

UNIVERZITET U BEOGRADU

FARMACEUTSKI FAKULTET



Gordana M. Zdunić

**Uporedna hemijska analiza i
farmakološki profil ekstrakata odabranih
vrsta roda *Hypericum* L.**

doktorska disertacija

Beograd, 2012.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF PHARMACY



Gordana M. Zdunić

**Comparative chemical analysis and
pharmacological profile of extracts of
selected species of the genus
Hypericum L.**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2012

Doktorska disertacija je urađena na Katedri za farmakognoziju Univerziteta u Beogradu - Farmaceutskog fakulteta. Deo eksperimenata je urađen u Institutu za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić“ u Beogradu, Institutu za hemiju, tehnologiju i metalurgiju Univerziteta u Beogradu, Institutu za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ u Beogradu i Katedri za mikrobiologiju i imunologiju Univerziteta u Beogradu - Farmaceutskog fakulteta.

Mentor:

Prof. dr Silvana Petrović, redovni profesor,
Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet

Članovi komisije:

Dr sc. Katarina Šavikin, naučni savetnik,
Institut za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić“, Beograd

Prof. dr Slobodan Milosavljević, profesor emeritus,
Univerzitet u Beogradu - Hemijski fakultet

Prof. dr Marina Milenković, vanredni profesor,
Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet

Dr sc. Mirko Tomić, viši naučni saradnik,
Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Beograd

Datum odbrane: _____

Svom mentoru, redovnom profesoru dr Silvani Petrović, izražavam veliku zahvalnost na sveobuhvatnom angažovanju i podršci, stručnoj pomoći i korisnim savetima tokom izrade ove disertacije.

Naučnom savetniku dr Katarini Šavikin, profesoru emeritusu dr Slobodanu Milosavljeviću, vanrednom profesoru dr Marini Milenković, kao i višem naučnom saradniku dr Mirku Tomiću najiskrenije se zahvaljujem na svestranoj stručnoj pomoći, korisnim sugestijama i podršci u toku izrade ovog rada.

Najtoplije se zahvaljujem naučnom savetniku dr Nebojši Menkoviću na neprocenjivoj pomoći u terenskom istraživanju i stalnom usmeravanju i podršci u profesionalnom usavršavanju, redovnom profesoru dr Vladimiru Stevanoviću i dr Danijeli Stešević na pomoći u identifikaciji biljnog materijala, mojim dragim kolegama dr Dejanu Gođevcu i mr Miroslavu Novakoviću na uloženom trudu, vremenu i strpljenju tokom eksperimentalnog rada u okviru hemijske analize, dipl. farm. Jeleni Kukić-Marković na nesebičnom angažovanju u delu ispitivanja antioksidantne aktivnosti, mr Tatjani Stević na dragocenoj pomoći u ispitivanju antimikrobne aktivnosti, kao i mr Gordani Tovilović, mr Biljani Butorović i mr Dragani Vučićević na stručnoj pomoći i saradnji tokom ispitivanja farmakoloških aktivnosti. Posebnu zahvalnost dugujem Saši Babiću, rukovodiocu Odseka za informacione tehnologije Farmaceutskog fakulteta na velikoj pomoći u tehničkoj pripremi rada.

Svim kolegama iz Instituta za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić“, koji su mi svako na sebi svojstven način pomogli u izradi ovog rada, dugujem veliku zahvalnost.

Najveću zahvalnost dugujem mojoj porodici i prijateljima na pruženoj iskrenoj i nesebičnoj podršci i razumevanju tokom celokupnog školovanja i izrade ove disertacije.

Usporedna hemijska analiza i farmakološki profil ekstrakata odabranih vrsta roda *Hypericum* L.

Rezime

U ovoj doktorskoj disertaciji izvršena je hemijska i farmakološka karakterizacija ekstrakata herbi sedam vrsta roda *Hypericum* L. sa teritorije Srbije i Crne Gore: *H. richeri* Vill., *H. perforatum* L., *H. barbatum* Jacq., *H. hirsutum* L., *H. androsaemum* L., *H. acutum* Mnch. i *H. maculatum* Crantz. Posebna pažnja posvećena je ispitivanju vrste *H. richeri*, s obzirom da je, među odabranim, jedna od manje hemijski proučavanih i da je u okviru terenskih istraživanja zabeležena njena upotreba u tradicionalnoj medicini u iste svrhe kao i vrste *H. perforatum*.

U okviru preliminarne hemijske analize, u herbama odabranih vrsta roda *Hypericum* i njihovim vodeno-etanolnim ekstraktima određen je sadržaj ukupnih naftodiantrona, ukupnih fenola i tanina.

Posebna pažnja posvećena je izolovanju i identifikaciji flavonoida iz herbe vrste *H. richeri*. Iz metanolnog ekstrakta herbe izolovano je devet flavonoida: tri glikozida miricetina (miricetin 3-*O*-rutinozid, miricetin 3-*O*-galaktozid, miricetin 3-*O*-glukozid) i I3,II8-biapigenin, koji u ovoj vrsti nisu bili ranije identifikovani, kao i kvercetin i njegovi glikozidi (rutin, hiperozid, izokvercitrin, kvercitrin). Strukture izolovanih jedinjenja utvrđene su na osnovu analize njihovih UV, ¹H NMR i ¹³C NMR spektralnih podataka. Izolovana jedinjenja upotrebljena su za uporednu kvalitativnu i kvantitativnu analizu ekstrakata herbi svih odabranih vrsta roda *Hypericum*. Pomoću LC-UV-MS tehnike u metanolnom ekstraktu i njegovim frakcijama utvrđeno je i prisustvo dva naftodiantrona (pseudohipericin i hipericin) i dve kafeoilhina kiseline (pored 3-*O*-izomera i 5-*O*- izomer koji je prvi put identifikovan u ovoj vrsti). Kvantitativna analiza metanolnog ekstrakta i njegovih frakcija izvršena je pomoću HPLC-UV tehnike.

Rezultati uporedne kvalitativne LC-UV-MS i kvantitativne HPLC-UV analize vodeno-etanolnih ekstrakata herbi svih sedam vrsta roda *Hypericum* ukazali su na njihove značajne međusobne razlike. Ukupno je identifikovano 17 jedinjenja: pored onih prethodno detektovanih u vrsti *H. richeri*, takođe i 4-*O*-kafeoilhina kiselina, flavonoidni C-glikozidi - orijentin i njegov 2"-*O*-acetil-derivat, i flavanonolni glikozid astilbin. U vrsti *H. barbatum* po prvi put su identifikovani I3,II8-biapigenin, kao i 4-*O*- i

5-*O*-kafeoilhina kiselina; u vrsti *H. hirsutum* prvi put je detektovana 5-*O*-kafeoilhina kiselina, dok su 5-*O*-kafeoilhina kiselina, izokvercitrin, astilbin, I3,I18-biapigenin, pseudohipericin i hipericin prvi put identifikovani u vrsti *H. acutum*.

Pripremljeni su uljani ekstrakti herbi svih sedam vrsta roda *Hypericum* na tri različita načina po tradicionalnim recepturama za uljani ekstrakt herbe kantariona. Njihova kvalitativna i kvantitativna analiza izvršena je HPLC-UV tehnikom. U uljanom ekstraktu vrste *H. androsaemum* identifikovan je samo kvercetin, a u svim ostalim ekstraktima pored kvercetina i I3,I18-biapigenin. Sadržaj ovih jedinjenja zavisio je kako od biljne vrste, tako i od primenjenog postupka ekstrakcije. Ekstrakti dobijeni prethodnom maceracijom suve herbe u etanolu, koja se nastavlja ekstrakcijom suncokretovim uljem uz zagrevanje i uklanjanje etanola, bili su najbogatiji flavonoidima, pri čemu je najveći sadržaj detektovan u ekstraktima vrsta *H. maculatum*, *H. perforatum* i *H. richeri*. U svim uljanim ekstraktima, osim u ekstraktu vrste *H. androsaemum*, detektovano je i prisustvo komponenti čiji su UV spektri bili slični UV spektrima hipericina i pseudohipericina, ali čija retencionna vremena nisu odgovarala ovim naftodiantronima. Floroglucinolni derivat hiperforin nije detektovan ni u jednom uljanom ekstraktu.

Za vodeno-etanolne ekstrakte svih sedam vrsta roda *Hypericum* ispitivana je sposobnost inhibicije enzima MAO A i MAO B u *in vitro* uslovima. Utvrđena je slaba sposobnost inhibicije ekstrakta herbe *H. perforatum*, što je u skladu sa literaturnim podacima prema kojima se antidepresivno delovanje ovog ekstrakta objašnjava drugim mehanizmima. I za ekstrakte herbi svih ostalih ispitivanih vrsta roda *Hypericum* utvrđena je veoma slaba sposobnost inhibicije enzima MAO ($IC_{50} > 0,30$ mg/ml). Za ove ekstrakte ispitivana je i sposobnost inhibicije preuzimanja 5-HT u sinaptozomima u *in vitro* uslovima. Ekstrakt herbe *H. perforatum* pokazao je visoku sposobnost inhibicije ($IC_{50} = 6,0$ µg/ml), što je u skladu sa literaturnim podacima prema kojima je ovo jedan od glavnih mehanizama njegovog antidepresivnog delovanja. U slučaju ekstrakata ostalih ispitivanih vrsta roda *Hypericum*, sposobnost inhibicije preuzimanja 5-HT je bila izuzetno niska, što ukazuje da u *in vivo* uslovima koncentracije ovih ekstrakata u plazmi neophodne za ispoljavanje antidepresivnog delovanja ne bi mogle biti dostignute.

Antioksidantni potencijal vodeno-etanolnih ekstrakata herbi svih sedam vrsta roda *Hypericum* procenjivan je spektrofotometrijski, na osnovu: sposobnosti redukcije

kompleksa Fe^{3+} -tripiridiltriazin (FRAP test), uticaja na inhibiciju lipidne peroksidacije, sposobnosti neutralizacije ABTS^{*+} , superoksid radikal anjona i DPPH radikala. U većini testova najveći antioksidantni potencijal pokazali su ekstrakti vrsta *H. acutum* i *H. maculatum*, za koje je utvrđeno da su i najbogatiji ukupnim fenolima i taninima. Najmanji antioksidantni potencijal pokazali su ekstrakti vrsta *H. perforatum*, *H. richeri* i *H. barbatum*. Spektrofotometrijski je ispitivan i antioksidantni potencijal metanolnog ekstrakta herbe *H. richeri* i svih njegovih frakcija, na osnovu: uticaja na inhibiciju lipidne peroksidacije, neutralizacije ABTS^{*+} i superoksid radikal anjona. Najveću antioksidantnu aktivnost pokazala je etilacetatna frakcija, a najslabiju hloroformska i vodena frakcija.

Sposobnost pojedinih sastojaka vodeno-etanolnih ekstrakata herbi svih sedam vrsta roda *Hypericum*, kao i metanolnog ekstrakta herbe *H. richeri* i njegovih frakcija, da neutrališu DPPH radikal praćena je pomoću post-kolonske HPLC-DPPH derivatizacije. Ustanovljeno je da od svih identifikovanih jedinjenja samo hipericin, pseudohipericin i I3,II8-biapigenin ne pokazuju sposobnost neutralizacije ovog radikala.

Antimikrobno delovanje vodeno-etanolnih ekstrakata herbi svih sedam vrsta roda *Hypericum*, kao i metanolnog ekstrakta herbe vrste *H. richeri* i svih njegovih frakcija, ispitivano je agar-difuzionom i mikrodilucionom metodom prema 16 mikroorganizama. Najveću aktivnost prema svim testiranim mikroorganizmima pokazale su *n*-butanolna i etilacetatna frakcija metanolnog ekstrakta vrste *H. richeri* (MIC=0,12–0,13 mg/ml) i vodeno-etanolni ekstrakt vrste *H. barbatum* (MIC=0,20–0,30 mg/ml). Takođe je ispitivana i antimikrobna aktivnost uljanih ekstrakata herbi vrsta *H. richeri* i *H. perforatum* mikrodilucionom metodom prema 11 mikroorganizama. Ekstrakt vrste *H. richeri* pripremljen direktnom ekstrakcijom suve herbe suncokretovim uljem nije pokazao antimikrobnu aktivnost u testiranom opsegu koncentracija (MIC>60 $\mu\text{l/ml}$), dok je odgovarajući ekstrakt vrste *H. perforatum* inhibirao samo rast *C. albicans* u koncentraciji od 55 $\mu\text{l/ml}$. Druga dva tipa uljanih ekstrakata pokazala su aktivnost prema svim testiranim mikroorganizmima (MIC=40–60 $\mu\text{l/ml}$), pri čemu je najbolju aktivnost ispoljio ekstrakt vrste *H. perforatum* dobijen prethodnom maceracijom herbe u etanolu, koja se nastavlja ekstrakcijom suncokretovim uljem uz zagrevanje, prema *C. albicans*.

Za sva tri tipa uljanih ekstrakata vrsta *H. perforatum* i *H. richeri*, kao i za kvercetin i I3,II8-biapigenin, ispitivane su antiedematozna aktivnost na modelu karageninom akutno izazvanog edema šapice pacova i gastroprotektivna aktivnost na eksperimentalnom modelu akutnog ulkusa pacova, posle *p.o.* primene. Svi ekstrakti vrste *H. perforatum* pokazali su bolju aktivnost u poređenju sa ekstraktima vrste *H. richeri*. U slučaju svake pojedinačne biljne vrste najizraženiji efekat ispoljili su ekstrakti dobijeni prethodnom maceracijom herbe u etanolu, koja se nastavlja ekstrakcijom suncokretovim uljem uz zagrevanje i uklanjanje etanola. Ovaj ekstrakt vrste *H. perforatum* u najvećoj testiranoj dozi (1,25 ml/kg) pokazao je statistički značajno veći antiedematozni efekat u odnosu na referentni lek indometacin (95,24% u odnosu na 61,90%), dok je antiedematozni efekat ovog ekstrakta vrste *H. richeri* bio oko dva puta manji u odnosu na indometacin. Takođe, ovaj ekstrakt vrste *H. perforatum* je već u dozi od 0,75 ml/kg pokazao gastroprotektivno delovanje identično delovanju referentnog leka ranitidina (indeks oštećenja zida želuca 0,5). Odgovarajući ekstrakt vrste *H. richeri* u istoj dozi ispoljio je slabije delovanje (indeks oštećenja želuca 0,9). S obzirom da su izolovani flavonoidi kvercetin i I3,II8-biapigenin ispoljili visok antiedematozni i gastroprotektivni efekat, kao i da su ekstrakti obe vrste najbogatiji ovim flavonoidima pokazali i najveću antiedematoznu i gastroprotektivnu aktivnost, može se pretpostaviti da kvercetin i I3,II8-biapigenin doprinose pokazanom delovanju ekstrakata. Pokazana antiedematozna i gastroprotektivna aktivnost ispitivanih uljanih ekstrakata herbi *H. perforatum* i *H. richeri* predstavlja dobru osnovu za dalja istraživanja u cilju opravdanja tradicionalne upotrebe ekstrakta vrste *H. perforatum*, odnosno otvaranja mogućnosti primene ekstrakta vrste *H. richeri* kod različitih inflamatornih stanja i oštećenja želudačne sluzokože.

Ključne reči: *H. richeri*, *H. perforatum*, *H. barbatum*, *H. hirsutum*, *H. androsaemum*, *H. acutum*, *H. maculatum*, hemijska i farmakološka karakterizacija.

Naučna oblast: Farmacija.

Uža naučna oblast: Farmakognozija.

UDK broj: 581.192:582.824(043.3)

615.322(043.3)

Comparative chemical analysis and pharmacological profile of extracts of selected species of the genus *Hypericum* L.

Abstract

In this doctoral dissertation, a comparative chemical and pharmacological characterization of extracts of selected species of the genus *Hypericum* L. from Serbia and Montenegro: *H. richeri* Vill., *H. perforatum* L., *H. barbatum* Jacq., *H. hirsutum* L., *H. androsaemum* L., *H. acutum* Mnch., and *H. maculatum* Crantz., was carried out. Special attention was paid to the study of *H. richeri* as this species has been one of the less chemically investigated, and during the field studies its usage was noticed in traditional medicine for the same purposes as the species *H. perforatum*.

In the preliminary chemical analysis of selected *Hypericum* species and their water-ethanol extracts, total contents of naphthodianthrones, phenols and tannins have been determined.

Special attention was paid to the isolation and identification of flavonoids from aerial parts of *H. richeri*. From the methanol extract of *H. richeri*, flavonoids rutin, hyperoside, isoquercitrin, and quercitrin have been isolated, along with three myricetin glycosides (myricetin 3-*O*-rutinoside, myricetin 3-*O*-galactoside, myricetin 3-*O*-glucoside) and I3,II8-biapigenin which have been identified in this species for the first time. The structures of the isolated compounds were elucidated by UV, ¹H NMR and ¹³C NMR spectral data. The isolated compounds were used for comparative qualitative and quantitative analysis of herb extracts of selected *Hypericum* species. The LC-UV-MS method also revealed the presence of two naphthodianthrones (pseudohypericin and hypericin) and two caffeoylquinic acids (3-*O*-isomer, and 5-*O*-isomer which was identified for the first time in *H. richeri*) in the methanol extract and its fractions. The HPLC-UV method was performed for the quantitative analysis of methanol extract and its fractions.

Comparative qualitative LC-UV-MS and quantitative HPLC-UV analyses of water-ethanol extracts of selected *Hypericum* species revealed significant differences between them. A total of 17 compounds were identified. In addition to 13 compounds already identified in *H. richeri*, 4-*O*-caffeoylquinic acid, *C*-glycosylated flavonoids orientin and 2''-*O*-acetyl orientin, and flavanonol glycoside astilbin have been identified.

Isoquercitrin, quercetin, I3,II8-biapigenin, and 4-*O*- and 5-*O*-caffeoylquinic acids were identified in *H. barbatum* for the first time; 5-*O*-caffeoylquinic acid was detected in *H. hirsutum* for the first time, while 5-*O*-caffeoylquinic acid, isoquercitrin, astilbin, I3,II8-biapigenin, pseudohypericin and hypericin were identified for the first time in *H. acutum*.

Oil extracts of all selected *Hypericum* species were prepared in three different ways, according to the prescriptions from traditional medicine for St. John's wort. HPLC-UV technique was used for their qualitative and quantitative analysis. Quercetin and I3,II8-biapigenin were detected in all examined oil extracts, except in the extract of *H. androsaemum*, where only quercetin was identified. The content of these flavonoids depended on the species as well as of type of the extraction. Extracts obtained by maceration of dried plant material with ethanol, followed by the addition of sunflower oil and further evaporation of the ethanol by heating, were the most abundant in flavonoids, and the highest amount was detected in the extracts of *H. maculatum*, *H. perforatum* and *H. richeri*. Compounds whose UV spectra, but not retention times, were similar to those of hypericin and pseudohypericin were present in all extracts except in *H. androsaemum*. Phloroglucinol hyperforin was not detected in any of oil extracts.

The ability of water-ethanol extracts of the studied *Hypericum* species on inhibition of MAO A and MAO B enzymes activity was investigated *in vitro*. The *H. perforatum* extract exhibited weak inhibitory activity which is in accordance with the previous findings that antidepressant activity of the extract could be achieved through different mechanisms. The extracts of other examined *Hypericum* species also exhibited weak inhibitory potency on MAO enzymes ($IC_{50} > 0.30$ mg/ml). Water-ethanol extracts of the studied *Hypericum* species were also evaluated regarding inhibition of synaptosomal 5-HT reuptake *in vitro*. Extract of *H. perforatum* the most efficiently inhibited 5-HT reuptake in synaptosomes ($IC_{50} = 6.0$ μ g/ml), which is in accordance with the literature data, which indicated that this is the main mechanism underlying antidepressant action of *H. perforatum*. Extracts of other examined species exhibited considerably weak inhibition of synaptosomal 5-HT reuptake, which implied that plasma concentrations necessary for therapeutic response can not be achieved *in vivo*.

Antioxidant potential of water-ethanol extracts of all selected species of the genus *Hypericum* was evaluated on the basis of the ability of the reduction of the

complex Fe^{3+} -tripiridyltriazin (FRAP assay), neutralization of ABTS^{*+} , superoxide radical anion, and DPPH radical, as well as the influence on the inhibition of lipid peroxidation. In most of the tests, extracts of species *H. acutum* and *H. maculatum* showed the highest antioxidant potential, and those extracts were found to be the richest in total phenols and tannins. The lowest antioxidant potential was shown by extracts of *H. barbatum*, *H. richeri* and *H. perforatum*. Antioxidant potential of *H. richeri* methanol extract, as well as its fractions, was also tested based on the effects on the inhibition of lipid peroxidation, neutralization of ABTS^{*+} and superoxide anion radical. The highest total antioxidant activity was shown by ethyl acetate fraction, while the lowest was for chloroform and water fractions. The ability of certain compounds from water-ethanol extracts of all seven *Hypericum* species, and of *H. richeri* methanol extract and its fractions to neutralize DPPH radical was investigated using post-column HPLC-DPPH derivatization. It was found that among all identified compounds only hypericin, pseudohypericin and I3, II8-biapigenin do not possess the ability to neutralize this radical.

Antimicrobial activity of water-ethanol extracts of all seven *Hypericum* species as well as of *H. richeri* methanol extract and its fractions, were tested by the agar diffusion and microdilution method against 16 microorganisms. The highest activity against all tested microorganisms was shown by *n*-butanol and ethyl acetate fraction of the methanol extract of *H. richeri* (MIC=0.12–0.13 mg/ml) and water-ethanol extract of *H. barbatum* (MIC=0.20–0.30 mg/ml). Antimicrobial activity of *H. richeri* and *H. perforatum* oil extracts was also tested against 11 microorganisms. Oil extract of *H. richeri* prepared by direct extraction of the dried herb with sunflower oil did not show antimicrobial activity in the tested range of concentrations (MIC>60 $\mu\text{l/ml}$), while the corresponding oil extract of *H. perforatum* inhibited only the growth of *C. albicans* at a concentration of 55 $\mu\text{l/ml}$. Activity against all tested microorganisms (MIC=40–60 $\mu\text{l/ml}$) was shown by two other types of oil extracts, and the best activity, especially against *C. albicans*, showed extract of *H. perforatum* obtained with prior maceration of herbs in ethanol followed by extraction with sunflower oil by heating.

All types of *H. perforatum* and *H. richeri* oil extracts, as well as dominant compounds quercetin and I3,II8-biapigenin were investigated for antiedematous activity in an experimental model of the acute carrageenan-induced rat paw edema, and for

gastroprotective activity in an experimental model of acute gastric mucosal damage in rats after *p.o.* administration. All extracts of *H. perforatum* showed better activity compared to the extracts of *H. richeri*. In both plant species, the most pronounced effect was shown by extracts obtained with prior maceration of herbs in ethanol followed by extraction with sunflower oil by heating. This extract of *H. perforatum* at the highest tested dose (1.25 ml/kg) showed statistically significant antiedematous effect compared to the reference drug indomethacin (95.24% compared to 61.90%), while the same extract of *H. richeri* showed two times lower antiedematous effect compared to indomethacin. Also, this extract of *H. perforatum* even at a dose of 0.75 ml/kg showed activity identical to gastroprotective reference drug ranitidine (gastric damage score 0.5), while extract of *H. richeri* showed weaker effect at the same dose (gastric damage score 0.9). Taking into the account that the isolated flavonoids quercetin and I3,II8-biapigenin demonstrated high antiedematous and gastroprotective effects, and that extracts with the highest quantity of these flavonoids expressed the highest activity, it could be assumed that quercetin and I3,II8-biapigenin contributes to these activities. Demonstrated antiedematous and gastroprotective activities of *H. perforatum* and *H. richeri* oil extracts represent a good basis for further investigations in order to justify the traditional use of *H. perforatum* oil extract, and open possibilities for the application of *H. richeri* oil extract in various inflammatory conditions and damage of the gastric mucosa.

Keywords: *H. richeri*, *H. perforatum*, *H. barbatum*, *H. hirsutum*, *H. androsaemum*, *H. acutum*, *H. maculatum*, chemical analysis, pharmacological profile.

Scientific research area: Pharmacy.

Specific scientific research area: Pharmacognosy.

UDK number: 581.192:582.824(043.3)

615.322(043.3)

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1 Rod <i>Hypericum</i> L. – mesto u sistematici, rasprostranjenje, opis	1
1.1.1 Zastupljenost vrsta roda <i>Hypericum</i> L. u Flori Evrope, Flori Srbije i Flori Crne Gore	2
1.1.2 Rasprostranjenje i opis vrste <i>Hypericum richeri</i> Vill.	7
1.1.3 Rasprostranjenje i opis vrste <i>Hypericum perforatum</i> L.	8
1.1.4 Rasprostranjenje i opis vrste <i>Hypericum barbatum</i> Jacq.	9
1.1.5 Rasprostranjenje i opis vrste <i>Hypericum hirsutum</i> L.	10
1.1.6 Rasprostranjenje i opis vrste <i>Hypericum androsaemum</i> L.	11
1.1.7 Rasprostranjenje i opis vrste <i>Hypericum acutum</i> Mnch.	12
1.1.8 Rasprostranjenje i opis vrste <i>Hypericum maculatum</i> Crantz.	13
1.2 Dosadašnja proučavanja sekundarnih metabolita odabranih vrsta roda <i>Hypericum</i>	14
1.3 Delovanje i primena odabranih vrsta roda <i>Hypericum</i>	21
2. CILJ	25
3. MATERIJAL I METODE	26
3.1 Aparatura	26
3.2 Biljni materijal	27
3.3 Izrada ekstrakata odabranih vrsta roda <i>Hypericum</i>	29
3.4 Određivanje sadržaja ukupnih hipericina u herbi i vodeno-etanolnim ekstraktima	32
3.5 Određivanje sadržaja ukupnih fenola u herbi i vodeno-etanolnim ekstraktima	32
3.6 Određivanje sadržaja tanina u herbi i vodeno-etanolnim ekstraktima	33
3.7 Izolovanje sekundarnih metabolita iz vrste <i>H. richeri</i>	34
3.8 Kvalitativna LC-UV-MS analiza ekstrakata odabranih vrsta roda <i>Hypericum</i>	39
3.9 Kvantitativna HPLC-UV analiza ekstrakata odabranih vrsta roda <i>Hypericum</i>	39
3.10 Kvalitativna i kvantitativna HPLC-UV analiza uljanih ekstrakata odabranih vrsta roda <i>Hypericum</i>	41
3.11 Ispitivanje sposobnosti inhibicije aktivnosti enzima MAO vodeno-etanolnih ekstrakata odabranih vrsta roda <i>Hypericum</i>	41
3.12 Ispitivanje sposobnosti inhibicije preuzimanja 5-HT vodeno-etanolnih ekstrakata odabranih vrsta roda <i>Hypericum</i>	43

3.13 Ispitivanje antioksidantne aktivnosti ekstrakata odabranih vrsta roda <i>Hypericum</i>	44
3.14 Ispitivanje antimikrobne aktivnosti ekstrakata odabranih vrsta roda <i>Hypericum</i>	48
3.15 Ispitivanje antiedematozne aktivnosti uljanih ekstrakata vrsta <i>H. perforatum</i> i <i>H. richeri</i>	51
3.16 Ispitivanje gastroprotektivne aktivnosti uljanih ekstrakata vrsta <i>H. perforatum</i> i <i>H. richeri</i>	52
4. REZULTATI I DISKUSIJA.....	54
4.1 Hemijska analiza	54
4.1.1 Sadržaj ukupnih hipericina u herbi i vodeno-etanolnim ekstraktima odabranih vrsta roda <i>Hypericum</i>	54
4.1.2 Sadržaj ukupnih fenola i tanina u herbi i vodeno-etanolnim ekstraktima odabranih vrsta roda <i>Hypericum</i>	56
4.1.3 Identifikacija flavonoida izolovanih iz vrste <i>H. richeri</i>	58
4.1.4 Uporedna kvalitativna i kvantitativna analiza metanolnog ekstrakta vrste <i>H. richeri</i> i njegovih frakcija (hloroformske, etilacetatne, <i>n</i> -butanolne i vodene).	87
4.1.5 Uporedna kvalitativna i kvantitativna analiza vodeno-etanolnih ekstrakata odabranih vrsta roda <i>Hypericum</i>	91
4.1.6 HPLC-UV analiza uljanih ekstrakata odabranih vrsta roda <i>Hypericum</i>	108
4.2 Farmakološka ispitivanja.....	111
4.2.1 Ispitivanje sposobnosti inhibicije aktivnosti enzima MAO i preuzimanja..	111
5-HT vodeno-etanolnih ekstrakata odabranih vrsta roda <i>Hypericum</i>	111
4.2.2 Ispitivanje antioksidantne aktivnosti ekstrakata odabranih vrsta roda <i>Hypericum</i>	117
4.2.3 Ispitivanje antimikrobne aktivnosti ekstrakata odabranih vrsta roda <i>Hypericum</i>	137
4.2.4 Ispitivanje antiedematozne aktivnosti uljanih ekstrakata vrsta <i>H. perforatum</i> i <i>H. richeri</i>	148
4.2.5 Ispitivanje gastroprotektivne aktivnosti uljanih ekstrakata vrsta <i>H. perforatum</i> i <i>H. richeri</i>	151
ZAKLJUČCI.....	153
LITERATURA	160

1. UVOD

1.1 Rod *Hypericum* L. – mesto u sistematici, rasprostranjenje, opis

Na osnovu morfoloških karakteristika, mesto roda *Hypericum* L. u sistematici biljaka je, u zavisnosti od izvora, predstavljano na različite načine:

- familija *Hypericaceae* Lindl., red Hypericales (1)
- familija *Hypericaceae* Lindl. (*Guttiferae* Juss.), red Theales (2)
- familija *Guttiferae* (*Chusiaceae*), red Guttiferales (3)
- familija *Guttiferae* (4,5).

U novije vreme je urađena filogenetika biljaka familije *Chusiaceae* (*Guttiferae*) na osnovu sekvence gena *rbcL*. Na osnovu ovog istraživanja, jedan od najvećih rodova ove familije, rod *Hypericum* L., svrstava se u tribus Hypericeae Choisy, a ovaj u podfamiliju Hypericoideae Engler (6).

Rod *Hypericum* L. obuhvata više od 450 vrsta koje rastu na svih pet kontinenata, u različitim uslovima spoljašnje sredine i širokog temperaturnog raspona. Vrste ovog roda uglavnom uspeavaju u umerenom pojasu severne hemisfere, ali ih ima i na području gde vlada tropska i subtropska klima (centralna i južna Amerika, Meksiko, istočna Afrika, jugoistočna Azija i severoistočna Australija), kao i u pojasevima umereno hladne klime u severnom delu Evrope, Azije i severne Amerike. Ne postoje podaci o prisustvu vrsta roda *Hypericum* u Amazoniji i u suvim oblastima holarktika (aralokaspijskoj niziji, centralnoj Aziji, Sahari, sunčanim pustinjama), dok je u Maleziji zabeležen mali broj vrsta. Maksimalna nadmorska visina na kojoj vrste roda *Hypericum* mogu da uspeavaju varira od 2000 m pa čak i do 4000 m (u Etiopiji, tropskoj istočnoj Africi, Kongu, Juanu, Venecueli, na istočnim Himalajima). Jedan od centara rasprostranjenja roda sa preko 140 vrsta i većim brojem podvrsta nalazi se u Mediteranu i Maloj Aziji (7).

Biljne vrste roda *Hypericum* L. su najčešće višegodišnje, ređe jednogodišnje, zeljaste biljke ili žbunovi. Stabljike su ovalnog oblika ili sa istaknutim uzdužnim prugama koje ponekad mogu da budu u vidu krila. Listovi su sedeći ili na kratkim

drškama, često sa prozirnim i crnim tačkama. Cvetovi su na vrhu izdanka grupisani u štitoliku cvast ili u grozdaste ili razgranate metlice. Čašični listići se zadržavaju na plodu. Krunični listići su žute do zlatastožute boje. Plod je čaura ili bobica. Po površini ploda javljaju se uljani rezervoari u obliku ovalnih ili eliptičnih bradavica ili kao istaknute uzdužne paralelne pruge. Semena su sitna sa neravnom površinom (2).

Karakteristično je prisustvo šizogenih sekretornih šupljina u listovima u vidu tamnih ili providnih tačaka. Sekretorni kanali su prisutni u floemu, ponekad i u primarnoj kori, periciklu i srži stabla, kao i u lisnim drškama i nervaturi lista. Listovi su uglavnom dorzoventralni sa stomama od kojih je svaka okružena sa po dve ili više ćelija. Na poprečnom preseku stabla se vide prstenovi ksilema i floema koji su ispresecani uskim, dobro definisanim sržnim zracima. Sekretorne ćelije se nalaze u kori, floemu i srži. U periciklu se nalazi prsten sklerenhimskih vlakana koji je obično zatvoren. Kristali Ca-oksalata mogu da budu prisutni (8).

1.1.1 Zastupljenost vrsta roda *Hypericum* L. u Flori Evrope, Flori Srbije i Flori Crne Gore

Prema Robsonu (1968) u flori Evrope zabeležena je 61 vrsta roda *Hypericum* L., u okviru 18 sekcija (zvezdicom su označene endemične vrste) (3):

1. Sekcija *Eremanthe* (Spach) Endl.

- *H. calycinum* L.

2. Sekcija *Androsaemum* (Duh.) Godron

- *H. foliosum* Aiton *

- *H. hircinum* L. (*Androsaemum hircinum* (L.) Spach)

- *H. inodorum* Miller (*H. elatum* Aiton)

- *H. androsaemum* L. (*Androsaemum officinale* All.)

3. Sekcija *Psorophytum* (Spach) Endl.

- *H. balearicum* L. *

4. Sekcija *Triadenia* (Spach) R. Keller

- *H. aciferum* (W. Greuter) N. K. B. Robson * (*Elodes acifera* W. Greuter)

- *H. aegypticum* L. (*Triadenia maritima* (Sieber) Boiss.)

5. Sekcija **Coridium** Spach.

- *H. empetrifolium* Willd.
- *H. amblycalyx* Coust. & Gand.
- *H. coris* L. *
- *H. ericoides* L.
- *H. jovis* Greuter *

6. Sekcija **Haplophylloides** Stefanov.

- *H. haplophylloides* Halácsy & Bald. *

7. Sekcija **Taeniocarpum** Jaub. & Spach

- *H. hirsutum* L. (*H. confertum* Choisy)
- *H. linaroides* Bosse
- *H. pulchrum* L.
- *H. nummularium* L. *
- *H. fragile* Heldr. & Sart. ex Boiss. *
- *H. taygeteum* Quézel & Contandr. *

8. Sekcija **Drosanthe** (Spach) Endl.

- *H. hyssopifolium* Chaix in Vill.

9. Sekcija **Olympia** (Spach) Endl.

- *H. olympicum* L. (*H. dimonieii* Velen.)
- *H. polyphyllum* (Boiss. & Balansa)

10. Sekcija **Campylopus**

- *H. cerastoides* (Spach) N. Robson (*H. rhodoppeum* Friv., *Campylopus cerastoides* Spach)

11. Sekcija **Adenosepalum** Spach

- *H. montanum* L.
- *H. annulatum* Moris (*H. atomarium* subsp. *degenii* (Bornm.) Hayek)
- *H. delphicum* Boiss. & Heldr. in Boiss. *
- *H. athoum* Boiss. & Orph. in Boiss. *
- *H. atomarium* Boiss.

- *H. cuisinii* W. Barbey
- *H. tomentosum* L.
- *H. pubescens* Boiss.
- *H. caprifolium* Boiss. *

12. Sekcija **Elodes** (Adanson) Koch

- *H. elodes* L. (*H. palustre* Salisb., *Elodes palustris* Spach) *

13. Sekcija **Drosocarpium** Spach

- *H. vesiculosum* Griseb. *
- *H. perfoliatum* L. (*H. ciliatum* Lam.)
- *H. montbretii* Spach (*H. cassium* Boiss.)
- *H. bithynicum* Boiss. (*H. confusum* Vandas)
- *H. setiferum* Stef.*
- *H. richeri* Vill. *
- *H. spruneri* Boiss. (*H. perfoliatum* sensu Hayek pro parte, non L.)
- *H. rochelii* Griseb. & Schenk * (*H. boissieri* Petrović, *H. pseudotenellum* Vandas)
- *H. barbatum* Jacq. *
- *H. rumeliacum* Boiss. *
- *H. trichocaulon* Boiss. & Heldr. in Boiss. *
- *H. kelleri* Bald.

14. Sekcija **Origanifolium** Stefanov

- *H. aviculariifolium* Jaub. & Spach Sect. **Thasia** Boiss
- *H. thasium* Griseb. *

15. Sekcija **Oligostema** (Boiss.) Stefanov

- *H. aucheri* Jaub. & Spach (*H. apterum* Velen., *H. jankae* Nyman)
- *H. linarifolium* Vahl
- *H. australe* Ten.
- *H. humifusum* L.

16. Sekcija **Hypericum**

- *H. tetrapterum* Fries (*H. quadrangulum* L., *H. acutum* Moench; incl. *H. corsicum* Steudel)

- *H. undulatum* Willd.
- *H. maculatum* Crantz (*H. quadrangulum* auct., non L.)
- *H. perforatum* L. (*H. noeanum* Boiss.)
- *H. triquetrifolium* Turra (*H. crispum* L.)
- *H. elegans* Stephan ex Willd
- *H. umbellatum* A. Kerner*

17. Sekcija **Brathys** (Mutis ex L. fil.) Choisy

- *H. gymnanthum* Engelm. & A. Gray
- *H. mutilum* L.
- *H. majus* (A. Gray) Britton
- *H. canadense* L.
- *H. gentianoides* (L.) Britton, E. E. Sterns & Poggenb.

U flori Srbije je zastupljeno 19 vrsta ovog roda (2):

1. *H. androsaemum* L. (*Androsaemum officinale* All.)
2. *H. olympicum* L.
3. *H. hirsutum* L. (*H. atomarium* var. *angustifolium* Form.)
4. *H. hyssopifolium* Vill. (*H. hyssopifolium* Vill. subsp. *euhyssopifolium* Hayek)
5. *H. atomarium* Boiss.
6. *H. montanum* L.
7. *H. humifisum* L.
8. *H. repens* L.
9. *H. maculatum* Crantz (*H. quadrangulum* L., *H. commutatum* Schur)
10. *H. acutum* Mneh. (*H. tetrapterum* Fries)
11. *H. transsilvanicum* Čel.
12. *H. perforatum* L. (*H. plasoni* Form.)
13. *H. elegans* Stephan (*H. kohlianum* Spr.)
14. *H. umbellatum* A. Kerner
15. *H. alpinum* W.K. (*H. alpigenum* Kit.)
16. *H. richeri* Vill. (*H. rochellii* Hayek)
17. *H. boissieri* Petrov. (*H. rochellii* Gris. et Schenk)
18. *H. rumelicum* Boiss. (*H. barbatum* var. *adscendens* Gris.)

19. *H. barbatum* Jacq. (*H. ilicianum* Form.).

Staništa na kojima rastu vrste roda *Hypericum* su vrlo raznolika. To mogu biti različiti tipovi livada, šuma i šibljaka, šumske čistine, požarišta, suva mesta i kamenjari, peščani ili pak močvarni tereni, ili mesta pored reka i potoka. Mogu se naći kako na manjim (nizije), tako i na većim nadmorskim visinama (brdsko-planinski pojas). Tereni na kojima ove vrste rastu su uglavnom krečnjačkog sastava, ali mogu biti i serpentinske podloge ili vlažno zemljište.

Neke od vrsta roda *Hypericum* su retke na teritoriji Srbije. Tako na primer, vrsta *H. androsaemum* L. raste u brdsko-bukovim šumama, na područjima u zapadnoj Srbiji, Podrinju oko Krupnja, na Ceru i Gučevu, dok vrsta *H. elegans* Stephan raste samo u južnom Banatu na području Deliblatske peščare. Vrsta *H. hyssopifolium* Vill. je vrlo retka, nađena je samo u istočnoj Srbiji na Crnom vrhu, kod Žagubice, i na planini Stol kod Bora. Vrste *H. olympicum* L., *H. humifisum* L. i *H. transsilvanicum* Čel. su takođe vrlo retke na teritoriji Srbije (2).

U flori Crne Gore zabeležene su sledeće vrste roda *Hypericum* (4):

1. *H. perforatum* L.
2. *H. maculatum* Cr. subsp. *quadrangulum* (Tourlet) Hay.
3. *H. acutum* Mch.
4. *H. hirsutum* L.
5. *H. montanum* L.
6. *H. grisebachii* Boiss. var. *quadrystylum* Bošnjak
7. *H. alpinum* W. K.
8. *H. barbatum* Jacq.

1.1.2 Rasprostranjenje i opis vrste *Hypericum richeri* Vill.



Slika 1.1 *Hypericum richeri*

Vrsta *H. richeri* raste po šumama i livadama, na skeletnoj krečnjačkoj podlozi i na eksponiranim terenima, uglavnom planinskog pojasa. Može se naći u južnoj i jugoistočnoj Evropi. U Srbiji raste na Kopaoniku, Goliji, Rtnju, Svrljiškim planinama, Suvoj planini i Sićevačkoj klisuri.

H. richeri spada u višegodišnje biljke. Stabljika je visoka 15-40 cm, uspravna ili pri osnovi malo polegla, a pri vrhu sa dve uzdužne pruge. Listovi su dužine 10-40 mm, duguljasti do trouglasto-jajasti ili eliptični, obično oko sredine najširi, na vrhu zatupasti, a pri osnovi plitko srcasto usečeni, sedeći, i ponekad poluobuhvataju stabljiku. Nemaju prozirne tačke, a crne tačke najčešće nisu prisutne. Cvetovi su u metličastim štitolikim cvastima. Čašični listići su lancetasti do lancetasto-jajasti, zašiljeni, po površini sa brojnim crnim tačkama i crticama, po obodu obično sa dugim žlezdanim resama. Rese su kraće od širine čašičnih listića. Krunični listići su duplo duži od čašičnih, sa crnim tačkama po površini i kratkim žlezdanim dlakama po obodu. Čaura je sa bradavičastim uljanim rezervoarima (2).

1.1.3 Rasprostranjenje i opis vrste *Hypericum perforatum* L.



Slika 1.2 *Hypericum perforatum*

Jedna od najpoznatijih i najbolje proučenih vrsta ovog roda, kako u pogledu hemijskog sastava, tako i u pogledu bioloških aktivnosti, je vrsta *H. perforatum* koja je dobro prilagođena životu na različitim staništima i u različitim klimatskim uslovima. Prirodna staništa ove vrste se nalaze u Evropi, zapadnoj Aziji i severnoj Africi, ali je uspešno preneti i odmaćena i u ostalom delu Azije, južne Afrike, severne i južne Amerike, Australije, pa čak i na Aljasci. Podloga može biti suva, kamenita ili peščana sa rasponom pH vrednosti od 4,3 do 7,6 (9).

Vrsta *H. perforatum* je višegodišnja biljka sa vretenastim i jako razgranatim korenom. Stabljika je visoka (10) 20-100 cm, gola, uspravna, obično pri vrhu razgranata, ovalna, sa dve istaknute uzdužne pruge. Listovi su dužine 5-30 mm, jajasti, duguljasti ili linearni, zatupasti ili sa kratkim šiljastim vrhom, sedeći ili skoro sedeći, goli, i po površini sa brojnim prozirnim tačkama, po obodu ponekad i po površini sa crnim. Cvetovi su u razgranatoj, širokoj štitolikoj cvasti. Čašični listići su jajasto lancetasti, lancetasti do linearni, sa šiljastim vrhom, po obodu najčešće celi, a ređe nazubljeni, nisu dlakavi, po površini sa većim ili manjim brojem prozirnih ili crnih

tačka ili crtica. Čaura je sa bradavičastim uljanim rezervoarima. Seme je po površini sa sitnim bradavicama, crne ili tamnobraon boje (2).

1.1.4 Rasprostranjenje i opis vrste *Hypericum barbatum* Jacq.



Slika 1.3 *Hypericum barbatum*

Vrsta *H. barbatum* raste na suvim livadama, pašnjacima, šumskim čistinama, kamenjaru, u svetlim borovim šumama, u brdskom, subalpskom i alpskom pojasu, uglavnom na terenima sa serpentinskom podlogom. Može se naći u jugoistočnoj Evropi, uglavnom na Balkanskom poluostrvu, a javlja se i u Mađarskoj, Austriji i južnoj Italiji.

H. barbatum je višegodišnja biljka. Stabljika je 10-45 cm visoka, uspravna ili se izdiže, ovalna, ponekad sa dve uzdužne pruge, i gola sa plavičastom prevlakom. Listovi su dužine 6-40 mm, lancetasti do jajasto-lancetasti, zašiljeni, pri osnovi zaobljeni, po obodu malo uvijeni, sedeći ili na kratkim drškama. Na naličju su po obodu po celoj površini prisutne crne i prozirne tačke. Cvetovi su na vrhu stabljike, najčešće u zbijenoj štitolikoj cvasti. Čašični listići su dugi oko 8 mm, trouglasto-lancetasti, zašiljeni, po površini sa brojnim crnim tačkama i crticama, po obodu sa dugačkim resama bez žlezda. Rese su obično duge koliko iznosi širina čašičnih listića. Krunični listići su dužine oko

10 mm, obrnutojajasti do linearno-lancetasti, po obodu celi ili na vrhu sa trepljama. Po površini se nalaze crne tačke. Čaura je jajasta, dužine 6-9 mm, skoro glatka, ili sa bradavičastim uljanim rezervoarima. Seme je cilindrično, malo povijeno sa uzdužnim prugama, svetlobraon boje (2).

1.1.5 Rasprostranjenje i opis vrste *Hypericum hirsutum* L.



Slika 1.4 *Hypericum hirsutum*

Vrsta *H. hirsutum* raste u hrastovim i bukovim šumama brdskog pojasa, na šumskim čistinama, na mezofilnim livadama, a na većoj nadmorskoj visini i na suvljim livadama. Najčešće se javlja pojedinačno. Rasprostranjena je u Evropi, zapadnoj i srednjoj Aziji, na Kavkazu i u severozapadnoj Africi. U Srbiji se može naći u brdskom pojasu Šumadije, Tare, Suve planine, Majdanpečke domene, na Avali i na Fruškoj Gori.

H. hirsutum je višegodišnja biljka sa horizontalnim rizomom. Stabljika je visoka 35-100 cm, uspravna, ovalna, nije granata, ili je sa kratkim granama. Zajedno sa lisnim drškama i cvetnim peteljčkama je gusto pokrivena kratkim, kovrdžavim dlakama. Listovi su dužine 25-60 mm, jajasti do eliptični, na kratkim drškama, i na vrhu zatupasti. S lica su tamnije, a s naličja svetlije zelene boje, sa obe strane sa kratkim beličastim dlakama i

malobrojnim prozirnim tačkama. Cvetovi su smešteni u rastresitoj, piramidalnoj cvasti. Čašični listići su dužine 4-5 mm, izduženo lancetasti, zašiljeni, po obodu zupčasti ili sa trepljama na vrhu kod kojih se nalaze crne žlezde. Krunični listići su dužine 8-11 mm, jajasto izduženi, na vrhu sa malim brojem crnih tačaka. Čaura je duga oko 8 mm, jajasta sa uzdužnim istaknutim uljanim rezervoarima. Seme je cilindrično, po površini bradavičasto, crvenkastomrke boje (2).

1.1.6 Rasprostranjenje i opis vrste *Hypericum androsaemum* L.



Slika 1.5 *Hypericum androsaemum*

Vrsta *H. androsaemum* raste u mezofilnim šumama i šibljacima, na vlažnom dubokom zemljištu. U Evropi je rasprostranjena na području Atlantika i zapadnom delu Sredozemlja, a može se naći i u severnoj Africi i Maloj Aziji. U Srbiji je ovo retka vrsta, i može se naći u Podrinju oko Krupnja, na Ceru, Gučevu, u brdskoj, bukovoj šumi.

H. androsaemum je polužbun visok 30-100 cm. Donji odrvenjeni deo stabljike je razgranat, a na njemu se razvijaju uspravni, razgranati i zeljasti izdanci koji su goli i imaju dve istaknute uzdužne pruge. Listovi su goli, 3-15 cm dugi, široko jajasti, ređe lancetasto jajasti, a pri osnovi zaobljeni, sedeći, i poluobuhvataju stabljiku. S lica su zeleni, a s naličja plavičasto sivozeleni. Na vrhu izdanka je prisutan manji broj cvetova u štitolikoj cvasti. Cvetovi su krupni, čašični listići su izduženo jajasti, dugi 8-12 (15) mm, po obodu celi, a na vrhu zatupasti, dok su krunični listići malo duži od čašičnih,

objajasti i žuti. Prašnici su srasli u najmanje 5 snopića. Plod je cilindrično-eliptična do loptasta crna bobica, duga 7-10 mm. Seme je nepravilno grubo izbrazdano (2).

1.1.7 Rasprostranjenje i opis vrste *Hypericum acutum* Mch.



Slika 1.6 *Hypericum acutum*

Vrsta *H. acutum* pretežno raste na vlažnim mestima, kako na manjoj, tako i na većoj nadmorskoj visini pored reka, potoka, na močvarnim terenima, na vlažnim livadama, u šumama topole i vrbe, u šibljacima jove, topole i vrbe. Može se naći u Evropi, srednjoj i zapadnoj Aziji i severozapadnoj Africi. U Srbiji je zastupljena pored Morave (Smederevska Palanka), podnožju Suve planine, na Kopaoniku, na vlažnim mestima Deliblatske peščare, na Fruškoj Gori uz potoke i na vlažnim mestima.

