



UNIVERZITET U NOVOM SADU
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET
DEPARTMAN ZA HEMIJU, BIOHEMIJU I
ZAŠTITU ŽIVOTNE SREDINE



Dejan Orčić

**VRSTE TRIBUSA SCANDICEAE
(APIACEAE LINDLEY 1836, SUBFAM. APIOIDEAE)
POTENCIJALNI IZVOR BIOLOŠKI I FARMAKOLOŠKI
AKTIVNIH SEKUNDARNIH BIOMOLEKULA**

– DOKTORSKA DISERTACIJA –

NOVI SAD, 2010.

Errata

	Stoji	Treba
Str. 57, 7. odozdo	<i>Chaerophyllum temulum</i>	<i>Chaerophyllum hirsutum</i>
Str. 74, 7 i 8 odozdo	2-2010, 2-2011	2-2011, 2-2010
Str. 76, 20 odozdo	ukupno trajanje analize 16,9 min	zadržavanje 16,9 min (ukupno trajanje analize 35 min)
Str. 98, 8. odozdo	255]	[255]
Str. 102, 8. odozgo	319 [M+H-CA] ⁺	319 [M+H-CA-2H ₂ O] ⁺
Str. 103, 4 i 5 odozdo	položaj 5	položaj 3
Str. 129, Tabela 5.4.	nedostaje jedinica	mg/g
Str. 175, Prilog 8.5.	Zbog greške prilikom kopiranja iz Excel tabele, kolona t_R sadrži besmislene podatke: 0.271, 0.300, 0.232, 0.062, 0.234, 5.240, 69.518, 0.335, 0.356, 0.647, 19.706, 0.439, 0.823, 0.244, 0.068, 0.076, 0.045, 0.053, 0.112, 0.028, 0.034, 0.048, 0.030, 0.056, 0.292, 0.209	Treba: 4.581, 5.931, 6.356, 6.508, 7.927, 8.030, 9.817, 11.038, 11.119, 12.288, 12.404, 12.636, 13.235, 13.284, 13.351, 13.384, 13.409, 14.171, 14.215, 15.968, 17.590, 18.663, 18.880, 19.825, 21.664, 24.266
Str. 251	lista	stabla
Str. 321–323	$C_{Fe,eks}$	C_{flavo}

Dodatne napomene

Str. 102, 8 odozgo	Pretpostavljena je 3,5-diCQA struktura. Naknadna ispitivanja potvrdila koeluiranje 3,5- i 1,3-izomera ($t_R = 1,91$ min i 1,86 min, respektivno).
Str. 103, 2–3 odozdo	Po mišljenju autora, ne može se verovati identifikacijama datim u navedenim radovima, zbog pogrešne pretpostavke o putu fragmentacije. Diskusija sa N. Kuhnert-om potvrdila da je mehanizam predložen u ref. 258 i 259 malo verovatan.
Pogl. 5.2.1.2.	Poređenjem sa referentnim standardom naknadno potvrđeno da je MeLut najverovatnije 3'-izomer, krizoeriol.
Str. 106, 12–22 odozgo	Naknadno izolovanje čistijih spektara, poređenje sa referentnim standardima i pseudo-MS ³ eksperimenti potvrdili da su u pitanju kemferol-3-O-glukozid i kemferol-3-O-acetilheksozid.
Str. 117, 1–2 odozdo	Kasnije pretrage baza (SciFinder) potvrdile da je u pitanju do sada nepoznati prirodni proizvod.
Str. 119, 13–14 odozdo	Kasnije pretrage baza (SciFinder) potvrdile da je u pitanju do sada nepoznati prirodni proizvod.
	Hemijski profili i ispitivanja aktivnosti ukazali su na značajne razlike uzorka ChH03 u odnosu na druge ChH uzorke, a veliku sličnost sa ChT. Ovo je omogućilo da se primerak ChH03 naknadno od strane botaničara reklasifikuje kao <i>Chaerophyllum temulum</i> , ChH06.

Na ovom mestu želim da se zahvalim svima koji mi na bilo koji način pomogli u toku izrade ovog rada:

- *svom mentoru, prof. dr Nedi Mimici-Dukić, koja me je uvela u svet lekovitog bilja, za ogromno strpljenje, razumevanje, toleranciju i podršku za sve vreme postdiplomskih studija i izrade i pisanja rada,*
- *dr Biljani Božin, sa kojom sam načinio svoje prve korake na terenu, koja je kao oko sokolovo i u najgušćoj šumi uspevala da uoči neku novu vrstu za mene, i koja mi je mnogo pomogla oko botaničkog dela teze,*
- *dr Goranu Anačkovu, za svo strpljenje i trud oko determinacije mojih uzoraka (koji često nisu bili u najsjajnijem stanju), uzorke koje mi je doneo sa svojih putešestvija, i pomoć oko botaničkog dela,*
- *Emiliji Jovin, koja mi je bezbroj puta krajnje nesebično pomagala u sakupljanju uzoraka i eksperimentalnom radu, i koja je na svoja pleća preuzela najveći deo obaveza vezanih za nastavu, dajući mi tako priliku da završim ovu tezu,*
- *mr Ivani Beara i MSc Mariji Lesjak, za veliku pomoć oko testova antiinflamatorne aktivnosti,*
- *Kristini Balog, za veliku pomoć u laboratoriji i uvek pozitivan stav,*
- *dr Gordani Bogdanović i Vesni Kojić sa Instituta za onkologiju Vojvodine u Sremskoj Kamenici, koje su mi pružile pomoć oko testova citotoksičnosti,*
- *osoblju BUNS herbarijuma, kroz čije su ruke prošli moji bezbrojni uzorci,*
- *mr Nataši Simin za pomoć oko testova antiinflamatorne aktivnosti,*
- *Marini Francišković i Jeleni Lovrić, koje su mi pomogle u sakupljanju uzoraka,*
- *mr Đuri Vujiću, skeptičnom hemičaru, koji me je naučio analitičkom načinu razmišljanja, i da nijedan rezultat ne treba uzimati zdravo za gotovo,*
- *diplomcima Leu Lebanovu, Ivi Kocić, Branislavi Mitić i Milici Roganović, za pomoć u eksperimentalnom radu,*
- *Mladenu Stanišiću, Azri Redžepović i mr Sonji Kaišarević za nabavku pribora i hemikalija, i Zoltanu Pentelenčiku za nabavku literature,*
- *mr Slobodanu Petroviću, za kosmajске uzorke *A. sylvestris* i hidrodestilator velikog kapaciteta,*
- *mr Milošu Svirčevu, za konstruktivne diskusije i druženje,*
- *Ministarstvu za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije, koje je finansiralo projekat br. 142036, u okviru koga je rađena i ova teza,*
- *i, naravno, mojoj Nikolini, za svo strpljenje i razumevanje.*

SADRŽAJ

1. Uvod	3
2. Cilj istraživanja	7
3. Opšti deo	11
3.1. Sistematska pripadnost vrsta tribusa Scandiceae.....	13
3.1.1. Familija Apiaceae Lindley.....	13
3.1.2. Rod <i>Antriscus</i> Pers. (syn. <i>Cerefolium</i> Hall. 1768 i <i>Chaerofolium</i> Hall.).....	14
3.1.3. Rod <i>Chaerophyllum</i> L. 1753.....	14
3.1.4. Rod <i>Scandix</i> L. 1753.....	15
3.1.5. Ispitivane vrste tribusa Scandiceae.....	16
3.2. Vrsta tribusa Scandiceae u fitofarmaciji.....	20
3.2.1. Farmakološko delovanje vrsta tribusa Scandiceae.....	20
3.2.2. Primena vrsta tribusa Scandiceae.....	22
3.3. Molekulske osnove bolesti.....	23
3.3.1. Oksidativni stres.....	23
3.3.2. Inflamatorni procesi.....	25
3.3.3. Karcinogeneza.....	29
3.4. Hemijski sastav vrsta tribusa Scandiceae.....	31
3.4.1. Fenolne kiseline i derivati.....	32
3.4.2. Kumarini.....	39
3.4.3. Flavonoidi.....	42
3.4.4. Lignani.....	48
3.4.5. Poliacetileni.....	59
3.4.6. Etarska ulja.....	63
4. Eksperimentalni deo	71
4.1. Biljni materijal.....	73
4.2. Obrada biljnog materijala.....	73
4.3. Priprema etarskih ulja.....	73
4.4. Priprema ekstrakata.....	73
4.5. GC-MS analiza volatilnih komponenti.....	76
4.6. LC-DAD-MS analiza.....	77
4.7. Određivanje antioksidantne aktivnosti DPPH testom.....	79
4.8. Određivanje antioksidantne aktivnosti FRAP testom.....	80
4.9. Određivanje ukupnih flavonoida.....	81
4.10. Određivanje COX/LOX inhibitornog delovanja.....	82
4.11. Određivanje citotoksičnosti kolorimetrijskim MTT testom.....	83
5. Rezultati i diskusija	85
5.1. GC-MS analiza volatilnih komponenti.....	87
5.1.1. Headspace GC-MS analiza.....	88
5.1.2. Analiza etarskih ulja.....	96
5.2. Kvalitativna LC-DAD-MS ⁿ analiza ekstrakata.....	97
5.2.1. Identifikacija jedinjenja po klasama.....	100
5.2.1.1. Hlorogenske kiseline.....	100
5.2.1.2. Flavonoidi.....	105
5.2.1.3. Lignani.....	110
5.2.2. Hemijski sastav ekstrakta ispitivanih vrsta.....	122
5.2.2.1. 70 % metanolni ekstrakti.....	122
5.2.2.2. Vodeni ekstrakti.....	126
5.3. Kvantitativna analiza ekstrakata.....	127
5.3.1. LC-MS kvantifikacija fenolnih jedinjenja.....	127
5.3.2. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih flavonoida.....	132

5.4. Biološka aktivnost ekstrakata	133
5.4.1. Antioksidantna aktivnost	133
5.4.2. COX/LOX inhibitorna aktivnost	138
5.4.3. Citotoksičnost	141
6. Zaključak.....	145
7. Reference.....	151
8. Prilozi	165
8.1. Podaci o uzorcima.....	167
8.2. Mapa lokaliteta	171
8.3. GC-MS – standard za Kovats indekse	172
8.4. GC-MS hromatogrami etarskih ulja	173
8.5. Rezultati GC-MS analize etarskih ulja	175
8.6. GC-MS – kalibracija za Kovats indekse (headspace).....	177
8.7. Headspace GC-MS hromatogrami.....	178
8.8. Rezultati headspace-GC-MS analize	203
8.9. GC-MS – uticaj faze razvoja na sastav isparljivih komponenti	235
8.10. PCA rezultata headspace-GC-MS analize	238
8.11. LC-DAD-MS hromatogrami 70 % MeOH ekstrakata.....	254
8.12. LC-MS hromatogrami vodenih ekstrakata	283
8.13. LC-MS – poređenje profila fenolâ u korenu i herbi	286
8.14. ESI-MS ² i UV spektri hlorogenskih kiselina.....	287
8.15. UV spektri flavonoida.....	290
8.16. LC-MS i LC-MS-MS kvantitacija – MS ² spektri standarda.....	293
8.17. LC-MS i LC-MS-MS kvantitacija – optimizacija MS parametara.....	298
8.18. LC-MS i LC-MS-MS kvantitacija – kalibracione krive	303
8.19. Rezultati testa na ukupne flavonoide	321
8.20. DPPH test – krive doza-odgovor	324
8.21. Rezultati FRAP testa.....	343
8.22. Antiinflamatorna aktivnost – krive doza-odgovor.....	346
8.23. Citotoksičnost – krive doza-odgovor.....	349
Korišćene skraćénice	365

1. Uvod

Familija Apiaceae (Umbelliferae) obuhvata između 3000 i 3700 vrsta podeljenih u 300-450 rodova (tačan broj je predmet diskusije, pošto još uvek ne postoji definitivno prihvaćena klasifikacija ove familije). Biljke ove familije, kako samonikle tako i kultivisane, od davnina imaju svoje mesto u čovekovoj ishrani i tradicionalnoj medicini. Značajni predstavnici uključuju jestive, začinske i lekovite biljke: šargarepu (*Daucus carota* L.), celer (*Apium graveolens* L.), peršun (*Petroselinum crispum*), paštrnak (*Pastinaca sativa* L.), mirođiju (*Anethum graveolens* L.), morač (*Foeniculum vulgare* Mill.), anis (*Pimpinella anisum* L.), kim (*Carum carvi* L.), korijander (*Coriandrum sativum* L.), kumin ili indijski kim (*Cuminum cyminum* L.), baštensku krasuljicu (*Anthriscus cerefolium* (L.) Hoffm.), anđeliku (*Angelica* spp.) itd. [1]. Dok su brojne vrste familije Apiaceae fitohemijski i farmakološki okarakterisane, i imaju primenu u oficijelnoj medicini, o mnogima nema podataka ili su oni veoma oskudni. Među slabo ispitane spadaju i samonikle vrste iz tribusa Scandiceae odabrane kao predmet istraživanja obuhvaćenog ovom tezom: *Anthriscus sylvestris* (L.) Hoffm., *Anthriscus cerefolium* (L.) Hoffm., *Chaerophyllum bulbosum* L., *Chaerophyllum hirsutum* L., *Chaerophyllum temulentum* L. i *Scandix pecten-veneris* L. Sam tribus Scandiceae sadrži 70-90 vrsta, od kojih više njih ima značaj (doduše, ograničen) u ishrani ili tradicionalnoj medicini, dok za sada nemaju primenu u oficijelnoj medicini i ne pominju se u farmakopejama. U Evropi, najpoznatiji predstavnik je verovatno baštenska krasuljica (*A. cerefolium*), koja se zahvaljujući intenzivnoj aromi sličnoj anisu koristi u ishrani, naročito kao sastojak tzv. *finest herbes* začina (zajedno sa peršunom, estragonom, vlašcem i ponekad majoranom, matičnjakom i kres salatom) koji je neizostavni deo franuske kuhinje [2]. Ova vrsta ima ograničenu primenu i u tradicionalnoj medicini, za čišćenje krvi, u vidu maski i losiona za čišćenje kože, za kupanje trudnica, kao digestiv, antihipertenziv, dijaforetik, diuretik i tonik. Dok *A. sylvestris* u današnje vreme u Evropi i Americi nema primenu (sem ornamentalnog „raven's wing” varijeteta sa ljubičastim listovima), i smatra se korovskom i invazivnom biljkom, na dalekom istoku (Kina, Japan, Koreja) ova vrsta predstavlja deo tradicionalne medicine (kao antitusik, antipiretik, analgetik, diuretik, hematinik i tonik) i ishrane [3–6]. Nekoliko vrsta roda *Chaerophyllum* takođe imaju vrlo ograničenu primenu u ishrani i narodnoj medicini [7, 8].

Uprkos komercijalnom značaju, primeni i rasprostranjenosti, hemijski sastav i aktivnost pripadnika tribusa Scandiceae slabo su poznati. Velika većina publikacija odnosi se na frakcionisanje i kvalitativnu analizu ekstrakata jednog od najpoznatijih predstavnika – *Anthriscus sylvestris*, u kome je identifikovan veliki broj jedinjenja sa dokazanom biološkom aktivnošću, pretežno lignana, kumarina i poliacetilena [3–7, 10–15], ali bez informacija o relativnom udelu. Savremene hromatografske tehnike veoma su retko primenjivane [5, 12], i mnogi autori se još uvek pozivaju na zastarele radove objavljene na japanskom jeziku [13, 16, 17]. Ovo za posledicu ima navođenje jedinjenja diskutabilnog identiteta (kao što je izoantricin, za koga se pretpostavlja da zapravo predstavlja deoksipikropodofilotoksin onečišćen hidrolizovanim laktonom), kao i kasno otkrivanje nekih od dominantnih komponenti (silvestrin [4]). Podaci o sastavu ekstrakata ostalih vrsta vrlo su ograničeni, i svode se na identifikaciju po nekoliko jedinjenja u *Chaerophyllum hirsutum* [18, 19] i *Anthriscus cerefolium* [2, 20]. S druge strane, sastav volatilnih komponenti odn. etarskih ulja detaljnije je ispitan je za brojne vrste, uključujući *Anthriscus sylvestris* [16, 17, 21], *Anthriscus cerefolium* [22], *Anthriscus nemorosa* [23], *Ch. aromaticum* [24], *Ch. aureum* [1], *Ch. azoricum* [25], *Ch. byzantinum* [26], *Ch. hirsutum* [1], *Ch. libanoticum* [7], *Ch. macropodium* [27] i *Ch. temulentum* [1].

Određeni lignani, uključujući podofilotoksin, kao i njihovi komercijalni semisintetički derivati etopozid, etofos i tenipozid, pokazali su izrazitu citotoksičnost i antitumorsku aktivnost. Ova jedinjenja se trenutno izoluju iz biljaka roda *Podophyllum* (*P. peltatum* i *P. hexandrum*, Berberidaceae) čija je ograničena dostupnost usled intenzivne eksploatacije i odsustva kultivacije, kao i visoka cena totalne sinteze, dovela do potrebe za pronalaženjem alternativnih izvora. Idealni izvor bila bi brzo rastuća biljka laka za kultivaciju, sa visokim sadržajem lignana, po mogućnosti u

herbi [5]. Alternativni pristupi – biokonverzija u ćelijskim kulturama sa odgovarajućim lignan-sintetišućim enzimima, kao i semisintetička proizvodnja – takođe su predmet skorašnjih istraživanja [11, 28, 29]. Ranijim istraživanjima [4, 9–12, 14] utvrđeno je da je *A. sylvestris* bogat izvor fenolnih jedinjenja iz klase lignana: angeloil-podofilotoksina i biogenetskih prekursora podofilotoksina – jateina, deoksipodofilotoksina itd., dok je u ostalim vrstama do sada pronađen samo mali broj ovih jedinjenja (nemerozin, deoksipodofilotoksin i jatein u *Chaerophyllum aureum* [30], deoksipodofilotoksin u nekim uzorcima *Anthriscus cerefolium* [20], herohirzutin A i B u *Chaerophyllum hirsutum* [18, 31] i herofilin (kerofilin) u *Chaerophyllum maculatum* [31, 32]. Sadržaj lignana u većini vrsta obuhvaćenih ovom tezom do sada nije ispitivan, čemu sigurno doprinosi i nedostupnost komercijalnih standarda.

Oskudnost informacija o hemijskom sastavu vrsta tribusa Scandiceae motivisala je prvi deo istraživanja obuhvaćenih ovom tezom – identifikaciju i, koliko to dostupnost referentnih standarda dopušta, kvantifikaciju dominantnih komponenti ekstrakata odabranih vrsta korišćenjem tečne hromatografije kuplovane sa UV/VIS i tandemskom masenospektrometrijskom detekcijom. Poseban naglasak biće stavljen na jedinjenja sa potencijalnom biološkom aktivnošću – lignane, flavonoide, fenolne kiseline i derivate. Ispitivanje sastava ekstrakata, kao i volatilnih komponenti odn. etarskih ulja doprineće i definisanju hemotaksonomskih markera i boljem razumevanju evolucionih odnosa unutar tribusa.

Dosadašnja istraživanja ukazuju na značajan potencijal vrsta tribusa Scandiceae kao izvora niza bioaktivnih sekundarnih biomolekula. Pored uobičajenih terpenoida, flavonoida [2, 6, 19, 33–35] i fenolnih kiselina [3, 9, 10, 13, 15–19, 22, 25, 30, 31], mnoge od ispitivanih vrsta bogate su lignanima (pretežno dibenzobutirolaktonskim i ariltetralinskim) [4, 9–12, 14, 20, 30–32], alifatičnim C₁₇-poliacetilenima [9, 10, 14, 18, 30, 31, 36], prostim kumarinima i furanokumarinima [4, 18, 31]. Primena ovih vrsta u tradicionalnoj medicini takođe ukazuje na njihovu značajnu biološku aktivnost. Uprkos tome, detaljna farmakološka *in vivo* ispitivanja nisu sprovedena. Svi do sada objavljeni rezultati odnose se na *in vitro* ili *ex vivo* istraživanja, pri čemu je većina vezana za antiproliferativno dejstvo ekstrakta *Anthriscus sylvestris* ili njegove najaktivnije komponente – deoksipodofilotoksina [4, 9, 10, 14, 18, 30, 37]. Stoga, drugi deo ove teze daće doprinos boljem poznavanju biološkog dejstva navedenih šest samoniklih vrsta i, koliko to bude moguće, jedinjenja odgovornih za uočenu aktivnost. Istraživanja će obuhvatiti dejstvo na preživljavanje i proliferaciju odabranih ćelijskih linija kancera, inhibitorno dejstvo na enzime koji učestvuju u konverziji arahidonske kiseline u medijatore inflamacije (bitne i u razvoju kancera) – ciklooksigenazu-1 i 12-lipooksigenazu, kao i antioksidantnu aktivnost, koja ne mora biti primarni mehanizam lekovitog dejstva ali može pružiti dodatne pozitivne (protektivno-reparatorne) efekte po zdravlje.

2. Cilj istraživanja

Ciljevi istraživanja obuhvaćenih doktorskom disertacijom su:

- Identifikacija i semikvantitacija volatilnih komponenti (terpenoida, fenilpropanoida i neterpenoidnih alifatičnih jedinjenja) odabranih vrsta tribusa Scandiceae sa teritorije Srbije, Crne Gore i Bosne i Hercegovine, uključujući:
 - raspodelu jedinjenja po biljnim organima,
 - kvalitativne i kvantitativne promene u toku razvoja, i
 - značaj pojedinačnih jedinjenja i klasa jedinjenja kao hemotaksonomskih markera.

- Identifikacija i semikvantitacija/kvantitacija ekstraktibilnih fenolnih komponenti (lignana, fenolnih kiselina, kumarina, flavonoida) korišćenjem spektrofotometrijskih i tečnehromatografskih metoda, sa posebnim osvrtom na:
 - utvrđivanje potencijala ispitivanih biljaka kao izvora antiproliferativnih lignana,
 - utvrđivanje hemotaksonomskog značaja detektovanih fenolnih jedinjenja.

- Ispitivanje biohemijske aktivnosti ekstrakata:
 - *in vitro* određivanje antioksidantnog potencijala, u smislu sposobnosti hvatanja slobodnih radikala i redukcionog kapaciteta,
 - *ex vivo* određivanje antiinflamatorne/proinflamatorne aktivnosti, putem merenja stepena inhibicije 12-lipooksigenaze i ciklooksigenaze-1 u trombocitima, i
 - *ex vivo* određivanje antiproliferativne aktivnosti prema odabranim ćelijskim linijama kancera i zdravim ćelijama.

3. Opšti deo

3.1. SISTEMATSKA PRIPADNOST VRSTA TRIBUSA SCANDICEAE

3.1.1. FAMILIJA APIACEAE LINDLEY

Familija Apiaceae (Umbeliferae Juss. 1789) obuhvata oko 300 rodova i preko 3000 većinom aromatičnih vrsta, rasprostranjenih po čitavoj planeti. I pored gotovo kosmopolitskog rasprostranjenja familije, većina rodova raste u severnoj umerenoj zoni, sa posebno razvijenim centrom diverziteta u Mediteranskom i Irano-Turanskom regionu [38–40].

Predstavnici ove familije uglavnom su jedno- ili dvogodišnje, nešto ređe višegodišnje zeljaste biljke, dok se kao polužbunovi vrlo retko javljaju. Stabljika je većinom sa šupljim inernodijama, različite visine (i do 3 m), prečnika i do 5 cm. Listovi su uglavnom naizmenično, ređe naspramno raspoređeni, obično krupni, i to naročito prizemni i oni pri osnovi stabljike. Najčešće su jednom ili više puta perasto deljeni na različite načine, pa isečci mogu biti različitog oblika, veoma retko su celi ili usečeni. Lisna drška ili liska pri osnovi prelaze u lisni rukavac koji obuhvata stabljiku. Cvetovi su sitni, najčešće dvopolni, većinom aktinomorfni, po obodu štita često zigomorfni. Grupisani su ili u proste štitove (štitici) ili složene štitove (štitovi), gde se bočne grane prvog reda završavaju prostim štitovima. Ispod glavnog štita može biti razvijen manji ili veći broj priperaka, obrazujući involukrum, a ispod štitica involucelum. Cvetovi se sastoje iz 5 čašičnih i 5 kruničnih listića, 5 prašnika i 2 oplodna listića, koji grade podcvetan plodnik. Krunični listići su slobodni, po obodu dvorežnjeviti ili usečeni, ređe celi. Plod je šizokarpijum, koji se, kada je zreo, raspada u dva jednosemena merikarpijuma, koji su izvesno vreme vezani za karpofor. Plodići su sa unutrašnje-ventralne strane većinom spljošteni, a sa spoljašnje-dorzalne ispupčeni. Na svakom plodiću nalazi se obično po 5 glavnih rebara, a često se između javljaju i sporedna. U perikarpu se između glavnih rebara u brazdama, ređe i ispod glavnih rebara, a nekad i na ventralnoj strani, nalaze kanali sa etarskim uljem. Seme često prirasta za zid plodnika [39].

Intrafamilijarnom podelom prema Taktadžanu [38] jasno su definisane dve podfamilije. Predstavnici podfamilije Saniculoideae grupisani su u dva tribusa: Saniculae i Lagoecieae. Predstavnici tipične podfamilije, Apioideae podeljeni su u veći broj tribusa sa različitim brojem rodova: Apiae, Scandiceae, Angelicae, Peucedanae, Echinopohorae, Caucalidae, Coriandrae, Smyrniae, Hohenackieriae, Pyramidopterae, Tordyliae i Laserpitiae. Iako su najpoznatije lekovite biljke ove familije uglavnom svrstane u tribuse Apiae (*Apium*, *Petroselinum*, *Ammi*, *Carum*, *Pimpinella*, *Foeniculum*), Coriandrae (*Coriandrum*), Angelicae (*Angelica*), Peucedanae (*Anethum*) i Tordyliae (*Pastinaca*, *Heracleum*), i svi ostali rodovi, obzirom na sličan hemijski sastav (etarsko ulje, flavonoidi, kumarini) mogu predstavljati značajan potencijal za farmaceutsku industriju. Tribus Scandiceae je jedna od grupa sa skromnijim brojem rodova, obuhvata rodove *Physocaulis*, *Chaerophyllum*, *Grammosciadium*, *Anthriscus*, *Scandix*, *Krasnowia*, itd. [41, 42].

Iako je znatan broj rodova familije Apiaceae precizno taksonomski grupisan, sistematika određenog broja rodova, samim tim i broja vrsta, pogotovo u tribusima Scandiceae, Caucalideae, Smyrniae i nosećem tribusu Apieae, još uvek je otvoreno pitanje zbog velikog broja taksona koji su tokom proteklih godina menjali taksonomski status i infrageneričku poziciju. Među pojedinim autorima postoje neslaganja u pogledu taksona koje tribusi obuhvataju, a i u istraživanjima istih autora često pojedini rodovi menjaju svoj infragenerički status [42–45]. Većina predstavnika su polimorfne vrste, pri čemu polimorfizam zahvata pre svega oblik i stepen deljenosti lista, stepen dlakavosti, karakter cveta, involukruma i involuceluma, morfologiju ploda, odnosno glavne karaktere koji se koriste u determinaciji. Često su za preciznu identifikaciju ovih taksona potrebni svi delovi biljke, a u većini slučajeva čak i delovi koji pripadaju različitim fenofazama (cvet, plod), pa je zbog toga sistematika ovih taksona vrlo složena, a determinacija teška [38–40].

U „Flori SR Srbije“ opisana su tri roda tribusa Scandiceae, *Chaerophyllum*, *Anthriscus* i *Scandix*, a svaki rod obuhvata veći broj veoma varijabilnih vrsta koje se dalje uglavnom dele na određen broj podvrsta, varijeteta ili formi [39, 46–48]. Međutim, u Flori Evrope [40, 49–51] se u okviru rodova izdvajaju još i grupe iz kojih se zatim izdvajaju niži taksoni. Pored toga, u brojnoj literaturi se pojedine vrste, ali i navedeni rodovi preklapaju, a za većinu „nebotaničkih“ (hemijskih,

biohemijskih, farmakoloških) ispitivanja nije data jasna sistematska pripadnost ispitivanog taksona [2, 3].

3.1.2. ROD *ANTRISCUS* PERS. (SYN. *CEREFOLIUM* HALL. 1768 I *CHAEREFOLIUM* HALL.)

Rod *Anthriscus* obuhvata jednogodišnje (*A. cerefolium* i *A. caucalis*), dvo- ili višegodišnje biljke (*A. sylvestris*, *A. nemorosa*, *A. nitidus* i *A. fumarioides*), golog ili više-manje dlakavog stabla. Međutim, stabljika može biti maljava ili čekinjasto dlakava i samo pri osnovi stabla (*A. sylvestris*, *A. nemorosa*, *A. nitidus*) ili ispod nodusa (*A. cerefolium*), uglavnom je šuplja, okrugla, uzdužno prugasta ili izbrazdana, razgranata od osnove (*A. nemorosa*) ili samo u gornjem delu (*A. sylvestris*). Listovi su 2-3 puta perasto deljeni, goli ili potpuno prekriveni mehaničkim dlakama (*A. sylvestris*), a u većini slučajeva dlakavi samo po obodu i na naličju (*A. cerefolium*, *A. nemorosa*, *A. caucalis*, *A. nitidus*, *A. fumarioides*). Najčešće su gornji listovi sedeći, a donji na kraćim ili dužim drškama. Involukrum kod većine predstavnika najčešće ne postoji (*A. sylvestris*, *A. cerefolium*, *A. caucalis*, *A. nitidus*, *A. fumarioides*, *A. nemorosa*) ili je sastavljen iz 1-2 listića (*A. nemorosa*). Involucelum čini 2-5 (*A. cerefolium* i *A. caucalis*) ili većinom 5 lancetastih do eliptičnih listića (*A. sylvestris*, *A. nemorosa*, *A. nitidus* i *A. fumarioides*). Štitovi mogu biti sa 3-6 (*A. cerefolium* i *A. caucalis*), 8-16 (*A. sylvestris*, *A. nitidus* i *A. fumarioides*) ili 7-10 zrakova različite dužine (*A. nemorosa*). Cvetovi su hermafroditni i muški, a čašica je slabo izražena. Krunični listići su mali, goli, beli, zelenkasti ili žućkasti, spoljašnji ponekad veći. Plod može biti jajastog oblika (*A. caucalis*), izduženo ili linearno duguljast (*A. sylvestris*, *A. nemorosa*, *A. cerefolium*), go i gladak (*A. sylvestris*, *A. cerefolium*, *A. nitidus*) ili dlakav (*A. nemorosa*, *A. caucalis*, *A. fumarioides*), na vrhu često sužen. Merikarpijumi zaobljeni, sa 5 rebara uočljivih samo na vrhu, dok su brazde sa pojedinačnim, slabo izraženim kanalima sa etarskim uljem. Stilopodijum je kupastog oblika [39, 46–49].

Rod obuhvata oko 12 vrsta rasprostranjenih u Evroaziji, a na teritoriji Srbije raste šest vrsta, sistematizovanih u veći broj nižih taksonomskih kategorija [39, 46–48]:

A. sylvestris (L.) Hoffm. 1814 (syn. *Chearefolium silvestre* L. 1753)

A. nemorosa (M. B.) Spreng. 1813 (syn. *Chaerophyllum nemorosum* M. B. 1808 i *A. vandasii* Vel. 1889)

f. *nemorosa*

f. *pilosissima* (Schur) Todor 1958

A. cerefolium (L.) Hoffm. 1814 (syn. *Scandix cerefolium* L. 1753 i *Chaerefolium cerefolium* Chinz et Thell.)

var. *cerefolium*

var. *trichospermus* (Schult.) Endl. 1830 (syn. *Chaerophyllum trichosperma* Schult. 1814 i *A. trichosperma* Spreng. 1820)

A. caucalis M. B. 1808 (syn. *A. scandicina* (Web.) Mansf. 1939, *Caucalis scandicina* Web. 1780, *Scandix anthriscus* L. 1753 i *Chaerefolium anthriscus* (L.) Sch. Et Thell. 1926)

A. nitidus (Wahlenb.) Garcke 1865 (syn. *Chaerophyllum nitidum* Wahlbg. 1814 i *A. alpestris* Vimmer et Grab. 1827)

A. fumarioides (W. Et K.) Spreng. 1813 (syn. *Scandix fumarioides* W. Et K. 1808).

3.1.3. ROD *CHAEROPHYLLUM* L. 1753

Chaerophyllum je rod koji obuhvata jedno- do dvogodišnje (*Ch. coloratum*, *Ch. temulentum*), dvo- ili višegodišnje (*Ch. bulbosum*), odnosno višegodišnje biljke (*Ch. aromaticum*, *Ch. aureum*, *Ch. hirsutum*) sa uspravnom, razgranatom okruglom stabljikom, koja može biti prilično duboko izbrazdana (*Ch. aromaticum*) ili u donjem delu rebrasta a u gornjem prugasta (*Ch. aureum*). Neki put je sa ljubičastim ili tamnocrvenim pegama ili u donjem delu ljubičasto obojena (*Ch. aromaticum*, *Ch. temulentum*, *Ch. bulbosum*, *Ch. aureum*), na čvorovima malo ili jače naduvana, gola ili dlakava u potpunosti, odnosno samo pri osnovi. Listovi su 2-3 (3-4) puta perasto deljeni, mogu biti goli (*Ch. hirsutum*) ili pokriveni kraćim ili dužim dlakama (*Ch. aromaticum*, *Ch.*

temulentum, *Ch. hirsutum*), a neki put su gornji listovi goli a donji maljavni (*Ch. aureum*, *Ch. bulbosum*, *Ch. hirsutum*). Rukavac je, ako ga ima, najčešće izdužen, gornji listovi su često sedeći, a donji na kraćim ili užim drškama. Reznjevi lista mogu biti veliki, celi, po obodu testerasto nazubljeni dužine 2-6 cm (*Ch. aromaticum*), perasto usečeni ili perasto dvo- do trostruko deljeni (*Ch. coloratum*, *Ch. aureum*, *Ch. hirsutum*, *Ch. temulentum*, *Ch. bulbosum*). Cvetovi su hermafroditni i muški, nalaze se u složenom štitu. Zupci na čašici su neprimetni, a krunični listići obrnuto srcastog oblika, na vrhu uvijeni. Krunica može biti žute (*Ch. coloratum*), bele ili ružičaste boje (*Ch. aromaticum*, *Ch. hirsutum*, *Ch. bulbosum*, *Ch. aureum*, *Ch. temulentum*), sa listićima koji su goli (*Ch. aromaticum*, *Ch. coloratum*, *Ch. bulbosum*, *Ch. aureum*, *Ch. temulentum*) ili dlakavi (*Ch. hirsutum*). Involukrum najčešće ne postoji ili je sačinjen iz 1–2 listića, dok listovi involuceluma mogu biti lancetastog ili uzano lancetastog oblika, goli, potpuno ili samo po obodu dlakavi. Šizokarpijum je linearan ili duguljast, bočno spljošten, na vrhu bez šiljka. Plodići su sa 5 zaobljenih, jednakih rebara, a pojedinačni kanali sa etarskim uljem (5) locirani su u brazdama i sa ventralne strane merikarpijuma (2). Stubići su dugački [39, 48, 50].

Rod obuhvata oko 40 vrsta rasprostranjenih u Evropi, Aziji i Severnoj Americi, a na teritoriji Srbije raste šest vrsta, sistematizovanih u veći broj nižih taksonomskih kategorija [39, 49]:

Ch. aromaticum L. 1753 (syn. *Myrrhis aromatica* Spreng. 1820)

Ch. aureum L. 1762

var. *aureum*

f. *glabriusculum* Koch 1837 (syn. *Ch. maculatum* Willd. 1813, *Ch. aureum* var. *maculatum* Beck 1895 i *Myrrhis aurea* var. *maculatum* Maly 1908)

var. *balcanicum* (Vel.) Hayek 1927 (syn. *Ch. balcanicum* Vel. 1893 i *Ch. elegans* Vel. 1891)

Ch. temulentum L. 1753

Ch. bulbosum L. 1753

var. *bulbosum*

var. *tenuissimum* (Vel.) Hay. 1927 (syn. *Ch. bulbosum* ssp. *tenuissimum* Vel. 1891)

Ch. hirsutum L. 1753 (syn. *Ch. cicutaria* Vill. 1779, *Myrrhis hirsutum* Spr. 1818)

f. *hirsuta*

f. *umbrosum* (Jord.) Beauv. 1901 (syn. *Ch. umbrosum* Jord. 1849, *Ch. hirsutum* var. *umbrosum* Nym. 1879, *Myrrhis hirsuta* var. *glabra* K. Maly 1904)

Ch. coloratum L. 1767 (syn. *Myrrhis coloratum* Spr.)

3.1.4. ROD *SCANDIX* L. 1753

Rodu *Scandix* pripadaju jednogodišnje niske biljke, uglavnom sa tankim, vretenastim korenima. Stabljika je jednostavna ili već od osnove razgranata, uspravna ili se izdiže, prugasta, pri osnovi lisnih drški dlakava ili gola. Listovi su na lisnim drškama, 2–4 puta persto deljeni, sa dlakavim i po obodu opnastim rukavcem, goli ili proređeno dlakavi. Štitovi su uglavnom sa malim brojem zrakova, a vršni štitovi mogu imati 1–3 gola zraka. Involukruma najčešće nema, a listići involuceluma su eliptični ili lancetasti, često dvozubi ili perasto deljeni. Cvetovi su hermafroditni i muški, sa belim kruničnim listićima, koji po obodu nekada mogu biti i veći. Plod je uglavnom linerano izdužen, sa dugačkim kljunom, a merikarpijumi su sa 5 zatupastih, jednakih rebara. Brazde sa dorzalne strane su sa 1–3 kanala sa etarskim uljem, a sa ventralne strane locirana su još dva žlezdana kanala. Stubići su dužine stilopodijuma ili mnogo duži [39, 51].

Rod obuhvata oko 15 vrsta rasprostranjenih većinom u oblasti Sredozemlja, a na teritoriji Srbije raste samo jedna vrsta – *S. pecten-veneris* L. 1753. Literaturni podaci ukazuju na postojanje još i podvrste *S. australis* L. subsp. *balcanica* Vierh. [39], međutim, novija istraživanja ne ukazuju na prisustvo ovog taksona u flori Srbije.

3.1.5. ISPITIVANE VRSTE TRIBUSA SCANDICEAE

Anthriscus cerefolium (baštenska krbuljica, krasuljica, krbuljica, *eng.* garden chervil, common chervil, french parsley, *nem.* Kerbel) je jednogodišnja aromatična biljka visine 15–70 cm, rasprostranjena u srednjoj Evropi, Balkanskom poluostrvu, jugozapadnoj Aziji i evropskom delu Rusije, mada se usled gajenja proširila. Cveta u rano leto. Tipično raste po zapuštenim površinama, međama, pored puteva i sl. Herba ima karakterističan sladak, aromatičan miris, između peršuna i anisa.

Tačno poreklo imena nije poznato. Grčko ime ove biljke, *antriskon* (*ανθρυσκον*), *antriskos* ili *antriskion*, verovatno potiče od *antherix* (stabalce), zbog tankog stabla, ili *anthos* (cvet) i *rhyscos* (živica) jer se često nalazi u živim ogradama. *Cerefolium* može značiti „voskoliko lišće” i ukazivati na svetlozelenu boju, ali verovatnije predstavlja grešku u transkripciji latinskog imena *cherifolium* odn. grčkog *chairephyllon*, poreklom od grčkog *chairein* (uživati u) i *phyllon* (list), što se odnosi na prijatnu aromu i/ili izgled lišća.

Koren biljke je tanak, vretenast (Slika 3.1.). Stabljika je uspravna, tanka (2–5 mm), obično šuplja, razgranata, gola, maljava samo ispod čvorova, svetlosmeđa do zelena, ponekad sa purpurnim prugama. Listovi su meki, svetlozeleni, goli (dlakavi po obodu i na naličju po nervima), donji na drškama a gornji sedeći, 2–3 puta perasto deljeni, sa jajastim, perasto deljenim režnjevima. Štitovi su na dužim ili kraćim drškama (bočni su sedeći), sa 3–6 zrakova, ravni do blago konveksni, najčešće bez involukruma, sa involucelomom sastavljenim od 1–4 linearno-lancetasta listića, malim belim cvetovima i obrnuto jajastim kruničnim listićima. Plod je linearno-lancetast, sa izduženim vrhom, go ili dlakav [39, 52].

Anthriscus sylvestris (velika krbuljica, velika krasuljica, šumska krasuljica, *eng.* cow parsley, wild chervil), od lat. *sylvestris* ili *silvestris* (šumski), je dvogodišnja biljka visine 30–150 cm, koja je rasprostranjena u Evropi, zapadnoj Aziji i severnoj Africi, mada je počela da se širi i po Americi. Tipično raste na vlažnim i sunčanim mestima, livadama i šikarama. Veoma uobičajena brzo rastuća korovska biljka, često označena kao štetna i invazivna vrsta.

Koren je repasto zadebljan (Slika 3.2.). Stabljika je šuplja, uspravna, rebrasto izbrazdana, skoro gola (pri osnovi može biti dlakava), razgranata uglavnom u donjem delu. Listovi su trouglasti, 2–3 puta perasto deljeni, sa izduženo lancetastim, šiljatim, nazubljenim ili duboko usečenim režnjevima. Donji listovi su na drškama, a srednji i gornji sedeći, sa maljavim rukavcem. Štitovi imaju 8–16 zrakova jednake dužine, involukruma nema, involucelom čime 5–8 lancetastih do eliptičnih listića, krunični listići obrnuto jajasti, cvetovi mali beli. Plod je gladak, izduženo lancetast ili linearno-lancetast, dužine 5–7 mm, prema vrhu sužen [39].

Chaerophyllum bulbosum (velika šarena trstika, *eng.* turnip-rooted chervil, bulbous chervil, parsnip chervil) je dvogodišnja ili višegodišnja biljka, visine 50–200 cm, rasprostranjena u centralnoj i jugoistočnoj Evropi, na Kavkazu, u Maloj Aziji i Jermeniji. Raste po šikarama, vlažnim šumama, pored reka i potoka, pored puteva, po njivama, vinogradima, kamenjarima.

Karakteristično je krtolasto zadebljali koren (Slika 3.3.) Stabljika je uspravna, šuplja, razgranata (ispod čvorova naduvena), pri osnovi dlakava, u donjem delu ljubičasto obojena. Listovi su 2–4 puta perasto deljeni, donji na drškama, gornji sedeći, goli ili dlakavi, sa izduženim rukavcem. Štitovi sa 15–20 zrakova različite dužine, involukrum od jednog listića ili odsutan, involucelom od 5–6 lancetastih listića, krunični listići obrnuto jajasti. Plod dužine 5–7 mm, izbrazdan, go, linearno izdužen ili jajasto-cilindričan, pri vrhu izdužen [39].

Chaerophyllum hirsutum (čupava krbuljica, hrapava krbuljica, *eng.* hairy chervil) dostiže visinu 20–120 cm. Javlja se u srednjoj i južnoj Evropi i na Kavkazu. raste na zasenčenim mestima, vlažnim livadama, obalama, pored planinskih potoka.

Rizom je dug, člankovit, sa ostacima lisnih drški na gornjem delu. Stabljika je šuplja, okrugla, izblazdana, gola ili dlakava, uspravna ili delimično položena, u gornjem delu razgranata (Slika 3.4.). Listovi su trouglasti, 3–4 puta perasto deljeni, donji na dugim drškama, gornji najčešće sedeći,

sa rukavcem. Štitovi imaju 10–20 zrakova, involukrum od 1–2 listića ili odsutan, involucelum od 5–10 lancetastih listića, krunični listići beli, ružičasti ili svetlopurpurni, obrnuto jajasti. Plod je dug 6–10 mm, izduženo kupast ili linearan [39].

Chaerophyllum temulentum (crvenopegava trstika, otrovna krabljica, njišuća krabljica, *eng.* rough chervil, cow mumble, sheep's parsley) je jednogodišnja ili dvogodišnja biljka visine 30–100 cm. Rasprostranjena je u Evropi, zapadnoj Aziji i sverozapadnoj Africi. Raste po njivama, šikarama, međama, svetlim šumama.

Koren je vretenast (Slika 3.5.). Stabljika je uspravna, razgranata u gornjem delu, dlakava, često pokrivena tamnocrvenim ili ljubičastim pegama. Listovi su 2–3 puta perasto deljeni, dlakavi, bledezeleni ili sivozeleni, često sa mrkocrnim mrljama, donji na drškama, gornji sedeći sa izduženim rukavcem. Štitovi sa 6–12 dlakavih zrakova, involukrum od 1–2 listića ili odsutan, involucelum od 5–8 lancetastih listića, krunični listići beli, nejednaki. Plod izduženo valjkast, dužine 4–7 mm, gladak, često ljubičast [39].

Scandix pecten-veneris (češljika, venerina češljika, zmijin češalj, *eng.* shepherd's needle, venus-comb) je jednogodišnja biljka visine 15–20 cm, koja raste u Evropi po poljima, neobrađenim površinama i pored puteva.

Koren je tanak, vretenast (Slika 3.6.). Stabljika je jednostavna ili razgranata od osnove, prugasta, kod lisnih drški gola ili maljava. Listovi su na drškama, goli ili dlakavi, 3–4 puta perasto deljeni, sa lancetastim ili končastim režnjevima poslednjeg reda. Štitovi sa 1–3 najčešće gola zraka, bez involukruma, involucelum od većeg broja listića, oko 10 hermafroditnih i muških cvetova, beli krunični listići. Plod su dužine 2–8 cm, sa 3–4 puta dužim kljunom [39].



Slika 3.1. *Anthriscus cerefolium*
Thomé, O.W. (1885): Flora von Deutschland,
Österreich und der Schweiz



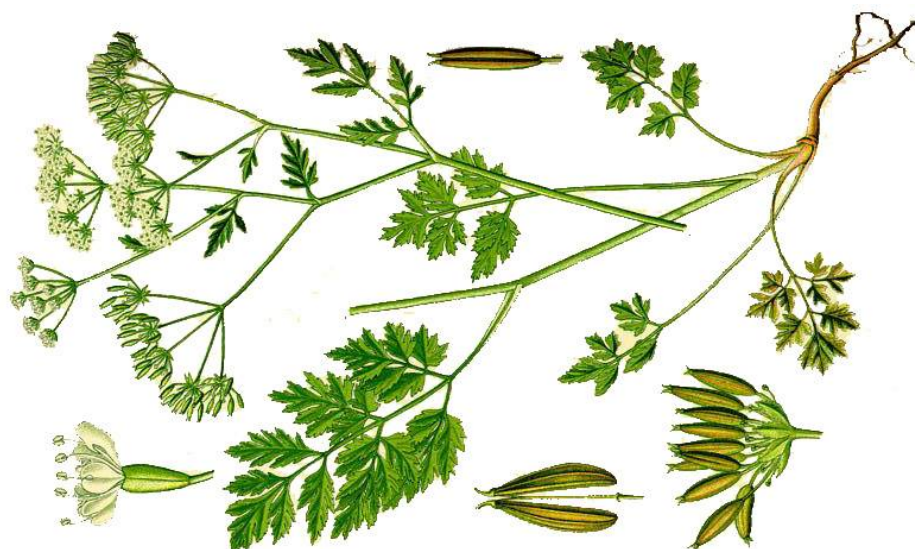
Slika 3.2. *Anthriscus sylvestris*
Köhler, F.E. (1887): Köhler's Medicinal-Plflanzen in
naturgetreuen Abbildungen mit kurz erläuterndem
Texte : Atlas zur Pharmacopoea germanica



Slika 3.3. *Chaerophyllum bulbosum*
Köhler, F.E. (1887): Köhler's Medicinal-Plflanzen in
naturgetreuen Abbildungen mit kurz erläuterndem
Texte : Atlas zur Pharmacopoea germanica



Slika 3.4. *Chaerophyllum hirsutum*



Slika 3.5. *Chaerophyllum temulentum*
Thomé, O.W. (1885): *Flora von Deutschland, Österreich und der Schweiz*



Slika 3.6. *Scandix pecten-veneris*
Thomé, O.W. (1885): *Flora von Deutschland, Österreich und der Schweiz*

3.2. VRSTA TRIBUSA SCANDICEAE U FITOFARMACIJI

3.2.1. FARMAKOLOŠKO DELOVANJE VRSTA TRIBUSA SCANDICEAE

Uprkos činjenici da neke od vrsta tribusa Scandiceae imaju svoje mesto u tradicionalnoj medicini, detaljna farmakološka *in vivo* ispitivanja nisu sprovedena – svi do sada objavljeni rezultati odnose se na *in vitro* ili *ex vivo* istraživanja, pri čemu je većina vezana za antiproliferativno dejstvo ekstrakta *Anthriscus sylvestris* ili njegove najaktivnije komponente – deoksipodofilotoksina.

Antiproliferativno dejstvo

Vrsta *Anthriscus sylvestris* najviše pažnje privlači zbog prisustva sekundarnih biomolekula sa antiproliferativnim svojstvima. Počevši od kasnih 1990-ih, objavljen je niz radova zasnovanih na frakcionisanju vođenom aktivnošću (*eng.* activity-guided fractionation) koje je, u kombinaciji sa spektrometrijskim metodama kao što su $^1\text{H-NMR}$ i $^{13}\text{C-NMR}$, omogućilo identifikaciju aktivnih principa. Ikeda i sar. [9, 10] utvrdili su prisustvo dveju potentnih antiproliferativnih komponenti u korenu i herbi – ariltetralinskih lignana deoksipodofilotoksina (ED_{50} prema tri ćelijske linije kancera 0,0005–0,0010 $\mu\text{g/mL}$) i podofilotoksina (ED_{50} 0,001–0,006 $\mu\text{g/mL}$). Pored njih, identifikovan je i niz jedinjenja sa višim ED_{50} , ali i dalje visokoaktivnih: dibenzobutirolaktoni jatein (0,3–0,8 $\mu\text{g/mL}$) i nemerozin (0,4–0,7 $\mu\text{g/mL}$), fenilpropeni antriskusin (2,1–3,0 $\mu\text{g/mL}$), antriscinol-metil-etar (2,4–2,9 $\mu\text{g/mL}$) i elemicin (2,0–4,5 $\mu\text{g/mL}$), i poliacetilen falkarindiol (3,2–21,4 $\mu\text{g/mL}$). Na osnovu sadržaja i vrednosti ED_{50} , zaključeno je da je kod herbe vrste *A. sylvestris* aktivni princip deoksipodofilotoksin (antricin) [9]. Lim i sar. [14] došli su do sličnih zaključaka. Jeong i sar. [4] dokazali su da metanolni ekstrakt *A. sylvestris* stimuliše aktivnost kaspaze-3 i fragmentaciju DNK u ćelijskoj liniji HL-60 (promijelocitna leukemija). Pokazano je da najaktivnija komponenta – deoksipodofilotoksin – indukuje apoptozu već pri nanomolarnim koncentracijama. Istovremeno, estar angeloil-podofilotoksin, i epimeri pikropodofilotoksin i deoksipikropodofilotoksin stimulisali su apoptozu pri mikromolarnim koncentracijama. Nezavisna istraživanja od strane Yonga i sar. [37] potvrdila su da deoksipodofilotoksin deluje putem vezivanja za tubulin (slično podofilotoksinu), blokiranjem ćelije u G2/M fazi (smanjenjem ekspresije ciklina A i stimulisanjem ekspresije ciklina B1, čime se remeti kontrola ćelijskog ciklusa), kao i putem iniciranja apoptoze (aktiviranjem kaspaze-3 ili -7).

Pored *A. sylvestris*, jedina vrsta tribusa Scandiceae ispitana na citotoksičnost je *Chaerophyllum hirsutum*. Dall'Acqua i sar. [18] utvrdili su da hloroformski ekstrakt korena pokazuje umerenu aktivnost prema LoVo/Doxo ćelijskoj liniji, sa ED_{50} od 57 $\mu\text{g/mL}$. Frakcionisanjem je izolovano pet komponenti aktivnih prema linijama HL-60, HT-1080, LoVo i (u nekim slučajevima) LoVo/Doxo: skopoletin, metil-kafeat, falkarindiol i lignani herohirzutin A i B. U većini slučajeva ED_{50} bio je reda 10^{-5} mol/L.

Antioksidantno dejstvo

S obzirom da je u vrstama tribusa Scandiceae do sada pronađen veliki broj fenolnih jedinjenja, ne iznenađuje da je kod svih ispitivanih vrsta utvrđena i umerena do snažna antioksidantna aktivnost.

Fejes i sar. [2, 43] ispitivali su antioksidantni potencijal ekstrakta *Anthriscus cerefolium* korišćenjem više *in vitro* testova. U prvom istraživanju [2], korišćeni su vodeni ekstrakti herbe i korena. Oba ekstrakta pokazala su značajnu sposobnost neutralizacije DPPH i OH radikala, helatacije Cu^{2+} , redukcije Fe^{3+} jona i inhibicije lipidne peroksidacije, pri čemu je ekstrakt herbe, bogatiji polifenolnim jedinjenjima, bio u svim testovima efikasniji od korena. U sklopu drugog istraživanja [43], potvrđena je sposobnost metanolnog ekstrakta herbe (dobijenog nakon prethodne sukcesivne ekstrakcije heksanom, hloroformom i etil-acetatom) da neutrališe OH radikale, kao i da inhibira lipidnu peroksidaciju u homogenatu mozga pacova, pri čemu je antilipoperoksidantna aktivnost bila veća nego kod referentnog jedinjenja – luteolin-7-*O*-glukozida.

Milovanović i sar. [6] određivali su antilipoperoksidantno dejstvo ekstrakta nadzemnih delova *Anthriscus sylvestris* u 70 % etanolu pomoću Schaal Oven testa i Rancimat testa. Utvrđeno je da pri nižim koncentracijama (0,02 %) ekstrakt pokazuje antioksidantnu aktivnost, mada značajno slabiju od referentne supstance – tokoferola. Pri višim koncentracijama (0,2 %), ekstrakt efikasnije inhibira lipidnu peroksidaciju od tokoferola, i ne dolazi do stvaranja merljivih količina isparljivih proizvoda degradacije. Izolovano je nekoliko jedinjenja za koje je pretpostavljeno da su nosioci aktivnosti: apigenin, kvercetin i rutin.

Istraživanja sprovedena od strane Dall'Acqua i sar. [19] pokazala su da metanolni ekstrakt *Chaerophyllum hirsutum* pokazuje slabu H-donorsku sposobnost, mereno DPPH testom, pri čemu je herba aktivnija od korena (EC₅₀ od 115 µg/mL i 220 µg/mL, respektivno, u odnosu na 4,8 µg/mL za referentnu supstancu – rutin). Ligoinski i hloroformski ekstrakt bili su manje aktivni od metanolnog. Frakcionisanje vođeno aktivnošću dalo je 6 jedinjenja odgovornih za antioksidantno dejstvo: flavonoidi 6-metilluteolin i luteolin-7-O-β-D-glukopiranozid, fenilpropanoidi – hlorogenska kiselina, ferulna kiselina i feruloil-6-O-β-D-glukopiranozid, i piron – maltol-β-D-glukopiranozid.

Antioksidantno dejstvo *Chaerophyllum macropodium* Boiss. ispitivali su Çoruh i sar. [54]. Izmerene IC₅₀ vrednosti u DPPH testu i testu lipidne peroksidacije iznosile su 0,623 mg/mL i 0,852 mg/mL, respektivno, što ukazuje na značano slabiju aktivnost od referentnih supstanci – kvercetina u slučaju DPPH testa, sa IC₅₀=0,0061 mg/mL, i α-tokoferola u slučaju lipidne peroksidacije, sa IC₅₀=0,23 mg/mL.

Dok se većina radova odnosi na aktivnost ekstrakata, Demirci i sar. [7] ispitivali su antioksidantni potencijal etarskog ulja plodova *Chaerophyllum libanoticum* Boiss. et Kotschy. Ulje je pokazivalo slabu aktivnost u testu ko-oksidacije β-karotena i linolne kiseline (aktivnost 17 %, u odnosu na 93 % kod BHT) i zanemarljivu sposobnost neutralizacije DPPH radikala (IC₅₀>30 mg/mL, u odnosu na 0,078 mg/mL kod BHT), što nije iznenađujuće, s obzirom na sastav (pretežno monoterpeni, malo seskviterpena, tragovi fenolnih jedinjenja).

Antiinflamatorno dejstvo

Ispitivanja antiinflamatornog dejstva vrsta tribusa Scandiceae do sada nisu sprovedena, uprkos činjenici da je do sada više istraživanja pokazalo aktivnost deoksipodofilotoksina izolovanog iz *A. sylvestris* [55, 56]. Lee i saradnici [56] istraživali su uticaj deoksipodofilotoksina (DPT) na ciklooksigenazu-1 i 2 (COX-1 i 2) u mastocitima iz koštane srži. Utvrđeno je da DPT inhibira konverziju arahidonske kiseline u PGD₂ pod dejstvom ova dva enzima, uz IC₅₀ vrednosti od 65,3 µmol/L i 1,89 µmol/L, respektivno. Odsustvo uticaja na ekspresiju COX-2 ukazuje na direktnu inhibiciju ovog enzima. Dalje, iz činjenice da je inhibirana i sinteza leukotriena C₄ (LTC₄), uz IC₅₀ od 0,37 µmol/L, može se zaključiti da DPT deluje i na 5-lipooksigenazu (5-LOX). Jin i sar. [55] ispitivali su uticaj DPT na ekspresiju inducibilne NO sintaze (iNOS) u RAW264.7 ćelijama (ćelije slične makrofagima). Pokazano je da DPT inhibira degradaciju IκBα, kao i transport p65 podjedinice NF-κB u jedro. IκBα je inaktivna forma NF-κB, iz koje se on oslobađa fosforilacijom i degradacijom, transportuje u jedro, vezuje za DNK i aktivira ekspresiju proteina uključenih u imuni i inflamatorni odgovor, uključujući i iNOS. Na ovaj način, DPT dovodi do smanjenja koncentracije NO i supresije inflamacije.

Antimikrobno dejstvo

Antimikrobno dejstvo utvrđeno je kod nekoliko vrsta roda *Chaerophyllum*. Rollinger i saradnici [30] potvrdili su dejstvo sirovog metilen-hloridnog ekstrakta korena *Chaerophyllum aureum* na *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* i *Streptococcus pyogenes*. U cilju identifikacije aktivnih komponenti, primenjena je tankoslojna hromatografija kombinovana sa bioautografijom. Pokazano je da glavna komponenta ekstrakta – falkarindiol – inhibira rast svih ispitivanih mikroorganizama sem jednog soja *E. coli*, dok je falkarinol delovao samo na *Streptococcus pyogenes*. *In vitro* ispitivanjima utvrđeno je i umereno do jako inhibitorno dejstvo etarskog ulja *Chaerophyllum byzantinum* na niz gljivica roda *Candida*: *C. albicans*, *C.*

zeylanoides, *C. parapsilosis*, *C. dubliniensis*, *C. glabrata* i *C. tropicalis*, uz minimalnu inhibitornu koncentraciju od 0,125–1 mg/mL [26], kao i slabo do umereno dejstvo etarskog ulja *Chaerophyllum libanoticum* na gljivicu *Candida albicans* i niz gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterija, uključujući *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis* i *Staphylococcus aureus* [7].

3.2.2. PRIMENA VRSTA TRIBUSA SCANDICEAE

Vrste tribusa Scandiceae za sada nemaju primenu u oficijelnoj medicini, i ne pominju se u farmakopejama. Međutim, niz vrsta našao je primenu, doduše ograničenu, u tradicionalnoj medicini i u ishrani.

Iako je dokumentovana i primena u fitofarmaciji (kao *cerefolii herba*), *Anthriscus cerefolium* se prvenstveno koristi za ishranu zahvaljujući intenzivnoj aromi, između peršuna i anisa [2]. Biljka je naročito popularna u francuskoj kuhinji, gde je (uz peršun, estragon, vlasac i ponekad majoran, matičnjak, kres salata) sastojak tzv. *fines herbes* začina. U narodnoj medicini, koristi se za čišćenje krvi, u vidu maski i losiona za čišćenje kože, a trudnice su se kupale u infuzu. Herba je primenjivana je i kao ekspektorans, digestiv, antihipertenziv, dijaforetik, diuretik i gorki tonik.

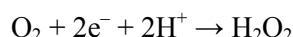
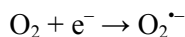
Koren *A. sylvestris* koristi se u koreanskoj tradicionalnoj medicini kao antitusik, antipiretik, analgetik i diuretik [4, 56]. Pretpostavlja se da mehanizam dejstva bar delom uključuje dvojni inhibiciju COX-2 i 5-LOX od strane deoksipodofilotoksina [56]. Ista droga, pod imenom „E Shen“ primenjuje se u Kini kao hematinik i tonik, a pod imenom „Zengo“ ranije je korišćena i u Japanu [3, 6]. Danas se *A. sylvestris* u Japanu koristi za ishranu, u vidu natopljenog i zatim sprasjenog korena i, ređe, mladih nadzemnih delova [3, 6].

Koren *Chaerophyllum bulbosum* se u 19. veku intenzivno koristio kao povrće; u današnje vreme, koristi se samo u francuskoj kuhinju, kao sastojak čorbi i drugih kuvanih jela. U Turskoj, *Chaerophyllum macropodum* ima primenu kao začin, dok se stabljika *Chaerophyllum libanoticum* koristi kao hrana [7]. Kod plemenskih zajednica na Himalajima, korenje i listovi *Chaerophyllum villosum*, lokalno poznatog kao Shigu-Zera, direktno se konzumiraju u cilju lečenja abdominalnih bolova izazvanih nazebom. Moguće je da se aktivnost može pripisati prisutnim terpenoidima – β -pinenu, 3-karenu i β -felandrenu, kao i steroidu – sitosterolu [8].

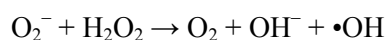
3.3. MOLEKULSKE OSNOVE BOLESTI

3.3.1. OKSIDATIVNI STRES

Dok je kod svih aerobnih organizama kiseonik esencijalan za preživljavanje, u slučaju neadekvatnog metabolisanja on zahvaljujući visokoj reaktivnosti (usled biradikalske strukture) postaje toksičan po organizam. Kod sisara, najveći deo ATP sintetiše se u mitohondrijalnom elektron-transportnom sistemu, pri čemu dolazi do kontrolisane četvoroelektronske redukcije O₂ do H₂O na citohrom-oksidazi. Međutim, u slučaju redukcije sa manje od 4 elektrona (što se dešava sa 3–5 % O₂) dolazi do stvaranja različitih reaktivnih oblika kiseonika (ROS) koje mogu biti štetni po ćeliju [57]:



Reakcijom O₂^{·-} sa vodonik-peroksidom u Haber-Weiss-reakciji nastaje veoma toksični hidroksi-radikal:



Hidroksi-radikal može nastati i u Fentonovoj reakciji, odn. raspadanju vodonik-peroksida u prisustvu Fe²⁺ jona kao katalizatora:



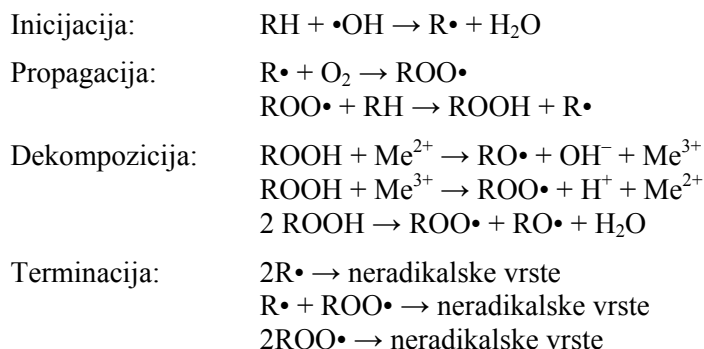
Pored nepotpune redukcije kiseonika u elektron-transportnom sistemu, slobodni radikali i drugi ROS mogu se generisati i drugim enzimskim i neenzimskim mehanizmima, uključujući jonizujuće zračenje (putem homolitičkog raskidanja O–H veze u vodi i drugih veza), toksične ksenobiotike, inflamatorne procese, imuni odgovor (sinteza O₂^{·-}, HOCl i NO od strane fagocita), jone prelaznih metala, aktivnost redoks-enzima (ksantin-oksidge, NADPH oksidge), metabolizam membranskih lipida itd. Citohrom P450-zavisni enzimi, uključeni u jednoelektronske redoks-reakcije, predstavljaju jedan od glavnih izvora „curenja” slobodnih radikala; indukcija ovih enzima pod dejstvom ksenobiotika (alkohol, lekovi, toksini) povećava verovatnoću slučajnog generisanja i oslobađanja ROS. Kod niza oksidaza iz peroksizoma, mitohondrija i endoplazmatičnog retikuluma H₂O₂ i lipidni peroksidi predstavljaju glavne proizvode reakcija.

Najznačajniji ROS uključuju radikalske vrste, kao što su superoksid-anjon (O₂^{·-}), hidroksi-radikal (·OH), peroksi-radikale (ROO·) i alkoksi-radikale (RO·), kao i neradikalske vrste – vodonik-peroksid (H₂O₂), hipohloritnu kiselinu (HOCl), singlet-kiseonik (¹O₂) i ozon (O₃). Najpotentniji je hidroksi-radikal, koji je sposoban da inicira lipidnu peroksidaciju i direktno se adira na druga jedinjenja. Superoksid-anjon je takođe veoma reaktivan, ali mu je radijus dejstva zbog slabe liposolubilnosti ograničen. Vodonik-peroksid ne ispoljava sam snažna oksidaciona svojstva, ali pod dejstvom jona prelaznih metala (Fe²⁺, Cu⁺) generiše visokoreaktivni ·OH. Zbog liposolubilnosti lako difunduje kroz biološke membrane i prodire do ćelijskih odeljaka bogatih prelaznim metalima., kao što su mitohondrije.

Još jedna važna grupa toksičnih vrsta su reaktivni oblici azota (RNS, RNOS). U reakciji azot(II)-oksida (generisanog u većim količinama od strane NO sintaze u toku inflamatornih procesa) sa superoksidom nastaje peroksinitritni anjon (ONOO⁻), visokoreaktivna čestica koja lako reaguje sa biomolekulima i dovodi do njihovog oštećenja (oksidacije tiola i tioetara, nitrovanja i hidroksilacije aromatičnih jedinjenja uključujući aminokiseline i azotne baze, raskidanja lanaca DNK itd.) [58]. Ova grupa jedinjenja uključena je u razvoj neurodegenerativnih bolesti (kao što je parkinsonizam) i hroničnih inflamatornih obolenja (reumatoidni artritis).

ROS i RNS dovode do oštećenja ćelijskih lipida, proteina, ugljenih hidrata i DNK, sa posledicama koje mogu varirati od smrti ćelije do neoplazija. Jedan od najčešćih procesa je lipidna peroksidacija, odn. slobodnoradikalska oksidacija polinezasićenih masnih kiselina. Reakcija započinje apstrakcijom protona sa molekula lipida, npr. pod dejstvom ·OH, pri čemu nastaju

slobodni ugljenik-centrirani radikali sa konjugovanim dvostrukim vezama. Slobodni kiseonik može reagovati sa ovakvim radikalima, gradeći peroksi-radikale koji dalje mogu reagovati sa drugim molekulima polinezasićenih masnih kiselina:



U ovako formiranoj lančanoj reakciji, naročito u slučaju gusto pakovanih bioloških membrana, dolazi do oštećenja velikog broja molekula lipida [57]. Pored narušavanja strukture i funkcije membrane (što u slučaju mitohondrijalne membrane može dovesti do dalje produkcije slobodnih radikala), aldehidi nastali u reakciji mogu dovesti do unakrsnog povezivanja molekula proteina. Što se proteina tiče, aminokiseline prolin, histidin, arginin, cistein i metionin naročito su podložne napadu $\bullet OH$ i oksidativnim oštećenjima. Posledica je fragmentacija ili unakrsno povezivanje, što dovodi do gubitka funkcije. Dejstvo ROS na DNK obuhvata promene u azotnim bazama i raskidanje polinukleotidnih lanaca.

Implicirana je uloga ROS u preko 100 obolenja (kao primarni uzrok bolesti ili faktor koji dovodi do komplikacija), uključujući kardiovaskularne i neurodegenerativne bolesti (ateroskleroza, Alchajmerova bolest, Parkinsonovu bolest, Daunov sindrom), multiplu sklerozu, dijabetes, akutnu renalna insuficijencija, kao i u procesu starenja. Na primer, oksidacija lipoproteina male gustine (LDL) smatra se ključnim faktorom u patogenezi ateroskleroze i vaskularne disfunkcije [57].

S obzirom na stalnu izloženost ovim potentnim oksidansima koji mogu dovesti do ozbiljnih oštećenja tkiva, ne iznenađuje činjenica da organizam poseduje niz sistema za zaštitu i njihovu neutralizaciju. Mehanizmi zaštite obuhvataju kompartmentalizaciju proizvodnje slobodnih radikala, zaštitne enzime (kao što je superoksid-dizmutaza koja razara O_2^-), endogene i egzogene antioksidanse (tokoferoli, askorbinska kiselina, karotenoidi, melatonin, urat itd), vezivanje metalnih jona (npr. vezivanje Fe u kompleks sa feritinom), i reparacione procese. Tipično lokacija različitih zaštitnih sistema u ćeliji odgovara tipu i količini ROS koje se generišu u datom odeljku. Superoksid dizmutaza (SOD) kao primarni odbrambeni sistem prisutna je u mitohondrijama, citosolu i ekstracelularnom prostoru. Katalaza, čija je funkcija uklanjanje H_2O_2 , prvenstveno se nalazi u peroksizomima, dok sistem glutation/glutation peroksidaza/glutation reduktaza ima funkciju uklanjanja H_2O_2 formiranog van peroksizoma i očuvanja integriteta bioloških membrana i prisutan je u citosolu i mitohondrijama.

Naročito u savremenom svetu, endogeni protektivni sistemi mogu biti nedovoljni za odbranu organizma od stresa kome je organizam izložen, zbog čega veliku popularnost stiču egzogeni antioksidansi prirodnog porekla. Najpoznatiji egzogeni antioksidansi su fenolna jedinjenja, naročito biljni polifenoli – fenolne kiseline i flavonoidi. Zahvaljujući sposobnosti doniranja atoma vodonika u stanju su da neutrališu nepoželjne radikalske vrste u organizmu, pri čemu sami prelaze u rezonantno stabilizovanu, mnogo inertniju radikalsku formu. Neka od ovih jedinjenja deluju i preventivno, putem kompleksiranja jona prelaznih metala [59]. Međutim, uprkos višedecenijskom istraživanju, još uvek nije moguće reći da li ovi polifenoli ispoljavaju *in vivo* antioksidantni efekat i da li je njihov pozitivan efekat na zdravlje možda posledica drugih mehanizama, nevezanih za oksidativni stres [60].

3.3.2. INFLAMATORNI PROCESI

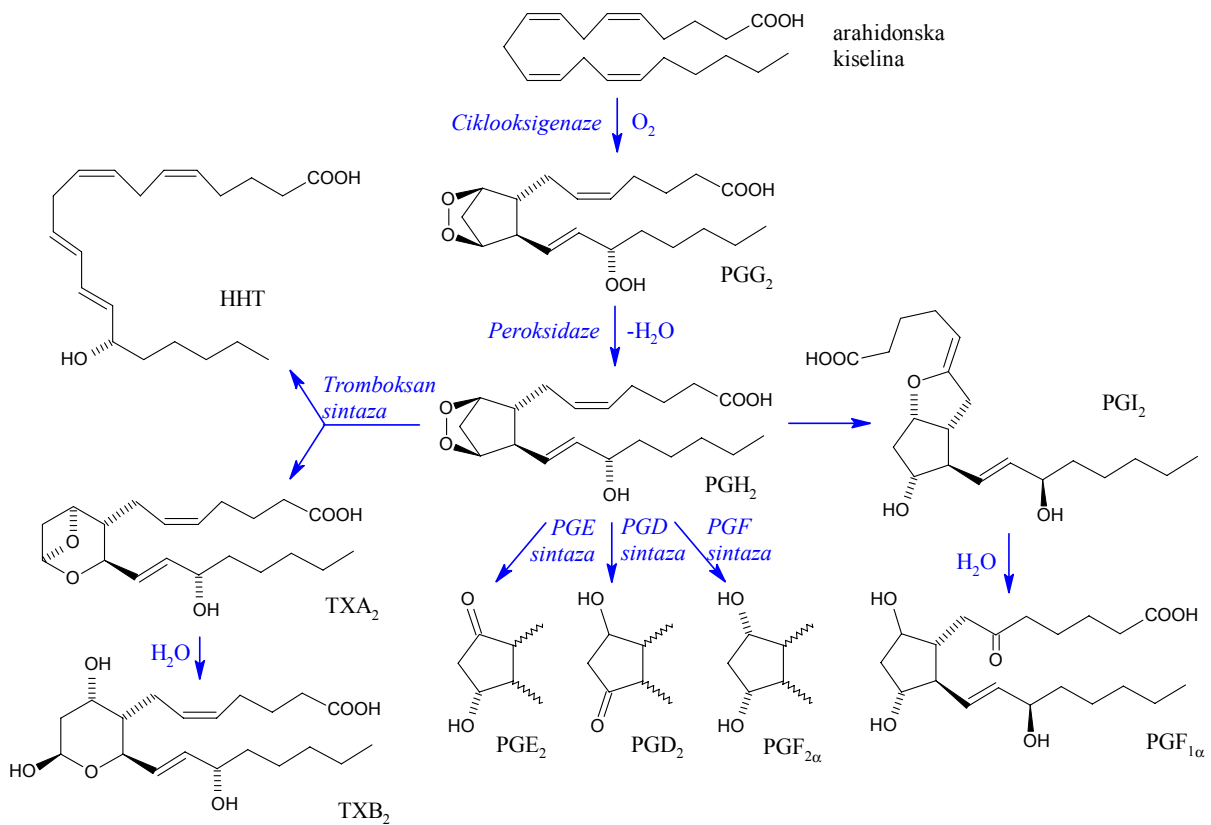
Zapaljenje (inflamacija) je kompleksni biološki odgovor tkiva na dejstvo štetnih stimulusa, uključujući patogene, toksine, oštećenja ćelija (opekotine, promrzline, jonizujuće zračenje, mehaničke povrede), hemijske iritante itd., kao i na imune/autoimune reakcije, sa ciljem neutralizacije datih agenasa, sprečavanja širenja infekcije, i iniciranja reparacije tkiva [61, 62]. U zavisnosti od agensa, intenziteta i vremena, inflamacija može obuhvatiti tri faze: akutnu, koju karakterišu povećanu permeabilnost krvnih sudova, vazodilatacija i edem, subakutnu, sa infiltracijom leukocita, i hroničnu, u kojoj dolazi do degeneracije tkiva i fibroze [63]. Međutim, hronični inflamatorni procesi, kao i inflamacija uzrokovana autoimunim reakcijama, mogu dovesti do niza patoloških poremećaja usled hiperprodukcije ćelija imunog sistema, enzima koji razaraju tkiva i inflamatornih citokina – astme, reumatoidnog artritisa i osteoartritisa, multiple skleroze, psorijaze i kancera [61, 62, 64].

Proces inflamacije reguliše niz medijatora, uključujući lipide kao što su metaboliti arahidonske kiseline i PAF (*platelet-activating factors*), peptide – IL (*interleukins*), TNF (*tumor necrosis factor*), GM-CSF (*granulocyte/macrophage colony stimulating factor*) itd. Njihovo kombinovano delovanje vodi leukocite do mesta delovanja i aktivira ih, stimuliše perfuziju, angiogenezu i reparaciju tkiva, i reguliše imune reakcije [62, 64]. Neka od ovih jedinjenja deluju putem stimulacije ekspresije gena aktivacijom transkripcionih faktora, kao što je NF- κ B [63].

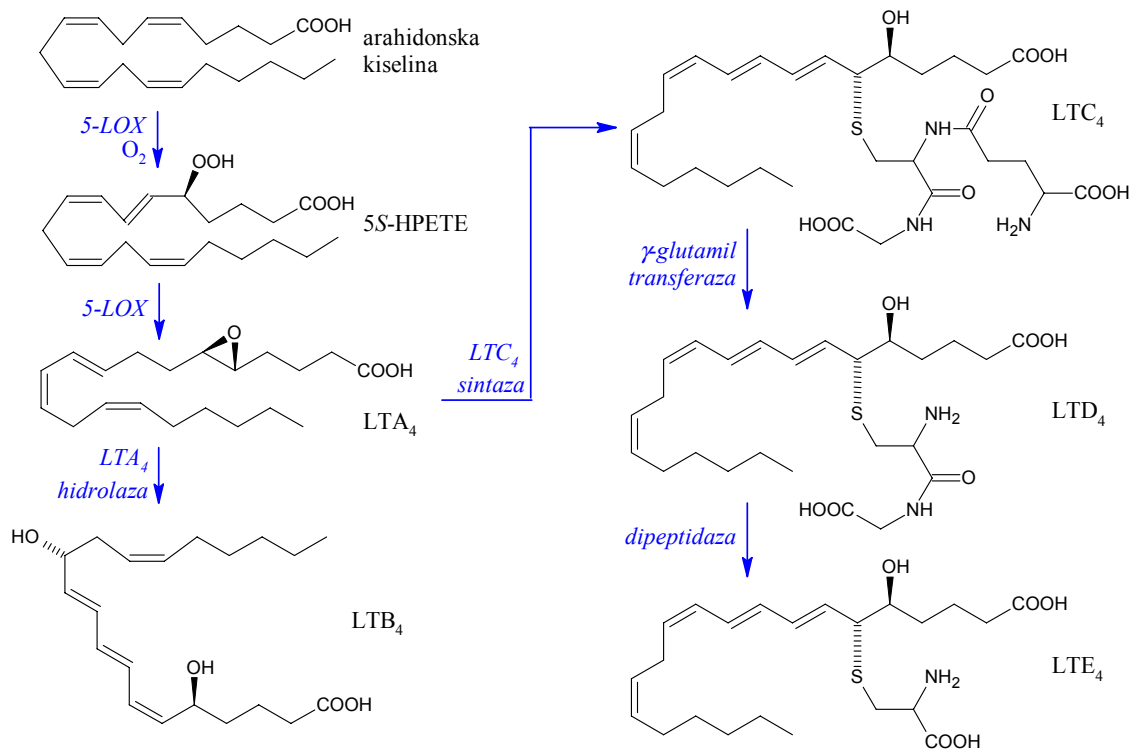
Jedinjenja sa antiinflamatornim svojstvima (uključujući i prirodne proizvode) mogu delovati na različitim nivoima, odn. imaju većiki broj mogućih meta delovanja, uključujući enzime (COX, IMP dehidrogenaza), citokine i njihove receptore (interleukine, interferone, TNF), transkripcione faktore itd. [62, 64]. Antihistaminici (koji su tipično antagonisti H₁ histaminskih receptora) smanjuju edem, vazodilataciju i druge simptome alergijskih reakcija, nesteroidni antiinflamatorni lekovi (NSAID) inhibiraju sintezu prostaglandina, glukokortikoidi stimulišu ekspresiju antiinflamatornih proteina zaduženih za terminaciju inflamatornog procesa (kao što je lipokortin I, inhibitor fosfolipaze A2 koja oslobađa arahidonsku kiselinu iz membranskih fosfolipida) a inhibiraju ekspresiju proinflamatornih proteina (niza hemokina, citokina, interleukina), dok druga jedinjenja mogu modifikovati ili inhibirati sintezu receptora i medijatora, uticati na dejstvo peptidnih medijatora, blokirati transkripcione faktore ili delovati kao hvatači slobodnih radikala koji se generišu u toku procesa [61,63].

Arahidonska kiselina je ključni intermedijer u biosintezi niza jedinjenja koja učestvuju u inflamaciji prostaglandina i tromboksana (produkti COX puta, Slika 3.7.), leukotriena i 5-HETE (proizvodi 5-LOX puta, Slika 3.8.). Zbog toga, nije iznenađujuće da mnogi lekovi (aspirin, paracetamol, ibuprofen) i lekovite biljke svoje dejstvo zasnivaju na inhibiciji COX i/ili LOX.

Ciklooksigenaza (prostaglandin-endoperoksid sintaza, prostaglandin G/H sintaza, EC 1.14.99.1, COX) je enzim koji oksiduje arahidonsku kiselinu do odgovarajućeg hidroperoksi-endoperoksida – prostaglandina G₂ (PGG₂), i zatim redukuje PGG₂ do alkohola – PGH₂, koji služi kao prekursor ostalih prostaglandina (PGD₂, PGE₂, PGF_{2 α}), prostaciklina (PGI₂) i tromboksana (TxA₂) [65–67]. Poznate su dve izoforme ciklooksigenaze: COX-1 i COX-2, a pretpostavlja se i postojanje COX-3 (ili COX-1v). COX-1 je konstitutivni enzim, prisutan je u većini ćelija sisara, i sintetiše prostaglandine koji su prekursori tromboksana u trombocitima i prostaciklina u vaskularnom endotelu, kontrolišu agregaciju trombocita, putem vazodilatacije regulišu protok krvi i glomerularnu filtraciju u bubrezima, štite želudačnu mukozu od ishemije i oštećenja [65, 68]. S druge strane, COX-2 je u većini normalnih tkiva prisutna samo u vrlo niskim koncentracijama ili odsutna. Aktivnost je detektibilna tek nakon indukcije u aktiviranim makrofagima i drugim specijalizovanim ćelijama na mestu inflamacije [65, 68].



Slika 3.7. Biosinteza eikozanoida – ciklooksigenazni put [65].



Slika 3.8. Biosinteza eikozanoida – 5-lipooksigenazni put [65].

Klasični lekovi zasnovani na inhibiciji COX su neselektivni, i deluju na sve izoforme, zbog čega pored antiinflamatornog, antipiretičkog, antitrombičkog i analgetskog dejstva (putem inhibicije sinteze prostaglandina i tromboksana) ispoljavaju i niz neželjenih efekata, od kojih je najznačajniji iritacija želudačne sluznice. Naime, smanjenje koncentracije PG u želucu (usled inhibicije COX-1) dovodi do pojačanog lučenja hlorovodonične kiseline a smanjene sekrecije HCO_3^- i zaštitne sluzi. Ovo je naročito izraženo kod acetilsalicilne kiseline, koja zapravo efikasnije inhibira COX-1 nego COX-2 [65]. Zbog toga, javlja se potreba za razvojem preparata koji će selektivno inhibirati COX-2, specifičnu za tkiva pod inflamacijom, i time ispoljavati antiinflamatorno, analgetsko i antipiretičko dejstvo, a neće uticati na konstitutivnu COX-1. Selektivna inhibicija moguća je zahvaljujući činjenici da je hidrofobni džep u aktivnom centru COX-2 zahvaljujući razlici u jednoj aminokiselini (Ile kod COX-1, Val kod COX-2) veći nego kod COX-1 [67]. Međutim, treba napomenuti da, dok selektivni COX-2 inhibitori znatno slabije iritiraju digestivni trakt, ostali neželjeni efekti karakteristični za nesteroidne antiinflamatorne lekove (rizik od gubitka funkcije bubrega, tromboze itd.) i dalje su prisutni, a zabeležen je i povećan rizik od infarkta usled inhibicije sinteze prostaciklina [61]. S druge strane, utvrđeno je da dugotrajno korišćenje NSAID, uključujući i selektivne COX-2 inhibitore, smanjuje incidencu malignih neoplazija [69].

Arahidonat-lipoksigenaze (EC 1.13.11, LOX) predstavljaju familiju dioksigenaza sa nehemskim gvoždem koji katalizuju dioksigenaciju polinezasićenih viših masnih kiselina do odgovarajućih hidroperoksida [65]. Najvažnije lipoksigenaze kod sisara su 12-LOX (EC 1.13.11.31, katalizuje stvaranje 5Z,8Z,10E,12S,14Z-12-hidroperoksiheksa-5,8,10,14-tetraenske kiseline – 12-HPETE), 15-LOX (EC 1.13.11.33, katalizuje sintezu 5Z,8Z,11Z,13E,15S-15-hidroperoksiheksa-5,8,11,13-tetraenske kiseline – 15-HPETE) i 5-LOX (EC 1.13.11.34, sintetishe 5-HPETE, koju dalje konvertuje u leukotriene B₄, C₄, D₄ i E₄ ili 5-hidroksiheksatetraensku kiselinu – 5-HETE) [70].

Leukotrieni (proizvodi 5-LOX puta) su inflamatorni medijatori značajni kod astme i alergijskih reakcija [65]. Deluju kao hemotoksični agensi za neutrofile, bronhokonstriktori, povećavaju permeabilnost krvnih sudova i stimulišu lučenje sluzi u disajnim organima. Zbog toga, jedinjenja koja pokazuju 5-LOX-inhibitorsku aktivnost imaju potencijal u tretmanu astme; što se tiče inflamacije, psorijaze, artritisa, osteoporoze i ateroskleroze, terapijska vrednost je zanemarljiva [66].

S druge strane, iako biološka uloga 12-LOX još uvek nije razjašnjena, poznato je da 12-LOX put ima poseban značaj za procese razvoja tumora, angiogeneze i metastaze. Naime, istraživanja ukazuju da je 12(S)-HETE modulator proliferacije i apoptoze ćelija tumora, kao i ključni regulator niza parametara povezanih sa metastatskim potencijalom ćelija. Pored toga, neki od proizvoda LOX-katalizovane peroksidacije masnih kiselina pokazuju genotoksična svojstva. Povišene koncentracije 12(S)-HETE detektovane su u kanceru prostate, pankreasa, dojke, pluća itd. Inhibitori 12(S)-LOX dovode do apoptoze ćelija tumora, smanjenja pokretljivosti i invazivnosti, inhibicije angiogeneze i proliferacije. 12(R)-izomer HETE dovodi se u vezu sa razvojem psorijaze, a 15-HETE sa aterosklerozom [70].

NO sintaza (EC 1.14.13.39) je enzim koji generiše NO oksidacijom L-arginina. Sa stanovišta inflamacije i imunog sistema, najznačajnija je inducibilna forma NOS (iNOS), koja se sintetishe nakon aktivacije odgovarajućeg gena faktorima IRF-1 ili NF-κB. Dok u niskim koncentracijama NO ima niz bitnih funkcija (neurotransmitter, vazodilatator, komponenta imunog sistema), povišene koncentracije zbog slobodnoradikalne structure mogu izazvati oštećenja tkiva, naročito mozga. NO je takođe uključen i u rast tumora. Stoga, jedinjenja kao što su seskviterpenske laktoni, koja inhibiraju inducibilnu NOS ili aktivaciju NF-κB, mogu imati terapijsku vrednost kod različitih inflamatornih procesa i kancera [55, 71].

NF-κB (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) utiče na ekspresiju niza gena uključenih u odgovor na bakterijske i viralne antigene, citokine, slobodne radikale, UV zračenje i druge stresore, i igra ključnu ulogu u regulaciji imunog odgovora i kontroli proliferacije i preživljavanja ćelija [61, 72]. Poremećaji u regulaciji komponenata NF-κB signalnog puta, kao što je konstantna aktivacija, doprinose razvoju patoloških stanja – reumatoidnog artritisa i

osteoartritisu, kancera, autoimunih bolesti, inflamacija i sl. [61, 62]. Stoga, inhibitori NF- κ B (vrlo često sekundarni biomolekuli, kao što su glikozidi iridoida i floroglucinola [72], rezveratrol, kurkumin, katehini [73]) imaju terapijski potencijal u tretmanu kancera i hroničnih inflamatornih procesa. Treba imati u vidu da u odsustvu NF- κ B dolazi do ozbiljnih apoptotičkih oštećenja tkiva, te se ovakva jedinjenja mogu aplicirati samo topikalno ili tokom kratkog vremenskog perioda [62].

Antiinflamatorno dejstvo utvrđeno je kod brojnih primarnih i sekundarnih biomolekula. Salicin (aktivni princip *Salix alba* L.) ireverzibilno inhibira COX kovalentnim modifikovanjem (acetilovanjem), utiče na sintezu NO, i modulira signalizaciju preko NF- κ B. Nezasićene više masne kiseline sa 18 i više ugljenikovih atoma, uključujući linolensku (postoje neslaganja u vezi oleinske kiseline), predstavljaju potentne kompetitivne inhibitore COX-2 (IC₅₀ reda μ mol/L), i značajno doprinose ukupnoj aktivnosti biljaka kao što je *Plantago major* [61, 67]. COX-2 inhibitorna aktivnost detektovana je kod približno 10 % od oko 500 ispitivanih biljnih ekstrakata [67]. Kurkumin iz *Curcuma longa* L. inhibira COX, NO sintazu (NOS) i NF- κ B, dok aristolohinska kiselina iz *Aristolochia* vrsta inhibira fosfolipazu A₂ [71]. Flavonoidi mogu delovati preko različitih mehanizama – luteolin i kvercetin u mikromolarnim koncentracijama inhibiraju oslobađanje citokina TNF- α i IL-6; luteolin, kemferol i kvercetin u značajnoj meri inhibiraju i MMP-9 i MMP-2 (metalopeptidaze matriksa, značajne kod artritisa i metastaze tumora). Luteolin je takođe i inhibitor NF- κ B-regulisane ekspresije gena, kao i selektivni COX-2 inhibitor (uz dodatno sniženje ekspresije COX-2). Utvrđeno je da je za antiinflamatornu aktivnost flavonoida neophodna planarna struktura, dvostruka veza između C-2 i C-3, i hidroksilacija u položajima 5-, 7-, i na prstenu B; glikozilovanje smanjuje aktivnost. Što se lignana tiče, antiinflamatorno dejstvo (zasnovano na inhibiciji COX, 5-LOX, iNOS, NF- κ B, TNF- α) utvrđeno je kod više klasa, mada tek pri višim koncentracijama (tipično reda desetina ili stotina μ mol/L) [61].

3.3.3. KARCINOGENEZA

Pod kancerom (malignom neoplazmom) podrazumeva se grupa bolesti za koje je karakteristična nekontrolisana deoba ćelija uz odsustvo apoptoze, invazivnost (prodiranje u okolna tkiva i njihovo uništavanje) i, ponekad, metastaza (širenje po organizmu putem krvotoka i limfotoka i formiranje sekundarnih tumora). Nasuprot tome, rast benignih tumora (benignih neoplazmi) je ograničen, a invazivno ponašanje i metastaziranje su odsutni. Sam proces transformacije normalne ćelije u ćeliju tumora (karcinogeneza ili onkogeneza) je višefazan proces. Prva faza, inicijacija, dešava se kada genom ćelije pretrpi promene koje ostaju nereparirane ili pogrešno reparirane. Tipično, potreban je veći broj mutacija da bi se normalna ćelija pretvorila u ćeliju kancera, što obično zahteva duži vremenski period. U fazi promocije, oštećena ćelija se deli, formirajući pre-maligni tumor. Pod dejstvom različitih faktora tumor prelazi u poslednju, ireverzibilnu fazu – progresiju. Dolazi do produkcije ćelija-klonova sa povećanim proliferativnim kapacitetom, invazivnošću i sposobnošću metastaziranja [65, 68, 74, 75]. Postepeno dolazi do morfoloških promena u tkivu, odn. lezija.

Kancer nastaje kao posledica anomalija u genetskom materijalu (tačnije, delovima genoma zaduženim za kontrolu rasta i diferencijacije) jedne ćelije usled interakcija sa endogenim ili egzogenim faktorima. Endogeni faktori obuhvataju genetske, hormonalne i imunološke faktore, kao i hemijske kancerogene nastale normalnim metaboličkim procesima (reaktivni oblici kiseonika i azota [74]), dok egzogeni predstavljaju uticaj agenasa iz okoline (fizički kancerogeni, kao što su UV i jonizujuće zračenje, hemijski kancerogeni, uključujući PAH-ove, miktoksine, jone nekih teških metala i sl., i biološki kancerogeni – određeni virusi, bakterije i paraziti) na genetski materijal. Rizik značajno povećavaju faktori koji stimulišu deobu odn. proliferaciju ćelija, zbog slučajnih mutacija koje se mogu javiti prilikom replikacije DNK. Primeri su steroidni hormoni (značajni kod hormon-zavisnih tumora) i sintetička jedinjenja kao što je saharin [76].

Genetske anomalije odgovorne za karcinogenezu mogu obuhvatiti konverziju proto-onkogeni u onkogen, inhibiciju/brisanje tumor-supresorskih gena, inhibiciju gena koji regulišu apoptozu, aktivaciju ekspresije telomeraza itd. [65].

Proto-onkogeni su normalni geni koji pod određenim uslovima (mutacija koja dovodi do deregulacije odn. trajne aktivacije, dupliranje gena, ekspresija u pogrešnom tipu ćelije ili u pogrešno vreme, i sl.) mogu preći u tumor-indukujući onkogen. Proto-onkogeni, kojih je poznato oko 100, često imaju ulogu u transdukciji signala – kodiraju faktore rasta, receptorske tirozin kinaze, regulatorne GTPaze, transkripcione faktore itd. Neki od tipičnih primera su: Ras (kodira GTPaze; aktivacija dovodi do rasta, diferencijacije i preživljavanja ćelije; najčešći je onkogen), Wnt (ima ulogu u embriogenezi i morfološkom razvoju organizma), Myc (reguliše ekspresiju brojnih gena) i Trk (utiču na funkciju, preživljavanje i diferencijaciju neurona).

Proteini kodirani tumor-supresorskim genima (anti-onkogenima) imaju funkciju supresora metastaze (učestvuju u adheziji ćelija i sprečavaju njihovu disperziju), represije gena zaduženih za produženje ćelijskog ciklusa, blokiranja ćelijskog ciklusa u slučaju detektovanog oštećenja DNK, sve dok se DNK ne reparira, ili iniciranja apoptoze ukoliko je reparacija DNK neizvodljiva [77]. Ukoliko se javi mutacija kod nekog od ovih gena, tako da dođe do smanjenja ili gubitka aktivnosti, inhibirana je reparacija DNK, oštećenja se akumuliraju i povećava se verovatnoća nekontrolisane deobe ćelije.

Većina malignih ćelija ima sposobnost ekspresije telomeraze, enzima koji produžava telomere na krajevima DNK lanaca. Kod normalnih ćelija, prilikom svake mitoze ireverzibilno se gubi deo telomera, čime se efektivno ograničava maksimalan broj deoba odn. životni vek ćelije, a u cilju sprečavanja nakupljanja prevelikog broja mutacija. Zahvaljujući telomeraznoj aktivnosti, ćelije kancera konstantno regenerišu telomere i time neograničeno produžavaju svoj život.

Pod normalnim uslovima, IL-2 aktivirane citotoksične ćelije, NK (*eng.* natural killer) ćelije i makrofagi u stanju su da prepoznaju i unište ćelije kancera. Međutim, ćelije kancera mogu se putem lučenja imunosupresorskih supstanci zaštititi od imunog sistema domaćina. Utvrđeno je da mnogi tumori luče PGE₂, koji inhibira lučenje citokina (uključujući IL-2) iz T-helper leukocita, ekspresiju IL-2 receptora u T-ćelijama, prezentaciju antigena, produkciju citokina i citotoksičnog NO u

makrofagima, i citotoksičnost NK ćelija. Pretpostavlja se da dolazi do lučenja i drugih signalnih molekula – IL-1, TNF- α (*tumor necrosis factor- α*), GM-CSF (*granulocyte/monocyte colony-stimulating factor*), TGF- β i IFN γ – koji dovode do aktiviranja imunosupresorskih mehanizama [65].

Jedan od ograničavajućih faktora rasta tumora je apoptoza. Apoptoza predstavlja programiranu ćelijsku smrt, koja se (za razliku od nekroze) odvija uz aktivno učešće ćelije koja umire i stogu genetsku kontrolu, a u cilju regulacije broja ćelija i formiranja tkiva, kao i uklanjanja oštećenih ili defektnih ćelija [78, 79]. Odgovarajućim signalnim putevima (internim ili eksternim – preko TNF- α , FasL i sl.) aktiviraju se kaspaze (cistein-aspartat proteaze), koje razgrađuju niz proteina, što dalje dovodi do razaranja ćelijskih struktura i odgovarajućih morfoloških promena (uključujući raspad citoskeleta, kondenzaciju i raspad hromatina, deformacije plazmatske membrane). Na kraju, ćelija biva razbijena na više vezikula koje se uklanjaju fagocitozom – eferocitozom. Ceo proces odvija se bez inflamatornog odgovora (makrofagi u ovom slučaju ne luče pro-inflamatorne medijatore) ili oštećenja okolnog tkiva (ćelijski sadržaj, uključujući i proteolitičke enzime, ostaje okružen membranom) [79]. Ovaj proces u ćelijama kancera može započeti usled iscrpljenja faktora rasta ili preživljavanja, hipoksije, gubitka interakcija sa ekstracelularnim matriksom, defekata u DNK, grešaka u signalnim putevima i sl. Zahvaljujući ovom mehanizmu, brzina rasta tumora je <5 % od brzine očekivane na osnovu kinetike proliferacije ćelija. Potvrđeno je da je frekvencija apoptoze povišena u spontano povlačećim tumorima, kao i tumorima tretiranim citotoksičnim agensima. Međutim, neke tumore karakteriše povišena ekspresija zaštitnih proteina, kao što su Bcl-2 (blokira apoptotički signal), DcR3 (*decoy receptor 3*, vezuje FasL čime sprečava njegovu interakciju sa Fas receptorom i indukciju apoptoze) i FasL (izaziva smrt citotoksičnih T ćelija koje pokušaju da unište tumor), ili promene u proteinima zaduženim za iniciranje apoptoze, kao što je p53 (aktivira se u slučaju nepopravljivih oštećenja DNK). Zahvaljujući činjenici da ćelije kancera zadržavaju apoptotičku „mašineriju” očuvanom, geni i proteini koji iniciraju i kontrolišu apoptozu predstavljaju potencijalne mete dejstva antikancer lekova. Ovi lekovi mogu inhibirati hiperaktivirane signale ćelijskog preživljavanja (kao što su Bcl-2, NF- κ B i sl), regenerirati pro-apoptotičku aktivnost (p53), ciljati pro-apoptotičke receptore inaktivne kod normalnih ćelija ili aktivirati kaspaze [78].

Hemoterapija kancera podrazumeva primenu jedinjenja, prirodnog ili sintetičkog porekla, koja usporavaju, zaustavljaju rast ćelija kancera ili dovode do njihove smrti. Primenu hemoterapeutskih agenasa u velikoj meri ograničava njihova toksičnost prema zdravim ćelijama; jedino je tolerancija prema jedinjenjima baziranim na hormonskoj aktivnosti visoka. Dalje, utvrđeno je da je većina humanih malignih tumora hemorezistentna. Zbog svega navedenog, potraga za hemoterapeuticima niske toksičnosti i širokog spektra dejstva još uvek je u toku [80].

Velika većina antikancer jedinjenja predstavljaju primarne i sekundarne biomolekule, bilo u nativnoj formi, bilo strukturno modifikovane, uključujući flavonoide i stilbene (antioksidansi, fitoestrogeni, inhibitori enzima faze 2, COX i ornitin dekarboksilaze, induceri diferencijacije), izotiocijanate (inhibitori enzima faze 2), lignane (fitoestrogeni, mitotički otrovi, antioksidansi, inhibitori topoizomerase, COX ornitin dekarboksilaze), steroide (fitoestrogeni, inhibitori enzima faze 2), seskvi- i diterpene (induceru diferencijacije, inhibitori ornitin dekarboksilaze) itd. [68].

3.4. HEMIJSKI SASTAV VRSTA TRIBUSA SCANDICEAE

Fitohemijaska ispitivanja vrsta tribusa Scandiceae do sada su sprovedena u vrlo ograničenom obimu. Velika većina publikacija odnosi se na jednog od najpoznatijih predstavnika – *Anthriscus sylvestris*, u kome je kombinacijom ekstrakcije velikih količina biljnog materijala, hromatografije na stubu i strukturnih instrumentalnih metoda – $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ i MS – identifikovan veliki broj jedinjenja, pretežno lignana, kumarina i poliacetilena [3, 4, 6, 9–15]. Međutim, nema podataka o koncentraciji ili relativnom odnosu detektovanih sekundarnih biomolekula. Savremene hromatografske tehnike veoma su retko primenjivane [5, 12], što za posledicu ima kasno otkrivanje nekih od dominantnih komponenti. Primer je nezasićeni dibenzilbutirolaktonski lignan silvestrin, koji je u *A. sylvestris* detektovan tek 2007. godine [4], tri decenije nakon prvih publikovanih rezultata fitohemijskih istraživanja ove vrste [13]. Literaturni podaci o hemijskom sastavu ekstrakta ostalih vrsta znatno su oskudniji i obuhvataju identifikaciju nekoliko fenolnih i poliacetilenskih jedinjenja u *Chaerophyllum hirsutum* [18, 19], flavonoidâ i deoksipodofilotoksina u *Anthriscus cerefolium* [2, 20], lignana, flavonoida, poliacetilena i fenilpropanoida u *Chaerophyllum aureum* [30, 35], kao i lignana u *Chaerophyllum maculatum* [32].

Sastav volatilnih komponenti odn. etarskih ulja ispitan je za niz vrsta, uključujući *Anthriscus sylvestris* [16, 17, 21], *Anthriscus cerefolium* [22], *Anthriscus nemorosa* [23], kao i veliki broj predstavnika roda *Chaerophyllum*: *Ch. aromaticum* [24], *Ch. aureum* [1], *Ch. azoricum* [25], *Ch. byzantinum* [26], *Ch. hirsutum* [1], *Ch. libanoticum* [7], *Ch. macropodium* [27] i *Ch. temulentum* [1]. Ulja su uglavnom tipičnog, terpenoidnog sastava; izuzetak je *A. cerefolium*, u kome dominiraju fenilpropenske komponente.

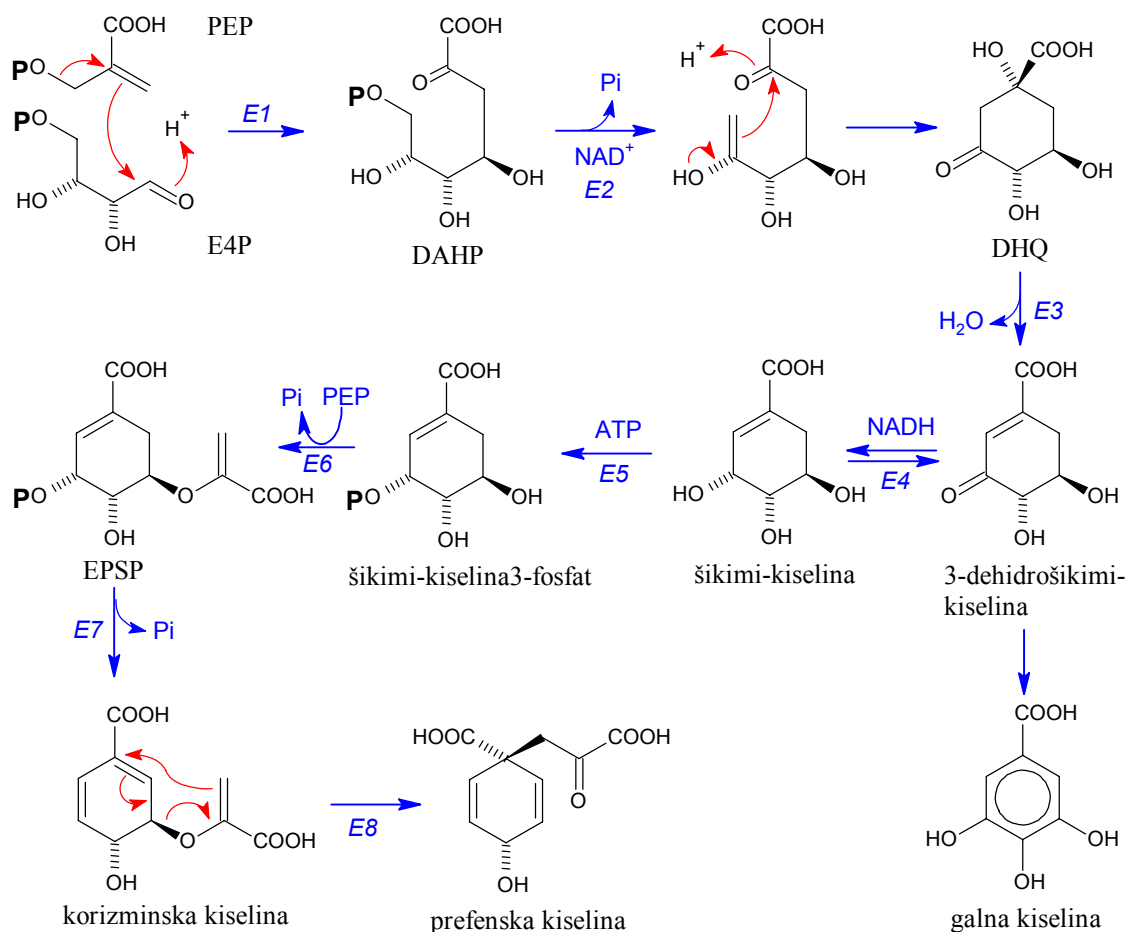
Dosadašnja istraživanja ukazuju na značajan potencijal vrsta tribusa Scandiceae kao izvora niza bioaktivnih sekundarnih biomolekula. Pored uobičajenih terpenoida, flavonoida i fenolnih kiselina, mnoge od ispitivanih vrsta bogate su lignanima (pretežno dibenzobutirolaktonskim i ariltetralinskim), alifatičnim C_{17} -poliacetilenima, prostim kumarinima i furanokumarinima.

3.4.1. FENOLNE KISELINE I DERIVATI

Pod fenolnim kiselinama podrazumevaju se dve velike grupe jedinjenja: hidroksibenzojeve kiseline (C_6C_1), često poistovećene sa terminom fenolne kiseline, i hidroksicimetne ili fenilpropenske kiseline (C_6C_3). U prirodi se javljaju pretežno u vidu estara sa šećerima, drugim fenolnim kiselinama, hidroksi-kiselinama itd.

Biosinteza

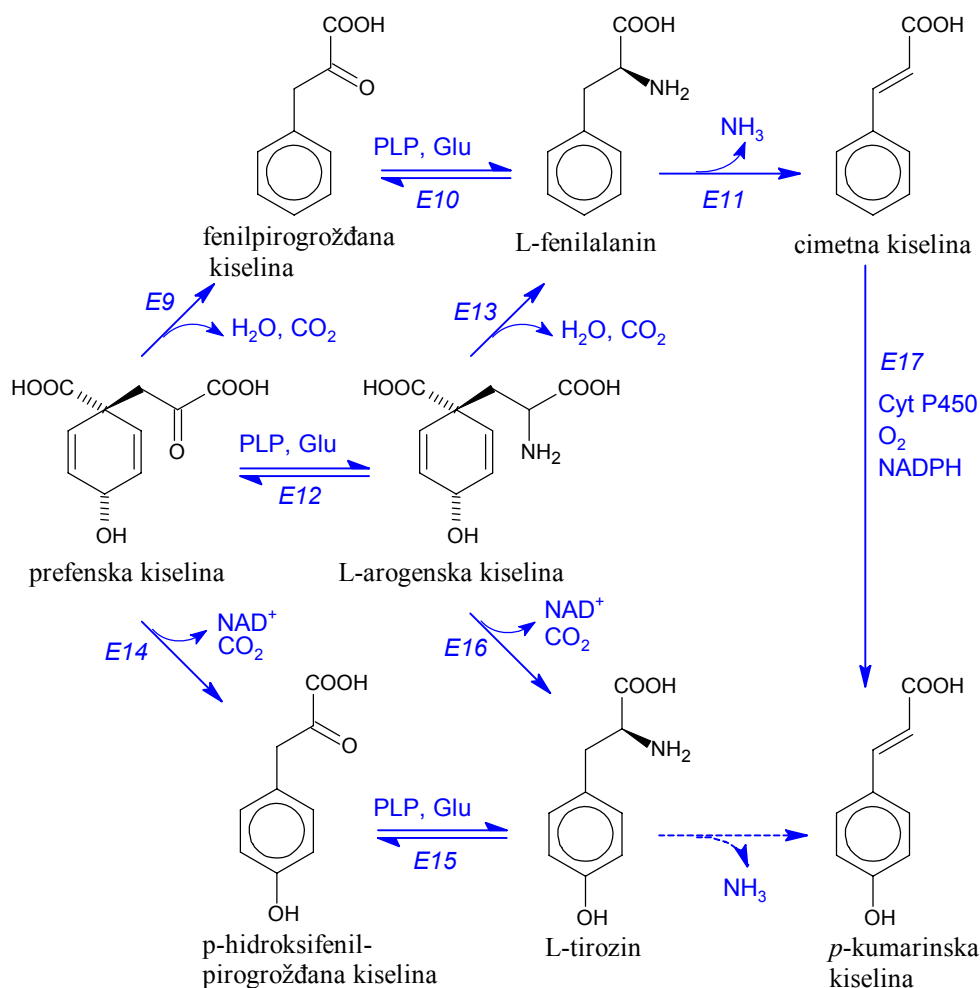
Dok neke od fenolnih kiselina (npr. orselinska) nastaju ciklizacijom poliketidnog niza, većina ih potiče iz šikimatnog (šikimat-arogenatnog) puta [81]. Biosintetički put započinje kuplovanjem D-eritroza-4-fosfata (E4P) i fosfoenolpiruvata (PEP), pri čemu nastaje D-arabino-heptulozonska kiselina-7-fosfat (DAHP) (Slika 3.9.). Sekvencom reakcija (NAD^+ -zavisna oksidacija 4-OH, eliminacija fosforne kiseline, redukcija 4-okso grupe i aldolna reakcija) nastaje 3-dehidrohinska kiselina (DHQ) koja se zatim može redukovati do hinske kiseline, ili dehidratacijom i redukcijom prevesti u šikimi-kiselinu. Daljom konverzijom, preko šikimat-3-fosfata i 5-enolpiruvil-šikimat-3-fosfata (EPSP) kao intermedijera, nastaje horizminka kiselina. Reakcijom Claisen-ovog premeštanja horizmat prelazi u prefenat.



Slika 3.9. Šikimatni put biosinteze fenolnih kiselina – od PEP i E4P do prefenata. E1 – 2-dehidro-3-deoksi-fosfoheptonat aldolaza (DAHP sintaza), E2 – 3-deoksihinat sintaza, E3 – 3-dehidrohinat dehidrataza, E4 – šikimat-3-dehidrogenaza (šikimat:NADP oksidoreduktaza), E5 – šikimat kinaza, E6 – EPSP sintaza, E7 – korizmat sintaza, E8 – korizmat mutaza [81]

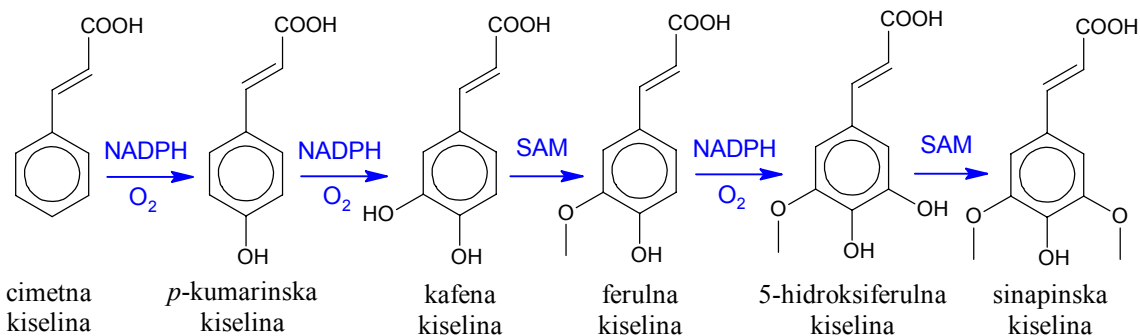
U sledećoj fazi, prefenat se mrežom metaboličkih puteva prevodi u osnovne C_6C_3 gradivne blokove - aromatične aminokiseline L-fenilalanin i L-tirozin (Slika 3.10.). Koji će od nekoliko mogućih puteva (odn. redosleda reakcija dekarboksilativne aromatizacije, transaminacije i

oksidacije) biti aktivni, zavisi od biljne vrste. Konačno, eliminacijom amonijaka dolazi do formiranja *E*-cimetnih kiselina. Većina biljaka nije sposobna za dezaminaciju L-tirozina; umesto toga, *p*-kumarinska kiselina nastaje hidroksilacijom cimetne kiseline.



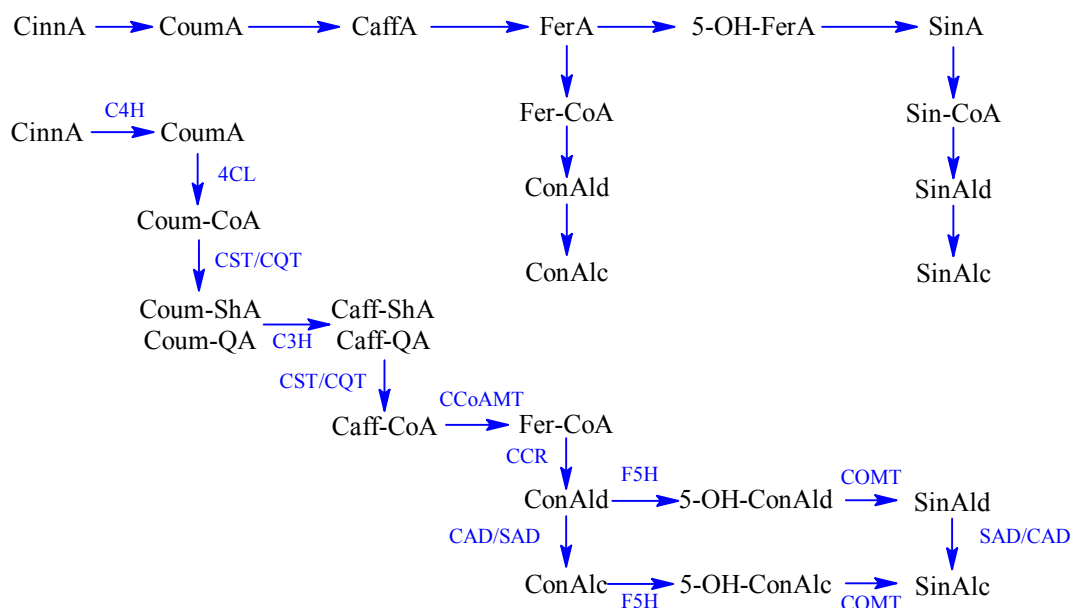
Slika 3.10. Šikimati put biosinteze fenolnih kiselina – od prefenata do fenilpropenskih kiselina. E9 – prefenat dehidrataza, E10 – fenilpiruvat aminotransferaza, E11 – fenilalanin-amonijak lijaza, E12 – prefenat aminotransferaza, E13 – arogenat dehidrataza, E14 – prefenat dehidrogenaza, E15 – 4-hidroksipiruvat aminotransferaza, E16 – arogenat dehidrogenaza, E17 – cinamat 4-hidroksilaza [81]

Daljim reakcijama hidroksilacije i metilacije (Slika 3.11.) nastaju različite fenilpropenske kiseline sa *orto*-obrascem supstitucije tipičnim za šikimati put (za razliku od *meta*-supstituisanih aromatičnih poliketida).



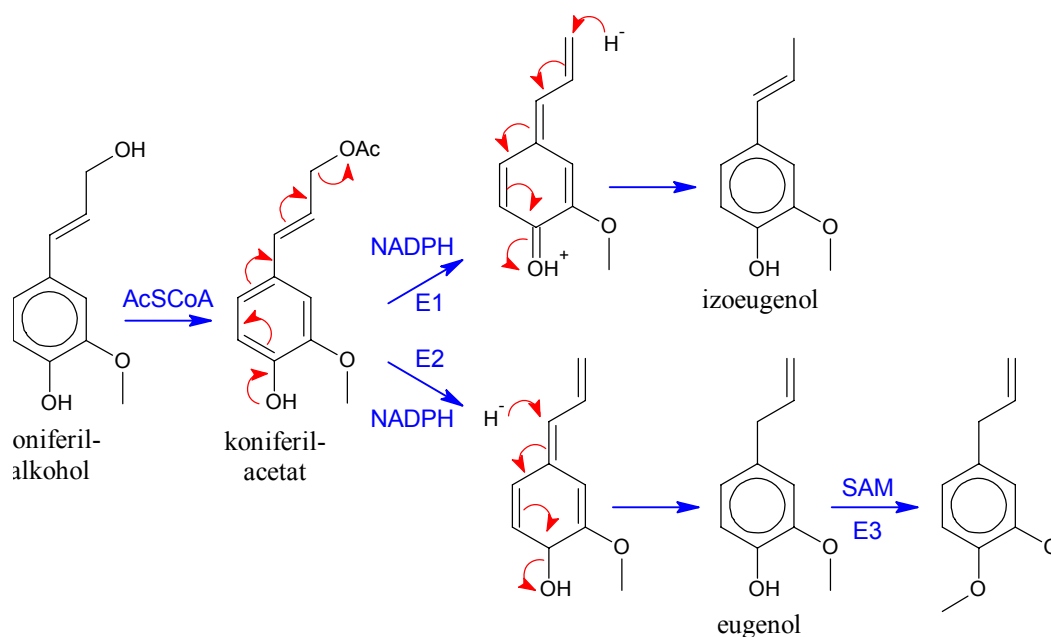
Slika 3.11. Biosinteza fenolnih kiselina – modifikacije na aromatičnom prstenu [81]

Ranije se smatralo da NADPH-zavisnom redukcijom ovih kiselina (u formi tioestara sa CoA), preko odgovarajućih aldehida, nastaju odgovarajući alkoholi – monolignoli [81]. Novija istraživanja ukazuju na to da je ovaj biosintetski put nešto složeniji, uz kumaroil- i kafeoil- šikimi- i hinsku kiselinu kao intermedijere (Slika 3.12.) [82, 83].



Slika 3.12. Biosinteza monolignola – stari i novi model. Caff – kafeoil, Cinn – cinamoil, Con – koniferil, Coum – kumaroil, Fer – feruloil, Sin – sinapil/sinapoil, ShA – šikimi-kiselina, QA – hinska kiselina; -A – kiselina, -Ald – aldehyd, -Alc – alkohol; 4CL – 4-hidroksicinaroil CoA ligaza, C3T – *p*-kumarat 3-hidroksilaza, C4H – cinamat 4-hidroksilaza, CAD – cinamil-alkohol dehidrogenaza, CCoAMT – kafeoil-CoA *O*-metiltransferaza, CCR – cinamoil-CoA reduktaza, COMT – kafenol/5-hidroksikafenol *O*-metiltransferaza, CQT – hidroksicinaroil CoA:hinat hidroksicinaroiltransferaza, CST – hidroksicinaroil CoA:šikimat hidroksicinaroiltransferaza, F5H – ferulat 5-hidroksilaza, SAD – sinapil-alkohol dehidrogenaza [82]

Fenilpropeni (alilfenoli i propenilfenoli) nastaju iz odgovarajućih cinamil-alkohola, tačnije, njihovih acetata (Slika 3.13.). Acetilovanje obezbeđuje dobro odlazeću grupu; eliminacija je dodatno potpomognuta prisustvom *p*-hidroksilne grupe, koja omogućava stvaranje hinonmetidnog intermedijera koji se dalje redukuje uz NADPH [81].



Slika 3.13. Biosinteza fenilpropena. E1 – izoeugenol sintaza I, E2 – eugenol sintaza I, E3 – eugenol *O*-metiltransferaza [81]

Sekvencom reakcija sličnom β -oksidaciji masnih kiselina iz fenilpropenskih kiselina mogu nastati odgovarajuće supstituisane benzojeve kiseline (4-hidroksibenzoeva iz kumarinske, vanilinska iz ferulne i sl.). Uopšte, fenilpropenske kiseline predstavljaju osnovne prekursore u biosintezi većine fenolnih jedinjenja u biljkama.

Rasprostranjenost

Fenilpropenske kiseline univerzalno su prisutne u biljkama, pri čemu je najčešća kafena, za kojom slede *p*-kumarinska, ferulna i sinapinska [84]. Isto važi i za benzojeve kiseline, od kojih su najzastupljenije one sa bar jednom slobodnom hidroksilnom grupom: *p*-hidroksibenzoeva, protokatehinska, vanilinska, galna i siringinska. Permetilovana jedinjenja, kao što je veratrinska (3,4-dimetoksibenzoeva) kiselina, i jedinjenja sa neuobičajenim obrascem supstitucije, kao gentizinska kiselina (2,5-dihidroksibenzoeva), mnogo su ređa [85].

Hidroksicimetne kiseline se retko deponuju u slobodnoj formi u biljnim ćelijama. Najuobičajeniji, univerzalno prisutni derivati su hlorogenske kiseline – estri sa hinskom kiselinom: mono-estri (kafeoil-, kumaroil- i feruloilhinske kiseline), di-, tri- i tetrakafeoilhinske kiseline, mešoviti di-estri (kafeoilferuloilhinske kiseline, kafeoilsinapoilhinske kiseline), i di-, tri- i tetrakafeoilhinske kiseline acilovane (na hinskoj ili kafenoj kiselini) raznim dikarboksilnim kiselinama (glutarna, oksalna, sukcinatna, malonatna). Poznati su i estri sa organskim hidroksikiselinama (jabučna, vinska...), etri i estri sa šećerima (monosaharidi, polisaharidi ćelijskog zida, šećerni alkoholi, glikozidi antocijana i flavonola), amidi sa aromatičnim aminokiselinama, holinom i sl. i estri sa višim masnim kiselinama i alkoholima [57, 84, 86].

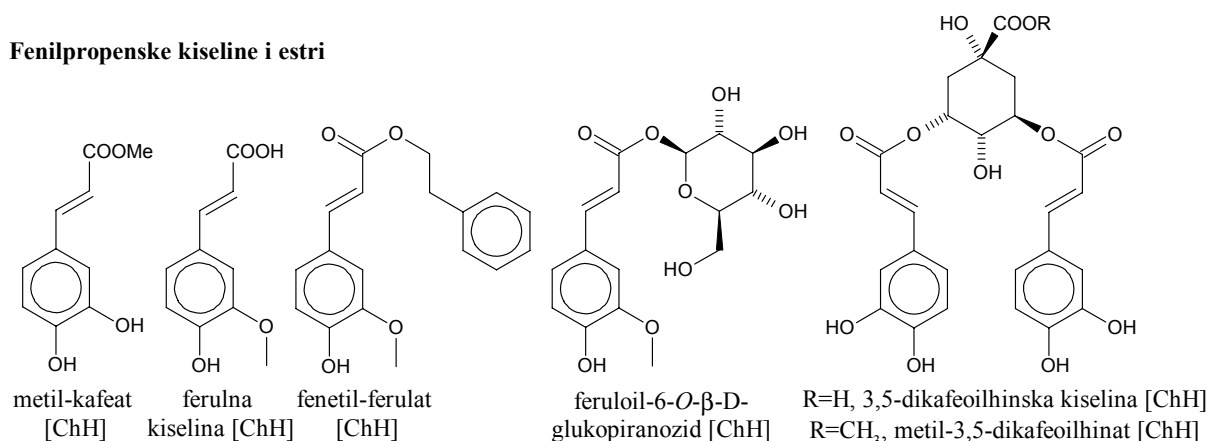
Mnogo se manje zna o derivatima benzojevih kiselina; mada se mogu naći u slobodnom obliku [87], najčešće su konjugovani sa šećerima, u vidu estara [85]. Vanilinska, *p*-hidroksibenzoeva, siringinska i protokatehinska kiselina potiču (bar delom) od degradacije lignina [87].

Fenilpropeni su najčešće prisutni kao glikozidi ili estri polifunkcionalnih karboksilnih kiselina; prilikom oštećenja ili obrade biljnog materijala, dolazi do hemijske ili enzimske hidrolize i oslobađanja isparljivih slobodnih fenilpropena.

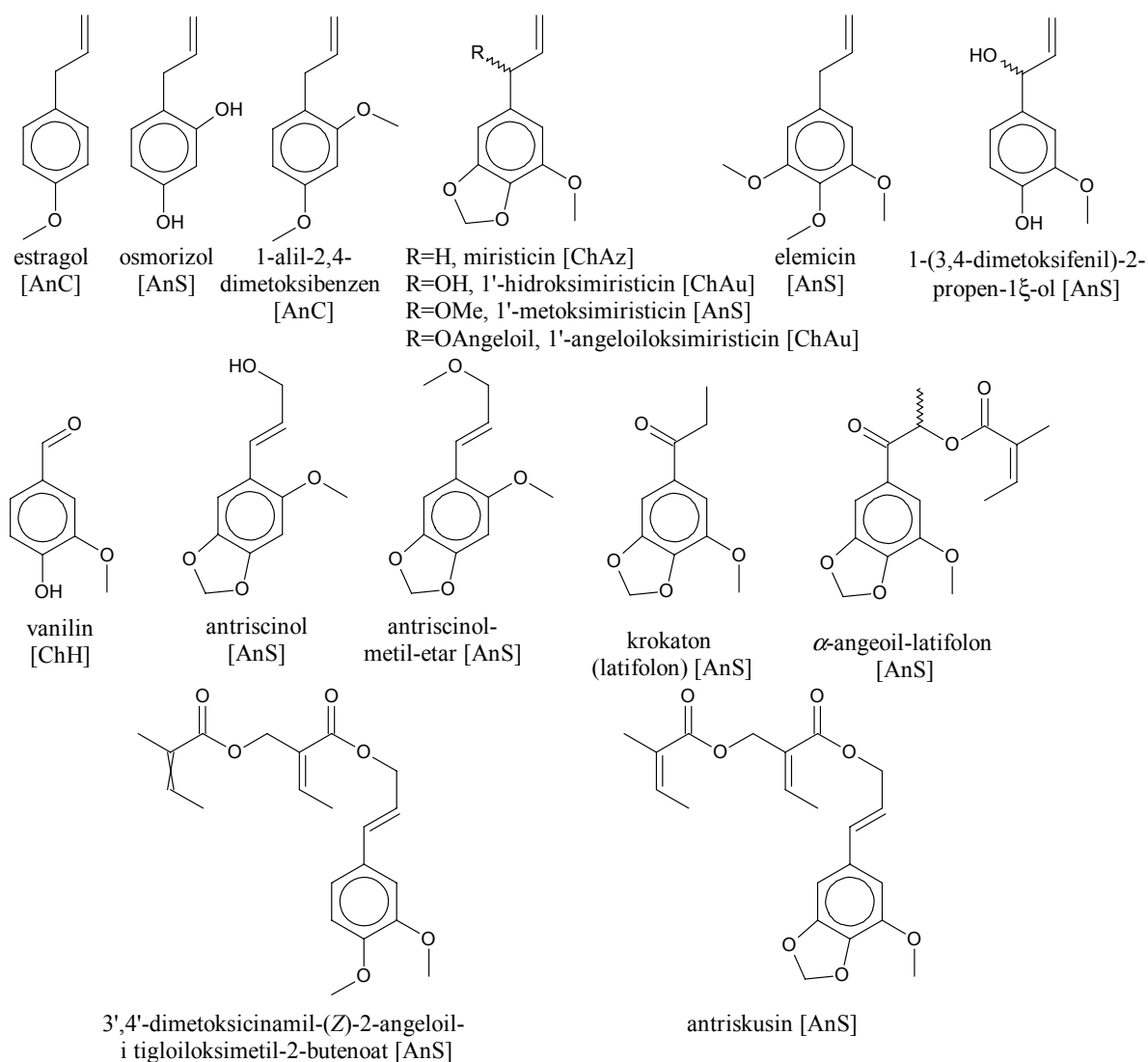
Što se tiče familije Apiaceae, distribucija fenilpropenskih kiselina tipična je za napredne familije cvetnica: kafena kiselina je univerzalna, ferulna, sinapinska i *p*-kumarinska su takođe redovno prisutne. Najzastupljeniji estri su 5-*O*-kafeoilhinska (hlorogenska) kiselina, kao i druge izomerne kafeoilhinske i dikafeoilhinske kiseline. Nisu detektovani prosti estri *p*-kumarinske kiseline, nego samo konjugati sa mono- i seskviterpenima (kao što je *p*-kumaroil-fenhon). Detektovan je i znatan broj fenilpropena, često odgovornih za karakteristična organoleptička svojstva (i primenu datih biljaka kao začina). Najčešći fenilpropen je miristicin, koji je nađen u etarskom ulju mnogih gajenih vrsta, kao što su celer, morač, peršun, šargarepa i pastrnak. Pored miristicina, pronađeni su i anetol (najjednostavniji fenilpropen), metileugenol, asaron, krokaton itd. [36].

U ekstraktima i etarskom ulju vrste *Anthriscus sylvestris* identifikovan je kombinacijom fraktionisanja i spektrometrijskih metoda veliki broj derivata fenolnih kiselina, alilfenolnog, propenilfenolnog i propilfenolnog skeleta (Slika 3.14.). Pored uobičajenih 3,4- i 3,4,5-obrazaca supstitucije: 3-metoksi-4-hidroksi- (gvajacil-tip), 3,4-dimetoksi- (veratril), 3,4-metilendioksi- (piperonil), 3-metoksi-4,5-metilendioksi- i 3,4,5-trimetoksi-, javlja se i retki 2,4,5-raspored u vidu 2-metoksi-4,5-metilendioksi-supstitucije kod antriscinola i njegovog metil-etra. Fenilpropeni i fenilpropani detektovani su u slobodnoj formi i u vidu estara sa 2-metil-2-butenskom kiselinama (angelika- i tiglinskom kiselinom) [3, 9, 10, 13, 15–17, 31]. Za sada nema podataka o kvantitativnom udelu ovih jedinjenja u biljnom materijalu. Ostale vrste tribusa *Scandiceae* nisu toliko detaljno ispitane. U etarskom ulju *Chaerophyllum azoricum* identifikovan je miristicin [25], dok su u ekstraktu *Chaerophyllum aureum* pronađeni hidroksilovani derivat miristicina, kao i njegov estar sa angelika kiselinom [30]. U ekstraktima *Chaerophyllum hirsutum* pronađen je niz derivata kafene i ferulne kiseline [18, 19, 31]. Etarsko ulje i ekstrakt *Anthriscus cerefolium* sadrži kao dominantne komponente estragol (metil-havikol) i 1-alil-2,4-dimetoksibenzen [22].

Fenilpropenske kiseline i estri



Redukovani derivati fenolnih kiselina



Slika 3.14. Strukture fenolnih kiselina i derivata detektovanih u vrstama tribusa *Scandiceae* (AnS – *A. sylvestris*, AnC – *A. cerefolium*, ChH – *Ch. hirsutum*, ChAz – *Ch. azoricum*, ChAu – *Ch. aureum*)

Biolški značaj

Primarna biološka funkcija fenolnih kiselina je zaštita od stresa – patogena, mehaničkih povreda i štetnih supstanci iz životne sredine (O₃, SO₂) [86]. Pošto su uglavnom konstitutivno prisutne u biljnim tkivima, i imaju relativno nisku toksičnost, čine deo pasivne, preventivne zaštite od manje agresivnih patogena, odn. predstavljaju fitoanticipine [83, 88]. 5-*O*-kafeoilhinska

(hlorogenska) kiselina i druge *orto*-dihidroksi-kiseline pri oštećenju tkiva pod dejstvom insekata dolaze u kontakt sa polifenol oksidazama, gradeći toksične hinone, koji napadaju –SH i –NH₂ grupe proteina i umrežavaju ih [83, 89]. Patogen-indukovana nekroza tkiva dovodi do aktivacije fenilalanin-amonijak lijaze (PAL), ključnog enzima u sintezi salicilne kiseline. Salicilna kiselina predstavlja signalni molekul i putem aktivacije niza proteina (tzv. *pathogenesis-related proteins*) dovodi do indukcije sistemskog stečenog imuniteta u celoj biljci (sinteza fitoaleksina) [86, 90]. Galoil- i elagoil-estri šećera (hidrolizabilni tanini) često su ekstremno astringentni, čine biljku nejestivom (denaturišu digestivne enzime) i tako je štite od herbivora. Čest je slučaj da nezreli plodovi sadrže vrlo visoke koncentracije tanina, koje pri sazrevanju opadaju, čime se obezbeđuje da plodovi ne budu pojedeni pre nego što je seme potpuno razvijeno [91].

Neki od eksperimenata ukazuju na moguću ulogu hidroksibenzoevih i hidroksicimetnih kiselina kao alelopatičkih agenasa [86]. Još uvek nije poznato da li fenolne kiseline imaju dodatnu, regulatornu funkciju u razvoju i metabolizmu biljaka [86]. Iako većina fenola ne predstavljaju hormone, moguće je da utiču na rast biljke putem interakcije sa auksinima i drugim grupama hormona. Na primer, utvrđeno je da 5-*O*-kafeilhinska kiselina štiti auksin indol-3-sirćetnu kiselinu (IAA) od oksidacije pod dejstvom IAA oksidaze, stimulišući tako rast [92]. Uopšte, dihidroksifenolne kiseline predstavljaju inhibitore a monohidroksifenolne kiseline stimulatore oksidacije IAA [86]. Drugi hormon na koga fenolne kiseline utiču je eten, koji ima ulogu u regulaciji rasta ćelija i njihovog oblika, odn. definiciji oblika biljke u celini. Dok kumarinska kiselina predstavlja neophodni kofaktor enzima koji sintetiše eten, kafena kiselina deluje kao njegov inhibitor; dakle, podešavanjem odnosa ove dve fenilpropenske kiseline moguće je precizno regulisati sintezu etena [86].

Apsorpcija i metabolizam

Slobodne fenilpropenske kiseline se brzo resorbuju želucu i tankom crevu pomoću transportera monokarboksilnih kiselina (koji je možda zapravo Na/glukoza kotransporter SGLT1), i zatim prevode u glukuronate i sulfate [84, 91]. Utvrđeno je da se estri mnogo slabije resorbuju [93]; sam mehanizam apsorpcije nije jasan, budući da se slobodne kiseline ubrzo nakon oralnog unosa estara pojavljuju u krvotoku, a odgovarajuća esterazna aktivnost u gastrointestinalnom traktu i jetri nije detektovana. Pretpostavlja se da do hidrolize i delimičnog metabolisanja neresorbovanih estara zapravo dolazi u debelom crevu pod dejstvom intestinalne mikroflore [84, 91]. Metaboličke transformacije kojima podležu fenilpropenske kiseline obuhvataju metilovanje hidroksilne grupe u položaju 3 pod dejstvom katehol *O*-metiltransferaze, β-oksidaciju bočnog niza do benzoevih kiselina, dehidroksilaciju, hidrogenizaciju, i konjugaciju sa glicinom, sulfatom ili glukuronskom kiselinom [57, 94]. Metaboliti detektovani u krvi i urinu po unosu kafene ili 5-*O*-kafeoilhinske kiseline su pretežno konjugati kafene, ferulne i izoferulne kiseline, kao i metaboliti mikrobialnog porekla: *m*-kumarinska kiselina-glukuronid, 3-hidroksifenil- i 3,4-dihidroksifenilpropanska kiselina, hipurne kiseline i vanilinska kiselina [57, 84, 91, 95].

Metaboličke transformacije kojima podležu hidroksibenzoeve kiseline obuhvataju konjugaciju sa sulfatom, glukuronatom i glicinom, metilovanje, demetilovanje, dehidroksilacija i (kod 4-hidroksi-kiselina) dekarboksilacija. U urinu su tipično prisutne slobodne kiseline, glukuronidi i sulfati [87]. Za galnu kiselinu utvrđeno je da se odlično resorbuje u poređenju sa ostalim fenolnim jedinjenjima. Glavni metaboliti u krvotoku su glukuronidi galne i 4-*O*-metilgalne kiseline. U slučaju elagne kiseline, u krvotoku (ali ne i u urinu) je prisutna slobodna forma, dok su u urinu detektovani proizvodi mikrobialnog metabolizma – urolitin A i B [91].

Biološka aktivnost

In vitro, *in vivo* i epidemiološke studije pokazuju da fenolne kiseline u voću, povrću, kafi i čaju imaju potencijalno blagotvoran efekat na zdravlje, u smislu antioksidantnog, hipoglikemijskog, antiviralnog i hepatoprotektivnog dejstva. Smatra se da su ova jedinjenja aktivne komponente mnogih lekovitih biljaka.

Antioksidantna aktivnost

Brojni *in vitro* testovi pokazali su da su fenolne kiseline odlični hvatači slobodnih radikala (*eng.* radical scavengers), uključujući superoksid radikal-anjon, hidroksil-radikal i peroksil-radikal, sa većim kapacitetom i reaktivnošću od troloksa, vodorastvornog derivata tokoferola [57, 96, 97]. Utvrđena je i sposobnost inhibicije reaktivnih oblika azota, čime doprinose zaštiti od mutageneze i karcinogeneze [57]. Sem direktne reakcije sa slobodnim radikalima, 5-*O*-kafeoilhinska i kafena kiselina u stanju su da grade helate sa jonima Fe³⁺ ili ih redukuju, i time inhibiraju generisanje hidroksil-radikala Fentonovom reakcijom (mada je utvrđeno da pri određenim uslovima zapravo mogu i stimulisati navedenu reakciju) [57, 98]. Potvrđen je sinergizam kafene, *p*-kumarinske i hlorogenskih kiselina sa α -tokoferolom i askorbinskom kiselinom [100].

Antikancer aktivnost

In vivo ogledi i epidemiološke studije pokazali su da unos umerenih količina 5-*O*-kafeoilhinske kiseline (npr. preko kafe) u kombinaciji sa antioksidantnim vitaminima pruža delimičnu zaštitu od genotoksičnih supstanci; pored ostalog, utvrđeno je da smanjuje rizik od raka debelog creva [84]. Kafena, ferulna i 5-*O*-kafeoilhinska kiselina *in vivo* inhibiraju mutageno delovanje benzopirena. Za galnu kiselinu takođe je u *in vitro* uslovima utvrđeno da ispoljava citotoksičnost prema više ćelijskih linija kancera, putem indukcije apoptoze, sa IC₅₀ u opsegu 5-13 µg/mL (koncentracije koje se teško mogu očekivati *in vivo*) [101, 102].

Antiinflamatorno dejstvo, uticaj na imuni sistem

Kafena i 5-*O*-kafeoilhinska kiselina inhibiraju oslobađanje histamina iz mastocita pri koncentracijama 25-50 µmol/L, kao i hijaluronidazu, što ukazuje na potencijal u tretmanu alergija, astme i inflamatornih procesa [57, 103]. Kafena, kafeoilhinske i dikafeoilhinske kiseline poboljšavaju mobilnost makrofaga, koji su u većini tkiva prva linija odbrane od infekcija [104]. Kafena i dikafeoilhinske kiseline, ali ne i hlorogenska kiselina, inhibiraju sintezu LTB₄ u leukocitima [105]. LTB₄ je jedan od molekula koji indukuju adheziju leukocita za endotelijum, fazu koja prethodi dijapezezi, a istovremeno deluje i kao hemoatraktant za neutrofile.

Antiviralno dejstvo

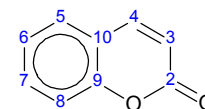
Kafeoil-jabučna i neke od dikafeoilhinskih kiselina (ali ne i monokafeoilhinske i slobodna kafena kiselina) ometaju razvoj HIV-1 u ćelijskim kulturama; međutim, pošto se ovi estri pre resorpcije najvećim delom hidrolizuju, terapijska vrednost je zanemarljiva [84, 106]. Za kafenu i hlorogensku kiselinu utvrđeno je da značajno inhibiraju herpes simpleks virus HSV-1, otporan na aciklovir, bez ispoljavanja citotoksičnih efekata [107].

Ostale aktivnosti

Veruje se da 1,3-dikafeoilhinska kiselina (cinarin) iz ekstrakta artičoke pokazuje blago hipoholesterolemično dejstvo; ekvivalentne doze 1,5-izomera (iz kafe) nisu pokazale aktivnost [84]. Galna i elagna kiselina pokazale su hepatoprotektivno dejstvo, ali tek pri koncentracijama daleko većim od onih koje se mogu očekivati iz normalne ishrane [108]. Hepatoprotektivno dejstvo zabeleženo je i kod 5-*O*-kafeoilhinske kiseline. Miristicin u većim koncentracijama ima halucinogeno dejstvo.

3.4.2. KUMARINI

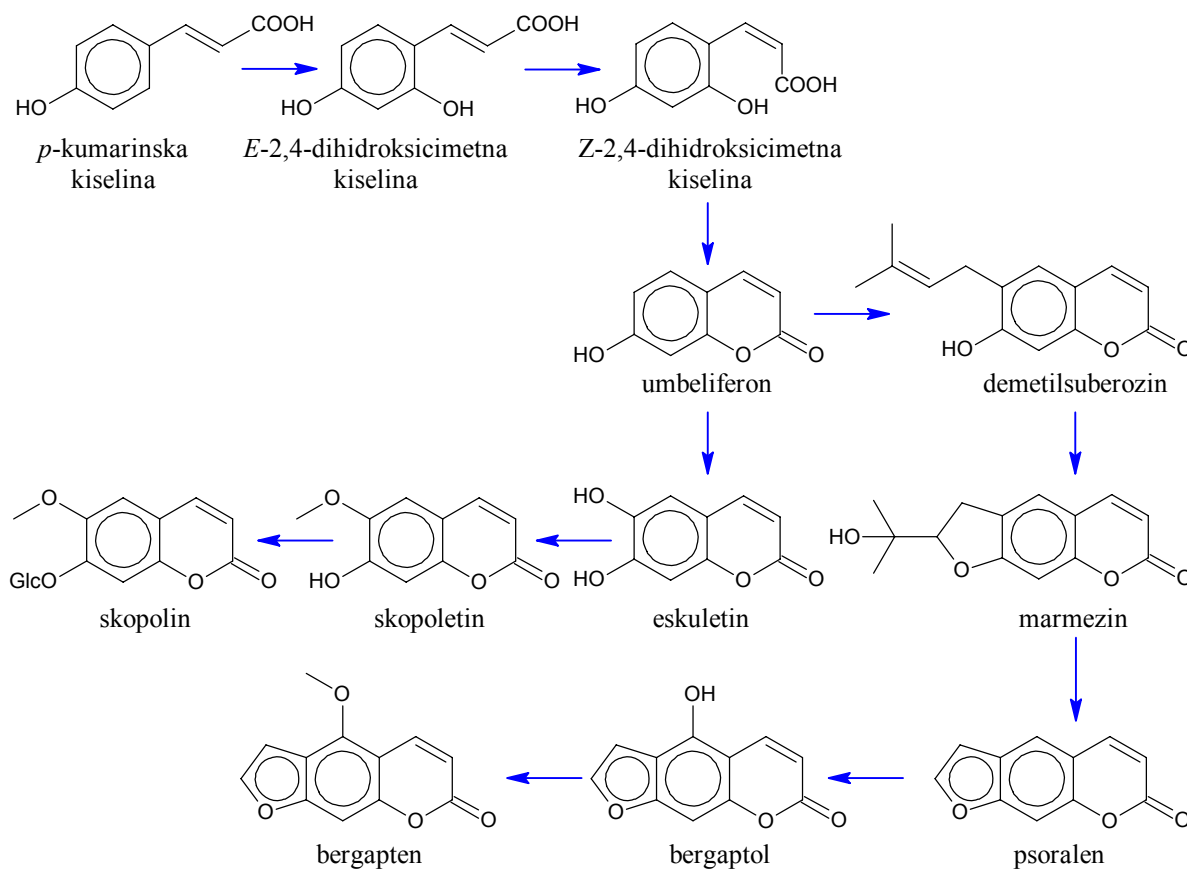
Kumarini predstavljaju laktonske derivate *cis-o*-hidroksi-fenilpropenskih kiselina, sa 5,6-benzo-2-pironskim skeletom (Slika 3.15.).



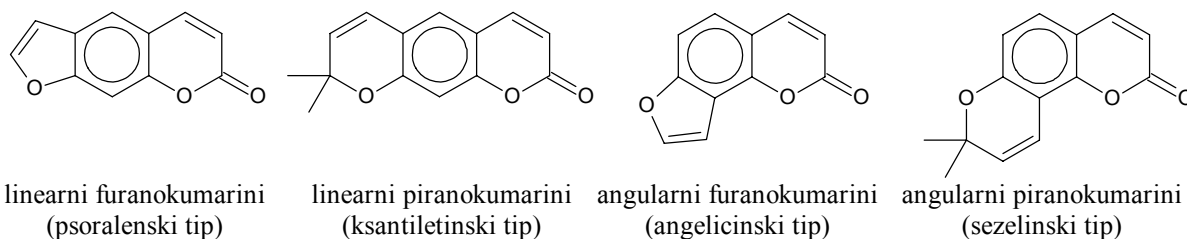
Slika 3.15. Struktura kumarina.

Biosinteza

Biogenetski prekursori kumarina su fenilpropenske kiseline hidroksilovane u položaju 2 (sa, za fenilpropanoide neuobičajenim, *meta*-odnosom kiseoničnih supstituenata) [81]. Izomerizacijom dvostruke veze u bočnom nizu karboksilna i fenolna hidroksilna grupa dovode se u povoljan položaj za reakciju intramolekulske esterifikacije (Slika 3.16.). Iako je *E*→*Z* izomerizacija najčešće nepovoljan proces, u ovom slučaju odigrava se lako zahvaljujući činjenici da je dvostruka veza oslabljena delokalizacijom (odnosno energija potrebna za π - π^* prelaz je značajno manja nego kod izolovane dvostruke veze). U toku reakcije izomerizacije i laktonizacije, karboksilna grupa je estarski vezana za glukozu. Nastali kumarin (u slučaju cimetine kiseline) i umbeliferon (u slučaju *p*-kumarinske kiseline) podležu daljim strukturnim modifikacijama – hidroksilaciji i metilovanju OH-grupa (dodatni kiseonični supstituenti potiču od ovih, naknadnih reakcija, a ne od polaznih fenilpropenskih kiselina). Aromatični prsten umbeliferona aktiviran je u *orto*-položaju i podložan je napadu alkilujućih agenasa, kao što je DMAPP (poreklom iz mevalonatnog puta). Prenilovani kumarini podležu daljoj ciklizaciji, uz formiranje linearnih i angularnih furanokumarina i piranokumarina (Slika 3.17.).



Slika 3.16. Biosinteza kumarina [81]



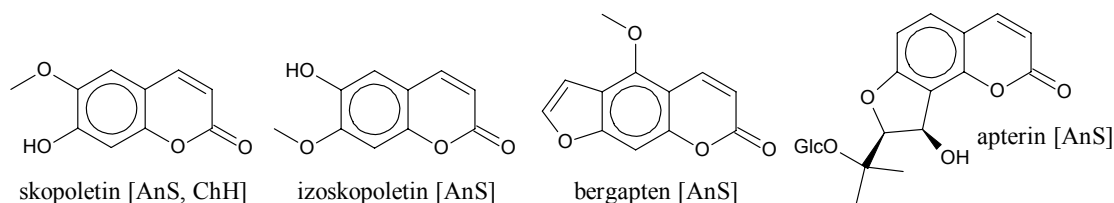
Slika 3.17. Struktura furano- i piranokumarina

Rasprostranjenost

Kumarini (u slobodnoj, acilovanoj i glikozilovanoj formi) su u biljkama, bakterijama i gljivama široko rasprostranjeni, sa preko 1300 predstavnika, dok su u životinjama veoma retki. Uobičajeni su u familijama Apiaceae i Rutaceae, kao i Leguminosae i Asteraceae. Mogu biti prisutni u svim delovima biljke, mada su najviše koncentracije detektovane u plodovima, zatim korenu, stablu i lišću [81, 109].

Kumarini su pronađeni u preko 410 vrsta (iz 87 rodova) iz familije Apiaceae. Prosti kumarini, sem umbeliferona, relativno su retki. Furanokumarini (praćeni dihidrofuranokumarinima) su uobičajeni, ali se nalaze samo u evoluciono razvijenijim rodovima. Angularni furanokumarini prisutni su uglavnom u rodovima *Heracleum*, *Pastinaca* i *Pimpinella*, dok su retki u *Angelica*, *Peucedanum*, *Prangos* i *Seseli*. S druge strane, linearni furanokumarini su zastupljeni u rodovima *Angelica*, *Peucedanum* i *Prangos*. Dok su angularni piranokumarini, kao što je sezelin, identifikovani, linearni analozi do sada nisu pronađeni u familiji Apiaceae (sem u redukovanoj formi) [36, 109].

U vrstama tribusa Scandiceae do sada su identifikovana dva prosta kumarina – skopoletin i izoskopoletin, linearni furanokumarin bergapten i angularni dihidrofuranokumarin apterin (vaginidiol-1"-*O*-glukozid) [4, 18, 31] (Slika 3.18.).

Slika 3.18. Strukture kumarina detektovanih u vrstama tribusa Scandiceae (AnS – *A. sylvestris*, ChH – *Ch. hirsutum*)

Biološki značaj

Istraživanja su pokazala da kumarini predstavljaju inducibilnu antifungalnu zaštitu (fitoaleksine), odn. biljke i neke gljive ih sintetišu kao odgovor na gljivične infekcije. Primeri su umbeliferon, skopoletin, eskuletin i skopolin kod slatkog krompira, furanokumarini kod celera i pastrnka itd. U nekim slučajevima, detektovani su i na površini listova, gde predstavljaju odbrambenu barijeru protiv patogena [109, 110].

Apsorpcija i metabolizam

Kod čoveka, kumarin se metaboliše u jetri pod dejstvom citohrom P450 izoforme CYP2A6, pri čemu dolazi do hidroksilacije u položaju 7. Čak i pri visokim koncentracijama, hepatotoksičnost je niska. Nasuprot tome, kod pacova je aktivan CYP2A-5 koji generiše 3-hidroksikumarin i produkte otvaranja heterocikličnog prstena, rezultujući visokom hepatotoksičnošću [109].

Biolška aktivnost

Kao i većina sekundarnih biomolekula, i kumarini pokazuju širok spektar bioloških aktivnosti, uključujući fotosenzibilizatorsku, antikoagulantnu, estrogenu, antimikrobnu, vazodilatatorsku, antiaritmiju, antioksidantnu, holeretičku, imunosupresivnu, antiinflamatornu, moluskacidalnu, antihelmintičku, adrenergičnu, sedativnu, hipnotičku i analgetsku aktivnost. U nekim slučajevima (aflatoksini) zabeležena je i izrazita hepatotoksičnost i kancerogenost, dejstvo na vitalne ćelijske procese (inhibicija glikolize i oksidativne fosforilacije) i fotokonjugacija sa DNK [109, 111].

Fotosenzibilizacija

Linearni furanokumarini (psoraleni) poznati su fotosenzibilizatori, koji lako apsorbuju UV zračenje i prenose energiju na druge molekule. Takođe, nakon UV-aktivacije ova jedinjenja mogu se vezivati za pirimidinske baze u DNK, čime inhibiraju replikaciju i transkripciju. Ove pojave koriste se već više od 3000 godina kod lečenja kožnih bolesti kao što su psorijaza i vitiligo. Zahvaljujući činjenici da apsorbuju samo štetno kratkotalasno zračenje (280–315 nm), dok propuštaju UV zrake dužih talasnih dužina (315–400 nm), koriste se kod preparata za potamnjenje kože. Međutim, treba imati u vidu fotokancerogenost ove grupe jedinjenja, usled generisanja slobodnih radikala koji dalje mogu interagovati sa DNK [81, 109]. Fotosenzibilizacija takođe može biti uzrok crvenila, hiperpigmentacije i formiranja plikova pri izlaganju sunčevoj svetlosti nakon kontakta sa biljkama koje sadrže furanokumarine (peršun, pastrnak, celer, smokve) [112]. Sâm psoralen je najaktivnije jedinjenje u grupi; hidroksilovani derivati, kao i 3,4- i 2',3'-dihidro-derivati inaktivni su. Angularni (7,8-) furanokumarini ne pokazuju ovu aktivnost, ili je ona mnogo slabija [109].

Antikoagulantno dejstvo

Jedno od najvažnijih farmakoloških dejstava kumarina je antikoagulantno dejstvo (prvo uočeno kod trovanja domaćih životinja dikumarolom iz deteline kontaminirane gljivicama). Prilikom koagulacije, Glu ostaci niza proteina (faktori II, VII, IX, X, protein S) karboksiluju se u prisustvu redukovano vitamina K, koji pritom prelazi u epoksid, i regeneriše se naknadno pod dejstvom enzima vitamin K-epoksid reduktaze. Neki od kumarina poznati su po tome da inhibiraju ovaj enzim, čime izazivaju deficijencije vitamina K i nemogućnosti koagulacije krvi, što može dovesti do fatalnih unutrašnjih krvarenja. Prirodni i sintetički kumarinski derivati (dikumarol, varfarin) našli su primenu kao oralni antikoagulansi u tretmanu kritičnih tromboza, i kao sredstva za deratizaciju [81, 109, 112].

Antibakterijsko i antifungalno dejstvo

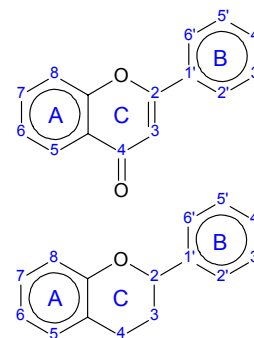
Neki od kumarina, uključujući umbeliferon, skopoletin i furanokumarine, inhibiraju germinaciju spora i rast plesni (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus* itd.) i kvasaca, tj. pokazuju fungistatsko dejstvo (ali ne i fungicidno), mada se vremenom razvija rezistencija. Treba pomenuti da kod nekih gljiva, kumarini izazivaju suprotan efekat, odn. značajno stimulišu germinaciju i rast. Eskuletin i skopoletin pokazuju fungicidno dejstvo. Aktivnost pokazuju samo aglikoni, dok su glikozidi inaktivni [109, 112]. 4-hidroksikumarini takođe su inaktivni. Dikumarol je veoma efikasan protiv različitih *Bacillus*, *Streptococcus* i *Staphylococcus* bakterija, pri čemu je dejstvo posledica inhibicije enzima DNK giraze [109].

Antikancer aktivnost

Kumarin i derivati, uključujući 4-hidroksikumarine i furanokumarine, inhibiraju mitozu i pokazali su obećavajuće rezultate u *in vivo* testiranjima hemoterapije melanoma, uz odsustvo neželjenih efekata. Antiproliferativni efekat ispoljava se u ranoj G1 fazi [109, 113]. Mehanizam dejstva još uvek nije poznat, ali se pretpostavlja da uključuje inhibiciju proliferacije tumorskih ćelija, prevenciju metastaze modulacijom imunog odgovora, antimutagene efekte, i (u nekim slučajevima) indukciju apoptoze.

3.4.3. FLAVONOIDI

Flavonoidi su najveća grupa fenolnih jedinjenja, sa zajedničkom $C_6C_3C_6$ strukturom izvedenom od flavona (2-fenilhromen-4-ona, 2-fenil-1,4-benzopirona) ili flavana (2-fenilbenzopirana) (Slika 3.19.). Prema stepenu oksidacije i supstituciji na prstenu C, mogu se podeliti na flavone, flavonole, flavanone, dihidroflavonole (flavanonole), flavan-3,4-diole (leukoantocijanidine), flavan-3-ole (katehine), flavan-4-ole i antocijanidine. U ovu grupu još spadaju i auron, jedinjenja bez C prstena – halkoni, dihidrohalkoni i retrohalkoni, zatim izoflavonoidi (izoflavoni, kumestani, pterokarpani, rotenoidi...) i oligo- i polimeri flavanola (proantocijanidini) [81, 94, 114, 115].



Slika 3.19. Struktura i numeracija flavona i flavana.

Biosinteza

Flavonoidi su mešovito biogenetskog porekla – fenilpropenske kiseline (proizvodi šikimatnog puta), u vidu tioestara sa CoA, uključuju se u acetatni put, pri čemu dolazi do elongacije bočnog niza pomoću 3 aktivirane C_2 -jedinice (malonil-CoA). Nastali poliketidni niz dalje podleže Claisen-ovoj reakciji, uz formiranje aromatičnog prstena A. Nastali halkan prekursor je za sve ostale klase flavonoida. Nukleofilnim napadom fenolne hidroksilne grupe na α,β -nezasićeni keton u reakciji Michael-ovog tipa dolazi do stereospecifičnog zatvaranja prstena C i građenja flavanona. Daljim reakcijama oksidacije i redukcije formiraju se ostale klase flavonoida (Slika 3.20.) [81]. Različito biogenetsko poreklo prstenova A i B ogleda se i u obrascima oksigenacije – kod prstena A, tipično su supstituisane pozicije 5 i 7 (*meta*-supstitucija, karakteristična za acetogentine), a kod prstena B – 3', 4' i 5' (karakteristično za fenilpropanoide). U stadijumu flavanona i dihidroflavonola može doći do dodatnih hidroksilacija aromatičnih prstenova.

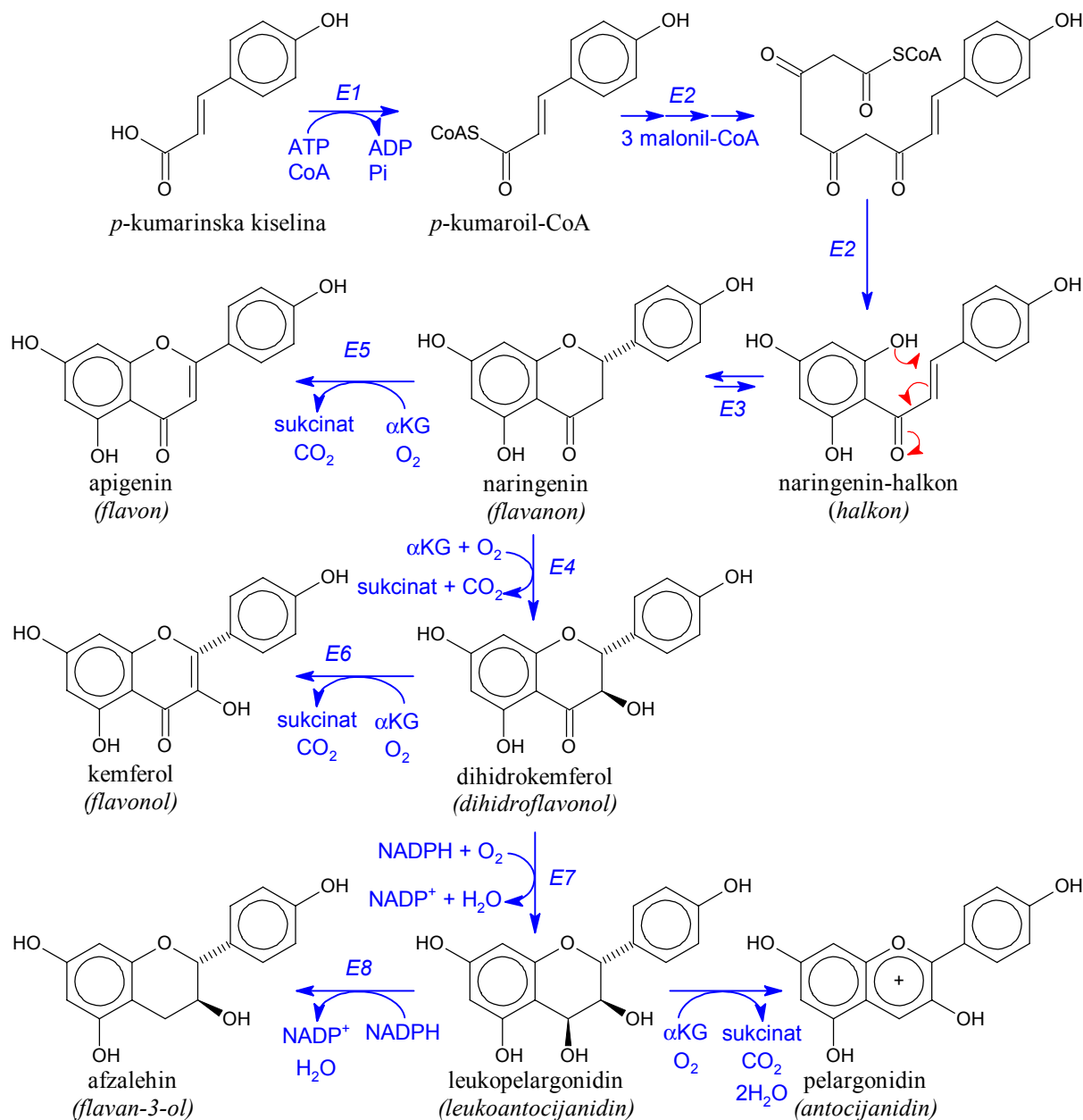
Rasprostranjenost

Do sada je otkriveno bar 6850 flavonoida, uglavnom u formi glikozida [116]. Prisutni su u svim familijama i skoro svim vrstama viših biljaka, uključujući i jestive i lekovite biljke, dok su u gljivama veoma retki [115, 117]. Tri najrasprostranjenije klase su flavonoli, flavoni i flavan-3-oli (katehini).

Flavoni su veoma zastupljeni u prirodi. Iako je uobičajen samo mali broj osnovnih, aglikonskih struktura (najčešći su apigenin i luteolin), oni grade širok spektar glikozida. Flavonolni glikozidi, koji se uglavnom izvode od kemferola, kvercetina, miricetina i ramnetina, takođe su brojni [117]. Ova jedinjenja su u biljkama obično prisutna u vidu *O*-glikozida, mada flavoni grade i *C*-glikozide. Poznato je bar 80 šećera koji ulaze u sastav glikozida (10 monosaharida, 39 disaharida, 30 trisaharida i 1 tetrasaharid), pri čemu je najčešća D-glukoza, za kojom slede D-galaktoza, L-ramnoza, L-arabinoza, D-ksiloza, D-apioza i D-glukuronska kiselina [115, 118, 119]. Glikozilacija je

najčešće u poziciji 3, ređe 7, i samo retko 3', 4' i 5 kod flavonola, odn. u poziciji 7 kod flavona [118].

Flavanoni i halkoni su relativno slabo zastupljeni. Flavanoni su uobičajeni samo u citrusima [117]. Javljaju se kao glikozidi, najčešće 7-*O*-rutinozidi (6-*O*- α -L-ramnozil-D-glukozidi) i neohesperidozidi (2-*O*- α -L-ramnozil-D-glukozidi) [120]. U nekoliko familija (Moraceae, Leguminosae, Asteraceae, Cannabinaceae) detektovan je niz *C*-prenilovanih aglikona flavanona i halkona [120].



Slika 3.20. Biosinteza flavonoida. E1 – 4-kumarat-CoA ligaza (EC 6.2.1.12), E2 – naringenin-halkon sintaza (flavanon sintaza, EC 2.3.1.74), E3 – halkon izomeraza (EC 5.5.1.6), E4 – flavanon dioksidgenaza (EC 1.14.11.9), E5 – flavon sintaza (EC 1.14.11.22), E6 – flavonol sintaza (EC 1.14.11.23), E7 – dihidrokemferol 4-reduktaza (EC 1.1.1.219), E8 – leukoantocijanidin reduktaza (EC 1.17.1.3), E8 – leukocijanidin oksigenaza (EC 1.14.11.19) [81]

Za razliku od ostalih klasa, flavan-3-oli uglavnom su prisutni u vidu aglikona [91]. Rajrasprostranjeniji pripadnici su (+)-katehin, (–)-epikatehin, (+)-galokatehin i (–)-apigalokatehin, kao i estri: (–)-epikatehin-galat i (–)-epigalokatehin-galat [118]. Naročito su zastupljeni u familiji Asteraceae, mada su pronađeni u još 26 familija viših biljaka [115].

Izoflavoni (glavni predstavnici su genistein i daidzein) se pretežno javljaju u vrstama porodice Fabaceae, kao što je soja, mada su pronađeni u još 19 porodica cvjetnica, kao i u nekim golosemenicama i mahovinama [115, 117]. Karakteriše ih B-prsten vezan u poziciji C-3 umesto C-2.

Antocijanidini i antocijani predstavljaju najveću i najznačajniju grupu vodorastvornih pigmenta. Strukture se izvode od 19 osnovnih antocijanidina, od kojih su najčešći pelargonidin, cijanidin, delfinidin, petunidin i malvidin [115]. Široko su rasprostranjeni u cvjetnicama i golosemenicama, sem u redu Caryophyllales (čiji pripadnici koriste betalaine kao pigmente) [115]. Naročito su zastupljeni u intenzivno obojenim plodovima (bobicama) [117]. U zavisnosti od strukture, pH vrednosti i prisustva kopigmenta, mogu biti crveni, ljubičasti ili plavi. Najvećim delom prisutni su u obliku glikozida – antocijana, sem u slučaju neuobičajenih 3-deoksi struktura. Najneuobičajeniji šećeri koji ulaze u sastav antocijana su glukoza, galaktoza, ramnoza i arabinosa. Šećerna komponenta često je acilovana fenilpropenskim kiselinama (kafena, *p*-kumarinska, ferulna, sinapinska) i drugim organskim kiselinama (sirćetna, jabučna, malonska, oksalna, ćilibarna) [121].

Što se tiče porodice Apiaceae, tri najvažnija aglikona su kemferol, kvercetin i luteolin, što je obrazac uobičajen za pretežno zeljaste biljke [36]. Identifikovano je bar pet *O*-metilovanih flavonoida: krizoeriol (3'-*O*-metilluteolin), diosmetin (4'-*O*-metilluteolin), akacetin (4'-*O*-metilapigenin), izoramnetin (3'-*O*-metilkvercetin) i hesperitin. Glikozidi kao šećernu komponentu sadrže tipično glukozu, rutinozu, glukuronsku kiselinu, arabinozu ili ramnozu, kao i neuobičajeni monosaharid apiozu. Flavoni su najčešće glikozilovani u poziciji C-7 (luteolin-7-*O*-glukozid je najrasprostranjeniji flavonski glikozid u porodici), dok se C-5 i C-4' derivati retko javljaju. Kod flavonola šećerna komponenta vezana je u položaju C-3. Svi pronađeni antocijani izvode se od najjednostavnijeg aglikona – antocijanidina. Generalno, za porodicu je karakteristično odsustvo jarke koloracije cvetova – latice su najčešće bele, ponekad žute ili bledoružičaste. Umesto toga, antocijani se, kada su prisutni, koncentrišu u stablu (primeri: *Heracleum*, *Conium*, *Chaerophyllum*), listu ili korenu.

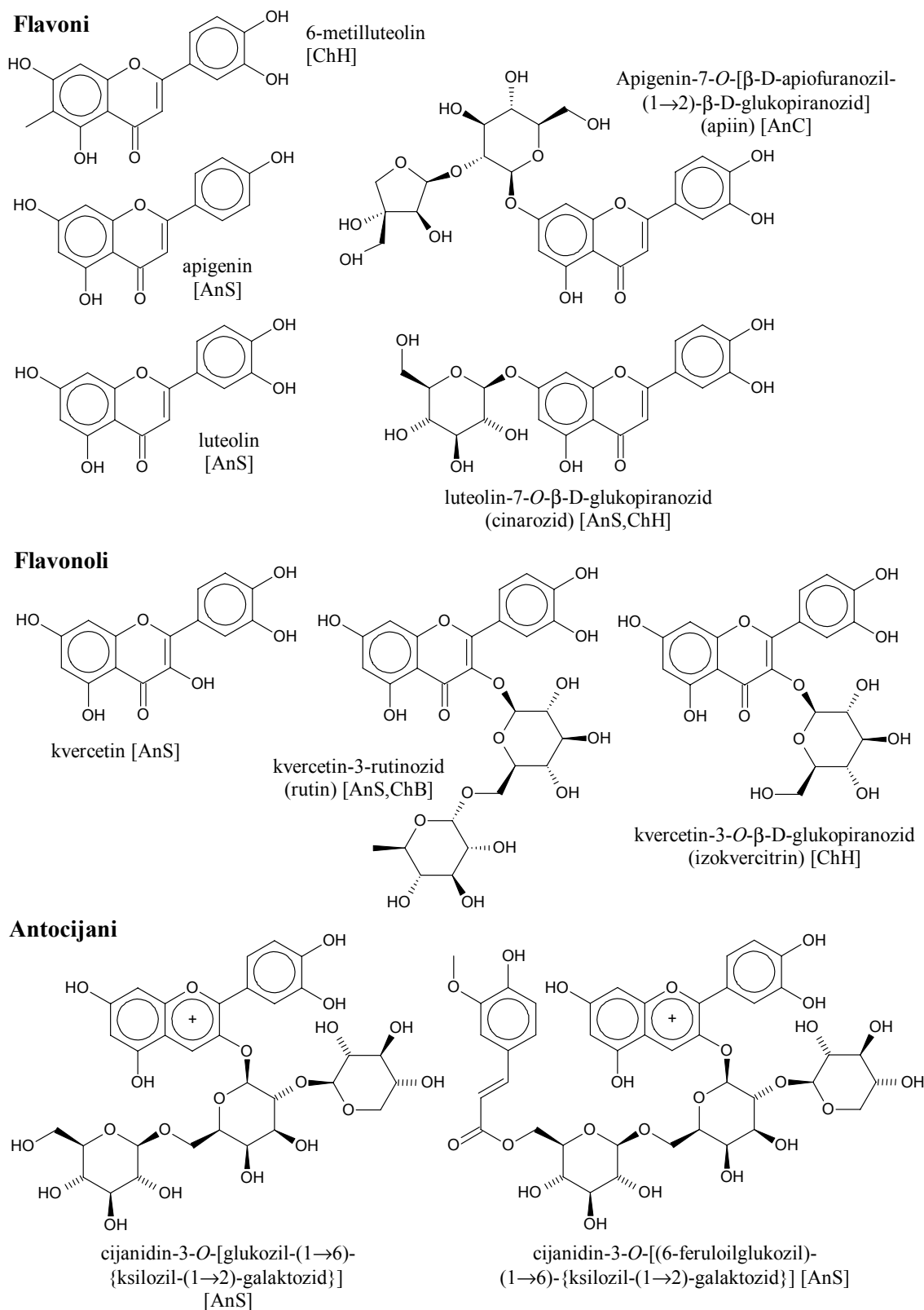
Podaci o flavonoidima u vrstama tribusa Scandiceae (Slika 3.21.) vrlo su ograničeni, i uglavnom se odnose na *Anthriscus sylvestris*, u kome su identifikovani apigenin, luteolin i kvercetin, kao i njihovi glikozidi (glukozidi i rutinozidi) [6, 33]. U *Chaerophyllum hirsutum* pronađeni su glikozidi kvercetina i luteolina [19, 33], kao i neuobičajeni aglikon 6-*C*-metilluteolin [19]. Treba još pomenuti apiin (karakterističan za porodicu Apiaceae) iz *Anthriscus cerefolium* [2], luteolin-diglukozid iz *Chaerophyllum bulbosum* i *Chaerophyllum aureum* [35], i neidentifikovani cijanidin-3,5-dimonozid (crveni pigment iz lista *Anthriscus caucalis*) [34].

Biološki značaj

Flavonoidi predstavljaju grupu sekundarnih biomolekula sa najviše različitih uloga u rastu, razvoju i opstanku biljke. Neke od ovih funkcija kritične su za preživljavanje: privlačenje oprašivača, stimulacija azotofiksirajućih bakterija, stimulacija rasta polenske cevi, resorpcija minerala iz odumirućeg lišća. Druge obezbeđuju kompetitivnost biljke u suboptimalnom okruženju: povećanje tolerancije prema abiotičkim faktorima stresa, odbranu od herbivora i patogena, kao i alelopatsku komunikaciju. Intenzivirana biosinteza pod dejstvom biotičkih i abiotičkih stresora (patogeni, herbivore, povrede, ekstremne temperature, UV zračenje, disbalans mineralnih nutrijenata, suša, anoksija, ozon...) ukazuje na funkciju flavonoida u odgovoru na stres, odn. ulogu u adaptaciji [94].

Smatra se da su bezbojni flavonoidi prvenstveno uključeni u zaštitu ćelija od kratkotalasnog UV zračenja, koje dovodi do oštećenja DNK, kao i do poremećaja u različitim fiziološkim procesima usled generisanja slobodnih radikala. Flavoni i flavonoli akumuliraju se u ćelijama epidermisa, filtriraju štetno UV-A i UV-B zračenje i štite dublje slojeve tkiva [94, 122]. Pod dejstvom stresa, potencira se sinteza flavonoida sa većim stepenom hidrosilacije (kvercetin nasuprot kemferolu) odn. većim antioksidantnim potencijalom.

Antioksidantna svojstva karakteristična su za sve polifenole, pa i flavonoide. Snažni su hvatači reaktivnih oblika kiseonika ($\text{OH}\cdot$, O_2^- , H_2O_2), pri čemu aktivnost raste sa uvođenjem dodatnih *orto*-hidroksilnih grupa u prstenu B. Najveći deo lociran je u vakuolama, što je idealna pozicija za UV protektora ali nepovoljna za antioksidantnu funkciju. Međutim, izvesne količine su detektovane i u citoplazmi, gde mogu reagovati sa reaktivnim oblicima kiseonika; pri neutralnoj pH vrednosti aktivnost flavonoida daleko je veća nego u kiseloj sredini u vakuolama [94, 123].



Slika 3.21. Strukture flavonoida detektovanih u vrstama tribusa *Scandiceae* (AnS – *A. sylvestris*, AnC – *A. cerefolium*, ChH – *Ch. hirsutum*, ChB – *Ch. bulbosum*)

Antocijani (i, u nekim slučajevima, halkoni, auron i flavonoli) najčešće daju glavni doprinos boji cveta i ploda. U mnogim slučajevima, uticaj flavonoida na izgled cveta nije ograničen samo na vidljivi spektar – u UV području uočljive su dodatne šare usled apsorpcije ili fluorescencije. Smatra se da je funkcija jarko obojenih latica privlačenje polinatora – insekata i ptica, a obojenih plodova – privlačenje životinja koje jedu plod i transportuju seme [94, 124]. Implicirano je (mada još uvek ne postoje čvrsti dokazi) da antocijani u lišću i ostalim vegetativnim tkivima imaju zaštitnu ulogu, odn. da služe kao aposematički koloranti (signali upozorenja za predatore) i antifungalni agensi. Utvrđeno je da insekti izbegavaju crveno obojene biljke; pretpostavlja se da antocijani maskiraju boje koje privlače herbivorne insekte – žutu i zelenu. Druga mogućnost je da crvena, smeđa ili crna koloracija kod biljojeda ostavlja utisak nejestivog, osušenog lišća [94].

Pretpostavlja se da antocijani imaju i fotoprotektivnu ulogu, odn. pri prejakom osvetljenju apsorbuju deo svetlosti neiskorišćene za fotosintezu, sprečavajući time nekontrolisano generisanje slobodnih radikala u ćeliji i oštećenje hloroplasta [94].

Apsorpcija i metabolizam

Procenjuje se da je dnevni unos flavonoida putem hrane 0,025–1 g/dan [125]. Apsorpciji flavonoida u tankom crevu obavezno prethodi hidroliza, odn. uklanjanje šećerne komponente pod dejstvom β -glukozidaza. Poznato je više enzima široke specifičnosti za koje se pretpostavlja da mogu da hidrolizuju flavonoidne glikozide, uključujući laktazu floridin hidrolazu (na površini epitelnih ćelija tankog creva; oslobođeni aglikoni zatim difunduju u ćelije) i citosolnu β -glukozidazu (koja zahteva prehodni transport glikozida u epitelne ćelije, možda pomoću Na^+ /glukoza kotransportera) [91, 94, 119, 126, 127]. Od tipa šećera zavisi gde se hidroliza vrši, kao i stepen apsorpcije. Neapsorbovani flavonoidi (kao što su neohesperidozidi i rutinozidi) stižu do debelog creva, gde ih metabolišu mikrobialne ramnozidaze i β -glukozidaze; deo aglikona biva pritom degradiran, ponekad (npr. kod izoflavona) do aktivnijeg proizvoda. Neki od proizvoda degradacije flavonoida su prosti fenoli (rezorcinol, pirogalol, floroglucinol), fenolne kiseline (4-hidroksibenzoeva, 2,4,6-hidroksibenzoeva, 4-hidroksifenilsirćetna...) i 2,4-dihidroksiacetofenon [120]. Flavan-3-oli, koji nisu glikozilovani, apsorbuju se putem difuzije već u tankom crevu. U toku apsorpcije, u intestinalnom zidu dolazi do konjugacije flavonoida i građenja β -glukuronida i sulfata, kao i do metilacije kateholâ. C-glikozidi ne podležu konjugaciji. Deo konjugata prelazi u krvotok, dok se (kod nekih flavonoida) deo vraća u lumen creva. Dalje strukturne modifikacije odigravaju se u jetri, i obuhvataju metilovanje, građenje sulfatnih estara, hidrolizu glukuronida, re-glukuronidaciju itd. [91].

Antocijani se brzo resorbuju i ulaze u cirkulaciju (maksimalna koncentracija postiže se posle 30 min), dok je apsorpcija antocijanidina mnogo sporija. Iako se u krvotoku antocijani nalaze u obliku glikozida, pretpostavlja se da u toku apsorpcije i oni hidrolizuju [91, 125]. U *in vivo* uslovima, antocijanidini su nestabilni i nakon otcepljenja šećerne komponente brzo se konvertuju u protokatehinsku kiselinu. Protokatehinska kiselina, koja predstavlja proizvod metabolizma mnogih flavonoida, takođe pokazuje antioksidantna i citotoksična svojstva, ali tek pri visokim koncentracijama [125]. Treba napomenuti da, iako antocijani čine oko 50 % ukupnih polifenola, njihova biodostupnost je slaba. Neapsorbovani deo izlučuje se nepromenjen putem fecesa; intestinalna mikroflora nije u stanju da metaboliše antocijane [121].

Biološka aktivnost

Flavonoidi već duže vreme privlače pažnju zbog antioksidantne aktivnosti, kao i moguće uloge u prevenciji kancera, osteoporoze, kardiovaskularnih, neurodegenerativnih i zaraznih bolesti [114]. Epidemiološke studije ukazale su na povoljan uticaj hrane biljnog porekla na zdravlje, što je pripisivano visokom sadržaju fenolnih jedinjenja, naročito flavonoida. Međutim, novija istraživanja pokazuju da je uloga flavonoida uglavnom precenjena, i uočeni efekti mogu poticati od prisustva drugih klasa primarnih i sekundarnih biomolekula u biljnoj hrani (polinezasićene masne kiseline,

jedinjenja sumpora i selen, poliacetileni, terpeni) [94, 128]. Dok je neosporno da u *in vitro* uslovima flavonoidi zaista pokazuju širok spektar aktivnosti (uključujući dejstvo na CNS, kardi-toničnost, sniženje nivoa lipida, antiulcer, hepatoprotektivno, fitoestrogeno, antioksidantno, antiinflamatorno, antineoplastično, vazodilatatorsko, antiagregatorno i antimikrobno dejstvo [114]), zbog kompleksnosti odnosa ishrane i zdravlja, mogućnosti sinergističkog ili kompetitivnog odnosa različitih biomolekula, kao i višestrukih mehanizama dejstva, prava vrednost flavonoida tek treba da bude utvrđena.

Antioksidantna aktivnost

Flavonoidi pokazuju antioksidantnu aktivnost tipičnu za polifenolna jedinjenja, zahvaljujući mogućnosti doniranja atoma vodonika uz formiranje rezonantno stabilizovanog radikala, kao i mogućnosti helatacije jona prelaznih metala. Sposobnost neutralizacije slobodnih radikala u vodenom rastvoru uporediva je ili nekoliko puta bolja od askorbinske kiseline i tokoferola [117]. Međutim, brojna istraživanja pokazuju da se po svemu sudeći antioksidantni kapacitet plazme ne menja bitno pri unosu flavonoida putem hrane, ili je efekat slab i kratkotrajan [94, 129–132]. Efikasnost je nešto veća kod lekovitog bilja, tipično znatno bogatijeg flavonoidima i drugim polifenolima. Može se pretpostaviti da, ukoliko povoljni efekti voća i povrća na zdravlje potiču bar delom od flavonoida, u pitanju su mehanizmi različiti od antioksidantnog delovanja [94].

Dok je pri određenim *in vivo* eksperimentalnim uslovima utvrđeno i potencijalno pro-oksidantno i mutageno dejstvo, ono nije verovatno pri umerenim dozama i *in vivo* uslovima. Međutim, dokazano je da kvercetin, zahvaljujući visokoj redoks-aktivnosti i lakoj autooksidaciji, može potencirati dejstvo nekih kancerogenih supstanci [133].

Estrogena i antiestrogena aktivnost

Kod više klasa flavonoida – flavona, flavonola, izoflavona – detektovana je fitoestrogena aktivnost, odn. sposobnost kompetitivnog vezivanja za estrogene receptore u ćelijskom jedru. Aktivnost je kod izoflavona približno 10× izraženija nego kod ostalih grupa, mada i dalje značajno slabija od samih estrogenih hormona [117, 134]. Zahvaljujući činjenici da mogu postići mnogo više koncentracije u plazmi od endogenih hormona, kod osoba sa niskim nivoom estrogena (žene u postmenopauzi) mogu značajno ispoljiti estrogene efekat već pri unosu umerenih doza [135]. Moglo bi se očekivati da će kod osoba sa visokim nivoom estrogena u plazmi izoflavoni delovati antiestrogeno, putem kompetitivne inhibicije receptora. Rezultati su još uvek nejasni, mada se čini da unos putem hrane (soje) zapravo dovodi do slabog/zanemarljivog proestrogenog efekta [136]. Uprkos tome, epidemiološka ispitivanja potvrđuju značajno smanjenje incidence kancera dojke i endometrijuma kod žena [137], i kancera prostate kod muškaraca koje redovno konzumiraju soju [138]. To može ukazivati na prisustvo drugog tipa estrogenskih receptora, prema kojima izoflavonoidi pokazuju veći afinitet, ili dodatnih aktivnih komponenti u soji.

Antikancer aktivnost

Sprovedena su brojna *in vitro* i *in vivo* ispitivanja antikancer aktivnosti različitih klasa flavonoida. Utvrđeno je da flavoni (apigenin, luteolin) inhibiraju proliferaciju niza ćelijskih linija kancera pri koncentracijama od tipično 1–50 $\mu\text{mol/L}$, dok je dejstvo na zdrave ćelije slabo [117, 139]. Slični rezultati dobijeni su i za flavonol – kvercetin [117, 140, 141]. Rezultati kliničkih testiranja takođe pokazuju da flavonoidi imaju značajan potencijal u terapiji karcinoma, i to bez neželjenih efekata [142]. Ispitivanja odnosa struktura-aktivnost pokazala su da su kod flavona i flavanona za aktivnost značajni $\Delta^{2,3}$ dvostruka veza i *orto*-dihidroksilacija na prstenu B. Kod polimetoksilovanih derivata, za aktivnost su esencijalne 3-OH i 8-OMe grupa [139]. Što se tiče antocijanidina, dokazano je *in vivo* antiproliferativno dejstvo na ćelije kancera želuca i debelog creva, uz IC_{50} vrednosti reda 10 $\mu\text{mol/L}$, 2–6 puta potentnije od drugih klasa flavonoida. Dejstvo je

neselektivno – pri istim koncentracijama, citotoksičnost je ispoljena i prema zdravim ćelijama fibroblasta [117].

Dok su neka istraživanja pokazala pro-proliferativno dejstvo genisteina, daidzeina i ekstrakata soje na estrogen-zavisne ćelije kancera, kod većine je došlo do inhibicije širokog spektra ćelijskih linija kancera [117, 143]. Čini se da je aktivnost bifazna – pri koncentracijama reda 0,001–1 $\mu\text{mol/L}$, dejstvo je stimulatorno, a pri višim koncentracijama (1–100 $\mu\text{mol/L}$) je snažno antiproliferativno (inhibitorni mehanizmi aktivni pri visokim koncentracijama nadvladavaju stimulatorne). Prisustvo estrogena dodatno modulira aktivnost.

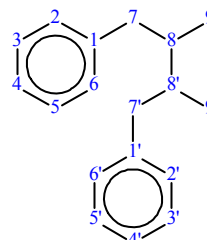
Kardiovaskularno dejstvo

Epidemiološke studije pokazuju potvrđuju da unos flavonoida (npr. preko vina) smanjuje incidencu kardiovaskularnih bolesti (ateroskleroze). Ova aktivnost tradicionalno je povezivana sa sprečavanjem oksidacije lipoproteina male gustine (LDL); noviji rezultati pokazuju da u *in vivo* uslovima flavonoidi u uobičajenim koncentracijama ne dovode do značajne inhibicije oksidacije LDL, i da protektivni mehanizmi nemaju veze sa antioksidantnom aktivnošću. Jedno od mogućih objašnjenja je modulacija signalnih puteva (koji uključuju proinflamatorne medijatore TNF- α i IL-1 β) koji stimulišu ekspresiju adhezionih molekula na površini ćelija endotela. Time se sprečava ključni korak u aterogenezi – adhezija monocita za zid arterije i njihov prolazak u subendotelni prostor [94, 144]. Drugi mehanizam vazoprotekcije je modulacija endotelijalne NO sintaze (eNOS). Utvrđeno je da neki flavonoidi (luteolin, luteolin-7-glukozid, cijanidin-3-glukozid, genistein...) pojačavaju ekspresiju i aktivnost eNOS, i time produkciju NO, koji je potentni vazodilatator [94, 145]. Za niz flavonoida dokazano je i da smanjuju fragilnost kapilara, pri čemu najjače dejstvo ispoljavaju hesperitin, rutin i kvercetin. Kvercein, (+)-katehol, fizetin i još nekoliko flavonoida pokazali su i antitrombogeno dejstvo (inhibiciju agregacije trombocita) [114].

3.4.4. LIGNANI

Podela

Lignani predstavljaju grupu sekundarnih biomolekula formiranih β,β' -kuplovanjem dve C_6C_3 (propilbenzene) jedinice [146], i mogu se smatrati derivatima ugljovodonika lignana (Slika 3.22.) [147]. Šira definicija obuhvata i jedinjenja nastala kuplovanjem u drugim pozicijama – neolignane.



Slika 3.22. Struktura i numeracija matičnog ugljovodonika – lignana (IUPAC preporuka [147])

Prema jednoj od podela, lignanske strukture mogu se razvrstati u 10 podklasa (A–J) (Slika 3.23.) koje se dalje mogu grupisati u 5 klasa [148]:

- Prosti lignani
 - A – dibenzilbutani (8,8'-veza)
- Lignanolidi (sa laktonskom funkcijom)
 - B – dibenzilbutirolaktoni (8,8' + 9-O-9') ili 9,9'-lignanolidi
- Monoepoksilignani
 - C – furani (8,8' + 7-O-7')
 - D – tetrahidrofurani: D(a) – 2,5-bisariltetrahidrofurani (8,8' + 7-O-7'), D(b) – 3,4-bisbenziltetrahidrofurani (8,8' + 7-O-9') i D(c) – 2-aril-3-metil-4-benziltetrahidrofuran (8,8' + 9-O-9')

- Ciklolignani

E – arilnaftaleni (8,8' + 2,7') ili 2,7'-ciklolignani: „donji“ laktoni (laktoni naftalen-2-karboksilne kiseline), „gornji“ laktoni (laktoni naftalen-3-karboksilne kiseline) i nelaktonski naftaleni

F – arildihidronaftaleni (8,8' + 2,7') ili 2,7'-ciklolignani: 1,2-dihidro-1-arilnaftaleni (α -apo), 1,4-dihidro-1-arilnaftaleni (β -apo) i 3,4-dihidro-1-arilnaftaleni (γ -apo)

G – ariltetralini (8,8' + 2,7') ili 2,7'-ciklolignani

I – dibenzociklooktadieni (8,8' + 2,2') ili 2,2'-ciklolignani

J – diarileklobutani (7,7' + 8,8')

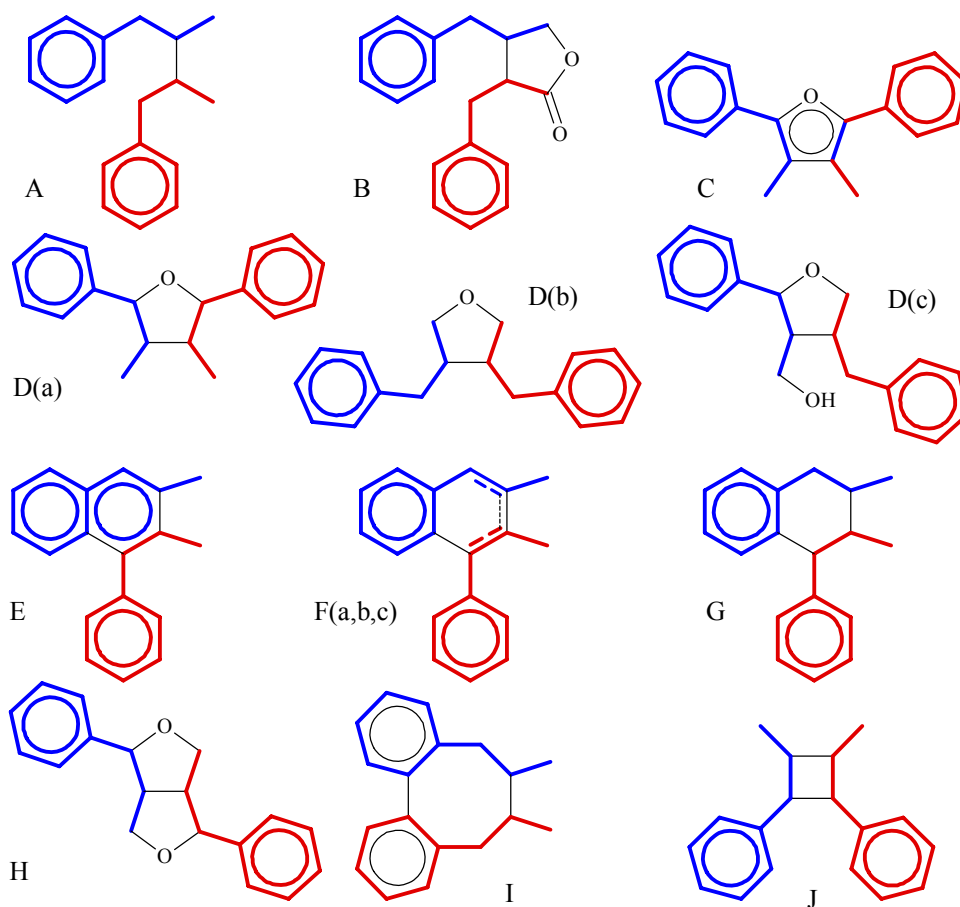
- Bisepoksilignani

H – tetrahidrofurofurani (8,8' + 7-O-9' + 7'-O-9) ili 7,9':7',9-diepoksilignani

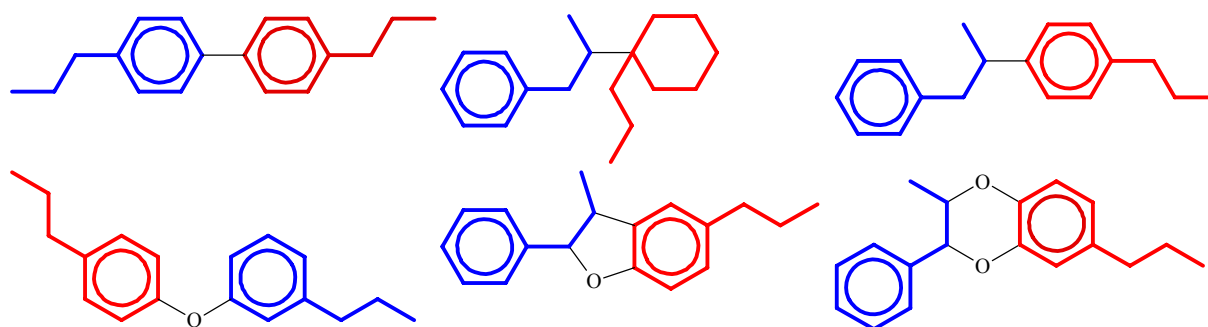
Za aromatične prstenove u lignanskoj strukturi tipično su vezane 1–4 različite kiseonične grupe (hidroksi, metoksi, metilendioksi, alkilkarboniloksi), koje mogu poticati od polaznog monolignola ili se formirati naknadnim modifikacijama u toku biosinteze. Sem nekoliko izuzetaka, svi imaju kiseonični supstituent u *p*-položaju. U ređim slučajevima, prisutne su i strukture tipa ketona, ketalu i karboksilnih kiselina [28, 148].

Neolignani predstavljaju dimere monolignola sa kuplovanjem različitim od β,β' (8,8'). Ova jedinjenja pokazuju veću raznovrsnost strukturalnih tipova, ali sa manje predstavnika. Primeri neolignanskih skeleta dati su na Slici 3.24.

U skorije vreme otkriven je značajan broj oligomernih struktura – seskvilignana (sa 3 cinamatne jedinice) i dilignana (4 cinamatne jedinice), kao i hibridnih lignana – flavonolignana, kumarinolignana, stilbenolignana, ksantolignana, makrocikličnih derivata, konjugata sa terpenima itd. [31]. Za sada nije poznato da li su lignani intermedijeri u biosintezi polimera – lignina.



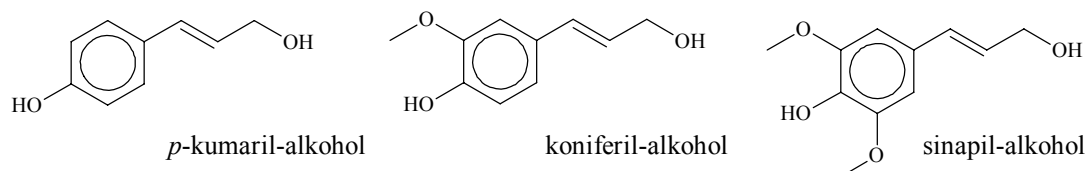
Slika 3.23. Klasifikacija lignana



Slika 3.24. Primeri neolignanskih skeleta

Biosinteza

Lignani se formiraju fenolnim oksidativnim kuplovanjem hidroksicimetnih alkohola (monolignola) [81]. Monomeri variraju u zavisnosti od biljne vrste, ali su najčešći *p*-kumaril-alkohol, koniferil-alkohol i sinapil-alkohol (Slika 3.25).

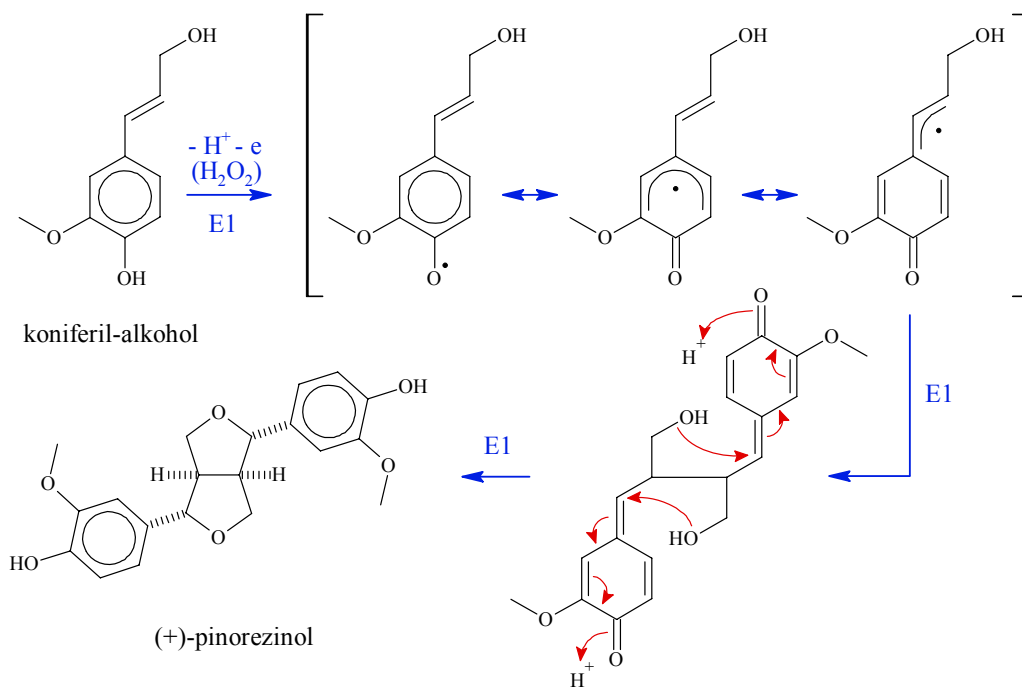


Slika 3.25. Najznačajniji monolignoli.

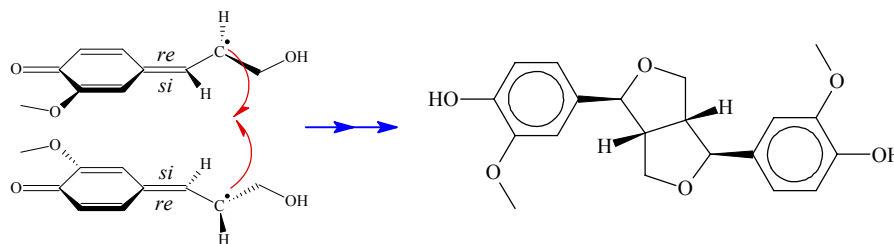
Monolignoli nastaju redukcijom derivata cimetine kiseline (oslobođenih iz skladišne forme – glukozida – dejstvom glukozidaza) odgovarajućim dehidrogenazama. Pod dejstvom selektivnih peroksidaza dolazi do jednoelektronske oksidacije fenolne hidroksilne grupe monolignola, formirajući radikal sa nesparenim elektronom delokalizovanim preko benzenovog prstena (povećana gustina spina u *o*- i *p*-položaju u odnosu na hidroksilnu grupu) i bočnog niza (Slika 3.26.). Radikalnim kuplovanjem dveju jedinica nastaju različite klase jedinjenja – β -ariletri fenolnih kiselina, fenilkumarani, neolignani i (u slučaju β,β' -kuplovanja) lignani. Nastali hinonmetidi podležu intramolekularnoj nukleofilnoj supstituciji, uz formiranje furanofurana (pinorezinola u slučaju koniferil-alkohola kao polaznog monolignola).

Utvrđeno je da enzim (+)-pinorezinol sintazu zapravo čine dva proteina. Prvi, bakar-zavisni enzim lakaza (EC 1.10.3.2), katalizuje jednoelektronsku oksidaciju fenolâ, uključujući monolignole, pri čemu se dobija racemska smeša proizvoda. Druga komponenta, tzv. dirigentni protein (DIR), nema oksidoreduktaznu aktivnost, nego prihvata generisane slobodne radikale i omogućava njihovo stereoselektivno *si-si* kuplovanje, pri čemu se formira proizvod koji je optički čist, ili je jedan od enantiomera prisutan u velikom višku (Slika 3.27.). Određeni dirigentni protein je specifičan za dati radikal monolignola – *p*-kumaril- ili sinapil-alkohol kuplovaće se racemski čak i u prisustvu pinoreznol-fomirajućeg dirigentnog proteina (*eng.* pinoresinol synthesizing dirigent protein, psd) [149–151].

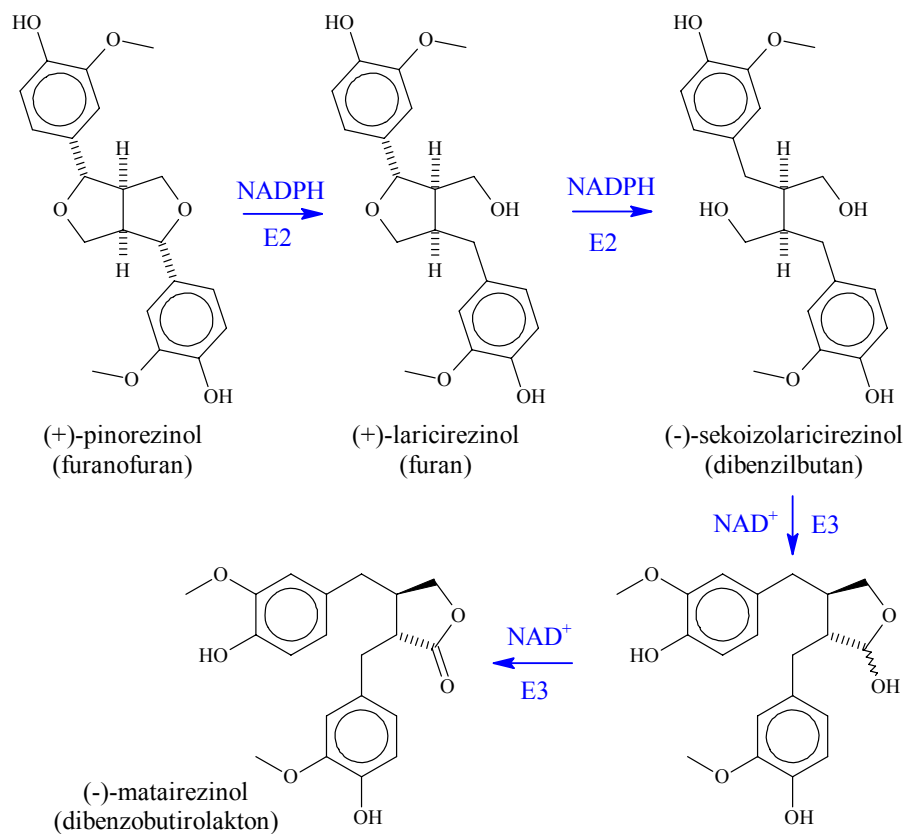
Daljim ciklizacijama i strukturnim modifikacijama formiraju se različite klase lignana. Stereoselektivnim reduktivnim otvaranjem furanskih prstenova pinorezinola nastaje dibenzilbutan (–)-sekoizolaricirezinol, koji podleže oksidaciji do laktola i zatim dibenzobutirolaktona – (–)-matairezinola (Slika 3.28.). U daljim reakcijama dolazi do modifikacije supstituenata na aromatičnim prstenovima (preko tujaplikatina, 5-*O*-metiltujaplikatina i 4,5-*O,O*-dimetiltujaplikatina) i formiranja jateina [29]. Pokazano je da određeni obrasci supstitucije, tipa trimetoksi-, ne potiču od polaznih monolignola, nego se formiraju nakon kuplovanja [152]. Matairezinol predstavlja tačku grananja za 3',4',5'-trimetoksi- i 4'-hidroksi-3',5'-dimetoksi-supstituisane lignane – u kasnijim fazama, ne može doći do konverzije 4'-demetil-lignana u 4'-metoksi-analoge [153, 154]. Poslednja faza je ciklizacija u ariltetralin – deoksipodofilotoksin i hidroksilacija do podofilotoksina (Slika 3.29.) [153, 155, 156].



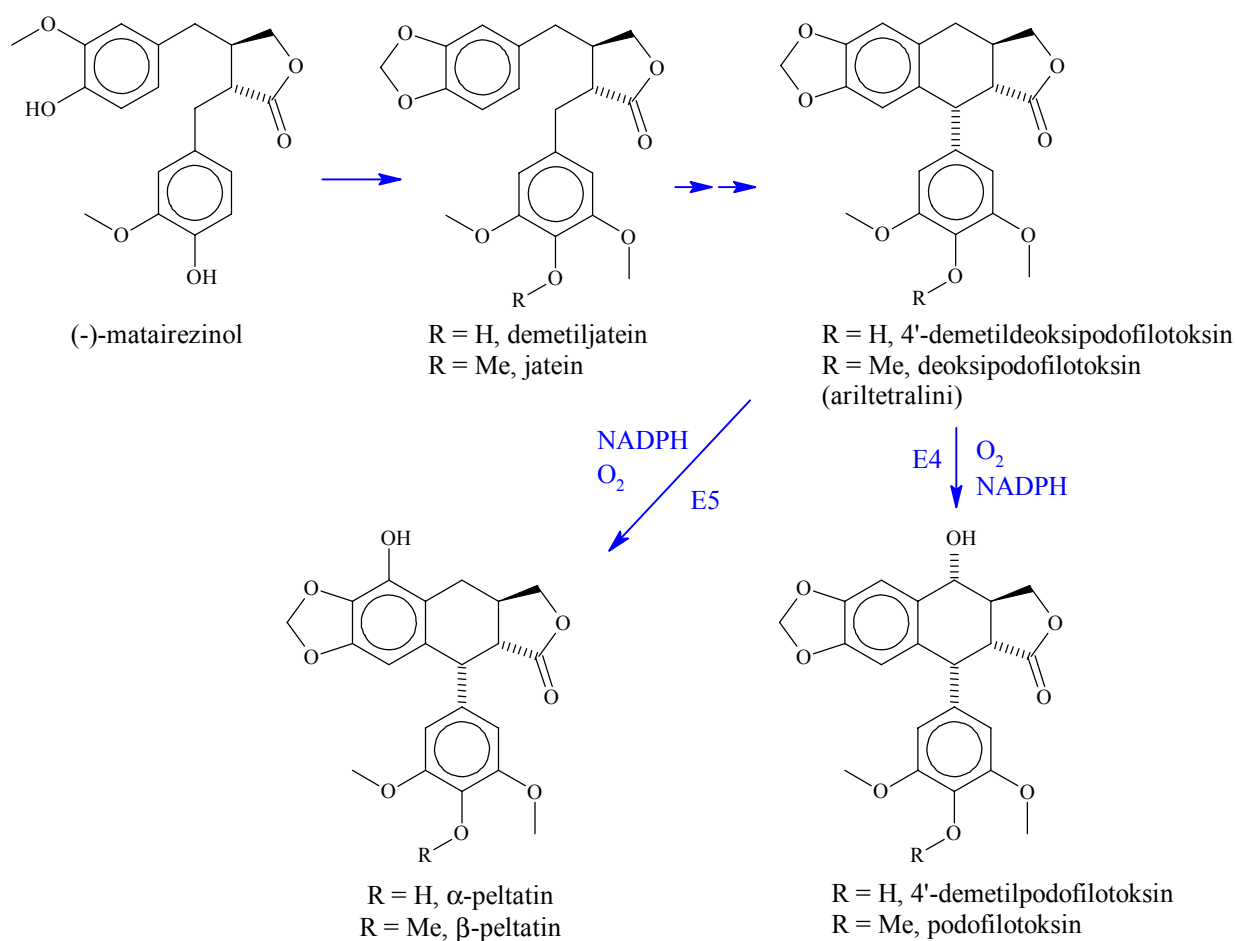
Slika 3.26. Biosinteza lignana - fenolno oksidativno kuplovanje monolignola. E1 – pinorezinol sintaza



Slika 3.27. Biosinteza lignana –mehanizam stereoselektivnog kuplovanja u prisustvu dirigentnog proteina.



Slika 3.28. Biosinteza lignana – formiranje različitih klasa. E2 – pinorezinol-laricirezinol reduktaza (PLR), E3 – sekoizolaricirezinol dehidrogenaza (SIRD).



