (MECWA FCUB CIA, OPCW L/ICA/ICB/210502/17; CIA p-LAB, HF-151; Twinning VERIFIN CIA, OPCW/L/ICA/ICB-75/21). Angažovan je kao analitičara na GC-FID-MS, FTIR i UV/Vis tehnikama Akreditovane laboratorije Centra za hemiju. Paralelno sa naučno-istraživačkim radom, od školske 2020/21. godine uključen je u izvođenje vežbi na Katedri za organsku hemiju Hemijskog fakulteta iz predmeta „Strukturne instrumentalne metode” za studente osnovnih akademskih studija.

Objavljeni radovi u sklopu doktorske disertacije**Rad objavljen u istaknutom međunarodnom časopisu (M22)**

1. **Stefan Ivanović**, Katarina Simić, Stefan Lekić, Milka Jadranin, Ljubodrag Vujisić, Dejan Gođevac, Plant Metabolomics as a Tool for Detecting Adulterants in Edible Plant: A Case Study of *Allium ursinum*, Metabolites, 12 (2022) 849. <https://doi.org/10.3390/metabo12090849> (IF₂₀₂₁ = 5,581).
2. **Stefan Ivanović**, Dejan Gođevac, Petar Ristivojević, Gordana Zdunić, Danilo Stojanović, Katarina Šavikin, HPTLC-based metabolomics approach for the detection of chokeberry (*Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliott) adulteration, Journal of Herbal Medicine, 37 (2023). 100618. <https://doi.org/10.1016/j.hermed.2022.100618> (IF₂₀₂₂ = 2,800).

Rad objavljen u međunarodnom časopisu (M23):

1. **Stefan Ivanović**, Manuela Mandrone, Katarina Simić, Mirjana Ristić, Marina Todosijević, Boris Mandić, Dejan Gođevac, GC-MS-based metabolomics for the detection of adulteration in oregano samples, Journal of the Serbian Chemical Society, 86 (12) (2021). <https://doi.org/10.2298/JSC210809089I> (IF₂₀₂₀ = 1,240).

Saopštenje sa međunarodnog skupa štampanih u izvodu (M34)

1. **Stefan Ivanović**, Petar Ristivojević, Gordana Zdunić, Danilo Stojanović, Katarina Šavikin, Dejan Gođevac, Detection of chokeberry adulteration by HPTLC-based metabolomics. The Second International UNIFood Conference – UNIFood2021, September 24-25, 2021, Belgrade, Serbia. ISBN 978-86-7522-066-4 <https://cer.ihtm.bg.ac.rs/handle/123456789/7537>

Saopštenje sa skupa nacionalnog značaja štampanih u izvodu (M64)

2. **Stefan Ivanović**, Katarina Simić, Stefan Lekić, Dejan Gođevac, Detection of biomarkers of adulterated *Allium ursinum* with *Convallaria majalis* and *Arum maculatum*, 8th Conference of Young Chemists of Serbia, 29th October 2022, Belgrade, Serbia. ISBN 978-86-7132-080-1 <https://cer.ihtm.bg.ac.rs/handle/123456789/5523>

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора **Стефан Ивановић**

Број индекса **ДХ08/2018**

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Метаболомички приступ у контроли квалитета лековитог биља и биљних препарата

- 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, _____

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора **Стефан Ивановић**

Број индекса **ДХ08/2018**

Студијски програм **Хемија**

Наслов рада **Метаболомички приступ у контроли квалитета лековитог биља и биљних
препарата**

Ментори **др Љубодраг Вујисић, др Дејан Гођевац**

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

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

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

Потпис аутора

У Београду, _____

Изјава о коришћењу

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

Метаболомички приступ у контроли квалитета лековитог биља и биљних препарата

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, _____

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