H. acutum je višegodišnja biljka. Stabljika je (10) 20-100 cm visoka, uspravna ili se izdiže, ređe polegla, nije dlakava, ima 4 uzdužne pruge, a obično se dve jače ističu i razvijene su kao krila. Listovi su dužine 1-35 mm, okruglasti, jajasti do široko-eliptični, na vrhu obično zatupasti, sedeći, poluobuhvataju stabljiku, po površini sa brojnim prozirnim tačkama, a po obodu sa crnim. Cvetovi su u gustim štitolikim cvastima. Čašični listići su dužine 4-5 mm, lancetasti do uzano lancetasti, šiljati, po obodu celi, a po površini sa prozirnim tačkama i crticama, i po nekom crnom tačkom. Krunični listići

su dužine 5-8 mm, eliptični, pri osnovi obično sa jedne strane malo dublje ovalno usečeni, sa prozirnim tačkama, a na vrhu mogu imati i nekoliko crnih. Čaura je jajasta, sa istaknutim uzdužnim uljanim rezervoarima. Seme je cilindrično sa sitnim bradavicama (2).

1.1.8 Rasprostranjenje i opis vrste *Hypericum maculatum* Crantz.



Slika 1.7 *Hypericum maculatum*

Vrsta *H. maculatum* pretežno raste u planinskom području po livadama sa dubokim humusnim zemljištima, šumskim četinarima, po obodu bukovo-jelovih šuma, a i na livadama brdskog pojasa. Rasprostranjena je po celoj Evropi i zapadnoj Aziji.

H. maculatum je višegodišnja biljka. Stabljika je visine 15-60 (100) cm, uspravna ili se izdiže, sa četiri uzdužne istaknute pruge. Listovi su dugi 10-40 mm, jajasti, jajasto izduženi ili eliptični, na vrhu zatupasti i sedeći. S lica su tamnozeleni, a s naličja svetlozeleni, sa gustom mrežastom nervaturom. Po obodu imaju crne tačke, ređe i po celoj površini. Prozirne tačke se vrlo retko javljaju. Na vrhu stabljike je manji broj cvetova sakupljen u štitolikoj cvasti (dihazijum). Čašični listići su jajasti ili izduženi, zatupasti ili malo zašiljeni, po obodu celi ili pri vrhu nazubljeni. Po površini imaju

prozirne tačke, a mogu imati i manji broj crnih. Krunični listići su jajasto ovalni, tri puta duži od čašičnih, zlatnožute boje sa prozirnim tačkama, ili sa prozirnim i crnim tačkama i crticama. Ponekad su crne tačke samo po obodu. Čaura je sa istaknutim uzdužnim, paralelnim uljanim rezervoarima. Seme je cilindrično sa sitnim bradavicama, svetlo- do tamnobraon boje (2).

1.2 Dosadašnja proučavanja sekundarnih metabolita odabranih vrsta roda *Hypericum*

Hypericum richeri Vill.

Na osnovu HPLC-UV analize, u vrsti *H. richeri* je utvrđeno prisustvo flavonoidnih glikozida rutina, hiperozida, kvercitrina i izokvercitrina, flavonoidnog aglikona kvercetina, naftodiantrona hipericina i pseudohipericina, 3-*O*-kafeoilhina kiseline kao i floriglucinolnog derivata hiperforina (10,11,12).

Sastav etarskog ulja vrste *H. richeri* veoma zavisi od geografskih faktora (13). Tako su, na primer, glavni sastojci etarskog ulja biljaka sakupljenih u jugoistočnoj Srbiji fenilpropensko jedinjenje (*E*)-anetol (9,5%), alkan *n*-nonan (7,9%) i seskviterpeni globulol (9,4%) i kariofilen-oksidi (7,1%) (14). S druge strane, glavni sastojci uzoraka iz centralne Italije su seskviterpenski alkan germakren D (26,9%) i monoterpenski ugljovodoni (*Z*)- β -ocimen (11,2%) koji nisu prisutni u uzorcima iz Srbije (13).

Hypericum perforatum L.

H. perforatum (kantaron, bogorodičina trava, gospina trava, gospino zelje) predstavlja do sada najbolje izučenu vrstu roda *Hypericum*. Nadzemni deo ove biljke sadrži veliki broj različitih klasa sekundarnih metabolita (15):

- naftodiantroni (0,1-0,15%) – hipericin, pseudohipericin, protohipericin i protopseudohipericin (lokalizovani su u sekretornim žlezdama prisutnim na listovima i cvetovima);
- prenilovani floroglucinoli (do 6%) – hiperforin i adhiperforin;
- flavonoidi (2-4%) – aglikoni: kvercetin, luteolin, kemferol; biflavonoidi: I3,II8-biapigenin i amentoflavon; flavonoidni glikozidi: rutin, hiperozid, kvercitrin, izokvercitrin;
- fenolkarboksilne kiseline (oko 0,1%) – kafena kiselina, 3-*O*-kafeoilhina kiselina, 3,4,5-*O*-trikafeoilhina kiselina i 1,3,5-*O*-trikafeoilhina kiselina (16);
- ksantoni (0,15-0,72%) – najzastupljeniji je 1,3,6,7-tetrahidroksiksanton (17);
- katehinski tanini i proantocijanidini (6,5-15%) (18). Najzastupljeniji su procijanidini A2, B1, B2, B3, B5, B7 i C1 (19);
- etarsko ulje (oko 0,1%) – glavni sastojci su alifatični ugljovodonici (kao što su 2-metiloktan, undekan), dodekanol, 2-metil-3-buten-2-ol, monoterpeni (α -pinen), seskviterpeni (β -kariofilen) (20).

Najznačajnijim aktivnim principima kantariona, koji su odgovorni za većinu farmakoloških efekata, smatraju se floroglucinoli, flavonoidi i naftodiantroni. Sadržaj pojedinih jedinjenja uslovljen je genetskim varijacijama, a varira i u zavisnosti od perioda žetve i ekoloških uslova. Tako je, na primer, utvrđeno da je sadržaj rutina najveći u fazi butonizacije, dok je sadržaj kvercitrina, kvercetina i I3,II8-biapigenina najveći u fazi punog cvetanja kantariona. Sadržaj hipericina je sličan u obe faze razvoja biljke (21). I pored varijacija u hemijskom sastavu, oko 20% ekstrakta kantariona čine biološki aktivna jedinjenja (22).

Herba kantariona, *Hyperici herba* oficinalna je u Evropskoj farmakopeji počev od III izdanja (23). Prema monografiji Evropske farmakopeje, uključujući i njeno sedmo izdanje (Ph. Eur. 7.0), sadržaj ukupnih naftodiantrona (tzv. hipericina) izražen kao hipericin treba da iznosi najmanje 0.08%. U Ph. Eur. 7.0 oficinalan je i suvi kvantifikovani ekstrakt herbe kantariona (*Hyperici herbae extractum siccum quantificatum*) u kome sadržaj ukupnih hipericina izražen kao hipericin treba da iznosi 0,10-0,30%, sadržaj flavonoida izražen kao rutin najmanje 6,0% i sadržaj hiperforina najviše 6,0% (24).

Hypericum barbatum Jacq.

U metanolnom ekstraktu ove biljne vrste su LC-MS/MS metodom detektovani hiperozid, kvercitrin, izokvercitrin, kvercetin, hiperforin, pseudohipericin i hipericin. Sadržaj hipericina u vrsti *H. barbatum* je bio značajno viši (3,9 puta) nego u *H. perforatum* (11,25).

U etarskom ulju vrste *H. barbatum* kao glavne komponente su detektovani α -pinen, β -pinen, limonen, (*E*)-kariofilen i kariofilen-oksidi (26).

Hypericum hirsutum L.

Od sekundarnih metabolita su u ovoj biljnoj vrsti LC-MS-MS i HPLC-UV metodama detektovani rutin, hiperozid, kvercitrin, izokvercitrin, kvercetin, I3,I18-biapigenin, 3-*O*-kafeoilhina kiselina, hiperforin, pseudohipericin i hipericin (27,28,29). Flavonoidni *C*-glikozidi orijentin i njegov acetil derivat su takođe detektovani u ovoj biljnoj vrsti (30).

Glavni sastojci etarskog ulja vrste *H. hirsutum* su *n*-undekan (32,2%), pačulen (11,8%) i kariofilen-oksidi, koji nisu značajno zastupljeni u etarskim uljima ostalih ispitivanih vrsta roda *Hypericum* (31).

Hypericum androsaemum L.

HPLC-UV metodom su u ovoj biljnoj vrsti od polifenolnih jedinjenja detektovani kvercitrin, hiperozid, izokvercitrin, kemferol, kvercetin, kvercetin 3-*O*-arabinozid, kvercetin 3-sulfat, 3-*O*-kafeoilhina kiselina i 5-*O*-kafeoilhina kiselina (28,32).

Za koren vrste *H. androsaemum* je karakteristično prisustvo ksantonskog *C*-glikozida mangiferina (33), kao i ostalih ksantonskih derivata, kao što su 2-hidroksi-5-metoksiksanton, 3-hidroksi-2,5-dimetoksiksanton, 3-hidroksi-2-metoksiksanton, 1,5,6-trihidroksi-3-metoksiksanton, 1,3,5,6-tetrahidroksiksanton, i 1,3,6,7-tetrahidroksiksanton, zatim 1,3,6,7-tetrahidroksi-8-prenilksanton, i ksantonolignan kjelkorin (34).

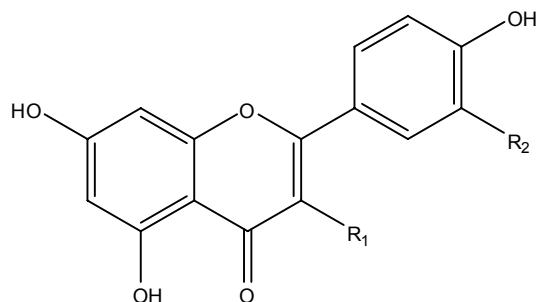
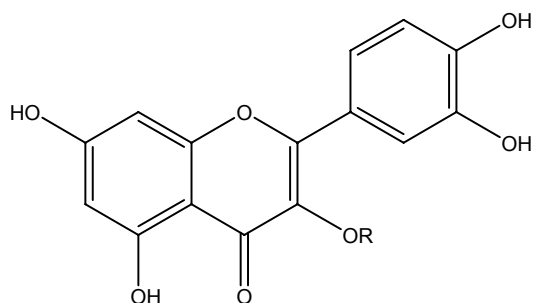
Glavni sastojci etarskog ulja lista ove biljne vrste su kariofilen-oksidi (35,8%), triciklični seskviterpenski ugljovodonik išvaran (30,5%) i humulen-epoksid II (5,6%), dok su u etarskom ulju cveta zastupljeni α -gvajen (40,2%) i kariofilen-oksidi (28,0%) (35).

Hypericum maculatum Crantz.

U metanolnom ekstraktu vrste *H. maculatum* je na osnovu HPLC-UV analize utvrđeno prisustvo 3-O-kafeoilhina kiseline, hiperozida, kvercitrina, izokvercitrina, kvercetina, I3,II8-biapigenina, pseudohipericina i hipericina. Takođe je dokazano da hiperforin nije prisutan u ovoj biljnoj vrsti (11,36,37).

Etarsko ulje vrste *H. maculatum* se sastoji od velikog broja komponenti prisutnih u malom procentu. Samo je pet jedinjenja bilo u koncentraciji višoj od 5%: β -farnezen (10,0%), *n*-undekan (8,2%), β -kariofilen (7,6%), δ -kadinen (7,2%) i γ -muurolen (5,2%) (38).

Hemijski sastav vrste *H. acutum* Mnch. nije do sada detaljnije ispitan. Rutin, hiperozid, kvercitrin, kvercetin, kafena i 3-O-kafeoilhina kiselina su detektovani jedino primenom tankoslojne hromatografije (39).



R = -H

Kvercetin

R₁ = -H

R₂ = -OH

Luteolin

R = β-D-Gal-

Hiperozid

R₁ = -OH

R₂ = -H

Kemferol

R = α-L-Rha-

Kvercitrin

R = β-D-Glc-

Izokvercitrin

R = 6-O-(α-L-Rha)-β-D-Glc-

Rutin

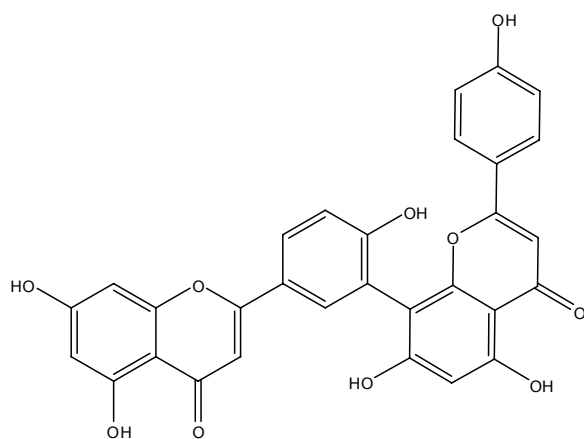
R = α-L-Ara-

Kvercetin 3-arabinozid

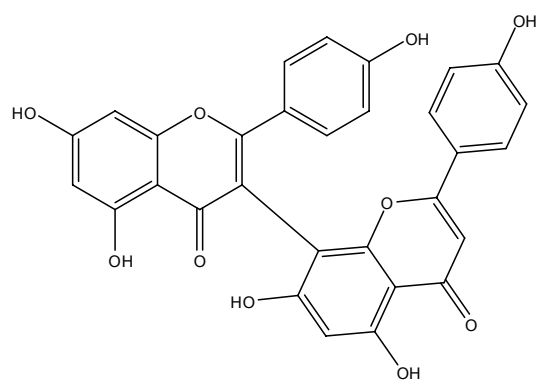
R = -SO₃H

Kvercetin 3-sulfat

Slika 1.8 Flavonoidi zastupljeni u odabranim vrstama roda *Hypericum*

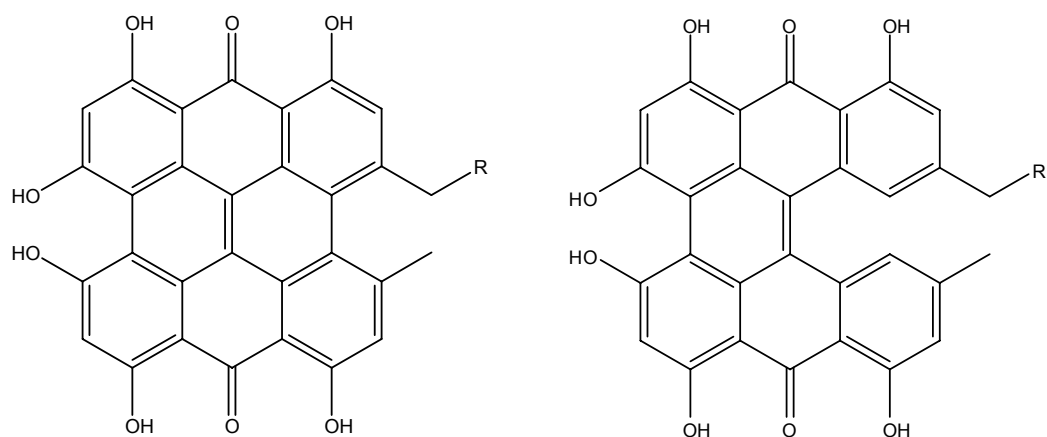


Amentoflavon



13,118-Biapigenin

Slika 1.9 Biflavonoidi zastupljeni u odabranim vrstama roda *Hypericum*



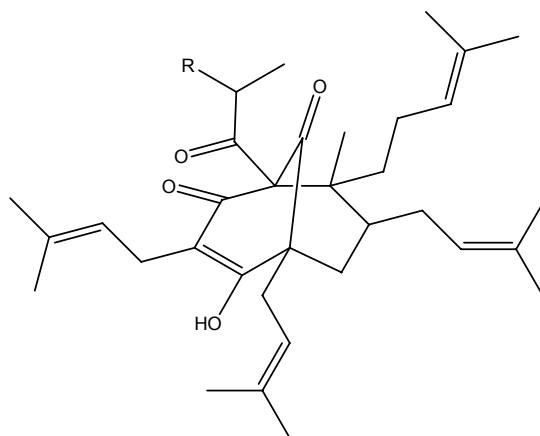
R = -H Hipericin

R = -OH Pseudohipericin

R = -H Protohipericin

R = -OH Protopseudohipericin

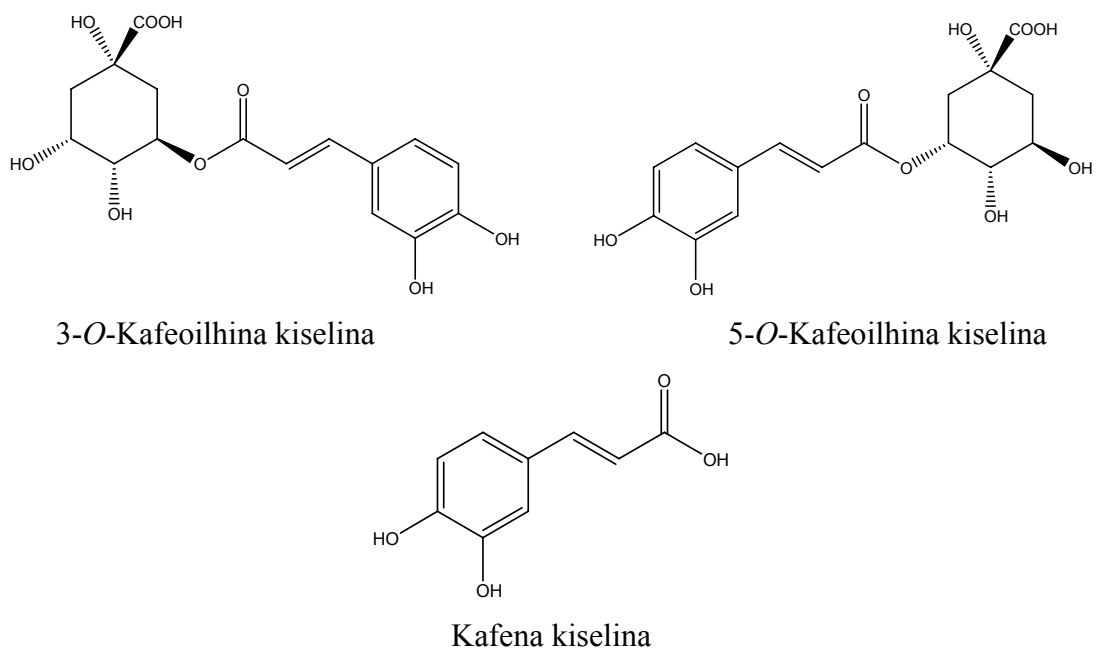
Slika 1.10 Naftodiantroni zastupljeni u odabranim vrstama roda *Hypericum*



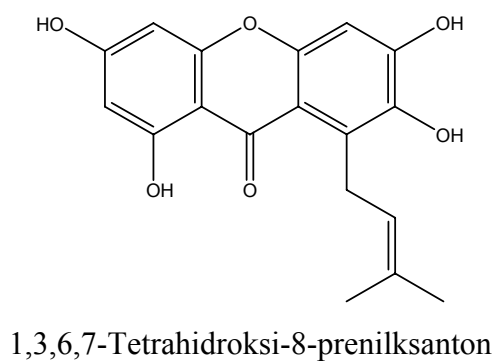
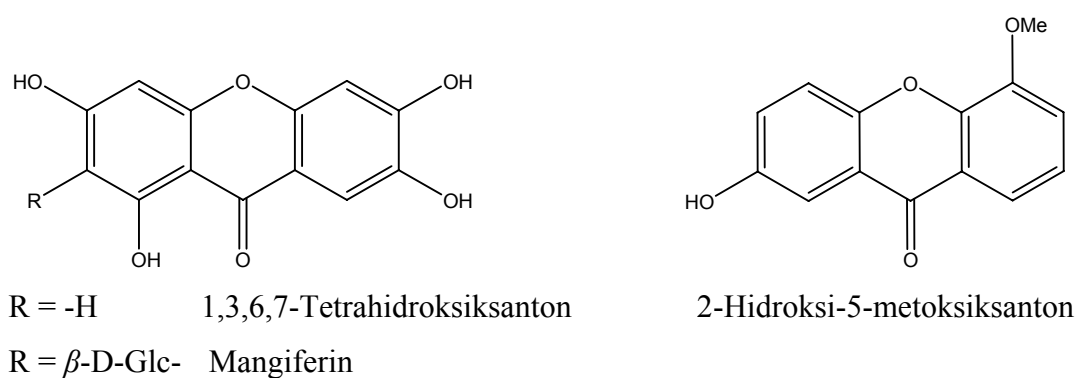
R = -H Hiperforin

R = -CH₃ Adhiperforin

Slika 1.11 Prenilovani floroglucinoli zastupljeni u odabranim vrstama roda *Hypericum*



Slika 1.12 Fenolkarboksilne kiseline zastupljene u odabranim vrstama roda *Hypericum*



Slika 1.13 Ksantoni zastupljeni u odabranim vrstama roda *Hypericum*

1.3 Delovanje i primena odabranih vrsta roda *Hypericum*

Od vrsta roda *Hypericum* najveći terapijski značaj ima *H. perforatum* (kantaron, bogorodičina trava, gospina trava, gospino zelje). Vršni delovi kantariana u cvetu se najčešće koriste u obliku čaja, suvih i tečnih vodeno-etanolnih ekstrakata i uljanih ekstrakata. Za herbu kantariana pokazano je da ispoljava antidepresivno, antibakterijsko, antivirusno, antioksidantno, antiinflamatorno, antiulkusno i adstringentno delovanje (40,41,42,43,49,58,61).

U narodnoj medicini kantaron se oralno koristi za lečenje depresivnih poremećaja, anksioznosti, mentalne uznemirenosti, bronhitisa, astme, čira na želucu, gastritisa, dijareje. Spolja se uglavnom koristi u obliku uljanog ekstrakta (tzv. kantaronovo ulje, *Oleum Hyperici*) kao sredstvo koje poboljšava zarastanje rana od opekotina i povreda, kod čireva na koži, kao i za ublažavanje tegoba koje prate hemoroide i mialgije (44,45,46,47,48,49). Kantaronovo ulje se tradicionalno koristi i oralno kod poremećaja varenja, za umirenje preosetljivog želuca i kod ulkusa želuca (44,45,46,50). Najčešće se izrađuje maceracijom sveže herbe kantariana na sunčevoj svetlosti, obično u maslinovom ili suncokretovom ulju, u trajanju od 40 dana. Kao glavne komponente kantaronovog ulja identifikovani su hiperforin i njegovi derivati, kao i flavonoidni aglikoni kvercetin i I3,II8-biapigenin (51,52). Uprkos dugotrajnoj tradicionalnoj upotrebi kantaronovog ulja, do sada je sproveden samo mali broj farmakoloških ispitivanja koja se uglavnom odnose na njegovu spoljašnju primenu. Lavagna i saradnici su utvrdili pozitivno delovanje kombinacije uljanih ekstrakata herbe kantariana i cvasti nevena na epitelizaciju kože kod hiruških rana nastalih prilikom porođaja carskim rezom (53). Süntar i saradnici su dokazali da uljani ekstrakt kantariana u maslinovom ulju pokazuje značajan pozitivan efekat na zarastanje rana kao i antiinflamatorno delovanje u *in vivo* uslovima (54). Peeva-Naumovska i saradnici su ispitivali delovanje tri masti sa 30%, 40% i 50% kantaronovog ulja, pogodnih za dermalnu ili vaginalnu primenu, na šest bakterijskih sojeva (*Streptococcus pyogenes* - 2 soja, *S. viridans*, *Micrococcus luteus*, *Moraxella catarrhalis* i *Lactobacillus acidophilus*). Ispitivani proizvodi su pokazali dozno-zavisnu antibakterijsku aktivnost prema svim testiranim sojevima, izuzev na *L. acidophilus* (55).

Herba kantariona, *Herba Hyperici*, oficinalna je u Ph. Eur. 7.0 (24), kao i u nekim nacionalnim farmakopejama kao što su British Pharmacopoeia 2009 (56), American Herbal Pharmacopoeia (57). Herbu kantariona u svojim izdanjima obradile su i Nemačka Komisija E (German Commission E) (44), Evropsko naučno udruženje za fitoterapiju (ESCOP) (58), Svetska zdravstvena organizacija (WHO) (49) i Evropska agencija za lekove (EMA) (59,60).

U skladu sa najnovijom zakonskom regulativom, prema odgovarajućim monografijama Evropske agencije za lekove iz 2009. god., herba kantariona se koristi kao sirovina za izradu biljnih (59) i tradicionalnih biljnih lekova (60). Biljni lekovi izrađuju se od standardizovanih suvih vodeno-alkoholnih ekstrakata. To su čvrsti dozirani oblici za oralnu upotrebu namenjeni za terapiju blagih do umerenih depresivnih epizoda i za kratkotrajnu simptomatsku terapiju blagih depresivnih poremećaja (59). Tačan mehanizam delovanja kao i komponentne odgovorne za antidepresivno delovanje još uvek nisu u potpunosti razjašnjeni. Smatra se da su glavni mehanizmi antidepresivnog delovanja ekstrakta herbe kantariona inhibicija preuzimanja noradrenalina, serotonina (5-HT) i dopamina (DA) u sinaptozomima i nishodna regulacija β -adrenergičnih receptora (59). Kao mogući mehanizmi diskutuju se još i ushodna regulacija postsinaptičkih receptora 5-HT₁, 5-HT₂ i dopaminergičkih receptora i povećan afinitet za GABA receptore. Do sada je utvrđeno da su sastojci koji doprinose antidepresivnoj aktivnosti derivati naftodiantrona (npr. hipericin i pseudohipericin), derivati floriglucinola (npr. hiperforin) i flavonoidi (61).

Doziranje i način primene biljnih lekova na bazi suvih ekstrakata herbe kantariona se razlikuju u zavisnosti od vrste ekstrakta koji je korišćen za njegovu izradu. Pojedinačna doza ekstrakata iznosi od 250 mg do 900 mg, a maksimalna dnevna doza od 500 mg do 1800 mg. Pojava pozitivnog terapijskog efekta očekuje se u toku prve četiri nedelje primene. Upotreba ovih biljnih lekova se ne preporučuje kod dece i adolescenata mlađih od 18 godina, trudnica i dojilja zbog nedostatka podataka o bezbednosti primene. Neželjene reakcije koje se mogu javiti tokom primene suvih ekstrakata herbe kantariona su gastrointestinalne tegobe, alergijske reakcije na koži, umor i uznemirenost. Kod preosetljivih osoba moguća je pojava reakcije fotosenzibilizacije (tzv. hipericizam). Iz tog razloga je preporuka da se u toku terapije izbegava izlaganje intenzivnom UV zračenju. (59). Generalno, neželjene reakcije koje

se mogu javiti tokom primene ekstrakata herbe kantariona su manje učestalosti i težine u odnosu na one koje prate primenu sintetskih antidepresiva (kardiovaskularne i neurološke tegobe, sedacija i gubitak seksualne želje, gastrointestinalne tegobe, porast telesne težine, aktivacioni sindrom i dr.) (61,62,63).

Biljni lekovi na bazi ekstrakata herbe kantariona mogu ispoljiti interakcije sa velikim brojem lekova. Ekstrakt herbe kantariona može sniziti koncentraciju mnogih lekova u plazmi, jer hiperforin vrši snažnu indukciju izoenzima citohroma P450 (CYP3A4, CYP2C9, CYP2C19), kao i P-glikoproteina. Iz tih razloga su ovi biljni lekovi kontraindikovani u slučaju primene ciklosporina, takrolimusa za sistemsku primenu, inhibitora proteaze (npr. amprenavira, indinavira), varfarina i irinotekana. Potreban je poseban oprez i prilikom istovremene primene svih ostalih lekova na čiji metabolizam utiču CYP3A4, CYP2C9, CYP2C19 i P-glikoprotein (npr. amitriptilina, feksofenadina, benzodiazepina, metadona, simvastatina, digoksina, finasterida). Smanjenje koncentracije oralnih kontraceptiva u plazmi može da dovede do pojačanog intermenstrualnog krvarenja i smanjene efikasnosti kontrole rađanja (predlažu se dodatne kontraceptivne mere). Dodatni razlog zašto treba izbegavati istovremenu primenu je što u slučaju naglog prekida uzimanja ekstrakta herbe kantariona može doći do porasta koncentracije leka u plazmi i povećanja rizika od potencijalne toksičnosti. Takođe, ekstrakt herbe kantariona može potencirati serotoninske efekte nekih sintetskih antidepresiva (npr. sertralin, paroksetin), buspirona ili triptana (59,64).

Tradicionalni biljni lekovi izrađeni od usitnjene herbe kantariona, ceđenog soka iz sveže herbe, suvog i tečnog vodeno-etanolnog ekstrakta herbe primenjuju se u vidu čvrstih ili tečnih doziranih oblika za olakšanje trenutne mentalne iscrpljenosti. Infuz od usitnjene herbe se koristi i za otklanjanje simptoma blagih gastrointestinalnih poremećaja. Tečni i polučvrsti dozirani oblici na bazi tečnih vodeno-etanolnih i uljanih ekstrakata herbe, kao i infuz od usitnjene herbe, primenjuju se u terapiji manjih zapaljenskih procesa na koži (kao što su opekotine od sunca) i kao pomoćno sredstvo za zarastanje manjih rana (60). Ukoliko simptomi postoje i nakon 2 nedelje upotrebe u slučaju tradicionalnih biljnih lekova za oralnu primenu, odnosno nakon 1 nedelje upotrebe u slučaju tradicionalnih biljnih lekova za dermalnu primenu, neophodno je da se pacijent obrati lekaru ili farmaceutu. Prilikom primene ovih biljnih lekovitih proizvoda preporučuje se izbegavanje izlaganja intenzivnom UV-zračenju. Kada se

tradicionalni biljni lekovi na bazi herbe kantariona koriste ne duže od 2 nedelje i ukoliko je unos hiperforina manji od 1 mg/dan, ne očekuju se klinički značajne interakcije. Neželjene reakcije tradicionalnih biljnih lekova za oralnu primenu su iste kao i u slučaju biljnih lekova, dok se u slučaju tradicionalnih biljnih lekova za dermalnu primenu mogu pojaviti neželjene reakcije na koži (61).

Od ostalih biljnih vrsta koje su predmet ove doktorske disertacije, do sada su delimično farmakološki okarakterisane: vrsta *H. androsaeumum* (antioksidantno dejstvo infuza i vodeno-etanolnog ekstrakta ispitivano je na nekoliko model sistema) (65,66), dok su za metanolne ekstrakte vrsta *H. richeri*, *H. barbatum*, *H. hirsutum* i *H. maculatum* ispitivane antioksidantna i antimikrobna aktivnost (67). Antioksidantna i antimikrobna svojstva ekstrakata vrste *H. acutum* nisu do sada ispitivana.

Postoji podatak da se *H. androsaeumum* tradicionalno koristi u Iranu za lečenje rana, zapaljenskih procesa na koži, bolova u grlu, prehlade i kašlja (68).

Vrste roda *Hypericum*, a naročito one koje se tradicionalno koriste, postaju sve interesantniji materijal za hemijska i biološka istraživanja u cilju iznalaženja novih lekovitih biljnih sirovina. U okviru našeg terenskog istraživanja na teritoriji Crne Gore nedavno je prvi put zabeleženo da se vrsta *H. richeri* tradicionalno koristi u iste svrhe kao i kantarion, *H. perforatum*.

2. CILJ

Početni cilj ove doktorske disertacije je određivanje sadržaja sekundarnih metabolita od značaja za farmaciju (ukupnih fenola, tanina i derivata naftodiantrona) u nadzemnim delovima u cvetu odabranih vrsta roda *Hypericum*: *H. richeri*, *H. perforatum*, *H. barbatum*, *H. hirsutum*, *H. androsaemum*, *H. acutum* i *H. maculatum*.

S obzirom da je među navedenim vrstama *H. richeri* jedna od manje proučavanih, i da je u okviru terenskih istraživanja primećena njena upotreba u tradicionalnoj medicini u iste svrhe kao i vrste *H. perforatum*, posebna pažnja biće posvećena ispitivanju flavonoida u nadzemnim delovima u cvetu ove biljne vrste (izolovanje različitim hromatografskim tehnikama i njihovo identifikovanje primenom različitih spektroskopskih tehnika).

Naredni cilj disertacije je izrada vodeno-etanolnih ekstrakata herbi svih sedam vrsta roda *Hypericum*, njihova detaljna hemijska karakterizacija, kao i *in vitro* ispitivanje njihove antioksidantne, antimikrobne aktivnosti i sposobnosti inhibicije enzima MAO i uticaja na preuzimanje 5-HT.

Uprkos dugoj tradicionalnoj upotrebi, uljani ekstrakt herbe kantariona (*Oleum Hyperici*), je nedovoljno hemijski i farmakološki proučen. U skladu sa tim, u nastavku istraživanja biće izrađeni i uljani ekstrakti svih sedam odabranih vrsta roda *Hypericum* na tri različita načina prema tradicionalnim recepturama za izradu kantarionovog ulja u cilju njihove hemijske karakterizacije (kvalitativna i kvantitativna HPLC analiza). Za uljane ekstrakte vrsta *H. richeri* i *H. perforatum* biće ispitivana antiedematozna i gastroprotektivna aktivnost u *in vivo* uslovima nakon oralne primene, kao i njihova antimikrobna aktivnost u *in vitro* uslovima.

3. MATERIJAL I METODE

3.1 Aparatura

Spektrofotometrijsko određivanje sadržaja ukupnih hipericina, fenola i tanina je urađeno na UV-VIS spektrofotometru Hewlett-Packard, model HP 8543.

NMR spektri izolovanih jedinjenja su snimani na aparatu Varian Gemini (200 MHz za ^1H), na sobnoj temperaturi u DMSO- d_6 ili CD_3OD kao rastvaračima. Hemijska pomeranja su data u δ skali u odnosu na tetrametilsilan kao unutrašnji standard.

Snimanje UV spektara izolovanih jedinjenja i spektrofotometrijska merenja u okviru testova za ispitivanje antioksidantne aktivnosti vršena su na UV/VIS spektrofotometru DRX Cintra 40.

Za post-kolonsku HPLC-DPPH derivatizaciju korišćena je sledeća aparatura: Biorad pumpa za unošenje DPPH; reaktor u vidu namotane spiralne cevi od nerđajućeg čelika, dužine 2 m i unutrašnjeg prečnika 0,2 mm; Varian-Aerograph VUV-10 UV-VIS detektor na 517 nm.

Kvalitativna LC-UV-MS analiza vodeno-etanolnih ekstrakata odabranih vrsta roda *Hypericum* i metanolnog ekstrakta vrste *H. richeri* i njegovih frakcija (hloroformske, etilacetatne, *n*-butanolne i vodene) dobijenih u procesu izolovanja jedinjenja, je izvršena na Agilent MSD TOF aparatu, povezanim sa Agilent 1200 HPLC, koristeći kolonu RR Zorbax Eclipse plus C18 (1,8 μm , 150 \times 4,6 mm). Maseni spektri su dobijeni na Agilent ESI-MSD TOF uređaju. Protok sušecćeg gasa (N_2) je bio 12 l/min, pritisak raspršivača 45 psig, temperatura sušecćeg gasa 350°C. Za ESI, uslovi su bili sledeći: napon kapilare 4000 V skimer 60 V, Oct RF V 250 V, opseg masa 100 do 2000 m/z.

Kvantitativna HPLC-UV analiza vodeno-etanolnih ekstrakata odabranih vrsta roda *Hypericum*, metanolnog ekstrakta vrste *H. richeri* kao i njegovih frakcija (hloroformske, etilacetatne, *n*-butanolne i vodene) izvršena je na Agilent 1200 aparatu opremljenom detektorom sa nizom dioda (DAD) model G1315B, binarnom pumpom

model G1312A, autosemplerom model G1313A i kolonom LiChrospher 100 RP-18e, veličine čestica 5 μm i dimenzija 250 \times 4 mm.

Kvalitativna i kvantitativna HPLC-UV analiza uljanih ekstrakata je izvršena na Hewlett Packard 1090 aparatu opremljenom detektorom sa nizom dioda (DAD) model HP1040, i kolonom Lichrospher RP-18 (5 μm , 250 \times 4 mm).

3.2 Biljni materijal

Biljni materijal predstavljaju nadzemni delovi u cvetu ispitivanih vrsta roda *Hypericum*, prikupljeni na karakterističnim lokalitetima u Srbiji i Crnoj Gori, kao i na plantažama Instituta za proučavanje lekovitog bilja "Dr Josif Pančić" u Pančevu. Herbarski materijal je deponovan na Prirodno-matematičkom fakultetu Univerziteta Crne Gore u Podgorici, na Odseku za biologiju.

Jedan deo biljnog materijala je osušen prirodnim putem na promajnom mestu u hladu, dok je drugi korišćen u svežem stanju. Neposredno pre pripreme odgovarajućih ekstrakata biljni materijal je usitnjen mlevenjem.

Vrsta *H. richeri* je prikupljena na lokalitetima u Crnoj Gori, na planinama Kotlovi u julu 2003. godine, i Bogićevica 2005. godine (K56/03; B314/05).

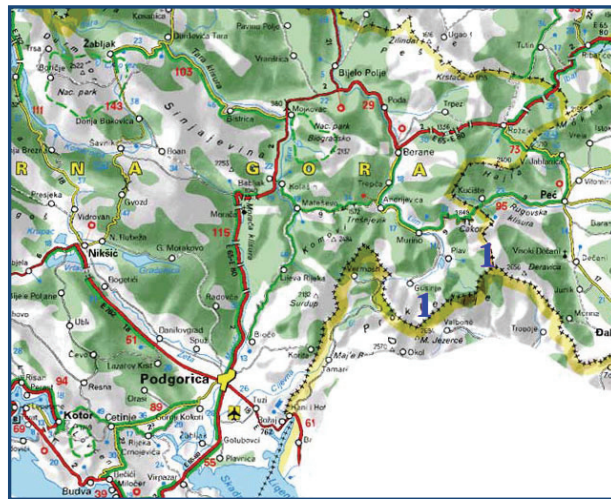
Vrsta *H. perforatum* prikupljena je na sledećim lokalitetima: plantaže Instituta za proučavanje lekovitog bilja "Dr Josif Pančić" u Pančevu, u julu 2003. godine, i na planini Suvobor 2007. godine (S286/07).

Vrsta *H. barbatum* je prikupljena na plantažama Instituta za proučavanje lekovitog bilja "Dr Josif Pančić" u julu 2003. godine u Pančevu, i na planini Suvobor 2007. godine (S287/07).

Vrsta *H. hirsutum* je prikupljena na planini Povlen, u julu 2003. godine (P68/03) i 2007. godine (P35/07).

Vrsta *H. androsaemum* je prikupljena na planini Maljen, u julu 2003. godine (M67/03) i 2007. godine (M36/07).

Vrste *H. acutum* i *H. maculatum* su prikupljene na planini Jablanik, u julu 2003. godine (J69/03; J70/03) i 2007. godine (J37/07; J38/07).



Slika 3.1 Lokaliteti na kojima je prikupljen biljni materijal. 1. *H. richeri*; 2. *H. perforatum*; 3. *H. barbatum*; 4. *H. hirsutum*; 5. *H. androsaemum*; 6. *H. acutum*; 7. *H. maculatum*.

3.3 Izrada ekstrakata odabranih vrsta roda *Hypericum*

Izrada vodeno-etanolnih ekstrakata

Osušeni samleveni vršni delovi u cvetu svih sedam ispitivanih vrsta (po 100,0 g) macerirani su u 70% etanolu na sobnoj temperaturi, tokom tri dana, u dobro zatvorenoj posudi, na tamnom mestu, uz povremeno mućkanje. Nakon filtriranja, u dobijenom ekstraktu je određen suvi ostatak. Maceracija je ponavljana sve dok suvi ostatak u dobijenim ekstraktima nije bio manji od 0,5%. Svi dobijeni ekstrakti su spojeni i rastvarač je uklonjen uparavanjem na vakuum uparivaču na temperaturi od 40°C. Ekstrakti su dodatno sušeni u vakuum-eksikatoru, na sobnoj temperaturi, do konstantne mase. Mase dobijenih suvih ekstrakata prikazane su u Tabeli 3.1.

Tabela 3.1 Mase suvih vodeno-etanolnih ekstrakata odabranih vrsta roda *Hypericum* dobijenih procesom maceracije

Herba (100,0 g)	Prinos maceracije (g)
<i>H. richeri</i>	28,5
<i>H. perforatum</i>	28,7
<i>H. barbatum</i>	24,3
<i>H. hirsutum</i>	22,9
<i>H. androsaemum</i>	15,6
<i>H. acutum</i>	21,9
<i>H. maculatum</i>	29,0

U vodeno-etanolnim ekstraktima je određivan sadržaj ukupnih hipericina, fenola i tanina. Ovi ekstrakti su takođe korišćeni za LC-UV-MS analizu, post-kolonsku HPLC-DPPH derivatizaciju, ispitivane su njihove antioksidantne osobine, sposobnost inhibicije enzima MAO i uticaj na preuzimanje 5-HT, kao i antimikrobna aktivnost.

Izrada uljanih ekstrakata

Uljani ekstrakti svih sedam ispitivanih vrsta su pripremljeni na tri različita načina prema tradicionalnim recepturama za izradu kantarionovog ulja (*Oleum Hyperici*) (Slika 3.2). Mase dobijenih uljanih ekstrakata su prikazane u Tabeli 3.2.

Postupak I: maceracijom sveže herbe (100 g) u suncokretovom ulju (odnos droga : ekstrakt = 1 : 5) na direktnoj sunčevoj svetlosti tokom 40 dana (45).

Postupak II: prethodnom maceracijom suve herbe (100 g) u 96% etanolu, 24 h na sobnoj temperaturi, koja se nastavlja ekstrakcijom suncokretovim uljem (odnos droga : ekstrakt = 1 : 6) uz zagrevanje na vodenom kupatilu uz istovremeno uklanjanje etanola, tokom 4 h (69).

Postupak III: direktnom ekstrakcijom suve herbe (100 g) suncokretovim uljem (odnos droga : ekstrakt = 1 : 10) tokom 3 h uz zagrevanje na vodenom kupatilu (69).



a)



b)



c)

Slika 3.2 Uljani ekstrakti herbe vrste *H. perforatum* pripremljeni prema tradicionalnim recepturama: a) postupkom I, b) postupkom II i c) postupkom III

Tabela 3.2 Mase uljanih ekstrakata odabranih vrsta roda *Hypericum* dobijenih na tri različita načina prema tradicionalnim recepturama za izradu kantarionovog ulja (postupak I, postupak II, postupak III)

Herba (100 g)	Prinos ekstrakcije (g)		
	Postupak I	Postupak II	Postupak III
<i>H. richeri</i>	483	550	950
<i>H. perforatum</i>	495	610	987
<i>H. barbatum</i>	487	574	965
<i>H. hirsutum</i>	490	565	954
<i>H. androsaemum</i>	485	590	970
<i>H. acutum</i>	492	580	960
<i>H. maculatum</i>	484	570	945

Svi dobijeni uljani ekstrakti su korišćeni za HPLC-UV analizu, a uljani ekstrakti vrsta *H. perforatum* i *H. richeri* su korišćeni i za ispitivanje antiedematozne i gastroprotektivne aktivnosti.

3.4 Određivanje sadržaja ukupnih hipericina u herbi i vodeno-etanolnim ekstraktima

Sadržaj ukupnih hipericina u herbi sedam odabranih vrsta roda *Hypericum* i njihovim vodeno-etanolnim ekstraktima je određivan spektrofotometrijskom metodom, po proceduri opisanoj u Evropskoj farmakopeji 6.0 za drogu *Hyperici herba* (70). Propisana količina usitnjene herbe (1000 mg) ili ekstrakta (500 mg), ekstrahovana je smešom vode i tetrahidrofurana na vodenom kupatilu na temperaturi od 70 °C uz povratni hladnjak u trajanju od 30 min. Supernatant je odvojen i postupak ponovljen. Supernatanti su spojeni i upareni do suva. Suvi ostatak je pomoću metanola prenet u odmernu tikvicu od 25 ml. Nakon filtriranja metanolnog ekstrakta apsorbancija je merena na 590 nm. Dobijeni rezultati predstavljaju srednju vrednost tri određivanja. Sadržaj ukupnih hipericina se izražava kao procenat (%) hipericina, čija je specifična apsorbancija $A_{1\%/1\text{cm}} = 870$, prema formuli:

$$\% \text{ ukupnih hipericina} = (A \times 125 / m \times 870)$$

A - apsorbancija uzorka

m - masa droge (ekstrakta) u gramima.

3.5 Određivanje sadržaja ukupnih fenola u herbi i vodeno-etanolnim ekstraktima

Sadržaj ukupnih fenola u herbi i vodeno-etanolnim ekstraktima sedam odabranih vrsta roda *Hypericum* je određivan spektrofotometrijski na bazi reakcije sa Folin-Ciocalteu (FC) reagensom (71). Herba (10 mg) je prelivena sa 10 ml metanola i ekstrahovana na ultrazvučnom kupatilu 30 min. Ekstrakt je filtriran preko filter papira u odmernu tikvicu od 10 ml i dopunjen metanolom. Vodeno-etanolni ekstrakt (5 mg) je rastvoren u 25 ml metanola. Dve stotine mikrolitara ekstrakta herbe ili ratsvorenog vodeno-etanolnog ekstrakta je dodato u 1 ml razblaženog (1:10) FC reagensa. Posle 4

min, dodato je 800 µl natrijum-karbonata (75 g/l). Nakon 2 h inkubacije na sobnoj temperaturi, izmerena je apsorbancija na 765 nm. Za kalibraciju standardne krive korišćena je galna kiselina (0-100 mg/l). Rezultati su izraženi kao ekvivalenti galne kiseline po g suve droge, odnosno suvog ekstrakta. Dobijeni rezultati predstavljaju srednju vrednost tri određivanja.

3.6 Određivanje sadržaja tanina u herbi i vodeno-etanolnim ekstraktima

Sadržaj tanina u herbi i vodeno-etanolnim ekstraktima sedam odabranih vrsta roda *Hypericum* određen je spektrofotometrijskom metodom prema propisu Ph. Eur. 6.0 (01/2008:20814).

Odmerena količina herbe (500 mg) ili vodeno-etanolnog ekstrakta (300 mg) je ekstrahovana vodom na vodenom kupatilu u trajanju od 30 min. Posle hlađenja, rastvor je kvantitativno prenet u odmernu tikvicu od 250 ml i ostavljen da se istaloži. Rastvor je zatim filtriran preko filter papira pri čemu je odbačeno prvih 50 ml filtrata. Sadržaj tanina je određivan na osnovu razlike apsorbancije rastvora u kome je određen sadržaj ukupnih polifenola posle reakcije sa reagensom za tanine i rastvorom natrijum-karbonata, i rastvora u kome je određen sadržaj polifenola, koji se ne adsorbuju na kožni prah. Apsorbancije rastvora se mere na 760 nm. Dobijeni rezultati predstavljaju srednju vrednost tri određivanja. Sadržaj tanina (%) se izračunava prema sledećoj formuli:

$$\text{Sadržaj tanina} = [62,5 \times (A_1 - A_2) \times m_2] / A_3 \times m_1$$

A_1 – apsorbancija rastvora koja potiče od ukupnih polifenola

A_2 – apsorbancija rastvora koja potiče od polifenola koji se ne vezuju za kožni prah

A_3 – apsorbancija rastvora pirogalola koji se koristi kao standard

m_1 – masa uzorka u gramima

m_2 – masa pirogalola u gramima.

Izrada reagensa za tanine

U 700 ml vode rastvoreno je 100 g natrijum-volframata i 25 g natrijum-molibdata. U taj rastvor dodato je 100 ml koncentrovane hlorovodonične kiseline i 50 ml koncentrovane fosforne kiseline i zagrevano 10 h na vodenom kupatilu, uz povratni hladnjak u staklenom balonu sa ravnim dnom. Zatim je dodato 150 g litijum-sulfata, 50 ml vode i nekoliko kapi broma i kuvano dok se ne ukloni višak broma (oko 15 min). Posle hlađenja, reagens je razblažen do 1000 ml vodom i filtriran. Reagens treba da je žute boje. Ako se pojavi zelenkasta boja, reagens više nije ispravan, ali može da se regeneriše zagrevanjem sa nekoliko kapi broma. Čuva se na temperaturi od 2-8 °C.

3.7 Izolovanje sekundarnih metabolita iz vrste *H. richeri*

U cilju izolovanja sekundarnih metabolita iz vrste *H. richeri*, pripremljen je metanolni ekstrakt i izvršeno njegovo frakcionisanje. Osušeni samleveni vršni delovi vrste *H. richeri* u cvetu (394 g) macerirani su u metanolu (2,2 l) u toku 24 h na sobnoj temperaturi. Nakon odvajanja prvog macerata, ekstrakcija je ponovljena sa 1,25 l metanola. Spojeni ekstrakti su filtrirani preko filter papira, a rastvarač uparen pomoću rotacionog vakuum uparivača na 40°C, pri čemu je dobijeno 64 g sirovog ekstrakta. Deo ovog ekstrakta (50 g) je suspendovan u 200 ml vode i sukcesivno ekstrahovan hloroformom (4 × 200 ml), etilacetatom (4 × 200 ml) i *n*-butanolom (4 × 200 ml). Uparavanjem rastvarača dobijeno je 6,5 g hloroformske, 12,3 g etilacetatne, 16,8 g *n*-butanolne i 9,5 g vodene frakcije.

Metanolni ekstrakt vrste *H. richeri*, kao i dobijene frakcije analizirane su LC-UV-MS tehnikom i ispitivane njihove antioksidantne osobine i antimikrobna aktivnost.

Izolovanje sekundarnih metabolita vršeno je iz *n*-butanolne i etilacetatne frakcije. Deo *n*-butanolne frakcije (6,8 g) metanolnog ekstrakta vrste *H. richeri* je razdvajan na koloni Sefadeksa LH-20, dimenzije 75×3 cm. Kolona je eluirana metanolom, brzinom od oko 30 kapi u minuti, pri čemu je dobijeno 148 frakcija zapremine po 3 ml. Tok razdvajanja je praćen pomoću hromatografije na tankom sloju (TLC) silikagela koristeći sistem rastvarača EtOAc/H₂O/HCOOH (90/9/6) za eluiranje. Na osnovu sličnosti TLC

hromatograma, frakcije sa Sefadeks kolone su spojene, tako da je dobijeno devet novih frakcija: S1 (129 ml), S2 (39 ml), S3 (12 ml), S4 (18 ml), S5 (39 ml), S6 (21 ml), S7 (15 ml), S8 (33 ml) i S9 (15 ml). Frakcije u kojima je, na osnovu TLC hromatograma, bio prisutan samo rastvarač su bile odbačene.