Slika 3.29. Biosinteza lignana – sinteza ariltetralinâ. E4 – deoksipodofilotoksin 7-hidroksilaza, E5 – deoksipodofilotoksin 6-hidroksilaza

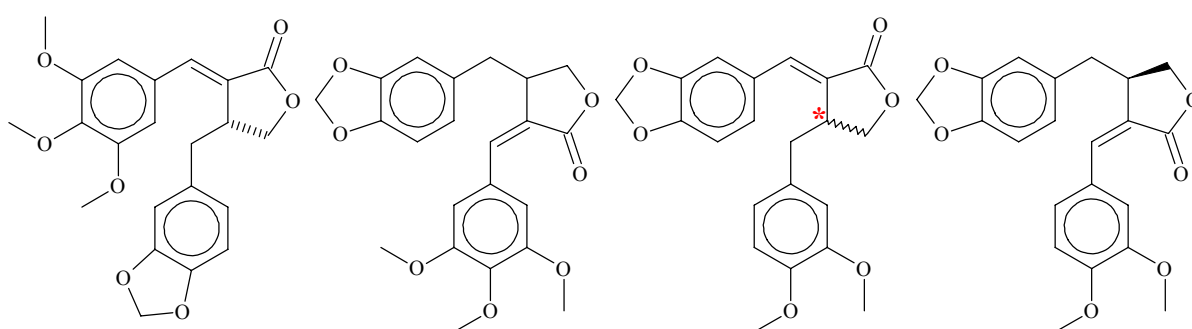
Rasprostranjenost

Evoluciono, lignani se rano pojavljuju u biljnom svetu. Odsutni su u algama, ali se javljaju već u ranim kopnenim biljkama kao što su Pteridophyta (paprati) i Hepatophyta. Lignani nižih biljaka derivati su kafene kiseline ili koniferil alkohola, mada se javljaju i neuobičajeni derivati sinapil-alkohola (za koje se obično smatra da se evoluciono javljaju kasnije, kod cvetnica). Sa razvojem gimnospermi, dolazi do naglog porasta raznovrsnosti lignanskih struktura, predominantno 8,8'-dimera koniferil-alkohola, ali i struktura sa 8-5', 8-O-4' vezama. Razvoj cvetnica dovodi do dalje diverzifikacije lignana. Iako su 8,8'-strukture i dalje najzastupljenije, pojavljuju se i 8-1', 8-5', 5-5', 7-1', 8-7', 1-5', 8-O-4', 2-O-3' i 3-O-4' [150]. Danas je poznato preko 900 lignana i oko 500 neolignana, prisutnih u oko 70 biljnih familija.

U prirodi, lignani se uglavnom javljaju slobodni, mnogo ređe kao glikozidi. Mogu biti prisutni u svim organima, u zavisnosti od biljne vrste, ali najčešće u koncentracijama nedovoljnim za industrijsku proizvodnju. Izuzetak su smole koje određene drvenaste vrste luče nakon povreda, srčika [157] i čvorovi drveta [158], koji mogu sadržati i do 24 % lignanâ. Izolovani su iz većine biljaka bogatih vlaknima, uključujući i brojne kultivisane vrste.

Što se tribusa Scandiceae tiče, dosadašnja istraživanja pretežno su se fokusirala na sastav ekstrakta *Anthriscus sylvestris*, u kome je postupkom hromatografije na stubu i kombinacije $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ i GC-MS identifikovan veći broj lignanskih struktura [4, 9–12, 14]. Najveći broj jedinjenja, uključujući i dominantne komponente (deokspodofilotoksin, jatein, nemerozin, silvestrin i podofilotoksin), pripadaju dvema klasama – dibenzobutirolaktonima i ariltetralinima. U ostalim vrstama do sada je identifikovan relativno mali broj lignana: nemerozin, deokspodofilotoksin i jatein u *Chaerophyllum aureum* [30], deokspodofilotoksin u *Anthriscus cerefolium* (pronađen od strane Fejes i sar. [20], ali ne i Koulmana [5]), herohirzutin A i B u *Chaerophyllum hirsutum* [18, 31] i herofilin (kerofilin) u *Chaerophyllum maculatum* [31, 32] (Slike 3.30.-3.32.). Tipični obrasci supstitucije na aromatičnim prstenovima su metilendioksi- (piperonil-tip supstitucije) i trimetoksi, i nešto ređe dimetoksi (veratril) i hidroksi-metoksi (gvajacil). Neolignani do sada nisu detektovani.

Dibenzobutirolaktoni (nezasićeni)



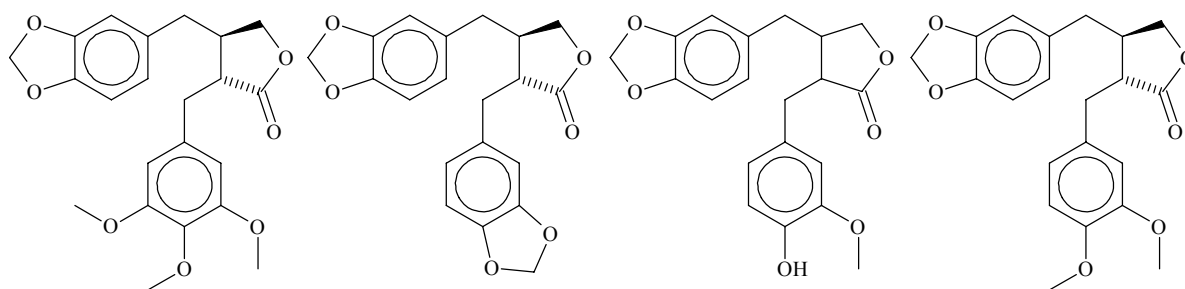
anhidropodorizol
(nemerozin) [AnS, ChAu]

silvestrin [AnS]

*S: jatrofan (suhilakton) [AnS] herofilin [ChM]

*R: izosuhilakton [AnS]

Dibenzobutirolaktoni (zasićeni)

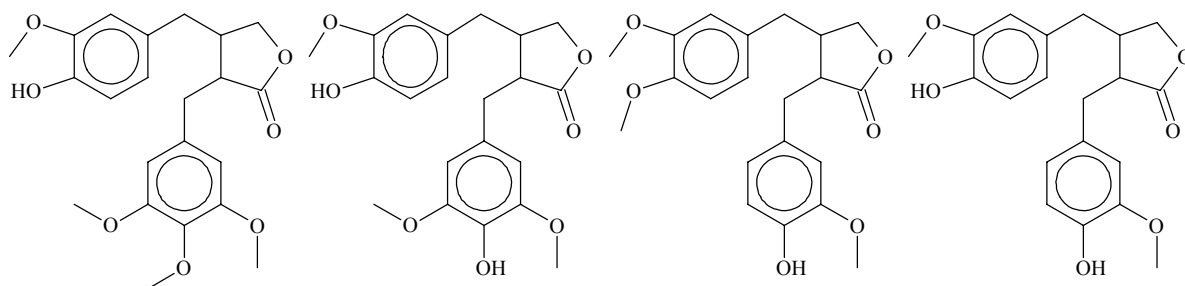


(-)-jatein
(deokspodorizon) [AnS, ChAu]

hinokinin [AnS]

pluviatolid [AnS]

burzehernin [AnS]



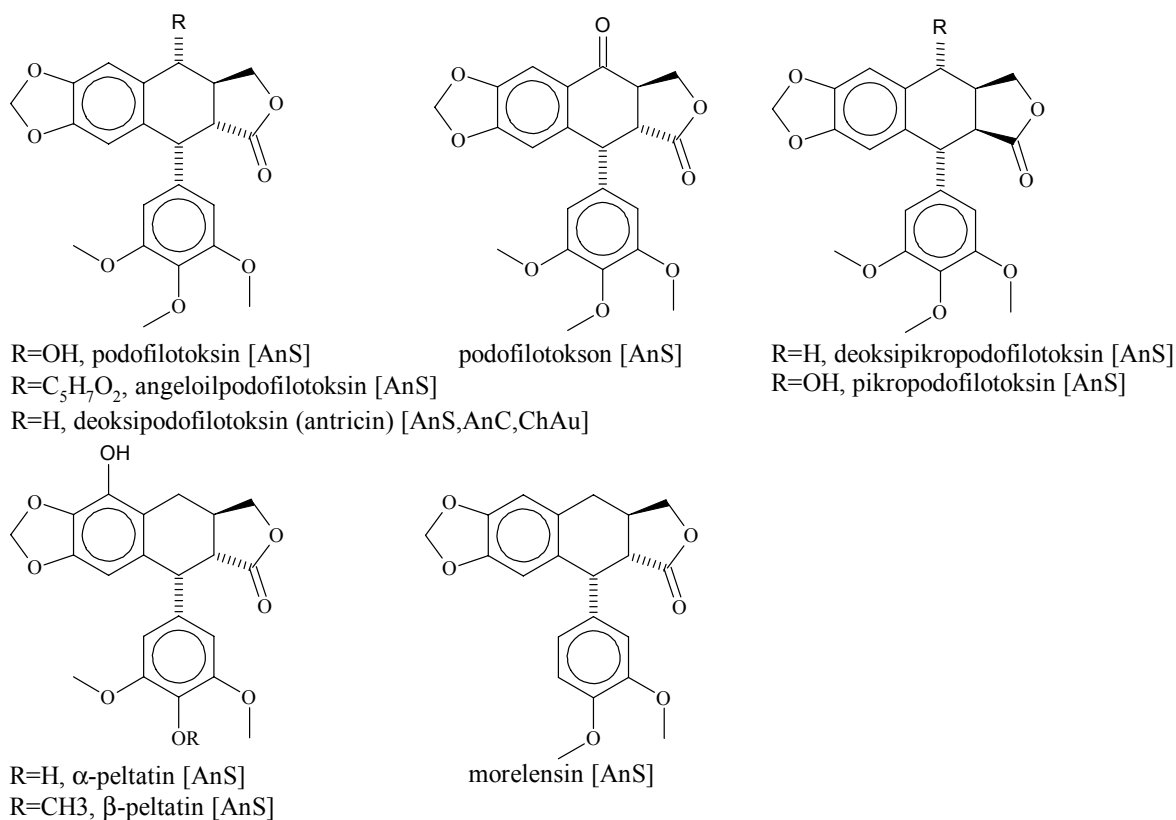
4,5-dimetiltujaplikatin [AnS]

5-metiltujaplikatin [AnS]

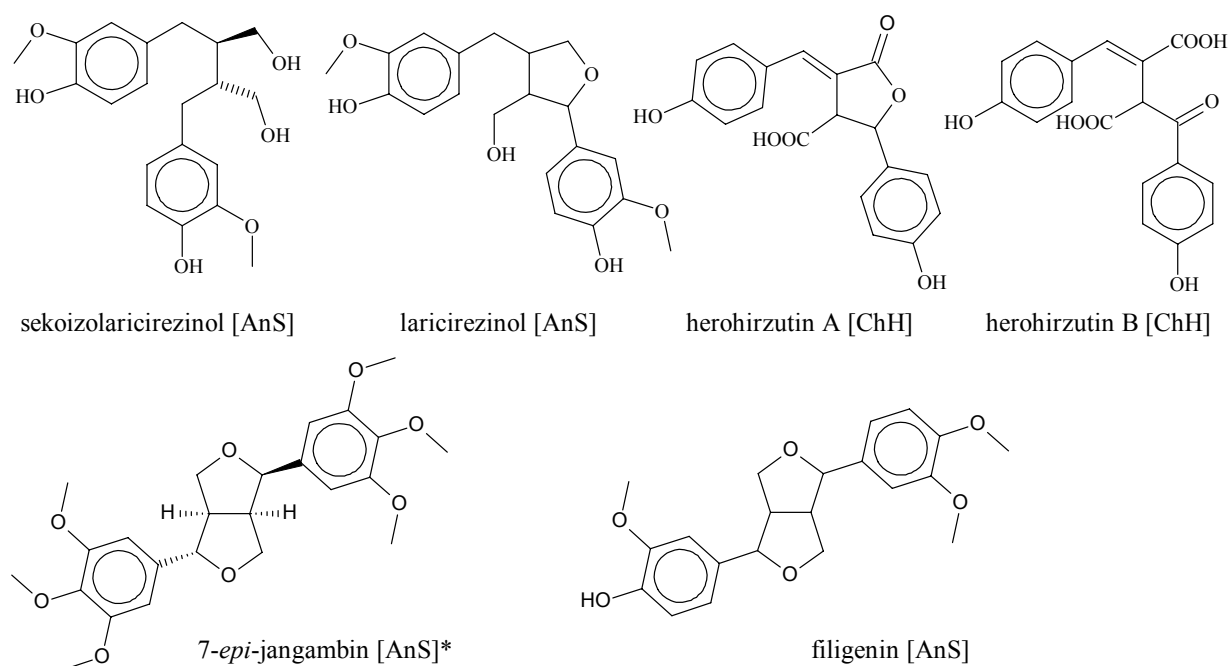
arktigenin [AnS]

matairezinol [AnS]

Slika 3.30. Strukture dibenzobutirolaktonskih lignana detektovanih u vrstama tribusa Scandiceae (AnS – *A. sylvestris*, ChM – *Ch. maculatum*, ChAu – *Ch. aureum*)



Slika 3.31. Strukture ariltetralinskih lignana detektovanih u vrstama tribusa Scandiceae (AnS – *A. sylvestris*, AnC – *A. cerefolium*, ChAu – *Ch. aureum*)



Slika 3.32. Strukture lignana iz ostalih klasa, detektovanih u vrstama tribusa Scandiceae (AnS – *A. sylvestris*, ChM – *Ch. maculatum*, ChA – *Ch. aureum*)

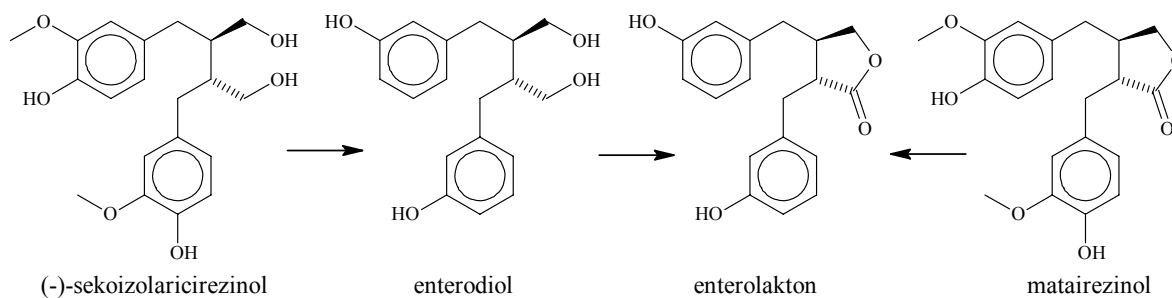
* sumnjiva indirektna referenca kod Young i sar. [37]

Biološki značaj

Biološka funkcija lignana u biljkama još uvek nije poznata, mada se na osnovu visoke antimikrobne, antifungalne, antiviralne, antioksidantne, insekticidne i antifidant aktivnosti većine može zaključiti da igraju ulogu u zaštiti biljke od predatora, parazita i patogena. Lignani i neolignani često se sintetišu i skladište i značajnim količinama u srčiki drveta (*eng.* heartwood), verovatno u cilju sprečavanja degradacije lignina i truljenja pod dejstvom gljivičnih enzima [28], čime se delimično objašnjava dugovečnost drvenastih biljaka u odnosu na zeljaste. Neka od ovih jedinjenja (uključujući ariltetraline deoksipodofilotoksin [4] i metil-etar β -peltatina A) toksična su za herbivorne insekte ili njihove larve, inhibirajući enzime zadužene za transformaciju biljnih metabolita, a neka sinergistički deluju sa drugim antifidantima (kao što su piretroidi). Druga (npr. matairezinol, burzehernin) inhibiraju izleganje nematoda. Značajno viši nivo ekspresije u perifernim i izloženim tkivima (kora, vrhovi grana, cvetovi, plodovi) takođe ukazuje na protektivnu funkciju [159, 160]. Pokazano je [160] da je ekspresija gena koji kodiraju dirigentne proteine intenzivirana u oštećenim tkivima i tkivima napadnutim od strane insekata, što ukazuje na funkciju u odgovoru na stres. Pored ovoga, implicirana je i uloga u rastu i razvoju [157], kao i alelopatska funkcija [63].

Apsorpcija i metabolizam

Pod dejstvom crevne mikroflore lignani iz hrane konvertuju se reakcijama *meta*-demetilovanja, *para*-hidroksilacija itd. u lignane sisara (*eng.* mammalian lignans) – enterodiol i enterolakton (Slika 3.33.), koji nakon apsorpcije podležu konjugaciji sa glukuronskom kiselinom ili sulfatom. U slučaju glikozida, ovim reakcijama prethodi hidroliza pod dejstvom želudačnog sekreta i β -glukozidaza iz hrane i crevne mikroflore [63, 94].

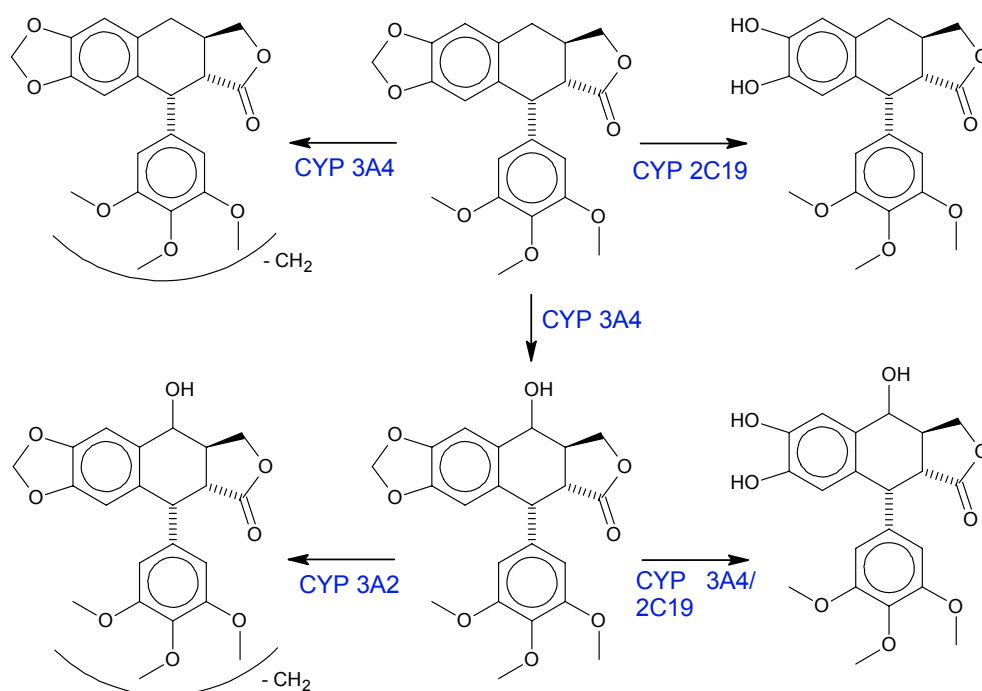


Slika 3.33. Katabolizam lignana [81]

Nakon resorpcije u tankom crevu, lignani se u jetri konjuguju i zatim u bubrezima eliminišu putem mokraće a u jetri putem žuči. Lignani u žuči ulaze u enterohepatičku cirkulaciju i nakon hidrolize pod dejstvom bakterija reapsorbuju se [63]. Laktonski lignani mogu podleći metaboličkoj inaktivaciji usled otvaranja laktonskog prstena (D) i konverzije u hidroksi-kiseline [161]. *In vitro* ispitivanja [162] pokazala su da se deoksipodofilotoksin, jedan od glavnih lignana iz *Anthriscus sylvestris*, u mikrozomima jetre transformiše reakcijama hidroksilacije, demetilacije, i otvaranja dioksolanskog prstena (Slika 3.34.).

Biološka aktivnost

Kao posledica velike raznovrsnosti u strukturama, lignani kao grupa poseduju širok spektar bioloških aktivnosti: citotoksičnost, inhibicija agregacije trombocita, fitoestrogeno, antiinflamatorno, antiviralno, antibakterijsko, antifungalno, paraziticidno, insekticidno, hepatoprotektivno i kardiovaskularno dejstvo [63]. Kod deoksipodofilotoksina, najvažnijeg lignana iz *A. sylvestris*, potvrđena je antitumorska, antiproliferativna, antiinflamatorna (5-LOX/COX-2 inhibitorna), antiastmatička, antiviralna i hepatoprotektivna aktivnost, inhibicija agregacije trombocita, pasivne kutane anafilaktičke reakcije, kao i široko insekticidno dejstvo [4, 55].



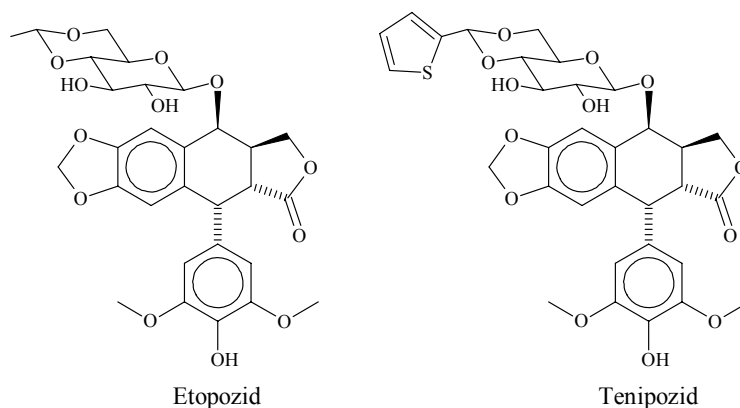
Slika 3.34. Katabolizam deoksi-podofilotoksina u mikrozomima jetre [31]

Citotoksičnost

Juniperus sabina je vrsta sa najdužom istorijom uspešne primene u tretmanu tumora – već u prvom veku n.e. ulje iglica, bogato deoksi-podofilotoksinom i podofilotoksinom, korišćeno je za lečenje karcinoma uterusa, polipa i genitalnih bradavica. U „The Leechbook of Bald”, staroengleskom medicinskom tekstu iz IX veka, pominje se upotreba ekstrakta korena *Anthriscus sylvestris* za lečenje kancera. Od 1820. godine droga podofilin, dobijena iz vrsta roda *Podophyllum*, uključena je u Farmakopeju SAD, a nešto kasnije i u evropske farmakopeje. Međutim, tek sredinom XX veka počinje sistematsko ispitivanje lignanskih droga. Potvrđeno je da podofilin inhibira rast tumora kod eksperimentalnih životinja [163], ali i da određene komponente (podofilotoksin, 4'-demetilpodofilotoksin, α - i β -peltatin, i njihovi glikozidi) dovode do značajnih neželjenih efekata u slučaju oralne aplikacije [164, 165], što ograničava kliničku primenu.

Antimitotičko dejstvo podofilotoksina, peltatinâ i drugih srodnih lignana potiče od vezivanja za protein tubulin u mitotičkom vretenu, što dovodi do sprečavanja polimerizacije i formiranja mikrotubula, čime se onemogućava razdvajanje hromozoma [161]. Čelijski ciklus biva blokiran u metafazi.

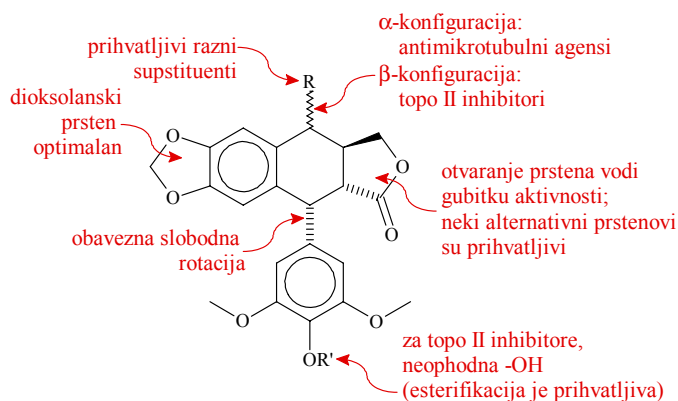
U cilju smanjenja neželjenih efekata, razvijeni su derivati 4'-demetilpodofilotoksin-glukozida – etopozid i tenipozid (Slika 3.35.). Etopozid (najpotentniji poznati lignan) i njegova vodorastvorna forma etofos (etopozid-4'-fosfat) našli su kliničku primenu u terapiji karcinoma pluća, testisa, glioblastoma, limfoma, Ewingovog sarkoma i nekih vrsta leukemije, a tenipozid u lečenju neuroblastoma.



Slika 3.35. Strukture sintetskih analoga podofilotoksina.

Treba pomenuti da se mehanizam dejstva 4'-demetilepipodofilotoksina (DMEP) i srodnih terapijski značajnih lignana (uključujući etopozid i tenipozid) razlikuje od dejstva podofilotoksina. Umesto vezivanja za tubulin i zaustavljanja ćelije u metafazi, oni deluju preko inhibicije enzima topoizomeraze II (EC 5.99.1.3), čime sprečavaju replikaciju DNK i potpuno sprečavaju mitozu (ćelija biva blokirana u kasnoj S ili G₂ fazi ciklusa). Topoizomeraza II ima funkciju odmotavanja lanca i regulisanja trodimenzionalne strukture (superheliksa) DNK, što postiže kontrolisanim raskidanjima i spajanjima oba DNK lanca. Veruje se da etopozid stabilizuje DNK-topo II kompleks u formi koja katalizuje raskidanje lanca, pretvarajući tako topoizomerazu II u potentni ćelijski otrov koji dovodi do razaranja DNK i ćelijske smrti [161, 166]. Generalno, topo II inhibitori pokazuju manje neželjenih efekata od antimikrotubulnih agenasa, zbog čega imaju veći klinički značaj [161].

Utvrđeno je da aktivnost derivata podofilotoksina kao otrova topoizomeraze II zavisi od prisustva *trans*-vezanog petočlanog laktonskog prstena, i da izomerizacija u stabilniji *cis*-oblik sa manjim naponom, do koje dolazi već u blago alkalnoj sredini, dovodi do skoro potpunog gubitka aktivnosti [81, 161]. Za aktivnost G₂-otrova odgovorni su OH-grupa u položaju C-4' (odn. 4'-demetilacija), epimerizacija u položaju C-7 i prisustvo glukozida (ili drugog voluminoznog supstituenta) na C-7 [161, 165]. Na Slici 3.36. prikazani su sumarno strukturni elementi neophodni za antineoplastičnu aktivnost derivata podofilotoksina.



Slika 3.36. Strukturni elementi neophodni za antineoplastičnu aktivnost derivata podofilotoksina

Pored ovog mehanizma, etopozid i tenipozid (i uopšte epipodofilotoksini) pod dejstvom peroksidaza ili citohroma P450 generišu katehole, *o*-hinone i fenoksi-radikale, koji se mogu kovalentno vezati za DNK i dovesti do daljih oštećenja [167]. Prisustvo jona prelaznih metala (Cu²⁺, Fe³⁺...) ili UV zračenja dovodi do dodatnog raskidanja lanaca DNK. Etopozid i deoksipodofilotoksin dodatno iniciraju apoptozu putem aktivacije kaspaze-3 i -7 [37], a etopozid i tenipozid deluju i kao inhibitori ćelijske respiracije.

Što se tiče lignana izolovanih iz vrsta tribusa Scandiceae, potvrđena je *in vitro* antiproliferativna aktivnost prema nizu ćelijskih linija kancera. Za antricin (deoksipodofilotoksin), deoksipodorizon, nemerozin, hinokinin, morelensin i jatein, izolovane iz *Anthriscus sylvestris*, ED₅₀ iznose 0,0005–0,001 µg/mL, 0,3–0,8 µg/mL, 0,4–0,7 µg/mL, 1,67–2,72 µg/mL, 0,053–0,087 µg/mL i 0,025–0,050 µg/mL respektivno [9, 10, 37, 168]. Niz jedinjenja sa citotoksičnom aktivnošću identifikovan je i u *Chaerophyllum temulum* [18].

Fitoestrogeno dejstvo

Fitoestrogeni predstavljaju biljne fenole koji se vezuju za estrogen-receptore (ER), aktiviraju odgovarajuće gene i dovode do fiziološkog odgovora sličnog endogenim estrogenim hormonima. Najvažniji fiziološki efekti obuhvataju: uticaj na polne hormone (i, samim tim, na polnu diferencijaciju, plodnost, sintezu i dostupnost estrogenâ, i uticaj na rast estrogen-zavisnih ćelija), diferencijaciju tumorskih ćelija i mitogenezu, angiogenezu i antioksidantnu aktivnost. Utiču na

hormon-zavisne patološke procese, kao što su osteoporoza, kancer polnih organa, kardiovaskularne bolesti (smanjuju nivo LDL holesterola a povećavaju nivo HDL), simptome vezani za menopauzu itd. Konzumiranje hrane bogate fitoestrogenima (kao što su lignani iz lana) povezano je sa smanjenom incidencom estrogen-zavisnih kancera [63].

Utvrđeno je da veliki broj lignana ima umeren do visok afinitet prema SHBG (*eng.* sex hormone binding globulin), glavnom transporteru androgenih i estrogenih hormona. Oni istiskuju hormone iz kompleksa sa SHBG*, čime utiču na njihovu koncentraciju u krvi, interakciju sa receptorima, i klirens [63, 169, 170], što može imati pozitivne efekte kod stanja kao što je hiperplazija prostate. U ovom pogledu, naročito su aktivni lignani sa 4-hidroksi-3-metoksi-supstitucijom [63, 169]. Dalje, kompetitivno vezivanje za estrogene receptore dovodi do poremećaja estrogen-kontrolisanih procesa [170]. Za niz lignana, uključujući enterolakton, dokazano je takođe da predstavljaju umerene kompetitivne inhibitore estrogen sintetaze (aromataze), čime se delimično može objasniti uticaj ishrane bogate ovim jedinjenjima na smanjenje incidence estrogen-zavisnih bolesti [63, 169]. Potvrđeno je i *in vitro* i *ex vivo* inhibitorno dejstvo endogenih lignana prema 5 α -reduktazi i 17 β -hidroksisteroid dehidrogenazi.

Antiinflamatorno dejstvo

Antiinflamatorna aktivnost lignana slabo je ispitana. Dok su neke klase pokazale značajnu aktivnost (naftaleni su potentni i selektivni inhibitori 5-LOX, često i pri nanomolarnim koncentracijama, a neolignani inhibiraju formaciju granuloma), tetrahidrofurani i furofurani poseduju samo relativno slabu 5-LOX i COX inhibitornu sposobnost [63]. Što se ariltetralina tiče, dokazano je da deokspodofilotoksin inhibira aktivnost COX-2 (inducibilne COX, odgovorne za sintezu prostaglandina kod inflamatornih procesa) i 5-LOX, uz IC₅₀ vrednosti od 1,89 μ mol/L i 0,37 μ mol/L, respektivno. U isto vreme, inhibicija konstitutivne COX-1, uključene u normalne fiziološke procese, kao i PLA₂, bila je značajno slabija (IC₅₀ = 65,3 μ mol/L i >50 μ mol/L, respektivno). Zahvaljujući dvojnoj inhibiciji COX-2/5-LOX, uz odsustvo dejstva na konstitutivne enzime (koje tipično vodi formiranju gastrointestinalnih ulcera i disfunkciji bubrega), deokspodofilotoksin pokazuje značajan potencijal kao nesteroidni antiinflamatorni lek (NSAID). Inhibitorno dejstvo prema 5-LOX, odgovornoj za sintezu leukotriena, smatra se idealnim i za tretman alergija i astme [56].

Antioksidantna aktivnost

Antioksidantna aktivnost pretežno je ispitana za furofuranske, benzofuranske i dibenzociklooktadienske lignane. *In vitro* i *in vivo* testovima utvrđeno je da mnogi značajno inhibiraju proces lipidne peroksidacije i produkcije MDA, u nekim slučajevim znatno efikasnije od tokoferolâ. Ostali efekti obuhvataju zaštitu ćelijske membrane i mitohondrija od ishemijsko-reperfusionih oštećenja hvatanje slobodnih radikala, kao i inhibiciju kiseonične eksplozije kod neutrofila putem supresije NADPH oksidaze i smanjenja koncentracije Ca²⁺ oslobođenog iz intracelularnih depoa [63].

Treba napomenuti je većina lignana pronađenih u vrstama tribusa Scandiceae, sem nekoliko minornih komponenti (matairezinol, arktigenin, larcirezinol, herohirzutini, sekoizolaricirezinol...), potpuno metilovana, te se ne može očekivati da ova klasa jedinjenja značajno doprinosi antioksidantnoj aktivnosti.

* Veza SHBG i kancera još uvek nije dovoljno razjašnjena. Dosadašnji eksperimenti dali su oprečne rezultate [76].

Kardiovaskularna aktivnost

Istraživanja pokazuju da konzumiranje hrane bogate lignanima može sniziti rizik od kardiovaskularnih bolesti. Aktivnost se ogleda u dejstvu na cAMP fosfodiesterazu, Ca²⁺-kanale, hipertenziju, faktor aktivacije trombocita, endotelin, hipoholesterolemiju, antioksidantnu i vazorelaksantnu aktivnost.

Potvrđeno je da neki od lignana (uključujući matairezinol i arktigenin, prisutne u vrstama tribusa Scandiceae, kao i endogeni 2,3-dibenzilbutan-1,4-diol) pokazuju značajno antagonističko dejstvo prema Ca²⁺ kanalima pri koncentracijama reda 10–100 nmol/L. Oni inhibiraju Ca²⁺ influks ali ne i Ca²⁺ oslobađanje iz unutarćelijskih depoa, i povećavaju koncentraciju cGMP, čime indukuju relaksaciju glatkih mišića krvnih sudova. Neki od endogenih lignana pokazuju i aktivnost sličnu digoksinu, u smislu inhibicije Na⁺/K⁺-ATPazne pumpe nekompetitivnim vezivanjem za ouabainske receptore. Pinorezinol, matairezinol i arktigenin snažno inhibiraju cAMP fosfodiesteraze (enzima koji cAMP prevodi u 5'-AMP), dovodeći do porasta nivoa cAMP, što rezultuje stimulacijom kontraktilnosti srca, vazodilatacijom, smanjenjem otpora u krvnim sudovima i sniženjem arterijskog pritiska, kao i bronhodilatacijom [63]. Istraživanja su ukazala i na anti-arterosklerotično dejstvo deoksipodofilotoksina, jednog od glavnih konstituenata ekstrakta *Anthriscus sylvestris* [171].

Kod pojedinih furanofuranskih i butirolaktonskih lignana (ali ne i tetrahidrofuranskih), naročito onih sa 3,4-dimetoksilovanim benzenovim prstenom, utvrđeno je antagonističko dejstvo prema faktoru aktivacije trombocita (*eng.* platelet activating factor, PAF). PAF je fosfolipid koga oslobađaju aktivirani bazofilni leukociti, a koji indukuje agregaciju trombocita. Uključen je u procese kao što su astma, alergije, inflamacija, koagulacija krvi, imuni odgovor... Lignani su antagonisti PAF-receptora na trombocitima, ali ne utiču na agregaciju indukovanu kolagenom, trombinom ili ADP-om, kao ni PAF-indukovanu hemotaksu neutrofila. Zbog svega navedenog, lignani pokazuju potencijal u lečenju PAF-zavisnih bolesti, kao što su astma, alergije, dermatitis i drugi inflamatorni procesi [63, 172].

Antiviralno dejstvo

Dugo je poznato dejstvo smole podofilina protiv genitalnih bradavica, izazvanih papiloma virusom. Plodovi šizandre sadrže dibenzooktadienske lignane koji su efikasni protiv hroničnog virusnog hepatitisa i dodatno štite jetru od hepatotoksina. Antiviralna aktivnost do sada je utvrđena kod predstavnika brojnih lignana iz klasa ariltetralina, arilnaftalena, dibenzociklooktadiena i dibenzilbutana. Najznačajnija je, najdetaljnije ispitana i najpotentnija prva klasa, sa pojedinim predstavnicima (podofilotoksini, peltatini) aktivnim već pri koncentracijama reda nmol/L. Utvrđena je aktivnost protiv niza virusa, uključujući herpes simpleks virus (HSV), virus boginja, virus vezikularnog stomatitisa (VSV), humani papiloma virus (HPV) i virus humane imunodeficijencije (HIV). Međutim, kod većine lignana (sem podofilotoksina, koji se topikalno koristi za lečenje bradavica izazvanih HPV) aktivnost previše slaba za kliničku primenu. Treba pomenuti da je ustanovljeno da je u nekim slučajevima usled sinergizma aktivnost smeše lignana značajno veća od aktivnosti pojedinačnih jedinjenja. Sam mehanizam dejstva nije detaljno ispitano, i pretpostavlja se da uključuje vezivanje za tubulin (u slučaju podofilotoksina), inhibiciju reverzne transkriptaze (nezavisna od strukture lignana), inhibiciju integraze (čime se sprečava integracija proviralne DNK u genom domaćina) i inhibiciju topoizomeraze [63, 173].

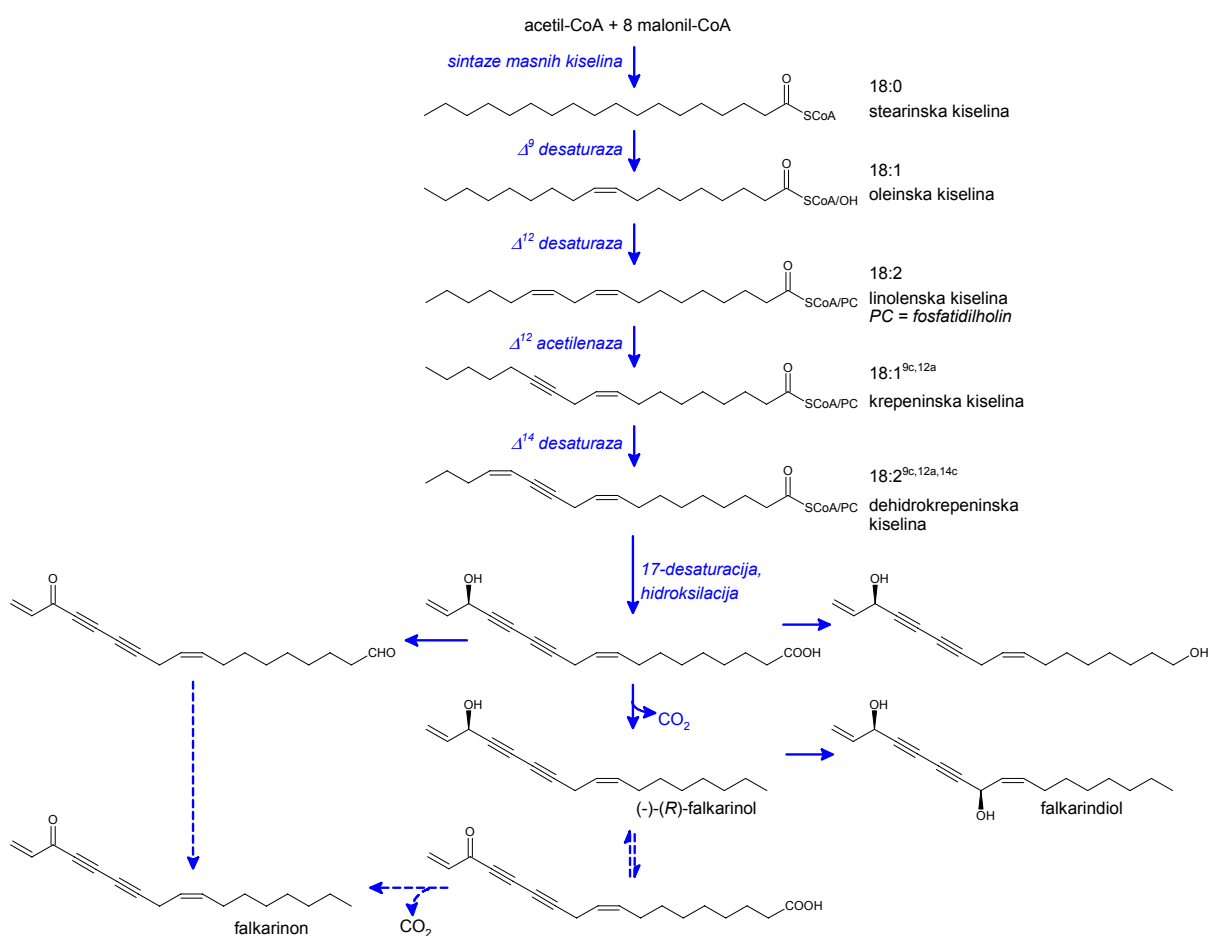
3.4.5. POLIACETILENI

Poliacetileni predstavljaju klasu sekundarnih biomolekula koju karakteriše prisustvo relativno neuobičajene trostruke veze. Sam naziv je donekle neodgovarajući, jer klasa obuhvata i jedinjenja sa samo jednom C≡C vezom.

Biosinteza

Većina acetilenskih prirodnih proizvoda izvode se od tri više masne kiseline: krepeninske (*Z*-oktadec-9-en-12-enska kiselina, *eng.* crepenynic acid), stearolne (oktadec-9-enska kiselina, *eng.* stearolic acid) i taririnske kiseline (oktadec-6-enska kiselina, *eng.* tariric acid).

Zasićene masne kiseline kod zelenih biljaka sintetiziraju se u stromi plastida iz acetil-CoA i malonil-CoA pod dejstvom β -ketoacil sintaza I, II i III (kod većine drugih eukariota reakcija se odvija u citosolu pod dejstvom multifunkcionalne sintaze masnih kiseline). Rastvorna stearoil-ACP desaturaza regiospecifično oksiduje nastale C_{16} i C_{18} kiseline, dajući Δ^9 -masne kiseline. Oleinska kiselina koja se koristi za biosintezu acetilenâ mobilizuje se iz membrane endoplazmatičnog retikuluma. Sem oleinske kiseline, i proizvodi katabolizma masnih kiseline (npr. 3-hidroksioleinska kiselina) mogu služiti kao prekursori acetilenâ. U metaboličkoj mreži reakcija dehidrogenizacije i skraćivanja niza nastaju kiseline sa 8–18 C-atoma i do tri konjugovane $C\equiv C$ veze. Tačan tok, kao i krajnji proizvodi, zavise od biljne familije. U slučaju familije Apiaceae, nastala krepeninska kiselina odmah se reakcijama hidrosilacije i dekarboksilacije prevodi u falkarion, falkarinol i falkarindiol (Slika 3.37). Detaljan mehanizam ovih reakcija nije poznat; pretpostavlja se da su u mnogim fazama intermedijeri vezani u vidu acilglicerolipida. Acetileni iz ove familije karakteristični su po redukovanom, metil-terminusu nastalom dekarboksilacijom. Kod nekih familija, nastali acetileni mogu podleći daljim modifikacijama u vidu ciklizacija (do benzena, furana, tiofena, kumarina, pirana, sulfoksida, sulfona,...), α -oksidacija, skraćivanja niza β -oksidacijama, oksidacija, konverzije u amide, uvođenja atoma sumpora itd. [36, 81, 91, 174].

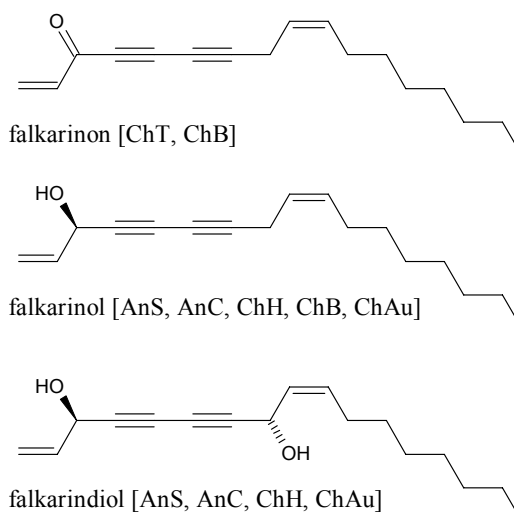


Slika 3.37. Krepeninatni put biosinteze poliacetilena. Samo putevi i proizvodi relevantni za tribus Scandiceae su prikazani. [174]

Rasprostranjenost

Poliacetileni su široko rasprostranjeni – pronađeni su u višim biljkama (gde su najzastupljeniji), mahovinama, lišajevima, gljivama, algama, sunderima i drugim morskim beskičmenjacima, insektima, žabama i (u tragovima) čoveku. Prvo jedinjenje iz ove klase – dehidromatrikaria ester – otkriven je još početkom XIX veka. Međutim, zbog izražene nestabilnosti (lako podležu oksidativnoj, fotolitičkoj i kiselobaznoj razgradnji), tek u poslednjim decenijama XX veka započinje sistematsko izolovanje i ispitivanje ovih jedinjenja. Danas je poznato preko 2000 predstavnika. Što se tiče viših biljaka, redovno se javljaju u familijama Asteraceae (preko 1100 identifikovanih jedinjenja), Apiaceae, Araliaceae, Campanulaceae, Olacaceae, Pittosporaceae i Santalaceae, a sporadično još u 14 familija [91, 175]. Prisutni su u velikom broju jestivih i lekovitih biljaka, uključujući celer, kim, šargarepu, morač, peršun, kamilicu, ehinaceu, paradajz, patlidžan, sočivo itd. [91].

Familije Apiaceae i Araliaceae karakteriše prisustvo alifatičnih C₁₇-poliacetilena sa zasićenim terminusom (tzv. acetileni tipa falkarinola), uključujući falkarinol (panaksinol), falkarindiol i falkarinon. Ova jedinjenja nađena su i vrstama tribusa Scandiceae (Slika 3.38.) [9, 10, 14, 18, 30, 31, 36]. Pošto veliki broj vrsta nije ispitan, hemosistematski značaj ovih jedinjenja u familiji Apiaceae još uvek nije utvrđen [36].



Slika 3.38. Strukture acetilena detektovanih u vrstama tribusa Scandiceae (AnS – *A. sylvestris*, AnC – *A. cerefolium*, ChT – *Ch. temulentum*, ChH – *Ch. hirsutum*, ChB – *Ch. bulbosum*, ChAu – *Ch. aureum*)

Biološki značaj

Biološka i ekološka funkcija poliacetilena relativno slabo je ispitana. Pretpostavlja se da, kao i većina prirodnih proizvoda, igraju ulogu u preživljavanju. Konstitutivno prisustvo u spoljašnjim slojevima tkiva (npr. falkarinol i falkarindiol u uljanim kanalima periderma šargarepe, *Daucus carota*) ukazuje na verovatnu ulogu u preventivnoj antifungalnoj zaštiti mladog korena, mada u slučaju infekcije dolazi do izvesnog povećanja koncentracije [91, 176]. Indukovana biosinteza kod vrsta koje ih konstitutivno ne sadrže (npr. kod familija Solanaceae i Apiaceae) pod dejstvom stresa implicira fitoaleksinsku funkciju. Pojedini acetileni deluju i alelopatski (inhibiraju klijanje i rast korena drugih vrsta), alomonski (signalni molekuli između različitih vrsta) ili insekticidno [174, 175].

Biološka aktivnost

Malo je raspoloživih podataka o aktivnosti poliacetilena, budući da je većina istraživanja fokusirana na skrining antikancer agenasa. Već i minimalne razlike u strukturi (npr. uvođenje –OH grupe) dovodi do ekstremnih promena u tipu i/ili intenzitetu dejstva.

Ranije je smatrano da je prisustvo ovih jedinjenja u jestivim biljkama nepoželjno, zbog potencijalno toksičnih svojstava pri visokim koncentracijama (neki od njih su potentni senzibilizatori kože ili neurotoksini). Međutim, skorašnja istraživanja pokazuju da svakodnevni unos malih količina zapravo može delimično objašnjavati pozitivne efekte konzumiranja određenog voća i povrća [175,177].

Alergeno dejstvo

Mnoge biljke koje sadrže alifatične C₁₇-poliacetilene izazivaju alergijski kontaktni dermatitis i iritacije kože. Za većinu efekata kod familija Apiaceae i Araliaceae (kao što su vrste roda *Hedera*) odgovoran je falkarinol. Pretpostavlja se da dolazi do građenja rezonantno stabilizovanog karbokacija po S_N1-sličnom mehanizmu, koji je veoma jak alkilujući agens i dalje reaguje sa –SH i –NH₂ grupama proteinâ dajući antigene konjugate (hapten-protein komplekse). Falkarion, falkarindiol i drugi uobičajeni acetileni pokazuju znatno slabije ili nedetektabilno antigeno delovanje. Ovim mehanizmom možda se može objasniti i uočeno antibakterijsko i antiinflamatorno delovanje. Dermatitis uzrokovan uobičajenim jestivim biljkama iz familije Apiaceae redak je, što se može objasniti nižim koncentracijama u odnosu na ukrasne i samonikle biljke, ili desenzitizacijom usled konstantnog oralnog unosa [91, 174, 175].

Citotoksičnost i antikancer aktivnost

U vrstama familije Apiaceae i Araliaceae detektovan je veći broj acetilena koji ispoljavaju antiproliferativnu aktivnost ili potenciraju dejstvo drugih antikancer lekova, uključujući falkarinol, falkarindiol i njegove etre, panaksinol itd. [174, 178, 179]. Potvrđena je visoka *in vitro* citotoksičnost falkarinola, panaksidiola i panaksitriola prema humanom gastričnom adenokarcinomu, i znatno slabija (ED₅₀ 20 puta veća) prema zdravim ćelijama [175, 178]. Falkarindiol je u *in vitro* testovima takođe ispoljio citotoksično i antimutageno dejstvo, ali slabije. Poliacetileni iz drugih bioloških izvora pokazuju selektivnost prema drugim ćelijskim linijama kancera [180]. Moguće je da se paradoksalno ponašanje β-karotena, odn. činjenica da njegovo pretpostavljeno protektivno dejstvo zavisi od izvora (da li je unet preko šargarepe ili u vidu aditiva – neka istraživanja pokazuju da čist karoten nema protektivno dejstvo, ili čak povećava rizik od kancera), može objasniti falkarinolom i srodnim jedinjenjima kao stvarnim aktivnim principima šargarepe. Pretpostavlja se da falkarinol indukuje apoptozu, čime usporava rast tumora [181], a utvrđeno je i da inhibira sintezu DNK, RNK i proteina [182]. Moguće je da i oštećenje bioloških membrana takođe doprinosi citotoksičnom delovanju [182]. Treba napomenuti da neka istraživanja pokazuju da je dejstvo falkarinola bifazno (genotoksično/ genoprotektivno) – pri niskim koncentracijama (0,5–10 μmol/L) zapravo deluje pro-proliferativno (inhibira ekspresiju kaspaze-3 i raskidanje lanaca DNK), pri srednjim dolazi do izražaja raskidanje lanaca DNK ali bez značajnog uticaja na ćelijsku vijabilnost, a tek pri >20 μmol/L dolazi do pojačane ekspresije kaspaze-3 odn. apoptoze [175, 177, 183]. Takođe je utvrđeno da kuvanje i skladištenje značajno smanjuje sadržaj poliacetilena u hrani [177]. Sumarno, iako poliacetileni iz familije Apiaceae definitivno utiču na preživljavanje ćelija i pokazuju potencijal kao antiproliferativni agensi, biće neophodno ispitati njihovu biodostupnost, stabilnost, metaboličku sudbinu, mehanizme dejstva, kao i sporedne efekte [174, 183]. Dok se zbog izražene nestabilnosti i alergnog delovanja ne može očekivati terapijska primena čistih poliacetilena, konzumiranje hrane bogate ovim jedinjenjima može imati hemopreventivni značaj (a unos prekomernih, toksičnih doza je malo verovatan zbog gorkog ukusa).

Antiinflamatorna aktivnost, inhibicija agregacije trombocita

Istraživanja su pokazala da falkarinol i falkarindiol imaju antiinflamatornu aktivnost i inhibiraju agregaciju trombocita. Pretpostavlja se da je kod falkarinola to posledica inhibiranja lipooksigenaza (potentan je inhibitor 5-LOX, dve izoforme 12-LOX i 15-LOX, sa IC₅₀ reda μmol/L

[182, 184, 185]) i modulacije katabolizma prostaglandina putem inhibiranja 15-hidroksi-prostaglandin dehidrogenaze. Aktivnost se ispoljava već pri niskim, netoksičnim koncentracijama [175]. I u ovom slučaju aktivnost značajno zavisi od strukture – dok je falkarinol slabo aktivan prema COX ($IC_{50} > 100 \mu\text{mol/L}$), falkarindiol predstavlja potentni inhibitor COX-1 [182, 184–186].

Ostale aktivnosti

Falkarindiol i falkarinol su potentni antifungalni agensi (inhibiraju germinaciju pri koncentracijama 20–200 $\mu\text{g/mL}$), koji dovode do promena u funkciji bioloških membrana različitih gljivica, što rezultuje rapidnim gubitkom elektrolita i razaranjem ćelija [174, 175]. Poznato je i inhibitorno dejstvo niza poliacetilena prema diacilglicerol aciltransferazi, inducibilnoj NO sintazi (iNOS), holesteril-estar transfernom proteinu, mikrozomalnim i mitohondrijalnim enzimima [179]. Acetileni iz nekih vrsta familije Apiaceae (rodovi *Cicuta*, *Oenanthe*) sa konjugovanom *E*-polienskom strukturom, terminalnom –OH i alilnom –OH na tačno definisanom rastojanju, ekstremno su neurotoksični – blokiraju K^+ -struje, dovode do intenzivnih konvulzija, povraćanja, respiratorne paralize i smrti [174, 175]. I falkarinol pokazuje izvesnu neurotoksičnost, ali mnogo slabiju ($LD_{50} = 100 \text{ mg/kg}$), dok kod falkarindiola nisu detektovani akutni efekti [91]. Ihtiotereol i ihtiotereol-acetat deluju kao *uncoupler*-i oksidativne fosforilacije [91].

3.4.6. ETARSKA ULJA

Etarska ulja predstavljaju kompleksne liposolubilne smeše isparljivih jedinjenja sintetisanih od strane biljaka: terpenoida (monoterpeni, nelaktoski seksviterpeni, neki diterpeni), isparljivih alifatičnih jedinjenja (ugljovodonici, alkoholi i estri kratkog lanca, karbonilna jedinjenja, masne kiseline i estri), isparljivih aromatičnih jedinjenja (fenilpropeni, aromatični alkoholi i aldehidi...), jedinjenja sumpora (izotiocijanati, sulfidi, merkaptani, heterociklična jedinjenja) i jedinjenja azota (aromatični amini, heterociklična jedinjenja, glukozinolati) [187–189].

Mogu biti sintetisana u svim biljnim organima. Skladište se u odgovarajućim strukturama – sekretornim ćelijama, šupljinama, kanalima, ćelijama epiderma ili žlezdanim dlakama [91, 188]. U slučaju familije Apiaceae, u plodovima i svim vegetativnim organima prisutni su šizogeni sekretorni kanali.

Biosinteza

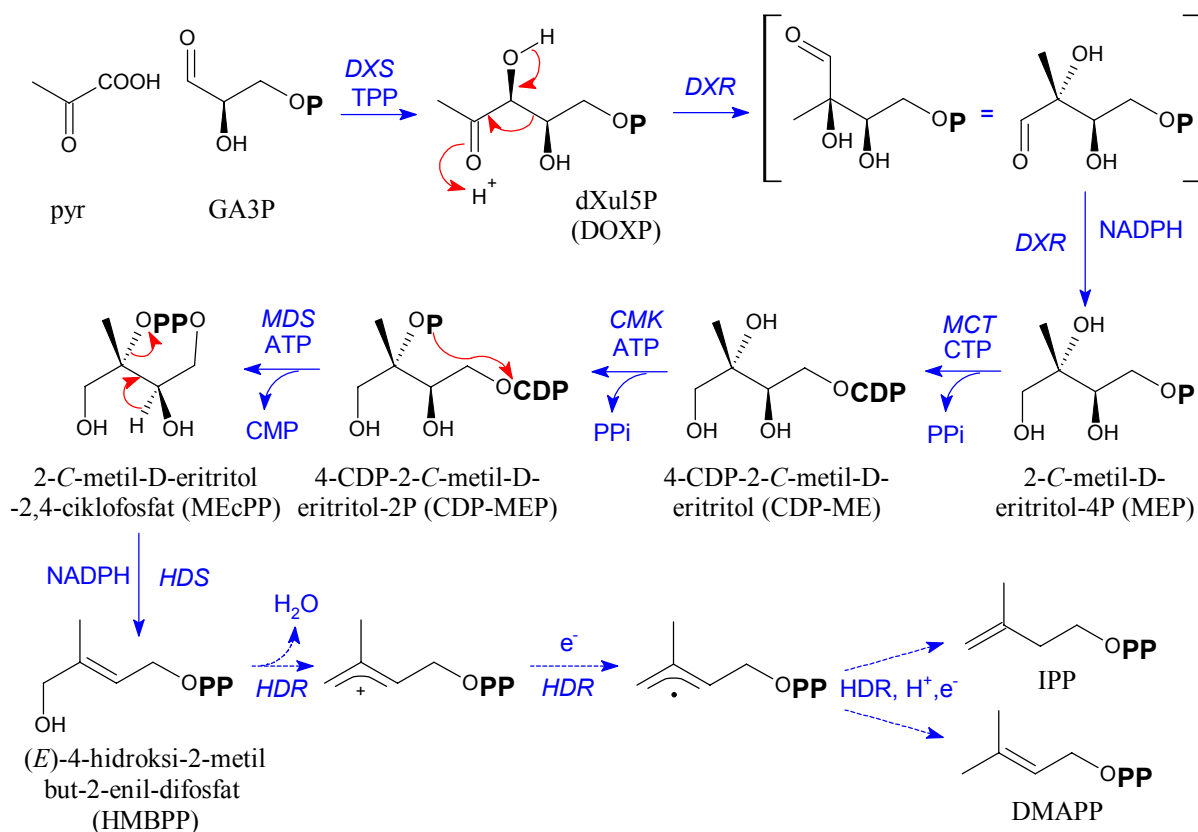
Terpenoidi

Terpenoidi su velika i strukturno raznovrsna familija prirodnih proizvoda izvedenih iz C_5 (izoprenskih) jedinica. Prema broju izoprenskih jedinica, dele se na hemi- (C_5), mono- (C_{10}), seskvi- (C_{15}), di- (C_{20}), sester- (C_{25}), tri- (C_{30}) i tetraterpene (C_{40}). Biogenetski prekursori terpenoida su aktivirane C_5 jedinice – izopentenil-pirofosfat (IPP) i dimetilalil-pirofosfat (DMAPP). Ranije se smatralo da se C_5 jedinice sintetišu isključivo preko mevalonatnog puta (uz mevalonsku kiselinu kao intermedijer) [187, 190–193]; danas se zna da postoji i alternativni, deoksiksiluloza-fosfatni put (piruvat/gliceraldehid-3-fosfatni put, mevalonat-nezavisni put, metileritritol-fosfatni put, MEP put, Rohmer-ov put) koji je u prirodi verovatno zastupljeniji. Dok životinje mogu da koriste isključivo mevalonatni put, biljke paralelno koriste oba, pri čemu su enzimi mevalonatnog puta lokalizovani u citosolu (i prvenstveno služe za biosintezu triterpena i steroida), a enzimi deoksiksiluloza-fosfatnog puta u plastidima, pretežno u leukoplastima (i učestvuju u sintezi monoterpena, kao i bočnog niza hlorofila, tokoferola i prenilhinona) [81, 91, 191, 192, 194, 195]. Neki od terpenoida (npr. bisabolol-oksidi i matricin iz kamilice) predstavljaju mešovite proizvode oba puta [91]. U daljem tekstu biće razmatran samo deoksiksiluloza-fosfatni put.

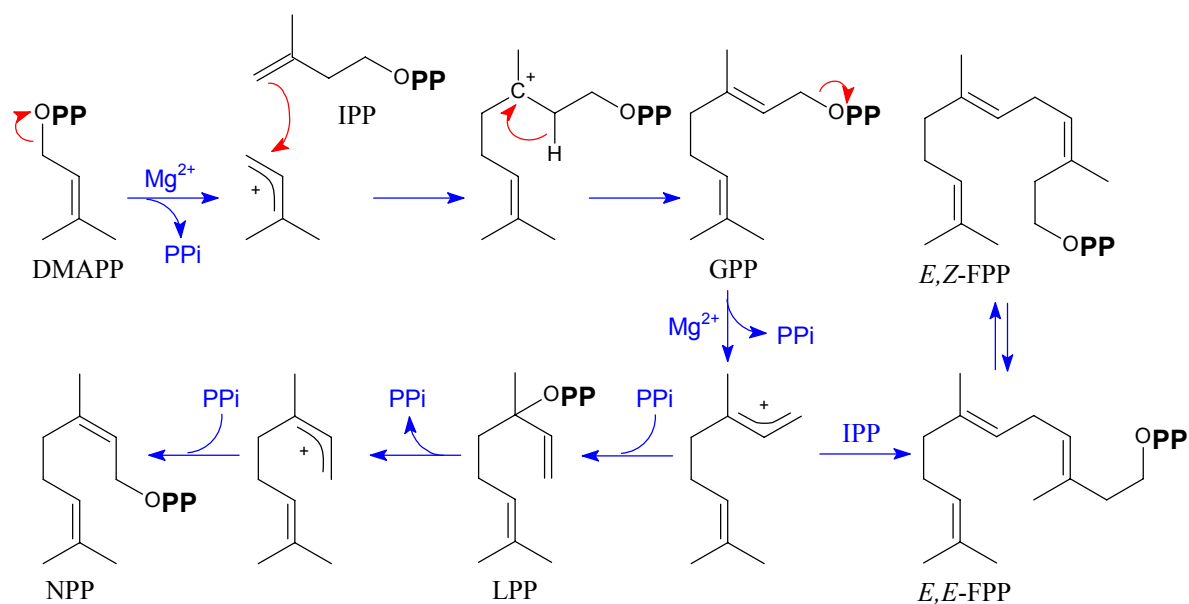
Prekursori za sintezu 1-deoksi-D-ksiluloza-5-fosfata (dXul5P) su produkti glikolize – D-gliceraldehid-3-fosfat i pirogroždana kiselina (Slika 3.39.) [81, 191–194, 196, 197]. Dekarboksilacijom piruvata nastaje ekvivalent acetaldehida (vezan za TPP), koji vrši nukleofilni napad na gliceraldehid-3-fosfat uz generisanje dXul5P, koji se reakcijom pinakol-pinakolonskog premeštanja i redukcije prevodi (preko nestabilnog, nedetektabilnog aldehida) u 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfat. Pretpostavlja se da sledi vezivanje CDP u položaju 4 i fosforilacija u položaju 2. Intramolekulskom nukleofilnom supstitucijom nastaje ciklični fosfoanhidrid (ciklofosfat), koji se dalje nizom za sada nepoznatih reakcija konvertuje u IPP. Eksperimenti pokazuju da DMAPP ne nastaje izomerizacijom IPP, nego se formira nezavisno [192, 198, 199].

Osnovni skelet monoterpena nastaje kuplovanjem dve C₅ jedinice u prisustvu odgovarajuće prenil transferaze – geranil-difosfat sintaze (Slika 3.40.) [81, 191]. Defosforilacijom DMAPP prelazi u alilni katjon, koji podleže nukleofilnom napadu od strane izopentenil-pirofosfata. Stereospecifičnom deprotonacijom uz formiranje *E* dvostruke veze nastaje geranil-pirofosfat (GPP), koji se može izomerizovati u odgovarajući, *Z*-diastereoizomer (neril-pirofosfat, NPP) i regioizomer sa terminalnom dvostrukom vezom (linalil-pirofosfat, LPP). Seskviterpeni (sa *E,E*- i *E,Z*-farnezil-pirofosfatom kao osnovnim prekursorima) nastaju analognim procesom, adicijom dodatne IPP jedinice na GPP u prisustvu farnezil-difosfat sintaze.

Ova osnovna jedinjenja dalje se jednostavnim reakcijama (redukcija, hidroksilacija, oksidacija) prevode u širok spektar monoterpenskih jedinjenja – ugljovodonika, alkohola i estara, karbonilnih jedinjenja, etara itd. Broj mogućih struktura dodatno se povećava reakcijama ciklizacije i Wagner-Meerwein-ovih premeštanja (Slika 3.41.) [81, 190].

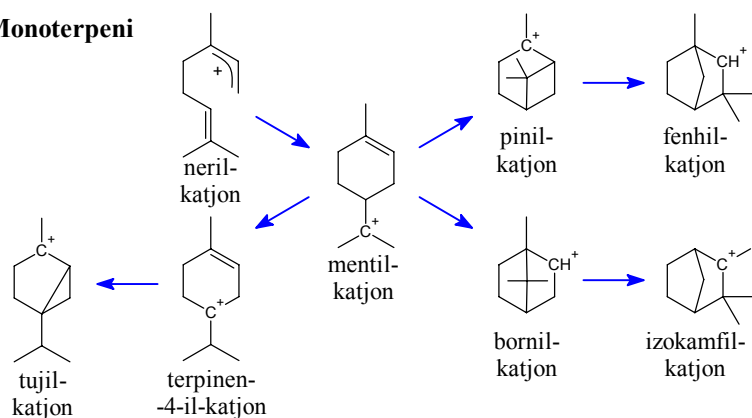


Slika 3.39. Biosinteza aktivnih C₅-jedinica – deoksiksiluloza-fosfatni put. DXS – 1-deoksi-D-ksiluloza-5-fosfat sintaza (EC 2.2.1.7), DXR – 1-deoksi-D-ksiluloza-5-fosfat reduktiozomeraza (EC 1.1.1.267), MCT – 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfat citidiltransferaza (EC 2.7.7.60), CMK – 4-(citidin-5'-difosfo)-2-C-metil-D-eritritol kinaza (EC 2.7.1.148), MDS – 2-C-metil-D-eritritol-2,4-ciklofosfat sintaza (EC 4.6.1.12), HDS – (E)-4-hidroksi-3-metilbut-2-enil-difosfat sintaza (EC 1.17.4.3), HDR – (E)-4-hidroksi-3-metilbut-2-enil-difosfat reduktaza (EC 1.17.1.2).

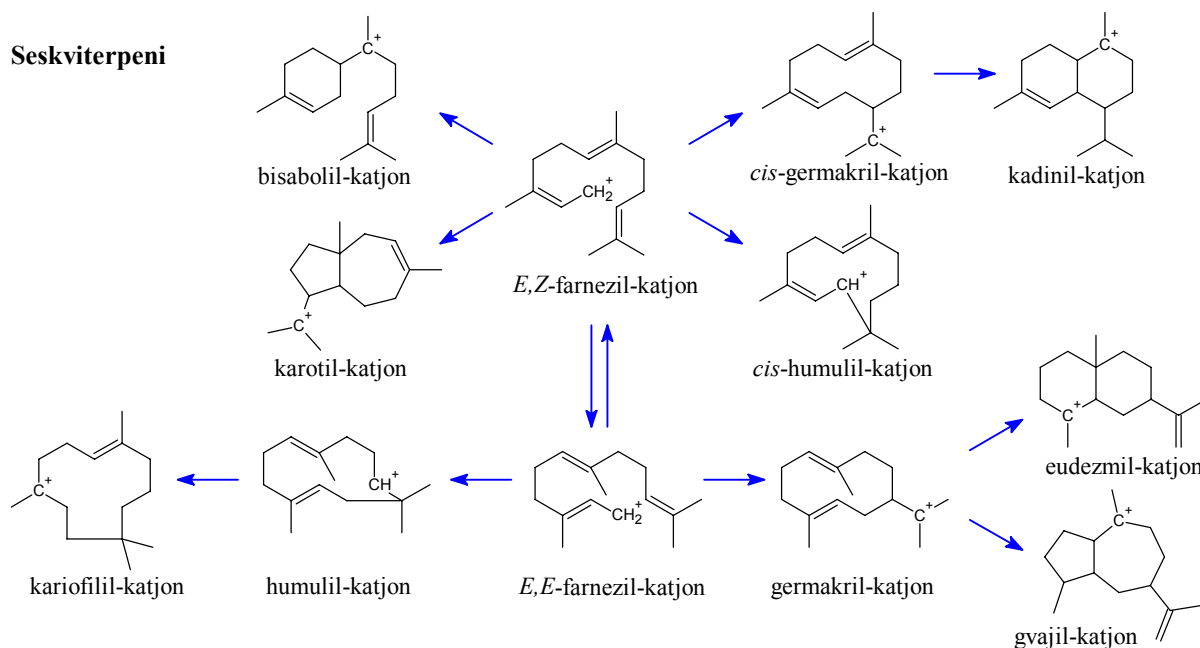


Slika 3.40. Biosinteza monoterpenskog i seskviterpenskog skeleta. DMAPP – dimetilalil-pirofosfat, GPP – geranil-pirofosfat, LPP – linalil-pirofosfat, NPP – neril-pirofosfat, FPP – farnezil-pirofosfat. [81, 91]

Monoterpeni



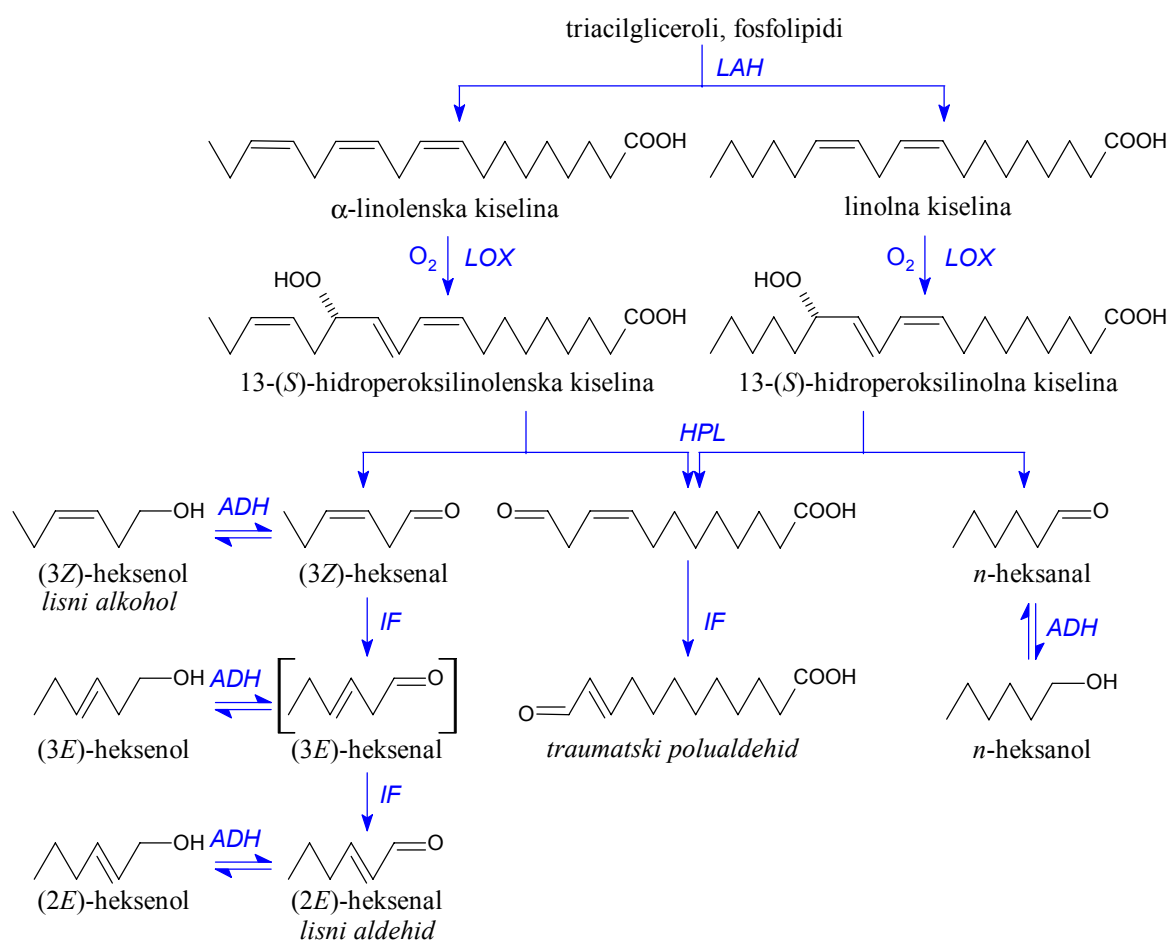
Seskviterpeni



Slika 3.41. Sinteza osnovnih monoterpenskih i seskviterpenskih skeleta [81, 187]

Neterpenska alifatična jedinjenja

Biogenetski prekursori alifatičnih C₆ alkohola, aldehida i srodnih jedinjenja su polinezasićene masne kiseline sa (1Z,4Z)-pentadienskim sistemom – linolna, α-linolenska i *cis,cis,cis*-Δ⁷,Δ¹⁰,Δ¹³-16:3 kiselina [200–204]. Enzimi koji katalizuju biosintezu ovih jedinjenja lokalizovani su u membrani lamela hloroplasta. Prilikom stresa, slobodne kiseline oslobađaju se iz triglicerida i fosfolipida membrane plastida pod dejstvom LAH (lipolytic acyl hydrolase) (Slika 3.42). Kiseline zatim podležu oksigenaciji do hidroperoksida (odn. lipidnoj peroksidaciji) pod dejstvom dioksigenaze sa nehemskim Fe – lipooksigenaze (LOX, EC 1.13.11.12). Hidroperoksid lijaza (HPL) iz konvertuje hidroperoksid u kratkoživući hemiacetal, koji spontano disocira uz raskidanje niza između C-12 i C-13, dajući C₆-aldehid i enol ω-oksokiseline. Pod dejstvom alkohol dehidrogenaze (ADH) i/ili faktora izomerizacije (IF), nastali (3Z)-heksenal može se prevesti u (3Z)- i (3E)-heksenol. Identifikovane su bar dve vrste lipooksigenaza (linoleat 9-LOX i 13-LOX) koje regiospecifično generišu 9S- ili 13S- hidroperoksid, i odgovarajuće lijaze.



Slika 3.42. Oksilipinski put biosinteze alifatičnih aldehida i alkohola [200, 202, 204].

Rasprostranjenost

Terpenoidi, kao najčešći sastojci etarskih ulja, spadaju u najraznovrsnije biomolekule, sa preko 30 000 predstavnika [31, 91]. Pronađeni su u biljkama, gljivama, morskim organizmima i insektima. Posebno su zastupljeni u tzv. aromatičnim biljkama, naročito u familijama Apiaceae, Asteraceae, Lamiaceae, Myrtaceae, Pinaceae, Rosaceae itd.

Poznato je približno 1500 monoterpena, uglavnom u sklopu etarskih ulja cvetnica i oleorezina četinarara [91, 205]. Aciklični monoterpenski ugljovodonici (mirceni, ocimeni), alkoholi i karbonilna jedinjenja zastupljena su u nizu ulja biljaka iz familija Lamiaceae, Myrtaceae, Rutaceae i

Cannabaceae, Rosaceae, Poaceae itd. Najrasprostranjeniji monociklični monoterpeni su cikloheksanski, i uglavnom se izvode od *cis*- i *trans-p*-mentana; najpoznatiji predstavnici su (+)-limonen iz *Citrus* vrsta, (–)- α -felandren iz Myrtaceae i (+)- β -felandren iz Apiaceae. Odgovarajući alkoholi i ketoni karakteristični su za *Mentha* i *Eucalyptus* vrste (Lamiaceae). Od bicikličnih monoterpena, najznačajniji su ciklopropani – karan i tujan, ciklobutan – pinan, i biciklo[2.2.1]heptani – kamfan, izokamfan i fenhan. Uobičajeni su u familijama Pinaceae, Cupressaceae, Lamiaceae i Asteraceae [205].

Seskviterpeni su pretežno zastupljeni u gljivama, *Streptomyces* bakterijama i morskim organizmima, mada je veliki broj identifikovan i u višim biljkama [91]. Poznato je oko 10 000 jedinjenja iz ove klase, sa velikim brojem različitih osnovnih skeleta, od kojih su naročito zastupljeni gvajani (preko 500 predstavnika), eudesmani (oko 500), germakrani (oko 300) i kadinani (preko 200) [205].

Neterpenska alifatična jedinjenja, naročito (3*Z*)-heksen-1-ol (lisni alkohol) i (2*E*)-heksenal (lisni aldehid) široko su zastupljena u svežem lišću i plodovima. Zajedno sa (3*E*)- i (2*E*)-heksen-1-olom, (3*Z*)- i (3*E*)-heksenalom, *n*-heksanolom i *n*-heksanalom, odgovorni su za tzv. „zeleni miris“ lišća [200, 203, 206]. Pored C₆-jedinjenja, u nekim vrstama su identifikovani i C₉-derivati: (3*Z*,6*Z*)- i (2*E*,6*Z*)-nonadienoli, (3*Z*)- i (2*E*)-nonen-1-oli, (3*Z*)- i (2*E*)-nonenali [200].

Što se tribusa Scandiceae tiče, sastav etarskih ulja ispitan je za više vrsta, uključujući *Anthriscus cerefolium* [22], *Anthriscus nemorosa* [23], *Anthriscus sylvestris* [16, 17, 21], kao i veliki broj predstavnika roda *Chaerophyllum*: *Ch. aromaticum* [24], *Ch. aureum* [1], *Ch. azoricum* [25], *Ch. byzantinum* [26], *Ch. hirsutum* [1], *Ch. libanoticum* [7], *Ch. macropodium* [27] i *Ch. temulentum* [1]. Dominantne komponente date su u Tabeli 3.1. Kao što se može videti, u pitanju su pretežno ulja bogata monoterpenskim jedinjenjima, sa (u nekim slučajevima) primesama seskviterpena. Izuzeci su ulje vrste *Anthriscus nemorosa*, bogato seskviterpenima, i ulje *Anthriscus cerefolium*, predominantno fenolnog (fenilpropenskog) porekla.

Tabela 3.1. Dominantne komponente etarskih ulja vrsta tribusa Scandiceae

Vrsta	Sastav
<i>A. cerefolium</i>	80 % metilhavikol, 16 % 1-alil-2,4-dimetoksibenzen
<i>A. sylvestris</i>	0,2–38,8 % β -felandren, 0,1–16,9 % <i>Z</i> - β -ocimen, 0,3–16,7 % β -mircen, <i>tr</i> -7,7 % <i>trans</i> -sabinil acetat, <i>tr</i> -6,2 % sabinen, <i>tr</i> -4,6 % α -pinen
<i>A. nemorosa</i>	41,7 % (<i>E</i>)-nerolidol, 13,0 % β -elemen, 9,9 % α -zingiberen, 5,0 % germakren D, 3,9 % (<i>E,E</i>)- α -farnezen, 3,7 % α -pinen
<i>Ch. aromaticum</i>	γ -terpinen, <i>p</i> -cimenen, <i>p</i> -cimen, germakren D, β -felandren, β -pinen, α -pinen, 2,6-dimetil-1,3,5,7-oktatetraen
<i>Ch. aureum</i>	37,4 % <i>endo</i> -fenhil-acetat, 15,6 % <i>E</i> -kariofilen-oksidi, 7,1 % <i>endo</i> -fenhil, 6,1 % akoren B, 4,4 % β -pinen
<i>Ch. azoricum</i>	44,4–62,3 % terpinolen, 9,4–30,8 % γ -terpinen, 4,8–9,3 % miristicin, 0,8–4,6 % zingiberen, 2,2–3,1 % limonen
<i>Ch. byzantinum</i>	30,0 % sabinen, 16,0 % <i>p</i> -cimen-8-ol, 11,5 % terpinolen, 4,6 % terpinen-4-ol, 4,0 % γ -terpinen, 3,7 % limonen
<i>Ch. hirsutum</i>	17,7 % (–)-limonen, 13,6 % (+)-sabinen, 7,1 % terpinolen, 7,6 % (+)- γ -terpinen, 6,7 % (–)-terpinen-4-ol, 5,6 % (<i>Z</i>)- β -ocimen, 4,7 % <i>o</i> -cimen
<i>Ch. libanoticum</i>	17,6 % β -felandren, 15,9 % limonen, 9,9 % γ -terpinen, 8,8 % β -pinen, 8,5 % sabinen, 7,9 % β -seskvifelandren, 4,3 % germakren D
<i>Ch. macropodium</i>	39,9 % <i>p</i> -cimen, 7,3 % spatulenol, 5,9 % <i>p</i> -cimen-8-ol, 5,2 % oktanal
<i>Ch. temulentum</i>	11,3 % (+)-sabinen, 5,6 % β -bisabolen, 5,4 % (+)-limonen, 4,5 % germakren D, 4,3 % oktanal, 3,9 % <i>ar</i> -kurkumen

Bioški značaj

Opšteprihvaćeni je stav da etarska ulja predstavljaju medijatore u interakcijama biljke sa okolinom. Smatra se da mnogi monoterpeni (i neki seskviterpeni) imaju funkciju atraktanata, u cilju privlačenja insekata radi polinacije ili disperzije semena. Primer su linalool, kamfen i cineol [91, 207]. Drugi terpenoidi zahvaljujući svom antiseptičkom delovanju igraju značajnu ulogu u zaštiti biljaka od patogenih mikroorganizama – bakterija, virusa i gljivica. Primer su oleorezini koje četinari luče kao odgovor na napad insekata, a koji predstavljaju kompleksne smeše od preko 30 mono-, seskvi- i diterpena [91, 207] (limonen, pinen, mircen itd.) toksičnih za insekte i gljivice. Neki od seskviterpena pokazuju antifidant dejstvo na herbivorne insekte [91]. Diterpeni, iako se svrstavaju u sekundarne biomolekule, često obavljaju esencijalne funkcije u organizmu (primer – giberelini, koji služe kao hormoni rasta) [91].

Pretpostavlja se da neterpenska alifatična jedinjenja imaju ulogu u komunikaciji između biljaka, kao i između biljaka i insekata (kao atraktanti ili repelenti). S obzirom na antimikrobnu aktivnost, može se pretpostaviti i protektivna uloga ovih jedinjenja [200, 203, 204].

Bioška aktivnost

Viševjekovna primena etarskih ulja i aromatičnih biljaka u tradicionalnoj, kao i oficijelnoj medicini zasniva se na njihovoj antimikrobnoj (baktericidnoj, virucidnoj, fungicidnoj) aktivnosti, kao i analgetskom, sedativnom, antiinflamatornom, spazmolitičkom ili lokalno-anestetičkom dejstvu [188, 189, 208]. Komponente etarskih ulja takođe pokazuju stimulatornu ili inhibitornu aktivnost prema nizu enzima: acetilholin esterazi, glutation S-transferazi, polifenol oksidazi, tizozinazi, α -glukozidazi, invertazi, aldoza reduktazi itd. [189]. Relativno niska toksičnost ovih jedinjenja čini ih atraktivnim u smislu potencijalnih terapijskih agenasa. Od oko 3000 poznatih etarskih ulja, trenutno oko 300 ima komercijalni značaj, bilo u farmaciji, bilo u kozmetici, prehrambenoj industriji, industriji parfema i sl.

Citotoksičnost, antimikrobno dejstvo

Etarska ulja sastavljena su od velikog broja strukturno raznovrsnih jedinjenja, i nemaju specifično ciljno mesto niti mehanizam delovanja. Zahvaljujući svojoj lipofilnosti, terpenoidi lako prolaze kroz bioške membrane, pri čemu remete njihovu strukturu – povećavaju fluidnost i, putem razmicanja masnokiselinskih ostataka fosfolipida i formiranja kanala, permeabilnost. Dolazi do narušavanja pH gradijenta, curenja proteina, Na^+ , K^+ i Ca^{2+} jona, citohroma C, slobodnih radikala [188, 209–211]. Smatra se da su mitohondrije jedna od glavnih meta delovanja etarskih ulja. Oštećenje unutrašnje i spoljašnje mitohondrijalne membrane rezultuje poremećajima u ćelijskoj respiraciji i apoptozom ili nekrozom [188, 209]. Komponente etarskih ulja takođe mogu da koagulišu citoplazmu i razore ćelijske strukture [212], oštećuju proteine i lipide [210], utiču na metabolizam lipida i transportne procese. Oštećenje ćelijskog zida i membrane može dovesti i do lize ćelije [211, 212].

Potvrđena je toksičnost etarskih ulja za niz gram-pozitivnih i, u manjoj meri, gram-negativnih bakterija [208, 210, 213, 214], virusa, kvasaca, gljivica, parazita, insekata i larvi [188, 189]. U slučaju bakterija, utvrđeno je da permeabilizacija membrana dovodi do naglog smanjenja membranskog potencijala, kolapsa protonske pumpe i iscrpljenja rezervi ATP [210, 213], kao i do autolize ćelija [212]. Smatra se da su za antimikrobno dejstvo u najvećoj meri odgovorna fenolna jedinjenja sa slobodnim hidroksilnim grupama, kao što su karvakrol, eugenol, *p*-cimen i timol; pretpostavlja se da ona dovode do inaktivacije mikrobijskih enzima (putem koagulacije), kao i do poremećaja u aktivnom transportu, toku elektrona i membranskim strukturama [209, 210, 214].

Demonstrirana je i *in vitro* aktivnost prema ćelijama sisara [215], zasnovana na indukciji apoptoze i nekroze. Citotoksično dejstvo etarskih ulja pretežno potiče od fenola, aldehida i alkohola [216]. *Ex vivo* eksperimentima potvrđena je genotoksičnost i citotoksičnost niza fenolnih jedinjenja – eugenola, metileugenola, izoeugenola i safrola – prema hepatocitima [217].

Mutageno, antimutageno, kancerogeno i antikancerogeno dejstvo

Ispitivanja su pokazala da većina etarskih ulja i njihovih sastojaka ne dovode do mutagenog efekta u jedru [188]. Međutim, za neke vrste, uključujući mirođiju (*Anethum graveolens*) i mentu, utvrđeno je *ex vivo* eksperimentima da dovode do hromozomskih aberacija [218]. Genotoksičnost je utvrđena i za niz jedinjenja, kao što je anetol iz morača (*Foeniculum vulgare*) i anisa (*Pimpinella anisum*), miristicin i elemicin [219].

U nekim slučajevima, utvrđeno je da komponente etarskih ulja mogu imati i antimutageno dejstvo. Na primer, α -bisabolol inhibira mutagenezu indukovanu nizom jedinjenja, putem inhibicije enzima koji transformišu promutagene (uključujući citohrom P450-zavisne enzime) [188, 220]. Za (–)-mentol, (–)- α -pinen, (+)- α -pinen, α -terpinen, α -terpineol, 1,8-cineol, d-limonen, kamfor, citronelal i citral takođe je dokazano CYP-modulatorno dejstvo [221, 222].

Pošto većina etarskih ulja pokazuje citotoksičnost i odsustvo mutagenih efekata, generalno se može se očekivati odsustvo kancerogenih svojstava. Međutim, smatra se da neki od sastojaka mogu predstavljati sekundarne kancerogene nakon metaboličke aktivacije. Primeri su psoraleni iz ulja bergamota (*Citrus aurantium* ssp. *bergamia*) koji mogu izazvati formiranje kovalentnih adukata DNK usled fotosenzibilizacije, pulegon iz mnogih vrsta roda *Mentha* putem generisanja *p*-krezola i iscrpljivanja rezervi glutaciona, metileugenol iz *Laurus nobilis*, estragol iz *Ocimum basilicum* itd. Kancerogeno dejstvo može takođe biti posledica i oštećenja mitohondrijalnih membrana i DNK, što dovodi do prekidanja toka elektrona kroz elektron-transportni sistem. To rezultuje akumulacijom reaktivnih oblika kiseonika (ROS), koji dalje oštećuju lipide, proteine i DNK. Dalje, i neke od fenolnih komponenti etarskih ulja u kontaktu sa ROS generišu vrlo reaktivne fenoksi radikale [188].

Za niz etarskih ulja i komponenti, uključujući mirođiju, morač, celer i kim, dokazano je da snažno stimulišu glutation S-transferaze (GST), enzim koji učestvuje u detoksifikaciji mnogih ksenobiotika (uključujući i karcinogene) i proizvoda lipidne peroksidacije [189]. Među jedinjenjima najaktivnijim u ovom pogledu su *d*-limonen, β -kariofilen, β -kariofilen-oksid, α -humulen, α -humulen-epoksid i eugenol [223].

Antiinflamatorno dejstvo

Za dve fenolne komponente etarskih ulja, eugenol i izoeugenol, utvrđeno je da inhibiraju biosintezu prostaglandina, smanjuju tonus crevne muskulature i miometrijuma i druge simptome indukovane prostaglandinima, sa IC_{50} reda 10^{-7} mol/L [189, 224].

4. Eksperimentalni deo

4.1. BILJNI MATERIJAL

Biljni materijal korišćen za istraživanja obuhvata predstavnike odabranih vrsta tribusa Scandiceae, iz rodova *Anthriscus*, *Chaerophyllum* i *Scandix*, sakupljene u periodu 2008–2009. na teritoriji Srbije, Crne Gore i Bosne i Hercegovine (Prilog 8.2.). Materijal je uzet sa originalnih staništa, u fenofazama vegetacije, cvetanja i plodonošenja. Determinacija je izvršena prema dihotomnim ključevima flore Evrope [225] a sistematska pripadnost određena po Takhtajan-u [38]. Determinacija i deponovanje primeraka jemstva (*voucher specimens*) obavljani su od strane dr Gorana Anačkova u herbarijumu Departmana za biologiju i ekologiju (BUNS Herbarium), Prirodno-matematički fakultet, Novi Sad. Detaljne informacije o uzorcima (lokaliteti, vremena uzorkovanja i oznake vaučera) date su u Prilogu 8.1.

4.2. OBRADA BILJNOG MATERIJALA

Uzorci za *headspace* GC-MS čuvani su do analize u plastičnim vrećama najviše 12 h od uzorkovanja. Svi ostali uzorci sušeni su na vazduhu i, nakon razdvajanja po organima, usitnjeni, homogenizovani i uskladišteni u papirnim vrećicama.

4.3. PRIPREMA ETARSKIH ULJA

Postupak

Etarska ulja dobijena su hidrodestilacijom odmerene mase biljnog materijala u aparaturi po Clevenger-u (Tabela 4.1.). Recipijent (heksan) uklonjen je pažljivim uparavanjem pod sniženim pritiskom. Do analize, ulja su čuvana na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ u 2 mL autosemplerskim vialima.

Tabela 4.1. Pripremljena etarska ulja

Vaučer	Vrsta	Biljni delovi	Odvaga [g]	Recipijent	Prinos [mg]	Prinos [%]	Oznaka
2-2021	<i>A. cerefolium</i>	cela biljka	76,38	heksan			AnC-EO01
2-2022	<i>A. cerefolium</i>	cela biljka	256,34	heksan	205,2	0,080	AnC-EO02
2-2026	<i>A. cerefolium</i>	cela biljka	263,49	heksan	302	0,11	AnC-EO03
2-2027	<i>A. cerefolium</i>	cela biljka	145,82	heksan	183,8	0,13	AnC-EO04
2-2043	<i>A. sylvestris</i>	cela biljka	172,48	heksan	54,4	0,032	AnS-EO06
2-2045	<i>A. sylvestris</i>	cela biljka	5263	heksan	1161,1	0,021	AnS-EO08
					524,0*	0,010	

* nakon dodatnog vakuumiranja

4.4. PRIPREMA EKSTRAKATA

Postupak

70 % MeOH-ekstrakti

Odmerena masa osušenog biljnog materijala (Tabele 4.2. i 4.3.) macerirana je u 70 % V/V metanolu (~8 mL MeOH po 1 g droge) na sobnoj temperaturi uz mućkanje tokom (tipično) 48 h. Ekstrakti su procedeni na vakuumu, uz ispiranje ostatka na filtru ekstragensom, i zatim upareni pod sniženim pritiskom na $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ (u cilju izbegavanja degradacije termolabilnih prirodnih proizvoda). Nakon sušenja u eksikatoru (minimum 48 h), izmerena je masa ostatka i izračunat prinos. Suvi

ostatak rekonstituisan je u DMSO* i tipično razblažen do koncentracije od približno 50 mg/mL (tačne koncentracije date su u Tabelama 4.2. i 4.3). Rastvori su do analize čuvani na 4 °C u krimp-vialima.

Vodeni ekstrakti

Odmerena masa osušenog biljnog materijala (700-800 mg, Tabela 4.4.) prelivena je sa 10 mL destilovane vode i zagrevana na ključalom vodenom kupatilu tokom 1 h. Ekstrakti su procedeni na vakuumu, uz ispiranje ostatka na filtru ključalom destilovanom vodom, i zatim upareni pod sniženim pritiskom na 45 °C. Nakon sušenja u eksikatoru (minimum 48 h), izmerena je masa ostatka i izračunat prinos. Suvi ostatak rekonstituisan je u vodi† i razblažen do koncentracije od približno 50 mg/mL (tačne koncentracije date su u Tabeli 4.4.). Rastvori su do analize čuvani na – 20 °C u krimp-vialima.

Tabela 4.2. 70 % metanolni ekstrakti korena odabranih uzoraka.

Vrsta	Vaučer	<i>m</i> (droga) [g]	<i>m</i> (ekstrakt) [mg]	prinos [%]	<i>C</i> [mg/mL]	<i>C</i> [g droge/mL]	oznaka
<i>A. cerefolium</i>	2-2035	0,8190	224,5	27,4	44,9	0,164	AnC10K-Ex(70M)
	2-2036	1,9048	497,0	26,1	49,7	0,190	AnC11K-Ex(70M)
	2-2037	10,0889	2338,9	23,2	104	0,448	AnC12K-Ex(70M)
	2-2038	9,8161	3093,6	31,5	51,7	0,164	AnC13K-Ex(70M)
	2-2039	5,8877	1850,9	31,4	49,6	0,158	AnC14K-Ex(70M)
	2-2040	0,9659	358,1	37,1	56,0	0,151	AnC15K-Ex(70M)
	2-2041	5,9197	1817,9	30,7	50,2	0,163	AnC16K-Ex(70M)
	2-2042	1,5233	250,2	16,4	50,0	0,305	AnC17K-Ex(70M)
<i>A. sylvestris</i>	2-1880	3,1813	1059,2	33,3	49,9	0,150	AnS01K-Ex(70M)
	2-1881	10,3215	3686,3	35,7	52,1	0,146	AnS03K-Ex(70M)
	2-2045	3,0554	672,4	22,0	67,2	0,306	AnS04K-Ex(70M)
	2-2044	9,8323	2398,3	24,4	50,8	0,208	AnS05K-Ex(70M)
	2-2046	9,2074	2520,6	27,4	51,6	0,189	AnS06K-Ex(70M)
	2-2047	10,0412	2216,3	22,1	51,6	0,234	AnS07K-Ex(70M)
	2-2048	10,075	2474,4	24,6	47,9	0,195	AnS08K-Ex(70M)
	2-2049	10,2417	2573,8	25,1	52,9	0,210	AnS09K-Ex(70M)
	2-2051	4,5971	843,6	18,4	84,4	0,460	AnS10K-Ex(70M)
	2-2052	5,8224	1415,1	24,3	50,4	0,208	AnS11K-Ex(70M)
<i>Ch. temulentum</i>	2-2012	4,2332	291,5	6,89	97,2	1,41	ChT01K-Ex(70M)
	2-2012	2,3620	150,4	6,37	80,9	1,27	ChT02K-Ex(70M)
	2-2012	6,8601	491,4	7,16	98,3	1,37	ChT03K-Ex(70M)
	2-2010	5,3831	446,9	8,30	99,3	1,20	ChT04K-Ex(70M)
	2-2011	8,7181	859,3	9,86	101	1,03	ChT05K-Ex(70M)
<i>Ch. bulbosum</i>	2-2018	4,9265	581,4	11,8	58,1	0,493	ChB01K-Ex(70M)
	2-2019	5,1621	620,5	12,0	62,1	0,516	ChB02K-Ex(70M)
<i>Ch. hirsutum</i>	2-2014	14,8354	1869,4	12,6	48,0	0,381	ChH01K-Ex(70M)
	2-2015	9,9020	1035,0	10,5	52,1	0,499	ChH02K-Ex(70M)
	2-2016	1,5166	173,2	11,4	50,2	0,440	ChH03K-Ex(70M)
<i>S. pecten-veneris</i>	2-2009	5,7378	1351,6	23,6	48,3	0,205	SPV01K-Ex(70M)

* U cilju izbegavanja uticaja dilatacije/kontrakcije zapremine, svi osnovni rastvori ekstrakata pripremljeni su u normalnim sudovima.

† Vodeni ekstrakti pokazali su slabu rastvorljivost u DMSO.

Tabela 4.3. 70 % metanolni ekstrakti herbe odabranih uzoraka.

Vrsta	Vaučer	m_{droga} [g]	$m_{ekstrakt}$ [mg]	prinos [%]	C [mg/mL]	C [g droge/mL]	oznaka
<i>A. cerefolium</i>	2-2035	8,1021	2403,0	29,7	48,1	0,162	AnC10H-Ex(70M)
	2-2036	9,7473	3313,4	34,0	49,7	0,146	AnC11H-Ex(70M)
	2-2037	9,7942	3042,5	31,1	48,7	0,157	AnC12H-Ex(70M)
	2-2038	9,8097	1841,1	18,8	55,2	0,294	AnC13H-Ex(70M)
	2-2039	9,7751	2639,2	27,0	52,8	0,195	AnC14H-Ex(70M)
	2-2040	9,9590	2683,5	26,9	53,7	0,199	AnC15H-Ex(70M)
	2-2041	9,6623	1922,4	19,9	57,7	0,290	AnC16H-Ex(70M)
	2-2042	9,7819	1290,7	13,2	48,4	0,367	AnC17H-Ex(70M)
<i>A. sylvestris</i>	2-1880	10,0244	2295,0	22,9	45,9	0,200	AnS01H-Ex(70M)
	2-1881	9,7085	2146,2	22,1	51,5	0,233	AnS03H-Ex(70M)
	2-2045	10,0186	1048,3	10,5	52,4	0,501	AnS04H-Ex(70M)
	2-2044	9,9288	1749,5	17,6	50,0	0,284	AnS05H-Ex(70M)
	2-2046	9,9187	2989,1	30,1	51,2	0,170	AnS06H-Ex(70M)
	2-2047	9,8309	2477,1	25,2	49,5	0,197	AnS07H-Ex(70M)
	2-2048	9,7915	2419,4	24,7	48,4	0,196	AnS08H-Ex(70M)
	2-2051	9,8315	1398,6	14,2	55,9	0,393	AnS10H-Ex(70M)
	2-2052	9,8525	2426,0	24,6	48,5	0,197	AnS11H-Ex(70M)
	<i>Ch. temulentum</i>	2-2012	9,8426	1504,4	15,3	52,7	0,344
2-2012		9,7428	1587,3	16,3	55,7	0,342	ChT02H-Ex(70M)
2-2012		9,9146	1405,3	14,2	49,5	0,349	ChT03H-Ex(70M)
2-2010		9,7835	1214,5	12,4	48,6	0,391	ChT04H-Ex(70M)
2-2011		9,7453	1659,3	17,0	49,8	0,292	ChT05H-Ex(70M)
<i>Ch. bulbosum</i>	2-2018	9,7860	1570,8	16,1	47,1	0,294	ChB01H-Ex(70M)
	2-2019	9,8036	1414,4	14,4	56,6	0,392	ChB02H-Ex(70M)
<i>Ch. hirsutum</i>	2-2014	9,9457	1744,8	17,5	52,4	0,298	ChH01H-Ex(70M)
	2-2015	9,8141	1523,7	15,5	45,7	0,294	ChH02H-Ex(70M)
	2-2016	3,2966	625,2	19,0	50,0	0,264	ChH03H-Ex(70M)
<i>S. pecten-veneris</i>	2-2009	9,8486	2008,2	20,4	50,2	0,246	SPV01H-Ex(70M)

Tabela 4.4. Vodeni ekstrakti korena i herbe odabranih uzoraka.

Vrsta	Vaučer	Deo	m_{droga} [g]	$m_{ekstrakt}$ [mg]	prinos [%]	C [mg/mL]	C [g droge/mL]	oznaka
<i>A. sylvestris</i>	2-2047	herba	0,7940	230,8	29,1	50,2	0,173	AnS07H-Ex(aq)
	2-2047	koren	0,7696	150,4	19,5	50,1	0,257	AnS07K-Ex(aq)
<i>A. cerefolium</i>	2-2037	herba	0,7978	192,0	24,1	50,5	0,210	AnC12H-Ex(aq)
	2-2037	koren	0,7434	186,5	25,1	50,4	0,201	AnC12K-Ex(aq)
<i>Ch. temulentum</i>	2-2011	herba	0,7576	180,7	23,9	50,2	0,210	ChT05H-Ex(aq)
	2-2011	koren	0,7747	103,4	13,3	49,2	0,369	ChT05K-Ex(aq)
<i>Ch. hirsutum</i>	2-2014	herba	0,7920	134,5	17,0	49,8	0,293	ChH01H-Ex(aq)
	2-2014	koren	0,7526	128,6	17,1	49,5	0,289	ChH01K-Ex(aq)
<i>Ch. bulbosum</i>	2-2018	herba	0,7243	112,1	15,5	51,0	0,329	ChB01H-Ex(aq)
	2-2018	koren	0,7046	84,0	11,9	46,9	0,394	ChB01K-Ex(aq)
<i>S. pecten-veneris</i>	2-2009	herba	0,7849	193,8	24,7	49,7	0,201	SPV01H-Ex(aq)

4.5. GC-MS ANALIZA VOLATILNIH KOMPONENTI

Headspace GC-MS analiza

Isparljiva jedinjenja u svežem biljnom materijalu analizirane su statičnom *headspace* GC-MS tehnikom. Korišćen je Agilent Technologies 6890N gasni hromatograf sa 5975B masenim spektrometrom, opremljen 7694E *headspace* autosemplerom. Nekoliko stotina mg uzorka usitnjeno je i smešteno u 20 mL *headspace* vial, koji je zatim ekvilibrisan 5 min na 120 °C (optimizovani uslovi). Tokom 0,15 min (*pressurization time*) strujom helijuma podignut je pritisak u vialu, nakon čega su isparljive komponente tokom 0,15 min (*loop fill time*) prenete u petlju temperature 135 °C. Tokom sledećih 1,0 min (*injection time*), uzorak je transfer-linijom temperature 145 °C prenet u *split/splitless* inlet gasnog hromatografa, temperature 250 °C, uz split mod (split protok 4 mL/min). Kao gas nosač korišćen je helijum čistoće 99,999 %, u režimu konstantnog protoka kroz kolonu od 1,1 mL/min. Komponente su razdvojene na HP-5ms (Agilent Technologies) WCOT kapilarnoj koloni dužine 30 m, prečnika 0,25 mm, debljine sloja 0,25 µL, sa stacionarnom fazom na bazi 5 % fenil, 95 % dimetilpolisiloksana, koristeći sledeći temperaturni program: startna temperatura 50 °C, 8 °C/min do 120 °C, 15 °C/min do 230 °C (ukupno trajanje analize 16,1 min). Eluat je preko transfer linije temperature 280 °C prenet na *single-quad* maseni spektrometar sa elektronskom jonizacijom (temperatura jonskog izvora 230 °C, energija elektrona 70 eV, temperatura kvadrupola 150 °C) i analiziran u sken modu u opsegu $m/z = 35\text{--}300$ Da. U cilju bolje korelacije masenih spektara sa spektralnim bibliotekama, instrument je tjuniran korišćenjem *Standard spectra tune-a*.

GC-MS analiza etarskih ulja

Sva izolovana etarska ulja su nakon razblaživanja heksanom analizirana na Agilent Technologies 6890N gasnom hromatografu sa 5975B masenim spektrometrom. Injektovano je po 1 µL uzorka u *split/splitless* inlet temperature 250 °C, u split modu (split odnos 1:100). Kao gas nosač korišćen je helijum čistoće 99,999 %, u režimu konstantnog protoka od 1,0 mL/min. Komponente su razdvojene na HP-5ms (Agilent Technologies) kapilarnoj koloni dimenzija 30 m × 0,25 mm × 0,25 µm, uz temperaturni program: startna temperatura 50 °C, 8 °C/min do 120 °C, 15 °C/min do 230 °C, 20 °C/min do 270 °C (ukupno trajanje analize 16,9 min). Razdvojene komponente su analizirane na masenom spektrometru (temperatura transfer linije 280 °C, temperatura jonskog izvora 230 °C, energija elektrona 70 eV, temperatura kvadrupola 150 °C) u sken modu, u m/z opsegu 35–400. U cilju bolje korelacije masenih spektara sa spektralnim bibliotekama, instrument je tjuniran korišćenjem *Standard spectra tune-a*.

Obrada podataka

Podaci su obrađeni pomoću Agilent Technologies MSD ChemStation softvera (revizija E01.01.335) u kombinaciji sa AMDIS (Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System, ver. 2.64) i NIST MS Search softverom (ver. 2.0d). AMDIS je korišćen za dekonvoluciju masenih spektara, tj. ekstrakciju čistih masenih spektara iz preklapljenih pikova, dok je NIST MS Search obezbedio algoritam za pretragu biblioteka komplementaran PBM (*Probability Best Match*) algoritmu ChemStation-a. Za identifikaciju masenih spektara korišćene su spektralne biblioteke Wiley Registry of Mass Spectral Data 7th Edition (338000 spektara, 289000 jedinjenja) i NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library 05 (190825 spektara, 163198 jedinjenja). Identitet jedinjenja potvrđen je poređenjem Kovats-evih retencionih indeksa (*KI*) sa literaturnim podacima [226]. Kao standard za određivanje *KI* korišćeno je dizel ulje, za koga je analizom utvrđeno da sadrži smešu svih *n*-alkana u opsegu C₈–C₂₈ (odgovara Kovats indeksu 800–2800). Relativni udeli jedinjenja određeni su metodom normalizacije, na osnovu površine pikova u TIC (*total ion chromatogram*).

Za analizu glavnih komponenti (PCA) korišćen je softver PAST ver. 2.00 (Hammer, Ø., Harper, D.A.T., 2010.).

4.6. LC-DAD-MS ANALIZA

Scan analiza

Komponente ekstrakata analizirane su tehnikom tečne hromatografije kuplovane sa UV/VIS detekcijom (*diode array detector*, DAD) i tandemskom masenospektrometrijskom detekcijom. Korišćen je Agilent Technologies 1200 Series Rapid Resolution tečni hromatograf (sastavljen od G1379B vakuum-degazera, G1312B binarne pumpe, G1367C autosemplera, G1316B termostatiranog odeljka za kolone i G1315C DAD detektora) kuplovan sa G6410A QqQ MS-MS detektorom sa elektrosprej (ESI) jonskim izvorom. Za kontrolu instrumenta i akviziciju podataka korišćen je MassHunter Workstation Data Acquisition ver. B.01.03 softver (Agilent Technologies).

Injektovano je 1–5 μL uzorka rastvorenog u smeši faza A i B (1:1)*. Kao mobilna faza A korišćena je 0,05 % V/V mravlja kiselina sa dodatkom 200 $\mu\text{g/mL}$ $\text{CH}_3\text{COONH}_4$, a kao faza B – MeOH. Komponente su eluirane u gradijentnom režimu: 0 min 30 % B, 6 min 70 % B, 9 min 100 % B, 12 min 100 % B, *post time* 3 min (ukupno vreme analize 15 min), uz konstantan protok od 1 mL/min. Razdvajanje je postignuto na Rapid Resolution HT Zorbax Eclipse XDB-C18 50 mm \times 4,6 mm \times 1,8 μm koloni (Agilent Technologies) temperiranoj na 50 $^\circ\text{C}$ (eluat je nakon kolone hlađen na temperaturu detektora), ispred koje je bio vezan *in-line* filter (2 mm, 0,2 μm , Agilent Technologies). Praćen je UV/VIS signal eluata na 215 nm, 260 nm, 290 nm i 340 nm (za sve signale, širina trake bila je 16 nm), kao i kontinualni spektar u opsegu 190–700 nm (sa korakom 2 nm).

Celokupna količina eluata prosleđena je u maseni spektrometar. Parametri jonskog izvora bili su: protok gasa za sušenje (N_2) 9 L/min, temperatura 350 $^\circ\text{C}$, pritisak gasa za nebulizaciju 40 psi, napon na kapilari 4 kV.

Za potrebe skrininga, svi uzorci analizirani su u MS2Scan modu (kvadrupol Q1 podešen na transmisiju, koliziona ćelija isključena, kvadrupol Q3 podešen na skeniranje), i u pozitivnom i u negativnom modu, uz *m/z* opseg 110–950 Da (korak 0,1 Da) i vreme skeniranja 200 ms. Napon fragmentora podešen je na 130 V.

MSⁿ analiza

U cilju identifikacije pojedinačnih komponenti, odabrane jonske vrste u reprezentativnim uzorcima analizirane su korišćenjem više MSⁿ tehnika:

- Product Ion Scan (Q1 podešen na propuštanje samo odabrane jonske vrste – SIM, koliziona ćelija uključena, Q3 – skeniranje), uz kolizionu energiju variranu u opsegu 0–40 V (sa korakom 10 V), korišćen je za dobijanje MS² i pseudo-MSⁿ spektara.
- Precursor Ion Scan (Q1 – skeniranje, koliziona ćelija uključena, Q3 – SIM) korišćen je za skrining molekula sa zajedničkim strukturnim elementima. Praćeni su Y_o⁺ joni aglikona tipičnih flavonoida prisutnih u familiji *Apiaceae* i $[\text{B}+\text{H}]^+ / [\text{C}+\text{H}]^+$ joni ariltetralinskih i dibenzobutirolaktonskih lignana.
- Neutral loss (Q1 – skeniranje, koliziona ćelija uključena, Q3 – SIM sa zadatim $\Delta m/z$ u odnosu na aktuelni *m/z* na Q1) upotrebljen je za skrining glikozida (praćeni su karakteristični gubici: 162 za heksozide i 146 za deoksiheksozide) i lignana (gubici ArH: 168 za trimetoksifenil-grupu, 138 za dimetoksifenil- i hidroksi-metilendioksifenil-).

Kod svih MSⁿ eksperimenata kao kolizioni gas korišćen je azot visoke čistoće.

* Istraživanja [227] pokazuju da je kod lignana optimalan udeo metanola 40–80 %. Niže koncentracije MeOH loše utiču na oblik pikova nepolarnih lignana, dok visoke koncentracije dovode do deformacije (cepanja) pikova polarnijih jedinjenja.

Kvantitativna analiza

Odabrane fenolne komponente u ispitivanih ekstraktima kvantifikovane su primenom LC-MS-MS tehnike. Korišćen je Agilent Technologies 1200 Series Rapid Resolution tečni hromatograf kuplovan sa G6410A QqQ MS-MS detektorom sa elektrosprej (ESI) jonskim izvorom, kontrolisan od strane MassHunter Workstation Data Acquisition ver. B.01.03 softvera (Agilent Technologies).

Injektovano je po 1 μ L uzorka razblaženog smešom faza A i B (1:1) do koncentracije oko 5–10 mg/mL. Kao mobilna faza A korišćena je 0,05 % V/V mravlja kiselina sa dodatkom 200 μ g/mL $\text{CH}_3\text{COONH}_4$, a kao faza B – MeOH. Komponente su eluirane u gradijentnom režimu: 0 min 30 % B, 6 min 70 % B, 9 min 100 % B, 12 min 100 % B, *post time* 3 min (ukupno vreme analize 15 min), uz konstantan protok od 1 mL/min. Za analizu standarda korišćen je kraći program: 0 min 30 % B, 6 min 70 % B, *post time* 2 min (ukupno vreme analize 8 min). Razdvajanje je postignuto na Rapid Resolution HT Zorbax Eclipse XDB-C18 50 mm \times 4,6 mm \times 1,8 μ m koloni (Agilent Technologies) temperiranoj na 50 °C, ispred koje je bio vezan *in-line* filter (2 mm, 0,2 μ m, Agilent Technologies). Praćen je UV/VIS signal eluata na 215 nm, 260 nm, 290 nm i 340 nm (za sve signale, širina trake bila je 16 nm). Celokupna količina eluata prosleđena je u maseni spektrometar (kod analize ekstrakata, nakon 5,5 min eluat je preusmeravan u otpad). Parametri jonskog izvora bili su: protok gasa za sušenje (N_2) 9 L/min, temperatura 350 °C, pritisak gasa za nebulizaciju 40 psi, napon na kapilari 4 kV, negativni polaritet. Jedinjenja su praćena u MRM (*eng.* multiple reactions monitoring) modu ili (u nekoliko slučajeva) MS2SIM modu (Q1 – transmisija, koliziona ćelija isključena, Q3 – SIM); optimizovani parametri su dati u Tabeli 4.5.. Vreme akvizicije po jonu/tranziciji (*eng.* dwell) bilo je 100 ms.

Tabela 4.5. Tranzicije/joni korišćeni za kvantitaciju fenolnih jedinjenja.

Vreme [min]	Jedinjenje	Mod	m/z prekursora	V_{frag}^* [V]	m/z produkta	V_{col} [V]
0	Hlorogenska kiselina	MRM	353	100	191	12
	Sinapinska kiselina	MRM	223	100	193	17
	Siringinska kiselina	MRM	197	90	182	7
	Ferulna kiselina	MRM	193	90	134	11
	Skopoletin	MRM	191	80	176	8
	Kafena kiselina	MRM	179	100	135	10
	Eskuletin	MRM	177	105	133	15
	Galna kiselina	MRM	169	90	125	10
	Kumarinska kiselina	MRM	163	90	119	9
	<i>p</i> -hidroksibenzoeva kiselina	MRM	137	80	93	10
2,2	Rutin	MRM	609	135	300	42
	Apigenin-7- <i>O</i> -glukozid	MRM	431	135	268	41
	Sekoizolaricirezinol	MRM	361	130	165	26
3,3	Matairezanol	MS2SIM	357	130	-	-
	Kvercetin	MS2SIM	301	130	-	-
	Luteolin, kemferol	MS2SIM	285	130	-	-
	Apigenin	MS2SIM	269	130	-	-

* V_{frag} – napon fragmentora, V_{col} – napon kolizione ćelije

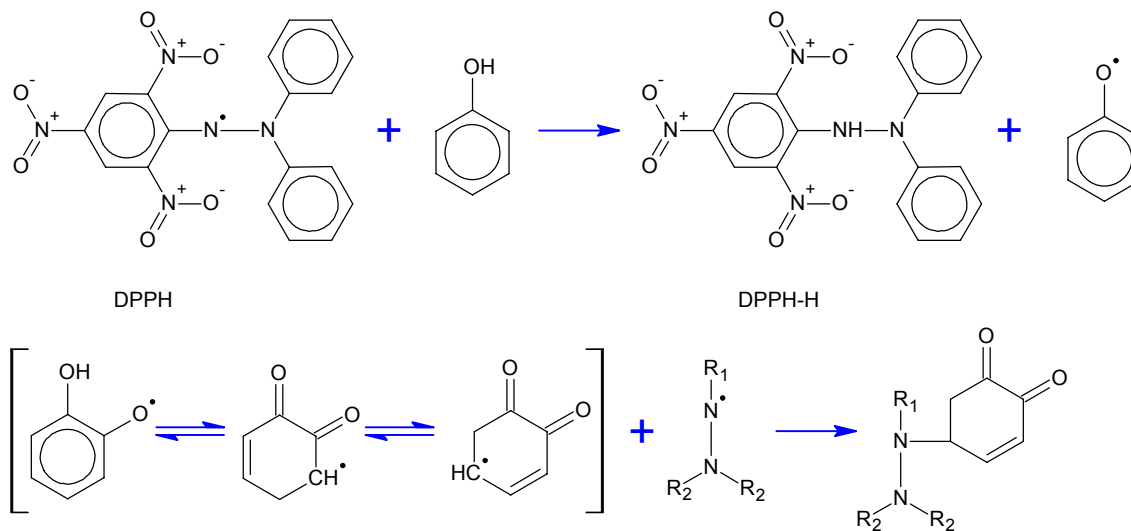
Obrada podataka

Za obradu podataka korišćen je softver MassHunter Qualitative Analysis ver. B.01.03 (Agilent Technologies). Molska masa jedinjenjâ određena je iz masenih spektara prvog reda pri oba polariteta, putem asignacije bar dve jonske vrste (u pozitivnom modu, adukti molekula i dimera sa protonom, jonima alkalnih metala i amonijum-jonom, u negativnom – deprotonovani molekul i dimer, adukti sa hloridom, formijatom i dihidrogenfosfatom). Za identifikaciju korišćeni su podaci o molskoj masi, karakteristični fragmenti u MS^n spektrima, UV spektri, poređenje sa referentnim standardima (ukoliko su dostupni), prethodno objavljeni rezultati i baza podataka Dictionary of Natural Products [31].

4.7. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDANTNE AKTIVNOSTI DPPH TESTOM

Princip

Metoda se zasniva na spektrofotometrijskom praćenju konverzije stabilnog, azot-centriranog radikala DPPH· (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil), intenzivno ljubičaste boje ($\lambda_{\max} = 515 \text{ nm}$), u žuto obojenu formu DPPH-H u prisustvu antioksidanasa [228–234]. Antioksidansi (npr. fenoli) redukuju DPPH po dva mehanizma – prenosa H· i kuplovanja sa organskim radikalima (Slika 4.1.).



Slika 4.1. Mehanizam reakcije fenola sa DPPH radikalom.

Postupak

Pripremljena je serija razblaženja (sekvencijalnim razblaživanjem 1:1) ispitivanih ekstrakata u MeOH. U mikroploči (12×8) pripremljene su probe odmeravanjem 190 μL MeOH, 10 μL rastvora ekstrakta (ili 10 μL MeOH u slučaju kontrole) i 100 μL rastvora DPPH reagensa 26,4 $\mu\text{g}/\text{mL} = 67,2 \text{ nmol}/\text{mL}$ u MeOH (100 μL MeOH kod korekcije). Za svaki uzorak pripremljeno je po 7 razblaženja u 3 ponavljanja. Za svaku mikroploču pripremljene su po 3 kontrole. Nakon 60 min inkubacije u mraku na sobnoj temperaturi, očitane su apsorbancije na 515 nm pomoću Multiskan Spectrum čitača mikroploča (Thermo Corporation).

Proračun

Za svaku koncentraciju ekstrakta izračunat je stepen inhibicije prema formuli:

$$I = 100 \cdot \left[1 - \frac{(A_{\text{proba}} - A_{\text{korekcija}})}{A_{\text{kontrola}}} \right]$$

gde je:

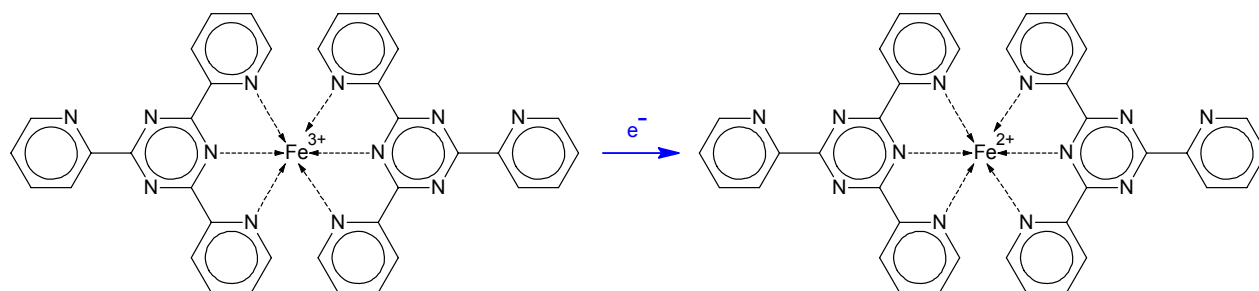
- I – inhibicija (procenat neutralisanih DPPH radikala) [%]
- A_{proba} – usrednjena vrednost apsorbancije radnih proba za datu koncentraciju
- $A_{\text{korekcija}}$ – apsorbancija korekcije za datu koncentraciju
- A_{kontrola} – usrednjena vrednost apsorbancije kontrolnih proba

U OriginPro 8.0724 softveru (OriginLab Corporation) konstruisana je kriva zavisnosti odgovora (I) od radne koncentracije (koncentracije ekstrakta u finalnoj reakcionoj smeši), i očitana IC_{50} vrednost kao koncentracija koja dovodi do neutralizacije 50 % DPPH radikala.

4.8. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDANTNE AKTIVNOSTI FRAP TESTOM

Princip

FRAP (eng. *ferric reducing ability of plasma*, alternativno *ferric ion reducing antioxidant power*) metoda originalno je razvijena za određivanje sadržaja redukjućih materija u krvnoj plazmi, ali je našla primenu i u ispitivanju antioksidantnog potencijala biljnih ekstrakata [232, 233, 235, 236]. Zasniva se na redukciji $[\text{Fe}^{3+}\text{-TPTZ}^*]$ kompleksa do intenzivno plavog (apsorpcioni maksimum 593 nm) $[\text{Fe}^{2+}\text{-TPTZ}]$ kompleksa u kiseloj sredini (Slika 4.2.). Reakcija je nespecifična, i bilo koji sistem sa redoks potencijalom negativnijim od para $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-TPTZ}/\text{Fe}^{\text{II}}\text{-TPTZ}$ dovešće do redukcije. Redukcioni kapacitet izražava se preko mase nekog standardnog reducensa (Fe^{2+} , askorbinska kiselina i sl.) koja bi izazvala isti nivo redukcije $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-TPTZ}$.



Slika 4.2. Reakcija redukcije $\text{Fe}^{3+}\text{-TPTZ}$ kompleksa.

Postupak

Pripremljeni su razblaženi rastvori svih ekstrakata (tipične koncentracije 1–5 mg/mL i ~8 mg/mL za 70 % metanolne ekstrakte herbe i korena, respektivno, i 4–16 mg/mL za vodene ekstrakte) u smeši voda-metanol (1:1) odn. vodi. U *well*-ove mikroploče odmereno je po 300 μL sveže pripremljenog FRAP reagensa (dobijenog mešanjem 50 mL 0,3 mol/L acetatnog pufera pH = 3,6, 5 mL 10 mmol/L rastvora TPTZ u 40 mmol/L HCl, i 5 mL 20 mmol/L vodenog rastvora FeCl_3) ili 300 μL vode (u slučaju korekcija) i 100 μL razblaženog ekstrakta. Svaki uzorak rađen je u triplikatu. Nakon 6 min inkubacije očitana je apsorbancija na 593 nm pomoću Multiskan Spectrum čitača mikroploča (Thermo Corporation). Paralelno sa uzorcima pripremljeni su i analizirani standardni rastvori FeSO_4 koncentracija $C(\text{Fe}) = 2,79\text{--}186 \mu\text{g/mL}$. Uzorci koji su izašli izvan opsega kalibracione krive ponovljeni su uz odgovarajuće podešavanje koncentracije.

Proračun

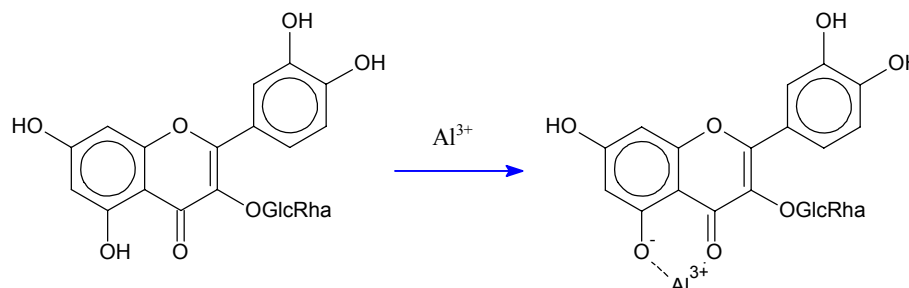
Koncentracija Fe^{2+} ekvivalenata u svakom ekstraktu očitana je direktno sa kalibracione krive i preračunata na masu ekstrakta.

* 2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazin

4.9. ODREĐIVANJE UKUPNIH FLAVONOIDA

Princip

Metoda se zasniva na osobini flavonoida da kompleksiraju metalne katjone (kao što je Al^{3+}), pri čemu dolazi do građenja helata (Slika 4.3.), proširenja delokalizacije i pomeranja UV i VIS apsorpcionih traka za oko 50 nm ka višim talasnim dužinama (batohromni efekat), tj. boja rastvora prelazi iz žute u žuto-zelenu ili intenzivniju žutu [237–241].



Slika 4.3. Građenje helata flavonoida (rutina) sa Al^{3+} jonom.

Reakcija nije univerzalna – za građenje stabilnih kompleksa potrebna je okso-grupa u položaju 4 i $-\text{OH}$ grupa u položaju 3 ili 5. Moguće je i građenje kompleksa, labilnih pri nižim vrednostima pH, sa *o*-dihidroksi grupom prstena B (3',4').

Flavonoli sa 3-OH i 5-OH (kemferol i sl.), i eventualnim 3',4'-OH (kvercetin, rutin, kvercitrin, miricetin), imaju apsorpcioni maksimum u intervalu 415–440 nm. Flavoni bez 3-OH, samo sa 5-OH (apigenin) imaju maksimum na <400 nm, ali luteolin sa 3',4'-OH pokazuje jaku apsorpciju na 415 nm. Stoga, ukoliko se u uzorcima očekuje širok spektar flavonoidnih struktura, poželjno je koristiti kompromisnu λ od 415 nm. Na 415 nm, flavonoli daju najjači signal, flavoni znatno slabiji, flavanoni i izoflavoni vrlo slab.

Izgled apsorpcionog spektra i stabilnost nagrađenog kompleksa značajno zavisi od pH. Optimalna pH vrednost za građenje kompleksa je oko 6. U vrlo kiseljoj sredini, kompleks se ne gradi (udeo deprotonovanog oblika flavonoida je zanemarljiv); pri $3 < \text{pH} < 6$, gradi se ljubičasti kompleks; pri $6 < \text{pH} < 8,5$ gradi se plavi kompleks, ali je rastvorljivost Al-soli mala zbog hidrolize; iznad pH 8,5, sistem nije stabilan.

Reakcija se odvija u pogodnom rastvaraču (50–80 % EtOH/MeOH) koji obezbeđuje rastvorljivost svih komponenti, uz konstantnu pH i jonsku jačinu.

Postupak

Pripremljeni su razblaženi rastvori svih ekstrakata (po tri koncentracije u opsegu od tipično 3–15 mg/mL) u u smeši voda-etanol (1:1). U *well*-ove mikroploče odmereno je po 25 μL rastvora ekstrakta, 75 μL etanola, 20 μL 0,2 mol/L rastvora AlCl_3 (u korekcije – ne), 20 μL 0,25 mol/L rastvora Na-acetata i 110 μL destilovane vode (130 μL kod korekcija). Svaki uzorak pripremljen je u triplicatu. Nakon 30 min inkubacije očitana je apsorbanca na 415 nm pomoću Multiskan Spectrum čitača mikroploča (Thermo Corporation). Paralelno sa uzorcima pripremljeni su i analizirani standardni rastvori kvercetina koncentracija 0,765–196 $\mu\text{g/mL}$.

Proračun

Koncentracija ekvivalenata kvercetina u svakom ekstraktu očitana je direktno sa kalibracione krive i preračunata na masu ekstrakta.

4.10. ODREĐIVANJE COX/LOX INHIBITORNOG DELOVANJA

Princip

Metoda se zasniva na *ex vivo* praćenju inhibicije dva enzima uključena u inflamatorne procese – ciklooksigenaze-1 (COX-1) i 12-lipooksigenaze (12-LOX) [242, 243]. Step en inhibicije određuje se LC-MS-MS kvantitacijom proizvoda metabolizma arahidonske kiseline (12-HETE i 12-HHT) u netretiranim i trombocitima tretiranim ispitivanim ekstraktom.

Postupak

2 mL suspenzije $4 \cdot 10^8$ humanih trombocita u puferu (0,137 mol/L NaCl, 2,7 mmol/L KCl, 2,0 mmol/L KH_2PO_4 , 5,0 mmol/L Na_2HPO_4 i 5,0 mmol/L glukoze, pH = 7,2) inkubirano je 5 min na 37 °C, nakon čega je dodato 100 μL rastvora ekstrakta u DMSO (mase ekstrakta tipično 1–8 mg; kod kontrole, korišćen DMSO umesto ekstrakta) i 100 μL 125 $\mu\text{mol/L}$ rastvora kalcimicina u DMSO (kod slepe probe korišćen DMSO) i inkubacija nastavljena tokom 2 min na 37 °C uz mešanje. Nakon dodatka 300 μL 16,7 mmol/L vodenog rastvora CaCl_2 (kod slepe probe – voda), reakciona smeša ponovo je inkubirana tokom 5 min na 37 °C uz mešanje. Reakcija je prekinuta dodatkom 5,8 mL hladne 1 % HCOOH uz intenzivno mućkanje. Nakon dodatka internog standarda (50 μL rastvora 6 $\mu\text{g/mL}$ PGB₂ u DMSO) reakciona smeša je ekstrahovana pomoću 8,0 mL smeše CHCl_3 -MeOH (1:1) uz intenzivno mućkanje tokom 15 min. Organski sloj je nakon centrifugiranja (15 min, 7012 \times g, 4 °C) uparen pod sniženim pritiskom na 40 °C, rekonstituisan u 500 μL MeOH i nakon filtracije analiziran na LC-MS-MS.

Korišćen je Agilent Technologies 1200 Series Rapid Resolution tečni hromatograf sa G6410A QqQ MS-MS detektorom sa elektrosprej (ESI) jonskim izvorom, kontrolisan od strane MassHunter Workstation Data Acquisition softvera, ver. B.01.03 (Agilent Technologies). Injektovano je 5 μL uzorka. Razdvajanje je postignuto na Zorbax SB-C18 30 mm \times 2,1 mm \times 3,5 μm koloni (Agilent Technologies) temperiranoj na 65 °C, ispred koje je bio vezan *in-line* filter (2 mm, 0,2 μm , Agilent Technologies). Kao mobilna faza A korišćena je 0,6 % V/V sirćetna kiselina, a kao faza B – MeOH. Komponente su eluirane u gradijentnom režimu: 0 min 65 % B, 2 min 100 % B, 3,5 min 100 % B, *post time* 3 min (ukupno vreme analize 15 min), uz konstantan protok od 1 mL/min. Celokupna količina eluata prosleđena je u maseni spektrometar. Parametri jonskog izvora bili su: protok gasa za sušenje (N_2) 9 L/min, temperatura 350 °C, pritisak gasa za nebulizaciju 40 psi, napon na kapilari 4 kV, napon fragmentora 120 V, negativan polaritet. Jedinjenja su praćena u MRM modu, sa vremenskim segmentima: 0–0,9 min PGB₂ (jon prekursor $m/z = 333$, kolizijska energija 13 V, jon produkt $m/z = 315$) i 12-HHT (prekursor $m/z = 279$, kolizijska energija 5 V, produkt $m/z = 261$), 0,9–3,5 min 12-HETE (prekursor $m/z = 319$, kolizijska energija 7 V, produkt $m/z = 301$).

Proračun

Za svaku koncentraciju ekstrakta izračunat je step en inhibicije prema formuli:

$$I = 100 \cdot \frac{(R_{kon} - R_{sp}) - (R_{uz} - R_{sp})}{R_{kon} - R_{sp}} = 100 \cdot \frac{R_{kon} - R_{uz}}{R_{kon} - R_{sp}}$$

gde je:

- I – step en inhibicije [%]
- R_{kon} – odnos odgovora (*eng.* response ratio) za kontrolu
- R_{uz} – odnos odgovora za datu koncentraciju
- R_{sp} – odnos odgovora za slepu probu

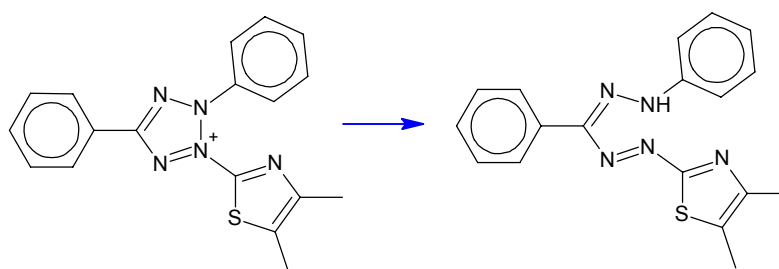
Faktori odgovora određeni su kao odnos površine pika datog analita i površine pika internog standarda (PGB₂).

U OriginPro 8.0724 softveru (OriginLab Corporation) konstruisana je kriva zavisnosti usrednjene inhibicije (I) od radne koncentracije (koncentracije ekstrakta u reakcionoj smeši pre dodatka 1 % HCOOH), i očitana IC_{50} vrednost kao koncentracija koja dovodi do 50 % inhibicije sinteze 12-HETE (za 12-LOX) odn. 12-HHT (za COX-1).

4.11. ODREĐIVANJE CITOTOKSIČNOSTI KOLORIMETRIJSKIM MTT TESTOM

Princip

Metoda se zasniva na činjenici da samo mitohondrije živih ćelija mogu da redukuju 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijum-bromid (MTT) do plavo-crnog formazana (Slika 4.4.) [244–248]. Citotoksičnost se određuje poređenjem broja živih (obojenih) ćelija u netretiranom i sistemu tretiranom ispitivanim ekstraktima.



Slika 4.4. Redukcija MTT do formazana.

Ćelijske linije

Za ispitivanje ćelijskog rasta korišćene su četiri ćelijske linije: humani adenokarcinom dojke pozitivan na estrogenske i progesteronske receptore (MCF-7, ATCC HTB 22), humani adenokarcinom dojke ER– (MDA-MB-231, ATCC HTB 26), humani karcinom grlića materice (HeLaS3, ATCC CCL 2), i normalne ćelije – humani fibroblasti pluća (MRC-5, ATCC CCL 171). U eksperimentima su korišćene ćelije u logaritamskoj fazi rasta između trećeg i desetog presađivanja.

Ćelije su gajene u DMEM (Dulbecco's modified Eagles medium, Sigma-Aldrich, Germany) sa dodatih 100 IJ/mL penicilina i 100 μ g/mL streptomicina (ICN Galenika) u sudovima za kulturu (Costar, 25 cm²) na 37 °C, u atmosferi sa 100 % vlage i 5 % CO₂ (Heraeus). Ćelije su presađivane po postizanju konfluencije od 80–90 %. Disocijacija monosloja je vršena dodavanjem 0,5 % rastvora tripsina, nakon čega su ćelije inkubirane 5 minuta na 37 °C. Enzimska reakcija je zaustavljena dodavanjem odgovarajućeg medijuma, pri čemu komponente seruma vrše inaktivaciju tripsina. Suspenzija je zatim centrifugirana 10 minuta na 1500 o/min, a ćelijski talog resuspendovan u svežem medijumu. Nakon toga su određivani broj ćelija i njihova vijabilnost.

Broj ćelija i njihova vijabilnost određeni su testom odbacivanja boje sa 0,1 % tripan plavim (boja koja ulazi u ćelije sa narušenim integritetom plazmatske membrane i boji ih u plavo). Ćelijska suspenzija (50 μ L) razblažena je sa 200 μ L 0,5 % rastvora tripan plavog i ćelije su odmah brojane u hemocitometru na invertnom mikroskopu. Vijabilnost ćelija korišćenih u eksperimentu bila je veća od 90 %.

Ćelije su sakupljene u logaritamskoj fazi rasta, istaložene centrifugiranjem (10 min, 200 \times g) i izbrojane. Vijabilne ćelije (5 \cdot 10³ ćelija u 90 μ L medijuma) posejane su u kvadrilikatu u mikroploče (12 \times 8) i inkubirane 24 h na 37 C atmosferi sa 5 % CO₂. Nakon toga, u sve *well*-ove (sem kontrolnih) dodato je po 10 μ L razblaženih ekstrakata (do finalne koncentracije od oko 0,01–100 μ g/mL) i inkubacija je nastavljena pod istim uslovima još 48 h. Zatim je u sve *well*-ove dodato po 10 μ L sveže pripremljenog rastvora MTT i inkubacija nastavljena još 3 h. Reakcija je zaustavljena dodatkom po 100 μ L 0,04 mol/L HCl u iPrOH i odmah očitavana apsorbancija na 540 nm (uz 690 nm kao referencu) na čitaču mikroploča Multiskan MCC/340 (Thermo Labsystems).

Proračun

Za svaku koncentraciju ekstrakta izračunata je citotoksičnost prema formuli:

$$CI = 100 \cdot \left[1 - \frac{A_{proba} - A_{slepa}}{A_{kontrola} - A_{slepa}} \right]$$

gde je:

- CI – citotoksičnost (procenat mrtvih ćelija) [%]
- A_{proba} – usrednjena vrednost apsorbancije radnih proba za datu koncentraciju
- A_{slepa} – usrednjena apsorbancija slepe probe (*well*-ovi sa medijumom i MTT, bez ćelija)
- $A_{kontrola}$ – usrednjena vrednost apsorbancije kontrolnih proba

Konstruisana je kriva zavisnosti odgovora (CI) od logaritma radne koncentracije (koncentracije ekstrakta u finalnoj reakcionoj smeši), i očitana IC_{50} vrednost kao koncentracija koja dovodi do smrti 50 % ćelija.

5. Rezultati i diskusija

5.1. GC-MS ANALIZA VOLATILNIH KOMPONENTI

Sastav volatilnih komponenti u ispitivanim vrstama određen je tehnikom kapilarne gasne hromatografije kuplovane sa masenospektrometrijskom detekcijom. Budući da biljni materijal sadrži niz jedinjenja (teško isparljivih ili termolabilnih) nekompatibilnih sa gasnom hromatografijom, neophodno je isparljive analite odvojiti odgovarajućom tehnikom pripreme uzorka. U ovom radu, korišćena je statička *headspace* tehnika, kao i (u slučaju *A. cerefolium* i *A. sylvestris*) hidrodestilacija etarskih ulja.

Kao primarna tehnika za analizu isparljivih jedinjenja u svežem biljnom materijalu odabran je *headspace* GC-MS (HS-GC-MS). Prednosti ove tehnike nad klasičnom (hidrodestilacija etarskog ulja za kojom sledi injektovanje razblaženog rastvora) su:

- budući da samo isparljive komponente uzorka dospevaju u inlet gasnog hromatografa, nije potrebna posebna priprema uzorka sem sitnjenja (što skraćuje vreme pripreme sa nekoliko sati na manje od minuta),
- nema gubitka lako isparljivih jedinjenja (uobičajenog pri uparavanju recipijenta etarskog ulja) niti veoma polarnih (koje pri hidrodestilaciji mogu zaostati u vodi),
- zbog kraćeg izlaganja visokim temperaturama, manja je verovatnoća degradacije termolabilnih komponenti,
- potrebna znatno manja količina uzorka (nekoliko stotina mg, u odnosu na desetine ili stotine grama potrebnih za destilaciju etarskog ulja).

Međutim, tehnika ima i nekoliko nedostataka:

- diskriminacija po isparljivosti (*eng.* volatility discrimination) – udeo teže isparljivih jedinjenja biće po pravilu značajno smanjen, zbog čega se rezultati mogu koristiti samo za međusobno poređenje, ne i za pravu kvantitaciju,
- najčešće su neophodni sveži uzorci,
- ne može se koristiti za analizu biljaka sa veoma niskim sadržajem etarskog ulja (nema mogućnosti prekoncentracije, sem u slučaju kombinacije sa SPME tehnikom), i
- odgovarajući standardi za retencione indekse teže su dostupni.

Za identifikaciju isparljivih komponenti korišćeno je poređenje masenih spektara pikova sa spektrima iz biblioteka. Međutim, vrlo često oni ne omogućavaju definitivnu i jednoznačnu identifikaciju jedinjenja, što je naročito slučaj kod terpena – molekulska premeštanja (često analogna reakcijama koje se javljaju pri biosintezi) i gubici grupa dovode do interkonverzije različitih terpenoida, što rezultuje vrlo sličnim ili identičnim spektrima. Dalje, u velikom broju slučajeva spektri ne pružaju dovoljno informacija za diferenciranje stereoizomera i položajnih izomera [226]. Zbog svega navedenog, identitet jedinjenja dodatno je potvrđen korišćenjem ortogonalne (nezavisne) tehnike – poređenjem Kovats-evih retencionih indeksa (*KI*) sa literaturnim podacima [226]. Kovats indeksi [249, 250] omogućavaju poređenje retencije jedinjenja analiziranih pri različitim uslovima (različite dimenzije kolone, protoci, temperaturni programi), pod uslovom da je stacionarna faza ista. U opštem slučaju, Kovats indeks računa se iz izraza:

$$KI_{(x)} = 100 \cdot \left[n + (N - n) \cdot \frac{f(t_{R(x)}) - f(t_{R(n)})}{f(t_{R(N)}) - f(t_{R(n)})} \right]$$

gde je:

- $t_{R(x)}$ – retenciono vreme analita [min]
- $t_{R(n)}$ – retenciono vreme *n*-alkana koji eluira pre analita [min]
- $t_{R(N)}$ – retenciono vreme *n*-alkana koji eluira posle analita [min]
- n* – broj C-atoma *n*-alkana koji eluira pre analita [min]
- N* – broj C-atoma *n*-alkana koji eluira posle analita [min]
- f* – funkcija kojom se transformišu retenciona vremena; kod izoternskog režima, tipično logaritama korigovanog t_R ; kod temperaturnog programiranja, najčešće se koristi netransformisano t_R .

Kao standard za određivanje *KI* korišćeno je dizel ulje, za koga je analizom utvrđeno da sadrži smešu svih *n*-alkana u opsegu C₈–C₂₈, odn. odgovara Kovats indeksu 800–2800 (hromatogram i kriva dati su u Prilogu 8.3.). U slučaju uzoraka analiziranih *headspace* tehnikom, napon pare ove smeše ugljovodnika bio je prenizak, te nije bilo moguće odrediti Kovats indekse uobičajenim postupkom. Umesto toga, kalibraciona kriva $KI = f(t_R)$ konstruisana je na osnovu retencionih vremena pouzdano identifikovanih komponenti samih uzoraka (Prilog 8.6.), uključujući i detektovane *n*-alkane, i zatim su *KI* interpolirani za nepoznata jedinjenja.

Relativni udeli jedinjenja određeni su metodom normalizacije, na osnovu površine pikova u TIC (*eng.* total ion chromatogram/current). Dok je za dato jedinjenje površina pika srazmerna koncentraciji, faktori proporcionalnosti (*eng.* response factors) različiti su za različita jedinjenja. Zbog toga, udeo površine pika datog jedinjenja u ukupnoj površini (*area%*) predstavlja samo grubo merilo sastava ulja, i nikako se ne može poistovećivati sa masenim, zapreminskim ili količinskim udelom. Međutim, pošto cilj ovog rada nije apsolutna kvantitacija isparljivih komponenti nego njihovo poređenje, koristiće se nekorigovani *area%*, a termini „udeo“ i „sadržaj“ biće korišćeni isključivo u smislu udela u hromatogramu.

5.1.1. HEADSPACE GC-MS ANALIZA

Tehnikom *headspace* uzorkovanja u kombinaciji sa GC-MS bilo je moguće detektovati i identifikovati veliki broj isparljivih jedinjenja u ispitivanim vrstama. Uprkos korišćenju retencionih indeksa, izvesni broj komponenti (naročito seskviterpena) ostao je neidentifikovan. Velika većina jedinjenja pripada četirma klasama:

- terpenoidi: monoterpenski ugljovodnici i seskviterpeni,
- neterpenska oksigenovana alifatična jedinjenja (kratkolančani alkoholi, njihovi estri, i karbonilna jedinjenja), nastala lipidnom peroksidacijom viših masnih kiselina (C₆, C₈) ili Strecker-ovom degradacijom aminokiselina (C₅),
- neterpenska aromatična jedinjenja: jedinjenja fenilpropanoidnog porekla (metoksi- i dimetoksialilbenzeni, fenetil alkohol) i proizvodi Strecker-ove degradacije aromatičnih aminokiselina (fenilacetaldehid) u tragovima, i
- alifatični ugljovodnici: predominantno *n*-alkani, mada su detektovana i jedinjenja nelinearnog skeleta, kao i alkeni.

Rezultati se značajno razlikuju od literaturnih [1, 240], u kvalitativnom i kvantitativnom smislu. Odstupanja se mogu objasniti razlikama u pripremi uzorka (statični, ravnotežni *headspace* nasuprot iscrpnoj hidrodestilaciji), kao i varijacijama usled ekoloških i genetskih faktora.

Anthriscus cerefolium

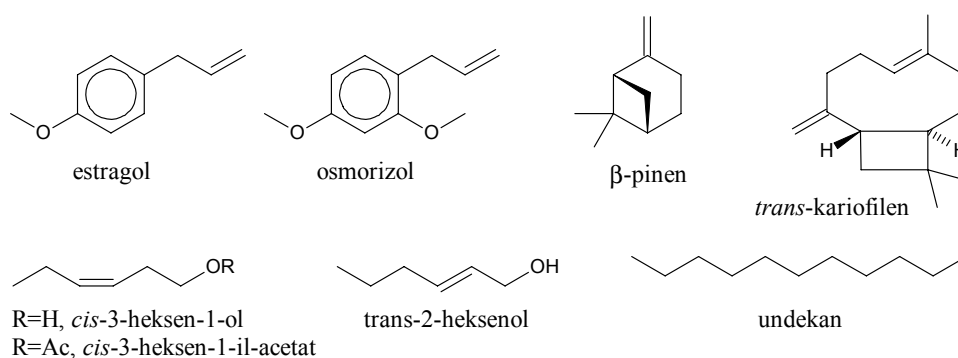
Rezultati kvalitativne i semikvantitativne analize volatilnih komponenti *Anthriscus cerefolium* dati su u Prilogu 8.8., a hromatogrami u Prilogu 8.7. Poredeći različite organe, kao i biljke u različitim stadijumima razvoja (Prilog 8.9.), utvrđene su velike varijacije u kvalitativnom i kvantitativnom sastavu.

Za ovu vrstu karakterističan je relativno jednostavan sastav (identifikovanih 46 jedinjenja čini ≥99 % od ukupne površine pikova, pri čemu 8 jedinjenja prikazanih na Slici 5.1. predstavlja ≥80 %), kao i veoma nizak sadržaj terpenoida, koji ni u jednom uzorku ne prelazi 23 %. Jedini monotermen koji je detektovan u značajnijim količinama je β-pinen (do 17,4 %), dok u zrelim biljkama, dominira seskviterpenoid – trans-β-kariofilen (do 22,7 %). Ova jedinjenja pretežno se koncentrišu u korenu biljke.

Kod nezrelih primeraka, dominantne komponente u svim organima su aromatična jedinjenja poreklom iz šikimat-arogenatnog puta, pretežno estragol (metilhavikol, 1-alil-4-metoksibenzen) i osmorizol (1-alil-2,4-dimetoksibenzen), pri čemu se dimetoksilovani derivati (osmorizol i izomeri) koncentrišu u korenu a monometoksilovani (estragol) u nadzemnim delovima (naročito cvetu i plodu). Ova jedinjenja odgovorna su za karakterističnu aromu *A. cerefolium*.

U svim organima detektovan je niz oksigenovanih alifatičnih jedinjenja, pretežno C₅- i C₆-alkohola, karbonilnih jedinjenja i estara. Najzastupljeniji predstavnici su trans-2-heksen-1-ol i njegov acetat, cis-3-heksen-1-ol (lisni alkohol) i odgovarajući acetat, trans-2-heksenal (lisni aldehid) i 3-metil-2-butenal (senecialdehid). U ispitivanim uzorcima, značajna koncentracija (i do 60 %) detektovana je samo u listovima.

Dominantne isparljive komponente zrelih primeraka, sa udelom i do 100 %, su kratkolančani *n*-alkani sa neparnim brojem ugljenikovih atoma. Ova jedinjenja nađena su u još nekoliko ispitivanih vrsta i nisu uobičajena u biljnom svetu, za razliku od C₂₁–C₃₃ alkana koji su uobičajene komponente kutikularnog voska. Najzastupljenije jedinjenje iz ove grupe je kod *A. cerefolium* undekan.



Slika 5.1. Strukture dominantnih volatilnih komponenti vrste *A. cerefolium*.

Anthriscus sylvestris

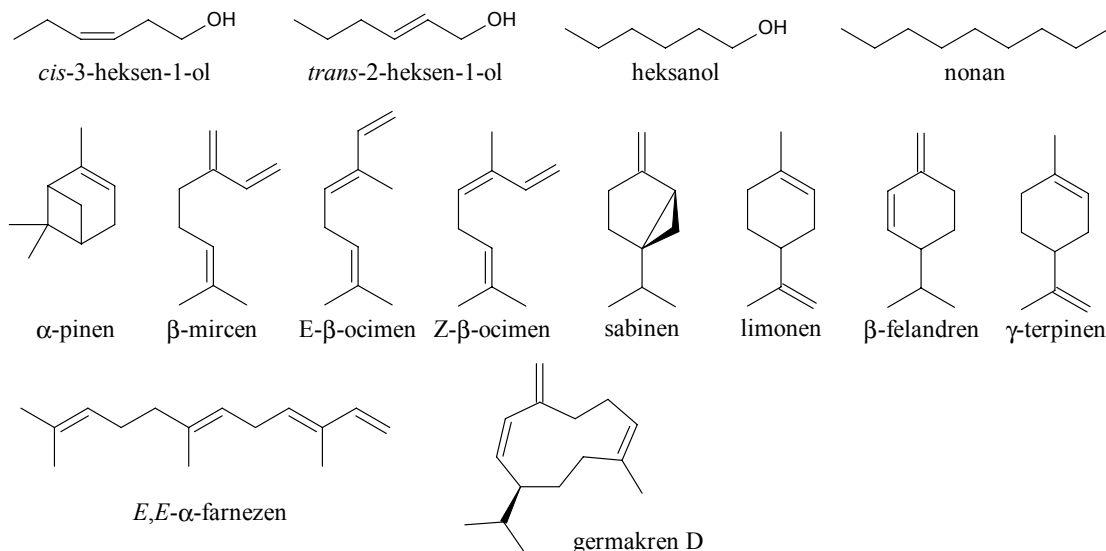
Headspace GC-MS hromatogrami pripadnika vrste *A. sylvestris* znatno su kompleksniji od odgovarajućih hromatograma *A. cerefolium* (Prilog 8.7). Detektovano je blizu 80 jedinjenja, od čega je identifikovano oko 50 (Prilog 8.8.). Za razliku od prethodne vrste, volatilna frakcija *A. sylvestris* bogata je terpenoidnim jedinjenjima (utvrđeno prisustvo najmanje 35 jedinjenja, od čega 10 sa udelom preko 10 %), dok fenilpropeni nisu detektovani. Odsustvo fenilpropanoide Bos i sar. [21] objasnili su njihovim preusmeravanjem u puteve biosinteze lignana. U većini tkiva prisutni su neterpensi alifatični ugljovodonici (pretežno *n*-alkani) sa 7–13 atoma ugljenika, pri čemu je najzastupljeniji *n*-nonan (i do 67,8 %). Utvrđene su značajne promene u sastavu u zavisnosti od ispitivanog dela biljke i faze razvoja (Prilog 8.9.), kao i intrapopulacijske varijacije. Generalno, može se reći da podzemne i prizemne delove karakteriše visok sadržaj alkanâ i nizak udeo seskviterpena, dok obrnuto važi za list, cvast i plod.

U korenu i donjem delu stabla dominiraju monoterpeni i *n*-alkani, čineći 99,4–100 % od ukupne površine pikova. Čini se da relativni odnos ove dve klase jedinjenja zavisi od faze razvoja, mada zbog velikih varijacija unutar populacije nije moguće doneti konačne zaključke. Kod zrelijih primeraka, sadržaj alkana je zanemarljiv. Od monoterpena, najzastupljeniji su β-mircen (26,4–47,1 % kod skoro zrelih primeraka, do 2 % kod mlađih), sabinen (9,1–28,7 %), limonen (prisutan u značajnim količinama u dva uzorka), *E*- i *Z*-β-ocimen, α-pinen i β-felandren (Slika 5.2.). Sadržaj seskviterpena u volatilnoj frakciji je nizak, ispod 3 %. U gornjem delu stabla su, pored navedenih jedinjenja, prisutna oksigenovana C₆-alifatična jedinjenja heksanol i cis-3-heksen-1-ol (sa udelom do 12,4 %), kao i do 10,7 % seskviterpenâ.

Oksigenovana alifatična jedinjenja prisutna su u značajnom udelu samo u listu, gde dostižu i do 53,3 %. Najzastupljenija jedinjenja iz ove grupe su C₆-alkoholi: trans-2-heksen-1-ol (do 21,7 %), cis-3-heksen-1-ol (do 19,9 %) i heksanol (do 17,2 %), uz manje količine njihovih estara,

aldehida, i C₅-aldehida i alkohola. Prilikom sazrevanja, sadržaj ovih jedinjenja i alkana u listu opada, dok udeo seskviterpena raste i dostiže 61,5 %. Za razliku od korena i stabla, kod kojih seskviterpensku frakciju čini niz jedinjenja niskog udela, u listu dominiraju dva jedinjenja: *E,E*- α -farnezen (do 30,4 %) i germakren D (do 23,3 %).

Cvet i plod karakterišu visok sadržaj monoterpenih ugljovodonika (i do 94,2 %), koji u toku razvoja značajno opada uz istovremeni porast udela seskviterpena – *E,E*- α -farnezena i germakrena D.



Slika 5.2. Strukture dominantnih volatilnih komponenti vrste *A. sylvestris*

Chaerophyllum temulentum

U vrsti *Ch. temulentum* detektovano je preko 70 jedinjenja, od čega je identifikovano oko 50 (Prilozi 8.7. i 8.8.). Zapaža se nehomogena raspodela različitih klasa jedinjenja po delovima biljke, znatno izraženija nego kod prethodne dve vrste. Sadržaj terpenoida je znatno viši nego u ispitivanim vrstama roda *Anthriscus*, i u pojedinim primercima prelazi 98 % od ukupnih isparljivih jedinjenja. Seskviterpeni su dominantni u listovima i plodovima, a monoterpeni (pretežno ugljovodonici) u ostalim delovima biljke. Fenolna jedinjenja nisu detektovana. Od *n*-alkana, identifikovani su oktan, undekan i pentadekan, pri čemu je samo undekan prisutan u značajnijim količinama (do 35,0 %).

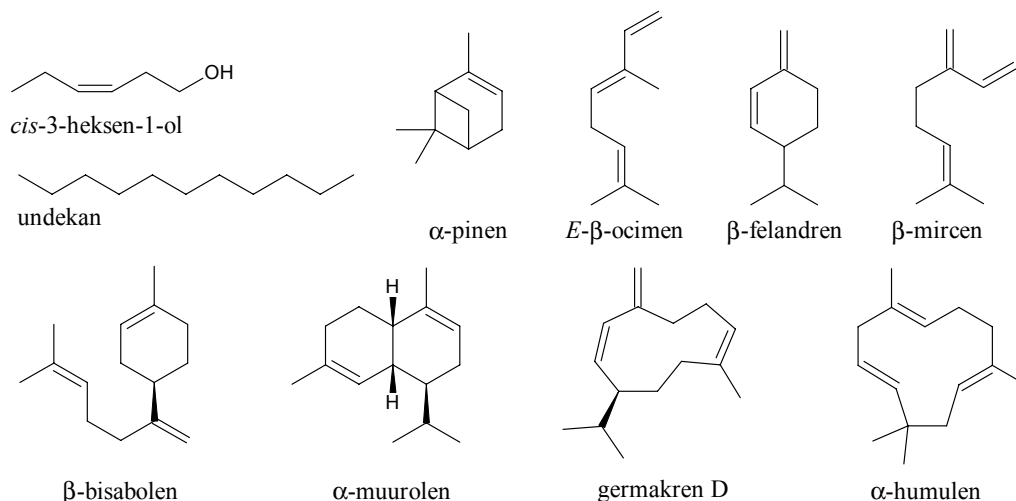
Kod korena, sadržaj monoterpena iznosi 67,3–91,6 %, i opada tokom sazrevanja biljke (Prilog 8.9.). Najzastupljenija jedinjenja iz ove klase su α -pinen (43,4–78,3 %), β -felandren (do 29,8 %), limonen (do 9,0 %) i α -terpinolen (do 7,4 %), Slika 5.3. Sadržaj seskviterpena, s druge strane, postepeno raste i dostiže 11,1 %, pri čemu sadržaj nijednog pojedinačnog jedinjenja ne prelazi 5 %. Sadržaj jedinog *n*-alkana detektovanog u korenu – undekana – u toku sazrevanja višestruko se povećava i kod primeraka bez cveta, sa nezrelim plodovima, dostiže 18,5 %. Oksigenovana alifatična jedinjenja (aldehidi, ketoni i estri sa C₆–C₈) prisutna su samo malim količinama.

U stabljici su najzastupljeniji monoterpeni (29,9–71,7 %), praćeni seskviterpenima (5,1–55,3 %) i alkanima (12,8–35,0 %). Za razliku od korena, dominantni monoterpen u stabljici je β -mircen (9,4–67,7 %), dok su udeli α -pinena i β -felandrena niži (do 25,3 %, i do 16,8 %, respektivno). Najzastupljeniji seskviterpeni su izomer farnezena (prema Kovats indeksima, verovatno *Z*- β -farnezen), β -bisabolen i seskviterpen čiji identitet nije potvrđen (mada je pretpostavljeno da je u pitanju α -muurolen). Od alkana, u značajnijim količinama prisutan je samo undekan.

Promena hemijskog sastava u toku razvoja najizrazitija je kod listova. Kod mladih primeraka, u fazi cvetanja, najzastupljenije komponente su seskviterpeni (83,2–98,3 %), od kojih se ističu germakren D, α -humulen i *trans*-kariofilen. Kod primeraka sa razvijenijim (mada, još uvek nezrelim) plodovima, sadržaj seskviterpena brzo opada do 8,3 %, uz nagli porast udela oksigenovanih alifatičnih jedinjenja do 91,7 %. Detektovana alifatična jedinjenja pretežno obuhvataju C₆-aldehide, alkohole i estre, pri čemu je najznačajniji *cis*-3-heksen-1-ol (lisni alkohol).

Dok su kod cveta uočene izvesne varijacije u sastavu, nije bilo moguće definisati nikakve trendove. U hromatogramu dominiraju monoterpeni, sa udelom 32,6–79,9 %, pri čemu su najzastupljeniji *E*-β-ocimen (21,5–55,2 %) i β-pinen (do 16,8 %). Seskviterpeni (pretežno neidentifikovani izomer farnezena, germakren D i α-humulena) čine 18,2–54,4 %. Sadržaj neterpenskih jedinjenja je nizak.

Na kraju, plod karakteriše visok sadržaj seskviterpena (62,0–91,8 %), uz nešto monoterpena i neterpenskih oksigenovanih alifatičnih jedinjenja. Od seskviterpena najzastupljeniji je β-bisabolen (do 80,0 %), praćen kurkumenom (ar- ili γ-izomer), β-kubebenom, α-kopaenom i α-muurolenom, a on monoterpena – β-pinen i *E*-β-ocimen. Prisutna alifatična neterpenska jedinjenja obuhvataju C₅-, C₆- i C₈-alkohole, karbonilna jedinjenja i estre.

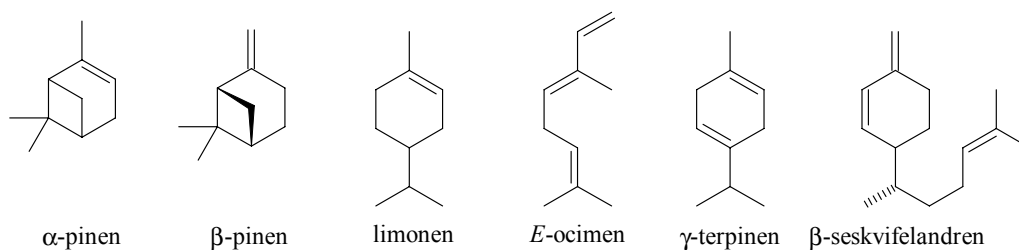


Slika 5.3. Strukture dominantnih volatilnih komponenti vrste *Ch. temulentum*.

Chaerophyllum bulbosum

Za razliku od *Ch. temulentum*, *Ch. bulbosum* karakteriše odsustvo *n*-alkana, kao i veoma nizak sadržaj seskviterpenoida i oksigenovanih alifatičnih jedinjenja (Prilozi 8.7. i 8.8.).

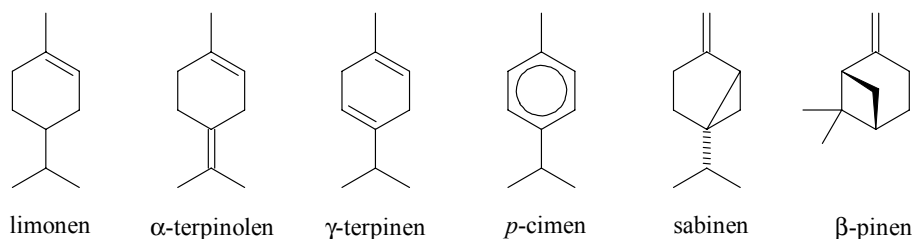
Dominantne komponente u hromatogramu *Ch. bulbosum*, sa udelom 80–100 %, su monoterpeni ugljovodonici (Slika 5.4.). Najzastupljeniji je aciklični monoterpen *E*-β-ocimen, koji u listovima premašuje 90 % od ukupne površine pikova. Pored njega, značajan udeo imaju i α-pinen (do 15,3 %), β-pinen (do 12,7 %), limonen (do 16,4 %) i γ-terpinolen (do 13,2 %), naročito u korenu. Kod većine uzoraka, detektovane su minorne količine seskviterpenskih jedinjenja (što može značiti da je njihov sadržaj u biljci nizak, ili im je isparljivost slaba); jedini značajni su β-seskvifelandren, neidentifikovani seskviterpen (sa masenim spektrom veoma sličnim farnezenu, ali mnogo nižom vrednošću KI) i farnezen (prema KI, verovatno *Z*-β-izomer).



Slika 5.4. Strukture dominantnih volatilnih komponenti vrste *Ch. bulbosum*.

Chaerophyllum hirsutum

Slično vrsti *Ch. bulbosum*, i *Ch. hirsutum* karakteriše visok sadržaj monoterpenaskih ugljovodonika od preko 90 % (Prilozi 8.7. i 8.8.). Strukture najzastupljenijih jedinjenja date su na Slici 5.5.. Uočene su velike varijacije u relativnom udelu pojedinačnih jedinjenja (u nekim slučajevima, od <1 % do >80 %), čak i kod pripadnika iste populacije. Kod jednog primerka, dominantni monoterpeni bili su limonen (18,4–46,8 %), α -terpinolen (do 35,8 %), γ -terpinen (do 31,8 %) i *o*-*p*-cimen (do 20,8 %), dok su kod drugog to sabinen (40,8–82,6 %), β -pinen (do 22,4 %) i γ -terpinen (do 13,8 %). Sadržaj seskviterpena je nizak, do 6,4 %, pri čemu je najzastupljeniji germakren D. Oksigenovana alifatična jedinjenja (sa 4 ugljenikova atoma) i *n*-alkani prisutni su samo u tragovima.



Slika 5.5. Strukture dominantnih volatilnih komponenti vrste *Ch. hirsutum*.

Scandix pecten-veneris

Headspace GC-MS hromatogrami vrste *Scandix pecten-veneris* veoma su jednostavni, sa jednim do dva intenzivna pika (Prilozi 8.7. i 8.8.). Dominantne komponente su alifatični ugljovodonici, sa udelom 78–100 %, pri čemu dominira tridekan uz manje količine pentadekana (za razliku od *A. cerefolium* i *Ch. temulentum*, kod kojih je najzastupljeniji undekan, i *A. sylvestris*, sa predominantnim nonanom). Jedini terpenoid koga je bilo moguće detektovati je *trans*-kariofilen, prisutan u manjim količinama (7 %) u listu. Oksigenovana alifatična jedinjenja slabo su zastupljena, i ukupan udeo ne prelazi 6,8 %. Interesantno je prisustvo relativno velikih količina dimetil-sulfida u listu i plodu (do 8,1 %).

Analiza glavnih komponenti

Rezultati kvalitativne i semikvantitativne HS-GC-MS analize predstavljaju matricu od 201 uzorka \times 142 varijable odn. jedinjenja (ukupno 28 542 tačke). U cilju redukcije matrice i ekstrahovanja relevantnih informacija, tj. identifikacije jedinjenja bitnih za diferenciranje između vrsta (hemotaksonomskih markera), primenjene su tehnike multivarijatne analize (*eng.* multivariate analysis, MVA), tačnije analiza glavnih komponenti (*eng.* principal components analysis, PCA). PCA je matematička procedura kojom se redukuje dimenzionalnost matrice, uz istovremenu dekorelaciju, na takav način da struktura podataka (klasteri) ostane nepromenjena.

Za PCA rezultata *headspace* GC-MS analize korišćeni su sirovi, netransformisani podaci (*area%*) iz dva razloga:

1. podaci su već normalizovani na 100 %, i
2. nesigurnost određivanja površine pika značajno raste sa smanjenjem površine; u slučaju skaliranja svake varijable posebno na neki maksimalan opseg (npr. 0–100 %), slučajne varijacije bi u PCA modelu bile pogrešno protumačene kao nosioci informacija i bio bi im dat značajan udeo u glavnim komponentama.

Matrica volatoma korena obuhvatala je 37 uzoraka i 71 pik, odn. 2627 tačaka. Biplot-ovi po PC1 i PC2 odn. PC3, grafici opterećenja (*eng.* loading plots) na prve tri glavne komponente, *scree* plot, vrednosti varijansi, skorova i opterećenja dati su u Prilogu 8.10. Uočava se da *Anthriscus cerefolium*, *Anthriscus sylvestris*, *Chaerophyllum temulentum* i *Chaerophyllum bulbosum* grade dobro definisane klastere (Slika 5.6.), dok se za preostale tri vrste to za sada ne može tvrditi zbog malog broja tačaka odn. uzoraka.

PC1, koja objašnjava 41,0 % ukupne varijanse, diferencira *A. cerefolium* (sa negativnim skorovima) od ostalih vrsta (pozitivni skorovi). *A. cerefolium* karakteriše visoka koncentracija fenilpropanoida, odsutnih u ostalim vrstama, kao i nizak sadržaj terpenoida. Najznačajnija opterećenja (*eng.* loadings) na PC1 odražavaju ovaj odnos: -0,793 za osmorizol i -0,232 za estragol, nasuprot 0,497 za α -pinen, 0,120 za *n*-nonan, 0,103 za *E*- β -ocimen, 0,100 za β -felandren, 0,095 za limonen i 0,090 za sabinen. Sledi da se osmorizol i estragol mogu smatrati markerima za ovu vrstu. Visoka varijabilnost unutar klastera *A. cerefolium* može se objasniti velikim promenama u sastavu u toku sazrevanja, odn. rapidnim porastom udela *n*-undekana.

PC2 (18,5 % varijanse) diferencira *Chaerophyllum temulentum* od ostalih vrsta. Najznačajnija opterećenja su: -0,741 (α -pinen), -0,301 (osmorizol), 0,344 (*E*- β -ocimen) i 0,335 (nonan). Visokonegativne vrednosti skorova uzoraka *Ch. temulentum* na PC2 potiče od visokog sadržaja α -pinena u ovoj vrsti, koji u korenu dostiže 43,3–78,3 %, dok u ostalim vrstama ne prelazi 17,8 %. Treba pomenuti da i PC1 u izvesnoj meri diferencira ovu vrstu, koju zahvaljujući visokoj vrednosti opterećenja za α -pinen karakterišu pozitivnije vrednosti skorova na PC1 od ostalih vrsta.

PC3 (9,8 % varijanse) karakterišu visokonegativni skorovi uzoraka *Ch. bulbosum*, vrednosti bliske nuli za *A. cerefolium*, *Ch. temulentum*, *Ch. hirsutum* i *S. pecten-veneris*, i pozitivne vrednosti za *A. sylvestris*. Najznačajnija opterećenja na PC3 su: -0,792 (*E*- β -ocimen), 0,487 (nonan), 0,254 (sabinen) i 0,175 (limonen). Ovo ukazuje na *E*- β -ocimen kao karakteristični konstituent *Ch. bulbosum*, sa udelom 45,3–98,7 % (u ostalim vrstama tipično prisutan sa udelom ≤ 3 %, u *A. sylvestris* do 19,4 %). Zbog velikih varijacija u udelu, značaj jedinjenja visokog pozitivnog opterećenja – *n*-nonana, sabinena i limonena – kao potencijalnih hemotaksonomskih markera za *A. sylvestris* je ograničen. Međutim, u modelu dobijenom postupkom izbora varijabli (*eng.* feature selection) tj. uklanjanjem visokokorelisanih i varijabli sa malim opterećenjem na prve tri glavne komponente, koji je koristio samo udele *E*- β -ocimena, α -pinena, osmorizola i sabinena, uzorci *A. sylvestris* jesu gradili kompaktni klaster (Prilog 8.10.), jasno izdiferenciran od klastera *A. cerefolium*, *Ch. temulentum* i *Ch. bulbosum*, što ukazuje na mogućnost korišćenja sabinena kao markera.

Glavne komponente višeg reda uglavnom odražavaju varijacije unutar vrsta, te nisu uzimane u dalje razmatranje. Treba pomenuti PC7, koju karakteriše visokonegativni skor *S. pecten-veneris*, usled visokog sadržaja *n*-tridekana (opterećenje -0,453) i *n*-pentadekana (-0,276), jedinjenja čiji je udeo u drugim vrstama ispod 3 %, dok u ovoj vrsti dostiže 63,4 % odn. 37,6 %, respektivno.

Što se tiče uzoraka lista, početna matrica obuhvatala je 43 uzorka i 73 varijable, tj. 3139 tačaka. Biplot-ovi po PC1 i PC2 odn. PC3, grafici opterećenja (*eng.* loading plots) na prve tri glavne komponente, *scree* plot, vrednosti varijansi, skorova i opterećenja dati su u Prilogu 8.10. I ovde PC1, koja objašnjava 35,3 % varijanse, diferencira *A. cerefolium* (uglavnom pozitivne vrednosti) od *Ch. bulbosum* (izrazito negativne vrednosti) i ostalih vrsta (umereno negativni skorovi), mada je klaster znatno difuzniji i delimično preklapljen sa *A. sylvestris*. Najznačajnije varijable su udeli estragola (opterećenje 0,889), *E*- β -ocimena (-0,369), sabinena (-0,145), germakrena D (-0,124) i *cis*-3-heksenola (-0,120).

PC2 (20,8 %), sa visokom pozitivnom vrednošću opterećenja za *E*- β -ocimen od 0,874, umereno pozitivnom za estragol (0,257) i negativnim za *cis*-3-heksenol, sabinen i germakren D (-0,291, -0,178 i -0,172, respektivno) diferencira *Ch. bulbosum* (visoko pozitivni skorovi), *A. cerefolium* (uglavnom umereno pozitivni skorovi) i ostale vrste (negativne vrednosti).

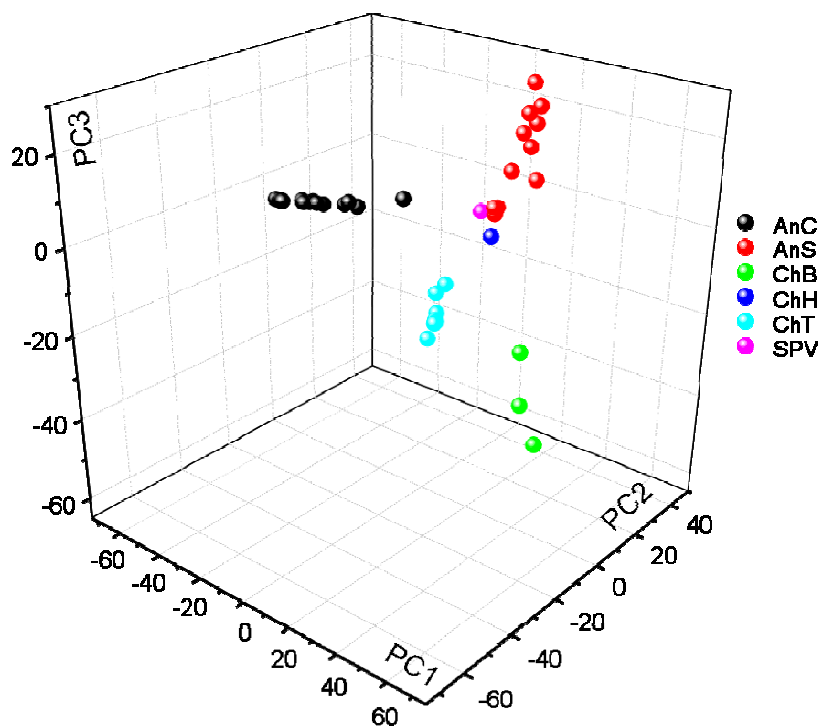
PC3 (10,6 %) u izvesnoj meri diferencira *Ch. temulentum* (mada, samo zrelije primerke) od ostalih vrsta, na bazi visokog udela cis-3-heksenola (preko 50 %). Mlađe primerke karakteriše visok udeo germakrena D, što je odraženo u PC4.

Generalno, može se reći da su hemotaksonomski karakteri u listu mnogo slabije izraženi nego u korenu. Izuzeci su *E*- β -ocimen za *Ch. bulbosum* i donekle estragol za *A. cerefolium* germakren D i *cis-3-heksenol* za *Ch. temulentum*).

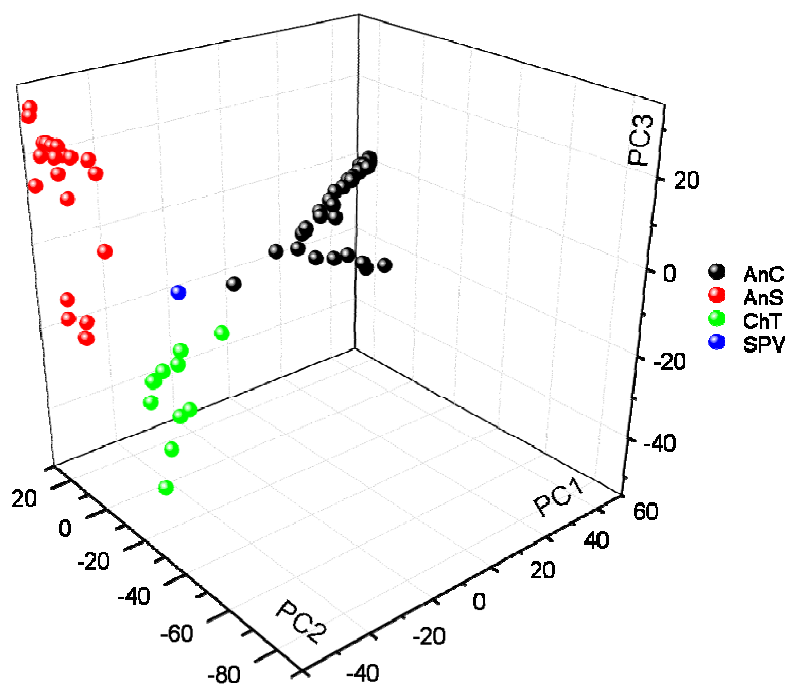
I kod uzoraka stabljike učeni su za ispitivane vrste (*A. sylvestris*, *A. cerefolium* i *Ch. temulentum*, *S. pecten-veneris*) dobro definisani klasteri (Slika 5.7., Prilog 8.10.). PC1 (41,2 % varijanse) diferencira nezrele primerke *A. cerefolium*, koji sadrže aromate (estragol, sa opterećenjem 0,887, i osmorizol, 0,148), od ostalih vrsta, bogatih pretežno terpenoidima (sabinen, -0,326, β -mircen, -0,188) i, u slučaju *A. sylvestris*, *n*-nonanom (opterećenje -0,187). PC2 u velikoj meri odražava varijabilnost unutar vrste *A. cerefolium* (estragol, prisutan u nezreloj biljci, sa opterećenjem 0,218, nasuprot n-undekanu iz zrelih primeraka, sa opterećenjem -0,878), ali takođe diferencira *A. sylvestris* (pozitivni skorovi, karakterističan visok sadržaj sabinena i n-nonana, sa opterećenjima 0,360 i 0,193) od *Ch. temulentum* i *S. pecten-veneris* (skorovi bliski nuli). Uzorak *S. pecten-veneris* karakteriše visok sadržaj n-tridekana, što se odražava visokom vrednošću opterećenja (-0,835) na PC6 osi, odn. visokonegativnim skorovima.

PCA analizom volatilnih komponenti cveta vrsta *A. sylvestris*, *A. cerefolium*, *Ch. temulentum* i *Ch. bulbosum* dobijeni su dobro definisani klasteri (Prilog 8.10.). 92,1 % od ukupne varijanse bilo je moguće objasniti pomoću prve dve glavne komponente. Uzorci *A. cerefolium* grade kompaktan klaster koga karakteriše visok sadržaj estragola, što odražava i visoko opterećenje na PC1 od 0,909. Preostale tri vrste razlikuju se po odnosu *E*- β -ocimena (opterećenje na PC2 -0,594) i sabinena (0,733). Uzorci *A. sylvestris*, bogati sabinenom, imaju pozitivne skorove na PC2, *Ch. temulentum* (koji sadrži 21-55 % *E*- β -ocimena) negativne, a *Ch. bulbosum* (94 %) jako negativne.

Sumarno, može se reći da vrstu *A. cerefolium* karakteriše visok nivo aromata (osmorizola i/ili estragola, u zavisnosti od dela biljke) ili, kod zrelih primeraka, n-undekana. Veoma visok sadržaj E- β -ocimena karakterističan je za *Ch. bulbosum* (mada i u nadzemnim delovima *Ch. temulentum* i cvetu i plodu *A. sylvestris* može dostići značajan udeo), a n-tridekan i n-pentadekan za *S. pecten-veneris*. Sabinen bi se u izvesnoj meri mogao smatrati karakterističnim za *A. sylvestris*, mada je sadržaj u plodu relativno nizak, dok su visoke koncentracije detektovane i u nekim primercima *Ch. hirsutum*. Slično važi i za n-nonan, koji je prisutan u vegetativnim delovima mlađih biljaka. Može se reći da, dok su vrste dobro izdiferencirane kada se posmatra jedan organ, nije uvek moguće definisati jedno ili više volatilnih jedinjenja koja predstavljaju specifične markere za datu vrstu. Naravno, ne sme se izgubiti iz vida ni činjenica da je u okviru ovog rada analiziran mali broj uzoraka (naročito kod vrsta *Ch. hirsutum*, *Ch. bulbosum* i *S. pecten-veneris*), sa ograničenog broja lokaliteta, i stoga veliki deo varijacija usled genetskih i ekoloških faktora nije uračunat.



Slika 5.6. Grafik skorova uzoraka korena na prve tri glavne komponente.



Slika 5.7. Grafik skorova uzoraka stabla na prve tri glavne komponente.

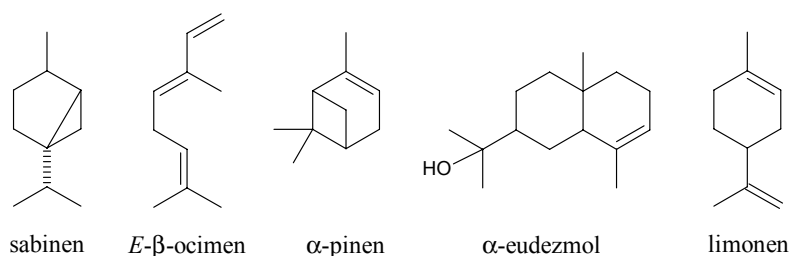
5.1.2. ANALIZA ETARSKIH ULJA

Anthriscus cerefolium

U etarskim uljima vrste *A. cerefolium* potpuno je identifikovano ukupno 20 jedinjenja koja čine ukupno 94,9–100 % (Prilozi 8.4. i 8.5.). Karakteriše ih veoma jednostavan sastav, naročito kod zrelijih primeraka, sa samo nekoliko komponenti čiji udeo prelazi 1 % (9 u slučaju AnC-EO01 i 3 kod ostalih). Za razliku od većine uobičajenih etarskih ulja, dominantne komponente su fenilpropanoidi, tačnije metoksilovani fenilpropeni – estragol i osmorizol, koji zajedno čine 74,0–97,6 %. Jedinjenja iz ove grupe detektovana su u nizu vrsta familije Apiaceae, uključujući anetol (u *Pimpinella anisum*), 3,4-dimetoksialilbenzen (*Daucus carota*), miristicin (*Apium graveolens*, *Anethum graveolens*, *Petroselinum crispum*, *Pastinaca sativa*, *Daucus carota*), krokaton (*Oenanthe*, *Laserpitium*) itd. [36]. Detektovan je i velik broj alifatičnih ugljenika, pretežno *n*-alkana, od kojih je najzastupljeniji *n*-undekan, sa udelom 2,4–9,7 %. Svi identifikovani ugljovodonici imaju neparan broj ugljenikovih atoma, i mogu se podeliti na jedinjenja kratkog lanca (9–13 ugljenikovih atoma) i dugog lanca (21–29 C-atoma, najverovatnije komponente voska). Sadržaj terpenoida je nizak, ispod 7 %.

Anthriscus sylvestris

U uljima *A. sylvestris* identifikovana su 24 jedinjenja sa ukupnim udelom 88,4–93,4 %. Hromatogrami su složeniji nego kod *A. cerefolium* (Prilozi 8.4. i 8.5.), sa većim brojem komponenta značajnog udela. Dok je i u ovoj vrsti uočen visok sadržaj *n*-alkana, sa *n*-nonanom kao najznačajnijim (12,9–27,4 %), dominantne komponente su terpenoidi, sa ukupnim udelom do 78,3 % (Slika 5.8.). Profil terpenoida značajno je varirao između dva ulja, sa sabinenom dominantnim u AnS-E06 (20,9 %) a limonenom i *E*-β-ocimenom (28,3 % i 11,3 %) u AnS-E08, dok je odnos mono- i seskviterpena u oba ulja bio približno 2:1. Neterpenska oksigenovana alifatična jedinjenja, brojna u *headspace* hromatogramima, u uljima nisu detektovana, verovatno usled gubitka pri uparavanju.

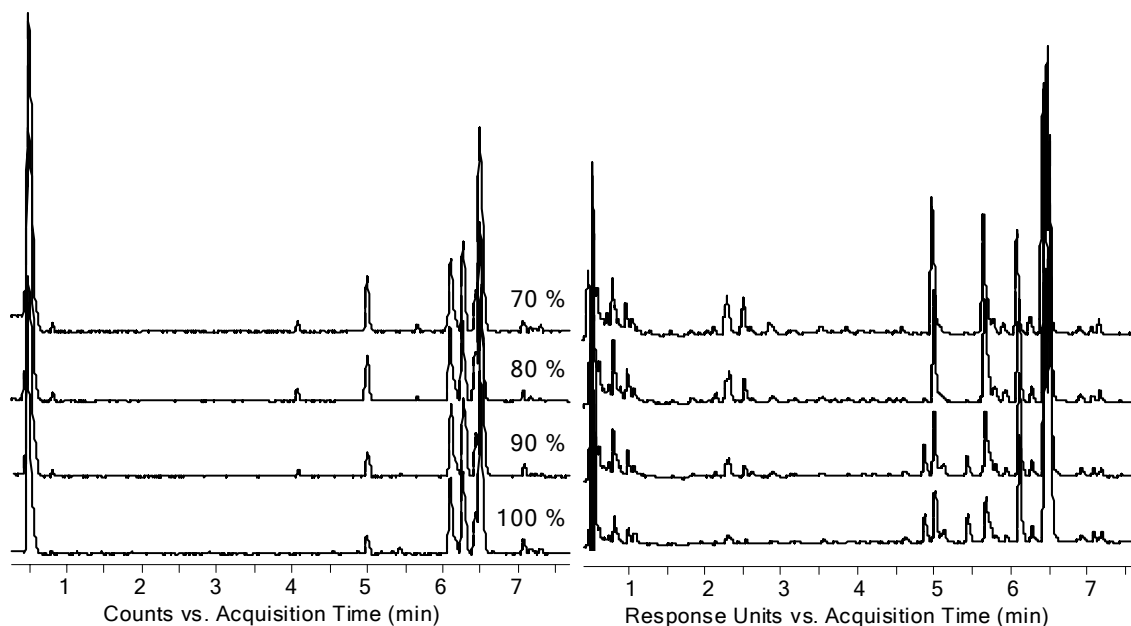


Slika 5.8. Strukture dominantnih terpenoida u etarskim uljima vrste *A. sylvestris*.

5.2. KVALITATIVNA LC-DAD-MSⁿ ANALIZA EKSTRAKATA

Ekstrakcija

U literaturi se pominje niz rastvarača koji mogu doći u obzir pri ekstrakciji biljnog materijala – voda, MeOH, EtOH, etil-acetat, DMSO, aceton, hloroform, metilen-hlorid itd. Pošto biljni materijal tipično sadrži jedinjenja vrlo različite polarnosti i kiselobaznih karakteristika, nijedan pojedinačni ekstragens nije sposoban da ekstrahuje sva jedinjenja od interesa, zbog čega se u nekim slučajevima pribegava sekvencijalnoj ekstrakciji nizom rastvarača različitih karakteristika [251]. U cilju jednostavnosti, u okviru istraživanja obuhvaćenih ovom tezom odabrana je ekstrakcija smešom voda-MeOH. Optimalan sastav ekstragensa eksperimentalno je određen. Po 1 g korena uzorka AnS05 ekstrahovano je tokom 24 h na sobnoj temperaturi, uz konstantno mešanje (150 min^{-1}), sa po 10 mL smeše voda-MeOH (70 %, 80 %, 90 % i 100 % MeOH). Ekstrakti su nakon ceđenja i ispiranja filtracione pogače upareni na oko $40 \text{ }^\circ\text{C}$, rekonstituisani u DMSO (finalna zapremina 10 mL) i analizirani na LC-DAD-ESI(+)-MS. I UV i maseni hromatogrami (Slika 5.9.) pokazuju da prinos lignana ne zavisi značajno od sadržaja MeOH (pikovi u intervalu 6–7,5 min) ili je najveći u slučaju 70 % MeOH (pikovi u opsegu 5–6 min); prinos ostalih fenolnih jedinjenja (pikovi u opsegu 0,5–3 min u DAD hromatogramu) takođe je najveći pri 70 % MeOH, zbog čega je ovaj ekstragens odabran za sve naredne eksperimente.



Slika 5.9. BPC (levo) i DAD (desno) hromatogrami ekstrakata korena *A. sylvestris* dobijenih korišćenjem različitih ekstragenasa (70–100 % MeOH).

U cilju sprečavanja eventualne degradacije manje stabilnih jedinjenja, biljni materijal sušen je na sobnoj temperaturi, mleven u suvom stanju, a svi ekstrakti upareni su na relativno niskoj temperaturi od $40 \text{ }^\circ\text{C}$. Treba napomenuti da se već i pri ovim uslovima može očekivati transformacija nekih klasa jedinjenja, kao što su malonatni estri flavonoida (tipično se raspadaju pri $>35 \text{ }^\circ\text{C}$) i fenolnih kiselina [252]. Dok su enzimske transformacije moguće u fazi sušenja materijala, u toku ekstrakcije enzimi su deaktivirani zahvaljujući prisustvu alkohola [253].

Zbog širokog raspona polarnosti komponenata (od veoma polarnih šećera do lipidnih jedinjenja), rastvorljivost ekstrakata se pokazala ograničenom. Preliminarna ispitivanja pokazala su ograničenu rastvorljivost u MeOH, EtOH, *i*PrOH, vodi, smešama EtOH-voda, acetonu, heksanu, smeši heksan-aceton i metilen-hloridu, i zadovoljavajuću rastvorljivost u DMSO (u mnogim slučajevima, postignuto je potpuno rastvaranje i pri koncentracijama od 200 mg/mL). Budući da je zbog male toksičnosti pogodan za biološke testove, zbog male isparljivosti praktičan je za čuvanje,

a kompatibilan je i sa RP HPLC mobilnom fazom, DMSO je odabran kao rastvarač u kome su svi ekstrakti rekonstituisani.

Pošto primena niza vrsta tribusa *Scandiceae* u ishrani i tradicionalnoj medicini obuhvata kuvanje sa vodom, paralelno sa 70 % MeOH ekstraktima pripremljeni su i vodeni dekolti, a sa ciljem utvrđivanja eventualnih razlika u sastavu.

LC-MS analiza

Za kvalitativnu analizu ekstrakata korišćena je reverznofazna tečna hromatografija kuplovana sa UV/VIS i tandemskom masenom spektrometrijom. Zahvaljujući kombinovanju tri ortogonalna pristupa, RP LC-DAD-MS je u poslednje vreme postala primarna tehnika za skrining, identifikaciju i kvantitaciju sekundarnih biomolekula. Za razliku od gasne hromatografije, LC najčešće ne zahteva detaljno prečišćavanje uzorka niti derivatizaciju analitâ. Razvoj savremenih kolona sa česticama dimenzija $<2 \mu\text{m}$ (tipično $1,8 \mu\text{m}$) omogućio je postizanje zadovoljavajućeg (ili, često, znatno boljeg) razdvajanja velikog broja komponenti uzorka za značajno kraće vreme od klasične tečne hromatografije visokih performansi (HPLC) [254]. Ovakva tehnika često se naziva UPLC (*eng.* ultra performance liquid chromatography) ili RR LC (*eng.* rapid resolution liquid chromatography).

Kao mobilna faza korišćena za sva ispitivanja korišćena je binarna faza, sastavljena od 0,05 % vodenog rastvora HCOOH sa dodatkom $200 \mu\text{g/mL}$ $\text{CH}_3\text{COONH}_4$, i MeOH kao organskog modifikatora. Dodatak kiseline potiskuje jonizaciju fenolnih i karboksilnih grupa, čime se poboljšava simetrija (smanjuje *tail-ovanje*) pikova. Takođe, u PI, kiselina obezbeđuje protone neophodne za građenje željenih $[\text{M}+\text{H}]^+$ adukta. Korišćena je HCOOH, jer alternativna ESI-kompatibilna kiselina (CH_3COOH) nepovoljno utiče na hromatografiju, u smislu skraćivanja retencionih vremena [255]. Koncentracija kiseline odabrana je tako da daje zadovoljavajuću osetljivost u PI, i ne dovodi do značajne supresije u NI. $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ dodat je u cilju dodatnog sprečavanja građenja adukta sa Na^+ i K^+ , koji se teško fragmentišu, za razliku od $[\text{M}+\text{H}]^+$ i $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$. Metanol je u preliminarnim ispitivanjima dao mnogo bolje razdvajanje od alternativnog rastvarača – acetonitrila.

Korišćena kombinacija kolone i mobilne faze rezultovala je zadovoljavajućim razdvajanjem velikog broja primarnih i sekundarnih biomolekula, uz kratko vreme analize. U hromatogramima se može uočiti jasno grupisanje jedinjenja po klasama: fenolne kiseline eluiraju u približnom intervalu 0,5–3 min, nekonjugovani kumarini 1–2 min, flavonoidni glikozidi 0,8–5 min, flavonoidni aglikoni 3,5–5 min, lignani 3,5–7,5 min, masne kiseline 9–10 min.

Elektrosprej jonizacija (*electrospray ionization*, ESI) je tehnika jonizacije pri atmosferskom pritisku (*eng.* atmospheric pressure ionization, API) koja omogućava detekciju širokog opsega jedinjenja, uz uslov da poseduju funkcionalne grupe koje se mogu jonizovati kiselobaznim reakcijama ili građenjem adukata sa jonima iz rastvora. Zahvaljujući blagim jonizacionim uslovima kod ESI, u jonskom izvoru najčešće ne dolazi do značajne fragmentacije, i moguće je detektovati pseudomolekulske jone analita (za razliku od elektronske jonizacije (EI) kod GC-MS, kod koje često dolazi do potpunog razaranja molekuskog jona). S druge strane, povećanjem napona fragmentora može se po potrebi izazvati fragmentacija jedinjenja u jonskom izvoru (*eng.* in-source fragmentation), što omogućava izvođenje pseudo-MS³ eksperimenata i dobijanje dodatnih strukturnih informacija.

Svi uzorci analizirani su pri oba polariteta (pozitivna/negativna jonizacija) iz dva razloga [255]:

- zahvaljujući različitim mehanizmima fragmentacije $[\text{M}+\text{H}]^+$ i $[\text{M}-\text{H}]^-$, često je moguće dobiti komplementarne informacije o strukturi,
- mnoga jedinjenja pokazuju značajan stepen jonizacije (i, samim tim, osetljivost) samo u jednom modu.

Generalno, kod biljnih fenola negativna jonizacija obezbeđuje bolju osetljivost (zbog manjeg stepena fragmentacije i nižeg nivoa šuma), dok pozitivna jonizacija pruža informativnije masene spektre (uz dodatnu činjenicu da su obrasci fragmentacije u pozitivnom modu detaljnije istraženi).

Permetilovana fenolna jedinjenja, kao što su brojni lignani vrste *A. sylvestris*, kao ni mnoge karboksilne kiseline, tipično neće davati signal u NI modu.

Kad god je bilo moguće, retenciona vremena, maseni i UV/VIS spektri detektovanih jedinjenja upoređeni su sa odgovarajućim referentnim standardima. Budući da mnoga od detektovanih jedinjenja nisu komercijalno dostupna, za identifikaciju su korišćeni MS, MSⁿ i UV/VIS spektri.

UV/VIS spektri korišćeni su prvenstveno za utvrđivanje klase jedinjenja: derivati fenilpropenskih kiselina pokazuju apsorpcione trake na ~240 nm i ~330 nm, sa *shoulder*-om na ~300 nm, flavonoli 250–270 nm i 320–360 nm, flavoni 210–230 nm, 250–280 nm i 330–350 nm, nezasićeni dibenzilbutirolaktonski lignani na 230–240 nm, 310–330 nm i *shoulder*-om na 290–300 nm, ariltetralinski lignani 230–240 nm i 280–290 nm. UV spektri omogućavaju detekciju strukturnih elemenata kao što je proširena delokalizacija, što je naročito značajno kod diferenciranja ariltetralinskih i nezasićenih dibenzilbutirolaktonskih lignana. Dalje, flavonoidni aglikoni iste molekulske mase – luteolin i kemferol – vrlo lako se mogu identifikovati poređenjem UV spektara. Na kraju, sličnost UV spektara može ukazati i na strukturnu sličnost (zajednički strukturni element), što je u konkretnom slučaju omogućilo identifikaciju niza hlorogenskih kiselina (kafeoil- i dikafeoilhinskih kiselina).

Molekulska masa jedinjenja određena je na osnovu MS¹ spektara (MS2Scan). U zavisnosti od strukture jedinjenja, sastava mobilne faze i uslova u jonskom izvoru, može nastati veći broj adukata:

- [M+H]⁺, [M+NH₄]⁺, [M+Na]⁺, [M+K]⁺, [2M+H]⁺, [2M+Na]⁺ itd. u pozitivnom modu, odnosno
- [M-H]⁻, [M+Cl]⁻, [M+HCOO]⁻, [M+H₂PO₄]⁻, [2M-H]⁻, [2M-2H+Na]⁻ itd u negativnom modu.

Karakteristične razlike u *m/z* između različitih jona (kao što su $\Delta m/z=22$ između adukata sa H⁺ i Na⁺, $\Delta m/z=16$ između adukata sa Na⁺ i K⁺) najčešće omogućavaju nedvosmisleno određivanje molekulske mase jedinjenja.

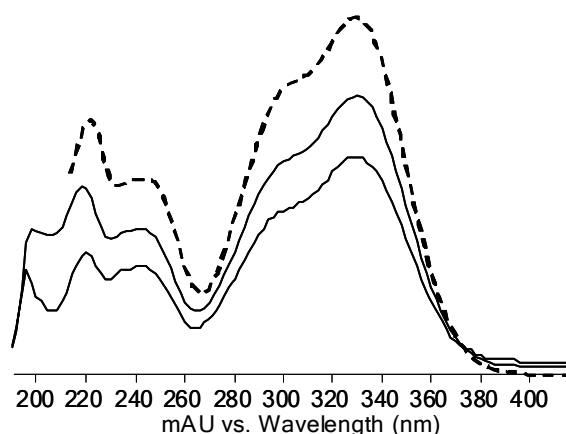
U nekim slučajevima, već maseni spektar prvog reda pruža izvesne strukturne informacije usled *in-source* fragmentacije – flavonoidni glikozidi gube molekule šećera, ariltetralinski lignani u pozitivnom modu gube bočni aromatični prsten (ArH), karboksilne kiseline u negativnom modu gube CO₂ itd. Međutim, za dobijanje detaljnijih informacija neophodni su MSⁿ eksperimenti. Za većinu pikova snimljeni su MS² spektri [M+H]⁺ jona ili, ukoliko je intenzitet protonovanog jona bio previše slab, adukta sa amonijum-jonom (ili, eventualno, sa jonima alkalnih metala, mada ovi adukti najčešće teško podležu fragmentaciji). Za akviziciju MS² spektara korišćen je Product Ion Scan mod, koji obuhvata filtraciju željenog prekursora od koeluirajućih jona na prvom kvadrupolu (Q1), kolizijom-indukovanu disocijaciju (CID) usled sudara sa molekulima azota i zatim skeniranje nastalih fragmenata na Q3. Pored toga, snimljeni su i pseudo-MS³ spektri odabranih fragmenata detektovanih u MS¹, kao što su [B+H]⁺/[C+H]⁺ joni lignana, tipično pri nekoliko različitih kolizionih energija (0–30 V, sa inkrementima 10 V). Pseudo-MS³ spektri dobijeni su primenom visokog napona fragmentora (napona između ulazne kapilare i skimera) koji dovodi do *in-source* fragmentacije (CID u jonskom izvoru); nastali fragmenti dalje se u QqQ analizatoru tretiraju kao prekursori.

Za sistematski skrining jedinjenja sa zajedničkim strukturnim karakteristikama, kao što su flavonoidni glikozidi, korišćen je Precursor Ion Scan mod. Ovaj mod podrazumeva detekciju prekursora koji pri datim uslovima u kolizionoj ćeliji rezultuju datim fragmentima. U slučaju flavonoida, praćeni su Y₀⁺ joni za najčešće aglikone.

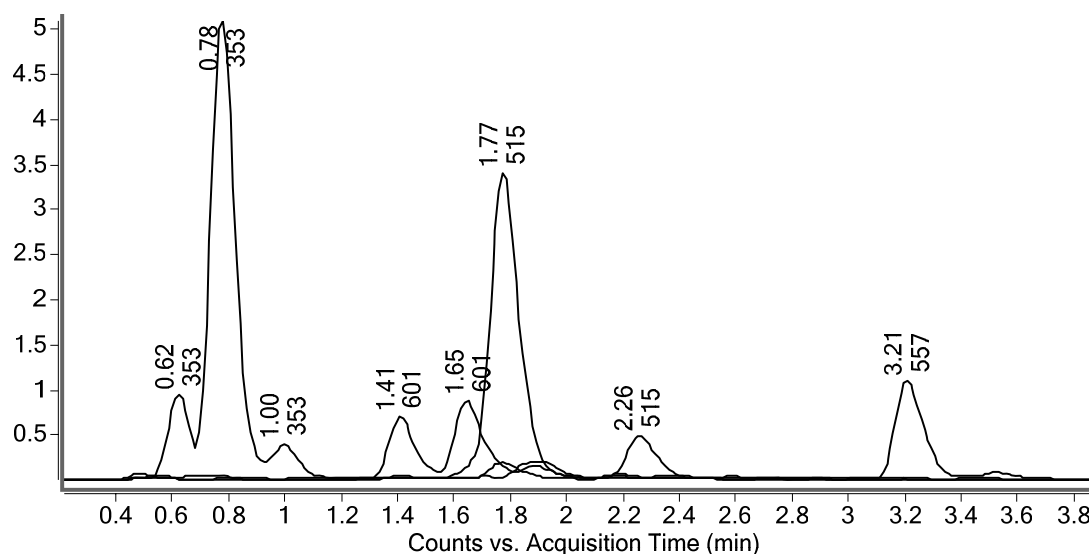
5.2.1. IDENTIFIKACIJA JEDINJENJA PO KLASAMA

5.2.1.1. Hlorogenske kiseline

Prilikom preliminarnog pregleda Scan hromatograma, u većini uzoraka ustanovljeno je prisustvo niza pikova (Slika 5.11.) sa veoma sličnim UV spektrom (λ_{max} : 330 nm, sh 298 nm, 242 nm i 218 nm, Slika 5.10., Prilog 8.14.). Za jedan od pikova u seriji ($t_R = 0,81$ min) poređenjem retencionog vremena, UV, MS¹ i MS² spektra sa referentnim standardom potvrđeno je da je u pitanju 5- kafeoilhinska kiselina (5-CQA)*. UV spektri ukazuju, dakle, da su u pitanju derivati kafene ili sličnih fenilpropenskih kiselina.



Slika 5.10. UV spektri odabranih pikova hlorogenskih kiselina (pune linije) i standarda 5-kafeoilhinske kiseline (isprekidana linija).



Slika 5.11. ESI(-) MS2SIM hromatogram reprezentativnog uzorka (ekstrakt herbe ChT02) sa označenim pikovima derivata kafene kiseline. Za svaki pik dato je retenciono vreme i m/z $[M-H]^-$ jona.

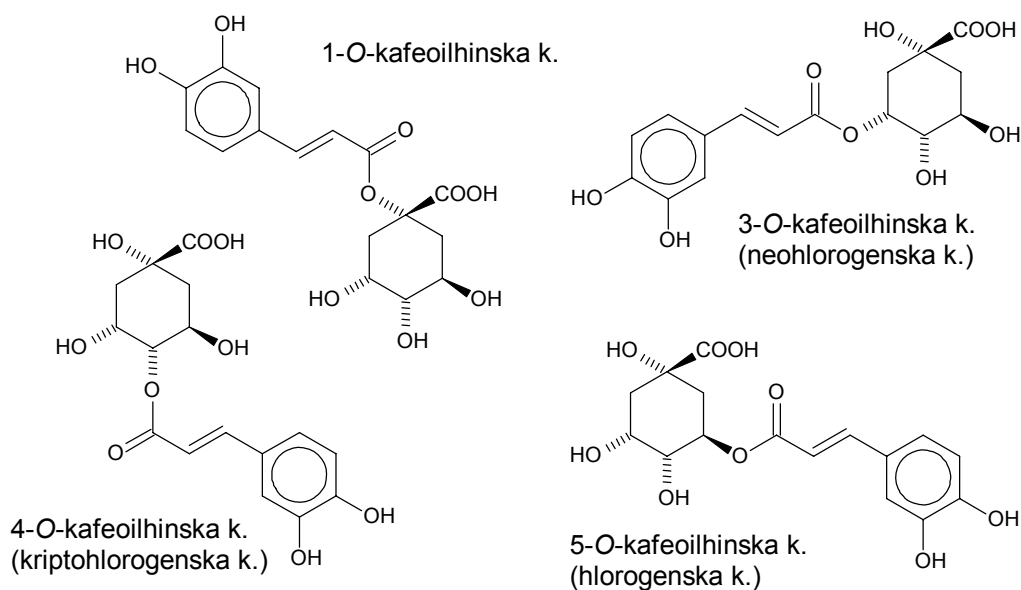
Utvrđeno je da svi pikovi sa datim spektrom pripadaju jedinjenjima molekulske mase 354 Da, 516 Da, 558 Da, 602 Da ili 644 Da (Slika 5.11.). Razlika $516-354=162$ Da ukazuje na heksozilovanje ili uvođenje kafeoil grupe, razlike $558-516=42$ Da i $644-602=42$ Da na acilovanje, a $602-516=86$ Da na malonilovanje. U cilju identifikacije, reprezentativni uzorak (ekstrakt herbe ChT02) analiziran je u Product Ion Scan modu, uz $[M-H]^-$ kao prekursore i kolizionu energiju od 0, 10 i 20 V. CID spektri dati su u Tabeli 5.1. i u Prilogu 8.14.

* Uobičajeni naziv ovog jedinjenja je hlorogenska kiselina. Međutim, u novijoj literaturi ovaj naziv se koristi za sve konjugate fenilpropenskih kiselina sa hinskom kiselinom [57, 84]. U literaturi se još uvek često sreće i naziv 3-kafeoilhinska kiselina; u ovom radu korišćena je IUPAC numeracija.

Tabela 5.1. MS² spektri (negativna jonizacija) derivata kafeine kiseline

t_R [min]	Prekursor m/z	V_{col} [V]	Produkti m/z (abundance%)
0,63		20	191 (100), 179 (46), 135 (16)
0,81	353	20	191 (100)
1,01		20	191 (100)
1,85	515	20	353 (92), 191 (100), 179 (33)
2,38		20	353 (100), 191 (40), 179 (7), 173 (16), 135 (8)
3,21	557	20	395 (100), 233 (67)
1,46		10	601 (26), 557 (65), 515 (17), 395 (100), 179 (16)
		20	515 (31), 439 (9), 395 (100), 353 (72), 179 (30)
1,73	601	10	601 (98), 583 (35), 557 (27), 515 (55), 439 (100), 395 (40), 233 (41)
		20	601 (8), 557 (7), 395 (11), 353 (6), 233 (100)
1,95		10	601 (100), 538 (15), 439 (32), 395 (76), 233 (23)
		20	601 (13), 395 (37), 383 (21), 233 (100), 179 (9)
3,13	643	20	437 (100), 395 (16), 233 (12), 179 (5)

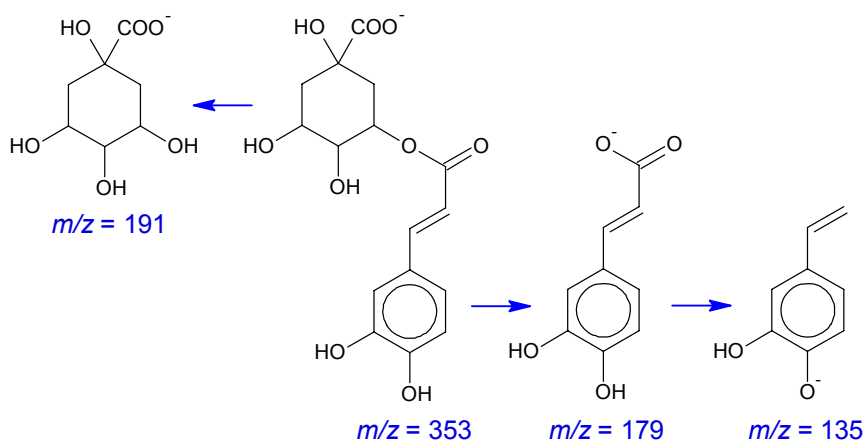
Jedinjenja mase 354 Da odgovaraju monokafeoilhinskim kiselinama (CQA). Poznata su 4 izomerna jedinjenja (Slika 5.12.) [31].



Slika 5.12. Strukture do sada otkrivenih monokafeoilhinskih kiselina

U PI MS², pored $[M+H]^+$ jona $m/z = 355$ uočava se i jon 163, koji odgovara acilijum-jonu kafeine kiseline. U NI MS² spektru svih pikova osnovni jon (*eng.* base peak) je na $m/z = 191$, i identifikovan je kao $[M+H-162]^- = [M+H-(CA^* - H_2O)]^- = QA^-$. Detektovani joni 179 i 135 takođe su u skladu sa pretpostavljenom strukturom (Slika 5.13.) [256]. Pikovi na 0,81 min i 1,01 pokazuju osnovni jon $m/z = 191$ i zanemarljiv jon 179 (kafeatni anjon), što odgovara 1-CQA ili 5-CQA (ova dva izomera ne mogu se razlikovati). Pik na 0,81 min od ranije je identifikovan kao 5-CQA, na osnovu čega se može pretpostaviti da je jedinjenja na 1,01 min možda 1-CQA. Pik na 0,63 min ima signal $m/z = 179$ intenziteta ~50 % od osnovnog jona, što je karakteristika 3-acilovane hinske kiseline, odn. u pitanju je 3-CQA. Četvrti izomer, koji po literaturi daje jon 173 (dehidrohinatni anjon) nije detektovan.

* CA = kafeina kiselina, $M_w = 180$



Slika 5.13. Obrazac fragmentacije CQA [256, 257]

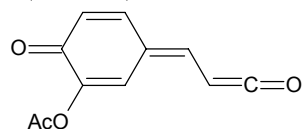
Dva pika koja pripadaju jedinjenjima molekulske mase 516 Da, na 1,85 min i 2,38 min, odgovaraju dikafeoilhinskim kiselinama (diCQA). Poznato je ukupno 6 izomera: 1,3-, 1,4- (cinarin), 1,5-, 3,4-, 3,5- i 4,5-diCQA. U pozitivnom modu kod prvog pika uočeni su joni $m/z = 499$ $[M+H-H_2O]^+$ i 319 $[M+H-CA]^+$. Jon $m/z=353$ detektovan u negativnom modu odgovara gubitku jednog ostatka kafene kiseline (u vidu ketena), odn. CQA^- . Ostali fragmenti mogu se protumačiti kao joni druge i treće generacije, i potiču od CQA^- (Slika 5.13.) [256]. Prisustvo veoma intenzivnog signala na $m/z = 191$ kod pika na 1,85 min ukazuje na acilovanje u položaju 3 i/ili 5. Jon 179 (CA^-) takođe ukazuje na 3-supstituciju. Moguće je da je u pitanju 3,5-diCQA, jedinjenje već identifikovano u *Ch. hirsutum*[18], ali definitivna potvrda nije moguća bez referentnih standarda.

Pik na 3,21 min odgovara jedinjenju molekulske mase 558 Da, odn. acetil-diCQA. Uočeni fragmenti $m/z = 395$ $[M-H-162]^+ = [M+H-(CA-H_2O)]^+$ i 233 $[M+H-2(CA-H_2O)]^+ = acetil-QA^-$ u skladu su sa literaturnim podacima [258]. Prisustvo fragmenta acetil- QA^- i odsustvo gubitka $\Delta m/z = 204$ (acetil $CA-H_2O$) može značiti da je acetil-grupa direktno vezana za hinsku kiselinu. Nijedan od mogućih izomera nije do sada pronađen u vrstama porodice Apiaceae [31].

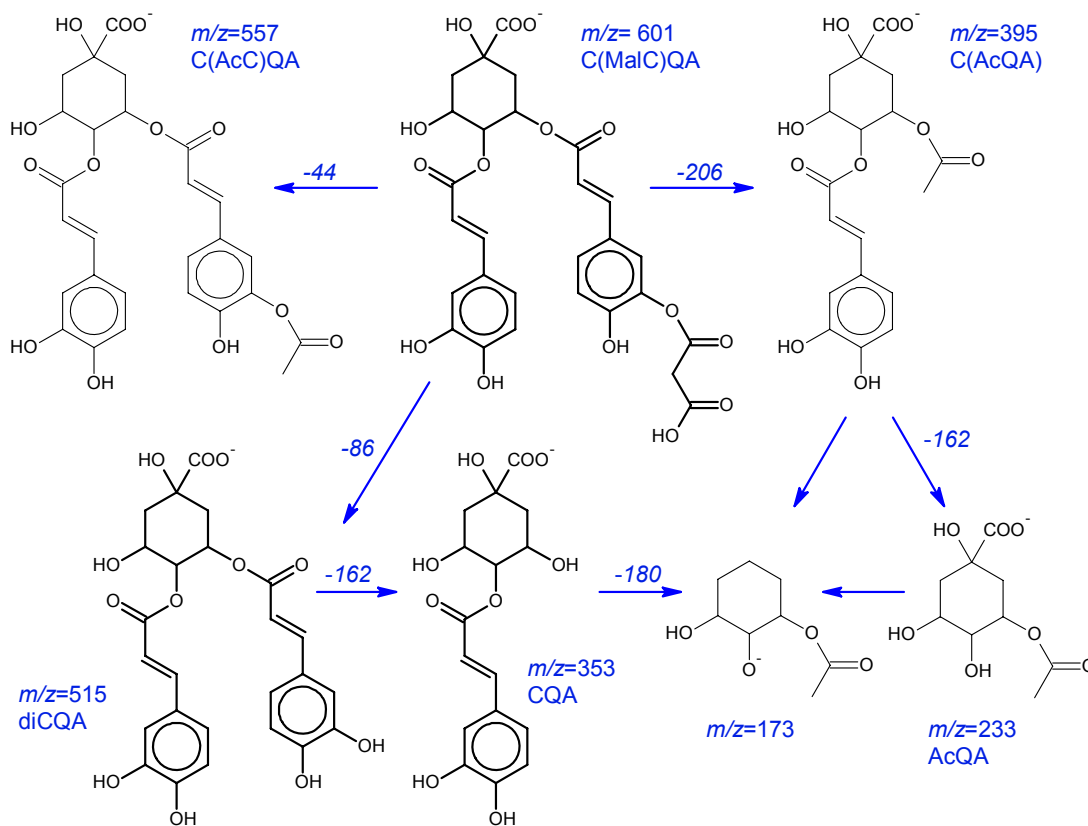
Detektovana su tri pika koja pripadaju jedinjenjima molekulske mase 602 Da, na 1,46 min, 1,73 min i 1,95 min. U NI MS² detektovan je niz signala, koji odgovaraju sledećim jonskim vrstama [259]: 601 $[M-H]^-$, 583 $[M-H-H_2O]^-$, 557 $[M-H-CO_2]^- = acetil-diCQA^-$, 515 $[M-H-86]^- = diCQA^-$, 439 $[M-H-(CA-H_2O)]^-$, 395 acetil- CQA^- , 353 CQA^- , 233 acetil- QA^- , 179 CA^- . U pozitivnom modu su kod pika na 1,73 min uočeni fragmenti 585 $[M+H-H_2O]^+$, 499 $[M+H-H_2O-86]^+$, 441 $[M+H-(CA-H_2O)]^+$, 423 $[M+H-CA]^+$ i 405 $[M+H-H_2O-CA]^+$. Gubici od 44 (CO_2), 86 (malonska kiselina- H_2O) u negativnom modu su dijagnostički za prisustvo malonil-grupe, što znači da ova tri pika predstavljaju izomerne malonil-dikafeoilhinske kiseline, strukture C(MalC)QA ili Mal-diCQA.

Razlika od 206 (601–395) prema Gouveia i sar. [259] potiče od gubitka acetilkafeoil-grupe i dokaz je da je malonil-grupa vezana za ostatak kafene kiseline a ne direktno za hinsku kiselinu. Ukoliko se pretpostavi C(MalC)QA struktura, uočeni joni mogu se racionalizovati reakcijama prikazanim na Slici 5.14. [259]. Međutim, rezultati prikazani u datom radu ne mogu se nedvosmisleno protumačiti na ovaj način, odn. nema dokaza da fragmentacija teče uz neuobičajeni gubitak 206 (naveden kao acetilkafeoil, iako bi se za tu neutralnu vrstu očekivala masa 204*) i intramolekulsko premeštanje uz formiranje acetil-grupe. Fragmentacija bi se alternativno mogla objasniti jonom 557 kao intermedijerom fragmenta 395, koji u tom slučaju nastaje sekvencijalnim

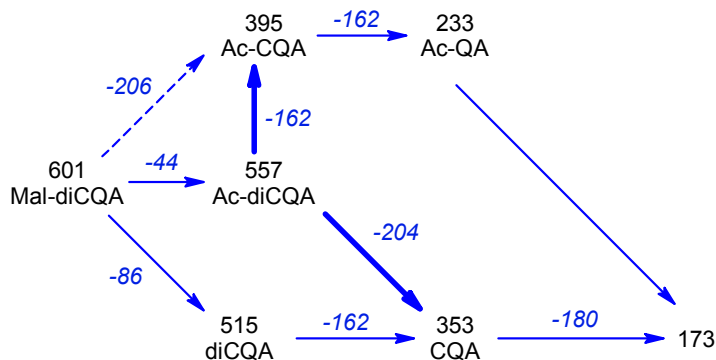
* (CA-H₂O):



gubitkom CO₂ i ostatka kafeine kiseline (44+162=206) – Slika 5.15. Po Zhang-u i sar. [258], jon 395 je zaista [M-H-CO₂-(CA-H₂O)]⁻, a odsustvo direktnog gubitka acetilkafeoil-grupe iz [M-H]⁻ protumačeno je kao dokaz direktnog vezivanja malonata za hinsku kiselinu. Sledi da zbog nedovoljno ispitanih mehanizama fragmentacije tačna identifikacija izomera nije moguća.



Slika 5.14. Obrazac fragmentacije malonil-diCQA po Gouveia i sar. [259]



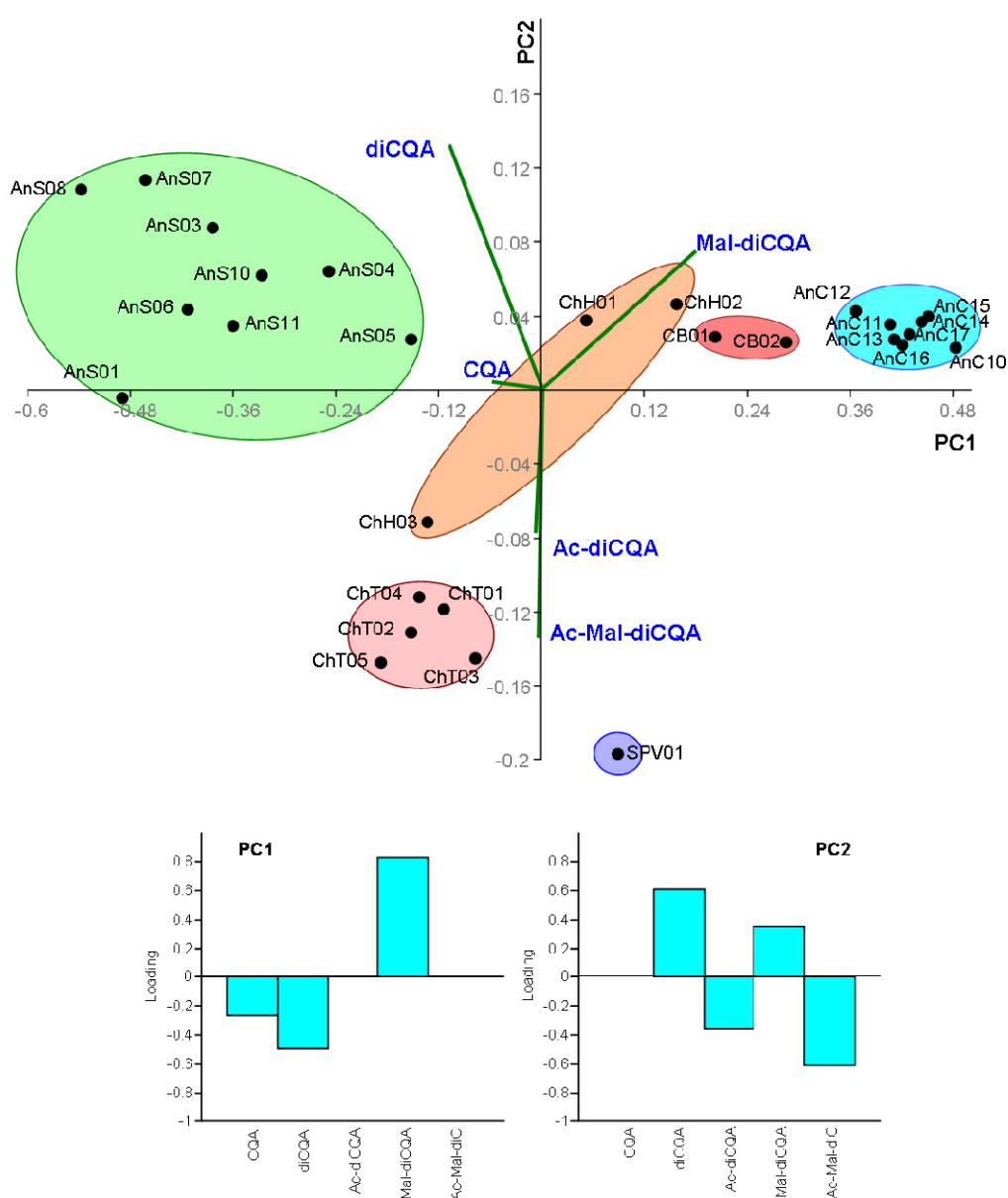
Slika 5.15. Alternativno tumačenje fragmentacije malonil-diCQA. Podebljane linije – reakcije predložene u ovom radu, isprekidana linija – reakcija navedena od strane Gouveia i sar. [259]

Jon 439, koji potiče od gubitka kafeoil-ostatka, a koji je naročito intenzivan kod pikova na 1,73 min i 1,95 min, nije pronađen kod jedinjenja identifikovanih kao 1,4-, 3,4- i 4,5-C(MalC)QA [259], dok je detektovan kod 4-Mal-3,5-diCQA i 1/3-Mal-4,5-diCQA [258].

Spektar pika na 1,46 min jedini sadrži uočljiv pik $m/z=179$, koji potiče od kafeine kiseline vezane u položaju 5. Ovaj jon može poticati od demalonilovanog jona 515 (diCQA⁻), ali može i ukazivati na to da 5-O-kafeoil supstituent nije malonilovan. Drugi intenzivan signal, odsutan kod druga dva jedinjenja, jeste CQA⁻ ($m/z=353$). U ovom spektru uočljivo je i odsustvo fragmenta 233 (acetil-QA⁻). U literaturi [258, 259] se navodi da je jon $m/z=233$ prisutan kod 3,4- i 4,5-C(MalC)QA i 4-Mal-3,5-diCQA, dok je kod 1,4-C(MalC)QA i 1/3-Mal-4,5-diCQA odsutan.

Na kraju, pik na 3,13 min, koji odgovara jedinjenju molekulske mase 644 Da, identifikovan je kao acetyl-malonil-diCQA. Fragmentacijom su dobijeni joni 465 $[M+H-CA]^+$, 447 $[M+H-H_2O-CA]^+$ i 303 $[M+H-H_2O-2\cdot CA]^+$ u pozitivnom modu, odn. 437 (diacetyl-CQA⁻), 395 (acetyl-CQA⁻) i 179 (CA⁻) u negativnom modu. U ovom trenutku nije moguće precizirati pozicije kafeoil-ostataka niti način vezivanja malonata i acetata.

Analizom glavnih komponenti (*biplot* i grafik opterećenja prikazani na Slici 5.16.) utvrđeno je da relativni sastav hlorogenskih kiselina pokazuje izrazitu hemotaksonomsku zavisnost. Iz grafikâ opterećenja vidi se da PC1 (objašnjava 92,3 % varijanse) diferencira vrste bogate sa Mal-diCQA od nesupstituisanih kiselina, dok PC2 (5,6 % varijanse) odražava sadržaj acetilovanih derivata. Tako, *Anthriscus sylvestris* karakterišu nesupstituisane CQA i diCQA. *Anthriscus cerefolium* i *Chaerophyllum bulbosum* imaju pozitivno opterećenje na PC1, odn. visok sadržaj malonil-diCQA (ove dve vrste razlikuju se po relativnom odnosu malonilovanih i nesupstituisanih kiselina). Za *Chaerophyllum temulentum* i *Scandix pecten-veneris* specifično je prisustvo acetilovanih derivata (Ac-diCQA i Ac-Mal-diCQA), odraženo visokim negativnim skorovima na PC2.



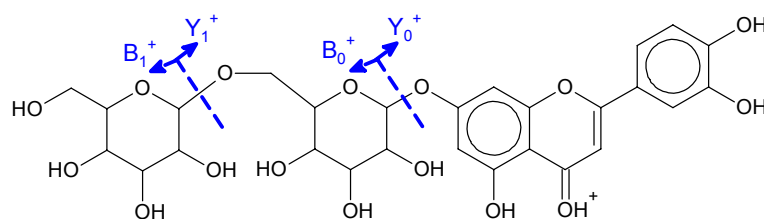
Slika 5.16. PCA detektovanih kafeoilhinskih kiselina u ekstraktima herbe ispitivanih vrsta (gore – biplot, dole – grafici opterećenja na PC1 i PC2). Kao ulazni podaci korišćene su površine pikova za $[M-H]^-$ jon (sumirane za svaku klasu posebno) normalizovane na ukupnu površinu pikova kafeoilhinskih kiselina u datom uzorku kao 100 %.

5.2.1.2. Flavonoidi

Za primarni skrining na flavonoide korišćen je Precursor Ion Scan, uz Y_0^+ kao produkte. Y_0^+ joni, po Domon & Costello nomenklaturi [255, 260], predstavljaju jone aglikona, i nastaju otepljenjem šećerne komponente *O*-glikozida uz zadržavanje glikozidnog *O*-atoma na aglikonskom jezgru.

U pozitivnom modu flavonoidni glikozidi se tipično protonuju na karbonilnom *O*-atomu; sledi homolitičko ili heterolitičko raskidanje glikozidne veze, uz formiranje radikal-katjona ili katjona (Slika 5.17.) [251, 255, 260]. Otepljenje šećera dovodi do $\Delta m/z$ od 162 u slučaju heksoza, 146 kod deoksiheksoza, 132 kod pentoza i 176 u slučaju heksuronskih kiselina. U nekim slučajevima, moguće je detektovati i komplementarni jon terminalnog monosaharida (B^+). Kod glikozida sa oligosaharidnom komponentom, pri nižim kolizionim energijama u spektru se može javiti i jon Y^* , često intenzivan, koji nastaje intramolekulskim premeštanjem i gubitkom neterminalnog molekula šećera. U negativnom modu, pored očekivanog Y_0^- jona javlja se i intenzivan $[Y_0-H]^-$ radikal-anjon koji nastaje homolitičkim raskidanjem glikozidne veze [255].

Kod *C*-glikozida ne dolazi do raskidanja glikozidne veze. Umesto toga, nastaje niz karakterističnih proizvoda visoke mase putem cepanja šećernog prstena – $^{0,2}X^+$, $^{0,3}X^+$ i $^{1,5}X^+$.



Slika 5.17. Obrazac fragmentacije flavonoidnih *O*-glikozida.

U okviru ispitivanja ekstrakta vrsta tribusa Scandiceae, praćeni su Y_0^+ joni očekivanih aglikona [2, 6, 19, 33, 35]: kemferola i luteolina ($m/z = 287$ u pozitivnom modu), apigenina (271), 6-*C*-metilluteolina (301) i kvercetin (303). Za sve detektovane prekursore snimljeni su MS^2 i UV spektri. Tipično su korišćene kolizije energije u intervalu 0–30 V, mada se najviše informacija i najintenzivniji signal dobijaju pri 20 V. Iz svih hromatograma ekstrahovani su joni sledećih glikozida (Slika 5.19): Pent* (aglikon+132), dHex (+146), Hex (+162), HexUA (+176), AcHex (+204), MalHex (+248), dHexHex (+308), HexHex (+324) i HexHexUA (+338).

Za svaki od aglikona detektovana je serija pikova, tzv. *satellite set* [251, 252, 254], koja uključuje heksozil-derivate datog aglikona, njihove acetil- i malonil-estre (Slika 5.19.). Treba pomenuti da ove serije do sada nisu ispitivane u vrstama tribusa Scandiceae; u svim dosadašnjim radovima [2, 6, 19, 33, 35] flavonoidi su identifikovani samo sporadično. Uočljivo je grupisanje po retencionim vremenima – heksuronidi, kao najpolarniji, eluiraju rano (ovo je omogućilo i njihovo razlikovanje od izobaričkih ali znatno nepolarnijih feruloilheksozida); za njima slede heksozidi, malonilheksozidi, i na kraju acetilheksozidi kao najnepolarniji. Dok je za svaki aglikon tipično pronađeno po nekoliko izomernih heksozida, malonil- i acetilheksozida, heksuronidi (glukuronidi/galakturonidi) i deoksiheksozidi (ramnozidi) su mnogo ređi i prisutni samo u vidu diglikozida, a pentozi uopšte nisu detektovani.

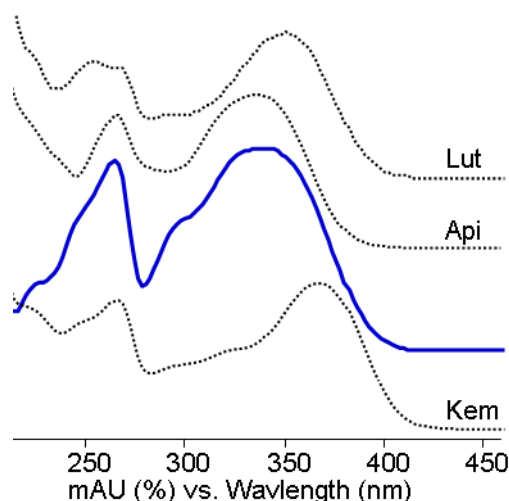
Tačan identitet šećernih komponenti, kao ni mesto glikozilacije, u okviru ovog istraživanja nisu utvrđeni. U tu svrhu, biće neophodni dodatni MS^n eksperimenti, uključujući i fragmentaciju uz korišćenje kompleksirajućih agenasa ($Co^{2+} + 2,2'$ -bipiridil) [261]. Jedini flavonoidi koji su potpuno identifikovani su rutin ($t_R = 2,21$ min) i apigenin-7-*O*-glukozid (2,68 min), putem poređenja sa referentnim standardima, i hiperozid (2,23 min) na osnovu poznate činjenice da koeluiraju sa rutinom. Drugi kvercetin-heksozid, sa $t_R = 2,36$ min, mogao bi biti kvercetin-3-*O*- β -D-glukopiranozid (kvercitrin), od ranije poznat u vrsti *Ch. hirsutum*. Može se pretpostaviti i da jedan od dva

* Pent – pentozi, Hex – heksozidi, dHex – deoksiheksozidi, HexUA – heksuronidi, AcHex – acetilheksozidi, MalHex – malonilheksozidi

intenzivna pika luteolin-*O*-heksozida na 2,14 min i 2,26 min odgovara najzastupljenijem flavonskom glikozidu u porodici Apiaceae – 7-*O*-glukozidu (cinarozidu).

U slučaju aglikona sa $m/z(Y_0^+) = 287$, bila je neophodna dodatna potvrda identiteta, pošto su od najmanje 96 poznatih flavonoida molekulske mase 286 Da [116] dva – luteolin i kemferol – veoma uobičajeni u biljnom svetu. Poređenjem UV spektara sa referentnim standardima aglikona, snimljenim pri istim uslovima, bilo je moguće potvrditi da većina pikova pripadaju derivatima luteolina, dok nije identifikovan nijedan glikozid kemferola. Zahvaljujući velikoj sličnosti UV spektara, bilo je moguće potvrditi i identitet glikozida metil-luteolina poređenjem sa luteolinom (da je u pitanju 6-*C*-metil- a ne 3'- ili 4'-*O*-metil-luteolin može se pretpostaviti na osnovu odsustva gubitka 15, 31, 32 i/ili 33). U nekim slučajevima, zbog koeluirajućih jedinjenja nije bilo moguće izolovati čist UV spektar.

Treba pomenuti da dva dominantna pika u Precursor Ion Scan hromatogramu *Chaerophyllum temulentum* potiču od heksozida i acetilheksozida neidentifikovanog aglikona molekulske mase 286 Da, čiji se UV spektar (λ_{max} 264 nm, sh ~295 nm i 339 nm, Slika 5.18.) razlikuje i od luteolina (254 nm, 266 nm i 350 nm) i od kemferola (265 nm, sh ~322 nm, 367 nm), dok je veoma sličan apigeninu (267 nm, 338 nm). Na osnovu položaja trake I, može se zaključiti da je u pitanju flavon ili flavonol sa supstituisanom 3-OH [262]. Ukoliko se pretpostavi flavonska struktura, položaj trake II ukazuje na oksigenaciju bar u 5-položaju, a odsustvo cepanja te trake na verovatnu 4'-oksigenaciju (odsustvo supstituenata u 3' i 4') na prstenu B. Ukoliko je u pitanju flavonol, značajan hipsokromni efekat (naročito kod trake I) ukazuje na 3-*O*-glikozid. Za potpunu identifikaciju klase flavonoida, obrasca oksigenacije prstenova A i B i poziciju glikozilovanja, biće neophodno snimanje MS³ spektara.



Slika 5.18. UV spektar nepoznatog flavonoidnog glikozida iz *Ch. temulentum*, $t_R=3,40$ min (puna linija), upoređen sa spektrima standarda kemferola, luteolina i apigenina (tačkaste linije).

Flavonoidni *O*-glikozidi detektovani su u svim ispitivanim vrstama (Tabela 5.2., Slika 5.20.). Uprkos činjenici da se površine pikova u MS i naročito MSⁿ hromatogramima ne mogu poistovećivati sa udelom komponenti, bezbedno je reći da je dominantni aglikon u svim vrstama luteolin. Čini se da raspodela flavonoida može imati hemotaksonomski značaj – dok su kod *Scandix pecten-veneris* prisutni skoro isključivo derivati luteolina, kod ostalih vrsta je tipično prisutan još jedan osnovni skelet: metil-luteolin kod *A. sylvestris*, apigenin kod *A. cerefolium*, kvercetin i (u manjoj meri) i apigenin kod *Ch. bulbosum*. Kod *Ch. hirsutum* detektovani su derivati svih ciljanih aglikona, dok su kod *Ch. temulentum* pronađeni glikozidi kvercetina i nepoznatog aglikona molekulske mase 286 Da.

Što se tiče slobodnih aglikona, najzastupljeniji je luteolin, sa naročito visokim udelom u herbi *A. sylvestris*, *Ch. hirsutum*, *Ch. bulbosum* (prisutan u velikim količinama) i *S. pecten-veneris*. U manjoj meri, prisutni su apigenin, kemferol (nije pronađen u *A. sylvestris*, *S. pecten-veneris* niti većini *Ch. hirsutum*), dok je kvercetin detektovan u malim količinama u samo nekoliko uzoraka.

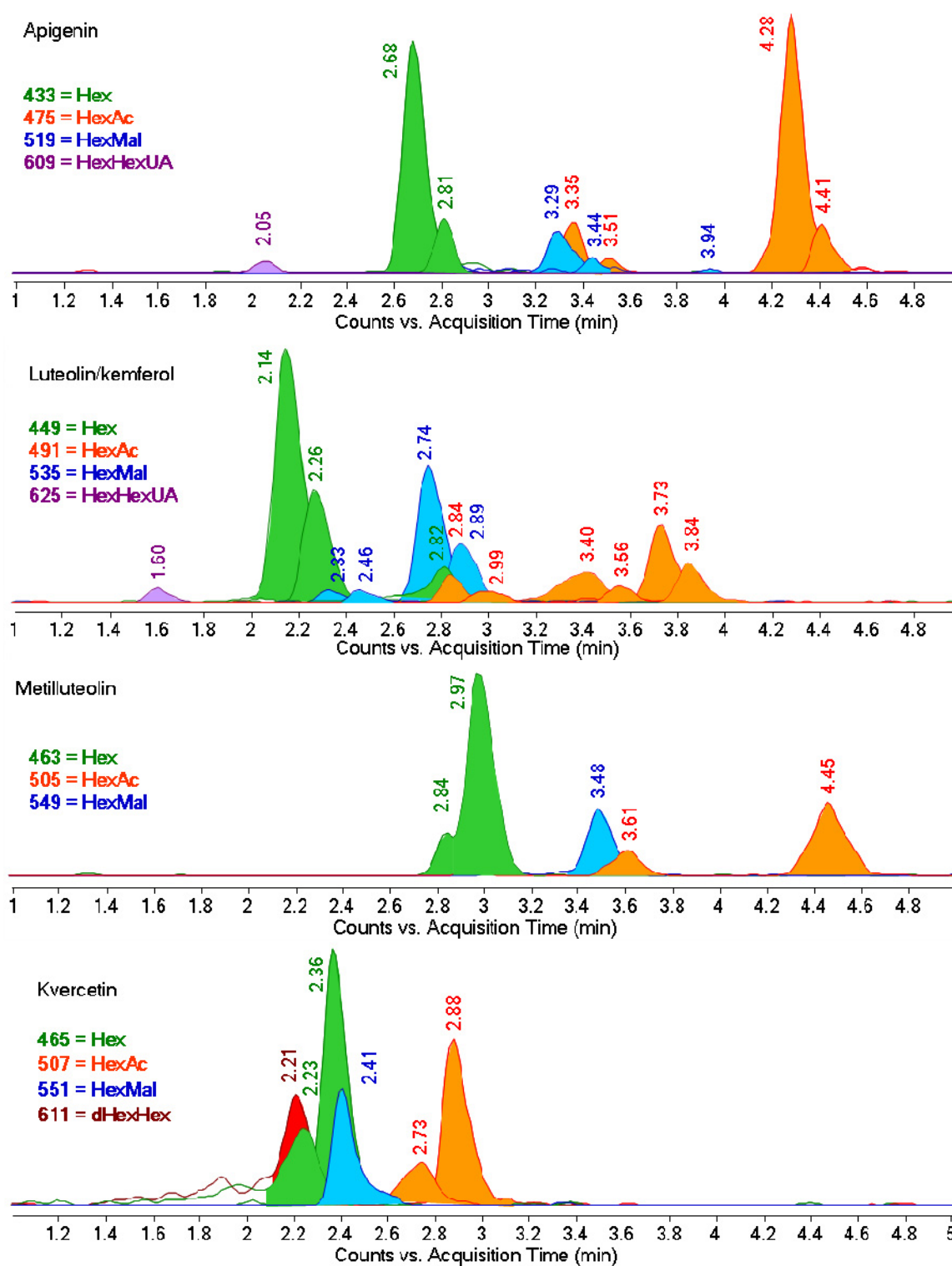
Velika većina od preko 30 flavonoida identifikovanih u sklopu ovog rada do sada nisu pronađeni u vrstama tribusa Scandiceae. Zanimljivo je da je apiin, flavonoid koji je karakterističan za familiju Apiaceae čije je prisustvo u *A. cerefolium* ranije utvrđeno [2], odsutan u svim ispitivanim uzorcima.

Tabela 5.2. Flavonoidni derivati identifikovani u vrstama tribusa Scandiceae. Lut-luteolin, Kem-kemferol, Api-apienin, Quer-kvercetin, MeLut-metilluteolin.

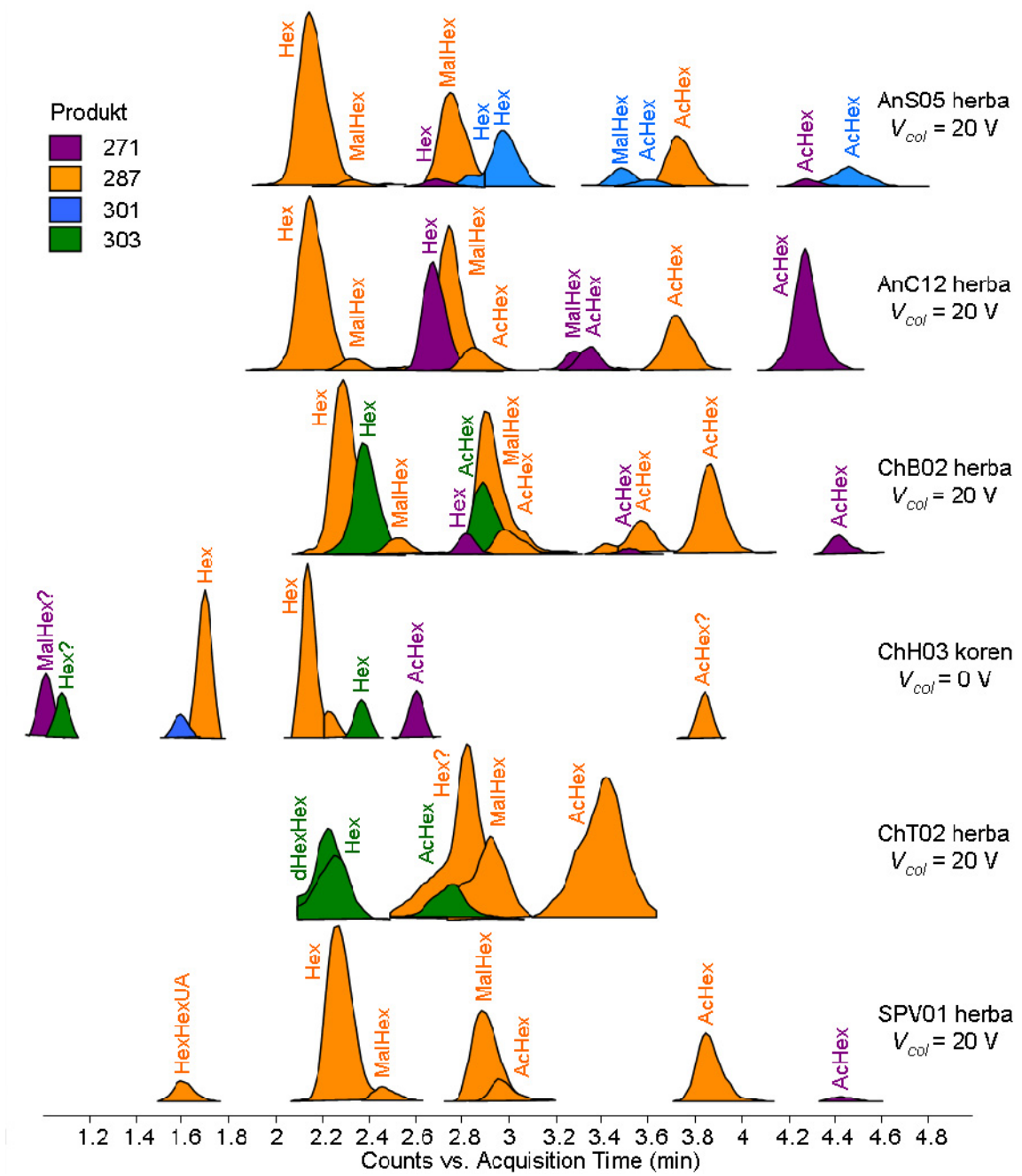
t_R [min]	Mw	Aglikon (Y_0^+)	Šećer	ID	AnS	AnC	ChB	ChH*	ChT	SPV
0,88	519?	271	Api	MalHex?				+		
0,95	464?	303	Quer	Hex?				+		
1,46	?	301	MeLut	?				+		
1,56	448	287	Lut/Kem	Hex				++		
1,60	624	287	Lut/Kem?	Hex-HexUA						+
2,00	448	287	Lut/Kem	Hex				++		
2,05	610	271	Api	Hex-HexUA						
2,09	?	287	Lut/Kem	?				+		
2,14	448	287	Lut [†]	Hex	++	++				
2,21	610	303	Quer	dHex-Hex					++	
2,23	464	303	Quer	Hex				+	+	?
2,26	448	287	Lut [†]	Hex			++			++
2,33	534	287	Lut/Kem	MalHex	+	+				
2,36	464	303	Quer	Hex			++			
2,41	550	303	Quer	MalHex						
2,46	534	287	Lut [†]	MalHex			+			+
2,47	475	271	Api	AcHex				+		
2,68	432	271	Api	Hex	+	++				
2,73	506	303	Quer	AcHex					+	
2,74	534	287	Lut [†]	MalHex	++	++				
2,81	432	271	Api	Hex			+			
2,82	448	287	?	Hex					++	
2,84	490	287	Lut/Kem	AcHex	+	+				
2,84	462/608	301	MeLut	Hex/dHexHex	+					
2,88	506	303	Quer	AcHex			++			
2,89	534	287	Lut [†]	MalHex			++		++	++
2,97	462	301	MeLut [†]	Hex	++					
2,99	490	287	Lut [†]	AcHex			+			+
3,29	518	271	Api	MalHex		+				
3,35	474	271	Api	AcHex		+				
3,40	490	301	?	AcHex			+		++	
3,44	518	271	Api	MalHex						
3,48	548	301	MeLut [†]	MalHex	+					
3,51	474	271	Api	AcHex			+			
3,55	490	287	?	AcHex			+			
3,61	504	301	MeLut	AcHex	+					
3,73	490	287	Lut [†]	AcHex	++	++		+		
3,84	490	287	Lut [†]	AcHex			++			++
3,94	518	271	Api	MalHex						
4,28	474	271	Api	AcHex	+	++				
4,41	474	271	Api	AcHex			+			+
4,45	504	301	MeLut [†]	AcHex	+					

* Precursor Ion Scan hromatogram za *Ch. hirsutum* snimljen je samo pri kolizionoj energiji od 0 V. Intenzitet signala je slab, a identifikacija nepouzdana.

[†] Identitet aglikona potvrđen iz UV spektra (Prilog 8.15.)



Slika 5.19. Flavonoidni O-glikozidi detektovani u vrstama tribusa Scandiceae, po aglikonima. Preklapljeni EIC za fragmentacije detektovane u Precursor Ion Scan-u reprezentativnih primeraka svih ispitivanih vrsta.

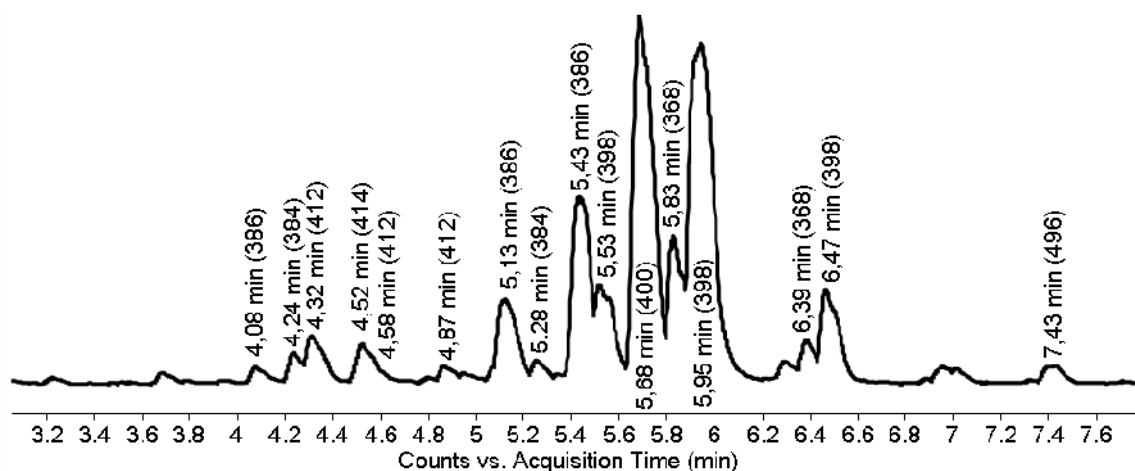


Slika 5.20. Identifikovani flavonoidni O-glikozidi, po vrstama. Preklapljeni EIC za detektovane tranzicije u Precursor Ion Scan hromatogramu.

5.2.1.3. Lignani

Zahvaljujući visokom sadržaju u ekstraktima *Anthriscus sylvestris*, veliki broj lignana bilo je moguće uočiti već u Scan hromatogramu (Slika 5.21.). Velika većina jedinjenja dala je intenzivan signal samo u PI modu, što ukazuje na odsustvo slobodnih fenolnih grupa (permetilacija i građenje metilendioksi-mostova uobičajeni su kod lignana [227]). Preliminarnim pregledom Scan hromatograma utvrđeno je da su sva jedinjenja, sem angeloil-podofilotoksina, prisutna samo u nekonjugovanoj formi, za razliku od lignana u lanu ili susamu [263]. Naravno, nije isključena mogućnost degradacije konjugata (estara, glikozida) prilikom obrade biljnog materijala i/ili pripreme uzorka [276].

U cilju identifikacije pojedinih struktura, snimljeni su MS² i pseudo-MS³ spektri svih detektovanih pikova. Zahvaljujući dobro ispitanim pravilima fragmentacije pojedinih klasa lignana [263, 265–269] kod ESI-MS, bilo je moguće delimično ili potpuno rasvetljenje strukture. Treba napomenuti da je kod lignana stereoizomerija vrlo česta pojava. Kod nezasićenih dibenzilbutirolaktona uobičajeno je prisustvo oba (*cis*- i *trans*-) izomera u istoj biljci. Kod ariltetralinskih laktona, moguća je *cis-trans* interkonverzija usled raskidanja i ponovnog formiranja laktonskog prstena [31, 264]. Pojedine stereoizomere je vrlo teško ili nemoguće identifikovati korišćenjem samo masene spektrometrije.



Slika 5.21. Reprezentativni BPC hromatogram ekstrakta korena *A. sylvestris* – region u kome eluiraju lignani. Scan, ESI(+).

U ekstraktima vrste *Anthriscus sylvestris* uspešno je identifikovan niz lignanskih jedinjenja, koji pripadaju klasama dibenzilbutirolaktona (zasićenih i nezasićenih) i ariltetralinskih laktona. Furanofuranski lignani nisu detektovani, što može biti posledica slabe jonizabilnosti ove klase jedinjenja u elektrosprej jonskom izvoru [263]. Veliku većinu identifikovanih lignana katarakteriše piperonil (metilendioksi) supstitucija na kondenzovanom aromatičnom prstenu i siringil (trimetoksi) supstitucija na bočnom prstenu. Može se očekivati da će zbog potpunog alkilovanja fenolnih hidroksilnih grupa doprinos lignana ukupnom antioksidantnom potencijalu biti zanemarljiv.

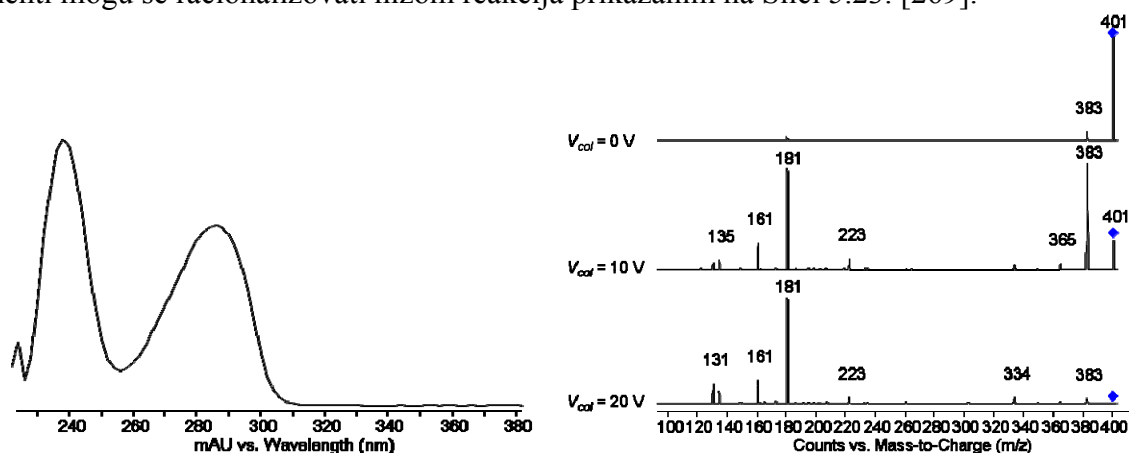
Iako se u literaturi navodi da su lignani pronađeni u *Chaerophyllum hirsutum* [18, 31], kao i nekim primercima *Anthriscus cerefolium* [20], od vrsta ispitivanih u ovom radu jedino su u *A. sylvestris* detektovane značajne količine ovih jedinjenja. Deoksipodofilotoksin i nemerozin pronađeni su u tragovima (koncentracije 10³ puta niže nego u *A. sylvestris*) u korenu *Ch. temulentum* i *Ch. bulbosum*, kao i jednom primerku *Ch. hirsutum* (rezultati nisu prikazani). Tragovi jateina detektovani su u korenu *Ch. temulentum*, korenu *Ch. bulbosum* i *S. pecten-veneris* i herbi *A. cerefolium*, i pojedinim primercima korena *A. cerefolium*, *Ch. temulentum* i *Ch. hirsutum*. Sledi da ispitivane vrste, sem *A. sylvestris*, ne mogu predstavljati komercijalno značajan izvor lignanskih jedinjenja. Treba pomenuti da će, u slučaju industrijskog dobijanja lignana iz *A. sylvestris*, značajan problem predstavljati prisustvo niza jedinjenja slične strukture (uključujući i stereoizomere). Dok je u više navrata u literaturi pominjana uspešna izolacija deoksipodofilotoksina iz korena ove biljke

[11, 37, 42, 55, 56, 162], pokušaj izolacije čistih dominantnih jedinjenja u sklopu ovog rada nije urodio plodom – korišćenjem preporučenog postupka (hromatografija na stubu silikagela, i dalje frakcionisanje na XAD-2) dobijena je smeša koeluirajućih lignana – jateina, deokspodofilotoksina i nemerozina.

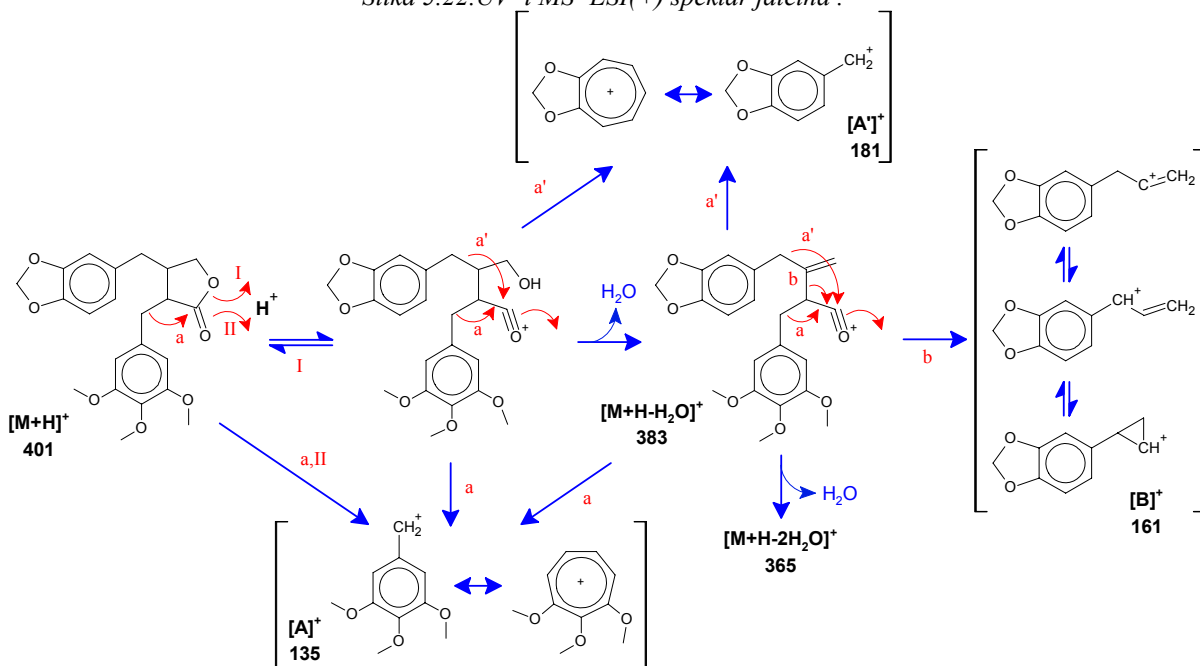
Lignan $M_w=400$ ($t_R=5,68$ min)

Dominantan pik na 5,68 min je u PI MS¹ spektru dao jone 823 [2M+Na]⁺, 439 [M+K]⁺, 423 [M+Na]⁺ i 401 [M+H]⁺, što odgovara jedinjenju molekulske mase 400 Da. Signal je odsutan u NI. Apsorpcioni maksimumi u UV spektru su: 202 nm, 236 nm i 286 nm (Slika 5.22.). U MS² spektru [M+H]⁺ jona uočeni su pikovi: 393 [M+H-H₂O]⁺, 365 [M+H-2H₂O]⁺, 181 [A']⁺, 161 [B]⁺ i slab 135 [A]⁺ (Slika 5.22).

U *A. sylvestris* do sada su otkrivena dva lignana mase 400: α -peltatin A i jatein (7-deokspodorizon). Ariltetralin α -peltatin A odbačen je iz više razloga: radovi prethodnih radova ukazuju da je u pitanju minorna komponenta, apsorpcioni maksimum u UV spektru nalazi se na 272 nm [31], može se očekivati intenzivan signal u NI (usled prisustva slobodne fenolne OH grupe), u MS² spektru očekivao bi se dominantni fragment [M+H-ArH]⁺ sa $m/z = 247$. S druge strane, dibenzilbutirolakton (lignano-9,9'-lakton) jatein jeste jedna od glavnih komponenti ekstrakta *A. sylvestris* [4, 9], a eksperimentalni MS² spektar u potpunosti se slaže sa literaturnim [269]. Uočeni fragmenti mogu se racionalizovati nizom reakcija prikazanim na Slici 5.23. [269].



Slika 5.22. UV i MS² ESI(+) spektar jateina.



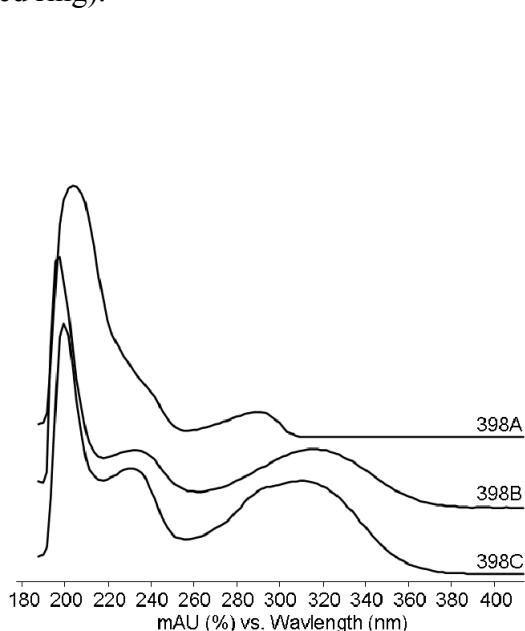
Slika 5.23. CID fragmentacija jateina (pozitivna jonizacija).

Lignani $M_w=398$ ($t_R=5,53$ min, $5,95$ min i $6,47$ min)

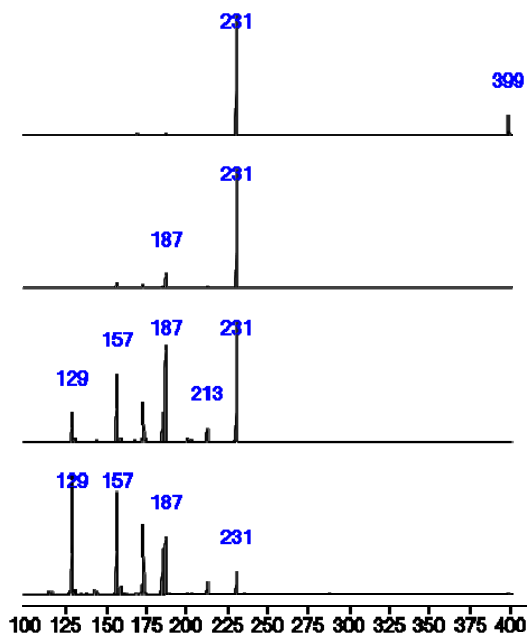
Tri intenzivna signala, na retencionim vremenima $5,52$ min (u daljem tekstu pik 398A), $5,93$ min (398B) i $6,49$ min (398C) odgovaraju jedinjenjima mase 398 . Apsorpcioni maksimumi ovih pikova su: 206 nm, 238 nm i 292 nm za 398A, 201 nm, 236 nm, sh 298 nm i 313 nm za 398B, i 200 nm, 237 nm i 318 nm za 398C (Slika 5.24.).

Od ranije su poznate 4 dominantne komponente *A. sylvestris* ove mase: ariltetralini deoksipodofilotoksin (antricin) i deoksipikropodofilotoksin, i lign-7-eno-9,9'-laktone (nezasićeni dibenzobutirilaktone) nemerozin (anhidropodorizol) i nedavno otkriveni silvestrin [4, 9]. Pikovi 398B i 398C pokazuju identične UV spektre, koji ukazuju na proširenu delokalizaciju, što odgovara lignenolaktone, dok iz spektra jedinjenja 398A proizilazi nekonjugovana, ariltetralinska struktura.

U PI MS^2 spektru pika 398A (Slika 5.25.) uočen je niz fragmenata: 231 $[M+H-ArH]^+=[B+H]^+$, 213 $[B+H-H_2O]^+$, 187 $[B+H-CO_2]^+$, 185 $[B+H-H_2O-CO]^+$, 173 , 157 i 129 . MS^2 spektri pikova 398B i 398C su identični (Slike 5.26. i 5.27.), sa najintenzivnijim jonima: 399 $[M+H]^+$, 381 $[M+H-H_2O]^+$, 363 $[M+H-2H_2O]^+$, 350 $[M+H-H_2O-MeO\cdot]^+$, 335 $[M+H-H_2O-MeO\cdot-Me\cdot]^+$, 231 $[M+H-ArH]^+=[C+H]^+$, 221 , $203=221-H_2O$, $187=231-CO_2$, 185 i 135 $[A']^+$. U MS^2 spektrima sva tri jedinjenja javlja se karakteristični fragment $m/z = 231$, koji odgovara gubitku trimetoksibenzena ($\Delta m/z = 168$) kao ArH [265 , 266 , 268 , 269], odn. trimetoksi-supstituciji bočnog aromatičnog prstena (eng. pendant ring). Međutim, kod 398A su ova fragmentacija (koja je intenzivna čak i u MS^1) i gubitak CO_2 iz $[M+H-ArH]^+$ jona jedine značajne tranzicije pri nižim kolizionim energijama ($V_{col} = 0-10$ V), što odgovara obrascu fragmentacije ariltetralina (Slika 5.28.) [265 , 268]. S druge strane, druga dva pika pri $V_{col} \geq 10$ V podležu ekstenzivnoj fragmentaciji, uz jasno izražene $[M+H-H_2O]^+$, $[M+H-2H_2O]^+$ i benzil/tropilijum $[A']^+$ jone karakteristične za lignenolaktone (Slika 5.29.) [269]. Masa fragmenta $[B+H]^+$ kod 398A, odn. $[C+H]^+$ i $[A']^+$ kod 398B i 398C ukazuju na metilendioksi-supstituciju kondenzovanog aromatičnog prstena (eng. fused ring).



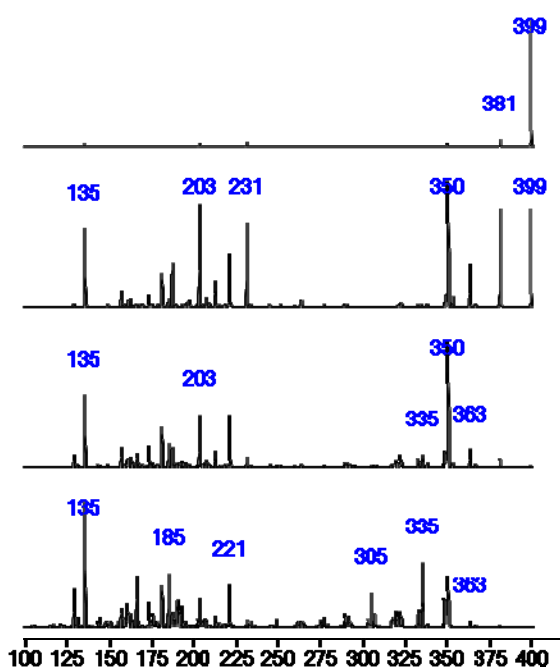
Slika 5.24. UV spektri lignana $M_w=398$ detektovanih u ekstraktu korena *A. sylvestris*.



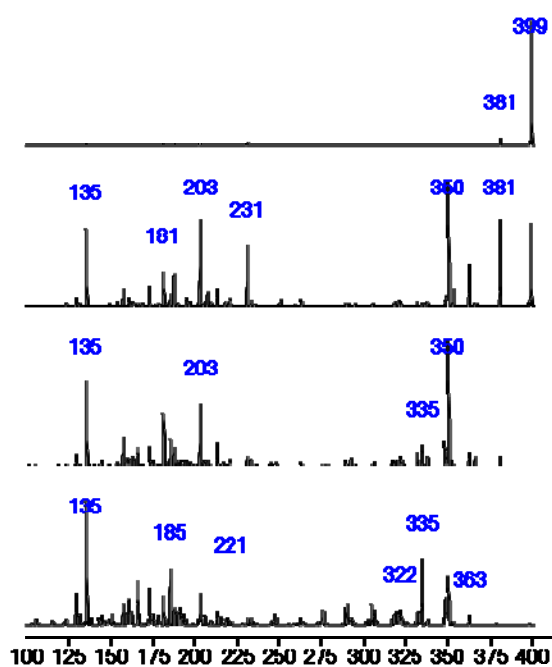
Slika 5.25. ESI(+)- MS^2 spektri lignana $M_w=398$ $t_R=5,53$ min, snimljeni pri kolizionim energijama $0-30$ V.

Na osnovu svega navedenog, može se zaključiti da pikovi 398B i 398C potiču od nemerozina i silvestrina, koji se kao *cis-trans* izomeri ne mogu razlikovati samo na osnovu masenog spektra [269]. Međutim, ranijim LC-MS i NMR eksperimentima [268, 269] utvrđeno je da nemerozin eluira pre silvestrina.

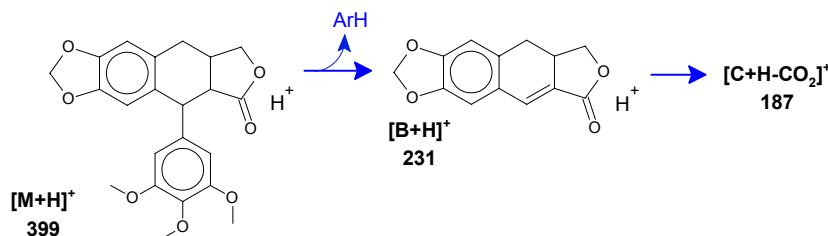
Što se tiče pika 398A, sledi da je u pitanju deoksipodofilotoksin ili njegov 8'-epimer, deoksipikropodofilotoksin. Za identifikaciju prisutnog izomera iskorišćena je činjenica da se ariltetralinski laktoni sa *trans*-kondenzovanim prstenovima C i D (cikloheksenski i butirolaktonski prsten) u alkalnoj sredini lako izomerizuju u odgovarajuće stabilnije *cis*-izomere (Slika 5.31.) [31, 264]. U tom cilju, 50 μL ekstrakta AnS04K-Ex(70M) razblaženo je sa 440 μL MeOH i tretirano sa 10 μL zasićenog rastvora MeONa u MeOH tokom 3 h na sobnoj temperaturi. Paralelno je pripremljena i slepa proba, sa dodatih 10 μL MeOH umesto rastvora metoksida. Reakciona smeša neutralisana je sa 500 μL 1 % vodenog rastvora HCOOH i nakon filtracije analizirana na LC-DAD-MS. Utvrđeno je da nakon tretmana bazom pik 398A nestaje, a javlja se novi, sa $t_R = 5,08$ min (označen sa 398D), identičnog UV i vrlo sličnog MS² spektra (Slika 5.30.). Sledi da je jedinjenje 398A deoksipodofilotoksin, dok pik 398D pripada deoksipikropodofilotoksinu, koji je u ispitivanim ekstraktima pronađen samo u minornim količinama.



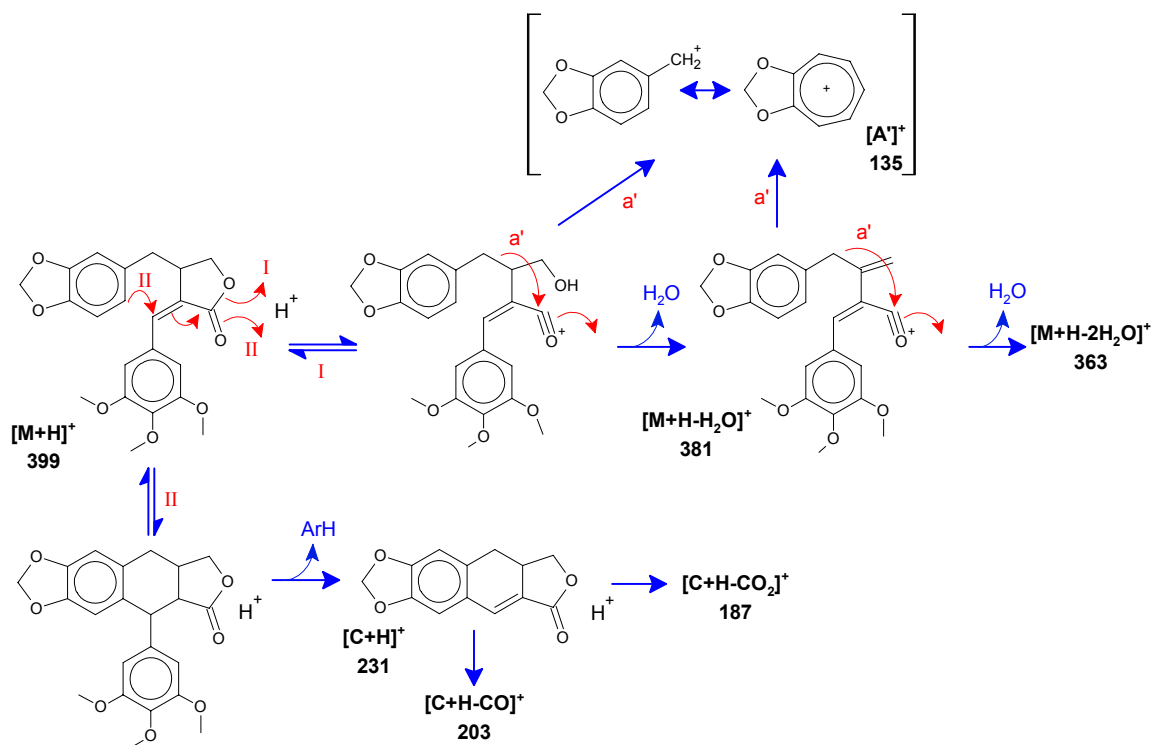
Slika 5.26. ESI(+)-MS² spektri lignana $M_w=398$ $t_R=5,95$ min, snimljeni pri kolizionim energijama 0–30 V.



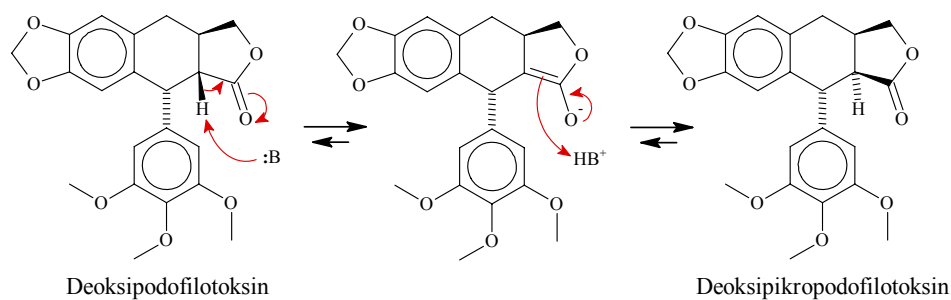
Slika 5.27. ESI(+)-MS² spektri lignana $M_w=398$ $t_R=6,47$ min, snimljeni pri kolizionim energijama 0–30 V.



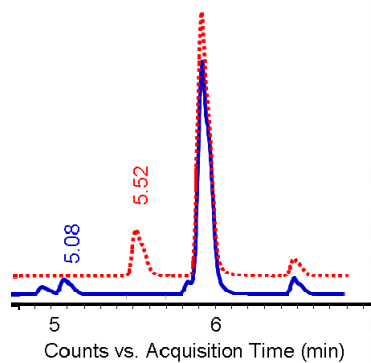
Slika 5.28. CID fragmentacija deoksipodofilotoksina i deoksipikropodofilotoksina (pozitivna jonizacija).



Slika 5.29. CID fragmentacija nemerozina i silvestrina (pozitivna jonizacija).



Slika 5.31. Mehanizam alkalne izomerizacije deksipodofilotoksina.

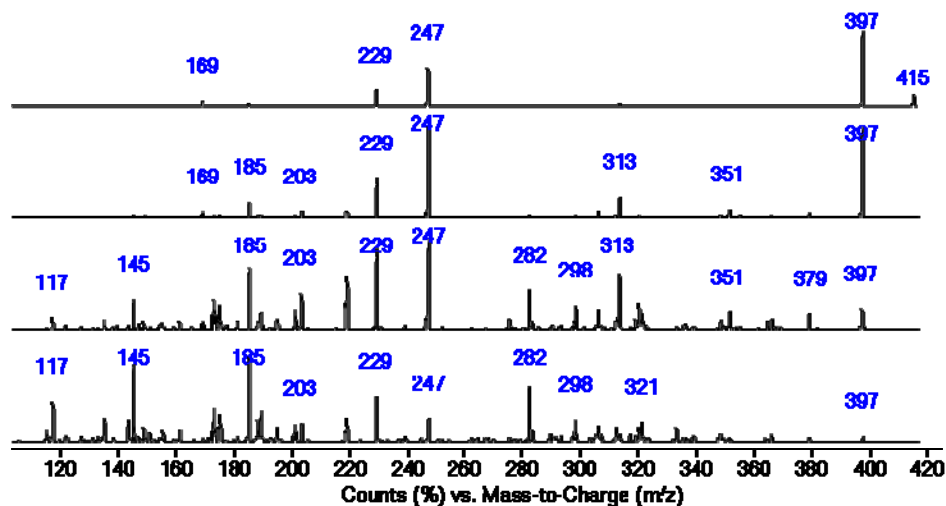


Slika 5.30. EIC(399) hromatogrami ekstrakta AnS04K-Ex(70M) pre i posle alkalne izomerizacije (isprekidana i puna linija, respektivno).

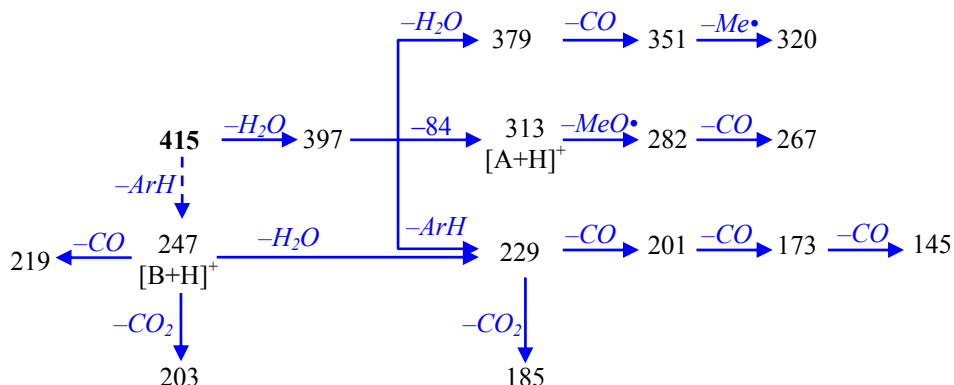
Lignan $M_w=414$ ($t_R=4,52$ min)

Relativno intenzivan pik na 4,52 min odgovara jedinjenju molekulske mase 414. Apsorpcioni maksimumi u UV spektru nalaze se na 205 nm, 233 nm i 290 nm (Slika 5.34.). U PI MS¹ spektru se, pored $[M+H]^+$ i adukata sa NH_4^+ , Na^+ i K^+ , uočavaju i intenzivni signali 397 $[M+H-H_2O]^+$ (osnovni jon; ukazuje na lako odlazeću OH grupu), 247 $[M+H-ArH]^+ = [B+H]^+$ i 229 $[B+H-H_2O]^+$. Lak raspad već pri niskim energijama, jednostavan spektar i gubitak ArH $m/z = 168$ jasno ukazuju na ariltetralinsku strukturu sa trimetoksilovanim bočnim prstenom. U MS² spektru $[M+H]^+$ jona

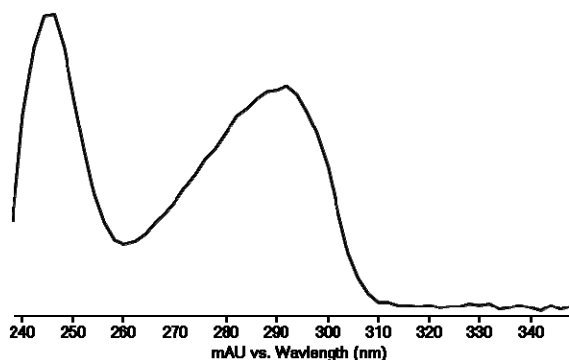
(Slika 5.32.) detektovan je veliki broj fragmenata, koji se mogu objasniti konkurentnim putevima raspada $[M+H-H_2O]^+$ jona (Slika 5.33.) [265]. Sukcesivni gubitak vode ($\Delta m/z = 18$) i krotonolaktona ($\Delta m/z = 84$) putem retro-Diels-Alderove reakcije (RDA) dokaz je za γ -butirolaktonsku funkciju u susjedstvu lako odlazeće grupe (u ovom slučaju, OH) u položaju 7 ariltetralinskog skeleta [265, 266]. Masa $[A+H]^+$ i $[B+H]^+$ jona ukazuju na metilendioksi-supstituciju kondenzovanog aromatičnog prstena. Sledi da pik pripada podofilotoksinu ili pikropodofilotoksinu. Analizom referentnog standarda i poređenjem retencionog vremena, UV, MS^1 i MS^2 spektra potvrđeno je da je u pitanju podofilotoksin.



Slika 5.32. ESI(+)- MS^2 spektri lignana $M_w=414$ $t_R=4,52$ min, snimljeni pri kolizionim energijama 0–30 V.



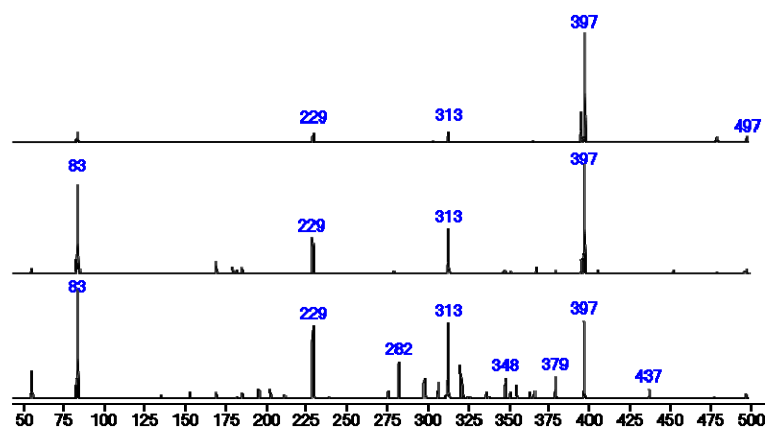
Slika 5.33. CID fragmentacija podofilotoksina (pozitivna jonizacija).



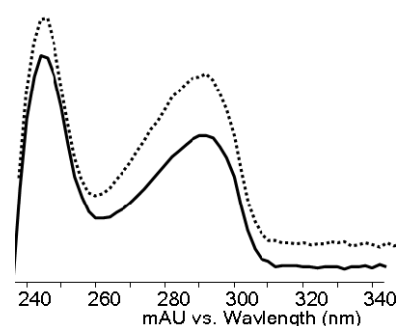
Slika 5.34. UV spektar lignana $M_w=414$ $t_R=4,52$ min.

Lignan $M_w=496$ ($t_R=7,40$ min)

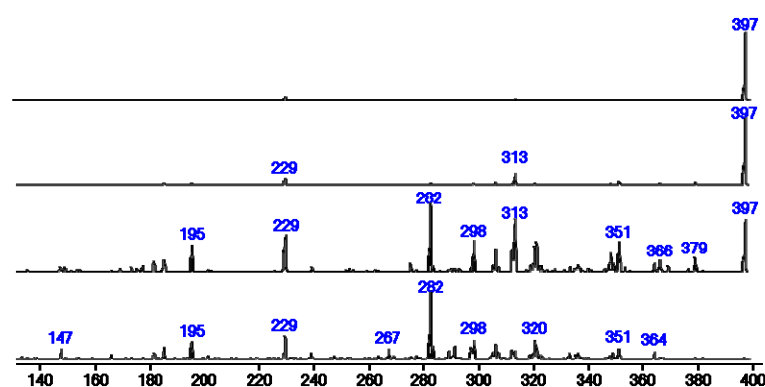
Ovaj pik, relativno visokog udela kod nekih uzoraka, u PI MS¹ i MS² spektru ima kao osnovni jon fragment $m/z = 397$ (Slika 5.35.). Neuobičajeni gubitak od 100 jedinica mase odgovara molekulu angelika-kiseline. U pseudo-MS³ spektru jona 397 (Slika 5.37.) uočava se niz fragmenata, od kojih su najintenzivniji: 313 [397–krotonolakton]⁺, 282 [313–MeO•]⁺, 229 [397–ArH]⁺, 185 [397–ArH–CO₂]⁺. Uopšte, uočava se velika sličnost sa spektrom podofilotoksina (ne računajući fragmente podofilotoksina koji potiču od [B+H]⁺), kao i odlično slaganje UV spektara (Slika 5.36.). Zaključuje se da je u pitanju angeloilpodofilotoksin, jedini konjugovani lignan otkriven u *A. sylvestris* [4, 31].



Slika 5.35. ESI(+)-MS² spektri angeloilpodofilotoksina, snimljeni pri kolizionim energijama 0–30 V.



Slika 5.36. UV spektri angeloilpodofilotoksina (puna linija) i podofilotoksina (isprekidana linija).

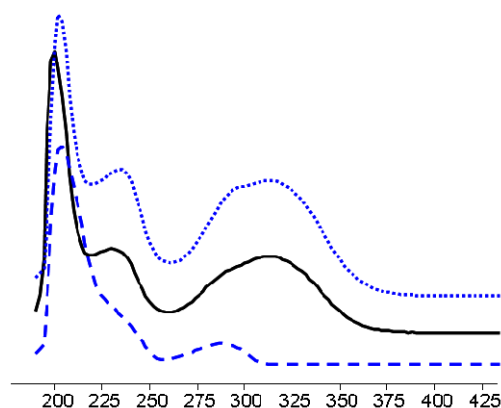


Slika 5.37. ESI(+)-Pseudo-MS³ spektri angeloilpodofilotoksina (prekursor $m/z=397$), snimljeni pri kolizionim energijama 0–30 V.

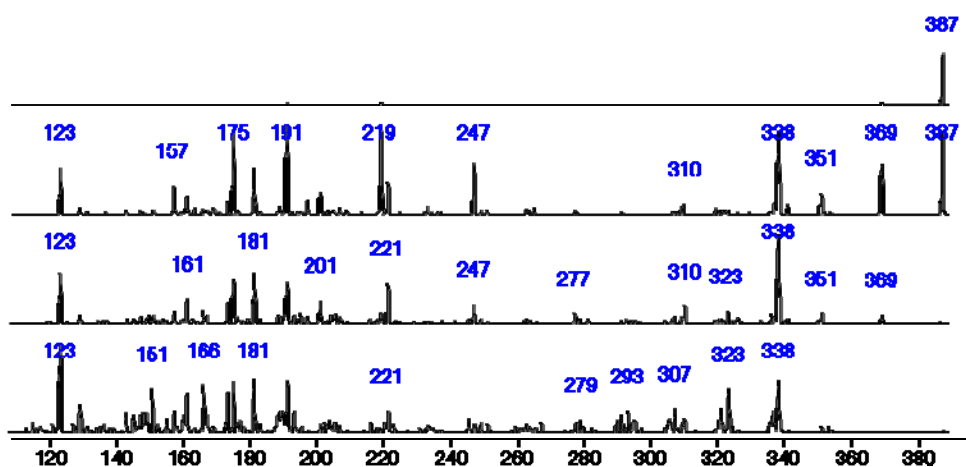
Lignan $M_w=386$ ($t_R=4,08$ min)

Ovaj pik, za razliku od velike većine lignana detektovanih u ispitivanim uzorcima, daje intenzivan signal u NI, što sugerise prisustvo slobodnih fenolnih OH grupa. UV spektar pokazuje maksimume na 200 nm, 230 nm i 313 nm (Slika 5.38.). U PI MS² spektru [M+H]⁺ jona (Slika 5.39.) uočava se ekstenzivna fragmentacija, sa dominantnim produktima: 369 [M+H–H₂O]⁺, 351 [M+H–2H₂O]⁺, 338 [M+H–H₂O–CH₃O•]⁺, 247, 219 [M+H–ArH]⁺ = [C+H]⁺, 191 [C+H–CO]⁺, 181, 175 [C+H–CO₂]⁺, 123 [A']⁺. Jon $m/z=219$ odgovara [M+H–ArH]⁺ jonu, uz trimetoksibenzen (uobičajeni bočni prsten kod *A. sylvestris* lignana) kao ArH, iz čega se zaključuje da je u pitanju ariltetralinski ili nezasićeni dibenzobutirolaktonski lignan. Nekoliko faktora potvrđuje lign-7-eno-9,9'-laktonsku (nez. dibenzobutirolaktonsku) strukturu:

- UV apsorpcioni maksimum na 313 nm sugerše proširenu delokalizaciju karakterističnu za lignenolaktone a odsutnu u ariltetralinima (Slika 5.38.),
- odsustvo fragmentacije u MS^1 spektru i veliki broj fragmenata pri $V_{col} \geq 10$ V (kod ariltetralina, jedina značajna tranzicija je gubitak ArH, do koga dolazi već i u jonskom izvoru),
- dva uzastopna gubitka molekula vode iz $[M+H]^+$ (kod ariltetralina dehidracija je moguća samo u slučaju 7-OH; u tom slučaju, gubi se samo jedan molekul H_2O , i odgovarajući proizvod daje intenzivan signal već i u MS^1),
- put fragmentacije alternativan gubitku ArH iz ciklizovanog jona, u kome nastaje $[A']^+$ jon, sa masom za 96 jedinica manjom od $[C+H]^+$ (u spektru su zaista detektovani intenzivni joni 219 i 123).



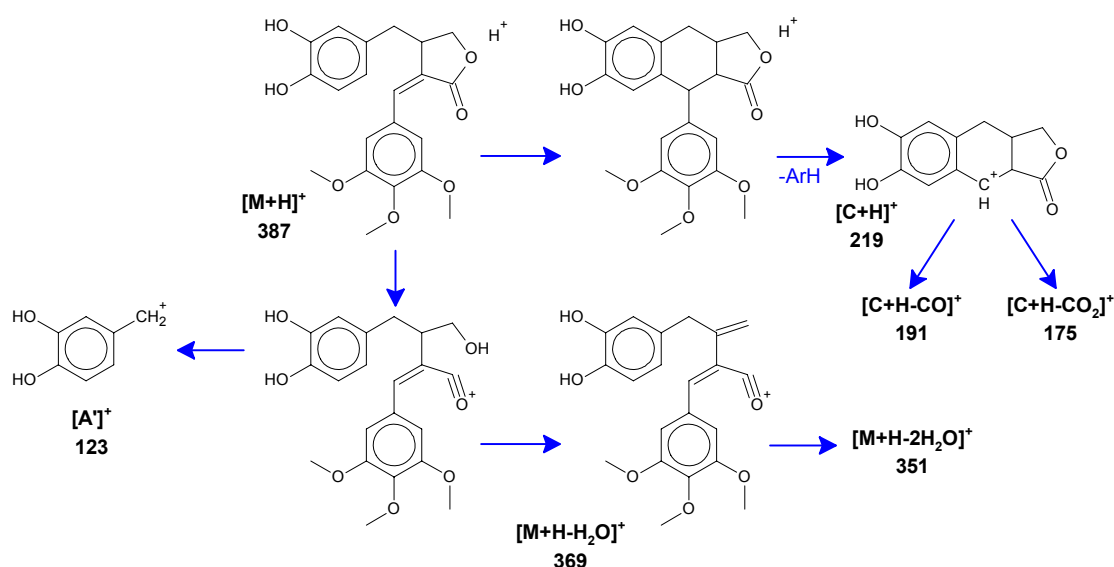
Slika 5.38. UV spektri 3,4,5-trimetoksi-3',4'-dihidroksilign-7-eno-9,9'-laktona (puna linija), deokspodofilotoksina (isprekidana linije) i nemerizina (tačkasta linija).



Slika 5.39. ESI(+) MS^2 spektri 3,4,5-trimetoksi-3',4'-dihidroksilign-7-eno-9,9'-laktona snimljeni pri kolizionim energijama 0–30 V.

Iz mase $[A']^+$ jona sledi dihidroksi- ili metilendioksi-supstitucija kondenzovanog aromatičnog prstena. Snažan signal u NI može se objasniti samo dihidroksi-supstitucijom. Na osnovu svih zapažanja, može se zaključiti da je jedinjenje 3,4,5-trimetoksi-3',4'-dihidroksilign-7-eno-9,9'-laktone (IUPAC ime [147]). Struktura i fragmentacija predloženog jedinjenja date su na Slici 5.40.

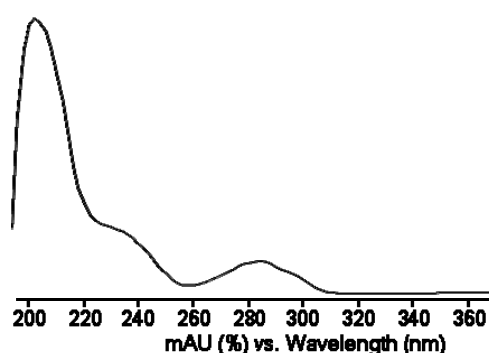
Konfiguraciju na C-8', kao i na dvostrukoj vezi između C-7 i C-8, nije bilo moguće utvrditi. Ovo jedinjenje nije do sada, zaključno sa 2007. godinom, zabeleženo u Dictionary of Natural Products [31].



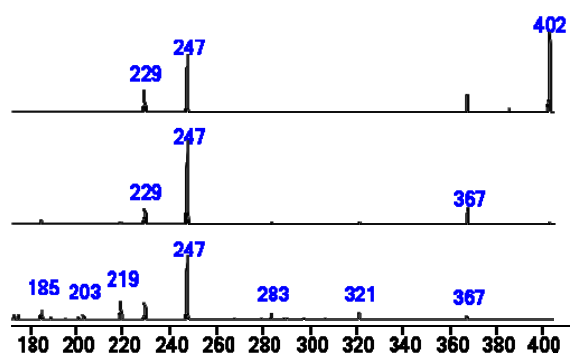
Slika 5.40. CID fragmentacija 3,4,5-trimetoksi-3',4'-dihidroksilign-7-eno-9,9'-laktona (pozitivna jonizacija).

Lignan $M_w=384$ ($t_R=4,24$ min)

Minorni pik na 4,24 min, detektovan kod pojedinih uzoraka, pokazuje u MS^1 i niskoenergetskim MS^2 spektrima (generisanim iz $[M+NH_4]^+$ jona zbog odsustva $[M+H]^+$) obrazac fragmentacije karakterističan za 7-hidroksiariltetralinske lignane – intenzivne 367 $[M+H-H_2O]^+$, 247 $[M+H-ArH]^+ = [B+H]^+$ i 229 $[B+H-H_2O]^+$ kao jedine produkte (Slika 5.42). UV spektar (Slika 5.41) sa apsorpcionim maksimumima na 202 nm, sh ~ 230 nm i 284 nm ukazuje na strukturu bez proširene delokalizacije, odn. da nije u pitanju lignenolakton. Pri višim kolizionim energijama, javljaju se dodatni fragmenti koji potiču od raspada $[M+H-H_2O]^+$ i $[B+H]^+$, što je dokazano pseudo- MS^3 spektrima ovih jona (Slika 5.43.). Prisustvo $[A+H]^+$ jona (nastalog sukcesivnim gubitkom H_2O i krotonolaktona) potvrđuje γ -butirolaktonsku strukturu u susedstvu 7-OH. Slab intenzitet $[A+H]^+$ verovatno ukazuje na *trans*-kondenzaciju laktonskog i tetralinskog prstena (β -vezan H-8'), analogno podofilotoksinu [270].

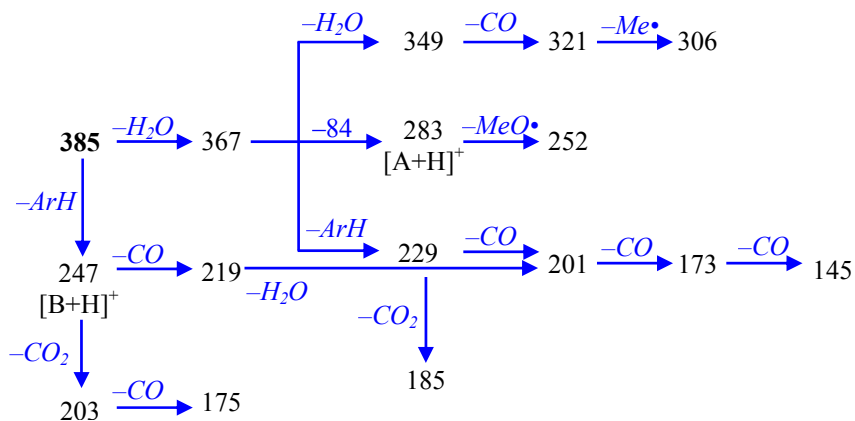


Slika 5.41. UV spektar lignana $t_R=4,24$ min.

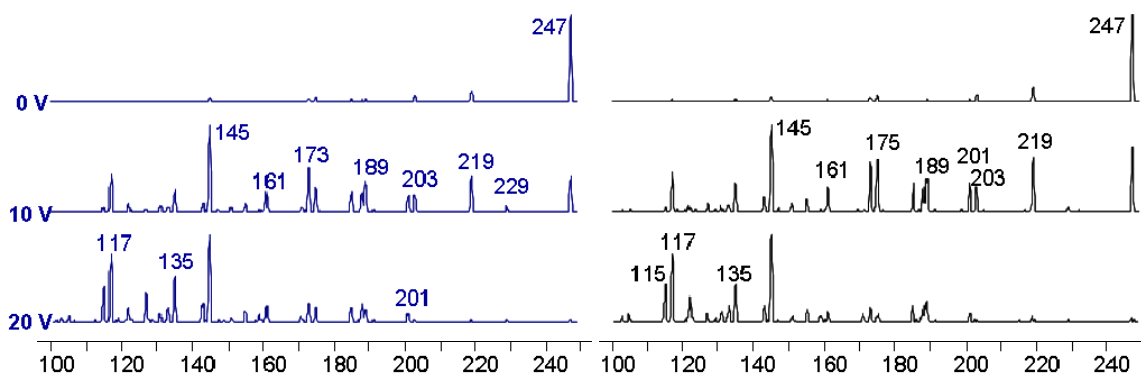


Slika 5.42. ESI(+) MS^2 spektar lignana $t_R=4,24$ min. Kao prekursor uzet je $[M+NH_4]^+$.

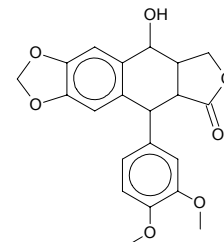
Pseudo- MS^3 spektar jona $[B+H]^+$ praktično je identičan odgovarajućem pseudo- MS^3 spektru kod podofilotoksina (Slika 5.44.), što je dokaz metilendioksi-supstitucije na kondenzovanom prstenu.



Slika 5.43 CID fragmentacija demetoxipodofilotoksina (pozitivna jonizacija).

Slika 5.44. Poređenje pseudo- MS^3 spektara $[B+H]^+$ jona podofilotoksina (levo) i lignana $t_r=4,24$ min (desno).

ArH mase 138 odgovara dimetoksi- ili hidroksi-metilendioksi-supstituisanom bočnom aromatičnom prstenu. Iz odsustva jakog signala u negativnom modu, kao i činjenice da hidroksi-metilendioksi-obrazac supstitucije na bočnom prstenu do sada nije pronađen kod *A. sylvestris* lignana, pretpostavljena je dimetoksilovana struktura (najverovatnije u uobičajenim pozicijama 3',4'). Sledi da je najverovatnije u pitanju 3'-demetoxipodofilotoksin (5'-demetoxipodofilotoksin, po numeraciji korišćenju u Dictionary of Natural Products), čija je struktura data na Slici 5.45. Ovo jedinjenje do sada nije detektovano u vrstama tribusa Scandiceae niti je, zaključno sa 2007. godinom, indeksirano u Dictionary of Natural Products [31].

Slika 5.45. Pretpostavljena struktura lignana $M_w=384$, $t_r=4,24$ min.

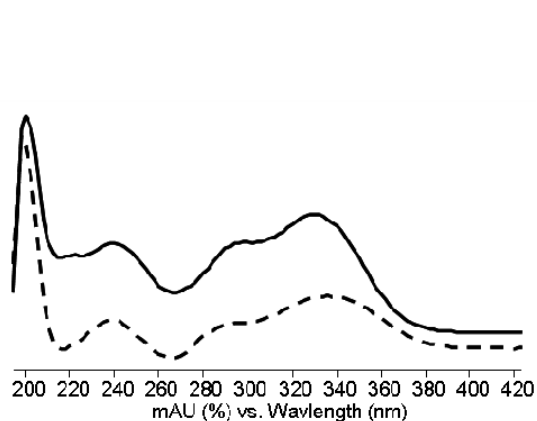
Lignani $M_w=368$ ($t_R=5,81$ min i $6,41$ min)

Detektovana su dva pika koji potiču od jedinjenja molekulske mase 368 Da, označeni sa 368A i 368B. U vrsti *A. sylvestris* do sada su identifikovana 4 lignana ove mase: nezasićeni dibenzilbutirolaktone jatrofan (suhilakton), izosuhilakton i herofilin (kerofilin), kao i ariltetralin morelensin (5'-demetoksideoksipodofilotoksin).

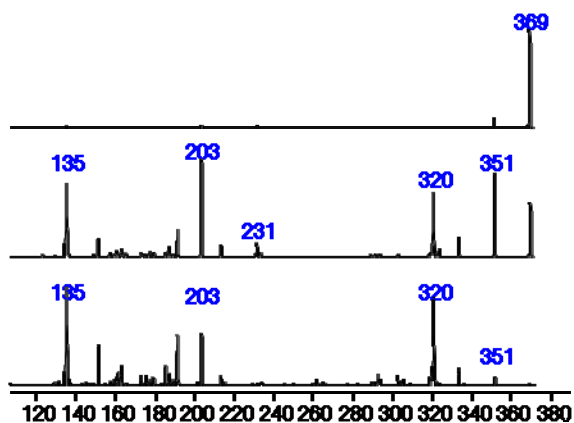
Kod oba pika u PI MS^1 nema detektabilnih fragmenata; signal u NI je odsutan, što sugeriše odsustvo slobodnih fenolnih grupa. UV spektri su jednaki (Slika 5.46.), sa maksimumima na 200 nm, 240 nm, 294 nm i 330 nm, i ukazuju na proširenu delokalizaciju. Maseni spektri drugog reda (Slika 5.47.) pokazuju izuzetnu sličnost, sa obrascem fragmentacije karakterističnim za nezasićene dibenzilbutirolaktone. Najznačajniji joni su: 351 $[M+H-H_2O]^+$, 333 $[M+H-2H_2O]^+$, 320 $[M+H-H_2O-CH_3O]^+$, 231 $[M+H-ArH]^+ = [C+H]^+$, 213 $[C+H-H_2O]^+$, 203 $[C+H-CO]^+$, 191, 151 i 135 $[A']^+$.

ArH mase 138 odgovara dimetoksi- ili hidroksi-metilendioksi-supstituisanom bočnom aromatičnom prstenu. Na osnovu činjenica diskutovanih kod demetoksipodofilotoksina, zaključuje se da je najverovatnije u pitanju 3,4-dimetoksilovana struktura.

Pseudo-MS³ analiza [C+H]⁺ jona nije bila moguća zbog delimičnog preklapanja sa pikom nemerozina (koji daje identičan jon). Međutim, na osnovu *m/z* može se zaključiti da je kondenzovani aromatični prsten metilendioksi-supstituisan. Ovako identifikovana 3,4-dimetoksi-3',4'-metilendioksilign-7-eno-9,9'-laktonska struktura odgovara herofilinu (*E*-izomer) i izoherofilinu (*Z*-izomer). MS² spektr dobijen pri sličnim uslovima od strane Schmidt i sar. [269] pokazuje veliku sličnost sa spektrima dobijenim u ovom radu, mada je intenzitet [C+H]⁺ znatno veći. Ranije eluirajući izomer identifikovan je kao herofilin. Izoherofilin je ranije identifikovan u vrsti *Bupleurum salicifolium* (Apiaceae) [31], ali u *A. sylvestris* do sada nije pronađen.



Slika 5.46. UV spektri lignana 368A (puna linija) i 368B (isprekidana linije) i pika 368B (tačkasta linija).



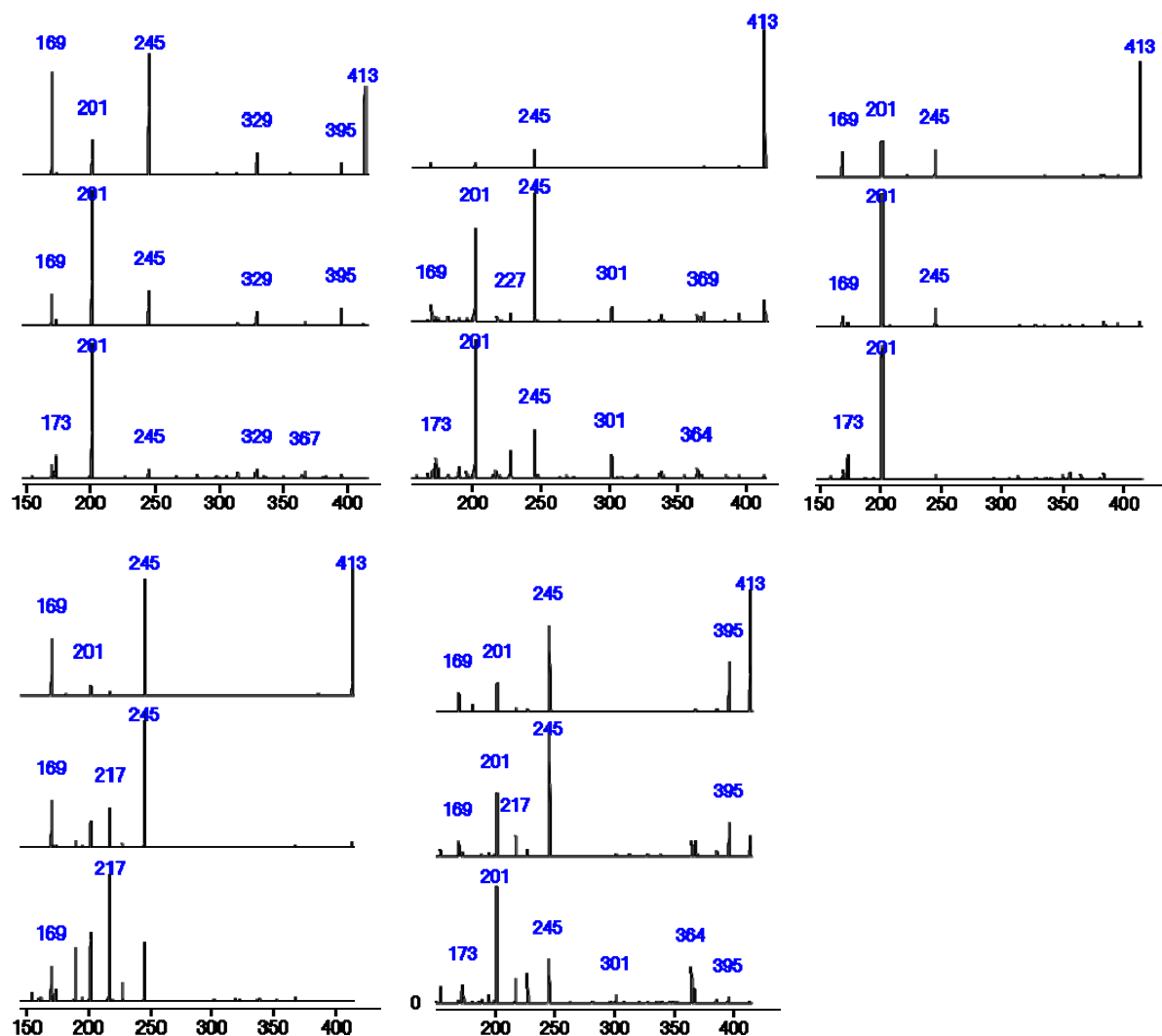
Slika 5.47. ESI(+) MS² spektri lignana 368A, snimljeni pri kolizionim energijama 0–20 V.

Lignani $M_w=412$

Na kraju, detektovan je niz pikova slabijeg intenziteta koji odgovaraju jedinjenjima mase 412, sa retencionim vremenima: 4,29 min (označen sa 412A), 4,39 min (412B), 4,55 min (412C), 4,83 min (412D) i 5,10 min (412E). Najzastupljenija su jedinjenja 412B i 412D. U svim slučajevima, u MS² spektru (Slika 5.48.) uočen je [M+H–ArH]⁺ jon *m/z* = 245. ArH mase 168 sugerise ariltetralinsku ili nezasićenu dibenzilbutirolaktonsku strukturu sa trimetoksilovanim bočnim prstenom. Univerzalno su prisutni i joni 201 [M+H–ArH–CO₂]⁺, 173=201–CO, 143=173–CH₂O, 115=143–CO, kao i neidentifikovani jon *m/z*=169 koji ne potiče iz [M+H–ArH]⁺ (utvrđeno pseudo-MS³ eksperimentom), ali bi mogao predstavljati njemu komplementaran [ArH+H]⁺ jon. U cilju potvrde ove pretpostavke, biće neophodni dodatni MSⁿ eksperimenti.

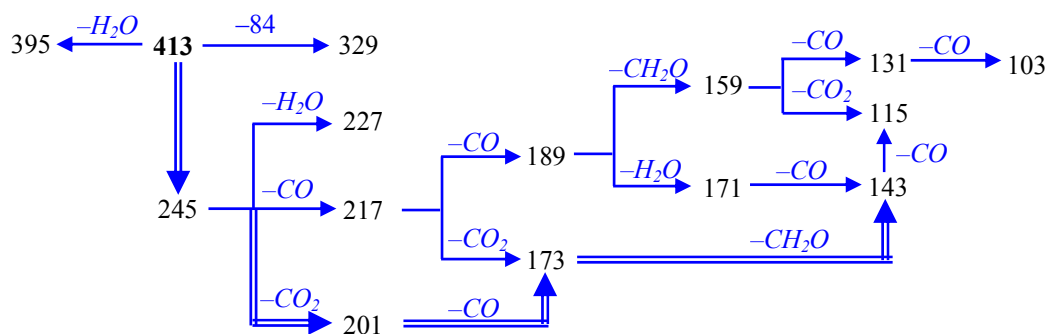
U spektrima pikova 412A i 412C uočava se mali broj fragmenata, sa masama za 2 jedinice manjim od odgovarajućih fragmenata podofilotoksina [265]: 245, 201, 173/171, 143, 115 (Slika 5.49.); ovo može ukazivati na dodatnu dvostruku vezu, možda u vidu karbonilne grupe u poziciji 7, što bi odgovaralo podofilotoksonu. UV spektar oba jedinjenja (205–206 nm, 240–242 nm, 280–288 nm i 326–328 nm) takođe odgovara podofilotoksonu (206 nm, 240 nm, 280 nm, 324 nm), kao i prisustvo fragmenata 245 i 201 [271].

Kod pika 412A jasno je uočljiv gubitak krotonolaktona iz [M+H–ArH]⁺ jona, što može značiti *cis*-kondenzaciju laktonskog i tetralinskog prstena, odn. (7'*R*, 8*R*, 8'*R*)-izomer (podofilotokson). U tom slučaju, pik 413C predstavljao bi (7'*R*, 8*R*, 8'*S*)-izomer (pikropodofilotokson). Kod jedinjenja 412A ostaje pitanje porekla uočenog 395 [M+H–H₂O]⁺ fragmenta, koji bi mogao ukazivati na prisustvo 7-OH, mada je moguć i gubitak vode iz latentne C-9 alkoholne grupe nakon otvaranja laktonskog prstena [265]. Budući da mehanizmi fragmentacije 7-okso-ariltetralinskih lignana još uvek nisu sistematski proučavani, data identifikacija ne može se smatrati definitivnom.



Slika 5.48. ESI(+) MS² spektri lignana 412A–412E, snimljeni pri kolizionim energijama 0–20 V.

U spektru 412D se pored fragmenata prisutnih u spektrima 412A i 412C uočava i niz dodatnih, koji se delom takođe mogu objasniti raspadom kondenzovanog sistema prstenova podofilotoksona ili njegovih izomera, analognom raspadu $[M+H-H_2O-ArH]^+$ podofilotoksina [269] (Slika 5.49.). UV spektar sličan je prethodnim jedinjenjima, sa apsorpcionim maksimumima na 205 nm, 237 nm, 280 nm i 322 nm.



Slika 5.49. Pretpostavljeni tok fragmentacije jedinjenjâ mase 412 (pozitivna jonizacija). Dvostruka linija – reakcije prisutne kod svih pikova.

Na kraju, pikovi 412B (najintenzivniji u grupi) i 412E pokazuju veliku međusobnu sličnost u pogledu UV spektara (maksimumi na 203–204 nm, 240 nm, 291–292 nm i 344 nm) i MS² spektara (pored uobičajenih jona, prisutni su 301, 227 i 217; 395 $[M+H-H_2O]^+$ i 364 $[M+H-H_2O-CH_3O]^+$)

su kod 413B izraženi, dok su kod 412B veoma slabi). Batohromni efekat u odnosu na ostale pikove u grupi implicira proširenu delokalizaciju, što može ukazivati na nezasićeni dibenzilbutirolaktonski skelet. Dok zbog koeluirajućih komponenti pik 412E nije vidljiv u negativnom modu, 412B pokazuje intenzivan signal, što je dokaz za prisustvo lako jonizabilne grupe (verovatno fenolne hidroksilne grupe). Iako identifikacija ova dva jedinjenja nije bila moguća, može se sa visokim stepenom sigurnosti reći da nisu u pitanju stereoizomeri podofilotoksina.

5.2.2. HEMIJSKI SASTAV EKSTRAKTA ISPITIVANIH VRSTA

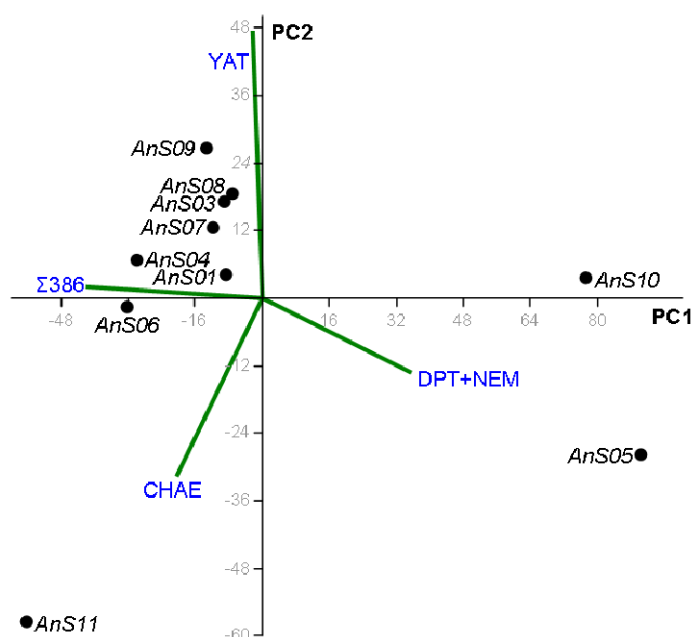
5.2.2.1. 70 % metanolni ekstrakti

Anthriscus sylvestris

Kao što se može videti iz *scan* hromatograma ekstrakata vrste *A. sylvestris* (Prilog 8.11), u pozitivnom modu dominantni pikovi potiču od lignana, pri čemu su najzastupljeniji nemerozin, jatein i deoksidofilotoksin. Biogenetski prekursori ovih jedinjenja: laricirezinol, sekoizolaricirezinol, matairezinol i 4,5-dimetiltujaplikatin, koji su ranije pronađeni u *A. sylvestris* [29, 277] nisu detektovani u ispitivanim uzorcima. Takođe nisu detektovani ni proizvodi 6-hidroksilacije deoksidofilotoksina/4'-demetildeoksidofilotoksina – α - i β -peltatin. S druge strane, dva neidentifikovana jedinjenja značajnog udela, molekulske mase 386, koja eluiraju na 5,13 min i 5,43 min, do sada nisu pronađena u ovoj vrsti.

Evidentno je da, što se lignana tiče, ne dolazi do kvalitativnih niti značajnijih kvantitativnih promena u toku razvoja biljke. S druge strane, ustanovljeno je se uzorci različitog geografskog porekla znatno razlikuju. Analizom glavnih komponenti (PCA) pokazano je da uzorak AnS11 (iz NP Sutjeska) karakteriše visok sadržaj herofilina u odnosu na fruškogorske uzorke, uz nizak udeo jateina (Slika 5.50.). Kod uzorka sa Kosmaja (AnS05) i kampa Bastasi (AnS10), povišen je udeo lignana mase 398 (deoksidofilotoksin i nemerozin), sadržaj herofilina je znatno niži, dok su jedinjenja mase 386 odsutna. Uzorci AnS05 i AnS10 međusobno se razlikuju po relativnom odnosu jateina i lignana mase 398. Konjugovani lignan – angeloilpodofilotoksin prisutan je u značajnim količinama samo u AnS10, i u manjoj meri AnS05.

Slični rezultati dobijeni su i poređenjem ekstrakata herbe. U pozitivnom modu, razlike su isključivo kvantitativne. Tipično je koncentracija datog jedinjenja u korenu od nekoliko puta do nekoliko desetina puta veća od odgovarajuće koncentracije u herbi (Tabela 5.3.).



Slika 5.50. PCA dominantnih jedinjenja iz intervala $t_R = 5-6,2$ min u ekstraktima korena *A. sylvestris*. Kao ulazni podaci korišćene su površine pikova normalizovane na pik nemerozina kao 100 %.

Tabela 5.3. Relativni sadržaj dominantnih lignana u ekstraktima korena i herbe *A. sylvestris*. Vrednosti su date kao površine pikova (sumirane površine svih značajnih jona datog jedinjenja) preračunate na koncentraciju (masu) injektovanog ekstrakta, i zatim radi preglednosti normalizovane na maksimalnu vrednost od 100.

		DPT	NEM	SYL	YAT	DPT	NEM	SYL	YAT
		Area/m				Odnos koren/herba			
AnS01	H	6,4	9,4	2,0	3,4	3,7	6,1	1,2	10,2
	K	23,9	57,2	2,4	34,7				
AnS03	H	7,0	11,2	2,3	6,2	4,8	5,3	1,8	8,6
	K	33,2	59,1	4,1	53,2				
AnS04	H	6,4	10,7	3,0	3,9	7,6	7,7	5,5	17,2
	K	48,7	82,0	16,7	66,7				
AnS05	H	21,6	3,4	0,8	3,5	2,4	11,9	4,2	4,3
	K	51,0	40,8	3,3	15,1				
AnS06	H	8,1	18,0	5,4	6,3	3,1	4,9	1,5	7,8
	K	25,1	87,5	8,2	49,0				
AnS07	H	9,1	18,1	5,3	7,9	6,0	5,5	1,5	10,1
	K	54,6	100,0	7,9	80,0				
AnS08	H	9,6	14,6	4,4	7,0	4,5	5,8	1,3	9,7
	K	43,8	84,4	5,6	67,6				
AnS10	H	20,8	3,8	1,2	3,0	4,5	22,6	7,1	21,4
	K	93,7	85,2	8,6	65,3				
AnS11	H	6,4	2,0	0,6	0,6	2,1	13,9	2,0	15,3
	K	13,3	28,3	1,2	8,7				

U pozitivnom modu, pored lignana uočava se i niz pikova manjeg intenziteta. U intervalu $t_R = 7,7-9,8$ min eluiraju neidentifikovana lipofilna jedinjenja.

Na početku svih hromatograma zapaža se *split*-ovani pik (maksimumi na 0,49 min i 0,53 min) sa najintenzivnijim jonom $381 [M+K]^+$ u PI, odn. $341 [M-H]^-$ i $377 [M+Cl]^-$ u NI, i bez signala u UV području. U MS^2 detektovan je niz fragmenata: $325 [M+H-H_2O]^+$, $307 [M+H-2H_2O]^+$, $289 [M+H-3H_2O]^+$, $181 [M+H-(\text{heksosa}-H_2O)]^+$, $163=181-H_2O$, $145=181-2H_2O$, $127=181-3H_2O$. Standard saharoze dao je takođe *split*-ovani pik sa identičnim MS^2 spektrom, na osnovu čega je zaključeno da je u pitanju saharoza ili neki drugi disaharid.

Na kraju, na 1,70 min detektovan je minorni pik jedinjenja $M_w = 192$, za koga je poređenjem retencionog vremena, UV i MS spektra sa referentnim standardom potvrđeno da predstavlja kumarin skopoletin.

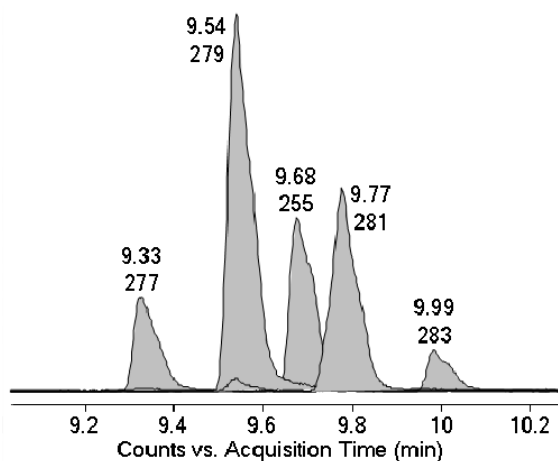
Hromatogram ekstrakta korena *A. sylvestris* snimljen u negativnom modu znatno je složeniji od odgovarajućeg PI hromatograma, sa preko 20 intenzivnih pikova. Dok veliki broj nije identifikovan, utvrđeno je da signali na 0,83 min (354 Da), 1,01 (354 Da), 1,86 (516 Da) i 2,38 min (516 Da) predstavljaju fenolna jedinjenja: 5-kafeoilhinsku („hlorogensku”), 1-kafeoilhinsku (ili neki drugi izomer), i dve izomerne dikafeoilhinske kiseline. U korenu, ali ne i herbi, izraženi su i pikovi podofilotoksina (4,52 min, 414) i dva neidentifikovana lignana $M_w = 412$ (4,39 min i 4,83 min).

U herbi su pored navedenih jedinjenja identifikovani i malonil-dikafeoilhinska kiselina (1,73 min, 602 Da), luteolin-O-heksozid (2,22 min, 449 Da), luteolin-O-malonilheksozid (2,83 min, 534 Da) i slobodni luteolin (3,99 min, 286 Da). Dok je u *scan* (MS^1) hromatogramima bilo moguće detektovati i identifikovati samo mali broj flavonoidnih jedinjenja, korišćenjem ciljane MS^2 (Precursor Ion Scan) analize utvrđeno je prisustvo najmanje 12 flavonoidnih glikozida, pri čemu dominiraju derivati luteolina i, u manjoj meri, metil-luteolina (Tabela 5.2.).

U svim NI hromatogramima se u intervalu 8,9–10,3 min uočava niz intenzivnih pikova, često višestruko veći od svih ostalih, koji potiču od veoma lipofilnih jedinjenja molekulske mase 250–312 (Slika 5.51.). Jedini vidljivi joni u MS^1 spektru su $[M-H]^-$ i $[2M-2H+Na]^-$ nije postignuta fragmentacija u MS^2 pri nižim kolizionim energijama. Pretpostavka da su u pitanju više masne

kiseline potvrđena je analizom smeše ovih jedinjenja, pripremljene saponifikacijom ulja lanenog semena, uklanjanjem neizreagovanih triglicerida ekstrakcijom metilen-hloridom, oslobađanjem slobodnih masnih kiselina sumpornom kiselinom i njihovom ekstrakcijom metilen-hloridom. U ekstraktu *A. sylvestris* identifikovane su linolenska kiselina ($t_R = 9,32$ min, 278 Da), linolna (9,53 min, 280 Da), palmitinska (9,67 min, 256 Da), oleinska (9,77 min, 282 Da) i stearinska kiselina (9,97 min, 284 Da).

U DAD hromatogramu, ističu se samo dva intenzivna pika, koji potiču od nemerozina i herofilina.



Slika 5.51. EIC hromatogrami masnih kiselina u ekstraktu herbe AnS10 (negativni mod).

Anthriscus cerefolium

Za razliku od ekstrakta korena *A. sylvestris*, kod *A. cerefolium* je u pozitivnom modu detektovan mali broj komponenti (Prilog 8.11.), od kojih je u ovom trenutku bilo moguće identifikovati samo saharozu i minorni pik skopoletina. U cilju identifikacije lipofilnih komponenti sa $t_R = 4,67$ min (246 Da), 5,66 min (328 Da), 6,11 min (330 Da) i 8,3–9,7 min, biće neophodni dodatni MSⁿ eksperimenti.

Korišćenjem MS² skrininga bilo je moguće detektovati i niz flavonoida; utvrđeno je da su za ovu vrstu karakteristični *O*-glikozidi luteolina i apigenina (Tabela 5.2.).

Dominantni pikovi u negativnom modu potiču od acetyl-malonildikafeoilhinske (2,63 min, samo u AnT10) i izomernih malonildikafeoilhinskih kiselina ($t_R = 1,71$ min i 1,99 min), pomenutih jedinjenja mase 328 i 330, i slobodnih viših masnih kiselina: linolenske, linolne, palmitinske, oleinske i stearinske.

Chaerophyllum bulbosum

U negativnom modu, u ekstraktima herbe *Ch. bulbosum* detektovan je niz fenolnih komponenti (Prilog 8.11.). Identifikovani su malonil-dikafeoilhinska kiselina (1,77 min, 602 Da), luteolin (3,96 min, $M_w = 286$ Da) i njegovi *O*-glikozidi: heksozid (2,21 min, 448 Da), malonilheksozid (2,82 min, 534 Da) i acetylheksozid (3,79 min, 490 Da), *O*-glikozidi kvercetina: heksozid (2,34 min, 464 Da), malonilheksozid (2,39 min, 550 Da) i acetylheksozid (2,82 min, 506 Da), kao i masne kiseline: linolenska, linolna, palmitinska, oleinska i stearinska. Luteolin-heksozid, malonilheksozid, kvercetin-heksozid i acetylheksozid predstavljaju dominantne pikove u DAD hromatogramu ekstrakta herbe. Koncentracija fenolnih jedinjenja znatno je veća u herbi nego u korenu.

U pozitivnom modu uočava se mali broj intenzivnih pikova, pri čemu za sada nijedan nije bilo moguće identifikovati. Dva pika na 4,76 min i 5,58 min potiču od heksozida i slobodnog aglikona nepoznate strukture. Neparna vrednost molekulske mase aglikona od 229 Da ukazuje, na osnovu azotnog pravila, na prisustvo neparnog broja atoma azota u molekulu. U MS² takođe se vidi gubitak

NH₃ iz protonovanog molekula. U UV spektru uočljivi su apsorpcioni maksimumi na 223 nm i 325 nm, što ukazuje na proširenu delokalizaciju, dok su u MS² spektru dominantni joni 213, 197, 184, 167, 145 i 130 (poslednji vidljiv i u MS¹).

Pik na 6,10 min odgovara jedinjenju mase 330, detektovanom i u ostalim vrstama. Jedinjenje ne pokazuje apsorpciju u UV području $\lambda > 250$ nm. MS² i pseudo-MS³ eksperimentima dobijeni su sledeći fragmenti: 295 [M+H-2H₂O?]⁺ (fragmentiše na 277=295-H₂O, 259=277-H₂O, 251=295-CO₂, 215=259-CO₂), 277=295-H₂O, 213 (daje produkte 195, 177 i niz fragmenata manje mase) i 195=213-H₂O.

Na 1,72 min detektovan je minorni pik skopoletina. Lignani su detektovani samo u tragovima. Koncentracija deoksidofilotoksina i nemerozina u ekstraktu korena je nekoliko stotina puta niža, a jateina oko 1000 puta niža od prosečne koncentracije u ekstraktu korena *A. sylvestris*.

Chaerophyllum hirsutum

Ekstrakti korena i herbe *Chaerophyllum hirsutum* pokazuju u negativnom modu veliku sličnost (Prilog 8.11.). Dominantne komponente u hromatogramu su hlorogenske kiseline: 5-kafeoilhinska kiselina (0,81 min, 354 Da), malonil-dikafeoilhinska kiselina (1,71 min, 602 Da), dikafeoilhinske kiseline (1,81 min, 1,86 min i 2,22 min, 516 Da) acetil-kafeoilhinska (3,34 min, 558 Da) i acetil-malonil-dikafeoilhinska kiselina (3,19 min, 644 Da). Detektovan je i niz flavonoida: luteolin (4,02 min, 286 Da) i njegov O-heksozid (2,22 min, 448 Da) i acetilheksozid (3,85 min, 490 Da), kao i rutin (2,28 min, 610 Da), masne kiseline (linolenska, linolna, palmitinska, oleinska i stearinska) i saharoza (0,49 min, 342 Da).

U pozitivnom modu, u korenu je detektovano nepoznato jedinjenje $M_w = 222$, $t_R = 1,81$ min, koje u MS² spektru daje fragmente: 208 [M+H-CH₃•]⁺, 190 [M+H-CH₃•-H₂O]⁺, 179 [M+H-CO₂]⁺ ili 208-CO/CH₂=CH₂, 162 = 190-CO/CH₂=CH₂, 135 [M+H-2CO₂]⁺, 117 = 135-H₂O, 107 = 135-CO/CH₂=CH₂. Brojni gubici CO, CO₂ i H₂O mogli bi da ukazuju na trikarboksilnu kiselinu. Pored slobodnog jedinjenja, detektovani su i odgovarajući heksozid (0,96 min, 384 Da) i acetilheksozidi (1,45 min i 1,60 min, 426 Da).

Lignani su prisutni u tragovima u herbi uzorka ChH03, sa koncentracijom deoksidofilotoksina u ekstraktu ~100 puta nižom od koncentracije u korenu *A. sylvestris*, a odgovarajućom koncentracijom nemerozina ~1000 puta nižom.

Chaerophyllum temulentum

U PI hromatogramu (Prilog 8.11.) ekstrakta korena *Ch. temulentum* dominira intenzivan pik skopoletina na 1,70 min, kao i neidentifikovana lipofilna komponenta $t_R = 6,10$ min $M_w = 330$. U ekstraktu herbe (u pozitivnom i negativnom modu) identifikovane su hlorogenske kiseline – 5-kafeoilhinska (0,81 min), dikafeoilhinske (1,85 min, 2,38 min), acetil-dikafeoilhinska kiselina (3,28 min), malonil-dikafeoilhinske (1,46 min, 1,73 min) i acetil-malonil-dikafeoilhinska kiselina (3,13 min). Koncentracija skopoletina u herbi višestruko je niža nego u korenu.

Flavonoidi su detektovani samo korišćenjem ciljanog MS². Detektovani su O-glikozidi kvercetina – 3-rutinozid (rutin), 3-galaktozid (hiperozid) i acetilheksozid, kao i heksozid, malonilheksozid i acetilheksozid neidentifikovanog aglikona mase 286.

Lignani su takođe detektovani samo u tragovima, uz koncentraciju deoksidofilotoksina, nemerozina i jeteina za tri reda veličine nižu od ekstrakta *A. sylvestris*.

Scandix pecten-veneris

U hromatogramu (Prilog 8.11.) ekstrakta herbe *S. pecten-veneris* bilo je moguće identifikovati većinu komponenti. Dominantni pikovi potiču od hlorogenskih kiselina, flavonoida, masnih

kiselina, saharoze, i neidentifikovanih jedinjenja mase 328 (5,74 min) i 330 (6,19 min), već detektovanih kod ostalih vrsta. Od hlorogenskih kiselina, pronađene su 5-kafeoilhinska (0,81 min), dikafeoilhinska (1,90 min), acetil-dikafeoilhinska (3,35 min), malonil-dikafeoilhinske (1,51 min i 1,77 min) i acetil-malonil-dikafeoilhinska kiselina (3,19 min). Što se tiče flavonoida, MS¹ eksperimentima pronađeni su samo luteolin (4,04 min) i njegovi *O*-glikozidi: heksozid-heksuronozid (1,60 min, 624 Da), heksozid (2,26 min, 448 Da), malonilheksozid (2,88 min, 534 Da) i acetilheksozid (3,84 min, 490 Da). Ciljanim MS² skriningom bilo je moguće detektovati i tragove apigenin-acetilheksozida (4,41 min, 474 Da) kao jedinog neluteolinskog glikozida. Pikovi heksozida i malonilheksozida predstavljaju dominantne pikove u DAD hromatogramu.

U ekstraktu korena identifikovano je samo nekoliko pikova hlorogenskih kiselina, kao i skopoletin. Poređenjem korena i herbe može se zaključiti da je herba znatno bogatija fenolnim jedinjenjima – flavonoidima i fenolnim kiselinama.

5.2.2.2. Vodeni ekstrakti

S obzirom na veoma visoku polarnost vode, moglo bi se očekivati da će vodeni ekstrakti biti bogatiji hidrofilnim biomolekulima (šećeri, karboksilne kiseline, glikozilovani flavonoidi) a siromašniji lipofilnim (permetilovani lignani, flavonoidni aglikoni, triacilgliceroli i masne kiseline) od 70 % MeOH-ekstrakata. Međutim, utvrđeno je [272] da je subkritična vrela voda dobar ekstragens i za nepolarnija jedinjenja (zbog čega postaje popularna alternativa zapaljivim i toksičnim organskim rastvaračima, naročito u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji), i na 85 °C ima ekstrakcionu moć i selektivnost veoma sličnu 70 % EtOH. Pritom, postupak maceracije daje rezultate uporedive sa ASE (*accelerated solvent extraction*) na 85–100 °C. Naravno, budući da su mnogi sekundarni biomolekuli termolabilni, može se očekivati degradacija određenih klasa jedinjenja (ASE eksperimenti pokazali su da prinos većine ispitivanih jedinjenja značajno opada na temperaturama iznad 100 °C).

Hromatogrami svih pripremljenih vodenih ekstrakata, upoređeni sa hromatogramima odgovarajućih 70 % MeOH ekstrakata, dati su u Prilogu 8.12.. Dok kod polarnijih jedinjenja nisu uočene pravilnosti, sadržaj lipofilnijih jedinjenja ($t_R > 4-5$ min) tipično je niži u vodenim ekstraktima. Ovo naročito važi za masne kiseline, čiji su pikovi veoma intenzivni u NI hromatogramima 70 % MeOH ekstrakata, dok su kod vodenih zanemarljivi (sem palmitinske kiseline).

Profil odn. relativno odnos dominantnih komponenti u PI hromatogramu – lignana – kod vrste *Anthriscus sylvestris* praktično je nezavisan od ekstragensa. Međutim, prinos je višestruko niži kod vodenih ekstrakata. Što se tiče polarnijih jedinjenja ($t_R < 5$ min) uočljivih u NI (pretpostavlja se, jedinjenja fenolne strukture), kod herbe sadržaj je relativno uporediv u hromatogramima vodenog i 70 % MeOH ekstrakta, dok je kod korena udeo u vodenim ekstraktima mnogo niži (mnogi od pikova intenzivnih u hromatogramu alkoholnog ekstrakta nedetektabilni su kod vodenog). Jedino jedinjenje kod koga je uočen značajan porast udela, sa $t_R = 4,96$ min i $M_w = 404$ Da, vidljivo samo u negativnom modu, za sada nije bilo moguće identifikovati.

Kod vrste *Anthriscus cerefolium* sadržaj polarnijih jedinjenja (koja su za sada uglavnom neidentifikovana) sličan je kod vodenih i alkoholnih ekstrakata. Pikovi malonilovanih hlorogenskih kiselina (malonil-diCQA, acetil-malonil-diCQA), kao i niza neidentifikovanih komponenti, znatno su niži ili odsutni. Sadržaj fenolnih komponenti u vodenom ekstraktu herbe *Cheerophyllum bulbosum* takođe je niži nego u alkoholnim ekstraktima. Ovo je naročito izraženo kod manje polarnih jedinjenja – luteolina i luteolin-*O*-acetilheksozida, kao i malonil-dikafeoilhinske kiseline (za koju se može očekivati da podleže degradaciji). S druge strane, profil i sadržaj polarnih jedinjenja u *Chaerophyllum hirsutum* veoma je sličan kod vodenih i alkoholnih ekstrakata, sem dodatnog pika malonil-diCQA na 1,54 min i u korenu i u herbi, koji je mogao nastati izomerizacijom. Profili polarnih jedinjenja u pozitivnom modu praktično su identični i kod *Scandix pecten-veneris*, dok se u negativnom modu uočava znatno niži sadržaj ili odsustvo niza jedinjenja – luteolina i njegovih *O*-heksozida i *O*-acetilheksozida, kao i acetil- i malonil-diCQA.

5.3. KVANTITATIVNA ANALIZA EKSTRAKATA

5.3.1. LC-MS KVANTIFIKACIJA FENOLNIH JEDINJENJA

Razvoj i optimizacija metode

U cilju kvantifikovanja sadržaja fenolnih kiselina (benzoevih i hidroksicimetnih), kumarina, flavonoida i lignana u ispitivanim ekstraktima, razvijena je LC-MS / LC-MS-MS metoda. Hromatografski parametri korišćeni za potrebe kvalitativne analize (Zorbax Eclipse XDB-C18 50 mm × 4,6 mm × 1,8 μm kolona, mobilna faza na bazi 0,05 % HCOOH + 200 μg/mL CH₃COONH₄ i metanola, u gradijentnom režimu) rezultovali su zadovoljavajućim razdvajanjem standardâ uz prihvatljivo trajanje, te su odabrani kao osnova za kvantitativnu metodu. Kod reverznofazne hromatografije fenolnih jedinjenja, dodatak kiselina (kao što je mravlja kiselina) u mobilnu fazu povoljno utiče na oblik pikova i razdvajanje putem suzbijanja disocijacije. S druge strane, preliminarna ispitivanja pokazala su da visoke koncentracije kiseline (1 % V/V) dovode do značajne supresije signala u negativnom modu, odn. smanjenja prinosa [M-H]⁻. Odabrana koncentracija od 0,05 % pokazala se pogodnom za kvantitativnu analizu..

Budući da su performanse hromatografske metode bile zadovoljavajuće pristupilo se izboru parametara masenog spektrometra, koja je obuhvatila izbor prekursora za svaki analit, optimizaciju napona fragmentora, izbor produkta (za jedinjenja koja će biti analizirana u MS² modu) i optimizaciju napona kolizione ćelije odn. energije kolizije.

Uz korišćenu mobilnu fazu i pri datim parametrima jonskog izvora, svi analiti davali su intenzivan [M-H]⁻ jon uz praktično odsutne nepoželjne adukte [M+Cl]⁻, [M+HCOO]⁻, [M+CH₃COO]⁻ i [M+H₂PO₄]⁻. Stoga, [M-H]⁻ joni odabrani su kao prekursori za sve analite.

Dalje, za svako od jedinjenja bilo je potrebno definisati napon fragmentora (napon između ulazne kapilare i prvog skimera) V_{frag} pri kome se postiže maksimalna koncentracija prekursora. Smeša standarda analizirana je u MS2SIM modu pri naponima u intervalu 80–140 V (uz inkremente od po 10 V). Grafički je predstavljena zavisnost površine pika [M-H]⁻ u EIC hromatogramu od V_{frag} (Prilog 8.17.) i procenjena vrednost koja daje maksimalan odgovor (Tabela 4.5.).

Sledeći korak obuhvatio je snimanje MS² spektara (Product Ion Scan mod) pri optimalnom naponu fragmentora i naponu kolizione ćelije V_{col} u intervalu 0–40 V (u inkrementima od po 10 V), a u cilju izbora najpogodnije tranzicije, koja će u isto vreme obezbediti selektivnost i osetljivost. Spektri su dati u (Prilog 8.16.). Za većinu fenolnih kiselina, najznačajnija fragmentacija je gubitak CO₂ iz karboksilne grupe. Kod *O*-metilovanih derivata, odabrani su specifičniji fragmenti nastali demetilacijom, dok je kod hlorogenske kiseline najznačajniji gubitak ostatka kafene kiseline. U spektrima flavonoidnih *O*-glikozida – rutina i apigenin-7-*O*-glukozida – jedini vidljivi fragment je [Y₀-H]⁻, nastao homolitičkim cepanjem glikozidne veze [255]. Kod tri flavonoidna aglikona – kvercetina, luteolina i apigenina – uočena je dobro definisana fragmentacija, uz najznačajniji produkt [^{1,2}A-CO]⁻ ($m/z = 151$) kod kvercetina, ^{1,3}B⁻ ($m/z = 133$) kod luteolina i ^{1,3}B⁻ ($m/z = 117$) kod apigenina. Međutim, kod četvrtog jedinjenja iz grupe – kemferola – fragmentacijom je dobijen veliki broj produkata, što bi rezultiralo niskom osetljivošću. Zbog toga je odlučeno da flavonoidni aglikoni budu analizirani u MS¹ (MS2SIM) modu.

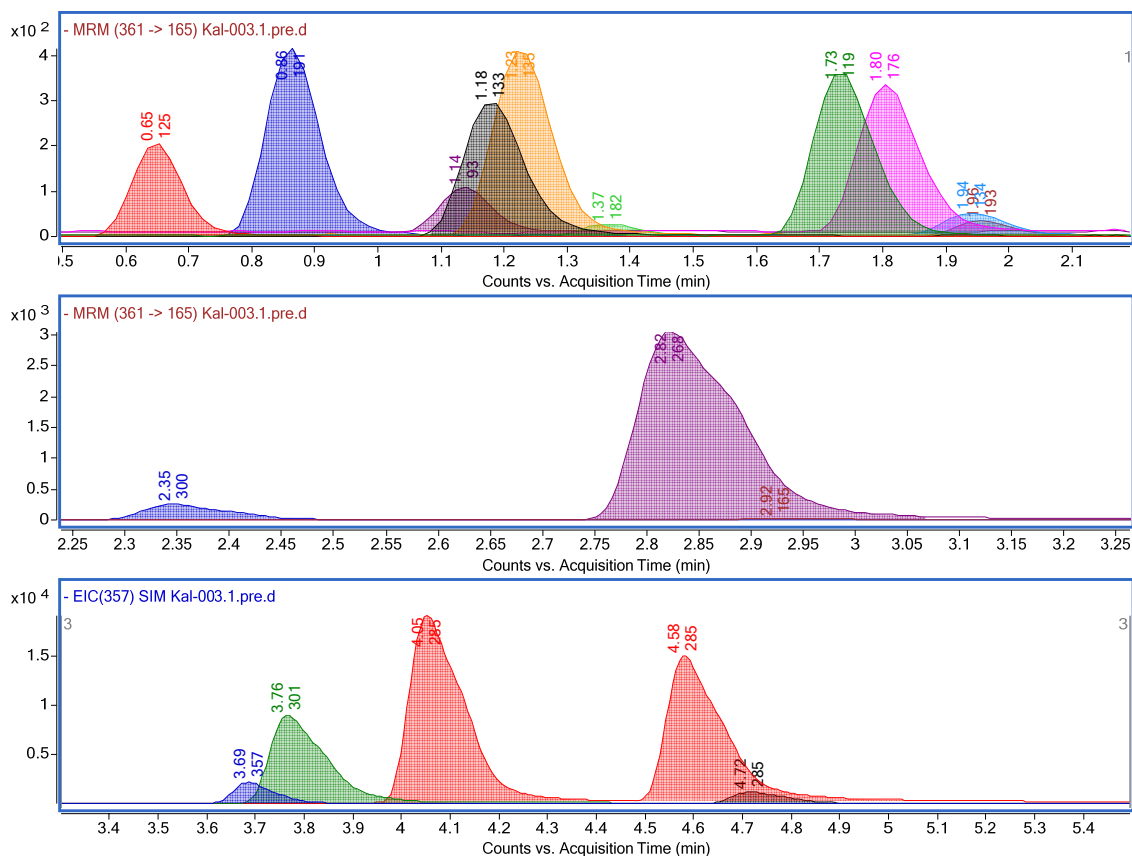
U okviru poslednje faze – optimizacije kolizione energije – smeša standarda analizirana je u MRM (multiple reactions monitoring) modu, koristeći prethodno određene optimalne tranzicije i napone fragmentora, uz variranje napona kolizione ćelije V_{col} u opsegu 0–50 V (inkrementi 5–10 V). Za svaku tranziciju konstruisana je kriva zavisnosti površine pika od V_{col} (Prilog 8.17.) i procenjena vrednost koja daje maksimalan odgovor (Tabela 4.5.).

Kalibracija i kvantitacija

Kalibracione krive pripremljene su analizom serije standarda u širokom opsegu, 0,04–10 μg/mL za apigenin i 0,4–100 μg/mL za ostale analite (primer hromatograma standarda dat je na Slici 5.52.),. Kalibracione krive (Prilog 8.18.) konstruisane su u Origin Pro 8.0724 softveru

(OriginLab Corporation) i vrednosti koncentracija u uzorcima očitane direktno korišćenjem regresione jednačine. U slučaju nižih koncentracija analita, korišćene su dodatne kalibracione krive u užem opsegu. Treba napomenuti da su u mnogim slučajevima, naročito kod krivih u punom opsegu koncentracija, zabeležena sistematska odstupanja od linearnosti, koja se mogu pripisati delimičnom zasićenju detektora.

Rezultati određivanja sadržaja odabranih fenolnih jedinjenja u ispitivanim ekstraktima dati su u Tabeli 5.4.



Slika 5.52 Hromatogram standarda $C \approx 3$ ng/mL (tri vremenska segmenta – dva MRM i jedan MS2SIM – prikazana su odvojeno).

Zapaža se nizak sadržaj benzoevih kiselina (galna, siringinska, *p*-hidroksibenzoeva), koji ni u jednom uzorku ne prelazi 0,16 mg/g (0,016 %). S druge strane, sadržaj hidroksicimetnih kiselina je znatno viši. Najzastupljenija je 5-*O*-kafeoilhinska (hlorogenska) kiselina, koja u uzorcima *Anthriscus sylvestris* dostiže i do 9 mg/g (0,9 %), i nešto niže koncentracije u *Chaerophyllum hirsutum*. Ferulna kiselina prisutna je u većini uzoraka, mada u relativno niskim koncentracijama (do 0,09 %). Što se kumarina tiče, male količine eskuletina detektovane su u nekim uzorcima, dok je skopoletin znatno zastupljeniji, naročito u korenu. Najveće koncentracije (do 0,09 %) detektovane su u *Chaerophyllum temulentum*.

Zbog nedostupnosti standardâ, kvantitacija lignana nije bila moguća, sem sekoizolaricirezinola i matairezina. Dok prvo jedinjenje nije detektovano ni u jednom uzorku, male količine matairezina pronađene su u korenu *A. sylvestris*, što se možda može protumačiti potpunim utroškom ovih intermedijera za biosintezu jateina, deoksi-podofilotoksina, podofilotoksina, nemerazina i silvestrina.

Sadržaj flavonoidnih aglikona uglavnom je bio vrlo nizak, ispod 0,1 mg/g, sem luteolina koji je dostizao do 0,25 mg/g.

Poređenjem vodenih i 70 % metanolnih ekstrakata uočava se da je u većini slučajeva sadržaj fenola znatno niži u vodenim ekstraktima, što se može objasniti manjom polarnošću rastvarača. Izuzeci su kafena i ferulna kiselina, skopoletin i, u nekim slučajevima, apigenin-7-*O*-glukozid.

Tabela 5.4. Rezultati kvantitativne LC-MS i LC-MS-MS analize odabranih fenola u ekstraktima. GA – galna kiselina, CQA – hlorogenska k., HBA – p-hidroksibenzoeva k., AES – eskuletin, CA – kafena k., SYR – siringinska k., COU – kumarinska k., SCO – skopoletin, FER – ferulna k., SYN – sinapinska k., RUT – rutin, A7G – apigenin-7-O-glukozid, SEC – sekoizolaricirezinol, MAT – matairezinol, QUE – kvercetin, LUT – luteolin, KAE – kemferol, API – apigein.

	GA	CQA	HBA	AES	CA	SYR	COU	SCO	FER	SYN	RUT	A7G	SEC	MAT	QUE	LUT	KAE	API
AnS01K-Ex(70M)	< 0,08*	2,51	< 0,08	< 0,08	0,103	< 0,08	< 0,08	< 0,08	< 0,08	< 0,08	< 0,08	< 0,09	< 0,08	< 0,08	< 0,07	< 0,08	< 0,08	< 0,008
AnS03K-Ex(70M)	< 0,07	3,51	< 0,07	< 0,08	0,132	< 0,07	< 0,08	0,0963	< 0,08	< 0,08	< 0,08	< 0,08	< 0,07	0,184	< 0,07	< 0,07	< 0,08	< 0,007
AnS04K-Ex(70M)	< 0,06	0,644	< 0,06	< 0,06	0,276	< 0,06	< 0,06	< 0,06	0,0651	< 0,06	< 0,06	< 0,06	< 0,06	< 0,06	< 0,05	< 0,06	< 0,06	< 0,006
AnS05K-Ex(70M)	< 0,08	1,21	< 0,08	< 0,08	< 0,08	< 0,08	< 0,08	< 0,08	0,0844	< 0,08	< 0,08	< 0,08	< 0,08	< 0,08	< 0,07	< 0,08	< 0,08	< 0,008
AnS06K-Ex(70M)	< 0,08	0,911	< 0,08	< 0,08	< 0,08	< 0,08	< 0,08	0,190	0,0954	< 0,08	< 0,08	< 0,08	< 0,08	< 0,08	< 0,07	< 0,08	< 0,08	< 0,008
AnS07K-Ex(70M)	< 0,08	3,69	< 0,08	< 0,08	0,180	< 0,08	< 0,08	0,207	0,170	< 0,08	< 0,08	< 0,08	< 0,08	< 0,08	< 0,07	< 0,08	< 0,08	< 0,008
AnS08K-Ex(70M)	< 0,08	9,00	< 0,08	< 0,09	0,176	< 0,08	< 0,09	0,130	0,160	< 0,09	< 0,09	< 0,09	< 0,08	0,215	< 0,08	< 0,08	< 0,09	< 0,008
AnS09K-Ex(70M)	< 0,07	7,15	< 0,07	< 0,08	0,0889	< 0,07	< 0,08	0,189	0,0845	< 0,08	< 0,08	< 0,08	< 0,07	0,220	< 0,07	< 0,07	< 0,08	< 0,007
AnS10K-Ex(70M)	< 0,08	2,15	< 0,08	< 0,08	< 0,08	< 0,08	< 0,08	< 0,08	0,771	< 0,08	< 0,08	< 0,08	< 0,08	< 0,08	< 0,07	< 0,08	< 0,08	< 0,008
AnS11K-Ex(70M)	< 0,08	0,992	< 0,08	< 0,08	< 0,08	< 0,08	< 0,08	< 0,08	0,890	< 0,08	< 0,08	< 0,09	< 0,08	< 0,08	< 0,07	< 0,08	< 0,08	< 0,008
AnC10K-Ex(70M)	< 0,04	0,194	0,0731	< 0,05	< 0,04	< 0,04	< 0,05	< 0,04	0,0559	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,05	< 0,004
AnC11K-Ex(70M)	< 0,04	0,297	0,0465	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	0,0818	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,004
AnC12K-Ex(70M)	< 0,04	0,210	< 0,04	0,0445	< 0,04	< 0,04	< 0,04	0,0410	0,131	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,03	< 0,04	< 0,04	< 0,004
AnC13K-Ex(70M)	< 0,04	0,200	< 0,04	0,0923	< 0,04	< 0,04	< 0,04	0,0734	0,171	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,03	< 0,04	< 0,04	< 0,004
AnC14K-Ex(70M)	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	0,0599	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,004
AnC15K-Ex(70M)	< 0,03	0,0673	< 0,03	< 0,04	< 0,03	< 0,03	< 0,04	< 0,03	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,03	< 0,03	< 0,03	< 0,03	< 0,04	< 0,003
AnC16K-Ex(70M)	< 0,04	0,199	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	0,0955	0,170	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,004
AnC17K-Ex(70M)	< 0,04	0,0550	< 0,04	0,0451	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	0,0804	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,004
ChB01K-Ex(70M)	< 0,03	< 0,03	0,0478	< 0,04	< 0,03	< 0,03	< 0,04	< 0,03	0,119	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,03	< 0,03	< 0,03	< 0,03	< 0,04	< 0,003
ChB02K-Ex(70M)	< 0,03	0,0946	< 0,03	< 0,03	< 0,03	< 0,03	< 0,03	0,0327	0,215	< 0,03	< 0,03	< 0,03	< 0,03	< 0,03	< 0,03	< 0,03	< 0,03	< 0,003
ChH01K-Ex(70M)	< 0,04	0,956	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	0,0787	0,0828	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,004
ChH02K-Ex(70M)	< 0,04	1,986	0,0504	< 0,04	< 0,04	0,0393	< 0,04	0,099	0,105	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	0,0501	< 0,03	< 0,04	< 0,04	< 0,004
ChH03K-Ex(70M)	< 0,04	0,264	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	0,0843	0,0819	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,004
ChT01K-Ex(70M)	< 0,04	0,171	0,0492	< 0,04	< 0,04	0,0422	0,0585	0,425	0,210	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,004
ChT02K-Ex(70M)	< 0,05	0,906	0,0688	< 0,05	< 0,05	< 0,05	0,109	0,932	0,317	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,04	< 0,05	< 0,05	< 0,005
ChT03K-Ex(70M)	< 0,04	0,204	0,0433	< 0,04	< 0,04	< 0,04	0,0434	0,140	0,225	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,004
ChT04K-Ex(70M)	< 0,04	0,536	0,0826	< 0,04	< 0,04	< 0,04	0,0466	0,164	0,169	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,004
ChT05K-Ex(70M)	< 0,04	0,236	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	0,133	0,145	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,004
SPV01K-Ex(70M)	< 0,04	0,293	0,0609	< 0,04	< 0,04		< 0,04	0,0576	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,004

	GA	CQA	HBA	AES	CA	SYR	COU	SCO	FER	SYN	RUT	A7G	SEC	MAT	QUE	LUT	KAE	API
AnS01H-Ex(70M)	< 0,04	3,12	0,0830	< 0,05	< 0,04	< 0,04	< 0,04	0,0759	< 0,04	< 0,05	< 0,04	< 0,05	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,05	< 0,004
AnS03H-Ex(70M)	< 0,04	0,363	0,0963	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	0,0407	0,0389	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,03	< 0,04	< 0,04	< 0,004
AnS04H-Ex(70M)	< 0,04	0,241	0,165	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	0,0489	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,03	< 0,04	< 0,04	< 0,004
AnS05H-Ex(70M)	< 0,04	6,89	0,0536	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	0,0374	< 0,04	< 0,04	< 0,04	0,100	< 0,04	< 0,04	< 0,04	0,137	< 0,04	0,0127
AnS06H-Ex(70M)	< 0,04	0,568	0,126	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,004
AnS07H-Ex(70M)	< 0,04	1,17	1,38	< 0,04	0,0449	< 0,04	< 0,04	0,0467	0,0414	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,004
AnS08H-Ex(70M)	< 0,04	1,83	1,12	< 0,04	0,0563	< 0,04	< 0,04	0,0828	0,0528	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,004
AnS10H-Ex(70M)	< 0,03	7,78	0,525	< 0,04	0,0437	< 0,03	< 0,04	0,0876	0,0424	< 0,04	< 0,04	0,0604	< 0,03	< 0,03	< 0,03	0,127	< 0,04	0,00903
AnS11H-Ex(70M)	< 0,04	8,41	0,478	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	0,0479	< 0,04	< 0,04	< 0,04	0,0407	< 0,04	< 0,004
AnC10H-Ex(70M)	< 0,04	0,49	0,698	< 0,04	0,0460	< 0,04	< 0,04	< 0,04	0,0369	< 0,04	< 0,04	0,0303	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,004
AnC11H-Ex(70M)	< 0,04	0,52	< 0,39	0,0584	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	0,0357	< 0,04	< 0,04	0,0735	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,004
AnC12H-Ex(70M)	< 0,04	0,92	0,426	0,0470	0,0497	< 0,04	< 0,04	0,0216	0,0506	< 0,04	< 0,04	0,344	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	0,0141
AnC13H-Ex(70M)	< 0,04	1,10	0,836	0,0530	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	0,0371	< 0,04	< 0,04	0,156	< 0,04	< 0,04	< 0,03	< 0,04	< 0,04	0,0360
AnC14H-Ex(70M)	< 0,04	0,51	< 0,39	0,162	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	0,0336	< 0,04	< 0,04	0,180	< 0,04	< 0,04	< 0,03	< 0,04	< 0,04	0,00806
AnC15H-Ex(70M)	< 0,04	0,37	0,656	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	0,0710	< 0,04	< 0,04	< 0,03	< 0,04	< 0,04	0,0171
AnC16H-Ex(70M)	< 0,03	1,37	< 0,39	< 0,04	< 0,03	< 0,03	< 0,04	< 0,03	0,0435	< 0,04	< 0,04	0,147	< 0,03	< 0,03	< 0,03	< 0,03	< 0,04	0,0364
AnC17H-Ex(70M)	< 0,04	0,15	0,462	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	0,00419
ChB01H-Ex(70M)	< 0,04	0,85	1,11	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	0,0532	< 0,04	< 0,04	0,0958	< 0,04	< 0,04	< 0,04	0,159	< 0,04	0,0124
ChB02H-Ex(70M)	< 0,03	0,80	1,12	< 0,04	< 0,03	< 0,03	< 0,04	< 0,03	0,0427	< 0,04	< 0,04	0,125	< 0,03	< 0,03	< 0,03	0,251	< 0,04	0,0251
ChH01H-Ex(70M)	< 0,04	4,36	0,416	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,03	0,0301	< 0,04	0,00727
ChH02H-Ex(70M)	< 0,04	4,80	0,442	< 0,05	< 0,04	< 0,04	< 0,04	0,042	< 0,04	< 0,05	< 0,04	0,0781	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	0,0227
ChH03H-Ex(70M)	< 0,04	8,50	< 0,39	< 0,04	0,0512	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	4,928	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,004
ChT01H-Ex(70M)	< 0,04	1,21	0,879	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	0,0882	0,0633	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,03	< 0,04	< 0,04	< 0,004
ChT02H-Ex(70M)	< 0,04	< 0,04	0,746	< 0,04	0,0480	< 0,04	< 0,04	0,0418	0,0616	< 0,04	0,863	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,03	< 0,04	< 0,04	< 0,004
ChT03H-Ex(70M)	< 0,04	3,45	0,847	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	0,0887	< 0,04	0,163	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,004
ChT04H-Ex(70M)	< 0,04	2,18	1,43	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	0,0413	< 0,04	0,109	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,004
ChT05H-Ex(70M)	< 0,04	2,20	0,773	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	0,0467	< 0,04	0,0626	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,004
SPV01H-Ex(70M)	< 0,04	1,56	< 0,39	< 0,04	< 0,04		< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	0,076	< 0,04	< 0,04	< 0,04	0,112	< 0,04	0,00566

	GA	CQA	HBA	AES	CA	SYR	COU	SCO	FER	SYN	RUT	A7G	SEC	MAT	QUE	LUT	KAE	API
AnS07H-Ex(aq)	< 0,04	< 0,04	< 0,39	< 0,04	0,282	< 0,04	< 0,04	1,35	0,0984	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,004
AnS07K-Ex(aq)	< 0,04	< 0,04	< 0,39	0,0626	0,166	< 0,04	< 0,04	0,792	0,0555	< 0,04	< 0,04	0,213	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,004
AnC12H-Ex(aq)	< 0,04	< 0,04	< 0,39	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,004
AnC12K-Ex(aq)	< 0,04	< 0,04	< 0,39	< 0,04	0,0516	< 0,04	< 0,04	0,452	0,167	< 0,04	< 0,04	0,0547	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,004
ChB01H-Ex(aq)	< 0,04	0,11	< 0,39	< 0,04	2,70	< 0,04	< 0,04	2,65	0,491	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,004
ChB01K-Ex(aq)	< 0,04	< 0,04	< 0,39	0,0467	< 0,04	< 0,04	< 0,04	0,119	0,210	< 0,04	< 0,04	< 0,05	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,004
ChH01H-Ex(aq)	< 0,04	0,10	< 0,39	< 0,04	0,0496	< 0,04	< 0,04	0,0845	0,354	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,004
ChH01K-Ex(aq)	< 0,04	< 0,04	< 0,39	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	0,182	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,004
ChT05H-Ex(aq)	< 0,04	< 0,04	< 0,39	< 0,04	0,240		< 0,04	3,80	0,0582	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,004
ChT05K-Ex(aq)	< 0,04	< 0,04	< 0,39	< 0,04	0,113	< 0,04	< 0,04	1,36	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	0,0767	< 0,04
SPV01H-Ex(aq)	< 0,04	< 0,04	< 0,39	< 0,04	0,162	< 0,04	0,0571	1,17	0,103	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,004

* Vrednosti ispod najniže tačke u kalibraciji.

5.3.2. SPEKTROFOTOMETRIJSKO ODREĐIVANJE UKUPNIH FLAVONOIDA

Sadržaj ukupnih flavonoida u ekstraktima određen je putem kompleksiranja sa Al^{3+} , pri čemu dolazi do batohromnog efekta usled građenja helata [237–241]. Apsorpcioni maksimumi traka I i II pomeraju se iz UV područja (u kome je apsorpcija nespecifična) u vidljivo područje. Talasna dužina na kojoj se vrši merenje bira se na osnovu prisutnih klasa; u slučaju širokog spektra struktura (kao što su ekstrakti ispitivani u okviru ove teze, koji sadrže i flavone i flavonole), najčešće se koristi kompromisna talasna dužina od 415 nm. Treba imati u vidu da dobijene vrednosti predstavljaju samo aproksimaciju sadržaja flavonoida; za dobijanje egzaktnih rezultata potrebno je hromatografsko razdvajanje i kvantifikacija pojedinačnih jedinjenja korišćenjem referentnih standarda.

Rezultati određivanja ukupnih flavonoida dati su u Prilogu 8.19., a grafički prikaz na Slici 5.53. Sadržaj flavonoida u ispitivanim 70 % MeOH ekstraktima varirao je u opsegu 2,27–30,4 mg ekvivalenata kvercetina po 1 g suvog ekstrakta, pri čemu je kod *Anthriscus sylvestris*, *Chaerophyllum bulbosum* i *Scandix pecten-veneris* koncentracija u herbi višestruko je veća nego u korenu (što se i može očekivati s obzirom na UV-protektivnu funkciju), dok kod *Chaerophyllum hirsutum* i *Chaerophyllum termulentum* važi suprotno. Kod svih vodenih ekstrakata sadržaj flavonoida je niži nego kod 70 % metanolnih (Slika 5.54).

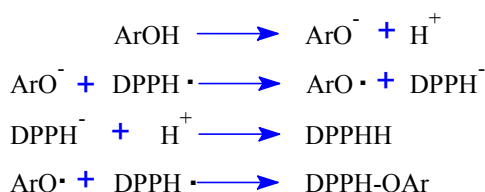
5.4. BIOLOŠKA AKTIVNOST EKSTRAKATA

5.4.1. ANTIOKSIDANTNA AKTIVNOST

Brojna istraživanja ukazuju na značaj oksidativnog stresa, naročito reaktivnih kiseoničnih (ROS) i azotnih vrsta (RNS), u razvoju degenerativnih i inflamatornih obolenja, zbog čega postoji interes za određivanje antioksidantnih svojstava jedinjenja iz jestivih i lekovitih biljaka. Dodatni značaj supstanci sa antioksidantnim svojstvima potiče od njihove sposobnosti da štite druge biomolekule, naročito masti, od štetnog dejstva kiseonika. Budući da ova jedinjenja mogu delovati putem različitih mehanizama – inhibicije oksidativnih enzima, reakcije sa oksidansima pre nego što mogu da oštete biomolekule, vezivanja jona prelaznih metala itd. – nemoguće je definisati jedinstveno merilo antioksidantne aktivnosti. Zbog toga nije iznenađujuće da postoji veliki broj testova za merenje antioksidantne aktivnosti i kapaciteta (striktno gledano, prvi termin vezan je za kinetiku reakcije uzorka sa specifičnim oksidansom, a drugi za količinu oksidansa koju može neutralisati dati uzorak), zasnovanih uglavnom na transferu elektrona ili atoma vodonika [278]. Ove metode mere sposobnost hvatanja slobodnih radikala (najvažnijih ROS i RNS – $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , ROO^{\cdot} , OH^{\cdot} , 1O_2 i $ONOO^-$), potrošnju O_2 , inhibiciju lipidne peroksidacije, transfer atoma vodonika (ORAC, TRAP i slični testovi), transfer elektrona (Folin-Ciocalteu test na „ukupne fenole“, TEAC, FRAP, DPPH, DMPD i sl.). Treba imati u vidu da se reaktivnost uzorka prema različitim oksidansima i pri različitim eksperimentalnim uslovima (pH, polarnost sredine, emulgatori itd.) razlikuje, i nijedan test ne odražava u potpunosti kompleksnost dejstva i interakcija antioksidanasa *in vivo*, zbog čega je neophodna primena više različitih metoda [232].

Antioksidantna aktivnost ekstrakata korena i herbe ispitivanih vrsta ocenjena je merenjem njihove sposobnosti da neutrališu DPPH-radikal, kao i sposobnosti da redukuju $[Fe-TPTZ]^{3+}$ kompleks.

DPPH test korišćen je za procenu reaktivnosti ekstrakata prema radikalskim vrstama, odn. *radical scavenging* aktivnosti [279]. DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil-radikal) jedan je od retkih stabilnih i komercijalno dostupnih slobodnih radikala. Treba imati u vidu da su, zbog njegove velike stabilnosti, rezultati ovog testa samo gruba procena ponašanja prema visokoreaktivnim radikalima kao što su ROS i RNS [234]. Dalje, noviji rezultati [273] sugerišu da je u polarnoj sredini (alkoholi, voda) transfer H^{\cdot} spor, i predominantan mehanizam barem sa nekim supstratima zapravo može biti jednoelektronska oksidacija DPPH reagensa:



Na kraju, kinetika reakcije nelinearno zavisi od koncentracije DPPH, te rezultati dobijeni pri različitim eksperimentalnim uslovima nisu nužno uporedivi [59, 232]. Uprkos navedenim nedostacima, zbog jednostavnosti izvođenja metoda se još uvek veoma često koristi za procenu *in vitro* antioksidantnog kapaciteta biljnih ekstrakata.

Rezultati DPPH testa dati su u Prilogu 8.20., a grafički prikaz na Slici 5.55. IC_{50} vrednosti 70 % metanolnih ekstrakata herbe varirale su u opsegu 8,76–77,4 $\mu g/mL$, a korena 8,53–204 $\mu g/mL$. U većini slučajeva, aktivnost ekstrakata herbe bila je uporediva ili nešto niža od sintetičkog antioksidanta BHT (butilovani hidroksitoluen, 4-metil-2,6-di-*terc*-butilfenol), pri čemu je najnižu aktivnost (prosečna IC_{50} 30,9 $\mu g/mL$) i najveću varijabilnost pokazivao *Anthriscus sylvestris*. Što se ekstrakata korena tiče, kod *A. sylvestris* i *Ch. hirsutum* (sem ChH03) aktivnost je uporediva sa herbom, dok je kod ostalih vrsta IC_{50} nekoliko puta viša. Ovo se može objasniti znatno nižim sadržajem fenolnih jedinjenja (flavonoidnih glikozida i hlorogenskih kiselina) u korenu vrsta *A. cerefolium*, *Ch. bulbosum*, *Ch. temulentum* i *S. pecten-veneris*, kao i u uzorku ChH03K (Prilog

8.13.). Pretpostavka da su ova jedinjenja odgovorna za uočenu aktivnost u skladu je sa rezultatima ranijih istraživanja [2, 6, 19, 20, 58].

U cilju dokazivanja ove pretpostavke, aktivnost (izražena kao recipročna vrednost IC_{50}) korelisana je sa sadržajem fenolnih jedinjenja (Slika 5.56.). Budući da zbog nedostupnosti referentnih standarda nije bilo moguće kvantifikovati veliku većinu detektovanih fenola, kao merilo sadržaja ovih jedinjenja uzeta je ukupna površina pikova u DAD hromatogramu na 340 nm (približan apsorpcioni maksimum dominantnih flavonoida i fenolnih kiselina), korigovana na koncentraciju rastvora korišćenih za HPLC analizu. Zapaža se visok stepen korelacije (Pearson-ov koeficijent od 0,874), što je potvrda hipoteze da uočena aktivnost prvenstveno potiče od polifenola. Najveća odstupanja uočena su kod vrste *A. sylvestris*, u smislu niže aktivnosti od očekivane. Ovo nije iznenađujuće, s obzirom na činjenicu da su dominantne komponente u ekstraktima ove vrste lignani sa (najčešće) permetilovanim hidrosilnim grupama, kod kojih se dakle ne može očekivati značajna aktivnost. Izostavljanjem uzoraka *A. sylvestris* dobija se odlična korelacija, sa $r^2 = 0,961$. Vezu je bilo moguće uspostaviti i sa sadržajem ukupnih flavonoida (određenih kompleksiranjem sa Al^{3+}), mada je koeficijent korelacije znatno niži ($r^2 = 0,728$) sem u slučaju vrste *A. cerefolium*, za koju r^2 iznosi 0,973 (Slika 5.57.).

Što se tiče vodenih ekstrakata, u većini slučajeva aktivnost je uporediva sa 70 % metanolnim ekstraktima (Slika 5.58.), i u odličnoj je korelaciji sa sadržajem fenolnih jedinjenja ($r^2 = 0,951$, Slika 5.59.).

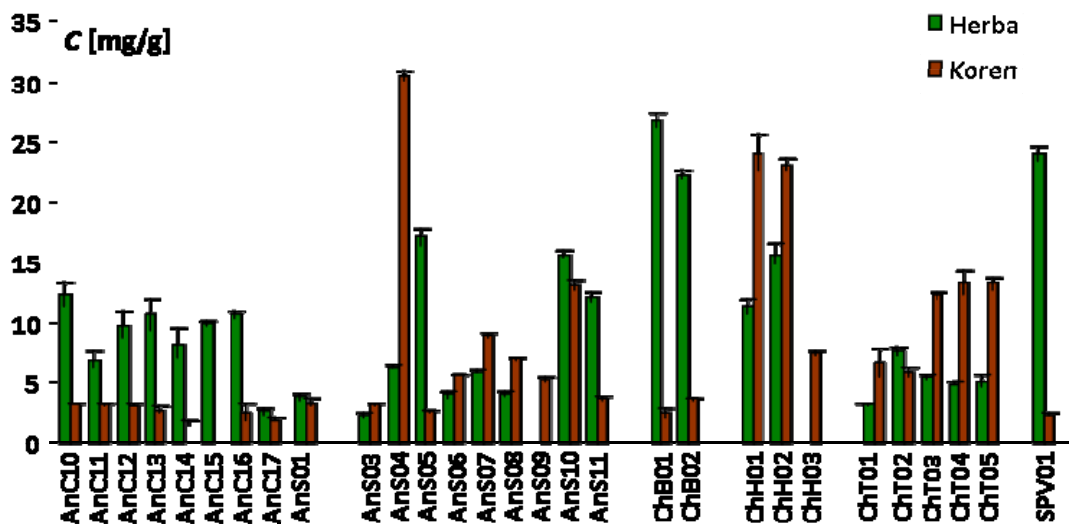
FRAP test (*ferric reducing ability of plasma* ili *ferric ion reducing antioxidant power*) jedna je od standardnih metoda za ispitivanje redukcionih svojstava biljnih ekstrakata, iako je prvobitno razvijena za potrebe analize krvne plazme. Ovom metodom određuje se sposobnost ekstrakta da učestvuje u jednoelektronskim redoks-reakcijama, što znači da antioksidansi sa različitim modusom delovanja (npr. karotenoidi) neće biti registrovani [232]. Drugi nedostatak je činjenica da izmeren redukcion kapacitet, zbog odsustva biomolekulâ kao supstrata, ne odražava nužno antioksidantnu aktivnost odn. protektivna svojstva [59]. Redukcioni mehanizam antioksidantnog dejstva može biti značajan kod neutralizacije vrsta kao što su HOCl i ONOO⁻ [232].

Rezultati FRAP testa dati su u Prilogu 8.21., a grafički prikaz na Slici 5.61. Zapaža se da je aktivnost ekstrakata herbe (izražena u mg ekvivalenata Fe^{2+} po 1 g ekstrakta) kod *Anthriscus sylvestris* i *Chaerophyllum hirsutum* uporediva sa ekstraktima korena, nešto veća kod *Chaerophyllum temulentum* i znatno veća kod *Anthriscus cerefolium*, *Chaerophyllum bulbosum* i *Scandix pecten-veneris*, što se može objasniti većim sadržajem fenolnih jedinjenja u herbi. Za razliku od DPPH, znatno je teže uspostaviti korelaciju između rezultata FRAP testa i sadržaja fenolâ (definisano ukupnom površinom pikova na 340 nm) – koeficijent korelacije za sve podatke iznosi tek $r^2 = 0,355$ (Slika 5.63.). Najbolje slaganje uočava se kod ekstrakata *A. sylvestris* i *A. cerefolium*, sa $r^2 = 0,818$. Kod ekstrakata herbe *Ch. temulentum*, *Ch. bulbosum* i *S. pecten-veneris* aktivnost ne zavisi bitno od koncentracije fenolnih jedinjenja, dok se kod korena istih vrsta (sa znatno nižim udelom fenolnih kiselina i flavonoida u odnosu na ostale komponente) pri sličnim koncentracijama fenola uočavaju velike varijacije redukcionne sposobnosti.

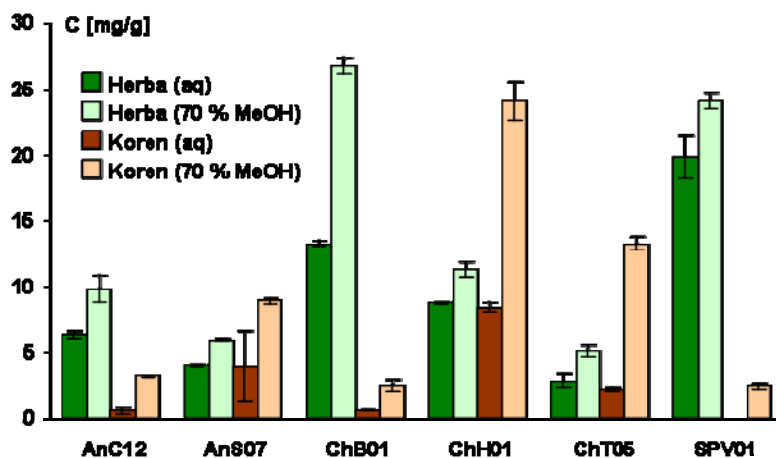
Nizak stepen korelacije ne znači nužno da fenoli nisu glavne redukcionne komponente ekstrakta – ne sme se zaboraviti da već jedinjenja sa malim razlikama u strukturi mogu imati bitno različit redoks-potencijal i stehiometriju reakcije sa FRAP reagensom, koja ne mora imati veze sa brojem elektrona koje mogu donirati [232].

Što se tiče odnosa između sadržaja flavonoida i rezultata FRAP testa (Slika 5.64.), korelacija se uočava kod vrsta *A. sylvestris* ($r^2 = 0,990$) i *A. cerefolium* ($r^2 = 0,934$ uz zanemarivanje ekstrakata korena AnS04 i AnS11).

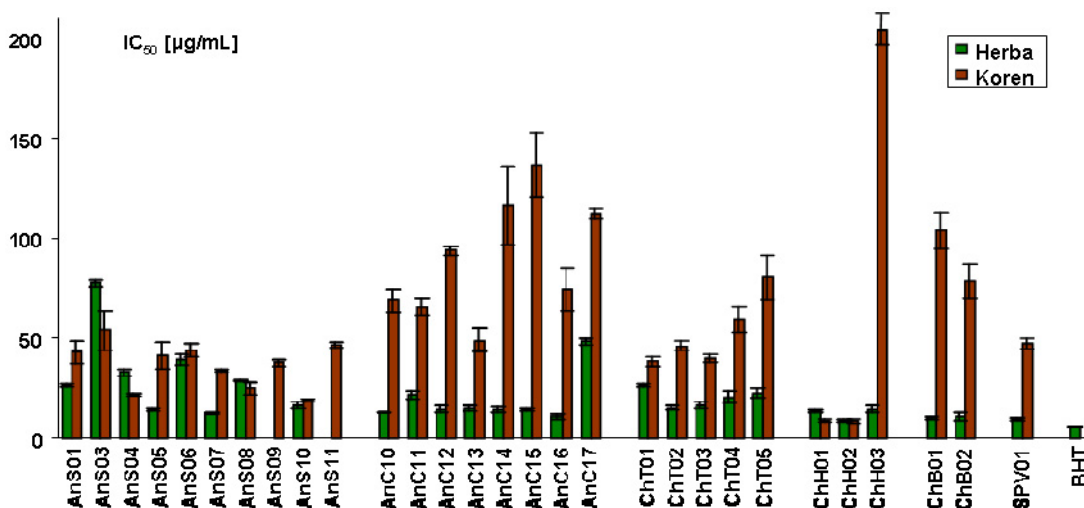
Kod vodenih ekstrakata uočava se sličnost aktivnosti sa metanolnim ekstraktima (Slika 5.62.), sem kod uzoraka *Ch. bulbosum* (koga karakteriše znatno niži sadržaj flavonoida) i *Ch. temulentum*, kao i odlična korelacija između apsorpcije na 340 nm i redukcionih svojstava, sa $r^2 = 0,964$.



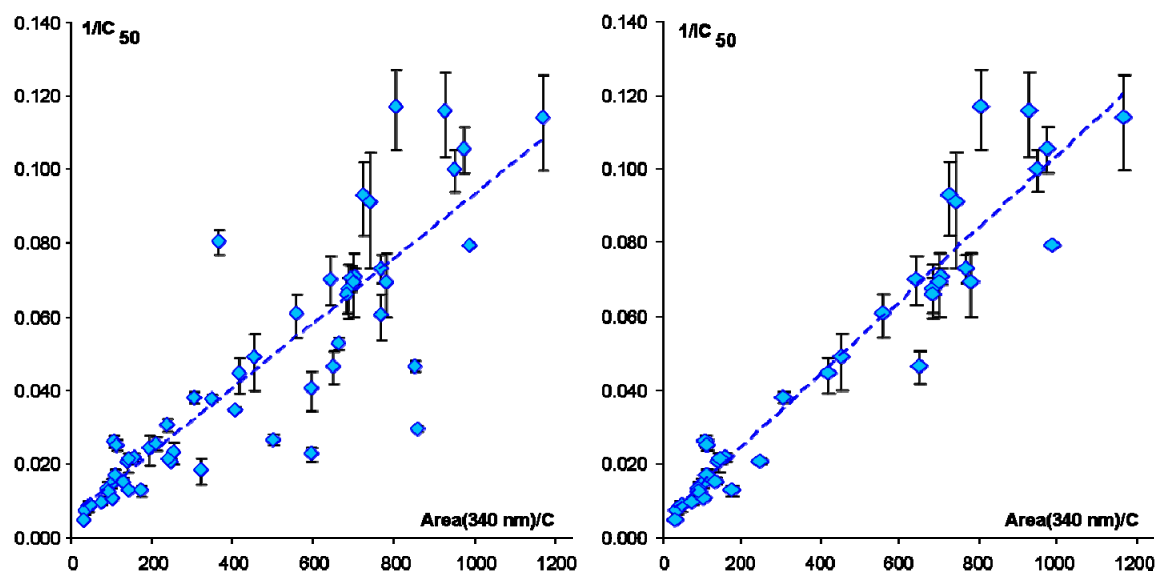
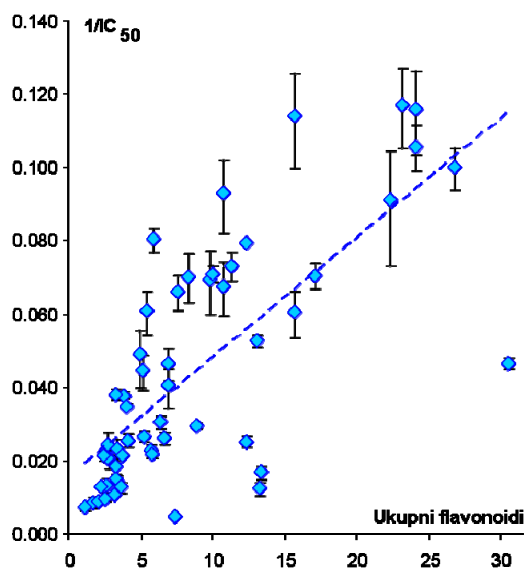
Slika 5.53. Poređenje sadržaja ukupnih flavonoida u 70 % MeOH ekstraktima.



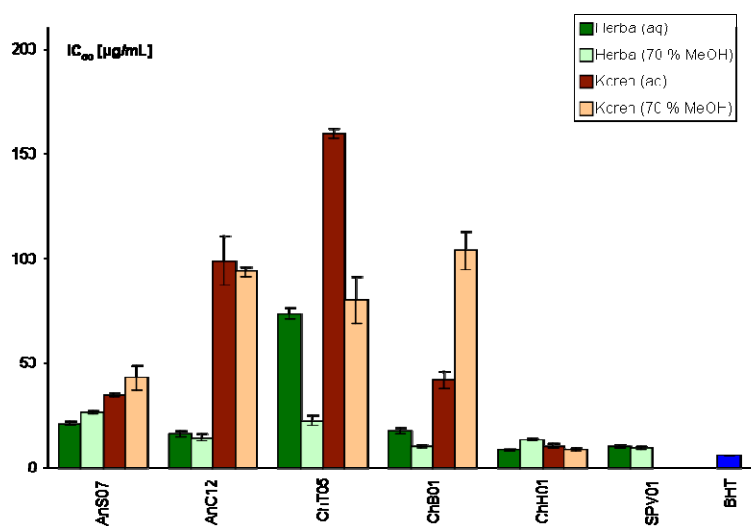
Slika 5.54. Poređenje sadržaja ukupnih flavonoida u vodenim i 70 % MeOH ekstraktima.



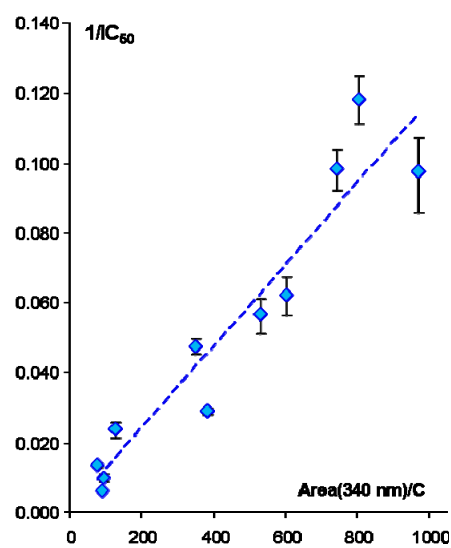
Slika 5.55. Poređenje antioksidantnog kapaciteta 70 % MeOH ekstrakata, određenog DPPH testom.

Slika 5.56. Korelacija rezultata DPPH testa i sadržaja fenola (levo – svi ekstrakti, desno – bez *A. sylvestris*).

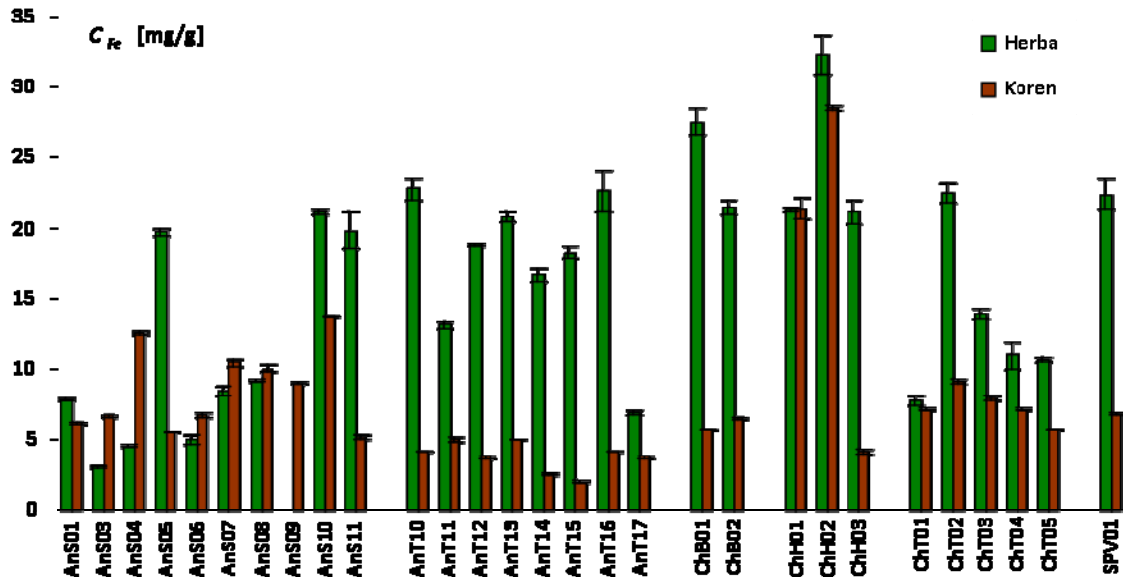
Slika 5.57. Korelacija rezultata DPPH testa i sadržaja ukupnih flavonoida.



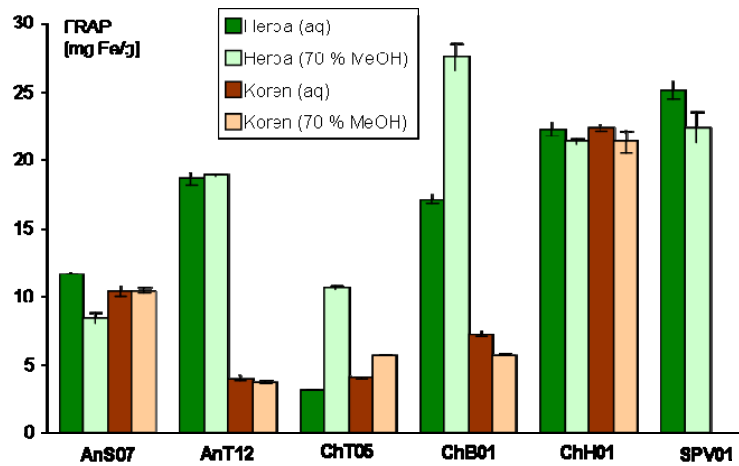
Slika 5.58. Poređenje antioksidantnog kapaciteta vodenih i 70% MeOH ekstrakata, određenog DPPH testom.



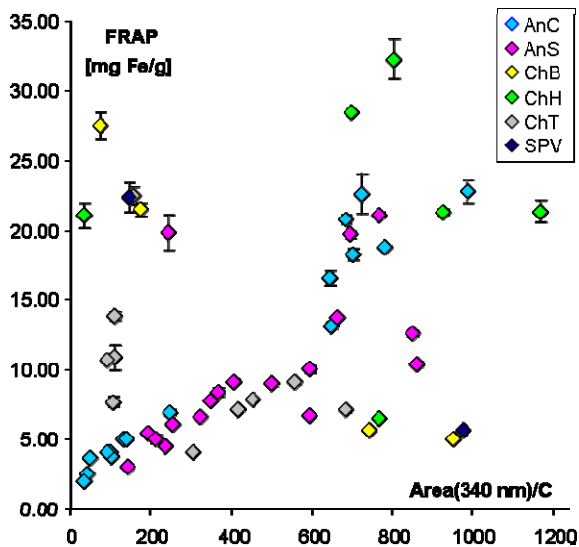
Slika 5.59. Korelacija rezultata DPPH testa i sadržaja fenola u vodenim ekstraktima.



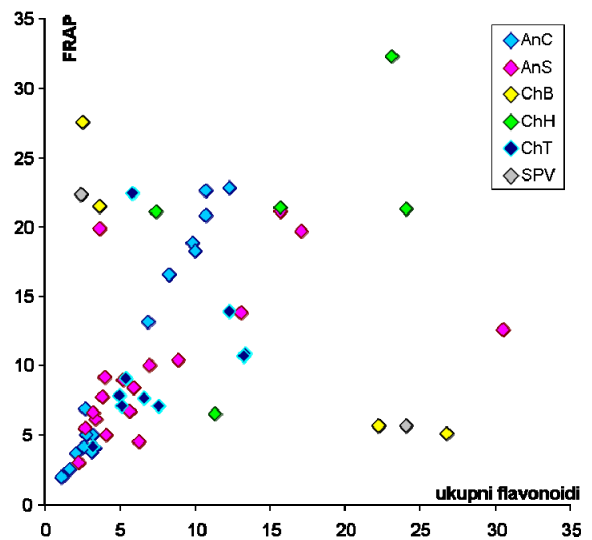
Slika 5.61. Poređenje antioksidantnog kapaciteta 70 % MeOH ekstrakata, određenog FRAP testom



Slika 5.62. Poređenje antioksidantnog kapaciteta vodenih ekstrakata, određenog FRAP testom



Slika 5.63. Korelacija FRAP vrednosti i sadržaja fenola.



Slika 5.64. Korelacija FRAP vrednosti i sadržaja flavonoida.

5.4.2. COX/LOX INHIBITORNA AKTIVNOST

U sklopu ispitivanja antiinflamatorne aktivnosti odabranih reprezentativnih uzoraka, određen je stepen inhibicije COX-1 i 12-LOX u *ex vivo* uslovima. Nakon aktivacije navedenih enzima u trombocitima kombinacijom Ca^{2+} i kalcijumove jonofore (A23184, kalcimicin), sadržaj produkata metabolizma endogene arahidonske kiseline – 12-HHT i 12-HETE – praćen je LC-MS-MS tehnikom. Korišćenje trombocita kao test sistema umesto izolovanih enzima ima višestruke prednosti:

- bolje odražava realne fiziološke uslove,
- trombociti sadrže oba ciljana enzima, odn. omogućavaju istovremeno ispitivanje inhibicije COX-1 i 12-LOX,
- zbog visoke peroksidazne aktivnosti u živim ćelijama, uticaj radikal-hvatačke sposobnosti biljnih fenola na metabolizam eikozanoida je zanemarljiv.

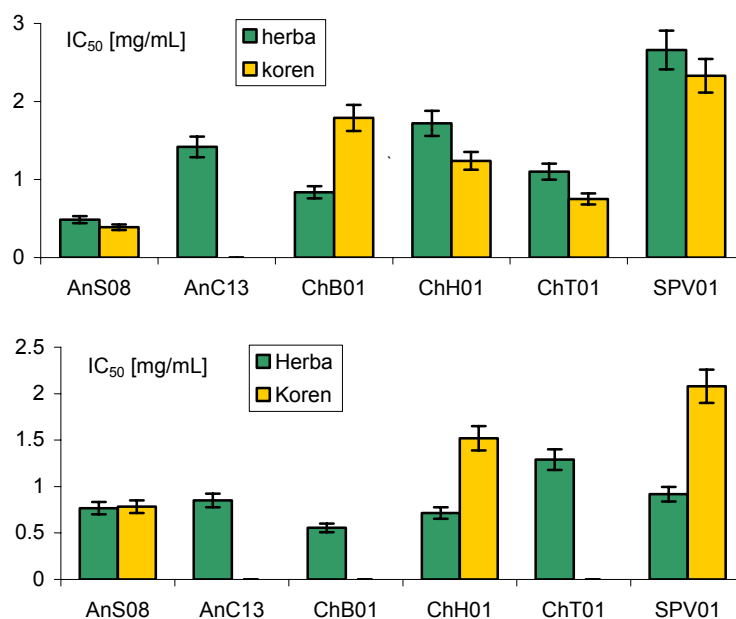
Krive doza-odgovor za sve ispitivane uzorke date su u Prilogu 8.22., a rezultati (IC_{50} vrednosti) u Tabeli 5.5. i na Slici 5.65.

Tabela 5.5. IC_{50} vrednosti (u mg/mL) za ispitivane ekstrakte i standarde.

Uzorci	COX-1		12-LOX	
	Herba	Koren	Herba	Koren
AnS08	0,487	0,390	0,768	0,784
AnC13	1,42	-	0,851	-
ChB01	0,837	1,79	0,555	-
ChH01	1,72	1,24	0,716	1,52
ChT01	1,1	0,752	1,29	-
SPV01	2,66	2,33	0,918	2,08
Standardi**				
Bajkalein	0,0192		0,0025	
Kvercetin			0,084	
Aspirin	0,001		-	

* Relativna standardna devijacija intermedijerne preciznosti ranije je određena i iznosi 9,3 % za IC_{50} (COX-1) i 8,6 % za IC_{50} (12-LOX)

** IC_{50} vrednosti određene u sklopu ranijih ispitivanja [242, 243].



Slika 5.65. COX-1 (gore) i 12-LOX (dole) inhibitorno dejstvo ispitivanih ekstrakata.

Kod većine ispitivanih uzoraka utvrđena je dozno-zavisna COX-1 i 12-LOX inhibitorna sposobnost.

IC₅₀ vrednosti za inhibiciju ciklooksigenaze-1 bile su u opsegu 0,390–2,66 mg/mL. Ove vrednosti su znatno više od IC₅₀ vrednosti za standardna jedinjenja aspirin i bajkalein (0,001 mg/mL i 0,0192 mg/mL, respektivno) određenih pri identičnim uslovima, ali uporedive sa drugim biljkama čija se primena u tradicionalnoj medicini zasniva na antiinflamatornim svojstvima (npr. *Plantago* vrste, IC₅₀ 0,65–6,59 mg/mL [242, 243]). Najjaču aktivnost pokazali su koren i herba *Anthriscus sylvestris*, što se možda može objasniti visokim sadržajem lignana. Naime, za jedno od dominantnih jedinjenja – deoksipodofilotoksin – ranije je utvrđeno da predstavlja potentnog inhibitora COX-1, COX-2 i 5-LOX (uz IC₅₀ od 0,026 mg/mL, 0,00075 mg/mL i 0,00015 mg/mL, respektivno) [56]. Za ostala jedinjenja iz ove klase detektovana u *A. sylvestris* za sada nema literaturnih podataka o antiinflamatornoj aktivnosti. Uprkos višestruko nižoj koncentraciji lignana u ekstraktu herbe, aktivnost je slična ekstraktu korena, što ukazuje na prisustvo i drugih COX-inhibirajućih jedinjenja, za čiju će identifikaciju biti neophodno frakcionisanje vođeno aktivnošću (*eng.* activity-guided fractionation).

I ostali ekstrakti pokazali su COX-1 inhibitornu aktivnost, mada sa nešto višim vrednostima IC₅₀, sem korena *Anthriscus cerefolium* kod koga nije uočena dozno-zavisna inhibicija u ispitivanom opsegu koncentracija (0,5–4 mg/mL). Najmanje aktivna vrsta je *Scandix pecten-veneris*, sa IC₅₀ iznad 2 mg/mL. U većini slučajeva, ekstrakt korena bio je nešto aktivniji od herbe.

U tkivima sisara COX-1 je konstitutivni enzim čija je aktivnost neophodna za mnoge procese. Međutim, u skorije vreme pokazano je da igra značajnu ulogu u inflamatornim procesima i karcinogenezi, i to preko nekoliko mehanizama – preko PGE₂ koji deluje kao imunosupresor i štiti kancer od ćelija imunog sistema (citotoksičnih ćelija, NK ćelija i makrofaga), metaboličkom aktivacijom karcinogena (zajedno sa prostaglandin H sintazom) i generisanjem genotoksičnih produkata (malondialdehid, slobodni radikali, peroksidi). Kombinovana terapija inhibitorima sinteze prostaglandina (NSAID) i imunostimulatornim citokinima, kao što je IL-2, pokazala je potencijal u aktiviranju imunog odgovora protiv ćelija tumora [65].

S obzirom na veliku sličnost aktivnog centra u COX-1 i COX-2 (uz veću toleranciju COX-2 prema voluminoznijim supstratima), može se očekivati da će pripremljeni ekstrakti predstavljati i značajne COX-2 inhibitore. U daljim istraživanjima, biće neophodno ispitati dejstvo pripremljenih ekstrakata na COX-2 i utvrditi eventualnu selektivnost.

Što se 12-lipooksigenaze tiče, dok su ekstrakti herbe svih vrsta jasno ispoljili inhibitornu aktivnost, sa IC₅₀ u intervalu 0,555–1,29 mg/mL, kod ekstrakata korena u više slučajeva nije uočena dozna zavisnost (*A. cerefolium*) ili nije bilo moguće odrediti IC₅₀ (*Ch. bulbosum* i *Ch. temulum*). Ove vrednosti više su od odgovarajućih vrednosti za standardna jedinjenja – kvercetin i bajkalein (IC₅₀ = 0,084 mg/mL i 0,0025 mg/mL, respektivno), ali uporedive sa drugim biljkama sa antiinflamatornim svojstvima (vrste roda *Plantago*, IC₅₀ = 0,56–3,96 mg/mL [243]). 12(*S*)-HETE, proizvod aktivnosti 12-LOX, značajan je faktor kod razvoja i preživljavanja tumora. Inhibicija ovog enzima dovodi do smanjenja prokrvljenosti tumora, inhibicije proliferacije, apoptoze ćelija kancera, smanjenja motilnosti i metastatičkog potencijala [70], te može potpomoći dejstvo citotoksičnih komponenata detektovanih u nekim ekstraktima. Budući da je implicirana i značajna uloga 12(*R*)-HETE u pojavi psorijaze [70], ekstrakti sa 12-LOX inhibitornom sposobnošću pokazuju potencijal i u tretmanu ovog oboljenja.

U svim vrstama identifikovan je niz jedinjenja sa poznatom antiinflamatornom aktivnošću:

1. Nezasićene masne kiseline (oleinska, linolna, linolenska), koje predstavljaju kompetitivne inhibitore COX, uglavnom COX-2 selektivne, sa IC₅₀ ispod 0,001 mg/mL prema COX-2 i >0,1 mg/mL za COX-1 (određeno *in vitro*, sa izolovanim enzimima) [61, 67].
2. Flavonoidi – detektovane su značajne količine luteolina, i nešto manje apigenina, kemferola i kvercetina, kao i njihovi glikozidi. Za sve navedene aglikone dokazana je *ex vivo* i *in vivo* antiinflamatorna aktivnost [31,61], zasnovana na više različitih mehanizama. Što se tiče uticaja na metabolizam eikozanoida, utvrđeno je da je luteolin selektivni inhibitor aktivnosti COX-2 (i,

dodatno, inhibira ekspresiju ovog proteina), kao i 12-LOX (IC_{50} oko 0,0002 mg/mL), kvercetin i kemferol deluju na 15-LOX (0,0012 mg/mL i 0,004 mg/mL), a apigenin na 12- i 15-LOX (0,02 mg/mL i 0,001 mg/mL), kao i ekspresiju COX-2 [61]. Aktivnost glikozida po pravilu je niža od aktivnosti odgovarajućih aglikona.

3. Kumarini – skopoletin predstavlja dominantnu komponentu ekstrakta korena *Chaerophyllum temulentum*, a prisutan je u manjim količinama i u ostalim ekstraktima. Za ovo jedinjenje poznato je da predstavlja inhibitora oslobađanja eikozanoida [31].
4. Fenolne kiseline – najzastupljenija jedinjenja iz ove grupe su u ispitivanim uzorcima bile hlorogenske kiseline: izomerne kafeoilhinske (CQA) i dikafeoilhinske kiseline (diCQA), kao i acilovani derivati diCQA. Istraživanja Kimure i sar. [105] pokazala su da, dok sama 5-*O*-kafeoilhinska kiselina („hlorogenska kiselina“) nema uticaja na metabolizam eikozanoida, 3,4-, 3,5- i 4,5-*O*-dikafeoilhinska kiselina predstavljaju inhibitore 5-LOX sa IC_{50} oko 0,3–0,4 mg/mL i COX sa IC_{50} oko 0,04–0,5 mg/mL. Istovremeno, nije uočen uticaj na 15-LOX.

Koja od jedinjenja iz navedenih klasa su najodgovornija za uočenu aktivnost, biće moguće utvrditi tek kombinacijom frakcionisanja, određivanja aktivnosti i hemijske analize, odn. postupkom aktivnošću vođenog frakcionisanja. Međutim, pri poređenju hromatograma, utvrđeno je da su ekstrakti herbe (koji pokazuju jaču 12-LOX inhibitornu aktivnost od ekstrakata korena) bogatiji flavonoidima i derivatima dikafeoilhinske kiseline (luteolin-heksozid, malonil-diCQA i niz nepoznatih jedinjenja u slučaju *A. cerefolium*, malonil-diCQA, luteolin, glikozidi i acilovani glikozidi luteolina i kvercetina kod *Ch. bulbosum*, glikozidi luteolina kod *Ch. hirsutum* i niz luteolin-glikozida i derivata diCQA kod *S. pecten-veneris*).

Treba pomenuti da ni kod jedne ispitivane vrste nije detektovano proinflatorno delovanje, koje bi moglo biti posledica prisustva alifatičnih C_{17} -poliacetilena ranije identifikovanih u vrstama ovog tribusa [9, 10, 14, 18, 30, 31, 36], naročito falkarinola. Međutim, budući da ova jedinjenja primarno deluju kao hapteni [91, 174, 175], odsustvo aktivnosti može biti posledica neadekvatnosti test-sistema; biće neophodna dodatna istraživanja da bi se utvrdilo dejstvo ispitivanih ekstrakata na imuni odgovor.

5.4.3. CITOTOKSIČNOST

Budući da je u ekstraktima svih ispitivanih vrsta detektovan niz sekundarnih biomolekula koji mogu pomoći u prevenciji kancera (antioksidansi, COX i LOX inhibitori) ili su direktno citotoksični, uključujući fenolne kiseline, kumarine, lignane i flavonoide, može se očekivati da će ti ekstrakti pokazivati antiproliferativno dejstvo. Uticaj odabranih ekstrakata na ćelijski rast ispitivan je formazanskim testom, koji se zasniva na poređenju broja živih ćelija (detektovanih bojenjem MTT-reagensom) u netretiranom i sistemu tretiranom ekstraktima. U okviru ovog rada, ispitano je dejstvo na tri ćelijske linije kancera:

1. MCF-7 (humani adenokarcinom dojke pozitivan na estrogenske i progesteronske receptore)
2. MDA-MB-231 (humani adenokarcinom dojke negativan na estrogenske receptore)
3. HeLa S3 (humani epiteloidni karcinom grlića materice)

U cilju određivanja selektivnosti, ispitano je i dejstvo na ćelijsku liniju MRC-5, koja predstavlja zdrave humane fibroblaste pluća. Dobijene krive doza-odgovor za sve ispitivane uzorke date su u Prilogu 8.23., a rezultati (IC_{50} vrednosti) u Tabeli 5.6. Treba napomenuti da se u mnogim slučajevima javlja odstupanje od uobičajene hiperbolične ili sigmoidne zavisnosti inhibicije od koncentracije, te IC_{50} vrednosti nisu adekvatno merilo aktivnosti.

Tabela 5.6. Rezultati ispitivanja citotoksičnosti.

	IC_{50}^* [$\mu\text{g/mL}$]			
	MRC-5	MCF-7	HeLaS3	MDA-MB-231
AnS09K-Ex(70M)	0,771**	19,2	16,3	~2,55**
AnS08H-Ex(70M)	49,0	2,30	> 100	7,97
AnC13K-Ex(70M)	> 100	0,0236[†]	> 100	> 100
AnC13H-Ex(70M)	> 100	< 0,01[†]	> 100	> 100
ChB01K-Ex(70M)	> 100	> 100? [†]	> 100	> 100
ChB01H-Ex(70M)	> 100	> 100	> 100	> 100
ChH01K-Ex(70M)	> 100	> 100	31,8	0,0670[†]
ChH01H-Ex(70M)	> 100	> 100	> 100	> 100
ChT03K-Ex(70M)	> 100	0,0378[†]	> 100	> 100
ChT01K-Ex(70M)	> 100	> 100	> 100	> 100
SPV01K-Ex(70M)	> 100	> 100	> 100	> 100
SPV01H-Ex(70M)	> 100	> 100	> 100	> 100
Podofilotoksin	~47,9**	5,41	> 100	0,289**

* Podebljane su vrednosti $\leq 30 \mu\text{g/mL}$.

** Kriva pokazuje inhibiciju blisku 50 % u širokom opsegu..

[†] Zbog odstupanja od uobičajenog oblika krive doza-odgovor, IC_{50} nije primenjiva.

Kao što se iz datih podataka može videti, citotoksičnost velike većine ekstrakata prema ispitivanim ćelijskim linijama je niska do umerena. Dok je kod skoro svih uzoraka uočena dozna zavisnost (Slika 5.66.), nagib je često vrlo mali, i inhibicija se pri povećanju koncentracije za 4 reda veličine tipično povećava za manje od 40 %.

Kao što je već pomenuto, u više slučajeva (ekstrakti korena i herbe *A. cerefolium*, korena *Ch. temulentum*, herbe *S. pecten-veneris*, i možda herbe *Ch. hirsutum* kod linije MCF-7, korena *Ch. hirsutum*, *S. pecten-veneris* i možda *Ch. bulbosum* kod MDA-MB-231) javlja se jasno odstupanje od uobičajenih modela doza-odgovor, tačnije pri nižim koncentracijama javlja se porast citotoksične aktivnosti. Alternativno, može se smatrati da je pri srednjim koncentracijama aktivnost značajno smanjena. Ovakvu bifaznu zavisnost neki istraživači tumače hormezisom, odn. adaptivnim odgovorom sličnih kvantitativnih svojstava (amplitude, koncentracionog opsega) kao originalni odgovor (u ovom slučaju – inhibicija proliferacije). Sam adaptivni odgovor može biti direktno indukovano (kod DSH – eng. direct stimulation hormesis) ili biti rezultat kompenzatornih mehanizama (OCSH – overcompensation stimulation hormesis) [274].

Kod OCSH modela, umerene doze dovode do poremećaja u homeostazi ćelija, i aktiviranja odgovarajućih odbrambenih mehanizama. Uloženi resursi uloženi teorijski bi trebali biti srazmerni

intenzitetu štetnog stimulusa i dovoljni za potpuni oporavak ćelije. Hormezis je posledica prednosti koju ćelija stiče angažovanjem resursa u umerenom višku u odnosu na količinu potrebnu za reparaciju trenutne štete. Dok se ovim osigurava potpuna reparacija, to takođe ima za posledicu i povećanu otpornost u prema ponovljenim izlaganjima. Ukoliko do ponovnog izlaganja ne dođe, višak resursa može biti iskorišćen za redukovanje uticaja uvek prisutnih stresora, rast i sl.

DSH model podrazumeva direktno stimulatorno dejstvo apliciranog stresora. U konkretnom slučaju, neke od komponenata ekstrakta mogu zapravo pokazivati slabu pro-proliferativnu aktivnost kojom u znatnoj meri kompenzuju dejstvo citotoksičnih jedinjenja (bar u oblasti njihove niske aktivnosti).

Neki od istraživača hormetičku zavisnost tumače preko prisustva dva podtipa receptora, koji imaju značajno različit afinitet prema ligandu i aktivnost koja može voditi stimulatornim ili inhibitorynim putevima [275].

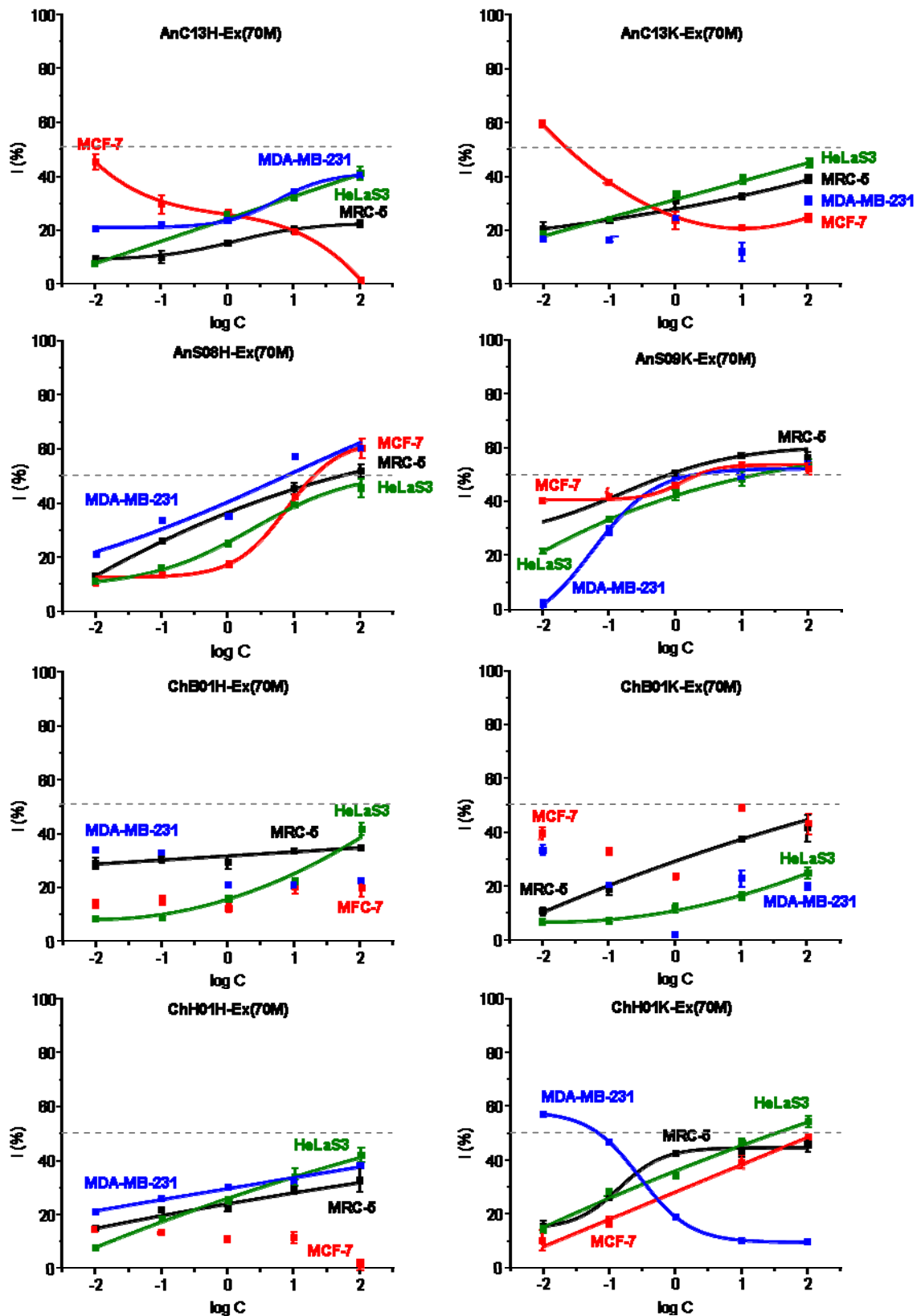
Budući da u ispitivanim uzorcima ni u jednom slučaju nije detektovana negativna vrednost citotoksičnosti, odn. pro-proliferativna aktivnost, pojava se ne može smatrati hormezisom u striktnom smislu tog termina [274], ali tumačenje oblika krive i dalje može biti validno. Budući da se efekti OCSH mehanizma tipično ispoljavaju u uskom opsegu koncentracija (tipično 5- do 300-strukom), dok DSH može obuhvatati i znatno šire opsege, može se pretpostaviti da je bar kod dela ispitivanih uzoraka DSH mehanizam odgovoran za uočeno ponašanje.

Standardno jedinjenje – podofilotoksin – pokazalo je neselektivno citotoksično dejstvo prema svim ispitivanim ćelijskim linijama, relativno nezavisno od doze, sa inhibicijom rasta od oko 40–50 % u ispitivanom opsegu koncentracija (sem u slučaju ER+ adenokarcinoma dojke, kod koga se zapaža nešto izrazitija dozna zavisnost).

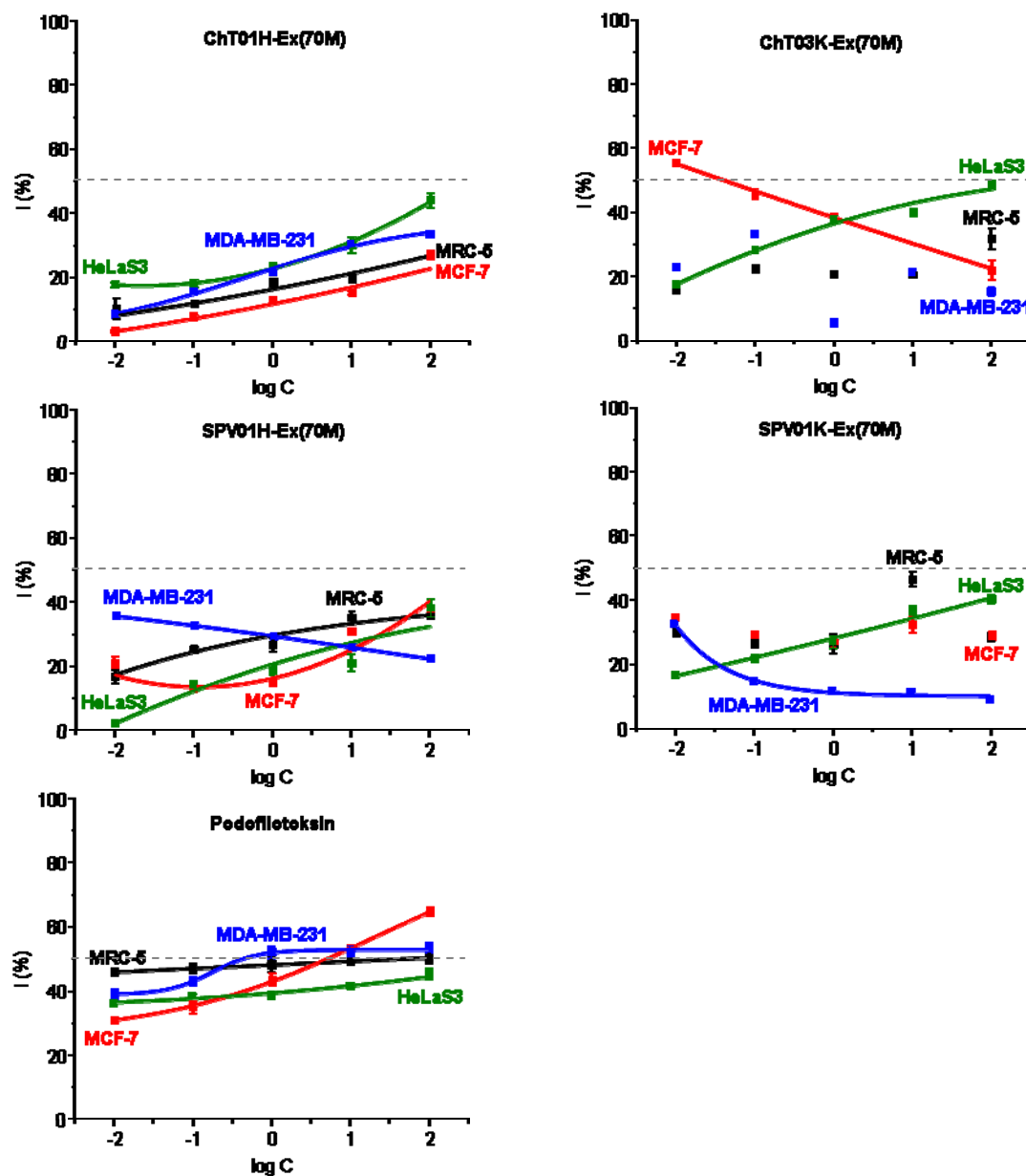
Citotoksična aktivnost ekstrakata herbe *Anthriscus cerefolium* prema linijama kancera MDA-MB-231 i HeLaS3 nešto je izraženija nego prema fibroblastima pluća, dok je aktivnost ekstrakata korena uporediva ili niža. Zbog slabe selektivnosti, sirovi ekstrakti imaju mali terapijski potencijal. Što se tiče ćelijske linije MCF-7 (ER+ adenokarcinom dojke), i kod korena i kod herbe uočava se porast aktivnosti sa sniženjem koncentracije. S obzirom da dejstvo na zdrave ćelije pokazuje uobičajenu doznu zavisnost odn. opada sa sniženjem koncentracije, pri niskim dozama selektivnost značajno raste. Biće neophodna dodatna istraživanja da bi se utvrdila doza koja rezultuje maksimalnim odgovorom i selektivnošću. Slična pojava uočena je i kod dejstva ekstrakta korena *Chaerophyllum hirsutum* na liniju MDA-MB-231 (ER- adenokarcinom dojke) i korena *Chaerophyllum temulentum* na MFC-7.

Kod ostalih ekstrakata, citotoksično dejstvo prema linijama kancera tipično je u pozitivnoj korelaciji sa dozom, i u ispitivanom opsegu koncentracija uporedivo ili slabije od dejstva na fibroblaste pluća (Slika 5.65.). Dok je u nekim slučajevima nagib krive veći za ćelije kancera nego za zdrave ćelije (dejstvo ekstrakata herbe i korena vrsta roda *Chaerophyllum* na HeLaS3, korena *Ch. hirsutum* i herbe *S. pecten-veneris* na MCF-7), te bi se pri visokim koncentracijama mogla očekivati značajna selektivnost, upitna je mogućnost postizanja tih koncentracija *in vivo*. Biljka sa najizraženijom aktivnošću je *Anthriscus sylvestris*, zahvaljujući visokom sadržaju lignana (ranija ispitivanja [9, 14] potvrdila su da je aktivni princip deoksipodofilotoksin, koji je jedna od dominantnih komponenti i u uzorcima ispitivanim u okviru ove teze). Ona ujedno jedina zadovoljava kriterijum American National Cancer Instituta, koji za sirove ekstrakte iznosi $IC_{50} \leq 30$ $\mu\text{g/mL}$ [180]. Međutim, budući da je selektivnost ekstrakta i korena i herbe niska, tj. pri datim koncentracijama ispoljava uporediv efekat i na zdrave ćelije, terapijski potencijal je mali.