Frakcija S2 je dalje razdvajana pomoću “dry-column flash” hromatografije na silikagelu, koristeći kolonu dimenzije 20×4 cm, i smešu rastvarača EtOAc/MeOH/H₂O rastuće polarnosti za eluiranje. U tradicionalnoj kolonskoj hromatografiji eluiranje se vrši pod dejstvom sile gravitacije. Za efikasnije razdvajanje neophodno je koristiti sitnije čestice stacionarne faze. Međutim, sitnije čestice pružaju veći otpor proticanju rastvarača, pa je neophodno ubrzati protok rastvarača. Za “dry-column flash” hromatografiju upotrebljen je silikagel čija je veličine čestica bila od 63–200 μm , i eluiranje se postizalo primenom sniženog pritiska pomoću vodene vakuum pumpe povezane na izlaz kolone (Slika 3.3). Kolona se eluira unapred određenom zapreminom rastvarača, pri čemu se u potpunosti osuši pre nego što se doda sledeća zapremina rastvarača. Ovakav način rada je pogodan za gradijentno eluiranje, pri čemu se progresivno dodaje sve polarniji sistem rastvarača. Prednost gradijentnog eluiranja je znatno kraće vreme potrebno za eluiranje polarnih jedinjenja sa kolone u kasnijim fazama razdvajanja, bez gubljenja kvaliteta razdvajanja manje polarnih komponenti na početku razdvajanja. Eluiranje je započeto sistemom rastvarača EtOAc/MeOH/H₂O (100/10/7), pri čemu je dobijeno 17 frakcija zapremine po 18 ml. Veća polarnost sistema rastvarača za eluiranje dobijena je povećanjem sadržaja MeOH i H₂O u odnosu na EtOAc: najpre 100/13/9 (6 frakcija zapremine 18 ml), zatim 100/16/12 (7 frakcija zapremine 18 ml), 100/20/15 (7 frakcija zapremine 18 ml), 100/25/17 (7 frakcija zapremine 18 ml) i na kraju 100/30/20 (7 frakcija zapremine 18 ml).

Iz frakcije eluirane sa EtOAc/MeOH/H₂O (100/10/7) nakon uparavanja je dobijeno 350 mg jedinjenja **8** (rutin).

Frakcija eluirana sa EtOAc/MeOH/H₂O (100/13/9) je dodatno prečišćena “dry-column flash” hromatografijom, dimenzije kolone 10×2 cm. Za eluiranje ove kolone je korišćen sistem rastvarača EtOAc/MeOH/H₂O/AcOH (100/10/10/2). Dobijeno je 15 frakcija zapremine po 5 ml. Nakon uparavanja frakcija 10-13 dobijeno je 10 mg jedinjenja **5** (miricetin 3-*O*-rutinozid).

Frakcija S5 je dalje razdvajana pomoću “dry-column flash” hromatografije na silikagelu, koristeći kolonu dimenzije 11×4 cm, i smešu rastvarača EtOAc/MeOH/H₂O rastuće polarnosti za eluiranje. Eluiranje je započeto sistemom rastvarača EtOAc/MeOH/H₂O (100/6/1) pri čemu je dobijena 1 frakcija zapremine 10 ml. Polarnost je povećana korišćenjem sistema 100/8/1,75 (10 frakcija zapremine 10 ml), zatim 100/10/2 (4 frakcije zapremine 10 ml), 100/15/3 (6 frakcija zapremine 10 ml), 100/20/7 (6 frakcija zapremine 10 ml) i 30/30/10 (7 frakcija zapremine 10 ml).

Frakcija eluirana sa EtOAc/MeOH/H₂O (100/8/1,75) je dodatno razdvajana pomoću “flash” hromatografije na koloni silikagela dimenzije $15 \times 1,5$ cm, koristeći sistem rastvarača EtOAc/MeOH/AcOH/HCOOH (100/4/1/1) za eluiranje. Za “flash” hromatografiju je korišćen silikagel veličine čestica 37–63 μm . U poređenju sa “dry-column flash” hromatografijom, kod “flash” hromatografije se zbog sitnijih čestica stacionarne faze postiglo još efikasnije razdvajanje. Pod pritiskom komprimovanog azota na početku kolone izvršeno je eluiranje (Slika 3.4). Dobijene su 22 frakcije zapremine po 2 ml. Nakon uparavanja frakcija 2-6 dobijeno je 34 mg jedinjenja **9** (hiperozid), a frakcija 13-15, 19 mg jedinjenja **11** (izokvercitrin). Frakcije 7-12 su kao glavnu komponentu sadržavale jedinjenje **7** (miricetin 3-*O*-glukozid). Ova frakcija je dodatno prečišćena pomoću “flash” hromatografije na koloni silikagela, dimenzije $15 \times 1,5$ cm, koristeći EtOAc/MeOH/AcOH/HCOOH (100/6,5/1/1) za eluiranje. Na ovaj način je nakon uparavanja odgovarajućih frakcija dobijeno 14 mg jedinjenja **7**.

Razdvajanje frakcije S6 je izvršeno pomoću “flash” hromatografije na koloni silikagela, dimenzije $15 \times 1,5$ cm. Za eluiranje je korišćen sistem rastvarača EtOAc/MeOH/H₂O/AcOH (100/4,3/2,5/1), pri čemu je dobijeno 22 frakcije zapremine po 2 ml. Nakon uparavanja frakcija 6-9 dobijeno je 25 mg jedinjenja **6** (miricetin 3-*O*-galaktozid).

Deo etilacetatnog ekstrakta (7 g) je hromatografisan na koloni Sefadeksa LH-20, dimenzije 15×3 cm. Kolona je eluirana metanolom, pri čemu je dobijeno 15 frakcija zapremine po 30 ml (SE1-SE15).

Prema sličnosti TLC hromatograma spojene su frakcije SE4-SE8. Dalje prečišćavanje je izvršeno pomoću tri uzastopne “flash” hromatografije na koloni silikagela koristeći sledeće sisteme rastvarača: EtOAc/MeOH/H₂O/HCOOH (9/1/1/0,3);

EtOAc/MeOH/H₂O/HCOOH (11,5/0,4/0,2/0,3) i EtOAc/PhMe/HCOOH (92/8/1,5). Nakon ovih razdvajanja, dobijeno je 10 mg jedinjenja **12** (kvercitrin).

Frakcije bogate flavonoidnim aglikonima (SE9-SE15) su spojene i prečišćene pomoću “flash” hromatografije na koloni silikagela dimenzije 15 × 1,5 cm uz sistem rastvarača EtOAc/PhMe/HCOOH (5/5/0,1), pri čemu su dobijene tri frakcije: A (6 ml), B (10 ml) i C (8 ml). Nakon prečišćavanja frakcije B pomoću “flash” hromatografije na koloni silikagela koristeći EtOAc/PhMe/HCOOH (5/5/0,1) kao eluens, dobijeno je 8 mg jedinjenja **14** (kvercetin). Frakcija C je dalje prečišćena hromatografijom na koloni Sefadeksa LH-20 uz MeOH kao eluens pri čemu je dobijeno 16 mg jedinjenja **15** (I3,II8-biapigenin).

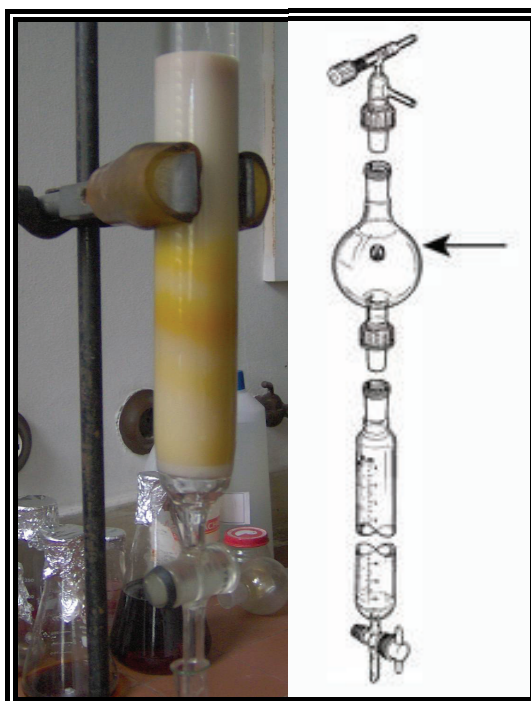
Praćenje toka svih “dry-column flash” i “flash” hromatografija je izvršeno pomoću TLC na silikagelu, korišćenjem istih mobilnih faza koje su korišćene za hromatografiju na koloni.

Za posthromatografsku derivatizaciju je korišćen NP/PEG-reagens: hromatogram je prskan rastvorom difenilboriloksietilamina (difenilborna kiselina aminoetilestar, NP) (1% rastvor u metanolu), a zatim, u cilju intenziviranja fluorescencije, rastvorom polietilenglikola, PEG (5% rastvor u etanolu). Hromatogrami su posmatrani na dnevnoj svetlosti i pod UV svetlošću na 254 i 365 nm, pre i posle derivatizacije (72). Svi flavonoidi na 254 nm gase fluorescenciju a na 365 nm, posle derivatizacije NP/PEG reagensom u zavisnosti od strukture fluoresciraju žuto, plavo ili zeleno.

Strukture izolovanih jedinjenja su određene na osnovu analize njihovih UV, ¹H NMR i ¹³C NMR spektralnih podataka.



Slika 3.3 Aparatura za “dry-column flash” hromatografiju



Slika 3.4 Aparatura za “flash” hromatografiju: fotografija (levo) i shematski prikaz (desno)

3.8 Kvalitativna LC-UV-MS analiza ekstrakata odabranih vrsta roda *Hypericum*

Za kvalitativnu LC-UV-MS analizu vodeno-etanolnih ekstrakata herbi odabranih vrsta roda *Hypericum*, kao i metanolnog ekstrakta vrste *H. richeri* i njegovih frakcija (kloroformske, etilacetatne, *n*-butanolne i vodene) dobijenih u procesu izolovanja jedinjenja, korišćena je kolona RR Zorbax Eclipse plus C18, veličine čestice 1,8 µm i dimenzija 150 × 4,6 mm. Injekciona zapremina je bila 2 µl. Kao mobilna faza A je korišćena 0,1% mravlja kiselina u vodi, a kao mobilna faza B acetonitril. Za razdvajanje komponenti je korišćen sledeći gradijentni program: 0-12 min 8-10% B, 12-14 min 10-16% B, 14-30 min 16% B, 30-36 min 16-36% B, 36-42 min 36-60% B, 42-46 min 60-100% B, pri protoku mobilne faze od 1 ml/min. Prikupljanje i obrada podataka je izvršena uz pomoć softvera „Molecular Feature Extractor“. Identifikacija jedinjenja je izvršena na osnovu karakterističnog izgleda UV spektra i molekulske formule izračunate iz preciznih masa kvazimolekulskih jona u ESI masenim spektrima. UV spektri, MS spektri i retencionna vremena identifikovanih jedinjenja su zatim upoređeni sa odgovarajućim podacima za standardna jedinjenja.

3.9 Kvantitativna HPLC-UV analiza ekstrakata odabranih vrsta roda *Hypericum*

Kvantitativna analiza vodeno-etanolnih ekstrakata herbi ispitivanih vrsta roda *Hypericum*, kao i metanolnog ekstrakta vrste *H. richeri* i njegovih frakcija (kloroformske, etilacetatne, *n*-butanolne i vodene) dobijenih u procesu izolovanja jedinjenja, urađena je HPLC-UV postupkom, pri čemu su za izradu kalibracionih kriva kao standardne supstance korišćena i jedinjenja prethodno izolovana iz vrste *H. richeri*. Kolona koja je korišćena za HPLC-UV analizu ekstrakata je bila LiChrospher 100 RP-18e, veličine čestice 5 µm i dimenzija 250 × 4 mm. Injekciona zapremina je bila 7 µl. Kao mobilna faza A je korišćena 0,1% fosforna kiselina u vodi, a kao mobilna faza B acetonitril. Za razdvajanje komponenti je korišćen sledeći gradijentni program: 0-12

min 8-10% B, 12-14 min 10-16% B, 14-30 min 16% B, 30-36 min 16-36% B, 36-42 min 36-60% B, 42-46 min 60-100% B, pri protoku mobilne faze od 1 ml/min. Detekcija je vršena na sledećim talasnim dužinama: 254 nm, 320 nm i 590 nm.

Koncentracije standarda za kvantifikaciju su bile sledeće: 0,2-2,0 mg/ml za flavonoide; 0,1-1,0 mg/ml za naftodiantrone; 0,1-0,5 mg/ml za kafeoilhina kiseline. Za izolovana jedinjenja miricetin 3-*O*-rutinozid, miricetin 3-*O*-glukozid i miricetin 3-*O*-galaktozid nisu bili dostupni komercijalni standardi, pa je njihova koncentracija izražena kao ekvivalent miricetina. Dobijeni rezultati predstavljaju srednju vrednost tri određivanja.

3.10 Kvalitativna i kvantitativna HPLC-UV analiza uljanih ekstrakata odabranih vrsta roda *Hypericum*

Za HPLC-UV analizu uljanih ekstrakata herbi ispitivanih vrsta roda *Hypericum*, po 50 ml uljanog ekstrakta je reekstrahovano tri puta sa po 50 ml metanola. Ovako dobijeni metanolni ekstrakti su spojeni i upareni pod vakuumom na temperaturi ispod 50°C do zapremine od 10 ml. Pre injektovanja uzorci su filtrirani kroz 0,45 µm filter. Tako dobijeni uzorci su analizirani na koloni LiChrospher 100 RP-18e, veličine čestice 5 µm i dimenzija 250 × 4 mm. Injekciona zapremina je bila 20 µl. Kao mobilna faza A je korišćena 1% fosforna kiselina u vodi, a kao mobilna faza B acetonitril. Za razdvajanje komponenti je korišćen sledeći gradijentni program: 16–36% B, 0–6 min; 36–60% B, 6–12 min, 60–80% B, 12–16 min, 80–100% B, 16–20 min, 100% B, 20–35 min, pri protoku mobilne faze od 1 ml/min. Detekcija je vršena na sledećim talasnim dužinama: 270 nm, 350 nm i 590 nm.

Kvercetin i I3,II8-biapigenin su identifikovani metodom koinjektiranja sa prethodno izolovanim jedinjenjima.

Za kvantitativnu analizu komponenti pravljene su kalibracione krive. Koncentracije standarda (prethodno izolovana jedinjenja) za kvantifikaciju su bile sledeće: 0,03-0,5 mg/ml za kvercetin i 0,03-0,2 mg/ml za I3,II8-biapigenin. Dobijeni rezultati predstavljaju srednju vrednost tri određivanja.

3.11 Ispitivanje sposobnosti inhibicije aktivnosti enzima MAO vodenolnih ekstrakata odabranih vrsta roda *Hypericum*

Mikrozomi su izolovani iz jetre pacova metodom koju su opisali Holt i saradnici (73). Jetra je homogenizovana u 40 zapremina hladnog rastvora 0,3 M saharoze (5 g/200 ml) pomoću električnog homogenizera. Nakon centrifugiranja homogenata (10 min, 1000 g, 4°C), odvojeni su supernatanti, koji su ponovo centrifugirani (30 min, 10000 g, 4°C). Odvajanje je talog sa grubo prečišćenom mitohondrijalnom frakcijom hepatocita, koji je potom resuspendovan u 4 ml hladnog rastvora 0,3 M saharoze, pa

naliven na rastvor 1,2 M saharoze (40 ml) i centrifugiran (2 h, 53000 g, 4°C). Saharoza iz taloga je uklonjena pomoću kalijum-fosfatnog pufera (200 mM K₂HPO₄, 200 mM KH₂PO₄, pH=7,6), a nataloženi mikrozozi su resuspendovani u 8 puta većoj zapremini istog pufera u odnosu na početnu masu tkiva (40 ml), brzo zamrzavani u tečnom azotu i čuvani na -70 °C do upotrebe.

Aktivnost mikrozomalne MAO u *in vitro* uslovima je praćena preko stepena razgrađivanja ¹⁴C-tiramina na način koji su opisali Yu i Hertz (74). Pošto je tiramin supstrat za obe izoforme MAO, određivana je najpre ukupna aktivnost MAO, a uz to je korišćenjem selektivnog inhibitora MAO B, pargilina, utvrđivan uticaj ispitivanih ekstrakata na aktivnost MAO A.

Osnovni rastvori vodeno-etanolnih ekstrakata ispitivanih vrsta roda *Hypericum* su pripremljeni u 20% DMSO i čuvani na 4°C. Potrebna razblaženja su pravljena u kalijum-fosfatnom puferu (50 mM K₂HPO₄, 50 mM KH₂PO₄, pH = 7,5) na dan eksperimenta. Eksperimenti su rađeni u dva ponavljanja. Ranije pripremljeni mikrozozi su preinkubirani (20 min, 37°C) sa različitim koncentracijama ekstrakata u kalijum-fosfatnom puferu, u dve serije (sa ili bez pargilina, u finalnoj koncentraciji od 0,2 μM). Ukupna zapremina smeše je bila 200 μl. Reakcija je započeta dodavanjem 50 μl smeše neobebeženog tiramina i ¹⁴C-tiramina u finalnim koncentracijama 0,1 mM i 1 μCi/ml, redom. Po isteku inkubacije (30 min, 37°C) reakcija je prekinuta dodavanjem 100 μl limunske kiseline (4 M) i uzorci su prebaćeni na led. Proizvod reakcije je ekstrahovan energičnim mućkanjem sa mešavinom toluena i etilacetata (1:1) na vorteks aparatu i prebaćen u scintilacioni koktel na bazi toluena (toluen, PPO, POPOP). Radioaktivnost je merena na scintilacionom brojaću. Dodavanjem limunske kiseline pre prve inkubacije inhibirana je aktivnost obe izoforme enzima i dokazano da se samo radioaktivno obebeženi proizvod reakcije ekstrahuje smešom toluena i etilacetata.

Koncentracije ekstrakata koje inhibiraju 50% aktivnosti MAO (IC₅₀) su određene softverskom analizom eksperimentalnih podataka (GraphPad Prism, v.4.0).

3.12 Ispitivanje sposobnosti inhibicije preuzimanja 5-HT vodenometanolnih ekstrakata odabranih vrsta roda *Hypericum*

Uticaj vodenometanolnih ekstrakata ispitivanih vrsta roda *Hypericum* na funkciju transportera za 5-HT u sveže pripremljenim sinaptosomalnim membranama pacova je rađen po standardnoj proceduri, uz korišćenje radioaktivno obeleženog 5-HT-a (^3H -5-HT) (75). Mozgovi mužjaka pacova (Wistar soj) su posle žrtvovanja brzo izvađeni i odvajane su i preuzimane prednje trećine kore velikog mozga. To tkivo je sakupljeno iz deset pacova i homogenizovano u deset puta većoj zapremini hladnog saharoznog pufera (0,3 M saharoza, 5 mM Hepes, pH = 7,2) u odnosu na početnu masu tkiva. Razbijanje tkiva je izvedeno rotacionim homogenizerom sa teflonskim tučkom, pri brzini od 1000 obrtaja u minuti, uz 6 zaveslaja. Homogenat je centrifugiran (10 min, 1000 g, 4°C) i dobijeni supernatant sačuvan. Talog je resuspendovan u početnoj zapremini saharoznog pufera i ponovo centrifugiran pod istim uslovima. Supernatanti su spojeni i još jednom centrifugirani (20 min, 4000 g, 4°C). Talog iz poslednjeg centrifugiranja je resuspendovan u deset zapremina hladnog Krebsovog pufera (124 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,3 mM MgSO₄, 0,75 mM CaCl₂, 20 mM Na₂HPO₄, 1,2 mM KH₂PO₄, 10 mM saharoza, 0,03% askorbinske kiseline i 10 M pargilina, pH = 7,2) u odnosu na početnu masu tkiva.

Eksperimenti preuzimanja su rađeni istog dana sa sveže izolovanim sinaptosomima. Ukupna zapremina uzoraka je bila 400 μl . Sinaptosomi sa ekstraktima u različitim koncentracijama su inkubirani (10 min, 37°C) i prebačeni na led. Reakcija je započeta dodavanjem ^3H -5-HT (50 nM u finalnoj koncentraciji). Svaki uzorak pripreman je u duplikatu i inkubiran 4 min na 37°C, pa je reakcija prekidana sa po 1 ml hladnog pufera (Krebsov pufer, pH = 7,2). Filtracijom kroz Whatman GF/B filtere u vakuumu, praćenom ispiranjem sa dva puta po 3,5 ml pufera odvojen je nevezani od vezanog obeleženog liganda. Nakon sušenja (2 h, 80°C), filteri su unošeni u scintilacioni koktel na bazi toluena i radioaktivnost je merena na scintilacionom brojaču. Specifično vezivanje radioaktivnog liganda izražavano je kao razlika između ukupnog vezivanja i vezivanja u prisustvu 20 μM amitriptilina, koji je specifični inhibitor preuzimanja 5-HT.

3.13 Ispitivanje antioksidantne aktivnosti ekstrakata odabranih vrsta roda *Hypericum*

Ispitivanje ukupne antioksidantne aktivnosti (FRAP test)

FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma) testom (76) utvrđena je ukupna antioksidantna aktivnost vodeno-etanolnih ekstrakata herbi ispitivanih vrsta roda *Hypericum*. Reagens za FRAP test je napravljen tako što je u 25 ml acetatnog pufera (300 mmol/l, pH = 3,6) dodato 2,5 ml rastvora TPTZ (10 mmol/l 2,4,6-tripiridil-s-triazina u 40 mmol/l hlorovodonične kiseline) i 2,5 ml rastvora $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ (20 mmol/l u destilovanoj vodi). U epruvete je sipano 3 ml FRAP reagensa, 100 μl ekstrakta odgovarajuće koncentracije rastvorenog u metanolu i inkubirano 30 min na 37°C. Apsorbancija rastvora je zatim merena na 593 nm. Za kalibraciju su korišćeni vodeni rastvori FeSO_4 poznate koncentracije (u rasponu od 100-1000 mmol/l). Ukupna antioksidantna aktivnost ekstrakata je izražena kao $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{mg}$. Dobijeni rezultati predstavljaju srednju vrednost tri određivanja.

Ispitivanje sposobnosti neutralizacije DPPH radikala

Sposobnost ekstrakata herbi odabranih vrsta roda *Hypericum* da neutrališu 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikal je ispitivana po metodi Cuendet-a i saradnika (77). Napravljen je serija razblaženja ekstrakata u 70% etanolu. Po 4 ml ovih rastvora je pomešano sa 1 ml 0,5 mM rastvora DPPH u 70% etanolu i ostavljeno u mraku 30 min. Apsorbancija rastvora je zatim merena na 517 nm. Procenat neutralizacije DPPH radikala je izračunat korišćenjem sledeće formule:

$$I (\%) = [(A_k - A_a) / A_k] \times 100$$

gde je A_k apsorbancija negativne kontrole (koja umesto rastvora ekstrakta sadrži 4 ml odgovarajućeg rastvarača), a A_a je apsorbancija uzoraka.

Konstruisan je grafik zavisnosti procenta neutralizacije DPPH radikala od koncentracije ekstrakta. Koncentracije ekstrakata koje neutrališu 50% DPPH radikala (EC_{50} vrednosti) su zatim određene korišćenjem algoritma nelinearne regresije. Dobijeni rezultati predstavljaju srednju vrednost tri određivanja.

Ispitivanje sposobnosti neutralizacije radikal katjona 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske kiseline) (ABTS^{•+})

Sposobnost vodeno-etanolnih ekstrakata herbi ispitivanih vrsta roda *Hypericum*, kao i metanolnog ekstrakta vrste *H. richeri* i njegovih frakcija (hloroformske, etilacetatne, *n*-butanolne i vodene) dobijenih u procesu izolovanja jedinjenja, da neutrališu ABTS^{•+} je merena prema metodi Re i saradnika (78), uz male izmene. ABTS^{•+} je dobijen u reakciji 7 mM vodenog rastvora 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) (ABTS) sa 2,45 mM $K_2S_2O_8$ u mraku na sobnoj temperaturi, u trajanju od 16 h. Dobijeni ABTS^{•+} je razblažen metanolom tako da mu apsorbancija na 734 nm bude 0,7.

Napravljena je serija razblaženja ispitivanih ekstrakata u metanolu. Njihova koncentracija je podešena tako da posle dodavanja 100 μ l svakog razblaženja u 900 μ l rastvora ABTS^{•+} nakon 5 min stajanja na sobnoj temperaturi dolazi do 10-80% smanjenja apsorbance na 734 nm. Procenat neutralizacije ABTS^{•+} je izračunat korišćenjem sledeće formule:

$$S (\%) = [(A_k - A_a) / A_k] \times 100$$

gde je A_k apsorbancija negativne kontrole (koja umesto rastvora ekstrakta sadrži 100 μ l odgovarajućeg rastvarača), a A_c je apsorbancija uzoraka. Kao pozitivna kontrola korišćen je sintetski antioksidans Trolox. Konstruisan je grafik zavisnosti procenta smanjenja apsorbancije u funkciji koncentracije ekstrakata. Antioksidantni kapacitet ekstrakata je izražen kao TEAC vrednost (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity), u

jedinicama mmol Trolox/g suvog ekstrakta. TEAC vrednost se izračunava tako što se nagib grafika za ekstrakt podeli sa nagibom grafika za Trolox. Dobijeni rezultati predstavljaju srednju vrednost tri određivanja.

Ispitivanje sposobnosti neutralizacije superoksid radikal anjona

Sposobnost vodeno-etanolnih ekstrakata herbi odabranih vrsta roda *Hypericum*, metanolnog ekstrakta vrste *H. richeri* i njegovih frakcija (hloroformske, etilacetatne, *n*-butanolne i vodene) dobijenih u procesu izolovanja jedinjenja, da neutrališu superoksid radikal anjon je merena prema metodi Valentao i saradnika (79), uz male izmene. Napravljena je serija razblaženja ispitivanih ekstrakata u metanolu. U svako pripremljeno razblaženje ekstrakta (200 µl) je dodato po 200 µl sledećih reagenasa rastvorenih u fosfatnom puferu (100 mM, pH 7,4): nikotinamid adenin dinukleotid hidrid (NADH, 468 µM), „nitro blue“ tetrazolijum hlorid (NBT, 156 µM) i 5-metilfenazinijum metil sulfat (PMS, 60 µM). Nakon 5 min inkubiranja reakcione smeše, merena je apsorbancija na 560 nm. Procenat neutralizacije superoksid radikal anjona je izračunat na osnovu sledeće formule:

$$S (\%) = [(A_k - A_a) / A_k] \times 100$$

gde je A_k apsorbancija negativne kontrole (koja umesto rastvora ekstrakta sadrži 200 µl odgovarajućeg rastvarača), a A_a je apsorbancija uzoraka.

Konstruisan je grafik zavisnosti procenta neutralizacije superoksid radikal anjona od koncentracije ekstrakta. Koncentracije ekstrakata koje neutrališu 50% superoksid radikal anjona (EC_{50} vrednosti) su zatim određene korišćenjem algoritma nelinearne regresije. Dobijeni rezultati predstavljaju srednju vrednost tri određivanja.

Ispitivanje sposobnosti inhibicije lipidne peroksidacije

Sposobnost vodeno-etanolnih ekstrakata herbi odabranih vrsta roda *Hypericum*, metanolnog ekstrakta vrste *H. richeri* i njegovih frakcija (hloroformske, etilacetatne, *n*-butanolne i vodene) dobijenih u procesu izolovanja jedinjenja, da inhibiraju lipidnu peroksidaciju je merena prema metodi Liu i saradnika (80). Lipidna peroksidacija je indukovana u lipozomima, koji su napravljeni tako što je hloroformski rastvor L- α -fosfatidilholina uparen pod vakuumom do suva. Zatim je dodat rastvor pufera (10 mM NaH₂PO₄, pH 7,4) i suspenzija intenzivno mešana 5 min na Vortex uređaju. Konačna koncentracija lipida u ovako dobijenim lipozomima je bila 10 mg/ml. Razblaženi rastvor lipozoma (0,5 mg/ml) je inkubiran na 37°C u toku 60 min sa ispitivanim ekstraktima različitih koncentracija, Morovom soli (290 μ M) i askorbinskom kiselinom (100 μ M) u fosfatnom puferu (70 mM, pH = 7,4). Ukupna zapremina reakcione smeše je bila 4 ml. Reakcija lipidne peroksidacije je prekinuta dodavanjem 1 ml 20% trihlorsirćetne kiseline i 1 ml 1% 2-tiobarbiturne kiseline u 0,05 M KOH. Uzorci su zatim zagrevani na vodenom kupatilu na 100°C u trajanju od 15 min. Dobijene suspenzije su centrifugirane 15 min na 3000-4000 obrtaja u minutu. Proizvodi lipidne peroksidacije u reakciji sa tiobarbiturnom kiselinom daju roze boju supernatanta, čija se apsorbanacija meri na 532 nm. Procenat inhibicije lipidne peroksidacije je izračunat na osnovu sledeće formule:

$$I (\%) = [(A_k - A_a) / A_k] \times 100$$

gde je A_k apsorbanacija negativne kontrole (koja umesto rastvora ekstrakta sadrži odgovarajući rastvarač), a A_a je apsorbanacija uzoraka. Kao pozitivna kontrola korišćen je sintetički antioksidant Trolox.

Konstruisan je grafik zavisnosti procenta inhibicije lipidne peroksidacije od koncentracije ekstrakta. EC₅₀ vrednosti su zatim određene korišćenjem algoritma nelinearne regresije. Dobijeni rezultati predstavljaju srednju vrednost tri određivanja.

Post-kolonska HPLC-DPPH derivatizacija

Post-kolonska HPLC-DPPH derivatizacija vodeno-etanolnih ekstrakata herbi ispitivanih vrsta roda *Hypericum*, kao i metanolnog ekstrakta vrste *H. richeri* i njegovih frakcija (hloroformske, etilacetatne, *n*-butanolne i vodene) dobijenih u procesu izolovanja jedinjenja, je urađena prema metodi Kolev-a i saradnika (81). Nakon izlaska sa HPLC kolone, eluent je uvođen u reaktor gde se mešao sa post-kolonskim reagensom (10 mg/l DPPH[•] u metanolu sa 6 mg/ml Tris pufera). Protok post-kolonskog reagensa je bio 0,5 ml/min. Na protočnom UV-VIS detektoru je praćena apsorbancija na 517 nm, koja odgovara apsorpcionom maksimumu za DPPH[•]. U prisustvu jedinjenja koje ima sposobnost neutralizacije DPPH radikala dolazilo je do smanjenja apsorbancije, što je rezultiralo pojavom negativnog pika na grafiku zavisnosti apsorbancije od vremena.

3.14 Ispitivanje antimikrobne aktivnosti ekstrakata odabranih vrsta roda *Hypericum*

Za ispitivanje antimikrobnog dejstva vodeno-etanolnih ekstrakata herbi odabranih vrsta roda *Hypericum*, metanolnog ekstrakta vrste *H. richeri* i njegovih frakcija dobijenih u procesu izolovanja sekundarnih metabolita (hloroformske, etilacetatne, *n*-butanolne i vodene), kao i uljanih ekstrakata vrsta *H. richeri* i *H. perforatum* koji su pripremljeni na tri različita načina prema tradicionalnim recepturama za izradu kantarionovog ulja, korišćene su agar-difuziona (82) i mikrodiluciona metoda (83,84). Za ispitivanje antimikrobne aktivnosti korišćena je kolekcija ATCC standardnih sojeva bakterija i gljivica *Candida albicans*.

G (–) bakterije:

1. *Escherichia coli* ATCC 25922
2. *Salmonella typhimurium* ATCC 14028
3. *Salmonella enteritidis* ATCC 13076
4. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
5. *Pseudomonas tolaasii* NCTC 387

6. *Proteus mirabilis* ATCC 14273

7. *Enterobacter cloacae* ATCC 13047

G (+) bakterije:

1. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

2. *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228

3. *Enterococcus faecalis* ATCC 19433

4. *Bacillus subtilis* ATCC 6633

5. *Micrococcus luteus* ATCC 10240

6. *Micrococcus flavus* ATCC 14452

7. *Sarcina lutea* ATCC 10054

8. *Listeria monocytogenes* ATCC 15313

Gljivica:

1. *Candida albicans* ATCC 14053.

Agar-difuziona metoda se izvodi na čvrstoj sterilnoj, hranljivoj podlozi (Mueller Hinton agar za bakterije i Sabouraud agar za *C. albicans*) u Petri posudi. Diskovi sa definisanim koncentracijama ispitivanih ekstrakata se stavljaju na površinu podloge koja je prethodno zasejana čistom bakterijskom kulturom. Sposobnost rasta i razmnožavanja soja zasejanog na podlozi zavisi od njegove osetljivosti na ispitivani ekstrakt, tako da se oko diska gradi bistra providna zona kružnog oblika u kojoj nema rasta mikroorganizama, ukoliko efekat postoji.

Pripremane su prekonoćne kulture mikroorganizama u 10 ml tečne hranljive podloge (bakterije u Mueller Hinton bujonu, a *C. albicans* u Tryptone Soya bujonu) i inkubirane na 37°C. Nakon 24 h, ove kulture su razblažene fiziološkim rastvorom do 10⁵ CFU/ml i zasejane na odgovarajuće sterilne podloge u Petri posudama (prečnik 90 mm, zapremina podloge 25 ml, debljina sloja podloge 4 mm) kako bi se postigao uniformni rast mikroorganizama. Pod sterilnim uslovima sterilni diskovi (prečnika 6 mm) sa prethodno nanetim različitim koncentracijama ispitivanih ekstrakata, su postavljeni na centralni deo Petri šolje sa pripremljenim agarom i bakterijskom suspenzijom. Na isti način su pripremane i pozitivna (streptomycin-Galenika a.d. i nistatin-Hemofarm) i negativna (DMSO) kontrola. Svi ispitivani ekstrakti su rastvarani u DMSO (početna koncentracija rastvora je bila 1 mg/ml). Inkubacija je vršena na 37°C

u trajanju od 18 h, za bakterije, tj. 28 °C u trajanju od 72 h, za kvasac. Posle perioda inkubacije, merene su zone inhibicije u mm. Svaki test je urađen u triplikatu.

U cilju određivanja minimalne koncentracije ekstrakata koja inhibira vidljivi rast mikroorganizama rađena je mikrodiluciona metoda na ploči sa 96-polja.

Serijska razblaženja ispitivanih vodeno-etanolnih ekstrakata se dodaju u „bazenčić“ sa hranljivom podlogom (Mueller Hinton bujon za bakterije i Sabouraud maltozni bujon za gljivicu) u kome se nalazi 10 µl bakterijske suspenzije (10^5 CFU/ml), tako da finalni volumen u bazenčiću iznosi 100 µl.

Različite zapremine uljanih ekstrakata se dodaju direktno u bazenčić sa hranljivom podlogom, uz dodatak jedne kapi Tween 20 (Merck) zbog boljeg rastvaranja.

U svaki bazenčić se doda 10 µl 0,2 mg/ml rastvora jodnitrotetrazolijum hlorida (Sigma-Aldrich). Mikrotitracione ploče se inkubiraju 24 h na 37 °C za bakterije i 72 h na 28 °C za *C. albicans*. Nakon završene inkubacije semikvantitativno se utvrđuje minimalna inhibitorna koncentracija. Svaka promena boje iz ljubičaste u roze ili obezbojavanje predstavlja dokaz antimikrobnog delovanja ispitivanog ekstrakta. Najniža koncentracija pri kojoj je došlo do promene boje se uzima kao MIC vrednost. Provera je vršena reinokulacijom na odgovarajućoj hranljivoj podlozi ili prebacivanjem 2 µl iz bazenčića u kome se ispitivani ekstrakt nalazi u minimalnoj inhibitornoj koncentraciji, u bazenčić sa 100 µl čistog hranljivog medijuma. U slučaju provere antibakterijskog delovanja, prati se da li dolazi do rasta bakterijskih sojeva posle inkubacije od 24 h pri temperaturi od 37 °C, dok se za proveru antifungalnog delovanja prati da li dolazi do rasta *C. albicans* posle inkubacije od 72 h pri temperaturi od 28 °C. DMSO je korišćen kao kontrola, dok su streptomycin i nistatin korišćeni kao pozitivne kontrole.

3.15 Ispitivanje antiedematozne aktivnosti uljanih ekstrakata vrsta *H. perforatum* i *H. richeri*

Antiedematozno delovanje ispitivano je na modelu karageninom akutno izazvanog edema šapice pacova (85). Za eksperimente su korišćeni Wistar pacovi muškog pola, stari šest do osam nedelja, težine 200-250 g. Životinje su čuvane u polipropilenskim kavezima pod standardnim uslovima: temperatura $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, vlažnost vazduha 50%, hranjene su briketiranom hranom (Vetprom), a vodu su dobijale *ad libitum* iz plastičnih pojilica. Svaka eksperimentalna grupa se sastojala od 7 životinja. Životinjama je uskraćena hrana 18-20 h pre početka eksperimenta, uz slobodan pristup pijaćoj vodi. Studije o životinjama su izvedene u skladu sa principima za korišćenje i brigu o laboratorijskim životinjama. Uljani ekstrakti vrste *H. perforatum* i *H. richeri* su davani životinjama *p.o.* u tri različite doze (0,5 ml/kg; 0,75 ml/kg; 1,25 ml/kg telesne mase pacova). Kao referentni lek korišćen je indometacin (Sigma-Aldrich) rastvoren u DMSO, u dozi od 8 mg/kg, *p.o.* Kvercetin i I3,II8-biapigenin, koji su rastvoreni u suncokretovom ulju, korišćeni su u dozi od 8 mg/kg, *p.o.* Kontrolnoj grupi životinja je dato suncokretovo ulje u dozi od 1,25 ml/kg *p.o.* Edem šapice je izazvan subplantarnim injektiranjem rastvora karagenina u fiziološkom rastvoru (0,5%; 0,1 ml) u zadnju desnu šapu 1 h posle oralne primene testiranih uzoraka. Čist fiziološki rastvor (0,9%; 0,1 ml) je injektovan u zadnju levu šapu koja je služila kao kontrolna (bez inflamacije). Životinje su žrtvovane 3 h posle injektovanja karagenina, a šape su amputirane i izmerene na analitičkoj vagi. Razlika u težini između desne i leve šape tretiranih u odnosu na netretirane pacove, poslužila je kao mera postignute antiedematozne aktivnosti testiranih uzoraka. Antiedematozni efekat (AE) je izračunat pomoću sledeće formule:

$$\text{AE} = (\Delta k - \Delta e) \times 100 / \Delta k$$

gde Δk razlika u težini šapa kod kontrolne grupe, a Δe razlika u težini šapa tretirane grupe.

Svi eksperimenti urađeni su u skladu sa Direktivom 86/609 EEZ. Statistička obrada rezultata je izvršena pomoću Mann–Whitney *U*-testa. Korišćen je statistički program SPSS 11.5 (SPSS11.5, Inc., Chicago, IL). Statistički značajnim su smatrane razlike srednjih vrednosti na nivou za $p < 0,05$.

3.16 Ispitivanje gastroprotektivne aktivnosti uljanih ekstrakata vrsta *H. perforatum* i *H. richeri*

Za ispitivanje gastroprotektivnog delovanja uljanih ekstrakata vrsta *H. perforatum* i *H. richeri* korišćen je eksperimentalni model akutnog ulkusa izazvanog indometacinom (86). Za eksperimente su korišćeni Wistar pacovi muškog pola, stari šest do osam nedelja, težine 200-250 g. Životinje su čuvane u polipropilenskim kavezima pod standardnim uslovima: temperatura $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, vlažnost vazduha 50%, hranjene su briketiranom hranom (Vetprom), a vodu su dobijale *ad libitum* iz plastičnih pojilica. Svaka eksperimentalna grupa se sastojala od 7 životinja. Životinjima je uskraćena hrana 18-20 h pre početka eksperimenta, uz slobodan pristup pijaćoj vodi. Studije o životinjama su izvedene u skladu sa principima za korišćenje i brigu o laboratorijskim životinjama. Životinjama je najpre davan indometacin (Sigma-Aldrich) u dozi 8 mg/kg *p.o.* Odmah nakon toga primenjeni su uljani ekstrakti *p.o.* u tri različite doze (0,5 ml/kg; 0,75 ml/kg; 1,25 ml/kg telesne mase pacova). Kvercetin i I3,II8-biapigenin, koji su rastvoreni u suncokretovom ulju, korišćeni su u dozi od 8 mg/kg, *p.o.* Kontrolnoj grupi životinja je dato suncokretovo ulje u dozi od 1,25 ml/kg *p.o.* Životinje su žrtvovane 4 h nakon primene indometacina. Želudac je otvaran po većoj krivini, ispran vodom i posmatran pod osvetljenom lupom (3×). Intenzitet gastričnih lezija je ocenjivan prema ukupnoj dužini (mm) i površini (mm²) gastričnih lezija, kao i prema modifikovanoj Adamijevoj skali (Tabela 3.3) (87).

Svi eksperimenti urađeni su u skladu sa Direktivom 86/609 EEZ. Statistička obrada rezultata je izvršena pomoću Mann–Whitney *U*-testa. Korišćen je statistički program SPSS 11.5 (SPSS11.5, Inc., Chicago, IL). Statistički značajnim su smatrane razlike srednjih vrednosti na nivou za $p < 0,05$.

Tabela 3.3 Modifikovana Adamijeva skala za ocenjivanje intenziteta gastričnih lezija

Skor	Stepen oštećenja
0	nema lezija
0,5	blaga hiperemija ili ≤ 5 petehija
1	≤ 5 erozija ≤ 5 mm u dužini
1,5	≤ 5 erozija ≤ 5 mm u dužini i mnoge petehije
2	6-10 erozija ≤ 5 mm u dužini
2,5	1-5 erozija > 5 mm u dužini
3	5-10 erozija > 5 mm u dužini
3,5	> 10 erozija > 5 mm u dužini
4	1-3 erozije ≤ 5 mm u dužini i 0,5 – 1 mm u širini
4,5	4-5 erozija ≤ 5 mm u dužini i 0,5 – 1 mm u širini
5	1-3 erozija > 5 mm u dužini i 0,5 – 1 mm u širini
6	5 lezija 4. ili 5. stepena
7	5 lezija ≥ 6 . stepena
8	kompletna lezija mukoze sa hemoragijom

4. REZULTATI I DISKUSIJA

4.1 Hemijska analiza

4.1.1 Sadržaj ukupnih hipericina u herbi i vodeno-etanolnim ekstraktima odabranih vrsta roda *Hypericum*

Naftodiantroni predstavljaju grupu jedinjenja čije je prisustvo karakteristika većine vrsta roda *Hypericum*. Dva glavna naftodiantrona u kantarionu su pseudohipericin i hipericin. Uglavnom se nalaze u cvetu i pupoljcima (58). U biljci se još mogu naći i biosintetski prekursori protohipericin i protopseudohipericin, koji su jako nestabilni i pod uticajem svetlosti lako prelaze u hipericin i pseudohipericin. Ovakav tip strukture molekula je relativno redak u biljnom svetu tako da je u početku hipericin smatran za glavnu aktivnu komponentu kantariona. Iako je na osnovu rezultata daljih istraživanja utvrđeno da postoje i druge aktivne komponente, Evropska farmakopeja i u svom poslednjem izdanju (Ph. Eur. 7.0) (24) kao zahtev za specifični kvalitet herbe kantariona, *Hyperici herba*, propisuje da sadržaj ukupnih naftodiantrona (tzv. hipericina) izražen kao hipericin mora da iznosi najmanje 0,08%. U Ph. Eur. 7.0 oficinalan je i suvi kvantifikovani ekstrakt herbe kantariona (*Hyperici herbae extractum siccum quantificatum*) u kome sadržaj ukupnih hipericina, izražen kao hipericin, treba da iznosi 0,10-0,30% (za ovaj ekstrakt Ph. Eur. 7.0 definiše takođe i najmanji sadržaj flavonoida i najveći sadržaj hiperforina) (24).

Sadržaj ukupnih hipericina u herbi i vodeno-etanolnim ekstraktima odabranih vrsta roda *Hypericum* je određivan spektrofotometrijski, po proceduri opisanoj u Ph. Eur. 6.0 za drogu *Hyperici herba*. Rezultati su prikazani u Tabeli 4.1.

Najveći sadržaj ukupnih hipericina je detektovan u vrsti *H. barbatum*: 0,58% u herbi i 0,98% u ekstraktu. Po količini hipericina sledi vrsta *H. perforatum*: u herbi je sadržaj iznosio 0,36%, što je oko četiri puta više od minimalnog sadržaja koji propisuje Evropska farmakopeja; ekstrakt ispitivanog uzorka bio je oko dva puta bogatiji

hipericinom u odnosu na ekstrakt oficinalan u Ph. Eur. 7.0. Sadržaj ukupnih hipericina u herbi i ekstraktu vrste *H. richeri* je sličan kao kod vrste *H. perforatum*, dok je u vrstama *H. maculatum*, *H. acutum* i *H. hirsutum* bio znatno niži (od 0,14-0,04% u herbama i od 0,28-0,08% u ekstraktima). U vrsti *H. androsaemum* nisu detektovana jedinjenja naftodiantronskog tipa.

Veći sadržaj hipericina određen u vrsti *H. barbatum* u odnosu na *H. perforatum* je u skladu sa do sada objavljenim rezultatima. Kitanov je detektovao 2,4 puta veći sadržaj hipericina u vrsti *H. barbatum* (0,306%) u odnosu na vrstu *H. perforatum* (0,125%) (88). Prema literaturnim podacima određeni su različiti sadržaji ukupnih hipericina u herbi *H. perforatum*: 0,07-0,17% (89); 0,125% (88); 0,14% (90); 0,585-0,985% (91). Utvrđeno je da razlike u sadržaju ukupnih hipericina nisu u korelaciji sa nadmorskom visinom i lokalitetom na kome su prikupljeni uzorci (89). Uzorak herbe *H. richeri*, koji je predmet istraživanja ove doktorske disertacije, je bio nešto bogatiji naftodiantronima u poređenju sa rezultatima drugih autora: 0,134% (88) i 0,22% (92), dok su sadržaji određeni u uzorcima vrsta *H. maculatum* i *H. hirsutum* bili ekvivalentni literaturnim podacima: 0,13% (88) i 0,043% (90). Odsustvo hipericina u vrsti *H. androsaemum* je potvrđeno i u ranije publikovanim radovima drugih autora (88,93).

Tabela 4.1 Sadržaj ukupnih hipericina u herbi i vodeno-etanolnim ekstraktima odabranih vrsta roda *Hypericum*

Biljna vrsta	Sadržaj ukupnih hipericina (%)	
	Herba	Vodeno-etanolni ekstrakt
<i>H. richeri</i>	0,32 ± 0,02	0,56 ± 0,02
<i>H. perforatum</i>	0,36 ± 0,02	0,68 ± 0,03
<i>H. barbatum</i>	0,58 ± 0,03	0,98 ± 0,05
<i>H. hirsutum</i>	0,042 ± 0,003	0,078 ± 0,004
<i>H. androsaemum</i>	nije detektovano	nije detektovano
<i>H. acutum</i>	0,06 ± 0,01	0,15 ± 0,03
<i>H. maculatum</i>	0,14 ± 0,02	0,28 ± 0,02

4.1.2 Sadržaj ukupnih fenola i tanina u herbi i vodeno-etanolnim ekstraktima odabranih vrsta roda *Hypericum*

Fenolna jedinjenja predstavljaju jednu od najšire rasprostranjenih grupa sekundarnih metabolita biljaka. U svojoj strukturi imaju jednu ili više hidroksilnih grupa vezanih direktno za aromatično jezgro. Do sada je identifikovano preko 8000 fenolnih jedinjenja, od jednostavnih sa jednim aromatičnim prstenom, do polimernih kompleksnih tanina i drugih složenih polifenolnih struktura (94). Pored značaja za samu biljku (zaštita od UV zračenja i raznih bolesti, privlačenje insekata zbog oprašivanja), pokazano je da fenoli ispoljavaju i čitav niz drugih bioloških aktivnosti (antioksidantna, antiinflamatorna, antimikrobna, antialergijska, antitumorska, inhibicija različitih enzima) koje mogu da doprinesu očuvanju zdravlja čoveka (95,96,97,98).

Sadržaj ukupnih fenola u herbi i vodeno-etanolnim ekstraktima odabranih vrsta roda *Hypericum* je određivan spektrofotometrijski na bazi bojene reakcije sa Folin-Ciocalteu (FC) reagensom. Apsorbancija je merena na 765 nm, a sadržaj ukupnih fenola je izračunat iz kalibracione krive za galnu kiselinu.

Sadržaj tanina u ispitivanim uzorcima je određivan spektrofotometrijski, po proceduri opisanoj u Evropskoj farmakopeji 6.0 (70).

Rezultati su prikazani u Tabeli 4.2. Najveći sadržaj ukupnih fenola je detektovan u vrsti *H. acutum* (81 mg GAE/g u herbi, 359 mg GAE/g u ekstraktu) i *H. maculatum* (65 mg GAE/g u herbi, 277 mg GAE/g u herbi). Zatim po sadržaju ukupnih fenola slede vrste *H. hirsutum* i *H. perforatum* (oko 25% manji sadržaj u odnosu na dobijene vrednosti za vrstu *H. acutum*), dok je najniži sadržaj ukupnih fenola detektovan u vrstama *H. barbatum*, *H. richeri* i *H. androsaemum*.