Mehanizam dejstva navedenih ekstrakata (indukcija apoptoze, inhibicija proliferacije) tek treba da bude ispitan. U slučaju *A. sylvestris*, poznato je da najaktivnija komponenta – deoksipodofilotoksin – aktivira kaspazu-3 i kaspazu-7, čime inicira apoptozu [37], dok podofilotoksin deluje kao mitotički otrov [161]. U sklopu daljih istraživanja biće neophodno fracionisanje vođeno aktivnošću (*eng. activity-guided fractionation*) u cilju identifikacije jedinjenja odgovornih za uočeni citotoksični efekat, kao i utvrđivanja mogućnosti pojačanja aktivnosti (što se može očekivati, s obzirom na visok sadržaj neaktivnih, balastnih materija) i poboljšanja selektivnosti.



Slika 5.66. Poređenje citotoksičnosti ispitivanih ekstrakata prema odabranim ćelijskim linijama.



Slika 5.66. (nastavak) Poređenje citotoksičnosti ispitivanih ekstrakata prema odabranim ćelijskim linijama.

6. Zaključak

Na osnovu rezultata fitohemijskih i biohemijskih ispitivanja samoniklih vrsta tribusa Scandiceae – *Anthriscus cerefolium*, *Anthriscus sylvestris*, *Chaerophyllum bulbosum*, *Chaerophyllum hirsutum*, *Chaerophyllum temulentum* i *Scandix pecten-veneris*, mogu se izvesti sledeći zaključci:

- *Headspace* GC-MS tehnikom uzvrđene su jasne razlike u hemijskom sastavu volatoma u funkciji ispitivane vrste, lokaliteta, organa i fenofaze. Vrstu *A. cerefolium* karakterisao je jednostavan sastav, nizak sadržaj terpenoida a visok udeo fenilpropena (estragola i osmorizola) kod mlađih primeraka i *n*-alkana (sa dominantnim *n*-undekanom) kod zrelih. *A. sylvestris* je vrsta bogata terpenoidnim jedinjenjima, pri čemu kod mlađih primeraka dominiraju monoterpeni (od kojih su najzastupljeniji β -mircen, sabinen, limonen, *E*- i *Z*- β -ocimen, α -pinen i β -felandren), a u toku zrenja raste udeo seskviterpena (sa *E,E*- α -farnezenom i germakrenom D kao najvažnijima). I u ovoj vrsti detektovane su značajne količine *n*-alkana, ali je dominantna komponenta *n*-nonan. Najzastupljenije komponente volatilne frakcije *Ch. temulentum* su terpenoidi, sa seskviterpenima dominantnim u listu i plodu i monoterpenima u ostalim delovima biljke. Nehomogenost raspodele jedinjenja po organima znatno je izraženija nego kod prethodne dve vrste. Jedini alkan detektovan u ovoj vrsti u većim količinama je *n*-undekan. *Ch. bulbosum* karakteriše odsustvo *n*-alkana, veoma nizak sadržaj seskviterpenoida i oksigenovanih alifatičnih neterpenskijh jedinjenja, i *E*- β -ocimen kao dominantna komponenta. I *Ch. hirsutum* karakteriše visok udeo monoterpenskijh ugljovodonika, pri čemu se uočavaju izrazite kvalitativne i kvantitativne varijacije, čak i unutar populacije. Na kraju, *S. pecten-veneris* je vrsta siromašna isparljivim jedinjenjima; dominantne komponente su *n*-alkani, sa *n*-tridekanom kao najzastupljenijim.

- Primenom analize glavnih komponenti (PCA) pokazano je da sastav volatoma dobro diferencira ispitivane vrste, mada zbog značajnih varijacija u sastavu u funkciji organa i fenofaze uglavnom nije bilo moguće definisati jedinstvene i univerzalne hemotaksonomske markere za svaku vrstu. Utvrđeno je da su osmorizol, estragol i *n*-undekan karakteristični za *A. cerefolium*, veoma visok sadržaj *E*- β -ocimena za *Ch. bulbosum*, a *n*-tridekan i *n*-pentadekan za *S. pecten-veneris*.

- Etarsko ulje vrste *A. cerefolium*, za razliku od većine uobičajenijh etarskih ulja, karakteriše fenilpropeni (estragol i osmorizol) i *n*-alkani kao dominantne komponente, uz nizak sadržaj terpenoida. Dok su i u ulju *A. sylvestris* prisutni *n*-alkani u značajnom udelu, najzastupljenije komponente su terpenoidi, naročito sabinen, limonen i *E*- β -ocimen. Sadržaj etarskih ulja u obe vrste bio je nizak, $\leq 0,13$ % (izraženo u odnosu na suhu drogu).

- Sadržaj suvog ekstrakta (dobijenog maceracijom u 70 % metanolu) varirao je u opsegu 6,4–12,6 % za koren i 12,4–19,0 % za herbu vrsta roda *Chaerophyllum* odn. 16,4–37,1 % za koren i 10,5–34,0 % za herbu vrsta rodova *Anthriscus* i *Scandix*. Prinosi vodenijh dekokta bili su u opsegu 11,9–29,1 %.

- Tehnikom tečne hromatografije kuplovane sa UV i tandemskom masenom spektrometrijom identifikovan je veliki broj primarnijh i sekundarnijh biomolekula u pripremljenijh ekstraktima: hlorogenske kiseline (izomerne kafeoilhinske, dikafeoilhinske, acetil-dikafeoilhinske, malonil-dikafeoilhinske i acetil-malonil-dikafeoilhinske kiseline), flavonoidi (uglavnom izomerni heksozidi, heksozil-heksuronozidi, malonilheksozidi i acetilheksozidi luteolina, apigenina, kvercetina i metil-luteolina), lignani (pretežno ariltetralini i zasićeni i nezasićeni dibenzilbutirolaktoni), kumarini (skopoletin) i više masne kiseline. Poliacetileni nisu detektovani, verovatno zbog ekstremne nestabilnosti, kao ni fototoksični furanokumarini. Sastav ekstrakata značajno je varirao u funkciji vrste, lokaliteta, fenofaze razvoja, organa i primenjenog ekstragensa.

- Analizom glavnijh komponenti pokazano je da raspodela hlorogenskijh kiselina ima hemosistematski značaj: *A. sylvestris* karakteriše CQA i diCQA, *A. cerefolium* i *Ch. bulbosum* malonil-diCQA, a *Ch. temulentum* i *S. pecten-veneris* acetilovani derivati.

- Raspodela flavonoida takođe ima hemosistematski značaj. Dok su u svim uzorcima derivati luteolina najzastupljeniji, kod *S. pecten-veneris* oni su praktično jedini prisutni flavonoidi. Kod *A.*

sylvestris prisutni su još u značajnom udelu derivati metil-luteolina, u *A. cerefolium* glikozidi apigenina, u *Ch. bulbosum* kvercetinina i (u manjoj meri) apigenina a u *Ch. temulentum* – kvercetinina i nepoznatog alikona molekulske mase 286. Kod *Ch. hirsutum* detektovani su glikozidi svih ciljanih aglikona.

- Lignani su prisutni u značajnim količinama samo u vrsti *A. sylvestris*, pri čemu su dominantne komponente jatein, nemerozin i deoksipodofilotoksin. Pored niza jedinjenja čije je prisustvo u ovoj vrsti ranije dokazano, primenom tandemske masene spektrometrije bilo je moguće identifikovati i do sada nepoznata jedinjenja: 3,4,5-trimetoksi-3',4'-dihidroksilign-7-eno-9,9'-laktone i 3'-demetoksipodofilotoksin.

- Korišćenjem LC-MS i LC-MS-MS tehnike određen je sadržaj 3 hidroksibenzojeve kiseline, 5 hidroksicimetnih kiselina, 2 kumarina, 2 lignana i 6 flavonoida. U svim uzorcima sadržaj benzojevih kiselina bio je nizak, do 0,16 mg/g suvog ekstrakta, dok je koncentracija fenilpropenskih kiselina dostizala i do 9 mg/g. Ciljani lignani (sekoizolaricirezinol i matairezinol) su u svim uzorcima bili nedetektibilni ili prisutni samo u tragovima. Sadržaj flavonoidnih aglikona uglavnom je bio veoma nizak, ispod 0,1 mg/g, sem luteolina koji je dostizao 0,25 mg/g.

- Sadržaj ukupnih flavonoida, određen kompleksiranjem sa Al^{3+} i izražen u mg ekvivalenta kvercetinina po 1 g suvog ekstrakta, izosio je kod 70 % MeOH ekstrakata 2,27–30,4 mg/g, i kod vrsta *A. sylvestris*, *Ch. bulbosum* i *S. pecten-veneris* bio je viši u herbi, dok je kod *Ch. hirsutum* i *Ch. temulentum* uočeno suprotno. Kod svih vodenih dekokta sadržaj flavonoida bio je niži nego kod odgovarajućih 70 % metanolnih ekstrakata.

- Za sve ekstrakte određen je *in vitro* antioksidantni kapacitet u odnosu na DPPH radikal. IC_{50} vrednosti 70 % metanolnih ekstrakata herbe varirale su u opsegu 8,76–77,4 $\mu\text{g/mL}$, a korena 8,53–204 $\mu\text{g/mL}$, što znači da je aktivnost uporediva ili niža od sintetskog antioksidansa BHT. Utvrđen je visok stepen korelacije sa ukupnim sadržajem fenolnih jedinjenja. Aktivnost vodenih ekstrakata uporediva je sa metanolnim.

- Ispitana su i *in vitro* redukciona svojstva svih ekstrakata korišćenjem FRAP testa. Redukcioni kapacitet iznosio je 3,06–25,0 mg Fe^{2+} /g za vodene ekstrakte, 3,01–32,3 mg/g za 70 % MeOH ekstrakte herbe i 1,95–25,8 mg/g za 70 % MeOH ekstrakte korena. Korelaciju između sadržaja fenolnih jedinjenja i redukcionog kapaciteta bilo je moguće utvrditi samo kod vrsta roda *Anthriscus*.

- Ispitana su *ex vivo* inhibitorna svojstva odabranih ekstrakata prema ciklooksigenazi-1 i 12-lipooksigenazi. Većina uzoraka pokazala je dozno zavisnu inhibitornu sposobnost. IC_{50} vrednosti za COX-1 visoke su, u opsegu 0,390–2,66 mg/mL, ali uporedive sa ekstraktima drugih biljaka sa antiinflamatornim svojstvima. Što se tiče 12-LOX, aktivnost je uglavnom uočena samo kod ekstrakata herbe, i odgovarajuće IC_{50} vrednosti iznose 0,555–1,29 mg/mL. Sposobnost inhibiranja COX-1 i 12-LOX ukazuje na potencijal ispitivanih vrsta u tretmanu tumora, kao i drugih patoloških procesa (kao što je psorijaza). Dok je u svim vrstama detektovan niz jedinjenja sa poznatom COX/LOX aktivnošću (nezasićene masne kiseline, flavonoidi, kumarini, fenolne kiseline), u ovom trenutku nije bilo moguće utvrditi koja jedinjenja su odgovorna za uočenu aktivnost.

- Na kraju, ispitano je *ex vivo* dejstvo odabranih ekstrakata na preživljavanje i proliferaciju ćelijskih linija humanog karcinoma cerviksa, ER+ i ER- humanog adenokarcinoma dojke, i humanih fibroblasta pluća kao referentnog normalnog tkiva. Citotoksičnost većine ekstrakata prema ćelijama tumora bila je niska do umerena, i tipično uporediva sa dejstvom na zdrave ćelije. Kod više uzoraka uočeno je odstupanje od uobičajene zavisnosti doza-odgovor, što može ukazivati na pro-proliferativno dejstvo nekih komponenata. Biće neophodno frakcionisanje vođeno aktivnošću u cilju identifikacije jedinjenja odgovornih za uočeni efekat, kao i utvrđivanja mogućnosti pojačanja aktivnosti i poboljšanja selektivnosti.

Sumarno, dobijeni rezultati ukazuju na potencijal ispitivanih vrsta kao izvora bioaktivnih molekula. Iako su ekstrakti uglavnom pokazali slabu do umerenu aktivnost, ne treba zaboraviti da su u pitanju sirovi ekstrakti sa visokim sadržajem inaktivnih, balastnih materija. Može se očekivati da će primenom različitih tehnika razdvajanja biti moguće izolovati čiste aktivne principe ili njihove koncentrate sa znatno poboljšanim dejstvom. Naravno, ne sme se zaboraviti ni činjenica da su sva ispitivanja vršena u *in vitro* ili *ex vivo* uslovima. Da bi se utvrdio pun potencijal navedenih ekstrakata i njihovih aktivnih komponenti, biće neophodno uzeti u obzir i procese apsorpcije i metabolizma pod dejstvom digestivnih enzima i crevne mikroflore, transport putem krvotoka, degradaciju u jetri, konjugaciju i izlučivanje.

7. Reference

1. Kapetanos, C., Karioti, A., Bojović, S., Marin, P., Veljić, M., Skaltsa, H. (2008): Chemical and principal-component analyses of the essential oils of Apioideae taxa (Apiaceae) from central Balkan, *Chem. Biodivers.* **5**: 101–119.
2. Fejes, S. Blázovics, A., Lugasi, A., Lemberkovics, É., Petri, G., Kéry, Á. (2000): In vitro antioxidant activity of *Anthriscus cerefolium* L. (Hoffm.) extracts, *J. Ethnopharmacol.* **69**: 259–265.
3. Kozawa, M., Baba, K., Matsuyama, Y., Kido, T., Sakai, M., Takemoto, T. (1982): Components of the root of *Anthriscus sylvestris* Hoffm. II. Insecticidal activity, *Chem. Pharm. Bull.*, **30**: 2885–2888.
4. Jeong, G.-S., Kwon, O.-K., Park, B.-Y., Oh, S.-R., Ahn, K.-S., Chang, M.-J., Oh, W. K., Kim, J.-C., Min, B.-S., Kim, Y.-C., Lee, H.-K. (2007): Lignans and Coumarins from the Roots of *Anthriscus sylvestris* and Their Increase of Caspase-3 Activity in HL-60 Cells, *Biol. Pharm. Bull.* **30**: 1340–1343.
5. Koulman, A. (2003): Podophyllotoxin. A Study of the Biosynthesis, Evolution, Function and Use of Podophyllotoxin and Related Lignans, Stichting Regenboog drukkerij, Groningen, The Netherlands.
6. Milovanovic, M., Picuric-Jovanovic, K., Vucelic-Radovic, B., Vrbaski, Z. (1996): Antioxidant Effects of Flavonoids of *Anthriscus sylvestris* in Lard, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **73**: 773–776.
7. Demirci, B., Koşar, M., Demirci, F., Dinç, M., Başer, K.H.C. (2007): Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil of *Chaerophyllum libanoticum* Boiss. et Kotschy, *Food Chem.* **105**: 1512–1517.
8. Singh, K.N., Lal, B. (2008): Ethnomedicines used against four common ailments by the tribal communities of Lahaul-Spiti in western Himalaya, *J. Ethnopharmacol.* **115**: 147–159.
9. Ikeda, R., Nagao, T., Okabe, H., Nakano, Y., Matsunaga, H., Katano, M., Mori, M. (1998): Antiproliferative constituents in *Umbelliferae* plants. III. Constituents in the root and the ground part of *Anthriscus sylvestris* Hoffm., *Chem. Pharm. Bull.* **46**: 871–874.
10. Ikeda, R., Nagao, T., Okabe, H., Nakano, Y., Matsunaga, H., Katano, M., Mori, M. (1998): Antiproliferative constituents in *Umbelliferae* plants. IV. Constituents in the fruits of *Anthriscus sylvestris* Hoffm., *Chem. Pharm. Bull.* **46**: 875–878.
11. Van Uden, W., Bos, J.A., Boeke, G.M., Woerdenbag, H.J., Pras, N. (1997): The Large-Scale Isolation of Deoxypodophyllotoxin from Rhizomes of *Anthriscus sylvestris* Followed by Its Bioconversion into 5-Methoxypodophyllotoxin β -D-Glucoside by Cell Cultures of *Linum flavum*, *J. Nat. Prod.* **60**: 401–403.
12. Koulman, A., Batterman, S., van Putten, F.M., Bos, R., Quax, W.J. (2003): Lignan profiles of indoor-cultivated *Anthriscus sylvestris*, *Planta Med.* **69**: 959–61.
13. Kozawa, M., Morita, N., Hata, K. (1978): Chemical components of the roots of *Anthriscus sylvestris* Hoffm. I. Structures of an acyloxycarboxylic acid and a new phenylpropanoid ester, anthriscusin, *Yakugaku Zasshi*, **98**: 1486–1490.
14. Lim, Y.-H., Leem, M.-J., Shin, D.-H., Chang, H.-B., Hong, S.-W., Moon, E.-Y., Lee, D.-K., Yoon, S.-J., Woo, W.-S. (1999): Cytotoxic constituents from the roots of *Anthriscus sylvestris*, *Arch. Pharmacol. Res.* **22**: 208–212.
15. Kozawa, M., Morita, N., Hata, K. (1978): Structure of anthriscusin, a new phenylpropanoid ester from the roots of *Anthriscus sylvestris* Hoffm., *Chem. Pharm. Bull.* **26**: 1337–1338.
16. Kurihara, T., Kikuchi, M., Suzuki, S., Hisamichi, S. (1978): Studies on the constituents of *Anthriscus sylvestris* Hoffm. I. On the components of the radix, *Yakugaku Zasshi*, **98**: 1586–1591.
17. Kurihara, T., Kikuchi, M. (1979): Studies on the constituents of *Anthriscus sylvestris* Hoffm. II. On the components of the flowers and leaves, *Yakugaku Zasshi*, **99**: 602–606.
18. Dall'Acqua, S., Viola, G., Piacente, S., Cappelletti, E.M., Innocenti, G. (2004): Cytotoxic Constituents of Roots of *Chaerophyllum hirsutum*, *J. Nat. Prod.* **67**: 1588–1590.
19. Dall'Acqua, S., Innocenti, G. (2004): Antioxidant compounds from *Chaerophyllum hirsutum* extracts, *Fitoterapia* **75**: 592–595.
20. Fejes, S., Lemberkovics, E., Balázs, A., Apáti, P., Kristó, T.S., Szöke, E., Kéry, Á., Blázovics, A. (2003): Antioxidant activity of different compounds from *Anthriscus cerefolium* L. (Hoffm.), *Acta. Hort.* (ISHS) **597**: 191–198.
21. Bos, R., Koulman, A., Woerdenbag, H.J., Quax, W.J., Pras, N. (2002): Volatile components from *Anthriscus sylvestris* (L.) Hoffm., *J. Chromatogr. A* **966**: 233–238.
22. Simándi, B., Oszagyán, M., Lemberkovics, É., Petri, G., Kéry, Á., Fejes, Sz. (1996): Comparison of the volatile composition of chervil oil obtained by hydrodistillation and supercritical fluid extraction, *J. Essent. Oil Res.* **8**: 305–306.
23. Nickavar, B., Mojab, F., Mojahedi, A. (2009): Composition of the essential oil from *Anthriscus nemorosa*, *Chem. Nat. Compd.* **45**: 443–444.

24. Chizzola, R. (2009): Composition of the essential oil of *Chaerophyllum aromaticum* (Apiaceae) growing wild in Austria, *Nat. Prod. Commun.* **4**: 1235–1238.
25. Pedro, L.G., da Silva, J.A., Barroso, J.G., Figueiredo, A.C., Deans, S.G., Looman, A., Scheffer, J.J.C. (1999): Composition of the essential oil of *Chaerophyllum azoricum* Trel., an endemic species of the Azores archipelago, *Flavour Fragr.* **14**: 287–289.
26. Kürkçüoğlu, M., Başer, K.H.C., Işcan, G., Malyer, H., Kaynak, G. (2006): Composition and anticandidal activity of the essential oil of *Chaerophyllum byzantinum* Boiss., *Flavour Fragr. J.* **21**: 115–117.
27. Başer, K.H.C., Özek, G., Özek, T., Duran, A. (2006): Composition of the essential oil of *Chaerophyllum macropodium* Boiss. fruits obtained by microdistillation, *J. Essent. Oil Res.* **18**: 515–517.
28. Suzuki, S., Umezawa, T., (2007): Biosynthesis of lignans and norlignans, *J. Wood. Sci.* **53**:273–284.
29. Sakakibara, N., Suzuki, S., Umezawa, T., Shimada, M. (2003): Biosynthesis of yatein in *Anthriscus sylvestris*, *Org. Biomol. Chem.* **1**: 2474–2485.
30. Rollinger, J.M., Zidorn, C., Dobner, M.J., Ellmerer, E.P., Stuppner, H. (2003): Lignans, Phenylpropanoids and Polyacetylenes from *Chaerophyllum aureum* L. (Apiaceae), *Z. Naturforsch. C.* **58**: 553–557.
31. Buckingham, J. (ur.) (2007): Dictionary of Natural Products. Version 15.1 on CD-ROM, Chapman & Hall/CRC Press, London, New York.
32. Khetwal, K.S., Harbola, S. (1993): X-ray crystal structure and absolute configuration of kaerophyllin (chaerophyllin), *J. Nat. Prod.* **56**: 318–328.
33. López-Lázaro, M. (2009): Distribution and biological activities of the flavonoid luteolin, *Mini-Rev. Med. Chem.* **9**: 31–59.
34. Robinson, G.M., Robinson, R. (1931): A survey of anthocyanins. I. *Biochem J.* **25**: 1687–1705.
35. Gonnet, J.-F. (1986): Individual variation of flavonoid glycosides in *Chaerophyllum aureum*, *Biochem. Syst. Ecol.* **14**: 409–415.
36. Heywood, V.H. (ur.), (1971): The Biology and chemistry of the Umbelliferae, Supplement I to the Botanical Journal of the Linnean Society, Vol. 64, Academic Press, Inc., London., UK.
37. Yong, Y., Shin, S.Y., Lee, Y.H., Lim, Y. (2009): Antitumor activity of deoxypodophyllotoxin isolated from *Anthriscus sylvestris*: Induction of G2/M cell cycle arrest and caspase-dependent apoptosis, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **19**: 4367–4371.
38. Takhtajan A. (1997): Diversity and classification of flowering plants, Columbia University Press, New York, USA.
39. Nikolić, B. (1973): Fam. Apiaceae Lindley. u: Josifović, M. (ur.): Flora SR Srbije V: 183–349, SANU, Beograd.
40. Tutin, T.G. (1968): Umbelliferae. u: Tutin, T.G., Heywood, V.H., Burges, N.A., Moore, D.M., Valentine, D.H., Walters, S.M., Webb, D.A. (ur.) Flora Europaea Vol. 2: 315–319, Cambridge University Press, Cambridge, UK.
41. Downie, S.R., Katz-Downie, D.S., Spalik, K. (2000): A phylogeny of Apiaceae tribe Scandiceae: evidence from nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences, *Am. J. Bot.* **87**: 76–95.
42. Spalik, K., Wojewódzka, A., Downie, S.R. (2001): Delimitation of genera in Apiaceae with examples from Scandiceae subtribe Scandicinae, *Edinb. J. Bot.* **58**: 331–346.
43. Pimenov, M.G., Leonov, M.V. (1993): The Genera of the Umbelliferae: A nomenclator. Royal Botanic Gardens Kew, Botanical Garden of Moscow University, Moscow, Russia.
44. Pimenov, M.G., Sdobina, L.I. (1984): Nodal anatomy as a taxonomic character in the family Umbelliferae. *Botanicheskij Zhurnal* **69**: 283–294.
45. Schneyer, V.C., Borshchenko, G.P., Pimenov, M.G., Leonov, M.V. (1991): The serological investigation of intergeneric relationships in the subfamily Apioideae (Apiaceae). *Botanicheskij Zhurnal* **76**: 245–257.
46. Nikolić, V., Diklić, N. (1986): *Anthriscus nitidus* (Wahlenb.) Garcke 1865, u: Sarić, M. (ur.): Flora SR Srbije X, dodatak (2): 151–152. SANU, Beograd.
47. Nikolić, V., Diklić, N. (1986): *Anthriscus fumaroides* (Waldst. et Kit.) Spreng. 1813, u: Sarić, M. (ur.): Flora SR Srbije X, dodatak (2): 151–152. SANU, Beograd.
48. Nikolić, V. (1977): Fam. Apiaceae, u: Josifović, M. (ur.): Flora SR Srbije IX, dodatak: 144–150. SANU, Beograd.
49. Cannon, J.F.M. (1968): *Chaerophyllum* L. u: Tutin, T.G., Heywood, V.H., Burges, N.A., Moore, D.M., Valentine, D.H., Walters, S.M., Webb, D.A. (ur.), Flora Europaea Vol. 2: 324–326, Cambridge University Press, Cambridge, UK.

50. Cannon, J.F.M. (1968): *Anthriscus* Pers. u: Tutin, T.G., Heywood, V.H., Burges, N.A., Moore, D.M., Valentine, D.H., Walters, S.M., Webb, D.A. (ur.), *Flora Europaea* Vol. 2: 326, Cambridge University Press, Cambridge, UK.
51. Cannon, J.F.M. (1968): *Scandix* L. u: Tutin, T.G., Heywood, V.H., Burges, N.A., Moore, D.M., Valentine, D.H., Walters, S.M., Webb, D.A. (ur.), *Flora Europaea* Vol. 2: 326–327, Cambridge University Press, Cambridge, UK.
52. http://www.floranordica.org/Review/-Review_public/accounts/Anthriscus.html (pristupljeno 15.4.2010.)
53. Fejes, Sz., Blázovics, A., Lemberkovics, É., Petri, G., Szőke, É., Kéry, Á. (2000): Free Radical Scavenging and Membrane Protective Effects of Methanol Extracts from *Anthriscus cerefolium* L. (Hoffm.) and *Petroselinum crispum* (Mill.) Nym. ex A. W. Hill., *Phytother. Res.* **14**: 362–365.
54. Çoruh, N., Sağdıçoğlu Celep, A.G., Özgökçe, F. (2007): Antioxidant properties of *Prangos ferulacea* (L.) Lindl., *Chaerophyllum macropodium* Boiss. and *Heracleum persicum* Desf. from Apiaceae family used as food in Eastern Anatolia and their inhibitory effects on glutathione-S-transferase, *Food Chem.* **100**: 1237–1242.
55. Jin, M., Moon, T.C., Quan, Z., Lee, E., Kim, Y.K., Yang, J.H., Suh, S.-J., Jeong, T.C., Lee, S.H., Kim, C.-H., Chang, H.W. (2008): The Naturally Occurring Flavolignan, Deoxypodophyllotoxin, Inhibits Lipopolysaccharide-Induced iNOS Expression through the NF-κB Activation in RAW264.7 Macrophage Cells, *Biol. Pharm. Bull.* **31**: 1312–1315.
56. Lee, S.H., Son, M.J., Ju, H.K., Lin, C.X., Moon, T.C., Choi, H.-G., Son, J.K., Chang, H.W. (2004): Dual Inhibition of Cyclooxygenases-2 and 5-Lipoxygenase by Deoxypodophyllotoxin in Mouse Bone Marrow-Derived Mast Cells, *Biol. Pharm. Bull.* **27**: 786–788.
57. Morishita, H., Ohnishi, M. (2001): Absorption, metabolism and biological activities of chlorogenic acids and related compounds, u: Atta-ur-Rahman (ur.), *Studies in Natural Products Chemistry*, Vol. 25. Bioactive natural products (Part F), Elsevier Science B.V., Amsterdam.
58. Armstrong, D. (ur.) (2002), Oxidative stress biomarkers and antioxidant protocols, *Methods in Molecular Biology* vol. 186, Humana Press, Totowa, New Jersey, USA.
59. Frankel, E.N., Meyer, A.S. (2000): The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants, *J. Sci. Food. Agric.* **80**: 1925–1941.
60. Halliwell, B. (2009): The wanderings of a free radical, *Free Radical Biol. Med.* **46**: 531–42.
61. Gautam, R., Jachak, S.M. (2009): Recent developments in anti-inflammatory natural products, *Med. Res. Rev.* **29**: 767–820.
62. Schmitz, M.L., Bacher, S. (2005): Novel molecular targets in the search for anti-inflammatory agents, *Phytochem. Rev.* **4**: 19–25.
63. Ríos, J.L., Giner, R.M., Prieto, J.M. (2002): New findings on the bioactivity of lignans, u: Atta-ur-Rahman (ur.), *Studies in Natural Products Chemistry*, Vol. 26, Bioactive natural products (Part D), Elsevier Science B.V., Amsterdam, The Netherlands.
64. Tincani, A., Andreoli, L., Bazzani, C., Bosiso, D., Sozzani, S. (2007): Inflammatory molecules: A target for treatment of systemic autoimmune diseases, *Autoimmun. Rev.* **7**: 1–7.
65. Marks, F., Fürstenberger, G. (ur.) (1999): Prostaglandins, leukotrienes and other eicosanoids: from biogenesis to clinical application, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany.
66. Schneider, I., Bucar, F. (2005): Lipoxygenase Inhibitors from natural plant sources. Part 1: Medicinal plants with inhibitory activity on arachidonate 5-lipoxygenase and 5-lipoxygenase/cyclooxygenase, *Phytother. Res.* **19**: 81–102.
67. Ringbom, T., Huss, U., Stenholm, Å., Flock, S., Skattebøl, L., Perera, P., Bohlin, L. (2001): COX-2 inhibitory effects of naturally occurring and modified fatty acids, *J. Nat. Prod.* **64**: 745–749.
68. Pezzuto, J.M., Kosmeder II, J.W., Park, E.-J., Lee, S.K., Cuendet, M., Gills, J., Bhat, K., Grubjesic, S., Park, H.-S., Mata-Greenwood, E., Tan, Y.M., Yu, R., Lantvit, D.D., Kinghorn, A.D. (2005): Characterization of natural product chemopreventive agents, u: Kelloff, G.J., Hawk, E.T., Sigman, C.C. (ur.), *Cancer Chemoprevention*, Vol. 2: Strategies for Cancer Chemoprevention., Humana Press Inc, New Jersey, USA.
69. Lawrence, T. (2007): Inflammation and cancer: a failure of resolution?, *Trends Pharmacol. Sci.* **28**: 162–165.
70. Schneider, I., Bucar, F. (2005): Lipoxygenase Inhibitors from natural plant sources. Part 2: Medicinal plants with inhibitory activity on arachidonate 12-lipoxygenase, 15-lipoxygenase and leukotriene receptor antagonists, *Phytother. Res.* **19**: 263–272.
71. Wiart, C (2006): *Ethnopharmacology of medicinal plants: Asia and Pacific*, Humana Press Inc., New Jersey, USA.
72. Bremner, P., Heinrich, M. (2005): Natural products and their role as inhibitors of the pro-inflammatory transcription factor NF-κB, *Phytochem. Rev.* **4**: 27–37.

73. Rahman, I., Biswas, S.K., Kirkham, P.A. (2006): Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols, *Biochem. Pharmacol.* **72**: 1439–1452.
74. Yuspa, S.T. (2000): Overview of carcinogenesis: past, present and future, *Carcinogenesis*, **21**: 341–344.
75. Yokota, J. (2000): Tumor progression and metastasis, *Carcinogenesis* **21**: 497–503.
76. Henderson, B.E., Feigelson, H.S. (2000): Hormonal carcinogenesis, *Carcinogenesis* **21**: 427–433.
77. Sherr, C.J. (2004): Principles of tumor suppression, *Cell* **116**: 235–346.
78. Lowe, S., Lin, A.W. (2000): Apoptosis in cancer, *Carcinogenesis* **21**: 485–495.
79. Kalden, J.R., Herrmann, M. (ur.) (2003): Apoptosis and Autoimmunity. From Mechanisms to Treatments, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, Germany.
80. Saleem, M., Kim, H.J., Ali, M.S., Lee, Y.S. (2005): An update on bioactive plant lignans, *Nat. Prod. Rep.* **22**: 696–716.
81. Dewick, P.M. (2009): Medicinal natural products: A biosynthetic approach, John Wiley & Sons Ltd, Chippingham, UK.
82. Humphreys, J.M., Chapple, C. (2002): Rewriting the lignin roadmap, *Curr. Opin. Plant Biol.* **5**: 224–229.
83. Vermerris, W., Nicholson, R. (2006): Phenolic compound biochemistry, Springer, Dordrecht, The Netherlands.
84. Clifford, M.N. (2000): Chlorogenic acids and other cinnamates – nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism, *J. Sci. Food Agric.* **80**: 1033–1043.
85. Heywood, V.H. (ur.), (1972): Plant phenolics, Oliver & Boyd, Edinburgh, UK.
86. Ruiz, J.M., Romero, L. (2001): Bioactivity of the phenolic compounds in higher plants, u: Atta-ur-Rahman (ur.), Studies in Natural Products Chemistry, Vol. 25. Bioactive natural products (Part F), Elsevier Science B.V., Oxford, UK.
87. Tomás-Barberán, F., Clifford, M.N. (2000): Dietary hydroxybenzoic acid derivatives – nature, occurrence and dietary burden, *J. Sci. Food Agric.* **80**: 1024–1032.
88. VanEtten, H.D., Mansfield, J.W., Bailey, J.A., Farmer, E. (1994): Two classes of plant antibiotics: phytoalexins versus “phytoanticipins”, *Plant Cell* **6**: 1191–1192.
89. Matheis, G., Whitaker, J.R. (1984): Modification of proteins by polyphenol oxidase and peroxidase and their products, *J. Food Biochem.* **8**: 137–162.
90. Ryals, J., Uknes, S., Ward, E. (1994): Systemic acquired resistance, *Plant Physiol.* **104**: 1109–1112.
91. Crozier, A., Clifford, M.N., Ashihara, H. (2006): Plant secondary metabolites: occurrence, structure and role in human diet, Blackwell Publishing, Singapore.
92. Stonier, T., Macgladrie, K., Shaw, G. (1979): Studies on auxin protectors XIV. Chlorogenic acid, a low molecular weight auxin protector in sunflower, *Plant Cell Environ.* **2**: 79–82.
93. Azuma, K., Ippoushi, K., Nakayama, M., Ito, H., Higashio, H., Terao, J. (2000): Absorption of chlorogenic acid and caffeic acid in rats after oral administration, *J. Agric. Food Chem.* **48**: 5496–5500.
94. Gould, K.S., Lister, C. (2006): Flavonoid functions in plants, u: Andersen, Ø.M., Markham, K.R. (ur.), Flavonoids: Chemistry, biochemistry and applications, Taylor & Francis, Boca Raton, USA.
95. Goodwin, B.L., Ruthven, C.R.J., Sandler, M. (1994): Gut flora and the origin of some urinary aromatic phenolic compounds, *Biochem. Pharmacol.* **47**: 2294–2297.
96. Terao, J., Karasawa, H., Arai, H., Nagao, A., Suzuki, T., Takama, K. (1993): Peroxyl radical scavenging activity of caffeic acid and its related phenolic compounds in solution, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **57**: 1204–1205.
97. Laranjinha, J.A.N., Almeida, L.M., Madeira, V.M.C. (1994): Reactivity of dietary phenolic acids with peroxyl radicals: antioxidant activity upon low density lipoprotein peroxidation, *Biochem. Pharmacol.* **48**: 487–494.
98. Kono, Y., Kashine, S., Yoneyama, T., Sakamoto, Y., Matsui, Y., Shibata, H. (1998): Iron chelation by chlorogenic acid as natural antioxidant, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **62**: 22–27.
100. Laranjinha, J.A.N., Vieira, O., Madeira, V., Almeida, L. (1995): Two related phenolic antioxidants with opposite effects on vitamin e content in low density lipoproteins oxidized by ferrylmyoglobin: Consumption vs regeneration, *Arch. Biochem. Biophys.* **323**: 373–381.
101. Inoue, M., Suzuki, R., Sakaguchi, N., Li, Z., Takeda, T., Ogihara, Y., Jiang, B.Y., Chen, Y. (1995): Selective induction of cell death in cancer cells by gallic acids, *Biol. Pharmaceut. Bull.*, **18**: 1526–1530.

102. Serrano, A., Palacios, C., Roy, G., Cespon, C., Villar, M.L., Nocito, M., Gonzalez-Porque, P. (1998): Derivatives of gallic acids induce apoptosis in tumoral cell lines and inhibit lymphocyte proliferation, *Arch. Biochem. Biophys.* **350**: 49–54.
103. Mirzoeva, O.K., Calder, P.C. (1996): The effect of propolis and its components on eicosanoid production during the inflammatory response, *Prostag. Leukotr. Ess.* **55**: 441–449.
104. Tatefuji, T., Izumi, N., Ohta, T., Arai, S., Ikeda, M., Kurimoto, M. (1996): Isolation and identification of compounds from Brazilian propolis which enhance macrophage spreading and mobility, *Biol. Pharm. Bull.* **19**: 966–970.
105. Kimura, Y., Okuda, H. (1987): Studies on the activities of tannins and related compounds, X. Effects of caffeetannins and related compounds on arachidonate metabolism in human polymorphonuclear leukocytes, *J. Nat. Prod.* **50**: 392–399.
106. Robinson Jr, W.E, Cordeiro, M., Abdel Malek, S., Jia, Q., Chow, S.A., Reinecke, M.G., Mitchell, W.M. (1996): Diceffeoylquinic acid inhibitors of human immunodeficiency virus integrase: inhibition of the core catalytic domain of human immunodeficiency virus integrase, *Mol. Pharmacol.* **50**: 845–855.
107. Almeida, A.P., Miranda, M.M.F.S., Simoni, I.C., Wigg, M.D., Lagrota, M.H.C., Costa, S.S. (1998): Flavonol Monoglycosides Isolated from the Antiviral Fractions of *Persea Americana* (Lauraceae) Leaf Infusion, *Phytother.Res.* **12**: 562–567.
108. Anand, K.K., Singh, B., Saxena, A.K., Chandan, B.K., Gupta, V.N., Bhardwaj, V. (1997): 3,4,5-trihydroxybenzoic acid (gallic acid), the hepatoprotective principle in the fruits of *Terminalia bellerica* – bioassay guided activity, *Pharmacol. Res.* **36**: 315–321.
109. Sardari, S., Nishibe, S., Daneshtalab, M. (2000): Coumarins, the bioactive structures with antifungal property, u: Atta-ur-Rahman (ur.), *Studies in Natural Products Chemistry, Vol. 23, Structure and chemistry (Part D)*, Elsevier Science B.V., Amsterdam, The Netherlands.
110. Grayer, R.J., Harborne, J.B. (1994): A survey of antifungal compounds from higher plants, 1982–1993, *Phytochem.* **37**: 19–42.
111. Houlst, J.R.S., Payá, M. (1996): Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: natural products with therapeutic potential, *Gen. Pharmac.* **27**: 713–722.
112. Mabry, T.J., Ulubelen, A. (1980): Chemistry and utilization of phenylpropanoids including flavonoids, coumarins, and lignans, *J. Agric. Food Chem.* **28**: 188–196.
113. Thornes, R.D., Daly, L., Lynch, G., Breslin, B., Browne, H., Browne, H.Y., Corrigan, T., Daly, P., Edwards, G., Gaffney, E., Henley, J., Healy, T., Keane, F., Lennon, F., McMurray, N., O’Loughlin, S., Shine, M., Tanner, A. (1994): Treatment with coumarin to prevent or delay recurrence of malignant melanoma, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **120**: S32–S34.
114. Narayana, K.R., Reddy, M.S., Chaluvadi, M.R., Krishna, D.R. (2001): Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential, *Indian J. Pharmacol.* **33**: 2–16.
115. Iwashina, T. (2000): The structure and distribution of the flavonoids in plants, *J. Plant Res.* **113**: 287–299.
116. Flavonoid viewer, URL: www.metabolome.jp/software/FlavonoidViewer/FlavonoidViewer, pristupljeno 16.2.2010.
117. Boik, J. (2001): *Natural compounds in cancer therapy*, Oregon Medical Press, LLC, Princeton, USA.
118. Hollman, P.C.H., Arts, I.C.W. (2000): Flavonols, flavones and flavanols – nature, occurrence and dietary burden, *J Sci Food Agric* **80**: 1081–1093.
119. Williams, C.A., Harborne, J.B. (1994): Flavone and flavonoid glycosides, u: Harborne, J.B. (ur.), *The Flavonoids: Advances in research since 1986*, Chapman and Hall, London, UK.
120. Tomás-Barberán, F.A., Clifford, M.N. (2000): Flavanones, chalcones and dihydrochalcones – nature, occurrence and dietary burden, *J Sci Food Agric* **80**: 1073–1080.
121. Clifford, M.N. (2000): Anthocyanins – natura, occurrence and dietary burden, *J. Sci. Food Agric.* **80**: 1063–1072.
122. Stapleton, A.E. (1992): Ultraviolet radiation and plants: burning questions, *Plant Cell* **4**: 1353–1358.
123. Olsson, L.C., Veit, M., Weissenböck, G., Bornman, J.F. (1998): Differential flavonoid response to enhanced UV-B radiation in *Brassica napus*, *Phytochemistry* **49**: 1021–1028.
124. Kong, J.-M., Chia, L.-S., Goh, N.-K., Chia, T.-F., Brouillard, R. (2003): Analysis and biological activities of anthocyanins, *Phytochemistry* **64**: 923–933.

125. Tsuda, T., Horio, F., Osawa, T. (1999): Absorption and metabolism of cyaniding 3-O- β -D-glucoside in rats, *FEBS Lett.* **449**: 179–182.
126. Day, A.J., DuPont, M.S., Ridley, S., Rhodes, M., Rhodes, M.J.C., Morgan, M.R.A., Williamson, G. (1998): Deglycosilation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver β -glucosidase activity, *FEBS Lett.*, **436**: 71–75.
127. Day, A., Cañada, F.J., Díaz, J.C., Kroon, P.A., Mclauchlan, R., Faulds, C.B., Plumb, G.W., Morgan, M.R.A., Williamson, G. (2000): Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolysed by the lactase site of lactase phlorizin hydrolase, *FEBS Lett.*, **468**: 166–170.
128. Hung, H.-C., Joshipura, K.J., Jiang, R., Hu, F.B., Hunter, D., Smith-Warner, S.A., Colditz, G.A., Rosner, B., Spiegelman, D., Willett, W.C. (2004): Fruit and vegetable intake and risk of major chronic disease, *J. Natl. Cancer Inst.* **96**: 1577–1584.
129. Ghiselli, A., Natella, F., Guidi, A., Montanari, L., Fantozzi, P., Scaccini, C. (2000): Beer increases plasma antioxidant capacity in humans, *J. Nutr. Biochem.* **11**: 76–80.
130. Kimura, M., Umegaki, K., Kasuya, Y., Sugisawa, A., Higuchi, M. (2002): The relation between single/double or repeated tea catechin ingestions and plasma antioxidant activity in humans, *Eur. J. Clin. Nutr.* **56**: 1186–1193.
131. Mazza, G., Kay, C.D., Cottrell, T., Holub, B.J. (2002): Absorption of anthocyanins from blueberries and serum antioxidant status in human subjects, *J. Agric. Food Chem.* **50**: 7731–7737.
132. Maxwell, S., Thorpe, G. (1996): Tea flavonoids have little short term impact on serum antioxidant activity, *Br. Med. J.*, **313**: 229.
133. Pereira, M.A., Grubbs, C.J., Barnes, L.H., Li, H., Olson, G.R., Eto, I., Juliana, M., Whitaker, L.M., Kelloff, G.J., Steele, V.E., Lubet, R.A. (1996): Effects of the phytochemicals, curcumin and quercetin, upon azoxymethane-induced colon cancer and 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced mammary cells in rats, *Carcinogenesis* **17**: 1305–1311.
134. Rosenberg Zand, R.S., Jenkins, D.J.A., Diamandis, E.P. (2000): Steroid hormone activity of flavonoids and related compounds, *Breast Cancer Res. Treat.* **62**: 35–49.
135. Duncan, A.M., Underhill, K.E.W., Xu, X., LaValleur, J., Phipps, W.R., Kurzer, M.S. (1999): Modest hormonal effects of soy isoflavones in postmenopausal women, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **84**: 3479–3484.
136. Hargreaves, D.F., Potten, C.S., Harding, C., Shaw, L.E., Morton, M.S., Roberts, S.A., Howell, A., Bundred, N.J. (1999): Two-week dietary soy supplementation has an estrogenic effect on normal premenopausal breast, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **84**: 4017–4024.
137. Fournier, D.B., Erdman Jr, J.W., Gordon, G.B. (1998): Soy, its components, and cancer prevention: a review of the in vitro, animal, and human data, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **7**: 1055–1065.
138. Landström, M., Zhang, J.-X., Hallmans, G., Åman, P., Bergh, A., Damber, J.-E., Mazur, W., Wähälä, K., Adlercreutz, H. (1998): Inhibitory effects of soy and rye diets on the development of Dunning R3327 prostate adenocarcinoma in rats, *Prostate* **36**: 151–161.
139. Kawaii, S., Tomono, Y., Katase, E., Ogawa, K., Yano, M. (1999): Antiproliferative activity of flavonoids on several cancer cell lines, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **63**: 896–899.
140. Csokay, B., Prajda, N., Weber, G., Olah, E. (1997): Molecular mechanisms in the antiproliferant action of quercetin, *Life Sci.* **60**: 2157–2163.
141. Yoshida, M., Sakai, T., Hosokawa, N., Marui, N., Matsumoto, K., Fujioka, A., Nishino, H., Aoike, A. (1990): The effect of quercetin on cell cycle progression and growth of human gastric cancer cells, *FEBS Lett.* **260**: 10–13.
142. Ferry, D.R., Smith, A., Malkhandi, J., Fyfe, D.W., deTakats, P.G., Anderson, D., Baker, J., Kerr, D.J. (1996): Phase I clinical trial of the flavonoid quercetin: pharmacokinetics and evidence for *in vivo* tyrosine kinase inhibition, *Clin. Cancer. Res.* **2**: 659–668.
143. Lyn-Cook, B.D., Stottman, H.L., Yan, Z., Blann, E., Kadlubar, F.F., Hammons, G.J. (1999): The effects of phytoestrogens on human pancreatic tumor cells in vitro, *Cancer Lett.*, **142**: 111–119.
144. Badia, E., Sacanella, E., Fernández-Solá, J., Nicolás, J.M., Antúnez, E., Rotilio, D., de Gaetano, G., Urbano-Márquez, A., Estruch, R. (2004): Decreased tumor necrosis factor-induced adhesion of human monocytes to endothelial cells after moderate alcohol consumption, *Am. J. Clin. Nutr.* **80**: 225–230.
145. Xu, J.-W., Ikeda, K., Yamori, Y. (2004): Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by cyanidin-3-glucoside, a typical anthocyanin pigment, *Hypertension* **44**: 217–222.
146. Haworth, R.D. (1936): Natural resins, *Ann. Rep. Prog. Chem.* **33**: 266–279.

147. Moss, G.P. (2000): Nomenclature of lignans and neolignans (IUPAC Recommendations 2000), *Pure Appl. Chem.* **72**:1493–1523.
148. R. Stevenson, (1995): Some Aspects of the Chemistry of Lignans, u: Atta-ur-Rahman (ur.), Studies in Natural Products Chemistry, Vol. 17, Structure and chemistry (Part D), Elsevier Science B.V., Amsterdam, The Netherlands.
149. Davin, L.B., Wang, H.-B., Crowell, A.L., Bedgar, D.L., Martin, D.M., Sarkanen, S., Lewis, N.G. (1997): Stereoselective bimolecular phenoxy radical coupling by an auxilliary (dirigent) protein without an active center, *Science* **275**: 362–366.
150. Davin, L.B., Lewis, N.G. (2003): An historical perspective on lignan biosynthesis: Monolignol, allylphenol and hydroxycinnamic acid coupling and downstream metabolism, *Phytochem. Rev.* **2**: 257–288.
151. Paré, P.W., Wang, H.-B., Davin, L.B., Lewis, N.G. (1994): (+)-Pinoresinol synthase: A streoselective oxidase catalysing 8,8'-lignan formation in *Forsythia intermedia*, *Tetrahedron Lett.* **35**: 4731–4734.
152. Jackson, D.E., Dewick, P.M. (1984): Biosynthesis of Podophyllum lignans – I. Cinnamic acid precursors of podophyllotoxin in *Podophyllum hexandrum*, *Phytochemistry* **23**: 1029–1035.
153. Jackson, D.E., Dewick, P.M. (1984): Biosynthesis of Podophyllum lignans – II. Interconversions of aryltetralin lignans on *Podophyllum hexandrum*, *Phytochemistry* **23**: 1037–1042.
154. Kamil, W.M., Dewick, P.M. (1986): Biosynthesis of the lignans α - and β -peltatin, *Phytochemistry* **25**: 2089–2092.
155. Ward, R.S. (1995): Recent Advances in the Chemistry of Lignans, u: Atta-ur-Rahman (ur.), Studies in Natural Products Chemistry, Vol. 24, Bioactive natural products (Part E), 739–798, Elsevier Science B.V., Amsterdam, The Netherlands.
156. Broomhead, A.J., Rahman, M.M.A., Dewick, P.M., Jackson, D.E., Lucas, J.A. (1991): Matairesinol as precursor of Podophyllum lignans, *Phytochemistry*, **30**: 1489.
157. Ayres, D., Loike, J.D. (1990): Chemistry and pharmacology of natural products. Lignans: chemical, biological and clinical properties, Cambridge University Press, Cambridge.
158. Holmbom, B., Eckerman, C., Eklund, P., Hemming, J., Nisula, L., Reunanen, M., Sjöholm, Sundberg, A., Sundberg, K., Wilför, S. (2003): Knots in trees – A new rich source of lignans, *Phytochem. Rev.* **2**: 331–340.
159. Kim, M.K., Jeon, J.-H., Fujita, M., Davin, L.B., Lewis, N.G. (2002) The western red cedar (*Thuja plicata*) 8–8' DIRIGENT family displays diverse expression patterns and conserved monolignol coupling specificity. *Plant Mol Biol* **49**:199–214.
160. Ralph, S., Park, J.-Y., Bohlmann, J., Mansfield, S.D. (2006): Dirigent proteins in conifer defense: gene discovery, phylogeny, and differential wound- and insect-induced expression of a family of DIR and DIR-like genes in spruce (*Picea* spp.). *Plant Mol Biol* **60**: 21–40.
161. Lee, K.-H., Xiao, Z. (2005): Podophyllotoxins and analogs, u: Anticancer agents from natural products, Cragg G.M., Kingston, D.G.I., Newman, D.J. (ur.), CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, USA.
162. Lee, S.K., Jun, I.H., Yoo, H.H., Kim, J.H., Seo, Y.M., Kang, M.J., Lee, S.H., Jeong, T.C., Kim, D.H. (2008): Characterization of in vitro metabolites of deoxypodophyllotoxin in human and rat liver microsomes using liquid chromatography/tandem mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **22**: 52–58.
163. Horwitz, S.B., Loike J.D. (1977): A comparison of the mechanism of action of VP-16-213 and podophyllotoxin, *J. Nat. Prod.* **40**: 82–89.
164. Stähelin, H.F., Von Wartburg, A. (1989): From podophyllotoxin glucoside to etoposide, *Progr. Drug Res.* **33**:169–266.
165. Stähelin, H.F., Von Wartburg, A., (1991): The chemical and biological route from podophyllotoxin glucoside to etoposide, *Cancer Res.* **51**: 5–15.
166. Berger, J.M., Wang, J.C. (1996): Recent developments in DNA topoisomerase II structure and mechanism, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **6**: 84-90.
167. Van Maanen, J.M.S., Lafleur, M.V.M., Mans, D.R.A., van den Akker, E., de Ruiter, C., Kootstra, P.R., Pappie, D., de Vries, J., Retèl, J., Pinedo, H.M. (1988): Effects of the ortho-quinone and catechol of the antitumor drug VP-16-213 on the biological activity of single-stranded and double-stranded Φ X174 DNA, *Biochem. Pharmacol.* **37**: 3579–3589.
168. Lim, Y.-H. Leem, M.-J., Shin, D.-H., Chang, H.-B., Hong, S.-W., Moon, E.-Y., Lee, D.-K., Yoon, S.-J., Woo, W.-S., (1999): Cytotoxic constituents from the roots of *Anthriscus sylvestris*, *Arch. Pharmacol. Res.* **22**: 208–212.
169. Schöttner, M., Spittler, G. (1998): Lignans Interfering with 5 α -Dihydrotestosterone Binding to Human Sex Hormone-Binding Globulin, *J. Nat. Prod.* **61**: 119–121.

170. Chao, Y.-Y., Jan, C.-R., Ko, Y.-C., Chen, J.-J., Jiann, B.P., Lu, Y.-C., Chen, W.-C., Su, W., Chen, I.-S. (2002): Effect of lignans isolated from *Hernandia nymphaeifolia* on estrogenic compounds-induced calcium mobilization in human neutrophils, *Life Sci.* **70**: 3109–3121.
171. Suh, S.-J., Kim, J.-R., Jin, H.-S., Choi, H.-S., Chang, Y.-Ch., Lee, Y.-Ch., Kim, S.-H., Lee, I.-S., Moon, T. C., Chang, H.-W., Kim, C.-H. (2009): Deoxypodophyllotoxin, flavolignan, from *Anthriscus sylvestris* Hoffm. inhibits migration and MMP-9 via MAPK pathways in TNF- α -induced HASMC, *Vasc. Pharmacology* **51**: 13–20.
172. Iwakami, S., Wu, J.-B., Ebizuka, Y., Sankawa, U. (1992): Platelet activating factor (PAF) antagonists contained in medicinal plants: lignans and sesquiterpenes, *Chem. Pharm. Bull.*, **40**: 1196–1198.
173. Charlton, J.L. (1998): Antiviral activity of lignans, *J. Nat. Prod.* **61**: 1447–1451.
174. Minto, R.E., Blacklock, B.J., Biosynthesis and function of polyacetylenes and allied natural products, *Prog. Lipid Res.* **47** (2008) 233–306.
175. Christensen, L.P., Brandt, K. (2006): Bioactive polyacetylenes in food plants of the Apiaceae family: Occurrence, bioactivity and analysis, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **41**: 683–693.
176. Christensen, L.P., Kreutzmann, S. (2007): Determination of polyacetylenes in carrot roots (*Daucus carota* L.) by high-performance liquid chromatography coupled with diode array detection, *J. Sep. Sci.* **30**: 483 – 490.
177. Hansen, S.L., Purup, S., Christensen, L.P. (2003): Bioactivity of falcarinol and the influence of processing and storage on its content in carrots (*Daucus carota* L.), *J. Sci. Food. Agric.* **83**: 1010–1017.
178. Furumi, K., Fujioka, T., Fujii, H., Okabe, H., Nakano, Y., Matsunaga, H., Katano, M., Mori, M., Mihashi, K. (1998): Novel antiproliferative falcariindiol furanocoumarin ethers from the root of *Angelica japonica*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **8**: 93–96.
179. Zidorn, C., Jöhner, K., Ganzera, M., Schubert, B., Sigmund, E.M., Mader, J., Greil, R., Ellmerer, E.P., Stuppner, H. (2005): Polyacetylenes from the Apiaceae Vegetables Carrot, Celery, Fennel, Parsley, and Parsnip and Their Cytotoxic Activities, *J. Agric. Food Chem.* **53**: 2518–2523.
180. Chicca, A., Pellati, F., Adinolfi, B., Matthias, A., Massarelli, I., Benvenuti, S., Martinotti, E., Bianucci, A.M., Bone, K., Lehmann, R., Nieri, P. (2008): Cytotoxic activity of polyacetylenes and polyenes isolated from roots of *Echinacea pallida*, *Br. J. Pharmacol.* **153**: 879–885.
181. Kobæk-Larsen, M., Christensen, L.P., Vach, W., Ritskes-Hoitinga, J., Brandt, K. (2005): Inhibitory Effects of Feeding with Carrots or (-)-Falcarinol on Development of Azoxymethane-Induced Preneoplastic Lesions in the Rat Colon, *J. Agric. Food Chem.* **53**: 1823–1827.
182. Dembitsky, V.M. (2006): Anticancer activity of natural and synthetic acetylenic lipids, *Lipids*, **41**: 883–924.
183. Young, J.F., Duthie, S.J., Milne, L., Christensen, L.P., Duthie, G.G., Bestwick, C.S. (2007): Biphasic Effect of Falcarinol on CaCo-2 Cell Proliferation, DNA Damage, and Apoptosis, *J. Agric. Food Chem.* **55**: 618–623.
184. Liu, J.H., Zschocke, S., Reininger, E., Bauer, R. (1998): Inhibitory effects of *Angelica pubescens* f. *biserrata* on 5-lipoxygenase and cyclooxygenase, *Planta Med.* **64**: 525–529.
185. Alanko, J., Kurahashi, Y., Yoshimoto, T., Yamamoto, S., Baba, K. (1994): Panaxynol, a polyacetylene compound isolated from oriental medicines, inhibits mammalian lipoxygenases, *Biochem. Pharmacol.* **48**: 1979–1981.
186. Prior, R.M., Lundgaard, N.H., Light, M.E., Stafford, G.I., van Staden, J., Jäger, A.K. (2007): The polyacetylene falcariindiol with COX-1 activity isolated from *Aegopodium podagraria* L., *J. Ethnopharmacol.* **113**: 176–178.
187. Başer, K.H.C. (2007): Chemistry of essential oils, u: R.G.Berger (ur.), Flavours and fragrances, Springer Berlin Heidelberg, Germany.
188. Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M. (2008): Biological effects of essential oils – A review, *Food Chem. Toxicol.* **46**: 446–475.
189. Nakatsu, T., Lupo Jr., A.T., Chinn, J.W., Kang, R.K.L. (2000): Biological activity of essential oils and their constituents, u: Atta-ur-Rahman (ur.), Studies in Natural Products Chemistry, Vol. 21, Bioactive natural products (Part B), Elsevier Science B.V., Amsterdam, The Netherlands.
190. Banthorpe, D.V., Charlwood, B.V., Francis, M.J.O. (1972): The biosynthesis of monoterpenes, *Chem. Rev.* **72**: 115–155.
191. Dewick, P.M. (1999): The biosynthesis of C₅–C₂₅ terpenoid compounds, *Nat. Prod. Rep.* **16**: 97–130.
192. Rohmer, M. (2003): Mevalonate-independent methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis. Elucidation and distribution, *Pure Appl. Chem.* **75**: 375–387.

193. Eisenreich, W., Schwarz, M., Cartayrade, A., Arigoni, D., Zenk, M.H., Bacher, A. (1998): The deoxyxylulose phosphate pathway of terpenoid biosynthesis in plants and microorganisms, *Chem. Biol.* **5**: R221–R233.
194. Phillips, M.A., León, P., Boronat, A., Rodríguez-Concepción, M. (2008): The plastidial MEP pathway: unified nomenclature and resources, *Trends Plant Sci.* **13**: 619–623.
195. Eisenreich, W., Sagner, S., Zenk, M.H., Bacher, A. (1997): Monoterpenoid essential oils are not of mevalonoid origin, *Tetrahedron Lett.* **38**: 3889–3892.
196. Rohmer, M. (1999): The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants, *Nat. Prod. Rep.* **16**: 565–574.
197. Rohmer, M., Seemann, M., Horbach, S., Bringer-Meyer, S., Sahm, H. (1996): Glyceraldehyde 3-Phosphate and Pyruvate as Precursors of Isoprenic Units in an Alternative Non-mevalonate Pathway for Terpenoid Biosynthesis, *J. Am. Chem. Soc.* **118**: 2564–2566.
198. Altincicek, B., Duin, E.C., Reichenberg, A., Hedderich, R., Kollas, A.-K., Hintz, M., Wagner, S., Wiesner, J., Beck, E., Jomaa, H. (2002): LytB protein catalyzes the terminal step of the 2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis, *FEBS Lett.* **532**: 437–440.
199. Kollas, A.-K., Duin, E.C., Eberl, M., Altincicek, B., Hintz, M., Reichenberg, A., Henschker, D., Henne, A., Steinbrecher, I., Ostrovsky, D.N., Hedderich, R., Beck, E., Jomaa, H., Wiesner, J. (2002): Functional characterization of GcpE, an essential enzyme of the non-mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis, *FEBS Lett.* **532**: 432–436.
200. Hatanaka, A., Kajiwarra, T., Matsui, K. (1995): The biogenesis of green odour by green leaves and its physiological functions – past, present and future, *Z. Naturforsch., C: J. Biosci.* **50**: 467–472.
201. Hatanaka, A., Harada, T. (1973): Formation of *cis*-3-hexenal, *trans*-2-hexenal and *cis*-3-hexenol in macerated *Thea sinensis* leaves, *Phytochemistry* **12**: 2341–2346.
202. Andreou, A., Brodhun, F., Feussner, I. (2009): Biosynthesis of oxylipins in non-mammals, *Prog. Lipid Res.* **48**: 148–170.
203. Gargouri, M., Drouet, P., Legoy, M.-D. (2004): Hydroperoxide-lyase activity in mint leaves. Volatile C6-aldehyde production from hydroperoxy-fatty acids, *J. Biotechnol.* **111**: 59–65.
204. Hatanaka, A. (1983): Biosynthesis of Leaf Alcohol, *Bull. Inst. Chem. Res.* **61**: 180–192.
205. Breitmaier, E. (2006): Terpenes, Wiley-VCH GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany.
206. Hatanaka, A., Kajiwarra, T., Sekiya, J. (1975): Biosynthesis of Leaf Alcohol, *Symposium on the chemistry of natural products*, **19**: 1–8.
207. Mahmoud, S.S., Croteau, R.B. (2002): Strategies for transgenic manipulation of monoterpene biosynthesis in plants, *Trends Plant Sci.* **7**: 366–373.
208. Kalemba, D., Kunicka, A. (2003): Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Curr. Med. Chem.* **10**: 813–829.
209. Di Pasqua, R., Betts, G., Hoskins, N., Edwards, M., Ercolini, D., Mauriello, G. (2007): Membrane toxicity of antimicrobial compounds from essential oils, *J. Agric. Food Chem.* **55**: 4863–4870.
210. Burt, S. (2004): Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review, *Int. J. Food Microbiol.* **94**: 223–253.
211. Cox, S.D., Mann, C.M., Markham, J.L., Bell, H.C., Gustafson, J.E., Warmington, J.R., Wyllie, S.G. (2000): The mode of antimicrobial action of essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *J. Appl. Microbiol.* **88**: 170–175.
212. Gustafson, J.E., Liew, Y.C., Chew, S., Markham, J., Bell, H.C., Wyllie, S.G., Warmington, J.R. (1998): Effects of tea tree oil on *Escherichia coli*, *Lett. Appl. Microbiol.* **26**: 194–198.
213. Di Pasqua, R., Hoskins, N., Betts, G., Mauriello, G. (2006): Changes in membrane fatty acids composition of microbial cells induced by addition of thymol, carvacrol, limonene, cinnamaldehyde, and eugenol in the growing media. *J. Agric. Food Chem.* **54**: 2745–2749.
214. Ceylan, E., Fung, D.Y.C. (2004): Antimicrobial activity of spices, *J. Rapid Methods Autom. Microbiol.* **12**: 1–55.
215. Söderberg, T.A., Johansson, A., Gref, R. (1996): Toxic effects of some conifer resin acids and tea tree oil on human epithelial and fibroblast cells. *Toxicology* **107**: 99–109.
216. Sacchetti, G., Maietti, S., Muzzoli, M., Scaglianti, M., Manfredini, S., Radice, M., Bruni, R. (2005): Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in food. *Food Chem.* **91**: 621–632.

217. Burkey, J.L., Sauer, J.M., McQueen, C.A., Sipes, I.G. (2000): Cytotoxicity and genotoxicity of methyleugenol and related congeners – a mechanism of activation for methyleugenol. *Mutat. Res.* **453**: 25–33.
218. Lazutka, J.R., Mierauskien, J., Slap, G., Dedonyt, V. (2001): Genotoxicity of dill (*Anethum graveolens* L.), peppermint (*Mentha piperita* L.) and pine (*Pinus sylvestris* L.) essential oils in human lymphocytes and *Drosophila melanogaster*. *Food Chem. Toxicol.* **39**: 485–492.
219. Hasheminejad, G., Caldwell, J. (1994): Genotoxicity of the alkenylbenzenes α - and β -asarone, myristicin and elimicin as determined by the UDS assay in cultured rat hepatocytes. *Food Chem. Toxicol.* **32**: 223–231.
220. Gomes-Carneiro, M.R., Dias, D.M.M., De-Oliveira, A.C.A.X., Paumgarten, F.J.R. (2005): Evaluation of mutagenic and antimutagenic activities of α -bisabolol in the *Salmonella*/microsome assay, *Mutat. Res.* **585**: 105–112.
221. De-Oliveira, A.C.A.X., Ribeiro-Pinto, L.F., Paumgarten, F.J.R. (1997): *In vitro* inhibition of CYP2B1 monooxygenase by β -myrcene and other monoterpenoid compounds. *Toxicol. Lett.* **92**: 39–46.
222. De-Oliveira, A.C.A.X., Fidalgo-Neto, A.A., Paumgarten, F.J.R. (1999): *In vitro* inhibition of liver monooxygenases by β -ionone, 1,8-cineole, (–)-menthol and terpineol. *Toxicology* **135**: 33–41.
223. Zheng, G.-O., Kenney, P. K., Lam, L. K. T. (1992): Sesquiterpenes from clove (*Eugenia caryophyllata*) as potential anticarcinogenic agents, *J. Nat. Prod.* **55**: 999–1003.
224. Laekeman, G. M., Van Hoof, L., Haemers, A., Vanden Berghe, D. A., Herman, A. G., Vlietinck, A. J. (1990): Eugenol a valuable compound for *in vitro* experimental research and worthwhile for further *in vivo* investigation, *Phytother. Res.* **4**: 90–96.
225. Cannon J.F.M. (1968): *Chaerophyllum, Anthriscus, Scandix*, ur: T.G. Tutin, V.H. Heywood, N.A. Burghes, D.M. Moore, D.H. Valentine, S.M. Walters, D.A. Webb (ur.), *Flora Europaea* Vol **2**: 324–327, Cambridge University Press, Cambridge, UK.
226. R.P. Adams (2001): Identification of essential oil components by gas chromatography/ quadrupole mass spectrometry, Allured Publishing Corporation, Illinois, USA.
227. Slanina, J., Glatz, Z. (2004): Separation procedures applicable to lignan analysis, *J. Chromatogr. B* **812**: 215–229.
228. Soler-Rivas, C., Espín, J.C., Wichers, H.J. (2000): An easy and fast test to compare total free radical scavenger capacity of foodstuffs, *Phytochem. Anal.* **11**: 330–338.
229. Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L., Hawkins Byrne, D. (2006): Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts, *J. Food Compos. Anal.* **19**: 669–675.
230. Marxen, K., Vanselow, K.H., Lippemeier, S., Hintze, R., Ruser, A., Hansen, U. (2007): Determination of DPPH Radical Oxidation Caused by Methanolic Extracts of Some Microalgal Species by Linear Regression Analysis of Spectrophotometric Measurements, *Sensors* **7**: 2080–2095.
231. Amarowicz, R., Pegg, R.B., Rahimi-Moghaddam, P., Barl, B., Weil, J.A. (2004): Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies, *Food Chem.* **84**: 551–562.
232. Macdonald-Wicks, L.K., Wood, L.G., Garg, M.L. (2006): Methodology for the determination of biological antioxidant capacity in vitro: a review, *J. Sci. Food Agric.* **86**: 2046–2056.
233. Magalhães, L.M., Segundo, M.A., Reis, S., Lima, J.L. (2008): Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties., *Anal. Chim. Acta.* **613**: 1–19.
234. Huang, D., Ou, B., Prior, R.L. (2005): The chemistry behind antioxidant capacity assays, *J. Agric. Food Chem.* **53**: 1841–1856.
235. Benzie, I.F.F., Strain, J.J. (1996): The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay, *Anal. Biochem.* **239**: 70–76.
236. Kranl, K., Schlesier, K., Bitsch, R., Hermann, H., Rohe, M., Bohm, V. (2005): Comparing antioxidative food additives and secondary plant products – use of different assays, *Food Chem.* **93**: 171–175.
237. Stanisavljević, I., Stojičević, S., Veličković, D., Veljković, V., Lazić, M. (2009): Antioxidant and Antimicrobial Activities of Echinacea (*Echinacea purpurea* L.) Extracts Obtained by Classical and Ultrasound Extraction, *Chin. J. Chem. Eng.* **17**: 478–483.
238. Moncada, M.C., Moura, S., João Melo, M., Roque, A., Lodeiro, C., Pina, F. (2003): Complexation of aluminum(III) by anthocyanins and synthetic flavylum salts: A source for blue and purple color, *Inorg. Chim. Acta* **356**: 51–61.
239. Malešev, D., Kuntić, V. (2007): Investigation of metal–flavonoid chelates and the determination of flavonoids via metal–flavonoid complexing reactions, *J. Serb. Chem. Soc.* **72**: 921–939.

240. Kartashova, G.S., Sudos, L.V. (1997): Quantitative determination of flavonoids in the above-ground part of agrimony plants, *Pharm. Chem. J.* **31**: 488–491.
241. Chang, C.-C., Yang, M.-H., Wen, H.-M., Chern, J.-C. (2002): Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods, *J. Food Drug Anal.* **10**: 178–182.
242. Beara I.N., Orčić, D.Z., Lesjak, M.M., Mimica-Dukić, N.M., Peković, B.A., Popović, M.R. (2010): Liquid chromatography/tandem mass spectrometry study of anti-inflammatory activity of Plantain (*Plantago* L.) species, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, doi:10.1016/j.jpba.2010.02.014.
243. Beara, I. (2010): Fitohemijski skrining i procena antioksidantnog i antiinflamatornog potencijala sekundarnih biomolekula u vrstama roda *Plantago* L. (doktorska disertacija), Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad.
244. Baltić, V.V. (1991) Indukcija diferencijacije, Medicinski fakultet, Institut za onkologiju, Sremska Kamenica.
245. Bogdanović, G., Raletić-Savić, J., Marković, N. (1994), *In vitro* assays for antitumor-drug screening on human tumor cell lines: dye exclusion test and colorimetric cytotoxicity assay, *Onkološki arhiv* **2**: 181–184.
246. Mossman, T. (1983): Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **65**: 55–63.
247. Van de Loosdrecht, A.A., Beelen, R.H.J., Ossenkoppele, G.J., Broekhoven, M.G., Langenhuijsen, M.M.A.C. (1994): A tetrazolium-based colorimetric MTT assay to quantitate human monocyte mediated cytotoxicity against leukemic cells from cell lines and patients with acute myeloid leukemia, *J. Immunol. Methods* **174**: 311–320.
248. Fotakis, G., Timbrell, J.A. (2006): In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride, *Toxicol. Lett.* **160**: 171–177.
249. Kováts, E. (1958): Gas-chromatographische Charakterisierung organischer Verbindungen. Teil 1: Retentionsindices aliphatischer Halogenide, Alkohole, Aldehyde und Ketone, *Helv. Chim. Acta* **41**: 1915–1932.
250. McNaught, A. D., Wilkinson, A. (1997): IUPAC Compendium of Chemical Terminology (the "Gold Book"). Blackwell Scientific Publications, Oxford, doi:10.1351/goldbook.
251. De Rijke, E., Out, P., Niessen, W.M.A., Ariese, F., Gooijer, C., Brinkman, U.A.Th. (2006) Analytical separation and detection methods for flavonoids, *J. Chromatogr. A* **1112**: 31–63.
252. De Rijke, E., Zappey, H., Ariese, F., Gooijer, C., Brinkman, U.A.T. (2004): Flavonoids in Leguminosae: Analysis of extracts of *T. pratense* L., *T. dubium* L., *T. repens* L., and *L. corniculatus* L. leaves using liquid chromatography with UV, mass spectrometric and fluorescence detection, *Anal. Bioanal. Chem.* **378**: 995–1006.
253. Jones, W.P., Kinghorn, A.D. (2006): Extraction of Plant Secondary Metabolites, u: Sarker, S.D., Latif, Z., Gray, A.I. (ur.), *Methods Biotechnol.* Vol. 20: Natural Products Isolation, Humana Press Inc., New Jersey, USA.
254. Muth, D., Marsden-Edwards, E., Kachlicki, P., Stobiecki, M. (2008): Differentiation of isomeric malonylated flavonoid glyconjugates in plant extracts with UPLC-ESI/MS/MS, *Phytochem. Anal.* **19**: 444–452.
255. Cuyckens, F., Claeys, M. (2004): Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids, *J. Mass Spectrom.*, **39**: 1–15.
256. Clifford, M.N., Knight, S., Kuhnert, N. (2005): Discriminating between six isomers of dicaffeoylquinic acids by LC-MSⁿ, *J. Agric. Food Chem.* **53**: 3821–3832.
257. Ye, M., Yan, Y., Guo, D. (2005): Characterization of phenolic compounds in the Chinese herbal drug Tu-Si-Zi by liquid chromatography coupled to electrospray ionization mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **19**: 1469–1484.
258. Zhang, Y., Shi, P., Qu, H., Cheng, Y. (2007): Characterization of phenolic compounds in *Erigeron breviscarpus* by liquid chromatography coupled to electrospray ionization mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **21**: 2971–2984.
259. Gouveia, S.C., Castilho, P.C. (2009): Analysis of phenolic compounds from different morphological parts of *Helichrysum devium* by liquid chromatography with on-line UV and electrospray ionization mass spectrometric detection, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **23**: 3939–3953.
260. Cuyckens, F., Ma, Y.L., Pocsfalvi, G., Claeys, M. (2000): Tandem mass spectral strategies for the structural characterization of flavonoid glycosides, *Analisis*, **28**: 888–895.
261. Pikulski, M., Brodbelt, J.S. (2003): Differentiation of flavonoid glycoside isomers by using metal complexation and electrospray ionization mass spectrometry, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **14**: 1437–1453.
262. Mabry, T.J., Markham, K.R., Thomas, M.B. (1970): The systematic identification of flavonoids, Springer-Verlag, New York, USA.

263. Struijs, K., Vincked, J.-P., Gruppen, H. (2008): Comparison of atmospheric pressure chemical ionization and electrospray ionization mass spectrometry for the detection of lignans from sesame seeds, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **22**: 3615–3623.
264. Rodrigo, R. (1980): A stereo- and regiocontrolled synthesis of *Podophyllum* lignans, *J. Org. Chem.* **45**: 4538–4540.
265. Li, Q., Yan, G., Ge, T. (2007): A fragmentation study of podophyllotoxin and its 4'-demethyl-4 β -substituted derivatives by electrospray ionization ion-trap time-of-flight tandem mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **21**: 2843–2852.
266. Zhao, L., Tian, X., Fan, P.-C., Zhan, Y.-J., Shen, D.-W., Jin, Y. (2008): Separation, determination and identification of the diastereoisomers of podophyllotoxin and its esters by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* **1210**: 168–177.
267. Eklund, P.C., Backman, M.J., Kronberg, L.Å., Smeds, A.I., Sjöholm, R.E. (2008) Identification of lignans by liquid chromatography-electrospray ionization ion-trap mass spectrometry, *J. Mass Spectrom.* **43**, 97–107.
268. Schmidt, T.J., Hemmati, S., Fuss, E., Alfermann, A.W. (2006): A combined HPLC-UV and HPLC-MS method for the identification of lignans and its application to the lignans of *Linum usitatissimum* L. and *L. bene* Mill., *Phytochem. Anal.* **17**: 299–311.
269. Schmidt, T.J., Alfermann, A.W., Fuss, E. (2008): High-performance liquid chromatography/mass spectrometric identification of dibenzylbutyrolactone-type lignans: insights into electrospray ionization tandem mass spectrometric fragmentation of lign-7-eno-9,9'-lactones and application to the lignans of *Linum usitatissimum* L. (common flax), *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **22**: 3642–3650.
270. Yu, P.-Z., Wang, L.-P., Chen, Z.-N. (1991): A new podophyllotoxin-type lignan from *Dysosma versipellis* var. *tomentosa*, *J. Nat. Prod.* **54**: 1422–1424.
271. Wong, S.-K., Tsui, S.-K., Kwan, S.-Y., Su, X.-L., Lin, R.-C. (2000): Identification and characterization of *Podophyllum emodi* by API-LC/MS/MS, *J. Mass Spectrom.* **35**: 1246–1251.
272. Bergeron, C., Gafner, S., Clausen, E., Carrier, D.J. (2005): Comparison of the chemical composition of extracts from *Scutellaria lateriflora* using accelerated solvent extraction and supercritical fluid extraction versus standard hot water or 70% ethanol extraction, *J. Agric. Food. Chem.* **53**: 3076–3080.
273. Foti, M.C., Daquino, C., Geraci, C. (2004): Electron-transfer reaction of cinnamic acids and their methyl esters with the DPPH \cdot radical in alcoholic solutions, *J. Org. Chem.* **69**: 2309–2314.
274. Calabrese, E.J., Baldwin, L.A. (2002): Defining hormesis, *Hum. Exp. Toxicol.* **21**: 91–97.
275. Calabrese, E.J. (2004): Hormesis: from marginalization to mainstream. A case for hormesis as the default dose-response model in risk assessment, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **197**: 125–136.
276. Willför, S.M., Smeds, A.I., Holmbom, B.R. (2006): Chromatographic analysis of lignans, *J. Chromatogr. A* **1112**: 64–77.
277. Suzuki, S., Sakakibara, N., Umezawa, T., Shimada, M. (2002): Survey and enzymatic formation of lignans of *Anthriscus sylvestris*, *J. Wood Sci.* **48**: 536–451.
278. Sanchez-Moreno, C. (2002): Methods Used to Evaluate the Free Radical Scavenging Activity in Foods and Biological Systems, *Food Sci. Technol. Int.* **8**: 121–137.
279. Sánchez-Moreno, C., Larrauri, J.A., Saura-Calixto, F. (1998): A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols, *J. Sci. Food Agric.* **76**: 270–276.

8. Prilozi

8.1. PODACI O UZORCIMA

Vaučer	Vrsta		Lokalitet		Datum	Determinisao
2-2009	<i>Scandix pecten-veneris</i> L. 1753 subsp. <i>pecten-veneris</i>	Apiaceae Apioidae	Crna Gora Čanj UTM 34T CM 1 37	ruderalno stanište	05.05.2009.	Goran Anačkov
2-2010	<i>Chaerophyllum temulentum</i> L. 1753	Apiaceae Apioidae	Fruška Gora Vrdnik UTM 34T DQ 1 09	šuma	22.05.2008.	Goran Anačkov
2-2011	<i>Chaerophyllum temulentum</i> L. 1753	Apiaceae Apioidae	Fruška Gora put Iriški Venac-Zmajevac UTM 34T DQ 1 09	obod šume	30.05.2008.	Goran Anačkov
2-2012	<i>Chaerophyllum temulentum</i> L. 1753	Apiaceae Apioidae	Fruška Gora put Iriški Venac-Zmajevac UTM 34T DQ 1 09	šuma	08.06.2008.	Goran Anačkov
2-2013	<i>Chaerophyllum temulentum</i> L. 1753	Apiaceae Apioidae	Fruška Gora Vrdnik UTM 34T DQ 1 09	šuma	23.05.2009.	Goran Anačkov
2-2014	<i>Chaerophyllum hirsutum</i> L. 1753	Apiaceae Apioidae	Tara pored reke UTM 34T	pored puta, ruderalno stanište	01.06.2009.	Goran Anačkov
2-2015	<i>Chaerophyllum hirsutum</i> L. 1753	Apiaceae Apioidae	Surdulica Plana put od jezera prema Vrtopu UTM 34T FM 2 13	šibljak	26.07.2009.	Goran Anačkov
2-2016	<i>Chaerophyllum hirsutum</i> L. 1753	Apiaceae Apioidae	Surdulica Čemernik put od jezera prema V. Čemerniku UTM 34T FM 2 03	šibljak	31.07.2009.	Goran Anačkov
2-2017	<i>Chaerophyllum hirsutum</i> L. 1753	Apiaceae Apioidae	Surdulica Vlasinsko jezero brana UTM 34T FM 2 13	pored puta ruderalno stanište	01.08.2009.	Goran Anačkov
2-2018	<i>Chaerophyllum bulbosum</i> L. 1753 subsp. <i>bulbosum</i>	Apiaceae Apioidae	Surdulica Plana put od jezera prema Vrtopu UTM 34T FM 2 13	šibljak	29.07.2009.	Goran Anačkov
2-2019	<i>Chaerophyllum bulbosum</i> L. 1753 subsp. <i>bulbosum</i>	Apiaceae Apioidae	Surdulica Vlasinsko jezero brana UTM 34T FM 2 13	pored puta ruderalno stanište	29.07.2009.	Goran Anačkov
n2- 2020	<i>Chaerophyllum bulbosum</i> L. 1753 subsp. <i>bulbosum</i>	Apiaceae Apioidae	Surdulica Vlasinsko jezero brana UTM 34T FM 2 13	pored puta ruderalno stanište	01.08.2009.	Goran Anačkov
2-2021	<i>Anthriscus cerefolium</i> (L.) Hoffm. 1814	Apiaceae Apioidae	Novi Sad Liman I Đačko igralište UTM 34T DR 2 01	ruderalno stanište	17.04.2008.	Goran Anačkov
2-2022	<i>Anthriscus cerefolium</i> (L.) Hoffm. 1814	Apiaceae Apioidae	Novi Sad Liman I	ruderalno stanište	23.04.2008.	Goran Anačkov

Vaučer	Vrsta		Lokalitet		Datum	Determinisao
			Đačko igralište UTM 34T DR 2 01			
2-2023	<i>Anthriscus cerefolium</i> (L.) Hoffm. 1814	Apiaceae Apiioideae	Novi Sad Sajam Medicinski fakultet UTM 34T DR 2 01	ruderalno stanište	24.04.2008.	Goran Anačkov
2-2024	<i>Anthriscus cerefolium</i> (L.) Hoffm. 1814	Apiaceae Apiioideae	Novi Sad Liman I Đačko igralište (Staklare) UTM 34T DR 2 01	ruderalno stanište	28.04.2008.	Goran Anačkov
2-2025	<i>Anthriscus cerefolium</i> (L.) Hoffm. 1814	Apiaceae Apiioideae	Fruška Gora Ciganski logor UTM 34T CQ 3 99		28.04.2008.a	Goran Anačkov
2-2026	<i>Anthriscus cerefolium</i> (L.) Hoffm. 1814	Apiaceae Apiioideae	Novi Sad Liman I Đačko igralište UTM 34T DR 2 01	ruderalno stanište	04.2008.	Goran Anačkov
2-2027	<i>Anthriscus cerefolium</i> (L.) Hoffm. 1814	Apiaceae Apiioideae	Novi Sad Sajam Medicinski fakultet UTM 34T DR 2 01	ruderalno stanište	04.2008.a	Goran Anačkov
2-2028	<i>Anthriscus cerefolium</i> (L.) Hoffm. 1814	Apiaceae Apiioideae	Novi Sad Liman I Đačko igralište UTM 34T DR 2 01	ruderalno stanište	29.04.2008.	Goran Anačkov
2-2029	<i>Anthriscus cerefolium</i> (L.) Hoffm. 1814	Apiaceae Apiioideae	Mošorin Titelski breg UTM 34T DR 2 31	livada na lesu	01.05.2008.	Goran Anačkov
2-2030	<i>Anthriscus cerefolium</i> (L.) Hoffm. 1814	Apiaceae Apiioideae	Novi Sad Liman I Đačko igralište (Staklare) UTM 34T DR 2 01	ruderalno stanište	03.05.2008.	Goran Anačkov
2-2031	<i>Anthriscus cerefolium</i> (L.) Hoffm. 1814	Apiaceae Apiioideae	Fruška Gora put Iriški Venac-Zmajevac UTM 34T DQ 1 09	rub šume	05.05.2008.	Goran Anačkov
2-2032	<i>Anthriscus cerefolium</i> (L.) Hoffm. 1814	Apiaceae Apiioideae	Novi Sad Liman I Đačko igralište UTM 34T DR 2 01	ruderalno stanište	07.05.2008.	Goran Anačkov
2-2033	<i>Anthriscus cerefolium</i> (L.) Hoffm. 1814	Apiaceae Apiioideae	Novi Sad Liman I Đačko igralište (Staklare) UTM 34T DR 2 01	ruderalno stanište	21.05.2008.	Goran Anačkov
2-2034	<i>Anthriscus cerefolium</i> (L.) Hoffm. 1814	Apiaceae Apiioideae	Fruška Gora put Iriški Venac-Zmajevac UTM 34T DQ 1 09	rub šume	08.06.2008.	Goran Anačkov
2-2035	<i>Anthriscus cerefolium</i> (L.) Hoffm. 1814	Apiaceae Apiioideae	Novi Sad Sajam Medicinski fakultet UTM 34T DR 2 01	ruderalno stanište	02.04.2009	Goran Anačkov

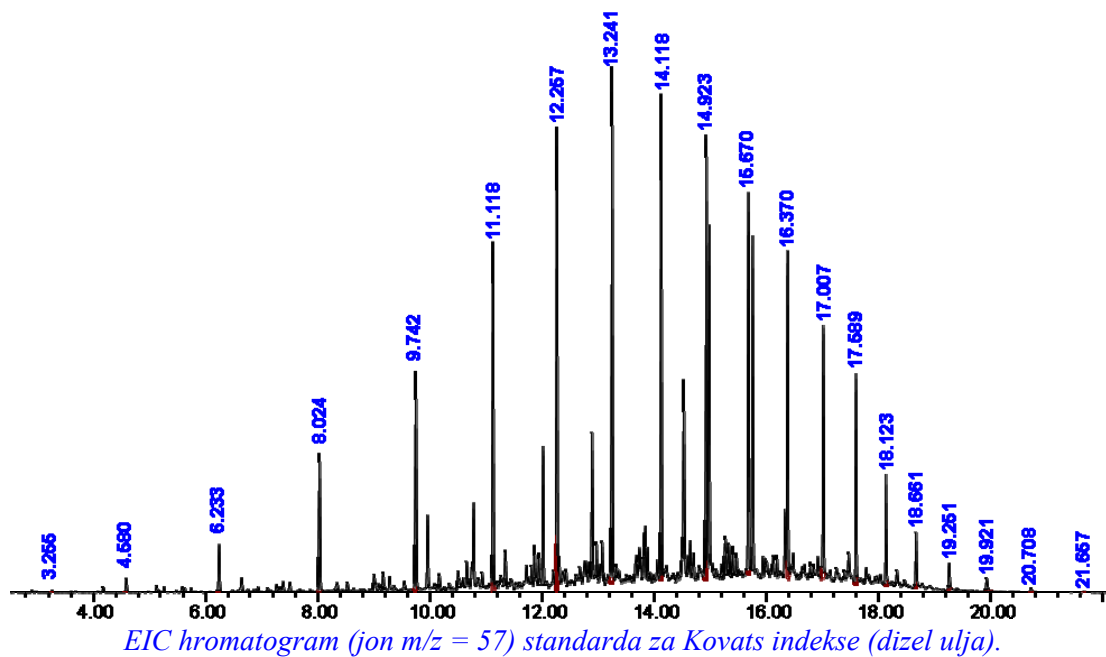
Vaučer	Vrsta		Lokalitet		Datum	Determinisao
2-2036	<i>Anthriscus cerefolium</i> (L.) Hoffm. 1814	Apiaceae Apiioideae	Novi Sad Liman I Đačko igralište UTM 34T DR 2 01	ruderalno stanište	07.04.2009.	Goran Anačkov
2-2037	<i>Anthriscus cerefolium</i> (L.) Hoffm. 1814	Apiaceae Apiioideae	Novi Sad Liman I Đačko igralište UTM 34T DR 2 01	ruderalno stanište	17.04.2009.	Goran Anačkov
2-2038	<i>Anthriscus cerefolium</i> (L.) Hoffm. 1814	Apiaceae Apiioideae	Fruška Gora Iriški Venac UTM 34T DQ 1 09	rub šume	26.04.2009.	Goran Anačkov
2-2039	<i>Anthriscus cerefolium</i> (L.) Hoffm. 1814	Apiaceae Apiioideae	Fruška Gora put Iriški Venac-Zmajevac UTM 34T DQ 1 09	rub šume	26.04.2009.	Goran Anačkov
2-2040	<i>Anthriscus cerefolium</i> (L.) Hoffm. 1814	Apiaceae Apiioideae	Novi Sad Liman I Đačko igralište UTM 34T DR 2 01	ruderalno stanište	28.04.2009.	Goran Anačkov
2-2041	<i>Anthriscus cerefolium</i> (L.) Hoffm. 1814	Apiaceae Apiioideae	Bačka Topola Zobnatica UTM 34T CR 3 97	ruderalno stanište	06.05.2009.	Goran Anačkov
2-2042	<i>Anthriscus cerefolium</i> (L.) Hoffm. 1814	Apiaceae Apiioideae	Fruška Gora Vrdnik UTM 34T DQ 1 09	rub šume	22.05.2009.	Goran Anačkov
2-1880	<i>Anthriscus sylvestris</i> (L.) Hoffm. 1814	Apiaceae Apiioideae	Fruška Gora Brankovac UTM 34T CR 4 90	šuma	28.04.2008.	Goran Anačkov
2-1881	<i>Anthriscus sylvestris</i> (L.) Hoffm. 1814	Apiaceae Apiioideae	Fruška Gora put Iriški Venac-Zmajevac UTM 34T DQ 1 09	šuma	05.05.2008.	Goran Anačkov
2-2043	<i>Anthriscus sylvestris</i> (L.) Hoffm. 1814	Apiaceae Apiioideae	Fruška Gora put Iriški Venac-Zmajevac UTM 34T DQ 1 09	šuma	06.05.2008.	Goran Anačkov
2-2044	<i>Anthriscus sylvestris</i> (L.) Hoffm. 1814	Apiaceae Apiioideae	Mladenovac Kosmaj UTM 34T DQ 4 62	šuma	21.05.2008.	Goran Anačkov
2-2045	<i>Anthriscus sylvestris</i> (L.) Hoffm. 1814	Apiaceae Apiioideae	Fruška Gora put Iriški Venac-Zmajevac UTM 34T DQ 1 09	šuma	30.05.2008.	Goran Anačkov
2-2046	<i>Anthriscus sylvestris</i> (L.) Hoffm. 1814	Apiaceae Apiioideae	Fruška Gora put Iriški Venac-Zmajevac UTM 34T DQ 1 09	šuma	10.04.2009.	Goran Anačkov
2-2047	<i>Anthriscus sylvestris</i> (L.) Hoffm. 1814	Apiaceae Apiioideae	Fruška Gora put Iriški Venac-Zmajevac UTM 34T DQ 1 09	šuma	17.04.2009.	Goran Anačkov
2-2048	<i>Anthriscus sylvestris</i> (L.) Hoffm. 1814	Apiaceae Apiioideae	Fruška Gora put Iriški Venac-Zmajevac UTM 34T DQ 1 09	šuma	17.04.2009.	Goran Anačkov
2-2049	<i>Anthriscus sylvestris</i> (L.) Hoffm. 1814	Apiaceae Apiioideae	Fruška Gora put Iriški Venac-Zmajevac UTM 34T DQ 1 09	šuma	26.04.2009.	Goran Anačkov

Vaučer	Vrsta		Lokalitet		Datum	Determinisao
2-2051	<i>Anthriscus sylvestris</i> (L.) Hoffm. 1814	Apiaceae Apioideae	Fruška Gora Vrdnik UTM 34T DQ 1 09	šuma	23.05.2009.	Goran Anačkov
2-2052	<i>Anthriscus sylvestris</i> (L.) Hoffm. 1814	Apiaceae Apioideae	Bosna i Hercegovina Foča Bastasi UTM 34T CP 2 20	šuma	01.06.2009.	Goran Anačkov
2-2053	<i>Anthriscus sylvestris</i> (L.) Hoffm. 1814	Apiaceae Apioideae	Bosna i Hercegovina NP Sutjeska Perućica UTM 34T CP 2 10	šuma	01.06.2009.	Goran Anačkov

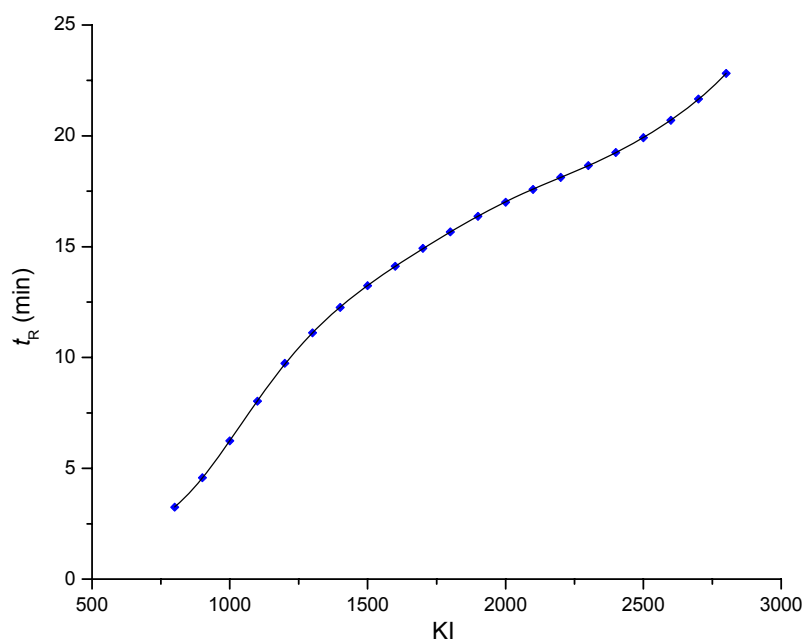
8.2. MAPA LOKALITETA



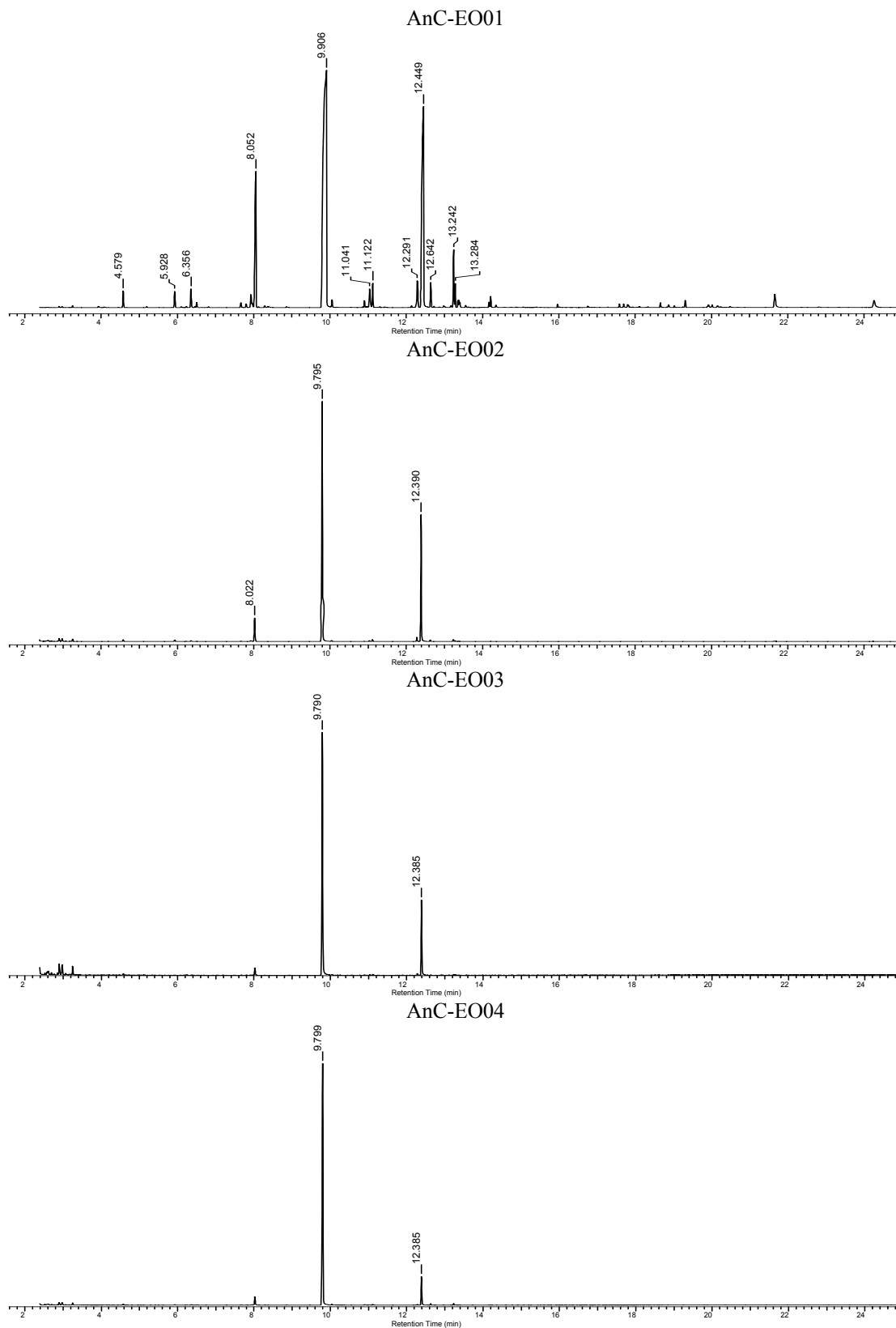
8.3. GC-MS – STANDARD ZA KOVATS INDEKSE



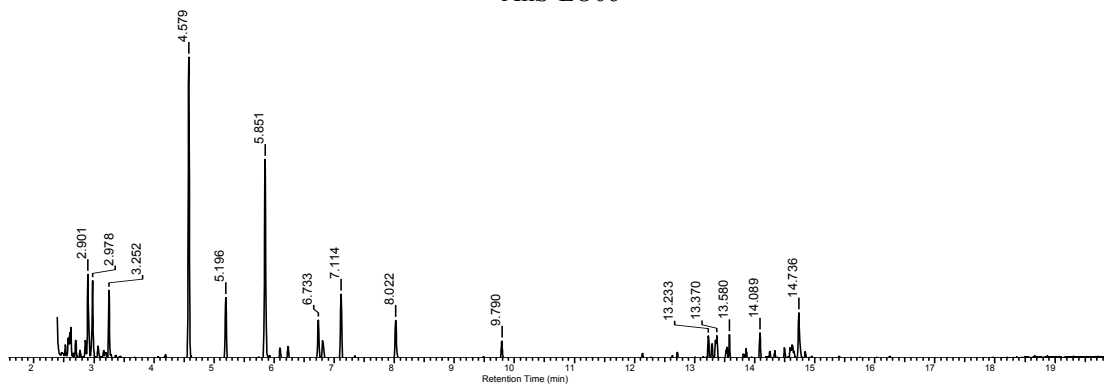
KI	t_R (min)
800	3,249
900	4,580
1000	6,234
1100	8,025
1200	9,743
1300	11,119
1400	12,258
1500	13,241
1600	14,118
1700	14,922
1800	15,670
1900	16,370
2000	17,007
2100	17,589
2200	18,124
2300	18,661
2400	19,251
2500	19,920
2600	20,708
2700	21,659
2800	22,816



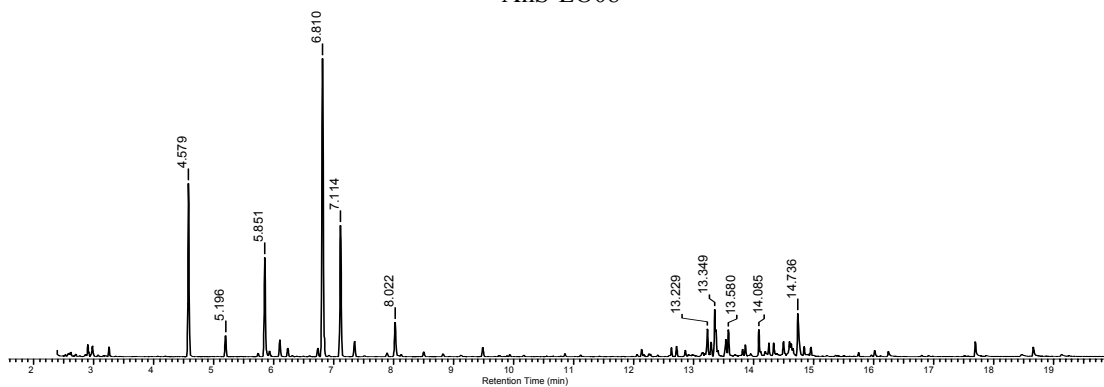
8.4. GC-MS HROMATOGRAMI ETARSKIH ULJA



AnS-EO06



AnS-EO08



8.5. REZULTATI GC-MS ANALIZE ETARSKIH ULJA

Rezultati GC-MS analize etarskih ulja *Anthriscus cerefolium*

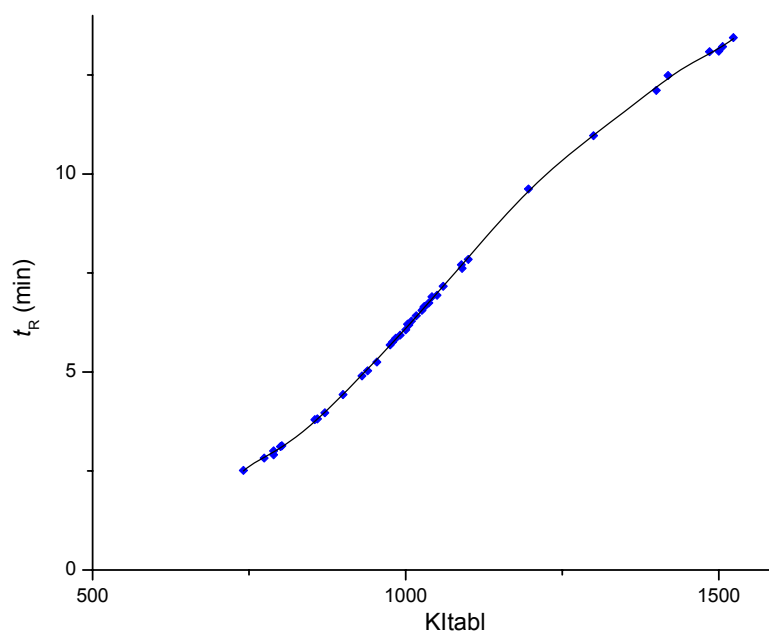
t_R	KI	KI tabl	Jedinjenje	AnC-EO01	AnC-EO02	AnC-EO03	AnC-EO04
0,271	901	900	Nonan	0,72	0,37	0,00	0,00
0,300	982	979	β -Pinen	0,80	0,40	0,00	0,00
0,232	1006	1005	Z-3-heksen-1-il-acetat	0,93	0,00	0,00	0,00
0,062	1014		E-2-heksen-1-il-acetat	0,25	0,00	0,00	0,00
0,234	1093		C11 alken	0,68	0,26	0,00	0,00
5,240	1099	1100	Undekan	9,74	6,05	2,39	2,78
69,518	1208	1196	Estragol	49,37	63,10	77,35	88,25
0,335	1294	1292	C13 alken	1,14	0,20	0,00	0,00
0,356	1300	1300	Tridekan	1,03	0,40	0,00	0,00
0,647	1401	1404	Metileugenol	1,72	0,87	0,00	0,00
19,706	1412		Osmorizol	22,88	27,45	20,25	8,24
0,439	1435	1419	trans- β -Kariofilen	1,11	0,31	0,00	0,34
0,823	1498	1485	Germakren D	2,51	0,39	0,00	0,39
0,244	1503	1494	α -Zingiberen	0,98	0,00	0,00	0,00
0,068	1511		seskviterpeni	0,27	0,00	0,00	0,00
0,076	1515	1500	Biciklogermakren	0,30	0,00	0,00	0,00
0,045	1517	1506	β -Bisabolen?	0,18	0,00	0,00	0,00
0,053	1607	1601	Geranil-2-metilbutanoat	0,21	0,00	0,00	0,00
0,112	1613	1607	Geranil-3-metilbutanoat	0,45	0,00	0,00	0,00
0,028	1842		Neofitadien ?	0,11	0,00	0,00	0,00
0,034	2099	2100	Heneikozan	0,14	0,00	0,00	0,00
0,048	2301	2300	Trikozan	0,19	0,00	0,00	0,00
0,030	2340		Alifatični ugljovodonik	0,12	0,00	0,00	0,00
0,056	2500	2500	Pentakozan	0,23	0,00	0,00	0,00
0,292	2702	2700	Heptakozan	1,17	0,00	0,00	0,00
0,209			Alifatični ugljovodonik	0,84	0,00	0,00	0,00
Ukupno				98,04	99,79	100,00	100,00
Monoterpeni				1,5	0,4	0,0	0,0
Seskviterpeni				5,5	0,7	0,0	0,7
Alifatični ugljovodonici				16,0	7,3	2,4	2,8
Oksigenovana alifatična jed.				1,2	0,0	0,0	0,0
Aromatična jed.				74,0	91,4	97,6	96,5

Rezultati GC-MS analize etarskih ulja *Anthriscus sylvestris*

t_R	KI	KI tabl	Jedinjenje	AnS-EO06	AnS-EO08
4,581	901	900	Nonan	27,38	12,89
5,196	939	939	α -Pinen	5,98	1,76
5,852	977	975	Sabinen	20,94	8,44
6,101	991	991	β -Mircen	1,08	1,40
6,235	999	1000	Dekan	1,15	0,71
6,736	1027	1026	<i>o</i> - <i>p</i> -cimen	4,09	0,75
6,814	1031	1029	Limonen	2,28	28,31
7,115	1048	1050	<i>E</i> - β -Ocimen	6,76	11,35
7,347	1061	1060	γ -Terpinen	0,00	1,35
8,030	1099	1100	Undekan	4,40	3,10
9,817	1208	1196	Estragol	1,87	0,00
12,715	1443	1432	β -Kopaen ?	0,00	0,76
13,235	1498	1485	Germakren D	2,06	2,32
13,291	1504	1496	Valensen ?	1,26	1,14
13,351	1511		<i>seskviterpeni</i>	1,28	3,21
13,372	1513	1497	Viridifloren ?	2,33	1,27
13,538	1532		<i>seskviterpen</i>	0,00	1,67
13,582	1537	1523	δ -Kadinen	2,01	1,98
13,861	1570	1563	<i>E</i> -Nerolidol	0,00	0,76
14,090	1597		<i>seskviterpen</i>	2,15	1,95
14,254	1617	1601	Gvajol	0,69	1,00
14,337	1628	1608	5-epi-7-epi- α -Eudezmol	0,80	0,89
14,498	1648	1624	10-epi- γ -Eudezmol	1,05	1,25
14,626	1664	1654	α -Kadinol ?	1,71	1,18
14,738	1678	1664	<i>seskviterpeni</i>	5,07	4,22
14,843	1692	1672	δ -Gvajen (bulnezol)	0,49	0,68
14,953	1706		<i>seskviterpen</i>	0,00	0,61
18,663	2301	2300	Trikozan	0,00	0,86
Ukupno				96,83	95,82
Monoterpeni				41,1	53,4
Seskviterpeni				20,9	24,9
Alifatični ugljovodonici				32,9	17,6
Oksigenovana alifatična jed.				0,0	0,0
Aromatična jed.				1,9	0,0

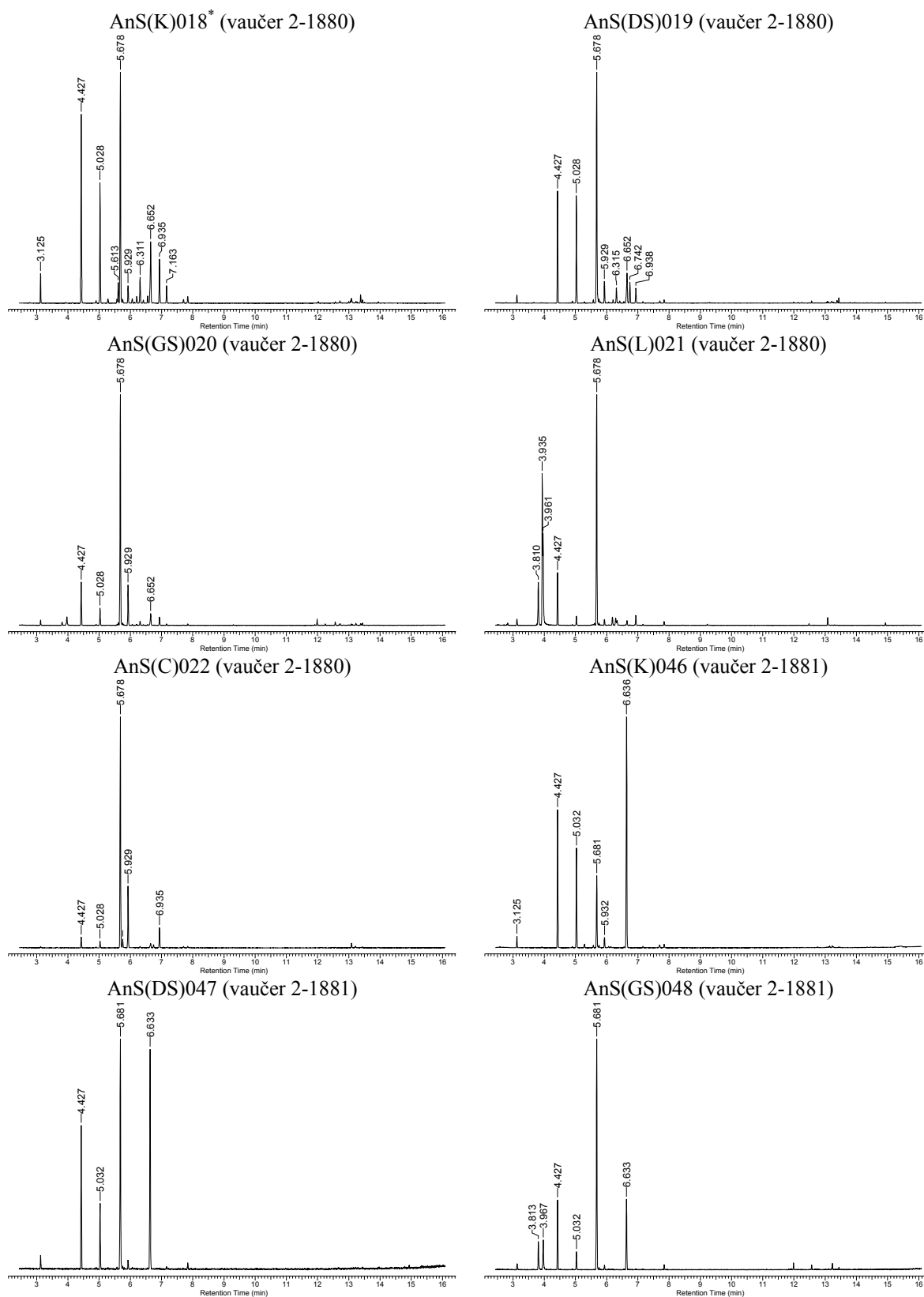
8.6. GC-MS – KALIBRACIJA ZA KOVATS INDEKSE (HEADSPACE)

KI	t_R (min)
741	2,513
774	2,827
789	2,909
789	3,005
800	3,118
802	3,139
855	3,794
859	3,815
871	3,970
900	4,431
930	4,904
939	5,034
954	5,253
975	5,683
979	5,758
984	5,851
991	5,933
1000	6,066
1003	6,207
1005	6,188
1009	6,289
1017	6,419
1026	6,559
1029	6,640
1030	6,657
1037	6,748
1042	6,900
1050	6,939
1060	7,167
1090	7,620
1089	7,708
1100	7,845
1196	9,624
1400	12,115
1300	10,967
1419	12,484
1485	13,089
1500	13,100
1506	13,216
1523	13,441

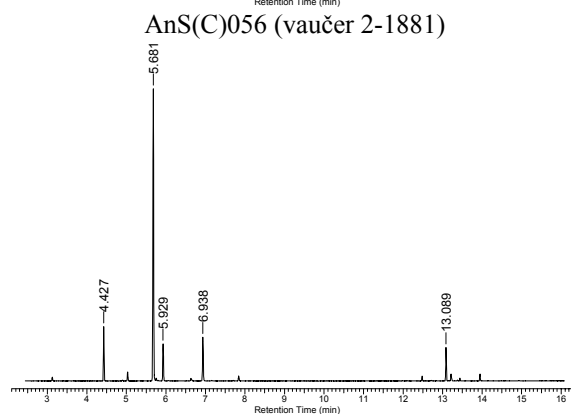
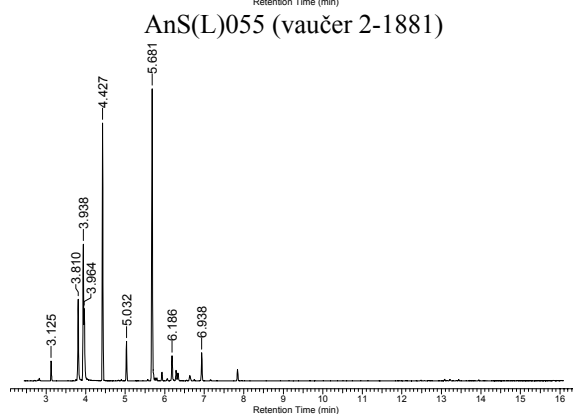
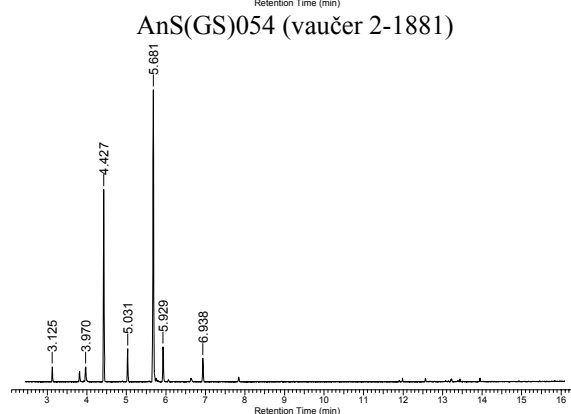
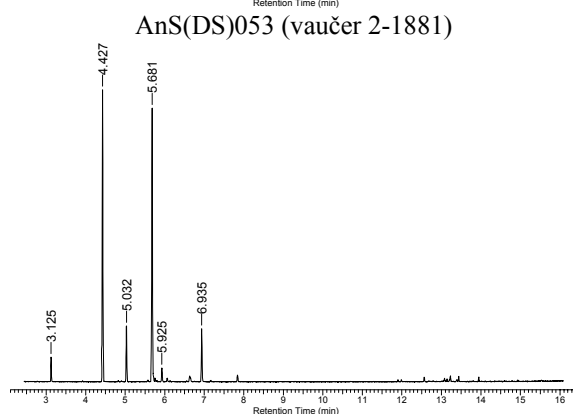
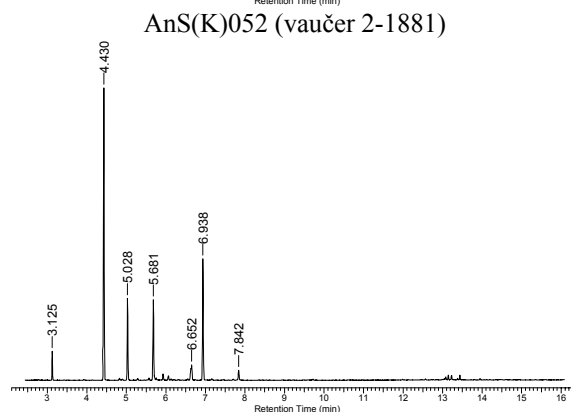
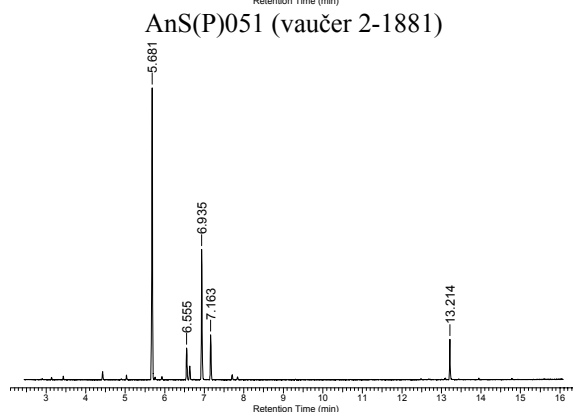
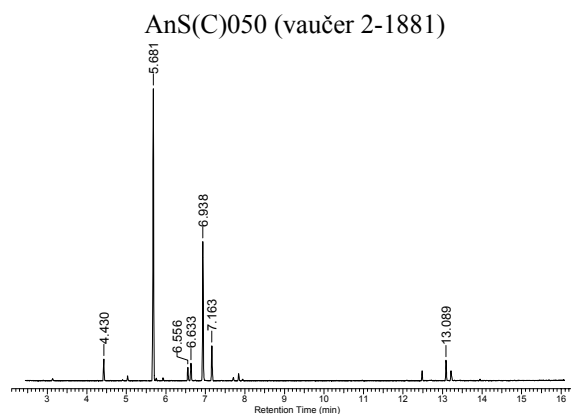
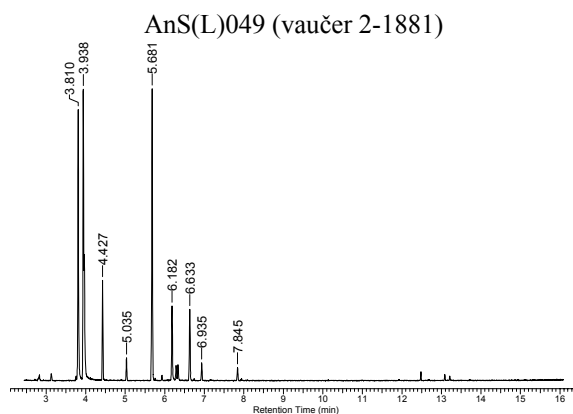


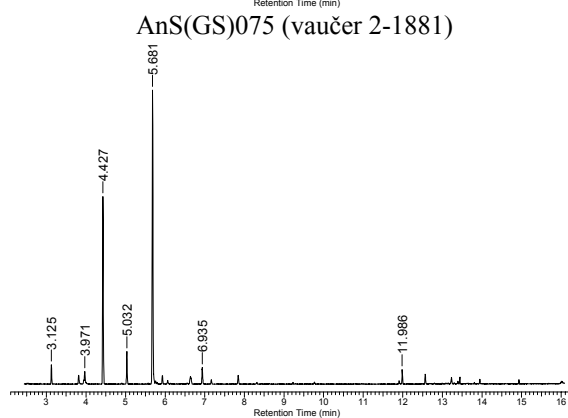
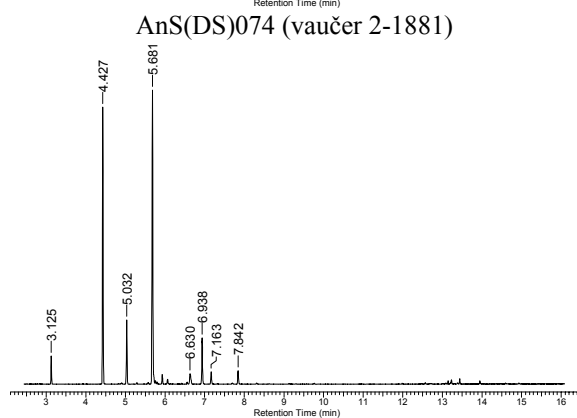
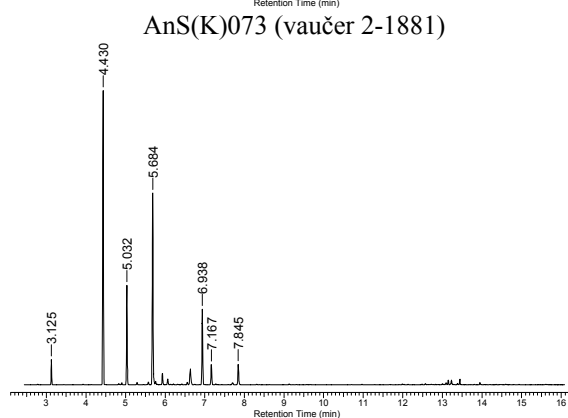
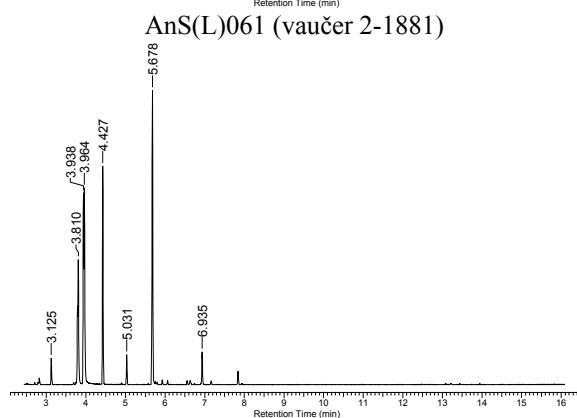
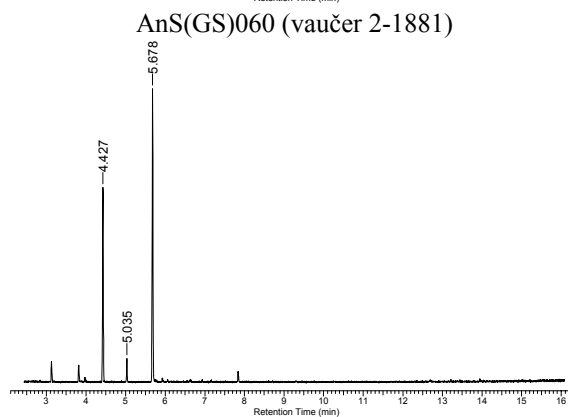
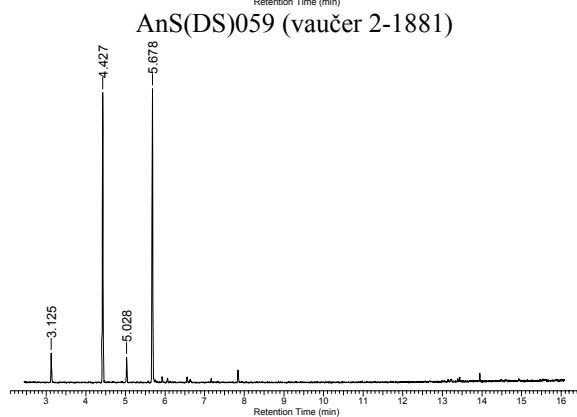
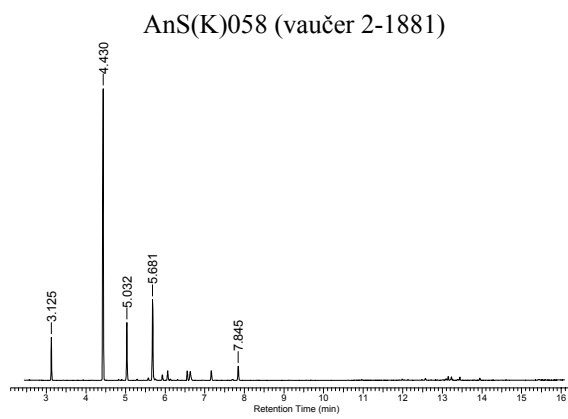
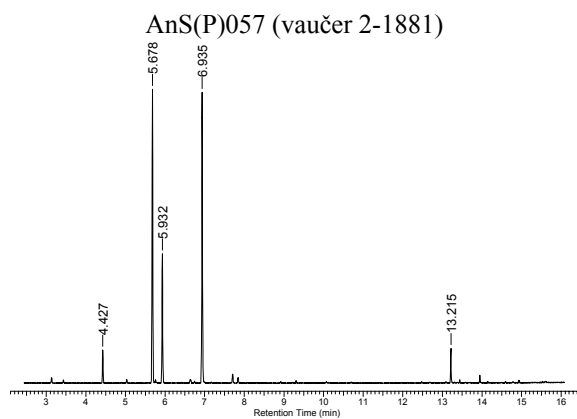
Kalibracija za Kovats indekse (headspace tehnika).

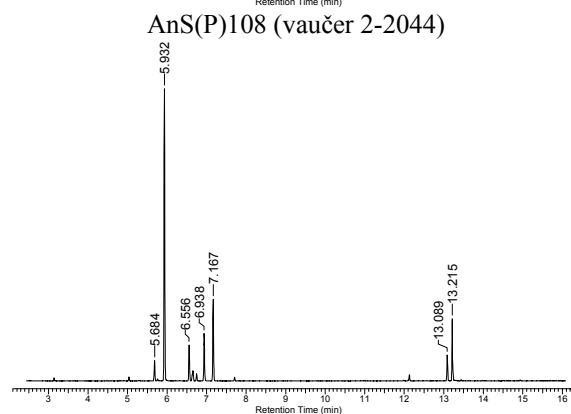
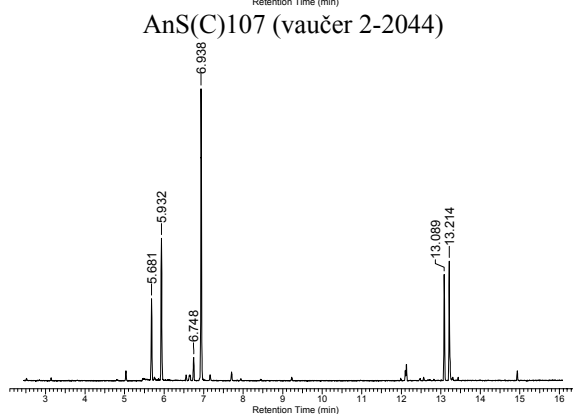
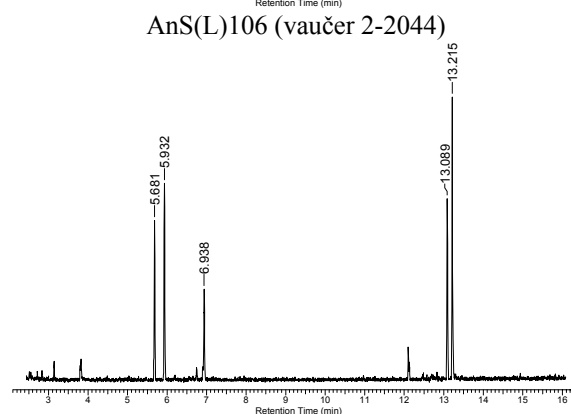
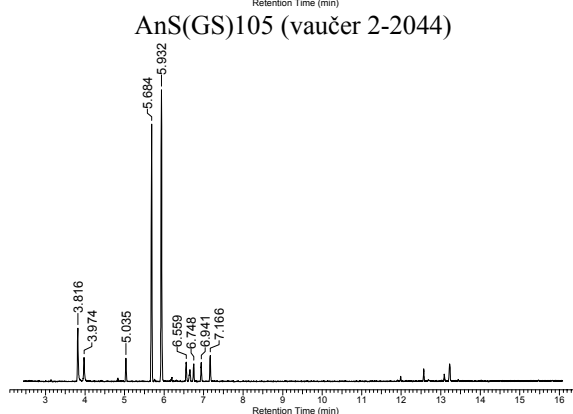
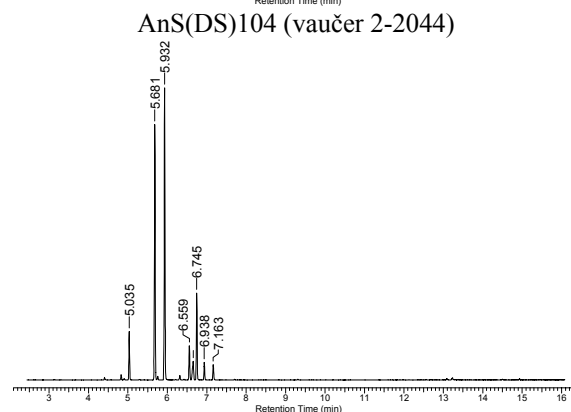
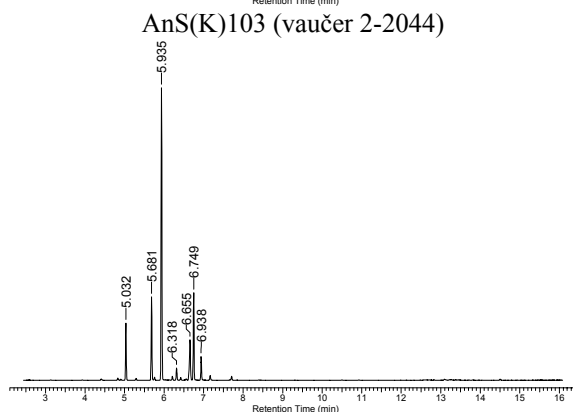
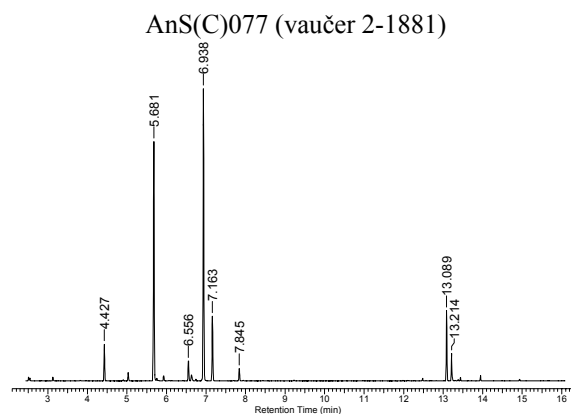
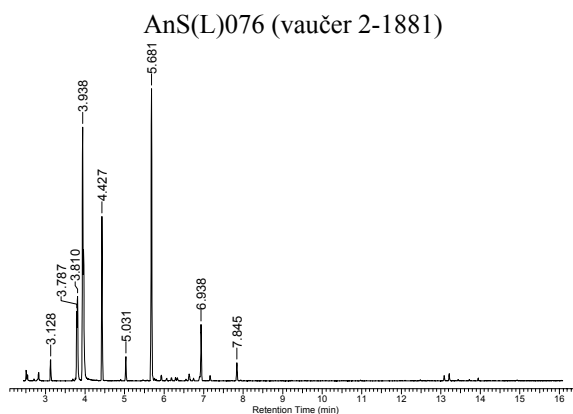
8.7. HEADSPACE GC-MS HROMATOGRAMI

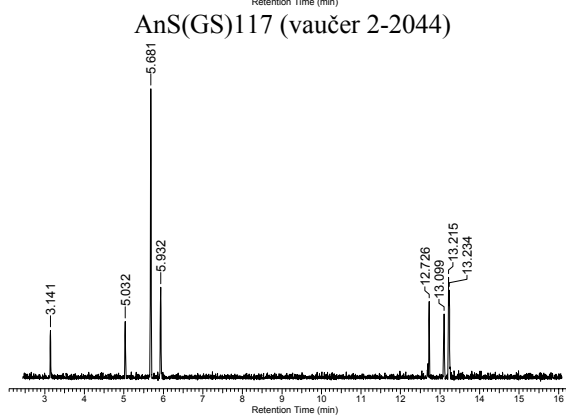
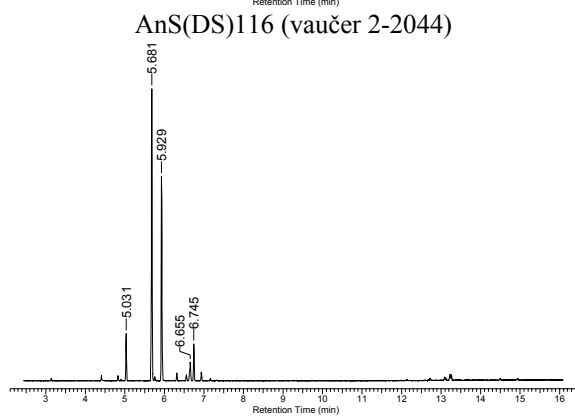
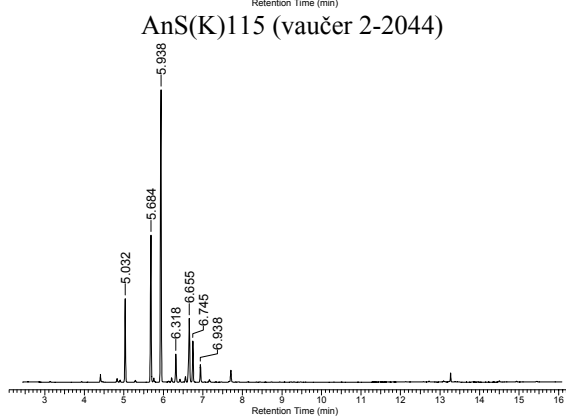
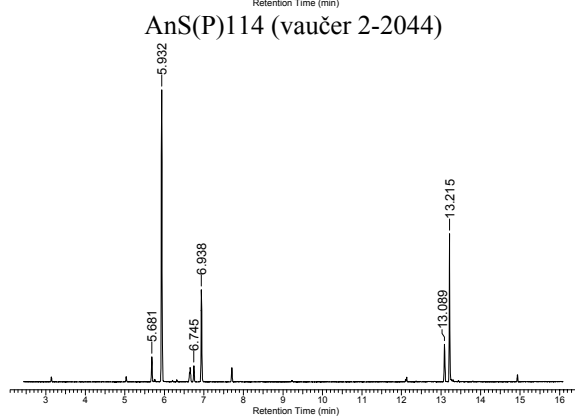
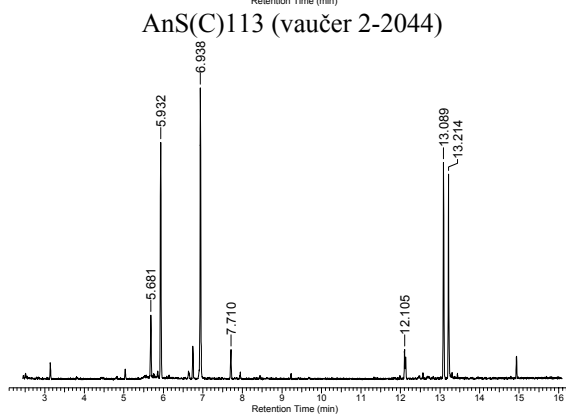
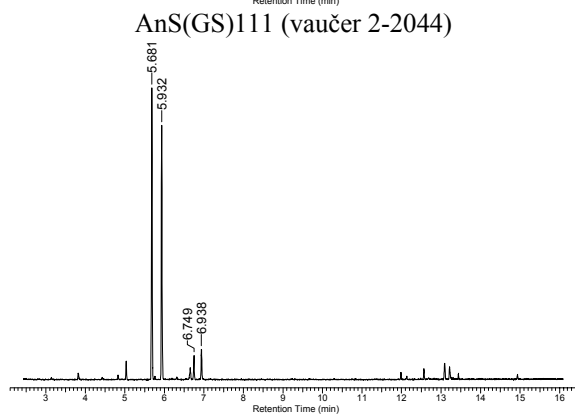
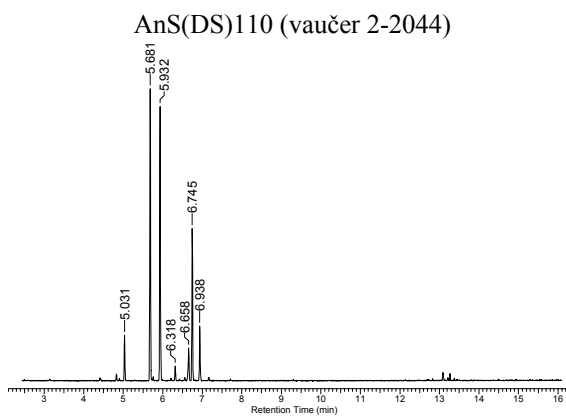
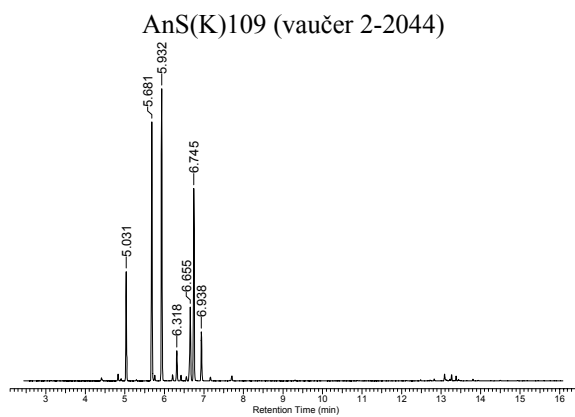


* K – koren, S – stablo, DS – donji deo stabla, GS – gornji deo stabla, L – list, DL – donji listovi, GL – gornji listovi, C – cvet, P – plod.

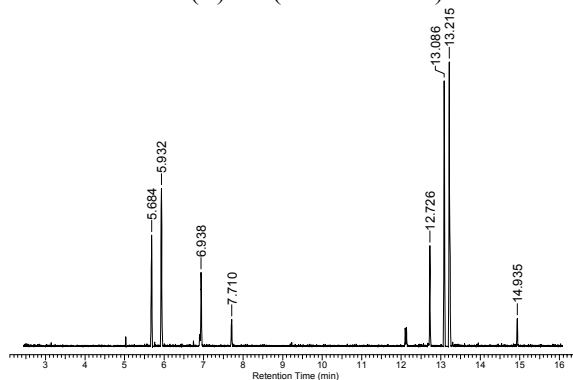




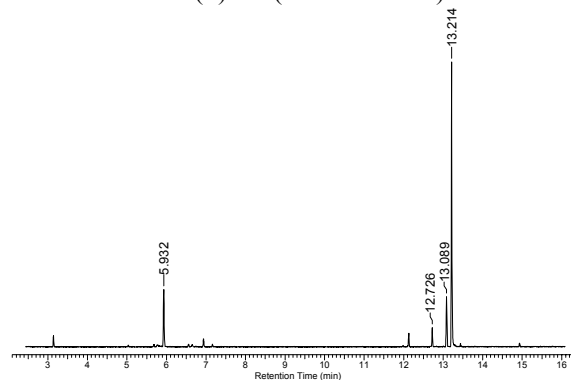




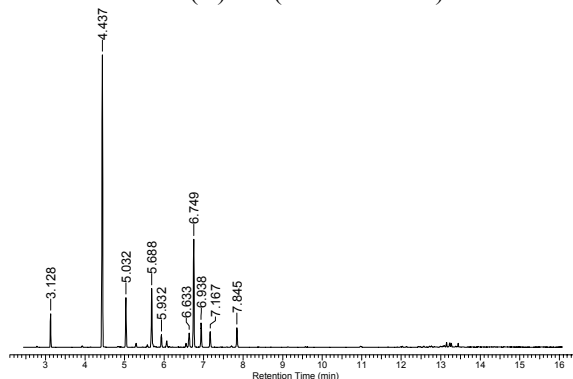
AnS(C)118 (vaučer 2-2044)



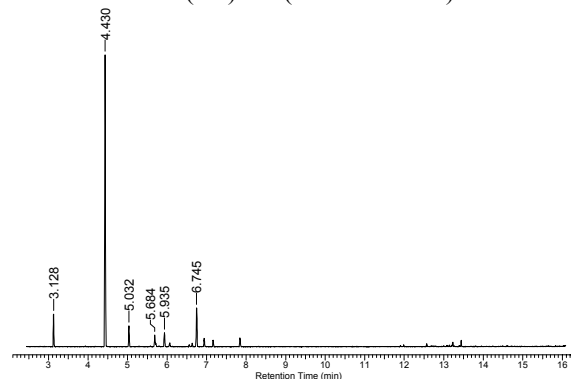
AnS(P)119 (vaučer 2-2044)



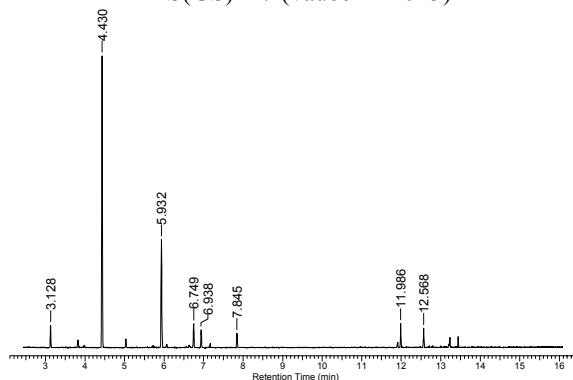
AnS(K)125 (vaučer 2-2045)



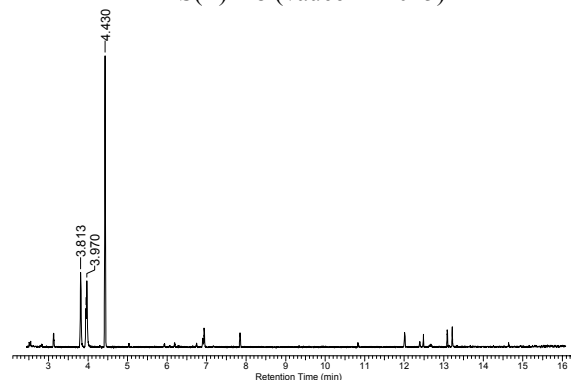
AnS(DS)126 (vaučer 2-2045)



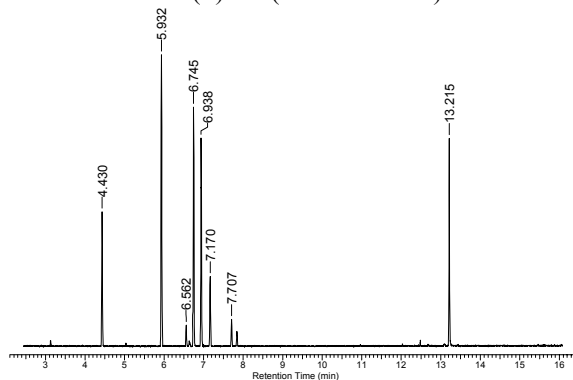
AnS(GS)127 (vaučer 2-2045)



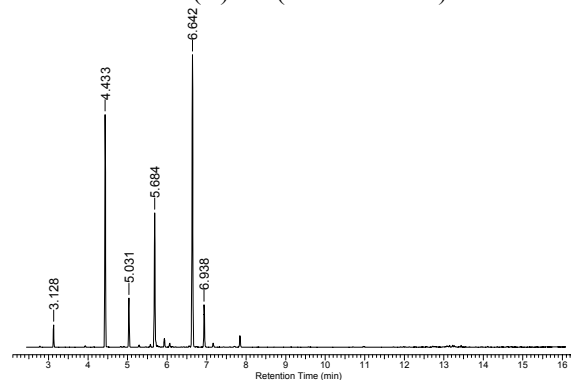
AnS(L)128 (vaučer 2-2045)

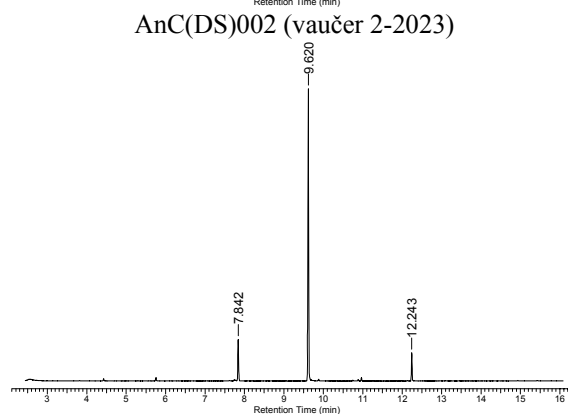
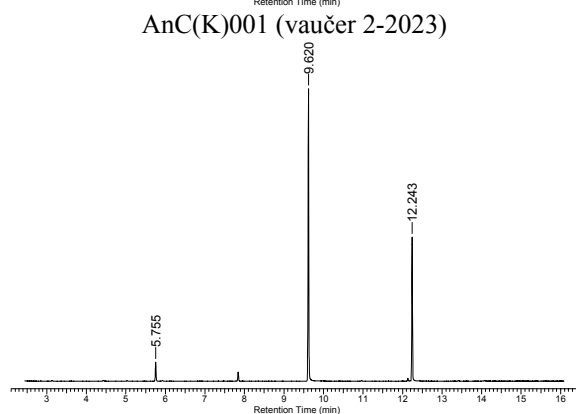
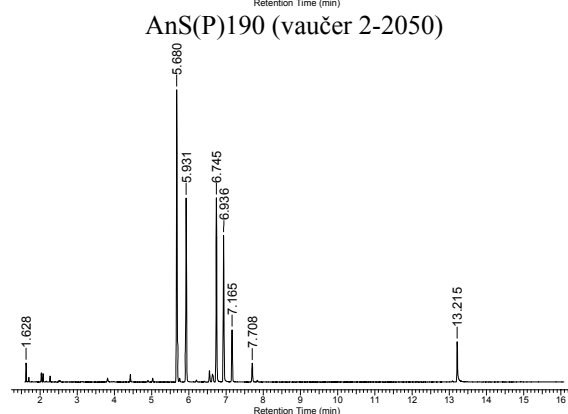
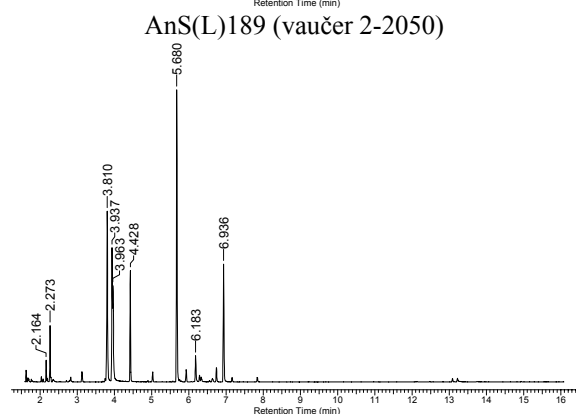
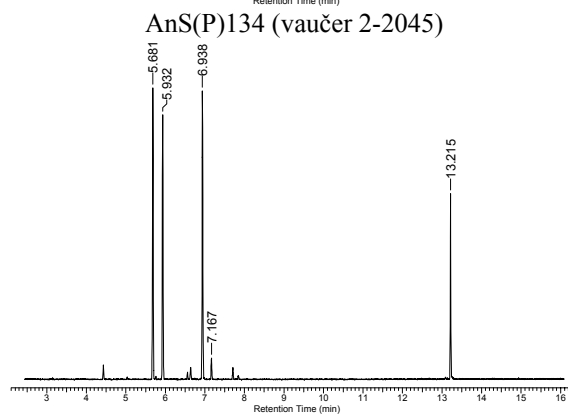
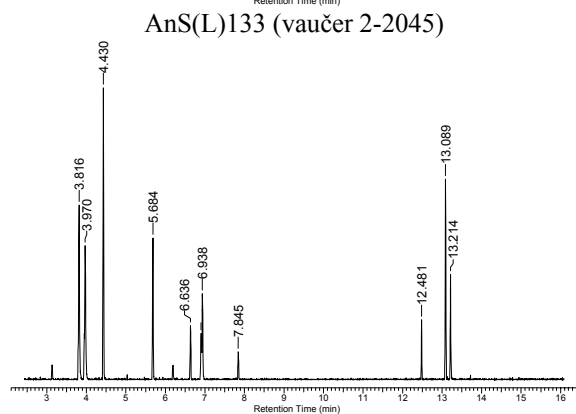
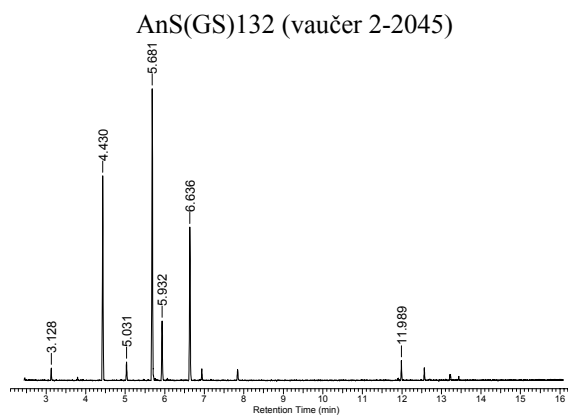
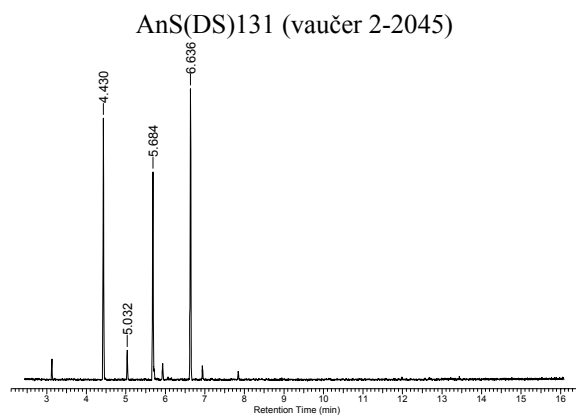


AnS(P)129 (vaučer 2-2045)

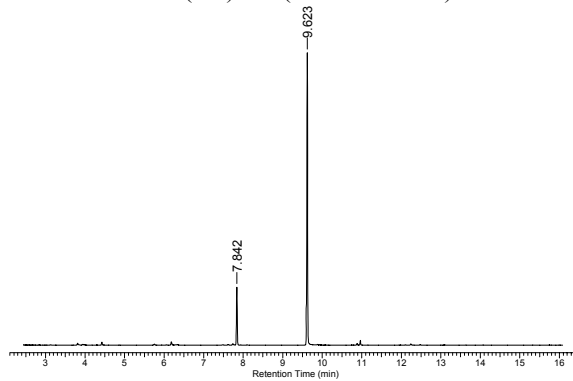


AnS(K)130 (vaučer 2-2045)

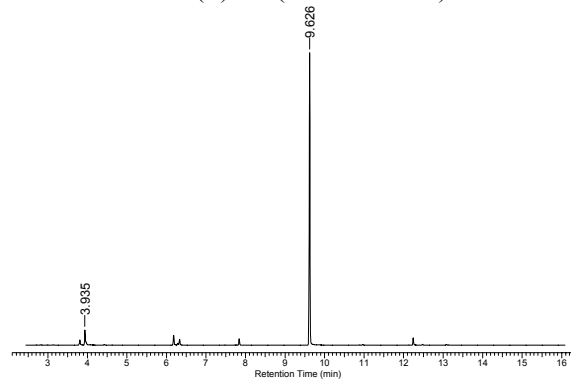




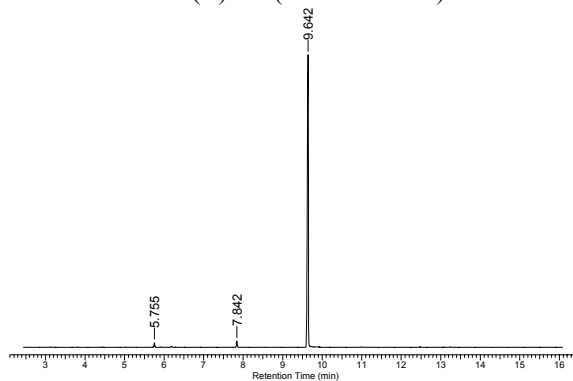
AnC(GS)003 (vaučer 2-2023)



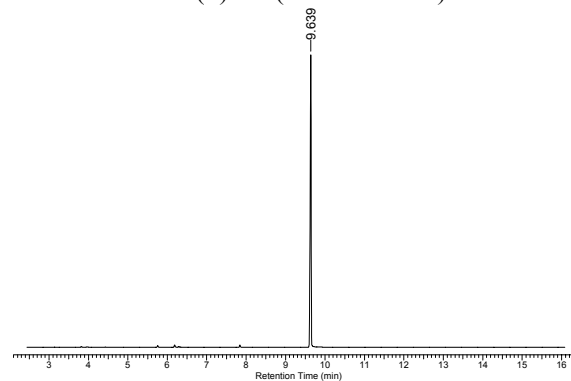
AnC(L)004 (vaučer 2-2023)



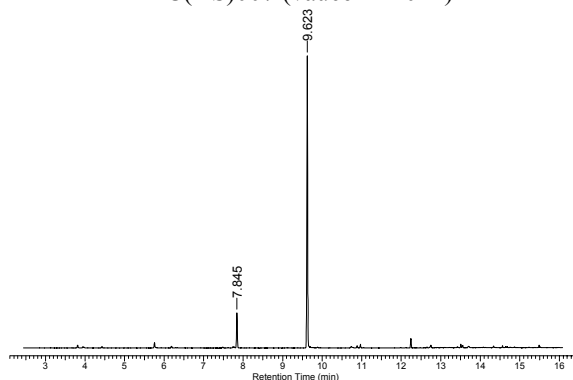
AnC(C)005 (vaučer 2-2023)



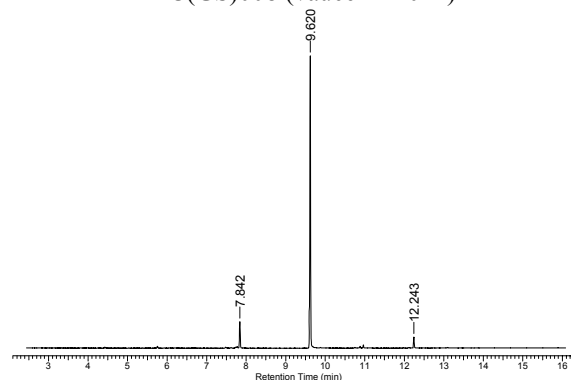
AnC(P)006 (vaučer 2-2023)



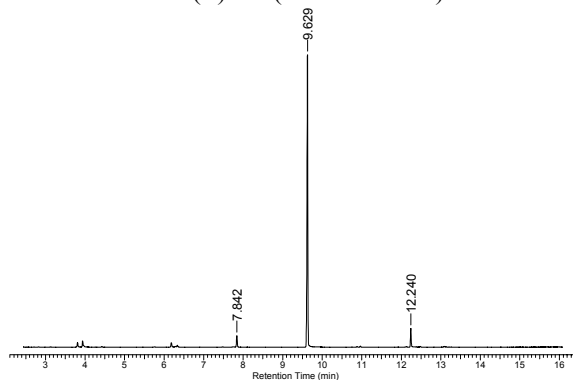
AnC(DS)007 (vaučer 2-2024)



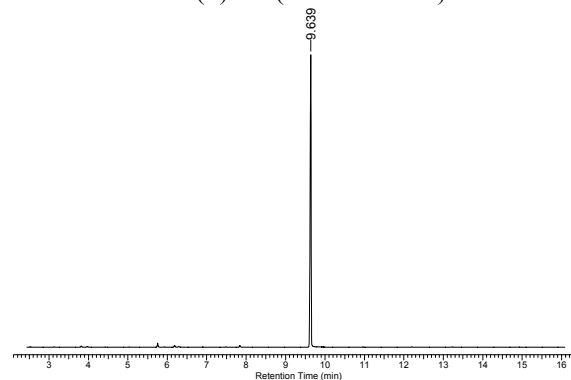
AnC(GS)008 (vaučer 2-2024)

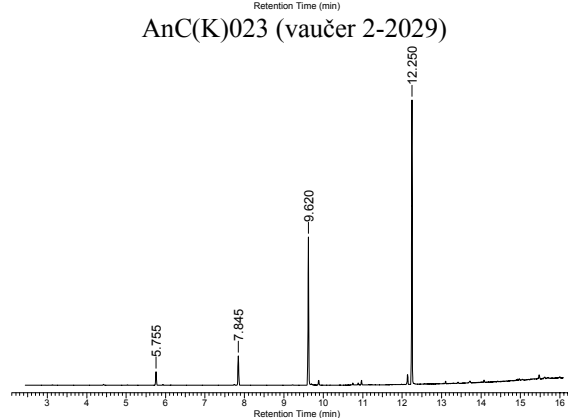
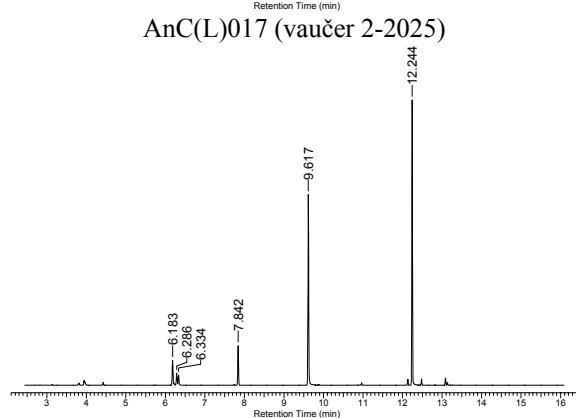
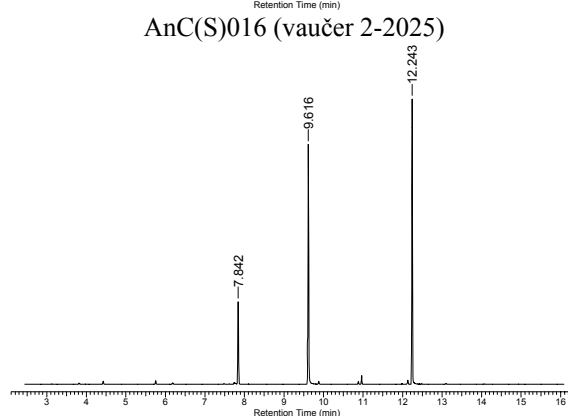
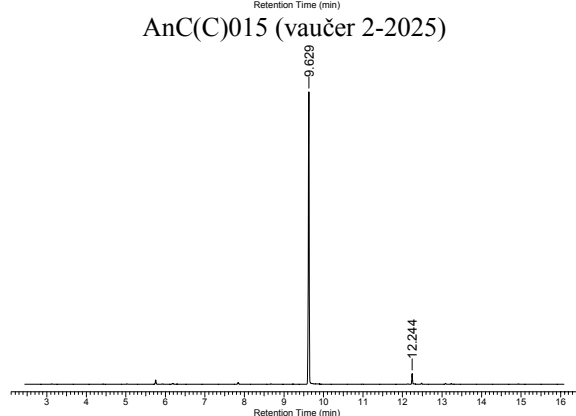
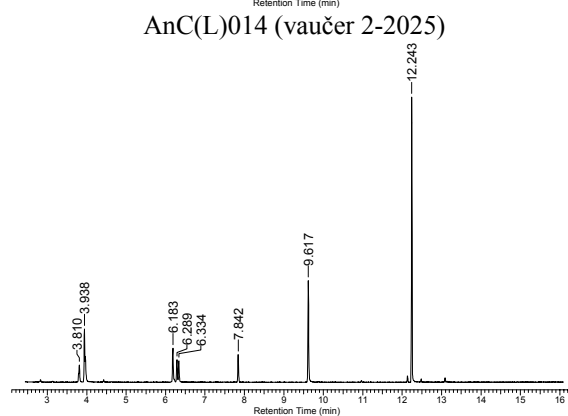
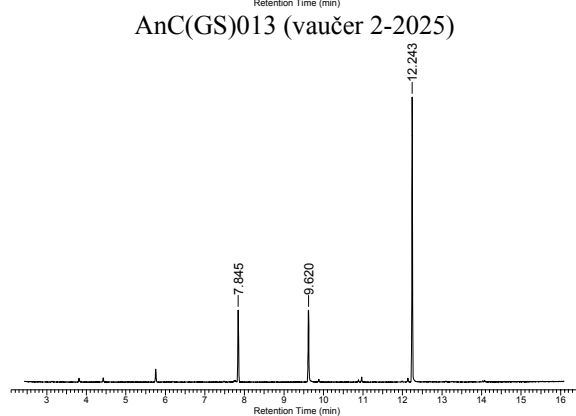
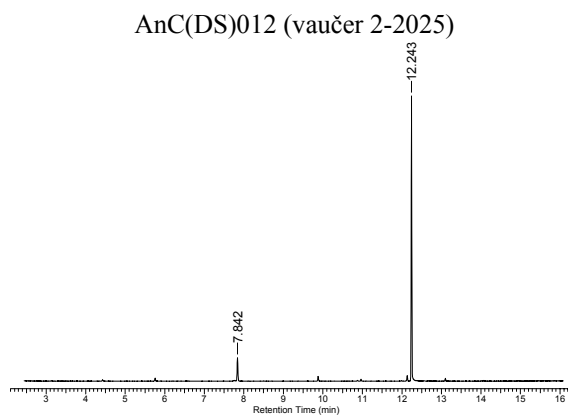
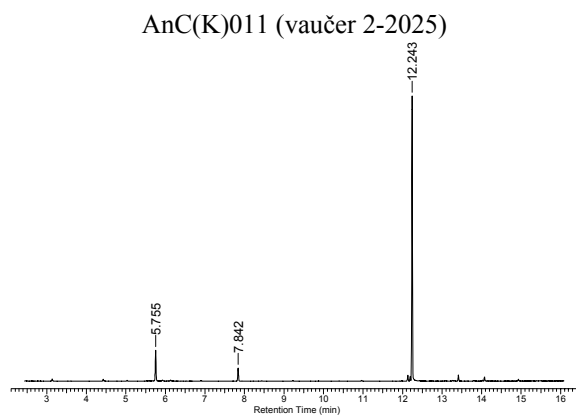


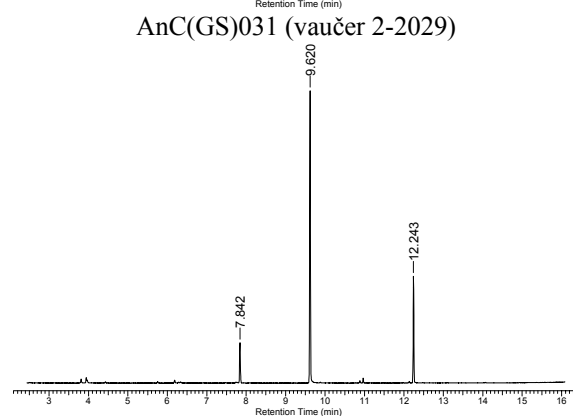
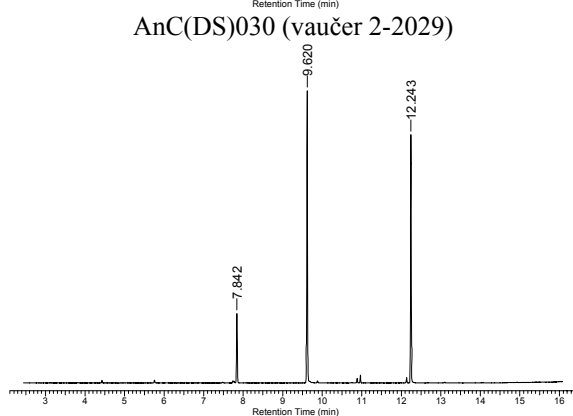
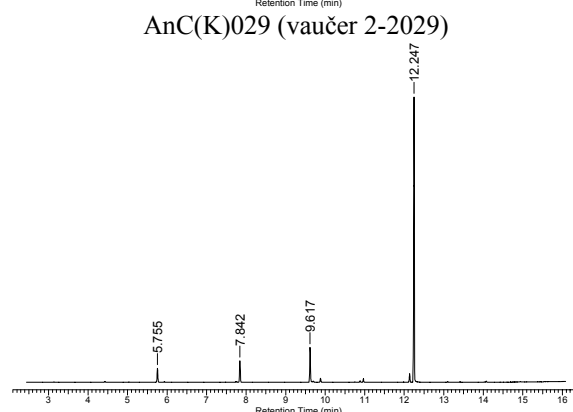
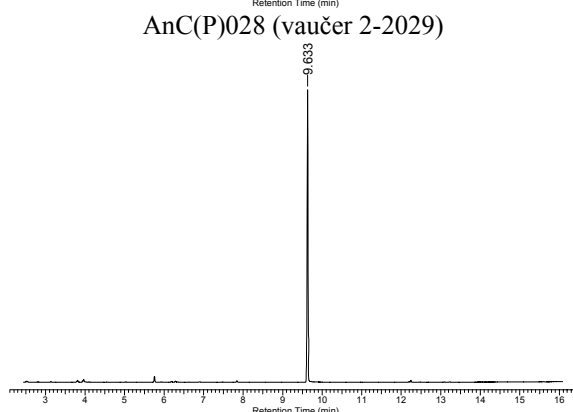
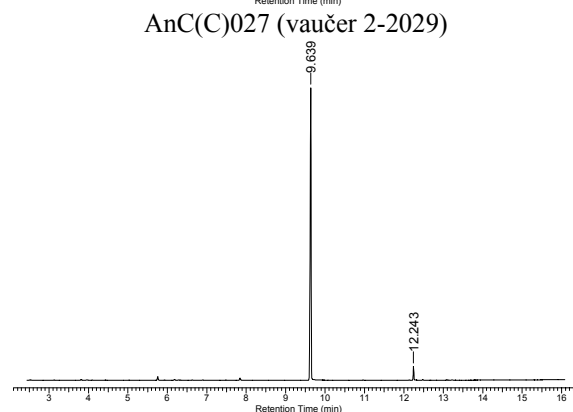
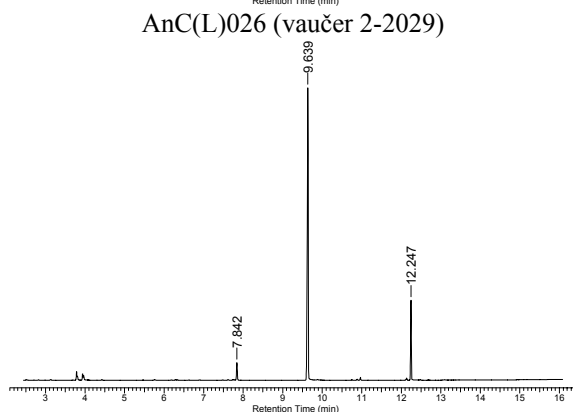
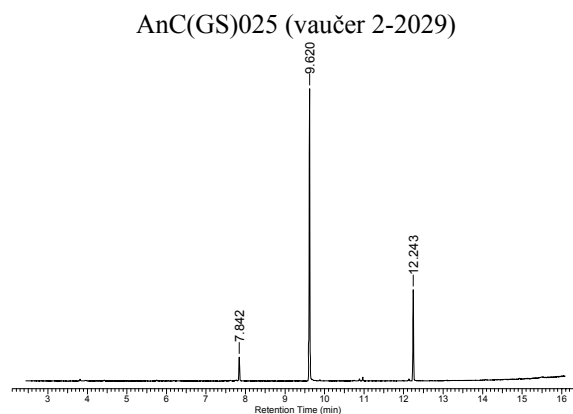
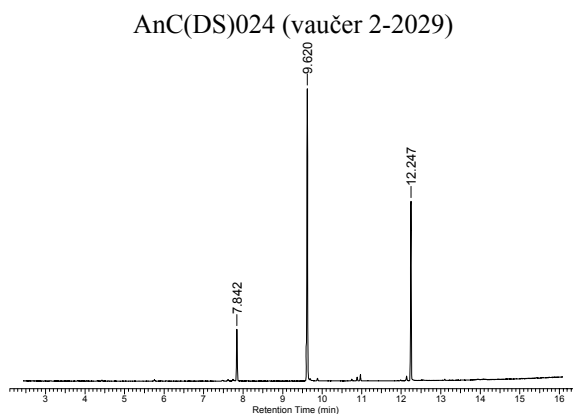
AnC(L)009 (vaučer 2-2024)

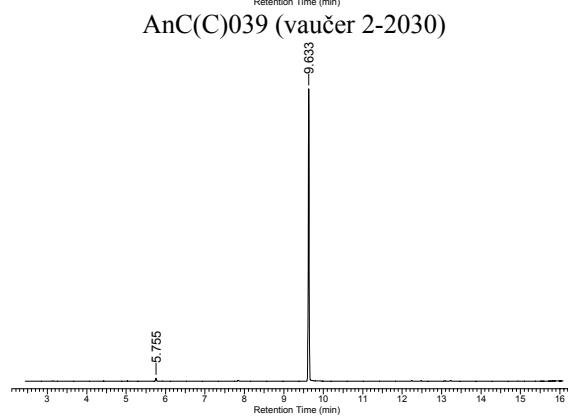
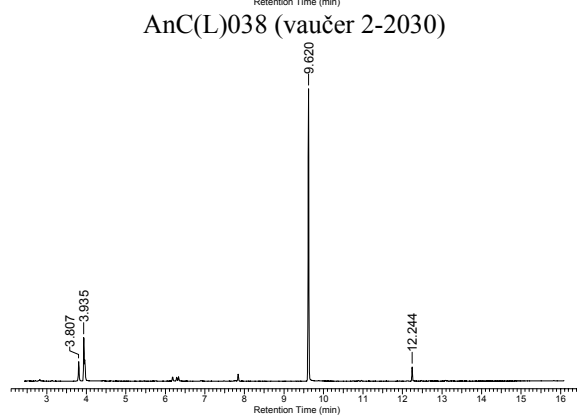
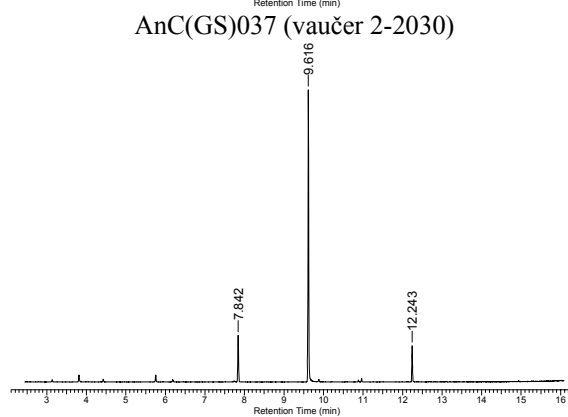
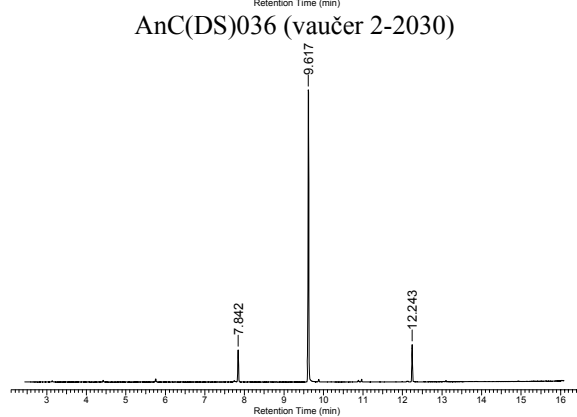
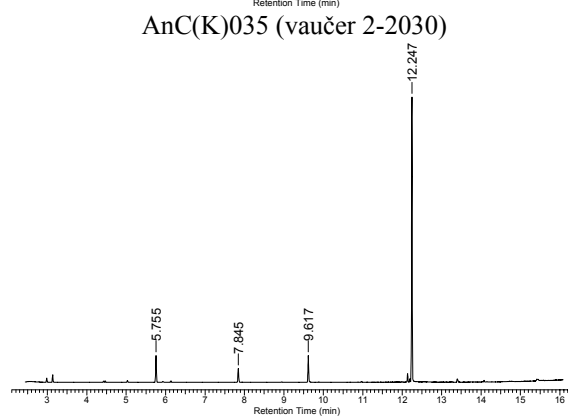
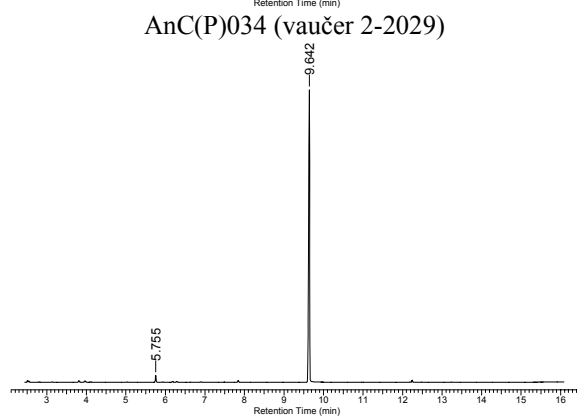
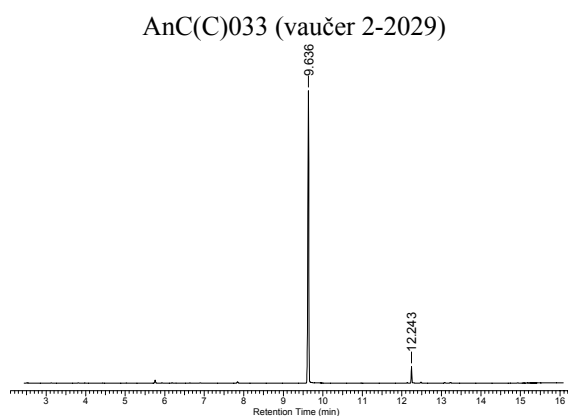
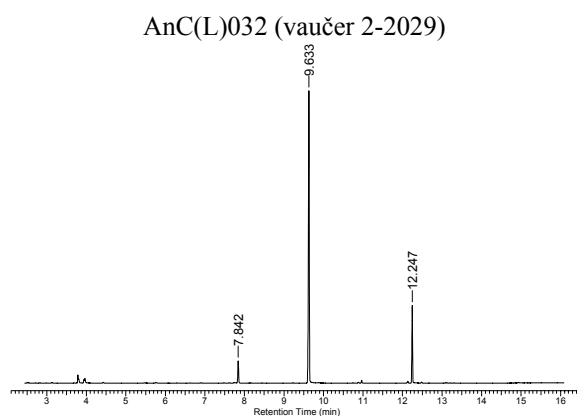


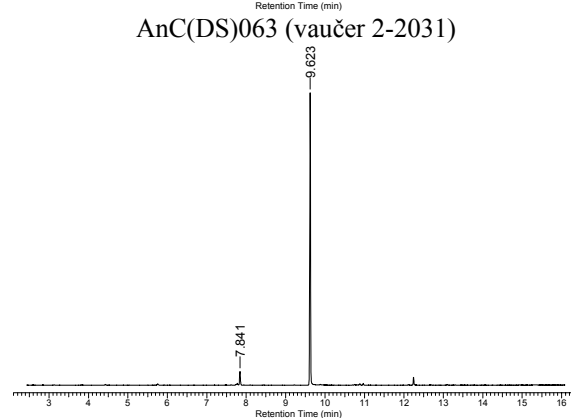
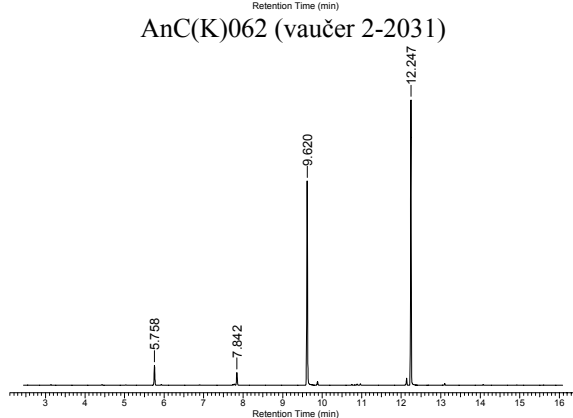
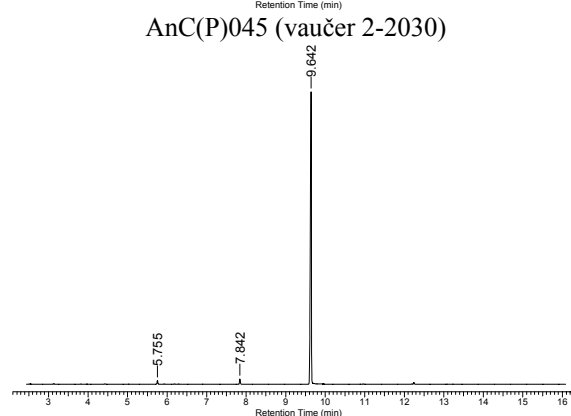
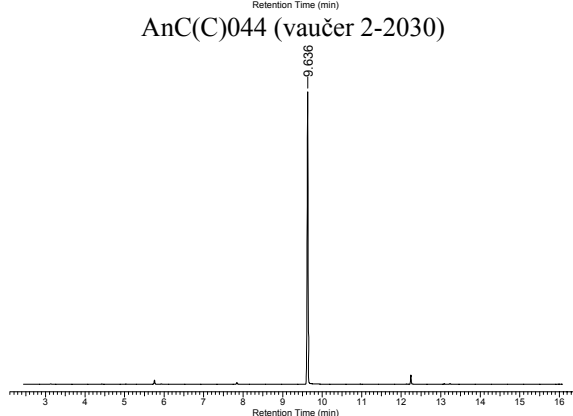
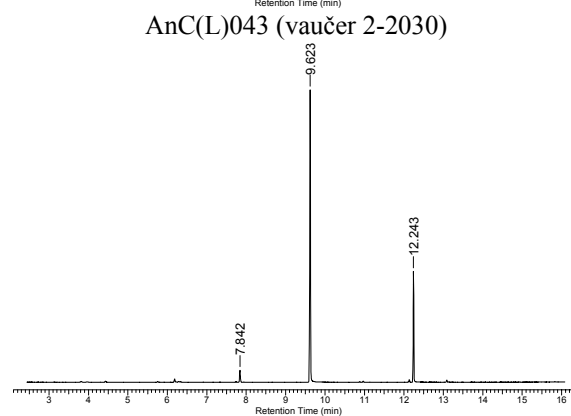
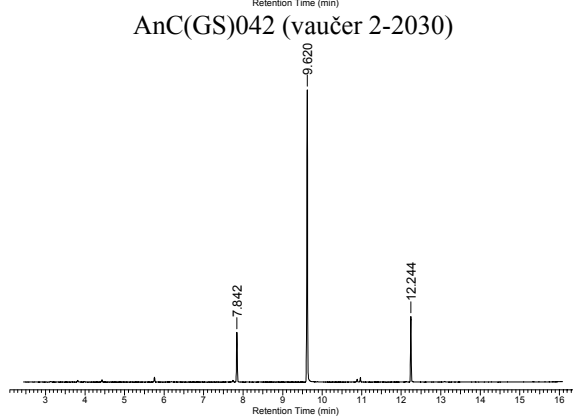
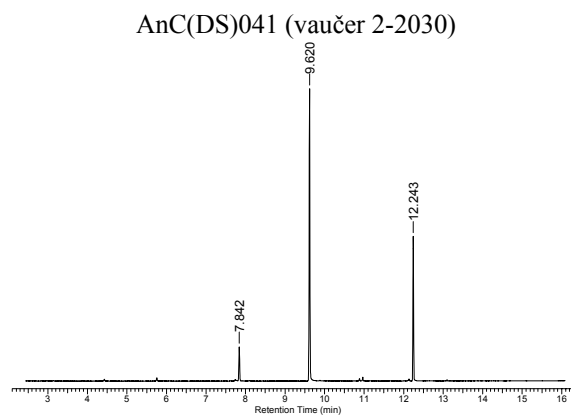
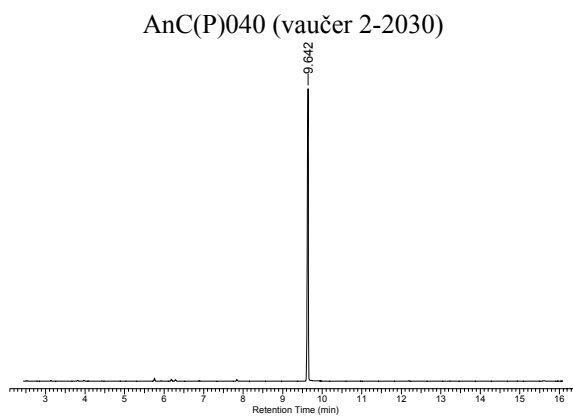
AnC(P)010 (vaučer 2-2024)

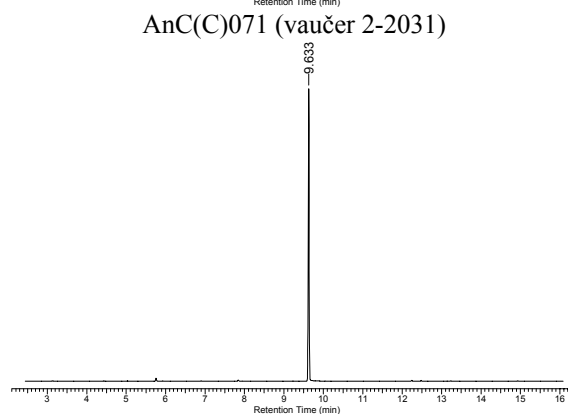
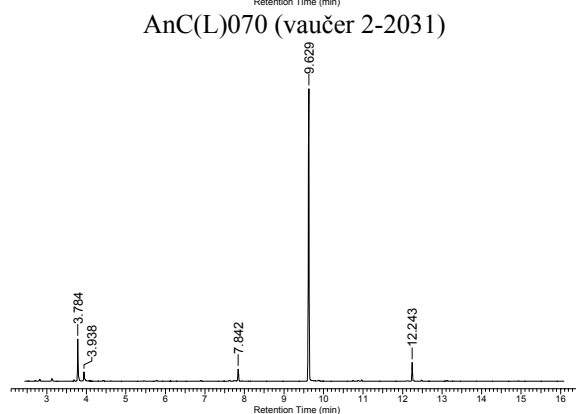
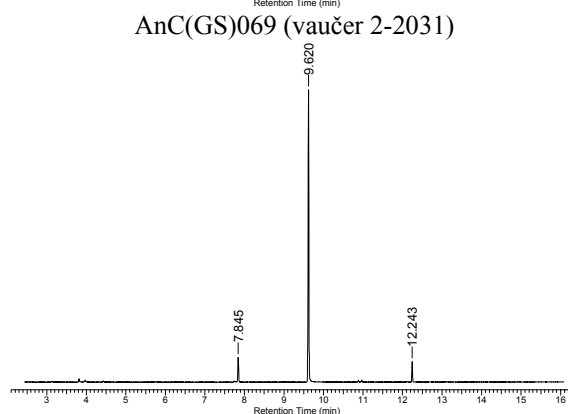
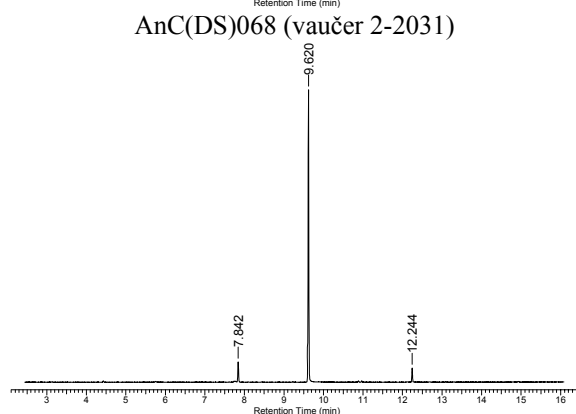
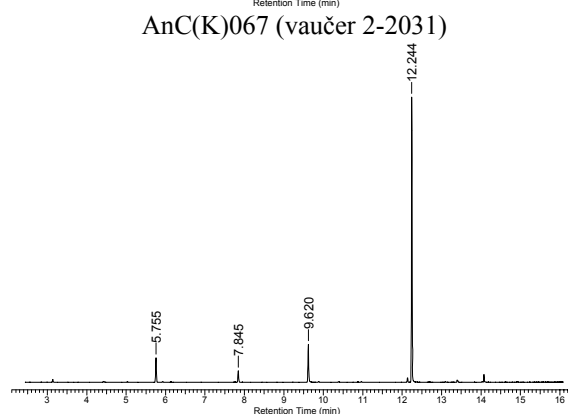
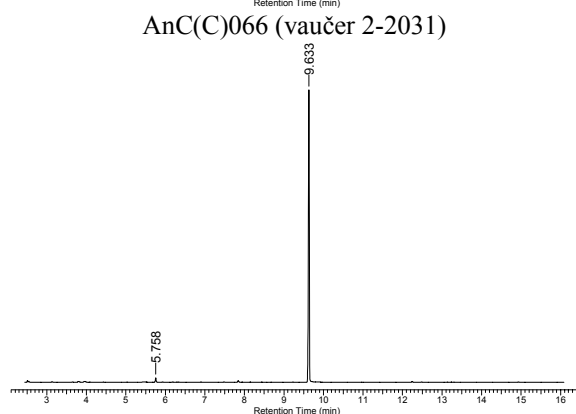
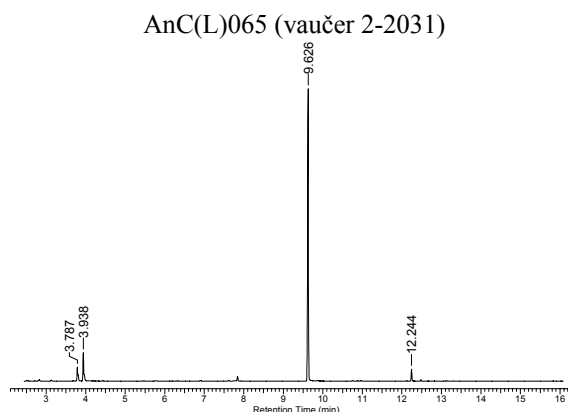
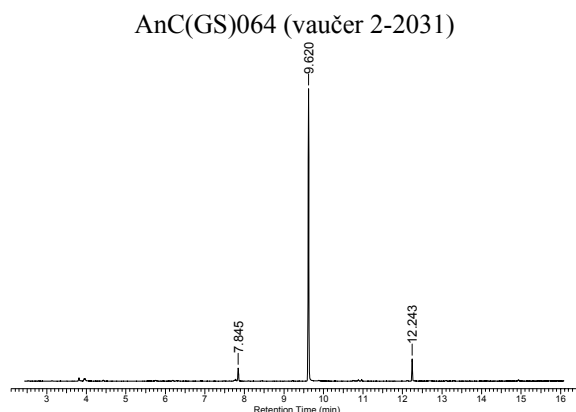




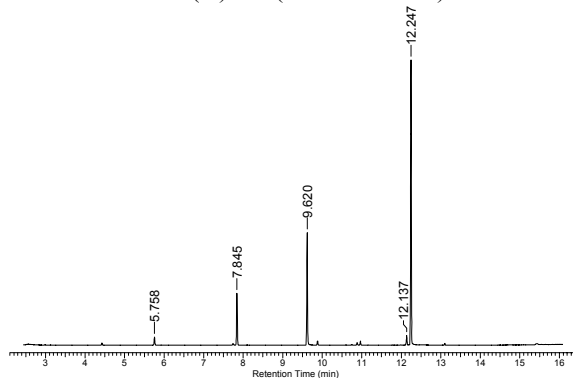




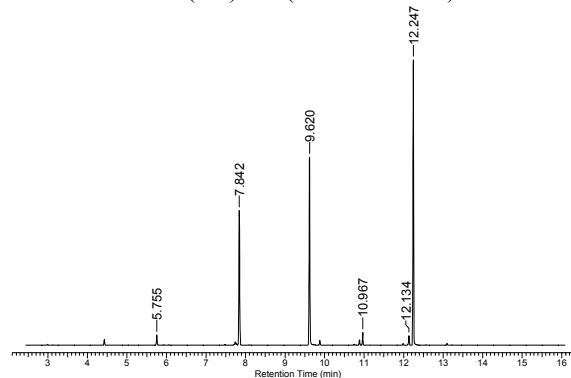




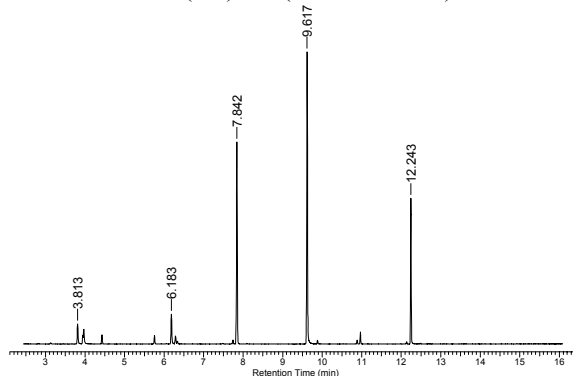
AnC(K)078 (vaučer 2-2032)



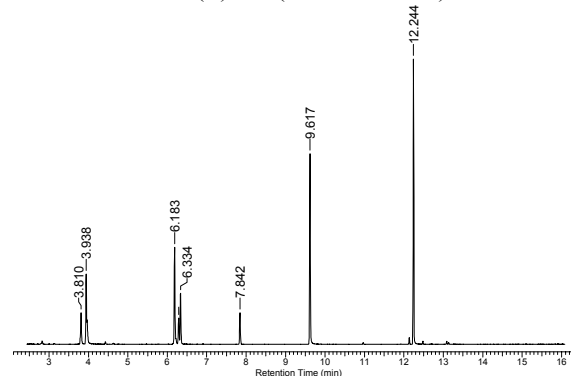
AnC(DS)079 (vaučer 2-2032)



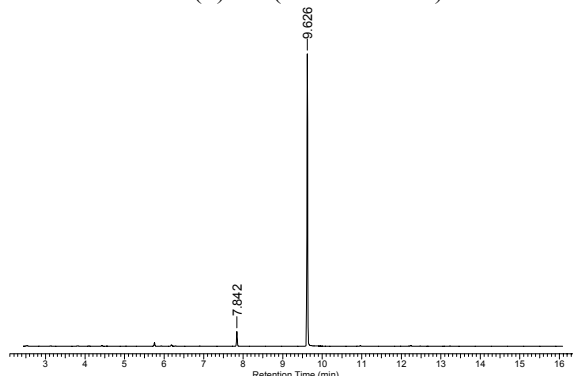
AnC(GS)080 (vaučer 2-2032)



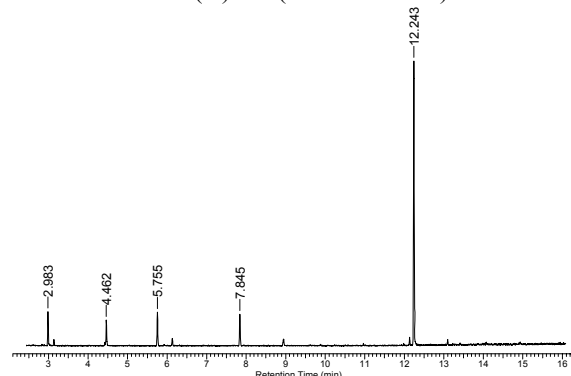
AnC(L)081 (vaučer 2-2032)



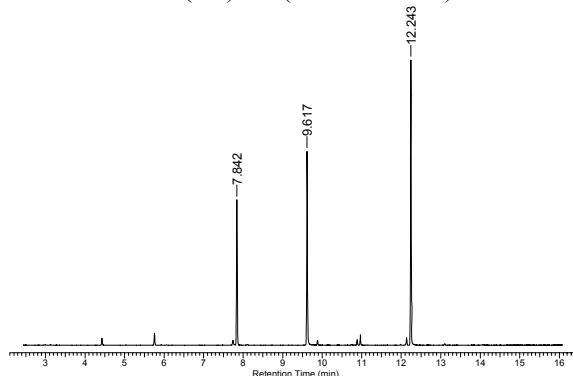
AnC(P)082 (vaučer 2-2032)



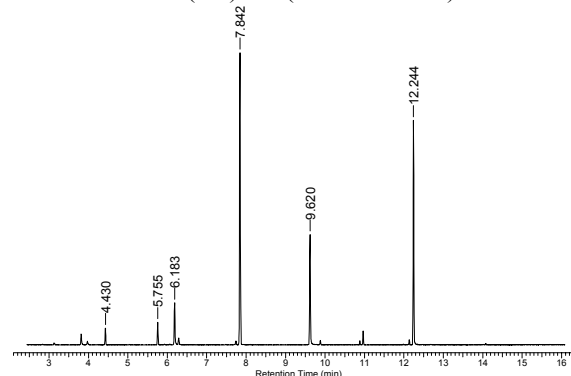
AnC(K)083 (vaučer 2-2032)

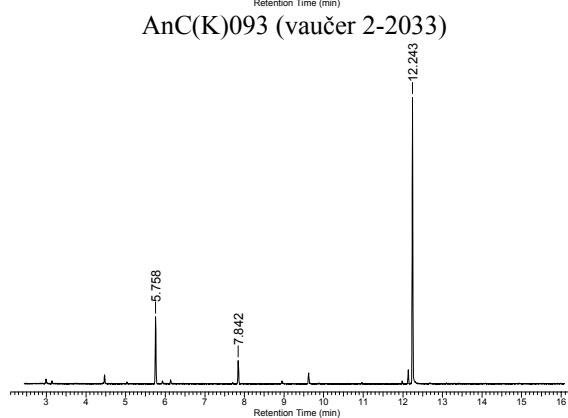
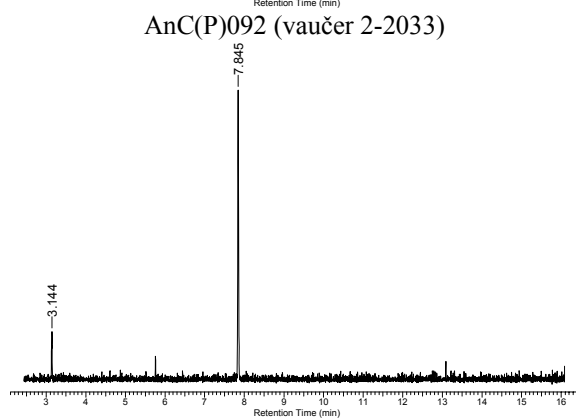
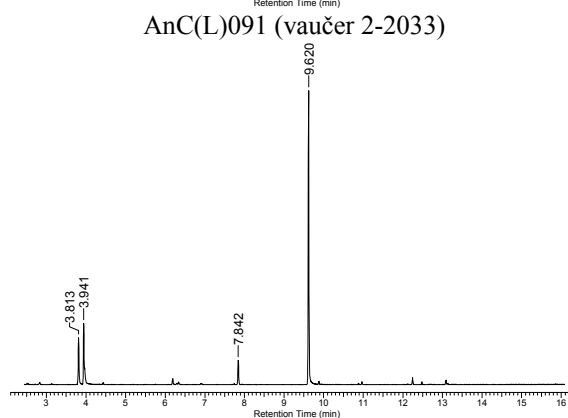
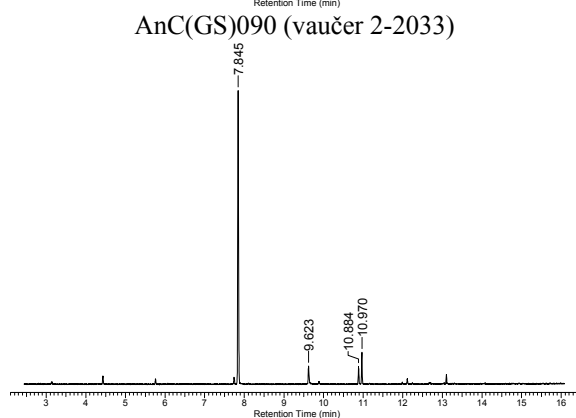
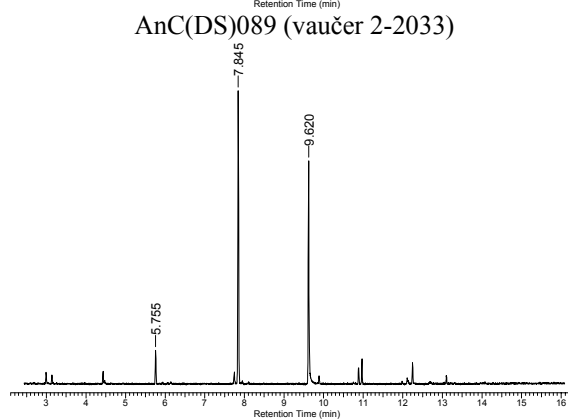
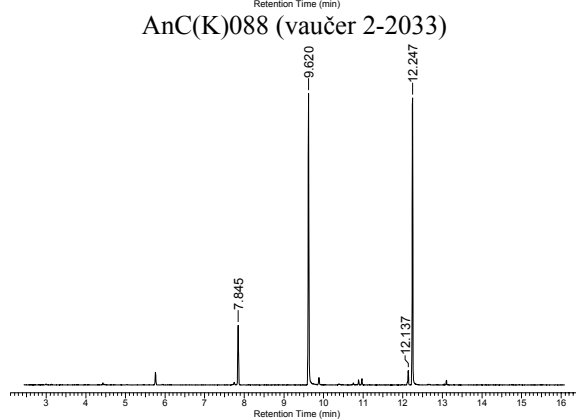
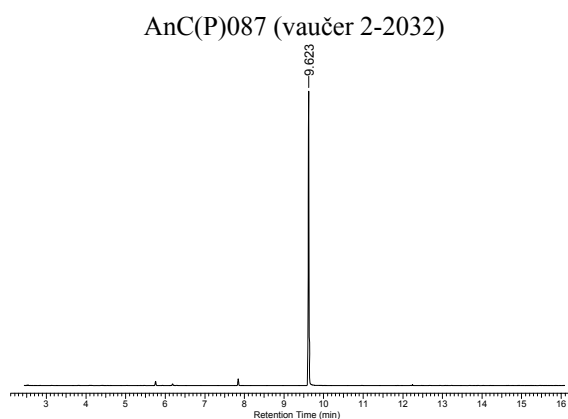
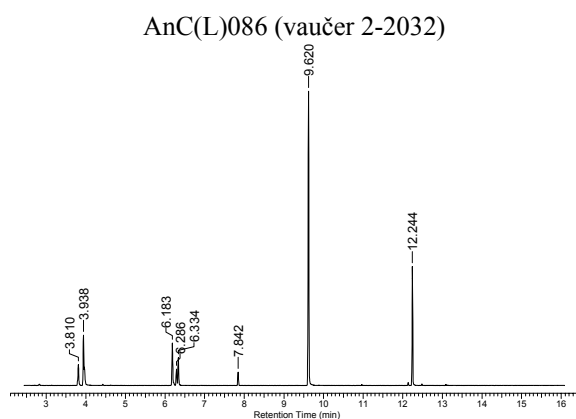


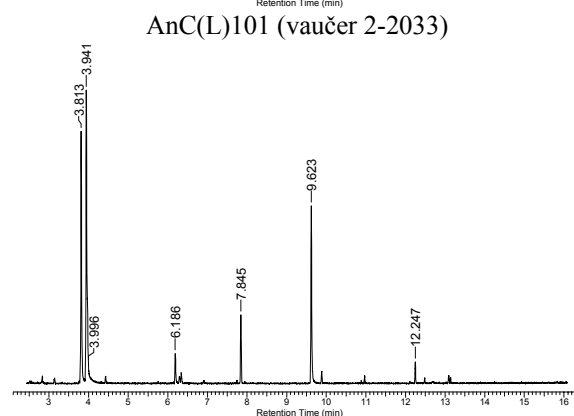
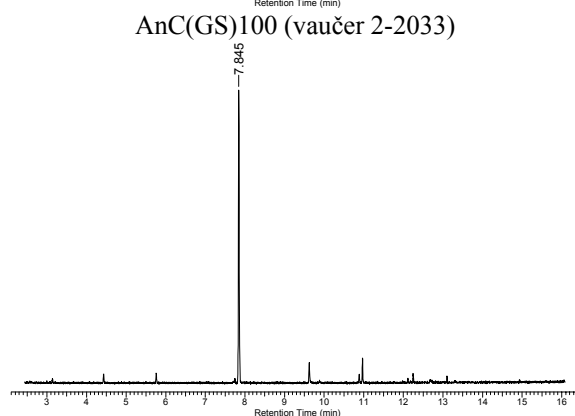
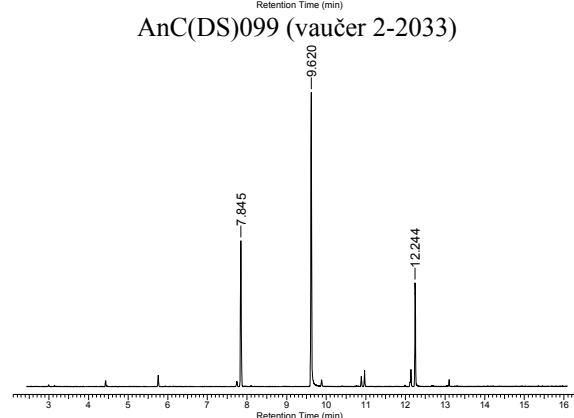
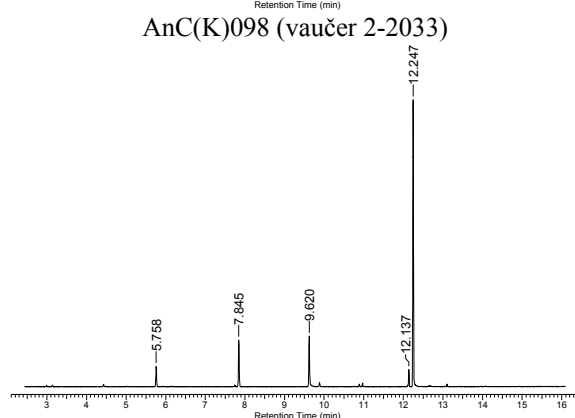
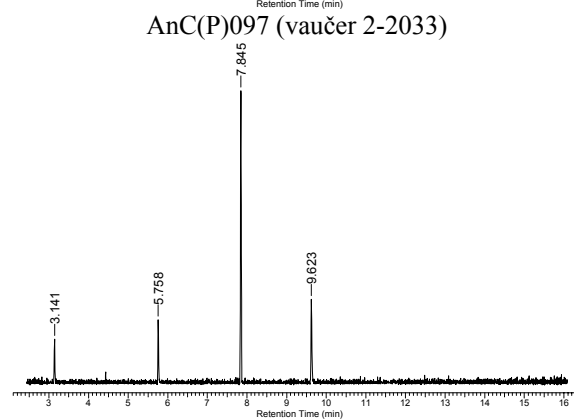
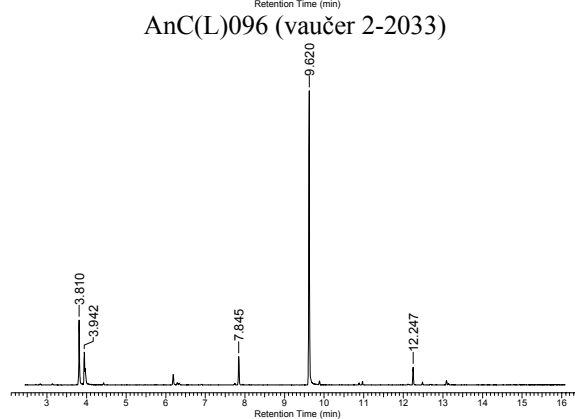
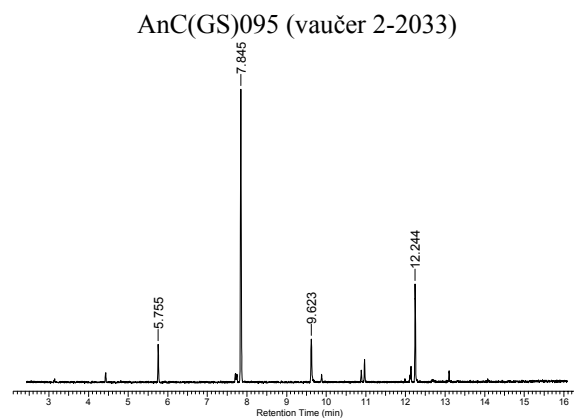
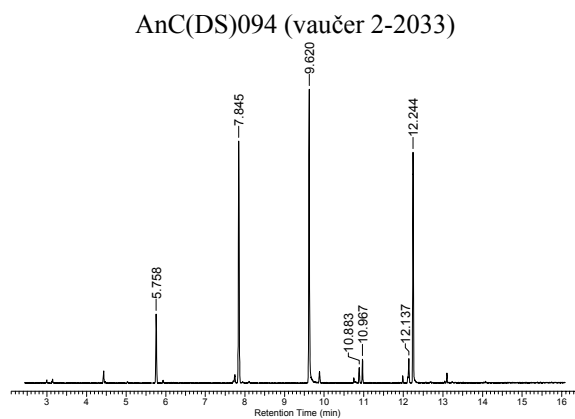
AnC(DS)084 (vaučer 2-2032)

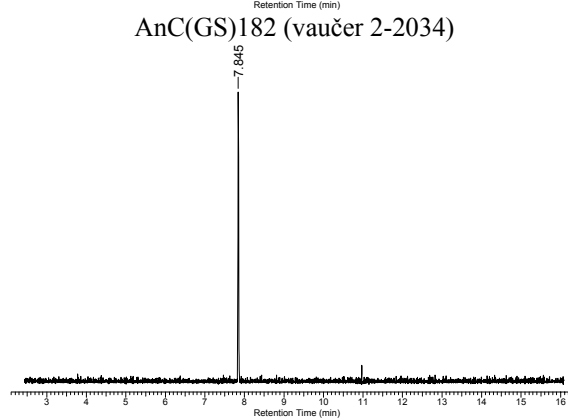
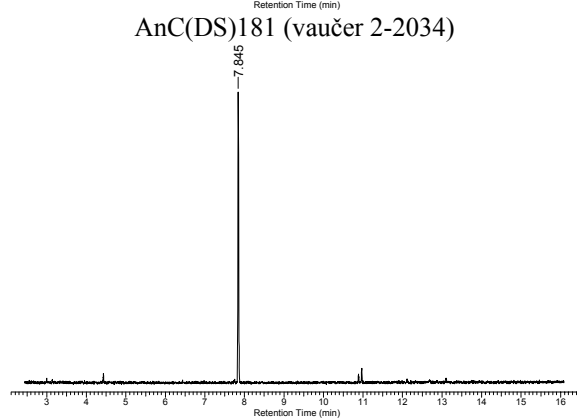
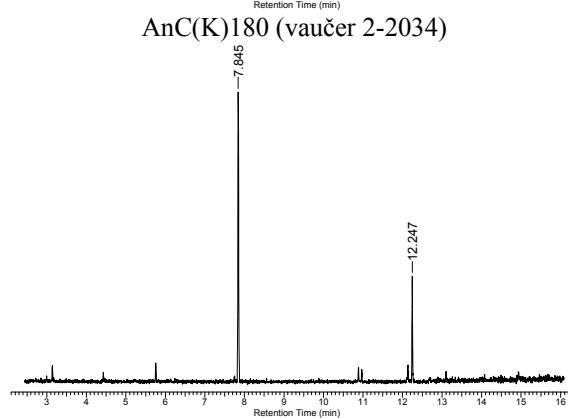
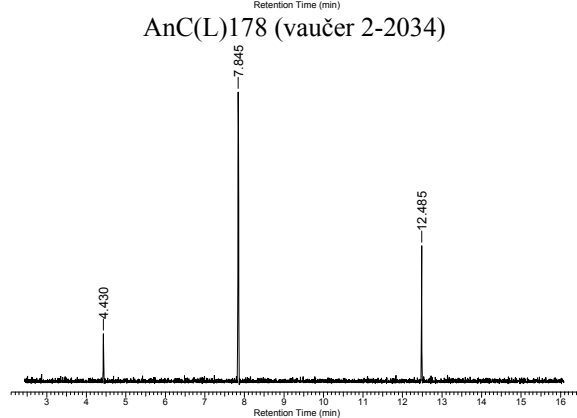
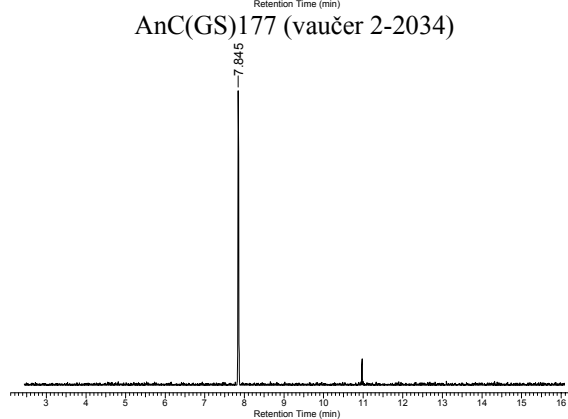
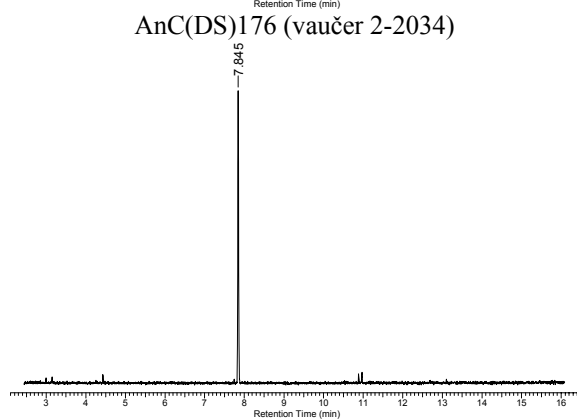
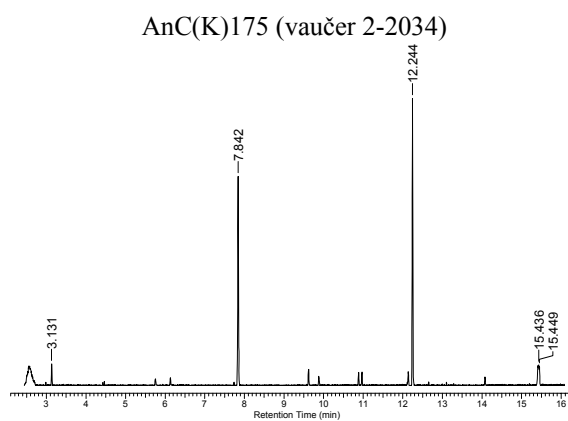
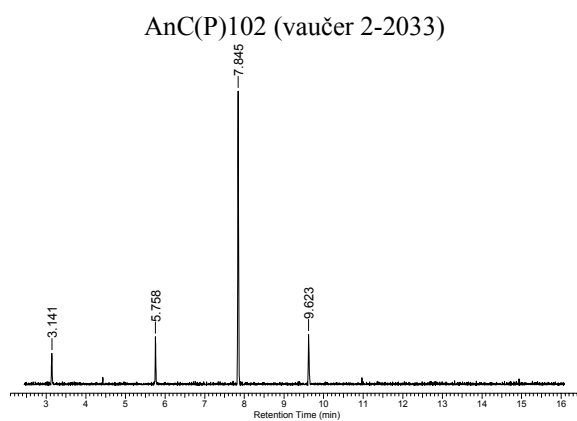


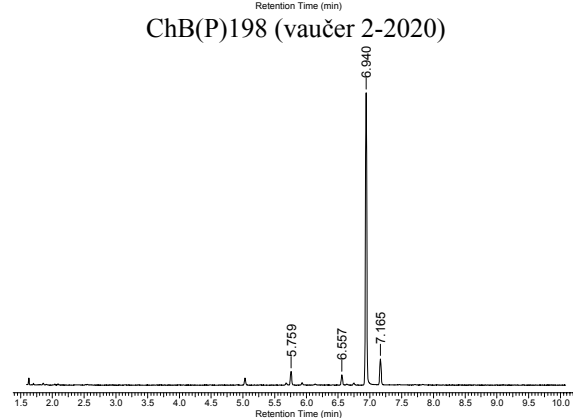
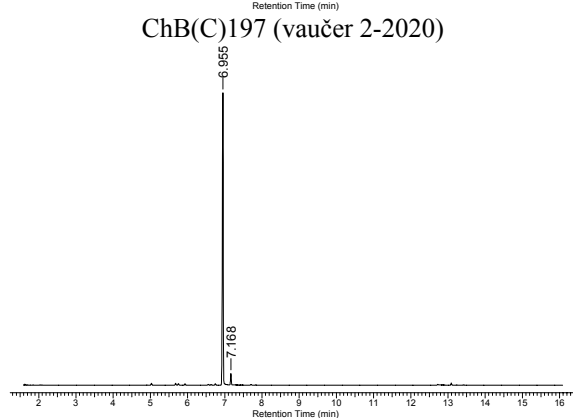
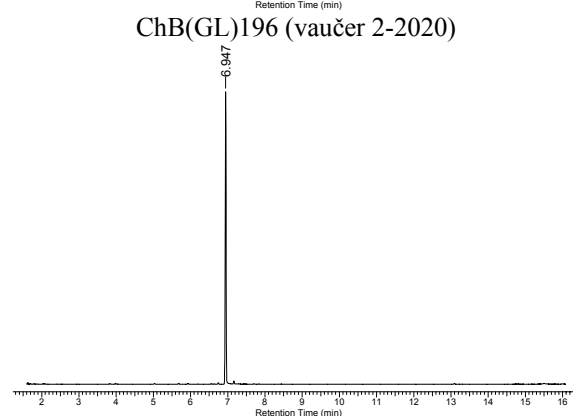
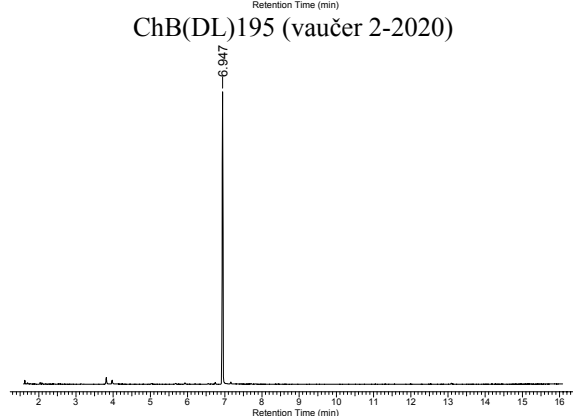
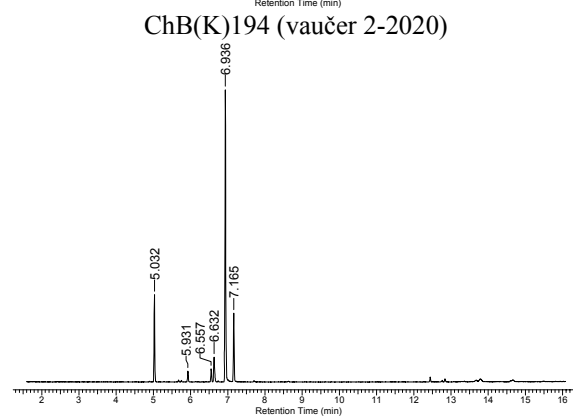
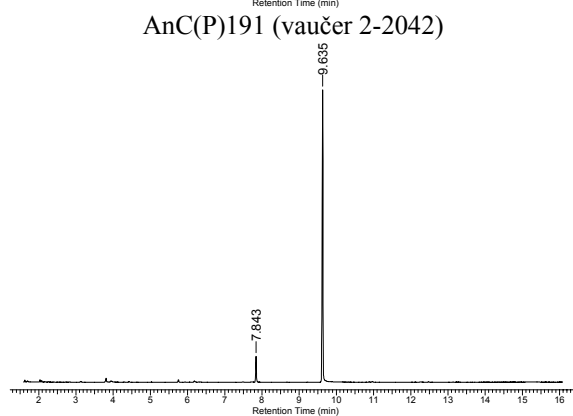
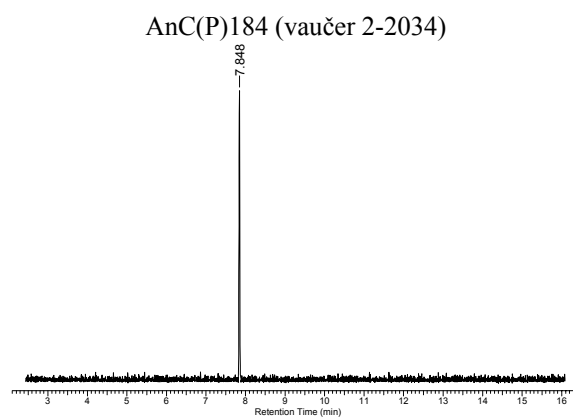
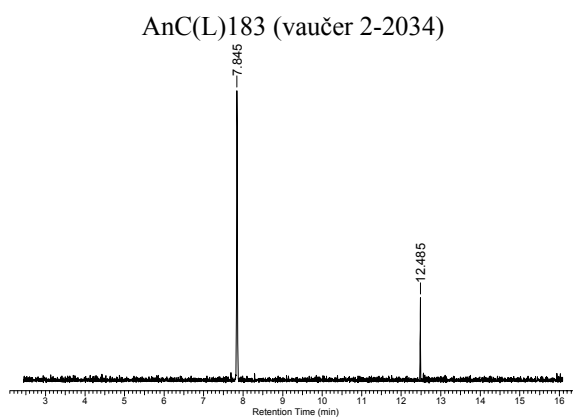
AnC(GS)085 (vaučer 2-2032)

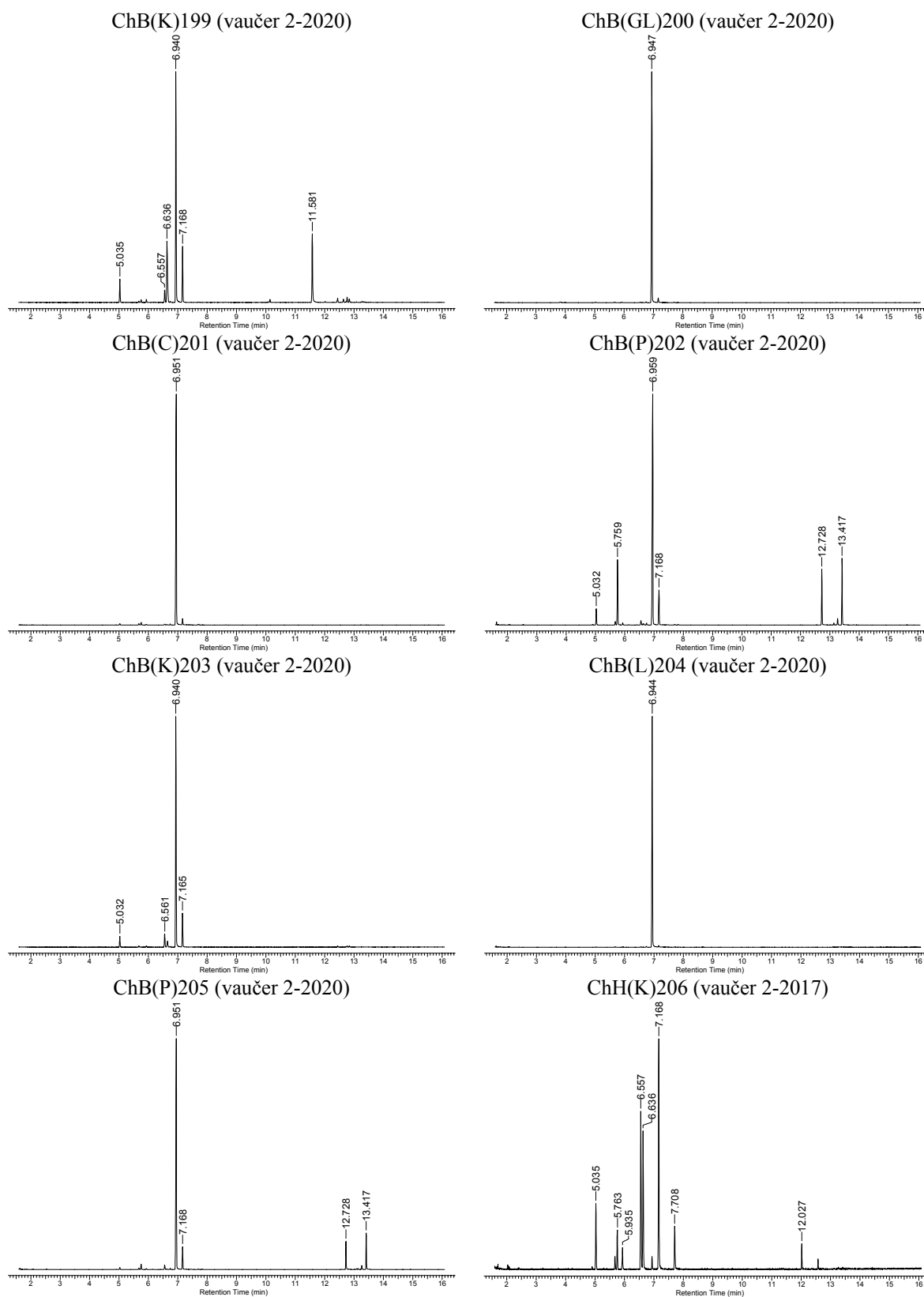




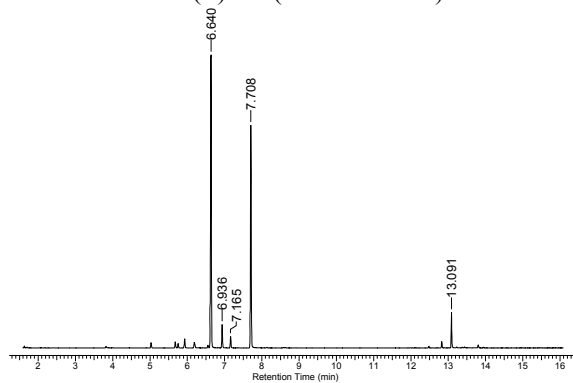




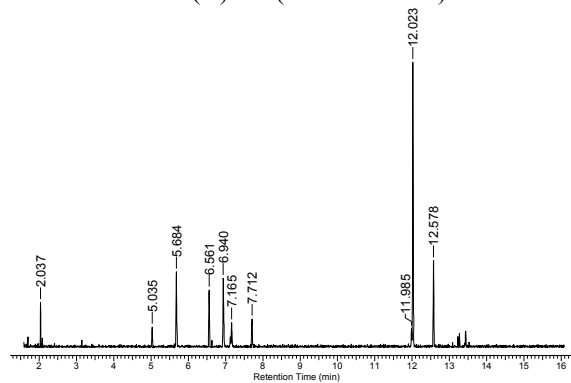




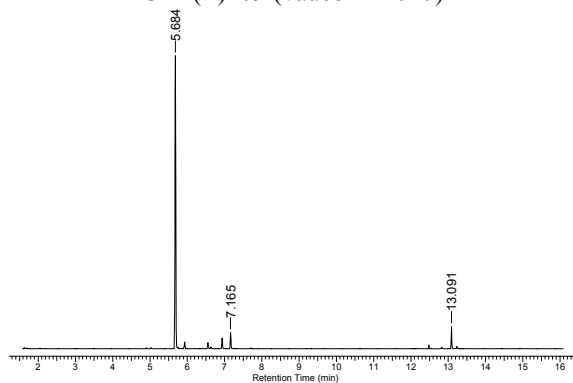
ChH(L)207 (vaučer 2-2017)



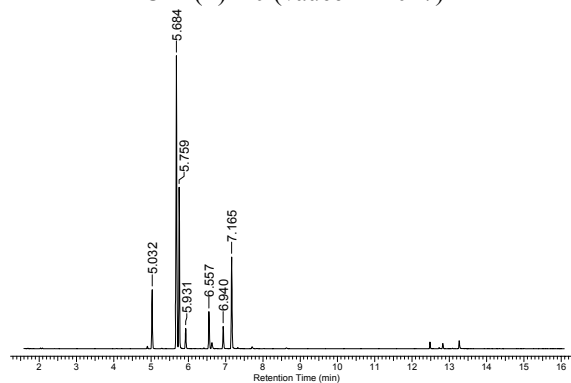
ChH(K)208 (vaučer 2-2017)



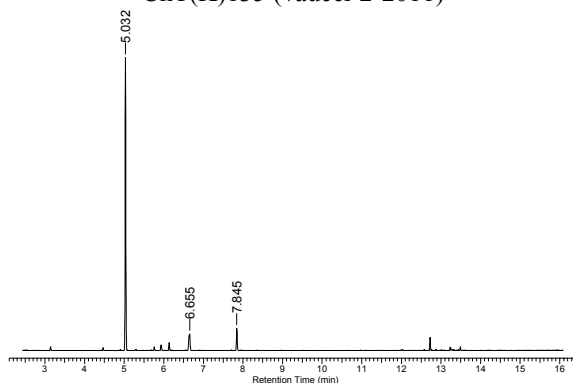
ChH(L)209 (vaučer 2-2017)



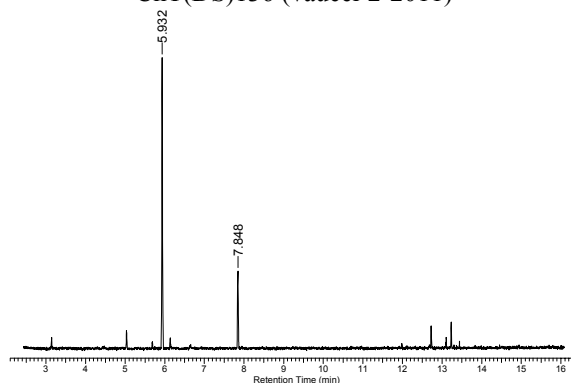
ChH(P)210 (vaučer 2-2017)



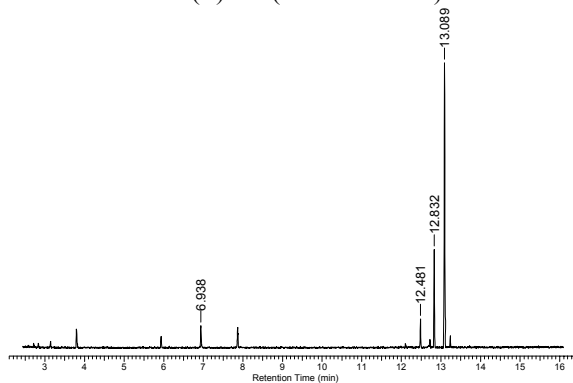
ChT(K)135 (vaučer 2-2011)



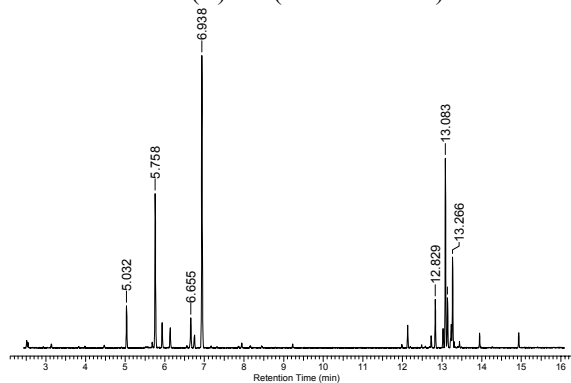
ChT(DS)136 (vaučer 2-2011)

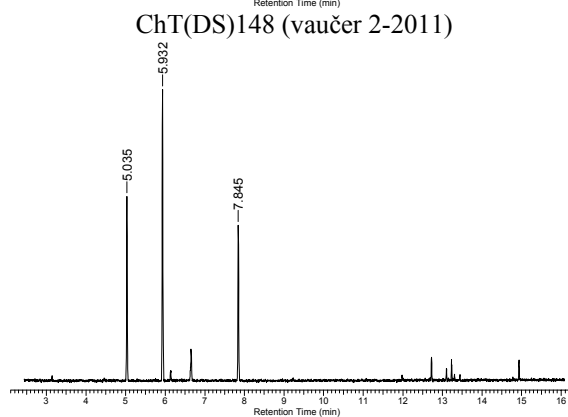
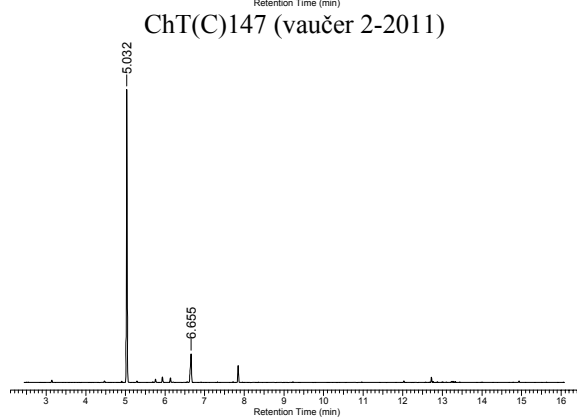
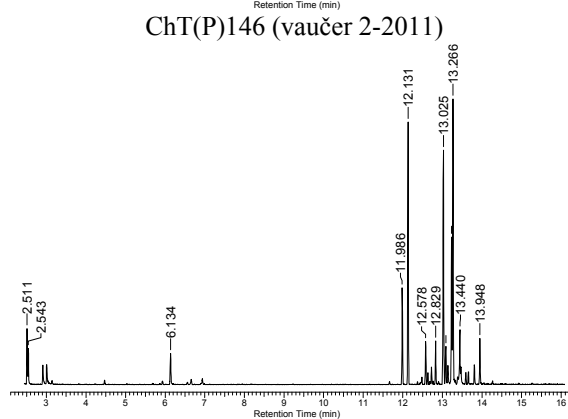
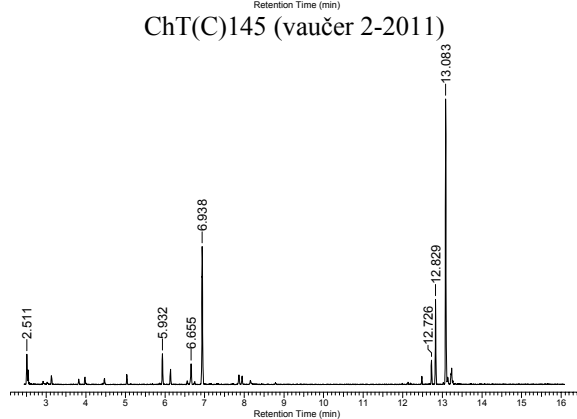
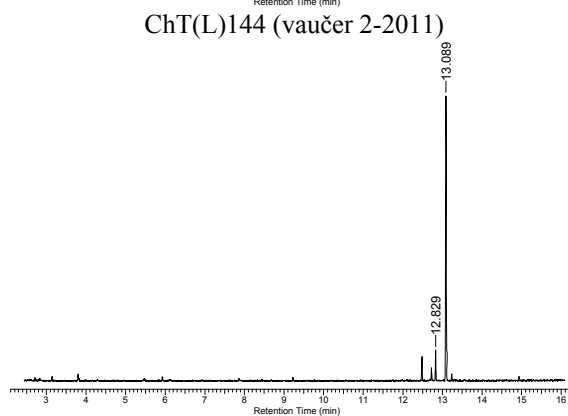
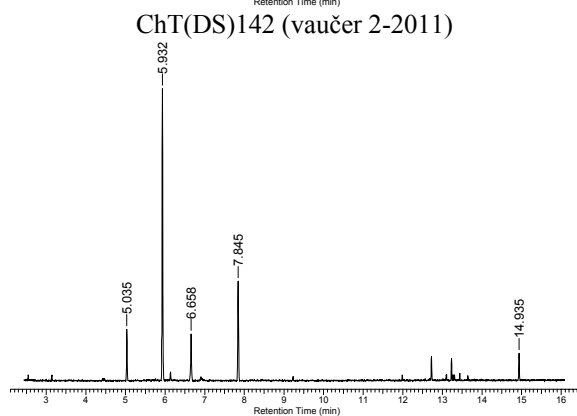
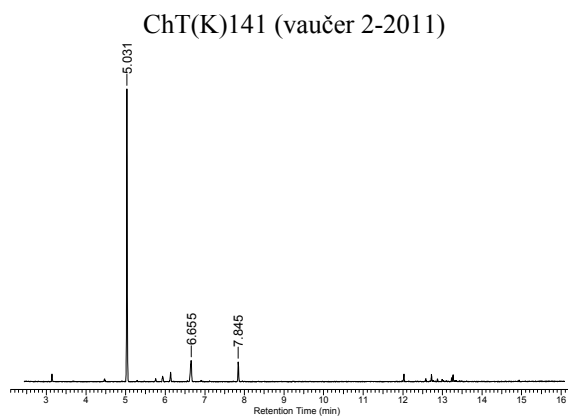
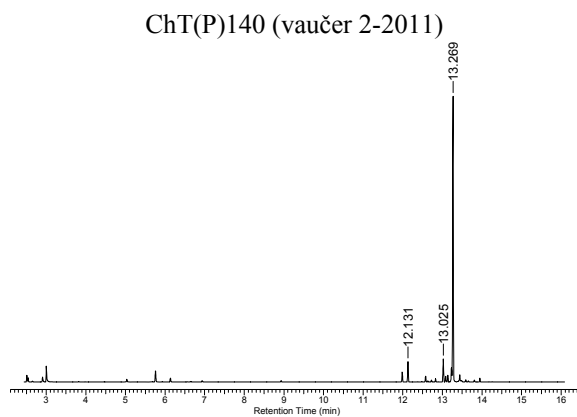


ChT(L)138 (vaučer 2-2011)

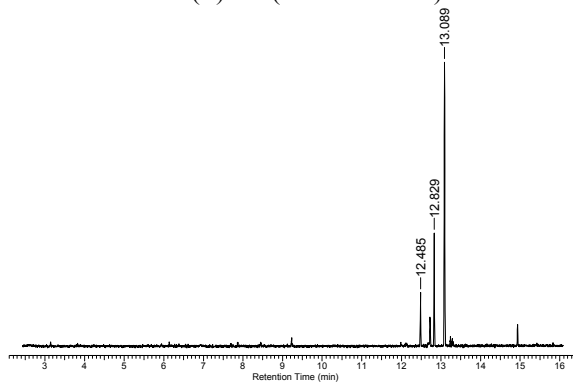


ChT(C)139 (vaučer 2-2011)

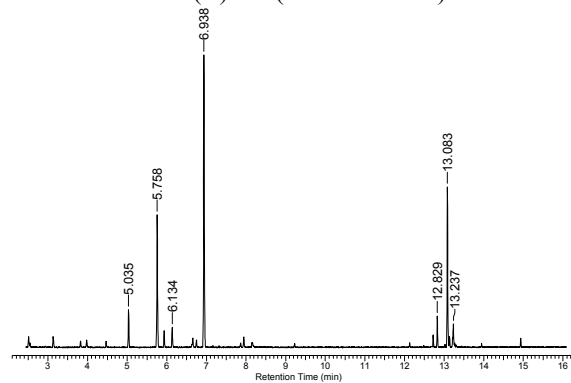




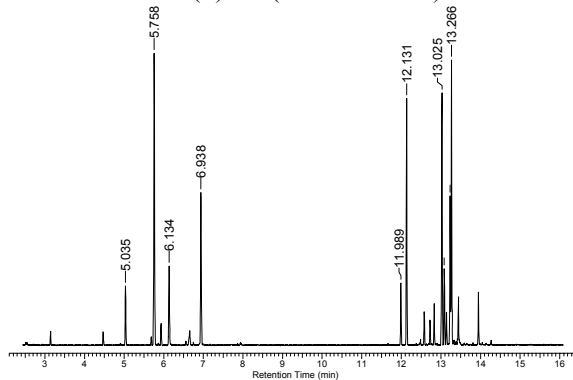
ChT(L)150 (vaučer 2-2011)



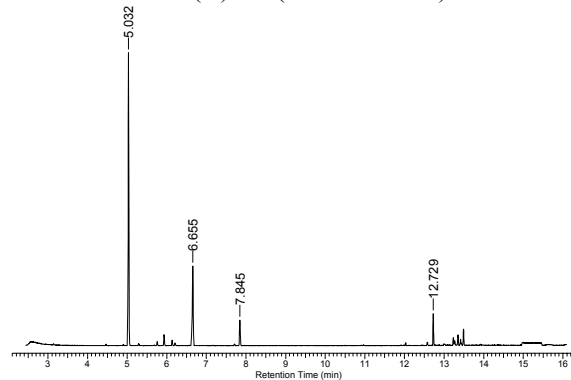
ChT(C)151 (vaučer 2-2011)



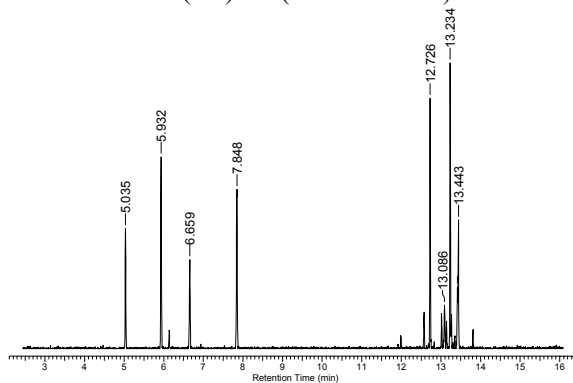
ChT(P)152 (vaučer 2-2011)



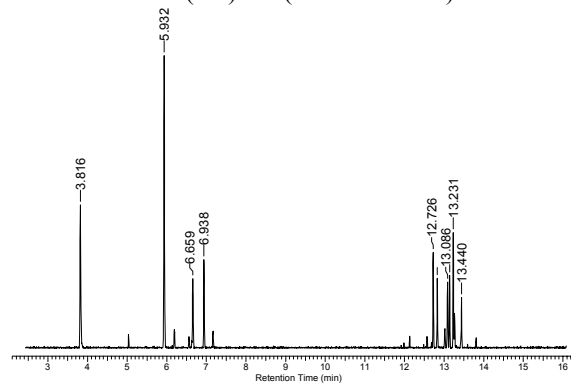
ChT(K)153 (vaučer 2-2012)



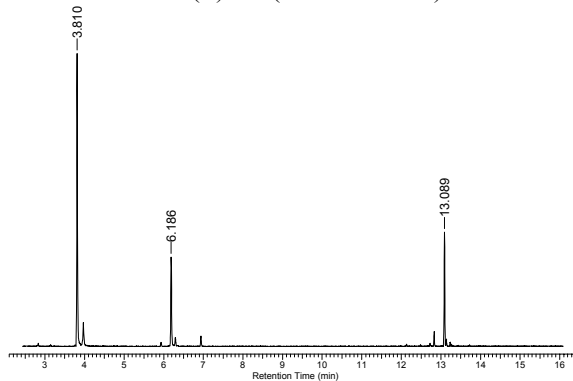
ChT(DS)154 (vaučer 2-2012)



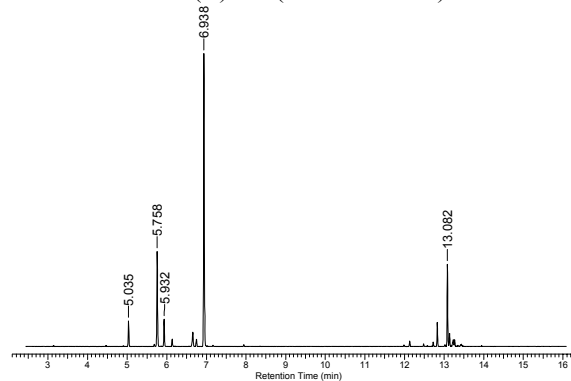
ChT(GS)155 (vaučer 2-2012)



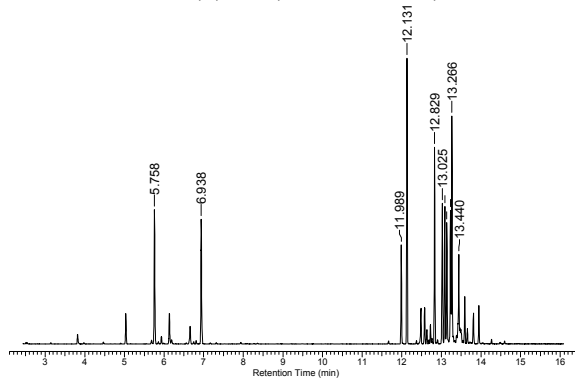
ChT(L)156 (vaučer 2-2012)



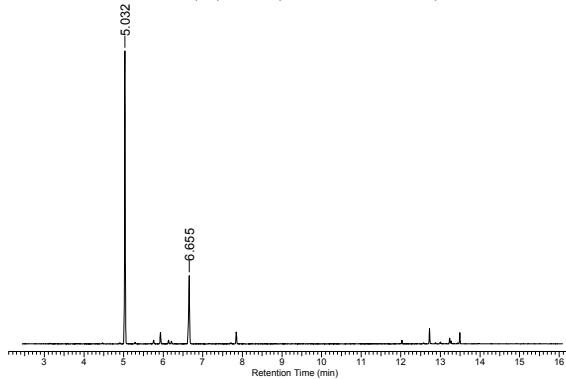
ChT(C)157 (vaučer 2-2012)



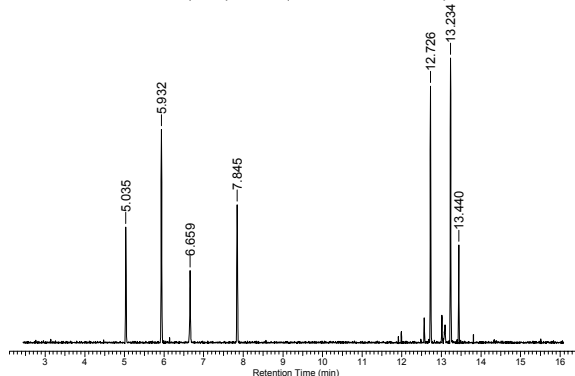
ChT(P)158 (vaučer 2-2012)



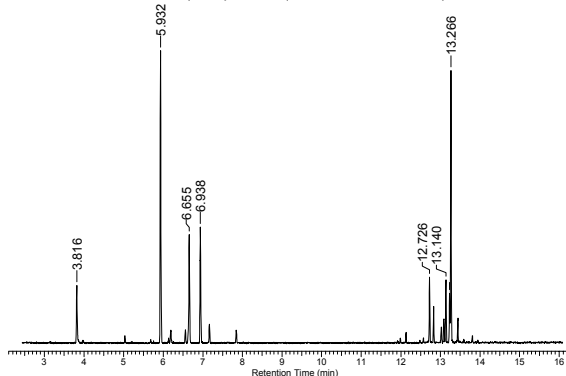
ChT(K)159 (vaučer 2-2012)



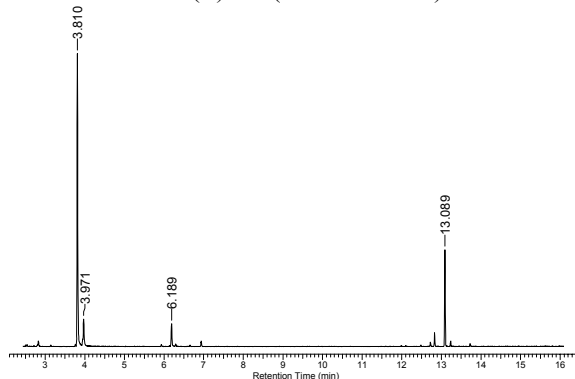
ChT(DS)160 (vaučer 2-2012)



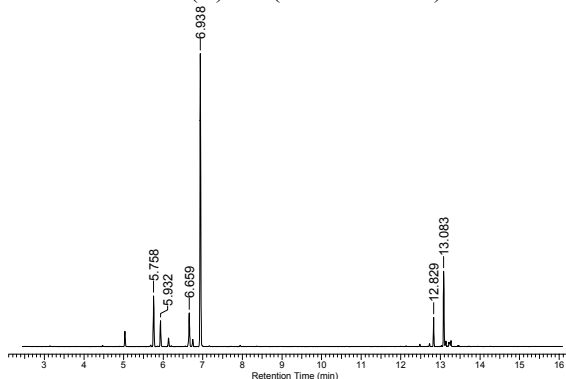
ChT(GS)161 (vaučer 2-2012)



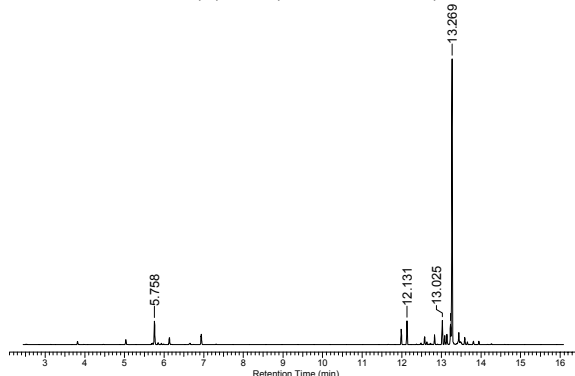
ChT(L)162 (vaučer 2-2012)



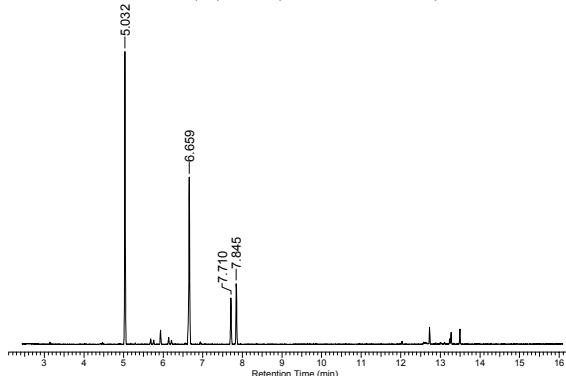
ChT(C)163 (vaučer 2-2012)



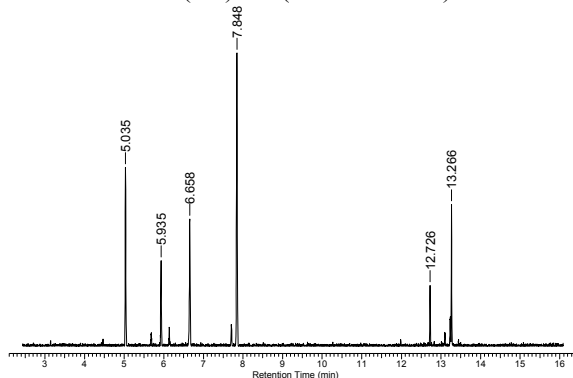
ChT(P)164 (vaučer 2-2012)



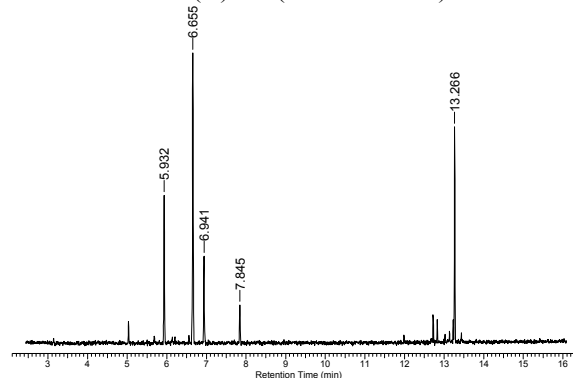
ChT(K)165 (vaučer 2-2012)



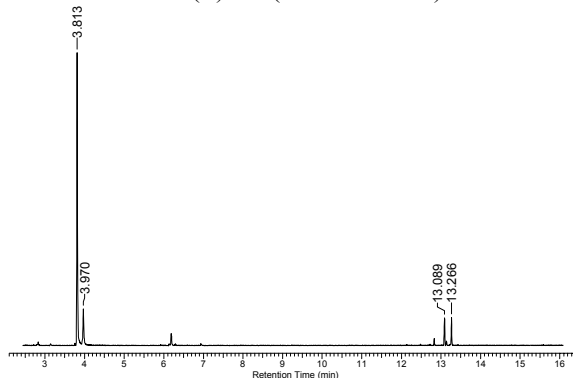
ChT(DS)166 (vaučer 2-2012)



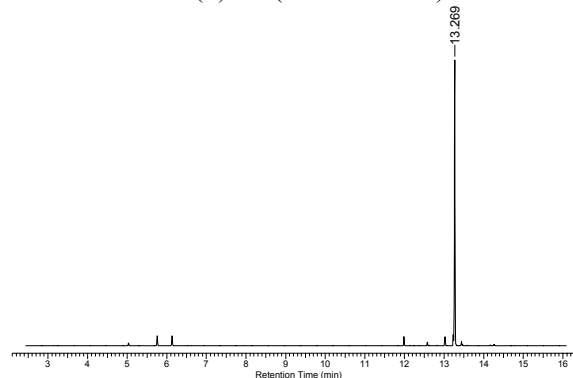
ChT(G)167 (vaučer 2-2012)



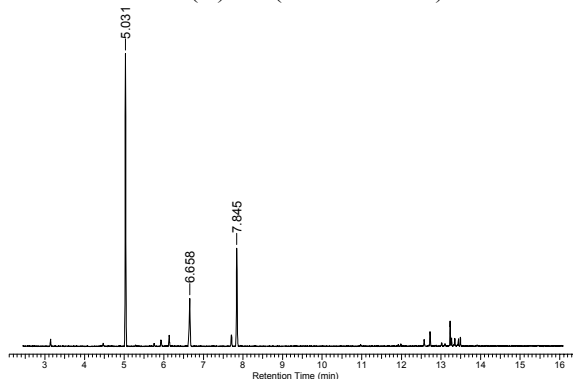
ChT(L)168 (vaučer 2-2012)



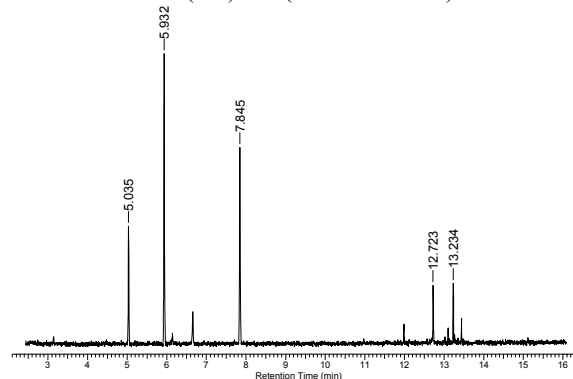
ChT(P)169 (vaučer 2-2012)



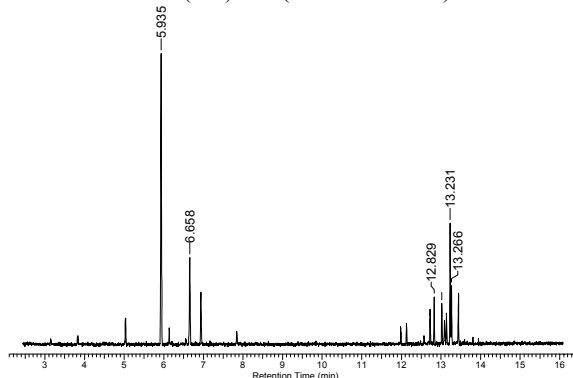
ChT(K)170 (vaučer 2-2012)



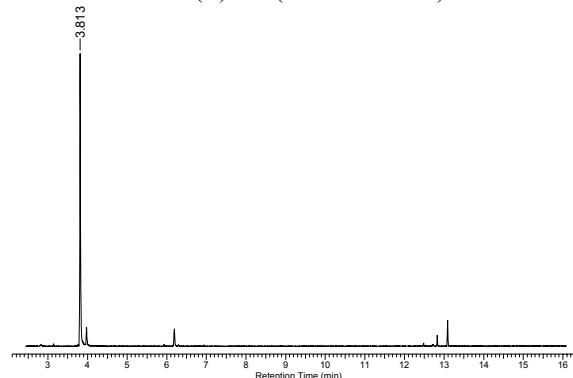
ChT(DS)171 (vaučer 2-2012)



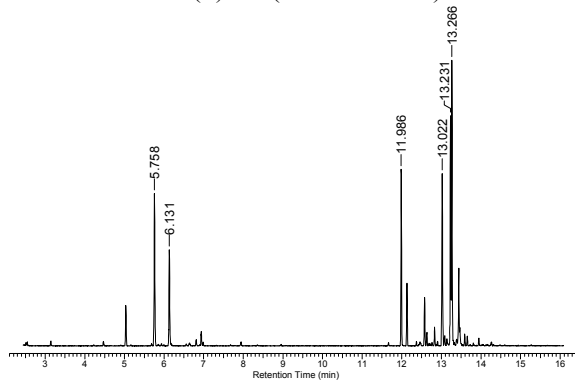
ChT(GS)172 (vaučer 2-2012)



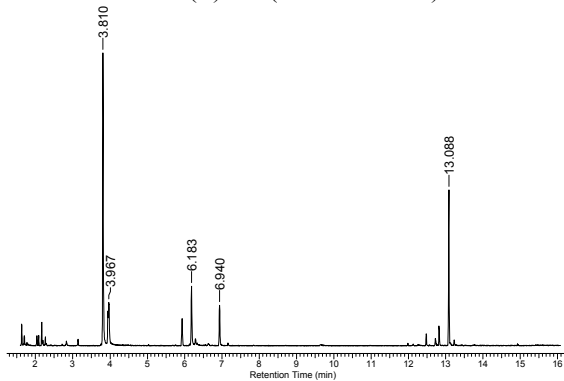
ChT(L)173 (vaučer 2-2012)



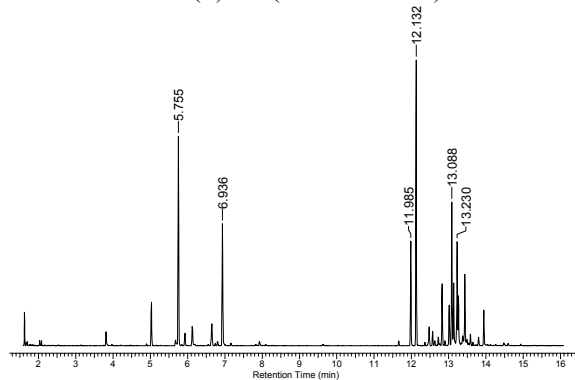
ChT(P)174 (vaučer 2-2012)



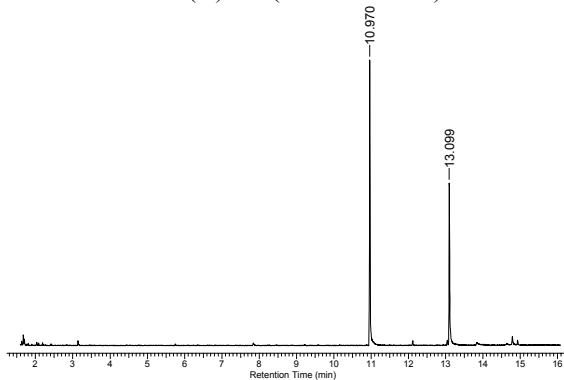
ChT(L)192 (vaučer 2-2013)



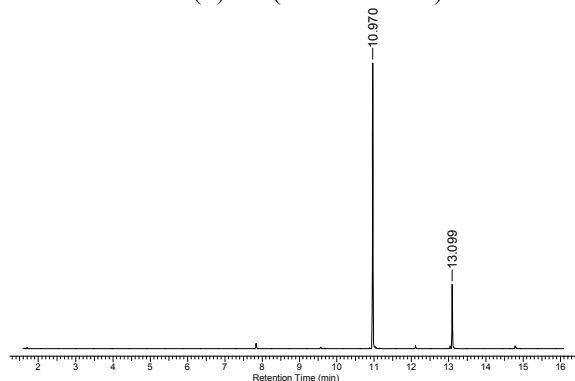
ChT(P)193 (vaučer 2-2013)



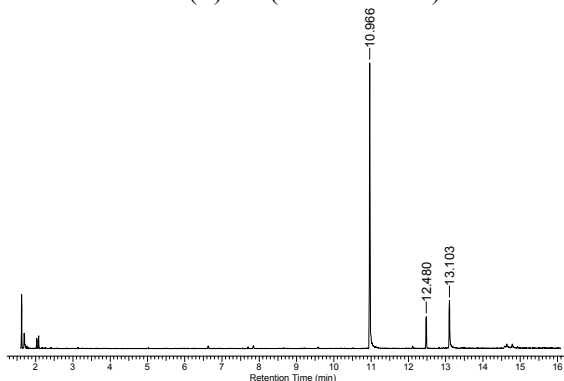
SPV(K)185 (vaučer 2-2009)



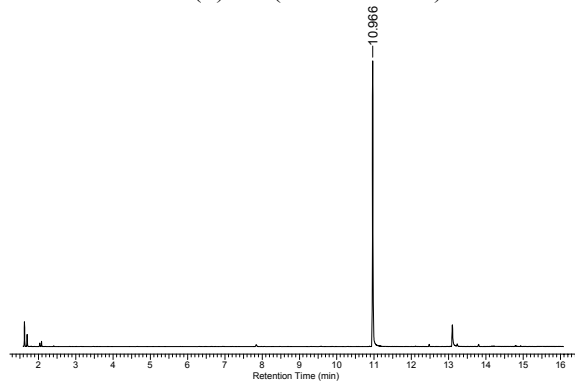
SPV(S)186 (vaučer 2-2009)



SPV(L)187 (vaučer 2-2009)



SPV(P)188 (vaučer 2-2009)



8.8. REZULTATI HEADSPACE-GC-MS ANALIZE

Rezultati headspace-GC-MS analize *Anthriscus cerefolium*

t_R [min]	KI	KI tabl.	Jedinjenje	AnC(K)011	AnC(DS)012	AnC(GS)013	AnC(L)014	AnC(C)015	AnC(K)062	AnC(DS)063	AnC(GS)064	AnC(L)065	AT0(C)66
2,039	692		3-Metilbutanal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,087	697		2-Metilbutanal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,513	744	741	3-Metil-1-butanol	-	-	-	-	-	-	-	-	0,13	0,28
2,545	747		2-Metil-1-butanol	-	-	-	-	-	-	-	-	0,09	0,24
2,826	775	774	2Z-Penten-1-ol	-	-	-	0,51	-	-	-	-	0,44	-
2,988	789		3-Metil-2-butenal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3,139	803	802	Heksanal	0,62	-	-	-	-	-	-	-	0,30	0,14
3,790	855	855	<i>trans</i> -2-Heksenal	-	-	-	0,84	-	-	-	-	2,93	0,15
3,815	857	859	<i>cis</i> -3-Heksen-1-ol	-	-	0,90	2,88	-	-	-	0,99	1,27	0,15
3,941	867		<i>trans</i> -2-Heksen-1-ol	-	-	-	8,50	-	-	-	0,65	6,60	0,21
3,969	869	871	Heksanol	-	-	-	5,06	-	-	-	0,72	1,34	0,22
4,430	901	900	Nonan	0,51	-	0,87	0,38	-	-	0,18	0,23	0,11	-
4,470	903	902	Heptanal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5,758	981	979	β -Pinen	10,66	1,20	3,00	-	1,17	4,13	0,42	-	-	1,15
6,135	1002	999	Oktanal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6,186	1005	1005	<i>cis</i> -3-Heksen-1-il-acetat	-	-	-	6,70	0,22	-	-	0,24	-	-
6,290	1011	1009	Heksil-acetat	-	-	-	4,02	-	-	-	-	-	-
6,336	1013		<i>trans</i> -2-Heksen-1-il-acetat	-	-	-	4,09	-	-	-	-	-	-
6,900	1044	1042	Fenilacetaldehid	-	-	-	-	-	-	-	-	0,15	-
7,620	1084	1090	<i>3-Nonanon</i> ?	-	-	-	-	-	-	-	-	0,14	-
7,743	1091		Undecen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7,775	1092		<i>Nonanol</i> ?	-	-	-	-	-	0,41	0,76	0,81	-	-
7,845	1096	1100	Undekan	4,26	8,75	17,18	5,19	0,45	2,60	4,20	3,84	1,25	0,48
9,626	1203	1196	Estragol	-	-	18,74	18,72	95,07	42,28	91,28	86,00	81,41	96,39
9,698	1208		<i>3-nonen-1-il-acetat</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10,886	1292		<i>C13 alken</i>	-	-	-	-	-	0,20	0,34	0,30	0,08	-
10,969	1298	1300	Tridekan	-	0,67	1,09	-	-	0,27	0,39	0,36	0,11	-
11,988	1383	1376	<i>seskviterpen</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12,117	1395	1400	Tetradekan	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12,138	1396	1404	Alil-dimetoksibenzen	1,61	1,81	0,95	0,90	0,05	1,27	-	-	-	-
12,197	1402		Alil-dimetoksibenzen	1,24	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12,246	1406		Osmorizol	77,89	85,26	56,58	41,04	2,51	47,72	1,87	5,17	2,72	0,20
12,484	1429	1419	<i>trans</i> - β -Kariofilen	-	-	-	0,49	0,24	-	-	-	0,30	0,07
12,751	1455		<i>seskviterpen</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13,090	1489	1485	Germakren D	-	-	-	0,67	0,15	-	-	-	-	-
13,101	1491	1500	Pentadecane	-	0,66	-	-	-	0,26	0,14	-	-	-
13,140	1495		<i>seskviterpen</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13,236	1505	1500	Biciklogermakren	-	-	-	-	0,09	-	-	-	-	-
13,418	1525	1523	β -Seskvifelandren	1,64	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13,511	1535		<i>seskviterpen</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13,558	1540		<i>seskviterpen</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14,077	1601		Geranil-2/3-metilbutanoat	1,14	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			Ukupno	99,6	98,4	99,3	100,0	99,9	99,1	99,6	99,3	99,4	99,7
			Monoterpeni*	11,8	1,2	3,0	0,0	1,2	4,1	0,4	0,0	0,0	1,2
			Seskviterpeni	1,6	0,0	0,0	1,2	0,5	0,0	0,0	0,0	0,3	0,1
			Alifatični ugljovodonici	4,8	10,1	19,1	5,6	0,5	3,3	5,2	4,7	1,6	0,5
			Oksigenovana alifatična jed.	0,6	1,6	1,6	32,6	0,2	1,3	1,2	3,8	13,6	1,5
			Aromatična jed.	80,7	87,1	76,3	60,7	97,6	91,3	93,2	91,2	84,3	96,6

* Sastav po klasama računat je na osnovu kompletnih podataka, uključujući i delimično identifikovana i neidentifikovana jedinjenja koja u tabelama nisu prikazana.

t_R [min]	KI	KI tabl.	Jedinjenje	AnC(S)016	AnC(L)017	AnC(K)067	AnC(DS)068	AnC(GS)069	AnC(L)070	AnC(C)071	AnC((K))175	AnC(DS)176	AnC(GS)177
2,039	692		3-Metilbutanal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,087	697		2-Metilbutanal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,513	744	741	3-Metil-1-butanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,545	747		2-Metil-1-butanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,826	775	774	2Z-Penten-1-ol	-	-	-	-	-	0,42	-	-	-	-
2,988	789		3-Metil-2-butenal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3,139	803	802	Heksanal	-	-	0,69	-	-	0,70	0,09	3,03	-	-
3,790	855	855	<i>trans</i> -2-Heksenal	-	-	-	-	-	9,48	-	-	-	-
3,815	857	859	<i>cis</i> -3-Heksen-1-ol	-	0,60	-	-	0,79	-	-	-	-	-
3,941	867		<i>trans</i> -2-Heksen-1-ol	-	0,73	-	-	-	2,45	-	-	-	-
3,969	869	871	Heksanol	-	0,60	-	-	0,59	-	-	-	-	-
4,430	901	900	Nonan	0,47	0,41	-	0,33	0,34	0,14	-	-	1,85	-
4,470	903	902	Heptanal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5,758	981	979	β -Pinen	0,56	-	7,61	0,26	-	-	0,85	-	-	-
6,135	1002	999	Oktanal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6,186	1005	1005	<i>cis</i> -3-Heksen-1-il-acetat	-	4,81	-	-	-	-	-	-	-	-
6,290	1011	1009	Heksil-acetat	-	2,21	-	-	-	-	-	-	-	-
6,336	1013		<i>trans</i> -2-Heksen-1-il-acetat	-	1,87	-	-	-	-	-	-	-	-
6,900	1044	1042	Fenilacetaldehid	-	-	-	-	-	0,11	-	-	-	-
7,620	1084	1090	3-Nonanon ?	-	-	-	-	-	0,15	-	-	-	-
7,743	1091		Undecen	-	-	-	0,31	0,32	0,14	-	-	-	-
7,775	1092		Nonanol ?	-	-	-	0,33	-	0,07	-	-	-	-
7,845	1096	1100	Undekan	14,29	7,28	3,45	6,06	7,30	3,00	0,32	36,45	92,26	92,49
9,626	1203	1196	Estragol	41,78	35,49	12,13	88,49	84,92	77,72	98,36	2,78	-	-
9,698	1208		3-nonen-1-il-acetat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10,886	1292		C13 alken	0,39	-	-	0,30	0,39	0,18	-	1,87	2,14	-
10,969	1298	1300	Tridekan	1,22	0,39	-	0,33	0,48	0,24	-	2,05	2,71	7,51
11,988	1383	1376	seskviterpen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12,117	1395	1400	Tetradekan	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12,138	1396	1404	Alil-dimetoksibenzen	0,58	0,92	1,22	-	-	0,07	-	2,02	-	-
12,197	1402		Alil-dimetoksibenzen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12,246	1406		Osmorizol	40,27	42,27	72,21	3,41	4,73	3,72	0,20	42,54	-	-
12,484	1429	1419	<i>trans</i> - β -Kariofilen	-	0,96	-	-	-	0,21	0,14	-	-	-
12,751	1455		seskviterpen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13,090	1489	1485	Germakren D	-	1,11	-	-	-	-	-	-	-	-
13,101	1491	1500	Pentadecane	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13,140	1495		seskviterpen	-	0,36	-	-	-	0,09	-	-	-	-
13,236	1505	1500	Biciklogermakren	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13,418	1525	1523	β -Seskvifelandren	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13,511	1535		seskviterpen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13,558	1540		seskviterpen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14,077	1601		Geranil-2/3-metilbutanoat	-	-	1,85	-	-	-	-	-	-	-
			Ukupno	99,6	100,0	99,2	99,8	99,9	98,9	100,0	90,7	98,9	100,0
			Monoterpeni	0,6	0,0	9,5	0,3	0,0	0,0	0,8	0,0	0,0	0,0
			Seskviterpeni	0,0	2,4	0,0	0,0	0,0	0,3	0,1	0,0	0,0	0,0
			Alifatični ugljovodonici	16,4	8,1	3,5	7,3	8,8	3,7	0,3	40,4	98,9	100,0
			Oksigenovana alifatična jed.	0,4	10,8	0,7	0,3	1,4	13,6	0,1	3,0	0,0	0,0
			Aromatična jed.	82,6	78,7	86,4	91,9	89,6	81,6	98,6	47,3	0,0	0,0

t_R [min]	KI	KI tabl.	Jedinjenje	AnC(L)178	AnC(K)180	AnC(DS)181	AnC(GS)182	AnC(L)183	AnC(P)184	AnC(K)001	AnC(DS)002	AnC(GS)003	AnC(L)004
2,039	692		3-Metilbutanal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,087	697		2-Metilbutanal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,513	744	741	3-Metil-1-butanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,545	747		2-Metil-1-butanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,826	775	774	2Z-Penten-1-ol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,10
2,988	789		3-Metil-2-butenal	-	-	-	-	-	-	W	-	-	-
3,139	803	802	Heksanal	-	2,60	-	-	-	-	-	-	-	-
3,790	855	855	<i>trans</i> -2-Heksenal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3,815	857	859	<i>cis</i> -3-Heksen-1-ol	-	-	-	-	-	-	-	-	0,44	1,51
3,941	867		<i>trans</i> 2-Heksen-1-ol	-	-	-	-	-	-	-	-	0,11	4,68
3,969	869	871	Heksanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4,430	901	900	Nonan	8,35	1,82	1,80	-	-	-	0,15	0,47	0,65	0,12
4,470	903	902	Heptanal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5,758	981	979	β -Pinen	-	3,65	-	-	-	-	4,11	0,87	0,29	-
6,135	1002	999	Oktanal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6,186	1005	1005	<i>cis</i> -3-Heksen-1-il-acetat	-	-	-	-	-	-	-	-	0,81	2,70
6,290	1011	1009	Heksil-acetat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,53
6,336	1013		<i>trans</i> -2-Heksen-1-il-acetat	-	-	-	-	-	-	-	-	0,10	1,62
6,900	1044	1042	Fenilacetaldehid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7,620	1084	1090	3-Nonanon ?	-	-	-	-	-	-	-	-	0,13	-
7,743	1091		Undecen	-	-	-	-	-	-	-	0,32	0,31	-
7,775	1092		Nonanol ?	-	-	-	-	-	-	-	0,27	-	-
7,845	1096	1100	Undekan	68,98	65,58	92,48	100,00	84,03	100,00	2,02	11,18	15,61	1,79
9,626	1203	1196	Estragol	-	-	-	-	-	-	65,49	78,38	79,72	84,77
9,698	1208		3-nonen-1-il-acetat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10,886	1292		C13 alken	-	2,30	1,99	-	-	-	-	0,37	0,31	-
10,969	1298	1300	Tridekan	-	2,30	3,73	-	-	-	0,16	0,73	1,02	0,14
11,988	1383	1376	seskviterpen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12,117	1395	1400	Tetradekan	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12,138	1396	1404	Alil-dimetoksibenzen	-	3,11	-	-	-	-	0,49	-	-	-
12,197	1402		Alil-dimetoksibenzen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12,246	1406		Osmorizol	-	17,06	-	-	-	-	27,60	6,30	0,23	1,72
12,484	1429	1419	<i>trans</i> - β -Kariofilen	22,68	-	-	-	15,97	-	-	-	0,11	0,18
12,751	1455		seskviterpen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13,090	1489	1485	Germakren D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13,101	1491	1500	Pentadecane	-	1,58	-	-	-	-	-	-	-	-
13,140	1495		seskviterpen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13,236	1505	1500	Biciklogermakren	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13,418	1525	1523	β -Seskvifelandren	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13,511	1535		seskviterpen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13,558	1540		seskviterpen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14,077	1601		Geranil-2/3-metilbutanoat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			Ukupno	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	98,9	99,8	99,9
			Monoterpeni	0,0	3,7	0,0	0,0	0,0	0,0	4,1	0,9	0,3	0,0
			Seskviterpeni	22,7	0,0	0,0	0,0	16,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,2
			Alifatični ugljovodonici	77,3	73,6	100,0	100,0	84,0	100,0	2,3	13,1	17,9	2,1
			Oksigenovana alifatična jed.	0,0	2,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,9	1,7	11,1
			Aromatična jed.	0,0	20,2	0,0	0,0	0,0	0,0	93,6	84,7	80,0	86,5

t_R [min]	KI	KI tabl.	Jedinjenje	AnC(C)005	AnC(P)006	AnC(DS)007	AnC(GS)008	AnC(L)009	AnC(P)010	AnC(K)023	AnC(DS)024	AnC(GS)025	AnC(L)026
2,039	692		3-Metilbutanal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,087	697		2-Metilbutanal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,513	744	741	3-Metil-1-butanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,545	747		2-Metil-1-butanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,826	775	774	2Z-Penten-1-ol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,988	789		3-Metil-2-butenal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3,139	803	802	Heksanal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,13
3,790	855	855	<i>trans</i> -2-Heksanal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,55
3,815	857	859	<i>cis</i> -3-Heksan-1-ol	-	0,15	0,78	-	1,205	0,26	-	-	-	0,61
3,941	867		<i>trans</i> -2-Heksan-1-ol	-	-	-	-	1,82	-	-	-	-	1,08
3,969	869	871	Heksanol	-	0,08	-	-	-	-	-	-	-	0,95
4,430	901	900	Nonan	0,05	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4,470	903	902	Heptanal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5,758	981	979	β -Pinen	1,06	0,41	1,78	0,54	-	1,06	3,05	-	-	-
6,135	1002	999	Oktanal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6,186	1005	1005	<i>cis</i> -3-Heksan-1-il-acetat	0,19	0,62	-	-	1,23	0,45	-	-	-	-
6,290	1011	1009	Heksil-acetat	-	0,15	-	-	-	-	-	-	-	-
6,336	1013		<i>trans</i> -2-Heksan-1-il-acetat	-	-	-	-	0,54	-	-	-	-	-
6,900	1044	1042	Fenilacetaldehid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7,620	1084	1090	3-Nonanon ?	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,14
7,743	1091		Undecen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7,775	1092		Nonanol ?	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7,845	1096	1100	Undekan	1,49	0,56	9,68	7,99	3,11	0,43	6,57	10,00	6,22	3,73
9,626	1203	1196	Estragol	96,94	98,03	80,46	87,36	87,52	97,80	31,59	57,58	73,30	76,62
9,698	1208		3-nonen-1-il-acetat	-	-	-	-	-	-	-	0,40	-	-
10,886	1292		C13 alken	-	-	0,54	0,46	-	-	0,40	0,61	-	0,18
10,969	1298	1300	Tridekan	0,05	-	0,93	0,83	0,26	-	0,89	1,07	0,76	0,49
11,988	1383	1376	seskviterpen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12,117	1395	1400	Tetradekan	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12,138	1396	1404	Alil-dimetoksibenzen	-	-	-	-	-	-	2,07	0,83	-	0,41
12,197	1402		Alil-dimetoksibenzen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12,246	1406		Osmorizol	-	-	2,07	2,83	4,33	-	52,74	29,07	19,73	13,86
12,484	1429	1419	<i>trans</i> - β -Kariofilen	0,07	-	-	-	-	-	-	-	-	0,11
12,751	1455		seskviterpen	-	-	0,90	-	-	-	-	-	-	-
13,090	1489	1485	Germakren D	0,03	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13,101	1491	1500	Pentadecane	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13,140	1495		seskviterpen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13,236	1505	1500	Biciklogermakren	0,05	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13,418	1525	1523	β -Seskvifelandren	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13,511	1535		seskviterpen	-	-	0,85	-	-	-	-	-	-	-
13,558	1540		seskviterpen	-	-	0,62	-	-	-	-	-	-	-
14,077	1601		Geranil-2/3-metilbutanoat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			Ukupno	99,9	100,0	98,6	100,0	100,0	100,0	97,3	99,6	100,0	99,9
			Monoterpeni	1,1	0,4	1,8	0,5	0,0	1,1	3,0	0,0	0,0	0,0
			Seskviterpeni	0,1	0,0	2,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1
			Alifatični ugljovodnici	1,6	0,6	11,1	9,3	3,4	0,4	7,9	11,7	7,0	4,4
			Oksigenovana alifatična jed.	0,2	1,0	0,8	0,0	4,8	0,7	1,4	0,8	0,0	4,6
			Aromatična jed.	96,9	98,0	82,5	90,2	91,8	97,8	86,4	87,5	93,0	90,9

t_R [min]	KI	KI tabl.	Jedinjenje	AnC(C)027	AnC(P)028	AnC(K)029	AnC(DS)030	AnC(GS)031	AnC(L)032	AnC(C)033	AnC(P)034	AnC(K)035	AnC(DS)036
2,039	692		3-Metilbutanal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,087	697		2-Metilbutanal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,513	744	741	3-Metil-1-butanol	-	0,20	-	-	-	0,10	-	0,27	-	-
2,545	747		2-Metil-1-butanol	-	0,17	-	-	-	-	-	0,24	-	-
2,826	775	774	2Z-Penten-1-ol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,988	789		3-Metil-2-butenal	-	-	-	-	-	-	-	-	1,03	-
3,139	803	802	Heksanal	-	-	-	-	-	-	-	-	1,81	-
3,790	855	855	<i>trans</i> -2-Heksenal	-	-	-	-	-	1,56	-	-	-	-
3,815	857	859	<i>cis</i> -3-Heksen-1-ol	0,15	0,62	-	-	0,87	0,71	-	0,37	-	-
3,941	867		<i>trans</i> -2-Heksen-1-ol	-	0,29	-	-	0,67	0,63	-	-	-	-
3,969	869	871	Heksanol	-	0,71	-	-	-	1,08	-	0,36	-	-
4,430	901	900	Nonan	-	-	-	-	-	0,15	-	-	-	0,42
4,470	903	902	Heptanal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5,758	981	979	β -Pinen	0,92	1,66	4,37	0,49	-	-	0,84	1,60	8,19	0,89
6,135	1002	999	Oktanal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6,186	1005	1005	<i>cis</i> -3-Heksen-1-il-acetat	0,19	0,20	-	-	0,65	-	-	0,18	-	-
6,290	1011	1009	Heksil-acetat	-	0,24	-	-	-	-	-	0,19	-	-
6,336	1013		<i>trans</i> -2-Heksen-1-il-acetat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6,900	1044	1042	Fenilacetaldehid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7,620	1084	1090	<i>3-Nonanon ?</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7,743	1091		Undecen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7,775	1092		<i>Nonanol ?</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7,845	1096	1100	Undekan	0,58	0,37	7,02	12,27	9,27	4,91	0,37	0,46	4,13	8,97
9,626	1203	1196	Estragol	95,22	95,11	10,52	48,83	67,41	75,11	95,07	95,90	8,14	79,41
9,698	1208		<i>3-nonen-1-il-acetat</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10,886	1292		<i>C13 alken</i>	-	-	-	0,62	-	0,17	-	-	-	0,47
10,969	1298	1300	Tridekan	-	-	0,93	1,10	0,86	0,53	-	-	-	0,68
11,988	1383	1376	<i>seskviterpen</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12,117	1395	1400	Tetradekan	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12,138	1396	1404	Alil-dimetoksibenzen	-	-	2,30	0,82	-	0,35	-	-	2,07	-
12,197	1402		Alil-dimetoksibenzen	-	-	-	-	-	-	-	-	0,86	-
12,246	1406		Osmorizol	2,80	0,43	73,79	35,88	20,27	14,48	3,50	0,44	73,76	8,56
12,484	1429	1419	<i>trans</i> - β -Kariofilen	0,14	-	-	-	-	0,22	0,22	-	-	-
12,751	1455		<i>seskviterpen</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13,090	1489	1485	Germakren D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13,101	1491	1500	Pentadecane	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13,140	1495		<i>seskviterpen</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13,236	1505	1500	Biciklogermakren	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13,418	1525	1523	β -Seskvifelandren	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13,511	1535		<i>seskviterpen</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13,558	1540		<i>seskviterpen</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14,077	1601		Geranil-2/3-metilbutanoat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			Ukupno	100,0	100,0	98,9	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	99,4
			Monoterpeni	0,9	1,7	4,4	0,5	0,0	0,0	0,8	1,6	8,2	0,9
			Seskviterpeni	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,2	0,0	0,0	0,0
			Alifatični ugljovodonici	0,6	0,4	7,9	14,0	10,1	5,8	0,4	0,5	4,1	10,5
			Oksigenovana alifatična jed.	0,3	2,4	1,1	0,0	2,2	4,1	0,0	1,6	2,8	0,6
			Aromatična jed.	98,0	95,5	86,6	85,5	87,7	89,9	98,6	96,3	84,8	88,0

t_R [min]	KI	KI tabl.	Jedinjenje	AnC(GS)037	AnC(L)038	AnC(C)039	AnC(P)040	AnC(DS)041	AnC(GS)042	AnC(L)043	AnC(C)044	AnC(P)045	AnC(L)070
2,039	692		3-Metilbutanal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,087	697		2-Metilbutanal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,513	744	741	3-Metil-1-butanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,545	747		2-Metil-1-butanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,826	775	774	2Z-Penten-1-ol	-	0,43	-	-	-	-	-	-	-	0,43
2,988	789		3-Metil-2-butenal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3,139	803	802	Heksanal	-	-	-	0,08	-	-	-	-	0,09	0,72
3,790	855	855	<i>trans</i> -2-Heksenal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9,69
3,815	857	859	<i>cis</i> -3-Heksen-1-ol	1,53	4,73	-	0,14	-	0,44	-	-	-	-
3,941	867		<i>trans</i> -2-Heksen-1-ol	-	9,06	-	-	-	-	-	-	-	2,54
3,969	869	871	Heksanol	-	4,86	-	0,15	-	-	-	-	-	-
4,430	901	900	Nonan	0,66	-	-	-	0,32	0,46	0,21	-	0,07	-
4,470	903	902	Heptanal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5,758	981	979	β -Pinen	1,71	-	0,88	0,76	0,71	1,22	-	1,12	0,86	-
6,135	1002	999	Oktanal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6,186	1005	1005	<i>cis</i> -3-Heksen-1-il-acetat	0,63	1,05	-	0,47	-	-	0,83	-	-	-
6,290	1011	1009	Heksil-acetat	-	0,92	-	0,36	-	-	-	-	-	-
6,336	1013		<i>trans</i> -2-Heksen-1-il-acetat	-	0,98	-	-	-	-	-	-	-	-
6,900	1044	1042	Fenilacetaldehid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7,620	1084	1090	3-Nonanon ?	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7,743	1091		Undecen	-	-	-	-	0,32	-	-	-	-	-
7,775	1092		Nonanol ?	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7,845	1096	1100	Undekan	11,99	1,70	0,23	0,38	7,28	11,99	3,00	0,43	1,23	3,07
9,626	1203	1196	Estragol	73,71	73,34	98,41	97,66	64,07	71,25	72,67	96,24	97,38	79,02
9,698	1208		3-nonen-1-il-acetat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10,886	1292		C13 alken	0,37	-	-	-	0,41	0,56	-	-	-	-
10,969	1298	1300	Tridekan	0,79	0,16	-	-	0,65	0,99	0,23	-	0,07	0,24
11,988	1383	1376	seskviterpen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12,117	1395	1400	Tetradekan	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12,138	1396	1404	Alil-dimetoksibenzen	-	-	-	-	0,36	-	0,49	-	-	-
12,197	1402		Alil-dimetoksibenzen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12,246	1406		Osmorizol	7,43	2,79	0,15	-	25,88	13,10	22,09	2,03	0,31	3,80
12,484	1429	1419	<i>trans</i> - β -Kariofilen	-	-	0,11	-	-	-	-	-	-	0,22
12,751	1455		seskviterpen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13,090	1489	1485	Germakren D	-	-	0,08	-	-	-	0,47	0,08	-	-
13,101	1491	1500	Pentadecane	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13,140	1495		seskviterpen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13,236	1505	1500	Biciklogermakren	-	-	0,15	-	-	-	-	0,12	-	-
13,418	1525	1523	β -Seskvifelandren	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13,511	1535		seskviterpen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13,558	1540		seskviterpen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14,077	1601		Geranil-2/3-metilbutanoat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			Ukupno	98,8	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	99,7
			Monoterpeni	1,7	0,0	0,9	0,8	0,7	1,2	0,0	1,1	0,9	0,0
			Seskviterpeni	0,0	0,0	0,3	0,0	0,0	0,0	0,5	0,2	0,0	0,2
			Alifatični ugljovodnici	13,8	1,9	0,2	0,4	9,0	14,0	3,4	0,4	1,4	3,3
			Oksigenovana alifatična jed.	2,8	22,0	0,0	1,2	0,0	0,4	0,8	0,0	0,1	13,4
			Aromatična jed.	81,1	76,1	98,6	97,7	90,3	84,4	95,3	98,3	97,7	82,8

t_R [min]	KI	KI tabl.	Jedinjenje	AnC(C)071	AnC(K)078	AnC(DS)079	AnC(GS)080	AnC(L)081	AnC(P)082	AnC(K)083	AnC(DS)084	AnC(GS)085	AnC(L)086
2,039	692		3-Metilbutanal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,087	697		2-Metilbutanal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,513	744	741	3-Metil-1-butanol	-	-	-	-	-	0,09	-	-	-	-
2,545	747		2-Metil-1-butanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,826	775	774	2Z-Penten-1-ol	-	-	-	-	0,44	-	-	-	-	0,33
2,988	789		3-Metil-2-butenal	-	-	-	-	-	-	7,44	-	-	-
3,139	803	802	Heksanal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3,790	855	855	<i>trans</i> -2-Heksenal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3,815	857	859	<i>cis</i> -3-Heksen-1-ol	-	-	-	2,88	4,47	-	-	-	-	3,86
3,941	867		<i>trans</i> 2-Heksen-1-ol	-	-	-	0,93	8,28	-	-	-	-	7,49
3,969	869	871	Heksanol	-	-	-	2,21	3,03	-	-	-	0,57	3,22
4,430	901	900	Nonan	-	0,41	0,76	1,10	0,29	0,18	-	0,95	1,97	0,15
4,470	903	902	Heptanal	-	-	-	-	-	-	6,28	-	-	-
5,758	981	979	β -Pinen	0,85	1,89	1,61	1,15	-	1,04	8,61	1,90	3,09	-
6,135	1002	999	Oktanal	-	-	-	-	-	-	1,98	-	-	-
6,186	1005	1005	<i>cis</i> -3-Heksen-1-il-acetat	-	-	-	4,02	13,34	0,42	-	-	6,21	7,46
6,290	1011	1009	Heksil-acetat	-	-	-	1,05	3,36	-	-	-	0,92	2,66
6,336	1013		<i>trans</i> -2-Heksen-1-il-acetat	-	-	-	-	6,70	-	-	-	-	4,80
6,900	1044	1042	Fenilacetaldehid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7,620	1084	1090	<i>3-Nonanon ?</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7,743	1091		Undecen	-	0,41	0,56	0,52	-	-	-	0,79	0,57	-
7,775	1092		<i>Nonanol ?</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7,845	1096	1100	Undekan	0,32	11,94	22,55	27,66	4,03	4,26	8,53	23,51	41,22	2,22
9,626	1203	1196	Estragol	98,63	25,73	30,30	40,43	25,00	93,67	-	30,87	15,54	50,41
9,698	1208		<i>3-nonen-1-il-acetat</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10,886	1292		<i>C13 alken</i>	-	0,50	0,73	0,46	-	-	-	0,75	0,44	-
10,969	1298	1300	Tridekan	-	0,83	1,64	1,41	-	0,14	-	1,30	1,69	0,11
11,988	1383	1376	<i>seskviterpen</i>	-	-	0,23	-	-	-	-	-	-	-
12,117	1395	1400	Tetradekan	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12,138	1396	1404	Alil-dimetoksibenzen	-	1,95	1,35	-	0,67	-	2,05	1,12	0,62	0,35
12,197	1402		Alil-dimetoksibenzen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12,246	1406		Osmorizol	0,20	55,16	39,44	15,70	29,78	0,20	62,92	37,88	25,27	16,59
12,484	1429	1419	<i>trans</i> - β -Kariofilen	-	-	-	-	0,33	-	-	-	-	0,22
12,751	1455		<i>seskviterpen</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13,090	1489	1485	Germakren D	-	-	-	-	0,30	-	-	-	-	0,12
13,101	1491	1500	Pentadecane	-	0,30	0,17	-	-	-	-	0,18	-	-
13,140	1495		<i>seskviterpen</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13,236	1505	1500	Biciklogermakren	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13,418	1525	1523	β -Seskvifelandren	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13,511	1535		<i>seskviterpen</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13,558	1540		<i>seskviterpen</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14,077	1601		Geranil-2/3-metilbutanoat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			Ukupno	100,0	99,1	99,3	99,5	100,0	100,0	97,8	99,3	98,1	100,0
			Monoterpeni	0,8	1,9	1,6	1,1	0,0	1,0	8,6	1,9	3,1	0,0
			Seskviterpeni	0,0	0,0	0,2	0,0	0,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,3
			Alifatični ugljovodonici	0,3	14,4	26,4	31,1	4,3	4,6	8,5	27,5	45,9	2,5
			Oksigenovana alifatična jed.	0,0	0,9	0,7	11,6	39,6	0,5	15,7	0,7	8,2	29,8
			Aromatična jed.	98,8	82,8	71,1	56,1	55,4	93,9	65,0	69,9	41,4	67,4

t_R [min]	KI	KI tabl.	Jedinjenje	AnC(P)087	AnC(K)088	AnC(DS)089	AnC(GS)090	AnC(L)091	AnC(K)093	AnC(DS)094	AnC(GS)095	AnC(L)096	AnC(P)097
2,039	692		3-Metilbutanal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,087	697		2-Metilbutanal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,513	744	741	3-Metil-1-butanol	0,12	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,545	747		2-Metil-1-butanol	0,09	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,826	775	774	2Z-Penten-1-ol	-	-	-	-	0,53	-	-	-	-	-
2,988	789		3-Metil-2-butenal	-	-	1,50	-	-	1,27	-	-	-	-
3,139	803	802	Heksanal	-	-	1,11	-	-	0,74	-	-	-	6,50
3,790	855	855	<i>trans</i> -2-Heksenal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3,815	857	859	<i>cis</i> -3-Heksen-1-ol	-	-	-	-	9,74	-	-	-	12,47	-
3,941	867		<i>trans</i> 2-Heksen-1-ol	-	-	-	-	11,82	-	-	-	5,75	-
3,969	869	871	Heksanol	-	-	-	-	2,97	-	-	-	3,28	-
4,430	901	900	Nonan	-	0,23	1,47	1,92	0,33	-	1,04	-	0,33	-
4,470	903	902	Heptanal	-	-	-	-	-	2,15	-	-	-	-
5,758	981	979	β -Pinen	1,33	1,91	4,89	1,35	-	17,36	7,61	7,06	-	13,42
6,135	1002	999	Oktanal	-	-	-	-	-	0,99	-	-	-	-
6,186	1005	1005	<i>cis</i> -3-Heksen-1-il-acetat	0,54	-	-	-	1,31	-	-	-	2,18	-
6,290	1011	1009	Heksil-acetat	-	-	-	-	-	-	-	-	0,44	-
6,336	1013		<i>trans</i> -2-Heksen-1-il-acetat	-	-	-	-	0,52	-	-	-	0,35	-
6,900	1044	1042	Fenilacetaldehid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7,620	1084	1090	3-Nonanon ?	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7,743	1091		Undecen	-	0,37	1,58	1,90	-	-	0,92	-	0,36	-
7,775	1092		Nonanol ?	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7,845	1096	1100	Undekan	2,07	9,00	43,12	75,40	5,35	6,23	26,84	56,92	5,56	59,62
9,626	1203	1196	Estragol	95,67	45,57	35,81	5,04	63,73	3,08	32,37	9,99	63,55	20,45
9,698	1208		3-nonen-1-il-acetat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10,886	1292		C13 alken	-	0,62	2,28	3,77	-	-	1,44	2,11	0,30	-
10,969	1298	1300	Tridekan	-	0,82	3,26	7,34	0,58	-	2,16	4,08	0,54	-
11,988	1383	1376	<i>seskviterpen</i>	-	-	-	-	-	0,74	0,59	-	-	-
12,117	1395	1400	Tetradekan	-	-	-	1,35	-	-	-	-	-	-
12,138	1396	1404	Alil-dimetoksibenzen	-	2,05	-	-	-	3,31	2,69	2,66	-	-
12,197	1402		Alil-dimetoksibenzen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12,246	1406		Osmorizol	0,18	37,28	2,82	-	1,21	64,13	21,80	15,54	2,93	-
12,484	1429	1419	<i>trans</i> - β -Kariofilen	-	-	-	-	0,52	-	-	-	0,47	-
12,751	1455		<i>seskviterpen</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13,090	1489	1485	Germakren D	-	-	-	-	0,83	-	-	-	0,82	-
13,101	1491	1500	Pentadecane	-	0,56	1,09	1,93	-	-	0,89	1,63	-	-
13,140	1495		<i>seskviterpen</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13,236	1505	1500	Biciklogermakren	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13,418	1525	1523	β -Seskvifelandren	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13,511	1535		<i>seskviterpen</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13,558	1540		<i>seskviterpen</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14,077	1601		Geranil-2/3-metilbutanoat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			Ukupno	100,0	98,4	98,9	100,0	99,4	100,0	98,3	100,0	99,3	100,0
			Monoterpeni	1,3	1,9	4,9	1,4	0,0	17,4	7,6	7,1	0,0	13,4
			Seskviterpeni	0,0	0,0	0,0	0,0	1,4	0,7	0,6	0,0	1,3	0,0
			Alifatični ugljovodnici	2,1	11,6	52,8	93,6	6,3	6,2	33,3	64,7	7,1	59,6
			Oksigenovana alifatična jed.	0,7	1,3	3,7	0,0	27,4	5,1	1,7	0,0	25,1	6,5
			Aromatična jed.	95,9	84,9	38,6	5,0	64,9	70,5	56,9	28,2	66,5	20,5

t_R [min]	KI	KI tabl.	Jedinjenje	AnC(K)098	AnC(DS)099	AnC(GS)100	AnC(L)101	AnC(P)102	AnC(P)191
2,039	692		3-Metilbutanal	-	-	-	-	-	0,38
2,087	697		2-Metilbutanal	-	-	-	-	-	0,26
2,513	744	741	3-Metil-1-butanol	-	-	-	-	-	-
2,545	747		2-Metil-1-butanol	-	-	-	-	-	-
2,826	775	774	2Z-Penten-1-ol	-	-	-	-	-	-
2,988	789		3-Metil-2-butenal	-	-	-	-	-	-
3,139	803	802	Heksanal	-	-	-	-	7,50	-
3,790	855	855	<i>trans</i> -2-Heksenal	-	-	-	-	-	-
3,815	857	859	<i>cis</i> -3-Heksen-1-ol	-	-	-	26,11	-	1,09
3,941	867		<i>trans</i> -2-Heksen-1-ol	-	-	-	36,13	-	0,16
3,969	869	871	Heksanol	-	-	-	-	-	-
4,430	901	900	Nonan	0,45	0,74	2,22	0,64	-	-
4,470	903	902	Heptanal	-	-	-	-	-	-
5,758	981	979	β -Pinen	5,26	1,80	2,36	-	10,05	0,61
6,135	1002	999	Oktanal	-	-	-	-	-	-
6,186	1005	1005	<i>cis</i> -3-Heksen-1-il-acetat	-	-	-	3,49	-	0,38
6,290	1011	1009	Heksil-acetat	-	-	-	0,89	-	-
6,336	1013		<i>trans</i> -2-Heksen-1-il-acetat	-	-	-	1,24	-	-
6,900	1044	1042	Fenilacetaldehid	-	-	-	-	-	-
7,620	1084	1090	<i>3-Nonanon ?</i>	-	-	-	-	-	-
7,743	1091		Undecen	-	0,87	-	-	-	-
7,775	1092		<i>Nonanol ?</i>	-	-	-	-	-	-
7,845	1096	1100	Undekan	11,70	24,40	79,90	7,18	70,33	6,93
9,626	1203	1196	Estragol	13,71	49,51	5,86	19,09	12,11	89,88
9,698	1208		<i>3-nonen-1-il-acetat</i>	-	-	-	-	-	-
10,886	1292		<i>C13 alken</i>	0,51	1,44	2,16	-	-	-
10,969	1298	1300	Tridekan	0,76	2,15	5,54	0,72	-	-
11,988	1383	1376	<i>seskviterpen</i>	-	-	-	-	-	-
12,117	1395	1400	Tetradekan	-	-	-	-	-	-
12,138	1396	1404	Alil-dimetoksibenzen	3,62	2,84	-	-	-	-
12,197	1402		Alil-dimetoksibenzen	-	-	-	-	-	-
12,246	1406		Osmorizol	62,64	14,30	1,96	1,82	-	-
12,484	1429	1419	<i>trans</i> - β -Kariofilen	-	-	-	-	-	-
12,751	1455		<i>seskviterpen</i>	-	-	-	-	-	-
13,090	1489	1485	Germakren D	0,49	-	-	-	-	-
13,101	1491	1500	Pentadecane	-	0,87	-	0,79	-	-
13,140	1495		<i>seskviterpen</i>	-	-	-	-	-	-
13,236	1505	1500	Biciklogermakren	-	-	-	-	-	-
13,418	1525	1523	β -Seskvifelandren	-	-	-	-	-	-
13,511	1535		<i>seskviterpen</i>	-	-	-	-	-	-
13,558	1540		<i>seskviterpen</i>	-	-	-	-	-	-
14,077	1601		Geranil-2/3-metilbutanoat	-	-	-	-	-	-
Ukupno				99,1	98,9	100,0	98,1	100,0	99,7
Monoterpeni				5,3	1,8	2,4	0,0	10,1	0,6
Seskviterpeni				0,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Alifatični ugljovodonici				13,4	30,5	89,8	9,3	70,3	6,9
Oksigenovana alifatična jed.				0,9	1,1	0,0	68,9	7,5	2,3
Aromatična jed.				80,0	66,7	7,8	20,9	12,1	89,9

Rezultati headspace-GC-MS analize *Anthriscus sylvestris*.

t_R	KI	KI tabl	Jedinjenje	Ans(K)018	Ans(DS)019	Ans(GS)020	Ans(L)021	Ans(C)022	Ans(K)046	Ans(DS)047	Ans(GS)048	Ans(L)049	Ans(C)050
1,630	641	740	Dimetil-sulfid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1,677	647		Ugljen-disulfid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1,702	650		2-Metilpropanal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,039	692		3-Metilbutanal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,087	697		2-Metilbutanal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,168	707		1-Penten-3-ol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,200	710		1-Penten-3-on	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,274	718	700	Heptan	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,297	721		2-Etilfuran	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,513	744	741	3-Metil-1-butanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,545	747		2-Metil-1-butanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,826	775	774	2Z-Pentenol	-	-	-	-	-	-	-	-	0,56	-
3,129	802	800	Oktan	2,61	1,07	1,16	0,94	0,31	1,47	1,64	1,28	0,56	-
3,139	803	802	Heksanal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3,430	827		Metil-angelat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3,790	855	855	<i>trans</i> -2-Heksanal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3,815	857	859	<i>cis</i> -3-Heksen-1-ol	-	-	0,93	7,44	-	-	-	5,83	19,88	-
3,941	867		<i>trans</i> -2-Heksen-1-ol	-	-	-	21,72	-	-	-	-	20,77	-
3,969	869	871	Heksanol	-	-	2,73	14,80	-	-	-	6,59	9,38	-
4,409	899		Nonen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4,430	901	900	Nonan	19,71	16,81	10,23	7,32	2,60	20,71	19,07	12,95	6,70	3,36
4,905	931	930	α -Tujen	0,29	-	-	-	0,23	0,20	-	-	-	-
5,034	939	939	α -Pinen	14,11	17,79	4,44	1,47	1,82	16,59	9,47	3,89	1,74	0,88
5,290	954	954	Kamfen	0,57	-	-	-	-	0,65	-	-	-	-
5,575	971		<i>izomer dekana</i>	0,49	0,53	-	-	-	0,41	-	-	-	-
5,615	973		<i>monoterpen</i>	2,33	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5,683	977	975	Sabinen	28,74	40,09	60,63	36,93	64,38	12,21	35,06	48,71	22,25	50,79
5,758	981	979	β -Pinen	0,55	0,79	-	-	2,39	0,42	-	-	-	-
5,933	991	991	β -Miracen	2,09	3,70	10,28	0,98	16,52	1,70	-	0,86	0,37	-
6,066	999	1000	Dekan	0,53	-	-	-	-	0,25	-	-	-	-
6,135	1002	999	Oktanal	0,14	-	-	-	-	0,24	-	-	-	-
6,186	1005	1005	<i>cis</i> -3-Heksen-1-il-acetat	-	-	-	1,58	-	-	-	-	6,09	-
6,209	1006	1003	α -Felandren	0,85	0,63	-	-	-	-	-	-	-	-
6,290	1011	1009	Heksil-acetat	-	-	-	1,54	-	-	-	-	1,21	-
6,316	1012	1010	<i>monoterpen</i>	3,29	2,85	1,21	-	0,47	-	-	-	-	-
6,336	1013		<i>trans</i> -2-Heksen-1-il-acetat	-	-	-	0,88	-	-	-	-	1,23	-
6,421	1018	1017	α -Terpinen	0,38	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6,560	1026	1026	<i>o</i> -/ <i>p</i> -cimen	0,91	-	-	-	-	0,19	-	-	-	2,46
6,640	1030	1029	Limonen*	-	-	-	-	-	42,97	34,76	15,43	5,82	3,31
6,657	1031	1030	β -Felandren	9,55	7,21	4,05	1,00	1,78	-	-	-	-	-
6,748	1036	1037	Z- β -Ocimen	-	3,57	-	-	0,91	-	-	-	-	-
6,941	1046	1050	<i>E</i> - β -Ocimen	5,38	2,77	2,09	1,74	5,68	-	-	-	1,50	24,61
7,167	1059	1060	γ -Terpinen	2,19	-	-	-	-	0,27	-	-	-	6,47
7,709	1089	1089	α -Terpinolen	0,48	-	-	-	-	-	-	-	-	0,54
7,845	1096	1100	Undekan	0,88	0,64	-	0,56	0,50	0,62	-	1,10	1,06	1,25
10,969	1298	1300	Tridekan	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11,988	1383	1376	α -Kopaen ?	-	-	1,41	-	-	-	-	1,19	-	-
12,028	1386		<i>seskviterpen</i>	0,15	-	-	-	-	-	-	-	-	-

t_R	KI	KI tabl	Jedinjenje	AnS(K)018	AnS(DS)019	AnS(GS)020	AnS(L)021	AnS(C)022	AnS(K)046	AnS(DS)047	AnS(GS)048	AnS(L)049	AnS(C)050
12,114	1394		<i>seskviterpen</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12,132	1396	1388	β -Kubeben	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12,484	1429	1419	<i>trans</i> - β -Kariofilen	-	-	-	-	-	-	-	-	0,53	1,53
12,570	1437		<i>seskviterpen</i>	0,18	0,34	0,85	-	0,13	-	-	0,91	-	-
12,727	1452		<i>izomer farnezena</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13,085	1489		<i>izomer farnezena</i>	-	-	-	1,12	-	-	-	-	-	-
13,090	1489	1485	Germakren D	0,85	-	-	-	1,13	-	-	-	0,37	2,87
13,148	1495		<i>seskviterpen</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13,217	1503	1506	<i>E,E</i> - α -Farnezen	-	-	-	-	0,52	-	-	-	-	1,93
13,233	1504	1500	α -Muurolen ?	0,24	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13,236	1505	1500	Biciklogermakren	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13,268	1508	1506	β -Bisabolen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13,290	1511	1515	<i>Z</i> - γ -Bisabolen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13,381	1521		<i>seskviterpen</i>	0,88	0,53	-	-	-	-	-	-	-	-
13,441	1527	1523	δ -Kadinen	0,32	0,71	-	-	0,22	-	-	-	-	-
13,949	1585		<i>seskviterpen</i>	0,16	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			Ukupno	98,8	100,0	100,0	100,0	99,6	98,9	100,0	98,7	100,0	100,0
			Monoterpeni	71,7	79,4	82,7	42,1	94,2	75,2	79,3	68,9	31,7	89,1
			Seskviterpeni	3,0	1,6	2,3	1,1	2,0	0,0	0,0	2,1	0,9	6,3
			Alifatični ugljovodonici	24,2	19,0	11,4	8,8	3,4	23,5	20,7	15,3	8,3	4,6
			Oksigenovana alifatična jed.	0,1	0,0	3,7	47,9	0,0	0,2	0,0	12,4	59,1	0,0
			Aromatična jed.	0,3	0,0	0,0	0,0	0,4	0,6	0,0	0,0	0,0	0,0

* U velikom broju slučajeva, pikovi limonena i β -felandrena su preklopljeni i nije ih moguće zasebno integrisati. U takvim slučajevima, ukupna površina pika data je kod zastupljenijeg jedinjenja.

t_R	KI	KI tabl	Jedinjenje	AnS(P)051	AnS(K)052	AnS(DS)053	AnS(GS)054	AnS(L)055	AnS(C)056	AnS(P)057	AnS(K)058	AnS(DS)059	AnS(GS)060
1,630	641	740	Dimetil-sulfid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1,677	647		Ugljen-disulfid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1,702	650		2-Metilpropanal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,039	692		3-Metilbutanal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,087	697		2-Metilbutanal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,168	707		1-Penten-3-ol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,200	710		1-Penten-3-on	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,274	718	700	Heptan	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,297	721		2-Etilfuran	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,513	744	741	3-Metil-1-butanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,545	747		2-Metil-1-butanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,826	775	774	2Z-Pentenol	-	-	-	-	0,30	-	-	-	-	-
3,129	802	800	Oktan	-	3,21	2,78	1,87	1,59	0,70	-	6,06	4,03	3,90
3,139	803	802	Heksanal	-	-	-	-	-	-	0,68	-	-	-
3,430	827		Metil-angelat	0,47	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3,790	855	855	<i>trans</i> -2-Heksanal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3,815	857	859	<i>cis</i> -3-Heksen-1-ol	-	-	-	1,63	8,22	-	-	-	-	3,25
3,941	867		<i>trans</i> -2-Heksen-1-ol	-	-	-	-	12,60	-	-	-	-	-
3,969	869	871	Heksanol	-	-	-	-	7,30	-	-	-	-	-
4,409	899		Nonen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4,430	901	900	Nonan	1,21	40,89	36,64	27,11	23,33	9,47	3,54	51,22	41,52	32,12
4,905	931	930	α -Tujen	-	0,15	-	-	-	-	-	-	-	-
5,034	939	939	α -Pinen	0,69	12,32	7,92	5,13	3,97	1,76	-	10,75	3,76	4,38
5,290	954	954	Kamfen	-	0,26	-	-	-	-	-	0,21	-	-
5,575	971		<i>izomer dekana</i>	-	0,33	-	-	-	-	-	0,47	-	-
5,615	973		<i>monoterpen</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5,683	977	975	Sabinen	50,72	12,61	40,36	49,10	31,01	59,77	36,69	15,75	48,57	54,36
5,758	981	979	β -Pinen	-	0,32	-	-	0,32	0,53	-	0,26	-	-
5,933	991	991	β -Mircen	0,59	0,92	2,04	5,58	0,88	7,33	15,85	1,07	-	-
6,066	999	1000	Dekan	-	0,64	-	-	0,25	-	-	1,85	-	-
6,135	1002	999	Oktanal	-	0,21	-	-	-	-	-	0,25	-	-
6,186	1005	1005	<i>cis</i> -3-Heksen-1-il-acetat	-	-	-	-	2,84	-	-	-	-	-
6,209	1006	1003	α -Felandren	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6,290	1011	1009	Heksil-acetat	-	-	-	-	1,11	-	-	-	-	-
6,316	1012	1010	<i>monoterpen</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6,336	1013		<i>trans</i> -2-Heksen-1-il-acetat	-	-	-	-	0,90	-	-	-	-	-
6,421	1018	1017	α -Terpinen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6,560	1026	1026	<i>o</i> -/ <i>p</i> -cimen	5,69	0,20	-	-	-	-	-	1,85	-	-
6,640	1030	1029	Limonen	2,54	1,97	1,40	0,92	0,84	0,74	-	2,48	-	-
6,657	1031	1030	β -Felandren	-	2,38	-	-	-	-	-	-	-	-
6,748	1036	1037	Z- β -Ocimen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6,941	1046	1050	E- β -Ocimen	23,27	19,42	7,82	3,88	3,01	9,19	37,14	-	-	-
7,167	1059	1060	γ -Terpinen	8,08	0,23	-	-	-	-	-	1,98	-	-
7,709	1089	1089	α -Terpinolen	0,94	0,17	-	-	-	-	1,18	-	-	-
7,845	1096	1100	Undekan	-	1,66	1,05	0,89	1,25	1,08	0,65	2,89	2,13	2,00
10,969	1298	1300	Tridekan	-	-	-	0,50	-	-	-	-	-	-
11,988	1383	1376	α -Kopaen ?	-	-	-	-	-	-	-	0,17	-	-
12,028	1386		<i>seskviterpen</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

t_R	KI	KI tabl	Jedinjenje	AnS(P)051	AnS(K)052	AnS(DS)053	AnS(GS)054	AnS(L)055	AnS(C)056	AnS(P)057	AnS(K)058	AnS(DS)059	AnS(GS)060
12,114	1394	1388	<i>seskviterpen</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12,132	1396	1388	β -Kubeben	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12,484	1429	1419	<i>trans</i> - β -Kariofilen	-	-	-	-	-	0,78	-	-	-	-
12,570	1437		<i>seskviterpen</i>	-	-	-	0,48	-	-	-	0,35	-	-
12,727	1452		<i>izomer farnezena</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13,085	1489		<i>izomer farnezena</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13,090	1489	1485	Germakren D	-	-	-	-	-	5,49	-	0,31	-	-
13,148	1495		<i>seskviterpen</i>	-	0,62	-	-	-	-	-	0,60	-	-
13,217	1503	1506	<i>E,E</i> - α -Farnezen	5,81	-	-	-	-	1,48	3,51	-	-	-
13,233	1504	1500	α -Muurolen ?	-	-	-	-	-	-	-	0,66	-	-
13,236	1505	1500	Biciklogermakren	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13,268	1508	1506	β -Bisabolen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13,290	1511	1515	<i>Z</i> - γ -Bisabolen	-	0,62	-	-	-	-	-	-	-	-
13,381	1521		<i>seskviterpen</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13,441	1527	1523	δ -Kadinen	-	0,59	-	-	-	0,51	-	0,50	-	-
13,949	1585		<i>seskviterpen</i>	-	-	-	0,40	-	1,18	0,76	0,32	-	-
			Ukupno	100,0	99,7	100,0	97,5	99,7	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
			Monoterpeni	92,5	50,9	59,5	64,6	40,0	79,3	90,9	34,4	52,3	58,7
			Seskviterpeni	5,8	1,8	0,0	0,9	0,0	9,4	4,3	2,9	0,0	0,0
			Alifatični ugljovodonici	1,2	47,0	40,5	30,4	26,4	11,3	4,2	62,5	47,7	38,0
			Oksigenovana alifatična jed.	0,5	0,2	0,0	1,6	33,3	0,0	0,7	0,3	0,0	3,2
			Aromatična jed.	0,0	0,0	0,0	0,0	0,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

t_R	KI	KI tabl	Jedinjenje	AnS(L)061	AnS(K)073	AnS(DS)074	AnS(GS)076	AnS(L)076	AnS(C)077	AnS(P?)078	AnS(K)120	AnS(DS)121	AnS(GS)122
1,630	641	740	Dimetil-sulfid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1,677	647		Ugljen-disulfid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1,702	650		2-Metilpropanal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,039	692		3-Metilbutanal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,087	697		2-Metilbutanal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,168	707		1-Penten-3-ol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,200	710		1-Penten-3-on	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,274	718	700	Heptan	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,297	721		2-Etilfuran	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,513	744	741	3-Metil-1-butanol	-	-	-	-	0,70	0,25	-	-	-	-
2,545	747		2-Metil-1-butanol	-	-	-	-	0,42	-	-	-	-	-
2,826	775	774	2Z-Pentenol	0,55	-	-	-	0,87	-	-	-	-	-
3,129	802	800	Oktan	-	2,34	2,83	2,45	1,76	0,39	-	1,65	2,65	1,68
3,139	803	802	Heksanal	2,01	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3,430	827		Metil-angelat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3,790	855	855	<i>trans</i> -2-Heksanal	4,81	-	-	-	4,64	-	-	-	-	-
3,815	857	859	<i>cis</i> -3-Heksen-1-ol	10,71	-	-	1,47	7,54	-	1,94	-	-	-
3,941	867		<i>trans</i> -2-Heksen-1-ol	14,11	-	-	-	20,10	-	0,34	-	-	-
3,969	869	871	Heksanol	17,18	-	-	2,64	12,29	-	1,79	-	-	-
4,409	899		Nonen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4,430	901	900	Nonan	16,42	34,41	32,33	26,45	13,18	4,03	2,50	27,42	30,67	22,01
4,905	931	930	α -Tujen	-	0,24	-	-	-	-	-	-	-	-
5,034	939	939	α -Pinen	2,47	12,28	8,44	4,97	2,10	1,04	0,50	3,23	3,87	1,81
5,290	954	954	Kamfen	-	0,29	-	-	-	-	-	-	0,19	-
5,575	971		<i>izomer dekana</i>	-	0,36	-	-	-	-	-	0,54	0,65	-
5,615	973		<i>monoterpen</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5,683	977	975	Sabinen	25,62	26,08	41,60	49,05	26,57	30,45	40,76	17,85	10,73	37,51
5,758	981	979	β -Pinen	-	0,39	-	-	-	-	-	-	-	-
5,933	991	991	β -Mircen	0,42	1,40	1,20	1,47	0,54	0,63	0,65	0,98	0,92	0,99
6,066	999	1000	Dekan	0,29	0,72	0,63	-	-	-	-	0,41	0,53	-
6,135	1002	999	Oktanal	-	-	-	-	-	-	-	-	0,30	-
6,186	1005	1005	<i>cis</i> -3-Heksen-1-il-acetat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6,209	1006	1003	α -Felandren	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6,290	1011	1009	Heksil-acetat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6,316	1012	1010	<i>monoterpen</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6,336	1013		<i>trans</i> -2-Heksen-1-il-acetat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6,421	1018	1017	α -Terpinen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6,560	1026	1026	<i>o</i> -/ <i>p</i> -cimen	0,37	0,32	-	-	-	2,61	0,90	-	0,32	-
6,640	1030	1029	Limonen	0,53	2,85	2,25	2,15	0,81	1,03	-	42,01	43,95	33,74
6,657	1031	1030	β -Felandren	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6,748	1036	1037	Z- β -Ocimen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6,941	1046	1050	<i>E</i> - β -Ocimen	2,94	9,96	6,51	2,72	5,32	38,16	43,08	3,51	2,57	1,50
7,167	1059	1060	γ -Terpinen	0,36	2,76	1,68	-	0,46	8,66	3,35	0,36	0,32	-
7,709	1089	1089	α -Terpinolen	-	-	-	-	-	-	0,82	-	-	-
7,845	1096	1100	Undekan	1,22	2,91	1,95	1,51	1,71	1,59	0,46	1,65	1,62	0,76
10,969	1298	1300	Tridekan	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11,988	1383	1376	α -Kopaen ?	-	-	-	1,84	-	-	-	-	-	-
12,028	1386		<i>seskviterpen</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

t_R	KI	KI tabl	Jedinjenje	AnS(L)061	AnS(K)073	AnS(DS)074	AnS(GS)076	AnS(L)076	AnS(C)077	AnS(P?)078	AnS(K)120	AnS(DS)121	AnS(GS)122
12,114	1394		<i>seskviterpen</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12,132	1396	1388	β -Kubeben	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12,484	1429	1419	<i>trans</i> - β -Kariofilen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12,570	1437		<i>seskviterpen</i>	-	-	-	1,35	-	-	-	-	-	-
12,727	1452		<i>izomer farnezena</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13,085	1489		<i>izomer farnezena</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13,090	1489	1485	Germakren D	-	0,26	-	-	0,42	7,27	-	-	-	-
13,148	1495		<i>seskviterpen</i>	-	0,52	-	-	-	-	-	-	-	-
13,217	1503	1506	<i>E,E</i> - α -Farnezen	-	-	-	-	0,58	2,99	2,91	-	-	-
13,233	1504	1500	α -Muurolen ?	-	0,56	-	1,14	-	-	-	0,21	0,12	-
13,236	1505	1500	Biciklogermakren	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13,268	1508	1506	β -Bisabolen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13,290	1511	1515	<i>Z</i> - γ -Bisabolen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13,381	1521		<i>seskviterpen</i>	-	0,18	-	-	-	-	-	-	-	-
13,441	1527	1523	δ -Kadinen	-	0,57	0,57	0,82	-	0,35	-	0,20	0,14	-
13,949	1585		<i>seskviterpen</i>	-	0,26	-	-	-	0,56	-	-	-	-
			Ukupno	100,0	99,7	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	99,5	100,0
			Monoterpeni	32,7	56,6	61,7	60,4	35,8	82,6	90,1	67,9	62,9	75,5
			Seskviterpeni	0,0	2,4	0,6	5,1	1,0	11,2	2,9	0,4	0,3	0,0
			Alifatični ugljovodonici	17,9	40,7	37,7	30,4	16,7	6,0	3,0	31,7	36,4	24,5
			Oksigenovana alifatična jed.	49,4	0,0	0,0	4,1	46,6	0,3	4,1	0,0	0,3	0,0
			Aromatična jed.	0,0	0,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,0

t_R	KI	KI tabl	Jedinjenje	AnS(L)123	AnS(P)124	AnS(K)125	AnS(DS)126	AnS(GS)127	AnS(L)128	AnS(P)129	AnS(K)130	AnS(DS)131	AnS(GS)132
1,630	641	740	Dimetil-sulfid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1,677	647		Ugljen-disulfid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1,702	650		2-Metilpropanal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,039	692		3-Metilbutanal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,087	697		2-Metilbutanal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,168	707		1-Penten-3-ol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,200	710		1-Penten-3-on	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,274	718	700	Heptan	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,297	721		2-Etilfuran	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,513	744	741	3-Metil-1-butanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,545	747		2-Metil-1-butanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,826	775	774	2Z-Pentenol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3,129	802	800	Oktan	-	-	3,73	6,74	3,44	2,73	-	1,93	1,90	1,14
3,139	803	802	Heksanal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3,430	827		Metil-angelat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3,790	855	855	<i>trans</i> -2-Heksanal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3,815	857	859	<i>cis</i> -3-Heksen-1-ol	-	-	-	-	1,56	14,37	-	-	-	-
3,941	867		<i>trans</i> -2-Heksen-1-ol	-	-	-	-	-	5,66	-	-	-	-
3,969	869	871	Heksanol	-	-	-	-	-	13,52	-	-	-	-
4,409	899		Nonen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4,430	901	900	Nonan	17,45	3,20	44,32	67,81	51,08	47,65	10,34	25,10	27,56	23,49
4,905	931	930	α -Tujen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5,034	939	939	α -Pinen	-	-	7,37	5,24	1,75	-	-	5,70	3,58	2,33
5,290	954	954	Kamfen	-	-	0,56	-	-	-	-	0,22	-	-
5,575	971		<i>izomer dekana</i>	-	-	0,34	-	-	-	-	0,28	-	-
5,615	973		<i>monoterpen</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5,683	977	975	Sabinen	56,05	34,52	9,06	2,00	-	-	-	17,02	26,76	38,08
5,758	981	979	β -Pinen	-	-	-	-	-	-	-	0,17	-	-
5,933	991	991	β -Mircen	2,22	7,26	1,79	3,53	20,48	-	24,66	1,00	1,77	7,74
6,066	999	1000	Dekan	-	-	0,92	-	-	-	-	0,42	-	-
6,135	1002	999	Oktanal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6,186	1005	1005	<i>cis</i> -3-Heksen-1-il-acetat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6,209	1006	1003	α -Felandren	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6,290	1011	1009	Heksil-acetat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6,316	1012	1010	<i>monoterpen</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6,336	1013		<i>trans</i> -2-Heksen-1-il-acetat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6,421	1018	1017	α -Terpinen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6,560	1026	1026	<i>o</i> -/ <i>p</i> -cimen	-	-	0,62	-	-	-	1,64	-	-	-
6,640	1030	1029	Limonen	24,28	4,25	2,57	-	-	-	-	40,16	36,05	21,20
6,657	1031	1030	β -Felandren	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6,748	1036	1037	Z- β -Ocimen	-	-	17,17	10,09	4,52	-	20,60	-	-	-
6,941	1046	1050	<i>E</i> - β -Ocimen	-	33,55	3,73	2,21	3,73	3,33	18,38	5,23	1,53	1,39
7,167	1059	1060	γ -Terpinen	-	-	2,51	-	-	-	6,65	0,49	-	-
7,709	1089	1089	α -Terpinolen	-	2,52	-	-	-	-	2,38	-	-	-
7,845	1096	1100	Undekan	-	-	3,11	2,38	2,78	2,94	1,37	1,43	0,86	1,41
10,969	1298	1300	Tridekan	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11,988	1383	1376	α -Kopaen ?	-	-	-	-	3,78	-	-	-	-	2,15
12,028	1386		<i>seskviterpen</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

t_R	KI	KI tabl	Jedinjenje	AnS(L)123	AnS(P)124	AnS(K)125	AnS(DS)126	AnS(GS)127	AnS(L)128	AnS(P)129	AnS(K)130	AnS(DS)131	AnS(GS)132
12,114	1394		<i>seskviterpen</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12,132	1396	1388	β -Kubeben	-	-	-	-	-	2,71	-	-	-	-
12,484	1429	1419	<i>trans</i> - β -Kariofilen	-	-	-	-	-	1,80	-	-	-	-
12,570	1437		<i>seskviterpen</i>	-	-	-	-	3,07	-	-	-	-	1,08
12,727	1452		<i>izomer farnezena</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13,085	1489		<i>izomer farnezena</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13,090	1489	1485	Germakren D	-	-	-	-	-	2,57	-	-	-	-
13,148	1495		<i>seskviterpen</i>	-	-	0,60	-	-	-	-	0,18	-	-
13,217	1503	1506	<i>E,E</i> - α -Farnezen	-	14,69	-	-	-	2,72	13,99	-	-	-
13,233	1504	1500	α -Muurolen ?	-	-	0,66	-	2,04	-	-	0,22	-	-
13,236	1505	1500	Biciklogermakren	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13,268	1508	1506	β -Bisabolen	-	-	0,47	-	-	-	-	0,19	-	-
13,290	1511	1515	<i>Z</i> - γ -Bisabolen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13,381	1521		<i>seskviterpen</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13,441	1527	1523	δ -Kadinen	-	-	0,47	-	1,78	-	-	0,15	-	-
13,949	1585		<i>seskviterpen</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			Ukupno	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	99,9	100,0	100,0
			Monoterpeni	82,5	82,1	45,4	23,1	30,5	3,3	74,3	70,0	69,7	70,7
			Seskviterpeni	0,0	14,7	2,2	0,0	10,7	9,8	14,0	0,7	0,0	3,2
			Alifatični ugljovodonici	17,5	3,2	52,4	76,9	57,3	53,3	11,7	29,3	30,3	26,0
			Oksigenovana alifatična jed.	0,0	0,0	0,0	0,0	1,6	33,5	0,0	0,0	0,0	0,0
			Aromatična jed.	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

t_R	KI	KI tabl	Jedinjenje	AnS(L)133	AnS(P)134	AnS(K)103	AnS(DS)104	AnS(GS)105	AnS(L)106	AnS(C)107	AnS(P)108	AnS(K)109	AnS(DS)110
1,630	641	740	Dimetil-sulfid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1,677	647		Ugilen-disulfid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1,702	650		2-Metilpropanal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,039	692		3-Metilbutanal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,087	697		2-Metilbutanal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,168	707		1-Penten-3-ol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,200	710		1-Penten-3-on	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,274	718	700	Heptan	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,297	721		2-Etilfuran	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,513	744	741	3-Metil-1-butanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,545	747		2-Metil-1-butanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,826	775	774	2Z-Pentenol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3,129	802	800	Oktan	1,16	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3,139	803	802	Heksanal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3,430	827		Metil-angelat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3,790	855	855	<i>trans</i> -2-Heksenal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3,815	857	859	<i>cis</i> -3-Heksen-1-ol	15,01	-	-	-	7,38	-	-	-	-	-
3,941	867		<i>trans</i> -2-Heksen-1-ol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3,969	869	871	Heksanol	15,15	-	-	-	3,83	-	-	-	-	-
4,409	899		Nonen	-	-	0,18	-	-	-	-	-	0,20	-
4,430	901	900	Nonan	19,81	1,21	-	-	-	-	-	-	-	-
4,905	931	930	α -Tujen	-	-	0,17	-	-	-	-	-	-	-
5,034	939	939	α -Pinen	-	-	8,63	5,99	2,90	-	1,09	0,68	9,75	5,09
5,290	954	954	Kamfen	-	-	0,26	-	-	-	-	-	-	-
5,575	971		<i>izomer dekana</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5,615	973		<i>monoterpen</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5,683	977	975	Sabinen	10,53	27,84	12,37	32,82	34,16	17,64	10,40	3,44	24,00	33,62
5,758	981	979	β -Pinen	-	-	0,50	-	-	-	-	-	0,54	-
5,933	991	991	β -Mircen	-	24,44	47,11	36,18	37,66	21,92	17,74	48,25	26,37	30,77
6,066	999	1000	Dekan	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6,135	1002	999	Oktanal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6,186	1005	1005	<i>cis</i> -3-Heksen-1-il-acetat	1,31	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6,209	1006	1003	α -Felandren	-	-	0,58	-	-	-	-	-	0,61	-
6,290	1011	1009	Heksil-acetat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6,316	1012	1010	<i>monoterpen</i>	-	-	2,01	0,65	-	-	-	-	3,01	1,79
6,336	1013		<i>trans</i> -2-Heksen-1-il-acetat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6,421	1018	1017	α -Terpinen	-	-	0,41	-	-	-	-	-	0,51	-
6,560	1026	1026	<i>o</i> -/ <i>p</i> -cimen	-	-	0,23	4,53	2,70	-	-	6,40	0,42	-
6,640	1030	1029	Limonen	4,00	1,34	-	-	-	-	-	-	-	-
6,657	1031	1030	β -Felandren	-	-	8,38	3,70	-	-	-	2,69	8,55	4,84
6,748	1036	1037	Z- β -Ocimen	-	-	13,67	11,26	2,24	-	3,04	1,19	18,57	17,51
6,941	1046	1050	<i>E</i> - β -Ocimen	7,25	28,04	3,65	2,20	2,55	12,29	37,86	8,03	4,63	6,38
7,167	1059	1060	γ -Terpinen	-	2,08	0,70	2,04	3,50	-	-	14,52	0,37	-
7,709	1089	1089	α -Terpinolen	-	1,11	0,62	-	-	-	-	-	0,53	-
7,845	1096	1100	Undekan	2,14	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10,969	1298	1300	Tridekan	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11,988	1383	1376	α -Kopaen ?	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12,028	1386		<i>seskviterpen</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

t_R	KI	KI tabl	Jedinjenje	AnS(L)133	AnS(P)134	AnS(K)103	AnS(DS)104	AnS(GS)105	AnS(L)106	AnS(C)107	AnS(P)108	AnS(K)109	AnS(DS)110
12,114	1394		<i>seskviterpen</i>	-	-	-	-	-	-	1,26	0,96	-	-
12,132	1396	1388	β -Kubeben	-	-	-	-	-	-	1,93	-	-	-
12,484	1429	1419	<i>trans</i> - β -Kariofilen	3,49	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12,570	1437		<i>seskviterpen</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12,727	1452		<i>izomer farnezena</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13,085	1489		<i>izomer farnezena</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13,090	1489	1485	Germakren D	12,97	-	-	-	-	19,98	11,90	4,24	0,45	-
13,148	1495		<i>seskviterpen</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13,217	1503	1506	<i>E,E</i> - α -Farnezen	7,19	13,93	-	-	-	28,18	13,82	8,99	-	-
13,233	1504	1500	α -Muurolen ?	-	-	-	-	3,08	-	-	-	-	-
13,236	1505	1500	Biciklogermakren	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13,268	1508	1506	β -Bisabolen	-	-	-	-	-	-	-	-	0,52	-
13,290	1511	1515	<i>Z</i> - γ -Bisabolen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13,381	1521		<i>seskviterpen</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	0,35	-
13,441	1527	1523	δ -Kadinen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13,949	1585		<i>seskviterpen</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			Ukupno	100,0	100,0	99,5	99,4	100,0	100,0	99,0	99,4	99,4	100,0
			Monoterpeni	21,8	84,9	99,3	99,4	85,7	51,8	70,1	85,8	97,9	100,0
			Seskviterpeni	23,6	13,9	0,0	0,0	3,1	48,2	28,9	14,2	1,3	0,0
			Alifatični ugljovodonici	23,1	1,2	0,4	0,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,6	0,0
			Oksigenovana alifatična jed.	31,5	0,0	0,2	0,0	11,2	0,0	0,0	0,0	0,2	0,0
			Aromatična jed.	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,0	0,0	0,0	0,0

t_R	KI	KI tabl	Jedinjenje	AnS(GS)111	AnS(C)113	AnS(P)114	AnS(K)115	AnS(DS)116	AnS(L)118	AnS(P)119	AnS(L)189	AnS(P)190
1,630	641	740	Dimetil-sulfid	-	-	-	-	-	-	-	0,61	1,10
1,677	647		Ugljen-disulfid	-	-	-	-	-	-	-	0,24	-
1,702	650		2-Metilpropanal	-	-	-	-	-	-	-	0,19	0,27
2,039	692		3-Metilbutanal	-	-	-	-	-	-	-	0,30	0,56
2,087	697		2-Metilbutanal	-	-	-	-	-	-	-	0,18	0,54
2,168	707		1-Penten-3-ol	-	-	-	-	-	-	-	1,36	-
2,200	710		1-Penten-3-on	-	-	-	-	-	-	-	0,26	-
2,274	718	700	Heptan	-	-	-	-	-	-	-	3,55	0,43
2,297	721		2-Etilfuran	-	-	-	-	-	-	-	0,22	-
2,513	744	741	3-Metil-1-butanol	-	-	-	-	-	-	-	-	0,07
2,545	747		2-Metil-1-butanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,826	775	774	2Z-Pentenol	-	-	-	-	-	-	-	0,51	-
3,129	802	800	Oktan	-	-	-	-	-	-	-	1,00	-
3,139	803	802	Heksanal	-	1,16	0,65	-	-	-	2,18	-	-
3,430	827		Metil-angelat	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3,790	855	855	<i>trans</i> -2-Heksanal	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3,815	857	859	<i>cis</i> -3-Heksen-1-ol	-	-	-	-	-	-	-	16,43	0,40
3,941	867		<i>trans</i> -2-Heksen-1-ol	-	-	-	-	-	-	-	10,50	-
3,969	869	871	Heksanol	-	-	-	-	-	-	-	8,66	-
4,409	899		Nonen	-	-	-	0,87	0,77	-	-	-	-
4,430	901	900	Nonan	-	-	-	-	-	-	-	8,64	0,64
4,905	931	930	α -Tujen	-	-	-	0,27	-	-	-	-	0,15
5,034	939	939	α -Pinen	2,64	-	0,78	10,67	7,12	-	-	0,82	0,35
5,290	954	954	Kamfen	-	-	-	0,23	-	-	-	-	-
5,575	971		<i>izomer dekana</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5,615	973		<i>monoterpen</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5,683	977	975	Sabinen	43,43	6,05	4,03	19,67	44,80	10,85	-	26,18	28,76
5,758	981	979	β -Pinen	-	-	-	0,58	0,76	-	-	0,18	0,38
5,933	991	991	β -Mircen	36,91	20,65	44,50	39,99	30,56	14,92	13,44	1,13	17,91
6,066	999	1000	Dekan	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6,135	1002	999	Oktanal	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6,186	1005	1005	<i>cis</i> -3-Heksen-1-il-acetat	-	-	-	-	-	-	-	2,64	-
6,209	1006	1003	α -Felandren	-	-	-	0,58	-	-	-	-	0,20
6,290	1011	1009	Heksil-acetat	-	-	-	-	-	-	-	0,64	-
6,316	1012	1010	<i>monoterpen</i>	-	-	-	3,83	1,19	-	-	-	-
6,336	1013		<i>trans</i> -2-Heksen-1-il-acetat	-	-	-	-	-	-	-	0,54	-
6,421	1018	1017	α -Terpinen	-	-	-	0,39	-	-	-	-	-
6,560	1026	1026	<i>o</i> - <i>p</i> -cimen	-	-	-	0,74	0,90	-	0,65	-	1,18
6,640	1030	1029	Limonen	-	-	-	-	-	-	-	0,51	0,70
6,657	1031	1030	β -Felandren	2,27	-	3,49	11,05	4,02	-	-	-	0,62
6,748	1036	1037	Z- β -Ocimen	3,62	2,97	2,59	5,43	5,65	-	-	1,32	18,82
6,941	1046	1050	E- β -Ocimen	4,80	28,07	15,12	2,30	1,38	7,13	1,96	11,16	15,20
7,167	1059	1060	γ -Terpinen	-	-	-	0,34	-	-	-	0,48	5,49
7,709	1089	1089	α -Terpinolen	-	2,55	2,31	1,69	-	2,41	-	-	2,11
7,845	1096	1100	Undekan	-	-	-	-	-	-	-	0,46	0,20
10,969	1298	1300	Tridekan	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11,988	1383	1376	α -Kopaen ?	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12,028	1386		<i>seskviterpen</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-

t_R	KI	KI tabl	Jedinjenje	AnS(GS)111	AnS(C)113	AnS(P)114	AnS(K)115	AnS(DS)116	AnS(L)118	AnS(P)119	AnS(L)189	AnS(P)190
12,114	1394		<i>seskviterpen</i>	-	2,30	-	-	-	-	-	-	-
12,132	1396	1388	β -Kubeben	-	1,77	0,60	-	-	-	2,87	-	-
12,484	1429	1419	<i>trans</i> - β -Kariofilen	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12,570	1437		<i>seskviterpen</i>	1,40	-	-	-	-	-	-	-	-
12,727	1452		<i>izomer farnezena</i>	-	-	-	-	-	7,79	4,02	-	-
13,085	1489		<i>izomer farnezena</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13,090	1489	1485	Germakren D	2,83	17,58	5,87	-	-	23,32	12,24	0,32	-
13,148	1495		<i>seskviterpen</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13,217	1503	1506	<i>E,E</i> - α -Farnezen	2,10	15,38	19,23	-	-	30,39	61,45	0,38	3,94
13,233	1504	1500	α -Muurolen ?	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13,236	1505	1500	Biciklogermakren	-	-	-	-	1,35	-	-	-	-
13,268	1508	1506	β -Bisabolen	-	-	-	0,94	0,71	-	-	-	-
13,290	1511	1515	<i>Z</i> - γ -Bisabolen	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13,381	1521		<i>seskviterpen</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13,441	1527	1523	δ -Kadinen	-	-	-	-	-	-	0,47	-	-
13,949	1585		<i>seskviterpen</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			Ukupno	100,0	98,5	99,2	99,6	99,2	96,8	99,3	99,4	100,0
			Monoterpeni	93,7	60,3	72,8	97,8	96,4	35,3	16,0	41,8	91,9
			Seskviterpeni	6,3	37,0	25,7	0,9	2,1	61,5	81,1	0,7	3,9
			Alifatični ugljovodonici	0,0	0,0	0,0	0,4	0,8	0,0	0,0	13,6	1,3
			Oksigenovana alifatična jed.	0,0	1,2	0,6	0,9	0,8	0,0	2,2	42,8	1,8
			Aromatična jed.	0,0	1,5	0,8	0,0	0,0	2,2	0,7	1,1	1,1

Rezultati headspace-GC-MS analize *Chaerophyllum bulbosum*

t_R	KI	KI tabl	Jedinjenje	ChB(K)194	ChB(DL)195	ChB(GL)196	ChB(P)198	ChB(K)199	ChB(GL)200	ChB(C)201	ChB(P)202	ChB(K)203	ChB(L)204	ChB(P)205
1,630	641	740	Dimetil-sulfid	-	0,56	0,23	1,01	-	0,13	0,07	0,30	-	0,25	0,19
1,702	650		2-Metilpropanal	-	0,21	-	0,30	-	-	-	0,06	-	-	-
2,039	692		3-Metilbutanal	-	0,31	0,12	-	-	-	-	0,03	-	-	-
2,087	697		2-Metilbutanal	-	0,25	-	0,19	-	-	-	0,05	-	-	-
3,815	857	859	<i>cis</i> -3-Heken-1-ol	-	2,01	-	-	-	0,26	-	-	-	-	-
3,969	869	871	Heksanol	-	1,09	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4,905	931	930	α -Tujen	-	-	-	-	-	-	-	0,11	-	-	-
5,034	939	939	α -Pinen	15,27	-	0,20	1,82	4,34	0,20	0,44	2,85	3,24	-	0,50
5,683	977	975	Sabinen	0,37	0,24	0,22	0,54	-	0,19	0,48	0,62	0,41	-	0,32
5,758	981	979	β -Pinen	0,31	-	-	3,66	0,52	-	0,93	12,67	-	-	1,48
5,933	991	991	β -Mircen	1,98	0,35	0,22	0,63	0,60	-	0,24	0,41	0,41	-	0,24
6,560	1026	1026	<i>o</i> -/ <i>p</i> -cimen	2,55	-	-	2,69	2,39	-	0,28	0,83	4,38	-	1,19
6,640	1030	1029	Limonen	6,22	-	-	-	16,38	-	0,19	0,35	-	-	-
6,657	1031	1030	β -Felandren	-	-	-	-	-	-	-	-	2,35	-	-
6,748	1036	1037	Z- β -Ocimen	-	0,48	0,41	0,54	-	0,33	0,34	0,35	-	0,29	0,32
6,941	1046	1050	<i>E</i> - β -Ocimen	56,24	93,62	96,86	80,82	45,29	96,95	94,19	54,97	76,39	98,72	73,64
7,167	1059	1060	γ -Terpinen	13,19	0,68	1,13	7,35	11,17	1,95	2,55	6,83	11,72	0,74	6,66
7,709	1089	1089	α -Terpinolen	-	-	-	-	-	-	0,29	0,14	-	-	-
10,143	1238		Metilkarvakrol / metiltimol	-	-	-	-	0,53	-	-	-	-	-	-
11,582	1348		<i>estar seskvi/monoterpena</i>	-	-	-	-	15,41	-	-	-	-	-	-
12,446	1425		<i>seskviterpen</i>	0,88	-	-	-	0,98	-	-	-	0,37	-	-
12,643	1444		<i>seskviterpen</i>	-	-	-	-	0,72	-	-	-	-	-	-
12,727	1452		<i>izomer farnezena</i>	-	-	-	-	-	-	-	7,87	-	-	5,92
12,769	1457		<i>seskviterpen</i>	0,32	-	-	-	0,96	-	-	-	0,37	-	-
12,842	1464		<i>seskviterpen</i>	0,69	-	-	-	0,70	-	-	-	0,36	-	-
13,090	1489	1485	Germakren D	-	0,21	0,18	-	-	-	-	-	-	-	0,18
13,140	1495		<i>seskviterpen</i>	-	-	-	-	-	-	-	0,28	-	-	0,20
13,268	1508	1506	β -Bisabolen	-	-	-	-	-	-	-	1,01	-	-	0,87
13,418	1525	1523	β -Seskvifelandren	-	-	-	-	-	-	-	10,17	-	-	8,30
			Ukupno	98,0	100,0	99,6	99,6	100,0	100,0	100,0	99,9	100,0	100,0	100,0
			Monoterpeni	96,1	95,4	99,0	98,1	80,7	99,6	99,9	80,1	98,9	99,7	84,4
			Seskviterpeni	1,9	0,2	0,2	0,0	18,8	0,0	0,0	19,3	1,1	0,0	15,5
			Alifatični ugljovodonici	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
			Oksigenovana alifatična jed.	0,0	3,9	0,1	0,9	0,0	0,3	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0
			Aromatična jed.	0,0	0,0	0,0	0,0	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Rezultati headspace-GC-MS analize *Chaerophyllum hirsutum*

t_R	KI	KI tabl	Jedinjenje	ChH(K)206	ChH(L)207	ChH(L)209	ChH(P)210
1,630	641	740	Dimetil-sulfid	-	0,20	-	-
1,702	650		2-Metilpropanal	-	0,06	-	-
3,815	857	859	<i>cis</i> -3-Heksen-1-ol	-	0,25	-	-
4,905	931	930	α -Tujen	-	-	-	0,31
5,034	939	939	α -Pinen	8,18	0,74	-	7,77
5,683	977	975	Sabinen	1,61	0,85	82,64	40,83
5,758	981	979	β -Pinen	5,17	0,67	-	22,41
5,933	991	991	β -Mircen	2,78	1,32	1,81	2,77
6,186	1005	1005	<i>cis</i> -3-Heksen-1-il-acetat	-	1,16	-	-
6,560	1026	1026	<i>o</i> -/ <i>p</i> -cimen	20,77	0,39	1,70	5,28
6,640	1030	1029	Limonen	18,37	46,85	-	1,11
6,941	1046	1050	<i>E</i> - β -Ocimen	1,52	3,53	2,94	3,12
7,167	1059	1060	γ -Terpinen	31,83	1,76	4,56	13,76
7,709	1089	1089	α -Terpinolen	6,09	35,75	-	-
7,713	1089		<i>monoterpen</i>	-	-	-	0,35
7,845	1096	1100	Undekan	-	0,10	-	-
8,137	1113	1100	1,3,8-p-mentatrien ?	-	0,09	-	-
12,028	1386		<i>seskviterpen</i>	2,70	-	-	-
12,484	1429	1419	<i>trans</i> - β -Kariofilen	-	0,20	0,81	0,73
12,570	1437		<i>seskviterpen</i>	0,98	-	-	-
12,830	1463	1455	α -Humulen	-	0,78	-	0,60
13,090	1489	1485	Germakren D	-	4,37	5,01	-
13,236	1505	1500	Biciklogermakren	-	-	0,54	-
13,268	1508	1506	β -Bisabolen	-	-	-	0,97
13,381	1521		<i>seskviterpen</i>	-	0,07	-	-
13,441	1527	1523	δ -Kadinen	-	0,13	-	-
13,810	1569		<i>seskviterpen</i>	-	0,39	-	-
13,949	1585		<i>seskviterpen</i>	-	0,10	-	-
			Ukupno	100,0	99,7	100,0	100,0
			Monoterpeni	96,3	91,9	93,6	97,7
			Seskviterpeni	3,7	6,0	6,4	2,3
			Alifatični ugljovodonici	0,0	0,1	0,0	0,0
			Oksigenovana alifatična jed.	0,0	1,5	0,0	0,0
			Aromatična jed.	0,0	0,0	0,0	0,0

Rezultati headspace-GC-MS analize *Chaerophyllum temulentum*

t_R	KI	KI tabl	Jedinjenje	ChT(K)153	ChT(DS)154	ChT(GS)155	ChT(L)156	ChT(C)157	ChT(P)158	ChT(K)135	ChT(DS)136	ChT(L)138	ChT(C)139
2,513	744	741	3-Metil-1-butanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,53
2,545	747		2-Metil-1-butanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,826	775	774	2Z-Pentenol	-	-	-	0,53	-	-	-	-	-	-
2,909	782	789	izomerni butandiol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3,005	791	789	izomerni butandiol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3,129	802	800	Oktan	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3,139	803	802	Heksanal	-	-	-	-	-	-	0,70	-	-	-
3,759	853		izomer heksenola	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3,790	855	855	trans-2-Heksanal	-	-	-	-	-	-	-	-	4,38	-
3,815	857	859	cis-3-Heksanal	-	-	13,32	51,62	-	0,50	-	-	-	-
3,969	869	871	Heksanol	-	-	-	5,52	-	-	-	-	-	-
4,470	903	902	Heptanal	-	-	-	-	-	-	0,66	-	-	-
5,034	939	939	α -Pinen	61,21	7,96	-	-	4,14	1,60	76,31	3,95	-	4,01
5,683	977	975	Sabinen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5,758	981	979	β -Pinen	-	-	-	-	16,48	7,59	0,86	-	-	15,96
5,851	986	984	3-Oktanon	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5,933	991	991	β -Mircen	2,26	14,36	27,08	0,69	4,30	-	1,58	67,71	2,33	2,47
6,135	1002	999	Oktanal	-	1,09	-	-	1,27	1,65	2,15	-	-	2,11
6,186	1005	1005	cis-3-Heksen-1-il-acetat	-	-	1,94	17,72	-	-	-	-	-	-
6,209	1006	1003	α -Felandren	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6,290	1011	1009	Heksil-acetat	-	-	-	1,47	-	-	-	-	-	-
6,560	1026	1026	<i>o</i> -/ <i>p</i> -cimen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6,640	1030	1029	Limonen	-	-	-	-	-	-	7,75	-	-	-
6,657	1031	1030	β -Felandren	21,34	7,57	7,57	-	2,98	1,11	-	-	-	3,46
6,748	1036	1037	Z- β -Ocimen	-	-	-	-	1,18	-	-	-	-	1,35
6,811	1039	1036	Butil-2-metilbutanoat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6,941	1046	1050	<i>E</i> - β -Ocimen	-	-	7,86	1,88	50,85	6,76	-	-	5,34	29,21
7,167	1059	1060	γ -Terpinen	-	-	1,45	-	-	-	-	-	-	-
7,709	1089	1089	α -Terpinolen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7,845	1096	1100	Undekan	5,66	12,79	-	-	-	-	5,93	19,69	-	-
7,867	1097		monoterpenski ester?	-	-	-	-	-	-	-	-	4,73	-
7,945	1102		nonanol?	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8,153	1114	1107	Fenetil-alkohol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11,988	1383	1376	α -Kopaen	-	-	-	-	-	4,64	-	-	-	-
12,028	1386		seskviterpen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12,132	1396	1388	β -Kubeben	-	-	-	-	-	13,28	-	-	-	1,87
12,371	1418		seskviterpen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12,484	1429	1419	trans- β -Kariofilen	-	-	-	-	-	1,78	-	-	5,79	-
12,570	1437		seskviterpen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12,578	1438	1435	trans- α -Bergamoten	-	2,21	-	-	-	1,79	-	-	-	-
12,635	1443	1440	α -Gvajen	-	-	-	-	-	0,68	-	-	-	-
12,727	1452		izomer farnezena	4,99	14,10	7,03	-	-	0,80	2,68	3,90	-	1,10
12,830	1463	1455	α -Humulen	-	-	5,51	2,15	3,43	9,14	-	-	20,70	4,42
13,024	1483	1482	ar-/ γ -Kurkumen	-	2,08	1,71	-	-	6,98	-	-	-	1,62
13,085	1489		izomer farnezena	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13,090	1489	1485	Germakren D	-	3,68	5,68	17,32	11,23	6,61	-	-	56,74	15,54
13,101	1491	1500	Pentadekan	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13,140	1495		seskviterpen	-	1,66	5,15	1,05	1,82	5,82	-	-	-	4,29

t_R	KI	KI tabl	Jedinjenje	ChT(K)153	ChT(DS)154	ChT(GS)155	ChT(L)156	ChT(C)157	ChT(P)158	ChT(K)135	ChT(DS)136	ChT(L)138	ChT(C)139
13,217	1503	1506	<i>E,E</i> - α -Farnezen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13,233	1504	1500	α -Muurolen ?	-	17,73	8,89	-	1,43	6,41	0,60	4,76	-	2,41
13,236	1505	1500	Biciklogermakren	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13,268	1508	1506	β -Bisabolen	-	1,93	2,60	-	0,89	10,42	-	-	-	7,27
13,290	1511	1515	<i>seskviterpen</i>	1,76	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13,351	1517		<i>seskviterpen</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13,381	1521		<i>seskviterpen</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13,418	1525	1523	β -Seskvifelandren	-	4,03	-	-	-	-	-	-	-	-
13,441	1527	1523	δ -Kadinen	-	7,92	4,22	-	-	4,90	-	-	-	-
13,469	1530		<i>seskviterpen</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13,493	1533	1531	<i>seskviterpen</i>	2,79	-	-	-	-	-	0,78	-	-	-
13,592	1544		<i>seskviterpen</i>	-	-	-	-	-	2,10	-	-	-	-
13,658	1551	1574	<i>seskviterpen</i>	-	-	-	-	-	0,71	-	-	-	-
13,726	1559		<i>seskviterpen</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13,810	1569		<i>seskviterpen</i>	-	-	-	-	-	1,41	-	-	-	-
13,949	1585		<i>seskviterpen</i>	-	-	-	-	-	1,72	-	-	-	1,13
14,171	1612		<i>seskviterpen</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14,265	1624		<i>seskviterpen</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			Ukupno	100,0	99,1	100,0	99,9	100,0	98,4	100,0	100,0	100,0	98,7
			Monoterpeni	84,8	29,9	44,0	2,6	79,9	17,1	86,5	71,7	12,4	56,5
			Seskviterpeni	9,5	55,3	40,8	20,5	18,8	79,2	4,1	8,7	83,2	39,6
			Alifatični ugljovodonici	5,7	12,8	0,0	0,0	0,0	0,0	5,9	19,7	0,0	0,0
			Oksigenovana alifatična jed.	0,0	1,1	15,3	76,8	1,3	2,2	3,5	0,0	4,4	2,6
			Aromatična jed.	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

t_R	KI	KI tabl	Jedinjenje	ChT(P)140	ChT(K)141	ChT(DS)142	ChT(L)144	ChT(C)145	ChT(P)146	ChT(K)147	ChT(DS)148	ChT(L)150	ChT(C)151
2,513	744	741	3-Metil-1-butanol	1,25	-	-	-	3,79	2,90	-	-	-	1,19
2,545	747		2-Metil-1-butanol	0,88	-	-	-	1,76	2,07	-	-	-	0,39
2,826	775	774	ZZ-Pentenol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,909	782	789	izomerni butandiol	1,20	-	-	-	-	1,33	-	-	-	-
3,005	791	789	izomerni butandiol	3,70	-	-	-	-	1,68	-	-	-	-
3,129	802	800	Oktan	-	-	-	-	1,27	-	-	-	-	1,46
3,139	803	802	Heksanal	-	1,53	-	-	-	-	0,51	-	-	-
3,759	853		izomer heksenola	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,72
3,790	855	855	trans-2-Heksenal	-	-	-	1,74	-	-	-	-	-	-
3,815	857	859	cis-3-Heksenal	-	-	-	-	0,77	-	-	-	-	0,72
3,969	869	871	Heksanol	-	-	-	-	1,09	-	-	-	-	1,03
4,470	903	902	Heptanal	-	-	-	-	0,87	0,27	-	-	-	0,67
5,034	939	939	α -Pinen	0,75	75,96	8,62	-	1,43	-	78,27	25,27	-	4,59
5,683	977	975	Sabinen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5,758	981	979	β -Pinen	2,94	-	-	-	-	-	-	-	-	16,81
5,851	986	984	3-Oktanon	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5,933	991	991	β -Mircen	-	1,60	51,70	-	4,32	0,27	1,59	39,64	-	1,87
6,135	1002	999	Oktanal	1,01	2,55	-	-	2,28	2,34	1,32	-	-	2,52
6,186	1005	1005	cis-3-Heksen-1-il-acetat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6,209	1006	1003	α -Felandren	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6,290	1011	1009	Heksil-acetat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6,560	1026	1026	<i>o</i> - <i>p</i> -cimen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6,640	1030	1029	Limonen	-	9,03	-	-	-	-	-	-	-	-
6,657	1031	1030	β -Felandren	-	-	10,14	-	3,81	0,49	11,72	5,62	-	1,44
6,748	1036	1037	Z- β -Ocimen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,71
6,811	1039	1036	Butil-2-metilbutanoat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6,941	1046	1050	<i>E</i> - β -Ocimen	0,35	-	-	-	21,47	0,53	-	-	-	36,88
7,167	1059	1060	γ -Terpinen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7,709	1089	1089	α -Terpinolen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7,845	1096	1100	Undekan	-	5,17	19,36	-	-	-	4,64	22,50	-	0,50
7,867	1097		monoterpenski estar?	-	-	-	-	1,52	-	-	-	-	-
7,945	1102		nonanol?	-	-	-	-	1,27	-	-	-	-	1,33
8,153	1114	1107	Fenetil-alkohol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,99
11,988	1383	1376	α -Kopaen	2,18	-	-	-	-	6,26	-	-	-	-
12,028	1386		seskviterpen	-	1,38	-	-	-	-	-	-	-	-
12,132	1396	1388	β -Kubeben	4,30	-	-	-	-	16,13	-	-	-	-
12,371	1418		seskviterpen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12,484	1429	1419	trans- β -Kariofilen	-	-	-	6,53	0,97	0,59	-	-	10,01	-
12,570	1437		seskviterpen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12,578	1438	1435	trans- α -Bergamoten	1,27	-	-	-	-	2,71	-	-	-	-
12,635	1443	1440	α -Gvajen	0,22	-	-	-	-	0,70	-	-	-	-
12,727	1452		izomer farnezena	0,37	1,43	3,14	3,01	3,01	1,08	1,08	3,04	5,81	1,06
12,830	1463	1455	α -Humulen	0,75	-	-	8,28	10,78	2,75	-	-	21,64	3,24
13,024	1483	1482	ar- γ -Kurkumen	5,15	-	-	-	-	15,39	-	-	-	-
13,085	1489		izomer farnezena	1,25	-	-	-	35,52	-	-	-	-	16,15
13,090	1489	1485	Germakren D	-	-	-	78,47	-	2,60	-	-	58,52	-
13,101	1491	1500	Pentadekan	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13,140	1495		seskviterpen	1,46	-	-	-	1,08	1,35	-	-	-	1,18
13,217	1503	1506	<i>E,E</i> - α -Farnezen	-	-	-	-	1,35	-	-	-	-	-

t_R	KI	KI tabl	Jedinjenje	ChT(P)140	ChT(K)141	ChT(DS)142	ChT(L)144	ChT(C)145	ChT(P)146	ChT(K)147	ChT(DS)148	ChT(L)150	ChT(C)151
13,233	1504	1500	α -Muurolen ?	3,23	-	2,96	1,97	1,66	9,35	-	2,02	-	-
13,236	1505	1500	Biciklogermakren	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,48
13,268	1508	1506	β -Bisabolen	63,00	1,35	-	-	-	17,61	-	-	-	-
13,290	1511	1515	seskviterpen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13,351	1517		seskviterpen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13,381	1521		seskviterpen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13,418	1525	1523	β -Seskvifelandren	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13,441	1527	1523	δ -Kadinen	1,96	-	-	-	-	3,79	-	-	-	-
13,469	1530		seskviterpen	-	-	-	-	-	1,23	-	-	-	-
13,493	1533	1531	seskviterpen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13,592	1544		seskviterpen	0,48	-	-	-	-	0,76	-	-	-	-
13,658	1551	1574	seskviterpen	0,24	-	-	-	-	0,86	-	-	-	-
13,726	1559		seskviterpen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13,810	1569		seskviterpen	0,41	-	-	-	-	1,19	-	-	-	-
13,949	1585		seskviterpen	0,90	-	-	-	-	2,82	-	-	-	0,37
14,171	1612		seskviterpen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14,265	1624		seskviterpen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			Ukupno	99,3	100,0	95,9	100,0	100,0	99,0	99,1	98,1	96,0	98,3
			Monoterpeni	4,0	86,6	70,5	0,0	32,6	1,3	91,6	70,5	0,0	62,3
			Seskviterpeni	87,2	4,2	6,1	98,3	54,4	87,1	1,1	5,1	96,0	24,5
			Alifatični ugljovodonici	0,0	5,2	19,4	0,0	1,3	0,0	4,6	22,5	0,0	2,0
			Oksigenovana alifatična jed.	8,0	4,1	0,0	1,7	11,8	10,6	1,8	0,0	0,0	8,6
			Aromatična jed.	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,0

t_R	KI	KI tabl	Jedinjenje	ChT(P)152	ChT(K)159	ChT(DS)160	ChT(GS)161	ChT(L)162	ChT(C)163	ChT(P)164	ChT(K)165	ChT(DS)166	ChT(GS)167
2,513	744	741	3-Metil-1-butanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,545	747		2-Metil-1-butanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,826	775	774	2Z-Pentenol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,909	782	789	izomerni butandiol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3,005	791	789	izomerni butandiol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3,129	802	800	Oktan	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3,139	803	802	Heksanal	0,50	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3,759	853		izomer heksenola	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3,790	855	855	trans-2-Heksenal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3,815	857	859	cis-3-Heksenal	-	-	-	5,12	61,36	-	0,68	-	-	-
3,969	869	871	Heksanol	-	-	-	-	7,34	-	-	-	-	-
4,470	903	902	Heptanal	0,68	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5,034	939	939	α -Pinen	3,07	65,49	10,05	-	-	2,70	1,13	43,35	17,97	2,32
5,683	977	975	Sabinen	0,41	-	-	-	-	-	-	0,94	-	-
5,758	981	979	β -Pinen	16,86	0,84	-	-	-	9,35	5,47	-	-	-
5,851	986	984	3-Oktanon	-	-	-	-	-	-	0,47	-	-	-
5,933	991	991	β -Mircen	1,16	2,44	18,60	25,44	-	4,40	0,29	2,09	9,44	17,15
6,135	1002	999	Oktanal	4,49	0,88	-	-	-	1,61	1,60	1,08	1,87	-
6,186	1005	1005	cis-3-Heksen-1-il-acetat	-	-	-	1,29	5,43	-	-	-	-	-
6,209	1006	1003	α -Felandren	-	0,65	-	-	-	-	-	-	-	-
6,290	1011	1009	Heksil-acetat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6,560	1026	1026	<i>o</i> - <i>p</i> -cimen	0,25	-	-	1,09	-	-	-	-	-	-
6,640	1030	1029	Limonen	1,23	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6,657	1031	1030	β -Felandren	-	20,14	6,39	11,06	-	6,85	0,48	29,78	16,77	37,18
6,748	1036	1037	Z- β -Ocimen	-	-	-	-	-	1,25	-	-	-	-
6,811	1039	1036	Butil-2-metilbutanoat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6,941	1046	1050	<i>E</i> - β -Ocimen	8,61	-	-	10,61	1,14	55,16	2,43	-	-	11,00
7,167	1059	1060	γ -Terpinen	-	-	-	1,92	-	-	-	-	-	-
7,709	1089	1089	α -Terpinolen	-	-	-	-	-	-	-	7,35	2,28	-
7,845	1096	1100	Undekan	-	2,67	13,03	1,16	-	-	-	9,31	35,02	4,83
7,867	1097		monoterpenski estar?	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7,945	1102		nonanol?	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8,153	1114	1107	Fenetil-alkohol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11,988	1383	1376	α -Kopaen	2,96	-	-	-	-	-	2,97	-	-	-
12,028	1386		seskviterpen	-	0,65	-	-	-	-	-	-	-	-
12,132	1396	1388	β -Kubeben	10,84	-	-	-	-	-	4,52	-	-	-
12,371	1418		seskviterpen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12,484	1429	1419	trans- β -Kariofilen	-	-	-	-	-	-	0,40	-	-	-
12,570	1437		seskviterpen	-	-	1,62	-	-	-	-	-	-	-
12,578	1438	1435	trans- α -Bergamoten	1,65	-	-	-	-	-	1,51	-	-	-
12,635	1443	1440	α -Gvajen	-	-	-	-	-	-	0,52	-	-	-
12,727	1452		izomer farnezena	1,11	2,60	16,93	4,92	0,76	0,56	0,23	1,94	5,19	3,48
12,830	1463	1455	α -Humulen	1,90	-	-	2,82	2,49	4,37	1,88	-	-	2,15
13,024	1483	1482	ar- γ -Kurkumen	12,54	-	1,84	1,38	-	-	4,92	-	-	-
13,085	1489		izomer farnezena	3,74	-	-	-	-	-	1,76	-	-	-
13,090	1489	1485	Germakren D	-	-	2,06	2,16	18,52	10,94	-	-	-	-
13,101	1491	1500	Pentadekan	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13,140	1495		seskviterpen	1,50	-	-	4,68	-	0,87	2,05	-	-	-
13,217	1503	1506	<i>E,E</i> - α -Farnezen	-	-	-	-	-	0,66	-	-	-	-

t_R	KI	KI tabl	Jedinjenje	ChT(P)152	ChT(K)159	ChT(DS)160	ChT(GS)161	ChT(L)162	ChT(C)163	ChT(P)164	ChT(K)165	ChT(DS)166	ChT(GS)167
13,233	1504	1500	α -Muurolen ?	7,33	-	20,23	3,78	-	-	3,82	-	-	-
13,236	1505	1500	Biciklogermakren	-	1,13	-	-	0,94	-	-	0,77	-	-
13,268	1508	1506	β -Bisabolen	13,53	0,52	-	20,70	-	0,86	55,82	1,60	11,46	20,00
13,290	1511	1515	<i>seskviterpen</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13,351	1517		<i>seskviterpen</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13,381	1521		<i>seskviterpen</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13,418	1525	1523	β -Seskvifelandren	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13,441	1527	1523	δ -Kadinen	2,67	-	6,73	1,89	-	-	2,41	-	-	-
13,469	1530		<i>seskviterpen</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13,493	1533	1531	<i>seskviterpen</i>	-	2,00	-	-	-	-	-	1,79	-	-
13,592	1544		<i>seskviterpen</i>	-	-	-	-	-	-	1,40	-	-	-
13,658	1551	1574	<i>seskviterpen</i>	-	-	-	-	-	-	0,59	-	-	-
13,726	1559		<i>seskviterpen</i>	-	-	-	-	0,53	-	-	-	-	-
13,810	1569		<i>seskviterpen</i>	-	-	-	-	-	-	0,73	-	-	-
13,949	1585		<i>seskviterpen</i>	2,26	-	-	-	-	-	0,66	-	-	-
14,171	1612		<i>seskviterpen</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14,265	1624		<i>seskviterpen</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			Ukupno	99,3	100,0	97,5	100,0	98,5	99,6	98,7	100,0	100,0	98,1
			Monoterpeni	31,6	89,5	35,0	50,1	1,1	79,7	9,8	83,5	46,5	67,7
			Seskviterpeni	62,0	6,9	49,4	42,3	23,2	18,2	86,2	6,1	16,6	25,6
			Alifatični ugljovodonici	0,0	2,7	13,0	1,2	0,0	0,0	0,0	9,3	35,0	4,8
			Oksigenovana alifatična jed.	5,7	0,9	0,0	6,4	74,1	1,6	2,8	1,1	1,9	0,0
			Aromatična jed.	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

t_R	KI	KI tabl	Jedinjenje	ChT(L)168	ChT(P)169	ChT(K)170	ChT(DS)171	ChT(GS)172	ChT(L)173	ChT(P)174
2,513	744	741	3-Metil-1-butanol	-	-	-	-	-	-	-
2,545	747		2-Metil-1-butanol	-	-	-	-	-	-	-
2,826	775	774	2Z-Pentenol	1,02	-	-	-	-	-	-
2,909	782	789	<i>izomerni butandiol</i>	-	-	-	-	-	-	-
3,005	791	789	<i>izomerni butandiol</i>	-	-	-	-	-	-	-
3,129	802	800	Oktan	-	-	-	-	-	-	-
3,139	803	802	Heksanal	-	-	1,05	-	-	-	0,29
3,759	853		<i>izomer heksenola</i>	0,44	-	-	-	-	-	-
3,790	855	855	<i>trans</i> -2-Heksenal	-	-	-	-	-	-	-
3,815	857	859	<i>cis</i> -3-Heksanol	71,61	-	-	-	1,02	80,87	-
3,969	869	871	Heksanol	10,23	-	-	-	-	5,21	-
4,470	903	902	Heptanal	-	-	-	-	-	-	0,35
5,034	939	939	α -Pinen	-	0,91	52,44	15,24	3,12	-	2,91
5,683	977	975	Sabinen	-	-	-	-	-	-	-
5,758	981	979	β -Pinen	-	3,41	-	-	-	-	11,47
5,851	986	984	3-Oktanon	-	-	-	-	-	-	-
5,933	991	991	β -Mircen	-	-	1,25	37,29	33,54	-	-
6,135	1002	999	Oktanal	-	3,42	2,04	-	1,53	-	7,73
6,186	1005	1005	<i>cis</i> -3-Heksen-1-il-acetat	3,19	-	-	-	-	5,58	-
6,209	1006	1003	α -Felandren	-	-	-	-	-	-	-
6,290	1011	1009	Heksil-acetat	-	-	-	-	-	-	-
6,560	1026	1026	<i>o</i> -/ <i>p</i> - <i>cimen</i>	-	-	-	-	-	-	-
6,640	1030	1029	Limonen	-	-	-	-	-	-	-
6,657	1031	1030	β -Felandren	-	-	11,37	5,50	11,37	-	-
6,748	1036	1037	Z- β -Ocimen	-	-	-	-	-	-	-
6,811	1039	1036	Butil-2-metilbutanoat	-	-	-	-	-	-	0,47
6,941	1046	1050	<i>E</i> - β -Ocimen	-	-	-	-	5,74	-	1,11
7,167	1059	1060	γ -Terpinen	-	-	-	-	-	-	-
7,709	1089	1089	α -Terpinolen	-	-	2,24	-	-	-	-
7,845	1096	1100	Undekan	-	-	18,49	25,77	1,53	-	-
7,867	1097		<i>monoterpenski estar?</i>	-	-	-	-	-	-	-
7,945	1102		nonanol?	-	-	-	-	-	-	0,36
8,153	1114	1107	Fenetil-alkohol	-	-	-	-	-	-	-
11,988	1383	1376	α -Kopaen	-	2,51	-	1,54	1,55	-	10,89
12,028	1386		<i>seskviterpen</i>	-	-	-	-	-	-	-
12,132	1396	1388	β -Kubeben	-	-	-	-	1,99	-	3,82
12,371	1418		<i>seskviterpen</i>	-	-	-	-	-	-	0,26
12,484	1429	1419	<i>trans</i> - β -Kariofilen	-	-	-	-	-	-	-
12,570	1437		<i>seskviterpen</i>	-	-	-	-	-	-	-
12,578	1438	1435	<i>trans</i> - α -Bergamoten	-	1,00	0,94	-	-	-	3,09
12,635	1443	1440	α -Gvajen	-	0,15	-	-	-	-	0,85
12,727	1452		<i>izomer farnezena</i>	-	-	2,10	5,48	3,13	-	-
12,830	1463	1455	α -Humulen	1,41	0,17	-	-	4,60	2,60	1,19
13,024	1483	1482	<i>ar</i> -/ γ -Kurkumen	-	2,77	-	-	4,23	-	11,95
13,085	1489		<i>izomer farnezena</i>	-	-	-	-	-	-	0,76
13,090	1489	1485	Germakren D	5,75	-	-	-	2,60	5,74	-
13,101	1491	1500	Pentadekan	-	-	-	1,47	-	-	-
13,140	1495		<i>seskviterpen</i>	0,92	-	-	-	2,88	-	0,48
13,217	1503	1506	<i>E,E</i> - α -Farnezen	-	-	-	-	-	-	-

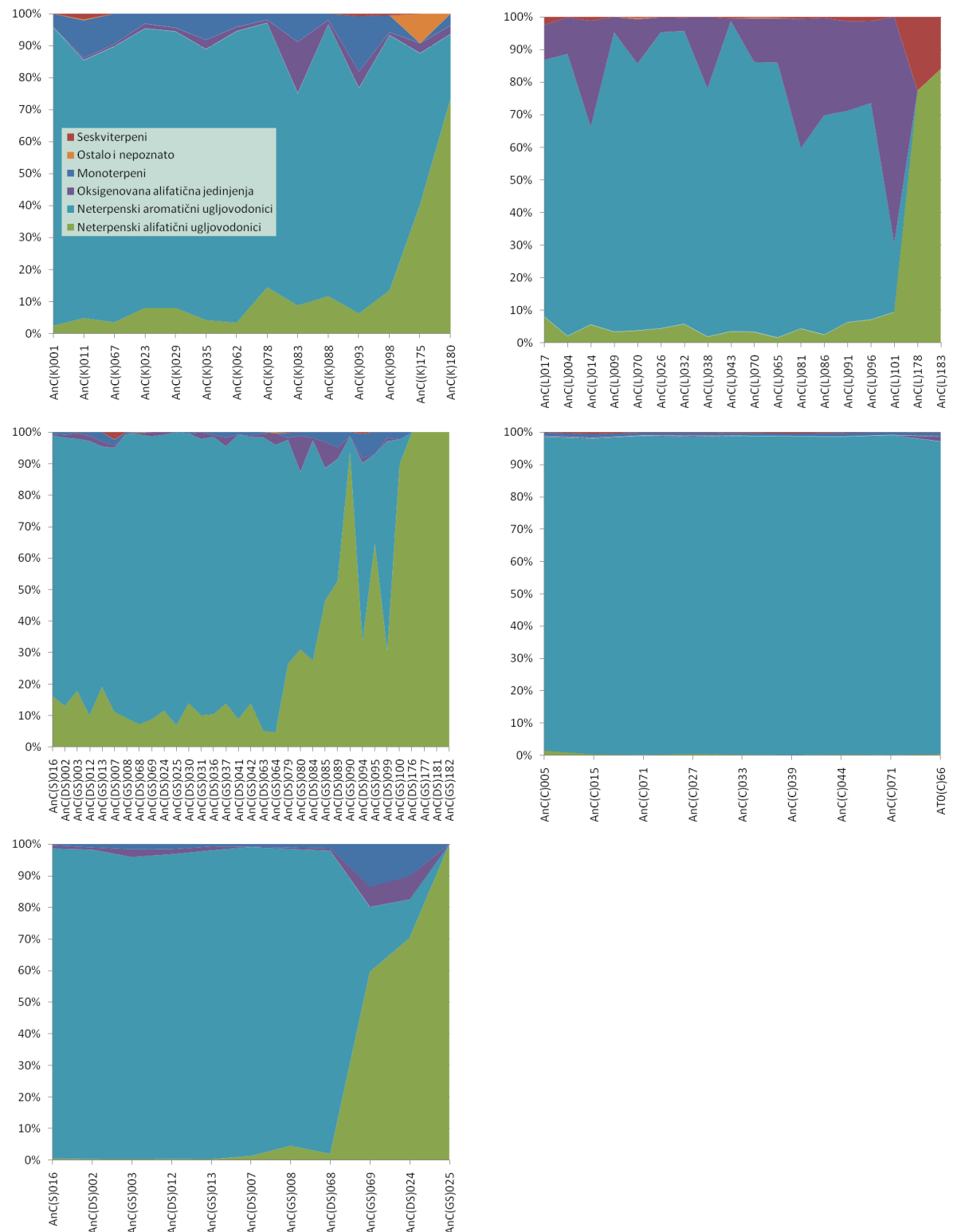
t_R	KI	KI tabl	Jedinjenje	ChT(L)168	ChT(P)169	ChT(K)170	ChT(DS)171	ChT(GS)172	ChT(L)173	ChT(P)174
13,233	1504	1500	α -Muurolen ?	-	2,85	3,29	5,77	11,09	-	14,59
13,236	1505	1500	Biciklogermakren	-	-	-	-	-	-	-
13,268	1508	1506	β -Bisabolen	5,44	79,97	1,14	-	4,57	-	17,53
13,290	1511	1515	seskviterpen	-	-	-	-	-	-	-
13,351	1517		seskviterpen	-	-	1,27	-	-	-	-
13,381	1521		seskviterpen	-	-	-	-	-	-	0,61
13,418	1525	1523	β -Seskvifelandren	-	-	-	-	-	-	-
13,441	1527	1523	δ -Kadinen	-	1,33	1,02	1,93	4,80	-	5,26
13,469	1530		seskviterpen	-	-	-	-	-	-	1,23
13,493	1533	1531	seskviterpen	-	-	1,37	-	-	-	-
13,592	1544		seskviterpen	-	0,17	-	-	-	-	0,67
13,658	1551	1574	seskviterpen	-	-	-	-	-	-	0,62
13,726	1559		seskviterpen	-	-	-	-	-	-	-
13,810	1569		seskviterpen	-	-	-	-	-	-	-
13,949	1585		seskviterpen	-	-	-	-	-	-	0,44
14,171	1612		seskviterpen	-	0,23	-	-	-	-	-
14,265	1624		seskviterpen	-	0,65	-	-	-	-	0,31
Ukupno				100,0	99,5	100,0	100,0	99,3	100,0	99,2
Monoterpeni				0,0	4,3	67,3	58,0	53,8	0,0	15,5
Seskviterpeni				13,5	91,8	11,1	14,7	41,4	8,3	74,5
Alifatični ugljovodonici				0,0	0,0	18,5	27,2	1,5	0,0	0,0
Oksigenovana alifatična jed.				86,5	3,4	3,1	0,0	2,5	91,7	9,4
Aromatična jed.				0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Rezultati headspace-GC-MS analize *Scandix pecten-veneris*.

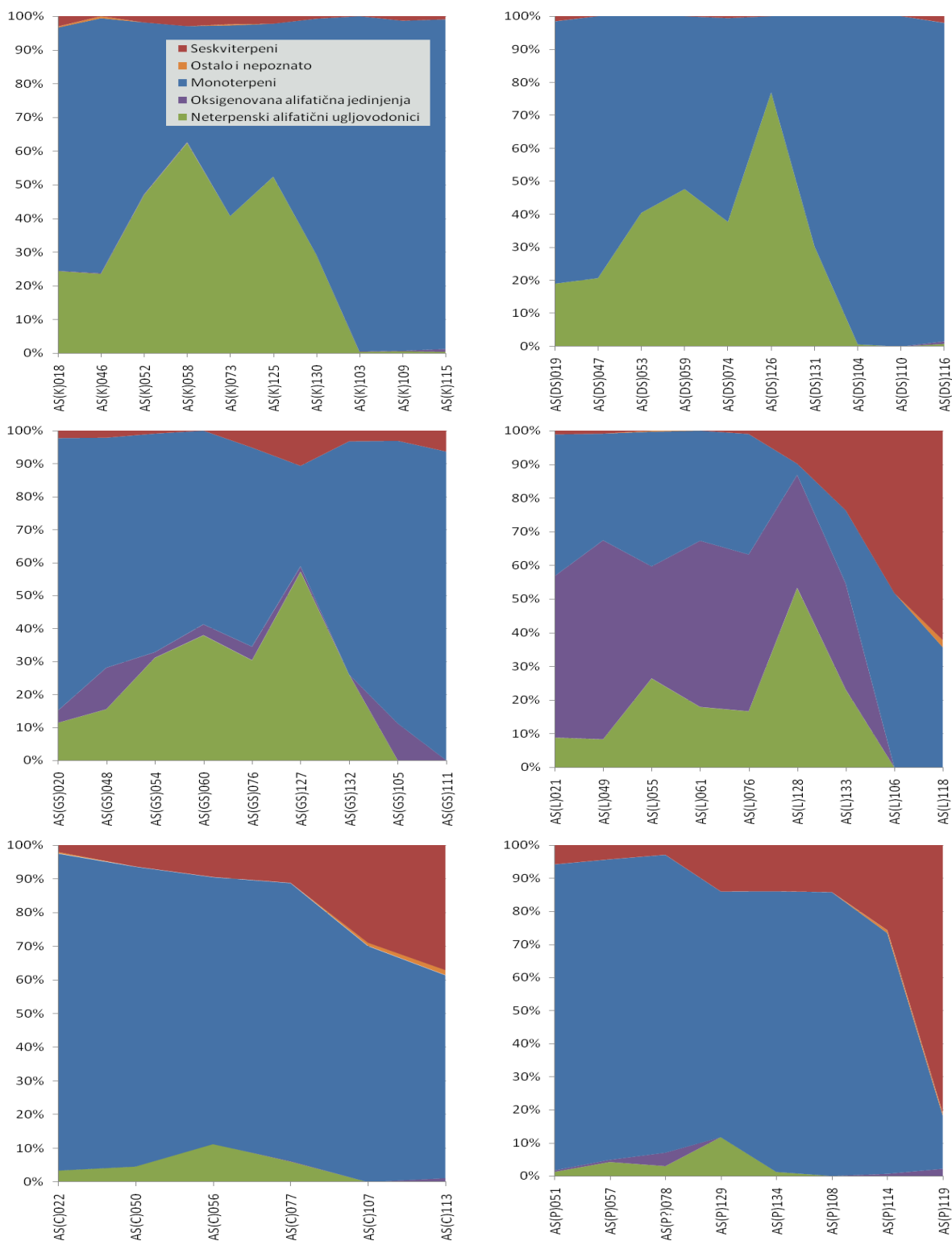
t_R	KI	KI tabl		SPV(K)185	SPV(S)186	SPV(L)187	SPV(P)188
1,630	641	740	Dimetil-sulfid	-	-	8,07	4,83
1,702	650		2-Metilpropanal	-	-	3,07	2,36
2,039	692		3-Metilbutanal	-	-	1,73	-
2,087	697		2-Metilbutanal	-	-	1,95	1,15
7,845	1096	1100	Undekan	-	1,83	-	-
10,969	1298	1300	Tridekan	62,37	78,79	66,71	83,08
12,117	1395	1400	Tetradekan	-	0,85	-	-
12,484	1429	1419	<i>trans</i> - β -Kariofilen	-	-	7,01	-
13,045	1485		<i>Alifatični ugljovodonik</i>	-	0,72	-	-
13,101	1491	1500	Pentadekan	37,63	16,79	11,46	8,58
14,790	1692		<i>Alifatični ugljovodonik</i>	-	1,03	-	-
Ukupno				100,0	100,0	100,0	100,0
Monoterpeni				0,0	0,0	0,0	0,0
Seskviterpeni				0,0	0,0	7,0	0,0
Alifatični ugljovodonici				100,0	100,0	78,2	91,7
Oksigenovana alifatična jed.				0,0	0,0	6,7	3,5
Aromatična jed.				0,0	0,0	0,0	0,0

8.9. GC-MS – UTICAJ FAZE RAZVOJA NA SASTAV ISPARLJIVIH KOMPONENTI

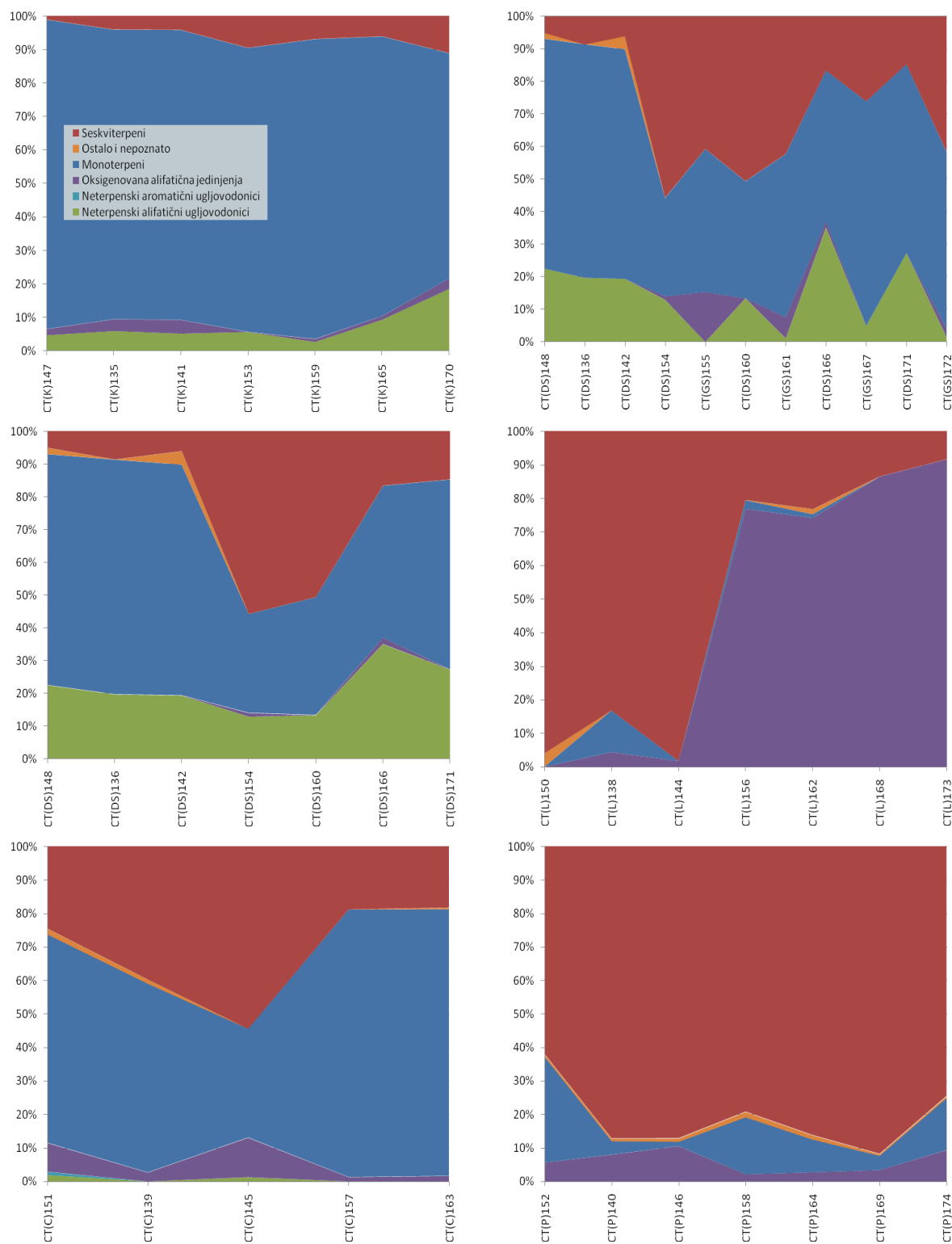
Anthriscus cerefolium



Promena sastava (određenog headspace-GC-MS tehnikom) različitih delova *Anthriscus cerefolium* u toku razvoja.

Anthriscus sylvestris

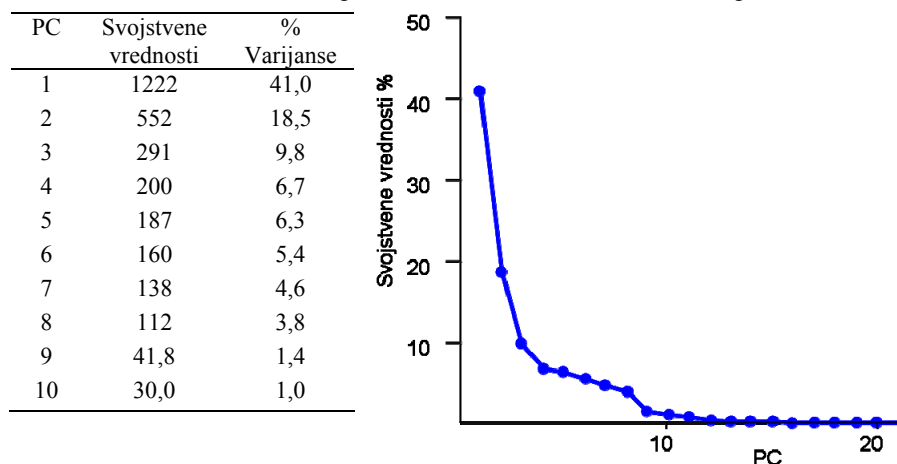
Promena sastava (određenog headspace-GC-MS tehnikom) različitih delova *Anthriscus sylvestris* u toku razvoja.

Chaerophyllum temulentum

Promena sastava (određenog headspace-GC-MS tehnikom) različitih delova *Chaerophyllum temulentum* u toku razvoja.

8.10. PCA REZULTATA HEADSPACE-GC-MS ANALIZE

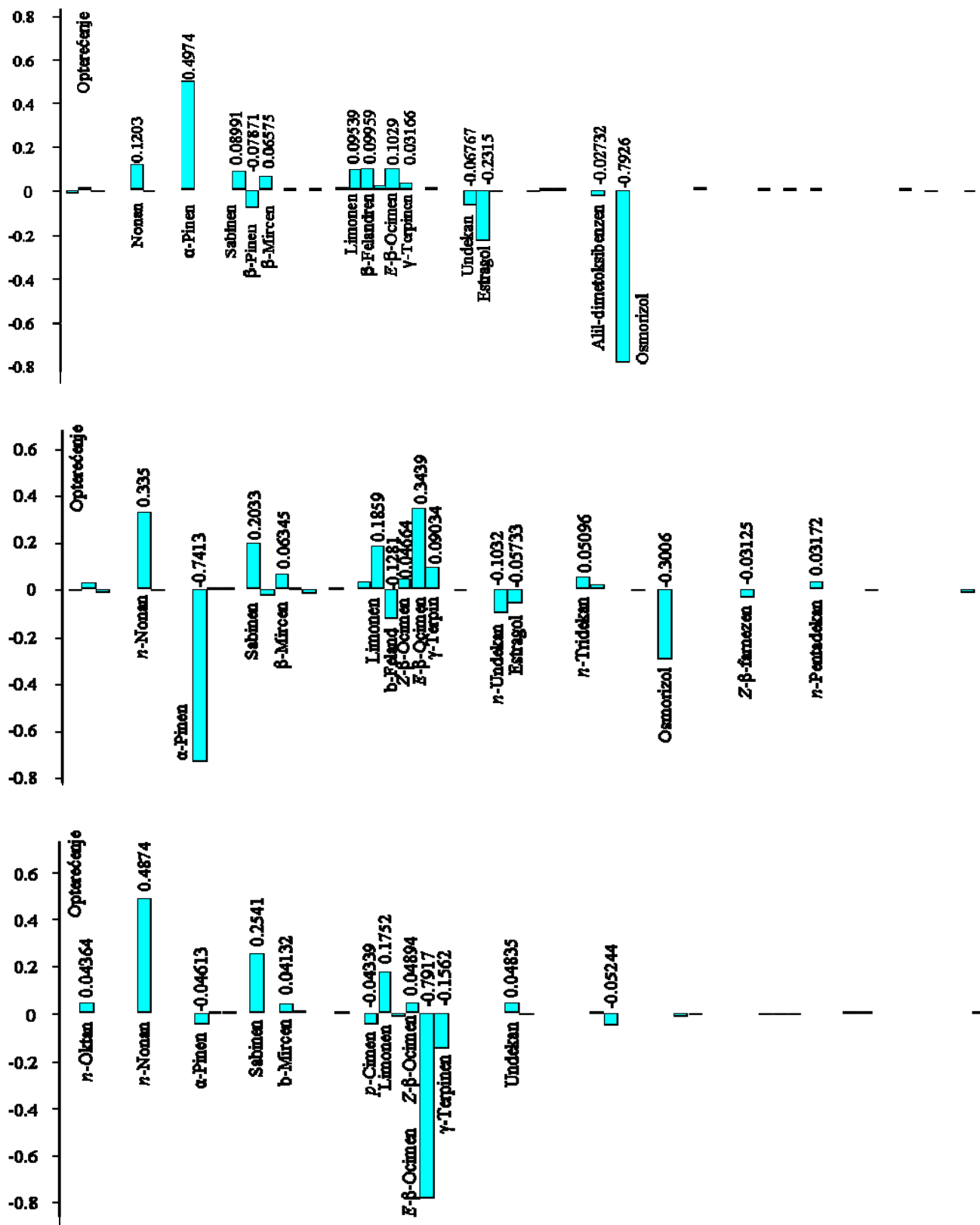
PCA rezultata headspace-GC-MS analize korena – scree plot.



PCA rezultata headspace-GC-MS analize korena – opterećenja (loadings) na prvih 10 glavnih komponenti.

	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	PC7	PC8	PC9	PC10
<i>n</i> -Nonan	0,120	0,335	0,487	-0,329	-0,265	0,078	0,049	-0,491	0,011	-0,130
α -Pinen	0,497	-0,741	-0,046	-0,165	-0,191	-0,006	-0,096	-0,087	-0,119	-0,184
Sabinen	0,090	0,203	0,254	-0,001	0,018	-0,273	0,016	-0,063	-0,166	0,196
β -Pinen	-0,079	-0,028	-0,003	-0,063	0,022	-0,035	-0,052	0,023	0,127	-0,024
β -Miracen	0,066	0,063	0,041	0,304	0,298	-0,606	0,049	0,132	-0,197	-0,322
<i>o</i> - <i>p</i> -cimen	0,013	0,035	-0,043	-0,004	-0,003	0,005	-0,019	0,103	0,453	-0,094
Limonen	0,095	0,186	0,175	-0,225	-0,227	0,160	-0,204	0,774	-0,276	0,067
β -Felandren	0,100	-0,128	-0,011	0,082	0,085	-0,163	0,047	-0,071	0,094	0,832
<i>Z</i> - β -Ocimen	0,022	0,047	0,049	0,084	0,088	-0,193	0,032	-0,044	-0,017	-0,221
<i>E</i> - β -Ocimen	0,103	0,344	-0,792	-0,223	-0,140	-0,021	0,051	-0,177	-0,276	-0,002
γ -Terpinen	0,032	0,090	-0,156	-0,034	-0,023	0,015	-0,028	0,154	0,671	-0,156
α -Terpinolen	0,011	-0,006	-0,002	0,014	0,016	-0,011	0,006	0,034	0,156	0,107
<i>n</i> -Undekan	-0,068	-0,103	0,048	-0,086	0,359	0,393	0,759	0,107	-0,126	-0,059
Estragol	-0,232	-0,057	-0,010	0,636	-0,653	0,118	0,200	-0,021	-0,079	-0,029
<i>n</i> -Tridekan	0,005	0,051	0,004	0,297	0,342	0,444	-0,453	-0,162	-0,131	-0,037
Osmorizol	-0,793	-0,301	-0,012	-0,342	-0,006	-0,143	-0,183	-0,065	-0,109	-0,022
<i>n</i> -Pentadekan	0,005	0,032	0,003	0,180	0,204	0,266	-0,276	-0,098	-0,077	-0,021

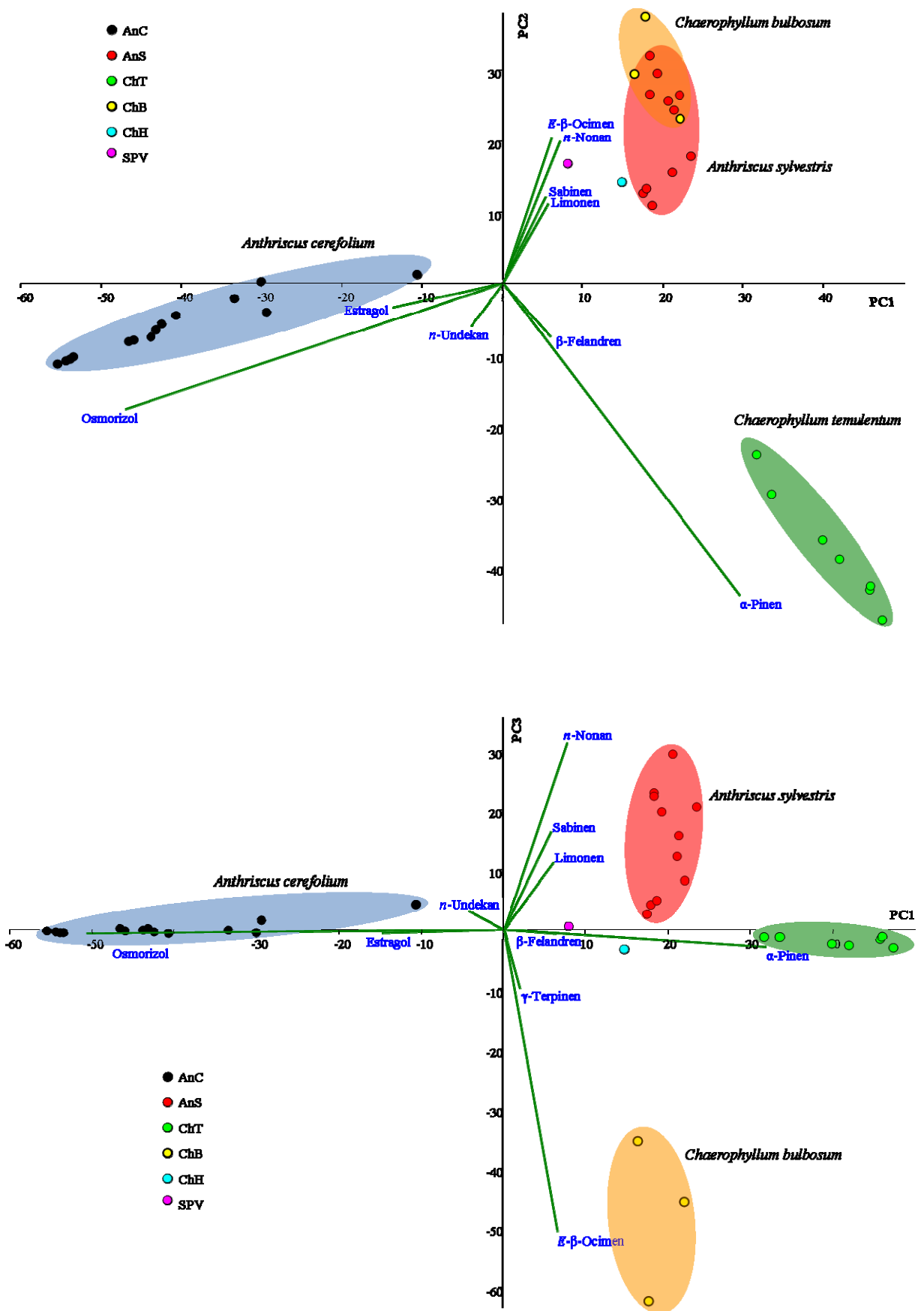
PCA rezultata headspace-GC-MS analize korena – grafici opterećenja (loading plots) na prve 3 glavne komponente.



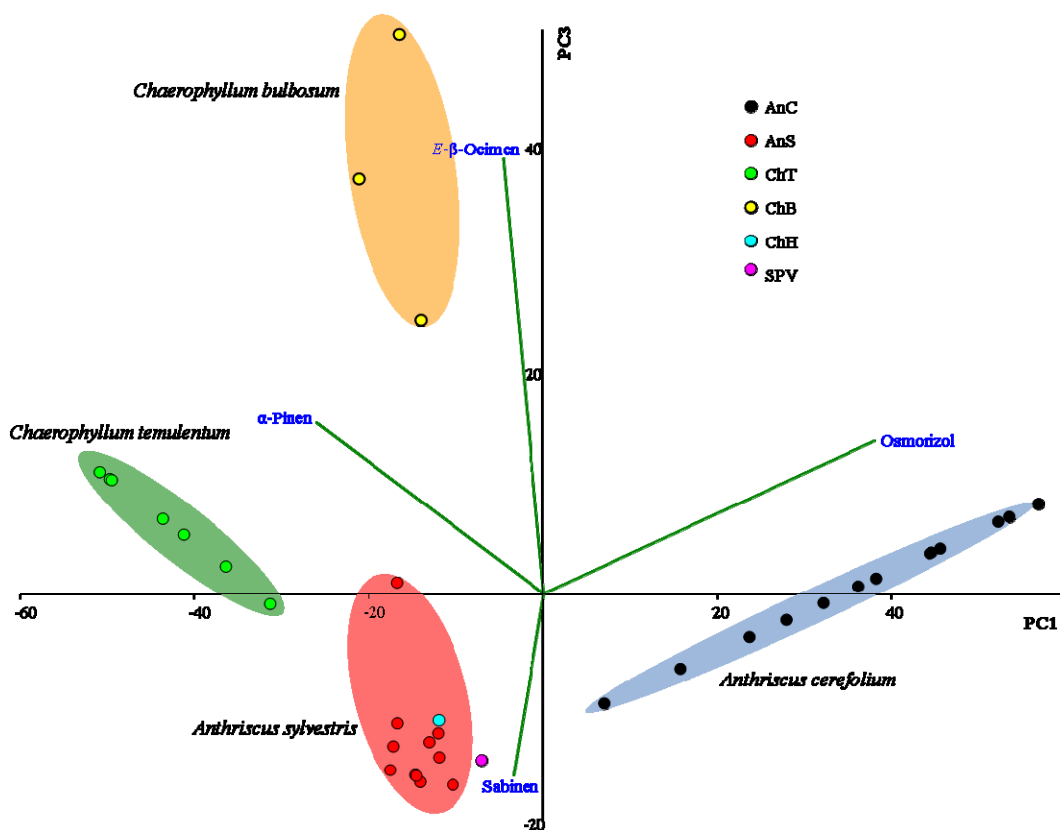
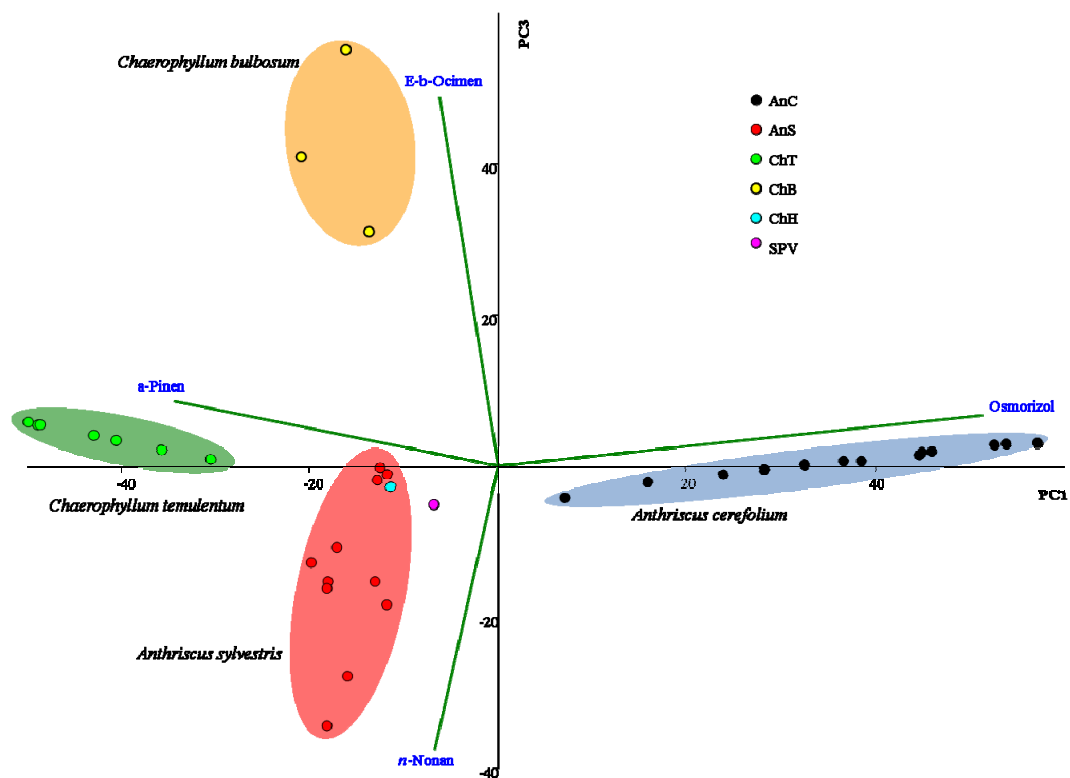
PCA rezultata headspace-GC-MS analize korena – skorovi na prvih 10 glavnih komponenti.

	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	PC7	PC8	PC9	PC10
AnC(K)175	-29,5	-4,2	1,4	-6,7	18,9	11,7	20,1	3,8	-1,8	-0,8
AnC(K)001	-30,0	0,1	-0,6	40,5	-35,3	6,4	9,4	0,0	0,1	-0,2
AnC(K)011	-55,4	-11,6	-0,3	-19,2	8,0	-7,8	-11,4	-1,7	0,4	0,2
AnC(K)023	-42,4	-6,0	-0,4	10,3	-11,4	1,0	1,3	-0,5	-0,7	0,0
AnC(K)029	-54,4	-11,2	-0,5	-10,4	2,4	-4,3	-6,6	-1,4	-1,3	0,1
AnC(K)035	-53,9	-10,9	-0,6	-12,3	2,8	-6,2	-9,0	-1,4	-0,1	0,2
AnC(K)062	-40,7	-4,7	-0,7	18,9	-19,9	1,2	1,4	-0,8	-0,3	0,0
AnC(K)067	-53,5	-10,5	-0,7	-9,1	-0,1	-5,8	-8,4	-1,5	-0,2	0,2
AnC(K)078	-43,2	-6,7	0,1	5,2	-5,7	2,2	3,7	-0,2	-1,4	-0,3
AnC(K)083	-43,8	-7,7	-0,2	-14,4	9,9	-4,1	-5,5	0,0	1,3	0,4
AnC(K)088	-33,4	-2,2	-0,2	24,3	-19,5	6,0	8,7	0,3	-0,7	-0,3
AnC(K)093	-46,0	-8,2	-0,4	-13,0	7,1	-5,0	-7,1	-0,2	2,3	0,2
AnC(K)098	-46,6	-8,4	0,1	-5,3	2,0	-0,6	-0,2	-0,4	-0,8	-0,1
AnC(K)180	-10,7	1,2	4,1	-2,7	31,1	26,9	45,4	7,5	-2,1	-2,2
AnS(K)018	21,1	15,4	12,0	-0,1	0,4	-7,2	1,6	-10,8	2,8	10,0
AnS(K)046	23,5	17,7	20,3	-10,1	-10,7	6,2	-8,5	24,1	-7,6	1,4
AnS(K)052	22,0	26,3	7,9	-11,4	-8,3	1,2	3,1	-20,9	-0,7	-0,9
AnS(K)058	20,6	25,5	29,2	-10,7	-8,0	2,5	3,5	-21,7	5,8	-3,9
AnS(K)073	21,3	24,2	15,5	-7,6	-4,9	-2,0	3,1	-15,4	0,6	0,0
AnS(K)103	17,5	12,4	2,5	22,6	20,9	-34,2	2,7	5,9	-4,0	-7,8
AnS(K)109	17,9	13,2	4,0	16,4	15,0	-25,9	2,0	1,9	-2,5	0,0
AnS(K)115	18,6	10,8	4,6	20,0	18,3	-30,9	2,1	4,8	-3,2	-0,3
AnS(K)120	18,3	31,9	22,7	-11,0	-10,0	5,9	-5,7	20,2	-7,7	4,2
AnS(K)125	18,3	26,4	22,1	-7,0	-4,3	0,1	4,3	-18,7	5,4	-7,6
AnS(K)130	19,2	29,4	19,5	-10,6	-9,7	5,5	-5,7	19,4	-7,7	3,8
ChB(K)194	22,0	23,1	-46,0	-7,6	-5,1	0,6	-0,1	-1,0	-1,4	-2,8
ChB(K)199	16,3	29,3	-35,7	-6,2	-4,3	3,5	-1,8	9,9	-1,1	0,8
ChB(K)203	17,7	37,3	-62,4	-8,9	-4,4	-0,2	3,4	-8,7	-3,5	1,5
ChH(K)206	14,7	14,2	-3,5	2,3	1,1	3,0	-5,7	23,8	33,3	-4,7
ChT(K)135	45,8	-43,4	-1,6	-5,7	-6,9	4,1	-4,2	3,1	-4,1	-11,7
ChT(K)141	45,9	-42,7	-1,4	-5,8	-7,4	4,0	-5,0	4,1	-4,4	-11,6
ChT(K)147	47,4	-47,5	-3,3	-3,2	-5,0	0,4	-3,2	-4,0	-1,1	-2,8
ChT(K)153	39,9	-36,3	-2,5	0,6	-0,4	-1,0	-0,4	-3,1	1,7	8,5
ChT(K)159	42,0	-39,0	-2,8	0,0	-2,3	-2,2	-3,1	-3,6	1,5	6,6
ChT(K)165	31,7	-24,3	-1,4	3,9	5,2	-1,1	4,6	-1,5	5,1	19,4
ChT(K)170	33,6	-29,9	-1,4	-0,2	4,8	6,3	9,8	-0,3	0,7	1,3
SPV(K)185	8,0	16,8	0,6	34,0	35,8	39,6	-38,5	-10,9	-3,0	-0,5

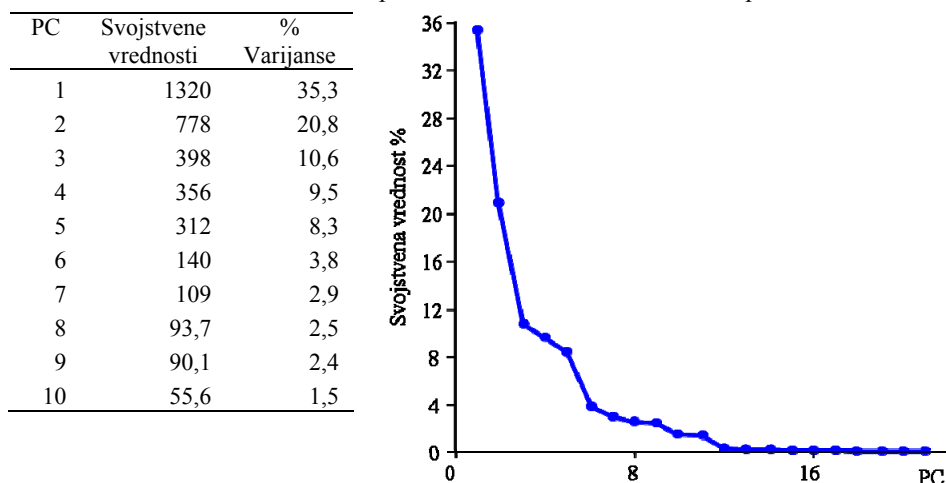
PCA rezultata headspace-GC-MS analize korena – biplotovi za PC1 vs. PC2 i PC1 vs. PC3.



PCA rezultata headspace-GC-MS analize korena – biplotovi za PC1 vs. PC3 nakon selekcije varijabli.



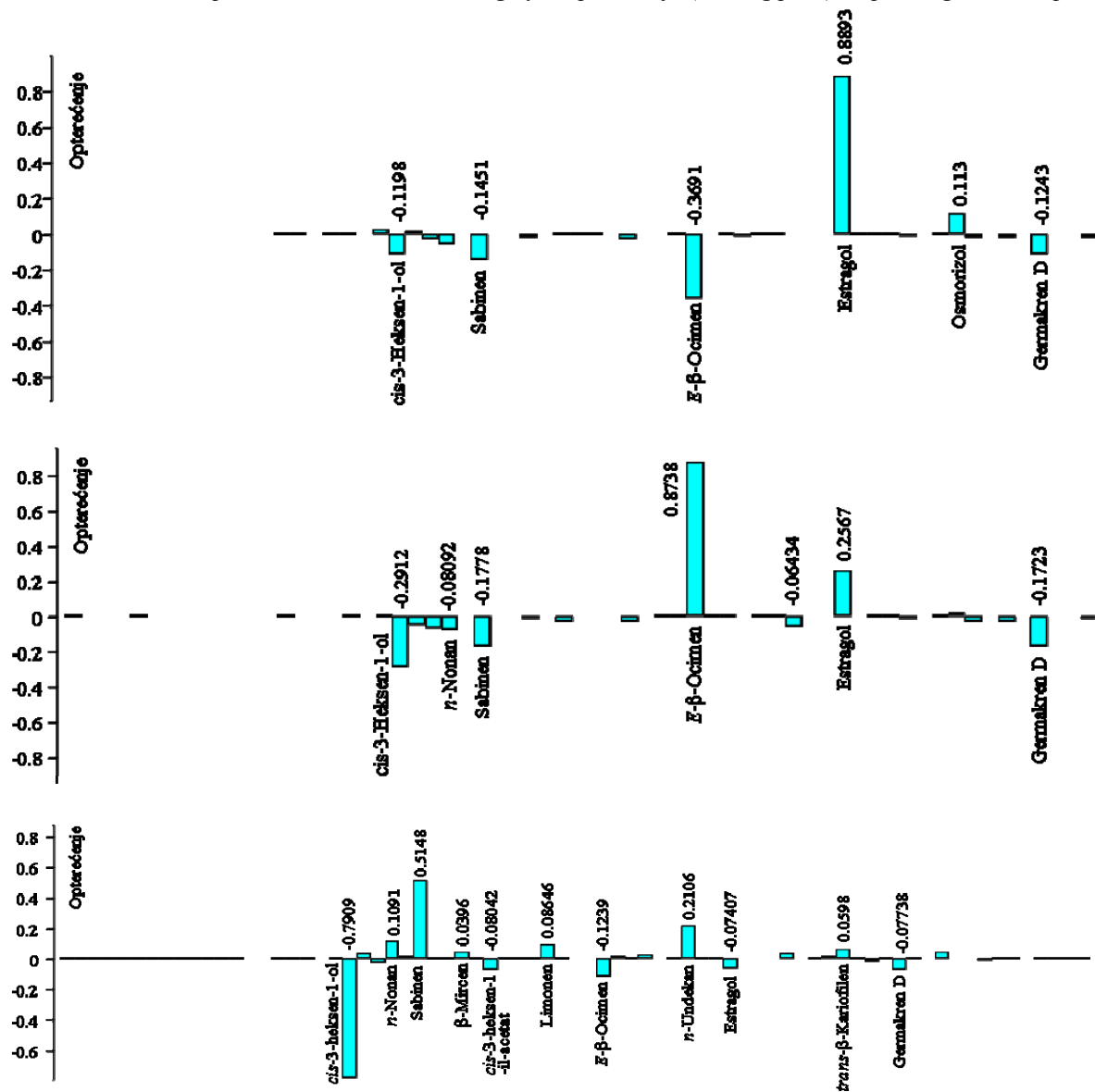
PCA rezultata headspace-GC-MS analize lista – scree plot.



PCA rezultata headspace-GC-MS analize lista – opterećenja (loadings) na prvih 10 glavnih komponenti.

	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	PC7	PC8	PC9	PC10
<i>cis</i> -3-Heksen-1-ol	-0.120	-0.291	-0.791	0.320	0.077	-0.213	-0.079	0.045	-0.151	-0.003
<i>trans</i> -2-Heksen-1-ol	0.012	-0.057	0.035	0.163	-0.006	0.035	0.120	0.062	0.365	0.325
Heksanol	-0.034	-0.067	-0.034	0.120	-0.010	0.008	0.075	0.002	0.285	0.014
<i>n</i> -Nonan	-0.062	-0.081	0.109	0.143	0.014	0.033	0.080	-0.176	0.694	-0.128
Sabinen	-0.145	-0.178	0.515	0.465	-0.313	-0.376	-0.102	0.216	-0.287	0.094
β -Mircen	-0.021	-0.012	0.040	-0.028	-0.049	-0.014	-0.007	0.000	-0.064	-0.438
<i>cis</i> -3-Heksen-1-il-acetat	0.000	-0.036	-0.080	0.032	0.013	0.055	0.142	0.059	-0.071	0.045
Limonen	-0.029	-0.033	0.086	0.038	-0.034	0.149	0.027	-0.697	-0.272	0.131
<i>E</i> - β -Ocimen	-0.369	0.874	-0.124	0.053	-0.024	-0.141	-0.015	0.042	-0.012	0.050
α -Terpinolen	-0.012	-0.009	0.023	-0.014	-0.005	0.130	0.027	-0.475	-0.181	0.049
<i>n</i> -Undekan	-0.002	-0.064	0.211	-0.198	0.819	-0.325	-0.053	0.049	-0.085	0.031
Estragol	0.889	0.257	-0.074	0.045	-0.113	-0.214	-0.131	-0.009	0.004	0.015
<i>n</i> -Tridekan	-0.014	-0.019	0.031	-0.027	0.033	0.618	-0.602	0.281	-0.063	0.073
Osmorizol	0.113	0.016	0.017	-0.017	0.046	0.352	0.720	0.325	-0.251	0.028
<i>trans</i> - β -Kariofilen	-0.021	-0.034	0.060	-0.132	0.163	-0.042	-0.086	0.038	0.011	0.076
α -Humulen	-0.024	-0.035	-0.023	-0.170	-0.085	-0.054	-0.003	0.015	0.019	0.180
Germakren D	-0.124	-0.172	-0.077	-0.721	-0.407	-0.257	-0.006	0.073	0.031	0.131
<i>E,E</i> - α -Farnezen	-0.028	-0.016	0.042	-0.053	-0.060	-0.002	-0.002	0.001	-0.024	-0.763

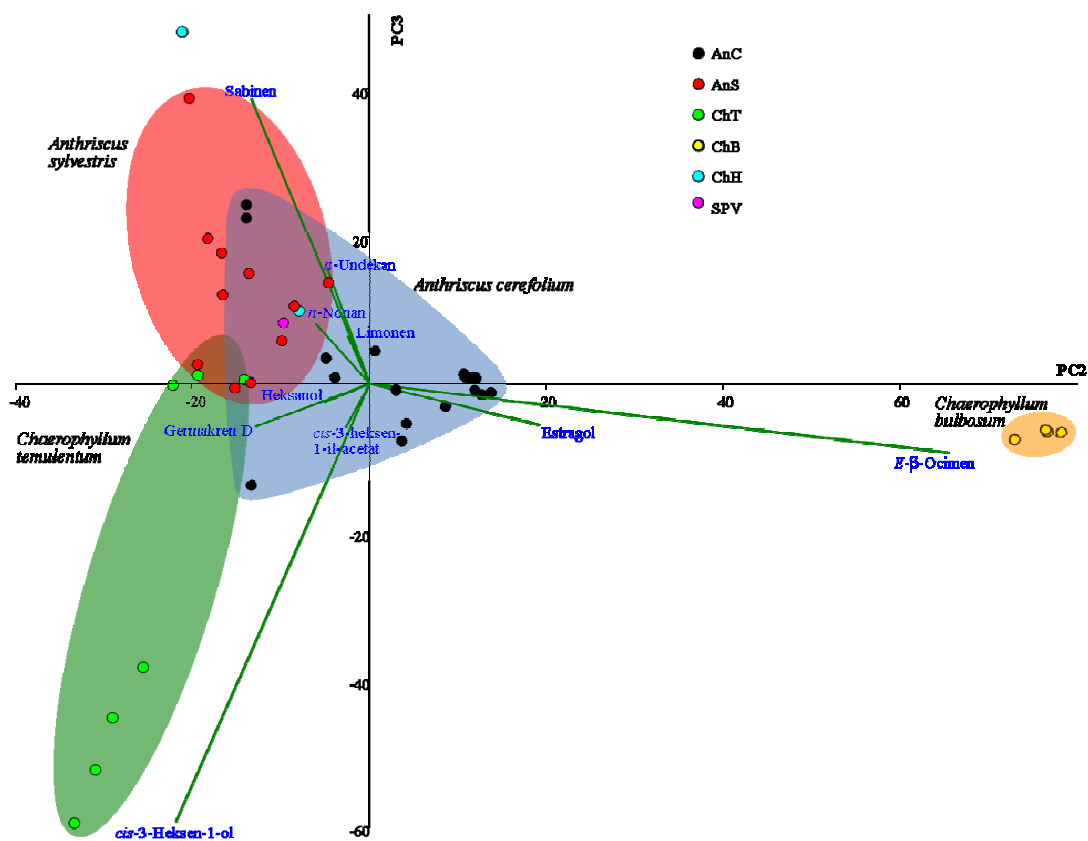
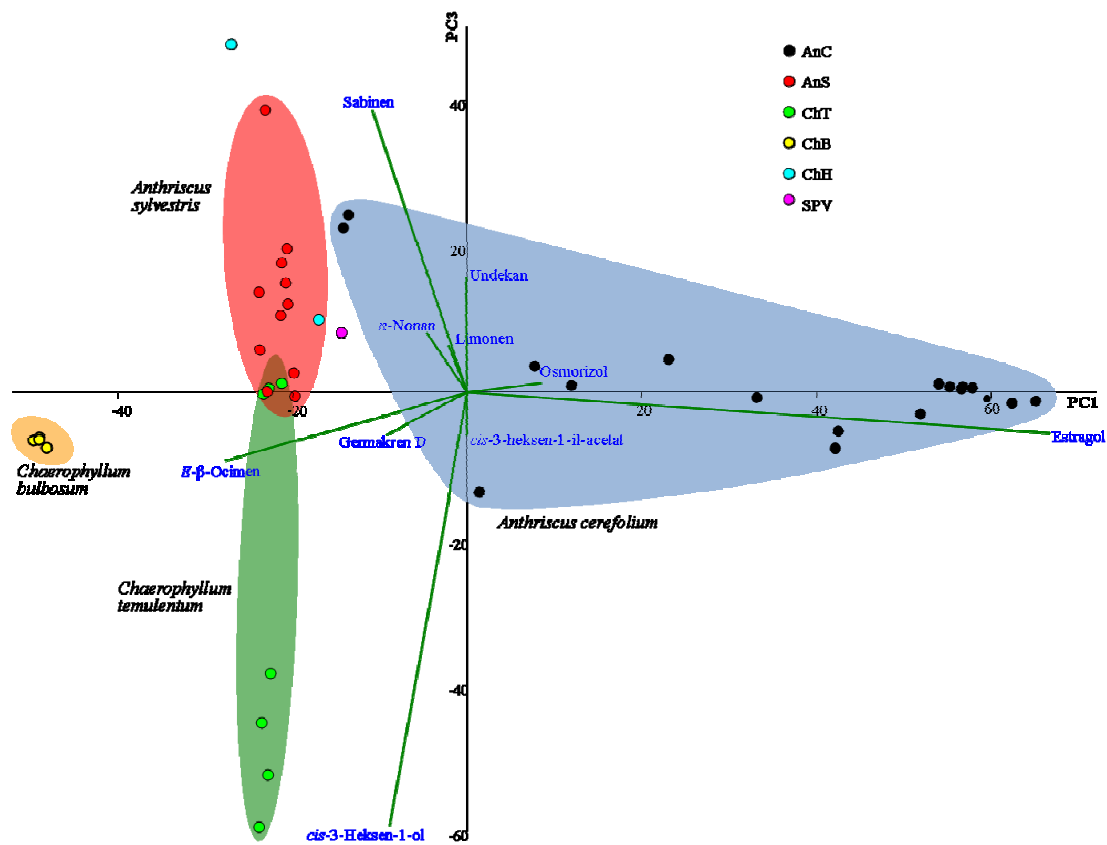
PCA rezultata headspace-GC-MS analize lista – grafici opterećenja (loading plots) na prve 3 glavne komponente.