U herbi i ekstraktu vrsta *H. maculatum* i *H. acutum* detektovan je i najveći sadržaj tanina: 8,4% u herbi (11,1% u ekstraktu) i 6,1% u herbi (9,6% u ekstraktu), redom. Prema količini tanina dalje slede vrste *H. perforatum*, *H. hirsutum*, dok je najmanji sadržaj određen u vrstama *H. barbatum*, *H. richeri* i *H. androsaemum*, sa sadržajem tanina od 4,1-5,6% u herbama i 5,3-7,3% u ekstraktima.

Sadržaj ukupnih fenola u vodeno-etanolnim ekstraktima odabranih vrsta roda *Hypericum* je u proseku bio četiri puta veći nego u herbi, dok je ta razlika u sadržaju tanina bila neznatna. Ovo se može objasniti time da 70% etanol dobro ekstrahuje

polifenolna jedinjenja iz herbe, za razliku od sposobnosti ekstrakcije tanina. Prilikom određivanja tanina, ekstrakcija se vrši vodom uz zagrevanje na vodenom kupatilu u trajanju od 30 min. Dobijeni rezultati ukazuju da je ekstrakcija tanina toplom vodom mnogo efikasnija nego što je to slučaj sa 70% etanolom.

Prema literaturnim podacima, sadržaj ukupnih fenola spektrofotometrijski je određivan samo u suvim ekstraktima vrsta *H. perforatum*, *H. hirsutum* i *H. androsaemum*. U ekstraktima vrste *H. perforatum*, koji su dobijeni ekstrakcijom u aparaturi po Soxhlet-u smešom rastvarača metanol-aceton (1:1), sadržaj ukupnih fenola je bio od 6,61-11,24 mgGAE/g ekstrakta, dok je u ekstraktu vrste *H. hirsutum* (isti način ekstrakcije) sadržaj ukupnih fenola bio 3,77 mgGAE/g ekstrakta (27). U literaturi se navodi još i podatak o sadržaju fenola u liofilizovanom vodenom ekstraktu vrste *H. androsaemum* (109 mg pirogalola/g ekstrakta) koji je dobijen zagrevanjem do ključanja 10 g droge sa 100 ml vode u trajanju od 10 minuta (99).

Sadržaj tanina određivan je u ranijim istraživanjima drugih autora u svim odabranim vrstama roda *Hypericum*, izuzev u vrstama *H. androsaemum* i *H. acutum*. Tako su npr. Zheleva-Dimitrova i saradnici konstatovali da je sadržaj tanina u metanolnom ekstraktu vrste *H. perforatum* bio 8,67%, u ekstraktima vrsta *H. maculatum* 7,06%, *H. barbatum* 2,89% i *H. richeri* 2,26% (100). U istraživanju koje su sprovedeli Ćorović i saradnici, sadržaj tanina bio je u intervalu od 6,47-11,24% za *H. perforatum*, 2,65-7,75% za *H. maculatum*, 7,62-10,54% za *H. barbatum* i 7,60-8,83% za *H. hirsutum* (91).

Tabela 4.2 Sadržaj ukupnih fenola i tanina u vodeno-etanolnim ekstraktima odabranih vrsta roda *Hypericum*

Biljna vrsta	Ukupni fenoli (mg GAE/g)		Ukupni tanini (%)	
	Herba	Vodeno-etanolni ekstrakt	Herba	Vodeno-etanolni ekstrakt
	<i>H. richeri</i>	42,9 ± 0,6	207 ± 5	4,1 ± 0,2
<i>H. perforatum</i>	57,8 ± 0,8	243 ± 7	6,2 ± 0,3	8,8 ± 0,3
<i>H. barbatum</i>	40,3 ± 0,5	200 ± 4	3,7 ± 0,3	4,4 ± 0,2
<i>H. hirsutum</i>	62,8 ± 0,8	254 ± 6	5,6 ± 0,3	7,3 ± 0,3
<i>H. androsaemum</i>	39,6 ± 0,5	212 ± 3	4,3 ± 0,3	5,6 ± 0,2
<i>H. acutum</i>	81,2 ± 0,8	359 ± 8	6,1 ± 0,2	9,6 ± 0,3
<i>H. maculatum</i>	65,3 ± 0,7	277 ± 5	8,4 ± 0,4	11,1 ± 0,3

4.1.3 Identifikacija flavonoida izolovanih iz vrste *H. richeri*

Primenom hromatografskih tehnika razdvajanja iz metanolnog ekstrakta herbe vrste *H. richeri* je izolovano devet flavonoida (Slika 4.1): tri glikozida miricetina (jedinjenja **5** - **7**), četiri glikozida kvercetina (jedinjenja **8**, **9**, **11**, **12**), aglikon kvercetin (jedinjenje **14**) i biflavonoid I3,II8-biapigenin (jedinjenje **15**).

Strukture izolovanih jedinjenja su utvrđene na osnovu analize UV, ¹H NMR i ¹³C NMR spektralnih podataka.

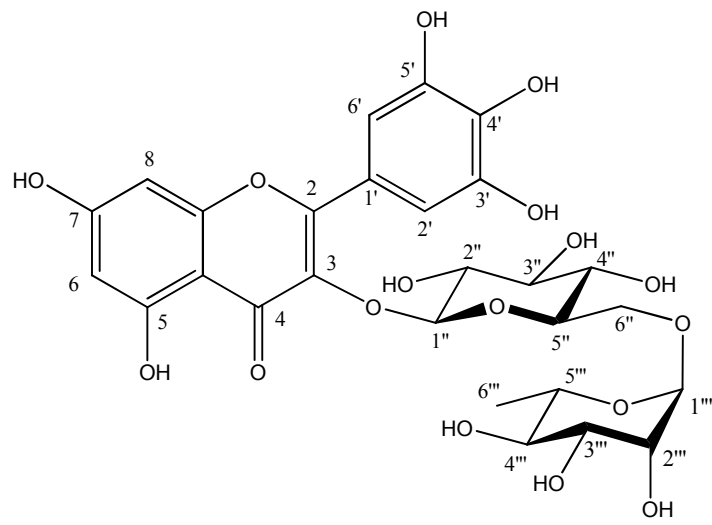
U ¹H NMR spektrima glikozida miricetina, kao i kvercetina i njegovih glikozida se uočava signal na $\delta \sim 12,6$ koji potiče od protona vezanog intramolekulskom vodoničnom vezom (H-5) (Slike 4.2, 4.4, 4.6, 4.8, 4.10 i 4.12).

Između 6 i 8 ppm u ¹H NMR spektrima svih ispitivanih jedinjenja se javljaju signali aromatičnih protona aglikona. Za kvercetin i njegove glikozide se uočavaju: dublet sa vicinalnom konstantom sprezanja ~ 8 Hz (H-5'), dublet sa daljinskom konstantom sprezanja ~ 2 Hz (H-2'), dvostruki dublet (H-6') i dva dubleta sa

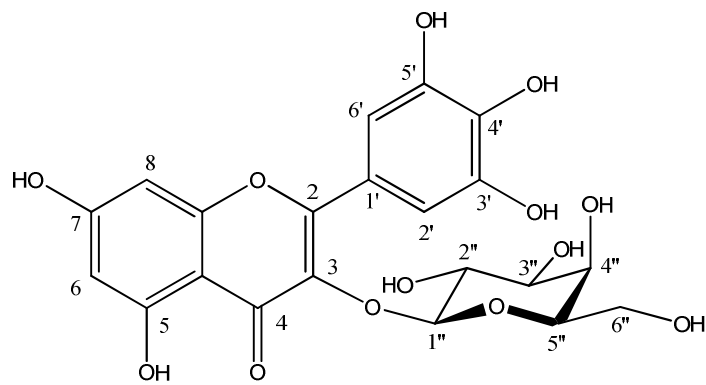
daljinskom konstantom sprezanja ~ 2 Hz (H-6 i H-8). Ovakav oblik signala je karakterističan za kvercetin i njegove derivate (Slike 4.8, 4.10, 4.12, 4.14 i 4.16). Pošto su kod glikozida miricetina protoni H-2' i H-6' hemijski ekvivalentni, u aromatičnoj oblasti ^1H NMR spektara ovih jedinjenja se javlja jedan singlet (H-2' i H-6'), uz dva dubleta sa daljinskom konstantom sprezanja ~ 2 Hz (H-6 i H-8) (Slike 4.2, 4.4 i 4.6). U ^1H NMR spektru I3,II8-biapigenina se javljaju dva AA'BB' spinska sistema (H-2', H-3', H-2'a, H-3'a), dva dubleta sa daljinskom konstantom sprezanja ~ 2 Hz (H-6 i H-8) i dva singleta (H-3a i H-6a) (Slika 4.18).

Signali anomernih protona flavonoidnih glikozida se nalaze u intervalu 4-5,5 ppm. Anomerni protoni β -glukozidnih i β -galaktozidnih jedinica se javljaju kao dubleti sa konstantom sprezanja od 7 Hz, dok se protoni α -ramnozidnih jedinica javljaju kao prošireni singleti. Signali odgovarajućih neanomernih protona se preklapaju, i nalaze se u oblasti 3-4 ppm, osim signala H-6 ramnoze koji se nalazi na $\delta \sim 1$ (jedinjenja **5**, **8** i **12**; Slike 4.2, 4.4, 4.6, 4.8, 4.10, 4.12 i 4.14).

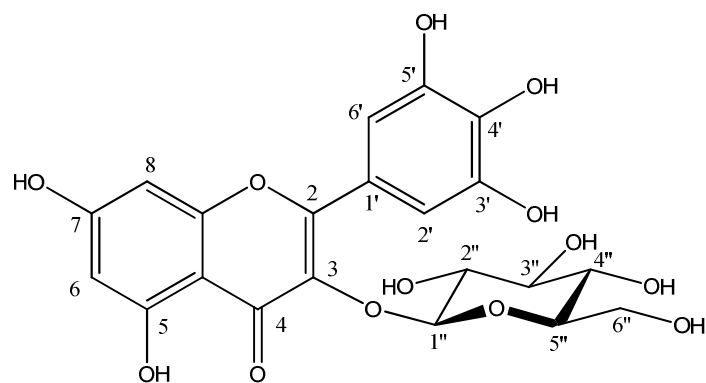
Identitet glikozidnih jedinica flavonoidnih glikozida je utvrđen na osnovu hemijskih pomeranja signala u ^{13}C NMR spektrima, koja su bila u skladu sa literaturnim podacima (101).



Miricetin 3-*O*-rutinozid (jedinjenje 5)

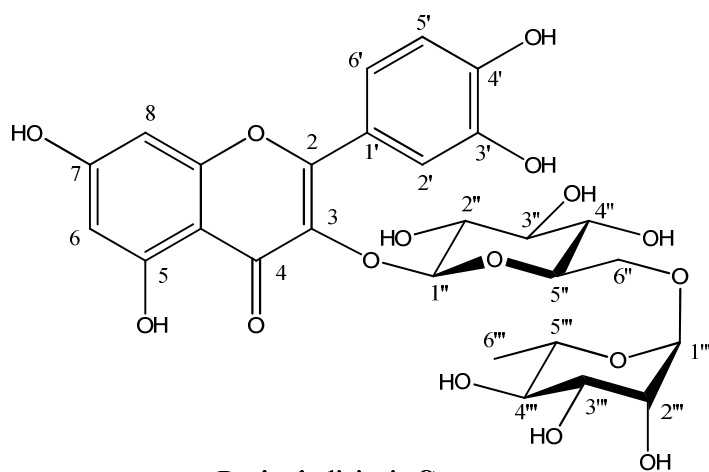


Miricetin 3-*O*-galaktozid (jedinjenje 6)

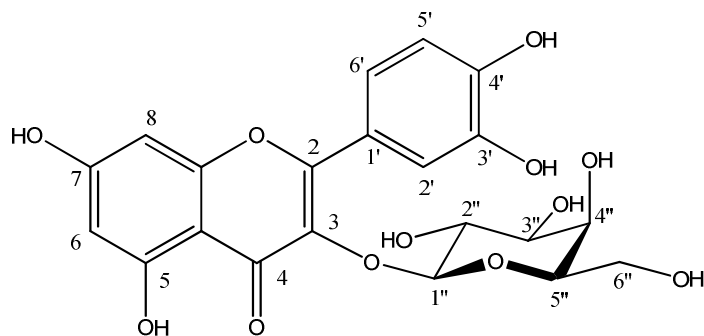


Miricetin 3-*O*-glukozid (jedinjenje 7)

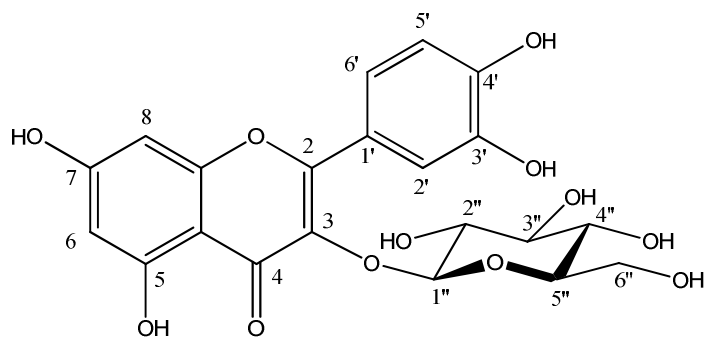
Slika 4.1 Struktura flavonoida izolovanih iz vrste *H. richeri*



Rutin (jedinjenje 8)

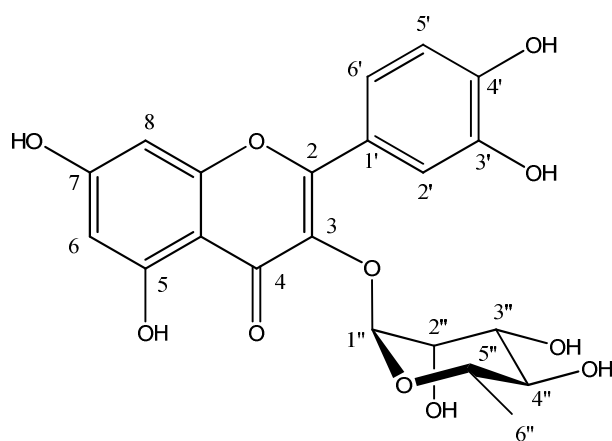


Hiperozid (jedinjenje 9)

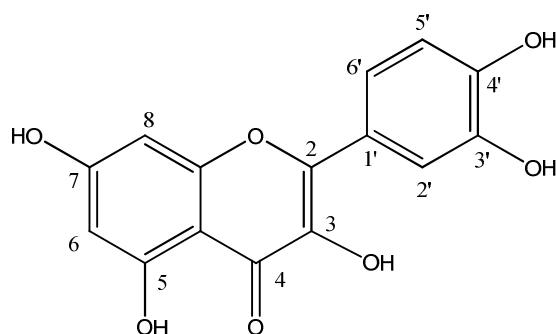


Izokvercitrin (jedinjenje 11)

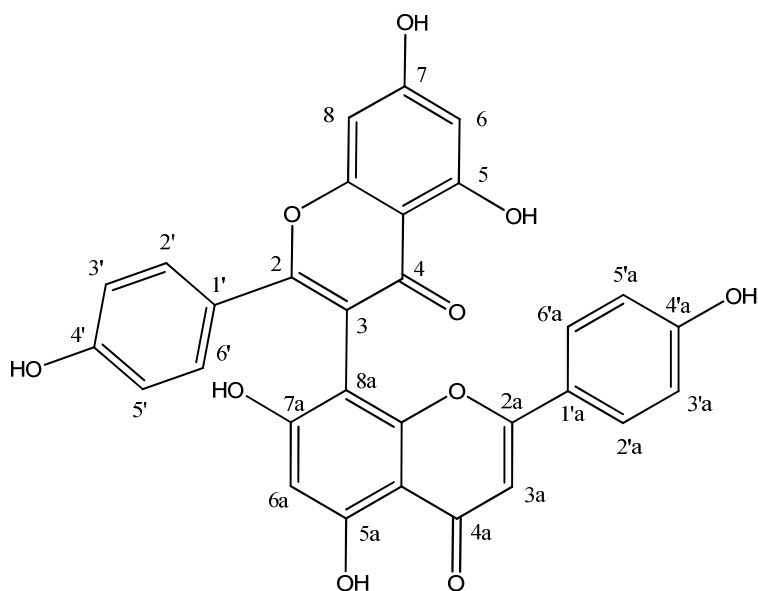
Slika 4.1 (nastavak) Struktura flavonoida izolovanih iz vrste *H. richeri*



Kvercitrin (jedinjenje 12)

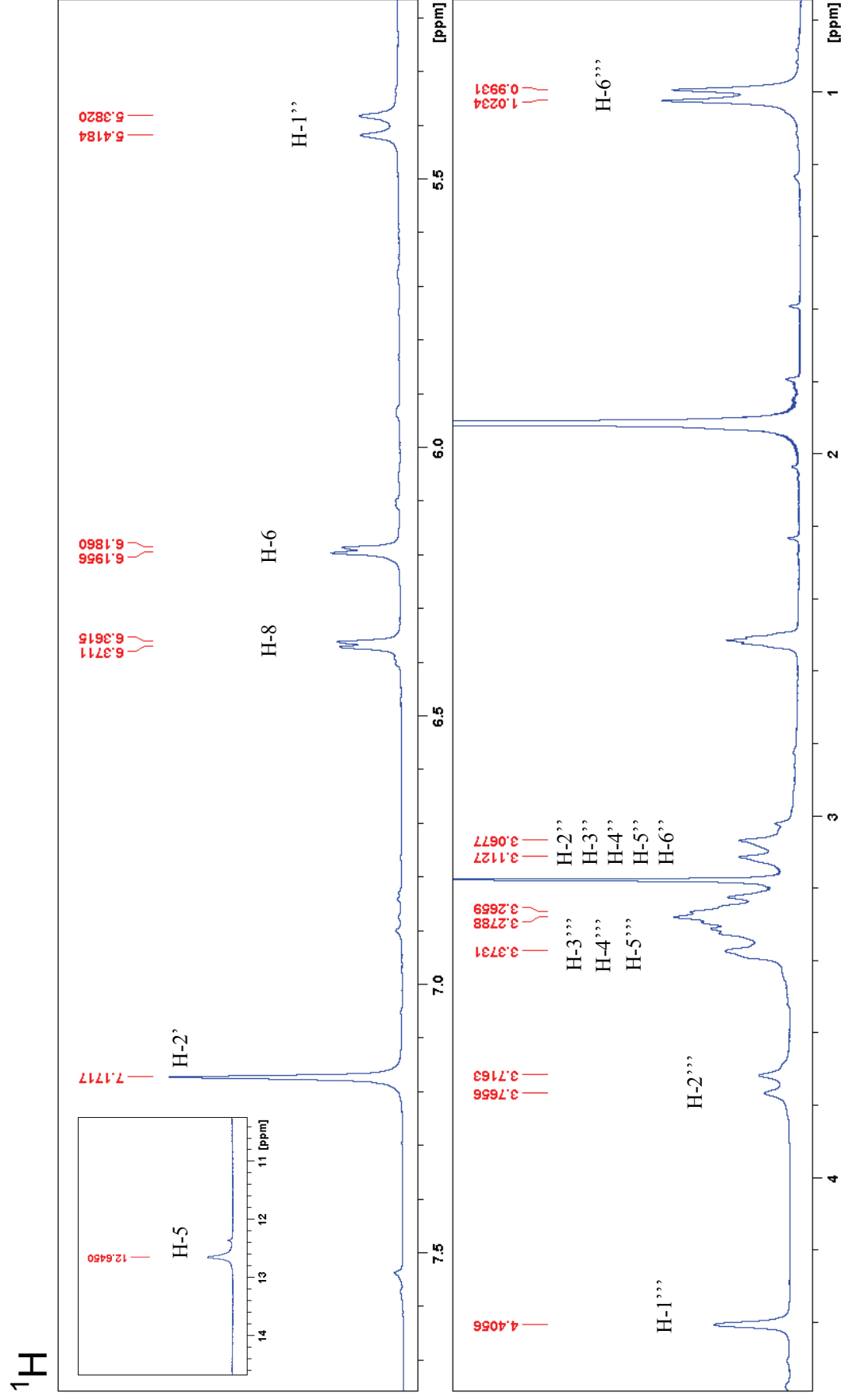


Kvercetin (jedinjenje 14)



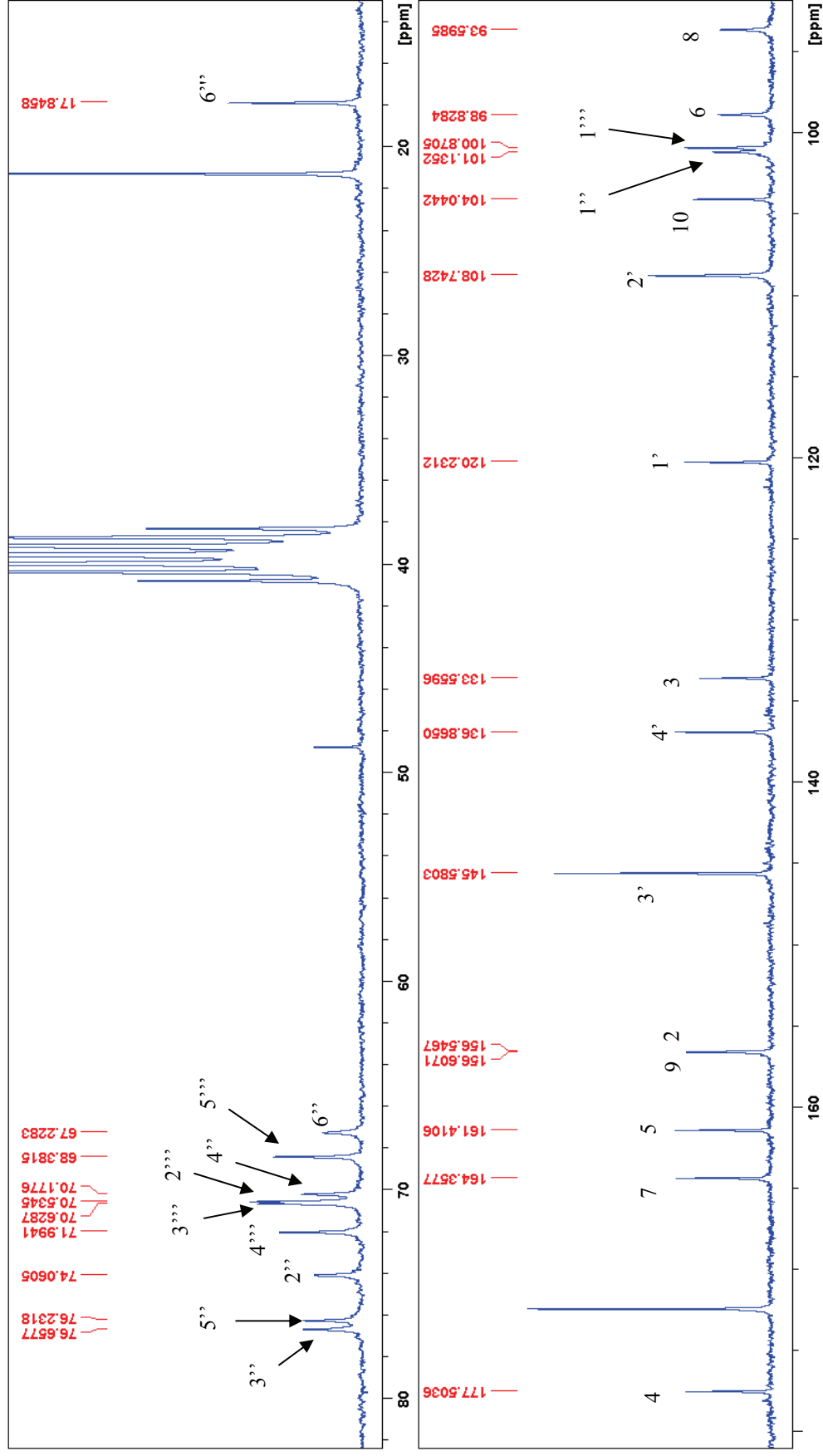
I3,II8-Biapigenin (jedinjenje 15)

Slika 4.1 (nastavak) Struktura flavonoida izolovanih iz vrste *H. richeri*

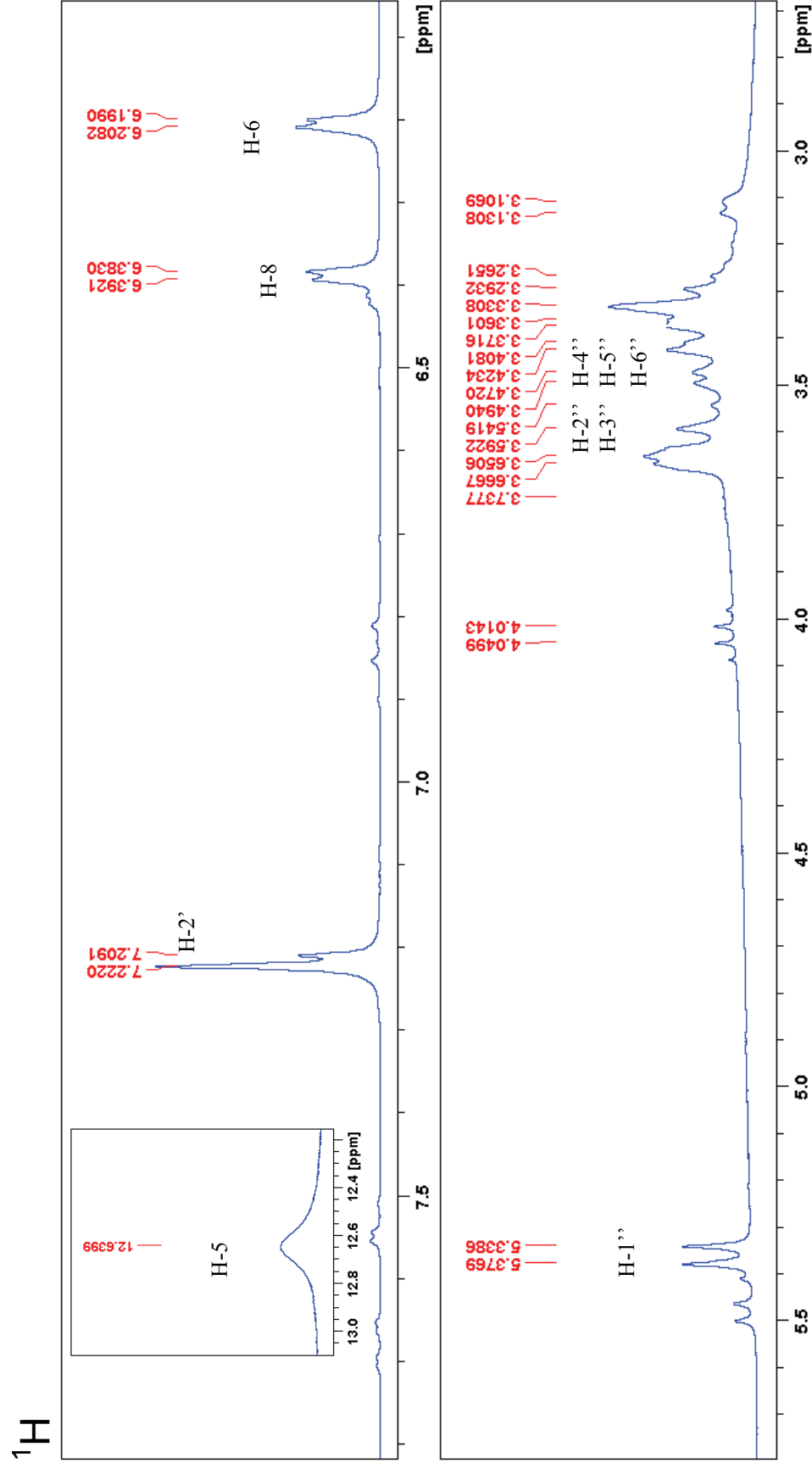


Slika 4.2 ^1H NMR spektar miricetin 3-O-rutinozida (jedinjenje 5)

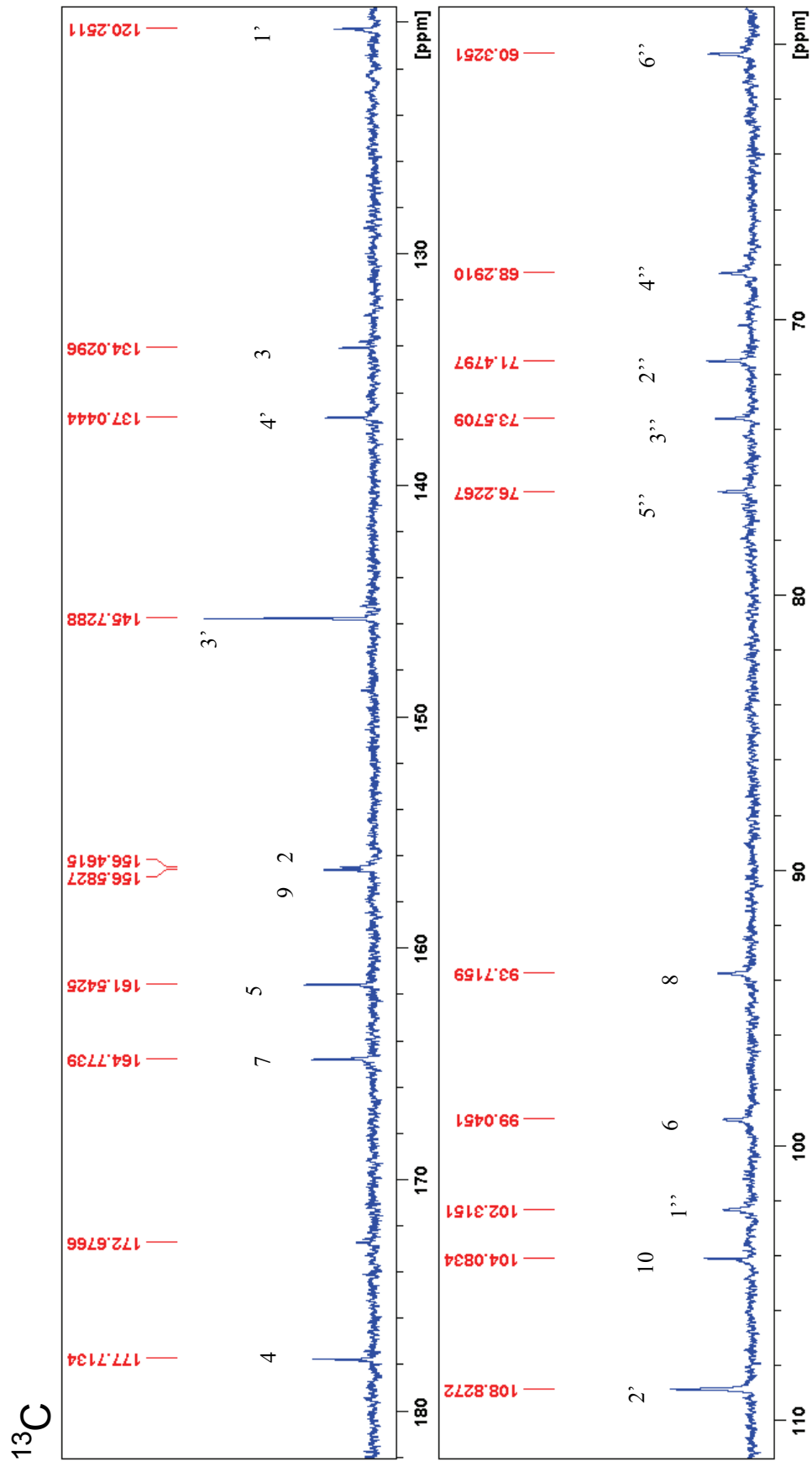
^{13}C



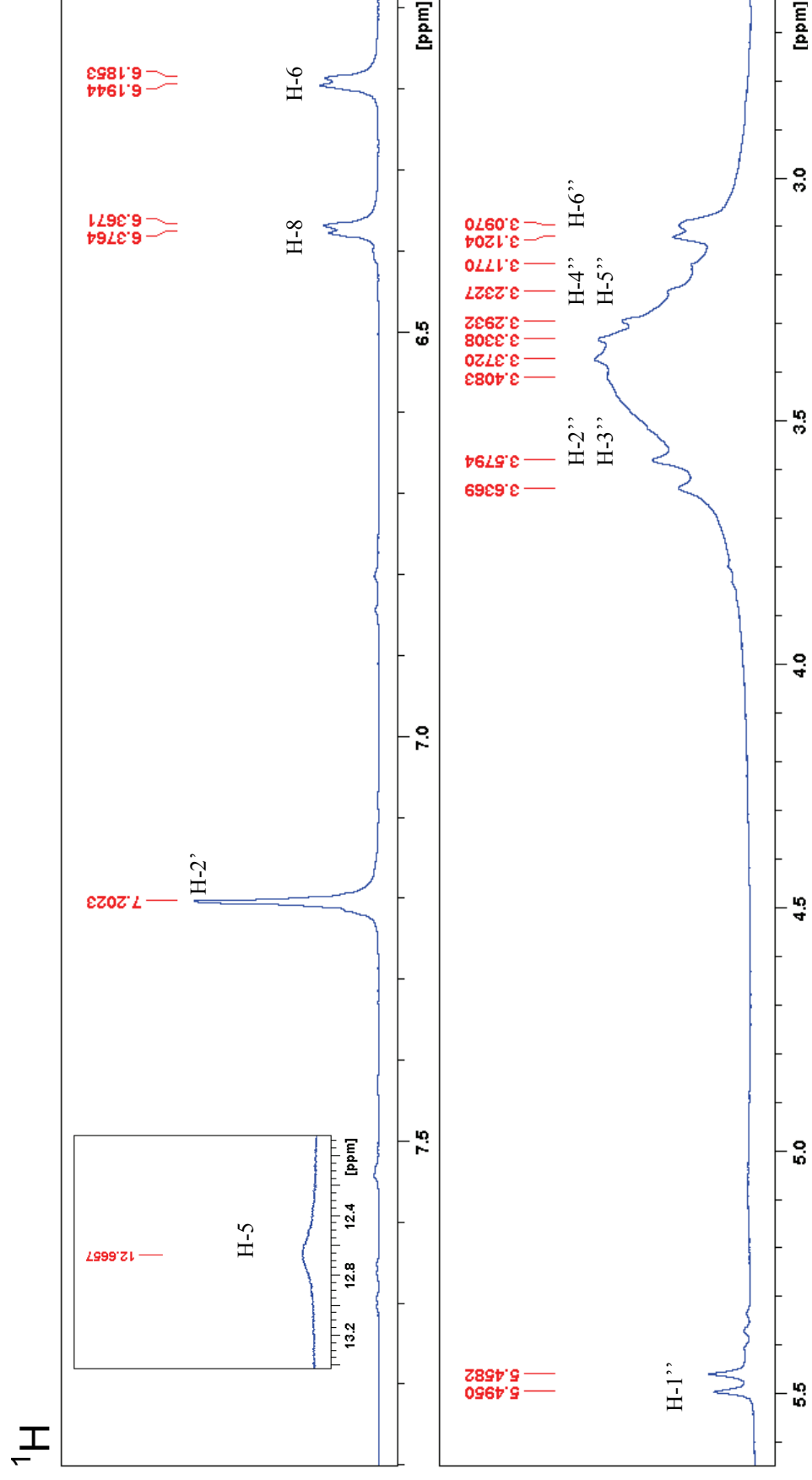
Slika 4.3 ^{13}C NMR spektar miricetin 3-O-rutinozida (jedinjenje 5)



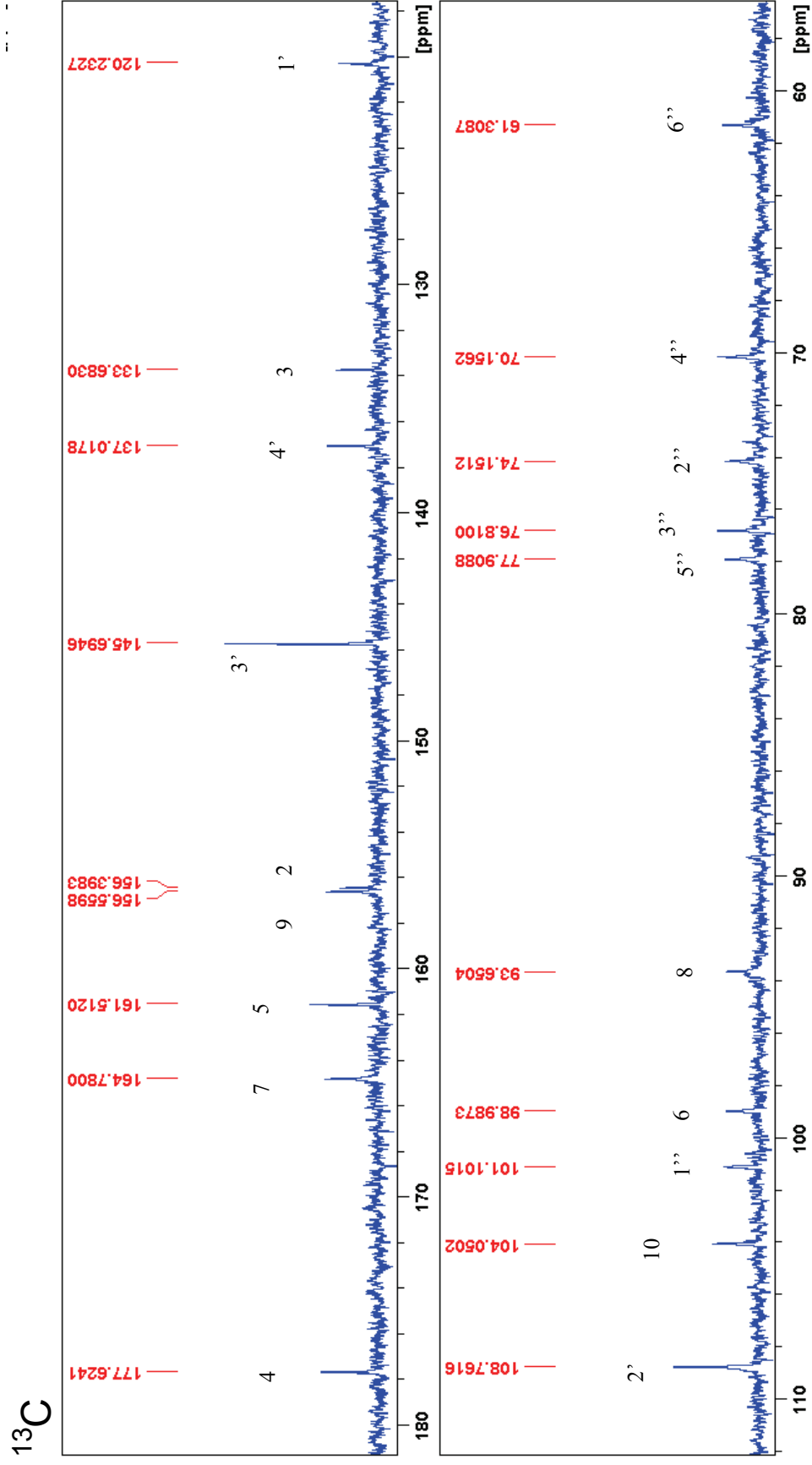
Slika 4.4 ^1H NMR spektar miricetin 3-*O*-galaktosida (jedinjenje 6)



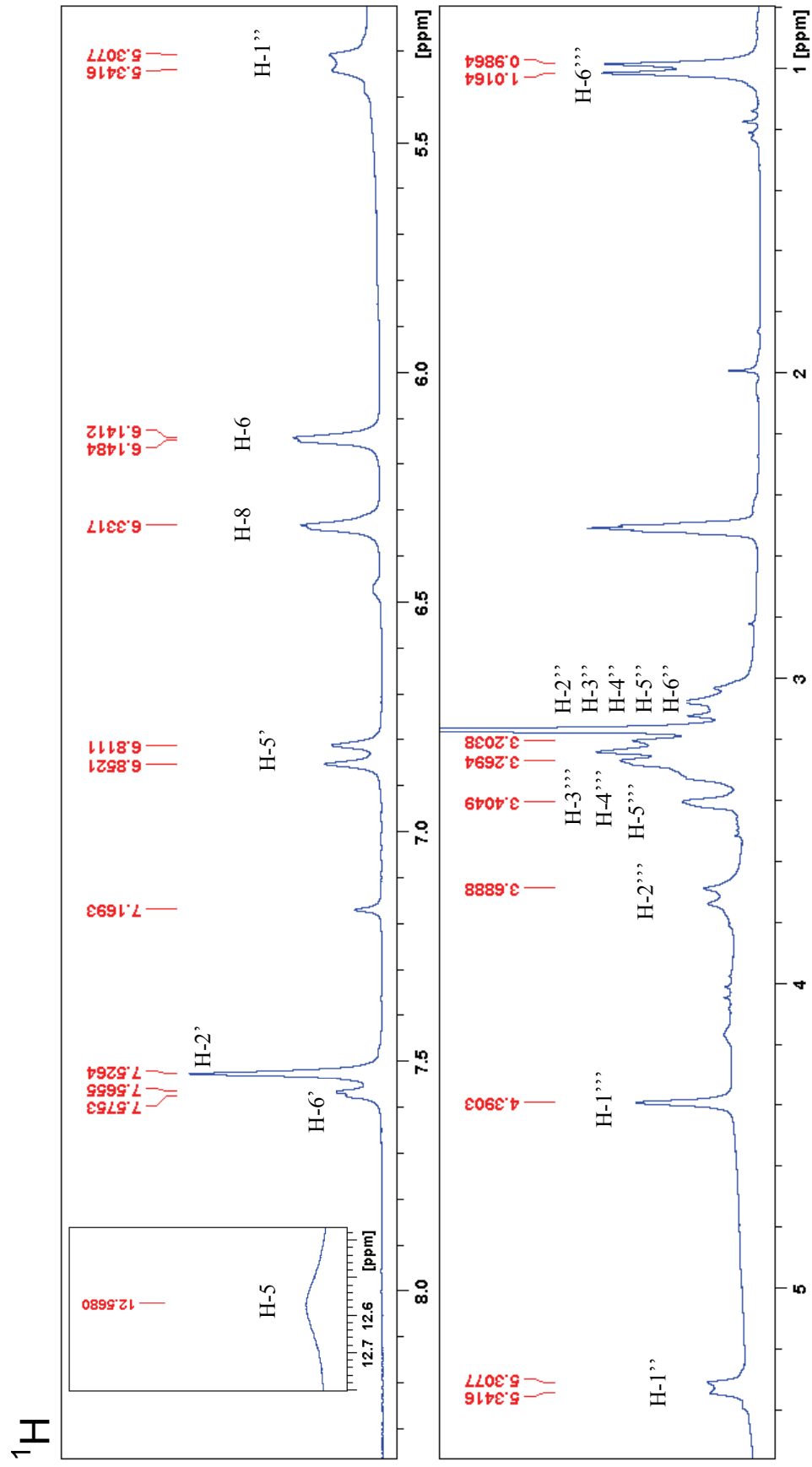
Slika 4.5 ^{13}C NMR spektar miricetin 3-*O*-galaktozida (jedinjenje 6)



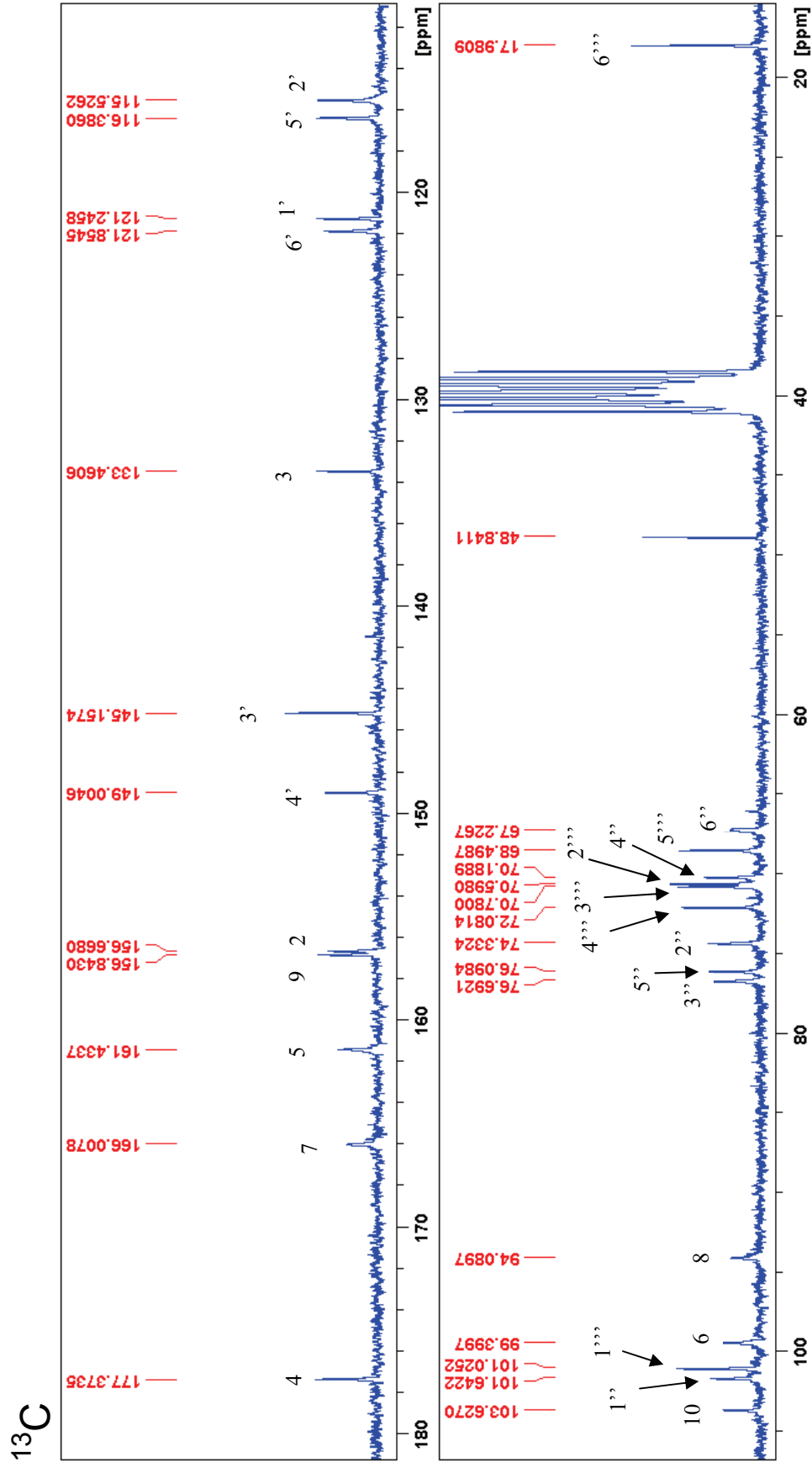
Slika 4.6 ^1H NMR spektar miricetin 3-O-glukozida (jedinjenje 7)



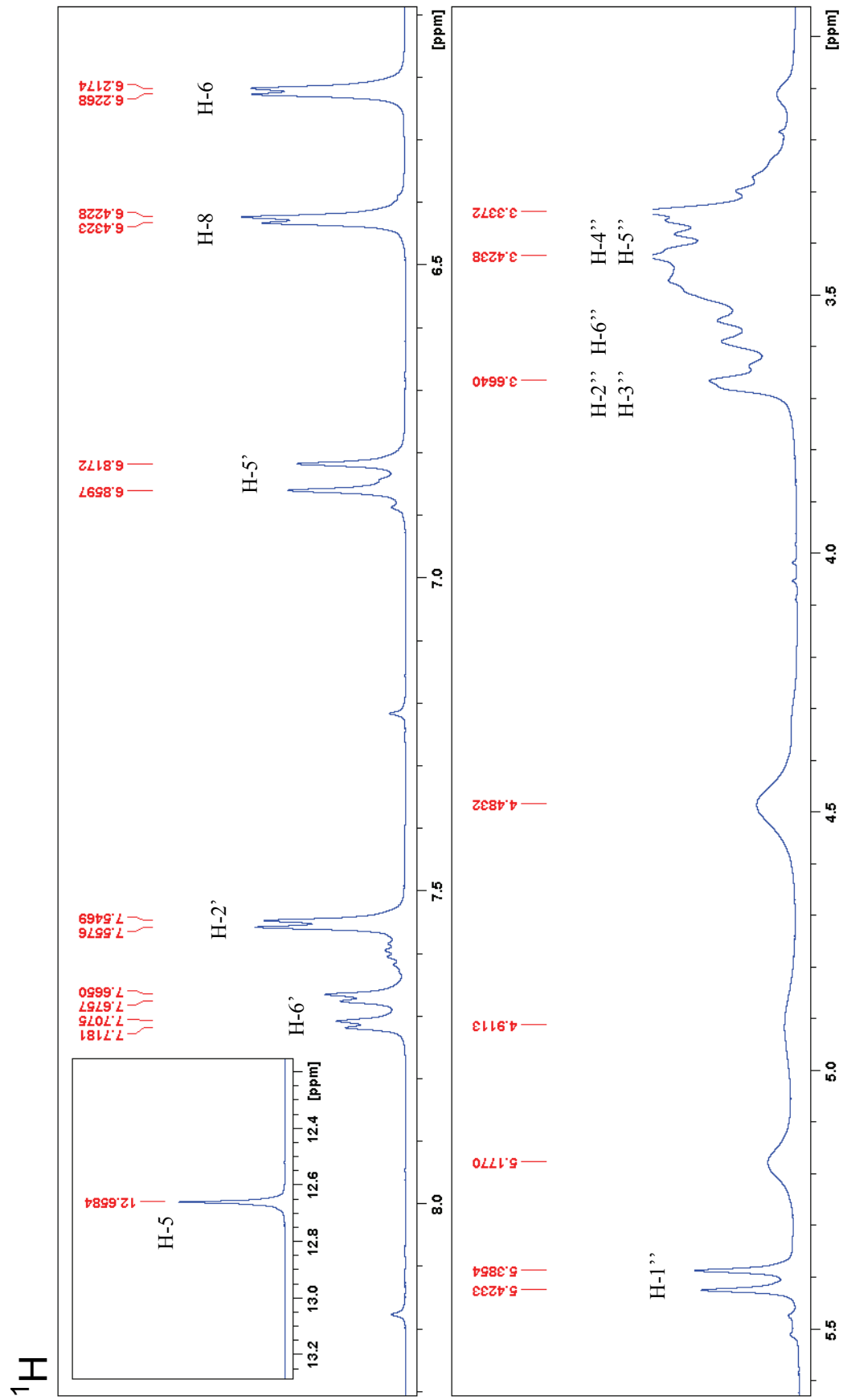
Slika 4.7 ^{13}C NMR spektar miricetin 3-O-glukoziida (jedinjenje 7)