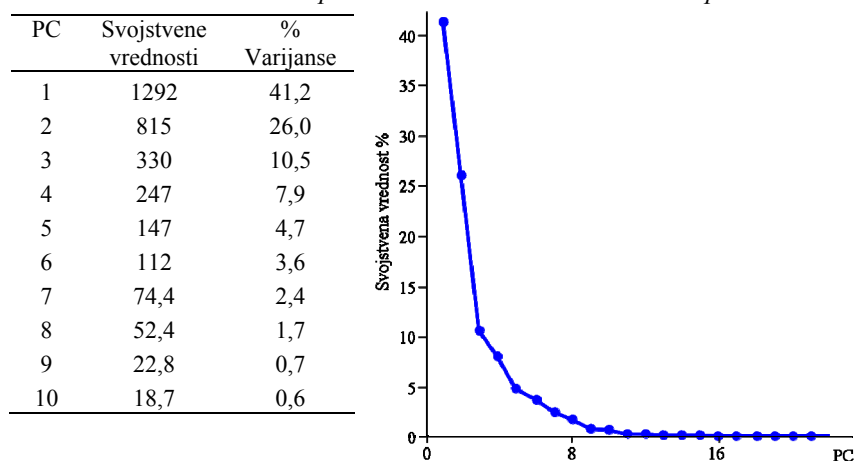
PCA rezultata headspace-GC-MS analize lista – skorovi na prvih 10 glavnih komponenti.

	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	PC7	PC8	PC9	PC10
AnC(L)004	62.3	12.8	-1.6	1.3	-4.9	-6.2	-7.8	-2.9	1.8	-0.2
AnC(L)009	65.1	13.8	-1.2	0.5	-4.0	-6.4	-7.0	-2.3	0.0	-1.0
AnC(L)014	7.7	-5.0	3.3	-1.7	7.1	20.7	30.8	11.4	-6.1	1.7
AnC(L)026	56.5	11.3	0.4	-0.6	-1.9	-0.8	0.9	0.9	-2.2	-1.1
AnC(L)032	55.2	10.8	0.7	-0.9	-0.7	-0.6	1.4	1.1	-2.5	-1.2
AnC(L)038	51.8	8.5	-3.2	3.0	-3.5	-3.9	-5.1	-2.1	4.0	1.1
AnC(L)043	53.9	10.6	1.1	-1.5	-1.9	3.1	7.5	3.4	-4.8	-1.3
AnC(L)065	59.5	12.0	-1.0	1.5	-5.0	-5.1	-6.8	-2.7	3.0	0.4
AnC(L)070	57.8	12.0	0.6	-0.3	-3.4	-4.8	-6.5	-2.5	1.1	-0.7
AnC(L)081	11.9	-4.0	0.6	-0.2	5.3	15.9	22.7	8.1	-4.7	1.7
AnC(L)086	33.1	2.9	-0.9	1.1	0.2	6.3	8.9	3.0	-0.9	1.0
AnC(L)091	42.4	4.0	-5.5	3.1	0.7	-4.6	-5.7	-1.8	4.0	2.0
AnC(L)096	42.0	3.5	-7.9	3.0	1.2	-4.8	-5.2	-1.5	0.9	0.1
AnC(L)101	1.3	-13.4	-13.9	10.4	8.7	2.5	2.2	1.2	9.1	9.2
AnC(L)017	22.9	0.6	4.3	-4.3	6.8	16.9	27.4	11.1	-10.2	-0.6
AnC(L)070	56.6	11.6	0.6	-0.4	-3.3	-4.5	-6.4	-2.6	1.2	-0.8
AnC(L)178	-14.2	-13.9	22.3	-18.9	63.4	-11.3	-3.7	-0.6	0.9	-0.4
AnC(L)183	-13.6	-14.0	24.2	-22.2	74.5	-16.2	-4.6	1.4	-6.3	0.6
AnS(L)021	-20.7	-18.2	19.5	22.5	-7.7	-2.9	1.6	5.3	6.0	6.4
AnS(L)049	-20.0	-19.4	2.5	18.7	-1.9	0.8	2.3	-1.0	4.1	6.0
AnS(L)055	-21.3	-16.7	17.5	19.9	-4.9	-0.9	1.9	0.2	13.0	1.0
AnS(L)061	-20.6	-16.5	12.0	18.5	-3.4	0.2	1.9	0.4	13.1	2.2
AnS(L)076	-20.9	-13.6	14.8	17.6	-3.8	0.0	2.1	1.4	11.8	4.3
AnS(L)106	-24.0	-4.6	13.6	-11.1	-13.7	-2.1	-1.1	2.5	-6.0	-29.4
AnS(L)118	-21.5	-8.5	10.4	-17.3	-12.8	0.6	-0.2	-0.1	-3.9	-28.9
AnS(L)123	-23.1	-20.2	38.5	25.9	-15.2	-5.1	-2.4	-11.2	-10.0	2.0
AnS(L)128	-19.9	-15.2	-0.7	7.9	6.1	8.4	5.3	-10.2	37.4	-8.7
AnS(L)133	-22.9	-13.4	0.0	0.8	-2.7	0.8	1.4	-5.1	12.3	-7.1
AnS(L)189	-23.8	-9.8	5.6	18.3	-4.0	-2.4	0.1	2.6	2.5	1.7
ChB(DL)195	-48.0	73.0	-7.6	2.2	0.7	-1.9	-0.3	0.7	-0.5	1.4
ChB(GL)196	-49.0	76.5	-6.4	1.6	0.5	-2.0	-0.2	0.7	-0.5	1.6
ChB(GL)200	-49.0	76.6	-6.6	1.8	0.6	-2.0	-0.3	0.7	-0.6	1.7
ChB(L)204	-49.6	78.2	-6.7	1.7	0.6	-2.1	-0.2	0.8	-0.5	1.7
ChH(L)207	-17.0	-7.9	9.8	-4.8	-0.9	21.3	3.4	-52.2	-18.9	5.2
ChH(L)209	-26.9	-21.0	47.5	31.4	-24.9	-21.1	-7.3	15.0	-23.2	4.7
ChT(L)138	-22.7	-14.1	0.4	-48.6	-21.2	-5.1	0.1	1.6	2.9	7.8
ChT(L)144	-23.2	-22.1	-0.3	-62.5	-28.7	-9.2	0.1	2.8	3.4	8.9
ChT(L)150	-21.2	-19.3	1.1	-51.0	-21.1	-5.0	0.0	1.7	3.0	8.8
ChT(L)156	-22.4	-25.5	-38.5	1.5	-0.1	-3.0	0.1	1.4	-6.3	0.0
ChT(L)162	-23.5	-28.9	-45.3	3.4	0.0	-6.0	-2.4	1.2	-6.3	-0.2
ChT(L)168	-22.8	-30.8	-52.3	16.4	6.0	-4.8	-3.2	0.5	-7.3	-2.1
ChT(L)173	-23.8	-33.2	-59.6	18.6	6.7	-6.8	-4.0	1.1	-10.2	-1.9
SPV(L)187	-14.3	-9.6	8.1	-6.3	6.5	54.6	-41.4	16.5	-3.6	2.5

PCA rezultata headspace-GC-MS analize lista – biplotovi za PC1 vs. PC3 i PC2 vs. PC3.



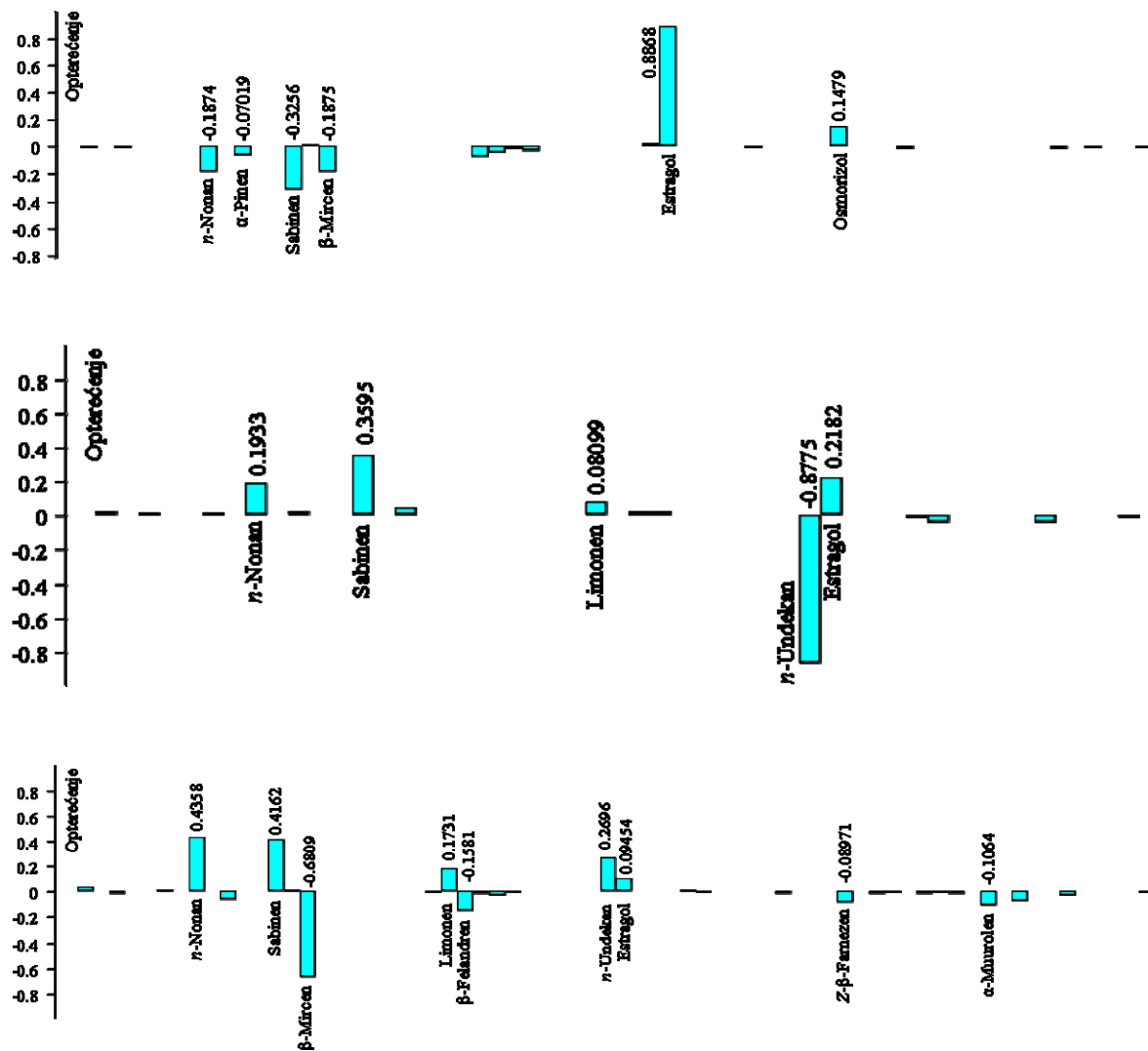
PCA rezultata headspace-GC-MS analize stabla – scree plot.



PCA rezultata headspace-GC-MS analize stabla – opterećenja (loadings) na prvih 10 glavnih komponenti.

	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	PC7	PC8	PC9	PC10
<i>cis</i> -3-heksen-1-ol	-0,009	0,012	-0,022	-0,006	0,006	-0,003	-0,003	-0,046	0,008	-0,265
<i>n</i> -Nonan	-0,187	0,193	0,436	0,004	-0,542	0,398	0,395	0,172	0,091	0,046
α -Pinen	-0,070	0,026	-0,063	-0,054	-0,006	0,061	-0,009	-0,085	-0,417	0,785
Sabinen	-0,326	0,360	0,416	-0,172	0,685	-0,118	0,064	0,026	0,024	0,009
β -Mircen	-0,188	0,047	-0,681	-0,232	0,137	0,238	0,132	0,489	0,171	0,032
Limonen	-0,073	0,081	0,173	0,016	-0,189	0,023	-0,861	0,346	0,097	0,056
β -Felandren	-0,040	0,000	-0,158	-0,028	-0,054	0,002	-0,088	-0,532	0,331	0,273
<i>Z</i> - β -Ocimen	-0,023	0,021	-0,022	-0,017	0,014	0,028	0,092	0,057	0,119	0,039
<i>E</i> - β -Ocimen	-0,031	0,026	-0,032	-0,011	-0,026	0,014	0,013	-0,160	0,235	-0,148
<i>n</i> -Undekan	0,018	-0,878	0,270	-0,198	0,173	0,109	0,043	0,110	0,055	0,046
Estragol	0,887	0,218	0,095	-0,262	0,095	0,069	0,049	0,106	0,042	0,066
<i>n</i> -Tridekan	-0,007	-0,042	-0,010	0,051	-0,245	-0,835	0,208	0,249	0,060	0,094
Osmorizol	0,148	-0,046	-0,027	0,894	0,249	0,136	0,069	0,136	0,045	0,078
<i>Z</i> - β -Farnezen	-0,017	-0,008	-0,090	-0,013	-0,054	0,017	-0,047	-0,158	-0,373	-0,113
α -Humulen	-0,004	0,001	-0,023	-0,001	-0,015	0,001	-0,012	-0,053	0,035	-0,101
Kurkumen	-0,003	0,000	-0,016	-0,001	-0,011	0,001	-0,008	-0,031	-0,048	-0,070
Germakren D	-0,005	0,002	-0,024	-0,002	-0,009	-0,001	-0,011	-0,041	-0,062	-0,129
<i>n</i> -Pentadekan	-0,003	-0,005	-0,007	0,014	-0,054	-0,177	0,044	0,054	0,003	0,032
α -Muurolen	-0,022	-0,004	-0,106	-0,015	-0,062	0,025	-0,036	-0,120	-0,514	-0,312
β -Bisabolen	-0,015	-0,002	-0,075	-0,003	-0,059	-0,005	-0,067	-0,360	0,367	0,004
δ -Kadinen	-0,008	0,000	-0,033	-0,002	-0,031	0,007	-0,012	-0,073	-0,198	-0,141

PCA rezultata headspace-GC-MS analize stabla – grafici opterećenja (loading plots) na prve 3 glavne komponente

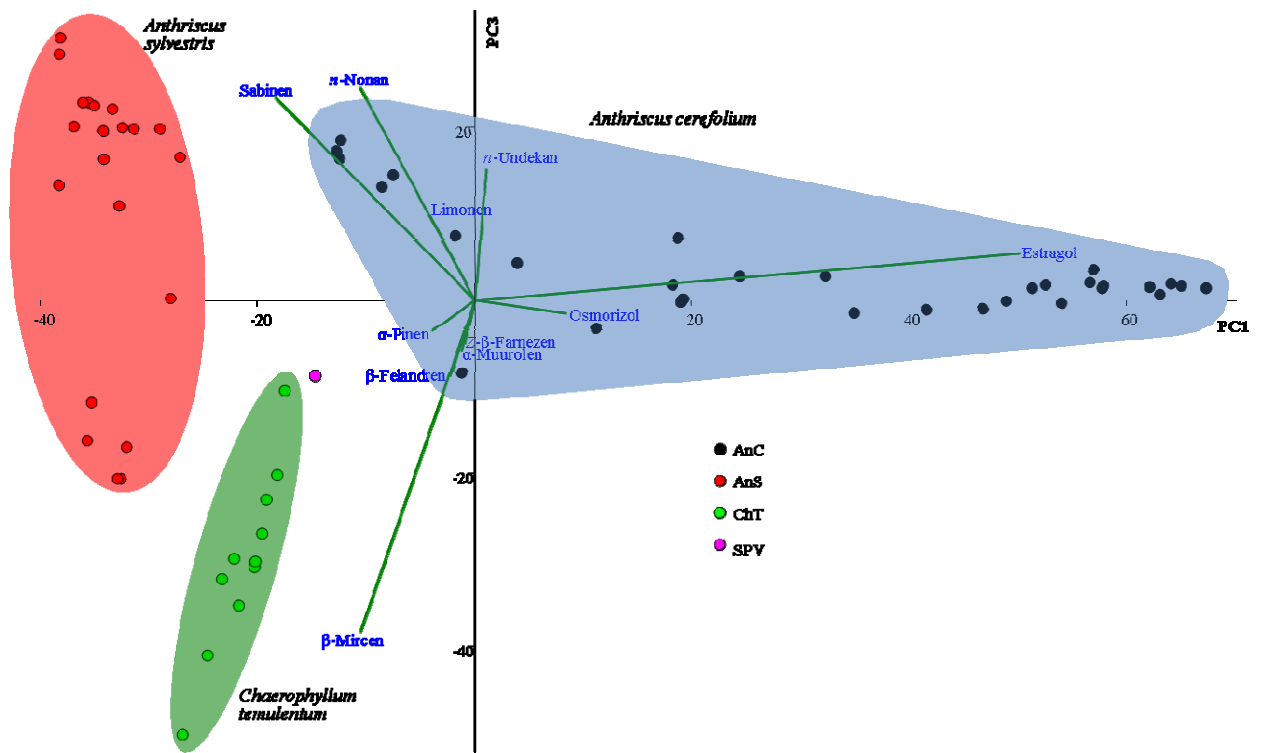
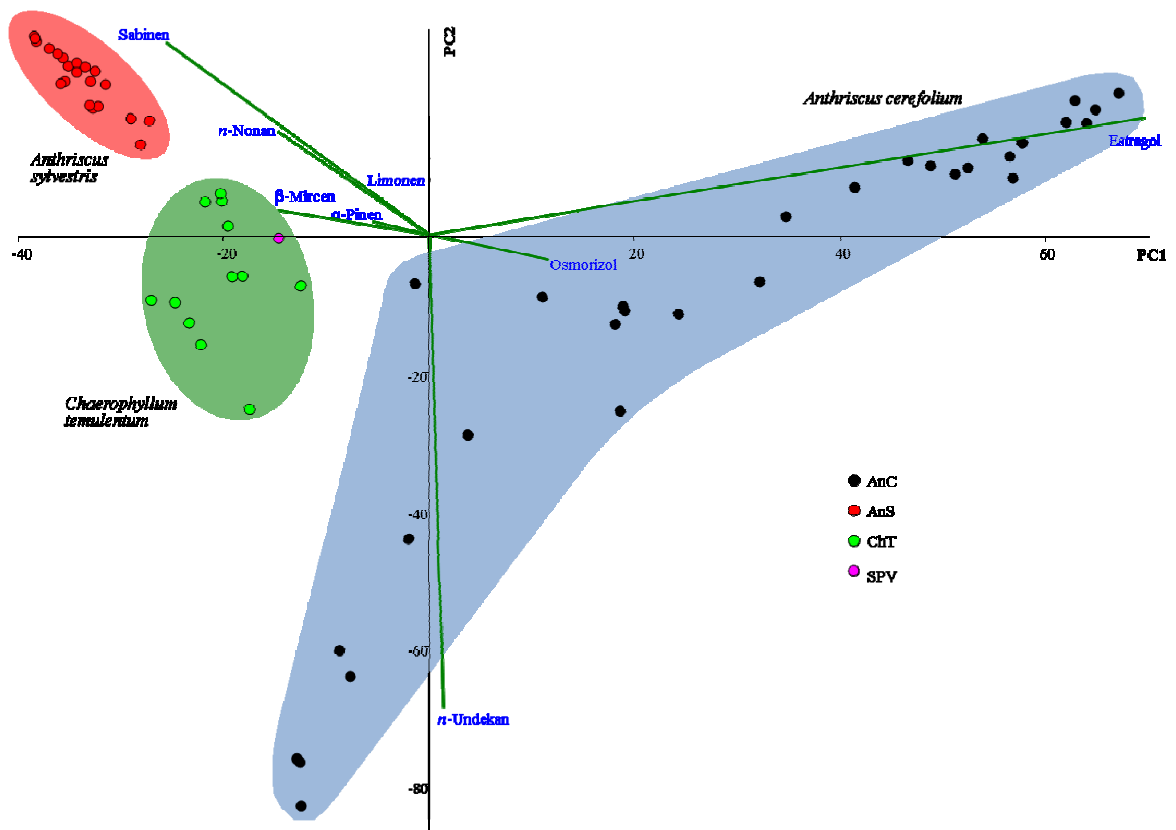


PCA rezultata headspace-GC-MS analize stabla – skorovi na prvih 10 glavnih komponenti.

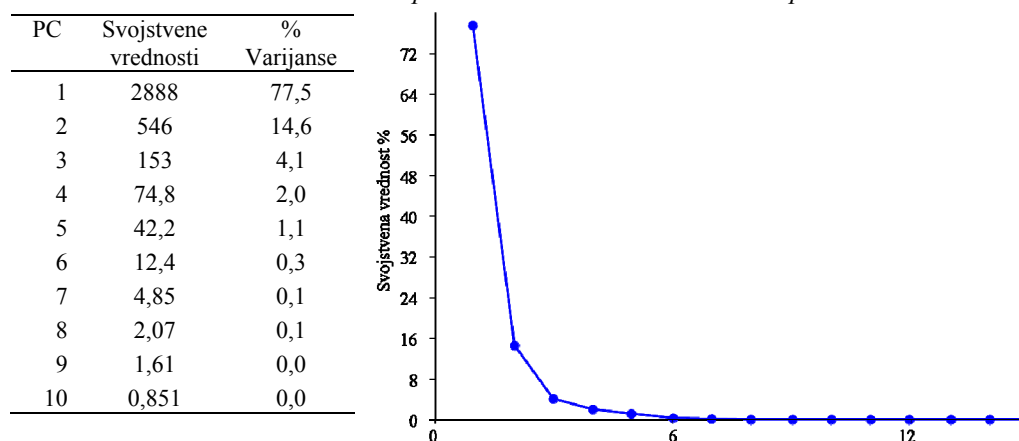
	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	PC7	PC8	PC9	PC10
AnC(DS)002	56,5	11,5	1,9	-10,3	-0,3	0,2	0,1	0,2	0,0	0,2
AnC(DS)007	57,7	13,3	1,6	-14,3	-1,2	-0,7	-0,3	-0,4	-0,2	-0,3
AnC(DS)012	-1,3	-7,2	-8,5	81,4	11,7	5,1	1,4	2,2	0,1	1,1
AnC(DS)024	41,4	6,8	-1,2	15,7	3,3	1,3	0,5	0,9	0,1	0,6
AnC(DS)030	34,7	2,6	-1,6	23,7	4,6	1,8	0,6	1,2	0,2	0,6
AnC(DS)036	57,7	13,5	1,4	-8,1	0,0	0,4	0,2	0,3	0,1	0,3
AnC(DS)041	46,6	10,8	-1,1	11,7	2,6	1,5	0,5	0,8	0,1	0,6
AnC(DS)063	67,2	20,6	1,3	-16,3	-1,2	-0,1	-0,1	0,0	-0,1	0,4
AnC(DS)068	64,9	18,3	1,5	-14,6	-0,8	0,2	0,0	0,1	0,0	0,4
AnC(DS)079	18,9	-10,5	-0,3	29,8	4,9	2,0	0,8	1,1	0,2	0,2
AnC(DS)084	19,1	-11,1	0,1	28,0	4,8	2,3	0,8	1,0	0,2	0,2
AnC(DS)089	18,6	-25,7	7,1	-8,3	-0,9	-1,6	0,1	-0,5	0,2	-1,2
AnC(DS)094	18,2	-13,1	1,7	12,8	1,3	-0,3	0,2	-0,4	-0,1	-0,9
AnC(DS)099	32,2	-6,9	2,7	2,0	0,7	-0,5	0,2	0,1	0,1	-0,3
AnC(DS)176	-12,8	-76,3	17,2	-11,3	3,5	1,6	0,3	0,6	1,2	-1,5
AnC(DS)181	-12,8	-76,6	17,2	-11,3	3,3	0,8	0,5	0,9	1,3	-1,4
AnC(GS)003	56,8	8,2	3,5	-17,0	-1,1	-0,2	0,0	0,0	0,1	-0,1
AnC(GS)008	63,9	16,3	1,8	-15,2	-0,7	-0,3	0,0	0,2	0,0	0,4
AnC(GS)013	11,1	-9,1	-3,3	49,2	7,3	3,5	1,1	1,4	0,2	0,3
AnC(GS)025	53,9	14,0	-0,5	4,0	1,9	0,9	0,4	0,8	0,1	0,7
AnC(GS)031	48,8	10,0	-0,2	5,4	2,0	0,9	0,3	0,6	0,1	0,2
AnC(GS)037	52,5	9,7	1,7	-8,2	-0,4	0,1	0,0	-0,1	0,0	-0,4
AnC(GS)042	51,2	8,9	1,3	-2,5	0,8	0,5	0,3	0,5	0,1	0,2
AnC(GS)064	63,0	19,6	0,6	-11,9	-0,9	0,0	-0,1	-0,2	-0,1	0,0
AnC(GS)069	62,0	16,4	1,5	-12,7	-0,6	0,2	0,0	0,1	0,0	0,1
AnC(GS)080	24,3	-11,6	2,8	4,8	0,8	0,3	-0,1	-0,7	-0,1	-1,8
AnC(GS)085	3,8	-29,3	4,2	17,4	2,6	1,5	0,4	-0,2	0,2	-1,3
AnC(GS)090	-8,7	-60,7	13,1	-9,0	-0,2	-4,0	0,9	0,6	0,8	-1,5
AnC(GS)095	-1,9	-44,4	7,4	7,2	2,8	-1,6	-0,1	0,0	0,3	-1,3
AnC(GS)100	-7,6	-64,4	14,5	-8,5	1,5	-1,2	0,9	0,9	1,1	-1,3
AnC(GS)177	-12,5	-77,1	16,4	-11,1	3,3	-3,1	0,5	1,5	1,4	-1,1
AnC(GS)182	-12,3	-83,3	18,5	-13,0	6,5	4,0	-0,7	0,4	1,3	-1,4
AnS(DS)019	-32,7	22,3	10,7	-2,3	7,6	-2,7	4,3	-10,4	-5,2	10,9
AnS(DS)047	-32,3	23,8	19,9	0,9	-3,9	-2,0	-25,2	4,9	-2,2	4,6
AnS(DS)053	-35,4	25,8	22,7	-1,2	-3,3	4,3	11,3	-3,5	-0,8	1,3
AnS(DS)059	-38,0	28,2	30,3	-2,1	0,1	4,5	14,7	-2,2	-0,7	-0,6
AnS(DS)074	-34,9	24,6	22,3	-1,4	-0,2	2,4	8,8	-4,1	-1,8	1,6
AnS(DS)104	-32,5	18,4	-20,8	-7,9	16,5	-1,4	2,5	5,9	3,5	1,1
AnS(DS)110	-32,0	18,6	-17,2	-6,9	16,2	-2,6	2,4	2,3	4,9	0,3
AnS(DS)116	-35,2	22,3	-12,0	-8,6	23,8	-4,3	2,0	2,7	1,7	2,1
AnS(DS)121	-27,1	16,6	16,5	5,0	-28,3	5,9	-29,8	10,1	2,3	0,7
AnS(DS)126	-28,8	16,8	19,7	4,9	-45,6	21,9	23,7	3,0	2,3	1,5
AnS(DS)131	-31,3	21,8	19,7	2,1	-14,0	2,6	-23,1	7,8	1,7	0,2
AnS(GS)020	-38,3	28,9	13,2	-6,4	26,3	-7,2	4,0	-5,1	-0,1	-0,8
AnS(GS)048	-34,0	25,0	19,5	-2,0	13,0	-6,5	-9,9	-1,8	-1,8	-2,9
AnS(GS)054	-36,8	27,1	19,9	-3,3	8,5	-0,4	9,0	-2,5	-0,6	-1,0
AnS(GS)060	-38,2	28,6	28,4	-3,1	9,1	0,1	11,4	-3,9	-1,6	-1,4
AnS(GS)076	-36,0	26,4	22,7	-2,5	8,2	-1,1	7,0	-4,2	-2,3	-1,7
AnS(GS)105	-32,8	18,8	-20,8	-8,2	17,7	-1,6	2,2	7,5	1,3	-5,8
AnS(GS)111	-35,7	22,0	-16,4	-9,6	23,7	-2,8	2,8	6,5	4,2	-2,8
AnS(GS)122	-33,3	24,4	22,0	0,5	-3,3	-1,2	-22,7	6,1	1,8	-1,5
AnS(GS)127	-28,0	13,1	0,1	1,4	-35,7	19,2	18,6	7,7	3,3	-3,3
AnS(GS)132	-34,1	23,6	16,2	-1,6	-0,3	0,7	-10,4	5,4	1,7	-1,5
ChT(DS)136	-26,9	-9,6	-50,4	-13,2	1,3	11,8	4,4	23,2	2,9	-1,8
ChT(DS)142	-24,6	-10,0	-41,3	-9,9	-1,4	8,3	1,4	10,0	2,7	4,9

	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	PC7	PC8	PC9	PC10
ChT(DS)148	-23,2	-12,9	-32,4	-8,5	-2,3	6,7	0,3	5,5	-7,1	16,7
ChT(DS)154	-18,2	-6,1	-20,3	-0,2	-9,5	-0,8	-4,9	-12,8	-17,7	-5,8
ChT(DS)160	-19,1	-6,1	-23,3	-1,4	-8,9	0,5	-4,3	-10,0	-20,7	-4,8
ChT(DS)166	-17,4	-25,5	-10,6	-3,9	-5,5	0,4	-4,9	-17,5	-0,4	14,1
ChT(DS)171	-22,2	-16,1	-30,0	-8,1	-2,5	5,8	0,0	4,7	-6,4	7,1
ChT(GS)155	-20,3	6,0	-31,0	-0,2	-9,1	0,0	-3,1	-7,4	-2,4	-14,1
ChT(GS)161	-20,2	4,8	-30,4	0,0	-9,9	-0,4	-4,4	-15,1	9,8	-8,3
ChT(GS)167	-19,6	1,3	-27,1	0,4	-11,4	-1,9	-7,2	-31,2	19,0	4,6
ChT(GS)172	-21,7	4,8	-35,4	-2,1	-8,2	1,9	-2,5	-5,7	-1,0	-6,4
SPV(S)186	-14,6	-0,6	-8,9	10,6	-30,7	-75,4	12,2	10,2	0,7	2,0

PCA rezultata headspace-GC-MS analize lista – biplotovi za PC1 vs. PC2 i PC1 vs. PC3.



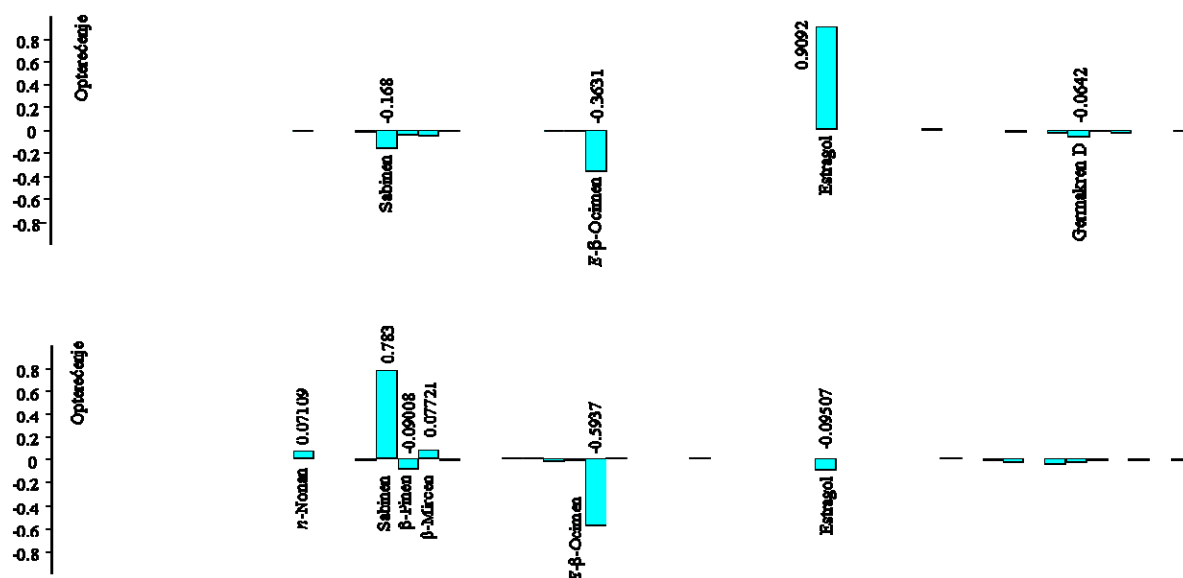
PCA rezultata headspace-GC-MS analize cveta – scree plot.



PCA rezultata headspace-GC-MS analize cveta – opterećenja (loadings) na prve 3 glavne komponente.

	PC1	PC2	PC3
Sabinen	-0,168	0,783	0,460
β -Pinen	-0,039	-0,090	-0,128
β -Mircen	-0,060	0,077	-0,122
<i>E</i> - β -Ocimen	-0,363	-0,594	0,627
γ -Terpinen	-0,015	0,016	0,084
Estragol	0,909	-0,095	0,291
α -Humulen	-0,019	-0,034	-0,149
Farnezen izomer?	-0,035	-0,045	-0,466
Germakren D	-0,064	-0,030	-0,090
<i>E,E</i> - α -Farnezen	-0,029	0,005	-0,065

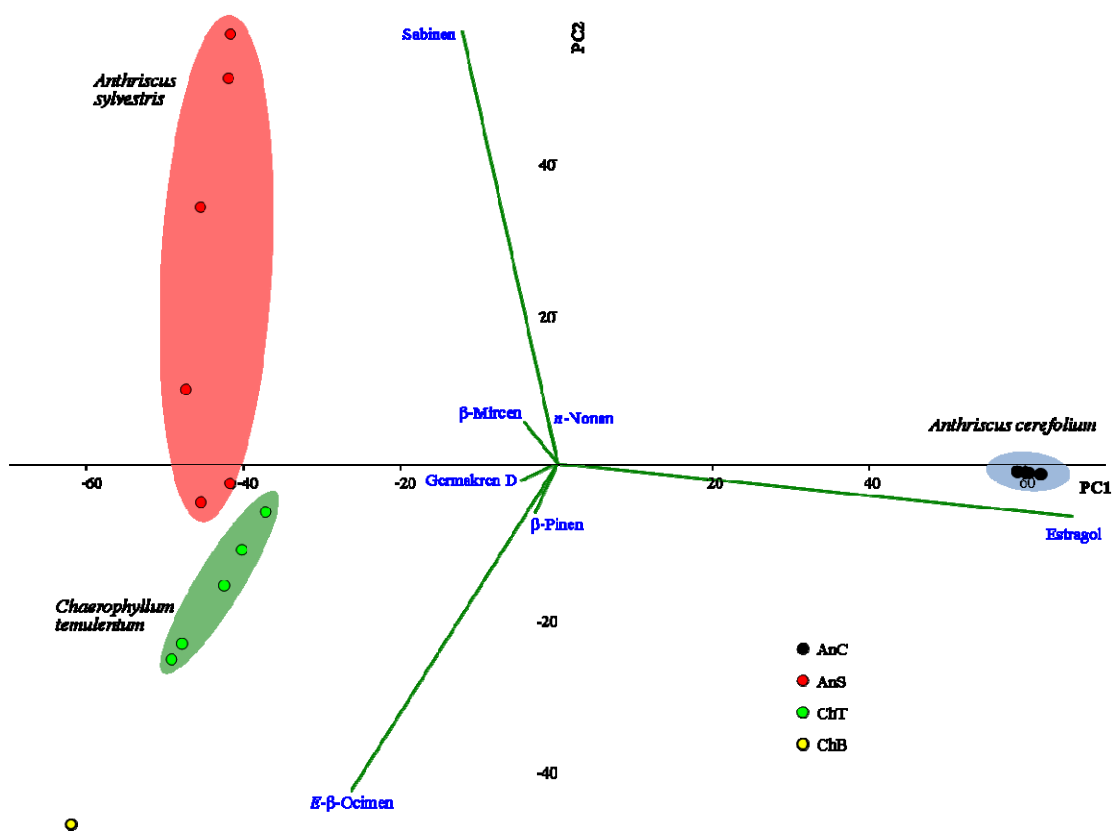
PCA rezultata headspace-GC-MS analize cveta – grafici opterećenja (loading plots) na prve 2 glavne komponente



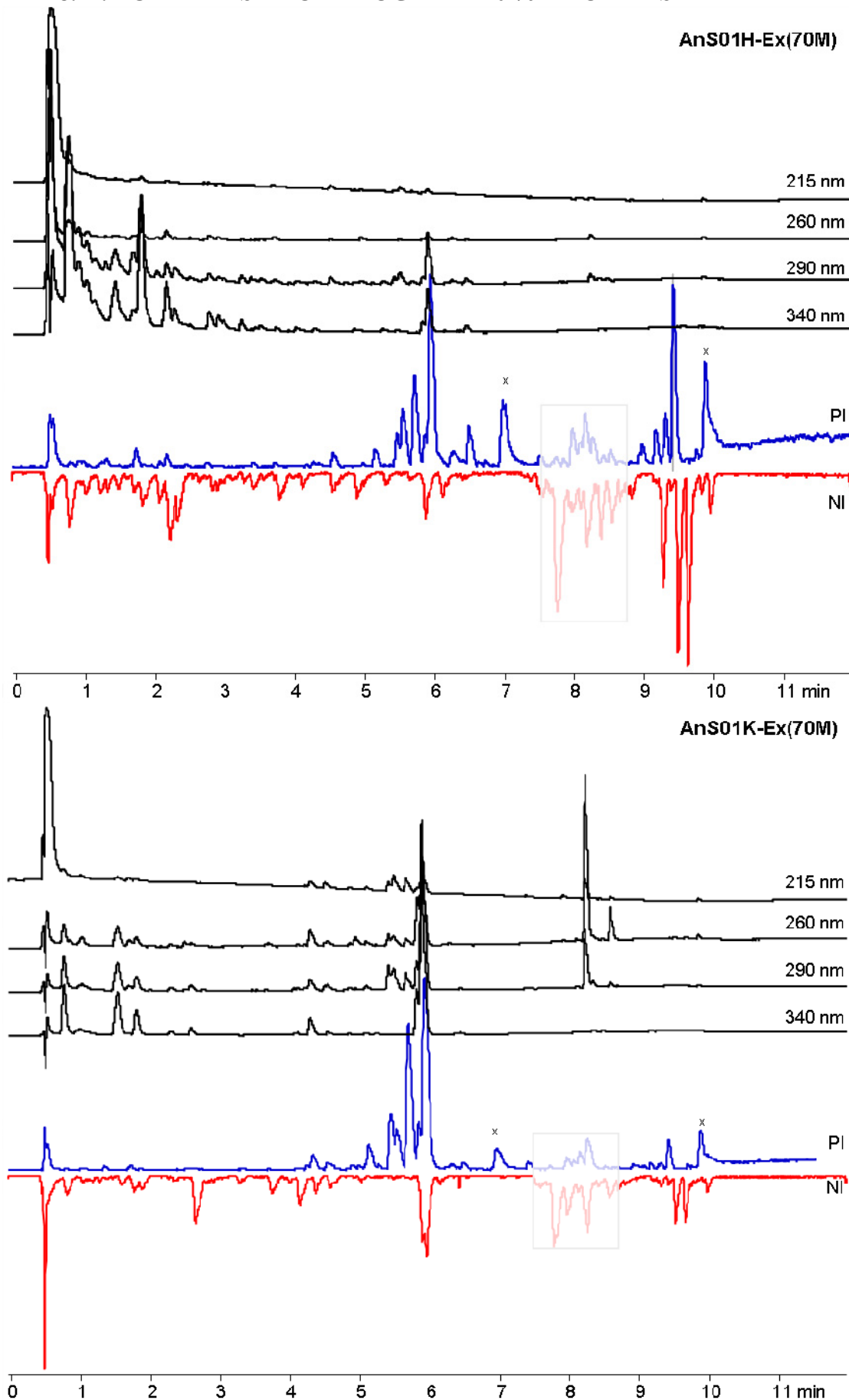
PCA rezultata headspace-GC-MS analize cveta – skorovi na prve 3 glavne komponente.

	PC1	PC2	PC3
AnC(C)005	60,5	-1,2	1,1
AnC(C)015	58,8	-1,1	0,5
AnC(C)027	59,0	-1,0	0,6
AnC(C)033	58,9	-1,0	0,6
AnC(C)039	61,9	-1,3	1,5
AnC(C)044	59,9	-1,2	0,9
AnC(C)071	62,1	-1,4	1,6
AnC(C)071	61,8	-1,3	1,5
AnC(C)66	60,0	-1,2	0,9
AnS(C)022	-41,7	56,3	3,6
AnS(C)050	-45,5	33,6	12,2
AnS(C)056	-42,0	50,5	5,1
AnS(C)077	-47,4	9,6	10,9
AnS(C)107	-45,4	-5,2	-2,8
AnS(C)113	-41,7	-2,7	-11,9
ChB(C)201	-62,0	-47,5	32,3
ChT(C)139	-40,3	-11,4	-14,2
ChT(C)145	-37,3	-6,5	-33,2
ChT(C)151	-42,5	-16,2	-14,9
ChT(C)157	-47,9	-23,9	0,2
ChT(C)163	-49,2	-25,9	3,5

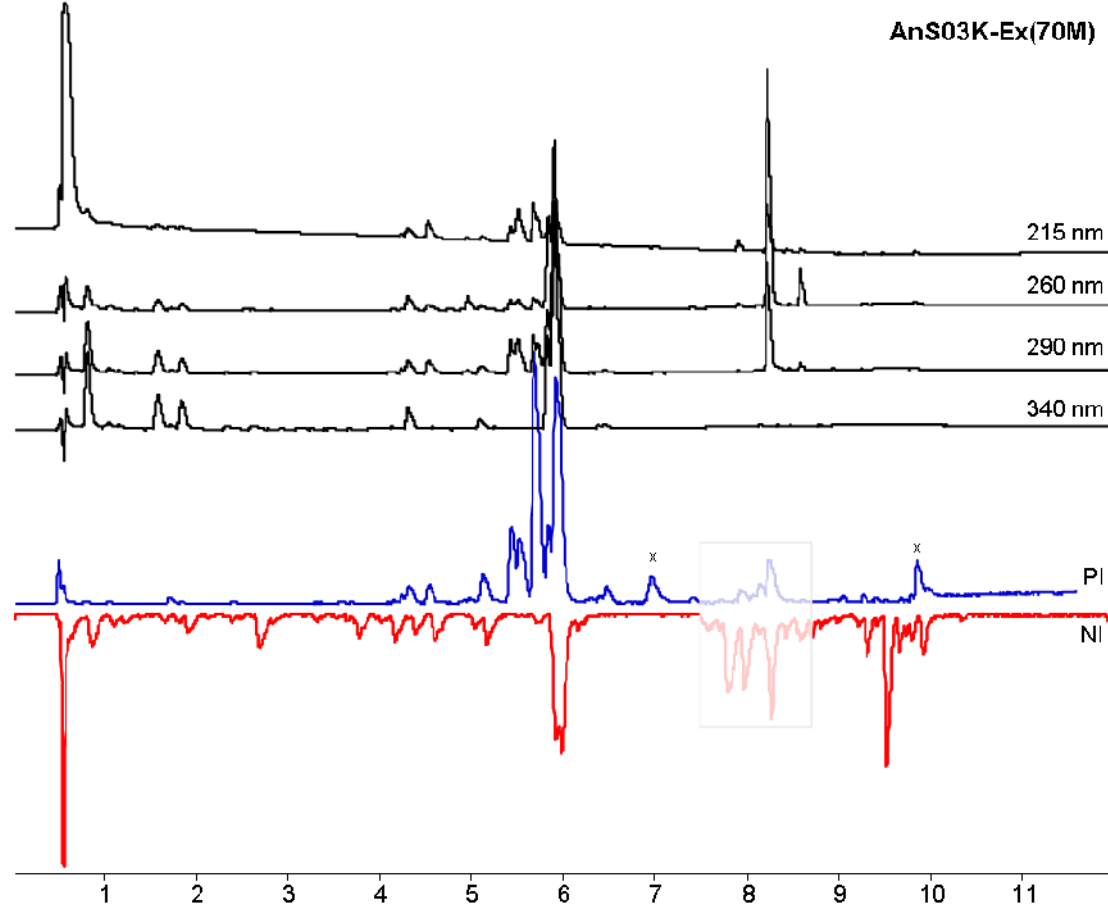
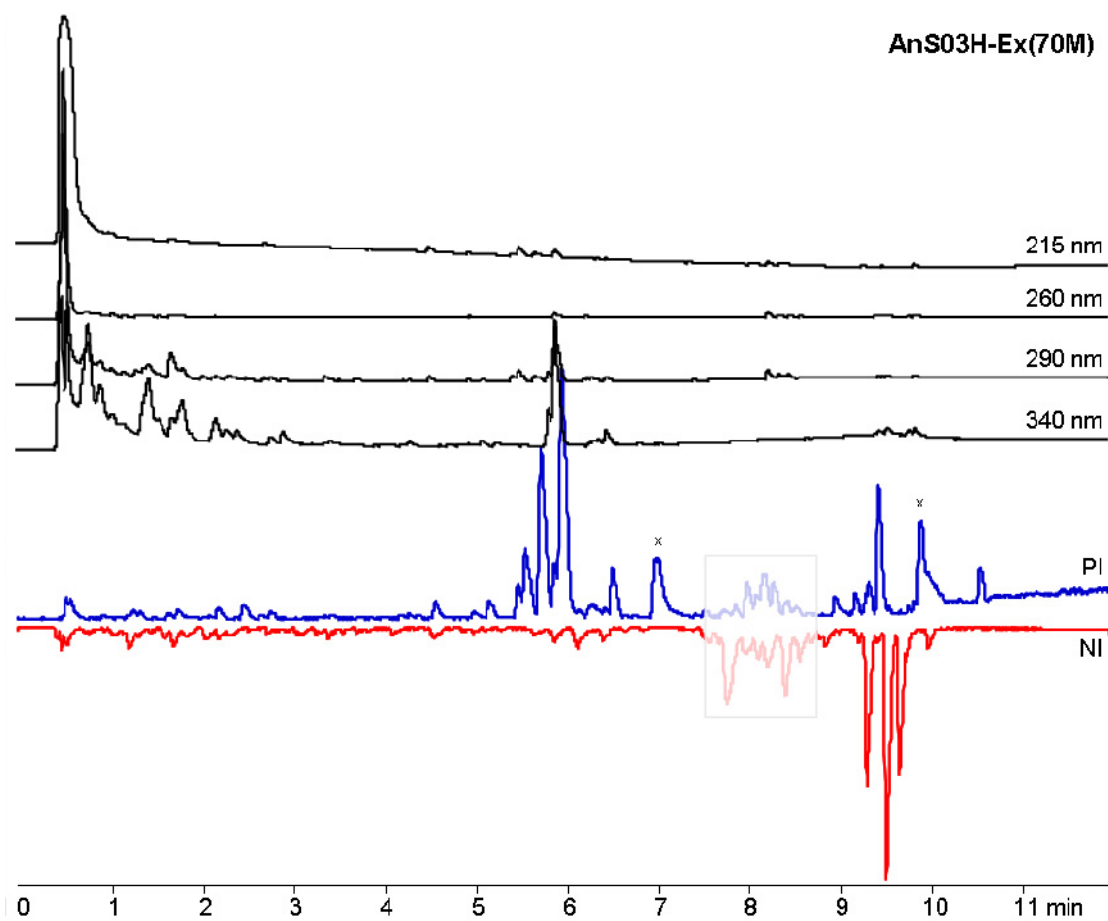
PCA rezultata headspace-GC-MS analize cveta – biplot za PC1 vs. PC2.

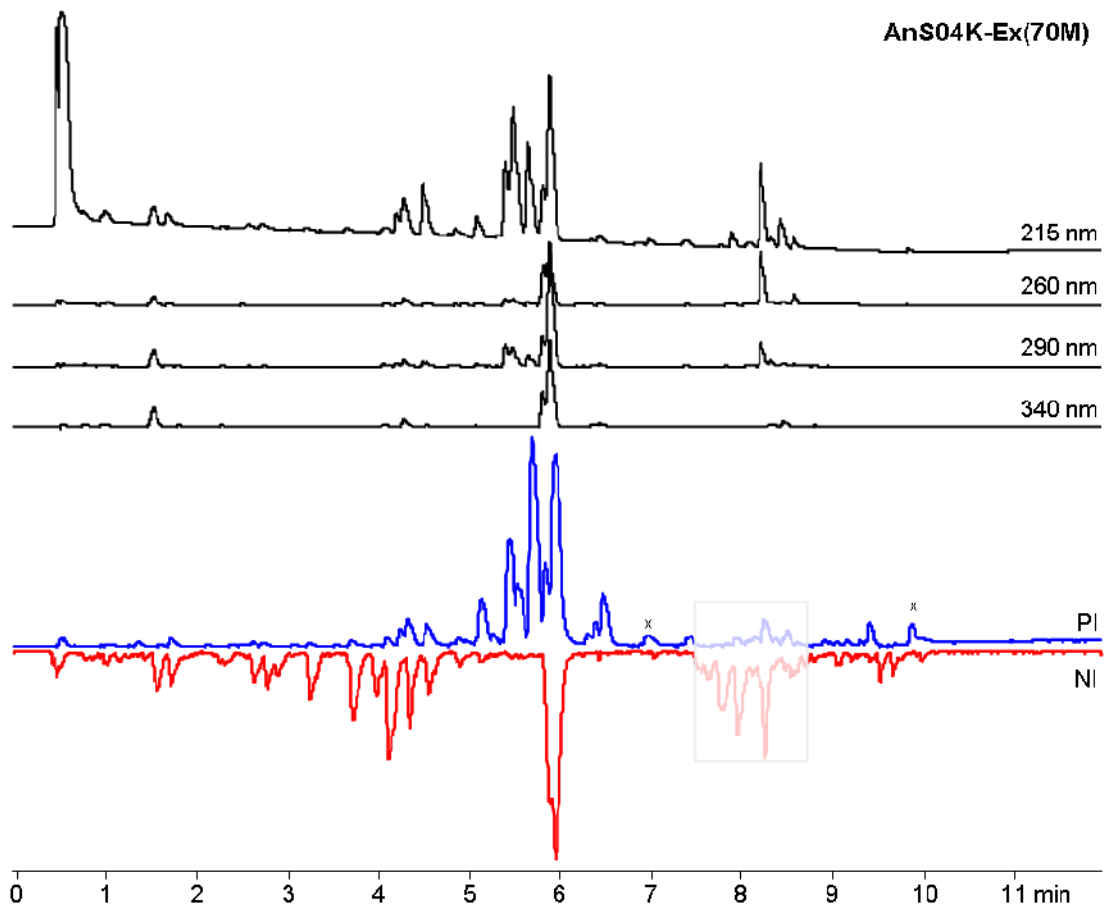
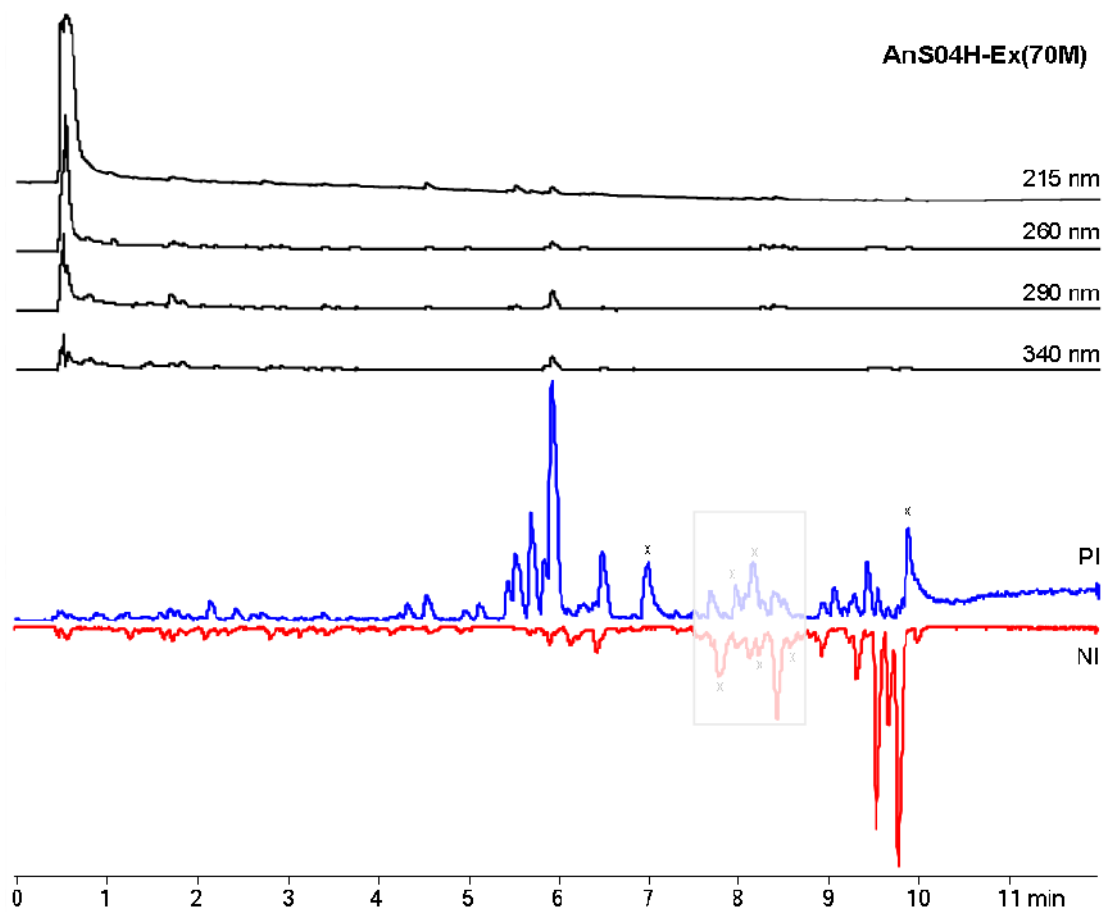


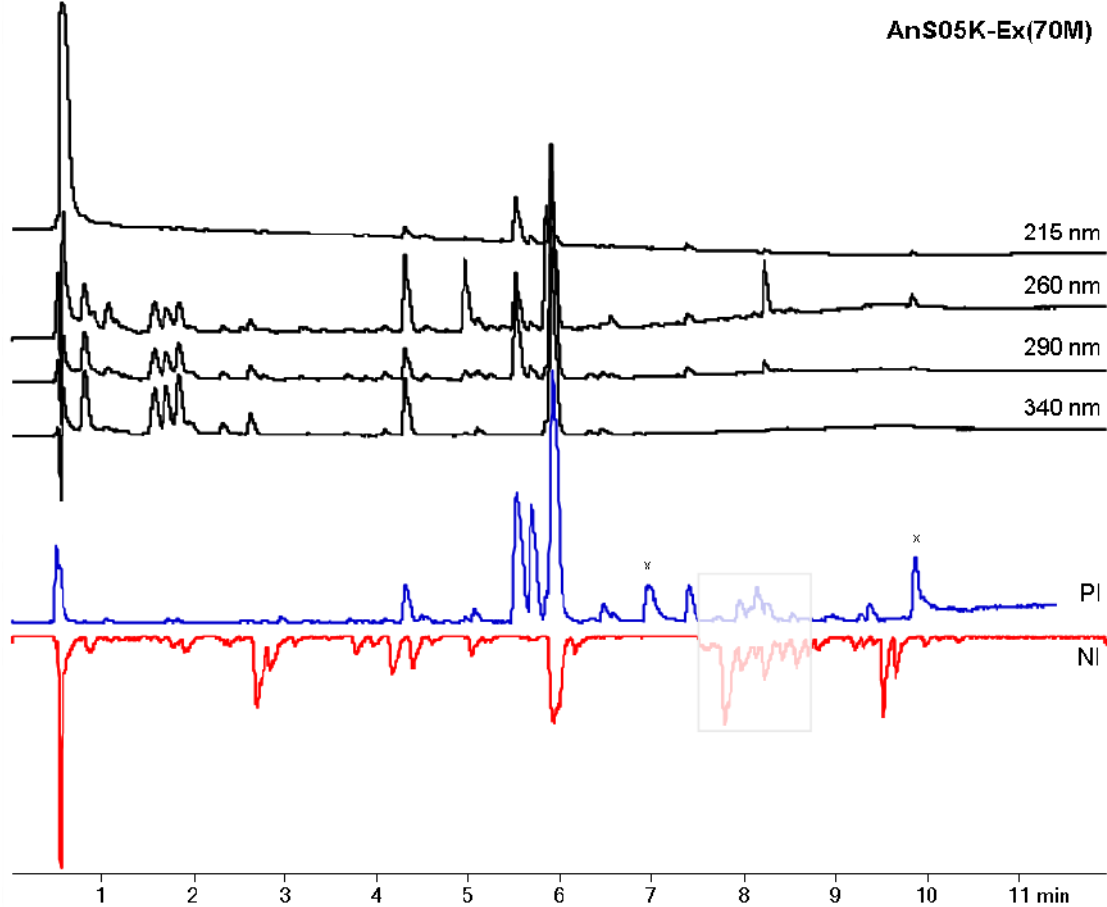
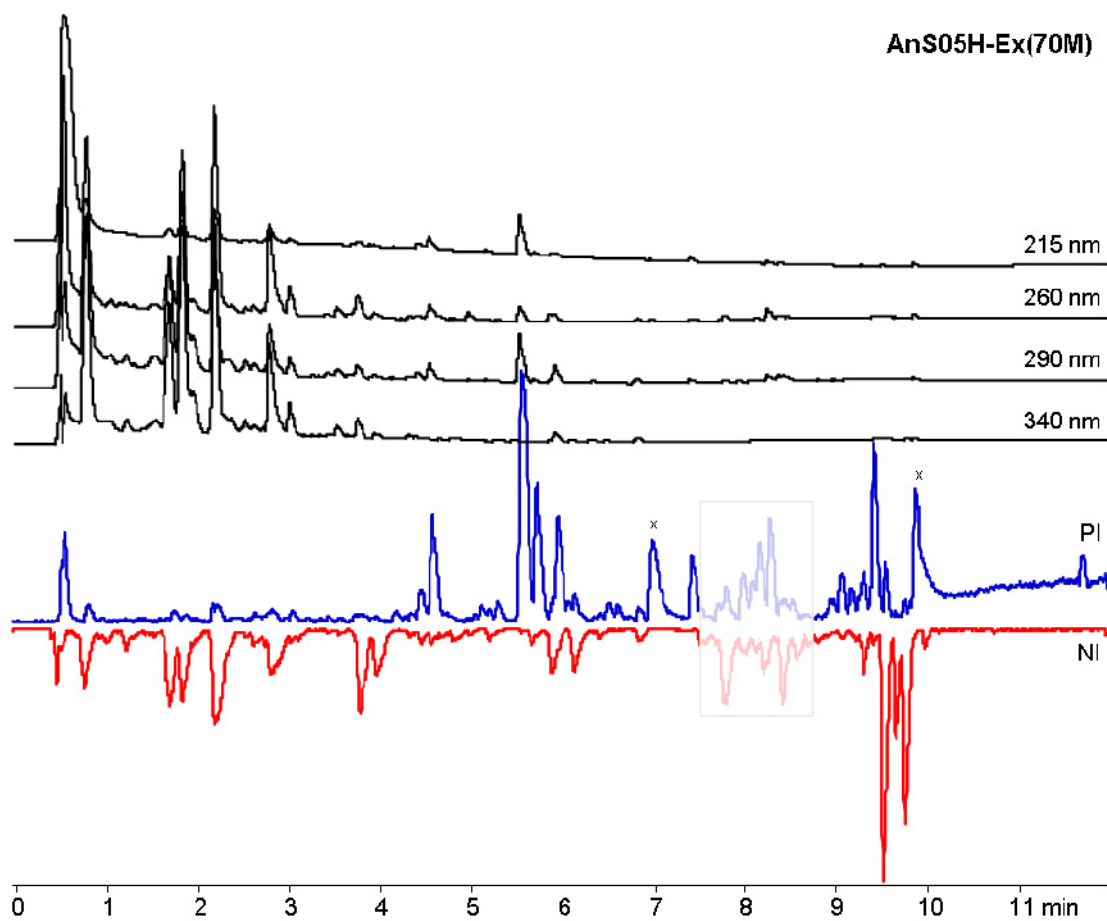
8.11. LC-DAD-MS HROMATOGRAMI 70 % MEOH EKSTRAKATA

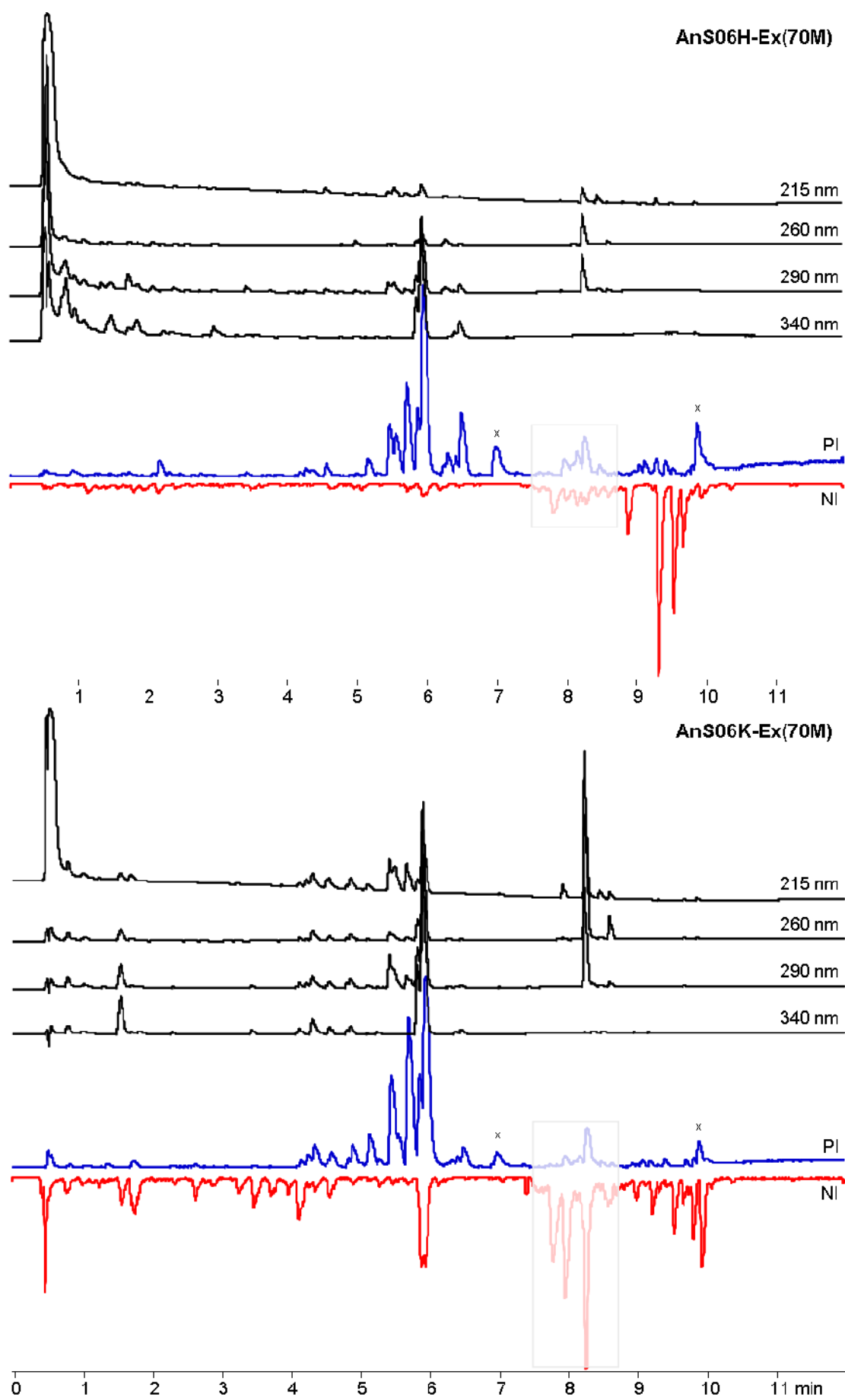


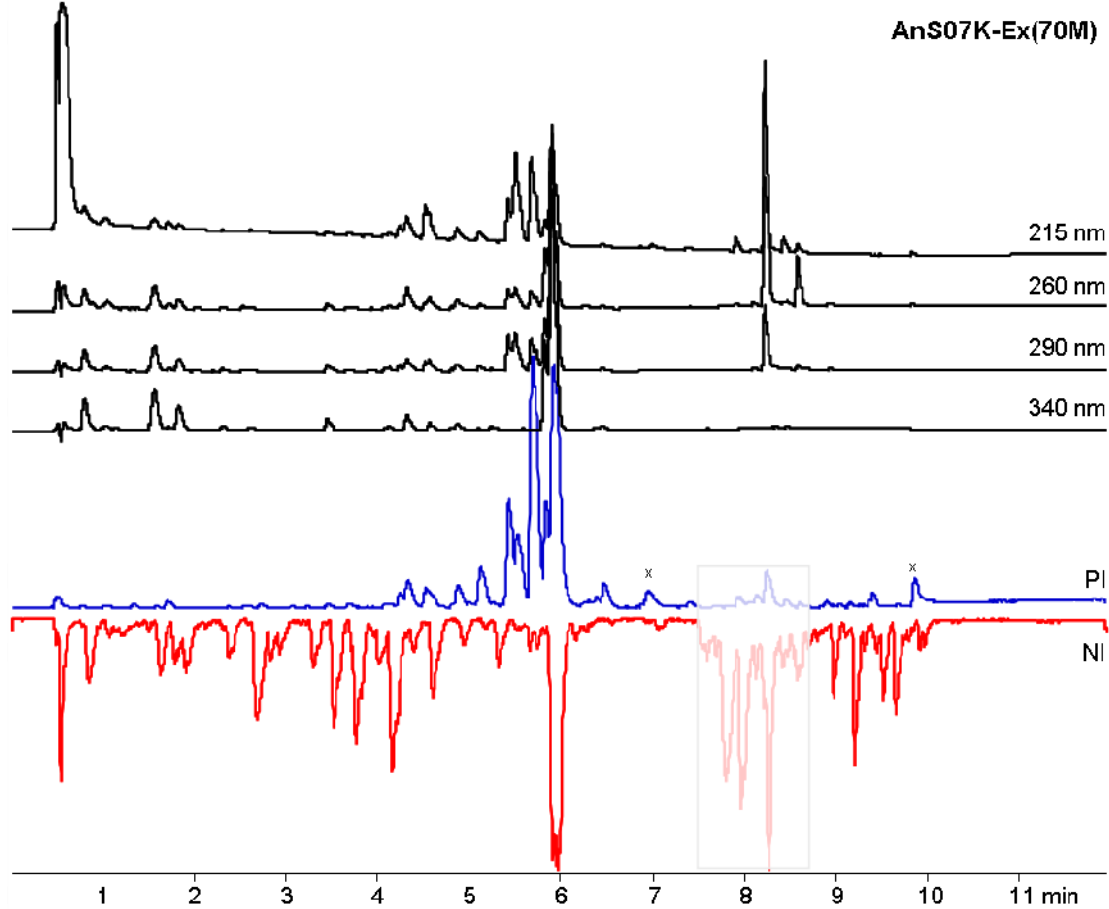
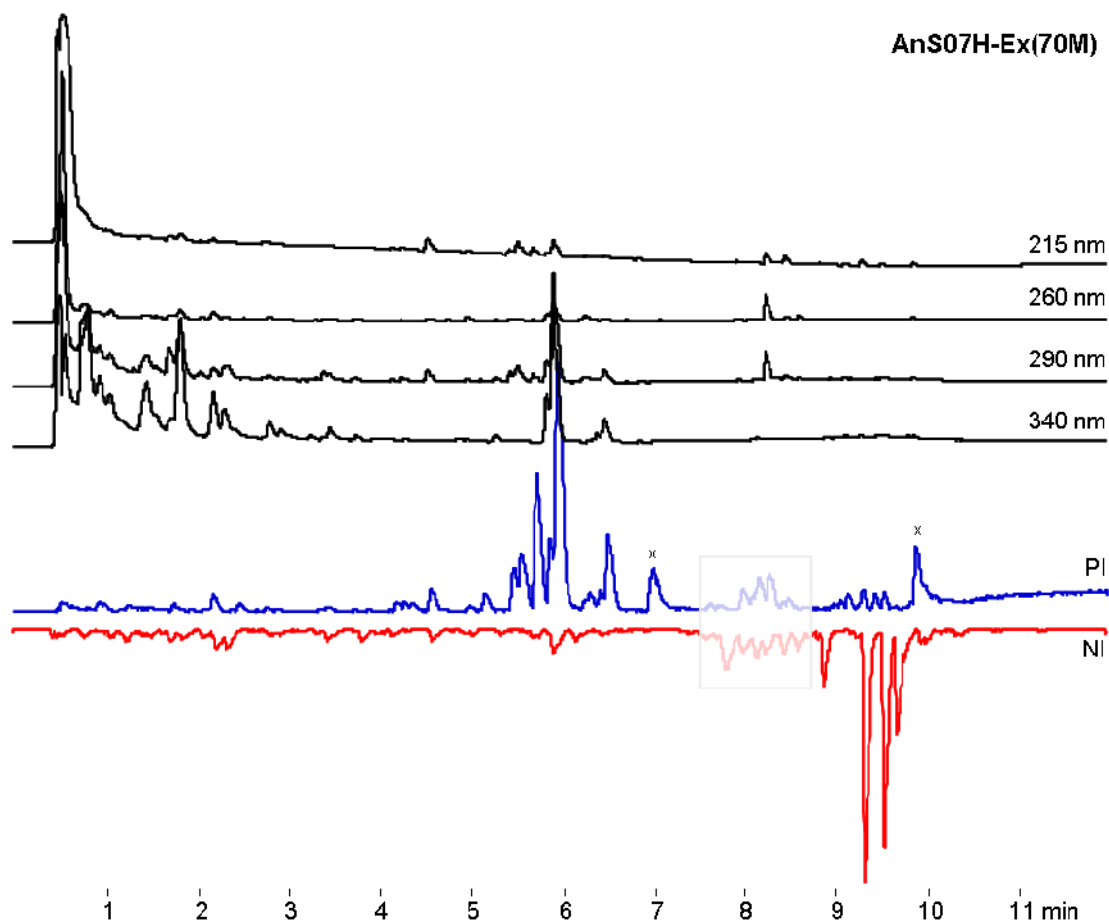
Pikovi označeni sa „x” i izbleđeni regioni predstavljaju artefakte, poreklom iz mobilne faze.

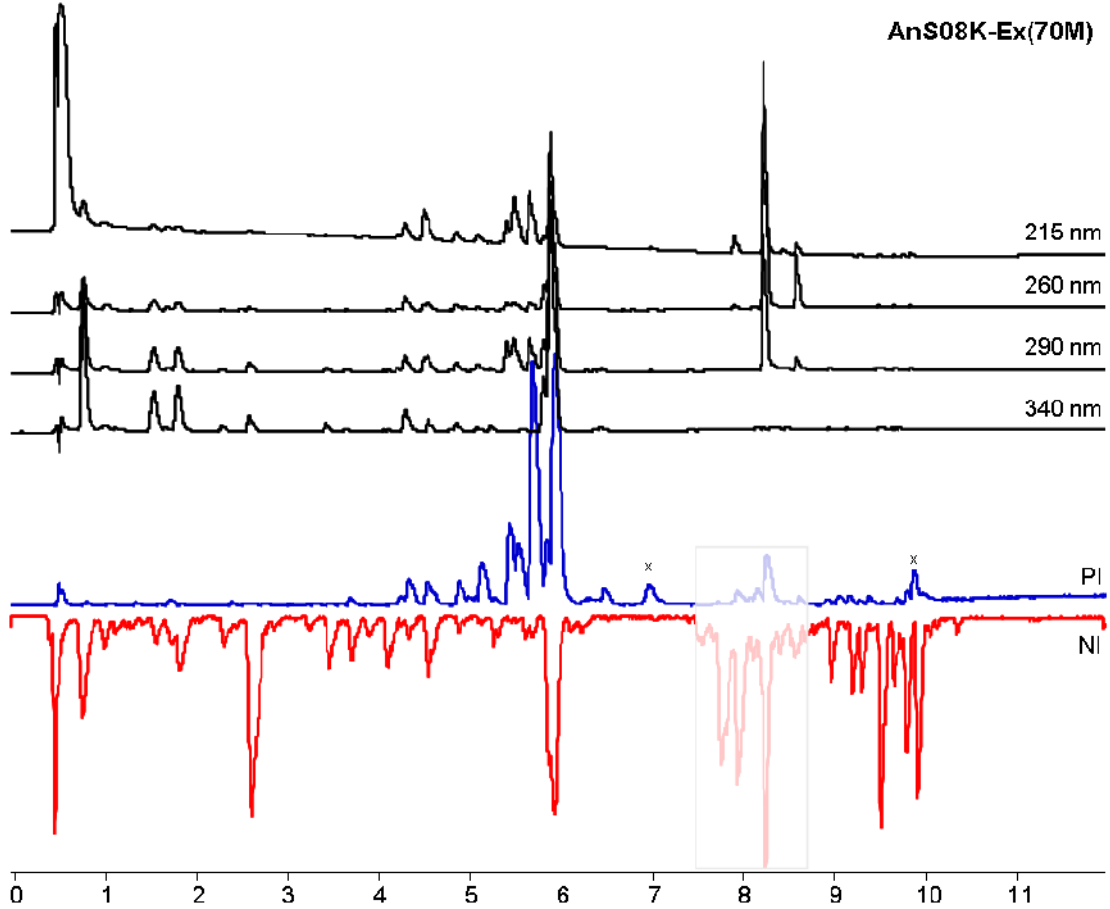
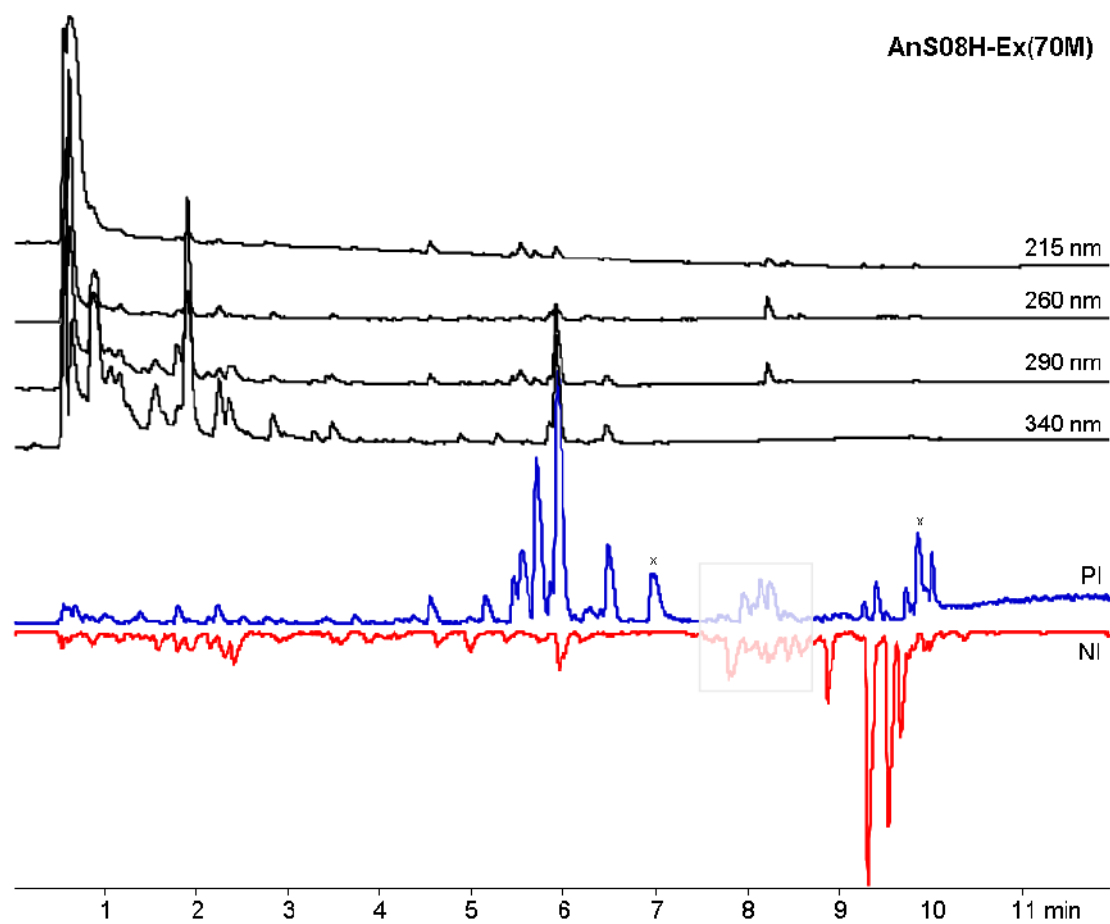


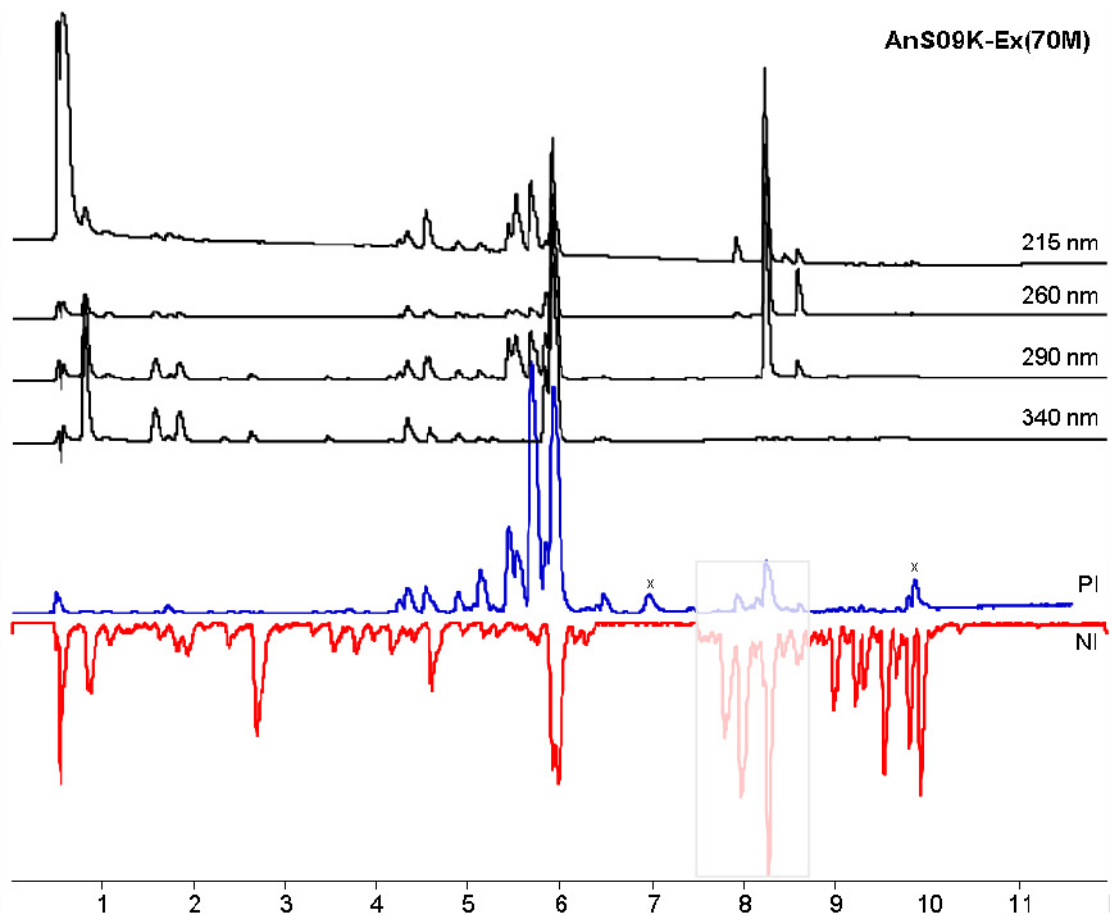


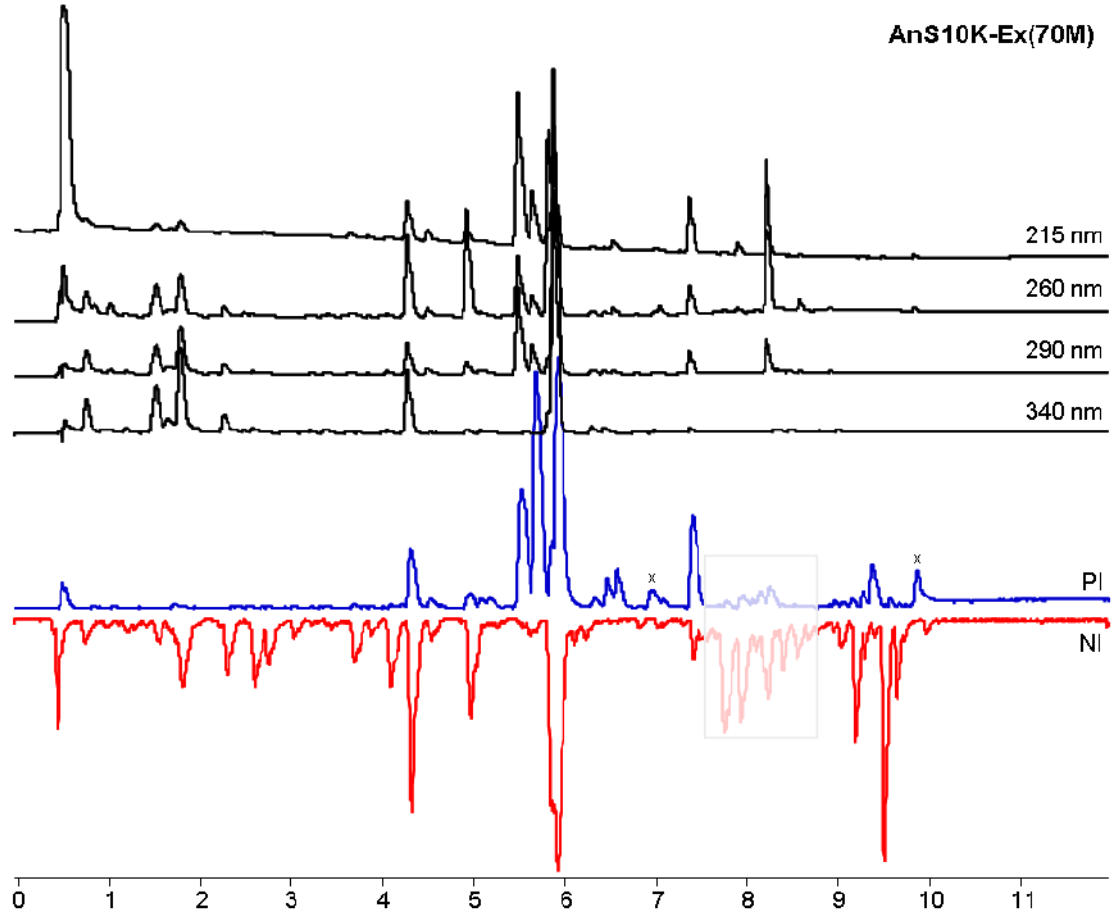
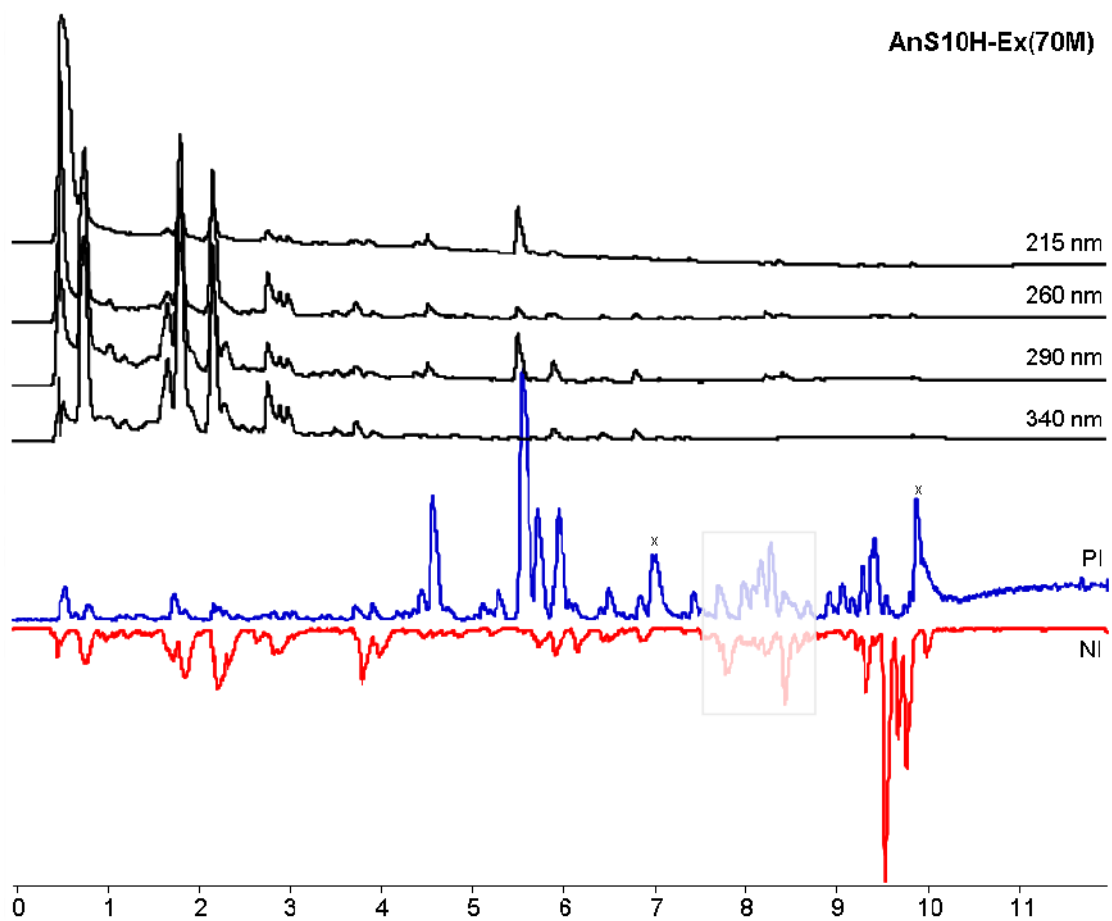


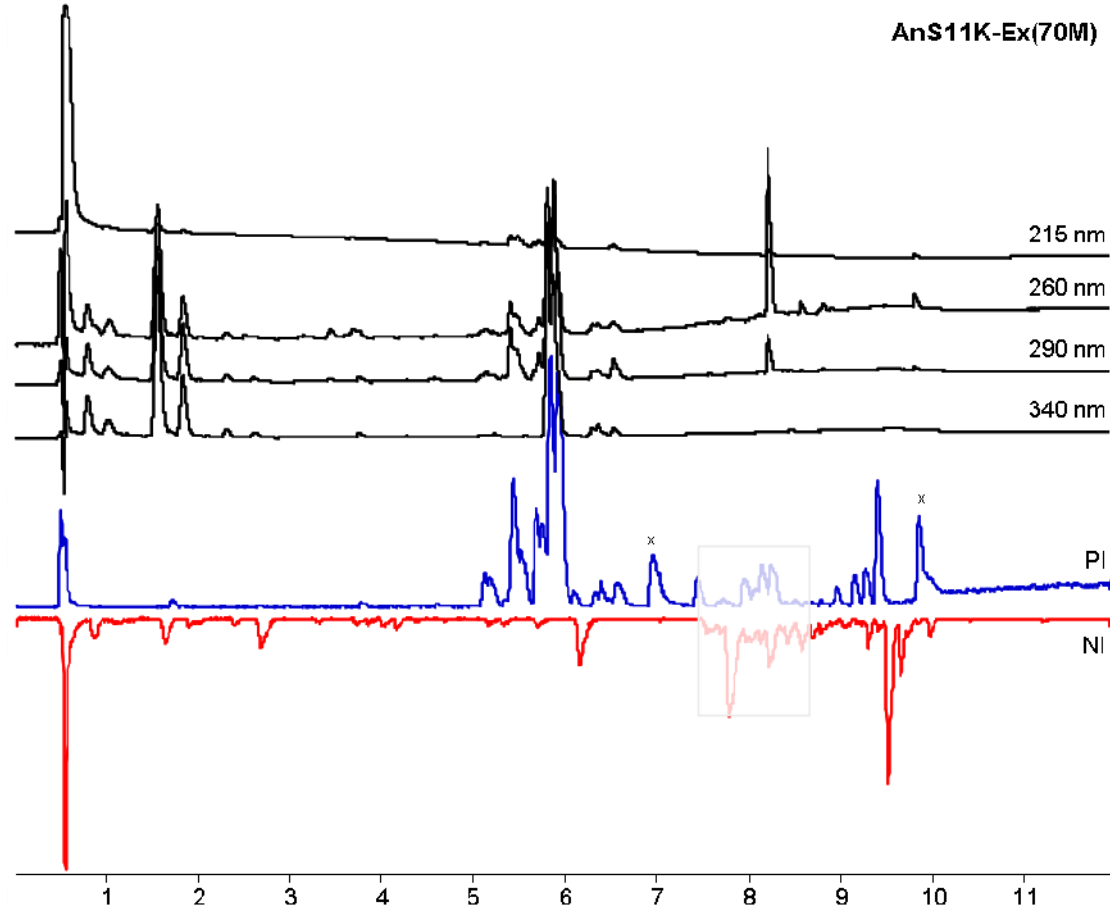
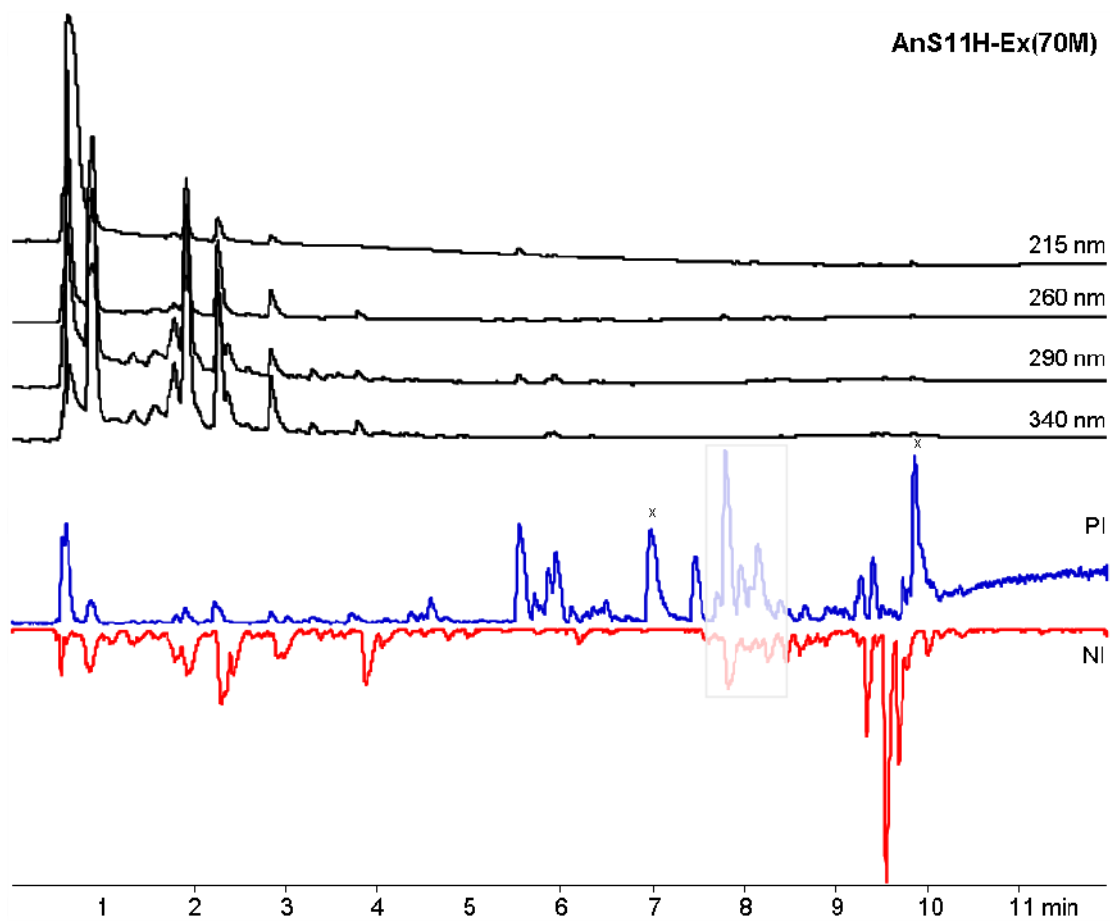


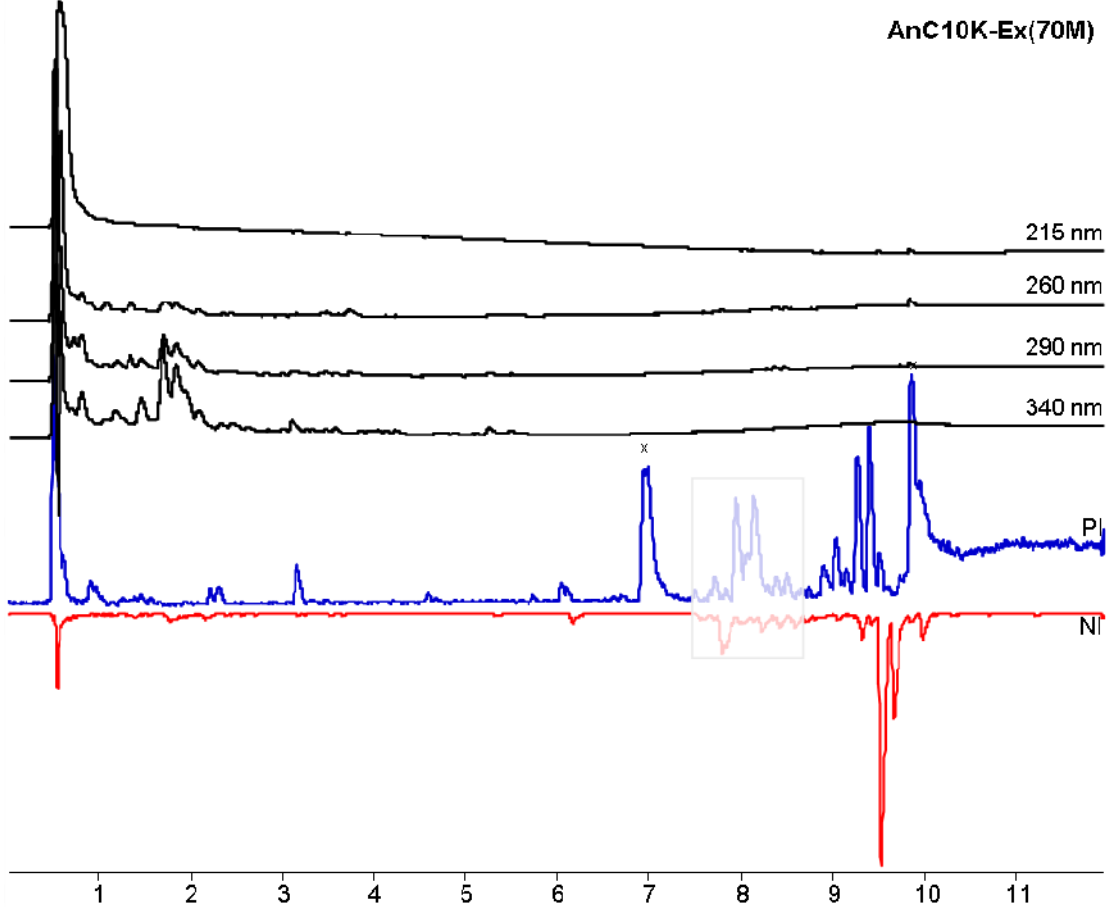
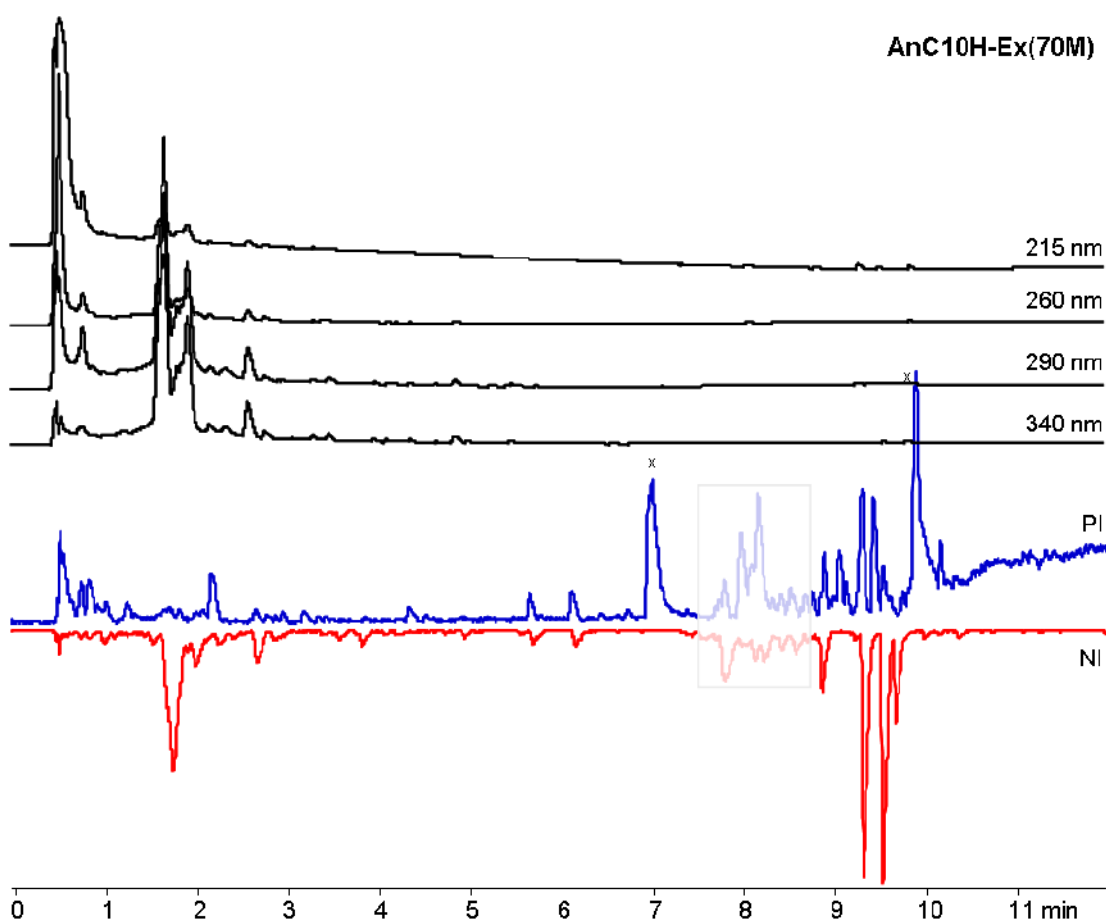


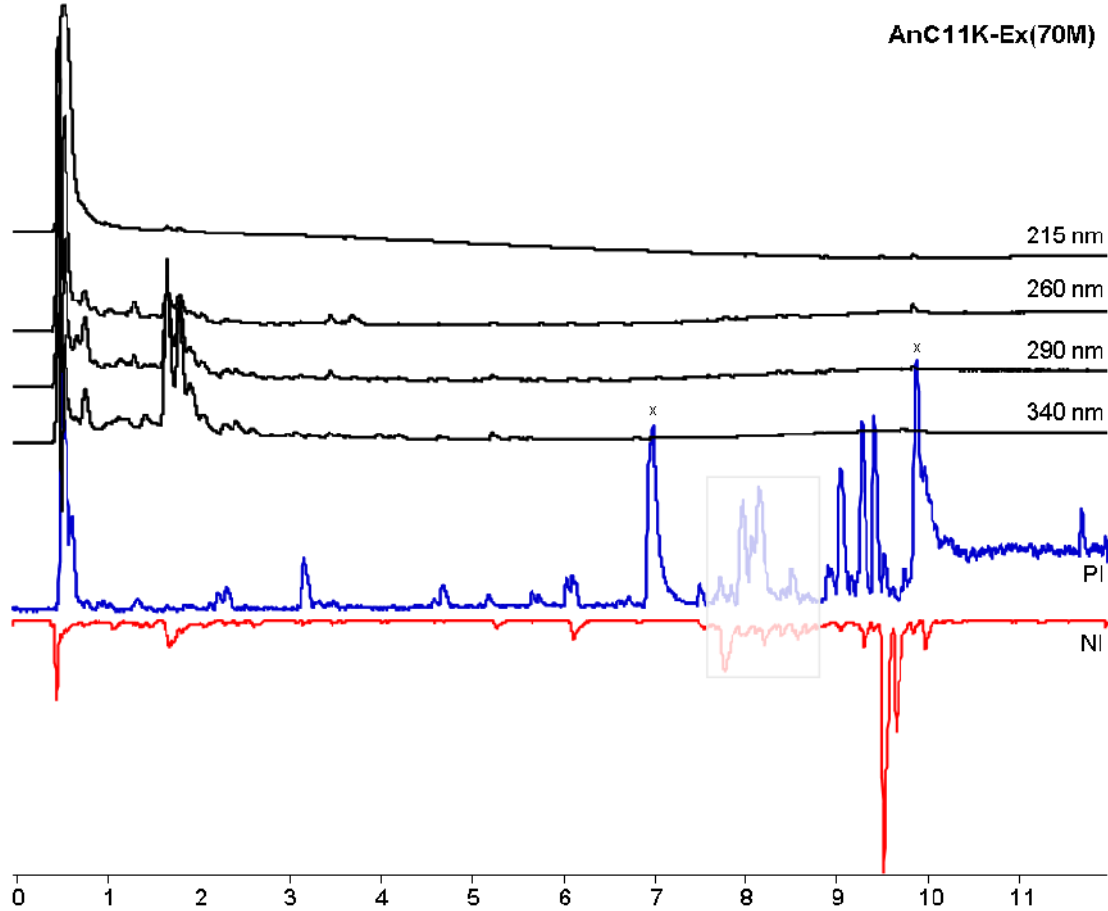
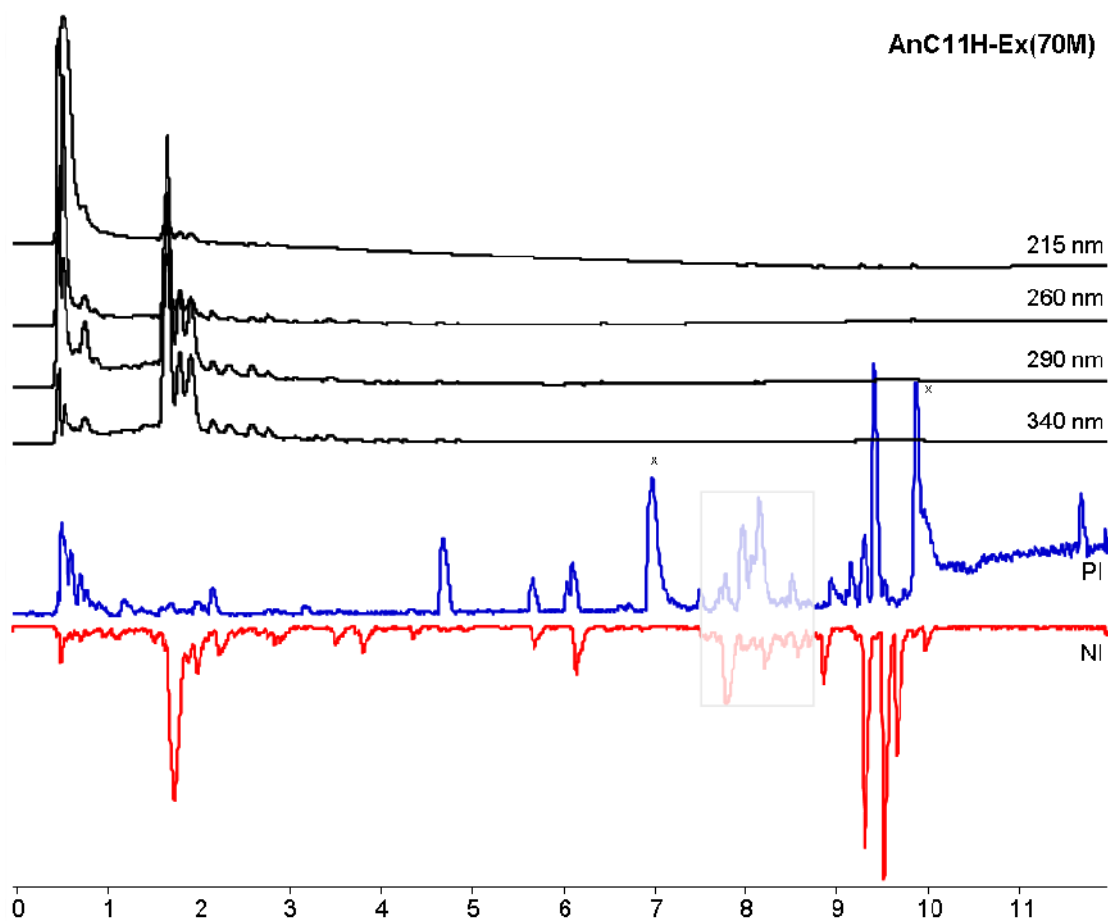


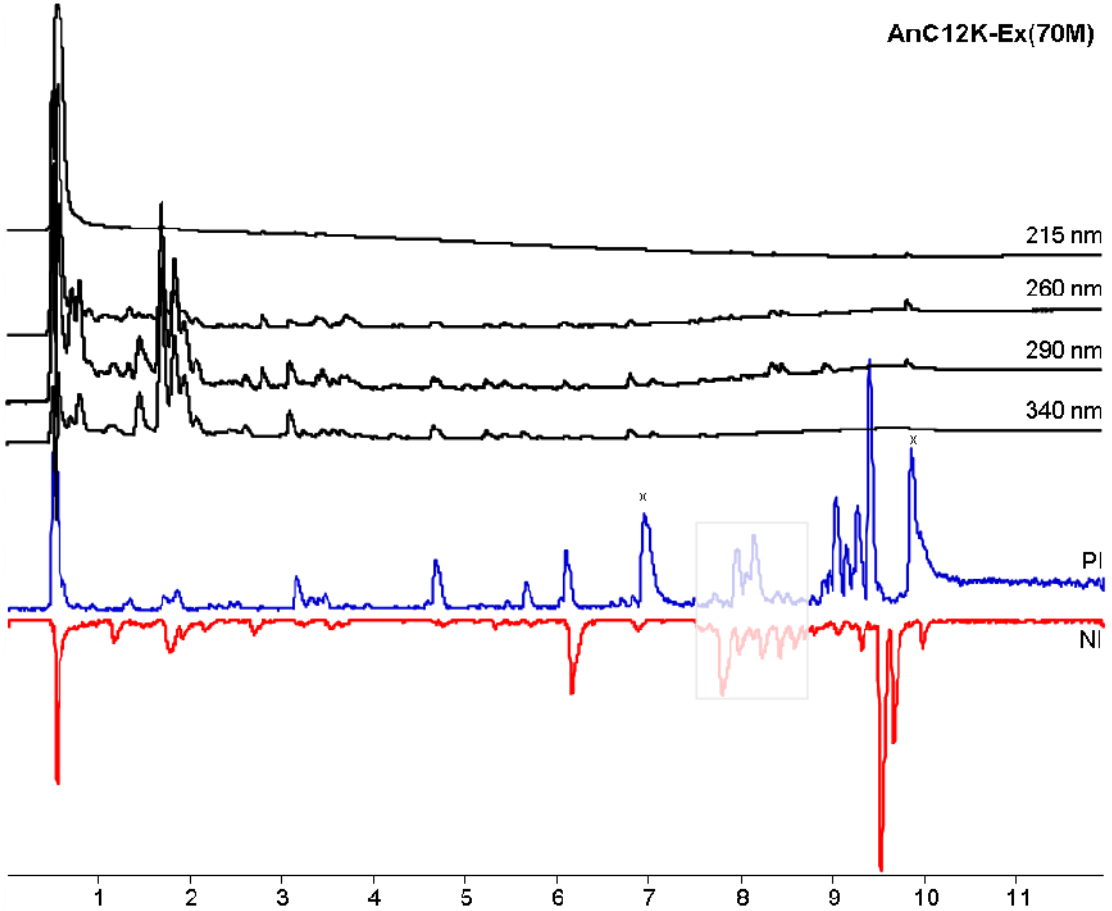
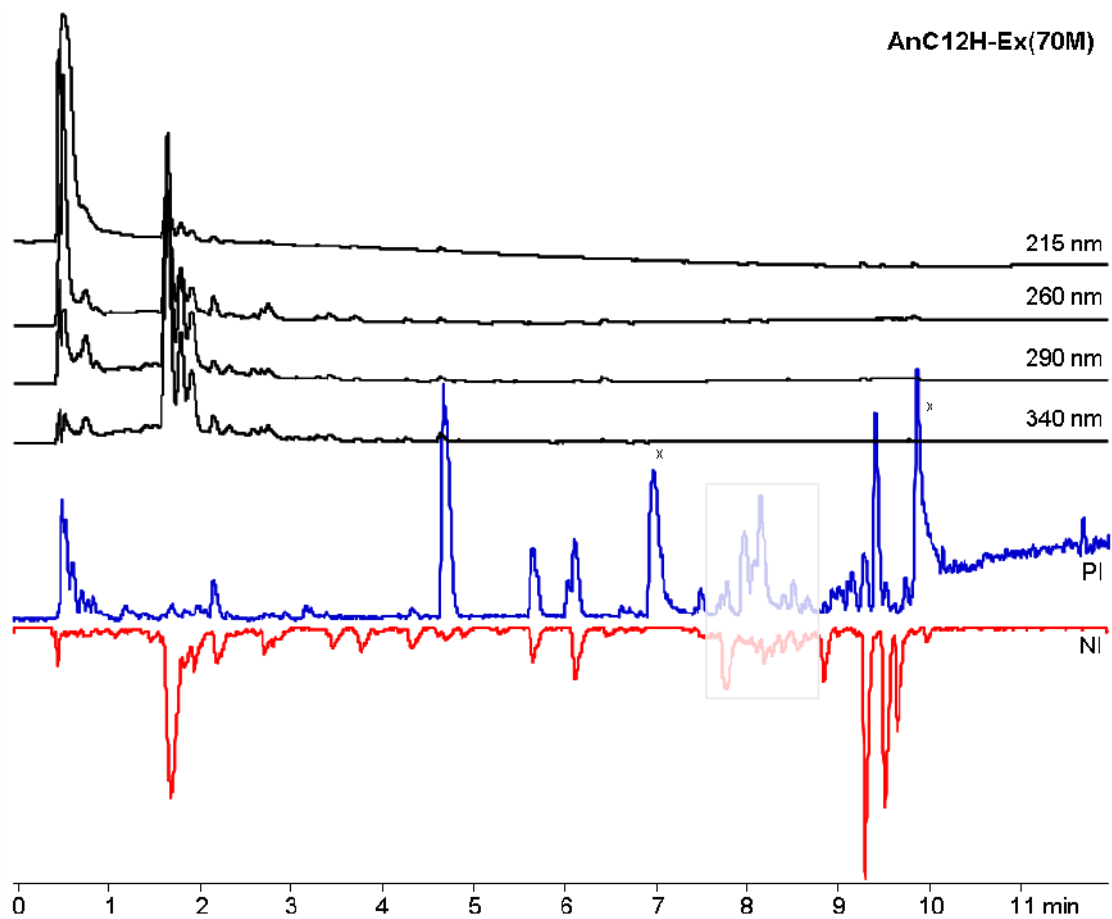


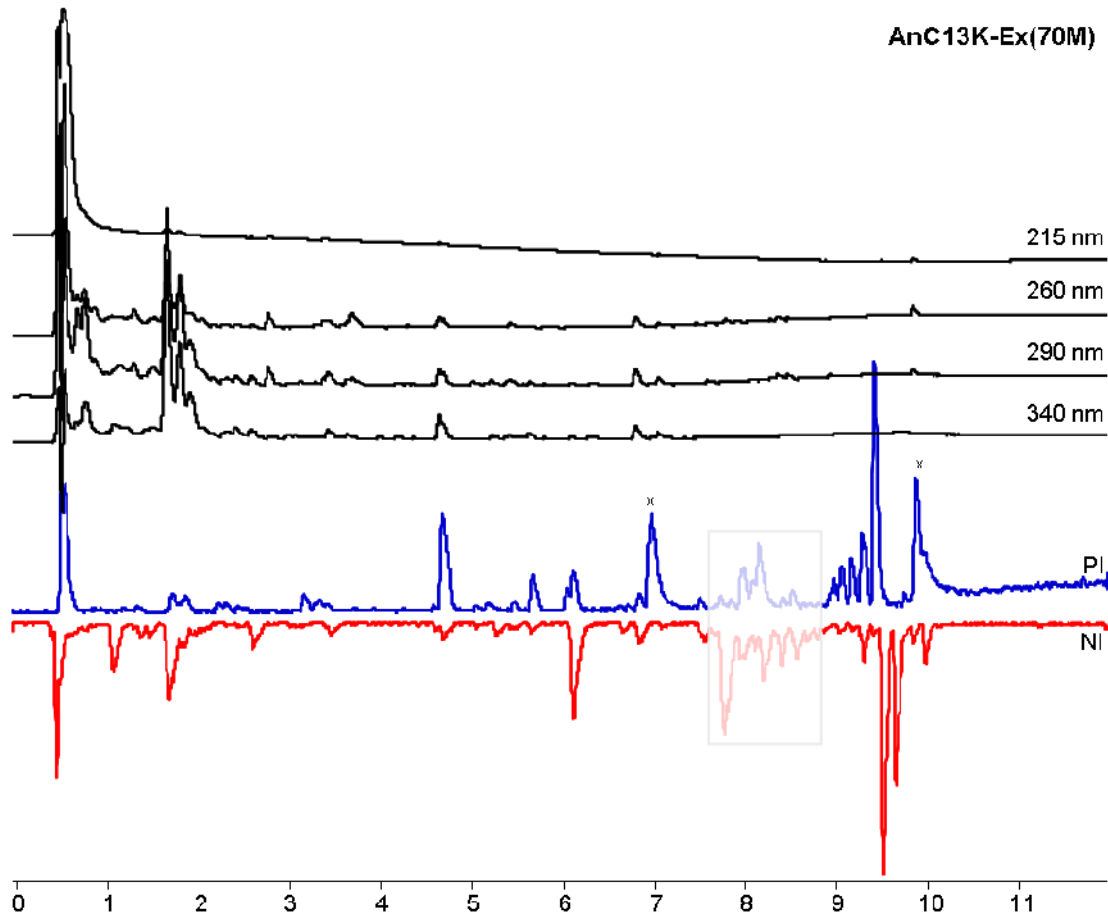
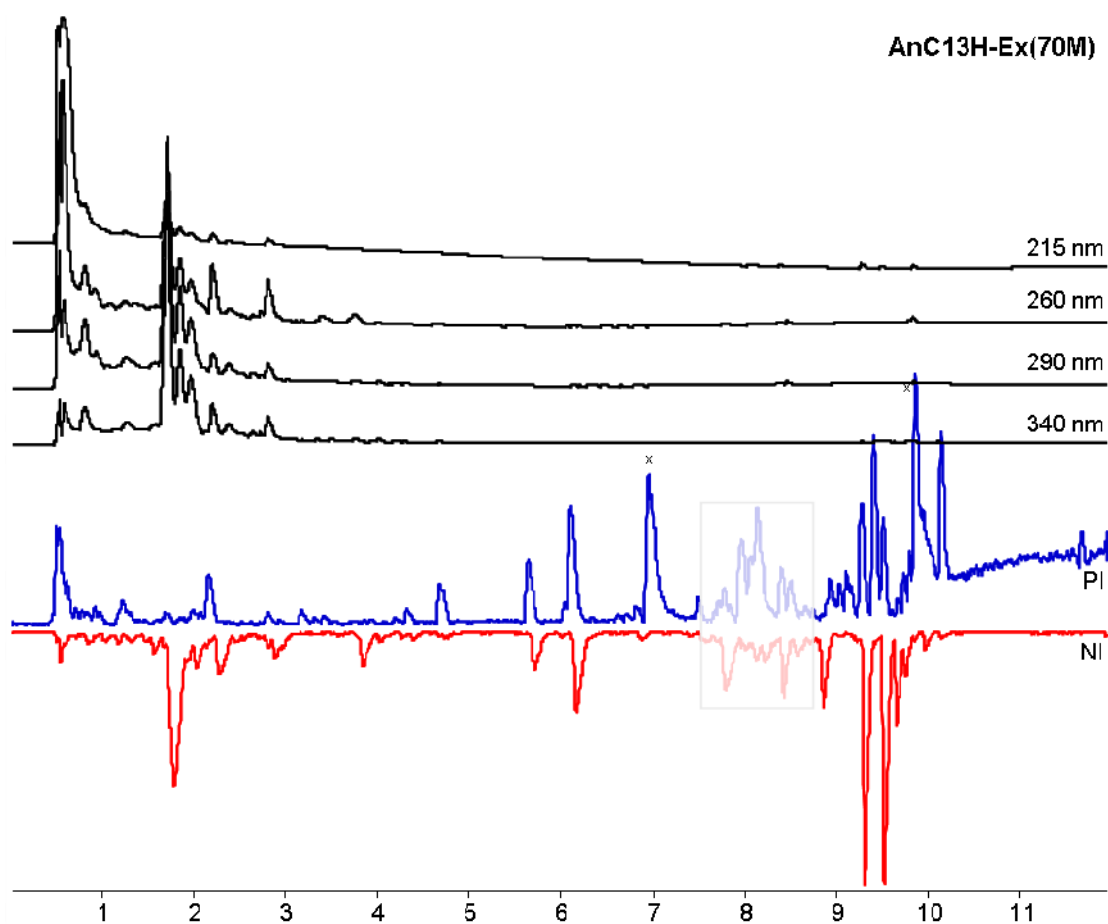


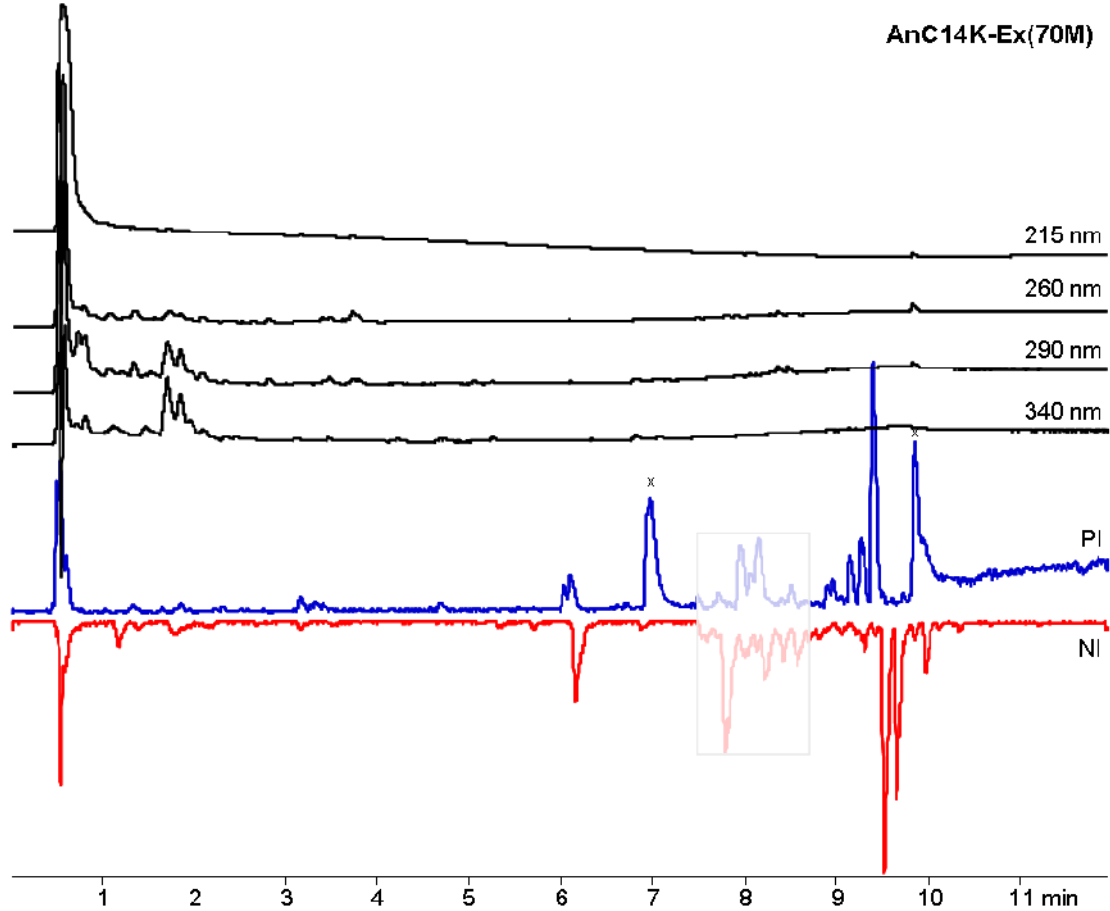
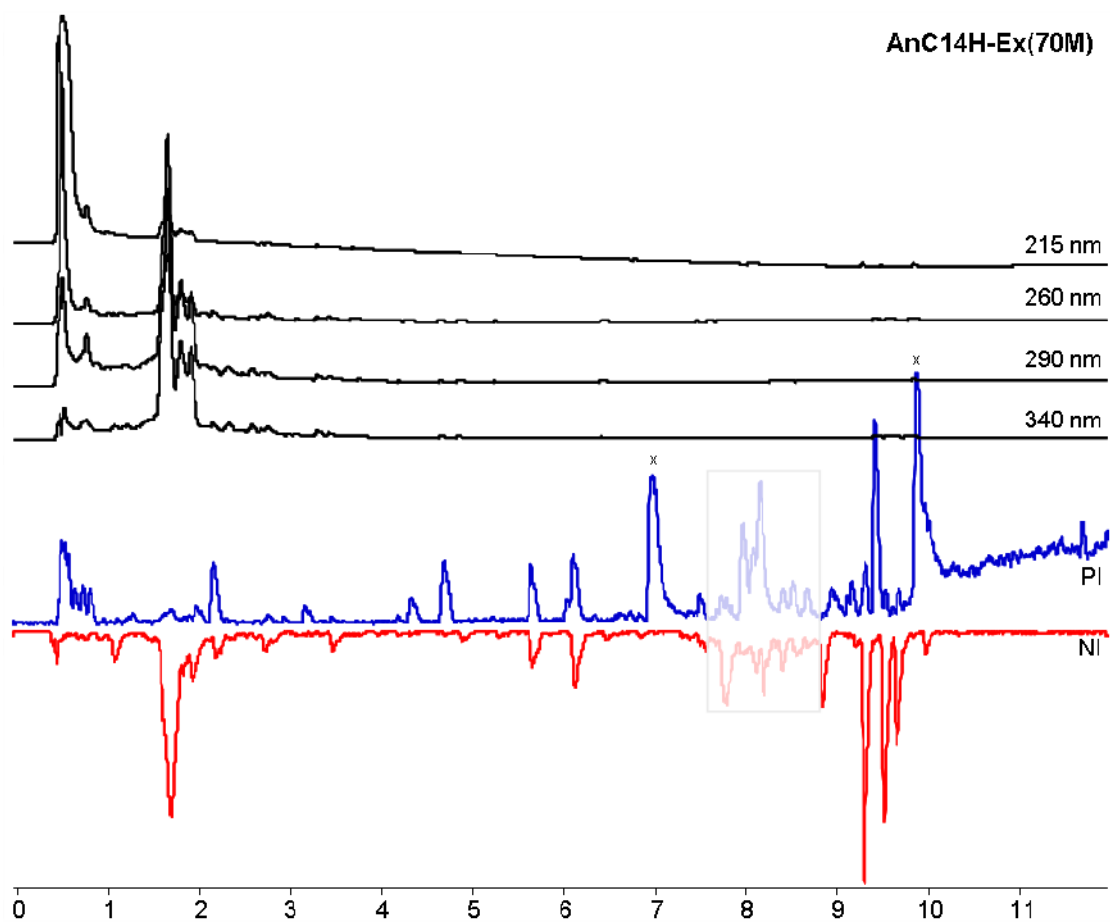


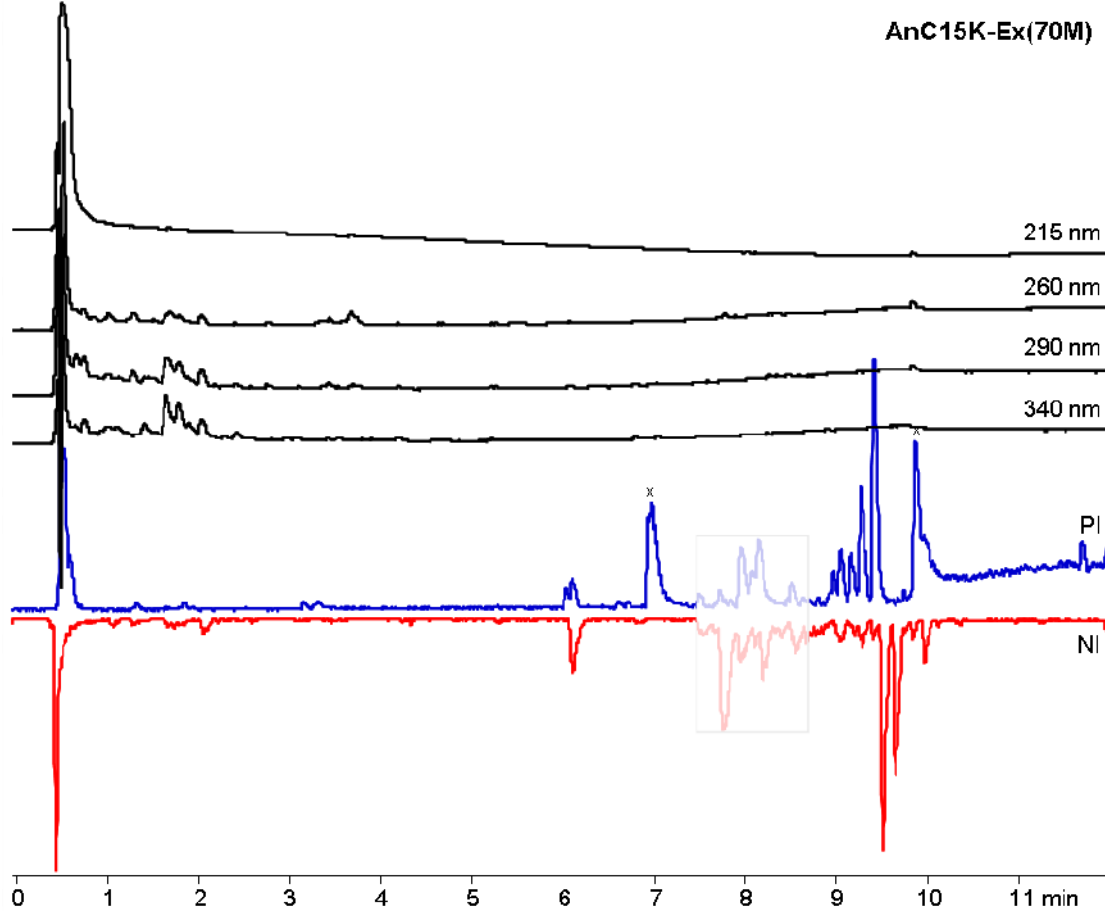
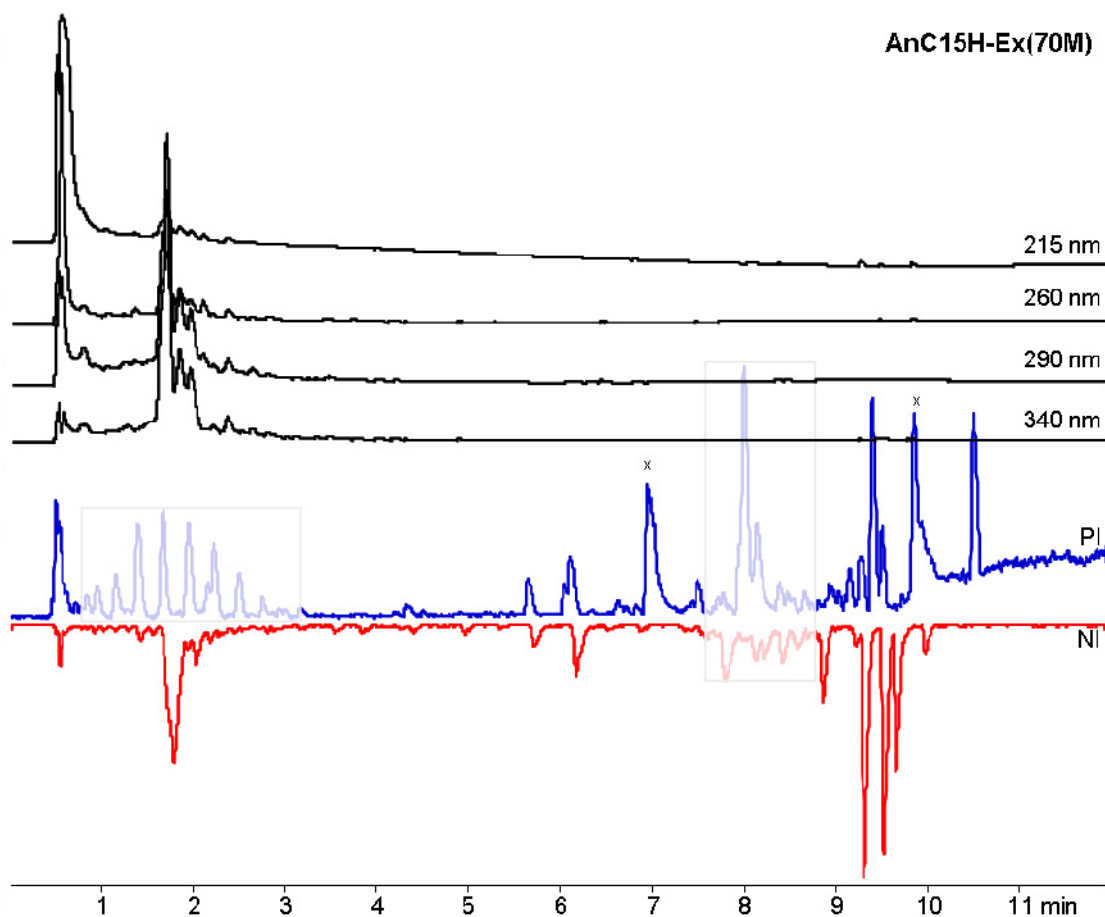


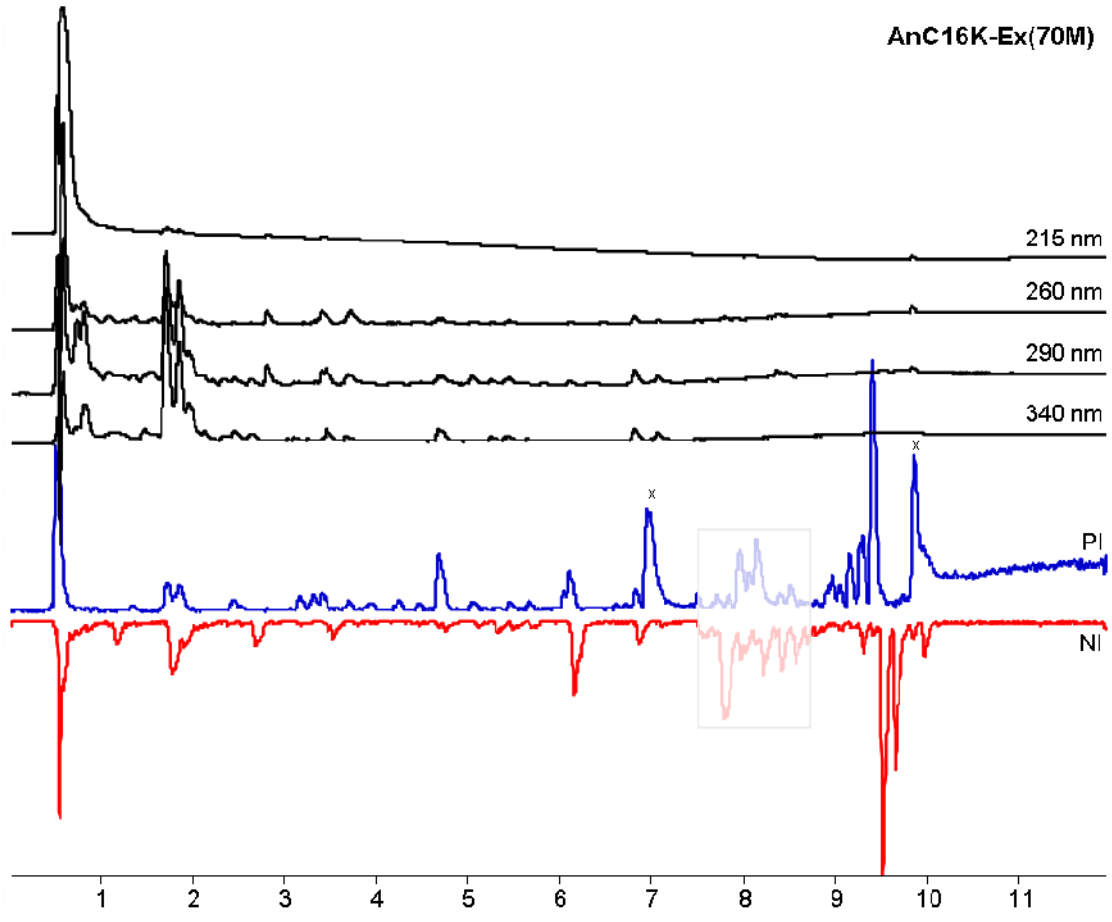
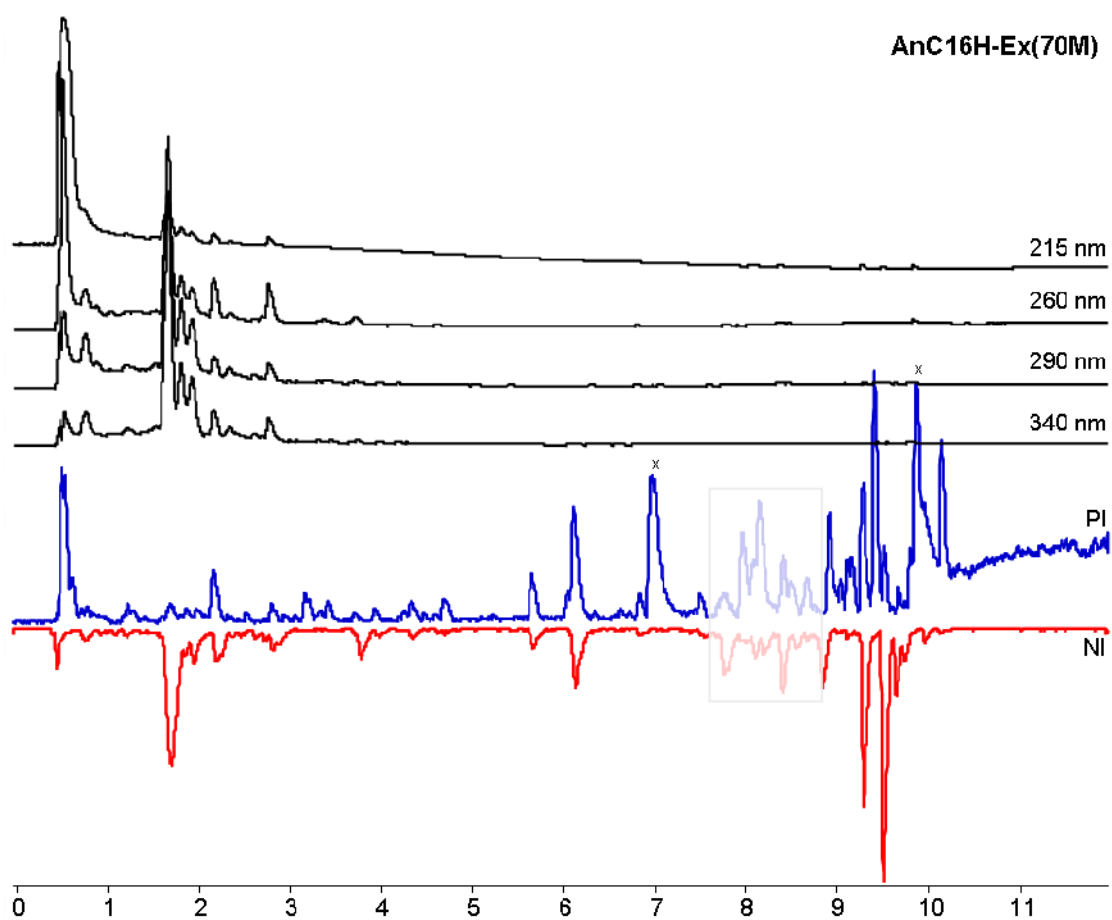


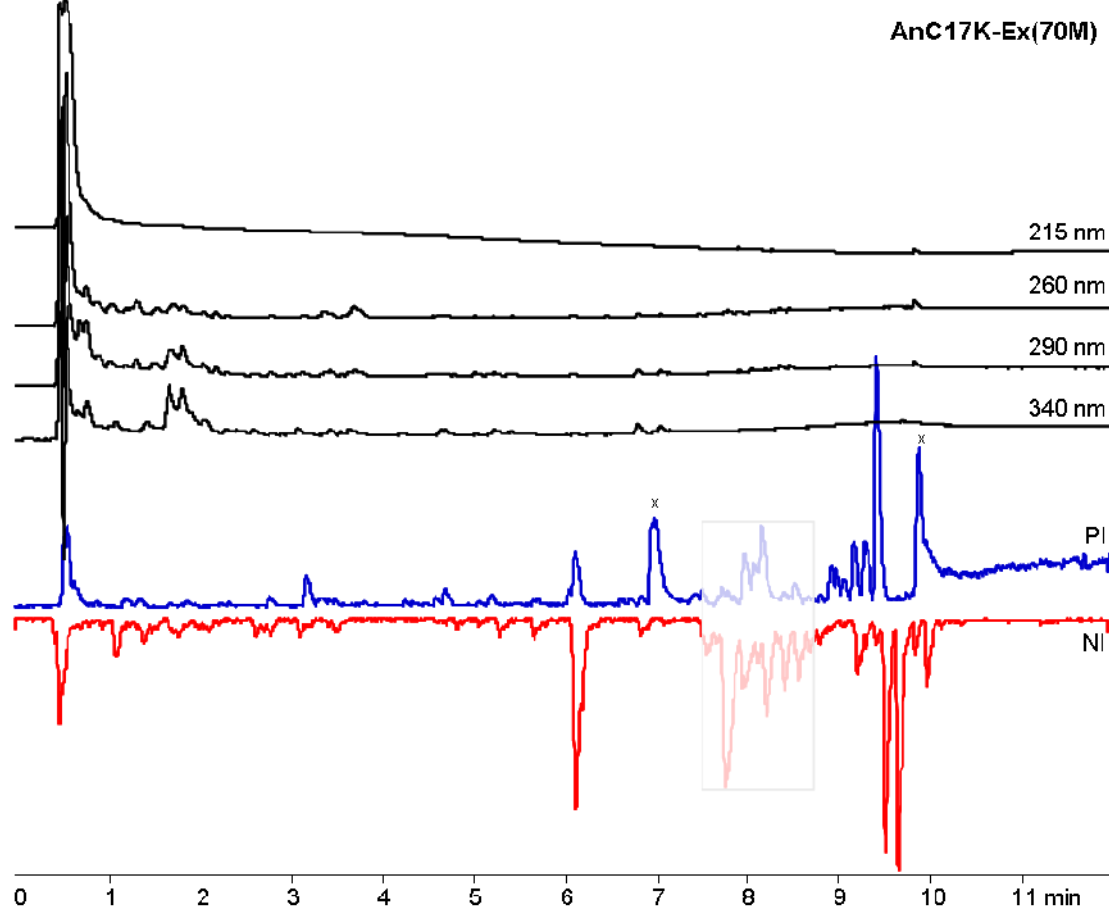
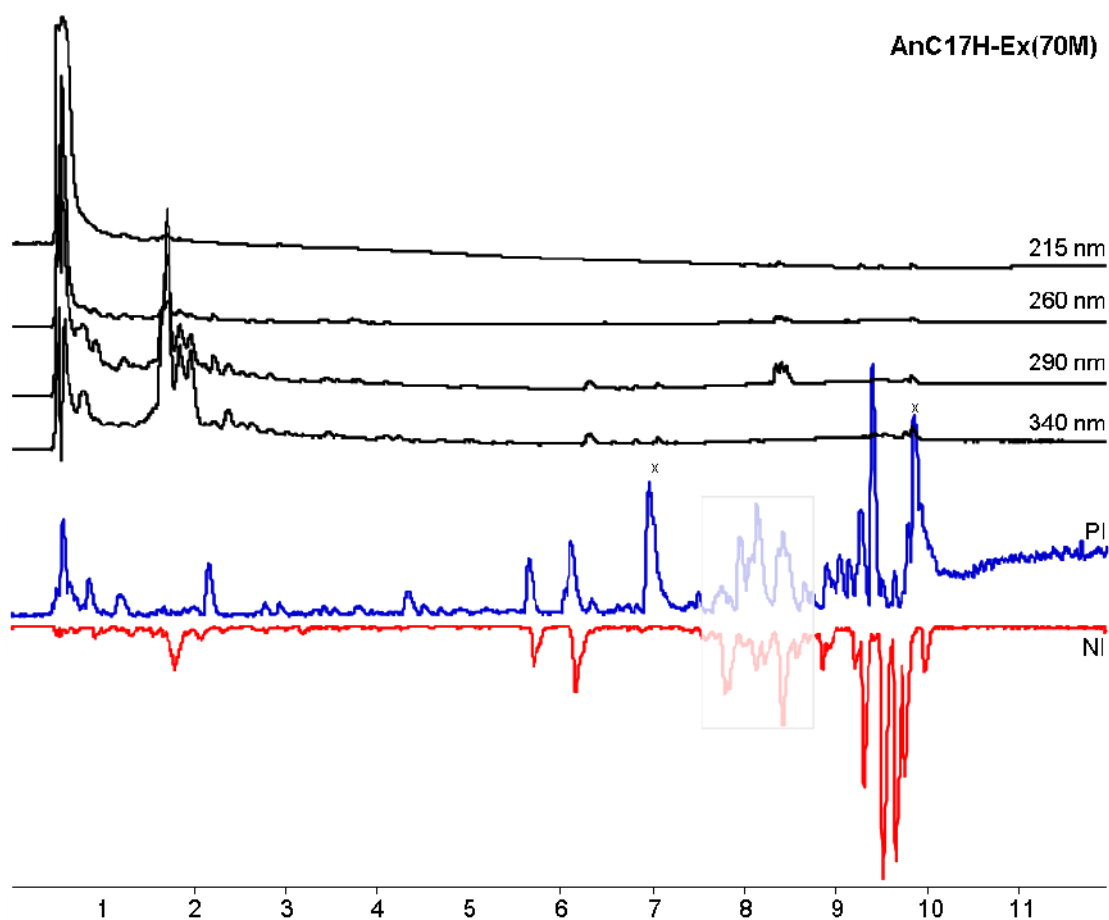


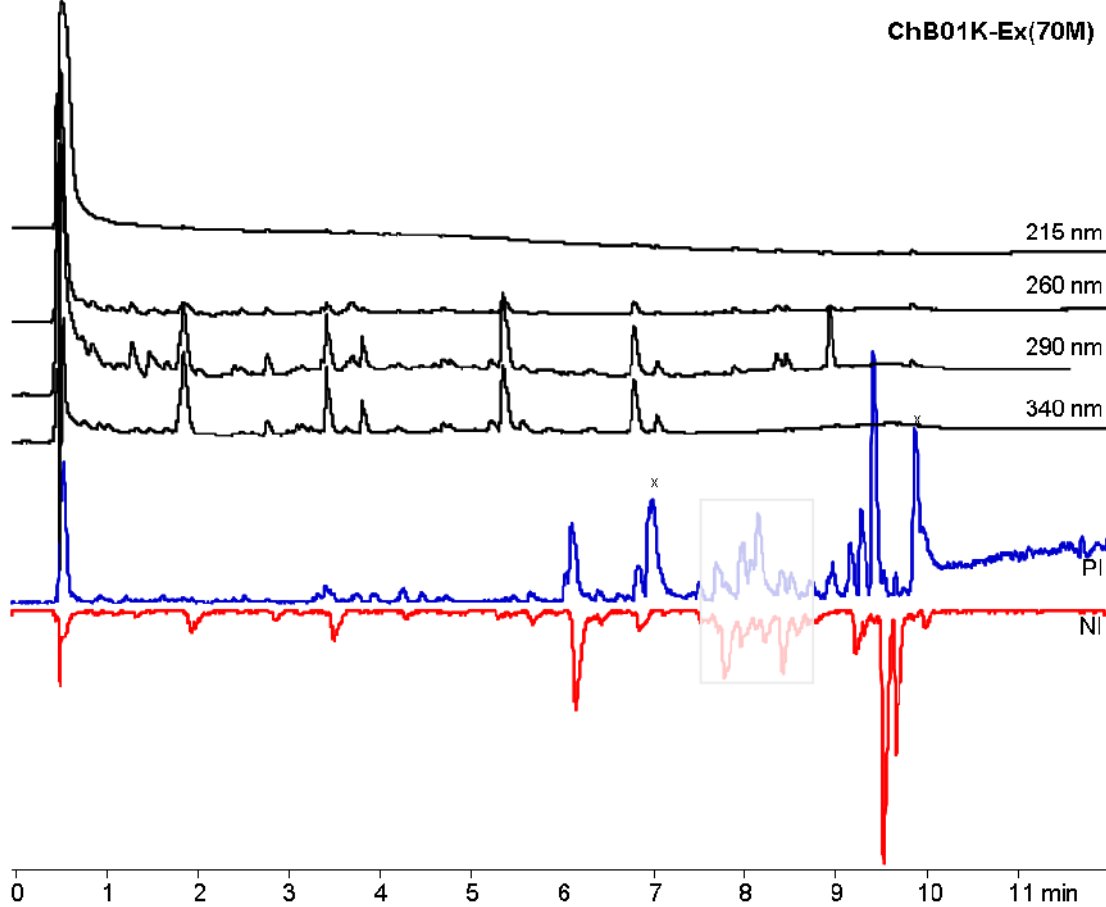
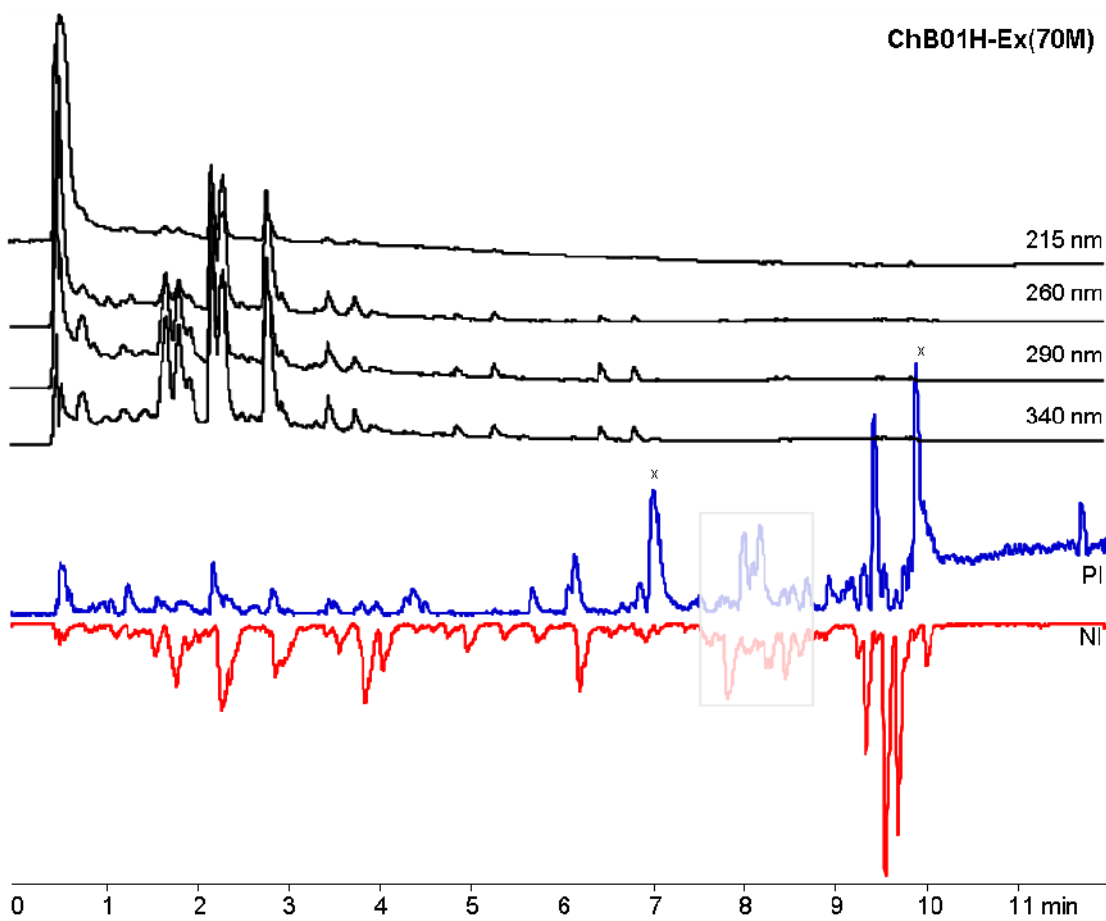


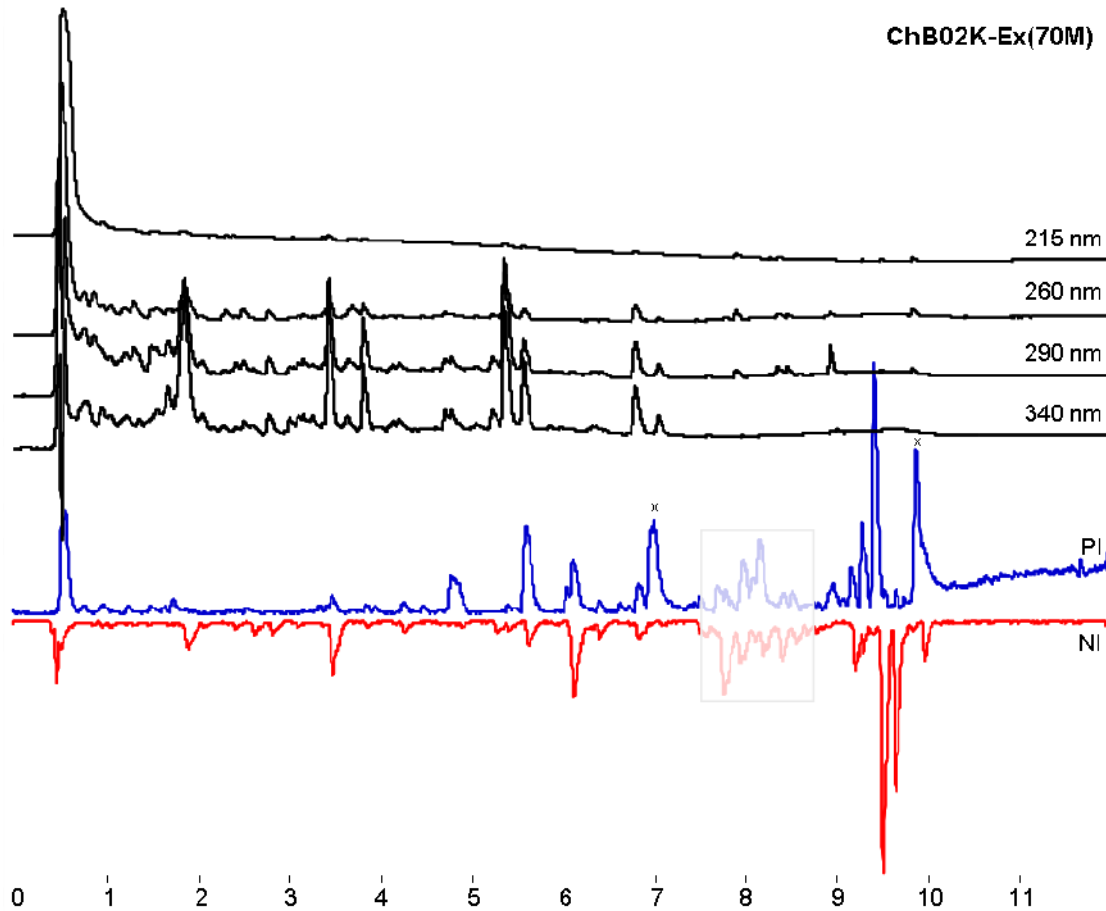
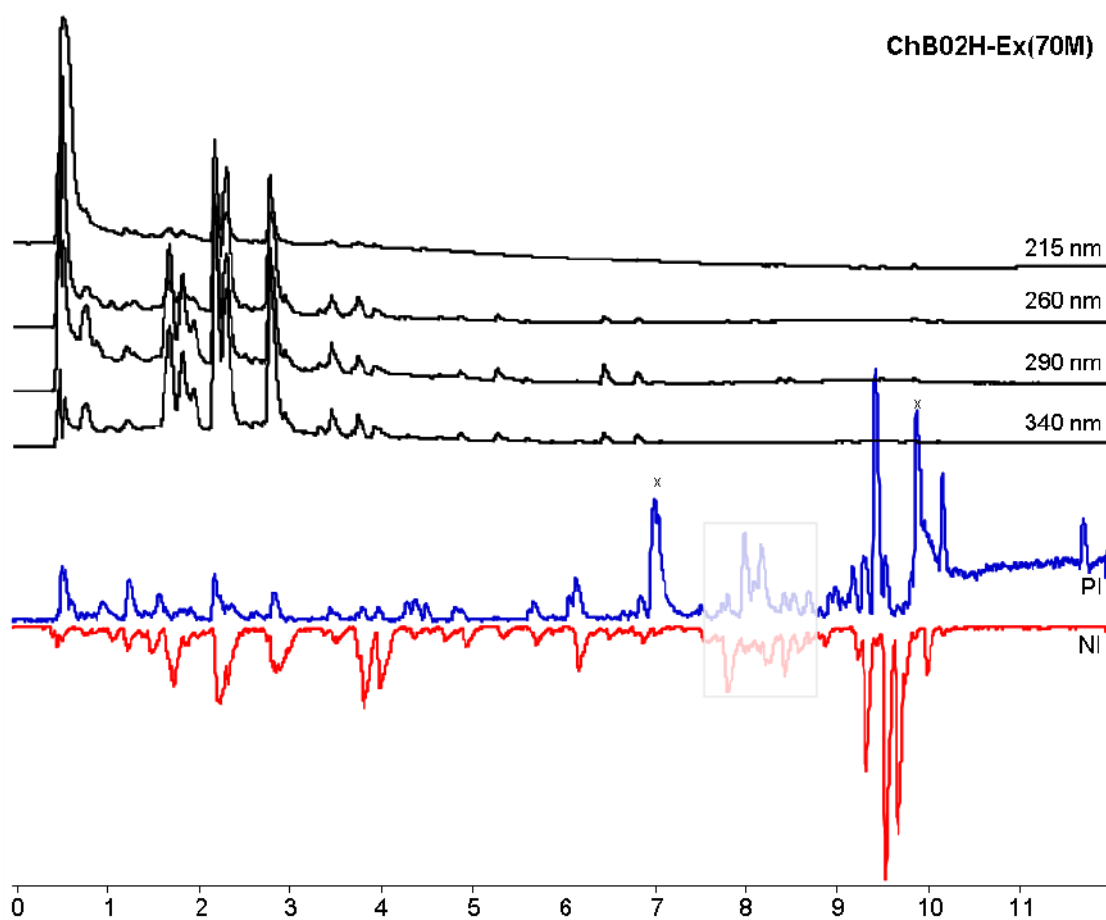


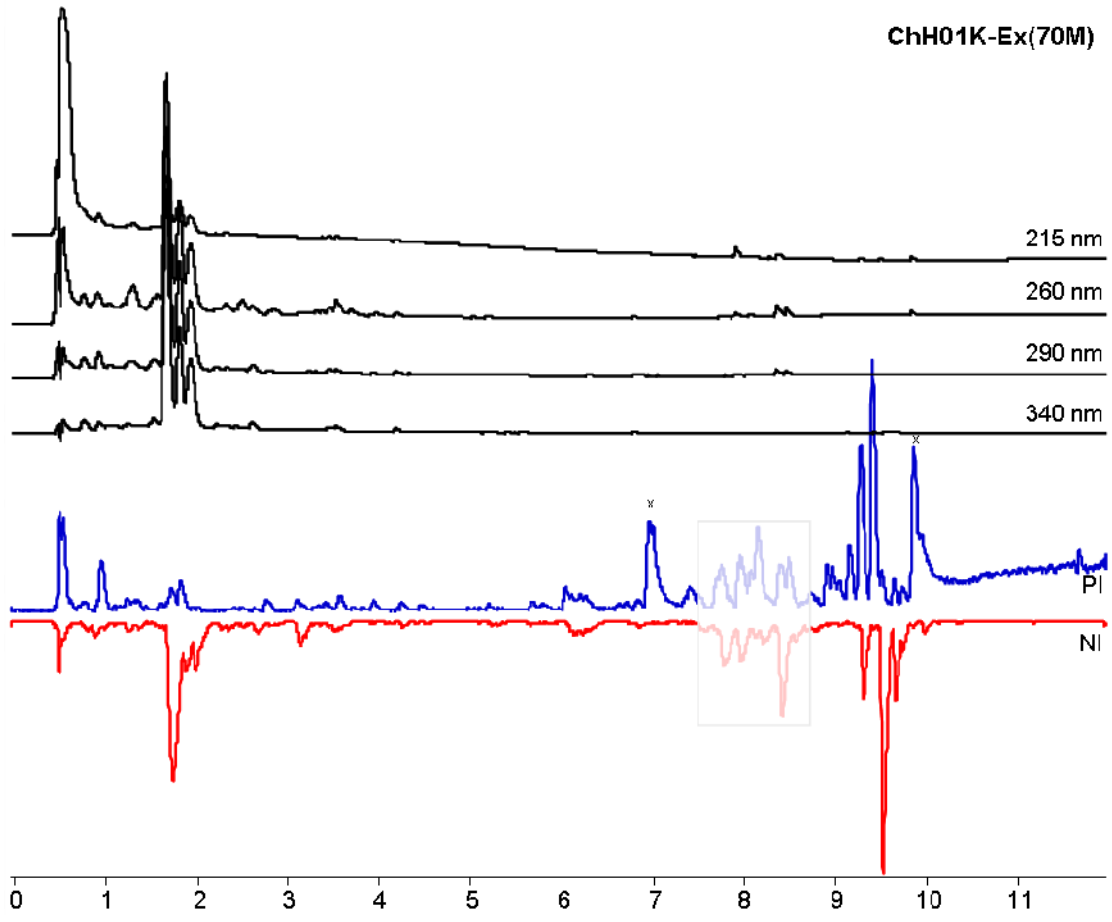
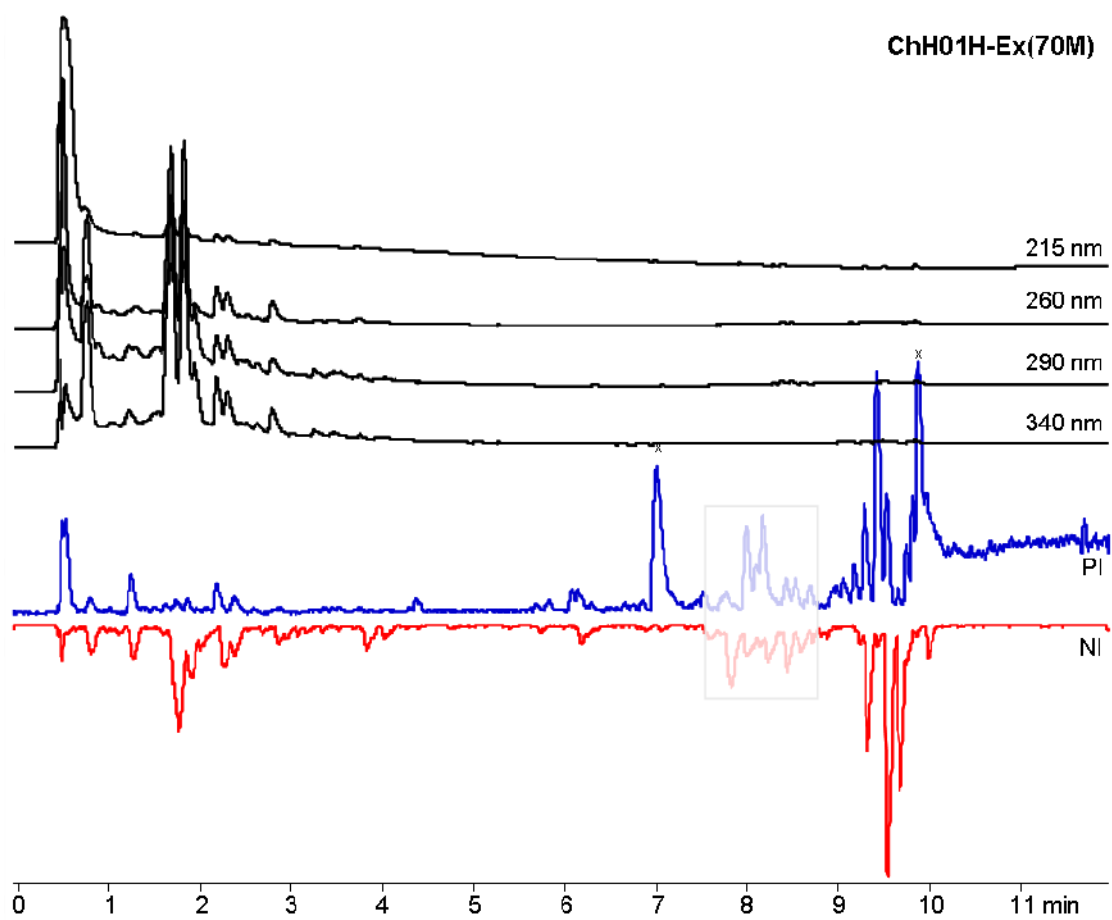


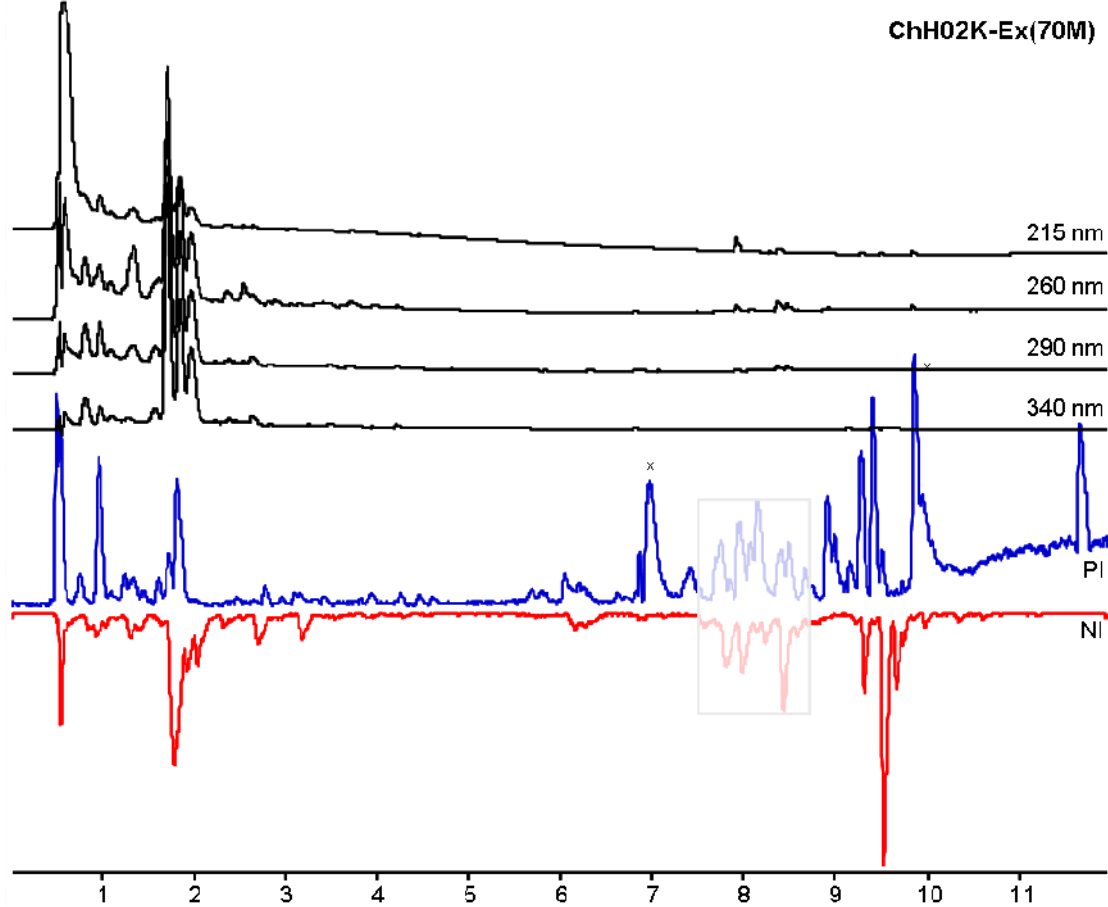
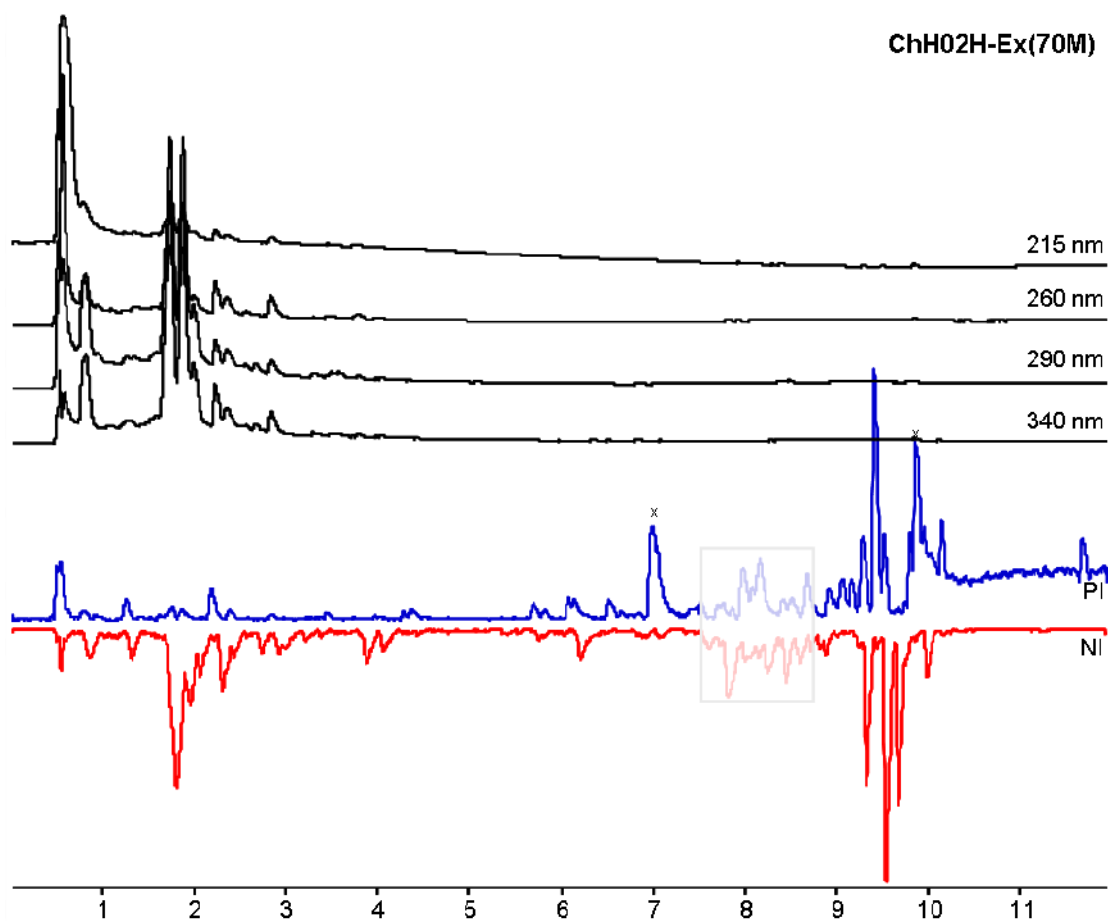


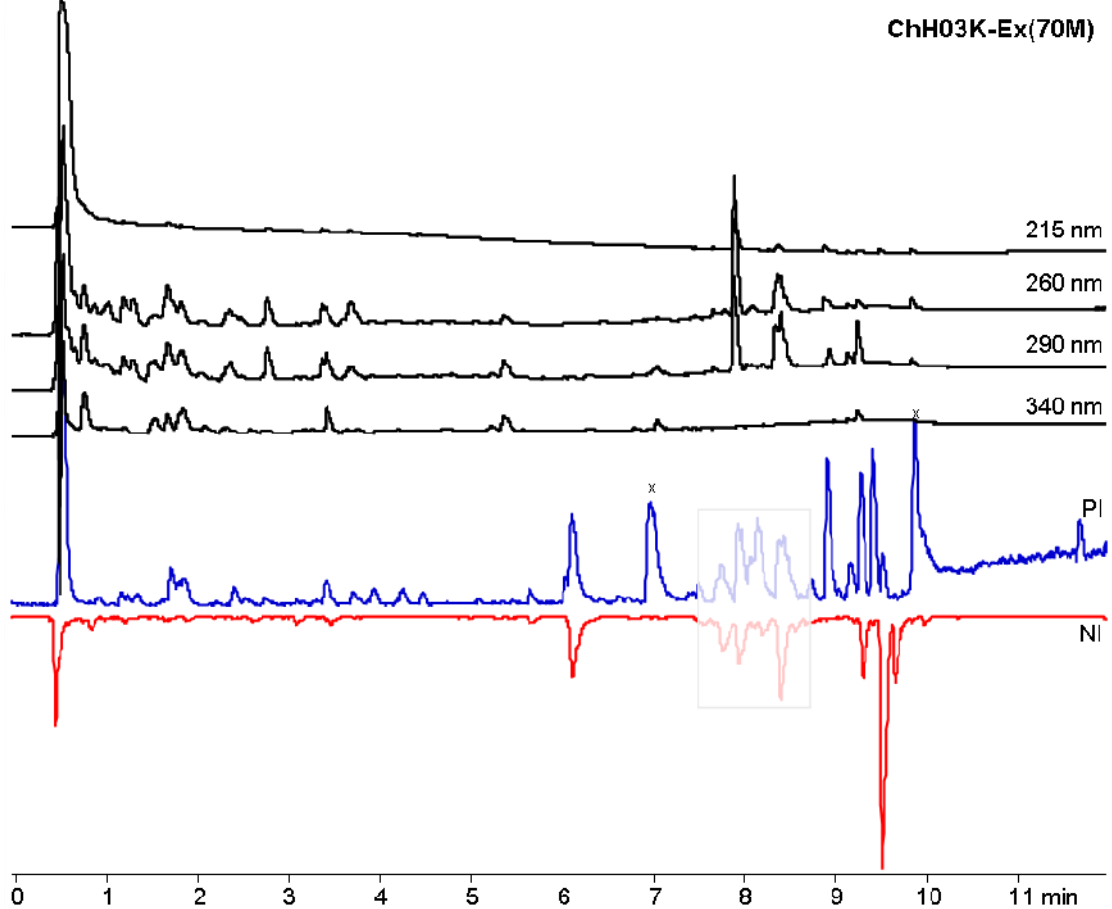
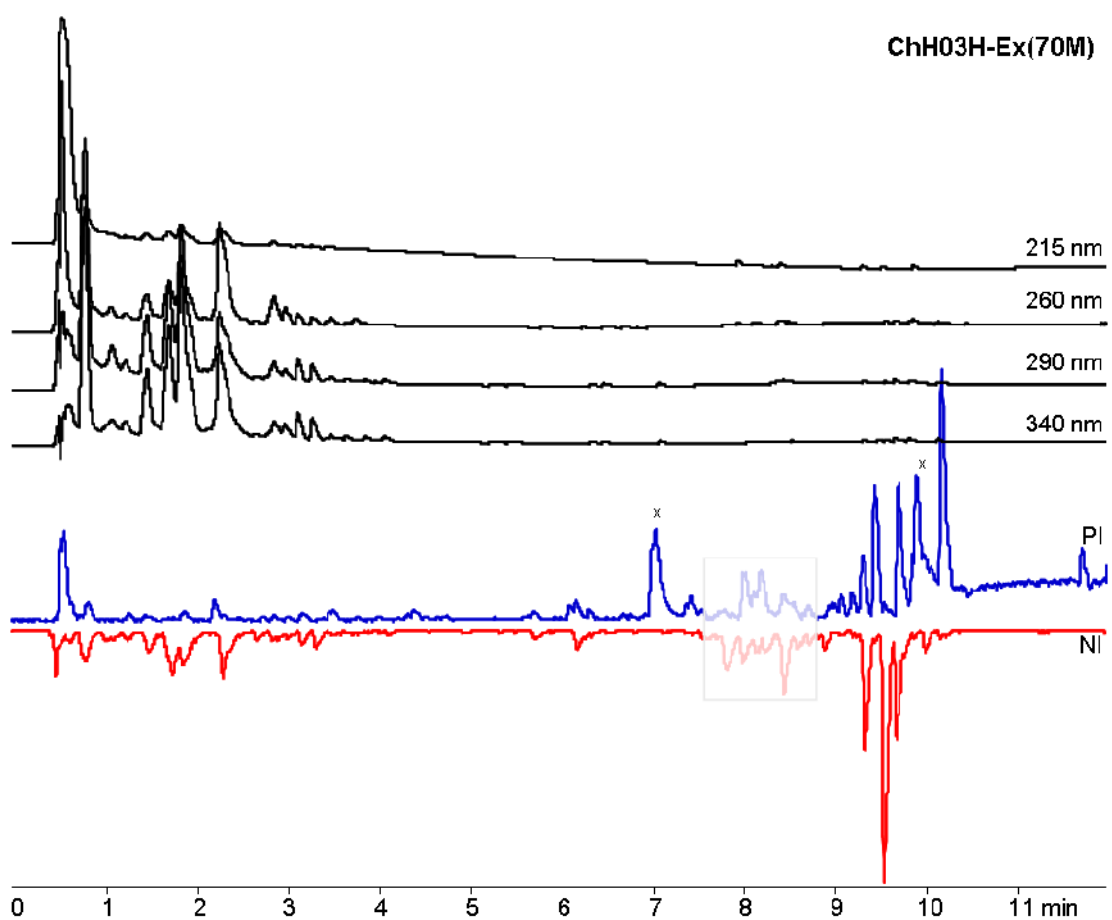


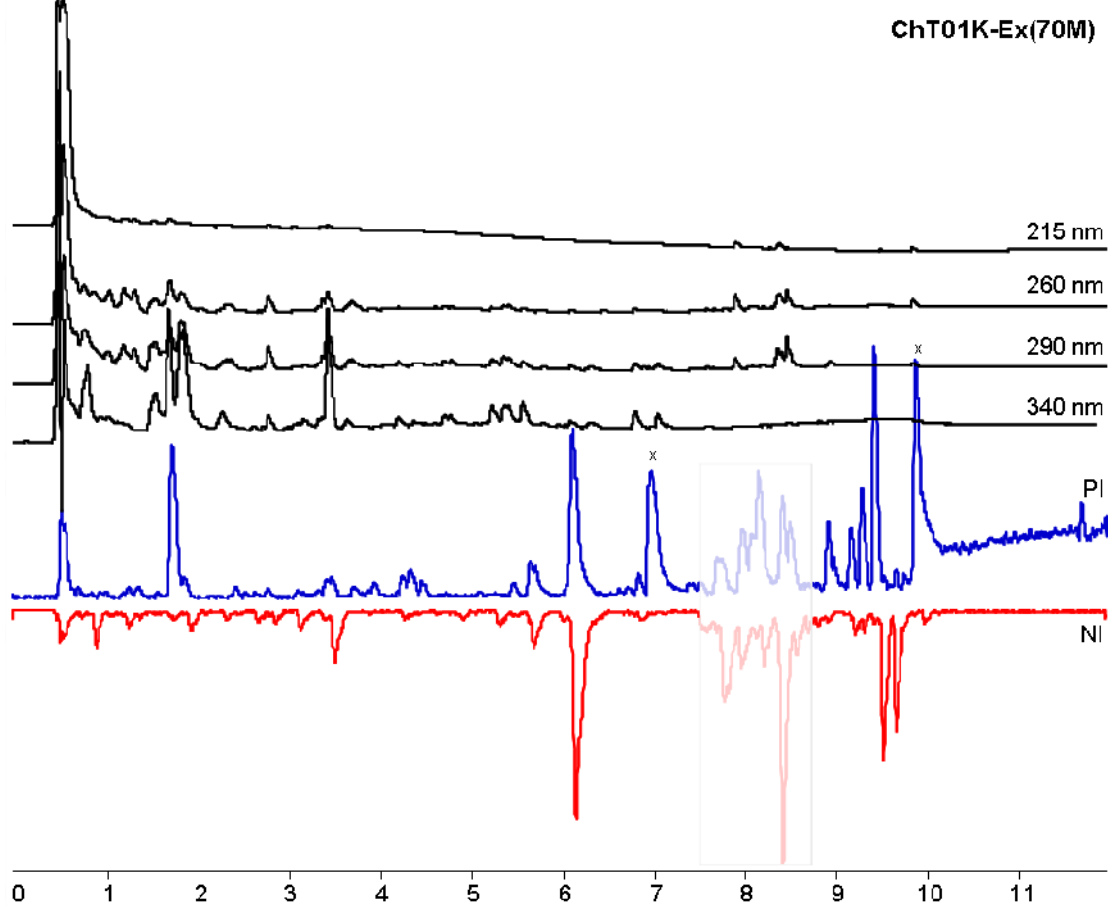
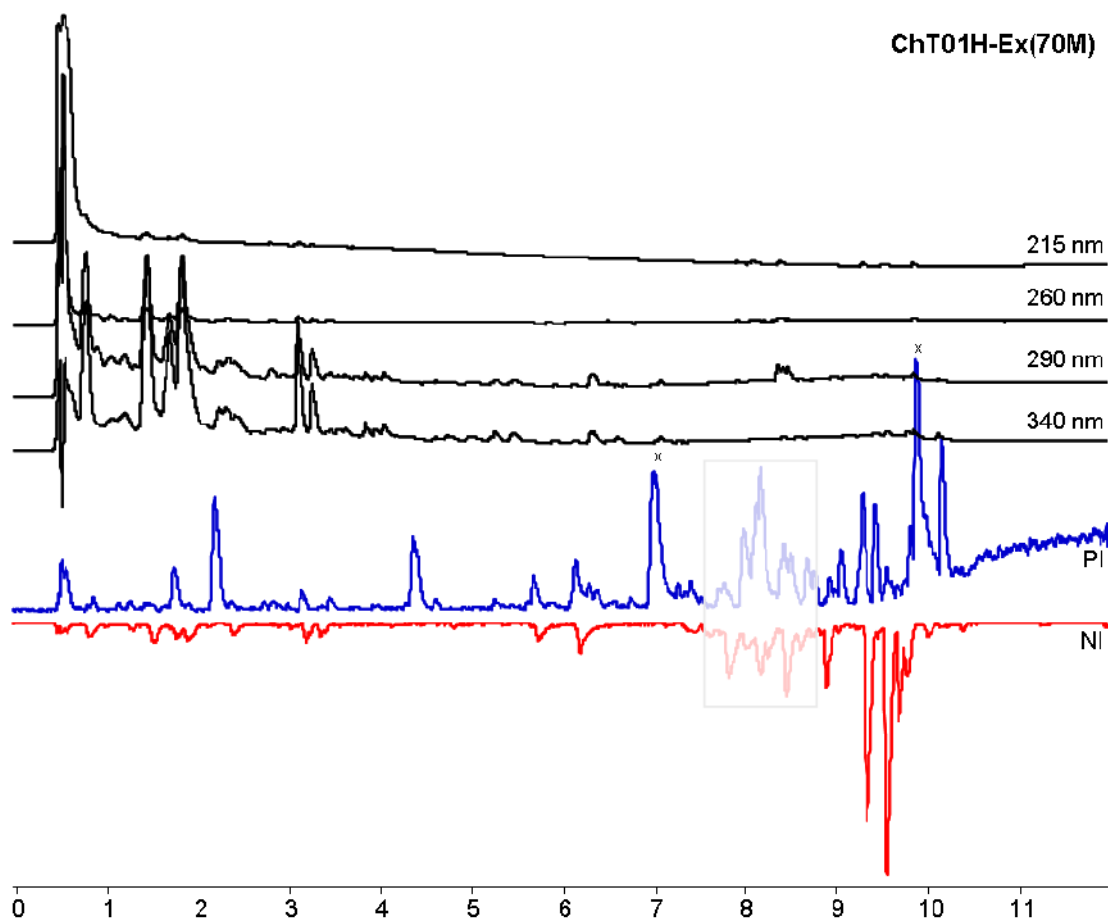


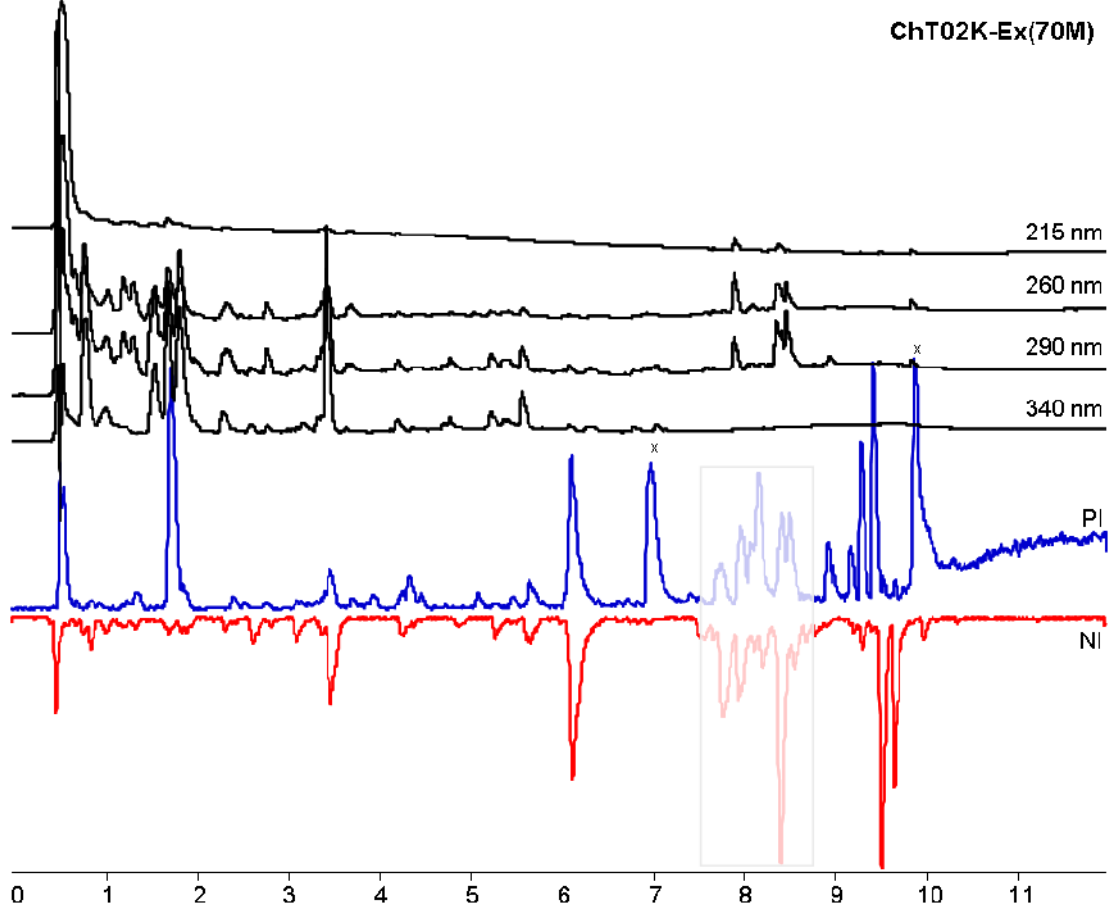
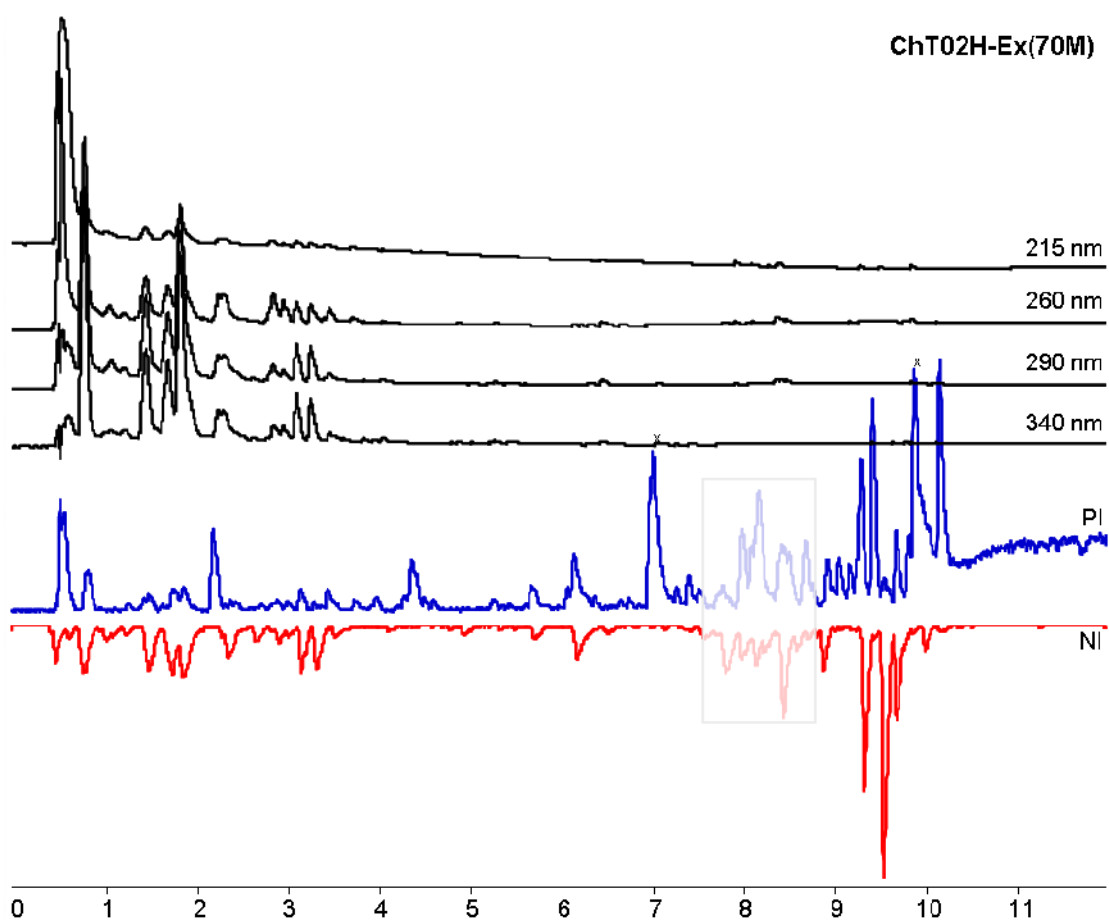


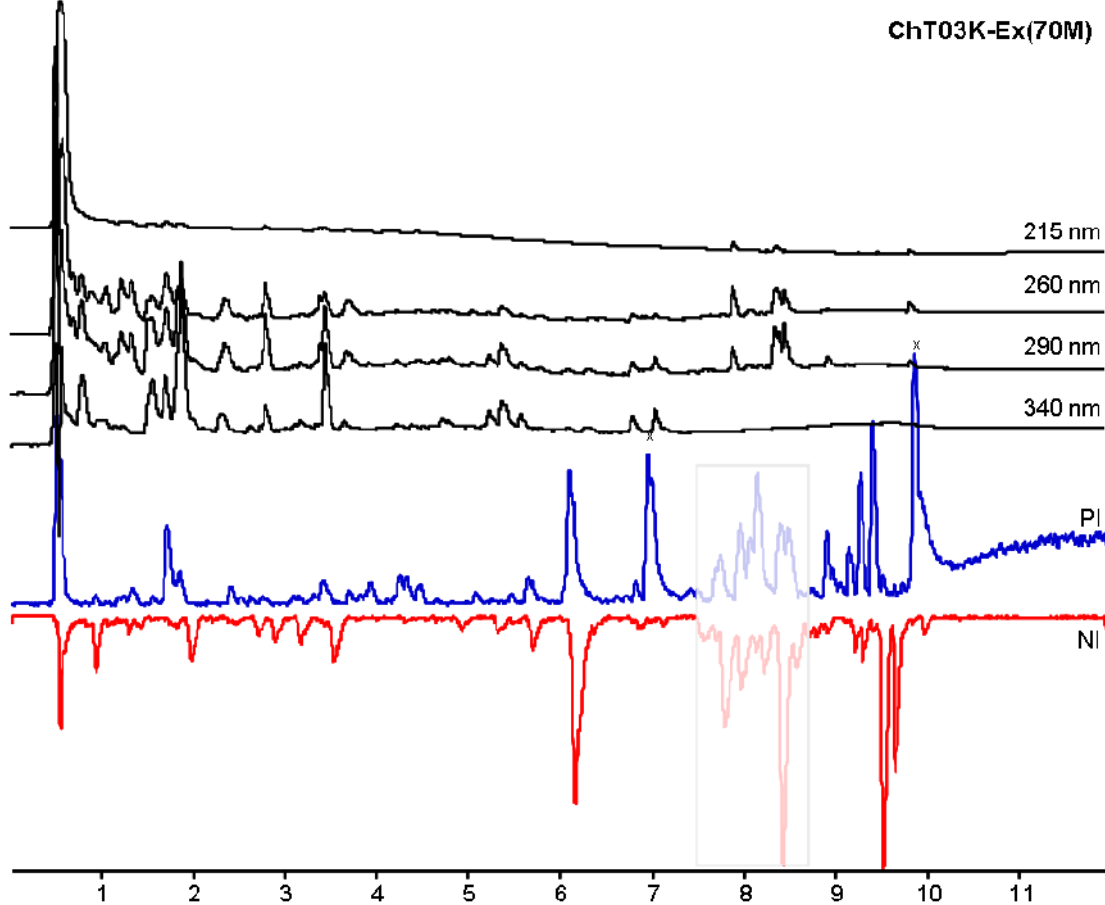
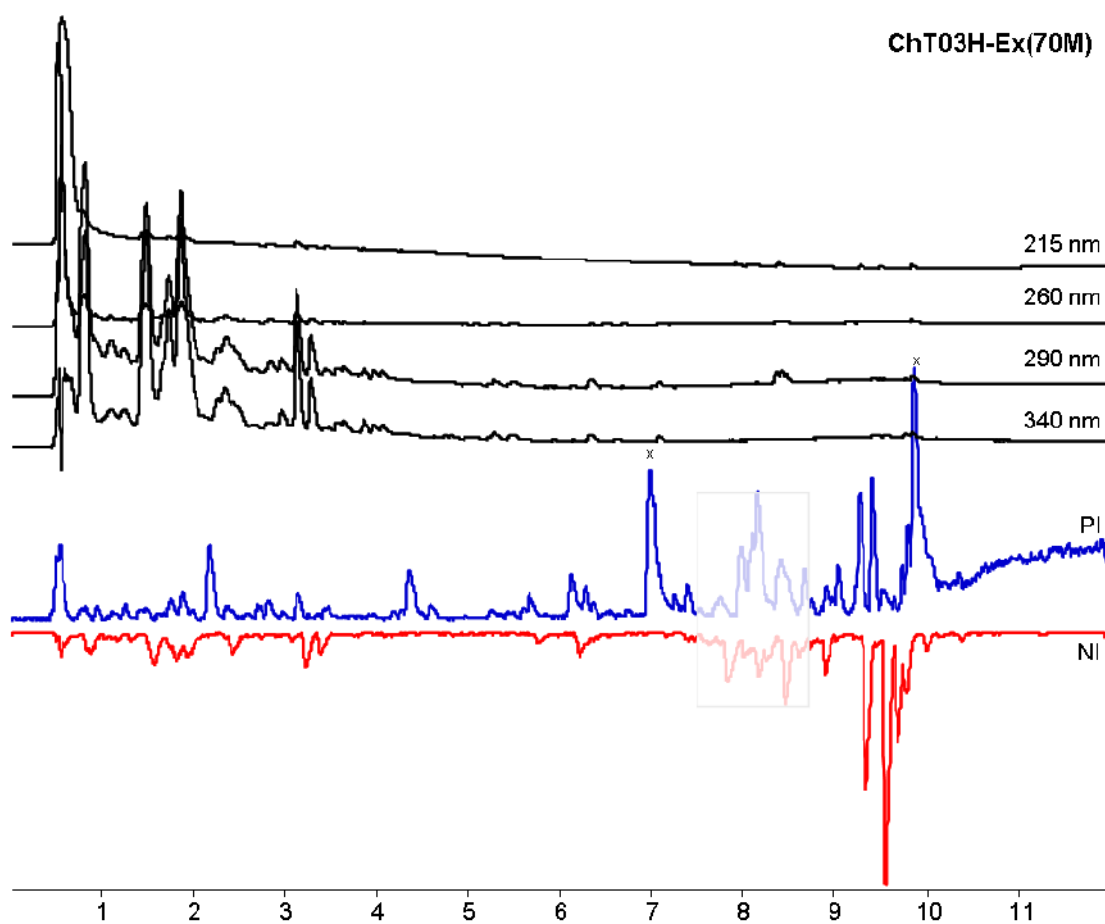


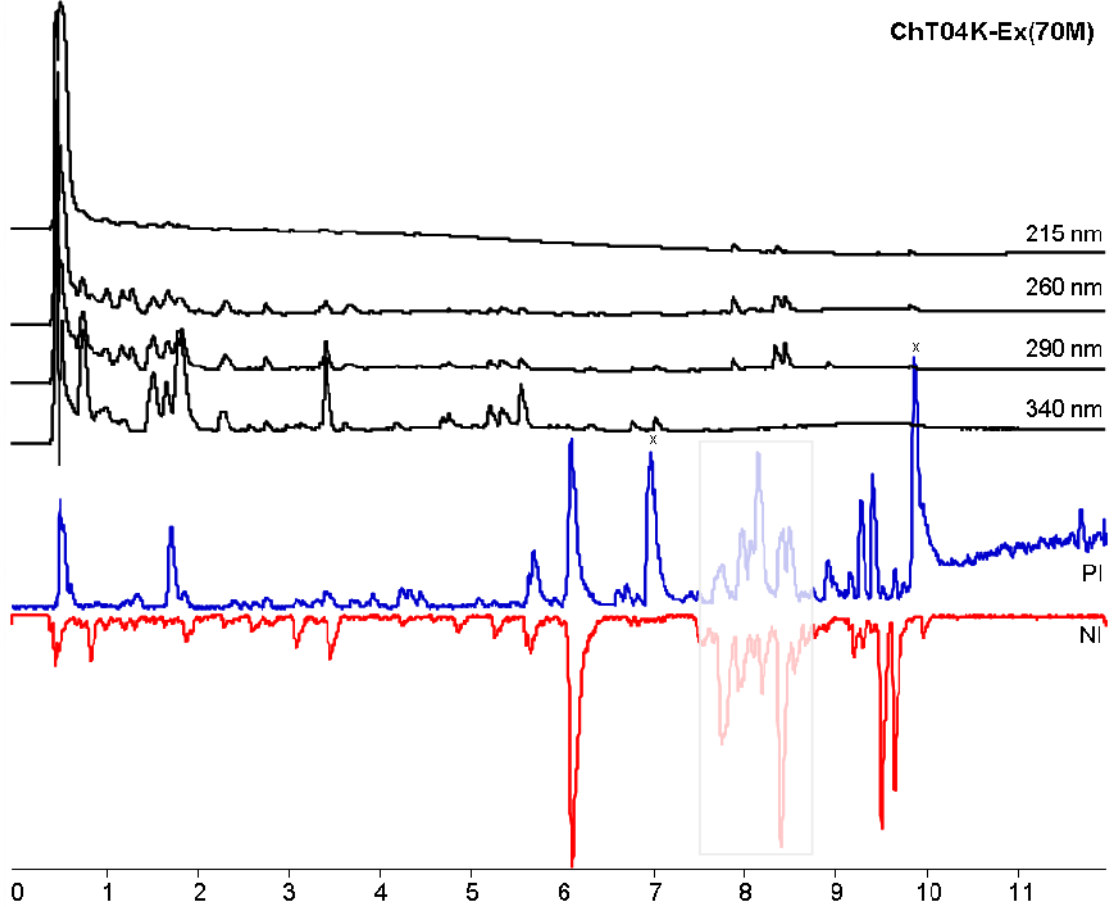
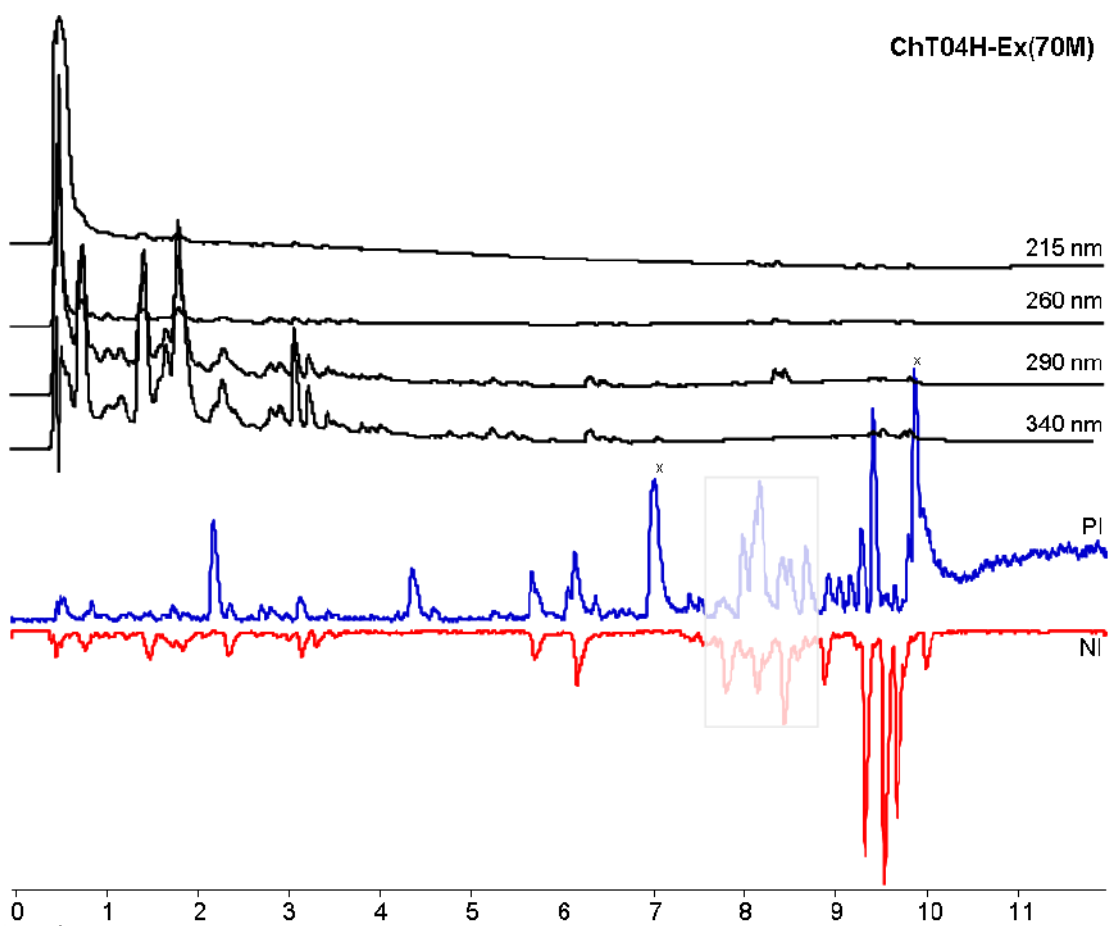


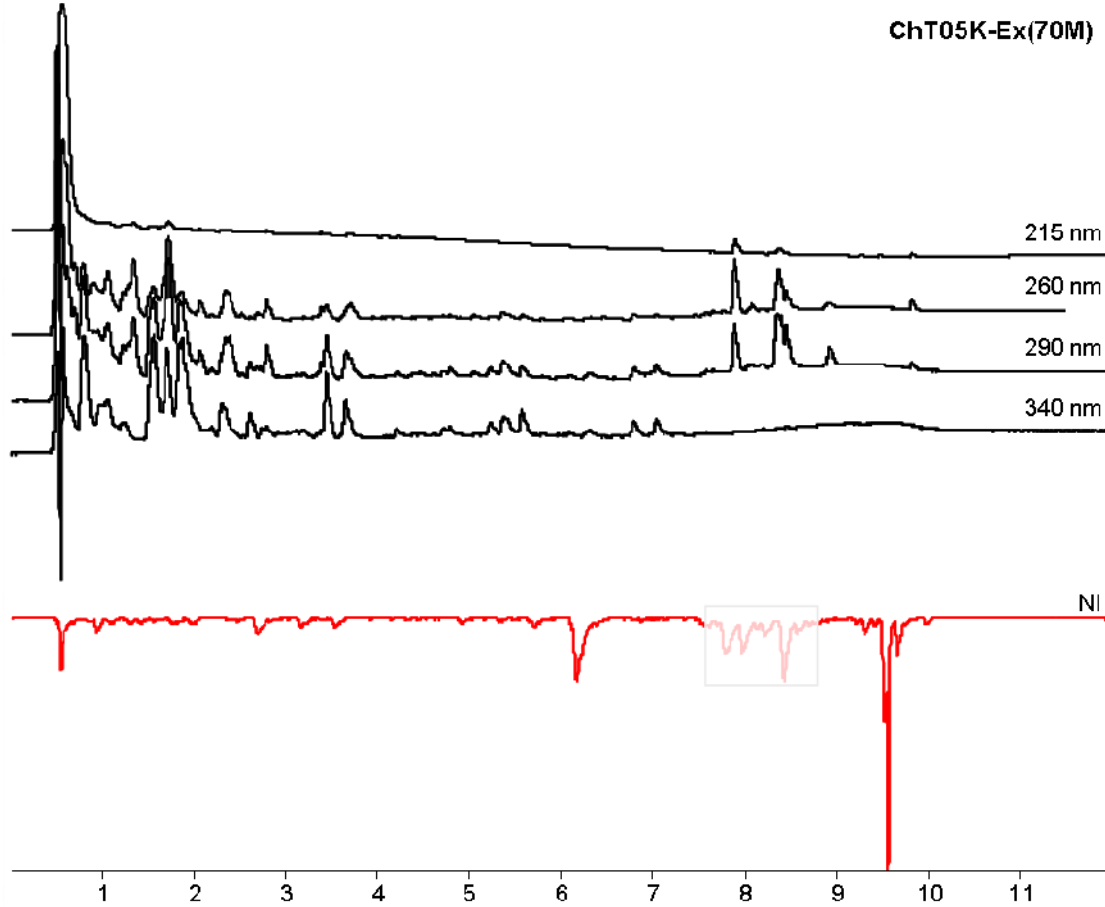
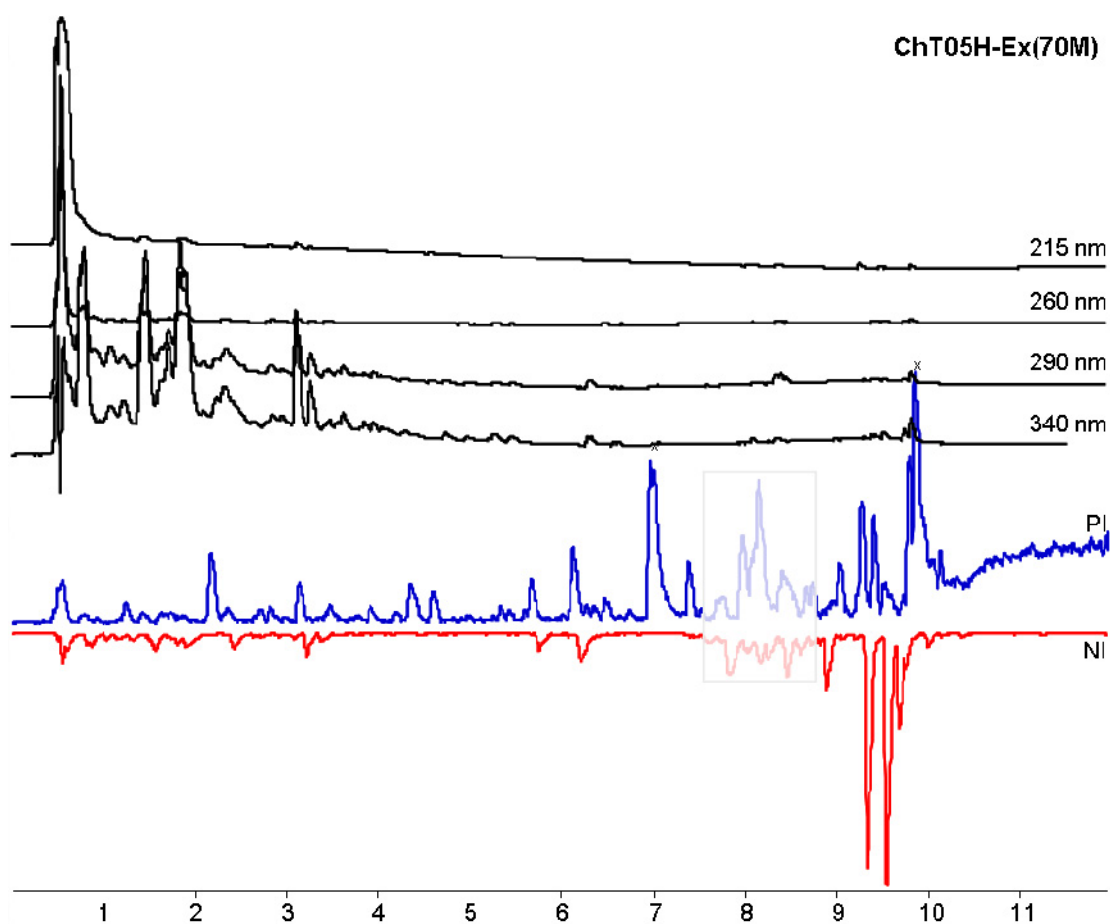


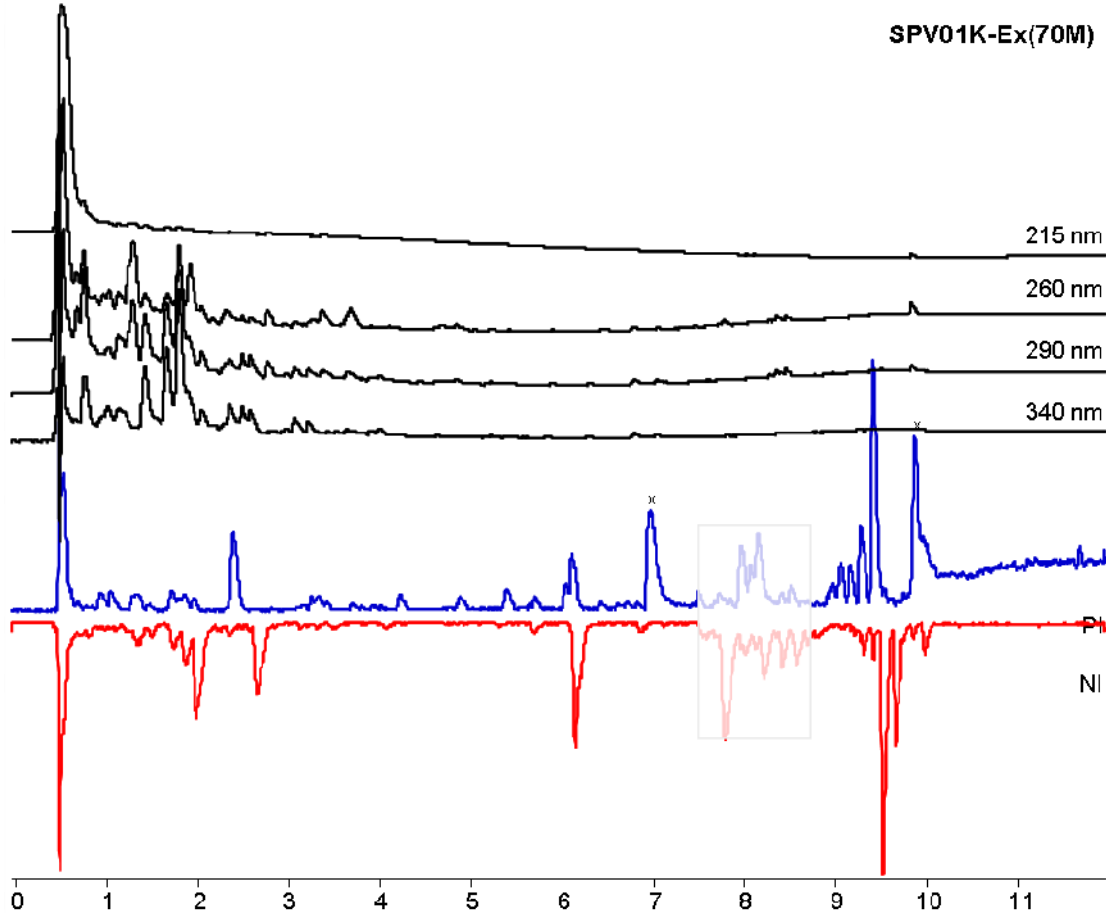
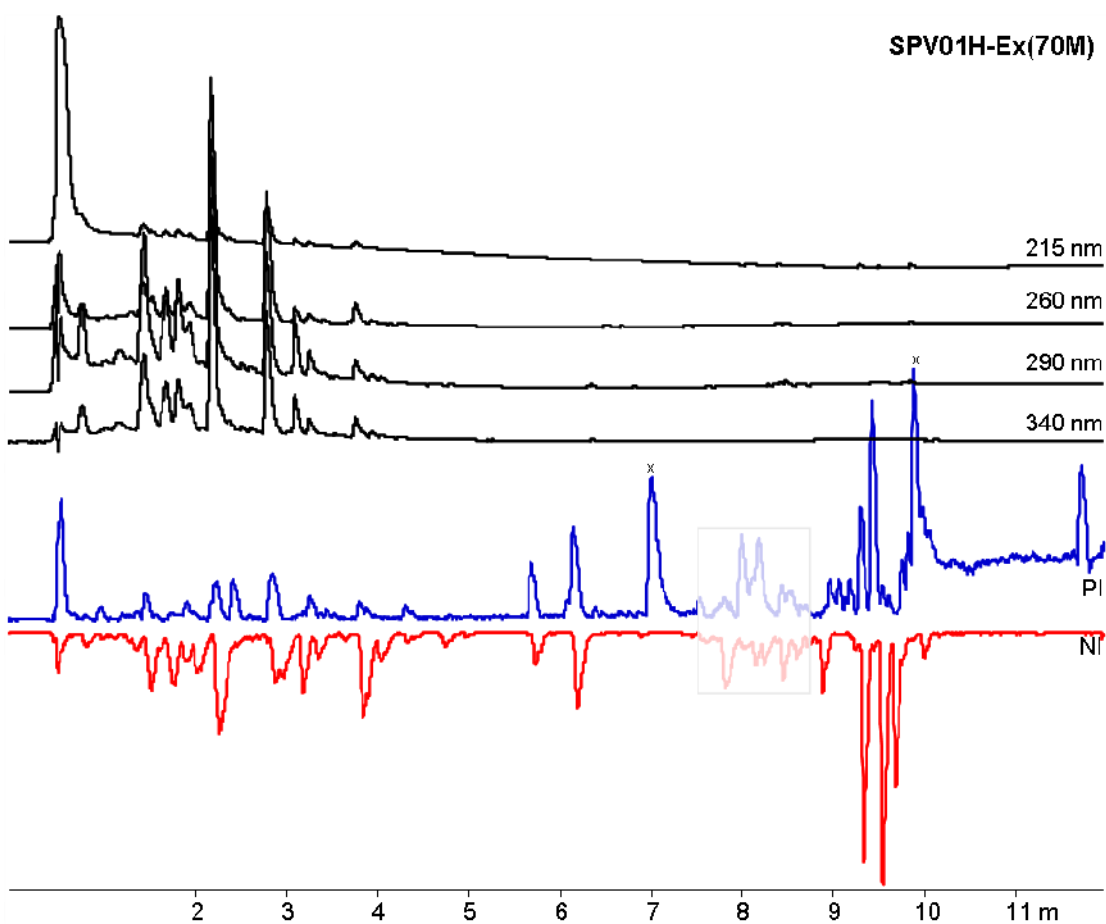




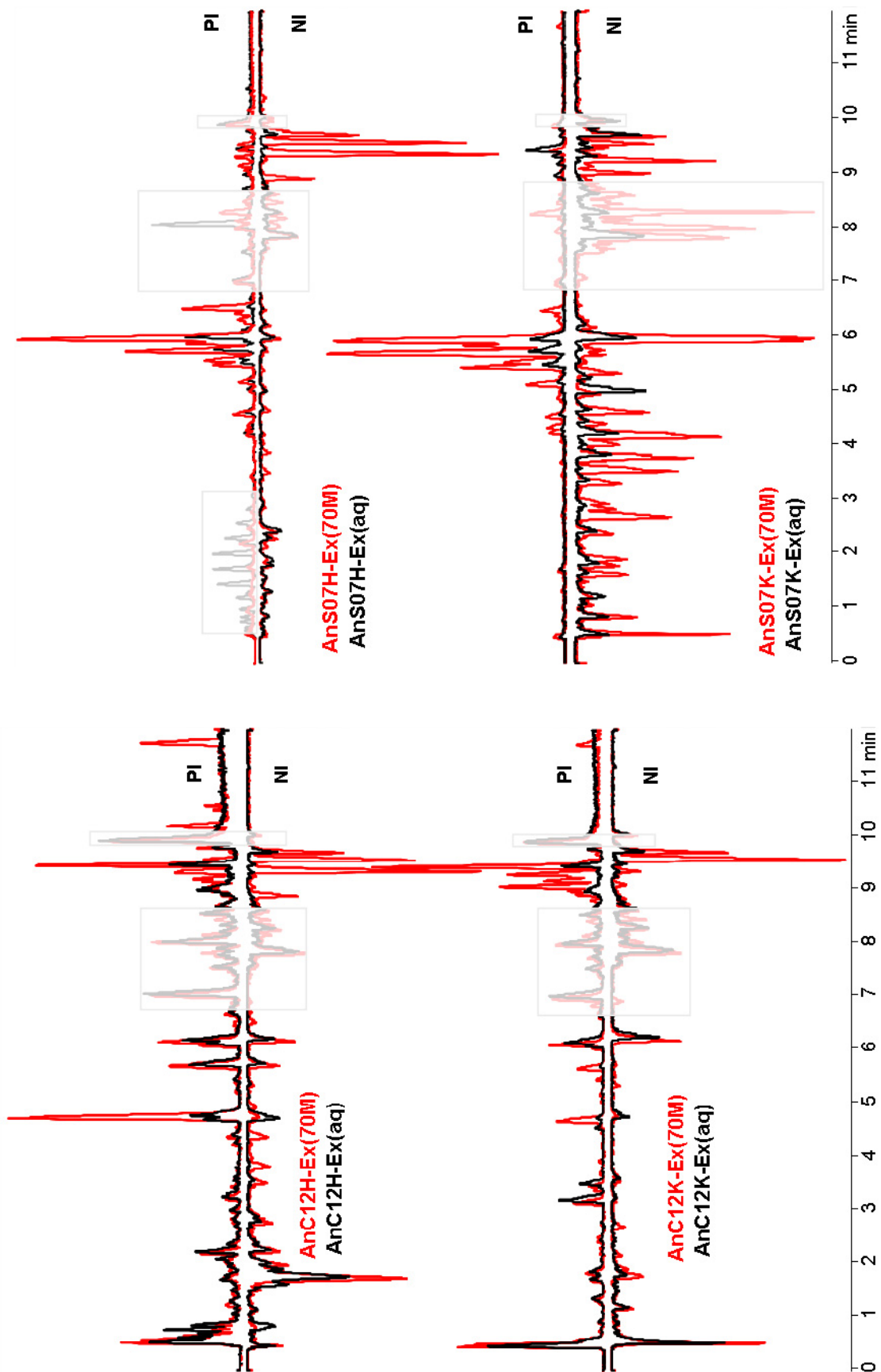


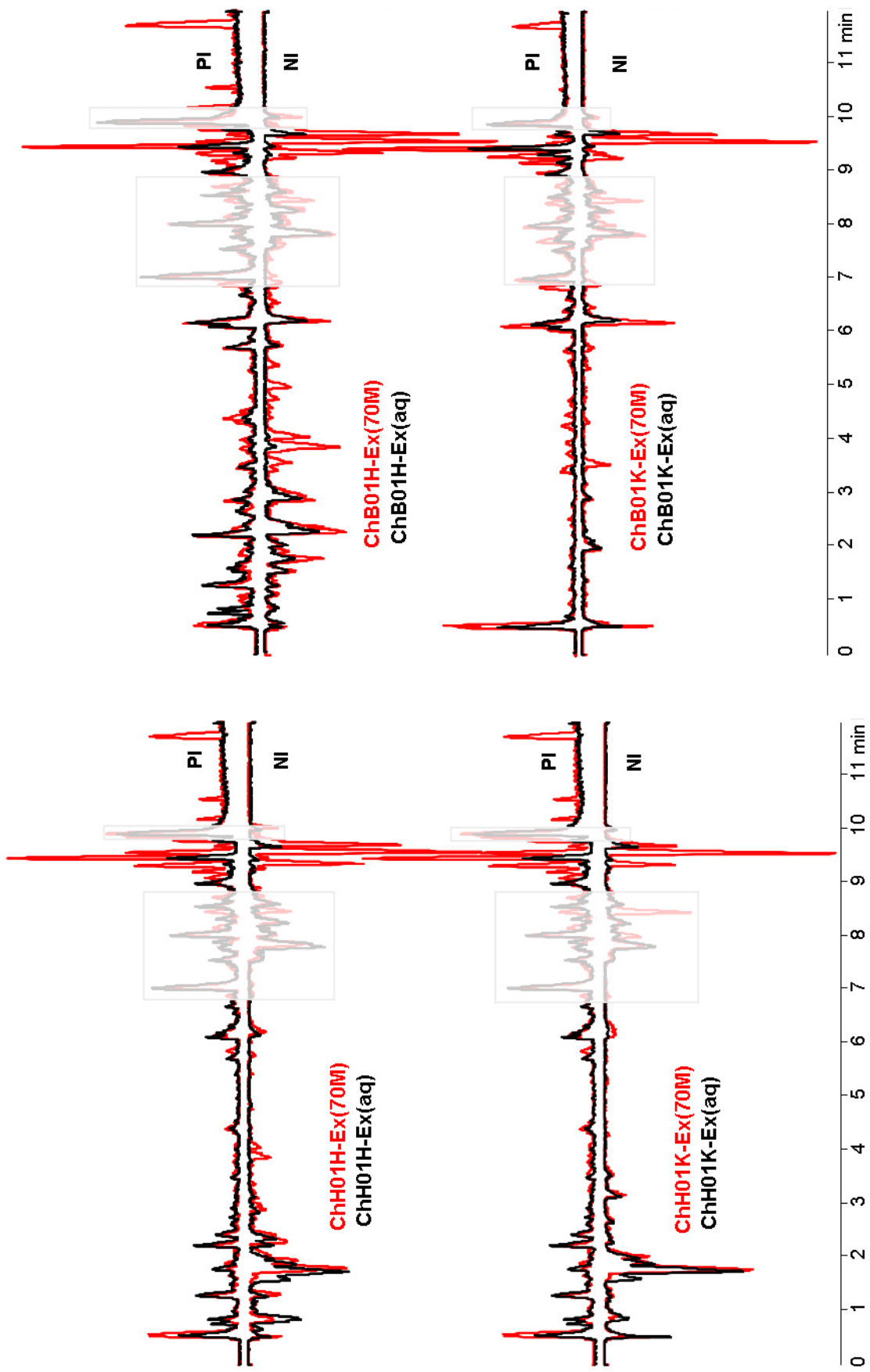


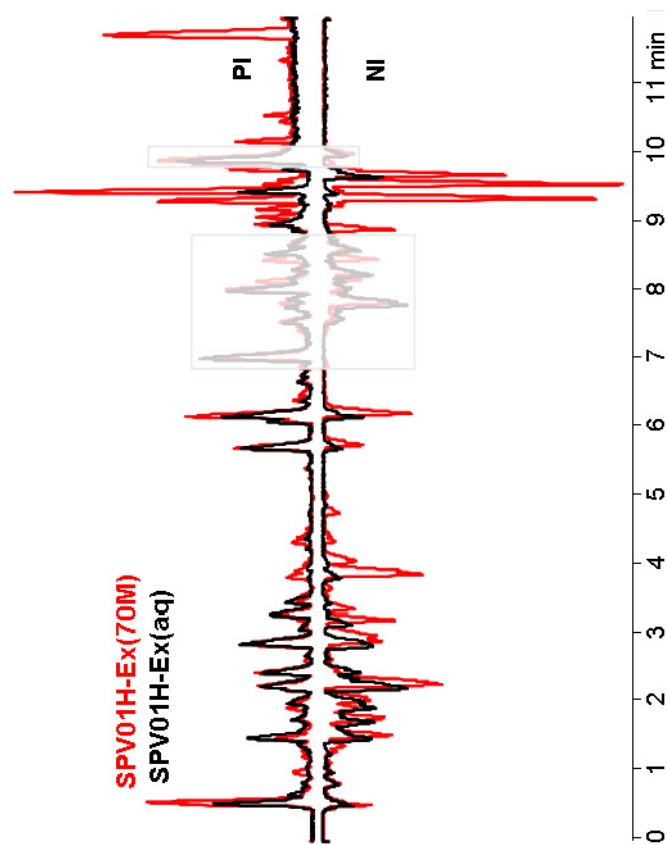
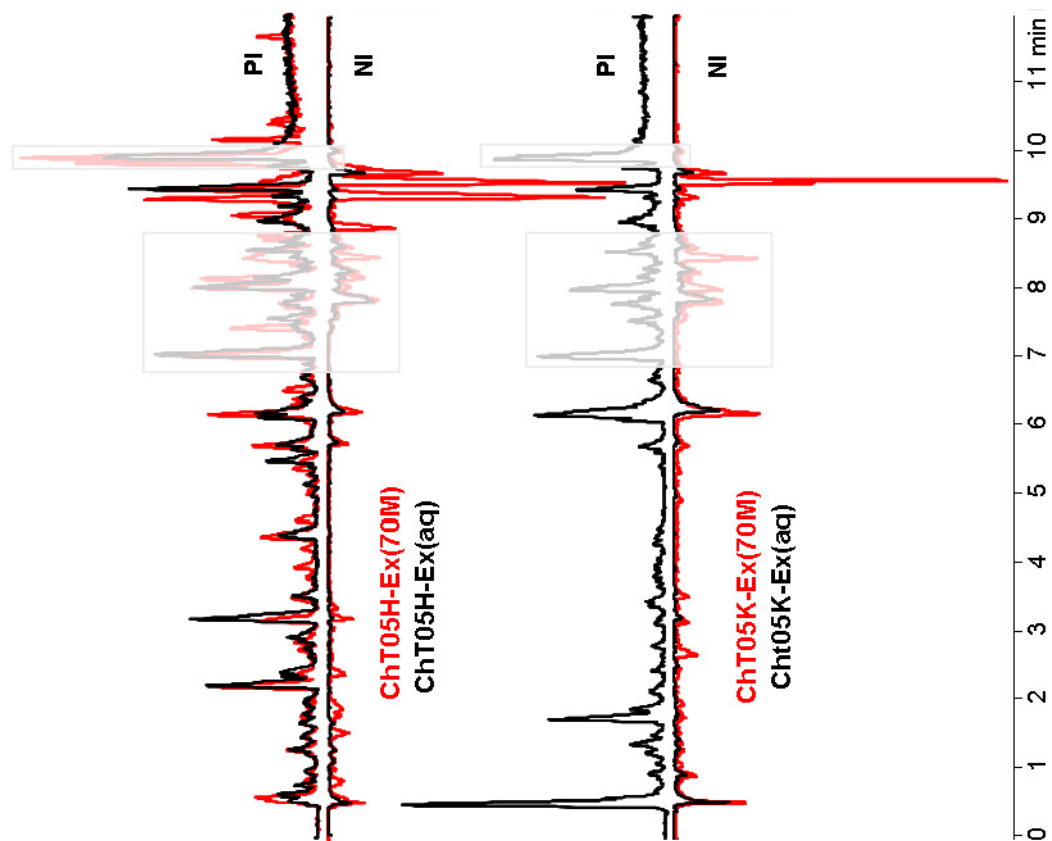




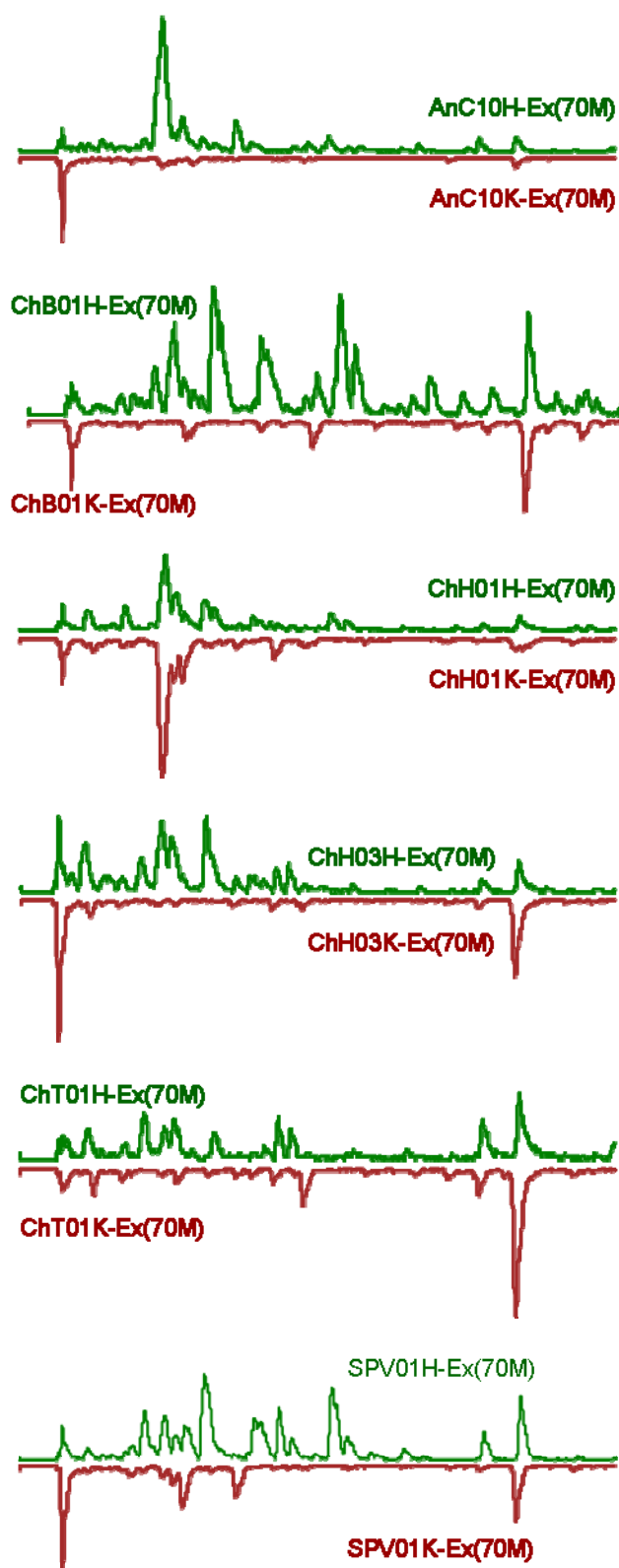
8.12. LC-MS HROMATOGRAMI VODENIH EKSTRAKATA



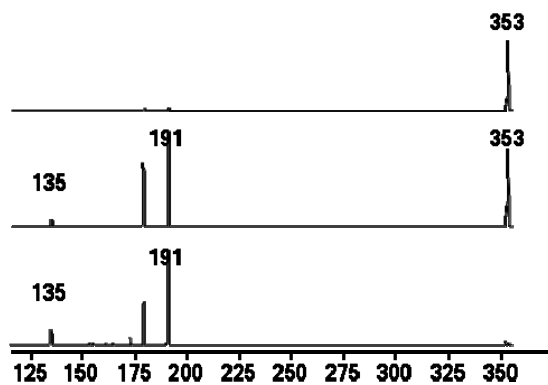




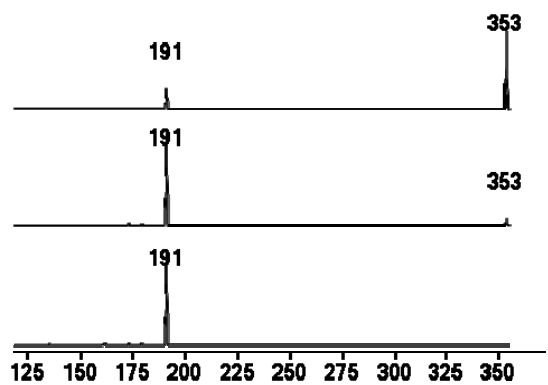
8.13. LC-MS – POREĐENJE PROFILA FENOLÂ U KORENU I HERBI



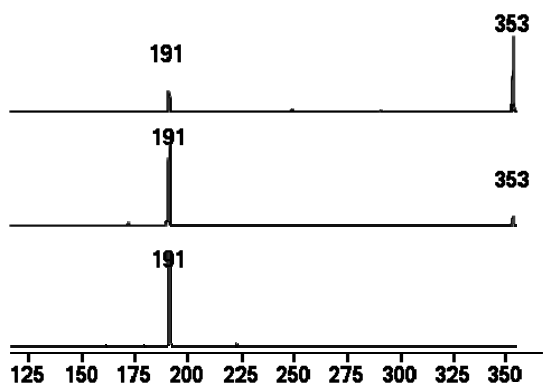
Prikazani su ESI(-) BPC hromatogrami, skalirani na istu koncentraciju.

8.14. ESI-MS² I UV SPEKTRI HLOOROGENSKIH KISELINA

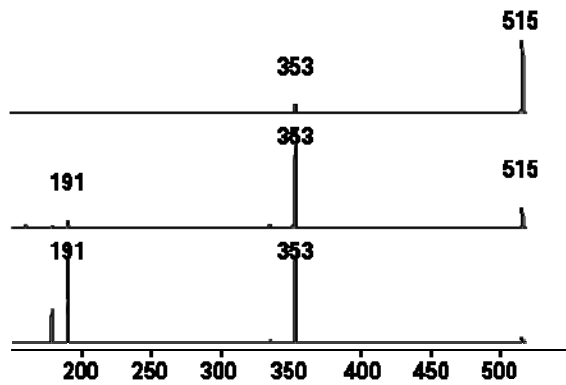
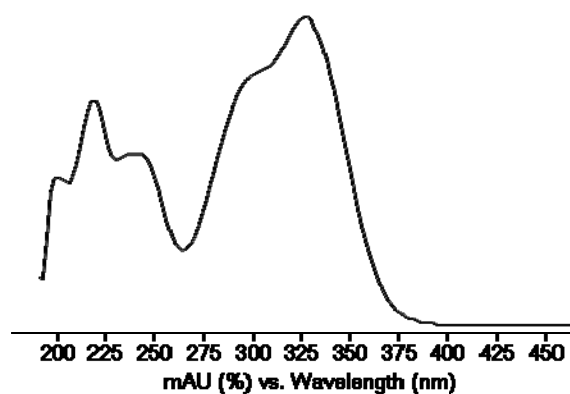
Kafeoilhinska kiselina (0,63 min, 354 Da), ESI(-)



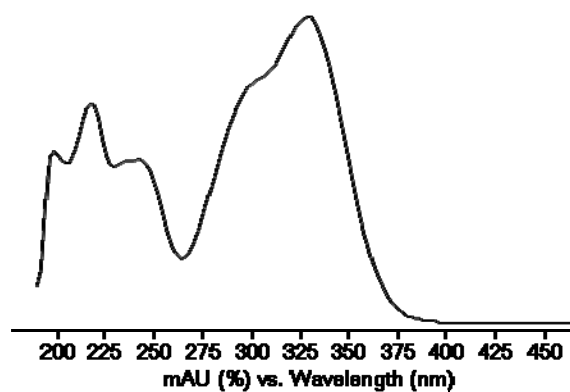
Kafeoilhinska kiselina (0,81 min, 354 Da), ESI(-)

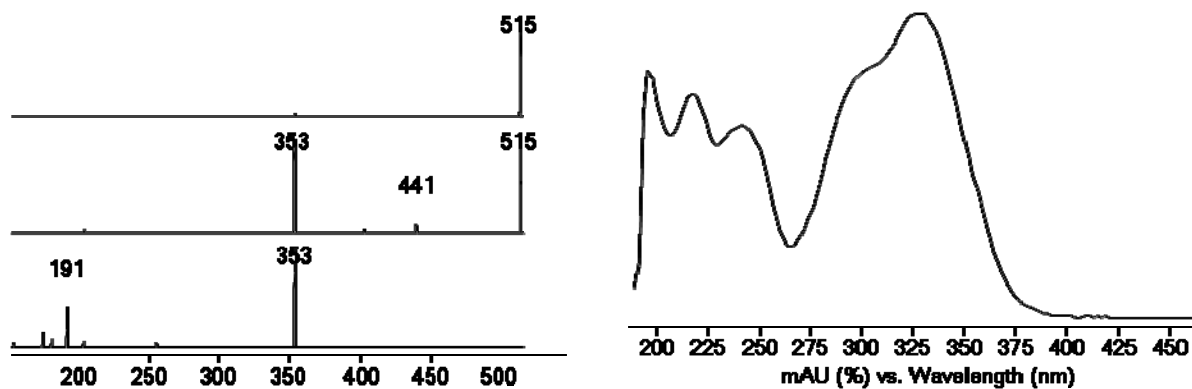


Kafeoilhinska kiselina (1,01 min, 354 Da), ESI(-)

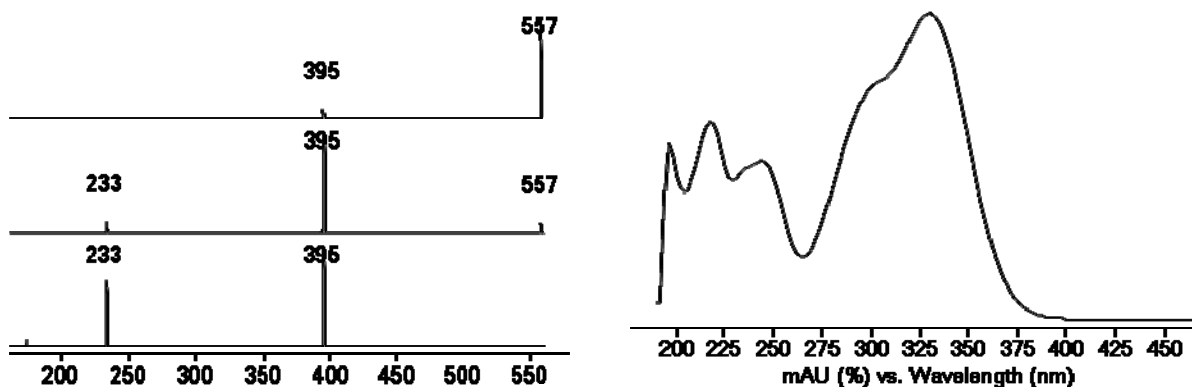


Dikafeoilhinska kiselina (1,85 min, 516 Da), ESI(-)

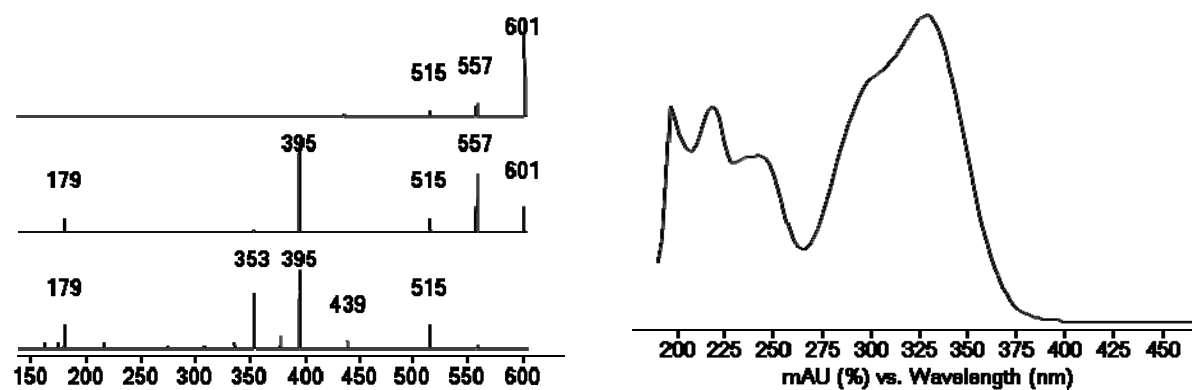




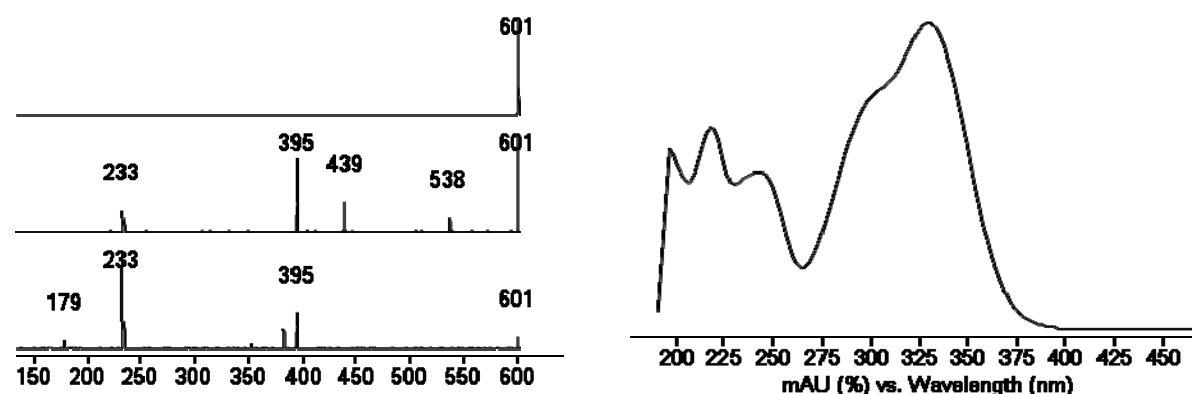
Dikafeoilhinska kiselina (2,38 min, 516 Da), ESI(-)



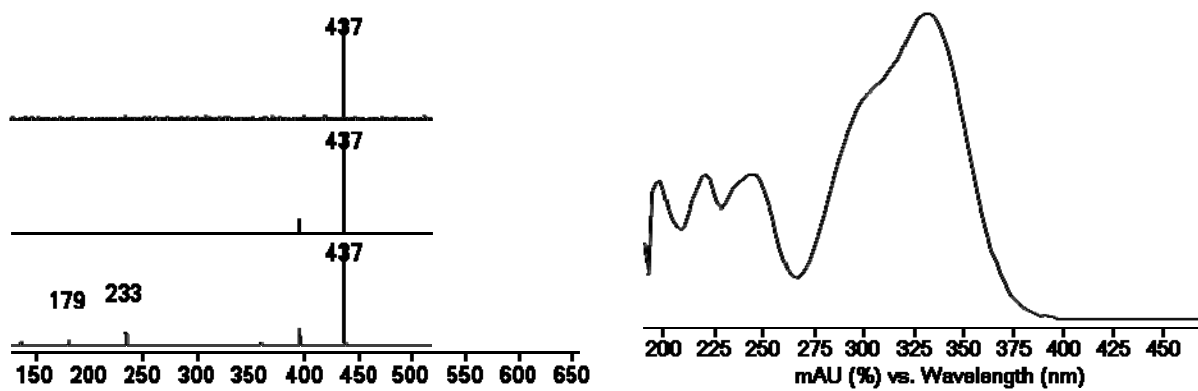
Acetil-dikafeoilhinska kiselina (3,21 min, 558 Da), ESI(-)



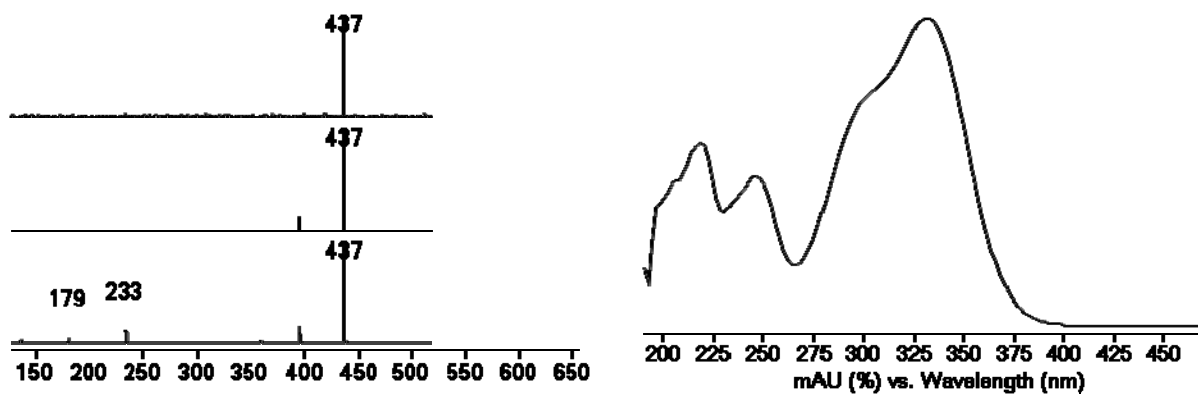
Malonil-dikafeoilhinska kiselina (1,46 min, 602 Da), ESI(-)



Malonil-dikafeoilhinska kiselina (1,73 min, 602 Da), ESI(-)

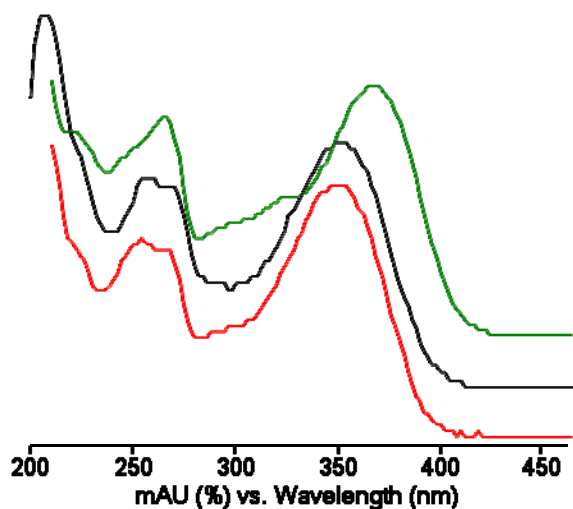
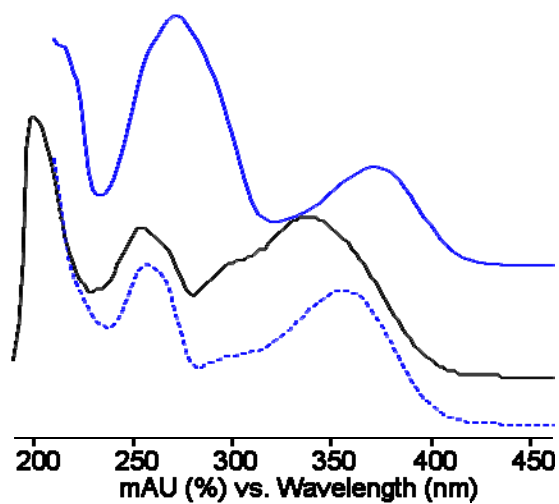
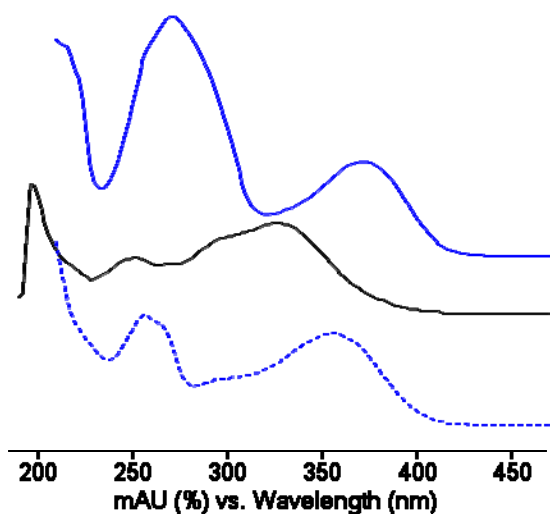
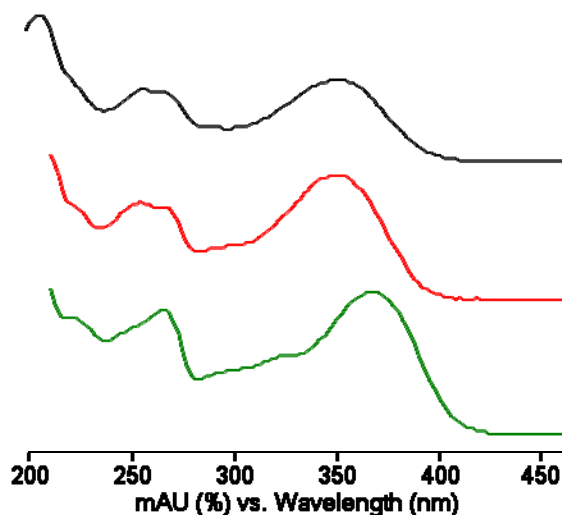
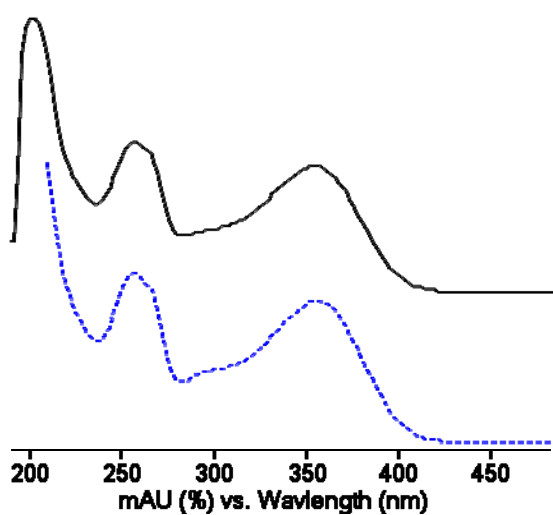
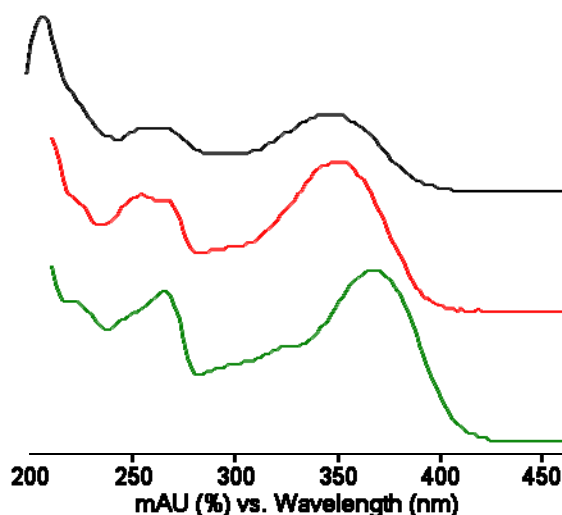


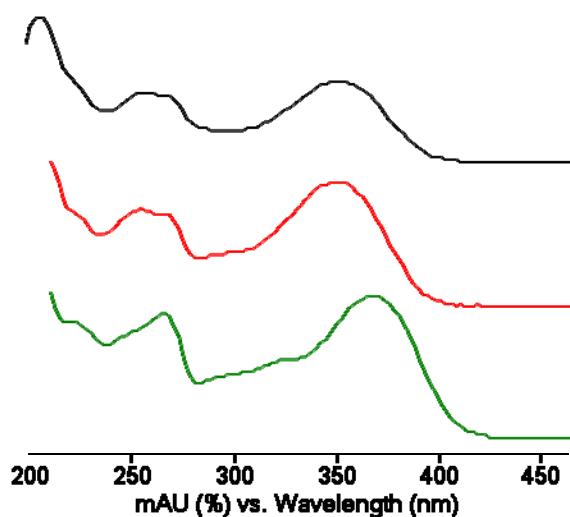
Malonil-dikafeoilhinska kiselina (1,95 min, 602 Da), ESI(-)



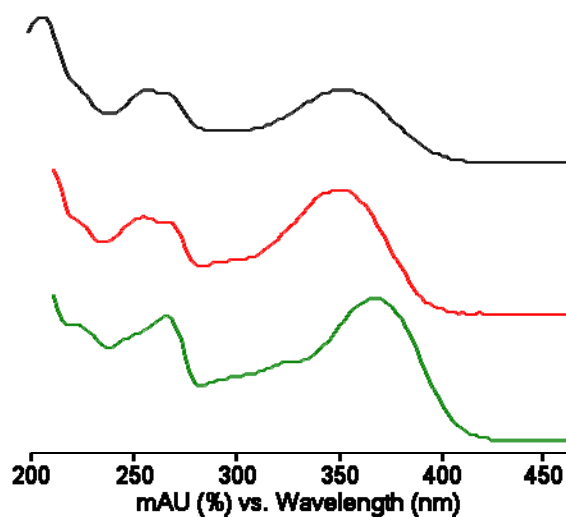
Acetil-malonil-dikafeoilhinska kiselina (3,13 min, 644 Da), ESI(-)

8.15. UV SPEKTRI FLAVONOIDA

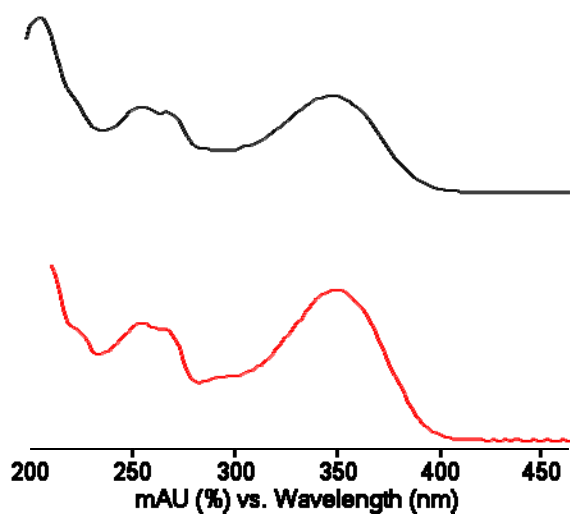
*Luteolin-O-heksozid (2,14 min, 448 Da)**Rutin (2,21 min, 610 Da)**Kvercetin-O-heksozid (2,23 min, 464 Da)**Luteolin-O-heksozid (2,26 min, 448 Da)**Kvercetin-O-heksozid (2,36 min, 464 Da)**Luteolin-O-malonilheksozid (2,46 min, 534 Da)*



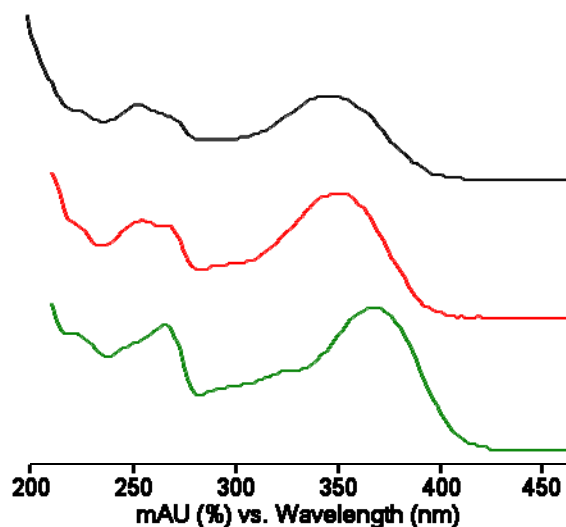
Luteolin-O-malonilheksozid (2,74 min, 534 Da)



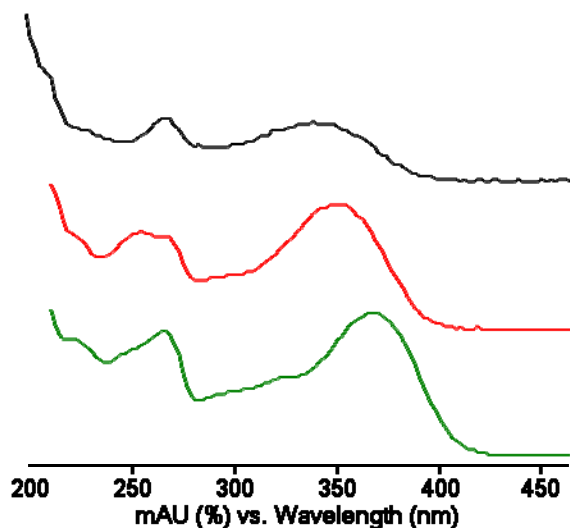
Luteolin-O-malonilheksozid (2,89 min, 534 Da)



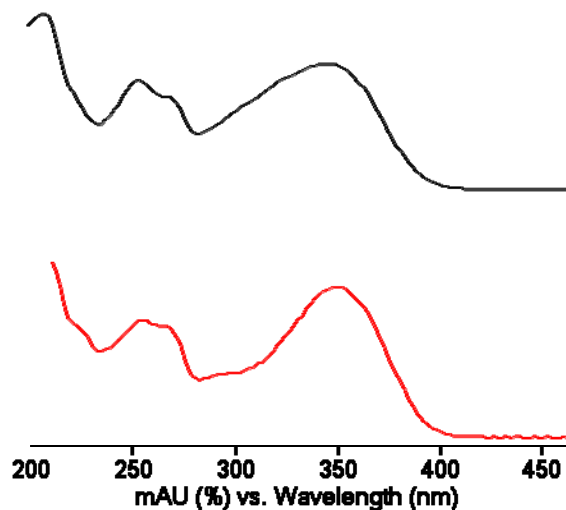
Metilluteolin-O-heksozid (2,97 min, 462 Da)



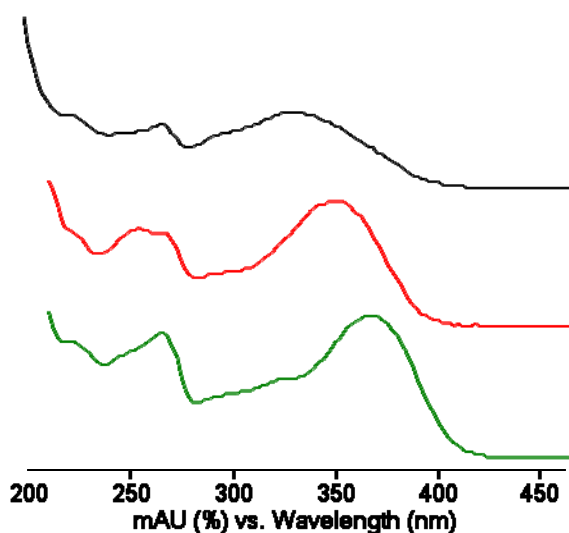
Luteolin-O-acetilheksozid (2,99 min, 490 Da)



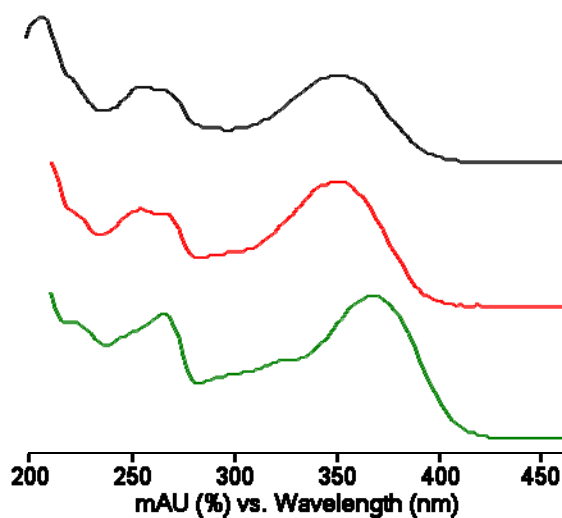
x-O-acetilheksozid (3,40 min, 490 Da)



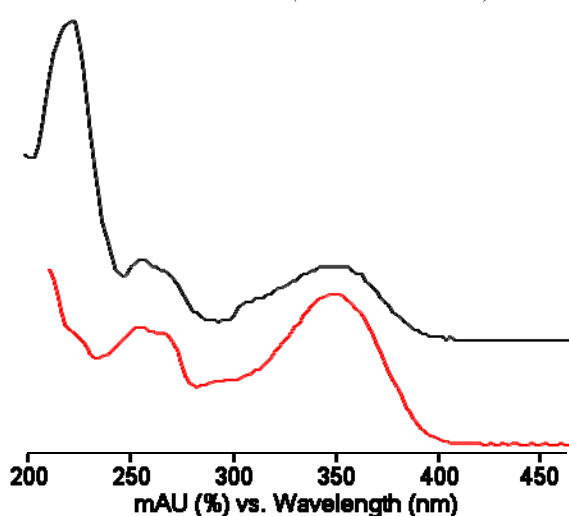
Metilluteolin-O-malonilheksozid (3,48 min, 548 Da)



x-O-acetilheksozid (3,55 min, 490 Da)

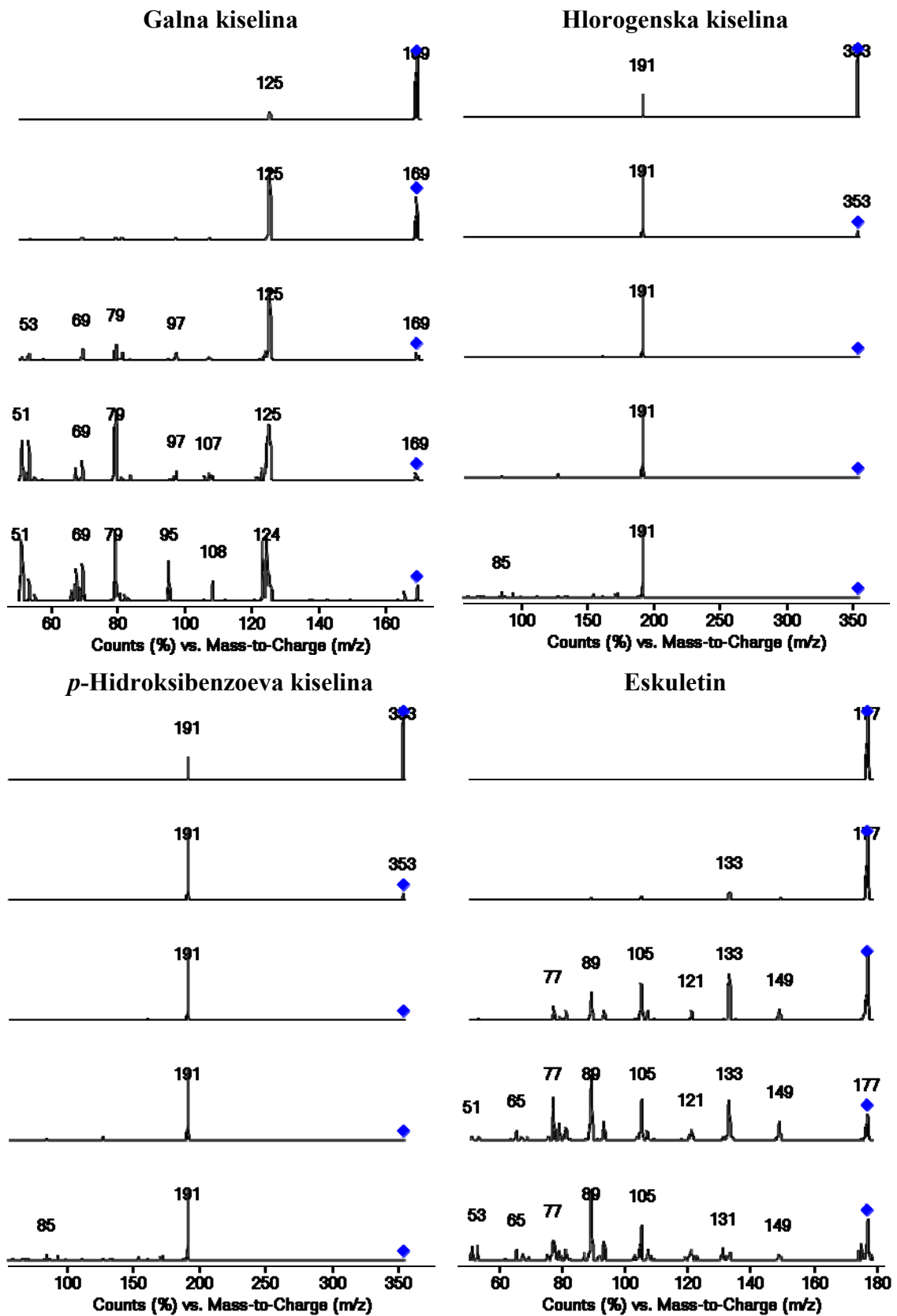


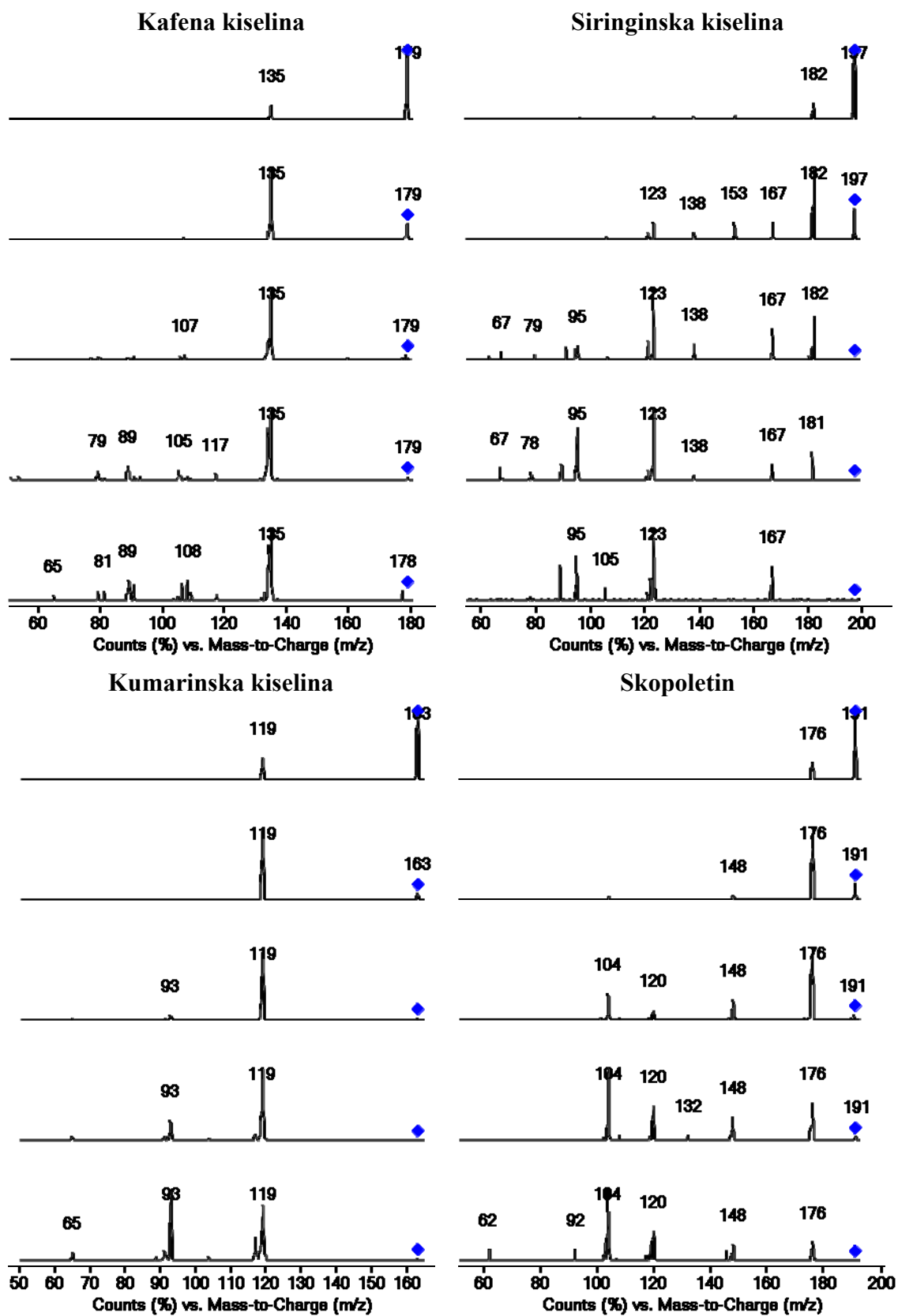
Luteolin-O-acetilheksozid (3,73 min, 490 Da)



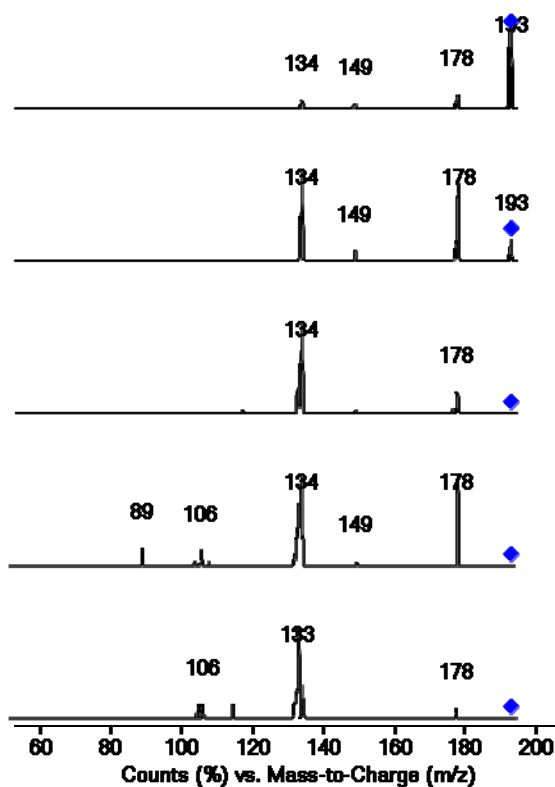
Metilluteolin-O-acetilheksozid (4,45 min, 504 Da)

(crveno – luteolin, zeleno – kemferol, plavo – kvercetin, plavo isprekidano - rutin)

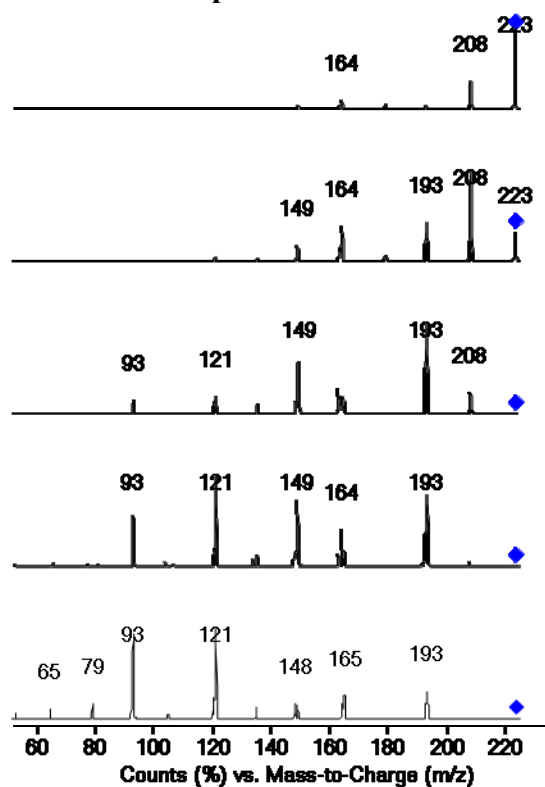
8.16. LC-MS I LC-MS-MS KVANTITACIJA – MS² SPEKTRI STANDARDA



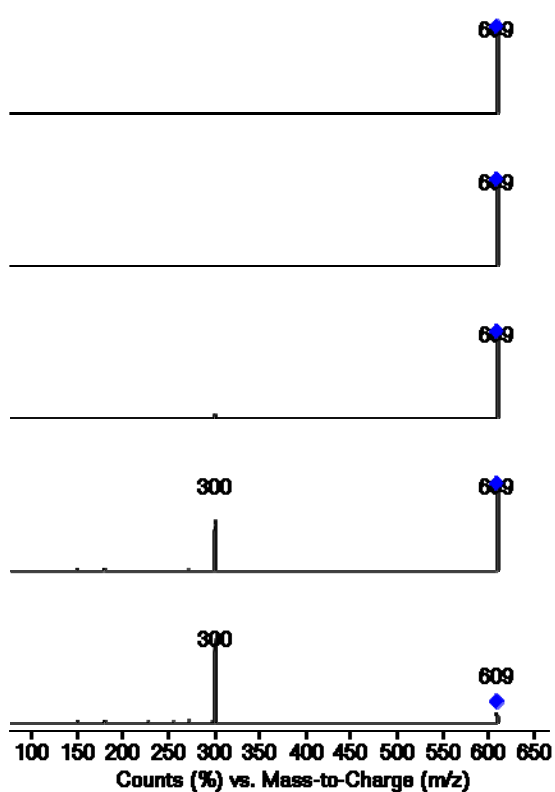
Ferulna kiselina



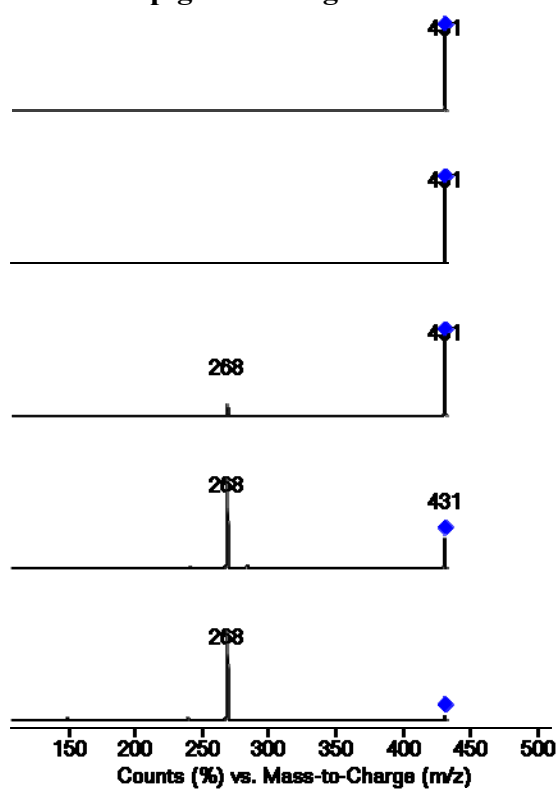
Sinapinska kiselina

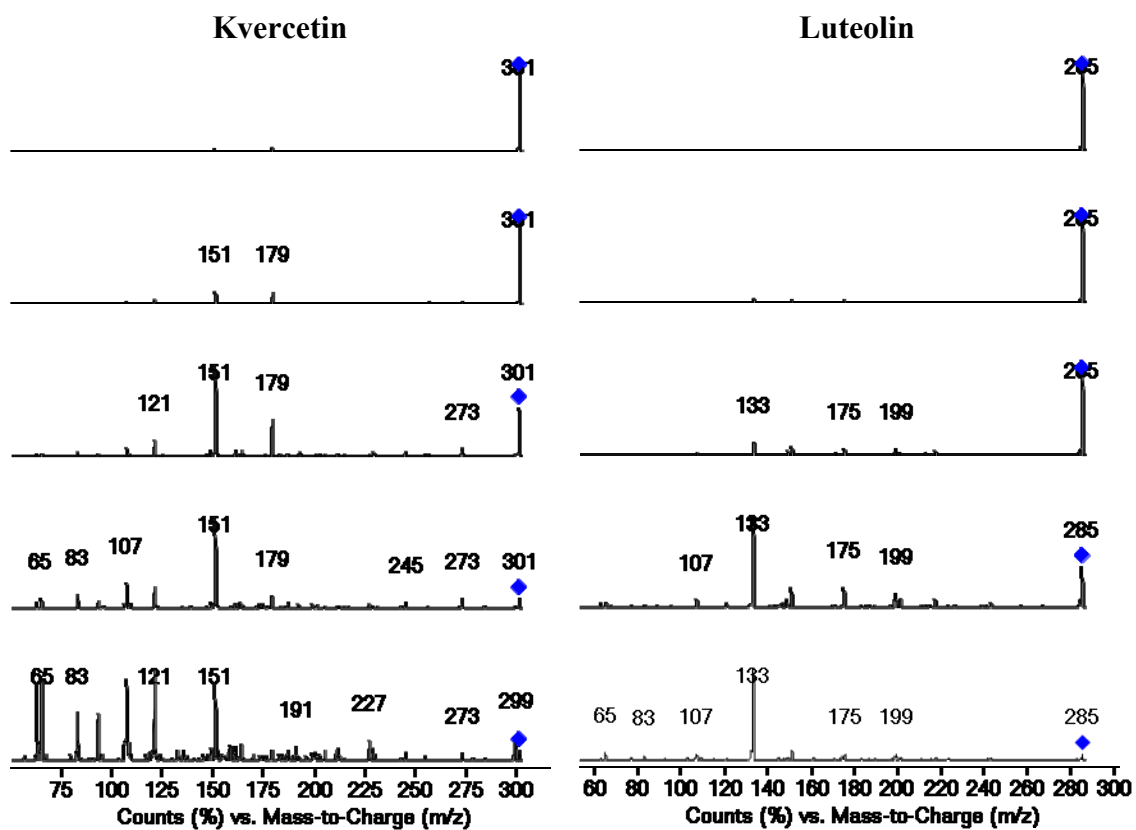
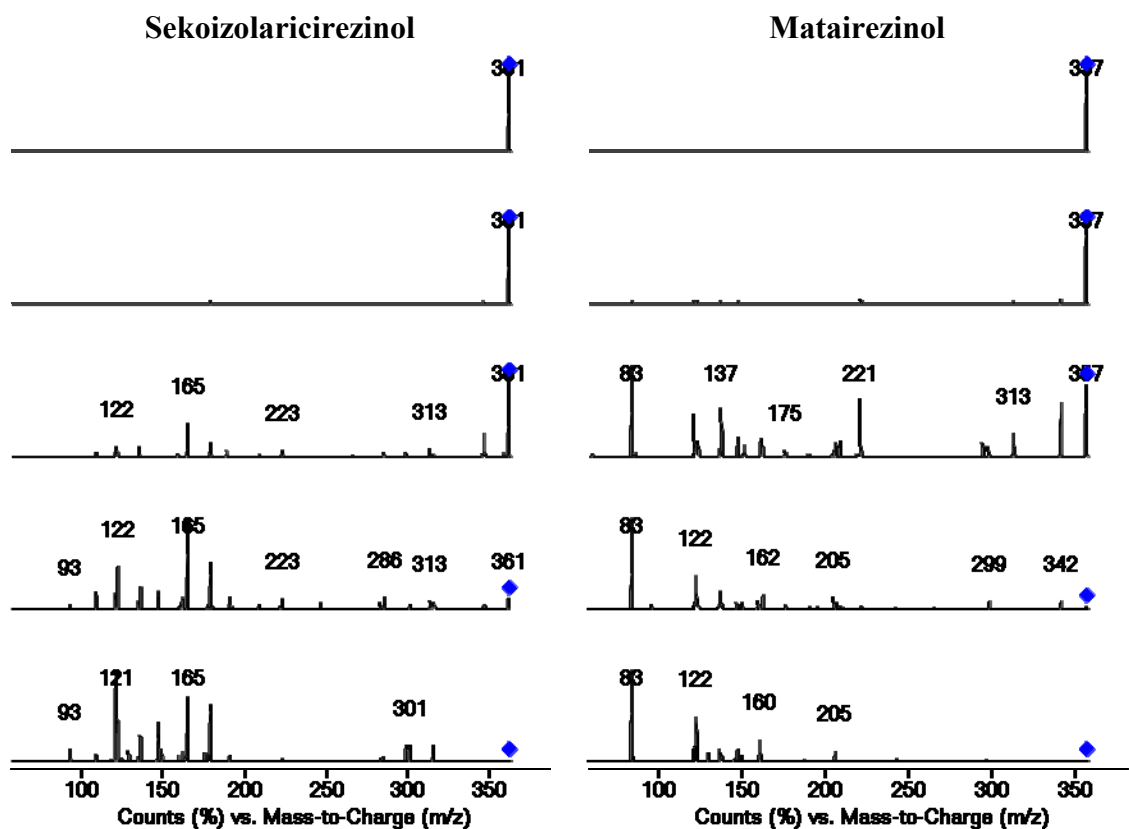


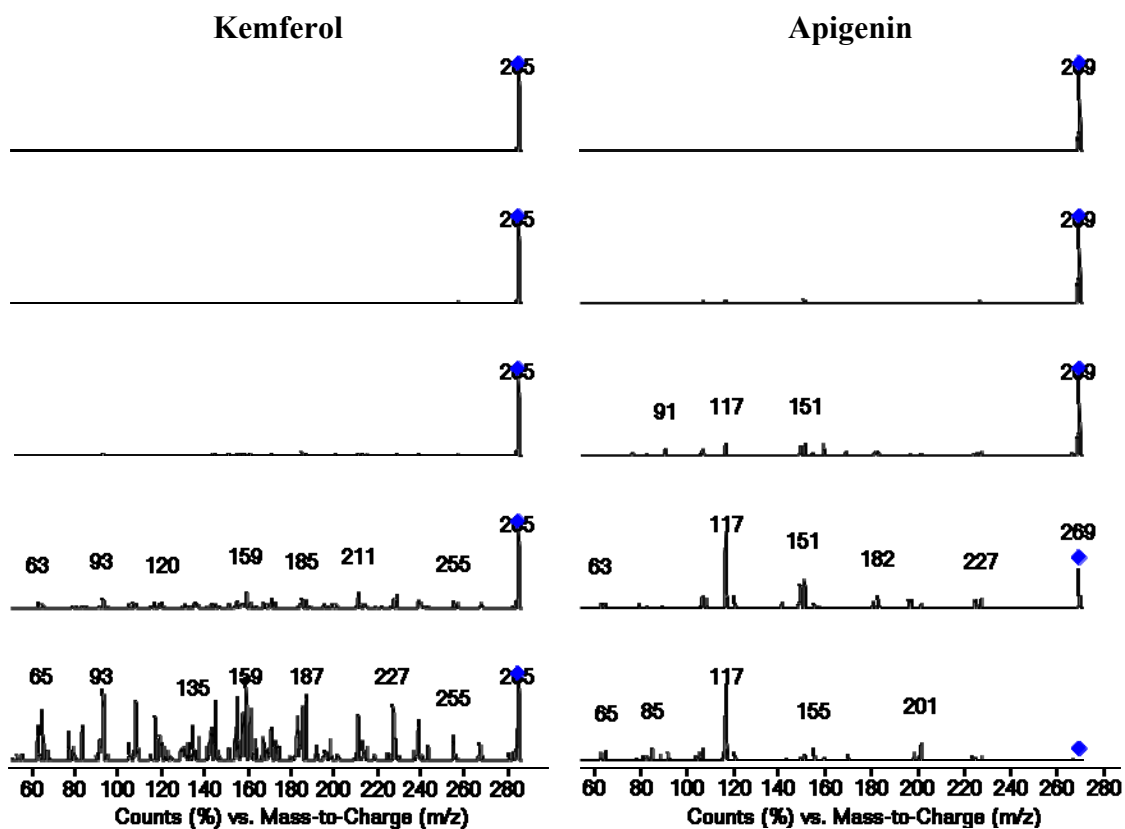
Rutin



Apigenin-7-O-glukozid





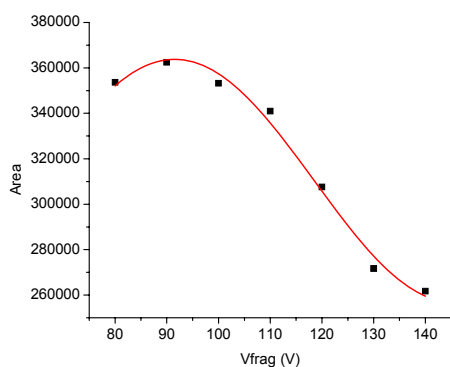


Svi spektri snimljeni su u Product Ion Scan modu, uz negativnu jonizaciju, pri optimalnom naponu fragmentora i kolizionim energijama 0–40 V (uz inkremente po 10 V).

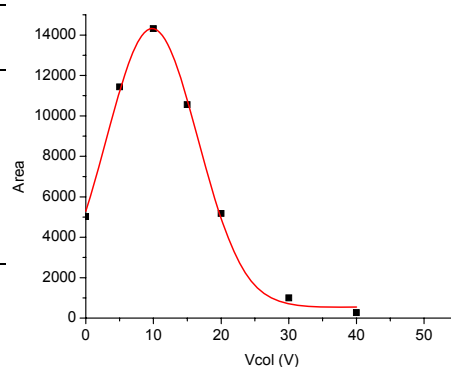
8.17. LC-MS I LC-MS-MS KVANTITACIJA – OPTIMIZACIJA MS PARAMETARA

Galna kiselina

V_{frag} [V]	Area
80	353636
90	362489
100	353198
110	340965
120	307599
130	271671
140	261706

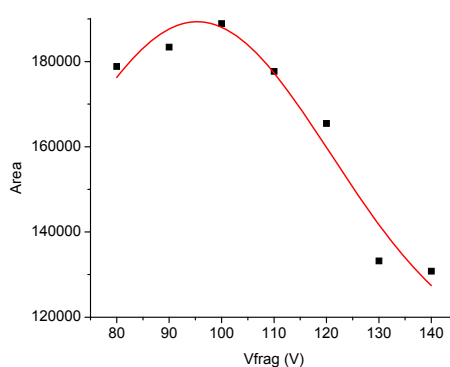


V_{col} [V]	Area
0	5025
5	11440
10	14317
15	10563
20	5180
30	1000
40	273

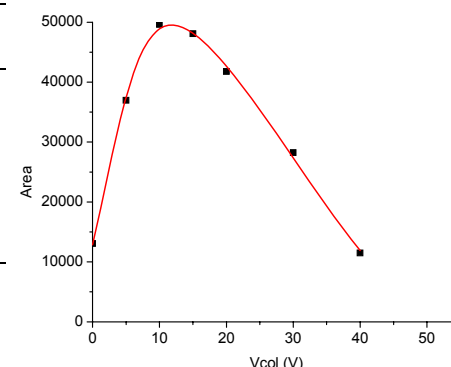


Hlorogenska kiselina

V_{frag} [V]	Area
80	178853
90	183383
100	188896
110	177699
120	165450
130	133208
140	130778

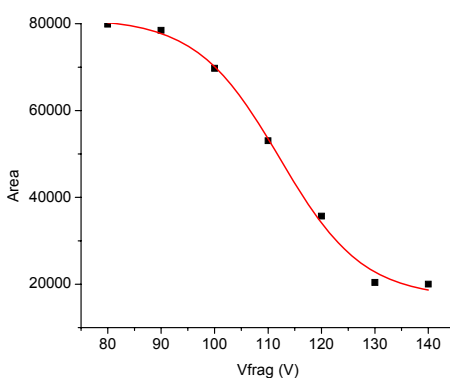


V_{col} [V]	Area
0	13058
5	36987
10	49624
15	48098
20	41785
30	28231
40	11496

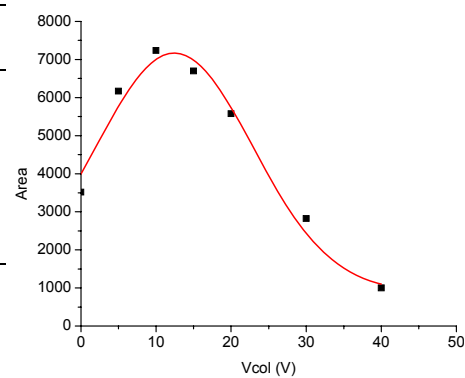


p-Hidroksibenzoeva kiselina

V_{frag} [V]	Area
80	79888
90	78481
100	69723
110	53029
120	35679
130	20417
140	20028

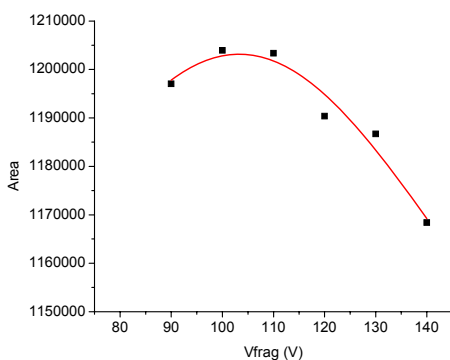


V_{col} [V]	Area
0	3517
5	6168
10	7235
15	6698
20	5576
30	2821
40	1001

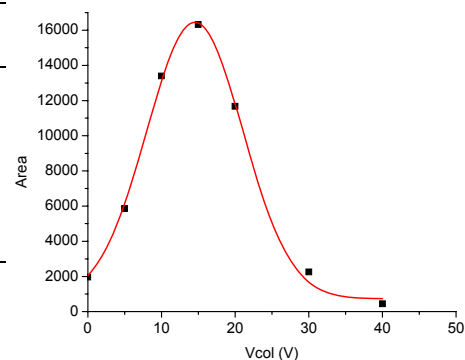


Eskuletin

V_{frag} [V]	Area
80	1201639
90	1197024
100	1203944
110	1203345
120	1190366
130	1186708
140	1168394

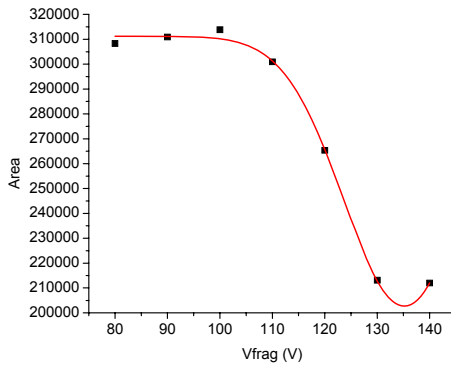


V_{col} [V]	Area
0	1962
5	5860
10	13400
15	16323
20	11673
30	2253
40	443

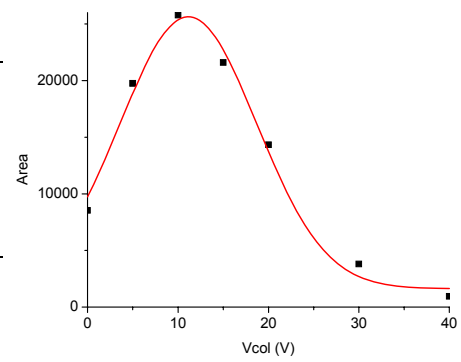


Kafena kiselina

V_{frag} [V]	Area
80	308299
90	310870
100	313856
110	300931
120	265326
130	213114
140	211982

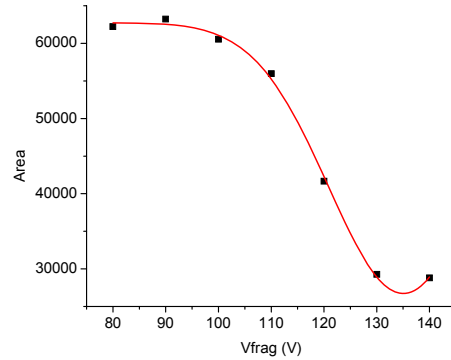


V_{col} [V]	Area
0	8538
5	19758
10	25794
15	21595
20	14328
30	3806
40	957

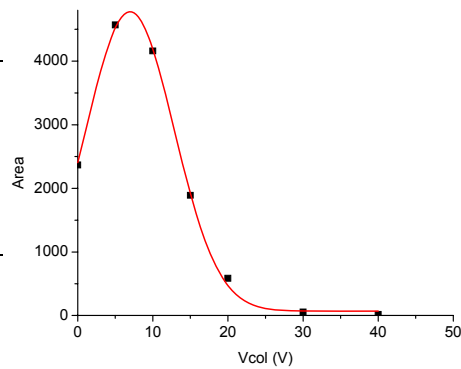


Siringinska kiselina

V_{frag} [V]	Area
80	62236
90	63209
100	60548
110	55954
120	41654
130	29251
140	28807

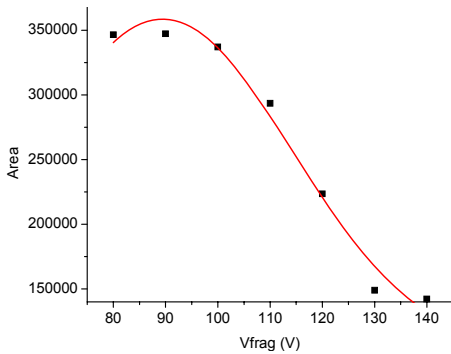


V_{col} [V]	Area
0	2368
5	4569
10	4160
15	1890
20	585
30	54
40	17

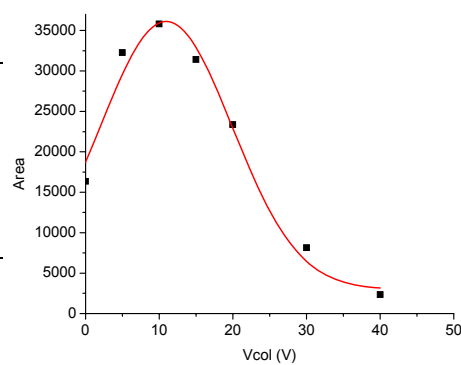


Kumarinska kiselina

V_{frag} [V]	Area
80	346557
90	347311
100	337098
110	293469
120	223531
130	148900
140	142113

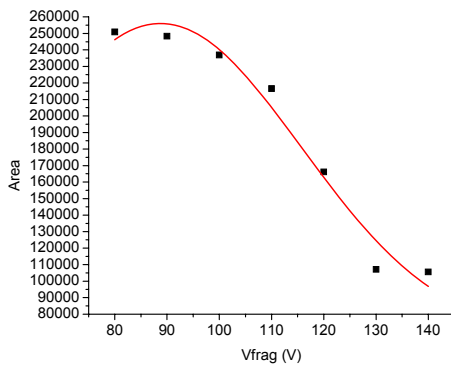


V_{col} [V]	Area
0	16338
5	32275
10	35813
15	31414
20	23358
30	8152
40	2351

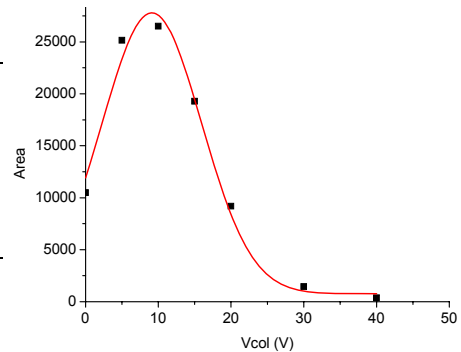


Skopoletin

V_{frag} [V]	Area
80	250829
90	248273
100	236903
110	216585
120	166131
130	107147
140	105599

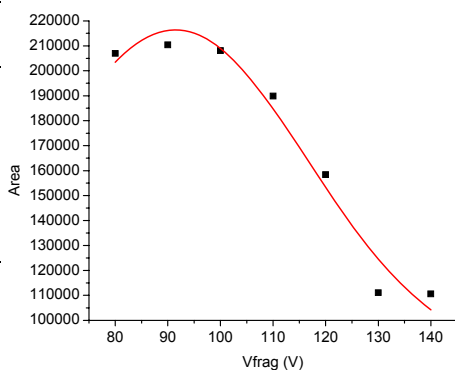


V_{col} [V]	Area
0	10486
5	25158
10	26512
15	19290
20	9177
30	1441
40	380

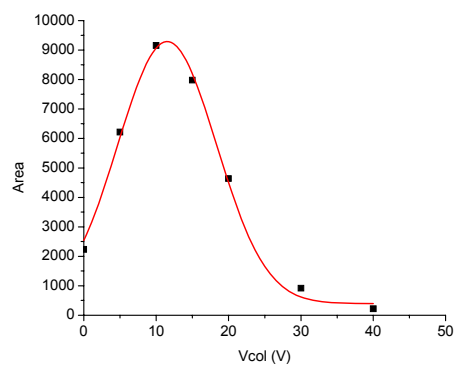


Ferulna kiselina

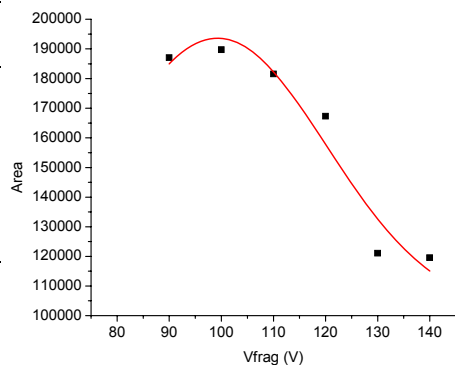
V_{frag} [V]	Area
80	206973
90	210371
100	208100
110	189847
120	158388
130	111060
140	110601



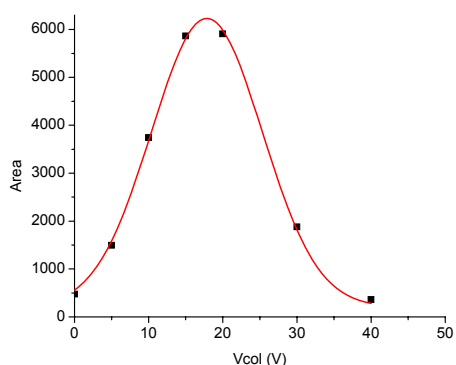
V_{col} [V]	Area
0	2234
5	6213
10	9152
15	7980
20	4636
30	919
40	221

**Sinapinska kiselina**

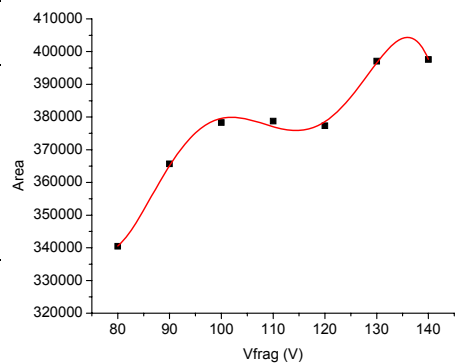
V_{frag} [V]	Area
80	188563
90	187077
100	189743
110	181537
120	167311
130	121088
140	119578



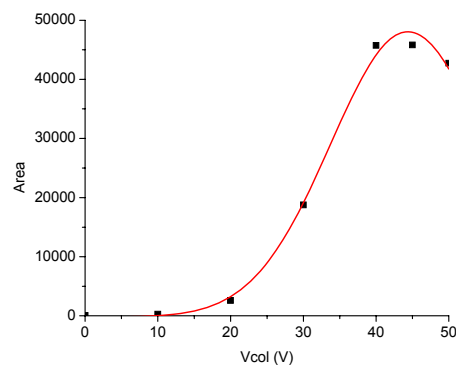
V_{col} [V]	Area
0	477
5	1497
10	3742
15	5863
20	5908
30	1878
40	366

**Rutin**

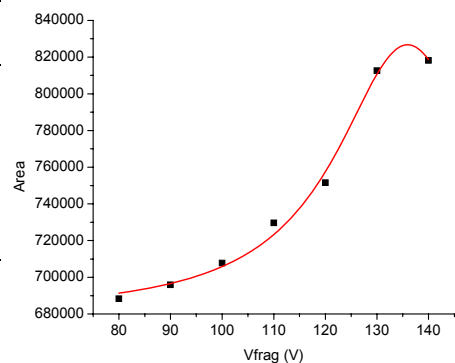
V_{frag} [V]	Area
80	340436
90	365658
100	378286
110	378758
120	377299
130	397049
140	397578



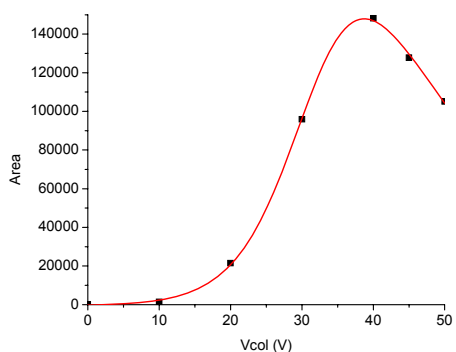
V_{col} [V]	Area
0	62
10	283
20	2589
30	18767
40	45734
45	45820
50	42730

**Apigenin-7-O-glukozid**

V_{frag} [V]	Area
80	688272
90	695873
100	707779
110	729621
120	751599
130	812598
140	818143

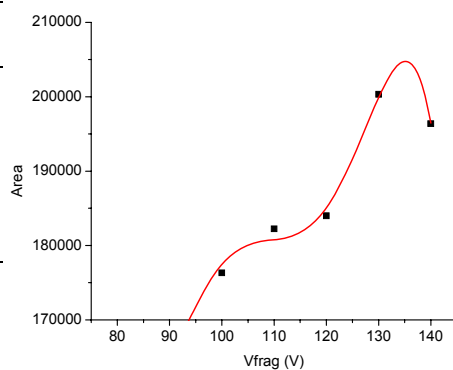


V_{col} [V]	Area
0	178
10	1379
20	21468
30	95926
40	148158
45	127829
50	105190

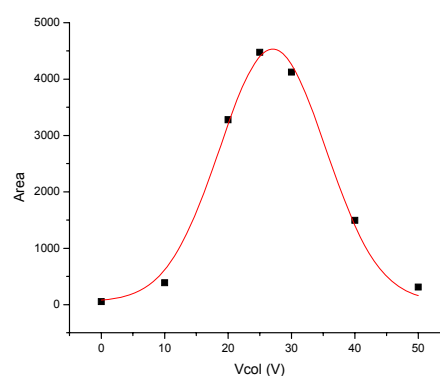


Sekoizolaricirezinol

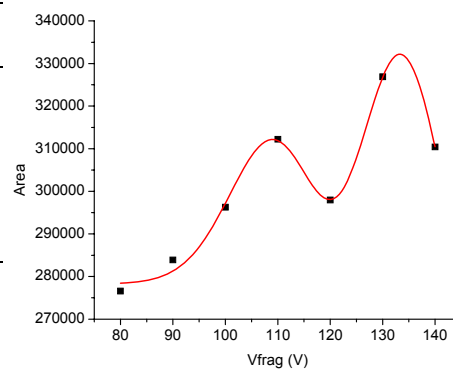
V_{frag} [V]	Area
80	166840
90	164809
100	176317
110	182231
120	183988
130	200314
140	196375



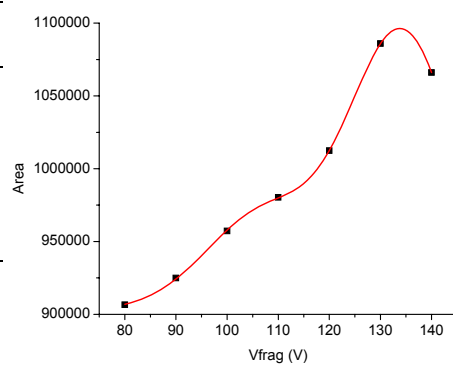
V_{col} [V]	Area
0	53
10	385
20	3278
25	4473
30	4122
40	1496
50	310

**Matairezol**

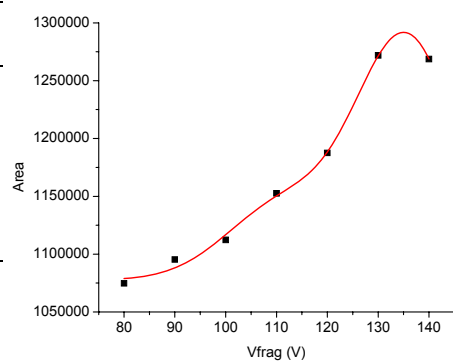
V_{frag} [V]	Area
80	276567
90	283881
100	296269
110	312199
120	297953
130	326875
140	310427

**Kvercetin**

V_{frag} [V]	Area
80	906500
90	924926
100	957228
110	980258
120	1012410
130	1085878
140	1065978

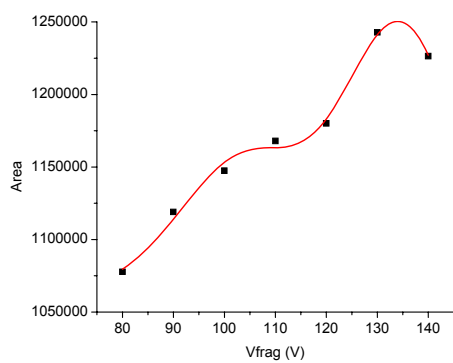
**Luteolin**

V_{frag} [V]	Area
80	1074698
90	1095336
100	1112328
110	1152553
120	1187465
130	1271891
140	1268738

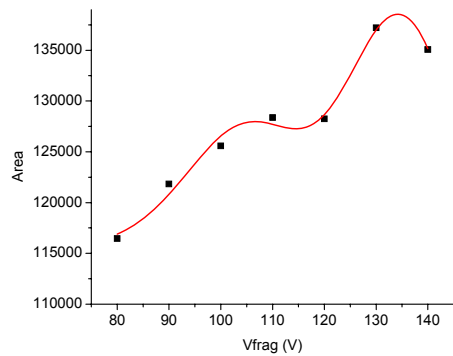


Kemferol

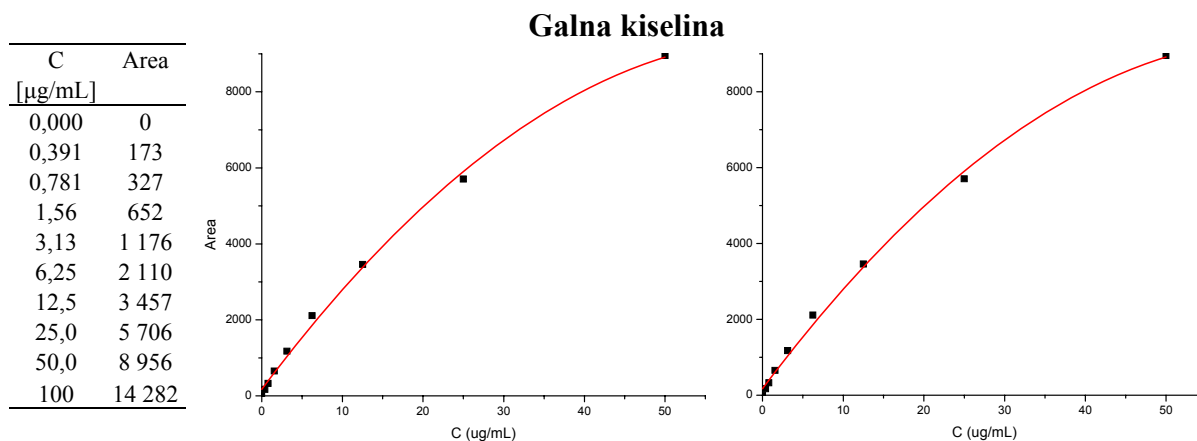
V_{frag} [V]	Area
80	1077770
90	1118999
100	1147384
110	1167993
120	1180137
130	1242797
140	1226424

**Apigenin**

V_{frag} [V]	Area
80	116467
90	121824
100	125580
110	128375
120	128246
130	137205
140	135078

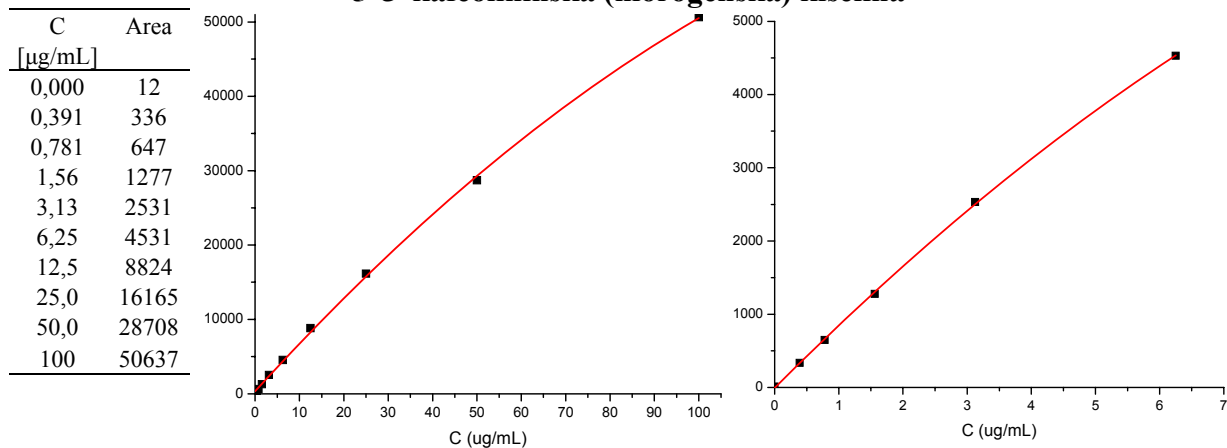


8.18. LC-MS I LC-MS-MS KVANTITACIJA – KALIBRACIONE KRIVE

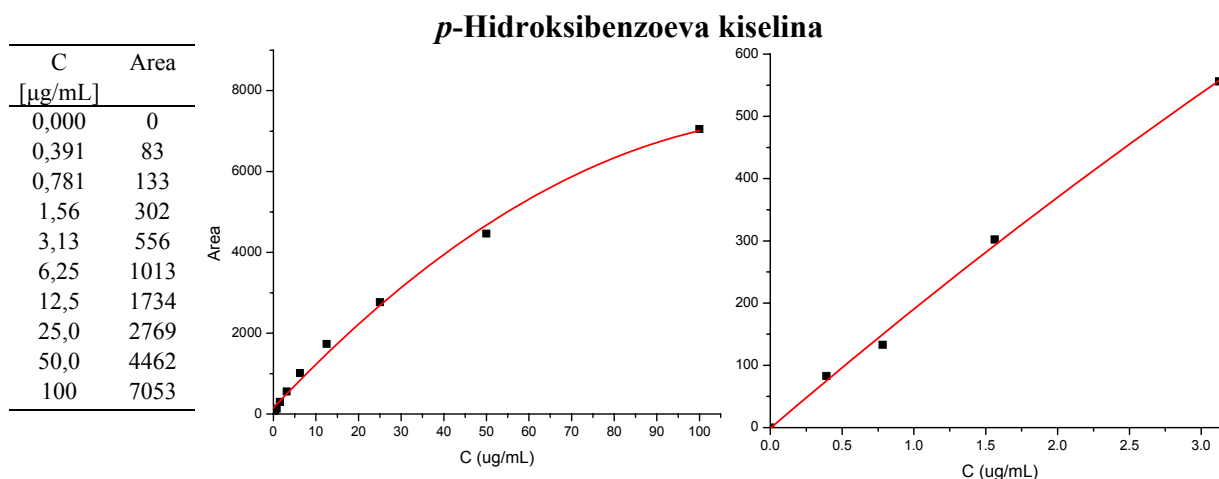


	C_{eks} [mg/mL]	Area	C_{galna} [ug/mL]	$C_{galna,eks}$ [mg/g]		C_{eks} [mg/mL]	Area	C_{galna} [ug/mL]	$C_{galna,eks}$ [mg/g]
AnS01K-Ex(70M)	4,99	0	< 0,39	< 0,08	AnS07H-Ex(70M)	9,91	0	< 0,39	< 0,04
AnS03K-Ex(70M)	5,21	0	< 0,39	< 0,07	AnS08H-Ex(70M)	9,68	0	< 0,39	< 0,04
AnS04K-Ex(70M)	6,72	0	< 0,39	< 0,06	AnS10H-Ex(70M)	11,2	0	< 0,39	< 0,03
AnS05K-Ex(70M)	5,08	0	< 0,39	< 0,08	AnS11H-Ex(70M)	9,70	0	< 0,39	< 0,04
AnS06K-Ex(70M)	5,16	0	< 0,39	< 0,08	AnC10H-Ex(70M)	9,61	0	< 0,39	< 0,04
AnS07K-Ex(70M)	5,16	0	< 0,39	< 0,08	AnC11H-Ex(70M)	9,94	0	< 0,39	< 0,04
AnS08K-Ex(70M)	4,79	0	< 0,39	< 0,08	AnC12H-Ex(70M)	9,74	0	< 0,39	< 0,04
AnS09K-Ex(70M)	5,29	0	< 0,39	< 0,07	AnC13H-Ex(70M)	11,0	0	< 0,39	< 0,04
AnS10K-Ex(70M)	5,06	0	< 0,39	< 0,08	AnC14H-Ex(70M)	10,6	0	< 0,39	< 0,04
AnS11K-Ex(70M)	5,04	0	< 0,39	< 0,08	AnC15H-Ex(70M)	10,7	0	< 0,39	< 0,04
AnC10K-Ex(70M)	8,98	0	< 0,39	< 0,04	AnC16H-Ex(70M)	11,5	0	< 0,39	< 0,03
AnC11K-Ex(70M)	9,94	0	< 0,39	< 0,04	AnC17H-Ex(70M)	9,68	0	< 0,39	< 0,04
AnC12K-Ex(70M)	10,4	0	< 0,39	< 0,04	ChB01H-Ex(70M)	9,43	0	< 0,39	< 0,04
AnC13K-Ex(70M)	10,3	0	< 0,39	< 0,04	ChB02H-Ex(70M)	11,3	0	< 0,39	< 0,03
AnC14K-Ex(70M)	9,91	0	< 0,39	< 0,04	ChH01H-Ex(70M)	10,5	0	< 0,39	< 0,04
AnC15K-Ex(70M)	11,2	0	< 0,39	< 0,03	ChH02H-Ex(70M)	9,14	0	< 0,39	< 0,04
AnC16K-Ex(70M)	10,0	0	< 0,39	< 0,04	ChH03H-Ex(70M)	10,0	0	< 0,39	< 0,04
AnC17K-Ex(70M)	10,0	0	< 0,39	< 0,04	ChT01H-Ex(70M)	10,5	0	< 0,39	< 0,04
ChB01K-Ex(70M)	11,6	0	< 0,39	< 0,03	ChT02H-Ex(70M)	11,1	0	< 0,39	< 0,04
ChB02K-Ex(70M)	12,4	0	< 0,39	< 0,03	ChT03H-Ex(70M)	9,90	0	< 0,39	< 0,04
ChH01K-Ex(70M)	9,60	0	< 0,39	< 0,04	ChT04H-Ex(70M)	9,72	0	< 0,39	< 0,04
ChH02K-Ex(70M)	10,4	0	< 0,39	< 0,04	ChT05H-Ex(70M)	9,96	0	< 0,39	< 0,04
ChH03K-Ex(70M)	10,0	0	< 0,39	< 0,04	SPV01H-Ex(70M)	10,0	0	< 0,39	< 0,04
ChT01K-Ex(70M)	9,72	0	< 0,39	< 0,04	AnS07H-Ex(aq)	10,0	0	< 0,39	< 0,04
ChT02K-Ex(70M)	8,09	0	< 0,39	< 0,05	AnS07K-Ex(aq)	10,0	0	< 0,39	< 0,04
ChT03K-Ex(70M)	9,83	0	< 0,39	< 0,04	AnC12H-Ex(aq)	10,1	0	< 0,39	< 0,04
ChT04K-Ex(70M)	9,93	0	< 0,39	< 0,04	AnC12K-Ex(aq)	10,1	0	< 0,39	< 0,04
ChT05K-Ex(70M)	10,1	0	< 0,39	< 0,04	ChB01H-Ex(aq)	10,2	0	< 0,39	< 0,04
SPV01K-Ex(70M)	9,66	0	< 0,39	< 0,04	ChB01K-Ex(aq)	9,39	0	< 0,39	< 0,04
AnS01H-Ex(70M)	9,18	0	< 0,39	< 0,04	ChH01H-Ex(aq)	9,96	0	< 0,39	< 0,04
AnS03H-Ex(70M)	10,3	0	< 0,39	< 0,04	ChH01K-Ex(aq)	9,89	66	< 0,39	< 0,04
AnS04H-Ex(70M)	10,5	0	< 0,39	< 0,04	ChT05H-Ex(aq)	10,0	0	< 0,39	< 0,04
AnS05H-Ex(70M)	10,0	0	< 0,39	< 0,04	ChT05K-Ex(aq)	9,85	0	< 0,39	< 0,04
AnS06H-Ex(70M)	10,2	0	< 0,39	< 0,04	SPV01H-Ex(aq)	9,94	0	< 0,39	< 0,04

5-O-kafeoilhinska (hlorogenska) kiselina

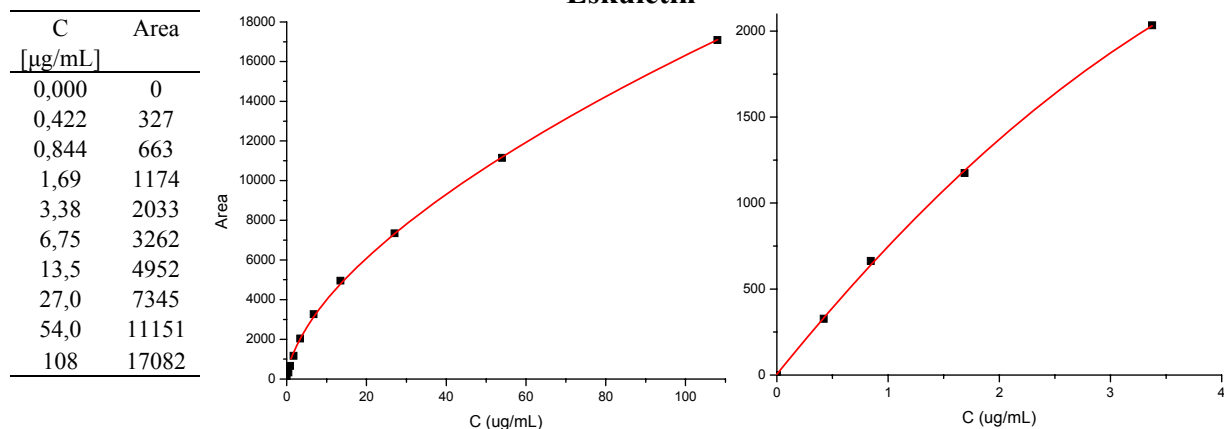


	C_{eks}	Area	C_{galna}	$C_{galna,eks}$		C_{eks}	Area	C_{galna}	$C_{galna,eks}$
	[mg/mL]		[$\mu\text{g/mL}$]	[mg/g]		[mg/mL]		[$\mu\text{g/mL}$]	[mg/g]
AnS01K-Ex(70M)	4,99	8 309	12,5	2,51	AnS07H-Ex(70M)	9,91	7 746	11,6	1,17
AnS03K-Ex(70M)	5,21	11 803	18,3	3,51	AnS08H-Ex(70M)	9,68	11 448	17,7	1,83
AnS04K-Ex(70M)	6,72	3 343	4,33	0,644	AnS10H-Ex(70M)	11,2	45 758	87,0	7,78
AnS05K-Ex(70M)	5,08	4 470	6,14	1,21	AnS11H-Ex(70M)	9,70	43 598	81,6	8,41
AnS06K-Ex(70M)	5,16	3 589	4,70	0,911	AnC10H-Ex(70M)	9,61	3 574	4,68	0,49
AnS07K-Ex(70M)	5,16	12 263	19,0	3,69	AnC11H-Ex(70M)	9,94	3 910	5,21	0,52
AnS08K-Ex(70M)	4,79	25 734	43,1	9,00	AnC12H-Ex(70M)	9,74	6 076	8,95	0,92
AnS09K-Ex(70M)	5,29	22 924	37,8	7,15	AnC13H-Ex(70M)	11,0	8 072	12,2	1,10
AnS10K-Ex(70M)	5,06	7 284	10,9	2,15	AnC14H-Ex(70M)	10,6	3 993	5,34	0,51
AnS11K-Ex(70M)	5,04	3 782	5,00	0,992	AnC15H-Ex(70M)	10,7	3 116	3,99	0,37
AnC10K-Ex(70M)	8,98	1 453	1,75	0,194	AnC16H-Ex(70M)	11,5	10 319	15,8	1,37
AnC11K-Ex(70M)	9,94	2 374	2,95	0,297	AnC17H-Ex(70M)	9,68	1 232	1,47	0,15
AnC12K-Ex(70M)	10,4	1 793	2,18	0,210	ChB01H-Ex(70M)	9,43	5 507	8,05	0,85
AnC13K-Ex(70M)	10,3	1 708	2,07	0,200	ChB02H-Ex(70M)	11,3	6 167	9,10	0,80
AnC14K-Ex(70M)	9,91	276	< 0,39	< 0,04	ChH01H-Ex(70M)	10,5	27 075	45,7	4,36
AnC15K-Ex(70M)	11,2	642	0,755	0,0673	ChH02H-Ex(70M)	9,14	26 167	43,9	4,80
AnC16K-Ex(70M)	10,0	1 649	1,99	0,199	ChH03H-Ex(70M)	10,0	44 965	85,0	8,50
AnC17K-Ex(70M)	10,0	469	0,550	0,0550	ChT01H-Ex(70M)	10,5	8 448	12,8	1,21
ChB01K-Ex(70M)	11,6	142	< 0,39	< 0,03	ChT02H-Ex(70M)	11,1	54 274	< 0,39	< 0,04
ChB02K-Ex(70M)	12,4	991	1,174	0,0946	ChT03H-Ex(70M)	9,90	20 965	34,2	3,45
ChH01K-Ex(70M)	9,60	6 219	9,18	0,956	ChT04H-Ex(70M)	9,72	13 530	21,2	2,18
ChH02K-Ex(70M)	10,4	13 248	20,7	1,986	ChT05H-Ex(70M)	9,96	13 981	21,9	2,20
ChH03K-Ex(70M)	10,0	2 150	2,65	0,264	SPV01H-Ex(70M)	10,0	10 250	15,7	1,56
ChT01K-Ex(70M)	9,72	1 388	1,66	0,171	AnS07H-Ex(aq)	10,0	286	< 0,39	< 0,04
ChT02K-Ex(70M)	8,09	5 047	7,32	0,906	AnS07K-Ex(aq)	10,0	103	< 0,39	< 0,04
ChT03K-Ex(70M)	9,83	1 654	2,00	0,204	AnC12H-Ex(aq)	10,1	25	< 0,39	< 0,04
ChT04K-Ex(70M)	9,93	3 981	5,32	0,536	AnC12K-Ex(aq)	10,1	70	< 0,39	< 0,04
ChT05K-Ex(70M)	10,1	1 951	2,39	0,236	ChB01H-Ex(aq)	10,2	916	1,08	0,11
SPV01K-Ex(70M)	9,66	2 288	2,83	0,293	ChB01K-Ex(aq)	9,39	253	< 0,39	< 0,04
AnS01H-Ex(70M)	9,18	17 870	28,7	3,12	ChH01H-Ex(aq)	9,96	868	1,02	0,10
AnS03H-Ex(70M)	10,3	2 941	3,74	0,363	ChH01K-Ex(aq)	9,89	55	< 0,39	< 0,04
AnS04H-Ex(70M)	10,5	2 061	2,53	0,241	ChT05H-Ex(aq)	10,0	192	< 0,39	< 0,04
AnS05H-Ex(70M)	10,0	38 222	68,9	6,89	ChT05K-Ex(aq)	9,85	90	< 0,39	< 0,04
AnS06H-Ex(70M)	10,2	4 282	5,82	0,568	SPV01H-Ex(aq)	9,94	254	< 0,39	< 0,04

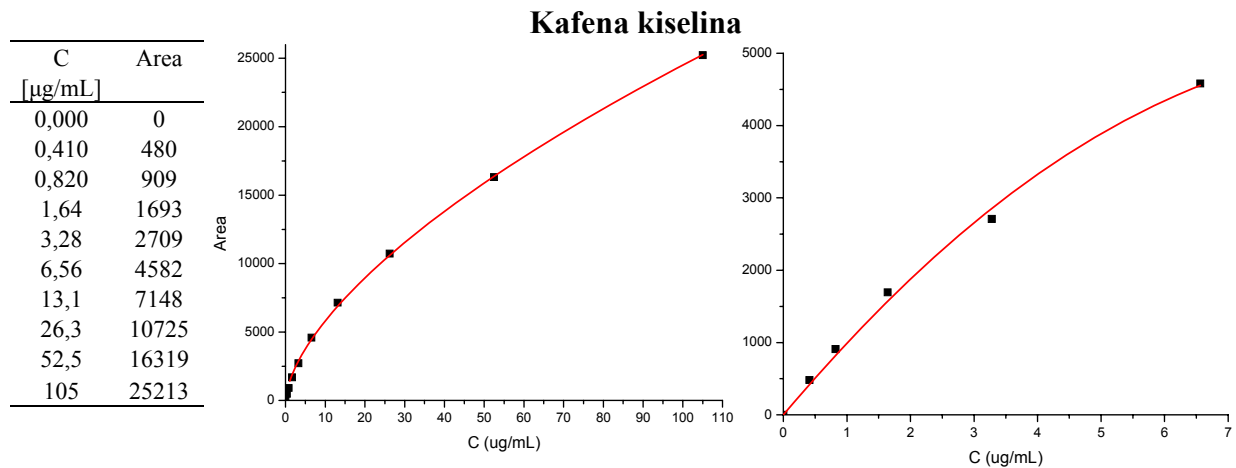


	C_{eks}	Area	C_{galna}	$C_{galna,eks}$	C_{eks}	Area	C_{galna}	$C_{galna,eks}$
	[mg/mL]		[ug/mL]	[mg/g]	[mg/mL]		[ug/mL]	[mg/g]
AnS01K-Ex(70M)	4,99	9	< 0,39	< 0,08	AnS07H-Ex(70M)	9,91	261	1,38
AnS03K-Ex(70M)	5,21	27	< 0,39	< 0,07	AnS08H-Ex(70M)	9,68	213	1,12
AnS04K-Ex(70M)	6,72	61	< 0,39	< 0,06	AnS10H-Ex(70M)	11,2	101	0,525
AnS05K-Ex(70M)	5,08	30	< 0,39	< 0,08	AnS11H-Ex(70M)	9,70	92	0,478
AnS06K-Ex(70M)	5,16	40	< 0,39	< 0,08	AnC10H-Ex(70M)	9,61	134	0,698
AnS07K-Ex(70M)	5,16	24	< 0,39	< 0,08	AnC11H-Ex(70M)	9,94	69	< 0,39
AnS08K-Ex(70M)	4,79	39	< 0,39	< 0,08	AnC12H-Ex(70M)	9,74	82	0,426
AnS09K-Ex(70M)	5,29	26	< 0,39	< 0,07	AnC13H-Ex(70M)	11,0	160	0,836
AnS10K-Ex(70M)	5,06	35	< 0,39	< 0,08	AnC14H-Ex(70M)	10,6	71	< 0,39
AnS11K-Ex(70M)	5,04	8	< 0,39	< 0,08	AnC15H-Ex(70M)	10,7	126	0,656
AnC10K-Ex(70M)	8,98	126	0,656	0,0731	AnC16H-Ex(70M)	11,5	67	< 0,39
AnC11K-Ex(70M)	9,94	89	0,462	0,0465	AnC17H-Ex(70M)	9,68	89	0,462
AnC12K-Ex(70M)	10,4	29	< 0,39	< 0,04	ChB01H-Ex(70M)	9,43	211	1,11
AnC13K-Ex(70M)	10,3	32	< 0,39	< 0,04	ChB02H-Ex(70M)	11,3	212	1,12
AnC14K-Ex(70M)	9,91	43	< 0,39	< 0,04	ChH01H-Ex(70M)	10,5	80	0,416
AnC15K-Ex(70M)	11,2	44	< 0,39	< 0,03	ChH02H-Ex(70M)	9,14	85	0,442
AnC16K-Ex(70M)	10,0	23	< 0,39	< 0,04	ChH03H-Ex(70M)	10,0	69	< 0,39
AnC17K-Ex(70M)	10,0	67	< 0,39	< 0,04	ChT01H-Ex(70M)	10,5	168	0,879
ChB01K-Ex(70M)	11,6	107	0,556	0,0478	ChT02H-Ex(70M)	11,1	143	0,746
ChB02K-Ex(70M)	12,4	65	< 0,39	< 0,03	ChT03H-Ex(70M)	9,90	162	0,847
ChH01K-Ex(70M)	9,60	57	< 0,39	< 0,04	ChT04H-Ex(70M)	9,72	269	1,43
ChH02K-Ex(70M)	10,4	101	0,525	0,0504	ChT05H-Ex(70M)	9,96	148	0,773
ChH03K-Ex(70M)	10,0	58	< 0,39	< 0,04	SPV01H-Ex(70M)	10,0	44	< 0,39
ChT01K-Ex(70M)	9,72	92	0,478	0,0492	AnS07H-Ex(aq)	10,0	70	< 0,39
ChT02K-Ex(70M)	8,09	107	0,556	0,0688	AnS07K-Ex(aq)	10,0	22	< 0,39
ChT03K-Ex(70M)	9,83	82	0,426	0,0433	AnC12H-Ex(aq)	10,1	77	< 0,39
ChT04K-Ex(70M)	9,93	157	0,820	0,0826	AnC12K-Ex(aq)	10,1	77	< 0,39
ChT05K-Ex(70M)	10,1	43	< 0,39	< 0,04	ChB01H-Ex(aq)	10,2	31	< 0,39
SPV01K-Ex(70M)	9,66	113	0,588	0,0609	ChB01K-Ex(aq)	9,39	46	< 0,39
AnS01H-Ex(70M)	9,18	146	0,762	0,0830	ChH01H-Ex(aq)	9,96	51	< 0,39
AnS03H-Ex(70M)	10,3	189	0,992	0,0963	ChH01K-Ex(aq)	9,89	45	< 0,39
AnS04H-Ex(70M)	10,5	322	1,73	0,165	ChT05H-Ex(aq)	10,0	25	< 0,39
AnS05H-Ex(70M)	10,0	103	0,535	0,0536	ChT05K-Ex(aq)	9,85	0	< 0,39
AnS06H-Ex(70M)	10,2	244	1,29	0,126	SPV01H-Ex(aq)	9,94	48	< 0,39

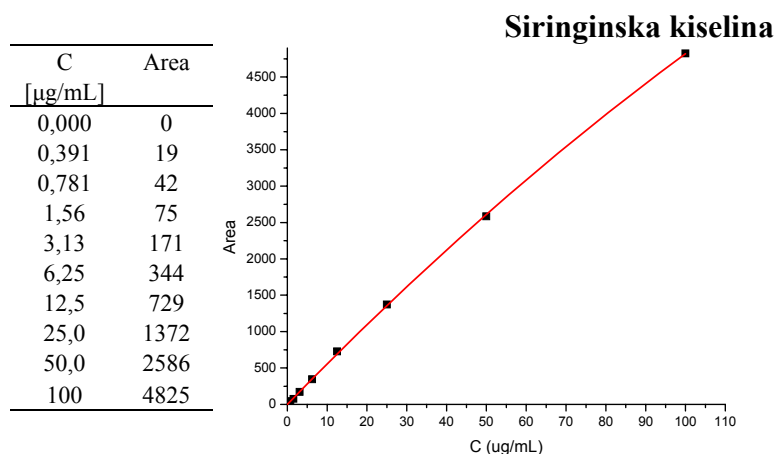
Eskuletin



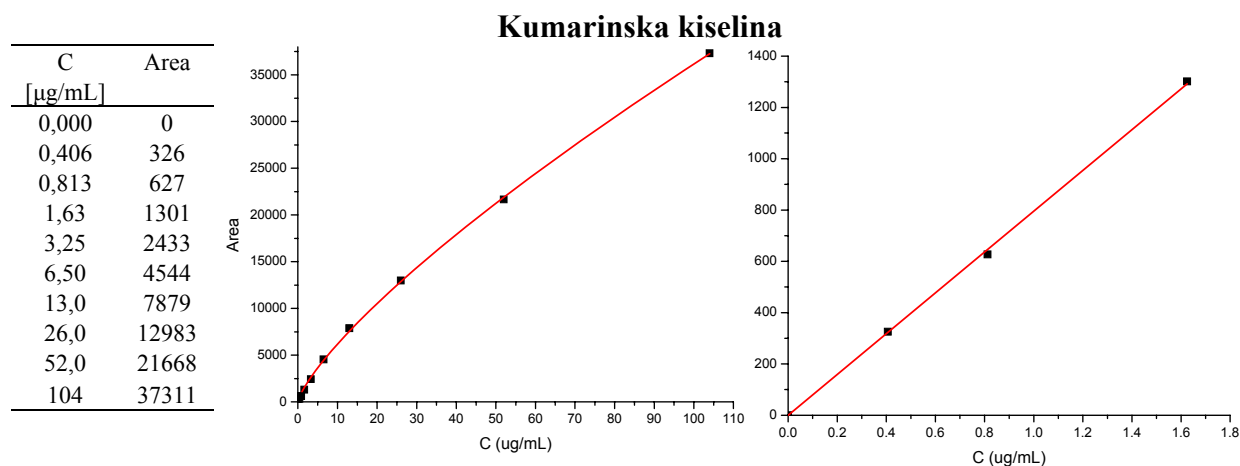
	C_{eks}	Area	C_{galna}	$C_{galna,eks}$		C_{eks}	Area	C_{galna}	$C_{galna,eks}$
	[mg/mL]		[ug/mL]	[mg/g]		[mg/mL]		[ug/mL]	[mg/g]
AnS01K-Ex(70M)	4,99	12	< 0,42	< 0,08	AnS07H-Ex(70M)	9,91	34	< 0,42	< 0,04
AnS03K-Ex(70M)	5,21	9	< 0,42	< 0,08	AnS08H-Ex(70M)	9,68	50	< 0,42	< 0,04
AnS04K-Ex(70M)	6,72	24	< 0,42	< 0,06	AnS10H-Ex(70M)	11,2	57	< 0,42	< 0,04
AnS05K-Ex(70M)	5,08	17	< 0,42	< 0,08	AnS11H-Ex(70M)	9,70	31	< 0,42	< 0,04
AnS06K-Ex(70M)	5,16	0	< 0,42	< 0,08	AnC10H-Ex(70M)	9,61	42	< 0,42	< 0,04
AnS07K-Ex(70M)	5,16	0	< 0,42	< 0,08	AnC11H-Ex(70M)	9,94	451	0,581	0,0584
AnS08K-Ex(70M)	4,79	0	< 0,42	< 0,09	AnC12H-Ex(70M)	9,74	360	0,458	0,0470
AnS09K-Ex(70M)	5,29	0	< 0,42	< 0,08	AnC13H-Ex(70M)	11,0	454	0,585	0,0530
AnS10K-Ex(70M)	5,06	0	< 0,42	< 0,08	AnC14H-Ex(70M)	10,6	1 202	1,71	0,162
AnS11K-Ex(70M)	5,04	0	< 0,42	< 0,08	AnC15H-Ex(70M)	10,7	107	< 0,42	< 0,04
AnC10K-Ex(70M)	8,98	73	< 0,42	< 0,05	AnC16H-Ex(70M)	11,5	271	< 0,42	< 0,04
AnC11K-Ex(70M)	9,94	192	< 0,42	< 0,04	AnC17H-Ex(70M)	9,68	144	< 0,42	< 0,04
AnC12K-Ex(70M)	10,4	363	0,462	0,0445	ChB01H-Ex(70M)	9,43	27	< 0,42	< 0,04
AnC13K-Ex(70M)	10,3	716	0,954	0,0923	ChB02H-Ex(70M)	11,3	31	< 0,42	< 0,04
AnC14K-Ex(70M)	9,91	186	< 0,42	< 0,04	ChH01H-Ex(70M)	10,5	53	< 0,42	< 0,04
AnC15K-Ex(70M)	11,2	74	< 0,42	< 0,04	ChH02H-Ex(70M)	9,14	53	< 0,42	< 0,05
AnC16K-Ex(70M)	10,0	282	< 0,42	< 0,04	ChH03H-Ex(70M)	10,0	256	< 0,42	< 0,04
AnC17K-Ex(70M)	10,0	355	0,451	0,0451	ChT01H-Ex(70M)	10,5	23	< 0,42	< 0,04
ChB01K-Ex(70M)	11,6	0	< 0,42	< 0,04	ChT02H-Ex(70M)	11,1	76	< 0,42	< 0,04
ChB02K-Ex(70M)	12,4	0	< 0,42	< 0,03	ChT03H-Ex(70M)	9,90	19	< 0,42	< 0,04
ChH01K-Ex(70M)	9,60	32	< 0,42	< 0,04	ChT04H-Ex(70M)	9,72	36	< 0,42	< 0,04
ChH02K-Ex(70M)	10,4	132	< 0,42	< 0,04	ChT05H-Ex(70M)	9,96	18	< 0,42	< 0,04
ChH03K-Ex(70M)	10,0	0	< 0,42	< 0,04	SPV01H-Ex(70M)	10,0	22	< 0,42	< 0,04
ChT01K-Ex(70M)	9,72	18	< 0,42	< 0,04	AnS07H-Ex(aq)	10,0	148	< 0,42	< 0,04
ChT02K-Ex(70M)	8,09	26	< 0,42	< 0,05	AnS07K-Ex(aq)	10,0	485	0,627	0,0626
ChT03K-Ex(70M)	9,83	10	< 0,42	< 0,04	AnC12H-Ex(aq)	10,1	0	< 0,42	< 0,04
ChT04K-Ex(70M)	9,93	15	< 0,42	< 0,04	AnC12K-Ex(aq)	10,1	27	< 0,42	< 0,04
ChT05K-Ex(70M)	10,1	0	< 0,42	< 0,04	ChB01H-Ex(aq)	10,2	178	< 0,42	< 0,04
SPV01K-Ex(70M)	9,66	0	< 0,42	< 0,04	ChB01K-Ex(aq)	9,39	345	0,438	0,0467
AnS01H-Ex(70M)	9,18	28	< 0,42	< 0,05	ChH01H-Ex(aq)	9,96	0	< 0,42	< 0,04
AnS03H-Ex(70M)	10,3	30	< 0,42	< 0,04	ChH01K-Ex(aq)	9,89	0	< 0,42	< 0,04
AnS04H-Ex(70M)	10,5	18	< 0,42	< 0,04	ChT05H-Ex(aq)	10,0	86	< 0,42	< 0,04
AnS05H-Ex(70M)	10,0	22	< 0,42	< 0,04	ChT05K-Ex(aq)	9,85	53	< 0,42	< 0,04
AnS06H-Ex(70M)	10,2	0	< 0,42	< 0,04	SPV01H-Ex(aq)	9,94	52	< 0,42	< 0,04



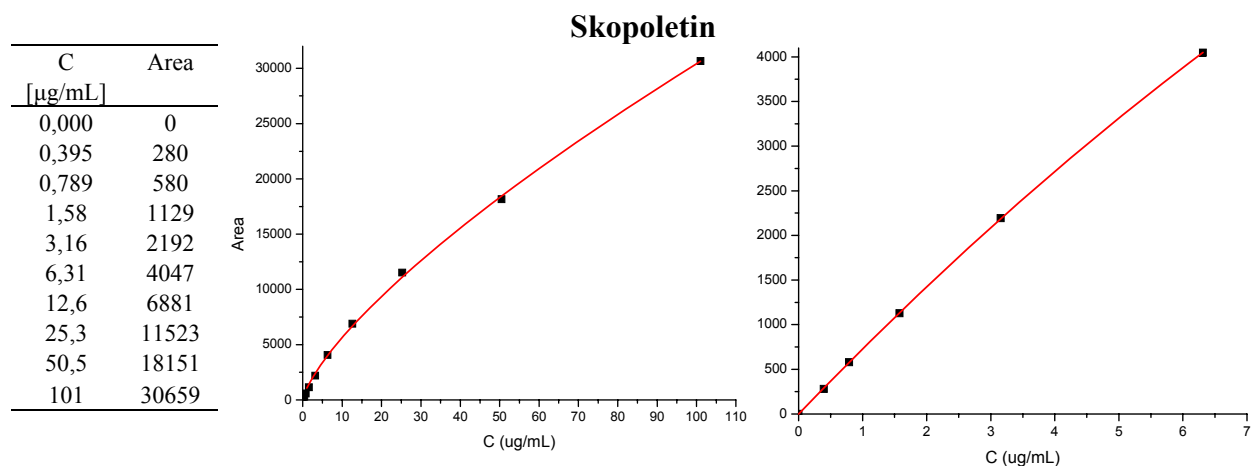
	C_{eks}	Area	C_{galna}	$C_{galna,eks}$		C_{eks}	Area	C_{galna}	$C_{galna,eks}$
	[mg/mL]		[µg/mL]	[mg/g]		[mg/mL]		[µg/mL]	[mg/g]
AnS01K-Ex(70M)	4,99	522	0,513	0,103	AnS07H-Ex(70M)	9,91	454	0,445	0,0449
AnS03K-Ex(70M)	5,21	691	0,685	0,132	AnS08H-Ex(70M)	9,68	554	0,545	0,0563
AnS04K-Ex(70M)	6,72	1 754	1,85	0,276	AnS10H-Ex(70M)	11,2	498	0,489	0,0437
AnS05K-Ex(70M)	5,08	311	< 0,39	< 0,08	AnS11H-Ex(70M)	9,70	416	< 0,39	< 0,04
AnS06K-Ex(70M)	5,16	382	< 0,39	< 0,08	AnC10H-Ex(70M)	9,61	452	0,443	0,0460
AnS07K-Ex(70M)	5,16	925	0,929	0,180	AnC11H-Ex(70M)	9,94	349	< 0,39	< 0,04
AnS08K-Ex(70M)	4,79	841	0,841	0,176	AnC12H-Ex(70M)	9,74	493	0,484	0,0497
AnS09K-Ex(70M)	5,29	479	0,470	0,0889	AnC13H-Ex(70M)	11,0	386	< 0,39	< 0,04
AnS10K-Ex(70M)	5,06	320	< 0,39	< 0,08	AnC14H-Ex(70M)	10,6	180	< 0,39	< 0,04
AnS11K-Ex(70M)	5,04	188	< 0,39	< 0,08	AnC15H-Ex(70M)	10,7	274	< 0,39	< 0,04
AnC10K-Ex(70M)	8,98	86	< 0,39	< 0,04	AnC16H-Ex(70M)	11,5	344	< 0,39	< 0,03
AnC11K-Ex(70M)	9,94	144	< 0,39	< 0,04	AnC17H-Ex(70M)	9,68	59	< 0,39	< 0,04
AnC12K-Ex(70M)	10,4	166	< 0,39	< 0,04	ChB01H-Ex(70M)	9,43	216	< 0,39	< 0,04
AnC13K-Ex(70M)	10,3	164	< 0,39	< 0,04	ChB02H-Ex(70M)	11,3	174	< 0,39	< 0,03
AnC14K-Ex(70M)	9,91	26	< 0,39	< 0,04	ChH01H-Ex(70M)	10,5	229	< 0,39	< 0,04
AnC15K-Ex(70M)	11,2	42	< 0,39	< 0,03	ChH02H-Ex(70M)	9,14	340	< 0,39	< 0,04
AnC16K-Ex(70M)	10,0	145	< 0,39	< 0,04	ChH03H-Ex(70M)	10,0	521	0,512	0,0512
AnC17K-Ex(70M)	10,0	45	< 0,39	< 0,04	ChT01H-Ex(70M)	10,5	154	< 0,39	< 0,04
ChB01K-Ex(70M)	11,6	11	< 0,39	< 0,03	ChT02H-Ex(70M)	11,1	543	0,534	0,0480
ChB02K-Ex(70M)	12,4	58	< 0,39	< 0,03	ChT03H-Ex(70M)	9,90	220	< 0,39	< 0,04
ChH01K-Ex(70M)	9,60	296	< 0,39	< 0,04	ChT04H-Ex(70M)	9,72	266	< 0,39	< 0,04
ChH02K-Ex(70M)	10,4	328	< 0,39	< 0,04	ChT05H-Ex(70M)	9,96	64	< 0,39	< 0,04
ChH03K-Ex(70M)	10,0	67	< 0,39	< 0,04	SPV01H-Ex(70M)	10,0	133	< 0,39	< 0,04
ChT01K-Ex(70M)	9,72	152	< 0,39	< 0,04	AnS07H-Ex(aq)	10,0	2 532	2,83	0,282
ChT02K-Ex(70M)	8,09	198	< 0,39	< 0,05	AnS07K-Ex(aq)	10,0	1 587	1,66	0,166
ChT03K-Ex(70M)	9,83	107	< 0,39	< 0,04	AnC12H-Ex(aq)	10,1	0	< 0,39	< 0,04
ChT04K-Ex(70M)	9,93	239	< 0,39	< 0,04	AnC12K-Ex(aq)	10,1	529	0,520	0,0516
ChT05K-Ex(70M)	10,1	103	< 0,39	< 0,04	ChB01H-Ex(aq)	10,2	10 929	27,5	2,70
SPV01K-Ex(70M)	9,66	158	< 0,39	< 0,04	ChB01K-Ex(aq)	9,39	337	< 0,39	< 0,04
AnS01H-Ex(70M)	9,18	357	< 0,39	< 0,04	ChH01H-Ex(aq)	9,96	503	0,494	0,0496
AnS03H-Ex(70M)	10,3	175	< 0,39	< 0,04	ChH01K-Ex(aq)	9,89	42	< 0,39	< 0,04
AnS04H-Ex(70M)	10,5	225	< 0,39	< 0,04	ChT05H-Ex(aq)	10,0	2 205	2,41	0,240
AnS05H-Ex(70M)	10,0	356	< 0,39	< 0,04	ChT05K-Ex(aq)	9,85	1 100	1,12	0,113
AnS06H-Ex(70M)	10,2	157	< 0,39	< 0,04	SPV01H-Ex(aq)	9,94	1 541	1,61	0,162



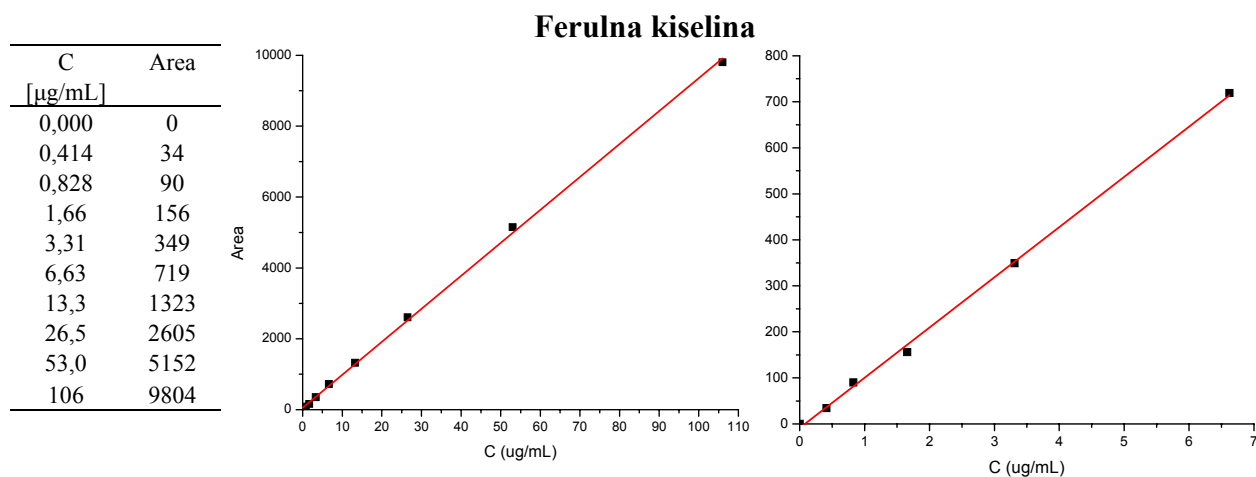
	C_{eks}	Area	C_{galna}	$C_{galna,eks}$		C_{eks}	Area	C_{galna}	$C_{galna,eks}$
	[mg/mL]		[µg/mL]	[mg/g]		[mg/mL]		[µg/mL]	[mg/g]
AnS01K-Ex(70M)	4,99	0	< 0,39	< 0,08	AnS07H-Ex(70M)	9,91	0	< 0,39	< 0,04
AnS03K-Ex(70M)	5,21	0	< 0,39	< 0,07	AnS08H-Ex(70M)	9,68	0	< 0,39	< 0,04
AnS04K-Ex(70M)	6,72	0	< 0,39	< 0,06	AnS10H-Ex(70M)	11,2	0	< 0,39	< 0,03
AnS05K-Ex(70M)	5,08	0	< 0,39	< 0,08	AnS11H-Ex(70M)	9,70	0	< 0,39	< 0,04
AnS06K-Ex(70M)	5,16	0	< 0,39	< 0,08	AnC10H-Ex(70M)	9,61	0	< 0,39	< 0,04
AnS07K-Ex(70M)	5,16	0	< 0,39	< 0,08	AnC11H-Ex(70M)	9,94	0	< 0,39	< 0,04
AnS08K-Ex(70M)	4,79	0	< 0,39	< 0,08	AnC12H-Ex(70M)	9,74	0	< 0,39	< 0,04
AnS09K-Ex(70M)	5,29	0	< 0,39	< 0,07	AnC13H-Ex(70M)	11,0	0	< 0,39	< 0,04
AnS10K-Ex(70M)	5,06	0	< 0,39	< 0,08	AnC14H-Ex(70M)	10,6	0	< 0,39	< 0,04
AnS11K-Ex(70M)	5,04	0	< 0,39	< 0,08	AnC15H-Ex(70M)	10,7	0	< 0,39	< 0,04
AnC10K-Ex(70M)	8,98	0	< 0,39	< 0,04	AnC16H-Ex(70M)	11,5	0	< 0,39	< 0,03
AnC11K-Ex(70M)	9,94	0	< 0,39	< 0,04	AnC17H-Ex(70M)	9,68	0	< 0,39	< 0,04
AnC12K-Ex(70M)	10,4	0	< 0,39	< 0,04	ChB01H-Ex(70M)	9,43	0	< 0,39	< 0,04
AnC13K-Ex(70M)	10,3	0	< 0,39	< 0,04	ChB02H-Ex(70M)	11,3	0	< 0,39	< 0,03
AnC14K-Ex(70M)	9,91	0	< 0,39	< 0,04	ChH01H-Ex(70M)	10,5	0	< 0,39	< 0,04
AnC15K-Ex(70M)	11,2	0	< 0,39	< 0,03	ChH02H-Ex(70M)	9,14	0	< 0,39	< 0,04
AnC16K-Ex(70M)	10,0	0	< 0,39	< 0,04	ChH03H-Ex(70M)	10,0	0	< 0,39	< 0,04
AnC17K-Ex(70M)	10,0	0	< 0,39	< 0,04	ChT01H-Ex(70M)	10,5	0	< 0,39	< 0,04
ChB01K-Ex(70M)	11,6	0	< 0,39	< 0,03	ChT02H-Ex(70M)	11,1	0	< 0,39	< 0,04
ChB02K-Ex(70M)	12,4	0	< 0,39	< 0,03	ChT03H-Ex(70M)	9,90	0	< 0,39	< 0,04
ChH01K-Ex(70M)	9,60	0	< 0,39	< 0,04	ChT04H-Ex(70M)	9,72	0	< 0,39	< 0,04
ChH02K-Ex(70M)	10,4	20	0,41	0,0393	ChT05H-Ex(70M)	9,96	0	< 0,39	< 0,04
ChH03K-Ex(70M)	10,0	8	< 0,39	< 0,04	SPV01H-Ex(70M)	10,0	?		
ChT01K-Ex(70M)	9,72	20	0,41	0,0422	AnS07H-Ex(aq)	10,0	0	< 0,39	< 0,04
ChT02K-Ex(70M)	8,09	16	< 0,39	< 0,05	AnS07K-Ex(aq)	10,0	0	< 0,39	< 0,04
ChT03K-Ex(70M)	9,83	18	< 0,39	< 0,04	AnC12H-Ex(aq)	10,1	0	< 0,39	< 0,04
ChT04K-Ex(70M)	9,93	13	< 0,39	< 0,04	AnC12K-Ex(aq)	10,1	0	< 0,39	< 0,04
ChT05K-Ex(70M)	10,1	0	< 0,39	< 0,04	ChB01H-Ex(aq)	10,2	0	< 0,39	< 0,04
SPV01K-Ex(70M)	9,66	?			ChB01K-Ex(aq)	9,39	0	< 0,39	< 0,04
AnS01H-Ex(70M)	9,18	0	< 0,39	< 0,04	ChH01H-Ex(aq)	9,96	0	< 0,39	< 0,04
AnS03H-Ex(70M)	10,3	0	< 0,39	< 0,04	ChH01K-Ex(aq)	9,89	0	< 0,39	< 0,04
AnS04H-Ex(70M)	10,5	0	< 0,39	< 0,04	ChT05H-Ex(aq)	10,0	?		
AnS05H-Ex(70M)	10,0	0	< 0,39	< 0,04	ChT05K-Ex(aq)	9,85	0	< 0,39	< 0,04
AnS06H-Ex(70M)	10,2	0	< 0,39	< 0,04	SPV01H-Ex(aq)	9,94	0	< 0,39	< 0,04



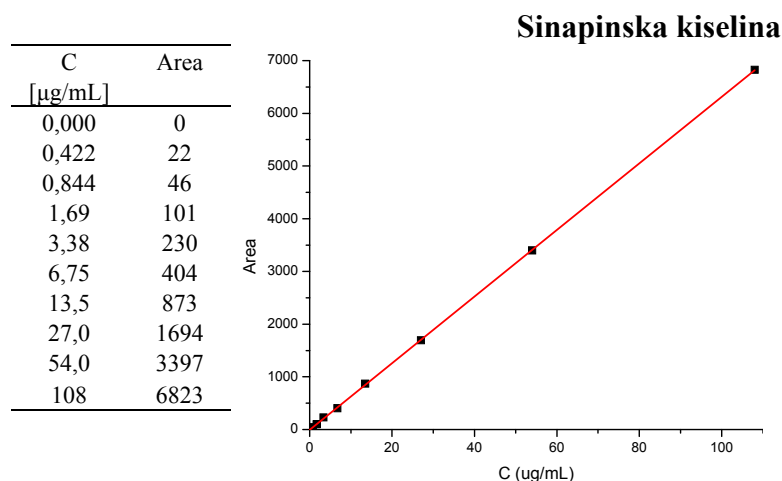
	C_{eks} [mg/mL]	Area	C_{galna} [ug/mL]	$C_{galna,eks}$ [mg/g]		C_{eks} [mg/mL]	Area	C_{galna} [ug/mL]	$C_{galna,eks}$ [mg/g]
AnS01K-Ex(70M)	4,99	57	< 0,41	< 0,08	AnS07H-Ex(70M)	9,91	201	< 0,41	< 0,04
AnS03K-Ex(70M)	5,21	62	< 0,41	< 0,08	AnS08H-Ex(70M)	9,68	181	< 0,41	< 0,04
AnS04K-Ex(70M)	6,72	84	< 0,41	< 0,06	AnS10H-Ex(70M)	11,2	157	< 0,41	< 0,04
AnS05K-Ex(70M)	5,08	65	< 0,41	< 0,08	AnS11H-Ex(70M)	9,70	64	< 0,41	< 0,04
AnS06K-Ex(70M)	5,16	36	< 0,41	< 0,08	AnC10H-Ex(70M)	9,61	91	< 0,41	< 0,04
AnS07K-Ex(70M)	5,16	80	< 0,41	< 0,08	AnC11H-Ex(70M)	9,94	134	< 0,41	< 0,04
AnS08K-Ex(70M)	4,79	128	< 0,41	< 0,09	AnC12H-Ex(70M)	9,74	193	< 0,41	< 0,04
AnS09K-Ex(70M)	5,29	67	< 0,41	< 0,08	AnC13H-Ex(70M)	11,0	76	< 0,41	< 0,04
AnS10K-Ex(70M)	5,06	40	< 0,41	< 0,08	AnC14H-Ex(70M)	10,6	100	< 0,41	< 0,04
AnS11K-Ex(70M)	5,04	27	< 0,41	< 0,08	AnC15H-Ex(70M)	10,7	78	< 0,41	< 0,04
AnC10K-Ex(70M)	8,98	134	< 0,41	< 0,05	AnC16H-Ex(70M)	11,5	63	< 0,41	< 0,04
AnC11K-Ex(70M)	9,94	92	< 0,41	< 0,04	AnC17H-Ex(70M)	9,68	42	< 0,41	< 0,04
AnC12K-Ex(70M)	10,4	153	< 0,41	< 0,04	ChB01H-Ex(70M)	9,43	211	< 0,41	< 0,04
AnC13K-Ex(70M)	10,3	100	< 0,41	< 0,04	ChB02H-Ex(70M)	11,3	233	< 0,41	< 0,04
AnC14K-Ex(70M)	9,91	54	< 0,41	< 0,04	ChH01H-Ex(70M)	10,5	85	< 0,41	< 0,04
AnC15K-Ex(70M)	11,2	45	< 0,41	< 0,04	ChH02H-Ex(70M)	9,14	90	< 0,41	< 0,04
AnC16K-Ex(70M)	10,0	87	< 0,41	< 0,04	ChH03H-Ex(70M)	10,0	160	< 0,41	< 0,04
AnC17K-Ex(70M)	10,0	89	< 0,41	< 0,04	ChT01H-Ex(70M)	10,5	205	< 0,41	< 0,04
ChB01K-Ex(70M)	11,6	130	< 0,41	< 0,04	ChT02H-Ex(70M)	11,1	199	< 0,41	< 0,04
ChB02K-Ex(70M)	12,4	151	< 0,41	< 0,03	ChT03H-Ex(70M)	9,90	192	< 0,41	< 0,04
ChH01K-Ex(70M)	9,60	223	< 0,41	< 0,04	ChT04H-Ex(70M)	9,72	195	< 0,41	< 0,04
ChH02K-Ex(70M)	10,4	229	< 0,41	< 0,04	ChT05H-Ex(70M)	9,96	135	< 0,41	< 0,04
ChH03K-Ex(70M)	10,0	105	< 0,41	< 0,04	SPV01H-Ex(70M)	10,0	30	< 0,41	< 0,04
ChT01K-Ex(70M)	9,72	452	0,568	0,0585	AnS07H-Ex(aq)	10,0	201	< 0,41	< 0,04
ChT02K-Ex(70M)	8,09	699	0,879	0,109	AnS07K-Ex(aq)	10,0	173	< 0,41	< 0,04
ChT03K-Ex(70M)	9,83	339	0,426	0,0434	AnC12H-Ex(aq)	10,1	177	< 0,41	< 0,04
ChT04K-Ex(70M)	9,93	368	0,463	0,0466	AnC12K-Ex(aq)	10,1	175	< 0,41	< 0,04
ChT05K-Ex(70M)	10,1	222	< 0,41	< 0,04	ChB01H-Ex(aq)	10,2	203	< 0,41	< 0,04
SPV01K-Ex(70M)	9,66	111	< 0,41	< 0,04	ChB01K-Ex(aq)	9,39	160	< 0,41	< 0,04
AnS01H-Ex(70M)	9,18	60	< 0,41	< 0,04	ChH01H-Ex(aq)	9,96	286	< 0,41	< 0,04
AnS03H-Ex(70M)	10,3	63	< 0,41	< 0,04	ChH01K-Ex(aq)	9,89	107	< 0,41	< 0,04
AnS04H-Ex(70M)	10,5	89	< 0,41	< 0,04	ChT05H-Ex(aq)	10,0	72	< 0,41	< 0,04
AnS05H-Ex(70M)	10,0	85	< 0,41	< 0,04	ChT05K-Ex(aq)	9,85	18	< 0,41	< 0,04
AnS06H-Ex(70M)	10,2	111	< 0,41	< 0,04	SPV01H-Ex(aq)	9,94	451	0,567	0,0571



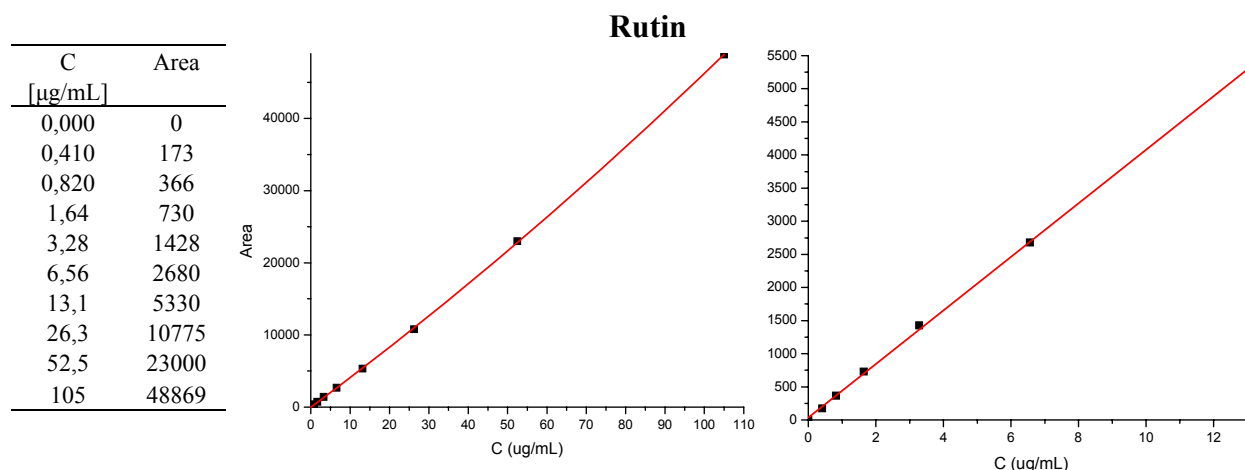
	C_{eks} [mg/mL]	Area	C_{galna} [µg/mL]	$C_{galna,eks}$ [mg/g]		C_{eks} [mg/mL]	Area	C_{galna} [µg/mL]	$C_{galna,eks}$ [mg/g]
AnS01K-Ex(70M)	4,99	89	< 0,39	< 0,08	AnS07H-Ex(70M)	9,91	341	0,463	0,0467
AnS03K-Ex(70M)	5,21	369	0,501	0,0963	AnS08H-Ex(70M)	9,68	586	0,801	0,0828
AnS04K-Ex(70M)	6,72	205	< 0,39	< 0,06	AnS10H-Ex(70M)	11,2	714	0,980	0,0876
AnS05K-Ex(70M)	5,08	196	< 0,39	< 0,08	AnS11H-Ex(70M)	9,70	151	< 0,39	< 0,04
AnS06K-Ex(70M)	5,16	713	0,979	0,190	AnC10H-Ex(70M)	9,61	0	< 0,39	< 0,04
AnS07K-Ex(70M)	5,16	776	1,07	0,207	AnC11H-Ex(70M)	9,94	62	< 0,39	< 0,04
AnS08K-Ex(70M)	4,79	457	0,622	0,130	AnC12H-Ex(70M)	9,74	156	0,211	0,0216
AnS09K-Ex(70M)	5,29	726	0,997	0,189	AnC13H-Ex(70M)	11,0	74	< 0,39	< 0,04
AnS10K-Ex(70M)	5,06	174	< 0,39	< 0,08	AnC14H-Ex(70M)	10,6	0	< 0,39	< 0,04
AnS11K-Ex(70M)	5,04	249	< 0,39	< 0,08	AnC15H-Ex(70M)	10,7	0	< 0,39	< 0,04
AnC10K-Ex(70M)	8,98	27	< 0,39	< 0,04	AnC16H-Ex(70M)	11,5	44	< 0,39	< 0,03
AnC11K-Ex(70M)	9,94	52	< 0,39	< 0,04	AnC17H-Ex(70M)	9,68	48	< 0,39	< 0,04
AnC12K-Ex(70M)	10,4	314	0,426	0,0410	ChB01H-Ex(70M)	9,43	87	< 0,39	< 0,04
AnC13K-Ex(70M)	10,3	555	0,758	0,0734	ChB02H-Ex(70M)	11,3	126	< 0,39	< 0,03
AnC14K-Ex(70M)	9,91	0	< 0,39	< 0,04	ChH01H-Ex(70M)	10,5	224	< 0,39	< 0,04
AnC15K-Ex(70M)	11,2	0	< 0,39	< 0,03	ChH02H-Ex(70M)	9,14	286	0,387	0,042
AnC16K-Ex(70M)	10,0	698	0,958	0,0955	ChH03H-Ex(70M)	10,0	97	< 0,39	< 0,04
AnC17K-Ex(70M)	10,0	91	< 0,39	< 0,04	ChT01H-Ex(70M)	10,5	677	0,928	0,0882
ChB01K-Ex(70M)	11,6	93	< 0,39	< 0,03	ChT02H-Ex(70M)	11,1	343	0,466	0,0418
ChB02K-Ex(70M)	12,4	299	0,405	0,0327	ChT03H-Ex(70M)	9,90	234	< 0,39	< 0,04
ChH01K-Ex(70M)	9,60	553	0,755	0,0787	ChT04H-Ex(70M)	9,72	204	< 0,39	< 0,04
ChH02K-Ex(70M)	10,4	747	1,03	0,099	ChT05H-Ex(70M)	9,96	156	< 0,39	< 0,04
ChH03K-Ex(70M)	10,0	618	0,846	0,0843	SPV01H-Ex(70M)	10,0	186	< 0,39	< 0,04
ChT01K-Ex(70M)	9,72	2 793	4,13	0,425	AnS07H-Ex(aq)	10,0	7 053	13,6	1,35
ChT02K-Ex(70M)	8,09	4 577	7,53	0,932	AnS07K-Ex(aq)	10,0	4 758	7,94	0,792
ChT03K-Ex(70M)	9,83	992	1,37	0,140	AnC12H-Ex(aq)	10,1	78	< 0,39	< 0,04
ChT04K-Ex(70M)	9,93	1 172	1,63	0,164	AnC12K-Ex(aq)	10,1	3 052	4,56	0,452
ChT05K-Ex(70M)	10,1	971	1,34	0,133	ChB01H-Ex(aq)	10,2	11 672	27,0	2,65
SPV01K-Ex(70M)	9,66	409	0,556	0,0576	ChB01K-Ex(aq)	9,39	814	1,12	0,119
AnS01H-Ex(70M)	9,18	511	0,697	0,0759	ChH01H-Ex(aq)	9,96	615	0,842	0,0845
AnS03H-Ex(70M)	10,3	309	0,419	0,0407	ChH01K-Ex(aq)	9,89	193	< 0,39	< 0,04
AnS04H-Ex(70M)	10,5	377	0,512	0,0489	ChT05H-Ex(aq)	10,0	15 018	38,2	3,80
AnS05H-Ex(70M)	10,0	276	0,374	0,0374	ChT05K-Ex(aq)	9,85	6 967	13,4	1,36
AnS06H-Ex(70M)	10,2	236	< 0,39	< 0,04	SPV01H-Ex(aq)	9,94	6 291	11,6	1,17



	C_{eks}	Area	C_{galna}	$C_{galna,eks}$		C_{eks}	Area	C_{galna}	$C_{galna,eks}$
	[mg/mL]		[$\mu\text{g/mL}$]	[mg/g]		[mg/mL]		[$\mu\text{g/mL}$]	[mg/g]
AnS01K-Ex(70M)	4,99	0	< 0,41	< 0,08	AnS07H-Ex(70M)	9,91	36	0,410	0,0414
AnS03K-Ex(70M)	5,21	13	< 0,41	< 0,08	AnS08H-Ex(70M)	9,68	47	0,511	0,0528
AnS04K-Ex(70M)	6,72	39	0,438	0,0651	AnS10H-Ex(70M)	11,2	43	0,474	0,0424
AnS05K-Ex(70M)	5,08	38	0,428	0,0844	AnS11H-Ex(70M)	9,70	17	< 0,41	< 0,04
AnS06K-Ex(70M)	5,16	45	0,493	0,0954	AnC10H-Ex(70M)	9,61	30	0,355	0,0369
AnS07K-Ex(70M)	5,16	87	0,878	0,170	AnC11H-Ex(70M)	9,94	30	0,355	0,0357
AnS08K-Ex(70M)	4,79	75	0,768	0,160	AnC12H-Ex(70M)	9,74	45	0,493	0,0506
AnS09K-Ex(70M)	5,29	40	0,447	0,0845	AnC13H-Ex(70M)	11,0	36	0,410	0,0371
AnS10K-Ex(70M)	5,06	417	3,90	0,771	AnC14H-Ex(70M)	10,6	30	0,355	0,0336
AnS11K-Ex(70M)	5,04	481	4,49	0,890	AnC15H-Ex(70M)	10,7	21	< 0,41	< 0,04
AnC10K-Ex(70M)	8,98	46	0,502	0,0559	AnC16H-Ex(70M)	11,5	46	0,502	0,0435
AnC11K-Ex(70M)	9,94	80	0,813	0,0818	AnC17H-Ex(70M)	9,68	12	< 0,41	< 0,04
AnC12K-Ex(70M)	10,4	140	1,36	0,131	ChB01H-Ex(70M)	9,43	46	0,502	0,0532
AnC13K-Ex(70M)	10,3	184	1,77	0,171	ChB02H-Ex(70M)	11,3	44	0,483	0,0427
AnC14K-Ex(70M)	9,91	56	0,593	0,0599	ChH01H-Ex(70M)	10,5	19	< 0,41	< 0,04
AnC15K-Ex(70M)	11,2	21	< 0,41	< 0,04	ChH02H-Ex(70M)	9,14	22	< 0,41	< 0,04
AnC16K-Ex(70M)	10,0	177	1,70	0,170	ChH03H-Ex(70M)	10,0	26	< 0,41	< 0,04
AnC17K-Ex(70M)	10,0	79	0,804	0,0804	ChT01H-Ex(70M)	10,5	64	0,667	0,0633
ChB01K-Ex(70M)	11,6	142	1,38	0,119	ChT02H-Ex(70M)	11,1	66	0,685	0,0616
ChB02K-Ex(70M)	12,4	283	2,67	0,215	ChT03H-Ex(70M)	9,90	87	0,878	0,0887
ChH01K-Ex(70M)	9,60	78	0,795	0,0828	ChT04H-Ex(70M)	9,72	35	0,401	0,0413
ChH02K-Ex(70M)	10,4	111	1,10	0,105	ChT05H-Ex(70M)	9,96	42	0,465	0,0467
ChH03K-Ex(70M)	10,0	81	0,823	0,0819	SPV01H-Ex(70M)	10,0	17	< 0,41	< 0,04
ChT01K-Ex(70M)	9,72	214	2,04	0,210	AnS07H-Ex(aq)	10,0	99	0,988	0,0984
ChT02K-Ex(70M)	8,09	271	2,56	0,317	AnS07K-Ex(aq)	10,0	52	0,557	0,0555
ChT03K-Ex(70M)	9,83	232	2,21	0,225	AnC12H-Ex(aq)	10,1	0	< 0,41	< 0,04
ChT04K-Ex(70M)	9,93	174	1,67	0,169	AnC12K-Ex(aq)	10,1	175	1,68	0,167
ChT05K-Ex(70M)	10,1	151	1,46	0,145	ChB01H-Ex(aq)	10,2	537	5,00	0,491
SPV01K-Ex(70M)	9,66	21	< 0,41	< 0,04	ChB01K-Ex(aq)	9,39	206	1,97	0,210
AnS01H-Ex(70M)	9,18	12	< 0,41	< 0,04	ChH01H-Ex(aq)	9,96	376	3,53	0,354
AnS03H-Ex(70M)	10,3	35	0,401	0,0389	ChH01K-Ex(aq)	9,89	188	1,80	0,182
AnS04H-Ex(70M)	10,5	27	< 0,41	< 0,04	ChT05H-Ex(aq)	10,0	55	0,584	0,0582
AnS05H-Ex(70M)	10,0	27	< 0,41	< 0,04	ChT05K-Ex(aq)	9,85	16	< 0,41	< 0,04
AnS06H-Ex(70M)	10,2	0	< 0,41	< 0,04	SPV01H-Ex(aq)	9,94	103	1,02	0,103

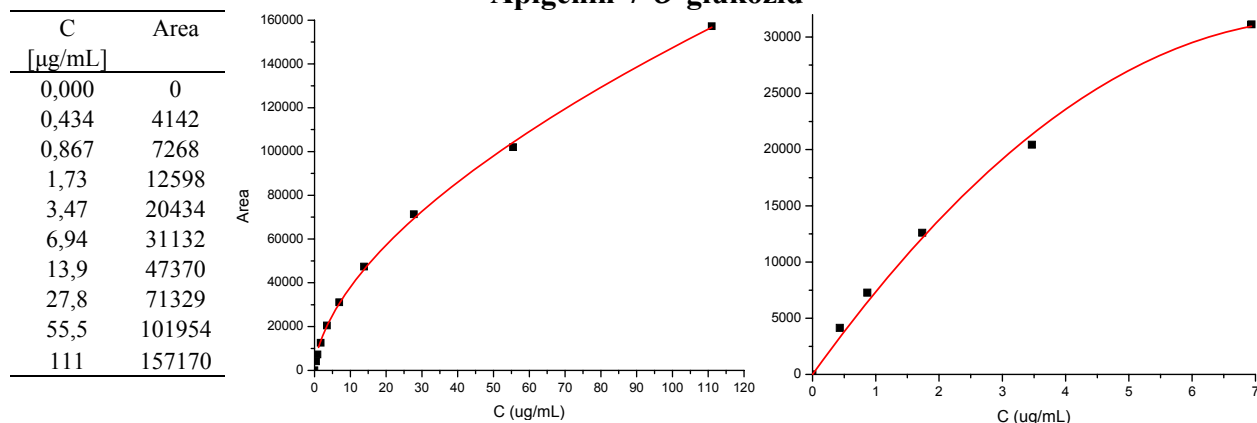


	C_{eks}	Area	C_{galna}	$C_{galna,eks}$		C_{eks}	Area	C_{galna}	$C_{galna,eks}$
	[mg/mL]	[ug/mL]	[ug/mL]	[mg/g]		[mg/mL]	[ug/mL]	[ug/mL]	[mg/g]
AnS01K-Ex(70M)	4,99	0	< 0,42	< 0,08	AnS07H-Ex(70M)	9,91	0	< 0,42	< 0,04
AnS03K-Ex(70M)	5,21	0	< 0,42	< 0,08	AnS08H-Ex(70M)	9,68	0	< 0,42	< 0,04
AnS04K-Ex(70M)	6,72	0	< 0,42	< 0,06	AnS10H-Ex(70M)	11,2	0	< 0,42	< 0,04
AnS05K-Ex(70M)	5,08	0	< 0,42	< 0,08	AnS11H-Ex(70M)	9,70	0	< 0,42	< 0,04
AnS06K-Ex(70M)	5,16	0	< 0,42	< 0,08	AnC10H-Ex(70M)	9,61	0	< 0,42	< 0,04
AnS07K-Ex(70M)	5,16	0	< 0,42	< 0,08	AnC11H-Ex(70M)	9,94	0	< 0,42	< 0,04
AnS08K-Ex(70M)	4,79	0	< 0,42	< 0,09	AnC12H-Ex(70M)	9,74	0	< 0,42	< 0,04
AnS09K-Ex(70M)	5,29	0	< 0,42	< 0,08	AnC13H-Ex(70M)	11,0	0	< 0,42	< 0,04
AnS10K-Ex(70M)	5,06	0	< 0,42	< 0,08	AnC14H-Ex(70M)	10,6	0	< 0,42	< 0,04
AnS11K-Ex(70M)	5,04	0	< 0,42	< 0,08	AnC15H-Ex(70M)	10,7	0	< 0,42	< 0,04
AnC10K-Ex(70M)	8,98	0	< 0,42	< 0,05	AnC16H-Ex(70M)	11,5	0	< 0,42	< 0,04
AnC11K-Ex(70M)	9,94	0	< 0,42	< 0,04	AnC17H-Ex(70M)	9,68	0	< 0,42	< 0,04
AnC12K-Ex(70M)	10,4	0	< 0,42	< 0,04	ChB01H-Ex(70M)	9,43	0	< 0,42	< 0,04
AnC13K-Ex(70M)	10,3	0	< 0,42	< 0,04	ChB02H-Ex(70M)	11,3	0	< 0,42	< 0,04
AnC14K-Ex(70M)	9,91	0	< 0,42	< 0,04	ChH01H-Ex(70M)	10,5	0	< 0,42	< 0,04
AnC15K-Ex(70M)	11,2	0	< 0,42	< 0,04	ChH02H-Ex(70M)	9,14	0	< 0,42	< 0,05
AnC16K-Ex(70M)	10,0	0	< 0,42	< 0,04	ChH03H-Ex(70M)	10,0	0	< 0,42	< 0,04
AnC17K-Ex(70M)	10,0	0	< 0,42	< 0,04	ChT01H-Ex(70M)	10,5	0	< 0,42	< 0,04
ChB01K-Ex(70M)	11,6	0	< 0,42	< 0,04	ChT02H-Ex(70M)	11,1	0	< 0,42	< 0,04
ChB02K-Ex(70M)	12,4	0	< 0,42	< 0,03	ChT03H-Ex(70M)	9,90	0	< 0,42	< 0,04
ChH01K-Ex(70M)	9,60	0	< 0,42	< 0,04	ChT04H-Ex(70M)	9,72	0	< 0,42	< 0,04
ChH02K-Ex(70M)	10,4	0	< 0,42	< 0,04	ChT05H-Ex(70M)	9,96	0	< 0,42	< 0,04
ChH03K-Ex(70M)	10,0	0	< 0,42	< 0,04	SPV01H-Ex(70M)	10,0	0	< 0,42	< 0,04
ChT01K-Ex(70M)	9,72	0	< 0,42	< 0,04	AnS07H-Ex(aq)	10,0	0	< 0,42	< 0,04
ChT02K-Ex(70M)	8,09	0	< 0,42	< 0,05	AnS07K-Ex(aq)	10,0	0	< 0,42	< 0,04
ChT03K-Ex(70M)	9,83	0	< 0,42	< 0,04	AnC12H-Ex(aq)	10,1	0	< 0,42	< 0,04
ChT04K-Ex(70M)	9,93	0	< 0,42	< 0,04	AnC12K-Ex(aq)	10,1	0	< 0,42	< 0,04
ChT05K-Ex(70M)	10,1	0	< 0,42	< 0,04	ChB01H-Ex(aq)	10,2	0	< 0,42	< 0,04
SPV01K-Ex(70M)	9,66	0	< 0,42	< 0,04	ChB01K-Ex(aq)	9,39	0	< 0,42	< 0,04
AnS01H-Ex(70M)	9,18	0	< 0,42	< 0,05	ChH01H-Ex(aq)	9,96	0	< 0,42	< 0,04
AnS03H-Ex(70M)	10,3	0	< 0,42	< 0,04	ChH01K-Ex(aq)	9,89	0	< 0,42	< 0,04
AnS04H-Ex(70M)	10,5	0	< 0,42	< 0,04	ChT05H-Ex(aq)	10,0	0	< 0,42	< 0,04
AnS05H-Ex(70M)	10,0	0	< 0,42	< 0,04	ChT05K-Ex(aq)	9,85	0	< 0,42	< 0,04
AnS06H-Ex(70M)	10,2	0	< 0,42	< 0,04	SPV01H-Ex(aq)	9,94	0	< 0,42	< 0,04

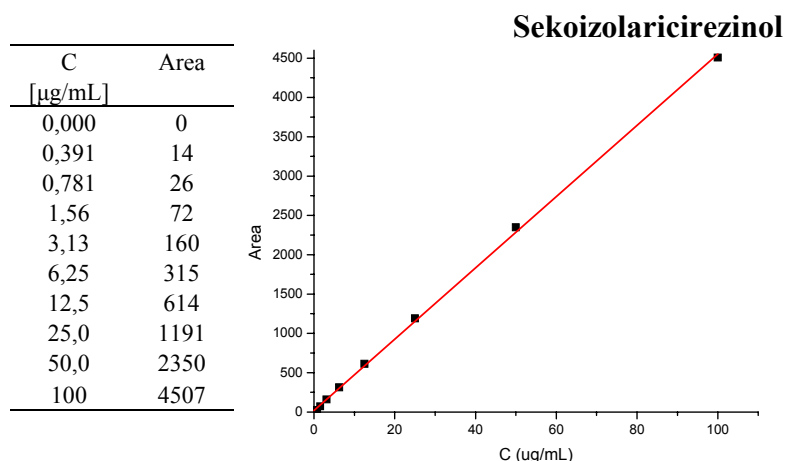


	C_{eks}	Area	C_{galna}	$C_{galna,eks}$		C_{eks}	Area	C_{galna}	$C_{galna,eks}$
	[mg/mL]		[$\mu\text{g/mL}$]	[mg/g]		[mg/mL]		[$\mu\text{g/mL}$]	[mg/g]
AnS01K-Ex(70M)	4,99	0	< 0,41	< 0,08	AnS07H-Ex(70M)	9,91	0	< 0,41	< 0,04
AnS03K-Ex(70M)	5,21	0	< 0,41	< 0,08	AnS08H-Ex(70M)	9,68	0	< 0,41	< 0,04
AnS04K-Ex(70M)	6,72	0	< 0,41	< 0,06	AnS10H-Ex(70M)	11,2	60	< 0,41	< 0,04
AnS05K-Ex(70M)	5,08	0	< 0,41	< 0,08	AnS11H-Ex(70M)	9,70	0	< 0,41	< 0,04
AnS06K-Ex(70M)	5,16	0	< 0,41	< 0,08	AnC10H-Ex(70M)	9,61	0	< 0,41	< 0,04
AnS07K-Ex(70M)	5,16	0	< 0,41	< 0,08	AnC11H-Ex(70M)	9,94	0	< 0,41	< 0,04
AnS08K-Ex(70M)	4,79	0	< 0,41	< 0,09	AnC12H-Ex(70M)	9,74	0	< 0,41	< 0,04
AnS09K-Ex(70M)	5,29	0	< 0,41	< 0,08	AnC13H-Ex(70M)	11,0	48	< 0,41	< 0,04
AnS10K-Ex(70M)	5,06	0	< 0,41	< 0,08	AnC14H-Ex(70M)	10,6	18	< 0,41	< 0,04
AnS11K-Ex(70M)	5,04	0	< 0,41	< 0,08	AnC15H-Ex(70M)	10,7	0	< 0,41	< 0,04
AnC10K-Ex(70M)	8,98	0	< 0,41	< 0,05	AnC16H-Ex(70M)	11,5	0	< 0,41	< 0,04
AnC11K-Ex(70M)	9,94	0	< 0,41	< 0,04	AnC17H-Ex(70M)	9,68	0	< 0,41	< 0,04
AnC12K-Ex(70M)	10,4	0	< 0,41	< 0,04	ChB01H-Ex(70M)	9,43	35	< 0,41	< 0,04
AnC13K-Ex(70M)	10,3	0	< 0,41	< 0,04	ChB02H-Ex(70M)	11,3	36	< 0,41	< 0,04
AnC14K-Ex(70M)	9,91	0	< 0,41	< 0,04	ChH01H-Ex(70M)	10,5	0	< 0,41	< 0,04
AnC15K-Ex(70M)	11,2	0	< 0,41	< 0,04	ChH02H-Ex(70M)	9,14	0	< 0,41	< 0,04
AnC16K-Ex(70M)	10,0	0	< 0,41	< 0,04	ChH03H-Ex(70M)	10,0	21 321	49,3	4,928
AnC17K-Ex(70M)	10,0	0	< 0,41	< 0,04	ChT01H-Ex(70M)	10,5	116	< 0,41	< 0,04
ChB01K-Ex(70M)	11,6	0	< 0,41	< 0,04	ChT02H-Ex(70M)	11,1	3 921	9,61	0,863
ChB02K-Ex(70M)	12,4	0	< 0,41	< 0,03	ChT03H-Ex(70M)	9,90	689	1,61	0,163
ChH01K-Ex(70M)	9,60	0	< 0,41	< 0,04	ChT04H-Ex(70M)	9,72	467	1,06	0,109
ChH02K-Ex(70M)	10,4	0	< 0,41	< 0,04	ChT05H-Ex(70M)	9,96	289	0,623	0,0626
ChH03K-Ex(70M)	10,0	0	< 0,41	< 0,04	SPV01H-Ex(70M)	10,0	0	< 0,41	< 0,04
ChT01K-Ex(70M)	9,72	0	< 0,41	< 0,04	AnS07H-Ex(aq)	10,0	0	< 0,41	< 0,04
ChT02K-Ex(70M)	8,09	0	< 0,41	< 0,05	AnS07K-Ex(aq)	10,0	0	< 0,41	< 0,04
ChT03K-Ex(70M)	9,83	0	< 0,41	< 0,04	AnC12H-Ex(aq)	10,1	0	< 0,41	< 0,04
ChT04K-Ex(70M)	9,93	0	< 0,41	< 0,04	AnC12K-Ex(aq)	10,1	0	< 0,41	< 0,04
ChT05K-Ex(70M)	10,1	0	< 0,41	< 0,04	ChB01H-Ex(aq)	10,2	0	< 0,41	< 0,04
SPV01K-Ex(70M)	9,66	0	< 0,41	< 0,04	ChB01K-Ex(aq)	9,39	0	< 0,41	< 0,04
AnS01H-Ex(70M)	9,18	0	< 0,41	< 0,04	ChH01H-Ex(aq)	9,96	0	< 0,41	< 0,04
AnS03H-Ex(70M)	10,3	0	< 0,41	< 0,04	ChH01K-Ex(aq)	9,89	28	< 0,41	< 0,04
AnS04H-Ex(70M)	10,5	0	< 0,41	< 0,04	ChT05H-Ex(aq)	10,0	0	< 0,41	< 0,04
AnS05H-Ex(70M)	10,0	0	< 0,41	< 0,04	ChT05K-Ex(aq)	9,85	0	< 0,41	< 0,04
AnS06H-Ex(70M)	10,2	0	< 0,41	< 0,04	SPV01H-Ex(aq)	9,94	0	< 0,41	< 0,04

Apigenin-7-O-glukozyd



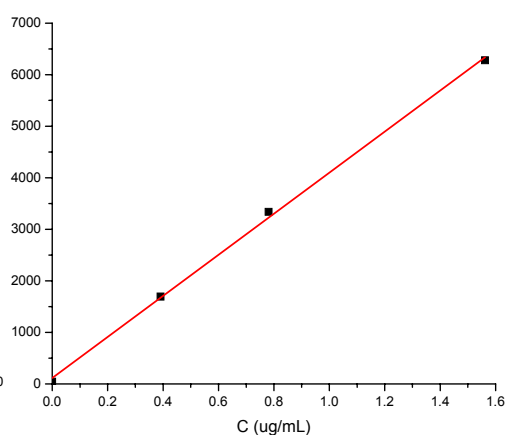
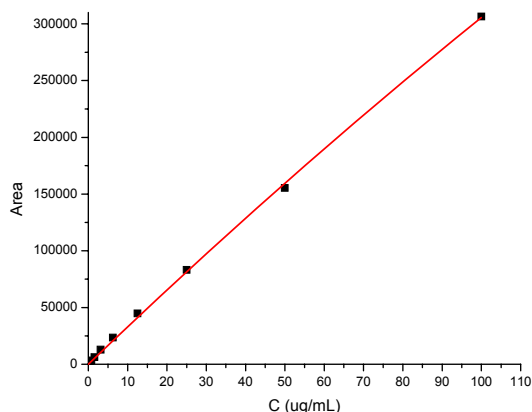
	C_{eks}	Area	C_{galna}	$C_{galna,eks}$		C_{eks}	Area	C_{galna}	$C_{galna,eks}$
	[mg/mL]		[$\mu\text{g/mL}$]	[mg/g]		[mg/mL]		[$\mu\text{g/mL}$]	[mg/g]
AnS01K-Ex(70M)	4,99	82	< 0,43	< 0,09	AnS07H-Ex(70M)	9,91	191	< 0,43	< 0,04
AnS03K-Ex(70M)	5,21	113	< 0,43	< 0,08	AnS08H-Ex(70M)	9,68	216	< 0,43	< 0,04
AnS04K-Ex(70M)	6,72	52	< 0,43	< 0,06	AnS10H-Ex(70M)	11,2	5 078	0,676	0,0604
AnS05K-Ex(70M)	5,08	131	< 0,43	< 0,08	AnS11H-Ex(70M)	9,70	3 541	0,465	0,0479
AnS06K-Ex(70M)	5,16	35	< 0,43	< 0,08	AnC10H-Ex(70M)	9,61	2 242	0,291	0,0303
AnS07K-Ex(70M)	5,16	24	< 0,43	< 0,08	AnC11H-Ex(70M)	9,94	5 473	0,731	0,0735
AnS08K-Ex(70M)	4,79	90	< 0,43	< 0,09	AnC12H-Ex(70M)	9,74	20 816	3,35	0,344
AnS09K-Ex(70M)	5,29	37	< 0,43	< 0,08	AnC13H-Ex(70M)	11,0	12 067	1,72	0,156
AnS10K-Ex(70M)	5,06	37	< 0,43	< 0,08	AnC14H-Ex(70M)	10,6	13 145	1,90	0,180
AnS11K-Ex(70M)	5,04	47	< 0,43	< 0,09	AnC15H-Ex(70M)	10,7	5 697	0,763	0,0710
AnC10K-Ex(70M)	8,98	76	< 0,43	< 0,05	AnC16H-Ex(70M)	11,5	11 915	1,70	0,147
AnC11K-Ex(70M)	9,94	53	< 0,43	< 0,04	AnC17H-Ex(70M)	9,68	474	< 0,43	< 0,04
AnC12K-Ex(70M)	10,4	104	< 0,43	< 0,04	ChB01H-Ex(70M)	9,43	6 684	0,903	0,0958
AnC13K-Ex(70M)	10,3	71	< 0,43	< 0,04	ChB02H-Ex(70M)	11,3	10 134	1,42	0,125
AnC14K-Ex(70M)	9,91	56	< 0,43	< 0,04	ChH01H-Ex(70M)	10,5	3 306	< 0,43	< 0,04
AnC15K-Ex(70M)	11,2	62	< 0,43	< 0,04	ChH02H-Ex(70M)	9,14	5 351	0,714	0,0781
AnC16K-Ex(70M)	10,0	27	< 0,43	< 0,04	ChH03H-Ex(70M)	10,0	457	< 0,43	< 0,04
AnC17K-Ex(70M)	10,0	48	< 0,43	< 0,04	ChT01H-Ex(70M)	10,5	81	< 0,43	< 0,04
ChB01K-Ex(70M)	11,6	40	< 0,43	< 0,04	ChT02H-Ex(70M)	11,1	163	< 0,43	< 0,04
ChB02K-Ex(70M)	12,4	193	< 0,43	< 0,03	ChT03H-Ex(70M)	9,90	39	< 0,43	< 0,04
ChH01K-Ex(70M)	9,60	0	< 0,43	< 0,04	ChT04H-Ex(70M)	9,72	103	< 0,43	< 0,04
ChH02K-Ex(70M)	10,4	16	< 0,43	< 0,04	ChT05H-Ex(70M)	9,96	166	< 0,43	< 0,04
ChH03K-Ex(70M)	10,0	0	< 0,43	< 0,04	SPV01H-Ex(70M)	10,0	5 718	0,765	0,076
ChT01K-Ex(70M)	9,72	0	< 0,43	< 0,04	AnS07H-Ex(aq)	10,0	119	< 0,43	< 0,04
ChT02K-Ex(70M)	8,09	16	< 0,43	< 0,05	AnS07K-Ex(aq)	10,0	14 537	2,14	0,213
ChT03K-Ex(70M)	9,83	13	< 0,43	< 0,04	AnC12H-Ex(aq)	10,1	59	< 0,43	< 0,04
ChT04K-Ex(70M)	9,93	25	< 0,43	< 0,04	AnC12K-Ex(aq)	10,1	4 179	0,552	0,0547
ChT05K-Ex(70M)	10,1	0	< 0,43	< 0,04	ChB01H-Ex(aq)	10,2	0	< 0,43	< 0,04
SPV01K-Ex(70M)	9,66	63	< 0,43	< 0,04	ChB01K-Ex(aq)	9,39	13	< 0,43	< 0,05
AnS01H-Ex(70M)	9,18	322	< 0,43	< 0,05	ChH01H-Ex(aq)	9,96	0	< 0,43	< 0,04
AnS03H-Ex(70M)	10,3	90	< 0,43	< 0,04	ChH01K-Ex(aq)	9,89	31	< 0,43	< 0,04
AnS04H-Ex(70M)	10,5	129	< 0,43	< 0,04	ChT05H-Ex(aq)	10,0	2 384	< 0,43	< 0,04
AnS05H-Ex(70M)	10,0	7 322	0,995	0,100	ChT05K-Ex(aq)	9,85	2 791	< 0,43	< 0,04
AnS06H-Ex(70M)	10,2	76	< 0,43	< 0,04	SPV01H-Ex(aq)	9,94	0	< 0,43	< 0,04



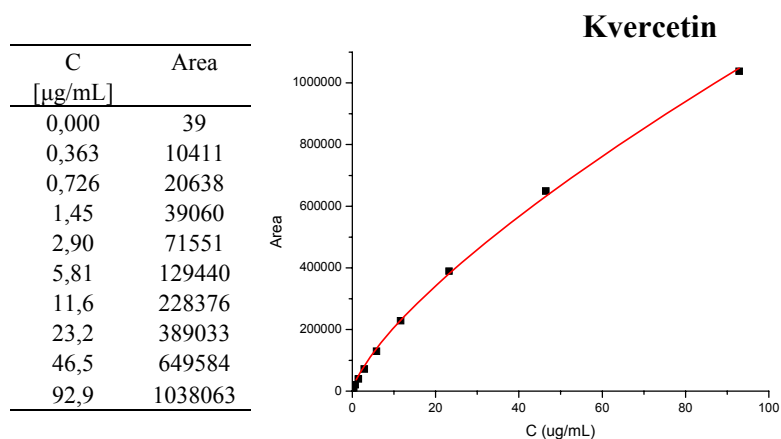
	C_{eks}	Area	C_{galna}	$C_{galna,eks}$		C_{eks}	Area	C_{galna}	$C_{galna,eks}$
	[mg/mL]		[$\mu\text{g/mL}$]	[mg/g]		[mg/mL]		[$\mu\text{g/mL}$]	[mg/g]
AnS01K-Ex(70M)	4,99	0	< 0,39	< 0,08	AnS07H-Ex(70M)	9,91	0	< 0,39	< 0,04
AnS03K-Ex(70M)	5,21	0	< 0,39	< 0,07	AnS08H-Ex(70M)	9,68	0	< 0,39	< 0,04
AnS04K-Ex(70M)	6,72	0	< 0,39	< 0,06	AnS10H-Ex(70M)	11,2	0	< 0,39	< 0,03
AnS05K-Ex(70M)	5,08	0	< 0,39	< 0,08	AnS11H-Ex(70M)	9,70	0	< 0,39	< 0,04
AnS06K-Ex(70M)	5,16	0	< 0,39	< 0,08	AnC10H-Ex(70M)	9,61	0	< 0,39	< 0,04
AnS07K-Ex(70M)	5,16	0	< 0,39	< 0,08	AnC11H-Ex(70M)	9,94	0	< 0,39	< 0,04
AnS08K-Ex(70M)	4,79	0	< 0,39	< 0,08	AnC12H-Ex(70M)	9,74	0	< 0,39	< 0,04
AnS09K-Ex(70M)	5,29	0	< 0,39	< 0,07	AnC13H-Ex(70M)	11,0	0	< 0,39	< 0,04
AnS10K-Ex(70M)	5,06	0	< 0,39	< 0,08	AnC14H-Ex(70M)	10,6	0	< 0,39	< 0,04
AnS11K-Ex(70M)	5,04	0	< 0,39	< 0,08	AnC15H-Ex(70M)	10,7	0	< 0,39	< 0,04
AnC10K-Ex(70M)	8,98	0	< 0,39	< 0,04	AnC16H-Ex(70M)	11,5	0	< 0,39	< 0,03
AnC11K-Ex(70M)	9,94	0	< 0,39	< 0,04	AnC17H-Ex(70M)	9,68	0	< 0,39	< 0,04
AnC12K-Ex(70M)	10,4	0	< 0,39	< 0,04	ChB01H-Ex(70M)	9,43	0	< 0,39	< 0,04
AnC13K-Ex(70M)	10,3	0	< 0,39	< 0,04	ChB02H-Ex(70M)	11,3	0	< 0,39	< 0,03
AnC14K-Ex(70M)	9,91	0	< 0,39	< 0,04	ChH01H-Ex(70M)	10,5	0	< 0,39	< 0,04
AnC15K-Ex(70M)	11,2	0	< 0,39	< 0,03	ChH02H-Ex(70M)	9,14	0	< 0,39	< 0,04
AnC16K-Ex(70M)	10,0	0	< 0,39	< 0,04	ChH03H-Ex(70M)	10,0	0	< 0,39	< 0,04
AnC17K-Ex(70M)	10,0	0	< 0,39	< 0,04	ChT01H-Ex(70M)	10,5	0	< 0,39	< 0,04
ChB01K-Ex(70M)	11,6	0	< 0,39	< 0,03	ChT02H-Ex(70M)	11,1	0	< 0,39	< 0,04
ChB02K-Ex(70M)	12,4	0	< 0,39	< 0,03	ChT03H-Ex(70M)	9,90	0	< 0,39	< 0,04
ChH01K-Ex(70M)	9,60	0	< 0,39	< 0,04	ChT04H-Ex(70M)	9,72	0	< 0,39	< 0,04
ChH02K-Ex(70M)	10,4	0	< 0,39	< 0,04	ChT05H-Ex(70M)	9,96	0	< 0,39	< 0,04
ChH03K-Ex(70M)	10,0	0	< 0,39	< 0,04	SPV01H-Ex(70M)	10,0	0	< 0,39	< 0,04
ChT01K-Ex(70M)	9,72	0	< 0,39	< 0,04	AnS07H-Ex(aq)	10,0	0	< 0,39	< 0,04
ChT02K-Ex(70M)	8,09	0	< 0,39	< 0,05	AnS07K-Ex(aq)	10,0	0	< 0,39	< 0,04
ChT03K-Ex(70M)	9,83	0	< 0,39	< 0,04	AnC12H-Ex(aq)	10,1	0	< 0,39	< 0,04
ChT04K-Ex(70M)	9,93	0	< 0,39	< 0,04	AnC12K-Ex(aq)	10,1	0	< 0,39	< 0,04
ChT05K-Ex(70M)	10,1	0	< 0,39	< 0,04	ChB01H-Ex(aq)	10,2	0	< 0,39	< 0,04
SPV01K-Ex(70M)	9,66	0	< 0,39	< 0,04	ChB01K-Ex(aq)	9,39	0	< 0,39	< 0,04
AnS01H-Ex(70M)	9,18	0	< 0,39	< 0,04	ChH01H-Ex(aq)	9,96	0	< 0,39	< 0,04
AnS03H-Ex(70M)	10,3	0	< 0,39	< 0,04	ChH01K-Ex(aq)	9,89	0	< 0,39	< 0,04
AnS04H-Ex(70M)	10,5	0	< 0,39	< 0,04	ChT05H-Ex(aq)	10,0	0	< 0,39	< 0,04
AnS05H-Ex(70M)	10,0	0	< 0,39	< 0,04	ChT05K-Ex(aq)	9,85	0	< 0,39	< 0,04
AnS06H-Ex(70M)	10,2	0	< 0,39	< 0,04	SPV01H-Ex(aq)	9,94	0	< 0,39	< 0,04

Matairezinol

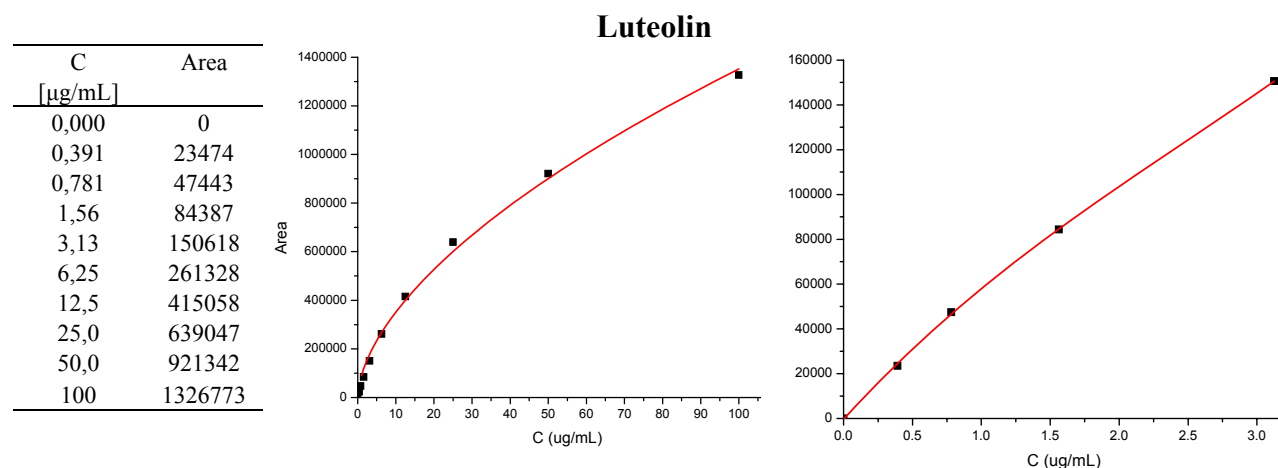
C [µg/mL]	Area
0,000	43
0,391	1694
0,781	3336
1,56	6279
3,13	12785
6,25	23543
12,5	44866
25,0	83172
50,0	155493
100	306455



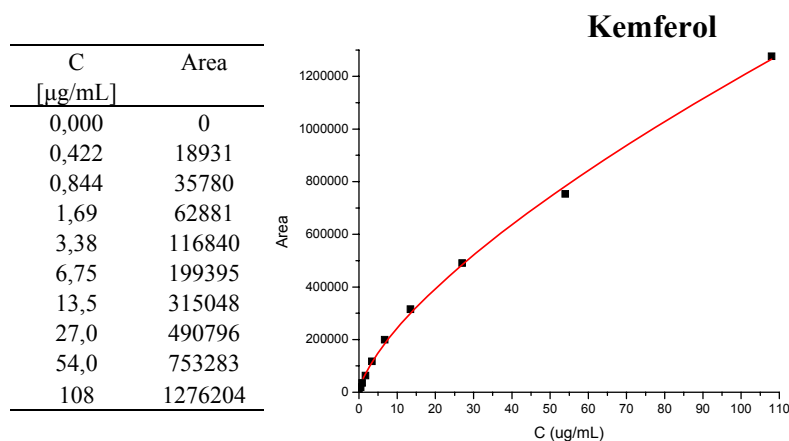
	C_{eks} [mg/mL]	Area	C_{galna} [ug/mL]	$C_{galna,eks}$ [mg/g]		C_{eks} [mg/mL]	Area	C_{galna} [ug/mL]	$C_{galna,eks}$ [mg/g]
AnS01K-Ex(70M)	4,99	967	< 0,39	< 0,08	AnS07H-Ex(70M)	9,91	0	< 0,39	< 0,04
AnS03K-Ex(70M)	5,21	3 924	0,956	0,184	AnS08H-Ex(70M)	9,68	0	< 0,39	< 0,04
AnS04K-Ex(70M)	6,72	957	< 0,39	< 0,06	AnS10H-Ex(70M)	11,2	0	< 0,39	< 0,03
AnS05K-Ex(70M)	5,08	0	< 0,39	< 0,08	AnS11H-Ex(70M)	9,70	0	< 0,39	< 0,04
AnS06K-Ex(70M)	5,16	471	< 0,39	< 0,08	AnC10H-Ex(70M)	9,61	0	< 0,39	< 0,04
AnS07K-Ex(70M)	5,16	584	< 0,39	< 0,08	AnC11H-Ex(70M)	9,94	0	< 0,39	< 0,04
AnS08K-Ex(70M)	4,79	4 222	1,03	0,215	AnC12H-Ex(70M)	9,74	0	< 0,39	< 0,04
AnS09K-Ex(70M)	5,29	4 741	1,16	0,220	AnC13H-Ex(70M)	11,0	951	< 0,39	< 0,04
AnS10K-Ex(70M)	5,06	0	< 0,39	< 0,08	AnC14H-Ex(70M)	10,6	0	< 0,39	< 0,04
AnS11K-Ex(70M)	5,04	0	< 0,39	< 0,08	AnC15H-Ex(70M)	10,7	0	< 0,39	< 0,04
AnC10K-Ex(70M)	8,98	0	< 0,39	< 0,04	AnC16H-Ex(70M)	11,5	766	< 0,39	< 0,03
AnC11K-Ex(70M)	9,94	0	< 0,39	< 0,04	AnC17H-Ex(70M)	9,68	536	< 0,39	< 0,04
AnC12K-Ex(70M)	10,4	0	< 0,39	< 0,04	ChB01H-Ex(70M)	9,43	0	< 0,39	< 0,04
AnC13K-Ex(70M)	10,3	0	< 0,39	< 0,04	ChB02H-Ex(70M)	11,3	0	< 0,39	< 0,03
AnC14K-Ex(70M)	9,91	0	< 0,39	< 0,04	ChH01H-Ex(70M)	10,5	0	< 0,39	< 0,04
AnC15K-Ex(70M)	11,2	0	< 0,39	< 0,03	ChH02H-Ex(70M)	9,14	0	< 0,39	< 0,04
AnC16K-Ex(70M)	10,0	0	< 0,39	< 0,04	ChH03H-Ex(70M)	10,0	0	< 0,39	< 0,04
AnC17K-Ex(70M)	10,0	0	< 0,39	< 0,04	ChT01H-Ex(70M)	10,5	470	< 0,39	< 0,04
ChB01K-Ex(70M)	11,6	0	< 0,39	< 0,03	ChT02H-Ex(70M)	11,1	402	< 0,39	< 0,04
ChB02K-Ex(70M)	12,4	0	< 0,39	< 0,03	ChT03H-Ex(70M)	9,90	0	< 0,39	< 0,04
ChH01K-Ex(70M)	9,60	0	< 0,39	< 0,04	ChT04H-Ex(70M)	9,72	0	< 0,39	< 0,04
ChH02K-Ex(70M)	10,4	2 194	0,522	0,0501	ChT05H-Ex(70M)	9,96	0	< 0,39	< 0,04
ChH03K-Ex(70M)	10,0	0	< 0,39	< 0,04	SPV01H-Ex(70M)	10,0	0	< 0,39	< 0,04
ChT01K-Ex(70M)	9,72	0	< 0,39	< 0,04	AnS07H-Ex(aq)	10,0	0	< 0,39	< 0,04
ChT02K-Ex(70M)	8,09	0	< 0,39	< 0,05	AnS07K-Ex(aq)	10,0	0	< 0,39	< 0,04
ChT03K-Ex(70M)	9,83	0	< 0,39	< 0,04	AnC12H-Ex(aq)	10,1	0	< 0,39	< 0,04
ChT04K-Ex(70M)	9,93	0	< 0,39	< 0,04	AnC12K-Ex(aq)	10,1	0	< 0,39	< 0,04
ChT05K-Ex(70M)	10,1	0	< 0,39	< 0,04	ChB01H-Ex(aq)	10,2	0	< 0,39	< 0,04
SPV01K-Ex(70M)	9,66	0	< 0,39	< 0,04	ChB01K-Ex(aq)	9,39	0	< 0,39	< 0,04
AnS01H-Ex(70M)	9,18	0	< 0,39	< 0,04	ChH01H-Ex(aq)	9,96	0	< 0,39	< 0,04
AnS03H-Ex(70M)	10,3	401	< 0,39	< 0,04	ChH01K-Ex(aq)	9,89	0	< 0,39	< 0,04
AnS04H-Ex(70M)	10,5	0	< 0,39	< 0,04	ChT05H-Ex(aq)	10,0	0	< 0,39	< 0,04
AnS05H-Ex(70M)	10,0	0	< 0,39	< 0,04	ChT05K-Ex(aq)	9,85	0	< 0,39	< 0,04
AnS06H-Ex(70M)	10,2	0	< 0,39	< 0,04	SPV01H-Ex(aq)	9,94	0	< 0,39	< 0,04



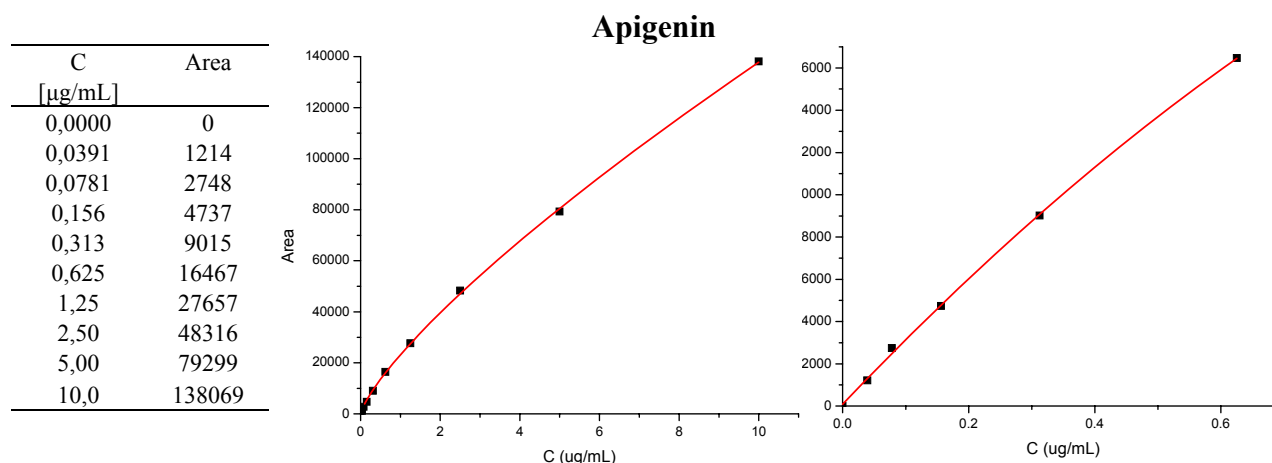
	C_{eks}	Area	C_{galna}	$C_{galna,eks}$		C_{eks}	Area	C_{galna}	$C_{galna,eks}$
	[mg/mL]		[$\mu\text{g/mL}$]	[mg/g]		[mg/mL]		[$\mu\text{g/mL}$]	[mg/g]
AnS01K-Ex(70M)	4,99	0	< 0,36	< 0,07	AnS07H-Ex(70M)	9,91	0	< 0,36	< 0,04
AnS03K-Ex(70M)	5,21	0	< 0,36	< 0,07	AnS08H-Ex(70M)	9,68	0	< 0,36	< 0,04
AnS04K-Ex(70M)	6,72	0	< 0,36	< 0,05	AnS10H-Ex(70M)	11,2	0	< 0,36	< 0,03
AnS05K-Ex(70M)	5,08	0	< 0,36	< 0,07	AnS11H-Ex(70M)	9,70	0	< 0,36	< 0,04
AnS06K-Ex(70M)	5,16	0	< 0,36	< 0,07	AnC10H-Ex(70M)	9,61	0	< 0,36	< 0,04
AnS07K-Ex(70M)	5,16	0	< 0,36	< 0,07	AnC11H-Ex(70M)	9,94	0	< 0,36	< 0,04
AnS08K-Ex(70M)	4,79	0	< 0,36	< 0,08	AnC12H-Ex(70M)	9,74	240	< 0,36	< 0,04
AnS09K-Ex(70M)	5,29	0	< 0,36	< 0,07	AnC13H-Ex(70M)	11,0	131	< 0,36	< 0,03
AnS10K-Ex(70M)	5,06	0	< 0,36	< 0,07	AnC14H-Ex(70M)	10,6	269	< 0,36	< 0,03
AnS11K-Ex(70M)	5,04	0	< 0,36	< 0,07	AnC15H-Ex(70M)	10,7	0	< 0,36	< 0,03
AnC10K-Ex(70M)	8,98	0	< 0,36	< 0,04	AnC16H-Ex(70M)	11,5	0	< 0,36	< 0,03
AnC11K-Ex(70M)	9,94	0	< 0,36	< 0,04	AnC17H-Ex(70M)	9,68	0	< 0,36	< 0,04
AnC12K-Ex(70M)	10,4	0	< 0,36	< 0,03	ChB01H-Ex(70M)	9,43	454	< 0,36	< 0,04
AnC13K-Ex(70M)	10,3	0	< 0,36	< 0,03	ChB02H-Ex(70M)	11,3	1 884	< 0,36	< 0,03
AnC14K-Ex(70M)	9,91	0	< 0,36	< 0,04	ChH01H-Ex(70M)	10,5	0	< 0,36	< 0,03
AnC15K-Ex(70M)	11,2	0	< 0,36	< 0,03	ChH02H-Ex(70M)	9,14	0	< 0,36	< 0,04
AnC16K-Ex(70M)	10,0	0	< 0,36	< 0,04	ChH03H-Ex(70M)	10,0	6 347	< 0,36	< 0,04
AnC17K-Ex(70M)	10,0	0	< 0,36	< 0,04	ChT01H-Ex(70M)	10,5	0	< 0,36	< 0,03
ChB01K-Ex(70M)	11,6	0	< 0,36	< 0,03	ChT02H-Ex(70M)	11,1	1 005	< 0,36	< 0,03
ChB02K-Ex(70M)	12,4	0	< 0,36	< 0,03	ChT03H-Ex(70M)	9,90	0	< 0,36	< 0,04
ChH01K-Ex(70M)	9,60	0	< 0,36	< 0,04	ChT04H-Ex(70M)	9,72	0	< 0,36	< 0,04
ChH02K-Ex(70M)	10,4	0	< 0,36	< 0,03	ChT05H-Ex(70M)	9,96	0	< 0,36	< 0,04
ChH03K-Ex(70M)	10,0	0	< 0,36	< 0,04	SPV01H-Ex(70M)	10,0	0	< 0,36	< 0,04
ChT01K-Ex(70M)	9,72	0	< 0,36	< 0,04	AnS07H-Ex(aq)	10,0	0	< 0,36	< 0,04
ChT02K-Ex(70M)	8,09	0	< 0,36	< 0,04	AnS07K-Ex(aq)	10,0	0	< 0,36	< 0,04
ChT03K-Ex(70M)	9,83	0	< 0,36	< 0,04	AnC12H-Ex(aq)	10,1	0	< 0,36	< 0,04
ChT04K-Ex(70M)	9,93	0	< 0,36	< 0,04	AnC12K-Ex(aq)	10,1	0	< 0,36	< 0,04
ChT05K-Ex(70M)	10,1	0	< 0,36	< 0,04	ChB01H-Ex(aq)	10,2	0	< 0,36	< 0,04
SPV01K-Ex(70M)	9,66	0	< 0,36	< 0,04	ChB01K-Ex(aq)	9,39	0	< 0,36	< 0,04
AnS01H-Ex(70M)	9,18	0	< 0,36	< 0,04	ChH01H-Ex(aq)	9,96	0	< 0,36	< 0,04
AnS03H-Ex(70M)	10,3	0	< 0,36	< 0,03	ChH01K-Ex(aq)	9,89	2 296	< 0,36	< 0,04
AnS04H-Ex(70M)	10,5	0	< 0,36	< 0,03	ChT05H-Ex(aq)	10,0	0	< 0,36	< 0,04
AnS05H-Ex(70M)	10,0	0	< 0,36	< 0,04	ChT05K-Ex(aq)	9,85	0	< 0,36	< 0,04
AnS06H-Ex(70M)	10,2	0	< 0,36	< 0,04	SPV01H-Ex(aq)	9,94	0	< 0,36	< 0,04