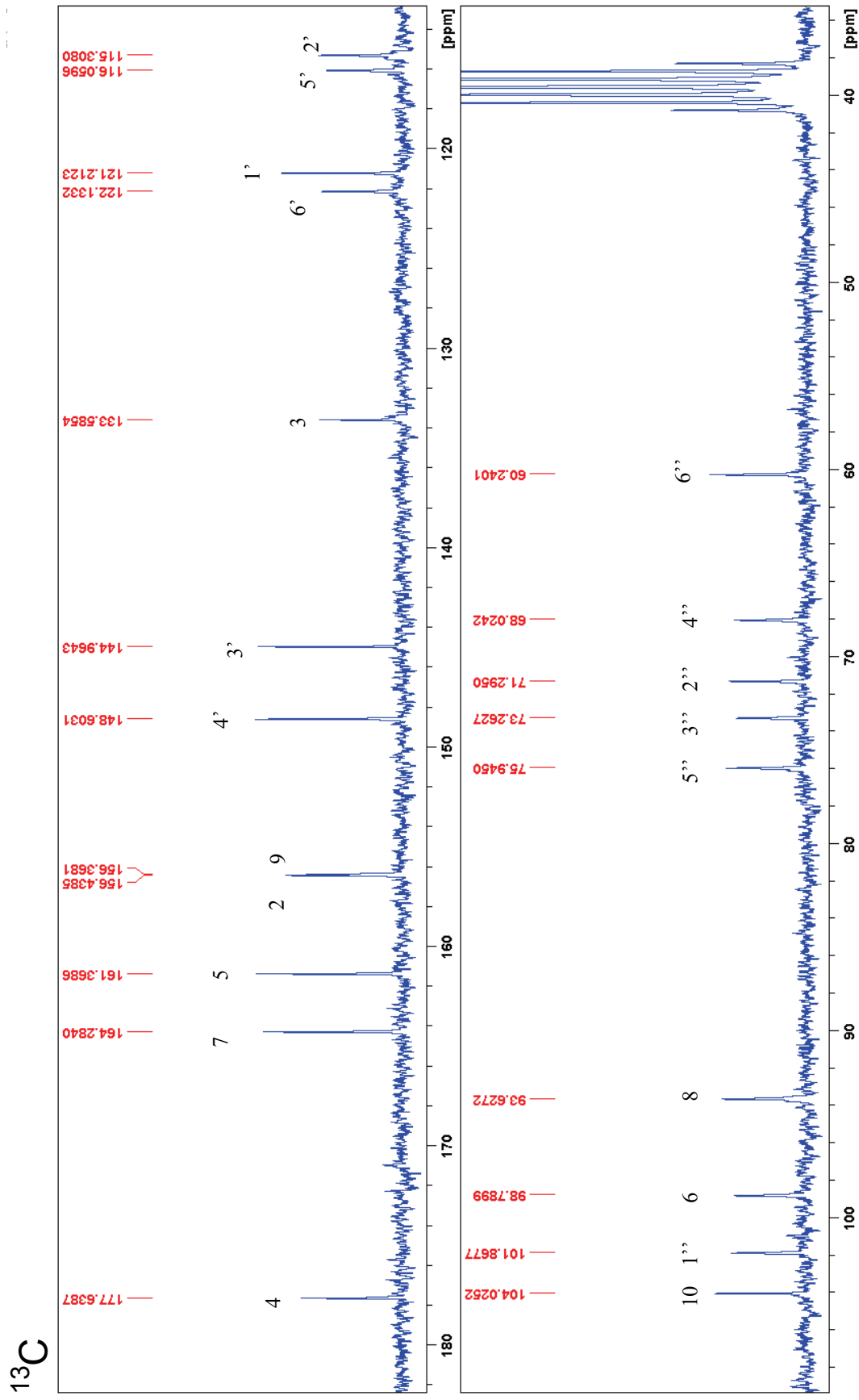
Slika 4.8 ^1H NMR spektar rutina (jedinjenje 8)



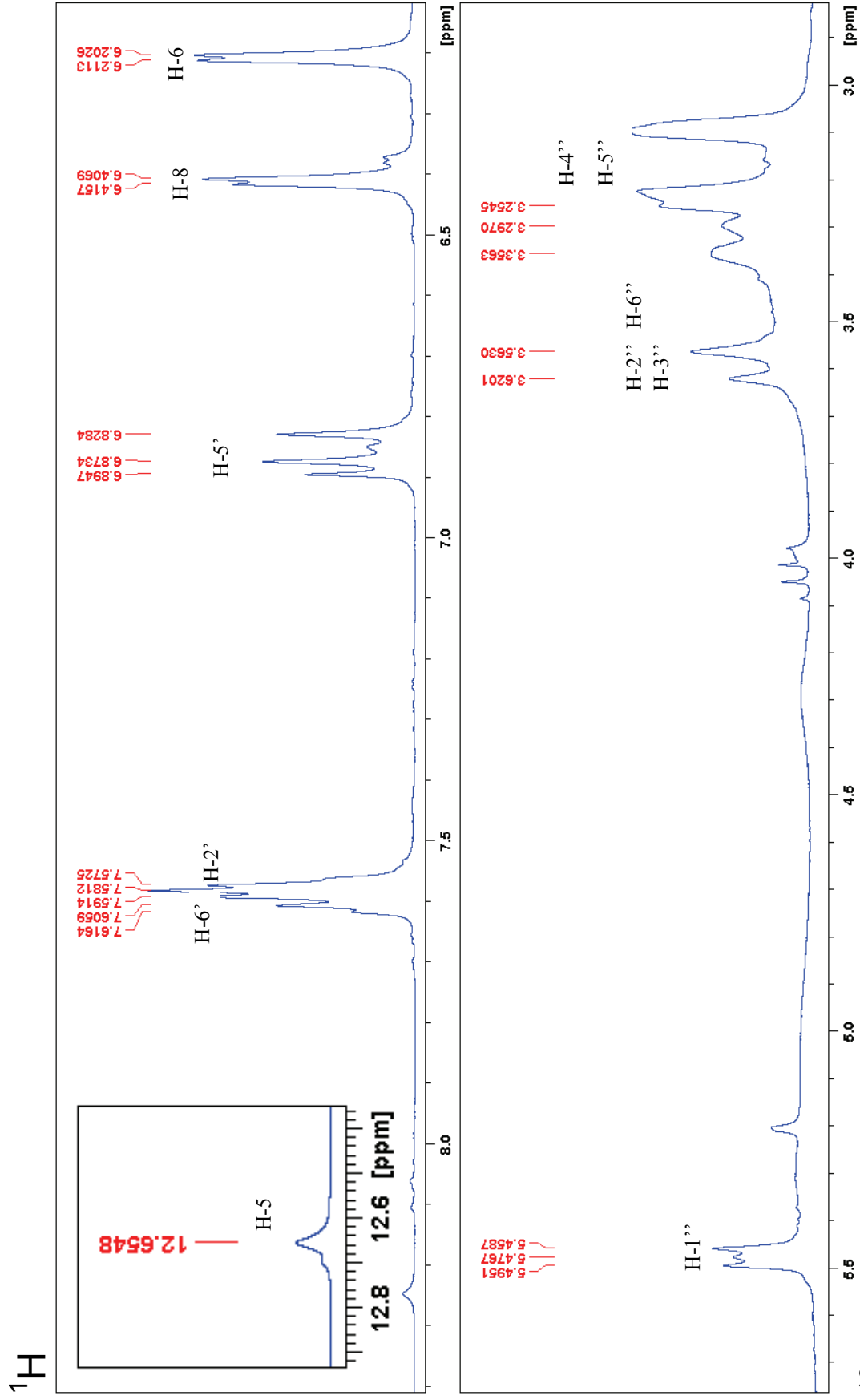
Slika 4.9 ^{13}C NMR spektar rutina (jedinjenje **8**)



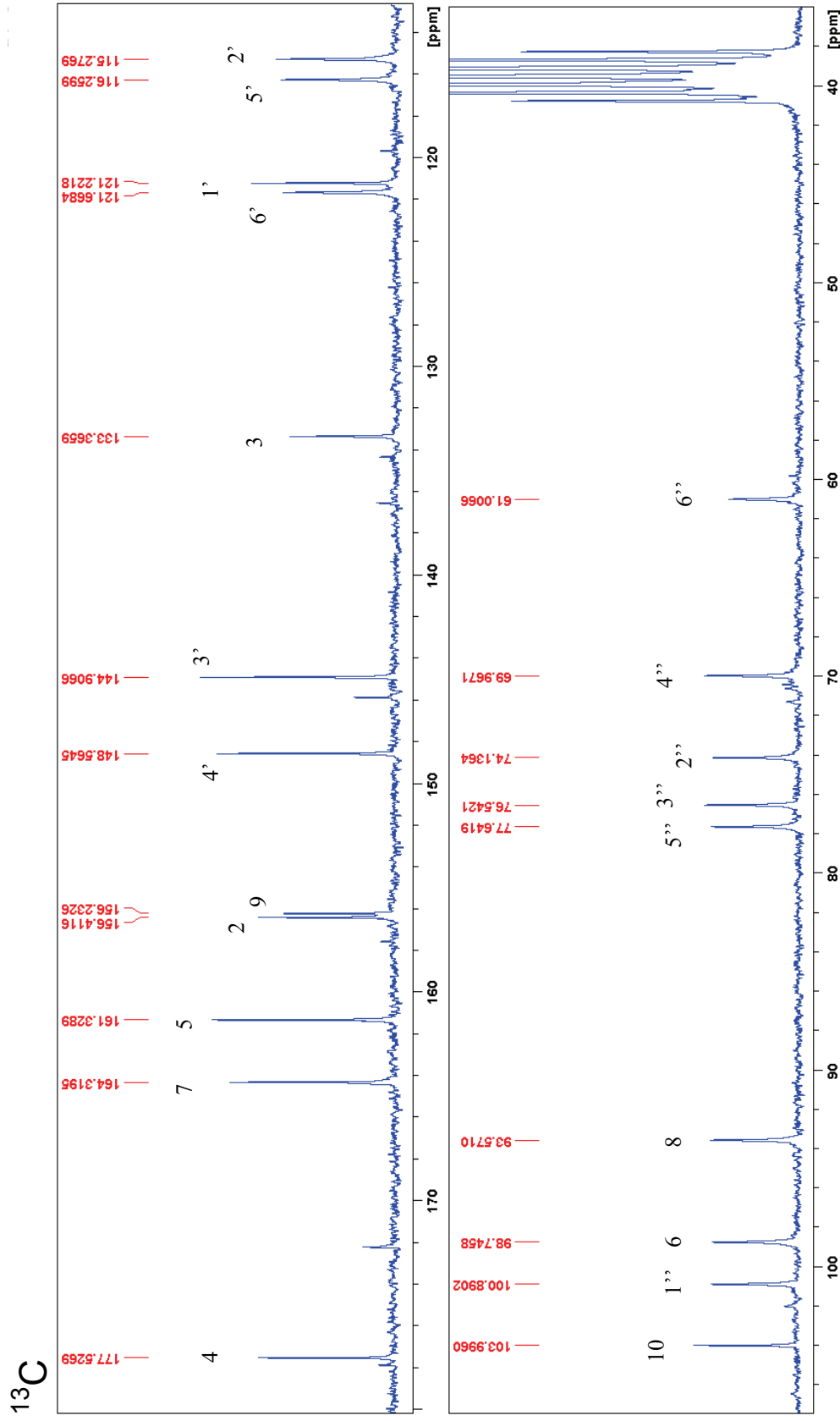
Slika 4.10 ^1H NMR spektar hiperozida (jedinjenje 9)



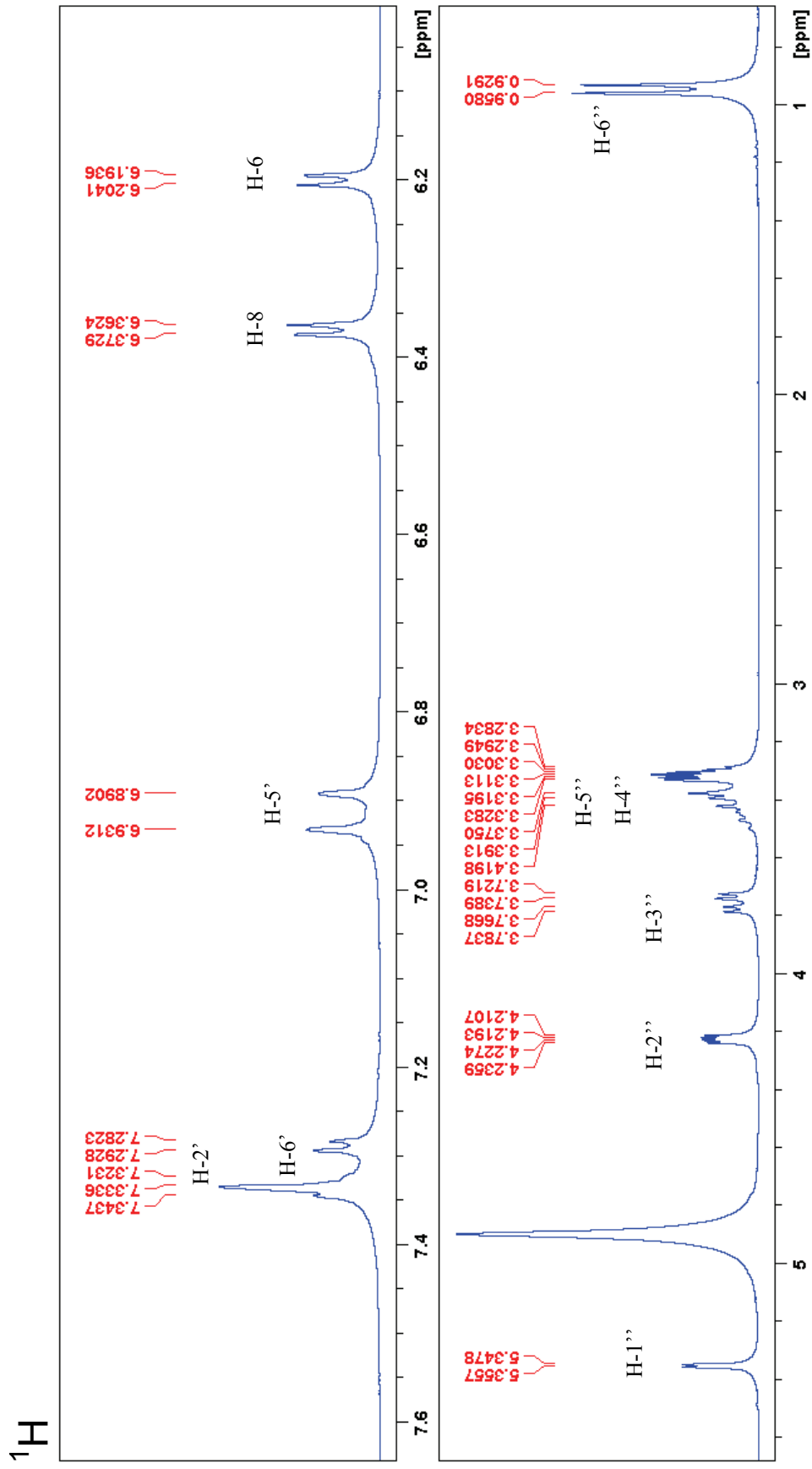
Slika 4.11 ^{13}C NMR spektar hiperozida (jedinjenje 9)



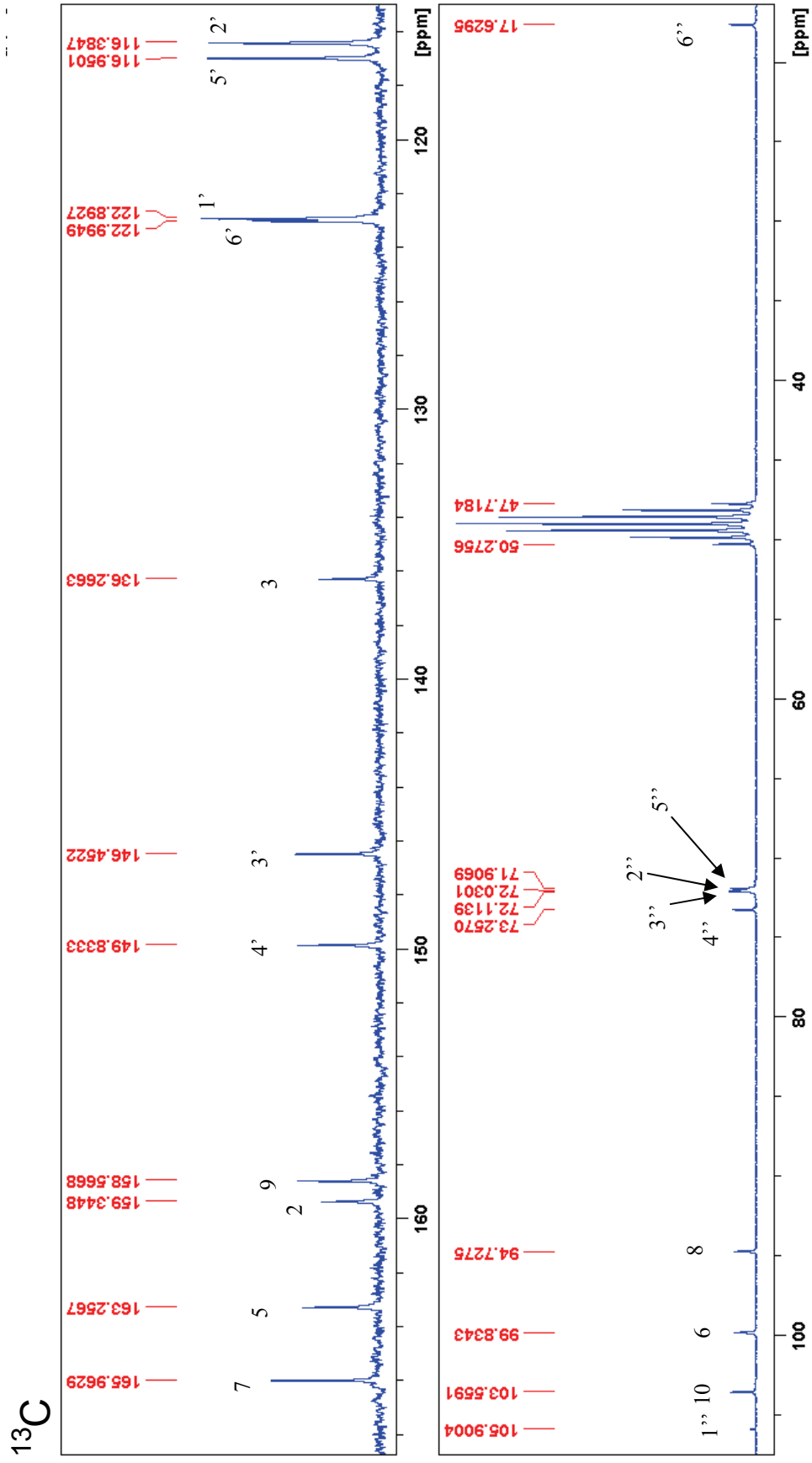
Slika 4.12 ^1H NMR spektar izokvercitrina (jedinjenje 11)



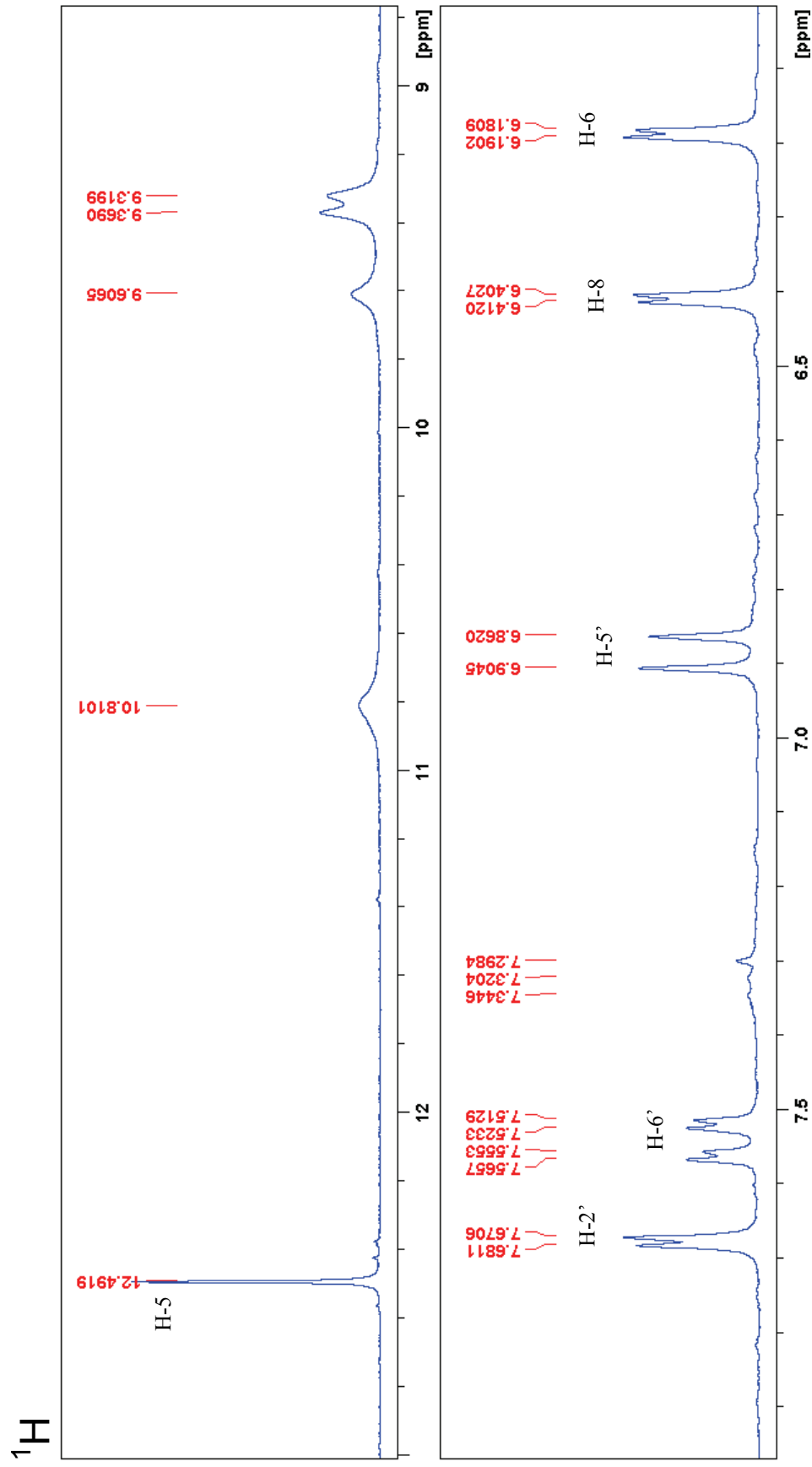
Slika 4.13 ^{13}C NMR spektar jedinjenja **11** (izokvercitrin)



Slika 4.14 ^1H NMR spektar kvercitina (jedinjenje 12)

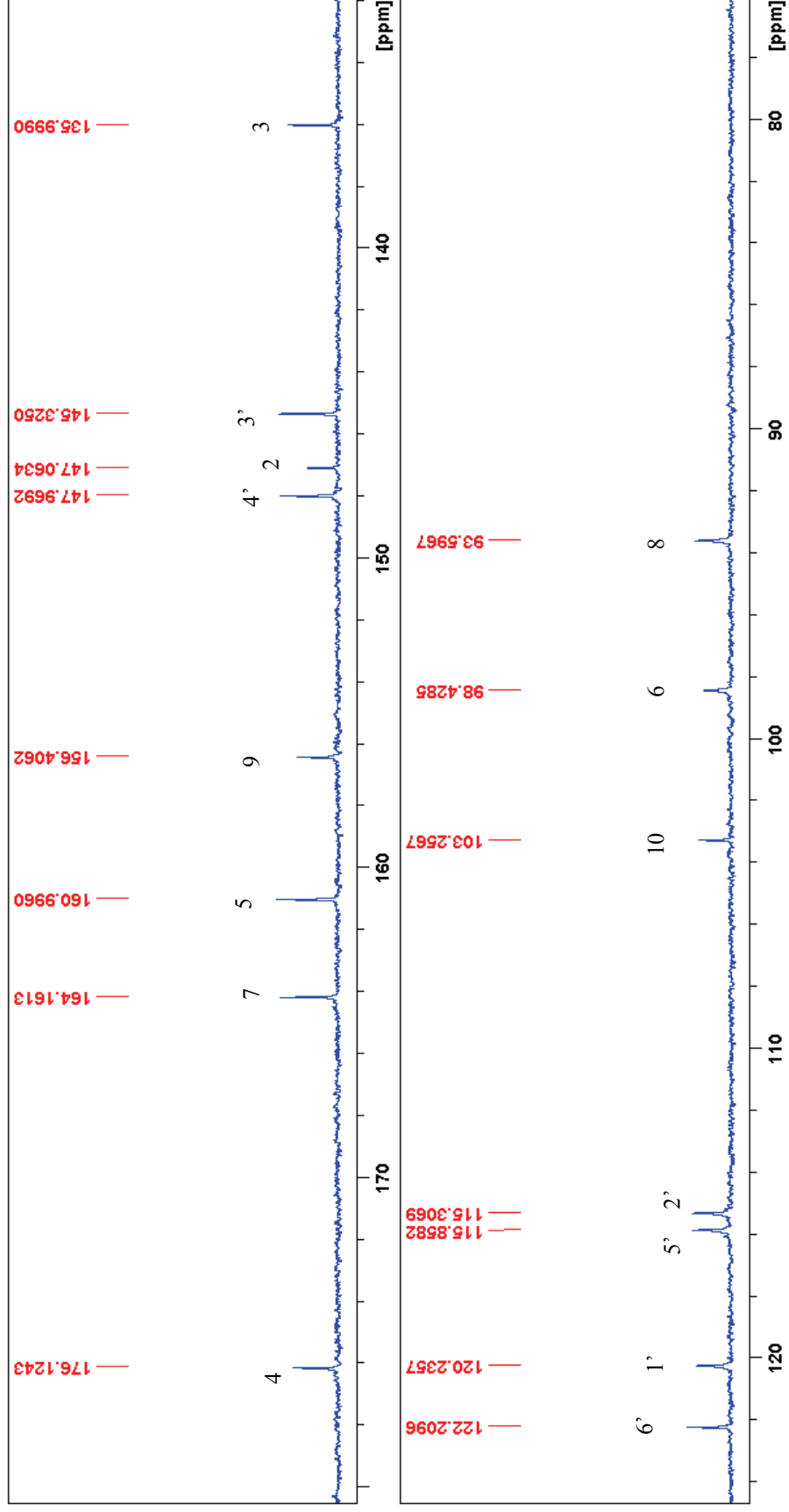


Slika 4.15 ^{13}C NMR spektar kvercitrina (jedinjenje 12)

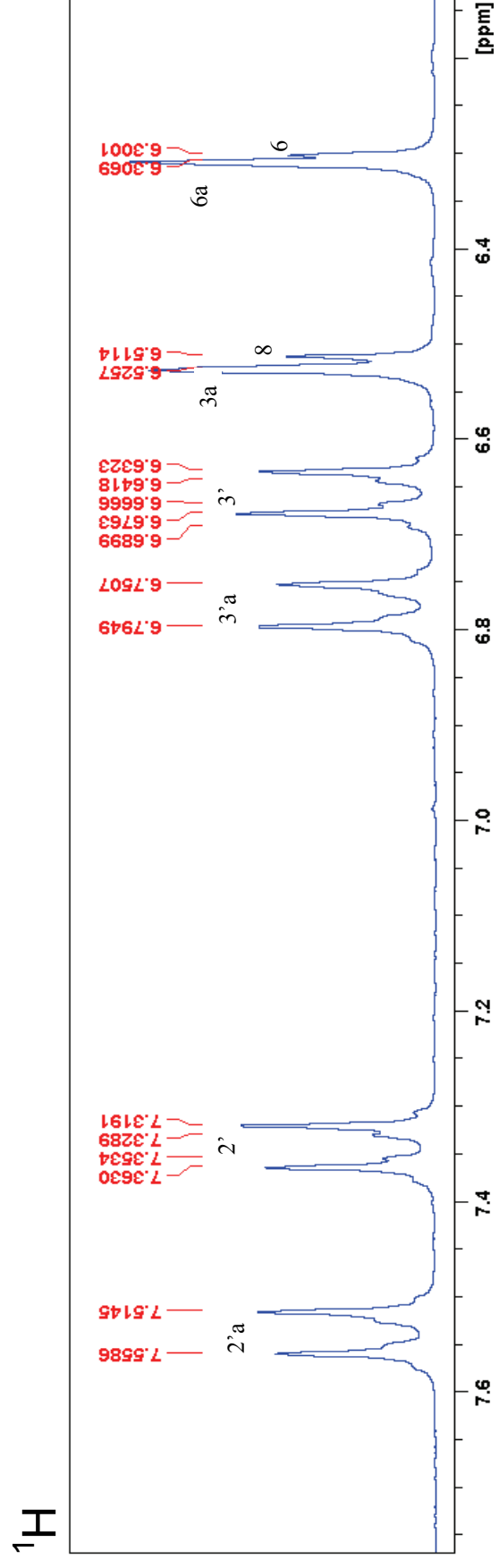


Slika 4.16 ^1H NMR spektar kvercetina (jedinjenje 14)

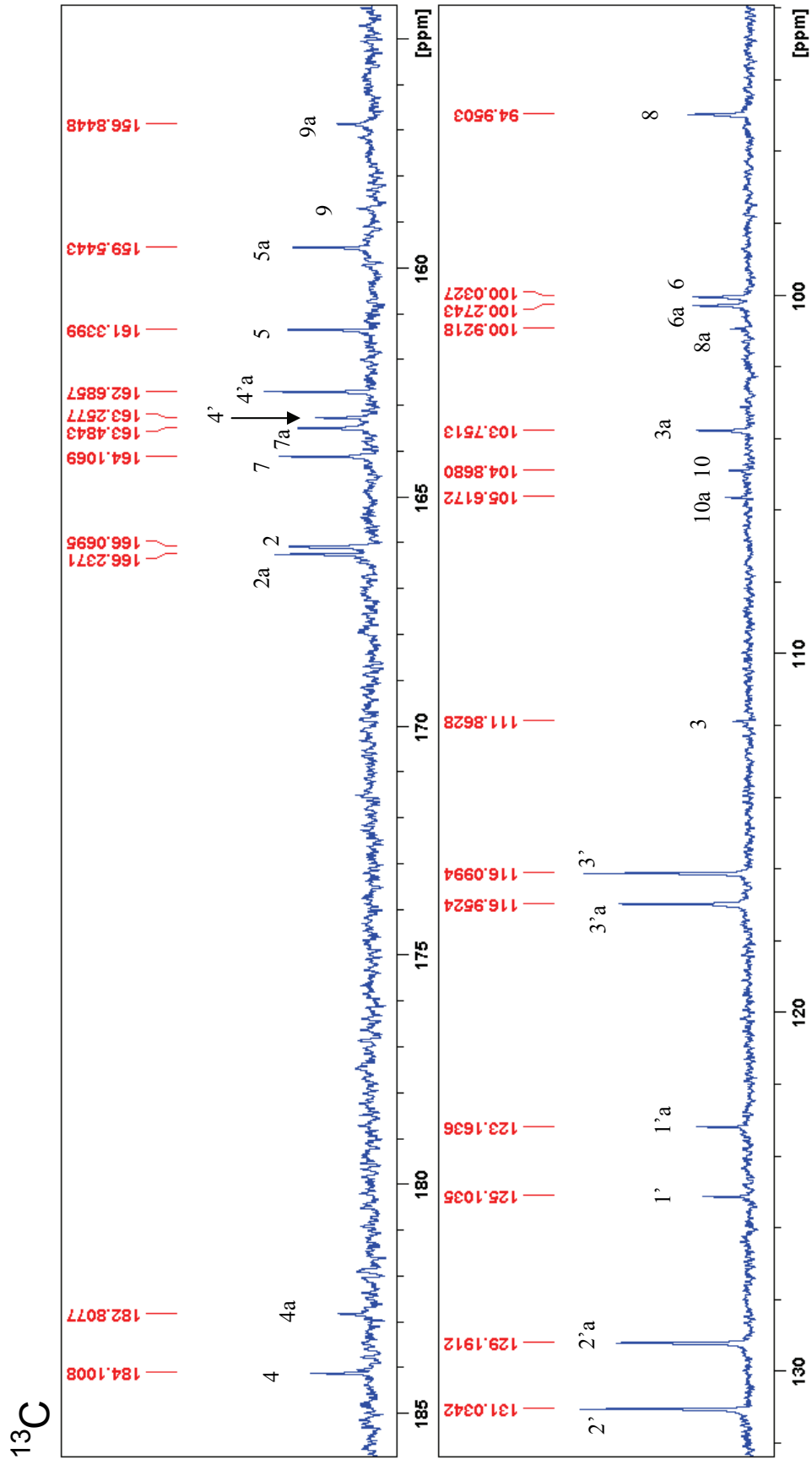
^{13}C



Slika 4.17 ^{13}C NMR spektar kvercetina (jedinjenje 14)



Slika 4.18 ^1H NMR spektar 13,118-biapigenina (jedinjenje 15)



Slika 4.19 ^{13}C NMR spektar I3, II8-biapigenina (jedinjenje **15**)

Položaj vezivanja glikozidnih jedinica je utvrđen na osnovu specifičnih promena u UV spektrima nakon dodatka odgovarajućih reagenasa (102).

Natrijum-metoksid (MeONa) je jaka baza i deprotonuje sve slobodne fenolne grupe flavonoidnog jezgra, pa dovodi do batohromnog pomeranja kod svih ispitivanih jedinjenja. Glikozidi miricetina i aglikon kvercetin se postepeno raspadaju u prisustvu MeONa.

Natrijum-acetat (NaOAc) je slabija baza od MeONa, tako da jonizuje samo kiselije hidroksilne grupe 7-OH i 4'-OH. Zbog toga je primećeno batohromno pomeranje kod svih ispitivanih flavonoida.

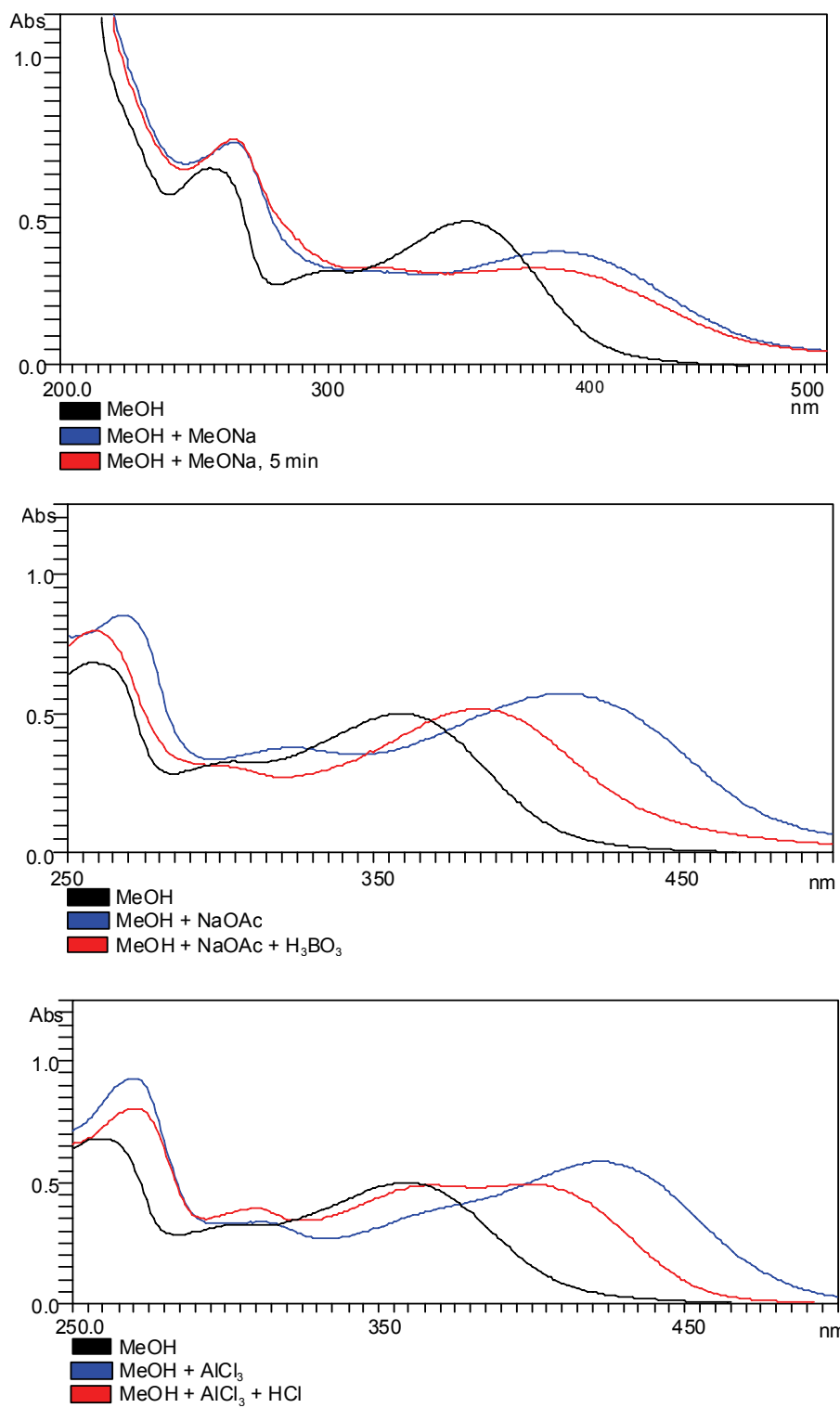
U prisustvu NaOAc borna kiselina gradi helat sa *orto*-dihidroksilnim grupama, tako da dodatno batohromno pomeranje nedvosmisleno ukazuje na slobodne 3'-OH i 4'-OH grupe kod svih ispitivanih flavonoida.

Spektar snimljen uz dodatak AlCl₃ pokazuje veliko batohromno pomeranje usled kompleksiranja sa *orto*-dihidroksilnim 3'-OH i 4'-OH grupama, kao i sa 5-OH i 4-keto grupom. Dodatkom HCl razgrađuje se samo kompleks AlCl₃ sa 3'-OH i 4'-OH grupama, pa se trake pomeraju ka nešto nižim vrednostima talasnih dužina.

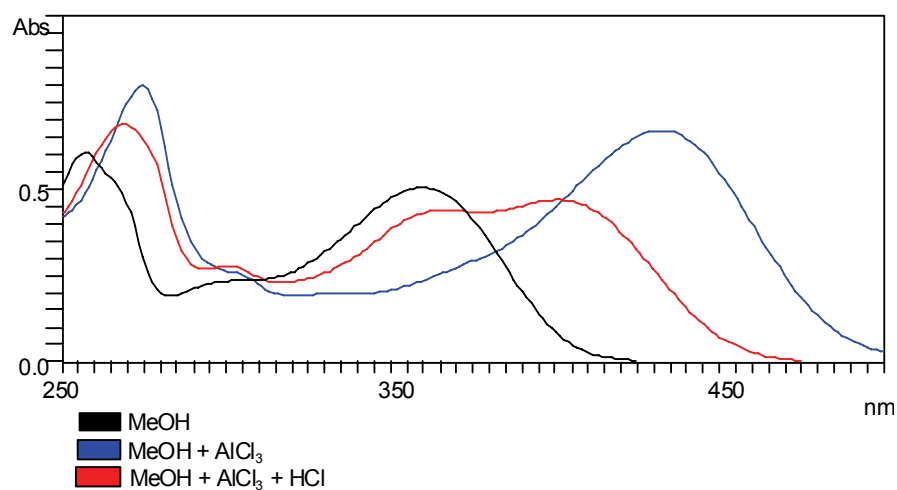
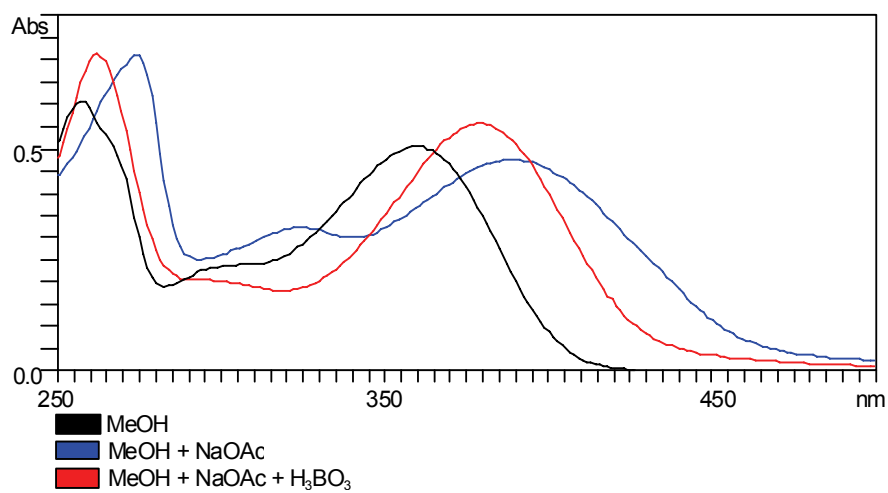
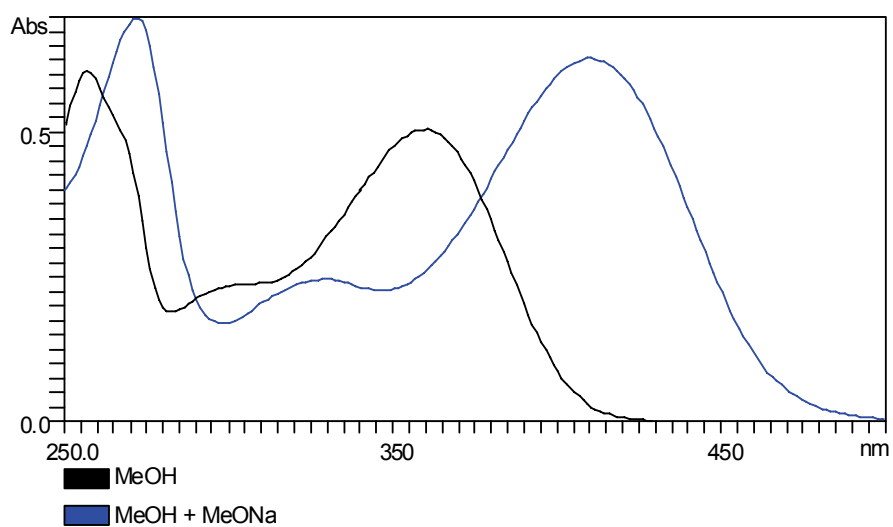
Tabela 4.3 Uticaj različitih reagenasa na pomeranje apsorpcionih maksimuma u UV spektrima flavonoida izolovanih iz vrste *H. richeri*

Jedinjenje	MeOH	+NaOAc	+NaOAc/H ₃ BO ₃	+MeONa	+AlCl ₃	+AlCl ₃ /HCl
5	358	418	384	393*	422	399
6	363	374	386	388*	432	405
7	362	389	384	393*	425	404
8	360	401	379	410	430	400
9	360	389	379	410	432	401
11	357	396	378	409	432	398
12	360	390	379	410	432	401
14	370	390	386	345*	452	428

*uz raspadanje



Slika 4.20 UV spektri glikozida miricetina u metanolu i u prisustvu različitih reagenasa (MeONa, NaOAc, H₃BO₃, AlCl₃, HCl)



Slika 4.21 UV spektri glikozida kvercetina u metanolu i u prisustvu različitih reagenasa (MeONa, NaOAc, H₃BO₃, AlCl₃, HCl)

Spektralni podaci izolovanih jedinjenja

Miricetin 3-*O*-rutinozid (jedinjenje **5**) UV (MeOH): λ_{\max} 258, 298sh, 358; ^1H NMR (DMSO- d_6): δ 1,01 (3H, *d*, $J = 6.1$ Hz, H-6'''), 2,8-3,8 (10H, H-2''- H-6'' i H-2'''- H-5''') 4,41 (1H, *br s*, H-1'''), 5,40 (1H, *d*, $J = 7,3$ Hz, H-1'''), 6,19 (1H, *d*, $J = 1,9$ Hz, H-6), 6,37 (1H, *d*, $J = 1,9$ Hz, H-8), 7,17 (2H, *s*, H-2'), 12,65 (1H, *s*, H-5); ^{13}C NMR (DMSO- d_6): δ 17,9 (6'''), 67,2 (6''), 68,4 (5'''), 70,2 (4''), 70,5 (2'''), 70,6 (3'''), 72,0 (4'''), 74,1 (2''), 76,2 (5''), 76,7 (3''), 93,6 (8), 98,8 (6), 100,9 (1'''), 101,1 (1), 104,0 (10), 108,7 (2'), 120,2 (1'), 133,6 (3), 136,9 (4'), 145,6 (3'), 156,5 (2), 156,6 (9), 161,4 (5), 164,4 (7), 177,5 (4).

Miricetin 3-*O*-galaktozid (jedinjenje **6**) UV (MeOH): λ_{\max} 258, 298sh, 363; ^1H NMR (DMSO- d_6): δ 3,0-3,8 (6H, H-2''- H-6''), 5,35 (1H, *d*, $J = 7,7$ Hz, H-1'''), 6,20 (1H, *d*, $J = 1,8$ Hz, H-6), 6,38 (1H, *d*, $J = 1,8$ Hz, H-8), 7,22 (2H, *s*, H-2'), 12,64 (1H, *s*, H-5); ^{13}C NMR (DMSO- d_6): δ 60,3 (6''), 68,3 (4''), 71,5 (2''), 73,6 (3''), 76,2 (5''), 93,7 (8), 99,0 (6), 102,3 (1''), 104,1 (10), 108,8 (2'), 120,3 (1'), 134,0 (3), 137,0 (4'), 145,7 (3'), 156,5 (2), 156,6 (9), 161,5 (5), 164,8 (7), 177,7 (4).

Miricetin 3-*O*-glukozid (jedinjenje **7**) UV (MeOH): λ_{\max} 258, 298sh, 362; ^1H NMR (DMSO- d_6): δ 3,0-3,8 (6H, H-2''- H-6''), 5,47 (1H, *d*, $J = 7,4$ Hz, H-1'''), 6,19 (1H, *d*, $J = 1,8$ Hz, H-6), 6,37 (1H, *d*, $J = 1,8$ Hz, H-8), 7,20 (2H, *s*, H-2'), 12,67 (1H, *s*, H-5); ^{13}C NMR (DMSO- d_6): δ 61,3 (6''), 70,2 (4''), 74,2 (2''), 76,8 (3''), 77,9 (5''), 93,7 (8), 99,0 (6), 101,1 (1''), 104,1 (10), 108,8 (2'), 120,2 (1'), 133,7 (3), 137,0 (4'), 145,7 (3'), 156,4 (2), 156,6 (9), 161,5 (5), 164,8 (7), 177,6 (4).

Rutin (jedinjenje **8**) UV (MeOH): λ_{\max} 256, 264sh, 298sh, 360; ^1H NMR (DMSO- d_6): δ 1,00 (3H, *d*, $J = 6.0$ Hz, H-6'''), 2,8-3,8 (10H, H-2''- H-6'' i H-2'''- H-5''') 4,39 (1H, *br s*, H-1'''), 5,32 (1H, *d*, $J = 6,8$ Hz, H-1'''), 6,14 (1H, *d*, $J = 1,5$ Hz, H-6), 6,33 (1H, *d*, $J = 1,5$ Hz, H-8), 6,83 (1H, *d*, $J = 8,2$ Hz, H-5'), 7,53 (1H, *br s*, H-2'), 7,55 (1H, *dd*, $J = 8,2$ i $2,0$ Hz, H-6') 12,57 (1H, *s*, H-5); ^{13}C NMR (DMSO- d_6): δ 18,0 (6'''), 67,2 (6''), 68,5 (5'''), 70,2 (4''), 70,6 (2'''), 70,8 (3'''), 72,0 (4'''), 74,3 (2''), 76,1 (5''), 76,7 (3''), 94,1 (8),

99,4 (6), 101,0 (1'''), 101,6 (1''), 103,6 (10), 115,5 (2'), 116,4 (5'), 121,2 (1'), 121,9 (6'), 133,5 (3), 145,2 (3'), 149,0 (4'), 156,7 (2), 156,8 (9), 161,4 (5), 166,0 (7), 177,4 (4).

Hiperozid (jedinjenje **9**) UV (MeOH): λ_{\max} 256, 264sh, 298sh, 360; ^1H NMR (DMSO- d_6): δ 3,0-3,8 (6H, H-2''- H-6''), 5,40 (1H, *d*, $J = 7,6$ Hz, H-1''), 6,22 (1H, *d*, $J = 1,9$ Hz, H-6), 6,42 (1H, *d*, $J = 1,9$ Hz, H-8), 6,83 (1H, *d*, $J = 8,5$ Hz, H-5'), 7,55 (1H, *d*, $J = 2,1$ Hz, H-2'), 7,68 (1H, *dd*, $J = 7,6$ i $2,1$ Hz, H-6') 12,66 (1H, *s*, H-5); ^{13}C NMR (DMSO- d_6): δ 60,2 (6''), 68,0 (4''), 71,3 (2''), 73,3 (3''), 75,9 (5''), 93,6 (8), 98,8 (6), 101,9 (1''), 104,0 (10), 115,3 (2'), 116,1 (5'), 121,2 (1'), 122,1 (6'), 133,6 (3), 145,0 (3'), 148,6 (4'), 156,4 (9), 156,4 (2), 161,4 (5), 164,3 (7), 177,6 (4).

Izokvercitrin (jedinjenje **11**) UV (MeOH): λ_{\max} 256, 264sh, 298sh, 357; ^1H NMR (DMSO- d_6): δ 3,0-3,8 (6H, H-2''- H-6''), 5,48 (1H, *d*, $J = 7,3$ Hz, H-1''), 6,21 (1H, *d*, $J = 1,9$ Hz, H-6), 6,41 (1H, *d*, $J = 1,9$ Hz, H-8), 6,84 (1H, *d*, $J = 8,5$ Hz, H-5'), 7,58 (1H, *m*, H-2'), 7,58 (1H, *m*, H-6') 12,65 (1H, *s*, H-5); ^{13}C NMR (DMSO- d_6): δ 61,0 (6''), 70,0 (4''), 74,1 (2''), 76,5 (3''), 77,6 (5''), 93,6 (8), 98,7 (6), 100,9 (1), 104,0 (10), 115,3 (2'), 116,3 (5'), 121,2 (1'), 121,7 (6'), 133,4 (3), 144,9 (3'), 148,6 (4'), 156,2 (9), 156,4 (2), 161,3 (5), 164,3 (7), 177,5 (4).

Kvercitrin (jedinjenje **12**) UV (MeOH): λ_{\max} 256, 264sh, 298sh, 360; ^1H NMR (DMSO- d_6): δ 0,94 (3H, *d*, $J = 5,8$ Hz, H-6''), 2,8-3,8 (4H, H-2''- H-5'') 4,35 (1H, *d*, $J = 1,6$ Hz, H-1''), 6,19 (1H, *d*, $J = 2,1$ Hz, H-6), 6,37 (1H, *d*, $J = 2,1$ Hz, H-8), 6,91 (1H, *d*, $J = 8,2$ Hz, H-5'), 7,31 (1H, *dd*, $J = 8,2$ i $2,1$ Hz, H-6') 7,33 (1H, *d*, $J = 2,1$ Hz, H-2'), 12,65 (1H, *s*, H-5); ^{13}C NMR (DMSO- d_6): δ 17,6 (6''), 71,9 (5''), 72,0 (2''), 72,1 (3''), 73,3 (5''), 94,7 (8), 99,8 (6), 103,6 (10), 105,9 (1''), 116,4 (2'), 117,0 (5'), 122,9 (1'), 123,0 (6'), 136,3 (3), 146,5 (3'), 149,8 (4'), 158,5 (9), 159,3 (2), 163,3 (5), 166,0 (7), 178,9 (4).

Kvercetin (jedinjenje **14**) UV (MeOH): λ_{\max} 256, 300sh, 372; ^1H NMR (DMSO- d_6): δ 6,19 (1H, *d*, $J = 1,9$ Hz, H-6), 6,41 (1H, *d*, $J = 1,9$ Hz, H-8), 6,88 (1H, *d*, $J = 8,5$ Hz, H-5'), 7,54 (1H, *dd*, $J = 8,5$ i $2,1$ Hz, H-6') 7,68 (1H, *d*, $J = 2,1$ Hz, H-2'), 12,49 (1H, *s*, H-5); ^{13}C NMR (DMSO- d_6): δ 93,6 (8), 98,4 (6), 103,3 (10), 115,3 (2'), 115,9

(5'), 120,2 (1'), 122,2 (6'), 136,0 (3), 145,3 (3'), 145,3 (2), 148,0 (4'), 156,4 (9), 161,0 (5), 164,2 (7), 176,1 (4).

I3,II8-Biapigenin (jedinjenje **15**) UV (MeOH): λ_{\max} 268, 330; ^1H NMR (DMSO- d_6): δ 6,30 (1H, *d*, $J = 1,9$ Hz, H-6), 6,31 (1H, *s*, H-6), 6,52 (1H, *d*, $J = 1,9$ Hz, H-8), 6,53 (1H, *s*, H-3a), 6,65 (2H, *m*, H-3'), 6,77 (2H, *m*, H-3'a), 7,33 (2H, *m*, H-2'), 7,53 (2H, *m*, H-2'a), ^{13}C NMR (DMSO- d_6): δ 95,0 (8), 100,0 (6), 100,3 (6a), 100,9 (8a), 104,9 (10), 105,6 (10a), 111,9 (3), 116,1 (3'), 117,0 (3'a), 123,2 (1'a), 125,1 (1'), 129,2 (2'a), 131,0 (2'), 156,8 (9a), 158,8 (9), 159,5 (5a), 161,3 (5), 162,7 (4'a), 163,3 (4'), 163,5 (7a), 164,1 (7), 166,1 (2), 166,2 (2a), 182,8 (4a), 184,1 (4).

4.1.4 Uporedna kvalitativna i kvantitativna analiza metanolnog ekstrakta vrste *H. richeri* i njegovih frakcija (hloroformske, etilacetatne, *n*-butanolne i vodene)

Uporedna kvalitativna analiza metanolnog ekstrakta vrste *H. richeri* i njegovih frakcija (hloroformske, etilacetatne, *n*-butanolne i vodene), dobijenih tokom izolovanja sekundarnih metabolita urađena je pomoću LC-UV-MS tehnike.

Nakon razdvajanja tečnom hromatografijom (LC), UV spektri pojedinih komponenti su dobijeni pomoću detektora sa nizom dioda (DAD). Precizna merenja masa kvazimolekulskih i fragmentacionih jona analita dobijenih u masenom spektrometru visoke rezolucije sa elektrosprej jonskim izvorom (ESI) izvršena su tehnikom vremena preleta (TOF).

Za hromatografisanje je korišćena RP-18 HPLC kolona uz 0,1% mravlju kiselinu u vodi i acetonitril kao mobilne faze, što je uz odgovarajući gradijentni program omogućilo razdvajanje 13 jedinjenja, od kojih 9 flavonoida, 2 izomera kafeoilhina kiseline i 2 derivata naftodiantrona.

Identifikacija jedinjenja je izvršena na osnovu karakterističnog izgleda UV spektra i molekulske formule izračunate iz preciznih masa kvazimolekulskih jona u ESI masenim spektrima.

Konačna identifikacija pojedinih signala flavonoida u LC-UV-MS hromatogramima je urađena poređenjem retencionih vremena, UV i MS spektara sa retencionim vremenima i odgovarajućim spektrima predhodno izolovanih jedinjenja.

Jedinjenja **1** i **3** su identifikovana kao izomeri kafeoilhina kiseline sa molekulskom formulom $C_{16}H_{18}O_9$. Prisustvo fragmentacionog jona na m/z 163 u pozitivnom modu potvrđuje prisustvo kafeoil grupe. Konačna identifikacija jedinjenja **1** i **3** (3-*O*- i 5-*O*-kafeoilhina kiselina) je izvršena na osnovu poređenja njihovih retencionih vremena, UV i MS spektara sa odgovarajućim retencionim vremenima i spektrima komercijalno dostupnih standardnih jedinjenja.

Naftodiantroni, pseudohipericin i hipericin, nisu mogli biti jonizovani pod primenjenim uslovima, pa su identifikovani na osnovu poređenja retencionih vremena i UV spektara sa retencionim vremenima i UV spektrima odgovarajućih standardnih jedinjenja.

Određivanje sadržaja pojedinih komponenti je izvršeno primenom kalibracionih krivih dobijenih nakon merenja površine signala u HPLC-UV hromatogramima odgovarajućih ekstrakata i serije standardnih jedinjenja različitih koncentracija.

Sadržaj devet flavonoida, hipericina, pseudohipericina i dve kafeoilhina kiseline u metanolnom ekstraktu *H. richeri* i njegovoj etilacetatnoj i *n*-butanolnoj frakciji prikazan je u Tabeli 4.4.

U vodenoj i hloroformskoj frakciji nisu detektovana prethodno identifikovana jedinjenja. Ustanovljeno je da u poređenju sa etilacetatnom frakcijom, *n*-butanolna frakcija sadrži veće količine polarnijih flavonoidnih jedinjenja. Tako, u *n*-butanolnoj frakciji dominiraju flavonoidni glikozidi rutin i miricetin 3-*O*-rutinozid, dok je etilacetatna frakcija bogata manje polarnim flavonoidima, kao što su kvercitrin, kvercetin i I3,I18-biapigenin. Miricetin 3-*O*-rutinozid, miricetin 3-*O*-galaktozid, miricetin 3-*O*-glukozid, I3,I18-biapigenin i 5-*O*-kafeoilhina kiselina u vrsti *H. richeri* nisu bili ranije identifikovani.

Tabela 4.4 Kvantitativni sastav metanolinog ekstrakta vrste *H. richeri* i njegovih frakcija (hloroformske, etilacetatne, *n*-butanolne i vodene) (mg/g suvog ekstrakta)

Pik	Jedinjenje	λ (nm)	Uzorci <i>H. richeri</i>		
			MeOH	EtOAc	<i>n</i> -BuOH
1	3- <i>O</i> -Kafeoilhina kiselina	320	13,70 ± 0,26 ^a	13,47 ± 0,38	41,58 ± 0,81
3	5- <i>O</i> -Kafeoilhina kiselina	320	2,74 ± 0,06	8,98 ± 0,11	5,04 ± 0,07
5	Miricetin 3- <i>O</i> -rutinozid	254	52,92 ± 0,90	25,84 ± 0,77	169,56 ± 1,21
6	Miricetin 3- <i>O</i> -galaktozid	254	20,02 ± 0,19	28,45 ± 0,80	50,71 ± 0,69
7	Miricetin 3- <i>O</i> -glukozid	254	29,10 ± 0,67	54,27 ± 1,30	59,48 ± 0,63
8	Rutin	254	60,99 ± 1,64	67,9 ± 1,20	164,53 ± 1,47
9	Hiperozid	254	19,57 ± 0,51	56,16 ± 1,09	36,87 ± 2,32
11	Izokvercitrin	254	17,53 ± 3,11	58,44 ± 0,98	29,41 ± 2,81
12	Kvercitrin	254	10,08 ± 0,92	46,42 ± 0,31	4,49 ± 0,51

^a Vrednosti su izražene kao srednja vrednost ± standardna devijacija.

Tabela 4.4 (nastavak) Kvantitativni sastav metanolnog ekstrakta vrste *H. richeri* i njegovih frakcija (hloroformske, etilacetatne, *n*-butanolne i vodene) (mg/g suvog ekstrakta)

Pik	Jedinjenje	λ (nm)	Uzorci <i>H. richeri</i>		
			MeOH	EtOAc	<i>n</i> -BuOH
14	Kvercetin	254	4,11 ± 1,02	27,49 ± 0,23	1,05 ± 0,25
15	I3,II8-Biapiigenin	320	3,98 ± 0,22	24,93 ± 0,70	n.d. ^b
16	Pseudohipericin	590	4,60 ± 0,13	11,17 ± 0,76	7,24 ± 0,37
17	Hipericin	590	0,42 ± 0,03	2,78 ± 0,17	0,57 ± 0,06
Ukupan sadržaj flavonoida			226,4 ± 5,2	442,3 ± 6,1	517,2 ± 6,8

^b Nije detektovano

4.1.5 Usporedna kvalitativna i kvantitativna analiza vodeno-etanolnih ekstrakata odabranih vrsta roda *Hypericum*

LC-UV-MS tehnikom izvršena je detaljna kvalitativna hemijska analiza fenolkarboksilnih kiselina, flavonoida, i naftodiantrona u vodeno-etanolnim ekstraktima vrsta *H. richeri*, *H. perforatum*, *H. barbatum*, *H. hirsutum*, *H. androsaemum*, *H. acutum* i *H. maculatum*.

Identifikacija jedinjenja je izvršena na osnovu karakterističnog izgleda UV spektara i molekulskih formula izračunatih iz preciznih masa kvazimolekulskih jona u ESI masenim spektrima. Odstupanja od izračunatih masa su bila ispod 2,5 ppm, za sva merenja (Tabela 4.5). Konačna identifikacija jedinjenja je izvršena na osnovu poređenja njihovih retencionih vremena, UV i MS spektara sa odgovarajućim retencionim vremenima i spektrima komercijalno dostupnih standardnih jedinjenja ili izolovanih flavonoida iz herbe vrste *H. richeri*. U analiziranim ekstraktima odabranih *Hypericum* vrsta identifikovano je ukupno 17 jedinjenja: pored onih prethodno detektovanih u vrsti *H. richeri* (Poglavlje 4.1.4), takođe i 4-*O*-kafeoilhina kiselina, flavonoidni *C*-glikozidi - orijentin i njegov 2"-*O*-acetil-derivat, i flavanonolni glikozid astilbin (Slika 4.22).

Maseni i UV spektri jedinjenja **2** su identični jedinjenjima **1** i **3**, pa je zaključeno da su svi međusobno izomeri. Jedinjenje **2** je konačno identifikovano kao 4-*O*-kafeoilhina kiselina poređenjem retencionog vremena sa retencionim vremenom standardnog jedinjenja.

U masenom spektru jedinjenja **4** se javljaju joni $[M-H]^-$ (u negativnom modu), odnosno $[M+H]^+$ (u pozitivnom modu) koji odgovaraju molekulskoj masi 448,1008. Iz ove mase je izračunata molekulska formula $C_{21}H_{20}O_{11}$. Ova formula, zajedno sa položajima maksimuma apsorpcije u UV spektru (256, 266, 300sh i 272 nm) odgovara flavonoidnom *C*-glikozidu orijentinu (102).

Na osnovu podataka iz masenih spektara za jedinjenje **10**, izračunata je molekulska formula $C_{23}H_{22}O_{12}$. UV spektar je identičan kao i za jedinjenje **4**, i na osnovu razlike u molekulskoj masi je zaključeno da je jedinjenje **10** njegov acetil derivat. Jedinjenje **10** je konačno identifikovano kao 2"-*O*-acetil-orijentin poređenjem njegovog retencionog vremena sa retencionim vremenom standardnog jedinjenja.

U masenom spektru jedinjenja **13** se javljaju joni $[M-H]^-$ (u negativnom modu), odnosno $[M+H]^+$ (u pozitivnom modu) koji odgovaraju molekulknoj masi 450,1161 i molekulknoj formuli $C_{21}H_{22}O_{11}$. Pored toga, u masenom spektru u pozitivnom modu je uočen fragmentacioni jon koji odgovara gubitku ramnoze. Ovi podaci, zajedno sa maksimumima apsorpcije u UV spektru na 290 i 326sh odgovaraju flavanonolnom glikozidu astilbinu (102).

Određivanje sadržaja tri kafeoilhina kiseline, jedanaest flavonoida, hipericina i pseudohipericina je izvršeno pomoću HPLC-UV tehnike. U ekstraktu *H. acutum* astilbin je bio prisutan u tragovima tako da nije bilo moguće odrediti njegov sadržaj.

Uporedna analiza vodeno-etanolnih ekstrakata odabranih vrsta roda *Hypericum* ukazala je na značajne razlike u kvalitativnom i kvantitativnom hemijskom sastavu (Tabele 4.5 i 4.6 – 4.12).

Od tri identifikovane kafeoilhina kiseline, 3-*O*-izomer nije bio prisutan samo u ekstraktu vrste *H. barbatum*, 5-*O*-izomer samo u ekstraktu vrste *H. maculatum*, dok je 4-*O*-kafeoilhina kiselina detektovana samo u ekstraktu vrste *H. barbatum*.

Orijentin i njegov 2"-*O*-acetil derivat su detektovani samo u ekstraktu vrste *H. hirsutum*, sva tri glikozida miricetina samo u ekstraktu vrste *H. richeri*, a astilbin samo u ekstraktu vrste *H. acutum*.

Prisustvo kvercetina i njegovih glikozida, u različitim kvalitativnim i kvantitativnim odnosima je karakteristično za sve ispitivane vrsta roda *Hypericum*. Hiperozid, izokvercitrin i kvercetin detektovani su u ekstraktima svih ispitivanih vrsta. Rutin je bio prisutan samo u ekstraktima vrsta *H. richeri*, *H. perforatum* i *H. hirsutum*. Kvercitrin nije identifikovan jedino u ekstraktima vrsta *H. hirsutum* i *H. androsaemum*, a 13,118-biapigenin samo u ekstraktu vrste *H. androsaemum*.

Ni LC-UV-MS tehnikom naftodiantroni nisu detektovani u ekstraktu vrste *H. androsaemum*, što je u skladu sa navodima iz literature (11,93). U ekstraktu vrste *H. hirsutum* identifikovan je samo hipericin što je potvrđeno i rezultatima drugih autora (88,93). U svim ostalim analiziranim ekstraktima bili su prisutni i hipericin i pseudohipericin.

Prisustvo 3-*O*-kafeoilhina kiseline, rutina, hiperozida, kvercitrina, izokvercitrina, kvercetina, hipericina i pseudohipericina u vrsti *H. richeri* je potvrđeno u ranijim studijama (10,11,12), dok su 5-*O*-kafeoilhina kiselina, miricetin 3-*O*-rutinozid, miricetin

3-*O*-galaktozid, miricetin 3-*O*-glukozid i I3,II8-biapigenin po prvi put detektovani u ovoj biljnoj vrsti.

Polifenolni sastav vrste *H. perforatum* je u skladu sa navodima iz literature (15,,21,22).

U metanolnom ekstraktu vrste *H. barbatum* su prema navodima iz literature do sada detektovani hiperozid, kvercitrin, kvercetin, izokvercitrin, hiperforin, pseudohipericin i hipericin (11,25); I3,II8-biapigenin, kao i 4-*O*- i 5-*O*-kafeoilhina kiselina su pronađene u biljnoj vrsti *H. barbatum* po prvi put.

Polifenolna jedinjenja 3-*O*-kafeoilhina kiselina, rutin, hiperozid, kvercitrin, izokvercitrin, kvercetin, orijentin, 2"-*O*-acetil-orijentin, pseudohipericin i hipericin su ranije detektovani u biljnoj vrsti *H. hirsutum* (27,28,29,30), dok je 5-*O*-kafeoilhina kiselina po prvi put detektovana u ovoj biljnoj vrsti.

U okviru dosadašnjeg proučavanja polifenolnog sastava herbe biljne vrste *H. androsaemum*, detektovani su 3-*O*-kafeoilhina kiselina, 5-*O*-kafeoilhina kiselina, hiperozid, kvercitrin, izokvercitrin, kemferol, kvercetin, kvercetin 3-*O*-arabinozid i kvercetin 3-sulfat (28,32). Prema rezultatima LC-UV-MS analize vodeno-etanolnog ekstrakta vrste *H. androsaemum*, takođe su detektovani 3-*O*- i 5-*O*-kafeoilhina kiseline, hiperozid, kvercitrin, izokvercitrin i kvercetin.

Prisustvo 3-*O*-kafeoilhina kiseline, hiperozida, kvercitrina, izokvercitrina, kvercetina, I3,II8-biapigenina, pseudohipericina i hipericina u vrsti *H. maculatum* je u skladu sa rezultatima drugih autora (11,29,36,37).

Hemijski sastav vrste *H. acutum* nije do sada detaljno proučavan. Jedino su primenom tankoslojne hromatografije detektovani rutin, hiperozid, kvercitrin, kvercetin, kafena i 3-*O*-kafeoilhina kiselina (39). Prema rezultatima LC-UV-MS analize, pored hiperozida, kvercitrina, kvercetina i 3-*O*-kafeoilhina kiseline, prvi put su identifikovani 5-*O*-kafeoilhina kiselina, izokvercitrin, astilbin, I3,II8-biapigenin, pseudohipericin i hipericin.

Kvantitativna analiza vodeno-etanolnih ekstrakata odabranih vrsta roda *Hypericum* izvršena je HPLC-UV tehnikom. Flavonoidima je bio najbogatiji ekstrakt vrste *H. richeri*, pri čemu su miricetin 3-*O*-rutinozid i rutin bili najzastupljeniji. Baroni Fornasiero i saradnici su prethodno u okviru kvantitativne analize metanolno-acetonskog (1:1) ekstrakta ove vrste (HPTLC tehnikom) odredili sadržaj hiperozida,

izokvercitrina, kvercitrina, kvercetina, hipericina i pseudohipericina, pri čemu je hiperozid bio najzastupljeniji (103).

Sledeći po zastupljenosti flavonoida bio je ekstrakt vrste *H. hirsutum*, sa najvećim udelom orijentina i njegovog 2"-*O*-acetil derivata. Iako su ova dva flavonoida već ranije detektovana u ovoj vrsti (30), u dostupnoj literaturi nema podataka o njihovom sadržaju. U literaturi se, do sada, kao najzastupljenije jedinjenje u različitim tipovima ekstrakata vrste *H. hirsutum* navodio hiperozid (27,28,29).

Po sadržaju flavonoida slede ekstrakti vrsta *H. perforatum*, *H. barbatum*, *H. acutum* i *H. maculatum*. U ekstraktima vrsta *H. barbatum* i *H. acutum* dominantan je bio hiperozid, u ekstraktu vrste *H. perforatum* najzastupljeniji su bili rutin i hiperozid, a u ekstraktu vrste *H. maculatum* kvercetin i hiperozid. Ranije je objavljeno da je hiperozid dominantno jedinjenje u vrstama *H. barbatum* (11) i *H. maculatum* (11,29,37). Prethodnim istraživanjima drugih autora utvrđeno je da sadržaj pojedinih jedinjenja u vrsti *H. perforatum* može da varira u zavisnosti od perioda žetve i ekoloških faktora. Tako je, na primer, utvrđeno da je sadržaj rutina najveći u fazi formiranja cvetnih pupoljaka (butonizacije), dok je sadržaj kvercitrina, kvercetina i I3,II8-biapigenina najveći u fazi punog cvetanja kantariona (15,21,22).

Ekstrakt vrste *H. androsaemum* se izdvojio po najnižem sadržaju flavonoida, kao i po najvećem sadržaju fenolkarboksilnih kiselina. Valentao i saradnici su prethodno pokazali da postoje varijacije u sadržaju ovih fenolnih jedinjenja u različitim uzorcima herbe vrste *H. androsaemum*, koje su objasnili mogućim postojanjem hemijskog polimorfizma (32). Kvantitativni sastav vrste *H. androsaemum* ispitivali su i Šmelcerović i saradnici, koji su pomoću LC-MS-MS tehnike u ovoj vrsti odredili samo sadržaj hiperforina i hiperozida (28).

Sadržaj naftodiantrona bio je najveći u ekstraktima vrsta *H. barbatum*, *H. perforatum* i *H. richeri*. U ekstraktima vrsta *H. richeri*, *H. perforatum*, *H. barbatum*, *H. acutum* i *H. maculatum*, u kojima su identifikovana oba naftodiantrona, pseudohipericin je bio zastupljeniji od hipericina, što je bilo najizraženije u slučaju ekstrakta vrste *H. richeri*. Utvrđen veći sadržaj pseudohipericina u odnosu na hipericin u ekstraktima odabranih vrsta roda *Hypericum*, je u skladu sa rezultatima do kojih je ranije došao Kitanov (88).

Tabela 4.5 LC-MS podaci vodeno-etanolnih ekstrakata odabranih vrsta roda *Hypericum*

Jedinjenje	Rt (min)	Pozitivan mod ^a		Negativan mod ^b		Formula	Biljna vrsta ^c	
		Masa	Greška	Masa	Greška			
1 3-O-Kafeoilhina kiselina	9,2	354,0951	M	0,0	354,0959	2,4	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	Ac; An; H; M; R; P
		162,0315	M-Caff ^d	1,1			C ₉ H ₆ O ₃	
2 4-O-Kafeoilhina kiselina	12,8	354,0953	M	0,6	354,095	0,1	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	B
		162,0314	M-Caff	1,7			C ₉ H ₆ O ₃	
3 5-O-Kafeoilhina kiselina	16,1	354,0952	M	0,4	354,095	0,1	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	Ac; An; H; B; R; P
		162,0315	M-Caff	1,1			C ₉ H ₆ O ₃	
4 Orijentin	22,9	448,1008	M	0,4	448,1007	0,7	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	H
5 Miricetin 3-O-rutinozid	23,3	626,1491	M	1,3	626,1485	0,4	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₇	R
		480,0906	M-Rha	0,5			C ₂₁ H ₂₀ O ₁₃	
6 Miricetin 3-O-galaktozid	23,9	318,0373	M-Rha-Hex	0,9			C ₁₅ H ₁₀ O ₈	R
		480,0906	M	0,5	480,0911	1,5	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₃	
7 Miricetin 3-O-glukozid	24,6	318,0373	M-Hex	0,9			C ₁₅ H ₁₀ O ₈	R
		480,0910	M	1,4	480,0909	1,1	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₃	
		318,0379	M-Hex	1,1			C ₁₅ H ₁₀ O ₈	

Tabela 4.5 (nastavak) LC-MS podaci vodeno-etanolnih ekstrakata odabranih vrsta roda *Hypericum*

Jedinjenje	Rt (min)	Pozitivan mod ^a		Negativan mod ^b		Formula	Biljna vrsta ^c
		Masa	Greška	Masa	Greška		
8 Rutin	31,2	610,1528	M	610,1535	0,2	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	H; R; P
		464,0957	M-Rha			C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	
		432,1059	M-Hex			C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	
9 Hiperozid	33,0	302,0427	M-Rha-Hex		0,0	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	Ac; An; H; B; M; R; P
		464,0956	M	464,0957	0,7	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	
10 2''-O-Acetil- orijentin	34,3	302,0426	M-Hex		0,4	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	H
		490,1118	M	490,1114	0,6	C ₂₃ H ₂₂ O ₁₂	
11 Izokvercitrin	34,5	464,0958	M	464,0957	0,7	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	Ac; An; H; B; M; R; P
		302,0425	M-Hex ^d		0,8	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	
12 Kvercitrin	36,9	448,1001	M	448,101	1,0	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	Ac; B; M; R; P

Tabela 4.5 (nastavak) LC-MS podaci vodeno-etanolnih ekstrakata odabranih vrsta roda *Hypericum*

Jedinjenje	Rt (min)	Pozitivan mod ^a		Negativan mod ^b		Formula	Biljna vrsta ^c
		Masa	Greška	Masa	Greška		
13 Astilbin	37,8	450,1161	M	0,2	450,1162	0,0	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₁ Ac
		276,0632	M-Rha	0,6			C ₁₄ H ₁₂ O ₆
14 Kvercetin	40,1	302,0431	M	1,5	302,0421	2,0	C ₁₅ H ₁₀ O ₇ Ac; An; H; B; M; R; P
15 I3,I18-Biapienin	42,18	538,0894	M	1,1	538,0893	1,3	C ₃₀ H ₁₈ O ₁₀ Ac; H; B; M; R; P

^a Mase izračunate iz M+H, M+Na, M+K i 2M+H jona.

^b Mase izračunate iz M-H jona.

^c R - *H. richeri*; P - *H. perforatum*; B - *H. barbatum*; H - *H. hirsutum*; An - *H. androsaemum*; Ac - *H. acutum*; M - *H. maculatum*.

^d Caff - kafeoil; Hex - heksozil; Rha – ramnozil

Tabela 4.6 Kvantitativan sastav vodeno-etanolnog ekstrakta vrste *H. richeri*

Pik	Jedinjenje	λ (nm)	Sadržaj (mg/g suvog ekstrakta) ^a
1	3- <i>O</i> -Kafeoilhina kiselina	320	21,5 ± 0,2
2	4- <i>O</i> -Kafeoilhina kiselina	320	n.d. ^b
3	5- <i>O</i> -Kafeoilhina kiselina	320	3,0 ± 0,1
4	Orijentin	254	n.d.
5	Miricetin 3- <i>O</i> -rutinozid	254	63,1 ± 1,4
6	Miricetin 3- <i>O</i> -galaktozid	254	25,9 ± 0,3
7	Miricetin 3- <i>O</i> -glukozid	254	33,2 ± 0,3
8	Rutin	254	61,0 ± 1,6
9	Hiperozid	254	15,7 ± 0,2
10	2''- <i>O</i> -Acetil-orijentin	254	n.d.
11	Izokvercitrin	254	14,5 ± 0,4
12	Kvercitrin	254	7,1 ± 0,2
14	Kvercetin	254	3,2 ± 0,1
15	I3,II8-Biapigenin	320	3,0 ± 0,1
16	Pseudohipericin	590	4,5 ± 0,1
17	Hipericin	590	0,4 ± 0,1
	Ukupan sadržaj flavonoida		226,7 ± 4,2

^a Vrednosti su izražene kao srednja vrednost ± standardna devijacija.

^b Nije detektovano

Tabela 4.7 Kvantitativan sastav vodeno-etanolnog ekstrakta vrste *H. perforatum*

Pik	Jedinjenje	λ (nm)	Sadržaj (mg/g suvog ekstrakta)^a
1	3- <i>O</i> -Kafeoilhina kiselina	320	3,8 ± 0,1
2	4- <i>O</i> -Kafeoilhina kiselina	320	n.d. ^b
3	5- <i>O</i> -Kafeoilhina kiselina	320	5,1 ± 0,1
4	Orijentin	254	n.d.
5	Miricetin 3- <i>O</i> -rutinozid	254	n.d.
6	Miricetin 3- <i>O</i> -galaktozid	254	n.d.
7	Miricetin 3- <i>O</i> -glukozid	254	n.d.
8	Rutin	254	17,0 ± 0,5
9	Hiperozid	254	15,5 ± 0,2
10	2''- <i>O</i> -Acetil-orijentin	254	n.d.
11	Izokvercitrin	254	7,2 ± 0,1
12	Kvercitrin	254	3,9 ± 0,1
14	Kvercetin	254	5,8 ± 0,1
15	I3,II8-Biapigenin	320	2,9 ± 0,1
16	Pseudohipericin	590	4,2 ± 0,1
17	Hipericin	590	2,0 ± 0,1
	Ukupan sadržaj flavonoida		52,3 ± 0,9

^a Vrednosti su izražene kao srednja vrednost ± standardna devijacija.

^b Nije detektovano

Tabela 4.8 Kvantitativan sastav vodeno-etanolnog ekstrakta vrste *H. barbatum*

Pik	Jedinjenje	λ (nm)	Sadržaj (mg/g suvog ekstrakta) ^a
1	3- <i>O</i> -Kafeoilhina kiselina	320	n.d. ^b
2	4- <i>O</i> -Kafeoilhina kiselina	320	0,5 ± 0,2
3	5- <i>O</i> -Kafeoilhina kiselina	320	30,7 ± 0,2
4	Orijentin	254	n.d.
5	Miricetin 3- <i>O</i> -rutinozid	254	n.d.
6	Miricetin 3- <i>O</i> -galaktozid	254	n.d.
7	Miricetin 3- <i>O</i> -glukozid	254	n.d.
8	Rutin	254	n.d.
9	Hiperozid	254	33,7 ± 0,2
10	2''- <i>O</i> -Acetil-orijentin	254	n.d.
11	Izokvercitrin	254	0,4 ± 0,1
12	Kvercitrin	254	9,1 ± 0,1
14	Kvercetin	254	0,3 ± 0,1
15	I3,II8-Biapigenin	320	0,4 ± 0,1
16	Pseudohipericin	590	5,0 ± 0,2
17	Hipericin	590	3,8 ± 0,1
	Ukupan sadržaj flavonoida		43,9 ± 0,5

^a Vrednosti su izražene kao srednja vrednost ± standardna devijacija.

^b Nije detektovano

Tabela 4.9 Kvantitativan sastav vodeno-etanolnog ekstrakta vrste *H. hirsutum*

Pik	Jedinjenje	λ (nm)	Sadržaj (mg/g suvog ekstrakta) ^a
1	3- <i>O</i> -Kafeoilhina kiselina	320	6,8 ± 0,1
2	4- <i>O</i> -Kafeoilhina kiselina	320	n.d. ^b
3	5- <i>O</i> -Kafeoilhina kiselina	320	1,0 ± 0,3
4	Orijentin	254	29,6 ± 0,3
5	Miricetin 3- <i>O</i> -rutinozid	254	n.d.
6	Miricetin 3- <i>O</i> -galaktozid	254	n.d.
7	Miricetin 3- <i>O</i> -glukozid	254	n.d.
8	Rutin	254	1,5 ± 0,2
9	Hiperozid	254	2,4 ± 0,2
10	2''- <i>O</i> -Acetil-orijentin	254	38,5 ± 0,3
11	Izokvercitrin	254	10,5 ± 0,2
12	Kvercitrin	254	n.d.
14	Kvercetin	254	3,9 ± 0,1
15	I3,II8-Biapigenin	320	4,1 ± 0,1
16	Pseudohipericin	590	n.d.
17	Hipericin	590	0,82 ± 0,03
	Ukupan sadržaj flavonoida		90,5 ± 1,1

^a Vrednosti su izražene kao srednja vrednost ± standardna devijacija.

^b Nije detektovano

Tabela 4.10 Kvantitativan sastav vodeno-etanolnog ekstrakta vrste *H. androsaemum*

Pik	Jedinjenje	λ (nm)	Sadržaj (mg/g suvog ekstrakta) ^a
1	3- <i>O</i> -Kafeoilhina kiselina	320	28,2 ± 0,2
2	4- <i>O</i> -Kafeoilhina kiselina	320	n.d. ^b
3	5- <i>O</i> -Kafeoilhina kiselina	320	25,4 ± 0,2
4	Orijentin	254	n.d.
5	Miricetin 3- <i>O</i> -rutinozid	254	n.d.
6	Miricetin 3- <i>O</i> -galaktozid	254	n.d.
7	Miricetin 3- <i>O</i> -glukozid	254	n.d.
8	Rutin	254	n.d.
9	Hiperozid	254	1,8 ± 0,2
10	2''- <i>O</i> -Acetil-orijentin	254	n.d.
11	Izokvercitrin	254	0,3 ± 0,1
12	Kvercitrin	254	n.d.
14	Kvercetin	254	1,1 ± 0,2
15	I3,I18-Biapigenin	320	n.d.
16	Pseudohipericin	590	n.d.
17	Hipericin	590	n.d.
	Ukupan sadržaj flavonoida		3,2 ± 0,3

^a Vrednosti su izražene kao srednja vrednost ± standardna devijacija.

^b Nije detektovano

Tabela 4.11 Kvantitativan sastav vodeno-etanolnog ekstrakta vrste *H. acutum*

Pik	Jedinjenje	λ (nm)	Sadržaj (mg/g suvog ekstrakta) ^a
1	3- <i>O</i> -Kafeoilhina kiselina	320	10,3 ± 0,1
2	4- <i>O</i> -Kafeoilhina kiselina	320	n.d. ^b
3	5- <i>O</i> -Kafeoilhina kiselina	320	1,0 ± 0,3
4	Orijentin	254	n.d.
5	Miricetin 3- <i>O</i> -rutinozid	254	n.d.
6	Miricetin 3- <i>O</i> -galaktozid	254	n.d.
7	Miricetin 3- <i>O</i> -glukozid	254	n.d.
8	Rutin	254	n.d.
9	Hiperozid	254	16,4 ± 0,1
10	2''- <i>O</i> -Acetil-orijentin	254	n.d.
11	Izokvercitrin	254	8,4 ± 0,1
12	Kvercitrin	254	0,4 ± 0,2
14	Kvercetin	254	7,8 ± 0,1
15	I3,II8-Biapigenin	320	0,5 ± 0,1
16	Pseudohipericin	590	0,88 ± 0,02
17	Hipericin	590	0,62 ± 0,02
	Ukupan sadržaj flavonoida		33,5 ± 0,5

^a Vrednosti su izražene kao srednja vrednost ± standardna devijacija.

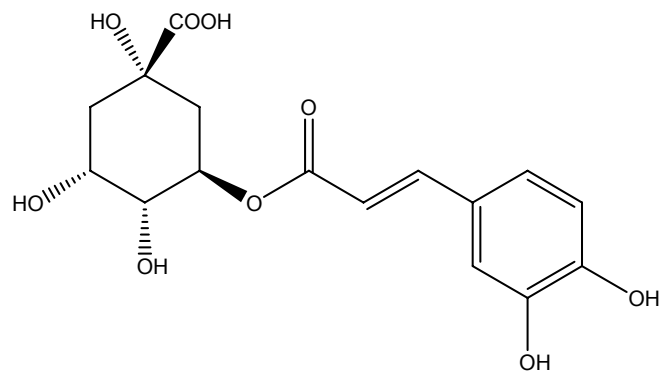
^b Nije detektovano

Tabela 4.12 Kvantitativan sastav vodeno-etanolnog ekstrakta vrste *H. maculatum*

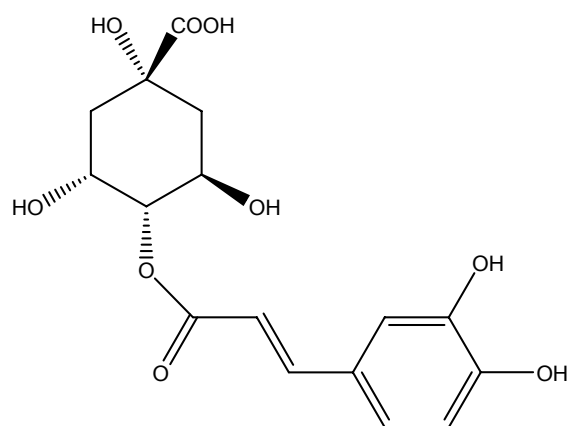
Pik	Jedinjenje	λ (nm)	Sadržaj (mg/g suvog ekstrakta) ^a
1	3- <i>O</i> -Kafeoilhina kiselina	320	7,1 ± 0,1
2	4- <i>O</i> -Kafeoilhina kiselina	320	n.d. ^b
3	5- <i>O</i> -Kafeoilhina kiselina	320	n.d.
4	Orijentin	254	n.d.
5	Miricetin 3- <i>O</i> -rutinozid	254	n.d.
6	Miricetin 3- <i>O</i> -galaktozid	254	n.d.
7	Miricetin 3- <i>O</i> -glukozid	254	n.d.
8	Rutin	254	n.d.
9	Hiperozid	254	6,1 ± 0,1
10	2''- <i>O</i> -Acetil-orijentin	254	n.d.
11	Izokvercitrin	254	1,2 ± 0,1
12	Kvercitrin	254	0.15 ± 0,05
14	Kvercetin	254	8,0 ± 0,1
15	I3,II8-Biapigenin	320	0,3 ± 0,1
16	Pseudohipericin	590	1,5 ± 0,1
17	Hipericin	590	1,1 ± 0,1
	Ukupan sadržaj flavonoida		15,8 ± 0,4

^a Vrednosti su izražene kao srednja vrednost ± standardna devijacija.

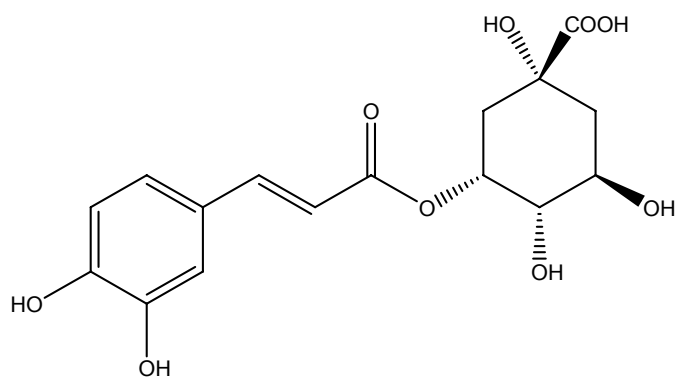
^b Nije detektovano



3-*O*-Kafeoilhina kiselina (jedinjenje 1)

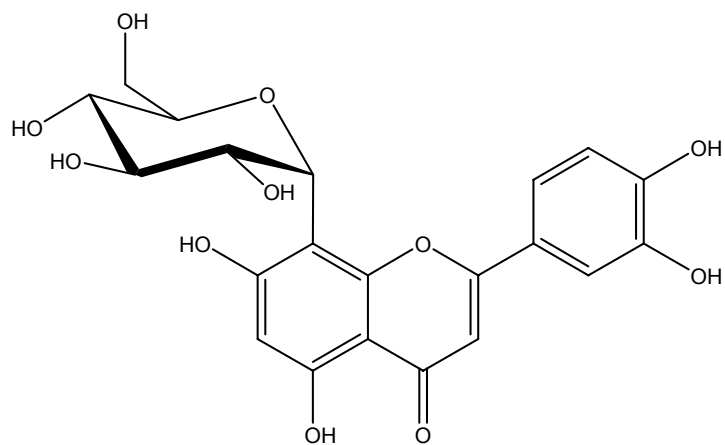


4-*O*-Kafeoilhina kiselina (jedinjenje 2)

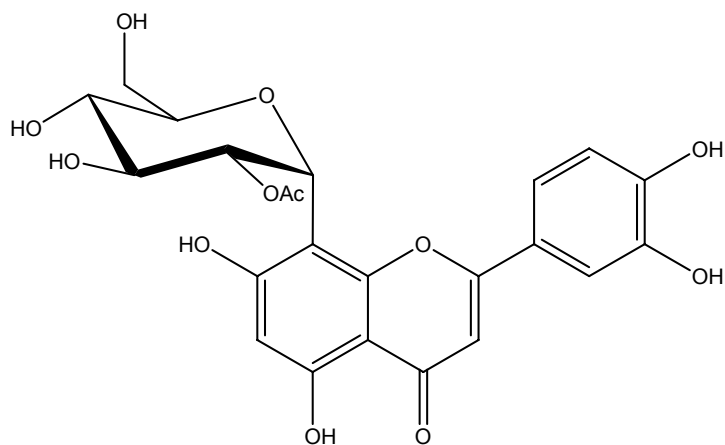


5-*O*-Kafeoilhina kiselina (jedinjenje 3)

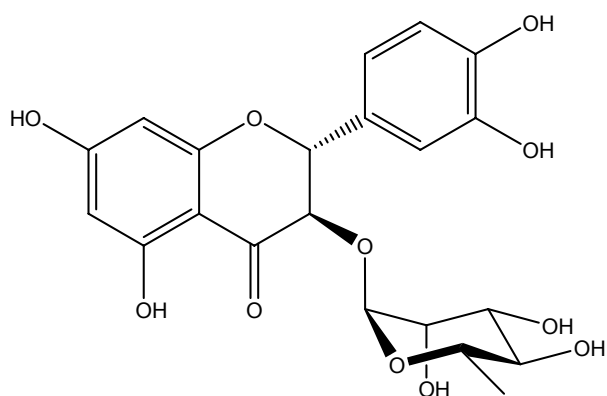
Slika 4.22 Strukture jedinjenja identifikovanih na osnovu LC-UV-MS analize



Orijentin (jedinjenje **4**)

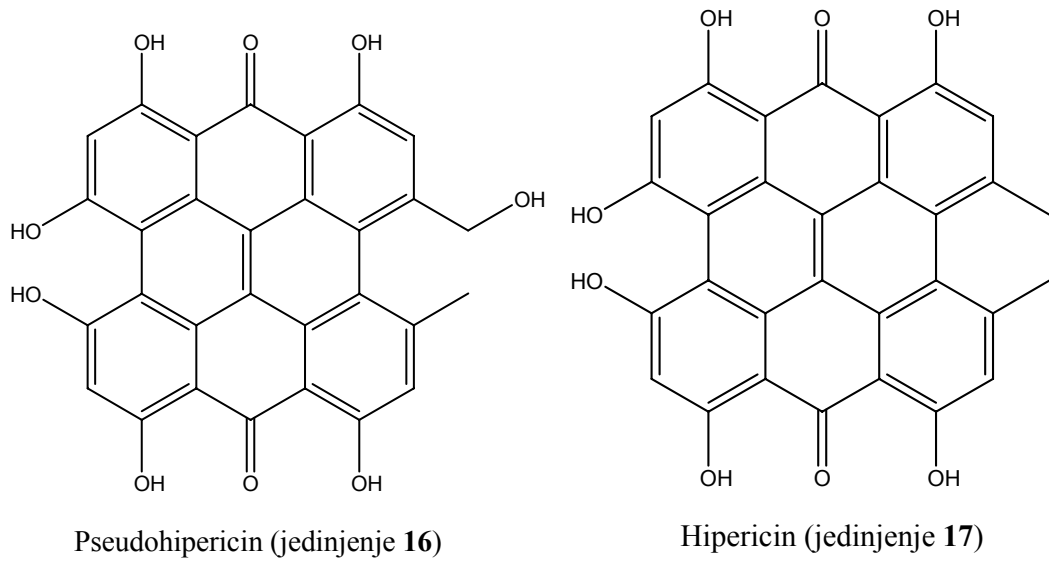


2'-*O*-Acetil-orijentin (jedinjenje **10**)



Astilbin (jedinjenje **13**)

Slika 4.22 (nastavak) Strukture jedinjenja identifikovanih na osnovu LC-UV-MS analize



Slika 4.22 (nastavak) Strukture jedinjenja identifikovanih na osnovu LC-UV-MS analize

4.1.6 HPLC-UV analiza uljanih ekstraktata odabranih vrsta roda *Hypericum*

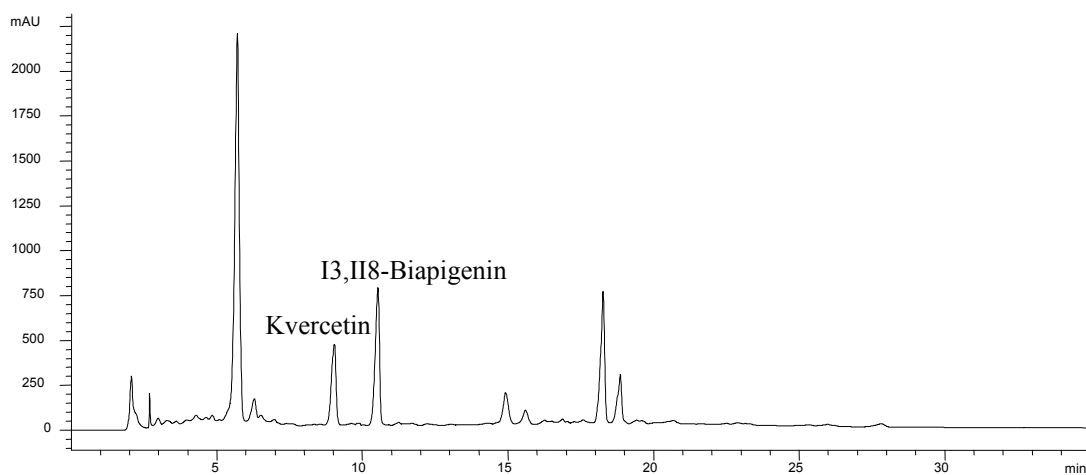
Uljani ekstrakti vrsta *H. richeri*, *H. perforatum*, *H. barbatum*, *H. hirsutum*, *H. androsaemum*, *H. acutum* i *H. maculatum* su pripremljeni prema tradicionalnim recepturama za izradu kantarionovog ulja (*Oleum Hyperici*) na tri različita načina: maceracijom sveže herbe u suncokretovom ulju na direktnoj sunčevoj svetlosti tokom 40 dana (postupak I) (45), prethodnom maceracijom suve herbe u 96% etanolu, koja se nastavlja ekstrakcijom suncokretovim uljem uz zagrevanje na vodenom kupatilu i istovremeno uklanjanje etanola (postupak II) (69), i direktnom ekstrakcijom suve herbe suncokretovim uljem tokom 3 h uz zagrevanje na vodenom kupatilu (postupak III) (69).

Poređenjem HPLC retencionih vremena i UV spektara sa retencionim vremenima i UV spektrima prethodno izolovanih jedinjenja iz vrste *H. richeri*, u uljanim ekstraktima ispitivanih *Hypericum* vrsta su identifikovani kvercetin i I3,II8-biapigenin. Izolovana jedinjenja su korišćena i za izradu kalibracionih kriva i kvantitativnu analizu kvercetina i I3,II8-biapigenina u uljanim ekstraktima.

Kvercetin i I3,II8-biapigenin su identifikovani u svim uljanim ekstraktima ispitivanih *Hypericum* vrsta, osim u ekstraktu *H. androsaemum*, gde je identifikovan samo kvercetin. I3,II8-Biapigenin nije identifikovan ni u vodeno-etanolnom ekstraktu vrste *H. androsaemum*. U analiziranim uljanim ekstraktima nisu identifikovani hipericin i pseudohipericin, ali su (osim u ekstraktu *H. androsaemum*) detektovane komponente čiji su UV spektri bili slični UV spektrima hipericina i pseudohipericina, ali čija retencionna vremena nisu odgovarala ovim naftodiantronima tako da najverovatnije predstavljaju njihove proizvode razgradnje (51,52). Hiperforin i njegovi derivati takođe nisu detektovani, što je u skladu sa objavljenim rezultatima drugih autora koji su pokazali da su hiperforin i njegovi analozi nestabilni u kantarionovom ulju (51).

Sadržaj flavonoida zavisio je kako od biljne vrste, tako i od primenjenog postupka ekstrakcije. Najveća količina ovih jedinjenja određena je u ekstraktima dobijenim prethodnom maceracijom suve herbe u 96% etanolu, koja se nastavlja ekstrakcijom suncokretovim uljem uz zagrevanje i istovremeno uklanjanje etanola (postupak II) (Tabela 4.13). Uljani ekstrakti vrsta *H. maculatum* (Slika 4.23), *H. perforatum* i *H. richeri* bili su najbogatiji u pogledu sadržaja kvercetina i I3,II8-biapigenina.

Dobijeni rezultati za uljane ekstrakte herbe *H. perforatum* su u skladu sa rezultatima drugih autora (51,52). Međutim, za ostalih šest ispitivanih vrsta roda *Hypericum* u literaturi nisu dostupni podaci o kvalitativnom i kvantitativnom sastavu njihovih uljanih ekstrakata.