	C_{eks}	Area	C_{galna}	$C_{galna,eks}$		C_{eks}	Area	C_{galna}	$C_{galna,eks}$
	[mg/mL]		[$\mu\text{g/mL}$]	[mg/g]		[mg/mL]		[$\mu\text{g/mL}$]	[mg/g]
AnS01K-Ex(70M)	4,99	0	< 0,39	< 0,08	AnS07H-Ex(70M)	9,91	8553	< 0,39	< 0,04
AnS03K-Ex(70M)	5,21	0	< 0,39	< 0,07	AnS08H-Ex(70M)	9,68	10378	< 0,39	< 0,04
AnS04K-Ex(70M)	6,72	0	< 0,39	< 0,06	AnS10H-Ex(70M)	11,2	77932	1,42	0,127
AnS05K-Ex(70M)	5,08	0	< 0,39	< 0,08	AnS11H-Ex(70M)	9,70	24767	0,395	0,0407
AnS06K-Ex(70M)	5,16	0	< 0,39	< 0,08	AnC10H-Ex(70M)	9,61	1363	< 0,39	< 0,04
AnS07K-Ex(70M)	5,16	0	< 0,39	< 0,08	AnC11H-Ex(70M)	9,94	2452	< 0,39	< 0,04
AnS08K-Ex(70M)	4,79	0	< 0,39	< 0,08	AnC12H-Ex(70M)	9,74	6647	< 0,39	< 0,04
AnS09K-Ex(70M)	5,29	0	< 0,39	< 0,07	AnC13H-Ex(70M)	11,0	13469	< 0,39	< 0,04
AnS10K-Ex(70M)	5,06	0	< 0,39	< 0,08	AnC14H-Ex(70M)	10,6	3121	< 0,39	< 0,04
AnS11K-Ex(70M)	5,04	0	< 0,39	< 0,08	AnC15H-Ex(70M)	10,7	2856	< 0,39	< 0,04
AnC10K-Ex(70M)	8,98	0	< 0,39	< 0,04	AnC16H-Ex(70M)	11,5	12454	< 0,39	< 0,03
AnC11K-Ex(70M)	9,94	0	< 0,39	< 0,04	AnC17H-Ex(70M)	9,68	3172	< 0,39	< 0,04
AnC12K-Ex(70M)	10,4	0	< 0,39	< 0,04	ChB01H-Ex(70M)	9,43	81847	1,50	0,159
AnC13K-Ex(70M)	10,3	0	< 0,39	< 0,04	ChB02H-Ex(70M)	11,3	138401	2,84	0,251
AnC14K-Ex(70M)	9,91	0	< 0,39	< 0,04	ChH01H-Ex(70M)	10,5	19917	0,315	0,0301
AnC15K-Ex(70M)	11,2	0	< 0,39	< 0,03	ChH02H-Ex(70M)	9,14	31850	0,516	0,0564
AnC16K-Ex(70M)	10,0	0	< 0,39	< 0,04	ChH03H-Ex(70M)	10,0	2731	< 0,39	< 0,04
AnC17K-Ex(70M)	10,0	631	< 0,39	< 0,04	ChT01H-Ex(70M)	10,5	228	< 0,39	< 0,04
ChB01K-Ex(70M)	11,6	0	< 0,39	< 0,03	ChT02H-Ex(70M)	11,1	718	< 0,39	< 0,04
ChB02K-Ex(70M)	12,4	498	< 0,39	< 0,03	ChT03H-Ex(70M)	9,90	314	< 0,39	< 0,04
ChH01K-Ex(70M)	9,60	0	< 0,39	< 0,04	ChT04H-Ex(70M)	9,72	608	< 0,39	< 0,04
ChH02K-Ex(70M)	10,4	0	< 0,39	< 0,04	ChT05H-Ex(70M)	9,96	261	< 0,39	< 0,04
ChH03K-Ex(70M)	10,0	0	< 0,39	< 0,04	SPV01H-Ex(70M)	10,0	64282	1,13	0,112
ChT01K-Ex(70M)	9,72	0	< 0,39	< 0,04	AnS07H-Ex(aq)	10,0	1600	< 0,39	< 0,04
ChT02K-Ex(70M)	8,09	0	< 0,39	< 0,05	AnS07K-Ex(aq)	10,0	1073	< 0,39	< 0,04
ChT03K-Ex(70M)	9,83	0	< 0,39	< 0,04	AnC12H-Ex(aq)	10,1	59	< 0,39	< 0,04
ChT04K-Ex(70M)	9,93	0	< 0,39	< 0,04	AnC12K-Ex(aq)	10,1	20055	< 0,39	< 0,04
ChT05K-Ex(70M)	10,1	0	< 0,39	< 0,04	ChB01H-Ex(aq)	10,2	59	< 0,39	< 0,04
SPV01K-Ex(70M)	9,66	0	< 0,39	< 0,04	ChB01K-Ex(aq)	9,39	34	< 0,39	< 0,04
AnS01H-Ex(70M)	9,18	3 197	< 0,39	< 0,04	ChH01H-Ex(aq)	9,96	130	< 0,39	< 0,04
AnS03H-Ex(70M)	10,3	903	< 0,39	< 0,04	ChH01K-Ex(aq)	9,89	213	< 0,39	< 0,04
AnS04H-Ex(70M)	10,5	5721	< 0,39	< 0,04	ChT05H-Ex(aq)	10,0	7136	< 0,39	< 0,04
AnS05H-Ex(70M)	10,0	75974	1,37	0,137	ChT05K-Ex(aq)	9,85	45160	0,755	0,0767
AnS06H-Ex(70M)	10,2	636	< 0,39	< 0,04	SPV01H-Ex(aq)	9,94	157	< 0,39	< 0,04

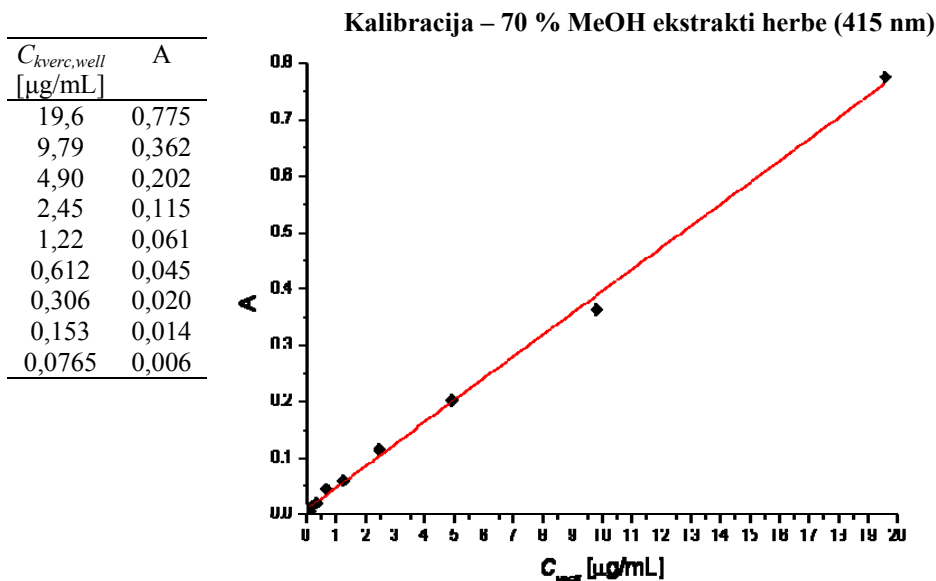


	C_{eks}	Area	C_{galna}	$C_{galna,eks}$		C_{eks}	Area	C_{galna}	$C_{galna,eks}$
	[mg/mL]		[ug/mL]	[mg/g]		[mg/mL]		[ug/mL]	[mg/g]
AnS01K-Ex(70M)	4,99	0	< 0,42	< 0,08	AnS07H-Ex(70M)	9,91	0	< 0,42	< 0,04
AnS03K-Ex(70M)	5,21	0	< 0,42	< 0,08	AnS08H-Ex(70M)	9,68	0	< 0,42	< 0,04
AnS04K-Ex(70M)	6,72	0	< 0,42	< 0,06	AnS10H-Ex(70M)	11,2	0	< 0,42	< 0,04
AnS05K-Ex(70M)	5,08	0	< 0,42	< 0,08	AnS11H-Ex(70M)	9,70	0	< 0,42	< 0,04
AnS06K-Ex(70M)	5,16	0	< 0,42	< 0,08	AnC10H-Ex(70M)	9,61	0	< 0,42	< 0,04
AnS07K-Ex(70M)	5,16	0	< 0,42	< 0,08	AnC11H-Ex(70M)	9,94	0	< 0,42	< 0,04
AnS08K-Ex(70M)	4,79	0	< 0,42	< 0,09	AnC12H-Ex(70M)	9,74	0	< 0,42	< 0,04
AnS09K-Ex(70M)	5,29	0	< 0,42	< 0,08	AnC13H-Ex(70M)	11,0	0	< 0,42	< 0,04
AnS10K-Ex(70M)	5,06	0	< 0,42	< 0,08	AnC14H-Ex(70M)	10,6	0	< 0,42	< 0,04
AnS11K-Ex(70M)	5,04	0	< 0,42	< 0,08	AnC15H-Ex(70M)	10,7	0	< 0,42	< 0,04
AnC10K-Ex(70M)	8,98	0	< 0,42	< 0,05	AnC16H-Ex(70M)	11,5	0	< 0,42	< 0,04
AnC11K-Ex(70M)	9,94	0	< 0,42	< 0,04	AnC17H-Ex(70M)	9,68	0	< 0,42	< 0,04
AnC12K-Ex(70M)	10,4	0	< 0,42	< 0,04	ChB01H-Ex(70M)	9,43	0	< 0,42	< 0,04
AnC13K-Ex(70M)	10,3	0	< 0,42	< 0,04	ChB02H-Ex(70M)	11,3	0	< 0,42	< 0,04
AnC14K-Ex(70M)	9,91	0	< 0,42	< 0,04	ChH01H-Ex(70M)	10,5	0	< 0,42	< 0,04
AnC15K-Ex(70M)	11,2	0	< 0,42	< 0,04	ChH02H-Ex(70M)	9,14	0	< 0,42	< 0,05
AnC16K-Ex(70M)	10,0	0	< 0,42	< 0,04	ChH03H-Ex(70M)	10,0	0	< 0,42	< 0,04
AnC17K-Ex(70M)	10,0	0	< 0,42	< 0,04	ChT01H-Ex(70M)	10,5	0	< 0,42	< 0,04
ChB01K-Ex(70M)	11,6	0	< 0,42	< 0,04	ChT02H-Ex(70M)	11,1	0	< 0,42	< 0,04
ChB02K-Ex(70M)	12,4	0	< 0,42	< 0,03	ChT03H-Ex(70M)	9,90	0	< 0,42	< 0,04
ChH01K-Ex(70M)	9,60	0	< 0,42	< 0,04	ChT04H-Ex(70M)	9,72	0	< 0,42	< 0,04
ChH02K-Ex(70M)	10,4	0	< 0,42	< 0,04	ChT05H-Ex(70M)	9,96	0	< 0,42	< 0,04
ChH03K-Ex(70M)	10,0	0	< 0,42	< 0,04	SPV01H-Ex(70M)	10,0	0	< 0,42	< 0,04
ChT01K-Ex(70M)	9,72	0	< 0,42	< 0,04	AnS07H-Ex(aq)	10,0	0	< 0,42	< 0,04
ChT02K-Ex(70M)	8,09	0	< 0,42	< 0,05	AnS07K-Ex(aq)	10,0	0	< 0,42	< 0,04
ChT03K-Ex(70M)	9,83	0	< 0,42	< 0,04	AnC12H-Ex(aq)	10,1	0	< 0,42	< 0,04
ChT04K-Ex(70M)	9,93	0	< 0,42	< 0,04	AnC12K-Ex(aq)	10,1	0	< 0,42	< 0,04
ChT05K-Ex(70M)	10,1	0	< 0,42	< 0,04	ChB01H-Ex(aq)	10,2	0	< 0,42	< 0,04
SPV01K-Ex(70M)	9,66	0	< 0,42	< 0,04	ChB01K-Ex(aq)	9,39	0	< 0,42	< 0,04
AnS01H-Ex(70M)	9,18	0	< 0,42	< 0,05	ChH01H-Ex(aq)	9,96	0	< 0,42	< 0,04
AnS03H-Ex(70M)	10,3	0	< 0,42	< 0,04	ChH01K-Ex(aq)	9,89	7 774	< 0,42	< 0,04
AnS04H-Ex(70M)	10,5	0	< 0,42	< 0,04	ChT05H-Ex(aq)	10,0	0	< 0,42	< 0,04
AnS05H-Ex(70M)	10,0	0	< 0,42	< 0,04	ChT05K-Ex(aq)	9,85	0	< 0,42	< 0,04
AnS06H-Ex(70M)	10,2	0	< 0,42	< 0,04	SPV01H-Ex(aq)	9,94	0	< 0,42	< 0,04



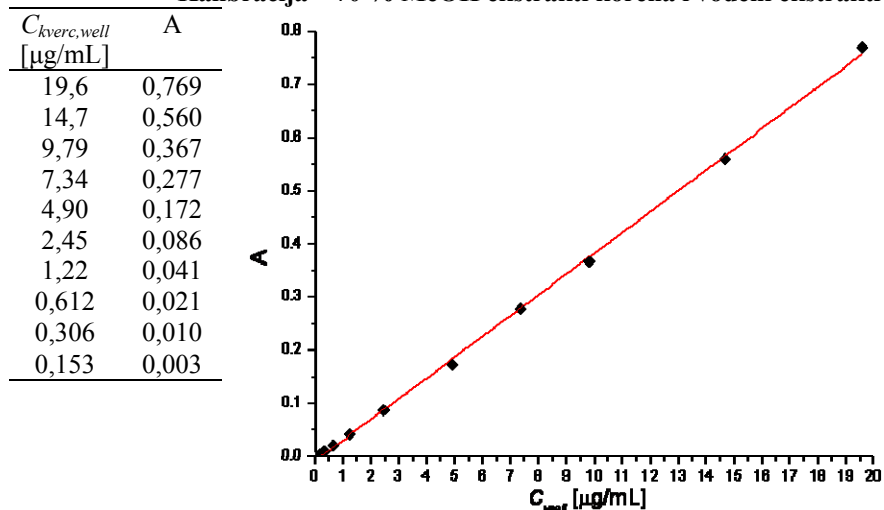
	C_{eks} [mg/mL]	Area	C_{galna} [ug/mL]	$C_{galna,eks}$ [mg/g]		C_{eks} [mg/mL]	Area	C_{galna} [ug/mL]	$C_{galna,eks}$ [mg/g]
AnS01K-Ex(70M)	4,99	0	< 0,039	< 0,008	AnS07H-Ex(70M)	9,91	249	< 0,039	< 0,004
AnS03K-Ex(70M)	5,21	0	< 0,039	< 0,007	AnS08H-Ex(70M)	9,68	383	< 0,039	< 0,004
AnS04K-Ex(70M)	6,72	0	< 0,039	< 0,006	AnS10H-Ex(70M)	11,2	3 168	0,101	0,00903
AnS05K-Ex(70M)	5,08	0	< 0,039	< 0,008	AnS11H-Ex(70M)	9,70	647	< 0,039	< 0,004
AnS06K-Ex(70M)	5,16	0	< 0,039	< 0,008	AnC10H-Ex(70M)	9,61	249	< 0,039	< 0,004
AnS07K-Ex(70M)	5,16	0	< 0,039	< 0,008	AnC11H-Ex(70M)	9,94	680	< 0,039	< 0,004
AnS08K-Ex(70M)	4,79	0	< 0,039	< 0,008	AnC12H-Ex(70M)	9,74	4 223	0,137	0,0141
AnS09K-Ex(70M)	5,29	0	< 0,039	< 0,007	AnC13H-Ex(70M)	11,0	11 245	0,398	0,0360
AnS10K-Ex(70M)	5,06	0	< 0,039	< 0,008	AnC14H-Ex(70M)	10,6	2 693	0,085	0,00806
AnS11K-Ex(70M)	5,04	0	< 0,039	< 0,008	AnC15H-Ex(70M)	10,7	5 560	0,183	0,0171
AnC10K-Ex(70M)	8,98	0	< 0,039	< 0,004	AnC16H-Ex(70M)	11,5	11 803	0,420	0,0364
AnC11K-Ex(70M)	9,94	0	< 0,039	< 0,004	AnC17H-Ex(70M)	9,68	1 345	0,041	0,00419
AnC12K-Ex(70M)	10,4	246	< 0,039	< 0,004	ChB01H-Ex(70M)	9,43	3 633	0,117	0,0124
AnC13K-Ex(70M)	10,3	0	< 0,039	< 0,004	ChB02H-Ex(70M)	11,3	8 313	0,284	0,0251
AnC14K-Ex(70M)	9,91	0	< 0,039	< 0,004	ChH01H-Ex(70M)	10,5	2 425	0,0761	0,00727
AnC15K-Ex(70M)	11,2	0	< 0,039	< 0,003	ChH02H-Ex(70M)	9,14	6 241	0,208	0,0227
AnC16K-Ex(70M)	10,0	0	< 0,039	< 0,004	ChH03H-Ex(70M)	10,0	912	< 0,039	< 0,004
AnC17K-Ex(70M)	10,0	419	< 0,039	< 0,004	ChT01H-Ex(70M)	10,5	311	< 0,039	< 0,004
ChB01K-Ex(70M)	11,6	0	< 0,039	< 0,003	ChT02H-Ex(70M)	11,1	178	< 0,039	< 0,004
ChB02K-Ex(70M)	12,4	184	< 0,039	< 0,003	ChT03H-Ex(70M)	9,90	275	< 0,039	< 0,004
ChH01K-Ex(70M)	9,60	0	< 0,039	< 0,004	ChT04H-Ex(70M)	9,72	285	< 0,039	< 0,004
ChH02K-Ex(70M)	10,4	283	< 0,039	< 0,004	ChT05H-Ex(70M)	9,96	370	< 0,039	< 0,004
ChH03K-Ex(70M)	10,0	0	< 0,039	< 0,004	SPV01H-Ex(70M)	10,0	1 842	0,0569	0,00566
ChT01K-Ex(70M)	9,72	0	< 0,039	< 0,004	AnS07H-Ex(aq)	10,0	0	< 0,039	< 0,004
ChT02K-Ex(70M)	8,09	0	< 0,039	< 0,005	AnS07K-Ex(aq)	10,0	663	< 0,039	< 0,004
ChT03K-Ex(70M)	9,83	0	< 0,039	< 0,004	AnC12H-Ex(aq)	10,1	0	< 0,039	< 0,004
ChT04K-Ex(70M)	9,93	0	< 0,039	< 0,004	AnC12K-Ex(aq)	10,1	735	< 0,039	< 0,004
ChT05K-Ex(70M)	10,1	0	< 0,039	< 0,004	ChB01H-Ex(aq)	10,2	0	< 0,039	< 0,004
SPV01K-Ex(70M)	9,66	0	< 0,039	< 0,004	ChB01K-Ex(aq)	9,39	0	< 0,039	< 0,004
AnS01H-Ex(70M)	9,18	199	< 0,039	< 0,004	ChH01H-Ex(aq)	9,96	0	< 0,039	< 0,004
AnS03H-Ex(70M)	10,3	753	< 0,039	< 0,004	ChH01K-Ex(aq)	9,89	0	< 0,039	< 0,004
AnS04H-Ex(70M)	10,5	563	< 0,039	< 0,004	ChT05H-Ex(aq)	10,0	719	< 0,039	< 0,004
AnS05H-Ex(70M)	10,0	3 922	0,127	0,0127	ChT05K-Ex(aq)	9,85	872	< 0,039	< 0,004
AnS06H-Ex(70M)	10,2	144	< 0,039	< 0,004	SPV01H-Ex(aq)	9,94	0	< 0,039	< 0,004

8.19. REZULTATI TESTA NA UKUPNE FLAVONOIDE



	$C_{eks,well}$ [mg/mL]	A_1	A_2	A_3	A_{kor}	$C_{Fe,eks}$ [mg kvercetin/g]
AnC10H-Ex(70M)	1,20	0,774	0,852	0,848	0,244	12,3 ± 0,9
AnC11H-Ex(70M)	1,24	0,524	0,481	0,456	0,145	6,91 ± 0,71
AnC12H-Ex(70M)	1,22	0,587	0,624	0,684	0,160	9,84 ± 1,04
AnC13H-Ex(70M)	1,38	0,763	0,894	0,816	0,245	10,7 ± 1,2
AnC14H-Ex(70M)	1,32	0,580	0,674	0,545	0,167	8,30 ± 1,32
AnC15H-Ex(70M)	1,34	0,770	0,756	0,758	0,234	10,0 ± 0,1
AnC16H-Ex(70M)	1,44	0,879	0,861	0,848	0,255	10,7 ± 0,3
AnC17H-Ex(70M)	1,21	0,395	0,411	0,423	0,274	2,69 ± 0,30
AnS01H-Ex(70M)	1,15	0,284	0,284	0,305	0,111	3,83 ± 0,28
AnS03H-Ex(70M)	1,29	0,274	0,283	0,262	0,149	2,27 ± 0,21
AnS04H-Ex(70M)	1,31	0,596	0,601		0,269	6,32 ± 0,07
AnS05H-Ex(70M)	0,625	0,528	0,563	0,541	0,122	17,1 ± 0,7
AnS06H-Ex(70M)	1,28	0,419	0,412	0,442	0,213	4,06 ± 0,32
AnS07H-Ex(70M)	1,24	0,553	0,549	0,554	0,259	5,92 ± 0,06
AnS08H-Ex(70M)	1,21	0,390	0,377	0,394	0,189	4,03 ± 0,20
AnS10H-Ex(70M)	0,699	0,577	0,591	0,594	0,154	15,7 ± 0,3
AnS11H-Ex(70M)	1,21	0,786	0,782	0,809	0,216	12,1 ± 0,3
ChB01H-Ex(70M)	0,589	0,826	0,806	0,820	0,201	26,8 ± 0,6
ChB02H-Ex(70M)	0,707	0,830	0,809	0,806	0,198	22,3 ± 0,5
ChH01H-Ex(70M)	1,31	0,776	0,809	0,823	0,221	11,3 ± 0,5
ChH02H-Ex(70M)	1,14	0,953	1,015	0,944	0,269	15,7 ± 0,9
ChT01H-Ex(70M)	1,32	0,377	0,383	0,378	0,205	3,25 ± 0,06
ChT02H-Ex(70M)	1,39	0,632	0,646	0,666	0,230	7,60 ± 0,33
ChT03H-Ex(70M)	1,23	0,444	0,433	0,456	0,177	5,42 ± 0,24
ChT04H-Ex(70M)	1,21	0,493	0,481	0,486	0,243	4,99 ± 0,13
ChT05H-Ex(70M)	1,24	0,475	0,510	0,470	0,227	5,17 ± 0,46
SPV01H-Ex(70M)	0,628	0,746	0,738	0,764	0,156	24,1 ± 0,5

Kalibracija – 70 % MeOH ekstrakti korena i vodeni ekstrakti (415 nm)



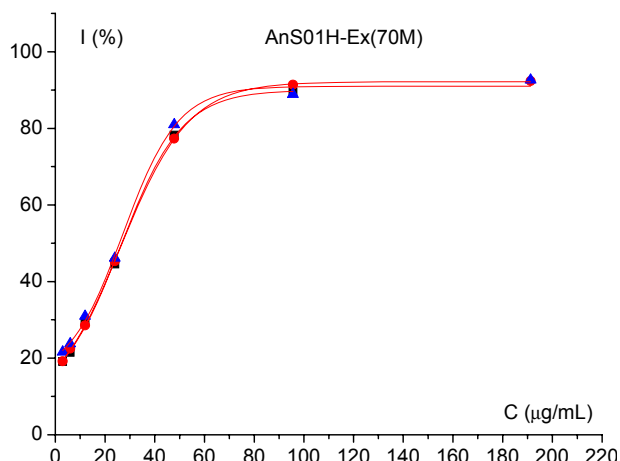
	$C_{eks,well}$ [$\mu\text{g/mL}$]	A_1	A_2	A_3	A_{kor}	$C_{Fe,eks}$ [mg kvercetin/g]
AnC10K-Ex(70M)	374,17	0,142	0,142	0,148	0,099	3,34 ± 0,02
AnC11K-Ex(70M)	414,17	0,137	0,138	0,141	0,092	3,26 ± 0,11
AnC12K-Ex(70M)	865,33	0,193	0,198	0,200	0,102	3,17 ± 0,12
AnC13K-Ex(70M)	430,50	0,131	0,135	0,129	0,090	2,82 ± 0,22
AnC14K-Ex(70M)	413,08	0,101	0,106	0,112	0,084	1,64 ± 0,37
AnC15K-Ex(70M)	466,94	0,100	0,102	0,111	0,084	1,09 ± 0,06
AnC16K-Ex(70M)	418,00	0,109	0,127	0,117	0,080	2,63 ± 0,62
AnC17K-Ex(70M)	417,00	0,124	0,133	0,134	0,104	2,05 ± 0,05
AnS01K-Ex(70M)	415,67	0,153	0,161	0,157	0,108	3,41 ± 0,28
AnS03K-Ex(70M)	433,75	0,165	0,166	0,170	0,118	3,26 ± 0,15
AnS04K-Ex(70M)	560,33	0,974		0,984	0,319	30,5 ± 0,4
AnS05K-Ex(70M)	422,92	0,126	0,129	0,126	0,088	2,68 ± 0,09
AnS06K-Ex(70M)	430,08	0,192	0,193	0,208	0,107	5,65 ± 0,05
AnS07K-Ex(70M)	429,75	0,270	0,274	0,269	0,137	8,91 ± 0,18
AnS08K-Ex(70M)	399,00	0,213	0,218	0,214	0,118	6,94 ± 0,19
AnS09K-Ex(70M)	440,42	0,199	0,192	0,196	0,115	5,26 ± 0,23
AnS10K-Ex(70M)	703,00		0,603	0,617	0,259	13,1 ± 0,4
AnS11K-Ex(70M)	420,33	0,172	0,177	0,162	0,121	3,69 ± 0,2
ChB01K-Ex(70M)	484,50	0,175	0,160	0,168	0,125	2,56 ± 0,43
ChB02K-Ex(70M)	517,08	0,198	0,219	0,215	0,152	3,62 ± 0,17
ChH01K-Ex(70M)	400,00	0,479	0,525	0,500	0,133	24,1 ± 1,4
ChH02K-Ex(70M)	434,25	0,525		0,538	0,147	23,1 ± 0,5
ChH03K-Ex(70M)	418,33	0,214	0,233	0,219	0,108	7,41 ± 0,26
ChT01K-Ex(70M)	438,75	0,304	0,337	0,313	0,216	6,67 ± 1,09
ChT02K-Ex(70M)	463,75	0,352	0,360	0,364	0,265	5,81 ± 0,39
ChT03K-Ex(70M)	412,42	0,577	0,571	0,568	0,382	12,3 ± 0,3
ChT04K-Ex(70M)	404,83		0,531	0,553	0,339	13,3 ± 1,0
ChT05K-Ex(70M)	414,83	0,500	0,502	0,487	0,290	13,3 ± 0,5
SPV01K-Ex(70M)	402,33	0,122	0,125	0,127	0,091	2,43 ± 0,16

	$C_{eks,well}$ [$\mu\text{g/mL}$]	A_1	A_2	A_3	A_{kor}	$C_{Fe,eks}$ [mg kvercetin/g]
AnC12H-Ex(aq)	1263,16	0,449		0,468	0,157	$6,28 \pm 0,27$
AnC12K-Ex(aq)	1260,14	0,128	0,117	0,150	0,115	$0,587 \pm 0,343$
AnS07H-Ex(aq)	1254,35	0,419	0,407	0,416	0,223	$4,06 \pm 0,13$
AnS07K-Ex(aq)	1253,33	0,543		0,360	0,266	$4,00 \pm 2,60$
ChB01H-Ex(aq)	1273,86	1,065	1,084	1,057	0,415	$13,3 \pm 0,3$
ChB01K-Ex(aq)	1173,18	0,269	0,274	0,254	0,247	$0,622 \pm 0,082$
ChH01H-Ex(aq)	1245,37		0,690	0,699	0,276	$8,76 \pm 0,12$
ChH01K-Ex(aq)	1236,54	0,648	0,622		0,236	$8,44 \pm 0,37$
ChT05H-Ex(aq)	1254,86	0,386	0,412	0,371	0,264	$2,87 \pm 0,46$
ChT05K-Ex(aq)	1230,95	0,218		0,209	0,121	$2,15 \pm 0,14$
SPV01H-Ex(aq)	828,21	0,874	0,802		0,204	$19,8 \pm 1,6$

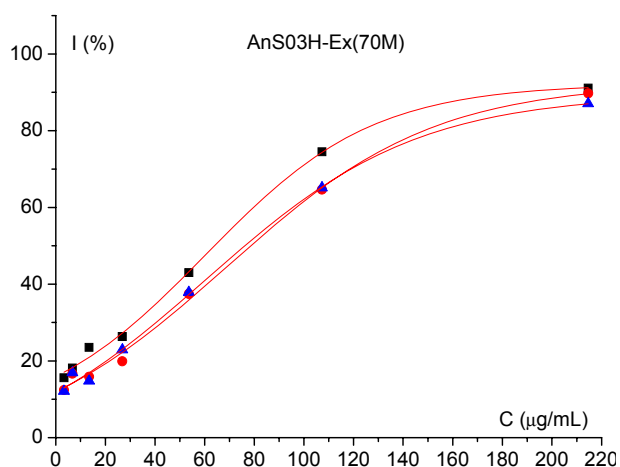
8.20. DPPH TEST – KRIVE DOZA-ODGOVOR

70 % MeOH ekstrakti herbe

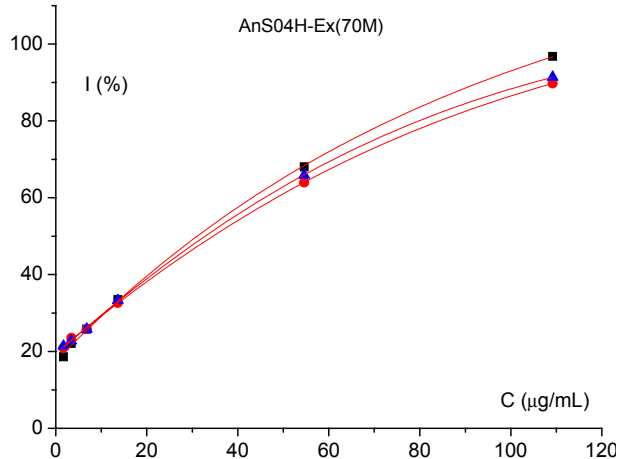
C_{well} [$\mu\text{g/mL}$]	I_1 [%]	I_2 [%]	I_3 [%]
191	86,3	92,4	92,6
96	89,5	91,4	88,9
48	78,2	77,3	81,0
23,9	44,6	45,3	46,2
12,0	29,5	28,5	31,0
6,0	21,5	22,5	23,8
2,99	19,1	19,2	21,6
IC_{50}	26,7	26,9	25,7



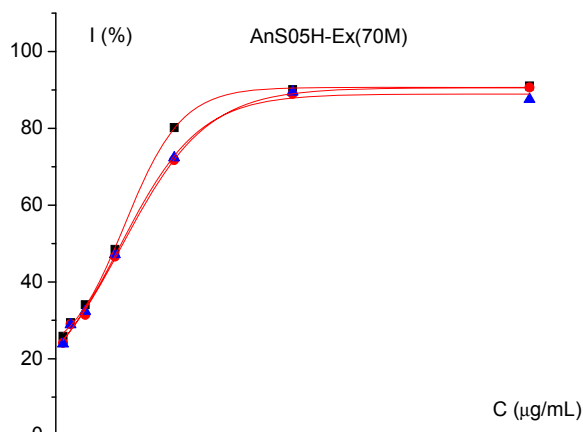
C_{well} [$\mu\text{g/mL}$]	I_1 [%]	I_2 [%]	I_3 [%]
215	91,1	89,7	87,0
107	74,5	64,6	65,2
54	43,0	37,5	37,9
26,8	26,3	19,9	22,9
13,4	23,5	15,9	14,8
6,71	18,1	16,7	17,0
3,35	15,6	12,4	12,1
IC_{50}	64,0	78,5	76,2



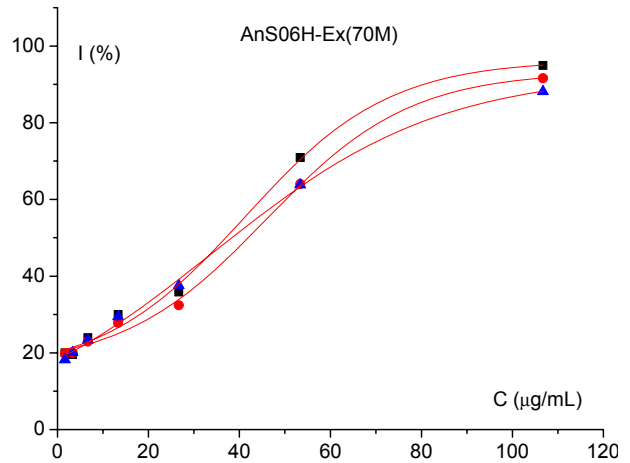
C_{well} [$\mu\text{g/mL}$]	I_1 [%]	I_2 [%]	I_3 [%]
109,2	96,8	89,7	91,4
54,6	68,0	64,0	65,9
27,3	34,2	38,9	28,9
13,6	33,5	32,6	33,3
6,82	25,8	25,9	25,9
3,41	22,1	23,6	22,7
1,71	18,6	20,9	21,4
IC_{50}	31,1	34,5	32,8



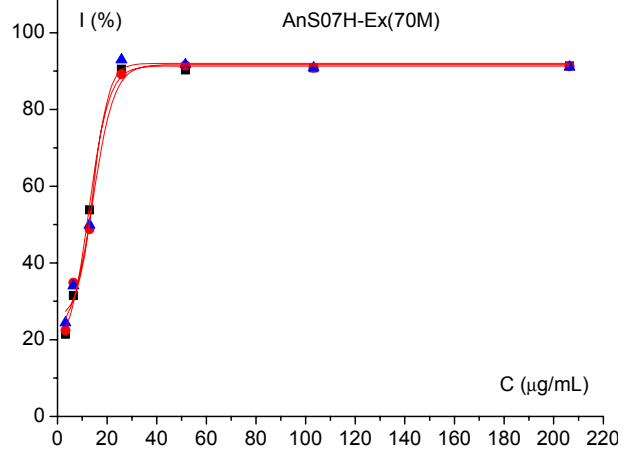
C_{well} [$\mu\text{g/mL}$]	I_1 [%]	I_2 [%]	I_3 [%]
104	91,0	90,6	87,6
52,1	90,1	88,9	89,5
26,0	80,2	71,7	72,4
13,0	48,5	46,6	47,2
6,51	34,1	31,4	32,4
3,25	29,4	29,0	28,9
1,63	25,8	24,1	23,9
IC_{50}	13,4	14,8	14,4



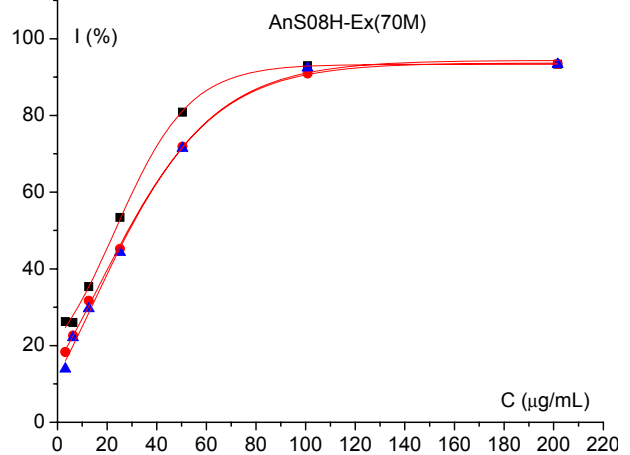
C_{well} [$\mu\text{g/mL}$]	I_1 [%]	I_2 [%]	I_3 [%]
107	94,9	91,6	88,1
53,4	70,9	64,0	63,8
26,7	35,8	32,4	37,5
13,3	30,0	27,8	29,5
6,67	24,0	23,0	23,3
3,34	19,5	20,0	20,1
1,67	20,0	19,9	18,2
IC_{50}	37,0	41,9	38,3



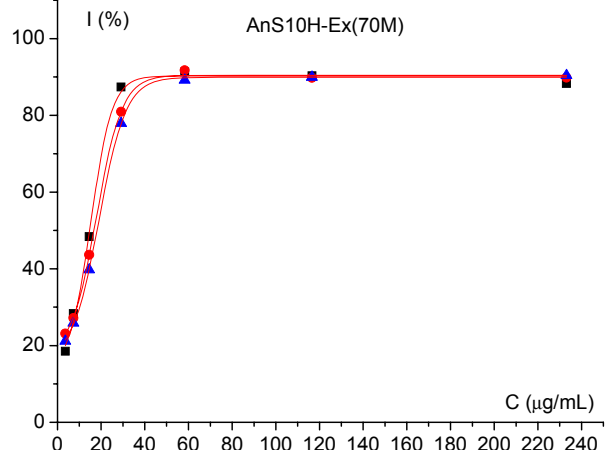
C_{well} [$\mu\text{g/mL}$]	I_1 [%]	I_2 [%]	I_3 [%]
206	91,4	91,3	91,1
103	90,8	90,9	90,9
51,6	90,3	91,5	91,7
25,8	90,5	89,2	93,0
12,9	53,9	48,8	49,9
6,45	31,5	34,9	34,1
3,23	21,4	22,4	24,4
IC_{50}	11,9	12,8	12,7



C_{well} [$\mu\text{g/mL}$]	I_1 [%]	I_2 [%]	I_3 [%]
202	93,3	93,4	93,4
101	93,0	90,9	92,4
50,4	80,8	71,9	71,5
25,2	53,4	45,2	44,3
12,6	35,4	31,7	29,6
6,30	26,0	22,6	22,1
3,15	26,2	18,3	13,9
IC_{50}	23,2	28,4	28,9



C_{well} [$\mu\text{g/mL}$]	I_1 [%]	I_2 [%]	I_3 [%]
233	88,3	89,8	90,4
117	90,3	89,8	90,0
58,3	91,3	89,7	89,2
29,1	87,4	80,9	77,9
14,6	48,4	43,7	39,8
7,28	28,3	27,1	25,9
3,64	18,5	23,1	21,2
IC_{50}	14,7	16,7	18,1

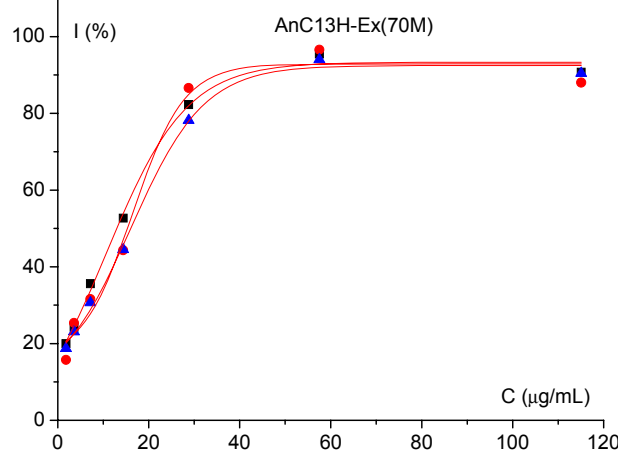
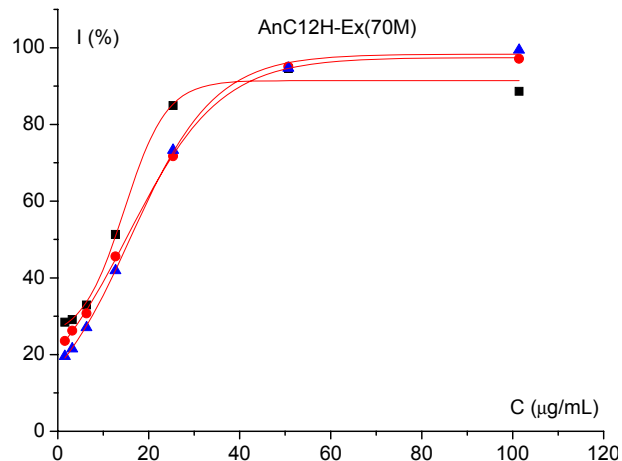
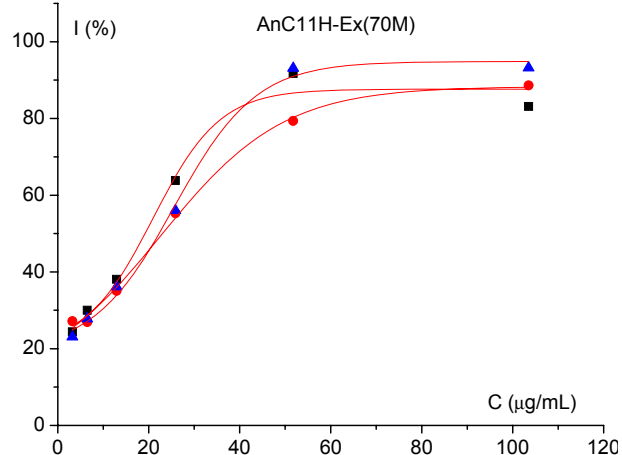
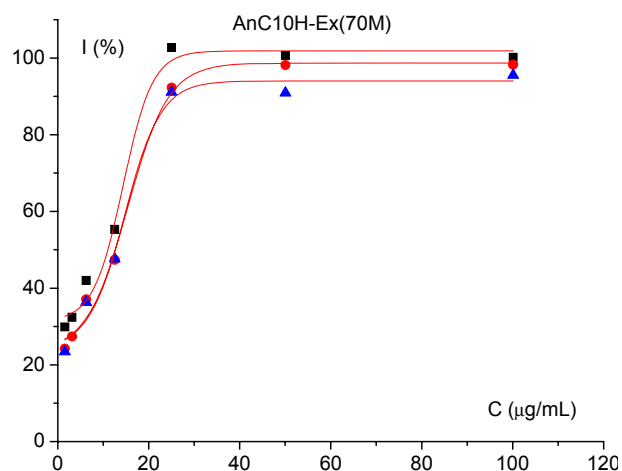


C_{well} [$\mu\text{g/mL}$]	I_1 [%]	I_2 [%]	I_3 [%]
100	100	98,2	95,6
50,1	101	98,2	90,9
25,0	103	92,2	91,1
12,5	55,3	47,4	47,6
6,26	42,0	37,1	36,3
3,13	32,4	27,4	
1,56	29,9	24,2	23,4
IC_{50}	11,0	12,6	12,6

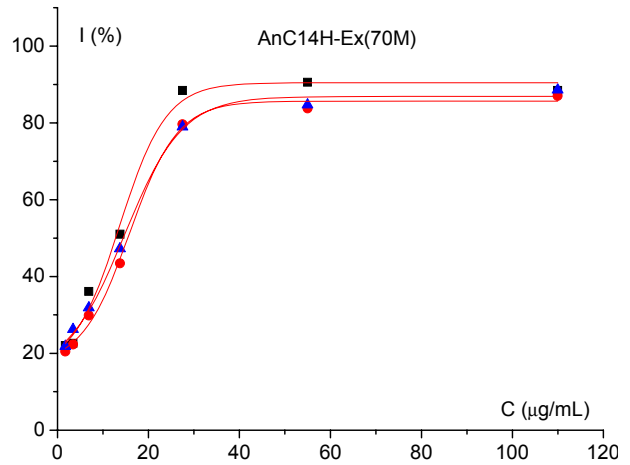
C_{well} [$\mu\text{g/mL}$]	I_1 [%]	I_2 [%]	I_3 [%]
104	83,1	88,6	93,2
51,8	91,7	79,4	93,1
25,9	63,8	55,3	56,0
12,9	38,1	35,1	36,1
6,47	30,0	26,9	27,8
3,24	24,4	27,2	23,1
IC_{50}	19,2	23,0	22,3

C_{well} [$\mu\text{g/mL}$]	I_1 [%]	I_2 [%]	I_3 [%]
101	88,6	97,1	99,4
50,7	94,5	95,1	94,7
25,4	84,9	71,7	73,3
12,7	51,3	45,6	41,9
6,34	32,9	30,8	27,1
3,17	29,1	26,2	21,5
1,58	28,4	23,6	19,6
IC_{50}	12,4	14,9	15,8

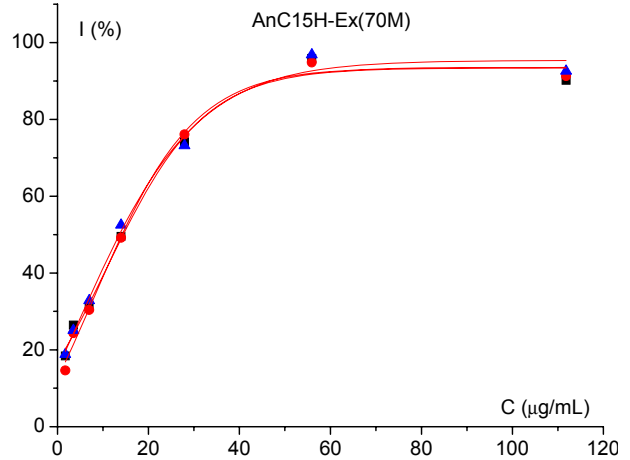
C_{well} [$\mu\text{g/mL}$]	I_1 [%]	I_2 [%]	I_3 [%]
115	90,7	88,0	90,4
57,5	95,5	96,6	94,0
28,8	82,3	86,6	78,2
14,4	52,7	44,4	44,5
7,19	35,6	31,6	30,7
3,60	24,3	25,4	23,1
1,80	20,0	15,8	18,7
IC_{50}	13,0	15,3	16,0



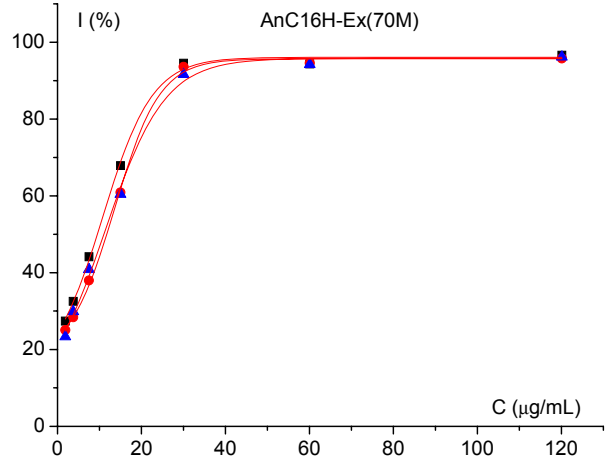
C_{well} [$\mu\text{g/mL}$]	I_1 [%]	I_2 [%]	I_3 [%]
110	88,4	87,0	88,6
55,0	90,6	83,8	84,7
27,5	88,4	79,6	79,0
13,7	51,0	43,4	47,2
6,87	36,1	29,9	31,9
3,44	22,6	22,3	26,2
1,72	22,0	20,5	21,8
IC_{50}	12,8	15,4	14,4



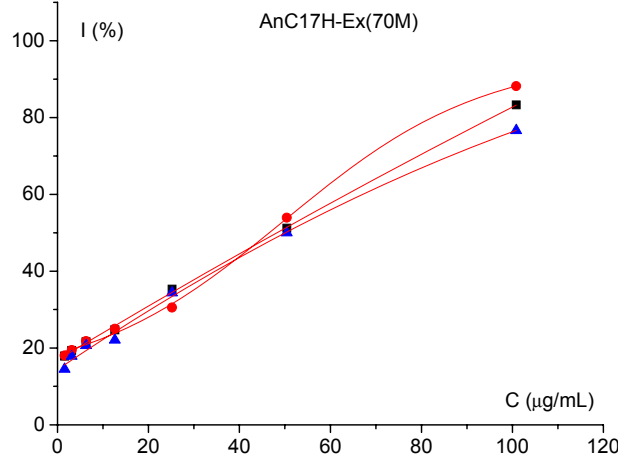
C_{well} [$\mu\text{g/mL}$]	I_1 [%]	I_2 [%]	I_3 [%]
112	90,2	91,2	92,6
55,9	95,9	94,8	96,8
28,0	74,2	76,0	73,2
14,0	49,5	49,2	52,5
6,99	31,3	30,4	32,8
3,49	26,4	24,4	25,1
1,75	18,4	14,6	18,9
IC_{50}	14,5	14,2	13,6



C_{well} [$\mu\text{g/mL}$]	I_1 [%]	I_2 [%]	I_3 [%]
120	96,6	95,8	96,2
60,1	94,3	94,5	94,2
30,0	94,6	93,6	91,6
15,0	67,9	60,9	60,4
7,51	44,1	38,0	40,8
3,75	32,6	28,4	29,9
1,88	27,4	25,1	23,3
IC_{50}	9,5	11,7	11,0



C_{well} [$\mu\text{g/mL}$]	I_1 [%]	I_2 [%]	I_3 [%]
101	83,3	88,2	76,7
50,4	51,2	53,9	50,0
25,2	35,3	30,5	34,4
12,6	24,7	25,0	22,1
6,30	21,6	21,8	20,7
3,15	19,4	19,5	17,9
1,58	17,9	18,0	14,5
IC_{50}	48,2	46,6	50,1

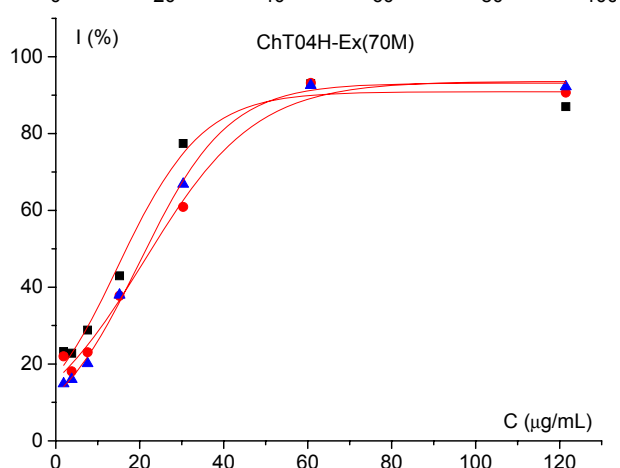
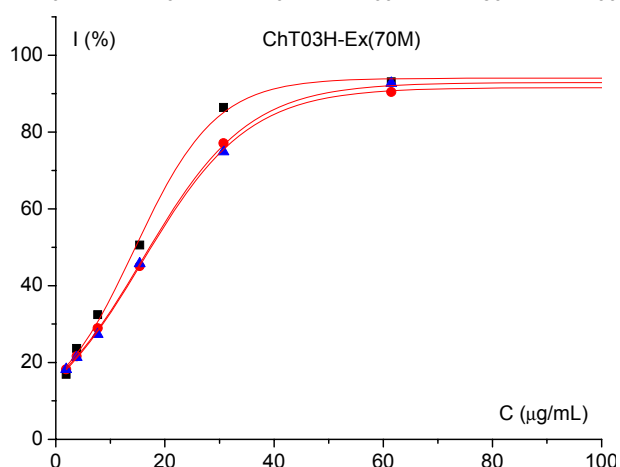
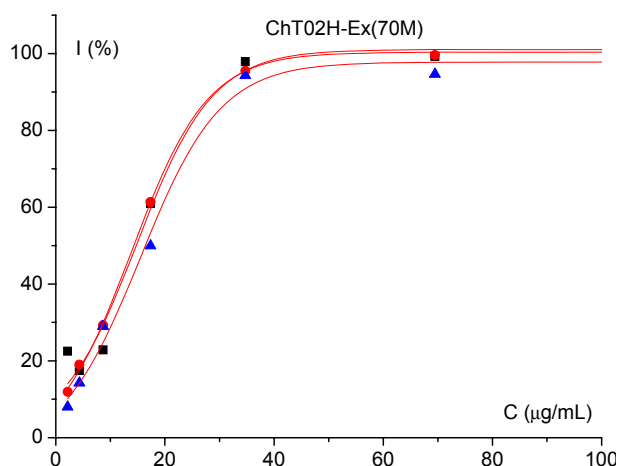
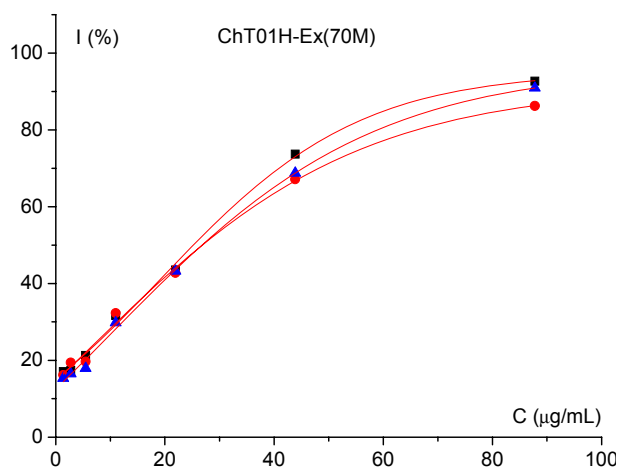


C_{well} [$\mu\text{g/mL}$]	I_1 [%]	I_2 [%]	I_3 [%]
87,8	92,7	86,3	90,9
43,9	73,7	67,2	68,8
21,9	43,5	42,7	43,3
11,0	31,7	32,3	29,8
5,49	21,3	19,7	17,9
2,74	17,4	19,4	16,5
1,37	17,1	16,2	15,4
IC_{50}	25,2	26,9	26,8

C_{well} [$\mu\text{g/mL}$]	I_1 [%]	I_2 [%]	I_3 [%]
139	101	101	98,7
69,5	99,2	99,6	94,6
34,7	97,9	95,5	94,3
17,4	61,0	61,3	50,0
8,68	22,8	29,3	29,0
4,34	17,5	19,0	14,3
2,17	22,5	11,9	8,0
IC_{50}	14,7	14,3	16,4

C_{well} [$\mu\text{g/mL}$]	I_1 [%]	I_2 [%]	I_3 [%]
123	94,1	94,3	89,9
61,5	93,1	90,4	92,7
30,7	86,4	77,1	74,9
15,4	50,6	45,1	45,8
7,69	32,5	28,9	27,4
3,84	23,6	21,6	21,3
1,92	16,9	18,2	18,3
IC_{50}	14,6	17,2	17,5

C_{well} [$\mu\text{g/mL}$]	I_1 [%]	I_2 [%]	I_3 [%]
121	87,0	90,6	92,2
60,7	92,9	93,2	92,5
30,4	77,4	60,9	66,8
15,2	43,0	37,7	38,0
7,59	28,8	23,0	20,2
3,80	22,8	18,1	16,0
1,90	23,2	22,0	14,9
IC_{50}	16,9	22,8	21,5

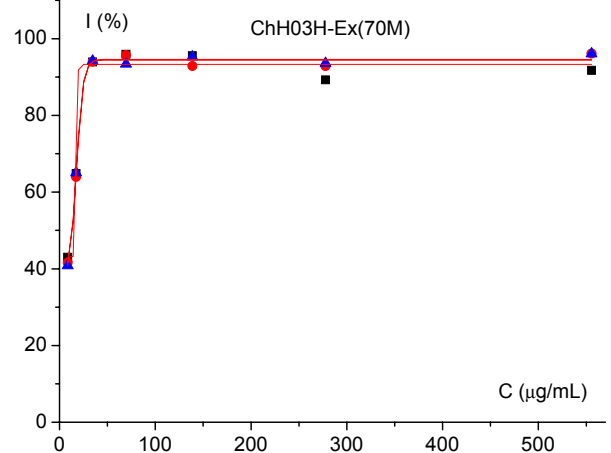
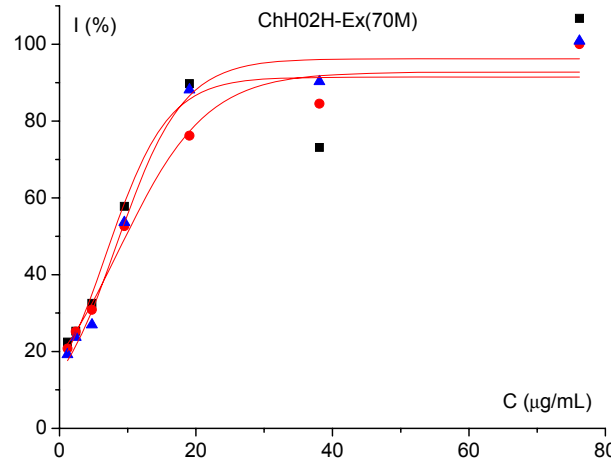
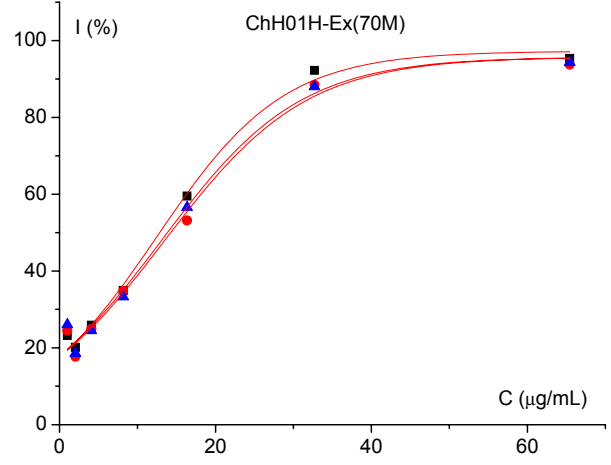
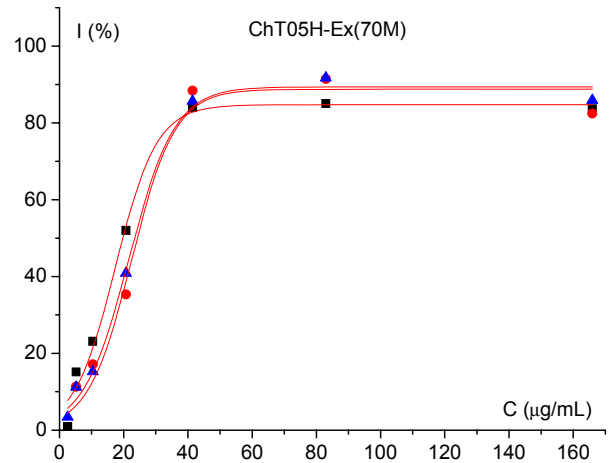


C_{well} [$\mu\text{g/mL}$]	I_1 [%]	I_2 [%]	I_3 [%]
166	83,6	82,4	85,9
83,0	85,1	91,4	91,7
41,5	83,9	88,4	85,7
20,7	52,0	35,4	40,9
10,4	23,2	17,1	15,3
5,19	15,2	11,3	11,2
2,59	0,96	-1,75	3,43
IC_{50}	19,7	24,2	23,4

C_{well} [$\mu\text{g/mL}$]	I_1 [%]	I_2 [%]	I_3 [%]
65,4	95,4	93,7	94,3
32,7	92,2	88,5	88,0
16,4	59,5	53,2	56,6
8,18	34,9	34,8	33,3
4,09	25,9	24,9	24,5
2,04	20,2	17,7	18,6
1,02	23,2	24,5	26,1
IC_{50}	12,8	14,3	13,8

C_{well} [$\mu\text{g/mL}$]	I_1 [%]	I_2 [%]	I_3 [%]
76,2	106,7	100,0	100,8
38,1	73,1	84,5	90,3
19,1	89,7	76,2	88,1
9,53	57,8	52,6	53,7
4,76	32,6	30,9	27,0
2,38	25,3	25,2	23,7
1,19	22,4	20,8	19,2
IC_{50}	7,75	9,72	8,82

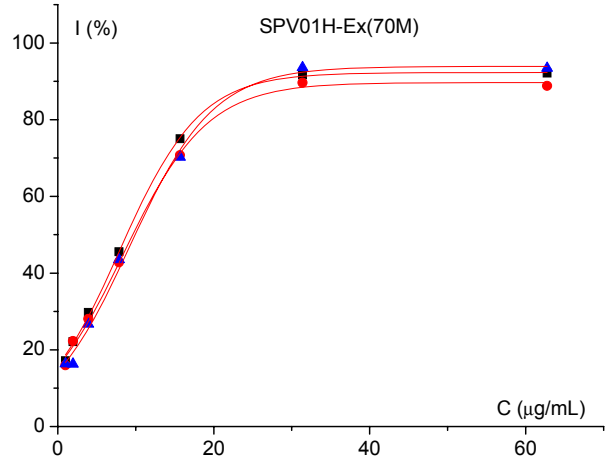
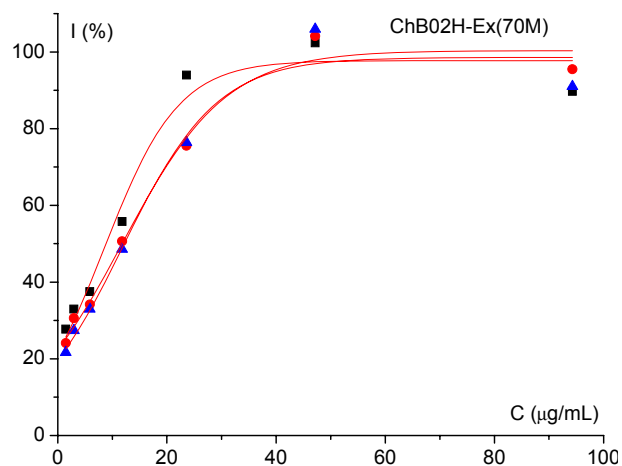
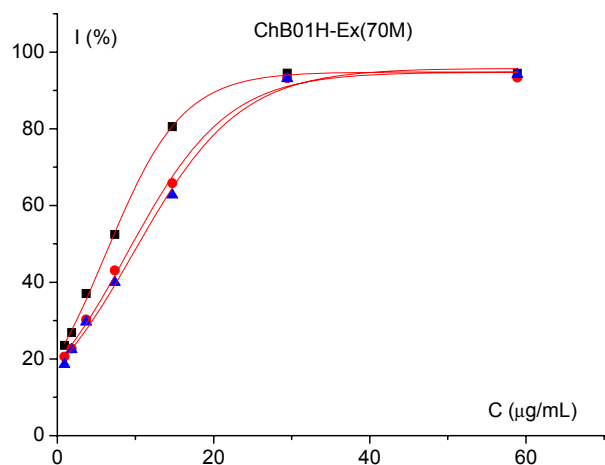
C_{well} [$\mu\text{g/mL}$]	I_1 [%]	I_2 [%]	I_3 [%]
556	91,7	96,1	96,1
278	89,2	92,8	93,6
139	95,5	92,9	95,3
69,4	95,9	95,7	93,4
34,7	93,9	94,0	94,2
17,4	64,9	63,9	65,1
8,68	43,0	41,6	40,8
IC_{50}	16,4	13,4	13,3



C_{well} [$\mu\text{g/mL}$]	I_1 [%]	I_2 [%]	I_3 [%]
58,9	94,4	93,3	94,2
29,5	94,5	93,2	93,1
14,7	80,5	65,8	62,7
7,36	52,4	43,1	40,0
3,68	37,0	30,2	29,6
1,84	26,9	22,7	22,5
0,920	23,5	20,6	18,6
IC_{50}	6,74	9,60	10,4

C_{well} [$\mu\text{g/mL}$]	I_1 [%]	I_2 [%]	I_3 [%]
94,3	89,7	95,5	91,0
47,2	102	104	106
23,6	94,0	75,5	76,4
11,8	55,8	50,6	48,6
5,89	37,5	34,2	33,0
2,95	33,0	30,6	27,4
1,47	27,7	24,1	21,7
IC_{50}	8,84	11,8	12,2

C_{well} [$\mu\text{g/mL}$]	I_1 [%]	I_2 [%]	I_3 [%]
62,8	92,2	88,8	93,4
31,4	91,7	89,6	93,6
15,7	75,0	70,7	70,2
7,85	45,6	42,8	43,5
3,92	29,7	28,1	26,7
1,96	22,2	22,3	16,3
0,981	17,1	16,0	16,4
IC_{50}	8,86	9,62	9,93



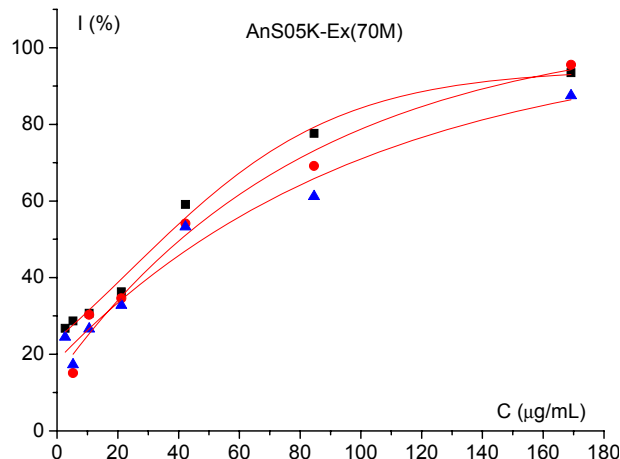
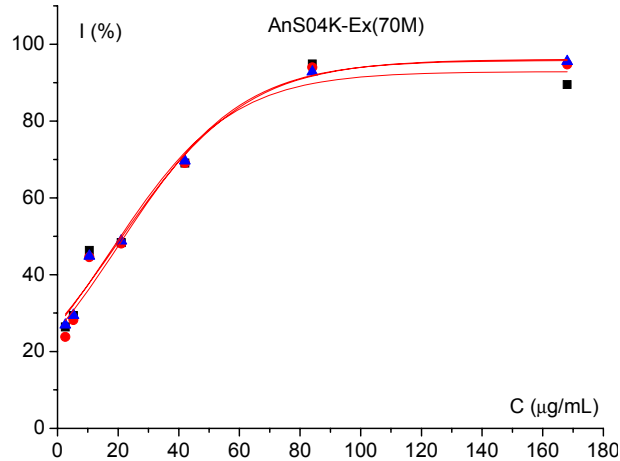
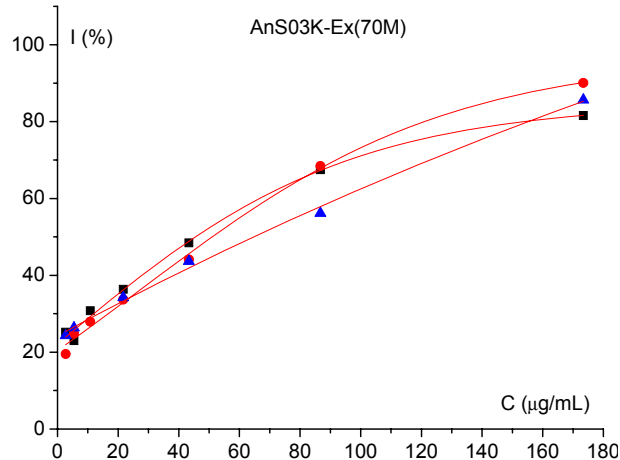
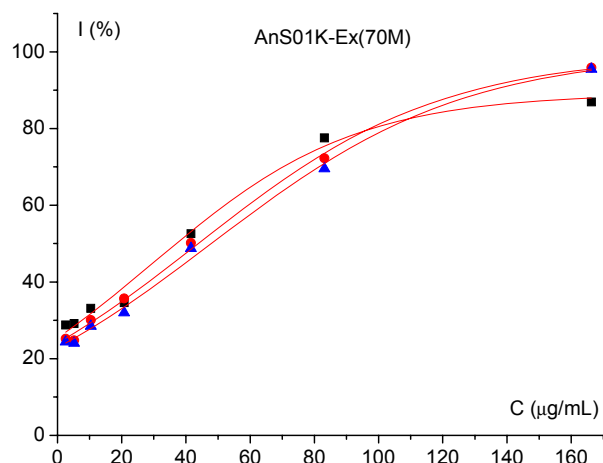
70 % MeOH ekstrakti korena

C_{well} [$\mu\text{g/mL}$]	I_1 [%]	I_2 [%]	I_3 [%]
166	86,9	95,9	95,5
83,1	77,6	72,2	69,5
41,6	52,6	50,2	48,8
20,8	34,6	35,7	32,0
10,4	33,1	30,1	28,5
5,20	29,2	24,8	24,1
2,60	28,8	25,2	24,4
IC_{50}	36,9	43,8	47,9

C_{well} [$\mu\text{g/mL}$]	I_1 [%]	I_2 [%]	I_3 [%]
173	81,5	90,1	85,7
86,7	67,5	68,5	56,2
43,4	48,4	44,1	43,7
21,7	36,3	33,7	34,2
10,8	30,8	27,9	
5,42	23,0	24,8	26,3
2,71	25,2	19,5	24,4
IC_{50}	45,5	51,0	64,7

C_{well} [$\mu\text{g/mL}$]	I_1 [%]	I_2 [%]	I_3 [%]
168	89,5	94,7	95,6
84,1	94,9	93,9	92,8
42,0	69,1	69,1	69,6
21,0	48,3	48,1	48,8
10,5	46,3	44,6	44,9
5,25	29,3	28,2	29,4
2,63	26,4	23,8	26,9
IC_{50}	20,9	22,1	21,4

C_{well} [$\mu\text{g/mL}$]	I_1 [%]	I_2 [%]	I_3 [%]
169	93,5	95,6	87,5
84,6	77,6	69,2	61,2
42,3	59,1	54,1	53,3
21,1	36,3	34,6	32,8
10,6	30,7	30,3	26,6
5,29	28,7	15,1	17,3
2,64	26,8		24,5
IC_{50}	34,7	40,7	48,0

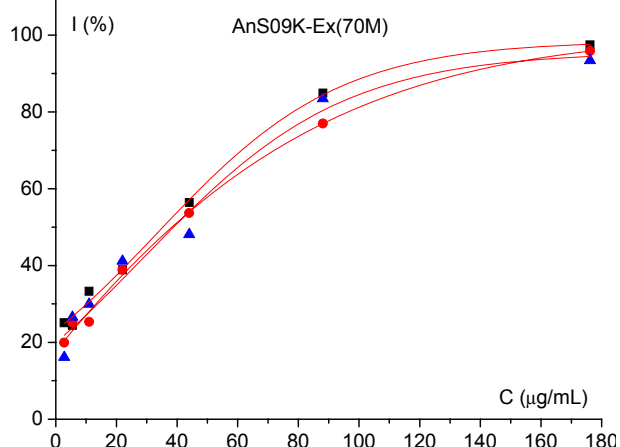
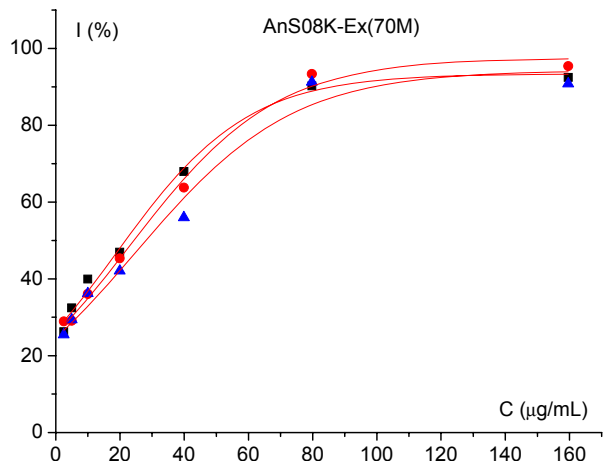
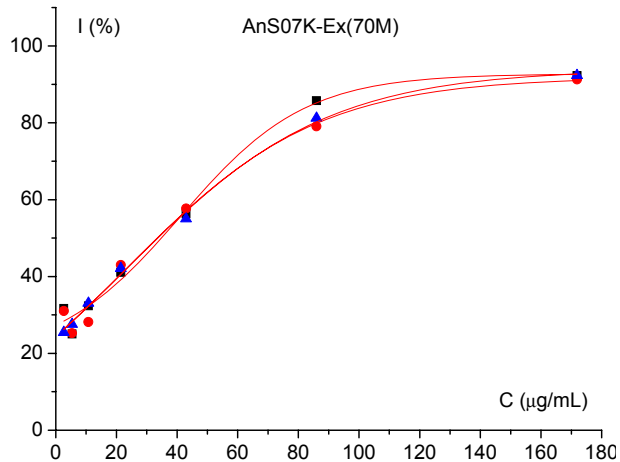
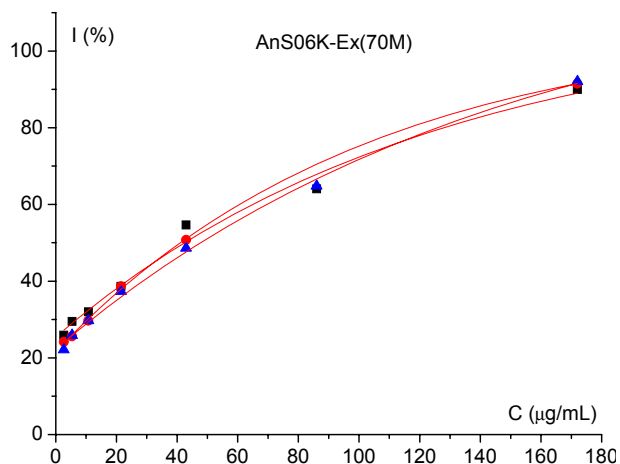


C_{well} [$\mu\text{g/mL}$]	I_1 [%]	I_2 [%]	I_3 [%]
172	90,0	91,5	92,1
86,0	64,0		64,8
43,0	54,7	50,8	48,6
21,5	38,6	38,7	37,4
10,8	32,0	29,7	29,7
5,38	29,5	25,6	25,9
2,69	25,9	24,2	22,2
IC_{50}	42,5	41,1	47,7

C_{well} [$\mu\text{g/mL}$]	I_1 [%]	I_2 [%]	I_3 [%]
172	92,3	91,3	92,4
86,0	85,8	79,1	81,2
43,0	56,3	57,7	55,0
21,5	41,1	43,0	42,2
10,7	32,4	28,1	33,1
5,37	25,1	25,3	27,6
2,69	31,7	31,0	25,5
IC_{50}	34,8	33,4	33,6

C_{well} [$\mu\text{g/mL}$]	I_1 [%]	I_2 [%]	I_3 [%]
160	92,4	95,4	90,8
79,8	90,3	93,4	91,2
39,9	67,9	63,8	56,0
20,0	46,9	45,3	42,1
10,0	40,0	36,1	36,2
4,99	32,5	29,1	29,4
2,49	26,2	28,9	25,5
IC_{50}	21,7	24,3	28,1

C_{well} [$\mu\text{g/mL}$]	I_1 [%]	I_2 [%]	I_3 [%]
176	97,4	95,8	93,4
88,1	84,9	77,0	83,5
44,0	56,4	53,7	48,1
22,0	38,9	38,9	41,2
11,0	33,3	25,3	30,0
5,51	24,4	25,2	26,6
2,75	25,1	20,0	16,1
IC_{50}	35,3	38,3	38,8

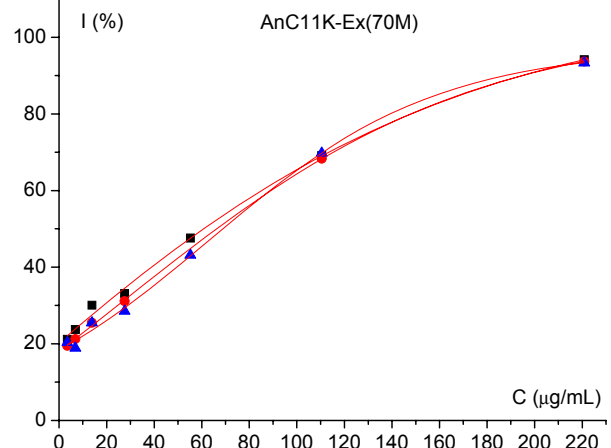
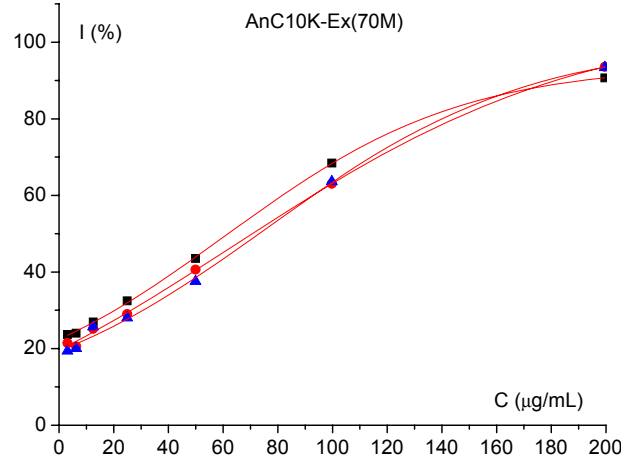
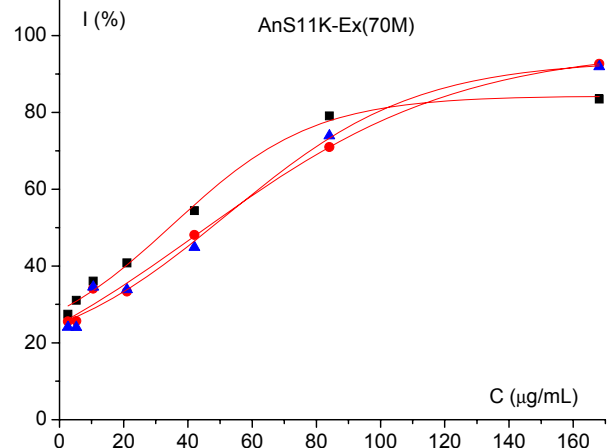
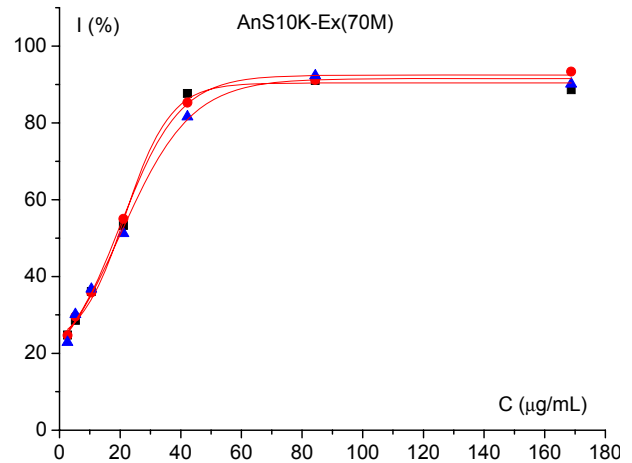


C_{well} [$\mu\text{g/mL}$]	I_1 [%]	I_2 [%]	I_3 [%]
169	88,6	93,3	90,1
84,4	91,1	91,2	92,3
42,2	87,6	85,3	81,6
21,1	53,3	55,0	51,2
10,5	36,1	35,8	36,7
5,27	28,6	29,6	30,2
2,64	24,8	24,7	22,9
IC_{50}	19,1	18,4	19,5

C_{well} [$\mu\text{g/mL}$]	I_1 [%]	I_2 [%]	I_3 [%]
168	83,5	92,6	91,9
84,1	79,1	70,9	73,9
42,0	54,4	48,1	44,9
21,0	40,8	33,3	33,9
10,5	36,1	34,1	34,6
5,25	31,1	25,7	24,1
2,63	27,5	25,6	24,1
IC_{50}	34,22	45,79	47,3

C_{well} [$\mu\text{g/mL}$]	I_1 [%]	I_2 [%]	I_3 [%]
200	90,7	93,6	93,4
100	68,5	63,0	63,6
49,9	43,5	40,6	37,5
24,9	32,4	29,0	28,1
12,5	26,9	25,1	25,7
6,24	24,0	20,6	20,0
3,12	23,7	21,4	19,4
IC_{50}	61,8	70,7	73,1

C_{well} [$\mu\text{g/mL}$]	I_1 [%]	I_2 [%]	I_3 [%]
221	94,1	93,7	93,3
110	69,1	68,3	69,8
55,2	47,6		43,1
27,6	33,1	31,1	28,5
13,8	30,0	25,5	25,5
6,90	23,7	21,3	18,9
3,45	21,1	19,5	20,3
IC_{50}	60,8	66,2	68,9

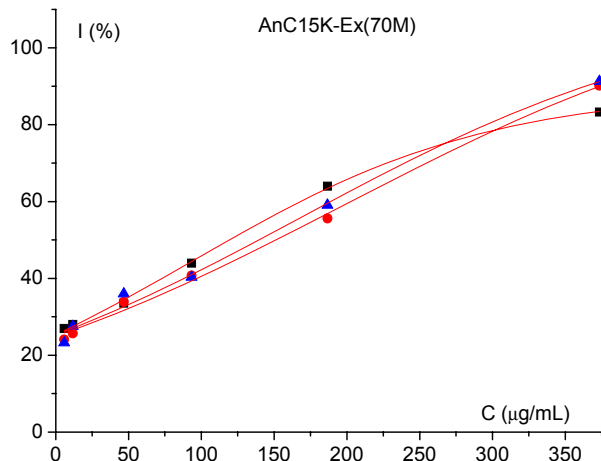
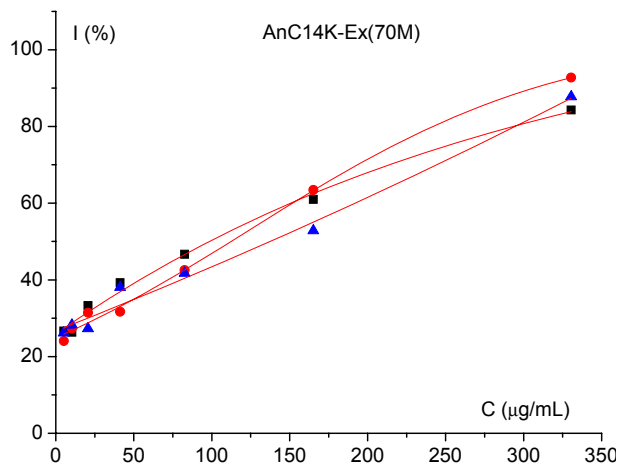
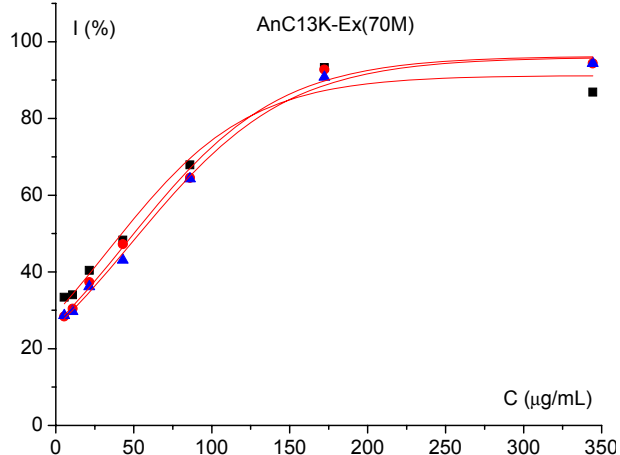
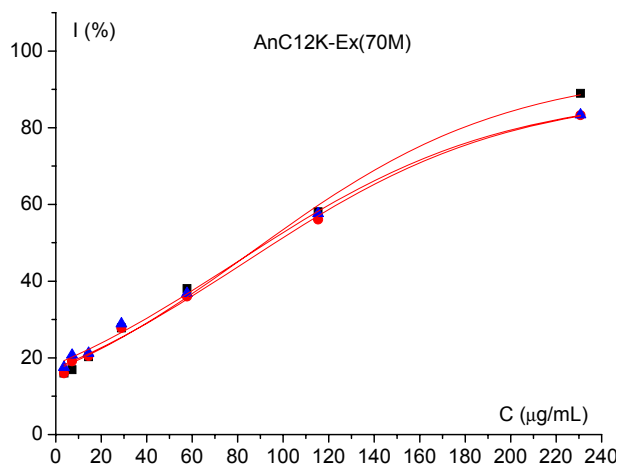


C_{well} [$\mu\text{g/mL}$]	I_1 [%]	I_2 [%]	I_3 [%]
231	89,0	83,3	83,4
115	58,1	56,1	57,6
57,7	38,0	36,0	36,8
28,8	27,8	27,8	28,9
14,4	20,3	20,5	21,2
7,21	16,9	19,1	20,7
3,61	16,0	16,0	17,6
IC_{50}	91,7	96,4	92,8

C_{well} [$\mu\text{g/mL}$]	I_1 [%]	I_2 [%]	I_3 [%]
344	86,9	94,4	94,4
172	93,3	92,7	90,8
86,1	67,9	64,5	64,3
43,1	48,3	47,3	43,1
21,5	40,4	37,4	36,2
10,8	34,0	30,5	29,7
5,38	33,4	28,4	28,7
IC_{50}	42,3	50,1	53,7

C_{well} [$\mu\text{g/mL}$]	I_1 [%]	I_2 [%]	I_3 [%]
330	84,3	92,7	87,8
165	61,0	63,4	52,8
82,6	46,7	42,5	41,8
41,3	39,3	31,7	38,1
20,7	33,3	31,4	27,3
10,3	26,4	27,3	28,2
5,16	26,7	24,0	26,2
IC_{50}	98,5	112	137

C_{well} [$\mu\text{g/mL}$]	I_1 [%]	I_2 [%]	I_3 [%]
373	83,3	90,2	91,3
187	64,0	55,6	59,1
93,4	44,0	40,8	40,3
46,7	33,5	33,9	36,0
11,7	28,0	25,7	27,6
5,84	27,0	24,1	23,2
IC_{50}	119	151	140

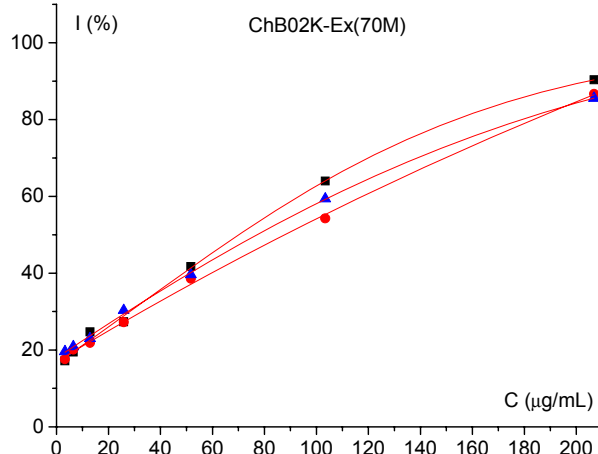
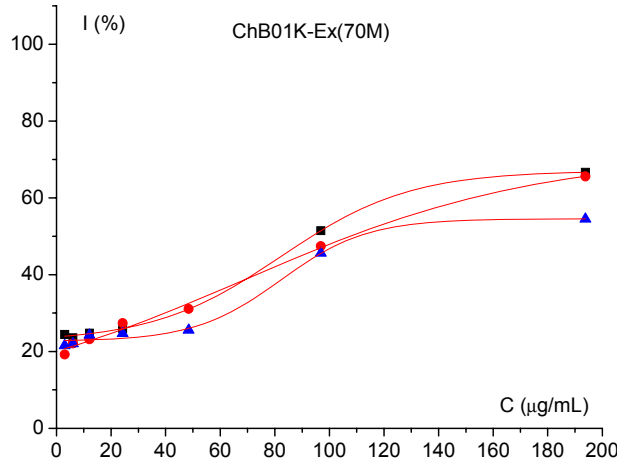
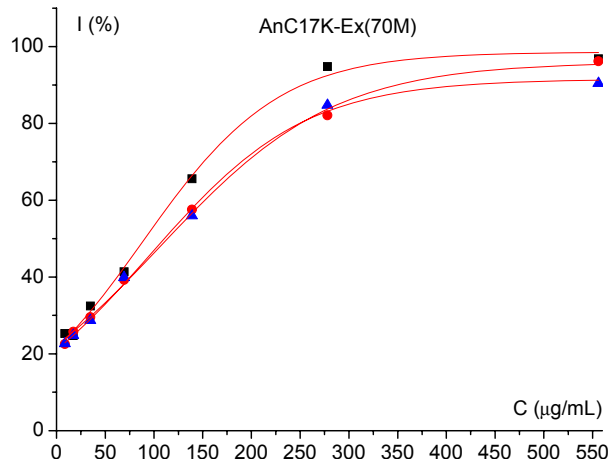
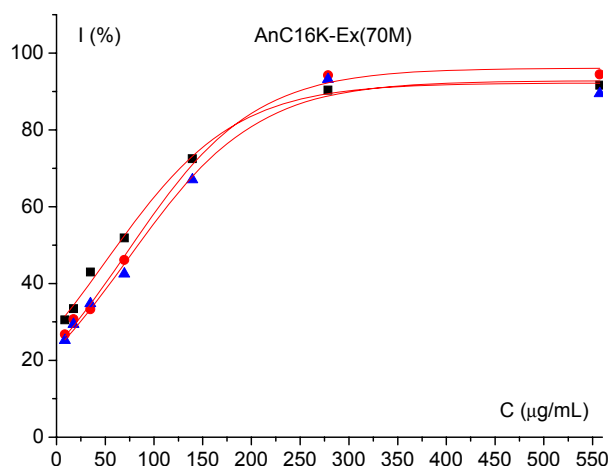


C_{well} [$\mu\text{g/mL}$]	I_1 [%]	I_2 [%]	I_3 [%]
557	91,6	94,4	89,5
279	90,3	94,2	93,1
139	72,5		67,1
69,7	51,9	46,1	42,5
34,8	43,0	33,3	34,8
17,4	33,5	30,7	29,4
8,71	30,5	26,8	25,2
IC_{50}	62,5	77,4	83,6

C_{well} [$\mu\text{g/mL}$]	I_1 [%]	I_2 [%]	I_3 [%]
556	96,8	96,2	90,4
278	94,8	82,1	84,7
139	65,6	57,6	56,0
69,5	41,4	39,3	39,9
34,8	32,4	29,5	28,7
17,4	24,8	25,8	24,9
8,69	25,3	22,6	22,7
IC_{50}	90,7	114	111

C_{well} [$\mu\text{g/mL}$]	I_1 [%]	I_2 [%]	I_3 [%]
194	66,7	65,6	54,5
96,9	51,5	47,4	45,6
48,5		31,1	25,6
24,2	26,0	27,4	24,7
12,1	24,8	23,2	24,3
6,06	23,6	22,1	22,0
3,03	24,4	19,2	21,6
IC_{50}	93,6	108	111

C_{well} [$\mu\text{g/mL}$]	I_1 [%]	I_2 [%]	I_3 [%]
207	90,3	86,7	85,6
103	64,0	54,2	59,4
51,7	41,7	38,6	39,7
25,9	27,4	27,2	30,4
12,9	24,7	21,8	23,0
6,46	19,5	20,1	20,9
3,23	17,2	17,6	19,6
IC_{50}	70,1	87,8	77,1

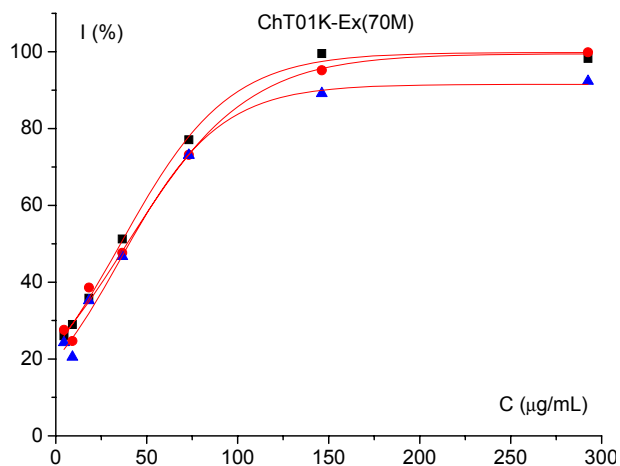
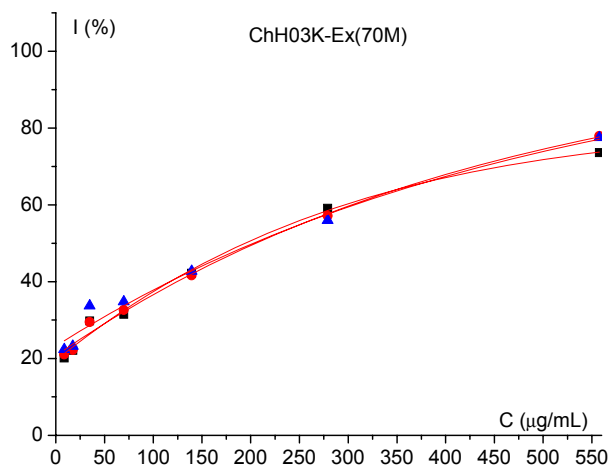
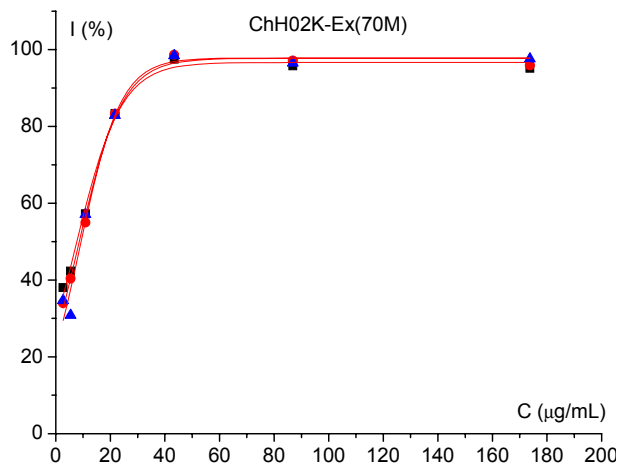
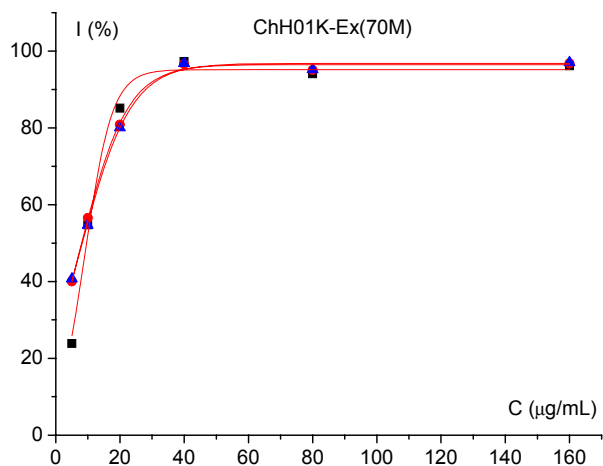


C_{well} [$\mu\text{g/mL}$]	I_1 [%]	I_2 [%]	I_3 [%]
160	96,2	96,8	97,0
80,0	94,0	95,1	95,1
40,0	97,3	96,6	96,8
20,0	85,2	80,8	80,0
10,0	54,7	56,6	54,7
5,00	23,8	40,1	40,7
IC_{50}	9,60	8,05	8,24

C_{well} [$\mu\text{g/mL}$]	I_1 [%]	I_2 [%]	I_3 [%]
174	95,1	95,9	97,6
86,9	95,7	97,1	96,5
43,4	97,5	98,6	98,4
21,7	83,4	83,3	82,9
10,9	57,2	55,0	57,1
5,43	42,3	40,4	30,8
2,71	38,0	34,0	34,7
IC_{50}	7,71	8,61	9,28

C_{well} [$\mu\text{g/mL}$]	I_1 [%]	I_2 [%]	I_3 [%]
558	73,6	77,9	77,6
279	59,1	57,1	56,0
139	42,2	41,7	42,8
69,7	31,5	32,6	34,8
34,9	29,8	29,5	33,7
17,4	22,2	22,3	23,2
8,72	20,1	21,0	22,4
IC_{50}	195	209	209

C_{well} [$\mu\text{g/mL}$]	I_1 [%]	I_2 [%]	I_3 [%]
293	98,3	99,8	92,4
146	99,5	95,2	89,1
73,1	77,1	73,1	73,0
36,6	51,2	47,6	46,7
18,3	35,8	38,6	35,2
9,14	29,0	24,7	20,5
4,57	26,1	27,6	24,3
IC_{50}	35,6	39,1	40,3

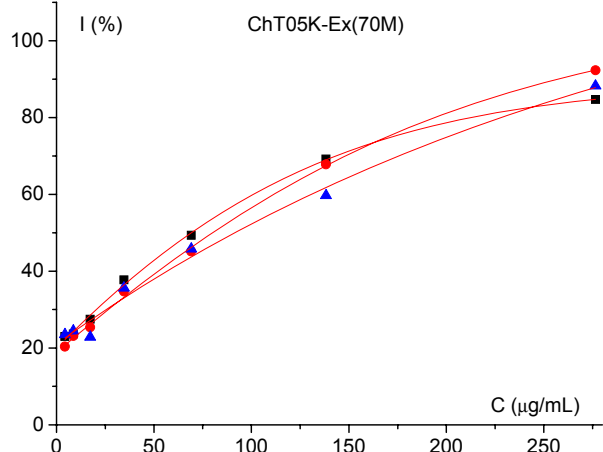
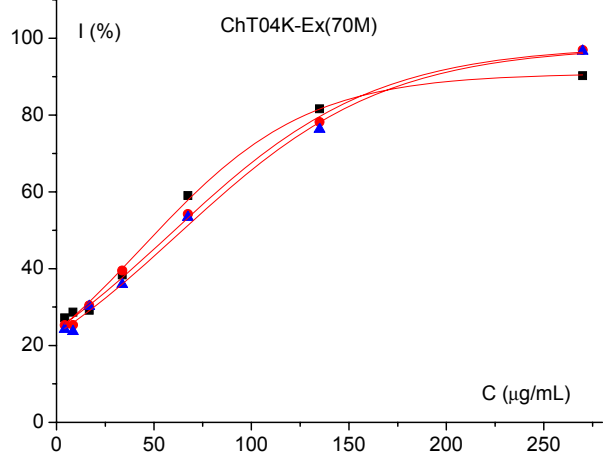
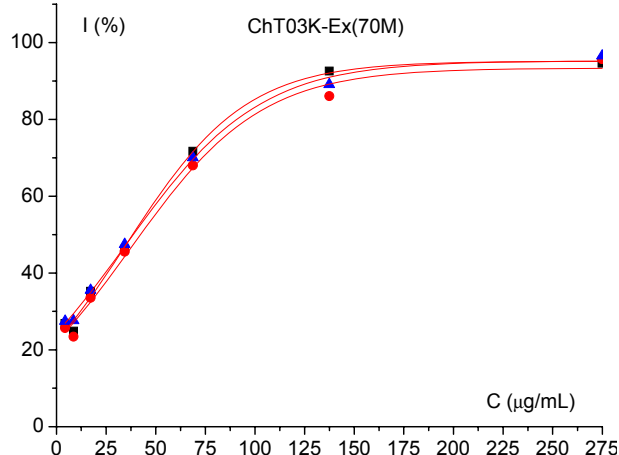
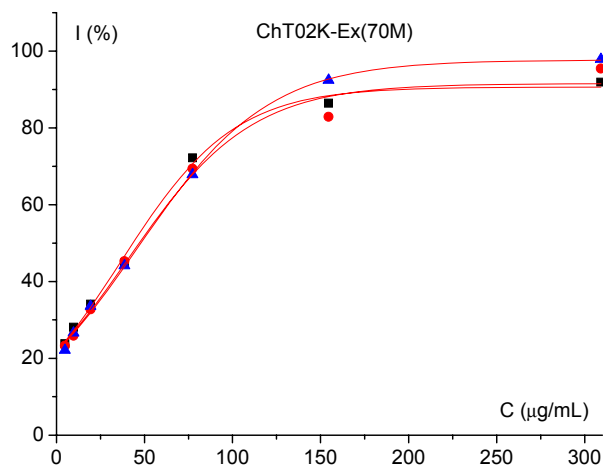


C_{well} [$\mu\text{g/mL}$]	I_1 [%]	I_2 [%]	I_3 [%]
309	91,9	95,5	97,9
155	86,4	82,9	92,4
77,3	72,2	69,4	67,9
38,6	44,8	45,3	44,2
19,3	34,1	32,8	33,6
9,66	28,1	25,9	26,6
4,83	23,8	23,3	22,1
IC_{50}	43,4	47,0	47,9

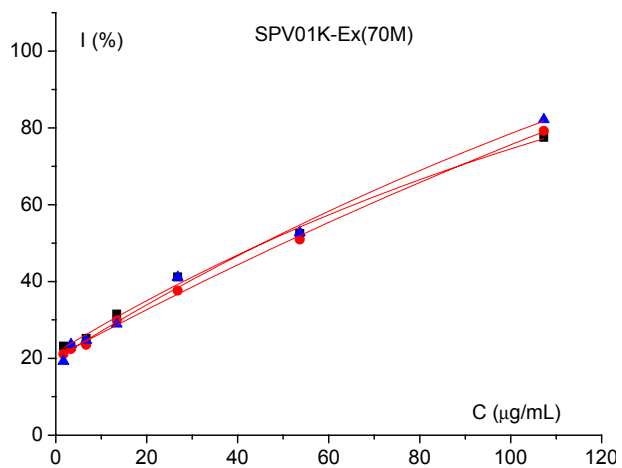
C_{well} [$\mu\text{g/mL}$]	I_1 [%]	I_2 [%]	I_3 [%]
275	94,7	95,7	96,5
137	92,6	86,0	89,1
68,7	71,7	68,0	70,1
34,4	46,2	45,6	47,5
17,2	35,2	33,6	35,5
8,59	24,9	23,5	27,6
4,30	26,9	25,7	27,5
IC_{50}	38,7	38,4	42,3

C_{well} [$\mu\text{g/mL}$]	I_1 [%]	I_2 [%]	I_3 [%]
270	90,2	96,9	96,7
135	81,6	78,2	76,3
67,5	59,1	54,2	53,4
33,7	38,4	39,5	35,9
16,9	29,2	30,5	30,2
8,43	28,7	25,3	23,7
4,22	27,2	25,3	24,3
IC_{50}	52,3	60,5	64,7

C_{well} [$\mu\text{g/mL}$]	I_1 [%]	I_2 [%]	I_3 [%]
277	84,7	92,3	88,3
138	69,2	67,8	59,7
69,1	49,3	45,2	45,8
34,6	37,7	34,7	35,7
17,3	27,5	25,4	22,8
8,64	23,7	23,1	24,5
4,32	23,0	20,4	23,5
IC_{50}	69,2	80,0	91,5



C_{well} [$\mu\text{g/mL}$]	I_1 [%]	I_2 [%]	I_3 [%]
107	77,6	79,2	82,2
53,7	52,5	50,9	52,7
26,8	41,2	37,7	41,1
13,4	31,6	29,9	29,0
6,71	25,2	23,5	24,8
3,35	23,0	22,4	23,6
1,68	23,2	21,1	19,3
IC_{50}	45,7	50,1	45,5



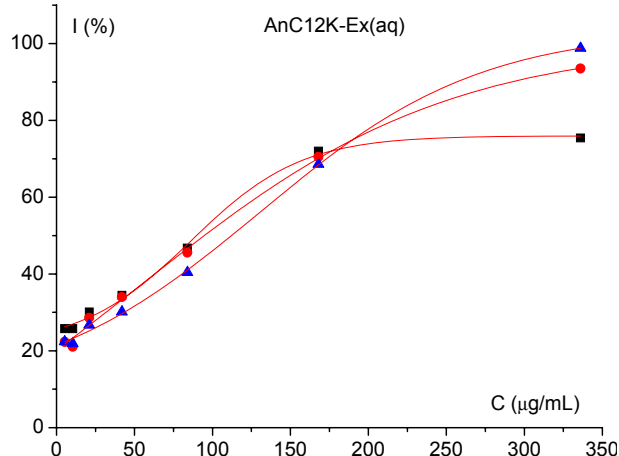
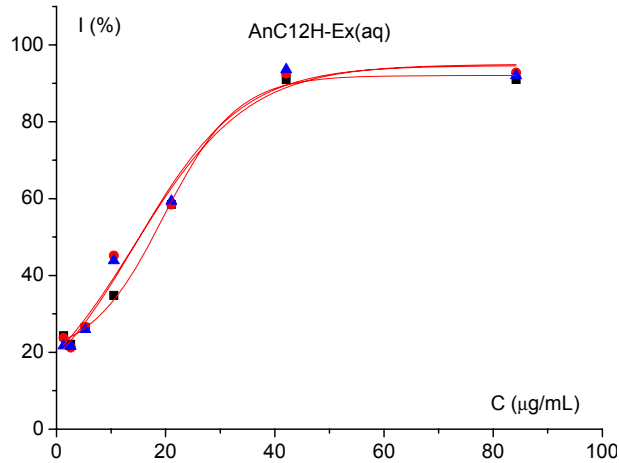
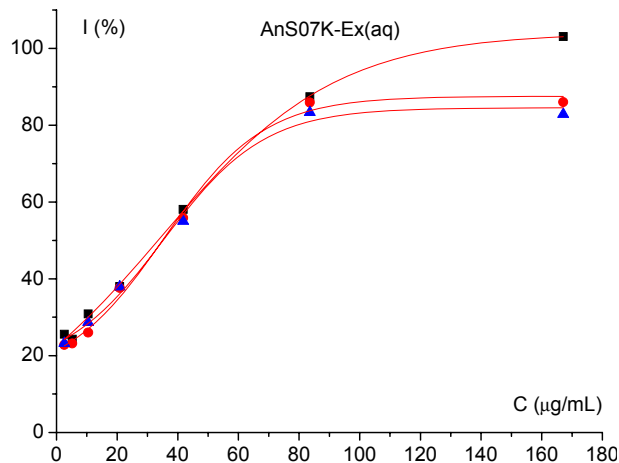
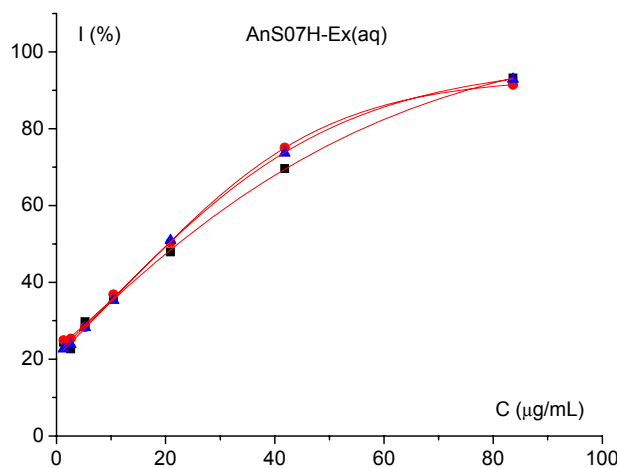
Vodeni ekstrakti

C_{well} [$\mu\text{g/mL}$]	I_1 [%]	I_2 [%]	I_3 [%]
83,6	93,2	91,4	92,9
41,8	69,6	75,1	73,7
20,9	47,9	50,4	50,9
10,5	36,1	36,8	35,3
5,23	29,7	28,3	28,3
2,61	22,7	25,4	23,8
1,31	24,4	24,9	22,7
IC_{50}	22,2	20,4	20,5

C_{well} [$\mu\text{g/mL}$]	I_1 [%]	I_2 [%]	I_3 [%]
167	103	86,0	82,8
83,6	87,4	85,9	83,3
41,8	58,1	55,8	55,0
20,9	38,0	37,7	37,9
10,4	30,9	26,0	28,7
5,22	24,3	23,2	
2,61	25,6	22,8	23,2
IC_{50}	33,5	35,0	35,2

C_{well} [$\mu\text{g/mL}$]	I_1 [%]	I_2 [%]	I_3 [%]
84,2	90,9	92,8	92,0
42,1	90,9	92,6	93,6
21,1	58,5	58,4	59,4
10,5	34,8	45,1	43,9
5,26	26,5	26,6	25,9
2,63	22,1	21,2	21,6
1,32	24,3	23,7	21,7
IC_{50}	15,2	17,7	15,2

C_{well} [$\mu\text{g/mL}$]	I_1 [%]	I_2 [%]	I_3 [%]
336	75,4	93,5	98,8
168	72,0	70,5	68,6
84,0	46,7	45,6	40,4
42,0	34,4	34,0	30,1
21,0	30,1	28,6	26,7
10,5	25,8	21,0	21,9
5,25	25,8	22,3	22,4
IC_{50}	89,8	94,7	112

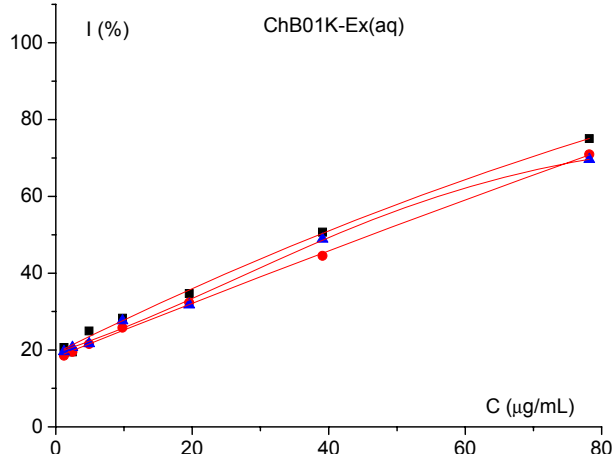
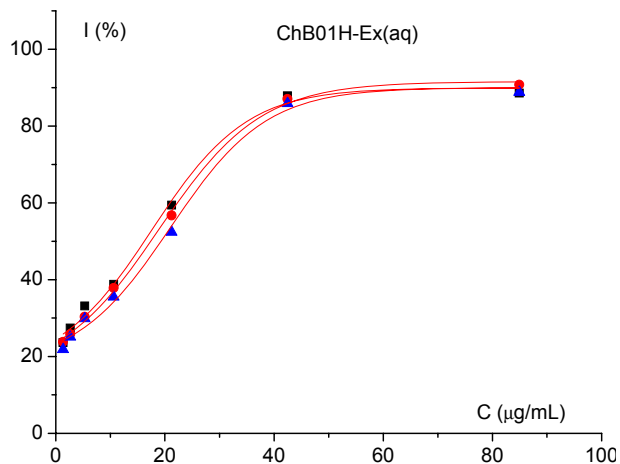
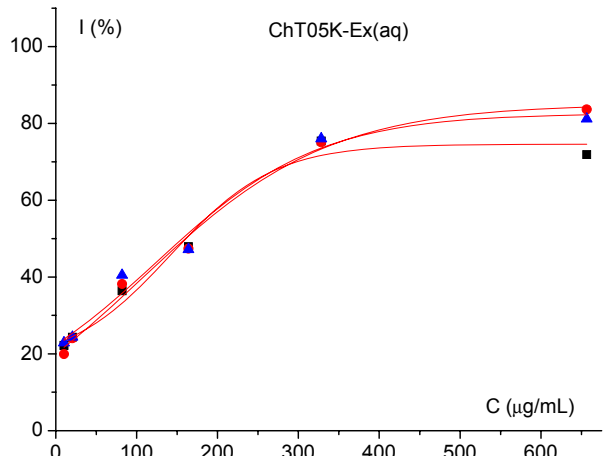
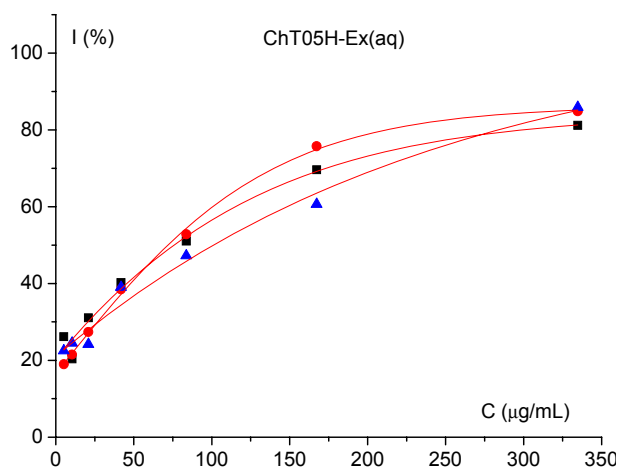


C_{well} [$\mu\text{g/mL}$]	I_1 [%]	I_2 [%]	I_3 [%]
335	81,2	84,8	85,9
167	69,6	75,7	60,7
83,7	51,1	52,8	47,2
41,8	40,2	38,5	39,0
20,9	31,1	27,4	24,2
10,5	20,4	21,5	24,5
5,23	26,1	19,0	22,5
IC_{50}	75,8	71,9	101

C_{well} [$\mu\text{g/mL}$]	I_1 [%]	I_2 [%]	I_3 [%]
657	71,9	83,6	81,2
328	75,4	75,1	76,0
164	47,9	47,4	47,2
82,1	36,4	38,2	40,5
20,5	24,4	24,1	24,4
10,3	22,2	19,9	22,9
IC_{50}	161	161	157

C_{well} [$\mu\text{g/mL}$]	I_1 [%]	I_2 [%]	I_3 [%]
84,9	88,6	90,7	88,8
42,5	87,9	87,0	85,9
21,2	59,4	56,8	52,4
10,6	38,8	37,9	35,5
5,31	33,2	30,4	29,9
2,65	27,4	25,8	25,1
1,33	23,6	23,8	21,9
IC_{50}	16,2	17,4	19,3

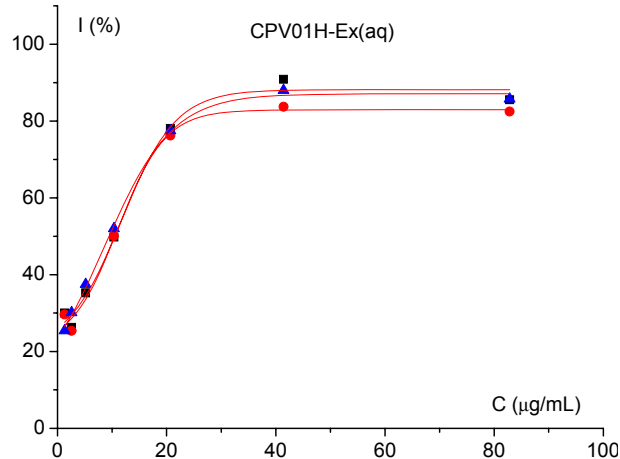
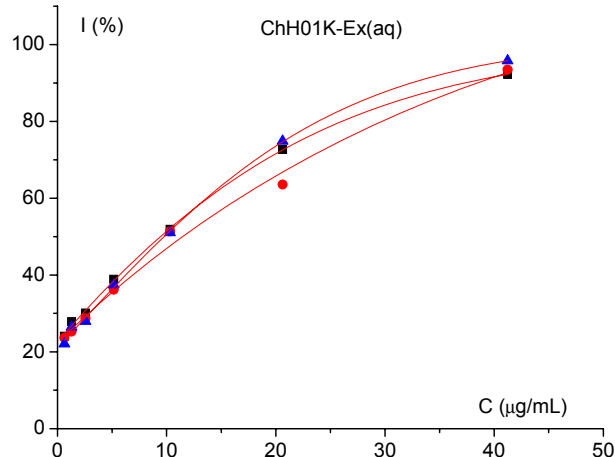
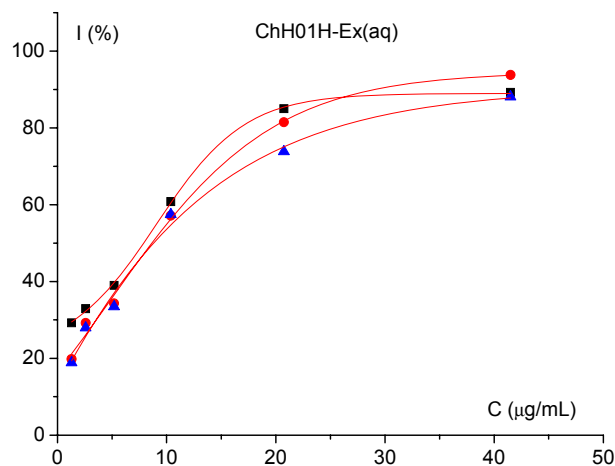
C_{well} [$\mu\text{g/mL}$]	I_1 [%]	I_2 [%]	I_3 [%]
78,2	75,0	70,9	69,6
39,1	50,7	44,5	48,9
19,6	34,7	32,4	31,8
9,78	28,3	25,8	27,6
4,89	25,0	21,6	21,7
2,44	19,5	19,5	20,7
1,22	20,6	18,5	19,6
IC_{50}	41,0	38,5	46,2



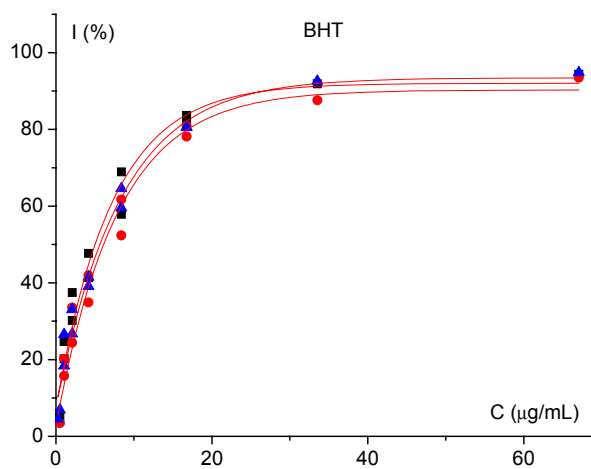
C_{well} [$\mu\text{g/mL}$]	I_1 [%]	I_2 [%]	I_3 [%]
41,5	89,2	93,8	88,1
20,8	85,0	81,5	73,8
10,4	60,8	57,1	57,5
5,19	39,0	34,3	33,4
2,59	32,9	29,2	28,0
1,30	29,3	19,8	18,9
IC_{50}	8,65	8,80	7,88

C_{well} [$\mu\text{g/mL}$]	I_1 [%]	I_2 [%]	I_3 [%]
41,2	92,2	93,4	95,8
20,6	72,7	63,5	74,9
10,3	51,9	51,3	51,0
5,15	38,9	36,2	37,5
2,58	30,1	28,7	27,9
1,29	27,9	25,3	26,5
0,644	24,0	23,7	22,1
IC_{50}	9,43	11,5	9,76

C_{well} [$\mu\text{g/mL}$]	I_1 [%]	I_2 [%]	I_3 [%]
82,8	85,5	82,5	85,7
41,4	90,9	83,7	88,0
20,7	78,1	76,2	77,5
10,4	49,8	50,1	52,0
5,18	35,3		37,5
2,59	26,3	25,4	30,1
1,29	30,0	29,6	25,5
IC_{50}	10,5	10,5	9,45



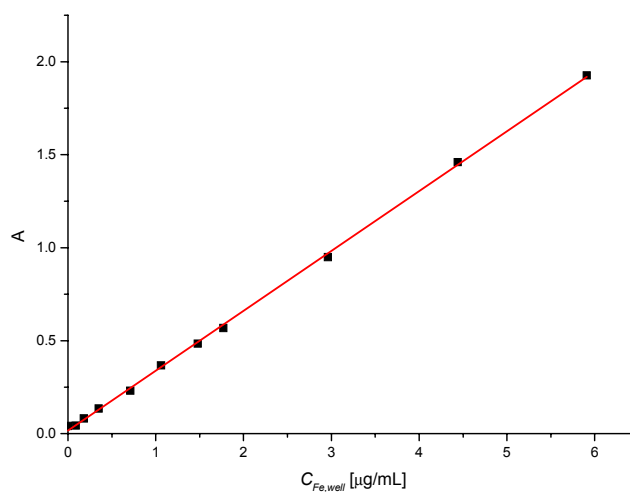
C_{well} [$\mu\text{g/mL}$]	I_1 [%]	I_2 [%]	I_3 [%]
67,1	94,4	93,5	94,8
33,5	91,9	87,6	92,6
16,8	81,3	78,1	80,5
16,8	83,6	80,9	80,5
8,38	57,8	52,4	59,6
8,38	68,9	61,7	64,6
4,19	41,4	34,9	39,1
4,19	47,7	41,9	41,5
2,10	30,2	24,4	26,7
2,10	37,5	33,5	33,1
1,05	20,2	15,8	18,4
1,05	24,7	20,2	26,6
0,524	5,20	3,43	6,93
0,262	5,91	-3,72	4,53
IC_{50}	5,50	6,12	5,64



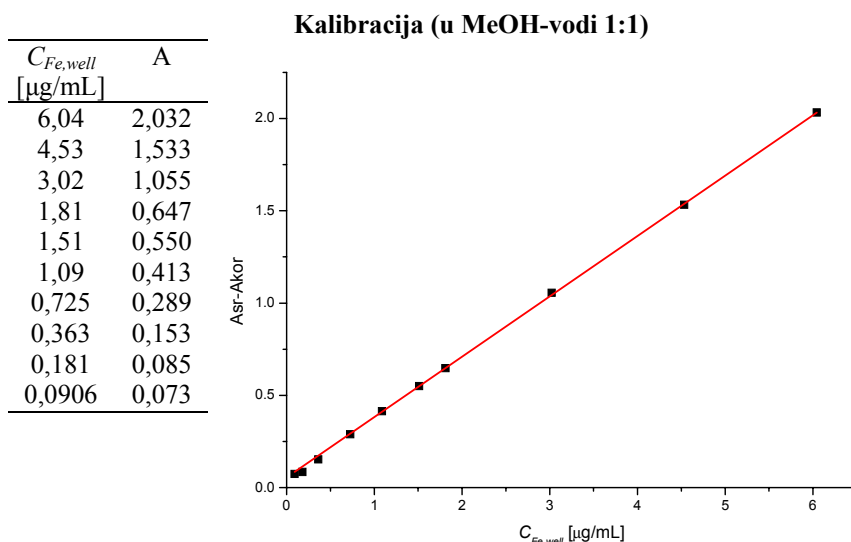
8.21. REZULTATI FRAP TESTA

Kalibracija (u vodi)

$C_{Fe,well}$ [$\mu\text{g/mL}$]	A
5,91	1,926
4,44	1,460
2,96	0,949
1,77	0,568
1,48	0,484
1,06	0,367
0,711	0,231
0,355	0,135
0,177	0,081
0,0888	0,043
0,000	0,041



	$C_{eks,well}$ [mg/mL]	A_1	A_2	A_3	A_{kor}	$C_{Fe,eks}$ [mg/g]
AnS07H-Ex(aq)	270		1,085	1,076	0,056	$11,7 \pm 0,1$
AnS07K-Ex(aq)	270		0,98	0,931	0,062	$10,4 \pm 0,4$
AnT12H-Ex(aq)	163		1,045	1,015	0,054	$18,6 \pm 0,4$
AnT12K-Ex(aq)	542		0,774	0,731	0,065	$3,97 \pm 0,18$
ChT05H-Ex(aq)	540	0,640		0,636	0,091	$3,06 \pm 0,02$
ChT05K-Ex(aq)	529	0,775		0,791	0,067	$4,06 \pm 0,06$
ChB01H-Ex(aq)	164	0,967	0,994	0,961	0,06	$17,1 \pm 0,3$
ChB01K-Ex(aq)	303	0,786		0,814	0,07	$7,18 \pm 0,20$
ChH01H-Ex(aq)	134	1,025		1,055	0,053	$22,2 \pm 0,5$
ChH01K-Ex(aq)	133		1,021	1,036	0,049	$22,3 \pm 0,3$
SPV01H-Ex(aq)	134	1,115	1,164	1,139	0,046	$25,0 \pm 0,6$



	$C_{eks,well}$ [mg/mL]	A_1	A_2	A_3	A_{kor}	$C_{Fe,eks}$ [mg/g]
AnS01H-Ex(70M)	148	0,466	0,472	0,543	0,038	7,76 ± 0,08
AnS03H-Ex(70M)	166	0,259	0,255	0,259	0,039	3,01 ± 0,05
AnS04H-Ex(70M)	169	0,403	0,350	0,343	0,042	4,52 ± 0,08
AnS05H-Ex(70M)	32,3	0,309	0,305	0,303	0,043	19,7 ± 0,3
AnS06H-Ex(70M)	165	0,387	0,361	0,356	0,042	5,01 ± 0,30
AnS07H-Ex(70M)	160	0,556	0,521	0,536	0,044	8,40 ± 0,34
AnS08H-Ex(70M)	156	0,565	0,555	0,568	0,039	9,17 ± 0,13
AnS10H-Ex(70M)	36,1	0,351	0,353	0,348	0,047	21,1 ± 0,2
AnS11H-Ex(70M)	31,3	0,314	0,293	0,290	0,041	19,8 ± 1,3
AnT10H-Ex(70M)	31,0	0,338	0,322	0,328	0,043	22,8 ± 0,8
AnT11H-Ex(70M)	160	0,801	0,784	0,770	0,039	13,2 ± 0,3
AnT12H-Ex(70M)	157	0,766	1,068	1,062	0,043	18,8 ± 0,1
AnT13H-Ex(70M)	35,6	0,343	0,339	0,347	0,046	20,8 ± 0,3
AnT14H-Ex(70M)	34,1	0,284	0,275	0,285	0,042	16,6 ± 0,5
AnT15H-Ex(70M)	34,6	0,308	0,299	0,302	0,042	18,3 ± 0,4
AnT16H-Ex(70M)	37,2	0,391	0,360	0,361	0,041	22,6 ± 1,4
AnT17H-Ex(70M)	156	0,450	0,439	0,459	0,041	6,93 ± 0,19
ChB01H-Ex(70M)	30,4	0,361	0,380	0,365	0,040	27,5 ± 1,0
ChB02H-Ex(70M)	36,5	0,359	0,352	0,347	0,042	21,5 ± 0,5
ChH01H-Ex(70M)	33,8	0,331	0,336	0,331	0,043	21,3 ± 0,2
ChH02H-Ex(70M)	29,5	0,395	0,417	0,420	0,045	32,3 ± 1,4
ChT01H-Ex(70M)	170	0,518	0,504	0,547	0,041	7,70 ± 0,40
ChT02H-Ex(70M)	35,8	0,352	0,359	0,368	0,042	22,5 ± 0,6
ChT03H-Ex(70M)	159	0,799	0,815	0,833	0,040	13,9 ± 0,3
ChT04H-Ex(70M)	157	0,666	0,603	0,692	0,040	10,9 ± 0,9
ChT05H-Ex(70M)	161	0,663	0,650	0,657	0,042	10,7 ± 0,1
SPV01H-Ex(70M)	162	1,345	1,277	1,230	0,044	22,4 ± 1,1

	$C_{eks,well}$ [mg/mL]	A_1	A_2	A_3	A_{kor}	$C_{Fe,eks}$ [mg/g]
AnS01K-Ex(70M)	268	0,677	0,660	0,658	0,075	6,10 ± 0,11
AnS03K-Ex(70M)	280	0,716	0,722	0,705	0,050	6,66 ± 0,10
AnS04K-Ex(70M)	289	1,445	1,474	1,448	0,209	12,6 ± 0,2
AnS05K-Ex(70M)	273		0,594	0,592	0,048	5,50 ± 0,01
AnS06K-Ex(70M)	277	0,731	0,743	0,750	0,077	6,71 ± 0,11
AnS07K-Ex(70M)	277	1,070	1,103	1,096	0,091	10,4 ± 0,2
AnS08K-Ex(70M)	257	0,972	1,014	0,980	0,089	10,0 ± 0,3
AnS09K-Ex(70M)	284	0,959	0,980	0,985	0,082	9,01 ± 0,15
AnS10K-Ex(70M)	272	1,351	1,348		0,067	13,8 ± 0,0
AnS11K-Ex(70M)	271	0,540	0,568	0,555	0,049	5,08 ± 0,16
AnT10K-Ex(70M)	241		0,427	0,427	0,051	4,07 ± 0,00
AnT11K-Ex(70M)	267	0,543	0,525	0,554	0,049	5,00 ± 0,16
AnT12K-Ex(70M)	279	0,454	0,434	0,448	0,049	3,74 ± 0,11
AnT13K-Ex(70M)	278	0,556		0,551	0,045	5,00 ± 0,04
AnT14K-Ex(70M)	267	0,325	0,318	0,319	0,047	2,51 ± 0,04
AnT15K-Ex(70M)	301	0,296	0,288	0,292	0,046	1,95 ± 0,04
AnT16K-Ex(70M)	270	0,473	0,467	0,472	0,051	4,15 ± 0,04
AnT17K-Ex(70M)	269	0,434	0,424	0,427	0,048	3,70 ± 0,06
ChB01K-Ex(70M)	313	0,701	0,691	0,695	0,058	5,70 ± 0,05
ChB02K-Ex(70M)	267	0,664	0,679	0,676	0,050	6,51 ± 0,09
ChH01K-Ex(70M)	258	1,857	1,952		0,048	21,3 ± 0,8
ChH02K-Ex(70M)	84,0	0,879	0,884		0,044	28,5 ± 0,1
ChH03H-Ex(70M)	269	1,898	2,053	1,960	0,063	21,1 ± 0,9
ChH03K-Ex(70M)	270	0,470	0,465	0,483	0,054	4,11 ± 0,11
ChT01K-Ex(70M)	261	0,700	0,719		0,046	7,12 ± 0,16
ChT02K-Ex(70M)	217	0,771	0,755		0,060	9,11 ± 0,16
ChT03K-Ex(70M)	264	0,783	0,797		0,053	7,90 ± 0,12
ChT04K-Ex(70M)	267	0,722	0,744	0,729	0,055	7,12 ± 0,13
ChT05K-Ex(70M)	272	0,622	0,623	0,624	0,065	5,65 ± 0,01
SPV01K-Ex(70M)	260	0,680	0,674	0,690	0,055	6,73 ± 0,10

8.22. ANTIINFLAMATORNA AKTIVNOST – KRIVE DOZA-ODGOVOR

AnS08H-Ex(70M)

<i>C_{radna}</i> [$\mu\text{g/mL}$]	COX-1		12-LOX	
	<i>I</i> ₁ [%]	<i>I</i> ₂ [%]	<i>I</i> ₁ [%]	<i>I</i> ₂ [%]
3,39	100	100	63,2	59,2
2,42	89,3	89,1	49,7	51,6
1,45	78,6	76,5	52,4	51,7
0,726	62,6	59,0	55,4	54,0
0,363	44,9	44,4	41,3	39,3
0,121	15,7	24,8	23,7	35,1
<i>IC</i> ₅₀	0,487		0,768*	

* visoka nesigurnost

AnS08K-Ex(70M)

<i>C_{radna}</i> [$\mu\text{g/mL}$]	COX-1		12-LOX	
	<i>I</i> ₁ [%]	<i>I</i> ₂ [%]	<i>I</i> ₁ [%]	<i>I</i> ₂ [%]
1,68	100	100	82,8	83,8
0,958	100	84,5	66,1	58,3
0,479	59,6	63,3	31,5	23,4
0,359	51,0	41,6	19,1	
0,239		34,6	17,9	12,1
0,0958	17,5	44,9	14,4	4,03
<i>IC</i> ₅₀	0,390		0,784	

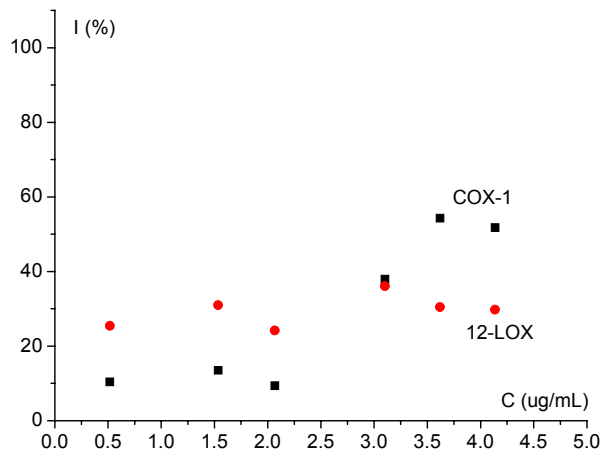
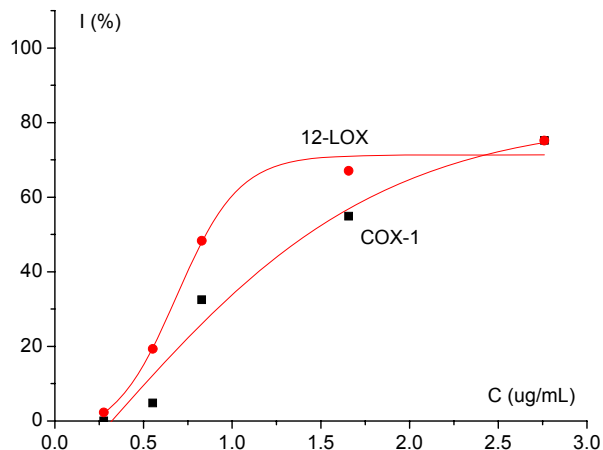
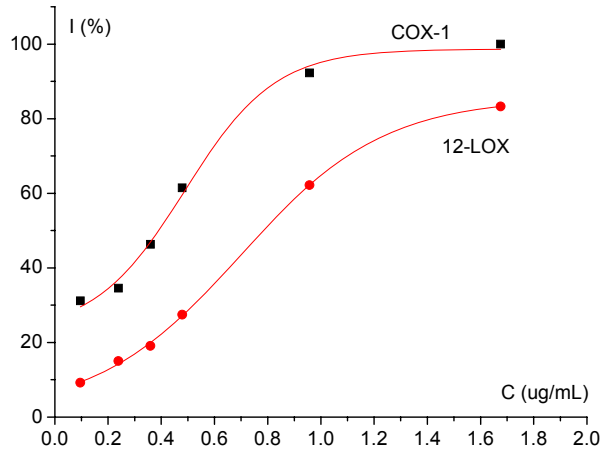
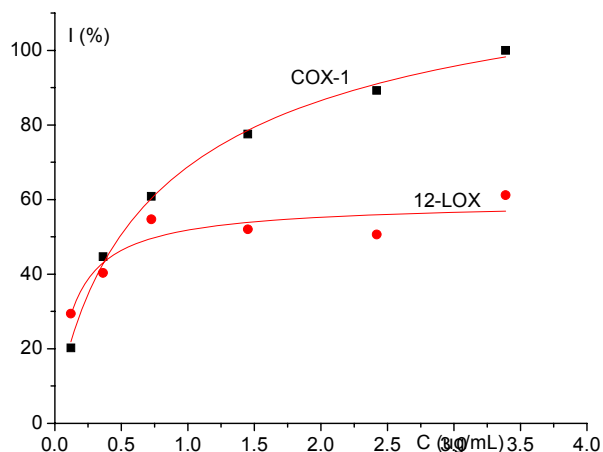
AnC13H-Ex(70M)

<i>C_{radna}</i> [$\mu\text{g/mL}$]	COX-1		12-LOX	
	<i>I</i> ₁ [%]	<i>I</i> ₂ [%]	<i>I</i> ₁ [%]	<i>I</i> ₂ [%]
2,76	75,5	75,0	75,2	75,0
1,66	51,5	58,3	63,5	70,5
0,828	45,9	19,1	58,1	38,5
0,552	9,61	0,00	24,8	13,8
0,276	0,00	0,00	4,59	0,00
<i>IC</i> ₅₀	1,42		0,851*	

* visoka nesigurnost

AnC13K-Ex(70M)

<i>C_{radna}</i> [$\mu\text{g/mL}$]	COX-1		12-LOX	
	<i>I</i> ₁ [%]	<i>I</i> ₂ [%]	<i>I</i> ₁ [%]	<i>I</i> ₂ [%]
4,14	55,5	48,0	26,7	32,9
3,62	58,1	50,5	27,2	33,7
3,10	43,3	32,6	39,9	32,2
2,07	11,6	7,15	36,2	12,2
1,53	13,3	13,7	33,8	28,2
0,517	9,22	11,6	24,3	26,6
<i>IC</i> ₅₀	-		-	



ChB01H-Ex(70M)

C_{radna} [$\mu\text{g/mL}$]	COX-1		12-LOX	
	I_1 [%]	I_2 [%]	I_1 [%]	I_2 [%]
3,77	100	100	75,3	76,3
2,83	100	97,3	81,5	80,1
1,88	81,2	83,6	70,6	76,6
0,94	54,2	51,4	62,2	61,9
0,71	51,0	43,9	59,8	59,9
0,24	-6,54	-6,33	28,7	23,1
IC_{50}	0,837		0,555	

ChB01K-Ex(70M)

C_{radna} [$\mu\text{g/mL}$]	COX-1		12-LOX	
	I_1 [%]	I_2 [%]	I_1 [%]	I_2 [%]
4,65	93,1	92,2	35,3	37,5
4,07	91,8	81,5	30,4	43,2
3,49	83,3	64,8	20,4	29,5
2,32	62,0	61,4	16,0	6,26
1,16	38,4	36,6	8,00	7,01
0,58	19,7	27,3	7,96	2,93
IC_{50}	1,79		-	

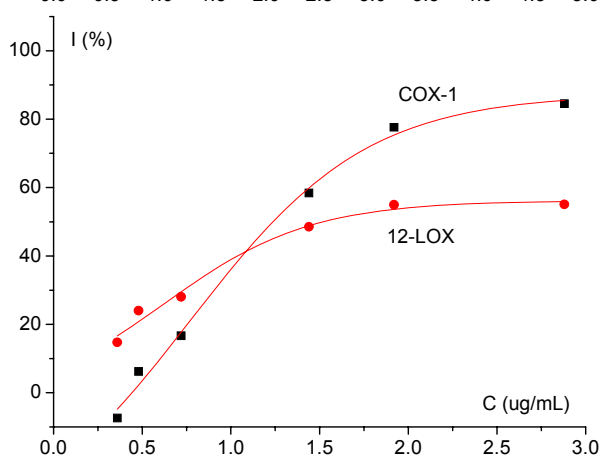
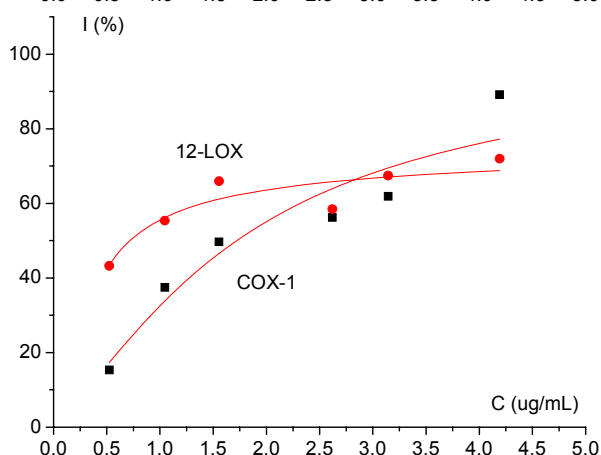
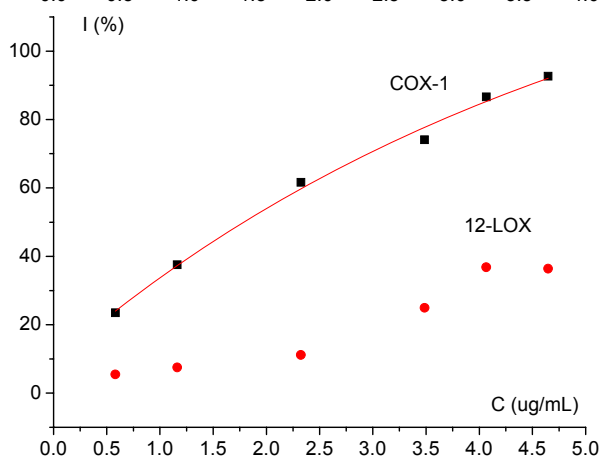
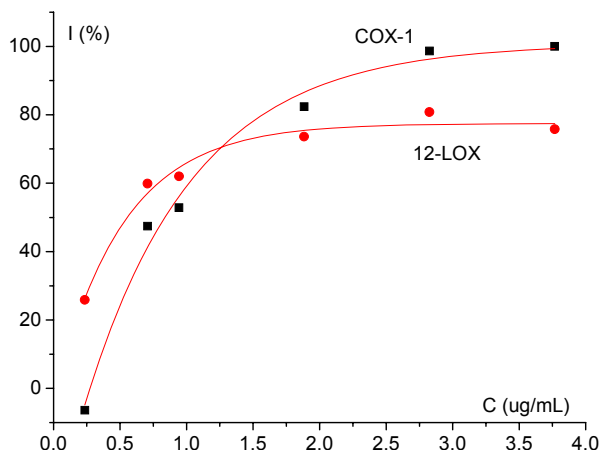
ChH01H-Ex(70M)

C_{radna} [$\mu\text{g/mL}$]	COX-1		12-LOX	
	I_1 [%]	I_2 [%]	I_1 [%]	I_2 [%]
4,19	88,2	90,1	72,1	71,9
3,14	74,7	49,1	67,4	
2,62	55,2	57,2	58,3	58,7
1,55	45,6	53,7	62,9	69,1
1,05	38,0	37,0	57,7	53,0
0,524	21,4	9,25	50,3	36,2
IC_{50}	1,72*		0,716*	

* visoka nesigurnost

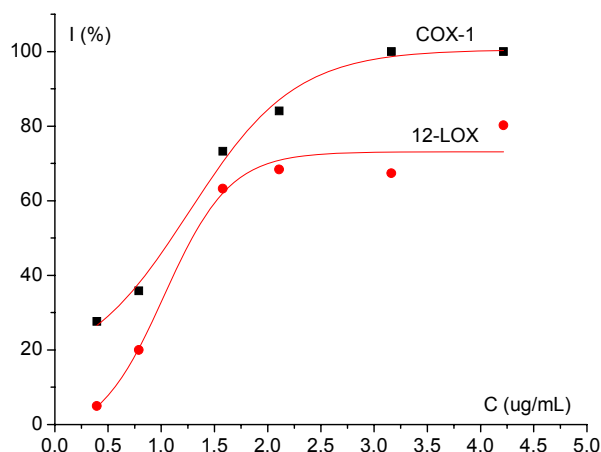
ChH01K-Ex(70M)

C_{radna} [$\mu\text{g/mL}$]	COX-1		12-LOX	
	I_1 [%]	I_2 [%]	I_1 [%]	I_2 [%]
2,88	88,9	80,2	57,6	52,5
1,92	78,3	76,9	61,5	48,5
1,44	55,2	61,7	50,0	47,1
0,720	15,5	17,8	31,4	24,6
0,480	6,83	5,56	24,9	23,1
0,360	0,271	-15,1	13,9	15,6
IC_{50}	1,24		1,52	

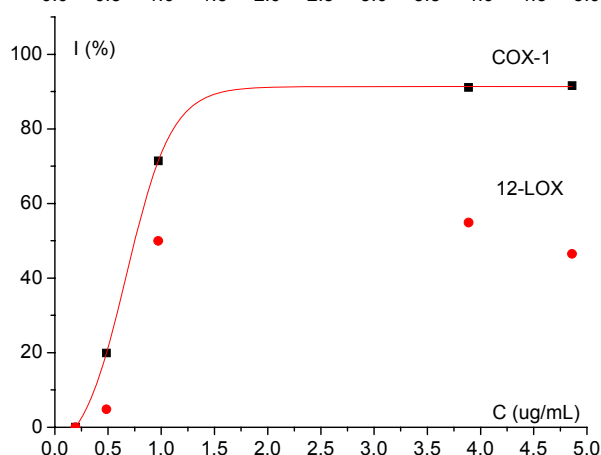


ChT01H-Ex(70M)

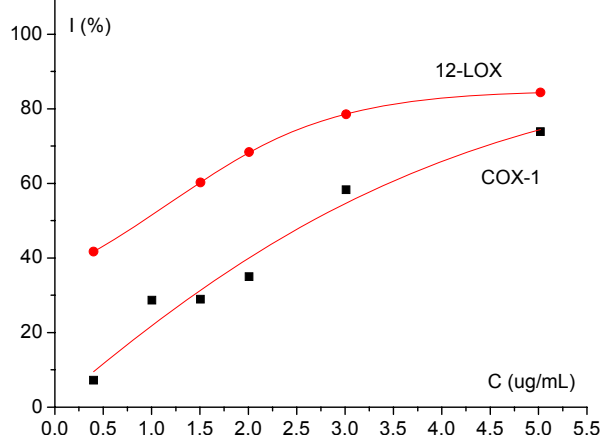
<i>C_{radna}</i> [$\mu\text{g/mL}$]	COX-1		12-LOX	
	<i>I</i> ₁ [%]	<i>I</i> ₂ [%]	<i>I</i> ₁ [%]	<i>I</i> ₂ [%]
4,22	100	100	80,6	79,9
3,16	100	100	70,0	64,8
2,11	84,3	83,8	65,7	71,1
1,58	77,0	69,5	68,6	57,8
0,790	53,9	17,7	39,3	0,717
0,395	29,7	25,6	7,32	2,62
<i>IC</i> ₅₀	1,10		1,29	

**ChT01K-Ex(70M)**

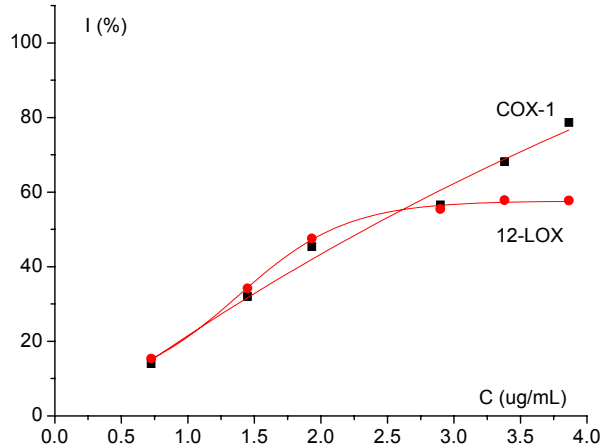
<i>C_{radna}</i> [$\mu\text{g/mL}$]	COX-1		12-LOX	
	<i>I</i> ₁ [%]	<i>I</i> ₂ [%]	<i>I</i> ₁ [%]	<i>I</i> ₂ [%]
4,86	90,1	93,0	48,3	44,6
3,89	90,9	91,3	63,0	46,7
2,43		142		97,2
0,972	100	42,8	93,5	6,44
0,486	20,2	19,6	9,15	0,448
0,194	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>IC</i> ₅₀	0,752		-	

**SPV01H-Ex(70M)**

<i>C_{radna}</i> [$\mu\text{g/mL}$]	COX-1		12-LOX	
	<i>I</i> ₁ [%]	<i>I</i> ₂ [%]	<i>I</i> ₁ [%]	<i>I</i> ₂ [%]
5,02	72,4	75,4	84,0	84,8
3,01	64,9	51,6	80,3	76,8
2,01	29,2	40,7	64,7	72,1
1,51	27,8	30,0	58,5	62,0
1,00	22,5	34,8	59,7	78,5
0,402	3,74	10,7	37,6	45,8
<i>IC</i> ₅₀	2,66		0,918	

**SPV01K-Ex(70M)**

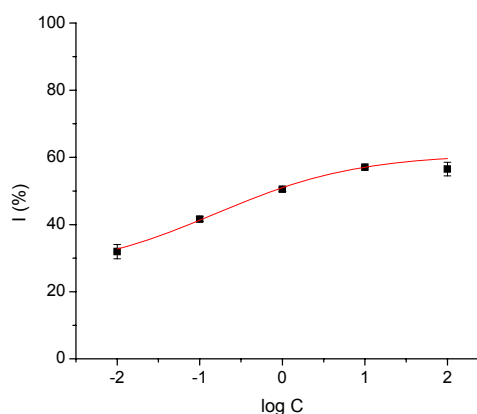
<i>C_{radna}</i> [$\mu\text{g/mL}$]	COX-1		12-LOX	
	<i>I</i> ₁ [%]	<i>I</i> ₂ [%]	<i>I</i> ₁ [%]	<i>I</i> ₂ [%]
3,86	81,8	75,5	59,2	56,2
3,38	70,7	65,6	59,0	56,7
2,90	57,2	55,9	51,5	59,5
1,93	48,5	42,2	54,8	40,3
1,45	33,0	30,9	33,2	35,2
0,724	0,227	27,8	8,53	22,2
<i>IC</i> ₅₀	2,33		2,08	



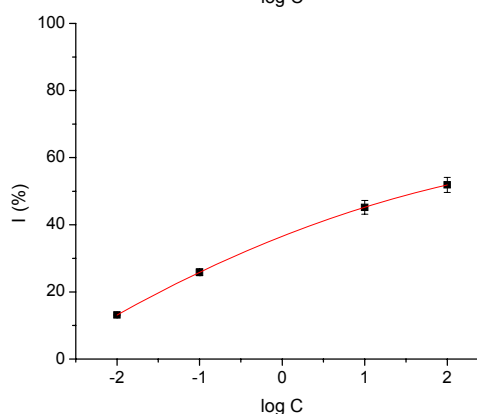
8.23. CITOTOKSIČNOST – KRIVE DOZA-ODGOVOR

Ćelijska linija: MRC-5

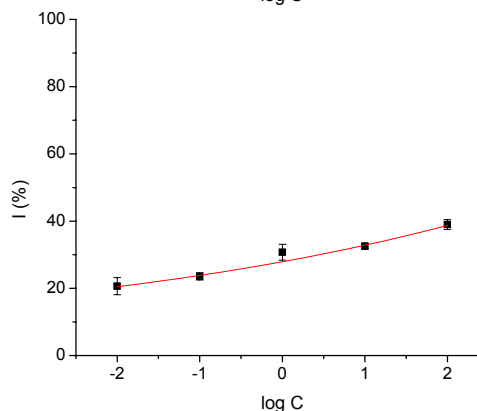
AnS09K-Ex(70M)	
C [$\mu\text{g/mL}$]	I [%]
100	56,5 \pm 2,0
10	57,1 \pm 0,1
1	50,5 \pm 0,6
0,1	41,6 \pm 0,8
0,01	31,9 \pm 2,1
IC₅₀	0,771



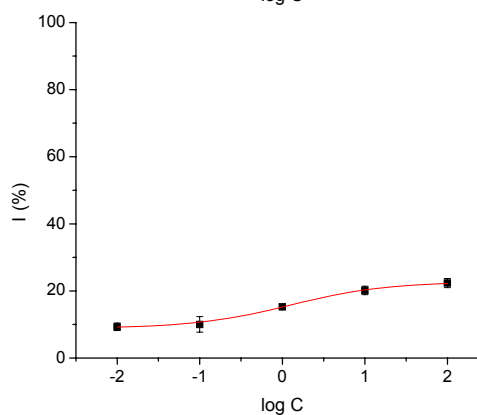
AnS08H-Ex(70M)	
C [$\mu\text{g/mL}$]	I [%]
100	51,9 \pm 2,2
10	45,2 \pm 2,0
1	29,5 \pm 0,6
0,1	25,8 \pm 1,0
0,01	13,1 \pm 0,2
IC₅₀	49,0



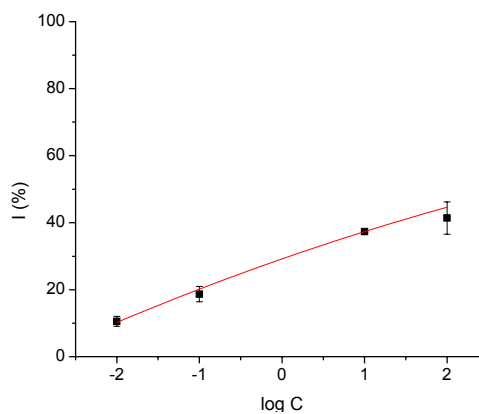
AnC13K-Ex(70M)	
C [$\mu\text{g/mL}$]	I [%]
100	39,0 \pm 1,5
10	32,6 \pm 0,8
1	30,7 \pm 2,4
0,1	23,6 \pm 1,1
0,01	20,7 \pm 2,6
IC₅₀	> 100



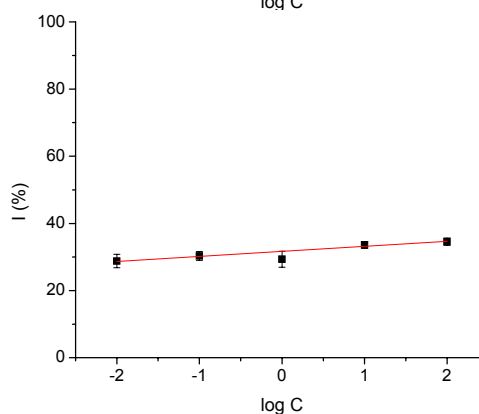
AnC13H-Ex(70M)	
C [$\mu\text{g/mL}$]	I [%]
100	22,3 \pm 1,4
10	20,1 \pm 1,3
1	15,2 \pm 0,6
0,1	10,0 \pm 2,3
0,01	9,3 \pm 1,1
IC₅₀	> 100



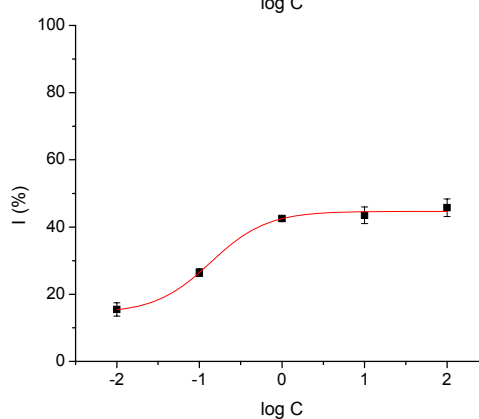
ChB01K-Ex(70M)	
C [$\mu\text{g/mL}$]	I [%]
100	41,4 \pm 4,8
10	37,4 \pm 0,2
1	18,2 \pm 0,7
0,1	18,7 \pm 2,3
0,01	10,6 \pm 1,5
IC₅₀	> 100



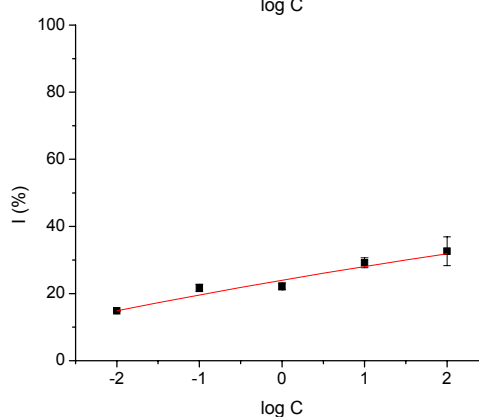
ChB01H-Ex(70M)	
C [$\mu\text{g/mL}$]	I [%]
100	34,6 \pm 1,1
10	33,6 \pm 1,0
1	29,3 \pm 2,4
0,1	30,3 \pm 1,3
0,01	28,8 \pm 2,0
IC₅₀	> 100



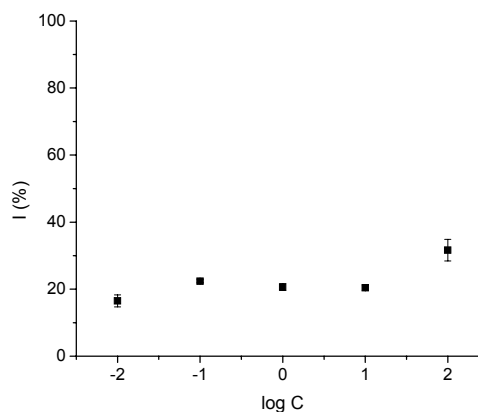
ChH01K-Ex(70M)	
C [$\mu\text{g/mL}$]	I [%]
100	45,8 \pm 2,6
10	43,5 \pm 2,5
1	42,5 \pm 0,7
0,1	26,4 \pm 1,2
0,01	15,4 \pm 2,0
IC₅₀	> 100



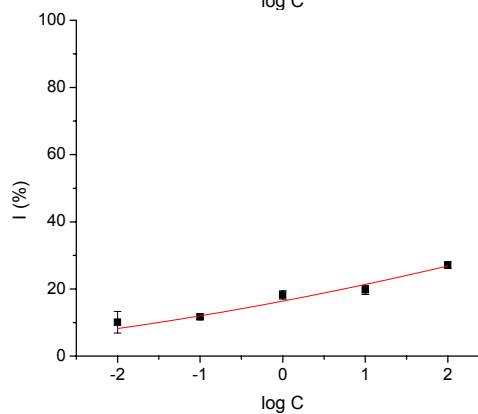
ChH01H-Ex(70M)	
C [$\mu\text{g/mL}$]	I [%]
100	32,6 \pm 4,3
10	29,2 \pm 1,5
1	22,1 \pm 1,0
0,1	21,7 \pm 1,1
0,01	14,8 \pm 0,1
IC₅₀	> 100



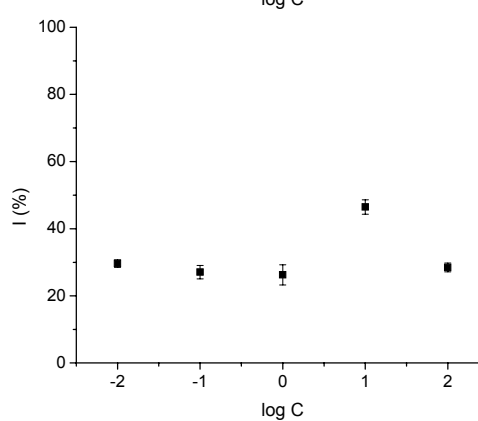
ChT03K-Ex(70M)	
C [$\mu\text{g/mL}$]	I [%]
100	31,6 \pm 3,2
10	20,4 \pm 0,8
1	20,6 \pm 1,0
0,1	22,4 \pm 0,5
0,01	16,5 \pm 1,8
IC₅₀	> 100



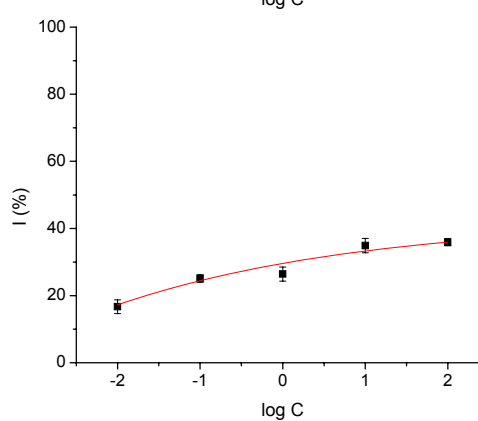
ChT01H-Ex(70M)	
C [$\mu\text{g/mL}$]	I [%]
100	27,1 \pm 1,0
10	19,7 \pm 1,4
1	18,2 \pm 1,2
0,1	11,7 \pm 0,7
0,01	10,1 \pm 3,2
IC₅₀	> 100



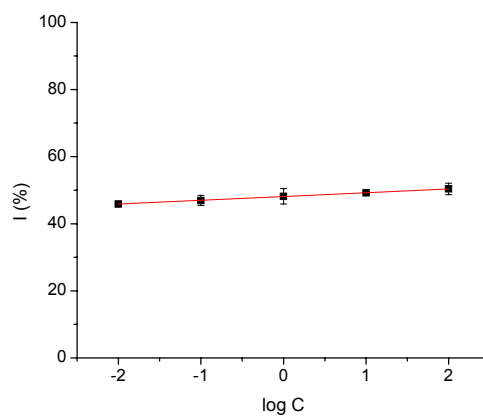
SPV01K-Ex(70M)	
C [$\mu\text{g/mL}$]	I [%]
100	28,5 \pm 1,3
10	46,5 \pm 2,1
1	26,3 \pm 3,0
0,1	27,1 \pm 2,0
0,01	29,6 \pm 1,1
IC₅₀	> 100



SPV01H-Ex(70M)	
C [$\mu\text{g/mL}$]	I [%]
100	35,9 \pm 1,1
10	34,9 \pm 2,1
1	26,4 \pm 2,1
0,1	25,1 \pm 1,1
0,01	16,7 \pm 2,1
IC₅₀	> 100

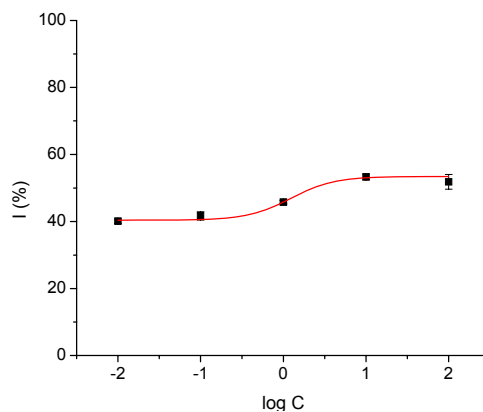


C [$\mu\text{g/mL}$]	PT I [%]
100	50,4 \pm 1,7
10	49,2 \pm 0,2
1	48,2 \pm 2,3
0,1	46,9 \pm 1,5
0,01	45,9 \pm 0,4
IC_{50}	(~47,9)

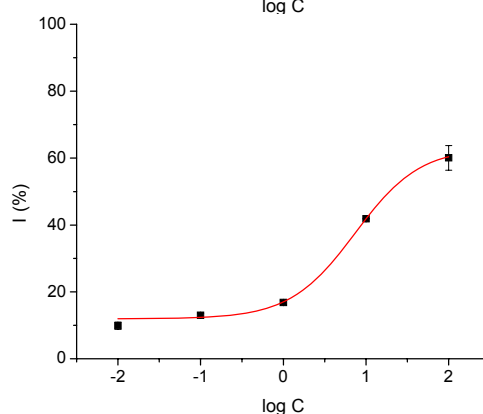


Ćelijska linija: MCF-7

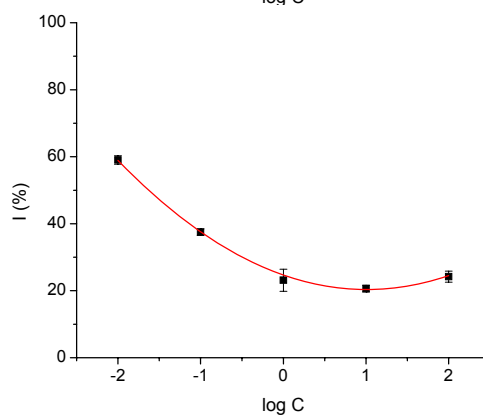
AnS09K-Ex(70M)	
C [$\mu\text{g/mL}$]	I [%]
100	51,8 \pm 2,2
10	53,3 \pm 0,9
1	45,8 \pm 0,5
0,1	41,7 \pm 1,3
0,01	40,1 \pm 0,7
IC₅₀	19,2



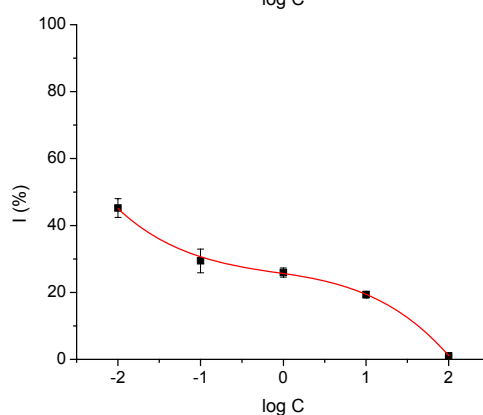
AnS08H-Ex(70M)	
C [$\mu\text{g/mL}$]	I [%]
100	60,1 \pm 3,7
10	41,9 \pm 0,0
1	16,8 \pm 0,7
0,1	13,0 \pm 0,5
0,01	9,9 \pm 1,1
IC₅₀	2,30



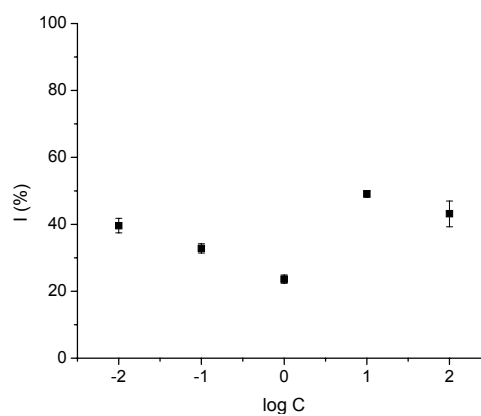
AnC13K-Ex(70M)	
C [$\mu\text{g/mL}$]	I [%]
100	24,2 \pm 1,6
10	20,6 \pm 1,0
1	23,1 \pm 3,3
0,1	37,5 \pm 1,0
0,01	59,0 \pm 1,2
IC₅₀	0,0236



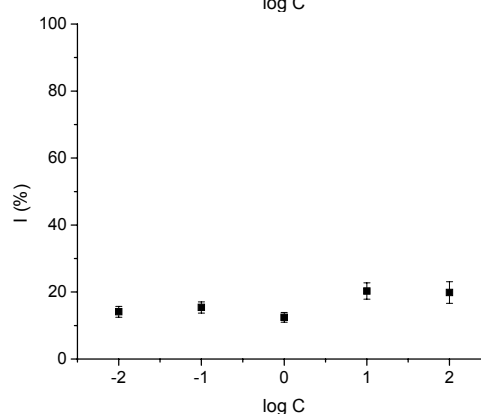
AnC13H-Ex(70M)	
C [$\mu\text{g/mL}$]	I [%]
100	1,1 \pm 0,0
10	19,3 \pm 1,0
1	25,9 \pm 1,4
0,1	29,4 \pm 3,5
0,01	45,2 \pm 2,8
IC₅₀	< 0,01



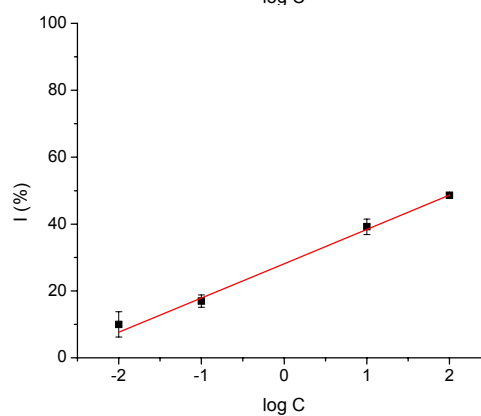
ChB01K-Ex(70M)	
C [$\mu\text{g/mL}$]	I [%]
100	$43,1 \pm 3,9$
10	$49,1 \pm 1,0$
1	$23,6 \pm 1,2$
0,1	$32,8 \pm 1,4$
0,01	$39,6 \pm 2,1$
IC_{50}	?



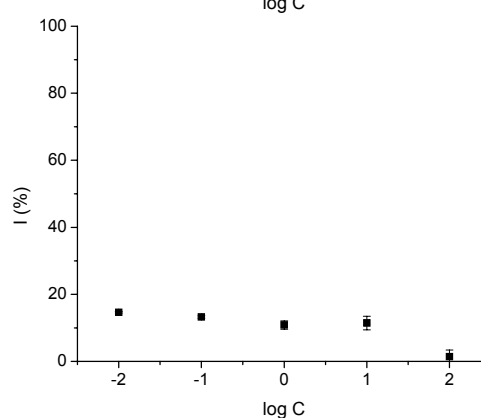
ChB01H-Ex(70M)	
C [$\mu\text{g/mL}$]	I [%]
100	$19,8 \pm 3,2$
10	$20,3 \pm 2,5$
1	$12,4 \pm 1,5$
0,1	$15,4 \pm 1,7$
0,01	$14,1 \pm 1,6$
IC_{50}	> 100



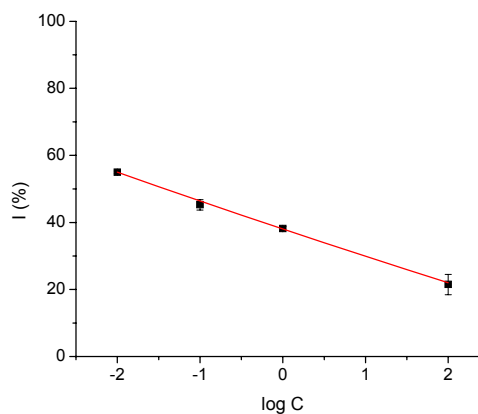
ChH01K-Ex(70M)	
C [$\mu\text{g/mL}$]	I [%]
100	$48,6 \pm 0,6$
10	$39,2 \pm 2,3$
1	$38,2 \pm 1,6$
0,1	$17,0 \pm 1,8$
0,01	$10,0 \pm 3,8$
IC_{50}	> 100



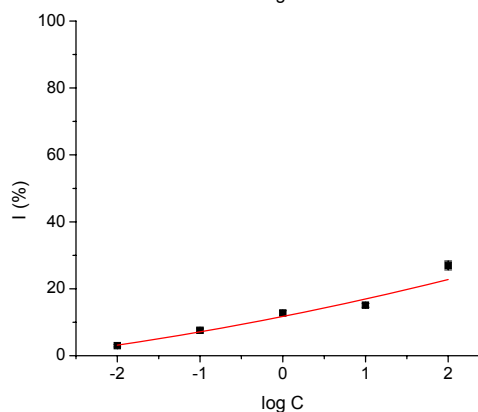
ChH01H-Ex(70M)	
C [$\mu\text{g/mL}$]	I [%]
100	$1,4 \pm 2,0$
10	$11,4 \pm 2,1$
1	$10,8 \pm 1,2$
0,1	$13,3 \pm 0,4$
0,01	$14,7 \pm 0,2$
IC_{50}	> 100



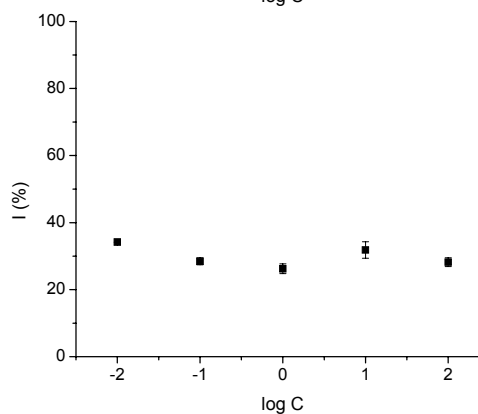
ChT03K-Ex(70M)	
<i>C</i> [$\mu\text{g/mL}$]	<i>I</i> [%]
100	21,5 \pm 3,0
10	37,5 \pm 2,4
1	38,2 \pm 0,6
0,1	45,3 \pm 1,6
0,01	55,0 \pm 0,3
<i>IC</i> ₅₀	0,0378



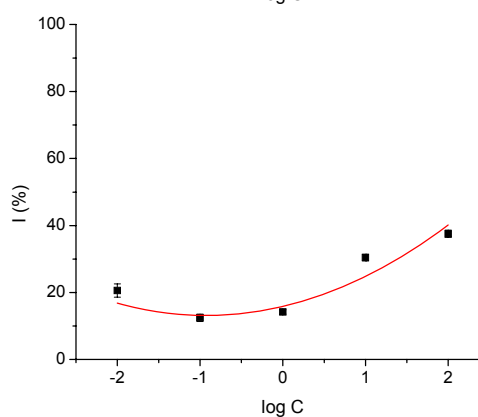
ChT01H-Ex(70M)	
<i>C</i> [$\mu\text{g/mL}$]	<i>I</i> [%]
100	27,0 \pm 1,3
10	15,1 \pm 0,6
1	12,7 \pm 0,7
0,1	7,6 \pm 0,5
0,01	3,0 \pm 0,3
<i>IC</i> ₅₀	> 100



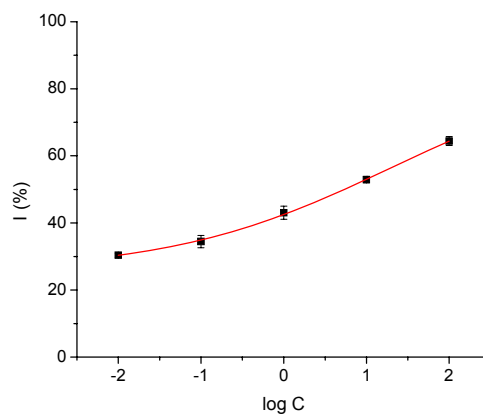
SPV01K-Ex(70M)	
<i>C</i> [$\mu\text{g/mL}$]	<i>I</i> [%]
100	28,2 \pm 1,3
10	31,8 \pm 2,5
1	26,2 \pm 1,5
0,1	28,5 \pm 1,0
0,01	34,2 \pm 0,0
<i>IC</i> ₅₀	> 100



SPV01H-Ex(70M)	
<i>C</i> [$\mu\text{g/mL}$]	<i>I</i> [%]
100	37,5 \pm 1,1
10	30,4 \pm 1,0
1	14,2 \pm 0,6
0,1	12,4 \pm 1,1
0,01	20,6 \pm 2,0
<i>IC</i> ₅₀	> 100

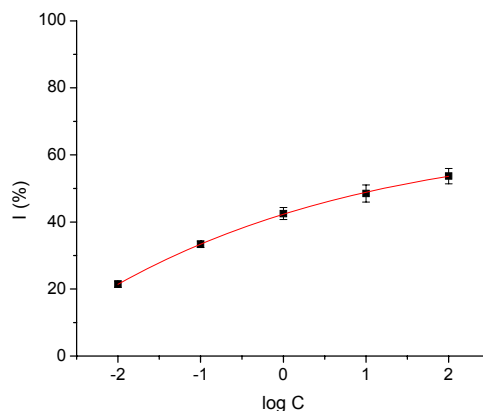


C [µg/mL]	PT I [%]
100	64,4 ± 1,3
10	52,9 ± 1,0
1	43,0 ± 2,0
0,1	34,5 ± 1,8
0,01	30,4 ± 0,6
IC₅₀	5,41

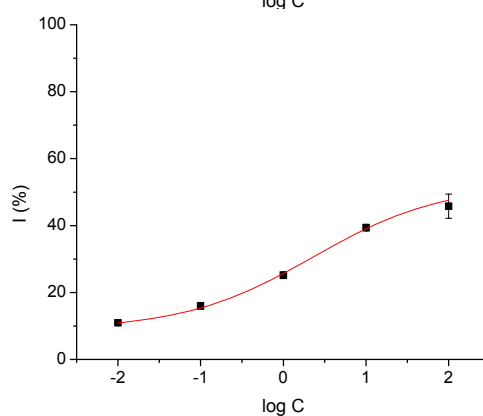


Ćelijska linija: HeLaS3

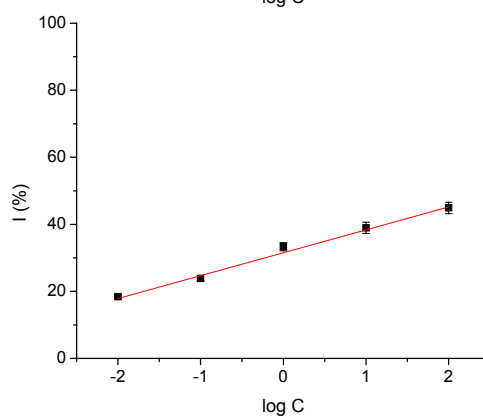
AnS09K-Ex(70M)	
C [$\mu\text{g/mL}$]	I [%]
100	53,7 \pm 2,3
10	48,5 \pm 2,6
1	42,5 \pm 1,8
0,1	33,4 \pm 1,0
0,01	21,4 \pm 1,0
IC₅₀	16,3



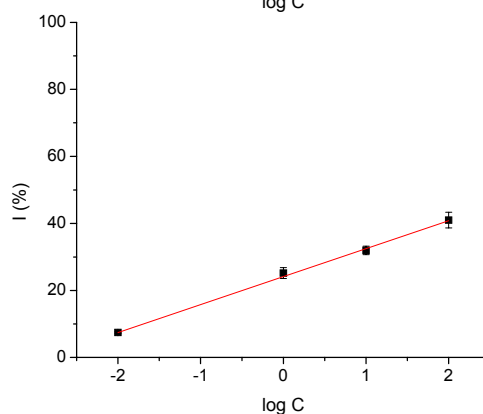
AnS08H-Ex(70M)	
C [$\mu\text{g/mL}$]	I [%]
100	45,8 \pm 3,6
10	39,4 \pm 1,0
1	25,2 \pm 1,0
0,1	16,0 \pm 1,0
0,01	10,9 \pm 0,0
IC₅₀	> 100



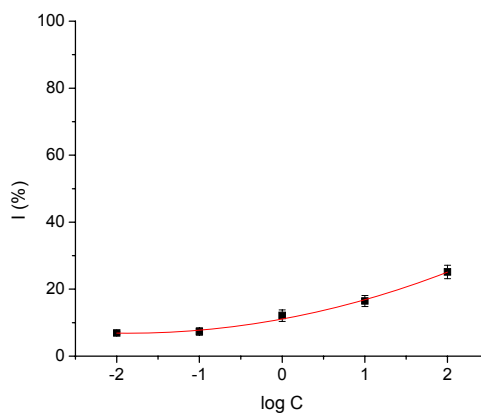
AnC13K-Ex(70M)	
C [$\mu\text{g/mL}$]	I [%]
100	44,9 \pm 1,7
10	39,0 \pm 1,7
1	33,3 \pm 1,2
0,1	23,8 \pm 0,5
0,01	18,4 \pm 0,6
IC₅₀	> 100



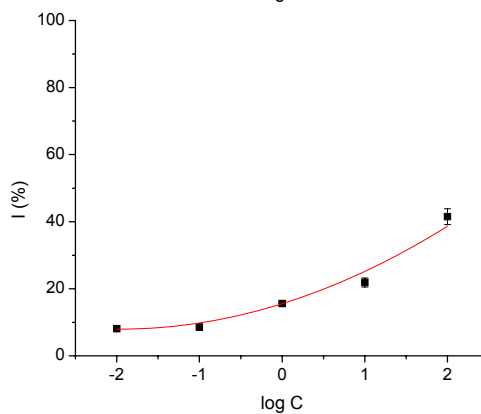
AnC13H-Ex(70M)	
C [$\mu\text{g/mL}$]	I [%]
100	41,0 \pm 2,3
10	32,0 \pm 1,3
1	25,2 \pm 1,6
0,1	9,7 \pm 1,0
0,01	7,4 \pm 0,2
IC₅₀	> 100



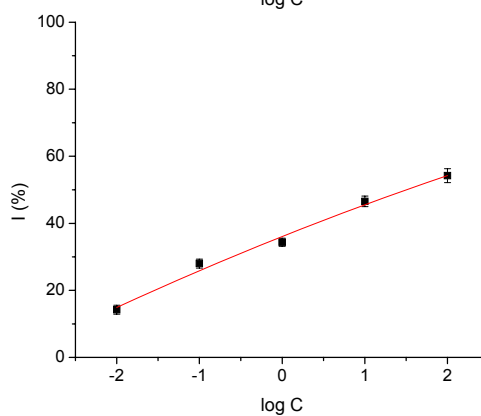
ChB01K-Ex(70M)	
C [µg/mL]	I [%]
100	25,1 ± 2,0
10	16,4 ± 1,7
1	12,1 ± 1,7
0,1	7,3 ± 1,1
0,01	6,9 ± 0,4
IC₅₀	> 100



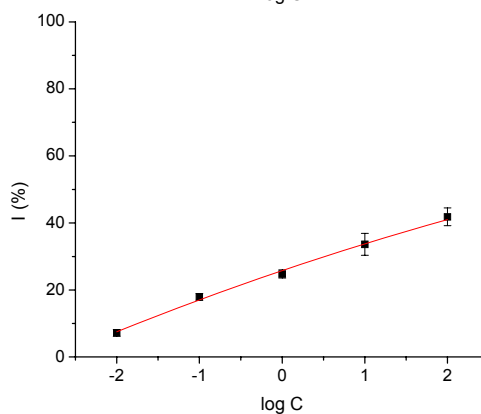
ChB01H-Ex(70M)	
C [µg/mL]	I [%]
100	41,5 ± 2,3
10	21,9 ± 1,3
1	15,5 ± 0,1
0,1	8,5 ± 1,0
0,01	8,1 ± 0,6
IC₅₀	> 100



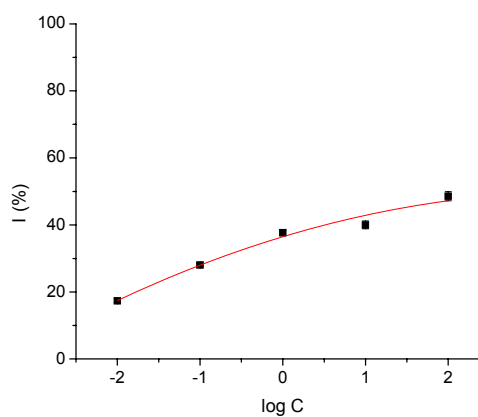
ChH01K-Ex(70M)	
C [µg/mL]	I [%]
100	54,2 ± 2,1
10	46,6 ± 1,6
1	34,3 ± 1,2
0,1	28,0 ± 1,3
0,01	14,2 ± 1,3
IC₅₀	31,8



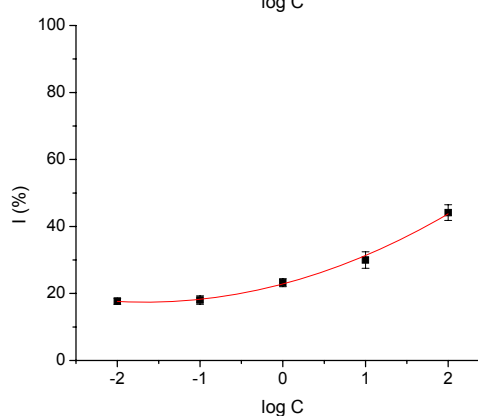
ChH01H-Ex(70M)	
C [µg/mL]	I [%]
100	41,8 ± 2,6
10	33,6 ± 3,2
1	24,8 ± 1,2
0,1	17,9 ± 1,0
0,01	7,2 ± 1,0
IC₅₀	> 100



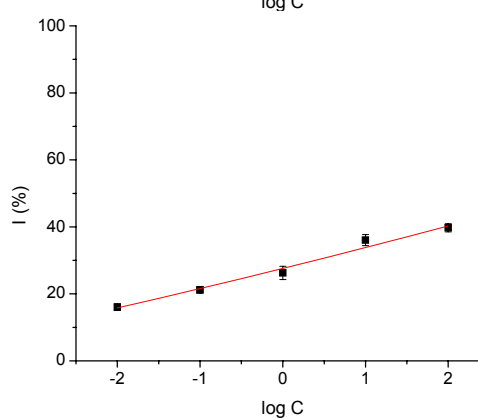
ChT03K-Ex(70M)	
<i>C</i> [µg/mL]	<i>I</i> [%]
100	48,6 ± 1,3
10	40,0 ± 1,2
1	37,7 ± 0,9
0,1	28,0 ± 0,5
0,01	17,3 ± 0,6
<i>IC</i> ₅₀	> 100



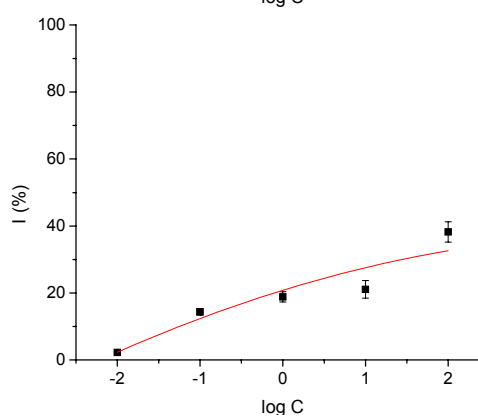
ChT01H-Ex(70M)	
<i>C</i> [µg/mL]	<i>I</i> [%]
100	44,1 ± 2,3
10	30,0 ± 2,5
1	23,2 ± 1,2
0,1	18,0 ± 1,3
0,01	17,7 ± 0,9
<i>IC</i> ₅₀	> 100



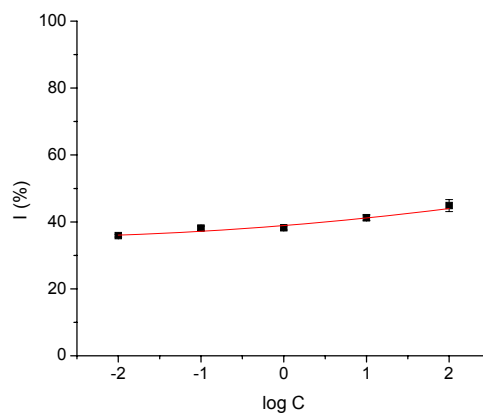
SPV01K-Ex(70M)	
<i>C</i> [µg/mL]	<i>I</i> [%]
100	39,7 ± 1,2
10	36,0 ± 1,6
1	26,2 ± 2,0
0,1	21,2 ± 1,0
0,01	16,0 ± 1,0
<i>IC</i> ₅₀	> 100



SPV01H-Ex(70M)	
<i>C</i> [µg/mL]	<i>I</i> [%]
100	38,2 ± 3,0
10	21,1 ± 2,6
1	18,8 ± 1,5
0,1	14,3 ± 1,0
0,01	2,2 ± 0,2
<i>IC</i> ₅₀	> 100

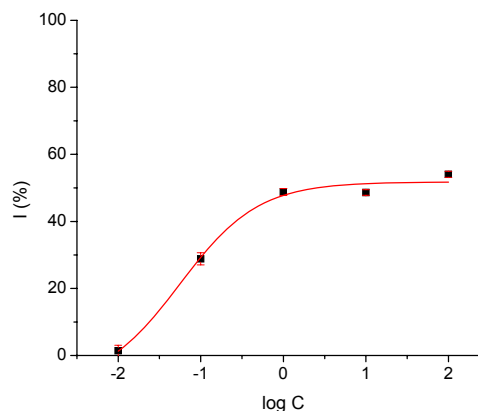


C [µg/mL]	PT I [%]
100	44,9 ± 1,8
10	41,2 ± 0,9
1	38,2 ± 0,6
0,1	38,1 ± 0,6
0,01	35,9 ± 0,4
IC₅₀	> 100

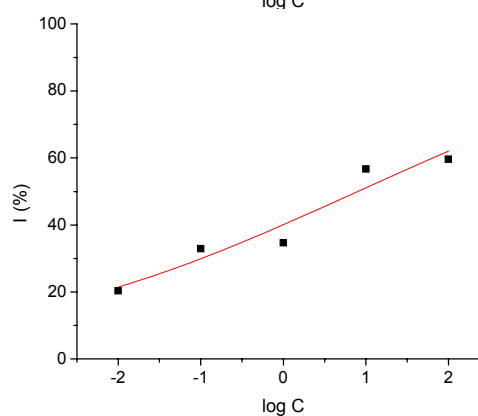


Ćelijska linija: MDA-MB-231

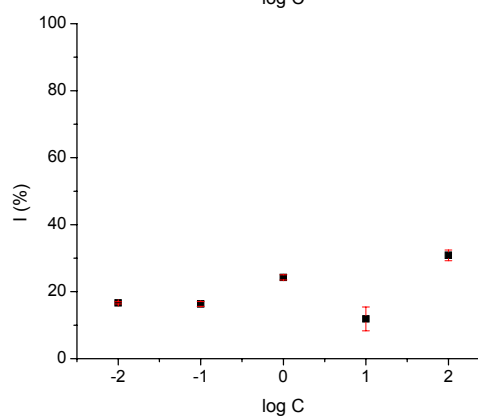
AnS09K-Ex(70M)	
C [$\mu\text{g/mL}$]	I [%]
100	54,0 \pm 0,9
10	48,6 \pm 0,8
1	48,8 \pm 1,0
0,1	28,8 \pm 1,8
0,01	1,4 \pm 1,7
IC₅₀	~2,55



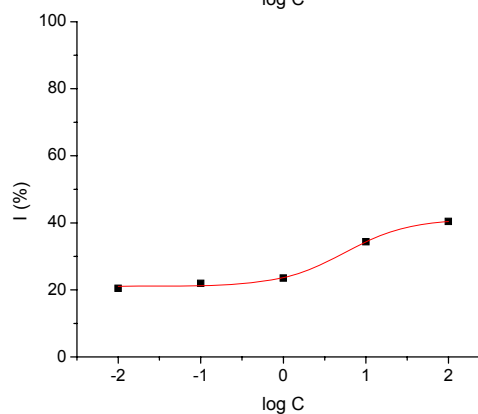
AnS08H-Ex(70M)	
C [$\mu\text{g/mL}$]	I [%]
100	59,6
10	56,7
1	34,7
0,1	32,9
0,01	20,4
IC₅₀	7,97



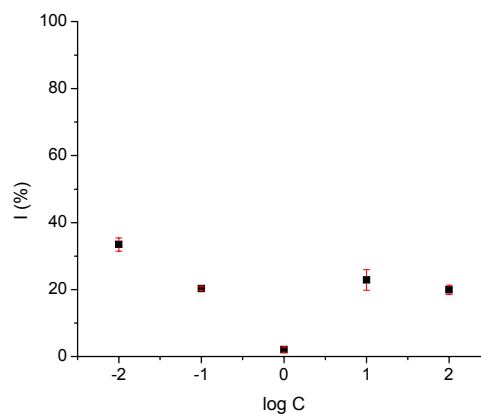
AnC13K-Ex(70M)	
C [$\mu\text{g/mL}$]	I [%]
100	30,9 \pm 1,6
10	11,9 \pm 3,6
1	24,3 \pm 0,8
0,1	16,3 \pm 0,7
0,01	16,6 \pm 0,3
IC₅₀	> 100



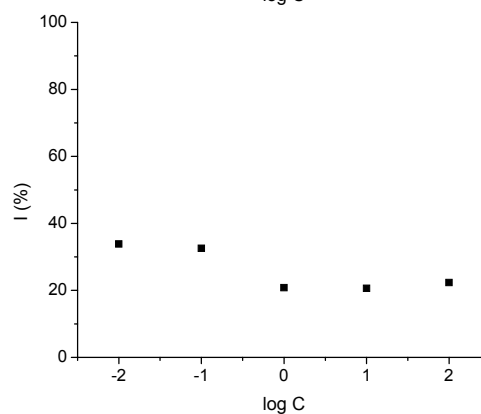
AnC13H-Ex(70M)	
C [$\mu\text{g/mL}$]	I [%]
100	40,4
10	34,3
1	23,5
0,1	21,9
0,01	20,5
IC₅₀	> 100



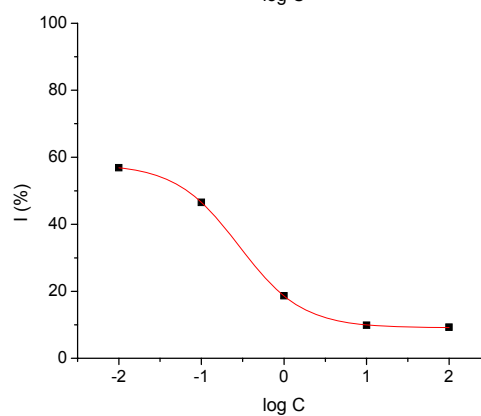
ChB01K-Ex(70M)	
C [$\mu\text{g/mL}$]	I [%]
100	19,9 \pm 1,4
10	22,9 \pm 3,0
1	2,1 \pm 0,8
0,1	20,3 \pm 0,5
0,01	33,5 \pm 2,0
IC₅₀	> 100



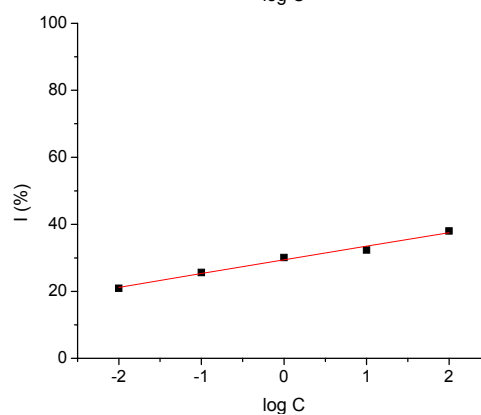
ChB01H-Ex(70M)	
C [$\mu\text{g/mL}$]	I [%]
100	22,3
10	20,6
1	20,8
0,1	32,5
0,01	33,9
IC₅₀	> 100



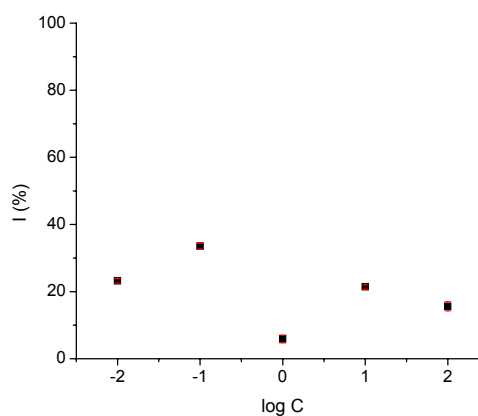
ChH01K-Ex(70M)	
C [$\mu\text{g/mL}$]	I [%]
100	9,3 \pm 1,6
10	9,9 \pm 0,3
1	18,7 \pm 1,5
0,1	46,5 \pm 4,3
0,01	56,9 \pm 0,6
IC₅₀	0,0670



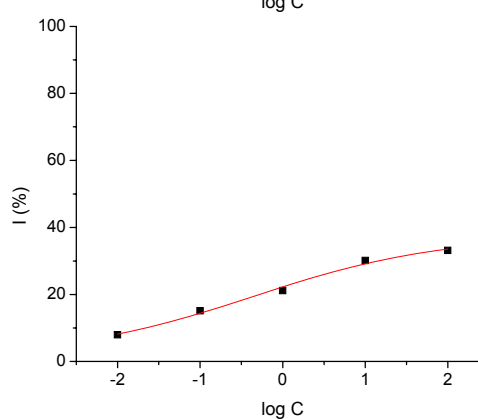
ChH01H-Ex(70M)	
C [$\mu\text{g/mL}$]	I [%]
100	38,0
10	32,3
1	30,1
0,1	25,6
0,01	20,9
IC₅₀	> 100



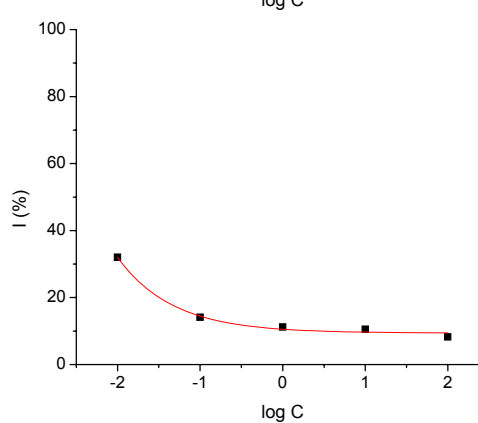
ChT03K-Ex(70M)	
C [$\mu\text{g/mL}$]	I [%]
100	15,6 \pm 1,4
10	21,4 \pm 0,6
1	5,9 \pm 1,2
0,1	33,6 \pm 0,8
0,01	23,2 \pm 0,6
IC₅₀	> 100



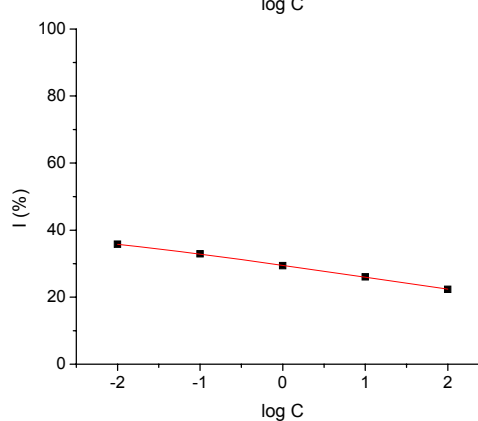
ChT01H-Ex(70M)	
C [$\mu\text{g/mL}$]	I [%]
100	33,2
10	30,1
1	21,1
0,1	15,1
0,01	8,0
IC₅₀	> 100



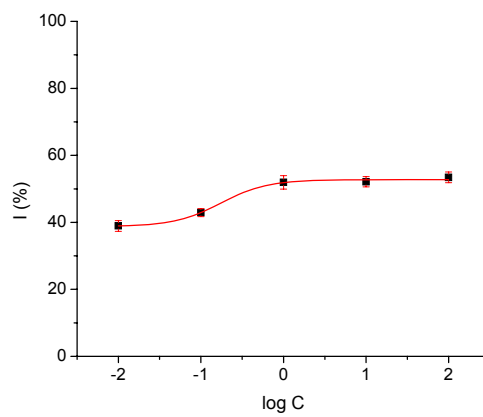
SPV01K-Ex(70M)	
C [$\mu\text{g/mL}$]	I [%]
100	8,3
10	10,5
1	11,2
0,1	14,1
0,01	32,0
IC₅₀	> 100



SPV01H-Ex(70M)	
C [$\mu\text{g/mL}$]	I [%]
100	22,4
10	26,1
1	29,4
0,1	32,9
0,01	35,8
IC₅₀	> 100



C [$\mu\text{g/mL}$]	PT I [%]
100	53,4 \pm 1,6
10	52,1 \pm 1,5
1	51,9 \pm 2,0
0,1	42,9 \pm 1,2
0,01	38,9 \pm 1,6
IC_{50}	0,289



KORIŠĆENE SKRAĆENICE

BHT	Butilovani hidroksitoluen
BPC	Hromatogram po osnovnom jonu (<i>eng.</i> base peak chromatogram)
CA	Kafena kiselina (<i>eng.</i> caffeic acid)
CID	Kolizijom indukovana disocijacija (<i>eng.</i> collision-induced dissociation)
COX	Ciklooksigenaza
CQA	Kafeoilhinska kiselina (<i>eng.</i> caffeoylquinic acid)
DAD	Detektor sa matricom dioda (<i>eng.</i> diode-array detector)
diCQA	Dikafeoilhinska kiselina (<i>eng.</i> dicaffeoylquinic acid)
DMSO	Dimetil-sulfoksid
DPPH	1,1-difenil-2-pikrilhidrazil
DSH	<i>eng.</i> Direct stimulation hormesis
EI	Elektronska jonizacija (<i>eng.</i> electron ionization)
EIC	<i>eng.</i> Extracted ion chromatogram
ESI	Elektrosprej jonizacija (<i>eng.</i> electrospray ionization)
EtOH	Etanol
FRAP	<i>eng.</i> Ferric reducing ability of plasma
GC	Gasna hromatografija (<i>eng.</i> gas chromatography)
5-HETE	5 <i>S</i> -hidroksi-6 <i>E</i> ,8 <i>Z</i> ,11 <i>Z</i> ,14 <i>Z</i> -eikozatetraenska kiselina
HPETE	Hidroperoksieikozatetraenske kiseline
HPLC	Tečna hromatografija visokih performansi (<i>eng.</i> high performance liquid chromatography)
HS	<i>eng.</i> Headspace
<i>i</i> PrOH	<i>izo</i> -Propanol
KI	Kovats indeks
LC	Tečna hromatografija (<i>eng.</i> liquid chromatography)
LOX	Lipooksigenaza
MeOH	Metanol
MVA	Multivarijatna analiza (<i>eng.</i> multivariate analysis)
MRM	<i>eng.</i> Multiple reactions monitoring
MS	Masena spektrometrija
MS ⁿ	Tandemska masena spektrometrija
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijum-bromid
NI	Negativna jonizacija (<i>eng.</i> negative ionization)
NSAID	Nesteroidni antiinflamatorni lekovi (<i>eng.</i> nonsteroidal anti-inflammatory drugs)
OCSH	<i>eng.</i> Overcompensation stimulation hormesis
PG	Prostaglandin
PC	Glavna komponenta (<i>eng.</i> principal component)
PCA	Analiza glavnih komponenti (<i>eng.</i> principal components analysis)
PI	Pozitivna jonizacija (<i>eng.</i> positive ionization)
Q1, Q2, Q3	Kvadrupoli 1–3
RDA	Retro-Diels-Alderova reakcija
RNS	Reaktivni oblici azota (<i>eng.</i> reactive nitrogen species)
ROS	Reaktivni oblici kiseonika (<i>eng.</i> reactive oxygen species)
RP	Reverzna faza (<i>eng.</i> reversed phase)
SIM	<i>eng.</i> Selected ions monitoring
SRM	<i>eng.</i> Selected reactions monitoring
TIC	<i>eng.</i> Total ion chromatogram
TPTZ	2,4,6- <i>tris</i> (2-piridil)- <i>s</i> -triazin
UPLC	Tečna hromatografija ultravisokih performansi (<i>eng.</i> ultra performance liquid chromatography)

UNIVERZITET U NOVOM SADU
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET
KLJUČNA DOKUMENTACIJA

Redni broj:
RBR

Identifikacioni broj:
IBR

Tip dokumentacije: Monografska dokumentacija
TD

Tip zapisa: Tekstualni štampani materijal
TZ

Vrsta rada: Doktorska disertacija
VR

Autor: Dejan Orčić
AU

Mentor: prof. dr Neda Mimica-Dukić
MN

Naslov rada: Vrste tribusa Scandiceae (Apiaceae Lindley 1836, subfam. Apioideae) – potencijalni izvor biološki i farmakološki aktivnih sekundarnih biomolekula
NR

Jezik publikacije: Srpski (latinica)
JP

Jezik izvoda : Srpski (latinica)
JI

Zemlja publikovanja: Srbija
ZP

Uže geografsko područje: Vojvodina
UGP

Godina: 2010.
GO

Izdavač: Autorski reprint
IZ

Mesto i adresa: Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 3
MA

Fizički opis rada: (8/371/279/12/112/0/23)
(broj poglavlja/strana/lit.citata/tabela/slika/grafika/priloga)
FO

Naučna oblast: Hemija
NO

Naučna disciplina: Biohemija
ND

Predmetna odrednica/Ključne reči: Apiaceae, Scandiceae, *Anthriscus*, *Chaerophyllum*, *Scandix*, LC-MS-MS, GC-MS, ligani, flavonoidi, fenoli, antioksidansi, citotoksičnost, antiinflamatorna aktivnost
UDK:

Čuva se: Biblioteka Departmana za hemiju, PMF Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 3
ČU

Važna napomena: nema
VN

Izvod: Ispitani su hemijski sastav i biološka aktivnost šest samoniklih vrsta iz tribusa Scandiceae (familija Apiaceae): *Anthriscus sylvestris*, *Anthriscus cerefolium*, *Chaerophyllum bulbosum*, *Chaerophyllum hirsutum*, *Chaerophyllum temulentum* i *Scandix pecten-veneris*. LC-MS-MS analizom ekstrakata identifikovano je više desetina sekundarnih biomolekula iz klasa flavonoida, fenilpropenskih kiselina, lignana i kumarina. GC-MS analiza pružila je uvid u sastav volatilnih komponenti i njihov hemosistematski značaj. Potvrđeno je da sve ispitivane vrste imaju umereno antioksidantno, antiinflamatorno i antiproliferativno dejstvo.

Datum prihvatanja teme od strane NN veća: 2.7.2009.
DP

Datum odbrane:
DO

Članovi komisije:
KO

Predsednik: dr Ksenija Kuhajda, red. profesor PMF u Novom Sadu

Član: dr Neda Mimica-Dukić, red. profesor PMF u Novom Sadu, mentor

Član: dr Boža Pal, red. profesor PMF u Novom Sadu

Član: dr Biljana Božin, docent Medicinskog fakulteta u Novom Sadu

Član: dr Đorđe Malenčić, vanr. profesor Poljoprivrednog fakulteta u Novom Sadu

UNIVERSITY OF NOVI SAD
FACULTY OF SCIENCE
KEY WORDS DOCUMENTATION

Accession number:
ANO

Identification number:
INO

Document type: Monograph type
DT

Type of record: Printed text
TR

Contents code: PhD Thesis
CC

Author: Dejan Orčić
AU

Mentor: Prof. Dr. Neda Mimica-Dukić
MN

Title: Scandiceae tribe (Apiaceae Lindley 1836, subfam. Apioideae) species – potential resources of biologically and pharmacologically active secondary biomolecules
XI

Language of text: Serbian (Latin alphabet)
LT

Language of abstract: Serbian
LA

Country of publication: Serbia
CP

Locality of publication: Vojvodina
LP

Publication year: 2010
PY

Publisher: Author's reprint
PU

Publ. place: Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 3
PP

Physical description: (8/371/279/12/112/0/23)
(chapters/pages/literature/tables/pictures/graphs/additional lists)
PD

Scientific field: Chemistry

SF

Scientific discipline: Biochemistry

SD

Key words: Apiaceae, Scandiceae, *Anthriscus*, *Chaerophyllum*, *Scandix*, LC-MS-MS, GC-MS, lignans, flavonoids, plant phenolics, antioxidants, cytotoxic activity, anti-inflammatory activity

UC:

Holding data: Library of Department of Chemistry, Biochemistry and Environmental Protection, Faculty of Sciences, Trg Dositeja Obradovića 3, Novi Sad

HD:

Note: none

Abstract: Chemical composition and biological activity of six wild-growing species from Scandiceae tribe (Apiaceae family) – *Anthriscus sylvestris*, *Anthriscus cerefolium*, *Chaerophyllum bulbosum*, *Chaerophyllum hirsutum*, *Chaerophyllum temulentum* and *Scandix pecten-veneris* – was examined. By LC-MS-MS analysis, a large number of secondary biomolecules was identified in extracts, including flavonoids, phenylpropanic acids, lignans and coumarins. GC-MS analysis provided insight into volatile components composition and chemosystematic significance. All investigated species exhibited moderate antioxidant, anti-inflammatory and antiproliferative activity.

Accepted by the Scientific Board on: 2.7.2009.

Defended:

Thesis defend board:

Chairperson: Dr Ksenija Kuhajda, Professor, Faculty of Sciences, Novi Sad

Mentor: Dr Neda Mimica-Dukić, Professor, Faculty of Sciences, Novi Sad

Member: Dr Boža Pal, Professor, Faculty of Sciences, Novi Sad

Member: Dr Biljana Božin, Assistant Professor, Medical Faculty, Novi Sad

Member: Dr Đorđe Malenčić, Associate Professor, Faculty of Agriculture, Novi Sad

BIOGRAFIJA



Dejan Orčić rođen je 29.11.1980. godine u Subotici, gde je završio osnovnu školu i srednju hemijsko-tehnološku školu (smer hemijsko-tehnološki tehničar). Prirodno-matematički fakultet, smer diplomirani hemičar, upisao je 1999. godine. Osnovne studije završio je 2003. godine sa temom diplomskog rada „Alkoksi-derivati fulerena C₆₀” i prosečnom ocenom 10,00, kao najbolji student fakulteta i univerziteta.

Posle završenih studija zapošljava se kao analitičar u Ekotoksikološkoj laboratoriji instituta A.D. Bio-ekološki centar, gde ostaje do 2006. godine. U tom periodu uključen je i u realizaciju projekta tehnološkog razvoja Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj br. TR-6823A.

Doktorske studije na Katedri za biohemiju Departmana za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu upisao je 2004. godine. Od 2007. godine zaposlen na Prirodno-matematičkom fakultetu kao istraživač-pripravnik, a od 2009. kao istraživač-saradnik, angažovan na projektu osnovnih istraživanja Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj br. 142036. Primarna oblast istraživanja je primena tandemske tehnike (GC-MS, LC-MS-MS) u analizi sekundarnih biomolekula. U koautorstvu objavio 5 radova u međunarodnim časopisima i preko 20 saopštenja na konferencijama.

Član je Srpskog hemijskog društva i Society for Medicinal Plants Research (GA).