Slika 4.23 HPLC hromatogram (UV detekcija na 270 nm) uljanog ekstrakta *H. maculatum* dobijenog postupkom II

Tabela 4.13 Sadržaj kvercetina i I3,II8-biapigenina ($\mu\text{g/ml}$) u uljanim ekstraktima odabranih vrsta roda *Hypericum*

Ekstrakt	Kvercetin	I3,II8-Biapigenin	Ukupan sadržaj flavonoida
<i>H. perforatum</i> I	29 \pm 3	12 \pm 3	41 \pm 5
<i>H. perforatum</i> II	129 \pm 9	52 \pm 4	181 \pm 10
<i>H. perforatum</i> III	12 \pm 2	3 \pm 1	15 \pm 2
<i>H. richeri</i> I	27 \pm 2	8 \pm 1	35 \pm 3
<i>H. richeri</i> II	49 \pm 3	60 \pm 4	109 \pm 5
<i>H. richeri</i> III	22 \pm 2	7 \pm 1	29 \pm 2
<i>H. androsaemum</i> I	1,9 \pm 0,2	nije detektovan	1,9 \pm 0,2
<i>H. androsaemum</i> II	25 \pm 2	nije detektovan	25 \pm 2
<i>H. androsaemum</i> III	4 \pm 1	nije detektovan	4 \pm 1
<i>H. acutum</i> I	22 \pm 2	10 \pm 1	32 \pm 3
<i>H. acutum</i> II	41 \pm 3	18 \pm 2	59 \pm 4
<i>H. acutum</i> III	21 \pm 2	6 \pm 1	27 \pm 2
<i>H. barbatum</i> I	40 \pm 3	14 \pm 3	54 \pm 5
<i>H. barbatum</i> II	63 \pm 3	23 \pm 3	86 \pm 5
<i>H. barbatum</i> III	15 \pm 2	5 \pm 1	20 \pm 2
<i>H. hirsutum</i> I	5 \pm 1	4 \pm 1	9 \pm 1
<i>H. hirsutum</i> II	12 \pm 1	11 \pm 4	23 \pm 3
<i>H. hirsutum</i> III	3 \pm 2	1,1 \pm 0,5	4,1 \pm 2,1
<i>H. maculatum</i> I	17 \pm 2	7 \pm 1	24 \pm 2
<i>H. maculatum</i> II	191 \pm 8	159 \pm 6	350 \pm 10
<i>H. maculatum</i> III	32 \pm 3	7 \pm 1	39 \pm 3

4.2 Farmakološka ispitivanja

4.2.1 Ispitivanje sposobnosti inhibicije aktivnosti enzima MAO i preuzimanja 5-HT vodeno-etanolnih ekstrakata odabranih vrsta roda *Hypericum*

Rezultati velikog broja kliničkih studija potvrđuju antidepresivno delovanje vodeno-alkoholnih ekstrakata herbe kantariona, *H. perforatum*. Biljni lekovi na bazi ovih ekstrakata zvanično se koriste u terapiji blagih do umerenih depresivnih epizoda i za kratkotrajnu simptomatsku terapiju blagih depresivnih poremećaja. Neželjene reakcije koje su karakteristične za vodeno-alkoholne ekstrakte herbe kantariona (gastrointestinalni poremećaji, alergijske reakcije na koži, zamor, uznemirenost, povećana osetljivost na intenzivno sunčevo zračenje) su uglavnom blage i značajno ređe se javljaju u odnosu na neželjene reakcije sintetskih antidepresiva (59). Smatra se da različite klase jedinjenja prisutne u herbi kantariona (naftodiantroni, floroglucinoli, flavonoidi, oligomerni procijanidini) doprinose antidepresivnoj aktivnosti (104,105,106,107). Ove klase jedinjenja prisutne su i u herbama drugih odabranih vrsta roda *Hypericum*, koje do sada uglavnom nisu istraživane u pogledu antidepresivnog delovanja. Iz ovih razloga izvršeno je *in vitro* ispitivanje sposobnosti inhibicije aktivnosti enzima MAO i preuzimanja 5-HT u sinaptozomima njihovih vodeno-etanolnih ekstrakata.

Ispitivanje sposobnosti inhibicije aktivnosti enzima MAO vodeno-etanolnih ekstrakata odabranih vrsta roda Hypericum

Enzim monoaminooksidaza je vrsta flavoenzima, lokalizovan je na unutrašnjoj strani spoljašnje membrane mitohondrija za koju je čvrsto vezan svojom C-terminalnom sekvencom. Ima ulogu u oksidativnoj dezaminaciji ksenobiotika i endogenih amina (uključujući neurotransmitere 5-HT, noradrenalin, dopamin). Izolovane su dve različite izoforme ovog enzima: MAO A i MAO B. Ova dva izoenzima imaju različite sekvence aminokiselina, drugačiju trodimenzionalnom strukturom i distribuciju u organima i tkivima, razlikuju se po osetljivosti na inhibitore kao i po specifičnosti za supstrate na koje deluju (108). Prvi neselektivni inhibitor aktivnosti enzima MAO bio je iproniazid koji je u terapiju depresivnih poremećaja uveden '50-ih godina XX veka. Iako se danas MAO inhibitori koriste tek kao treći ili četvrti korak u terapiji depresije, još uvek inhibicija ovog enzima predstavlja interesantno polje za istraživanje i dobijanje novih antidepressiva i antiparkinsonika (109,110).

Sposobnost inhibicije aktivnosti enzima MAO vodeno-etanolnih ekstrakata odabranih vrsta roda *Hypericum* ispitivana je u *in vitro* uslovima na mikrozomima izolovanim iz jetre pacova. Aktivnost mikrozomalne MAO je praćena preko stepena razgrađivanja ¹⁴C-tiramina koji je supstrat za obe izoforme MAO (MAO A i MAO B) uz korišćenje pargilina koji je selektivni inhibitor MAO B. Inhibitorno delovanje vodeno-etanolnih ekstrakata ispitivanih vrsta roda *Hypericum* na aktivnost enzima MAO A i MAO B je predstavljeno u Tabeli 4.14. Prikazana je srednja vrednost IC₅₀ (kao koncentracije ekstrakta na kojoj dolazi do 50% inhibicije početne aktivnosti enzima) iz dva nezavisna eksperimenta. Prema dostupnoj literaturi, do sada su u pogledu ove aktivnosti proučavani samo ekstrakti herbe *H. perforatum*, dok za ostalih šest odabranih vrsta roda *Hypericum* ovo ispitivanje nije sprovedeno.

Rezultati drugih autora u pogledu uticaja herbe kantariona na inhibiciju aktivnosti enzima MAO su kontroverzni. Thiede i Walper (111) i Bladt i Wagner (112) su pokazali da alkoholni ekstrakti herbe kantariona mogu da inhibiraju aktivnost enzima MAO, dok su Müller i saradnici (113) pokazali da metanolni ekstrakt kantariona ima slab efekat na ove enzime. Od pojedinačnih komponenata prisutnih u herbi kantariona, u

početku se smatralo da bi hipericin mogao da bude odgovoran za inhibiciju aktivnosti enzima MAO (114). Međutim, ovakvo delovanje hipericina u narednim studijama nije bilo potvrđeno (115,116,117). Postoje podaci koji pokazuju da bi ksantoni i flavonoidi mogli da budu odgovorni za delovanje herbe kantariona kao MAO inhibitora, ali koncentracije koje su potrebne da bi se taj efekat postigao su značajno veće od terapijskih doza (58,61,118). Utvrđena slaba sposobnost inhibicije enzima MAO ekstrakta herbe *H. perforatum* je u skladu sa literaturnim podacima prema kojima se antidepresivno delovanje ovog ekstrakta ipak objašnjava drugim mehanizmima (61). Takođe, relativno visoke IC₅₀ vrednosti ekstrakata ostalih šest odabranih vrsta roda *Hypericum* ukazuju na to da inhibicija aktivnosti enzima MAO nije jedan od mehanizama delovanja preko koga bi ovi ekstrakti mogli da ispolje antidepresivnu aktivnost.

Tabela 4.14 Delovanje vodeno-etanolnih ekstrakata odabranih vrsta roda *Hypericum* na inhibiciju aktivnosti enzima MAO A i MAO B u *in vitro* uslovima

Ekstrakt	MAO A	MAO B
	IC ₅₀ (mg/ml)*	IC ₅₀ (mg/ml)*
<i>H. richeri</i>	0,33	0,41
<i>H. perforatum</i>	0,32	0,61
<i>H. barbatum</i>	1,33	0,92
<i>H. hirsutum</i>	0,42	0,40
<i>H. androsaemum</i>	0,43	0,41
<i>H. acutum</i>	0,35	1,03
<i>H. maculatum</i>	0,32	0,30

*Srednja vrednost iz 2 eksperimenta

Ispitivanje sposobnosti inhibicije preuzimanja 5-HT vodeno-etanolnih ekstrakata odabranih vrsta roda Hypericum

Selektivni inhibitori preuzimanja serotonina (SSRI) se danas smatraju lekovima prvog reda u lečenju nehospitalizovanih pacijenata sa epizodama depresije blagog/umerenog intenziteta i distimija, kao i kod depresivnih epizoda umerenog intenziteta sa melanhelijom (somatskim simptomima), pogotovo u populaciji pacijenata kod kojih se mogu očekivati neželjeni efekti tricikličnih antidepressiva (119). U toku primene SSRI javlja se manji broj neželjenih efekata, benignijeg su karaktera i ređe dovode do prekida terapije (120,121,122). Jedan od glavnih mehanizama antidepressivnog delovanja vodeno-alkoholnih ekstrakata herbe kantariona je i inhibicija preuzimanja 5-HT (61).

Uticaj vodeno-etanolnih ekstrakata sedam odabranih vrsta roda *Hypericum* na funkciju transportera za 5-HT ispitavan je u testu sa sveže pripremljenim sinaptozomima pacova u *in vitro* uslovima, uz korišćenje radioaktivno obeleženog 5-HT. Na osnovu dobijenih rezultata (Tabela 4.15) gde su prikazane srednje vrednosti konstanti inhibicije preuzimanja 5-HT, utvrđeno je da je najefikasniji ekstrakt vrste *H. perforatum* ($IC_{50} = 6,0 \mu\text{g/ml}$). Slična aktivnost zabeležena je u literaturi za metanolni ekstrakt herbe kantariona ($IC_{50} = 2 \mu\text{g/ml}$) (123). Takođe, izmerena sposobnost inhibicije sinaptozomalnog preuzimanja 5-HT nekih komercijalno dostupnih proizvoda na bazi herbe kantariona, kod kojih su utvrđene razlike u pogledu sadržaja svih kvantifikovanih aktivnih jedinjenja, se kretala u opsegu IC_{50} vrednosti od 3 - 18 $\mu\text{g/ml}$ (124). Rezultati eksperimenata sprovedenih u okviru ove doktorske disertacije pokazuju da vodeno-etanolni ekstrakti ostalih šest odabranih vrsta roda *Hypericum*, koji u pogledu ove aktivnosti do sada nisu proučavani, znatno slabije blokiraju preuzimanje sinaptozomalnog 5-HT. Značajniji stepen inhibicije je postignut još samo ekstraktom vrste *H. androsaemum* ($IC_{50} = 60,5 \mu\text{g/ml}$). Ekstrakti vrsta *H. richeri*, *H. acutum*, *H. maculatum* i *H. barbatum* imaju značajnu aktivnost samo pri visokim koncentracijama (IC_{50} vrednosti između 100 i 1000 $\mu\text{g/ml}$), dok ekstrakt *H. hirsutum* nije pokazao merljiv efekat. Pošto su aktivne koncentracije ispitivanih ekstrakata odabranih vrsta roda *Hypericum*, osim *H. perforatum*, koje su pokazale aktivnost u našim

eksperimentima bile prilično visoke, pretpostavlja se da koncentracije ovih ekstrakata u plazmi neophodne za ispoljavanje antidepresivnog delovanja ne bi mogle biti dostignute.

Dosadašnjim ispitivanjima utvrđeno je da su sastojci vodeno-alkoholnih ekstrakata herbe kantariona, *H. perforatum*, odgovorni za njihovo antidepresivno delovanje floroglucinoli (hiperforin i adhiperforin), naftodiantroni (hipericin i pseudohipericin), kao i pojedini flavonoidi. Hiperforin, pored inhibitornog delovanja na preuzimanje 5-HT, inhibira i preuzimanje drugih neurotransmitera, kao što su noradrenalin, dopamin, GABA i L-glutamat (125,126,127,128). U slučaju svih navedenih enzima, IC₅₀ vrednost hiperforina u *in vitro* uslovima kreće se u opsegu od 80 - 1234 nM. Posle dnevnog unosa od 900 mg ekstrakta herbe kantariona, hiperforin je detektovan u krvi u koncentraciji od 180 nM, što dovodi do zaključka da je u toku terapije moguće postići dovoljnu količinu ovog sastojka koja bi dovela do inhibicije preuzimanja odgovarajućih neurotransmitera. Kao mogući mehanizmi putem kojih hiperforin ispoljava ovakvo delovanje navode se, između ostalog, inhibicija kalcijumovih kanala tipa P i povećanje intracelularne koncentracije natrijuma (61,129,130). Na osnovu rezultata *in vitro* studija, flavonoidi (amentoflavon, kvercetin, rutin, mikvelijanin, hiperozid), kao i hipericin bi svoj antidepresivni efekat mogli da ispolje putem vezivanja za različite receptore u mozgu (131,132,133). S druge strane, u testovima koji su se bavili kako ispitivanjem mogućih biohemijskih mehanizama delovanja, tako i farmakološkim modelima za ispitivanje antidepresivne efikasnosti, ekstrakti kantariona sa različitim sadržajem hiperforina, hipericina i flavonoida su pokazali antidepresivnu aktivnost, na osnovu čega se i dalje kao aktivna supstanca posmatra celokupan vodeno-alkoholni ekstrakt (61).

Tabela 4.15 Delovanje vodeno-etanolnih ekstraktata odabranih vrsta roda *Hypericum* na inhibiciju preuzimanja 5-HT u sinaptosome pacova u *in vitro* uslovima

Ekstrakt	IC₅₀ (µg/ml)*
<i>H. richeri</i>	358
<i>H. perforatum</i>	6
<i>H. barbatum</i>	181
<i>H. hirsutum</i>	>1 mg/ml
<i>H. androsaemum</i>	60,5
<i>H. acutum</i>	727
<i>H. maculatum</i>	262

* Srednja vrednost iz 2 eksperimenta

4.2.2 Ispitivanje antioksidantne aktivnosti ekstrakata odabranih vrsta roda *Hypericum*

Reaktivne kiseonične vrste koje nastaju u oksidacionim procesima u organizmu, predstavljaju važan deo odbrambenog mehanizma protiv infekcija, ali njihovo preterano stvaranje može dovesti do oštećenja tkiva. Neravnoteža između reaktivnih kiseoničnih vrsta i antioksidantnih odbrambenih mehanizama može dovesti do oštećenja ćelijskih membrana ili intracelularnih molekula, pri čemu nastaju lipidni peroksidi i oštećuju se nukleinske kiseline, ugljeni hidrati, proteini i masti. Oksidativni stres može biti povezan sa nastankom raka, starenjem, aterosklerozom, i pojavom neurodegenerativnih bolesti kao što su Parkinsonova i Alchajmerova bolest (134,135). Flavonoidi i fenolkarboksilne kiseline, kao najzastupljenije klase biljnih fenolnih jedinjenja, predstavljaju glavne nosioce antioksidantnog delovanja najvećeg broja biljnih vrsta. Njihova antioksidantna aktivnost dobro je dokumentovana u različitim *in vitro* i *in vivo* eksperimentalnim modelima (136,137,138,139,140,141,142,143,144,145,146,147). Zbog pomenutih antioksidantnih svojstava, fenolna jedinjenja mogu smanjiti oksidativna oštećenja prouzrokovana reaktivnim kiseoničnim vrstama i na taj način dovesti do usporavanja razvoja mnogih hroničnih bolesti.

Za ispitivanje antioksidantnog potencijala vodeno-etanolnih ekstrakata odabranih vrsta roda *Hypericum*, kao i metanolnog ekstrakta vrste *H. richeri* i njegovih frakcija (hloroformske, etilacetatne, *n*-butanolne i vodene), korišćeno je više različitih testova. Ovakav pristup neophodan je zbog potpunije evaluacije antioksidantnog potencijala, s obzirom na to da su tema istraživanja vrste koje sadrže jedinjenja raznovrsne strukture, fizičko-hemijskih osobina i aktivnosti.

Ispitivanje antioksidantne aktivnosti vodeno-etanolnih ekstrakata odabranih vrsta roda Hypericum

Antioksidantne osobine vodeno-etanolnih ekstrakata odabranih vrsta roda *Hypericum* su ispitane spektrofotometrijskim testovima u kojima je merena njihova ukupna antioksidantna aktivnost (Ferric Reducing Ability of Plasma, FRAP), određena

sposobnost neutralizacije 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikala (DPPH[•]), superoksid anjon radikala, radikal katjona 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske kiseline) (ABTS^{•+}), kao i sposobnost inhibicije lipidne peroksidacije. Dobijeni rezultati prikazani su u Tabelama 4.16 - 4.20.

Ispitivanje ukupne antioksidantne aktivnosti (FRAP test)

FRAP test se zasniva na redukciji kompleksa Fe³⁺-tripiridiltriazin (Fe(III)-TPTZ) do Fe²⁺-tripiridiltriazin (Fe(II)-TPTZ), u kiseloj sredini, pri čemu se razvija intenzivno plava boja. Antioksidantna aktivnost ispitivanih ekstrakata se kretala u rasponu od 3,6 – 4,5 μmol Fe²⁺/mg ekstrakta (Tabela 4.16). Najveća antioksidantna aktivnost izmerena je za ekstrakte vrsta *H. acutum* (4,5 μmol Fe²⁺/mg) i *H. maculatum* (4,1 μmol Fe²⁺/mg), dok su ekstrakti vrsta *H. barbatum* (3,6 μmol Fe²⁺/mg) i *H. perforatum* (3,7 μmol Fe²⁺/mg) pokazali najmanju aktivnost. Aktivnost 1 g ekstrakta vrste *H. acutum* ekvivalentna je aktivnosti koju pokazuje 180 ml ekstrakta zelenog čaja, poznatog biljnog antioksidansa (2 g zelenog čaja ekstrahovano sa 200 ml vode 15 minuta na 80°C) (148).

Tabela 4.16 Ukupni antioksidantni potencijal vodeno-etanolnih ekstrakata odabranih vrsta roda *Hypericum*

Ekstrakt	FRAP (μmol Fe ²⁺ /mg)
<i>H. richeri</i>	4,1 ± 0,2
<i>H. perforatum</i>	3,7 ± 0,1
<i>H. barbatum</i>	3,6 ± 0,1
<i>H. hirsutum</i>	3,9 ± 0,2
<i>H. androsaemum</i>	4,0 ± 0,2
<i>H. acutum</i>	4,5 ± 0,2
<i>H. maculatum</i>	4,1 ± 0,2

Prema dostupnim literaturnim podacima, sposobnost redukcije kompleksa Fe^{3+} -tripiridiltriazin je ranije ispitivana za metanolne ekstrakte vrsta *H. perforatum*, *H. richeri*, *H. barbatum* i *H. maculatum*, dobijenih nakon ekstrakcije biljnog materijala metilenhloridom. Kao i u ispitivanju sprovedenom u okviru ove disertacije, najveću aktivnost merenu FRAP testom pokazao je ekstrakt vrste *H. maculatum*, dok su najmanje aktivni bili ekstrakti vrsta *H. barbatum* i *H. richeri* (100). FRAP testom ispitivana je i redukciona sposobnost različitih frakcija metanolnog ekstrakta vrste *H. perforatum*. Frakcije u kojima je određen najveći sadržaj flavonoida i fenolkarboksilnih kiselina pokazale su i najveću antioksidantnu aktivnost, veću i od sintetskog antioksidansa BHT, dok su najmanje aktivne bile frakcije u kojima su dominirali naftodiantroni i biflavonoidi (149). Redukcione osobine metanolnih ekstrakata vrsta *H. richeri*, *H. perforatum*, *H. barbatum*, *H. hirsutum* i *H. maculatum* ispitivane su još i fosfomolibdenskim testom, koji se zasniva na redukciji molibdena iz Mo (VI) u Mo (V), pri čemu se intenzitet zelene boje nastalog fosfatnog kompleksa meri spektrofotometrijski (67).

Ispitivanje sposobnosti neutralizacije DPPH radikala

DPPH test je jedan od najčešće primenjivanih antioksidantnih testova za procenu sposobnosti neutralizacije slobodnih radikala. Sposobnost ekstrakata odabranih vrsta roda *Hypericum* da neutrališu DPPH radikal izražena je preko koncentracija ekstrakata koje neutrališu 50% DPPH radikala (EC_{50} vrednosti). Najveću aktivnost pokazali su ekstrakti vrsta *H. maculatum* ($\text{EC}_{50} = 10,2 \mu\text{g/ml}$) i *H. acutum* ($\text{EC}_{50} = 10,9 \mu\text{g/ml}$) (Tabela 4.17). Po aktivnosti zatim slede ekstrakti vrsta *H. hirsutum* i *H. androsaemum*, dok su najmanje aktivni bili ekstrakti vrsta *H. perforatum*, *H. richeri* i *H. barbatum* ($\text{EC}_{50} = 20,5 \mu\text{g/ml}$, $\text{EC}_{50} = 20,7 \mu\text{g/ml}$ i $\text{EC}_{50} = 21,3 \mu\text{g/ml}$). Može se konstatovati da svi ispitivani ekstrakti pokazuju veću aktivnost u odnosu na aktivnost liofilizovanog vodenog ekstrakta zelenog čaja ($\text{EC}_{50} = 44,3 \mu\text{g/ml}$) koji je dobijen ekstrakcijom 5 g droge sa 200 ml vode, 20 min na 80°C (150).

Tabela 4.17 Sposobnost vodeno-etanolnih ekstrakata odabranih vrsta roda *Hypericum* da neutrališu DPPH radikal

Ekstrakt	EC ₅₀ (µg/ml)
<i>H. richeri</i>	20,7 ± 0,1
<i>H. perforatum</i>	20,5 ± 0,1
<i>H. barbatum</i>	21,3 ± 0,1
<i>H. hirsutum</i>	13,6 ± 0,1
<i>H. androsaemum</i>	15,4 ± 0,1
<i>H. acutum</i>	10,9 ± 0,1
<i>H. maculatum</i>	10,2 ± 0,1

Dobijeni rezultati ispitivanja sposobnosti neutralizacije DPPH radikala vrsta *H. perforatum*, *H. hirsutum*, *H. richeri*, *H. maculatum*, *H. barbatum* i *H. androsaemum*, koji ukazuju na njihovu značajnu aktivnost, su u skladu sa postojećim literaturnim podacima. Za 80% etanolni ekstrakt vrste *H. perforatum* izmerena je EC₅₀ vrednost od 21 µg/ml (151), dok su se za liofilizovane vodene ekstrakte (10 g droge različitog porekla ekstrahovano sa 100 ml vode 10 minuta na 100°C) EC₅₀ vrednosti kretale od 9,0 do 11,7 µg/ml (99). Ekstrakti nadzemnih delova u cvetu vrste *H. perforatum* prikupljenih sa različitih lokaliteta, izrađeni smešom rastvarača aceton-metanol (1:1) u aparaturi po Soxhlet-u, su u maksimalno testiranoj koncentraciji od 12 µg/ml postigli procenat neutralizacije DPPH radikala od 27 do 36%. Sličnu aktivnost pokazao je i ekstrakt vrste *H. hirsutum* izrađen istim postupkom (31%) (27). Suvi metanolni ekstrakt vrste *H. barbatum* dobijen nakon prethodne ekstrakcije droge metilenhloridom, je u koncentraciji od 10 µg/ml neutralisao 31,9% DPPH radikala; nešto aktivniji bio je ekstrakt vrste *H. richeri* (49,4%), dok je još veću sposobnost neutralizacije DPPH radikala pokazao ekstrakt vrste *H. maculatum* (56,2%) (100). Almeida i saradnici su takođe pokazali visoku sposobnost liofilizovang 40% etanolnog ekstrakta vrste *H. androsaemum* da neutrališe DPPH radikal (EC₅₀ = 11,3 µg/ml) (65).

*Ispitivanje sposobnosti neutralizacije radikal katjona 2,2'-azino-bis-(3-
etilbenzotiazolin-6-sulfonske kiseline) (ABTS•+)*

U okviru ABTS^{•+} testa, antioksidantni kapacitet ispitivanih ekstrakata je izražen kao TEAC vrednost (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity), u jedinicama mmol Trolox/g suvog ekstrakta, koji se izračunava tako što se nagib krive zavisnosti procenta smanjenja apsorbancije u funkciji koncentracije ispitivanih uzoraka podeli sa nagibom odgovarajuće krive za sintetski antioksidans Trolox.

Od svih ispitivanih uzoraka, ekstrakt vrste *H. acutum* je pokazao najveći antioksidantni kapacitet sa TEAC vrednošću 1,69 mmol Trolox/g, dok su ekstrakti vrsta *H. barbatum* i *H. richeri* (0,64 mmol Trolox/g i 0,65 mmol Trolox/g) pokazali najslabiju aktivnost (Tabela 4.18). Aktivnost 1 g ekstrakta vrste *H. acutum* je ekvivalentna aktivnosti koju pokazuje 85 ml ekstrakta zelenog čaja (1,5 g zelenog čaja ekstrahovano sa 180 ml vode 5 minuta na 80°C) (152).

Tabela 4.18 Antioksidantni kapacitet vodeno-etanolnih ekstrakata odabranih vrsta roda *Hypericum* (ABTS^{•+} test)

Ekstrakt	TEAC (mmol Trolox/g ekstrakta)
<i>H. richeri</i>	0,65 ± 0,07
<i>H. perforatum</i>	1,02 ± 0,06
<i>H. barbatum</i>	0,64 ± 0,02
<i>H. hirsutum</i>	1,06 ± 0,08
<i>H. androsaemum</i>	1,36 ± 0,06
<i>H. acutum</i>	1,69 ± 0,09
<i>H. maculatum</i>	0,74 ± 0,06

Prema rezultatima Zheleve-Dimitrove i saradnika, metanolni ekstrakti vrsta *H. barbatum*, dobijeni nakon prethodne ekstrakcije metilenhloridom, u koncentraciji od 10 µg/ml, su takođe pokazali najmanju sposobnost neutralizacije ABTS radikala u odnosu na aktivnost ekstrakata vrsta *H. perforatum*, *H. maculatum* i *H. richeri* (100). U

dostupnoj literaturi nema podataka o sličnom ispitivanju ostalih odabranih vrsta roda *Hypericum*.

Ispitivanje sposobnosti neutralizacije superoksid radikal anjona

Za razliku od DPPH[•] i ABTS^{•+}, superoksid anjon radikal je reaktivna kiseonična vrsta koja se može naći u biološkim sistemima. Od superoksid radikala Fentonovom reakcijom lako nastaju još reaktivnije kiseonične vrste, kao što su singletni kiseonik, hidroksilni radikal i vodonik-peroksid, koji dalje iniciraju lipidnu peroksidaciju (153) i oštećuju ugljene hidrate, proteine i DNK (154).

Sposobnost ispitivanih ekstrakata da neutrališu superoksid anjon radikal izražena je preko koncentracija ekstrakata koje neutrališu 50% ovog radikala (EC₅₀ vrednosti) nastalog prenosom elektrona sa NADH na kiseonik prisutan u vodenom sistemu. Najveću aktivnost pokazali su ekstrakti vrsta *H. androsaemum* (EC₅₀ = 125 µg/ml) i *H. acutum* (EC₅₀ = 177 µg/ml) (Tabela 4.19). Zatim slede ekstrakti vrsta *H. hirsutum*, *H. maculatum* i *H. richeri*. Ekstrakti vrsta *H. perforatum* i *H. barbatum* pri maksimalnim ispitivanim koncentracijama nisu dostigli EC₅₀.

Tabela 4.19 Sposobnost vodeno-etanolnih ekstrakata odabranih vrsta roda *Hypericum* da neutrališu superoksid anjon radikal

Ekstrakt	EC ₅₀ (µg/ml)
<i>H. richeri</i>	249 ± 8
<i>H. perforatum</i>	n.d. ^a
<i>H. barbatum</i>	n.d.
<i>H. hirsutum</i>	183 ± 6
<i>H. androsaemum</i>	125 ± 4
<i>H. acutum</i>	177 ± 5
<i>H. maculatum</i>	243 ± 8

^a Nije dostignuta EC₅₀

Visoka sposobnost neutralizacije superoksid anjon radikala vrste *H. androsaemum*, koja je u nivou aktivnosti liofilizovanog vodenog ekstrakta zelenog čaja $EC_{50} = 164,8 \mu\text{g/ml}$ (150), potvrđena je i u istraživanjima drugih autora. Prema rezultatima Almeida i saradnika, za liofilizovani 40% etanolni ekstrakt ove vrste određena je EC_{50} vrednost od $32,7 \mu\text{g/ml}$ (65), dok je za liofilizovani vodeni ekstrakt dobijen kuvanjem, ta vrednost bila $25,6 \mu\text{g/ml}$ (66). Zou i saradnici su ispitivali sposobnost neutralizacije superoksid anjon radikala za komercijalni ekstrakt vrste *H. perforatum*, koji je naknadnim prečišćavanjem na koloni nejonske smole obogaćen flavonoidima, i pokazali njegovu umerenu aktivnost merenu ovim testom (155). Takođe su, ovu vrstu aktivnosti ispitivali i Orčić i saradnici za frakcije metanolnog ekstrakta vrste *H. perforatum*. Frakcije, u kojima je određen najveći sadržaj biflavonoida, naftodiantrona i floroglucinola i najmanji sadržaj flavonoida i fenolkarbonskih kiselina, su ispoljile i najslabiju sposobnost neutralizacije superoksid anjon radikala (149).

Ispitivanje sposobnosti inhibicije lipidne peroksidacije

U biološkim sistemima, lipidna peroksidacija obuhvata oksidativnu degradaciju polinezasićenih masnih kiselina u ćelijskim membranama, gde ključnu ulogu igra hidroksilni radikal koji u *in vivo* sredini uglavnom nastaje kao proizvod tzv. Fentonove reakcije gde hidroksilni radikal nastaje iz H_2O_2 u prisustvu fero soli (156). Nastali lipidni radikal u reakciji sa kiseonikom daje lipidni peroksil radikal koji sa novim molekulom polinezasićene masne kiseline gradi lipidni peroksid. Sposobnost inhibicije lipidne peroksidacije lipozoma određena je spektrofotometrijski, merenjem intenziteta ružičaste boje kompleksa TBA i aldehida nastalih razgradnjom lipidnih peroksida na 532 nm. Oksidacija lipozoma izazvana je redoks sistemom askorbinska kiselina/ FeCl_3 u kome se Fentonovom reakcijom stvaraju hidroksilni radikali. Ispitivanje sposobnosti inhibicije lipidne peroksidacije je u prednosti u odnosu na testove sa DPPH[•] i ABTS^{•+} kod kojih sintetički stabilni azotni radikali nemaju velike sličnosti sa visoko reaktivnim peroksidnim radikalima (157).

Od ispitivanih ekstrakata odabranih vrsta roda *Hypericum*, najveću sposobnost inhibicije lipidne peroksidacije pokazali su ekstrakti vrsta *H. acutum* i *H. maculatum* ($EC_{50} = 26 \mu\text{g/ml}$ i $EC_{50} = 33 \mu\text{g/ml}$) (Tabela 4.20). Po aktivnosti slede ekstrakti vrsta *H. androsaemum*, *H. hirsutum*, *H. perforatum* i *H. richeri* (EC_{50} od 41 do 56 $\mu\text{g/ml}$), dok pri maksimalno testiranoj koncentraciji ekstrakt vrste *H. barbatum* nije dostigao EC_{50} . Svi ekstrakti su pokazali manju aktivnost u poređenju sa liofilizovanim vodenim ekstraktom zelenog čaja (5 g droge ekstrahovano sa 200 ml vode, 20 min na 80°C) čija EC_{50} vrednost je bila 1,94 $\mu\text{g/ml}$ (150).

Tabela 4.20 Sposobnost vodeno-etanolnih ekstrakata odabranih vrsta roda *Hypericum* da inhibiraju proces lipidne peroksidacije

Ekstrakt	EC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
<i>H. richeri</i>	56 ± 3
<i>H. perforatum</i>	53 ± 3
<i>H. barbatum</i>	n.d. ^a
<i>H. hirsutum</i>	48 ± 3
<i>H. androsaemum</i>	41 ± 3
<i>H. acutum</i>	26 ± 2
<i>H. maculatum</i>	33 ± 2
Trolox	$4,5 \pm 0,1$

^a Nije dostignuta EC_{50}

Silva i saradnici su ispitivali sposobnost inhibicije lipidne peroksidacije na izolovanim sinaptozomima pacova, i pokazali da 80% etanolni ekstrakt herbe vrste *H. perforatum* ($EC_{50} = 27,7 \mu\text{g/ml}$) dovodi do značajne inhibicije lipidne peroksidacije (158). Prema dostupnim literaturnim podacima, sposobnost inhibicije lipidne peroksidacije vrsta *H. richeri*, *H. barbatum* i *H. maculatum*, do sada je jedino ispitivana tiocijanatnim testom koji se zasniva na inhibiciji peroksidacije linolenske kiseline. Na osnovu dobijenih rezultata, iako su oni bili nešto slabiji u odnosu na sintetski antioksidans BHT, konstatovano je da metanolni ekstrakti ovih vrsta, dobijeni nakon ekstrakcije metilenhloridom, poseduju značajnu antioksidantnu aktivnost (100). Za

ekstrakt vrste *H. hirsutum* (metanol:aceton=1:1) ispitivana je antioksidantna aktivnost u sistemu β -karoten/linolenska kiselina, pri čemu je rastvor koncentracije 0,1% postigao procenat inhibicije lipidne peroksidacije od 35% (27).

Na osnovu dobijenih rezultata ispitivanja antioksidantne aktivnosti ekstrakata odabranih vrsta roda *Hypericum*, u većini primenjenih testova (ispitivanje ukupne antioksidantne aktivnosti, sposobnosti neutralizacije DPPH radikala i inhibicije lipidne peroksidacije) najveći antioksidantni potencijal pokazali su vodeno-etanolni ekstrakti vrsta *H. acutum* i *H. maculatum*, dok su najmanju aktivnost ispoljili ekstrakti vrsta *H. barbatum*, *H. richeri* i *H. perforatum*. Dobijena aktivnost ekstrakata može se objasniti razlikama u njihovom hemijskom sastavu. Najaktivniji ekstrakti su ujedno bili i najbogatiji fenolima i taninima, dok su najmanje aktivni ekstrakti imali i najmanji sadržaj ovih jedinjenja i najveći sadržaj ukupnih hipericina. U slučaju ABTS⁺⁺ testa i testa neutralizacije superoksid radikala, najaktivniji su bili ekstrakti vrste *H. acutum* i *H. androsaemum*, dok su najslabiju aktivnost i u ovim testovima takođe pokazali ekstrakti vrsta *H. barbatum*, *H. richeri* i *H. perforatum*.

Prema rezultatima Orčića i saradnika, frakcije metanolnog ekstrakta vrste *H. perforatum*, u kojima je određen veći sadržaj fenolnih jedinjenja, flavonoida i fenolkarboksilnih kiselina, su pokazale bolju aktivnost i od sintetskog antioksidansa BHT u FRAP testu, testovima neutralizacije superoksid anjon i DPPH radikala, kao i u testu inhibicije lipidne peroksidacije. Nisku aktivnost u svim testovima (izuzev lipidne peroksidacije) su pokazale frakcije u kojima su dominirali naftodiantroni i biflavonoidi (149). I pored slabe antiradikalske aktivnosti, za biflavonoide je u testu inhibicije lipidne peroksidacije pokazana visoka antioksidantna aktivnost, za razliku od naftodiantrona koji ni u ovom testu nisu pokazali antioksidantnu aktivnost (158).

Ispitivanje antioksidantne aktivnosti metanolnog ekstrakta vrste H. richeri i njegovih frakcija (hloroformske, etilacetatne, n-butanolne i vodene)

Antioksidantne osobine metanolnog ekstrakta vrste *H. richeri* i svih njegovih frakcija (hloroformska, etilacetatna, *n*-butanolna i vodena) dobijenih u procesu izolovanja sekundarnih metabolita, analizirane su ispitivanjem sposobnosti neutralizacije radikal katjona 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske kiseline) (ABTS^{•+}) i superoksid anjon radikala, kao i inhibicije procesa lipidne peroksidacije (Tabele 4.21 - 4.23).

U okviru ABTS^{•+} testa antioksidantni kapacitet metanolnog ekstrakta i njegovih frakcija je izražen kao TEAC vrednost (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity), u jedinicama mmol Trolox/g ekstrakta. Od svih ispitivanih uzoraka, najveći antioksidantni kapacitet je pokazala etilacetatna frakcija sa TEAC vrednošću 2,49 mmol Trolox/g. Po aktivnosti slede *n*-butanolna frakcija i metanolni ekstrakt. Ova činjenica se može objasniti znatno većim sadržajem flavonoida sa izraženim antioksidantnim kapacitetom (kvercetin, kvercitrin, izokvercitrin i hiperozid) (161) u odnosu na ostale ekstrakte (Tabela 4.4). Etilacetatna frakcija ima izrazito veći sadržaj kvercetina (27,49 mg/g) u odnosu na *n*-butanolnu frakciju (1,05 mg/g). Razlika u sadržaju ostalih glikozida kvercetina je manje izražena: sadržaj kvercitrina je veći oko 10 puta, izokvercitrina oko 2, a hiperozida oko 1,5 put. *n*-Butanolna frakcija i pored većeg sadržaja glikozida miricetina (279,75 mg/g) i derivata kafeoilhina kiseline (46,62 mg/g) u odnosu na etilacetatnu frakciju (108,56 mg/g i 22,45 mg/g, redom), ima manji antioksidantni potencijal. Hloroformska i vodena frakcija metanolnog ekstrakta vrste *H. richeri* su pokazale najniže TEAC vrednosti, što je očekivano s obzirom da u ovim ekstraktima pod primenjenim eksperimentalnim uslovima polifenolna jedinjenja nisu detektovana.

Najveću sposobnost neutralizacije superoksid radikala pokazala je etilacetatna frakcija sa EC₅₀ vrednošću 94,6 µg/ml. Hloroformska i vodena frakcija metanolnog ekstrakta vrste *H. richeri* nisu dostigle 50% neutralizacije superoksidnog radikala.

Svi ispitivani uzorci pokazali su sposobnost da inhibiraju lipidnu peroksidaciju, ali je etilacetatna frakcija pokazala najveću aktivnost (EC₅₀ = 27,8 µg/ml). Nasuprot rezultatima post-kolonske HPLC-DPPH derivatizacije (videti sledeće poglavlje), testova sa ABTS^{•+} i superoksidnim radikalom, lipofilna hloroformska frakcija je u testu

inhibicije lipidne peroksidacije skoro dostigla nivo aktivnosti *n*-butanolne frakcije. To se može objasniti činjenicom da su neki antioksidansi prisutni čak i u malim količinama u hloroformskoj frakciji u stanju da lako prodru u membrane lipozoma, gde efikasno sprečavaju lipidnu peroksidaciju. Iako *n*-butanolna frakcija sadrži znatno veću koncentraciju jedinjenja koja imaju osobine antioksidanasa, ona su polarnija, i njihov prodor u membrane lipozoma je ograničen.

Tabela 4.21 Antioksidantni kapacitet metanolnog ekstrakta vrste *H. richeri* i njegovih frakcija (hloroformska, etilacetatna, *n*-butanolna i vodena) - ABTS⁺⁺ test

<i>H. richeri</i>	TEAC (mmol Trolox/g ekstrakta)
MeOH ekstrakt	1,41 ± 0,03
CHCl ₃ frakcija	0,39 ± 0,01
EtOAc frakcija	2,49 ± 0,11
<i>n</i> -BuOH frakcija	1,01 ± 0,03
H ₂ O frakcija	0,65 ± 0,02

Tabela 4.22 Sposobnost metanolnog ekstrakta vrste *H. richeri* i njegovih frakcija (hloroformska, etilacetatna, *n*-butanolna i vodena) da neutrališu superoksid anjon radikal

<i>H. richeri</i>	EC ₅₀ (µg/ml)
MeOH ekstrakt	278,5 ± 7,2
CHCl ₃ frakcija	n.d. ^a
EtOAc frakcija	94,6 ± 3,0
<i>n</i> -BuOH frakcija	195,9 ± 4,4
H ₂ O frakcija	n.d.

^a Nije dostignuta EC₅₀

Tabela 4.23 Sposobnost metanolnog ekstrakta vrste *H. richeri* i njegovih frakcija (hloroformska, etilacetatna, *n*-butanolna i vodena) da inhibiraju proces lipidne peroksidacije

<i>H. richeri</i>	EC ₅₀ (µg/ml)
MeOH ekstrakt	36,3 ± 1,8
CHCl₃ frakcija	59,2 ± 3,5
EtOAc frakcija	27,8 ± 0,6
<i>n</i>-BuOH frakcija	52,2 ± 4,9
H₂O frakcija	81,2 ± 2,2
Trolox	4,5 ± 0,1

Ispitivanje sposobnosti komponenata ekstrakata da neutrališu DPPH radikal pomoću post-kolonske HPLC-DPPH derivatizacije

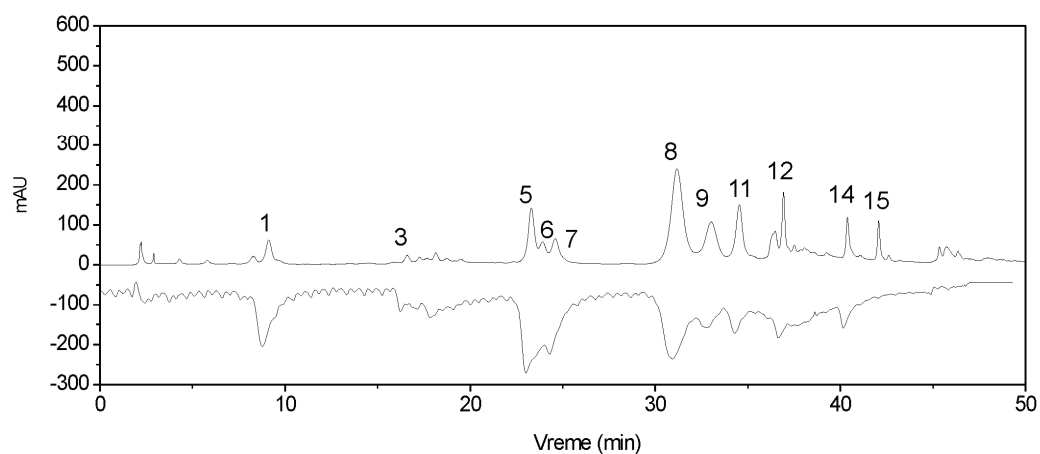
Nakon HPLC-UV detekcije pri analizi pojedinih ekstrakata, eluent je u post-kolonskom reaktoru mešan sa puferisanim rastvorom DPPH radikala. Sposobnost pojedinih jedinjenja da neutrališu DPPH radikal je praćena pomoću još jednog UV detektora koji je pratio slabljenje apsorbanije na 517 nm. Na ovaj način su za sva jedinjenja razdvojena na HPLC koloni simultano beleženi njihovi UV spektri i sposobnost neutralizacije DPPH radikala.

U vodenoj i hloroformskoj frakciji metanolnog ekstrakta vrste *H. richeri* nisu detektovana polifenolna jedinjenja koja mogu neutralisati DPPH radikal, tj. nije primećeno slabljenje apsorbanije na 517 nm. Kod metanolnog ekstrakta, njegove etilacetatne i *n*-butanolne frakcije su primećeni negativni pikovi, usled slabljenja apsorbanije na 517 nm, za sve prisutne derivate hina kiseline, flavonoidne glikozide i kvercetin (Slike 4.24-4.28). Jedino za naftodiantrone (jedinjenja **12** i **13**) i biflavonoid I3,II8-biapigenin (jedinjenje **11**) nije pokazana sposobnost neutralizacije DPPH radikala, što je u skladu sa navodima iz literature (149,158,159).

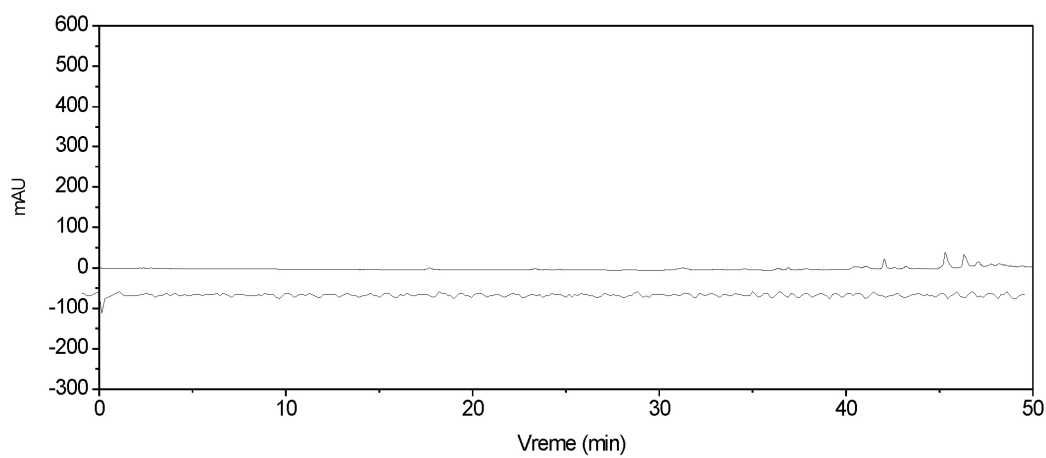
Slično je ustanovljeno i za vodeno-etanolne ekstrakte odabranih *Hypericum* vrsta. Sva identifikovana polifenolna jedinjenja poseduju sposobnost neutralizacije

DPPH radikala, osim biflavonoida I3,II8-biapigenina i naftodiantrona (Slike 4.29-4.35). To je u skladu sa činjenicom da je ekstrakt herbe *H. barbatum*, iako najbogatiji naftodiantronima, pokazao najslabiju sposobnost neutralizacije DPPH radikala utvrđenu spektrofotometrijskim postupkom.

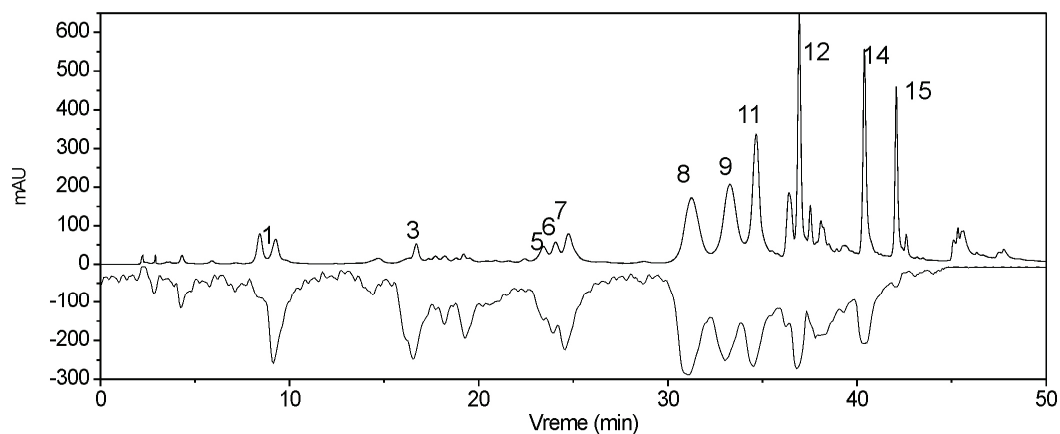
U ovoj doktorskoj disertaciji, prvi put je primenjena post-kolonska HPLC-DPPH derivatizacija za ispitivanje antiradikalske aktivnosti odabranih vrsta roda *Hypericum*, izuzev za vrstu *H. perforatum*. Gioti i saradnici su na osnovu rezultata post-kolonske HPLC-DPPH derivatizacije metanolnog ekstrakta cveta *H. perforatum*, takođe pokazali sposobnost neutralizacije DPPH radikala za derivate hina kiseline, rutin, hiperozid, izokvercitrin i kvercetin (160).



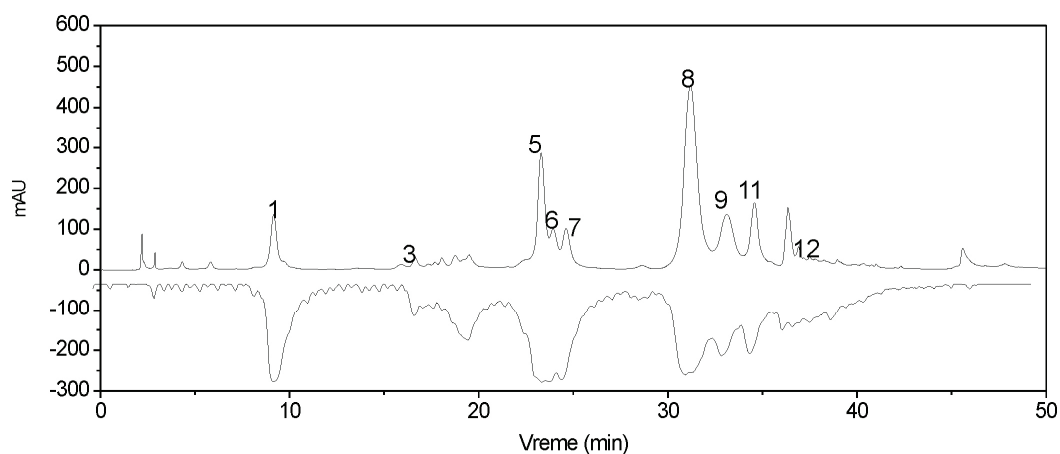
Slika 4.24 Post-kolonska HPLC-DPPH derivatizacija metanolnog ekstrakta vrste *H. richeri*



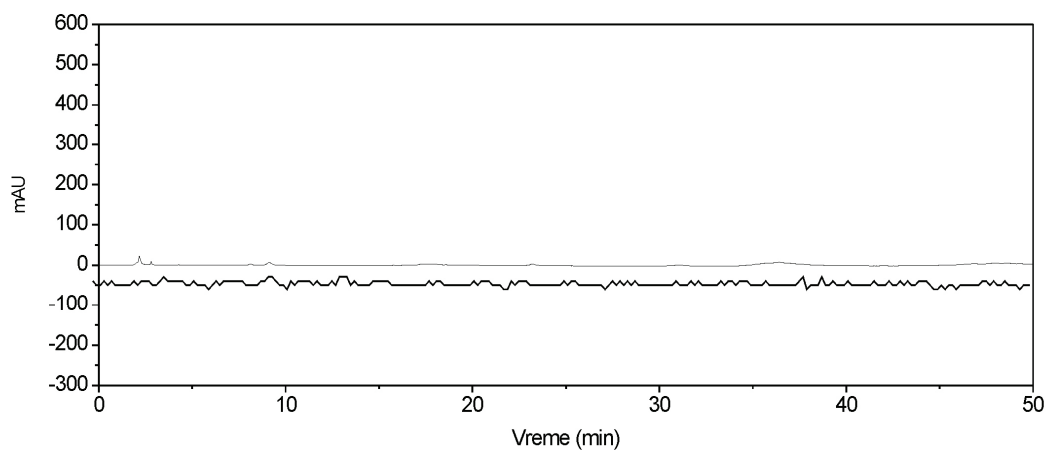
Slika 4.25 Post-kolonska HPLC-DPPH derivatizacija hloroformske frakcije metanolnog ekstrakta vrste *H. richeri*



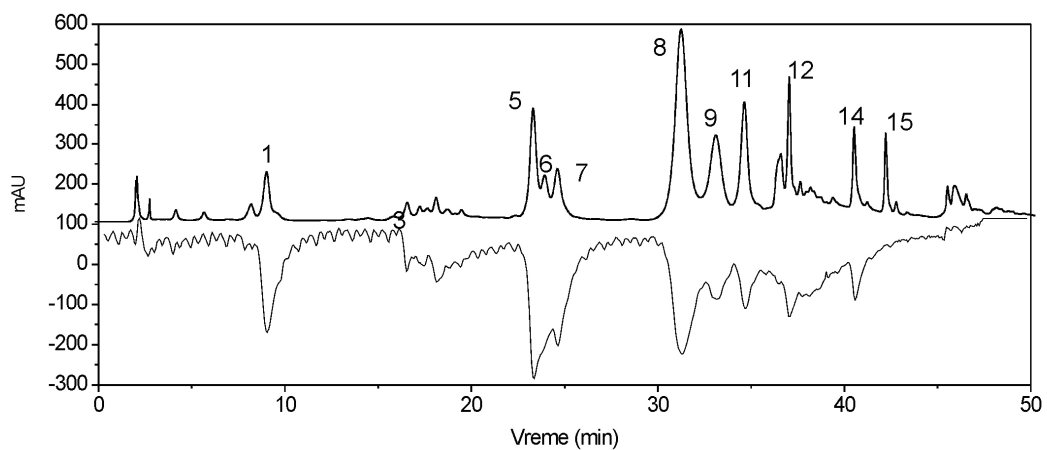
Slika 4.26 Post-kolonska HPLC-DPPH derivatizacija etilacetatne frakcije metanolnog ekstrakta vrste *H. richeri*



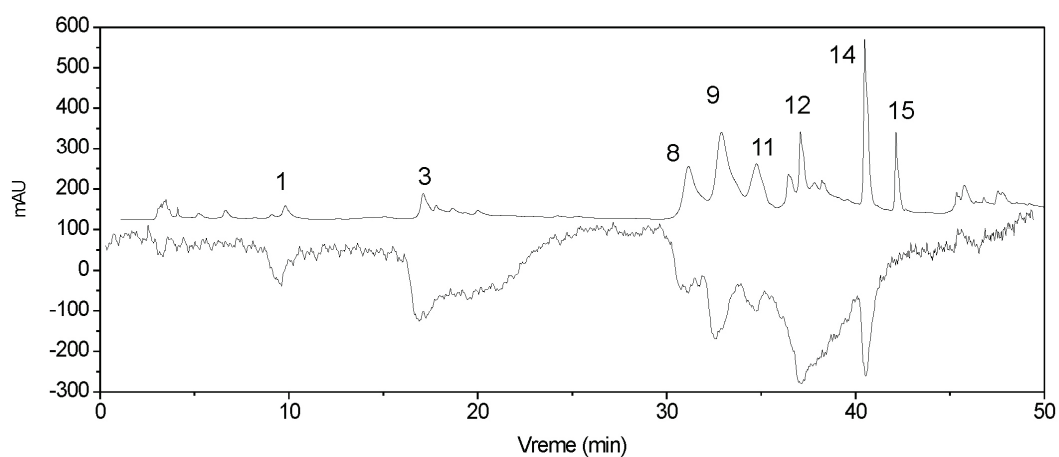
Slika 4.27 Post-kolonska HPLC-DPPH derivatizacija *n*-butanolne frakcije metanolnog ekstrakta vrste *H. richeri*



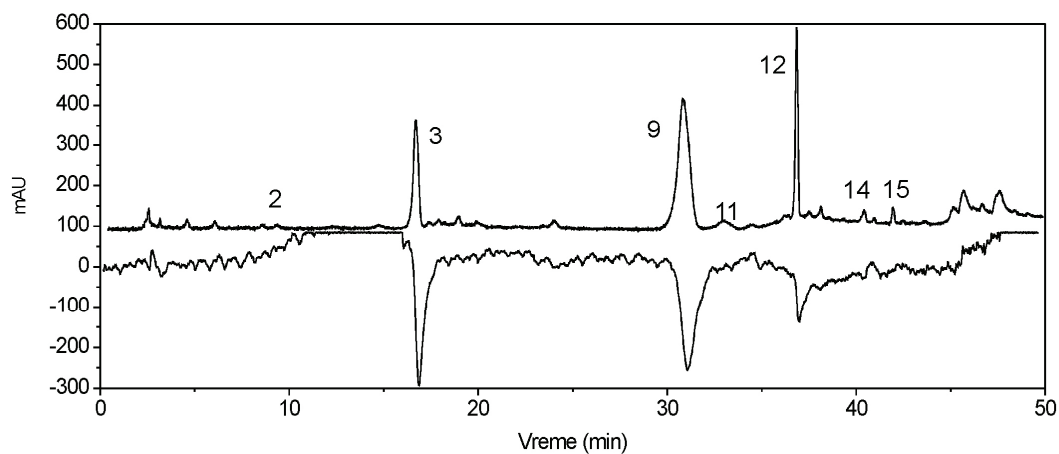
Slika 4.28 Post-kolonska HPLC-DPPH derivatizacija vodene frakcije metanolnog ekstrakta vrste *H. richeri*



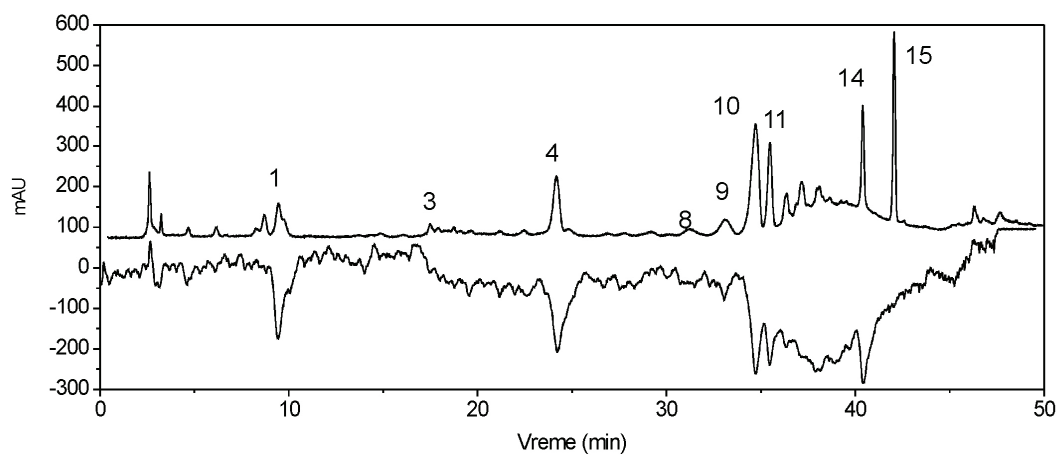
Slika 4.29 Post-kolonska HPLC-DPPH derivatizacija vodeno-etanolnog ekstrakta vrste *H. richeri*



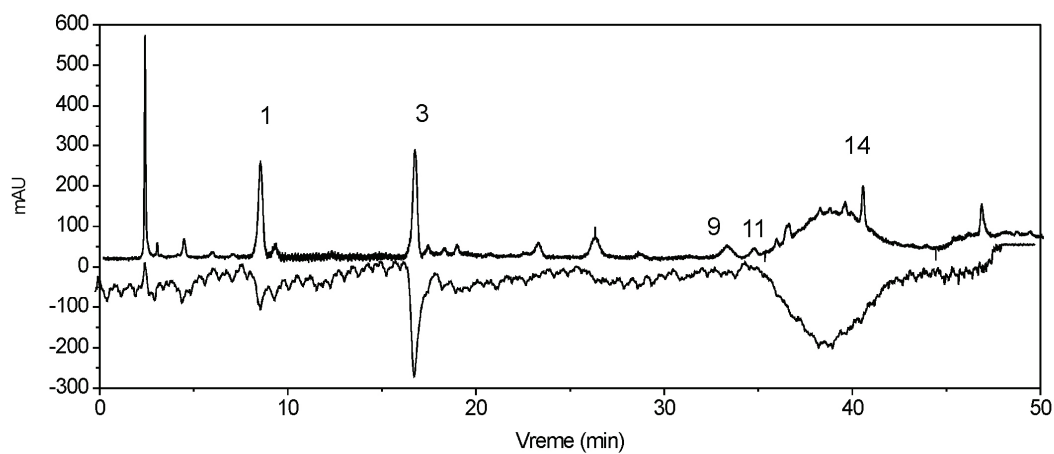
Slika 4.30 Post-kolonska HPLC-DPPH derivatizacija vodeno-etanolnog ekstrakta vrste *H. perforatum*



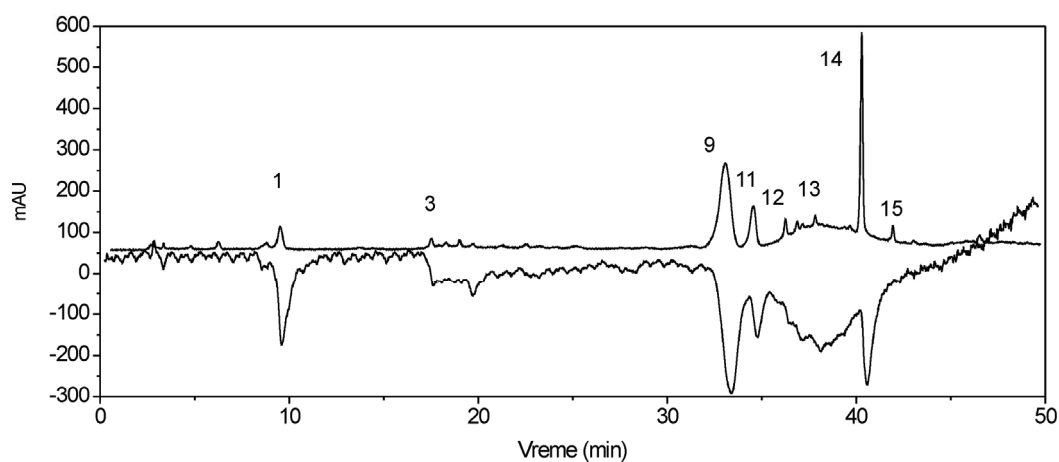
Slika 4.31 Post-kolonska HPLC-DPPH derivatizacija vodeno-etanolnog ekstrakta vrste *H. barbatum*



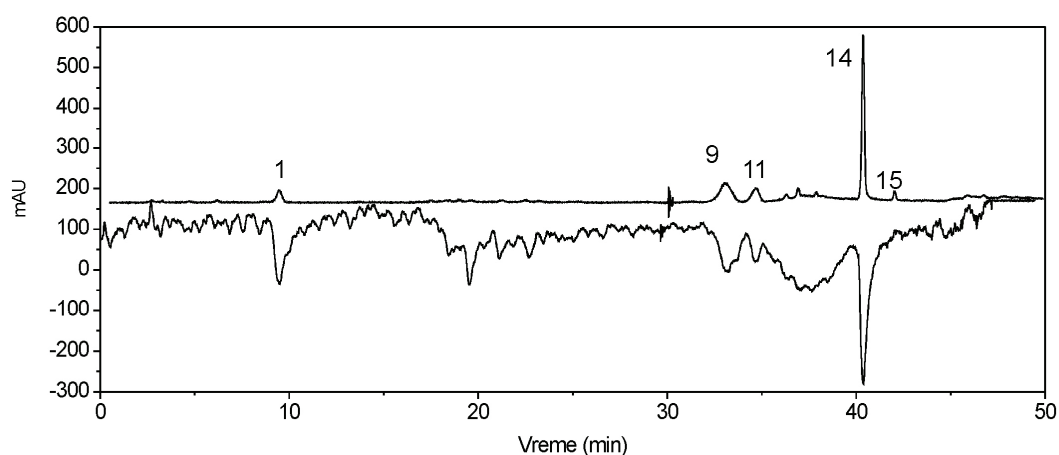
Slika 4.32 Post-kolonska HPLC-DPPH derivatizacija vodeno-etanolnog ekstrakta vrste *H. hirsutum*



Slika 4.33 Post-kolonska HPLC-DPPH derivatizacija vodeno-etanolnog ekstrakta vrste *H. androsaemum*



Slika 4.34 Post-kolonska HPLC-DPPH derivatizacija vodeno-etanolnog ekstrakta vrste *H. acutum*



Slika 4.35 Post-kolonska HPLC-DPPH derivatizacija vodeno-etanolnog ekstrakta vrste *H. maculatum*

Cai i saradnici su ispitivali antioksidantnu aktivnost velikog broja različitih klasa jedinjenja, među kojima i aktivnost fenolnih kiselina, flavonoida, tanina, primenom ABTS i DPPH testova. U grupi flavonoida, najveću antioksidantnu aktivnost, posle epigalokatehin galata i epikatehin galata koji su dominantne komponente čaja, pokazao je kvercetin. TEAC vrednost za kvercetin iznosi 4,42 mM, što je oko dva puta veća

vrednost u odnosu na TEAC vrednosti za njegove glikozide (161). Kvercetin pripada klasi flavonoida koji pored hidroksilne grupe u položaju C-3, sadrži i 3',4'-dihidroksi grupe na B prstenu i koji imaju i 2,3-dvostruku vezu koja je konjugovana sa keto grupom u položaju C-4. Navedene strukturne karakteristike su osnov za izrazitu sposobnost neutralizacije slobodnih radikala (162,163). Glikozilacijom 3-OH grupe dolazi do znatnog smanjenja antioksidantnog kapaciteta ovih molekula (163). Na osnovu prethodno iznetog, najveći sadržaj kvercetina u vodeno-etanolnim ekstraktima vrsta *H. acutum* i *H. maculatum* makar delom doprinosi njihovoj visokoj antioksidantnoj aktivnosti. U skladu sa tim, ekstrakt vrste *H. barbatum* koji je imao i najmanji sadržaj kvercetina pokazao je i najslabiju antioksidantnu aktivnost.

Na isti način se može objasniti i veća antioksidantna aktivnost etilacetatne u odnosu na *n*-butanolnu frakciju i metanolni ekstrakt vrste *H. richeri*. S druge strane, *n*-butanolna frakcija je, u odnosu na etilacetatnu frakciju i metanolni ekstrakt vrste *H. richeri*, znatno bogatija glikozidima miricetina, koji imaju strukturne karakteristike koje bi teoretski trebalo da ukazuju na visoku antioksidantnu aktivnost. Međutim, Cai i saradnici su utvrdili da miricetin pokazuje znatno slabiju sposobnost neutralizacije radikala (TEAC vrednost 1,31 mM) u odnosu na kvercetin, i pored toga što flavonol miricetin ima šest hidroksilnih grupa i *orto*-dihidroksi strukturu (161). Moguće objašnjenje mogla bi da bude visoka osetljivost miricetina na oksidaciju, pri čemu može doći do njegove delimične razgradnje tokom određivanja antioksidantne aktivnosti (164). Sličnu aktivnost pokazuje i 3-*O*-kafeoilhina kiselina (TEAC vrednost 1,56 mM) (161). Sposobnost flavonoida da inhibiraju lipidnu peroksidaciju ispitivali su Silva i saradnici. Najveća antioksidantna aktivnost je određena za kvercetin ($EC_{50} = 0,08 \mu M$), dok su njegovi glikozidi (rutin, hiperozid, izokvercitrin i kvercitrin) i I3,II8-biapigenin pokazali slabije delovanje (158).

4.2.3 Ispitivanje antimikrobne aktivnosti ekstrakata odabranih vrsta roda *Hypericum*

Ispitivanje antimikrobne aktivnosti vodeno-etanolnih ekstrakata odabranih vrsta roda Hypericum

Neracionalna upotreba antibiotika dovela je do pojave rezistencije mnogih bakterijskih sojeva na delovanje lekova, zbog čega su ispitivanje i pronalazak novih jedinjenja sa antimikrobnim delovanjem jedna od značajnih istraživačkih oblasti. Iako su najvažniji izvori antibiotika plesni i bakterije, lekovite biljne vrste takođe sadrže veliki broj raznovrsnih sekundarnih metabolita sa antimikrobnim delovanjem (165). Prema literaturnim podacima, ova aktivnost je prethodno detaljno ispitivana samo za vrstu *H. perforatum* (166,167), dok su ostale odabrane vrste ovog roda slabo, ili nisu uopšte, proučavane u pogledu ove aktivnosti (67).

Antimikrobno delovanje vodeno-etanolnih ekstrakata herbi svih sedam vrsta roda *Hypericum* ispitivano je agar-difuzionom i mikrodilucionom metodom na sedam G (-) bakterija, osam G (+) bakterija i gljivici *Candida albicans*.

Inhibicija rasta testiranih mikroorganizama merena metodom difuzije sa filter diskova kretala se u rasponu od 6 - 24 mm. Najveću antimikrobnu aktivnost pokazao je ekstrakt vrste *H. richeri*, prema bakteriji *L. monocytogenes* (Tabela 4.24). Mikrodilucionom metodom određene su minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) ispitivanih ekstrakata koje inhibiraju vidljivi rast testiranih mikroorganizama (Tabela 4.24). Najveću antimikrobnu aktivnost pokazao je ekstrakt vrste *H. barbatum* (MIC = 0,20-0,30 mg/ml), koji je već pri koncentraciji od 0,20 mg/ml ispoljio inhibitorni efekat na rast *E. coli*, *S. enteritidis*, *P. mirabilis*, *E. cloacae* i *M. flavus*. Sa povećanjem koncentracije ekstrakta vrste *H. barbatum* zabeležena je inhibicija rasta svih ispitivanih mikroorganizama. Najveću antifungalnu aktivnost prema gljivici *C. albicans* ispoljili su ekstrakti vrsta *H. barbatum* i *H. perforatum* (MIC vrednost za oba ekstrakta je bila 0,30 mg/ml).

Iako postoji veliki broj podataka o antimikrobnoj aktivnosti polifenolnih jedinjenja (tanini, flavonoidi, fenolkarboksilne kiseline) (168,169), koja su u najvećoj

meri zastupljena u vrstama roda *Hypericum*, i druga jedinjenja prisutna u malim koncentracijama značajno doprinose njihovoj antimikrobnoj aktivnosti (170). Tako je npr. dobro dokumentovano antifungalno i antibakterijsko delovanje derivata floroglucinola (166,169,171). Takođe, prema rezultatima Maleša i saradnika, podvrsta vrste *H. perforatum*, *H. perforatum* subsp. *angustifolium*, koja ima manji sadržaj flavonoida, tanina i fenolkarboksilnih kiselina, ali veći sadržaj hipericina, ima izraženije antimikrobno delovanje na ispitivane bakterijske sojeve *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. faecalis* i *B. subtilis* (172). Avato i saradnici su takođe pokazali da hipericin, kao jedna od komponenata različitih tipova ekstrakata vrste *H. perforatum*, ispoljava antimikrobno delovanje (173). Na osnovu prethodno iznetog, dobijena najveća antimikrobna aktivnost ekstrakta vrste *H. barbatum* i pored najmanjeg sadržaja ukupnih fenola i tanina, može se objasniti činjenicom da je ovaj ekstrakt imao i najveći sadržaj naftodiantronskih sastojaka. Nešto slabiju i međusobno sličnu aktivnost pokazali su ekstrakti vrsta *H. perforatum* i *H. richeri*, na čije su delovanje bili najosetljiviji sojevi *E. coli*, *S. enteritidis*, *P. mirabilis*, *E. faecalis* i *M. flavus*. Dodatno je ekstrakt vrste *H. perforatum* bio aktivan i u odnosu na *S. typhimurium* i *L. monocytogenes* (MIC vrednost za oba soja je bila 0,25 mg/ml, što je ujedno i najniža MIC vrednost u poređenju sa dobijenim vrednostima za ostale ekstrakte). Po aktivnosti zatim slede ekstrakti vrsta *H. androsaemum*, *H. acutum* i *H. maculatum* koji su takođe pokazali međusobno slično delovanje. Ekstrakt vrste *H. hirsutum* ni u jednoj od ispitivanih koncentracija nije inhibirao rast testiranih mikroorganizama (MIC > 0,50 mg/ml). Ispitivani ekstrakti odabranih vrsta roda *Hypericum* su ispoljili isti ili čak nešto jači antimikrobni efekat prema G (-) u odnosu na G (+) bakterije. Od G (-) bakterija najosetljiviji na delovanje ispitivanih ekstrakata bili su sojevi *E. coli* i *S. enteritidis*, dok je od G (+) bakterija najosetljiviji bio soj *B. subtilis*. Radulović i saradnici su agar-difuzionom metodom ispitivali antimikrobnu aktivnost metanolnih ekstrakata različitih vrsta roda *Hypericum*, među kojima i ekstrakata vrsta *H. richeri*, *H. perforatum*, *H. barbatum* i *H. hirsutum*, i takođe konstatovali da su ekstrakti pokazali istu ili veću aktivnost prema G (-) u odnosu na G (+) bakterije (67).

Iako su uglavnom G (+) bakterije, zbog različite strukture ćelijskog zida ili razvijenog zaštitnog mehanizma membranske akumulacije, osetljivije na delovanje antimikrobnih agenasa u odnosu na G (-) bakterije (166,173,174),(175), detektovana

visoka antimikrobna aktivnost ispitivanih ekstrakata prema G (-) bakterijama, naročito prema *E. coli*, se može javiti zahvaljujući postojanju porina u spoljašnjoj membrani ove grupe bakterija (176). Porini su proteini koji u membrani formiraju velike pore ispunjene vodom koje se ponašaju kao kanali putem koji se vrši razmena većine tečnosti između spoljašnje i unutrašnje sredine. Karakteriše ih specifična raspodela naelektrisanja zbog prisustva aminokiselina u unutrašnjem delu kanala, tako da naspraman raspored negativnog i pozitivnog naelektrisanja stvara elektrostatičko polje. Tako npr. kvercetin može da omogući ulazak drugih flavonoida u unutrašnjost bakterije neutralizacijom naelektrisanja aminokiselina i pojača antimikrobni efekat (177). Neki drugi porini su specijalizovani za prenos oligomernih šećera ili nukleozida. Pokazano je da šećerna komponenta molekula može delimično da se ugradi u strukturu kanala. Na ovaj način deluje rutin, koji pojedinačno testiran ne pokazuje antimikrobnu aktivnost, ali u smeši drugih flavonoida, on pospešuje njihovu difuziju usled prisustva glikozidnog dela (177). Iz ovoga se može zaključiti da flavonoidi prisutni u ekstraktu, čak iako kao pojedinačne komponente ne ispoljavaju antimikrobno delovanje, ako se nalaze u smeši sa drugim aktivnim jedinjenjima, mogu dovesti do pojave sinergističnog efekta.

Pokazana antimikrobna aktivnost vodeno-etanolnih ekstrakata odabranih vrsta roda *Hypericum* može biti od značaja sa stanovišta potencijalne kliničke primene, s obzirom da su MIC vrednosti većine ispitivanih ekstrakata (izuzev ekstrakta vrste *H. hirsutum*) bile manje od 1 mg/ml (167).

Tabela 4.24 Antimikrobna aktivnost vodeno-etanolnih ekstrakata odabranih vrsta roda *Hypericum* (zone inhibicije u mm, MIC u mg/ml)

Mikroorganizam ^a	<i>H. richeri</i>		<i>H. perforatum</i>		<i>H. barbatum</i>		<i>H. hirsutum</i>		<i>H. androsaemum</i>		<i>H. acutum</i>		<i>H. maculatum</i>	
	ZI ^b	MIC ^c	ZI	MIC	ZI	MIC	ZI	MIC	ZI	MIC	ZI	MIC	ZI	MIC
<i>E. coli</i>	-	0,20	-	0,20	6	0,20	-	> 0,50	-	0,35	-	0,25	-	0,40
<i>S. typhimurium</i>	-	0,40	-	0,25	-	0,30	-	> 0,50	-	0,40	-	0,40	-	0,45
<i>S. enteritidis</i>	9	0,20	12	0,20	-	0,20	8	> 0,50	-	0,35	10	0,35	8	0,35
<i>P. aeruginosa</i>	10	0,40	11	0,40	18	0,30	12	> 0,50	12	0,40	8	0,40	10	0,45
<i>P. tolaasii</i>	-	0,45	-	0,40	-	0,30	-	> 0,50	-	0,45	-	0,45	-	0,50
<i>P. mirabilis</i>	-	0,20	-	0,30	-	0,20	-	> 0,50	-	0,35	-	0,45	-	0,50
<i>E. cloacae</i>	-	0,50	-	0,35	-	0,20	-	> 0,50	-	0,45	-	0,35	-	0,50
<i>S. aureus</i>	-	0,45	-	0,30	-	0,30	-	> 0,50	-	0,40	-	0,45	-	0,50

^aVrednosti MIC za streptomycin i nistatin su iste kao u Tabeli 4.25; ^bZI-zona inhibicije izražena u mm; ^cMIC-minimalna inhibitorna koncentracija izražena u mg/ml

Tabela 4.24 (nastavak) Antimikrobna aktivnost vodeno-etanolnih ekstrakata odabranih vrsta roda *Hypericum* (zone inhibicije u mm, MIC u mg/ml)

Mikroorganizam ^a	<i>H. richeri</i>		<i>H. perforatum</i>		<i>H. barbatum</i>		<i>H. hirsutum</i>		<i>H. androsaemum</i>		<i>H. acutum</i>		<i>H. maculatum</i>	
	ZI ^a	MIC ^b	ZI	MIC	ZI	MIC	ZI	MIC	ZI	MIC	ZI	MIC	ZI	MIC
<i>S. epidermidis</i>	7	0,45	-	0,40	-	0,30	-	> 0,50	-	0,40	9	0,45	-	0,45
<i>E. faecalis</i>	9	0,20	12	0,25	-	0,30	10	> 0,50	-	0,45	7	0,45	-	0,50
<i>B. subtilis</i>	9	0,30	12	0,30	-	0,30	10	> 0,50	11	0,35	-	0,30	10	0,35
<i>M. luteus</i>	8	0,45	-	0,35	-	0,25	-	> 0,50	-	0,50	-	0,50	-	> 0,50
<i>M. flavus</i>	15	0,30	-	0,25	8	0,20	6	> 0,50	15	0,50	13	0,40	10	0,50
<i>S. lutea</i>	-	0,30	-	0,40	-	0,30	-	> 0,50	-	0,35	-	0,35	-	0,35
<i>L. monocytogenes</i>	24	0,45	13	0,25	7	0,30	-	> 0,50	10	0,45	16	0,45	7	0,45
<i>C. albicans</i>	-	0,35	-	0,35	-	0,30	-	> 0,50	-	0,35	-	0,40	-	0,45

^aVrednosti MIC za streptomycin i nistatin su iste kao u Tabeli 4.25 ^bZI-zona inhibicije izražena u mm; ^cMIC-minimalna inhibitorna koncentracija izražena u mg/ml

Ispitivanje antimikrobne aktivnosti metanolnog ekstrakta vrste H. richeri i njegovih frakcija (hloroformske, etilacetatne, n-butanolne i vodene)

Antimikrobno delovanje metanolnog ekstrakta vrste *H. richeri* i njegovih frakcija (hloroformske, etilacetatne, *n*-butanolne i vodene) ispitivano je agar-difuzionom i mikrodilucionom metodom na sedam G (–) bakterija, osam G (+) bakterija i gljivici *Candida albicans*.

U ispitivanju agar-difuzionom metodom, na delovanje *n*-butanolne frakcije bili su osetljivi svi testirani mikroorganizmi, sa jasnim zonama inhibicije (Tabela 4.25). Sojevi *S. enteritidis*, *S. epidermidis* i *B. subtilis* su pokazali najveću osetljivost (zone inhibicije 17-19 mm). Etilacetatna frakcija je takođe pokazala jaku aktivnost protiv većine mikroorganizama.

U ispitivanju mikrodilucionom metodom najveću aktivnost takođe su ispoljile *n*-butanolna i etilacetatna frakcija (MIC = 0,12-0,13 mg/ml). Po aktivnosti zatim sledi metanolni ekstrakt, dok su hloroformska i vodena frakcija ispoljile najslabije delovanje prema svim testiranim mikroorganizmima. Dobijeni rezultati su u skladu sa rezultatima hemijske analize ovih frakcija. Ispitivani uzorci su pokazali neznatno bolju ili istu antimikrobnu aktivnost prema G (–) bakterijama u odnosu na G (+) bakterije.

Može se zaključiti da *n*-butanolna i etilacetatna frakcija imaju dobar antimikrobni potencijal, s obzirom na to da se njihove MIC vrednosti kreću oko 0,10 mg/ml (178). Ove dve frakcije su na osnovu rezultata HPLC-UV kvantitativne analize imale i najveći sadržaj fenolkarboksilnih kiselina i flavonoida, kao i hipericina i pseudohipericina. Za većinu jedinjenja identifikovanih u ovim frakcijama (rutin, izokvercitrin, kvercitrin, miricetin 3-*O*-rutinozid, kvercetin, I3,II8-biapigenin i hipericin) antimikrobna aktivnost je dobro dokumentovana ranijim ispitivanjima drugih autora (172,177,179,180,181,182,183,184). Antimikrobno delovanje flavonoida zasnovano je na sposobnosti vezivanja za bakterijske adhezine, čime ometaju međusobno povezivanje bakterija ili adheziju bakterija na površinu domaćina (172). Takođe je utvrđeno da flavonoidi mogu da grade komplekse sa ekstracelularnim i rastvorljivim proteinima, ili sa bakterijskim ćelijskim zidom, dok lipofilniji flavonoidi mogu poremetiti strukturu bakterijske membrane (67,185).

Tabela 4.25 Antimikrobna aktivnost metanolnog ekstrakta vrste *H. richeri* i njegovih frakcija (kloroformske, etilacetatne, *n*-butanolne i vodene) (zone inhibicije u mm, MIC u mg/ml)

Mikroorganizam	Uzorci <i>H. richeri</i>											
	<i>n</i> -BuOH		CHCl ₃		H ₂ O		EtOAc		MeOH		Streptomycin	Nistatin
	ZI ^a	MIC ^b	ZI	MIC	ZI	MIC	ZI	MIC	ZI	MIC	MIC	MIC
<i>E. coli</i>	10	0,12	-	0,21	8	0,29	-	0,12	9	0,13	0,005	-
<i>S. typhimurium</i>	7	0,12	-	0,21	-	0,27	-	0,12	-	0,13	0,038	-
<i>S. enteritidis</i>	17	0,12	8	0,21	8	0,29	-	0,12	8	0,13	0,038	-
<i>P. aeruginosa</i>	-	0,12	-	0,21	-	0,29	-	0,12	-	0,13	0,016	-
<i>P. tolaasii</i>	7	0,13	-	0,21	8	0,29	-	0,12	-	0,15	0,027	-
<i>P. mirabilis</i>	13	0,12	10	0,24	20	0,27	-	0,12	-	0,15	0,005	-
<i>E. cloacae</i>	13	0,12	7	0,21	8	0,27	11	0,12	8	0,13	0,038	-
<i>S. aureus</i>	8	0,13	-	0,24	-	0,24	9	0,13	-	0,15	0,005	-

^aZI-zona inhibicije izražena u mm; ^b MIC-minimalna inhibitorna koncentracija izražena u mg/ml

Tabela 4.25 (nastavak) Antimikrobna aktivnost metanolnog ekstrakta vrste *H. richeri* i njegovih frakcija (hlороformske, etilacetatne, *n*-butanolne i vodene) (zone inhibicije u mm, MIC u mg/ml)

Mikroorganizam	Uzorci <i>H. richeri</i>											
	<i>n</i> -BuOH		CHCl ₃		H ₂ O		EtOAc		MeOH		Streptomycin	Nistatin
	ZI ^a	MIC ^b	ZI	MIC	ZI	MIC	ZI	MIC	ZI	MIC	MIC	MIC
<i>S. epidermidis</i>	17	0,12	-	0,24	-	0,27	16	0,12	-	0,15	0,005	-
<i>E. faecalis</i>	11	0,12	-	0,24	7	0,24	16	0,12	8	0,15	0,027	-
<i>B. subtilis</i>	19	0,12	7	0,21	7	0,27	8	0,12	-	0,15	0,005	-
<i>M. luteus</i>	13	0,12	7	0,24	-	0,27	-	0,12	7	0,15	0,016	-
<i>M. flavus</i>	12	0,12	-	0,24	-	0,27	8	0,12	8	0,15	0,005	-
<i>S. lutea</i>	12	0,12	8	0,24	-	0,27	15	0,13	-	0,16	0,038	-
<i>L. monocytophenes</i>	9	0,12	9	0,24	-	0,27	-	0,13	8	0,16	0,016	-
<i>C. albicans</i>	12	0,12	10	0,20	9	0,18	9	0,12	9	0,13	-	0,005

^aZI-zona inhibicije izražena u mm; MIC^b-minimalna inhibitorna koncentracija izražena u mg/ml

Ispitivanje antimikrobne aktivnosti uljanih ekstrakata vrsta H. richeri i H. perforatum

U narodnoj medicini mnogih zemalja od davnina je poznata upotreba kantarionovog ulja (uljani ekstrakt herbe vrste *H. perforatum*), najčešće za spoljašnju primenu, kao sredstva koje poboljšava zarastanje rana od opekotina i povreda i ublažava tegobe koje prate hemoroide i mialgije (44,45,46,47,48,49). U skladu sa najnovijom zakonskom regulativom danas je priznata upotreba kantarionovog ulja kao tradicionalnog biljnog leka u terapiji manjih zapaljenskih procesa na koži (kao što su opekotine od sunca), kao i pomoćnog sredstva za zarastanje manjih rana (60). U literaturi postoje podaci samo o antimikrobnoj aktivnosti nekih preparata u čiji sastav ulazi uljani ekstrakt vrste *H. perforatum*. Tako su npr. Peeva-Naumovska i saradnici ispitivali delovanje tri masti sa 30%, 40% i 50% kantarionovog ulja za dermalnu ili vaginalnu primenu, na šest bakterijskih sojeva (*Streptococcus pyogenes* - 2 soja, *S. viridans*, *Micrococcus luteus*, *Moraxella catarrhalis* i *Lactobacillus acidophilus*) i pokazali njihovu dozno-zavisnu aktivnost prema svim patogenim bakterijama (ekstrakti nisu delovali jedino prema bakteriji *L. acidophilus* koja je inače normalan stanovnik vaginalne flore) (55).

U okviru ove doktorske disertacije ispitivana je antimikrobna aktivnost uljanih ekstrakata vrsta *H. richeri* i *H. perforatum* mikrodilucionom metodom prema šest G (-) bakterija, četiri G (+) bakterije i gljivici *C. albicans* (Tabele 4.26 i 4.27).

Uljani ekstrakt vrste *H. richeri* pripremljen direktnom ekstrakcijom suve herbe suncokretovim uljem tokom 3 h uz zagrevanje na vodenom kupatilu (postupak III) nije pokazao antimikrobnu aktivnost u testiranom opsegu koncentracija (MIC > 60 µl/ml), dok je odgovarajući ekstrakt vrste *H. perforatum* inhibirao samo rast *C. albicans* u koncentraciji od 55 µl/ml.

Druga dva tipa uljanih ekstrakata dobijenih maceracijom sveže herbe u suncokretovom ulju na direktnoj sunčevoj svetlosti tokom 40 dana (postupak I) i prethodnom maceracijom suve herbe u 96% etanolu tokom 24 h na sobnoj temperaturi, koja se nastavlja ekstrakcijom suncokretovim uljem uz zagrevanje na vodenom kupatilu uz istovremeno uklanjanje etanola (postupak II), pokazala su aktivnost prema svim testiranim mikroorganizmima (MIC = 40 – 60 µl/ml). Aktivnost ova dva tipa uljanih ekstrakata bila je nešto izraženija prema G (-) bakterijama, u odnosu na G (+) bakterije.

Uljani ekstrakti dobijeni postupkom II bili su nešto aktivniji u odnosu na uljane ekstrakte dobijene postupkom I. Uljani ekstrakti vrste *H. perforatum* su pri nešto nižim koncentracijama inhibirali rast svih testiranih mikroorganizama u odnosu na uljane ekstrakte *H. richeri*. Najnižu MIC vrednost postigao je uljani ekstrakt vrste *H. perforatum* dobijen postupkom II u slučaju *C. albicans* (MIC = 40 µl/ml).

Tabela 4.26 Antimikrobna aktivnost uljanih ekstrakata vrste *H. richeri* koji su pripremljeni na tri različita načina prema tradicionalnim recepturama (MIC u µl/ml)

Mikroorganizam ^a	Uljani ekstrakti <i>H. richeri</i> -MIC (µl/ml)		
	Postupak I	Postupak II	Postupak III
<i>E. coli</i>	50	50	> 60
<i>S. typhimurium</i>	55	55	> 60
<i>S. enteritidis</i>	55	55	> 60
<i>P. aeruginosa</i>	55	50	> 60
<i>P. mirabilis</i>	60	55	> 60
<i>E. cloacae</i>	55	55	> 60
<i>S. aureus</i>	60	60	> 60
<i>M. luteus</i>	60	60	> 60
<i>M. flavus</i>	60	55	> 60
<i>L. monocytogenes</i>	60	55	> 60
<i>C. albicans</i>	55	50	> 60

^aVrednosti MIC za streptomycin i nistatin su iste kao u Tabeli 4.25

Tabela 4.27 Antimikrobna aktivnost uljanih ekstrakata vrste *H. perforatum* koji su pripremljeni na tri različita načina prema tradicionalnim recepturama (MIC u $\mu\text{l/ml}$)

Mikroorganizam ^a	Uljani ekstrakti <i>H. perforatum</i> -MIC ($\mu\text{l/ml}$)		
	Postupak I	Postupak II	Postupak III
<i>E. coli</i>	55	55	> 60
<i>S. typhimurium</i>	55	50	> 60
<i>S. enteritidis</i>	57	50	> 60
<i>P. aeruginosa</i>	60	55	> 60
<i>P. mirabilis</i>	60	55	> 60
<i>E. cloacae</i>	60	53	> 60
<i>S. aureus</i>	60	60	> 60
<i>M. luteus</i>	58	60	> 60
<i>M. flavus</i>	60	60	> 60
<i>L. monocytogenes</i>	60	53	> 60
<i>C. albicans</i>	50	40	55

^aVrednosti MIC za streptomycin i nistatin su iste kao u Tabeli 4.25

4.2.4 Ispitivanje antiedematozne aktivnosti uljanih ekstrakata vrsta *H. perforatum* i *H. richeri*

Prema odgovarajućoj monografiji Evropske agencije za lekove, uljani ekstrakt herbe kantariona se koristi kao tradicionalni biljni lek u terapiji blažih zapaljenskih procesa na koži (kao što su opekotine od sunca) i kao pomoćno sredstvo za zarastanje manjih rana (60). Kantarionovo ulje se tradicionalno koristi i oralno kod poremećaja varenja, za umirenje preosetljivog želuca i kod ulkusa želuca (44,45,46,186). Međutim, uprkos dugoj tradicionalnoj upotrebi, uljani ekstrakt herbe kantariona je nedovoljno farmakološki proučen, naročito kada je u pitanju oralna primena. Iz ovih razloga, u okviru ove doktorske disertacije pripremljeni su različiti tipovi uljanih ekstrakata vrsta *H. perforatum* i *H. richeri* prema tradicionalnim recepturama za kantarionovo ulje i ispitana njihova antiedematozna i gastroprotektivna aktivnosti posle oralne (*p.o.*) primene u dva nezavisna eksperimenta.

Antiedematozna aktivnost uljanih ekstrakata vrsta *H. perforatum* i *H. richeri* dobijenih različitim postupcima ekstrakcije (postupak I, II i III), kao i izolovanih jedinjenja kvercetina i I3,II8-biapigenina (dve glavne flavonoidne komponente uljanih ekstrakata), prvi put je ispitivana u okviru ove doktorske disertacije na modelu karageninom akutno izazvanog edema šapice pacova. Ekstrakti su primenjeni *p.o.* u dozama od 0,5; 0,75 i 1,25 ml/kg telesne mase pacova. Rastvori kvercetina i I3,II8-biapigenina u suncokretovom ulju primenjeni su u dozi od 8 mg/kg, *p.o.* Kao referentni lek korišćen je indometacin rastvoren u DMSO, takođe u dozi od 8 mg/kg, *p.o.*

Svi testirani uljani ekstrakti pokazali su statistički značajnu ($p < 0,01$) dozno-zavisnu antiedematoznu aktivnost (Tabela 4.28). Izuzetak je bio ekstrakt *H. richeri* dobijen postupkom III, koji samo u najnižoj dozi nije pokazao statistički značajnu aktivnost u poređenju sa kontrolnom grupom koja je dobijala suncokretovo ulje. Zbirno gledano, sva tri tipa ekstrakata vrste *H. perforatum* su pokazala bolju antiedematoznu aktivnost u poređenju sa ekstraktima vrste *H. richeri*. Upoređujući različite tipove ekstrakata, najizraženiji antiedematozni efekat, i kod vrste *H. perforatum* i *H. richeri*, pokazali su ekstrakti dobijeni postupkom II primenjeni u najvećoj dozi od 1,25 ml/kg

(38% i 95%, redom). U slučaju uljanog ekstrakta vrste *H. perforatum*, antiedematozni efekat je bio veći i od antiedematozne aktivnosti indometacina (62%).

Pojedinačne komponente, kvercetin i I3,II8-biapigenin, koje su primenjene u istoj dozi kao i referentni lek indometacin, pokazale su antiedematozni efekat koji je bio nešto slabiji od efekta indometacina (Tabela 4.28). Pelzer i saradnici su proučavali antiinflamatornu aktivnost 30 flavonoida posle intraperitonealne primene, među kojima je bio i kvercetin, i pokazali da on značajno inhibira stvaranje edema šapice miša koji je izazvan karageninom. Efekat kvercetina je bio u nivou efekta koji je pokazao fenilbutazon (187). Morikawa i saradnici su pokazali da kvercetin, lokalno apliciran, deluje na ranu i kasnu fazu inflamatornog odgovora ukazujući na to da ovaj flavonol inhibira funkciju ćelija koje proizvode medijatore zapaljenja (188). Kvercetin takođe smanjuje ekspresiju gena i produkciju faktora TNF- α (189,190). Iako su Graefe i saradnici pokazali da je bioraspoloživost kvercetina niska (191), prema Azumi i saradnicima solubilizacija kvercetina uz pomoć lipida, emulgatora, etanola ili njihove kombinacije omogućava njegovu poboljšanu rastvorljivost u tankom crevu što dovodi do njegove bolje apsorpcije (192). Do sada antiedematozna aktivnost I3,II8-biapigenina nije ispitivana. Za amentoflavon, koji je po strukturi sličan biflavonoid, postoji podatak da deluje antiinflamatorno preko inhibicije aktivacije nuklearnog faktora- κ B (193).

S obzirom da su izolovani flavonoidi kvercetin i I3,II8-biapigenin ispoljili visok antiedematozni efekat koji je bio uporediv sa delovanjem indometacina, kao i da su ekstrakti obe vrste najbogatiji ovim flavonoidima (dobijeni postupkom II) pokazali i najveći antiedematozni efekat, može se pretpostaviti da kvercetin i I3,II8-biapigenin doprinose pokazanom delovanju ekstrakata.

Tabela 4.28 Efekat uljanih ekstrakata vrsta *H. perforatum* i *H. richeri* posle *p.o.* primene na edem šapice pacova koji je akutno izazvan karageninom

Grupe	Doza (ml/kg)	Antiedematozni efekat (%)	
		<i>H. perforatum</i>	<i>H. richeri</i>
Ekstrakt dobijen postupkom I	0,5	47,55 ± 13,43**	14,9 ± 4,2**
	0,75	67,22 ± 17,47**	16,8 ± 7,7**
	1,25	85,71 ± 15,65**	24,7 ± 4,2**
Ekstrakt dobijen postupkom II	0,5	53,50 ± 16,37**	30,7 ± 9,5**
	0,75	74,07 ± 19,14**	35,3 ± 5,8**
	1,25	95,24 ± 11,66**	38,4 ± 7,8**
Ekstrakt dobijen postupkom III	0,5	42,79 ± 13,39**	10,7 ± 3,5
	0,75	60,38 ± 17,82**	21,4 ± 6,4**
	1,25	71,43 ± 18,07**	26,3 ± 7,0**
Indometacin ^a	8	61,90 ± 22,24**	71,5 ± 15,9**
Kvercetin ^a	8	52,38 ± 23,33*	59,0 ± 14,7**
I3,II8-Biapigenin ^a	8	57,14 ± 15,65**	60,9 ± 20,6**

Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost ± S.D. (n=6); ^aDoza referentnog leka i pojedinačnih komponenti izražena je u mg/kg; * p < 0,05 značajno različito u poređenju sa kontrolnom grupom (Mann-Whitney *U* test); ** p < 0,01 značajno različito u poređenju sa kontrolnom grupom (Mann-Whitney *U* test)

4.2.5 Ispitivanje gastroprotektivne aktivnosti uljanih ekstrakata vrsta *H. perforatum* i *H. richeri*

Gastroprotektivna aktivnost uljanih ekstrakata vrsta *H. perforatum* i *H. richeri* dobijenih različitim postupcima ekstrakcije (postupak I, II i III), kao i kvercetina i I3,II8-biapigenina, je ispitivana na eksperimentalnom modelu akutnog ulkusa pacova. Prema dostupnoj literaturi, ova istraživanja do sada nisu bila sprovedena. Svi ekstrakti su primenjeni *p.o.* u dozama od 0,5; 0,75 i 1,25 ml/kg telesne mase pacova. Kao referentni lek korišćen je ranitidin, u dozi od 20 mg/kg, *p.o.* Rastvori kvercetina i I3,II8-biapigenina u suncokretovom ulju, primenjeni su u dozi od 8 mg/kg, *p.o.* Ulkus je izazvan *p.o.* primenom indometacina, u dozi od 8 mg/kg, pri čemu se javljaju tipične akutne lezije na sluznici želuca.

Uglavnom su svi testirani uljani ekstrakti pokazali statistički značajan ($p < 0,01$) gastroprotektivni efekat (Tabela 4.29). Izuzetak su ekstrakti obe vrste dobijeni postupcima I i III primenjeni u najmanjoj dozi, kao i ekstrakt vrste *H. perforatum* dobijen postupkom III koji je primenjen u dozi od 0,75 ml/kg. Uljani ekstrakti obe vrste dobijeni postupkom II pokazali su najveću gastroprotektivnu aktivnost (indeks oštećenja zida želuca 0,9 kod vrste *H. richeri*; indeks oštećenja zida želuca 0,2 kod vrste *H. perforatum*). U poređenju sa gastroprotektivnom aktivnošću ranitidina (indeks oštećenja zida želuca 0,5), ekstrakt II vrste *H. perforatum* je imao niži indeks oštećenja želuca. Do značajnog smanjenja oštećenja sluznice želuca došlo je i posle oralne primene kvercetina i I3,II8-biapigenina. Aktivnost ovih flavonoida je bila uporediva sa delovanjem primenjenog referentnog leka. Ekstrakti obe vrste dobijeni postupkom II kod kojih je detektovan najveći sadržaj kvercetina i I3,II8-biapigenina pokazuju i najveću gastroprotektivnu aktivnost. Suncokretovo ulje, koje je korišćeno kao kontrola, nije pokazalo statistički značajan gastroprotektivni efekat.

Tabela 4.29 Gastroprotektivni efekat uljanih ekstrakata vrsta *H. perforatum* i *H. richeri*

Grupe	Doza (ml/kg)	Intenzitet lezija	
		<i>H. perforatum</i>	<i>H. richeri</i>
Kontrola ^a	/	1,5 ± 0,9	3,5 ± 1,2
Ekstrakt dobijen	0,5	1,1 ± 0,5	2,7 ± 1,2
postupkom I	0,75	0,9 ± 0,2*	2,3 ± 1,0*
	1,25	0,4 ± 0,2*	1,8 ± 0,5**
Ekstrakt dobijen	0,5	0,8 ± 0,4*	1,4 ± 0,4*
postupkom II	0,75	0,5 ± 0,3*	1,2 ± 0,5**
	1,25	0,2 ± 0,1*	0,9 ± 0,5**
Ekstrakt dobijen	0,5	1,4 ± 1,1	2,8 ± 0,7
postupkom III	0,75	1,1 ± 0,4	2,7 ± 0,8*
	1,25	0,4 ± 0,2*	2,0 ± 1,0*
Indometacin ^b	8	2,6 ± 1,9	3,8 ± 0,9
Kvercetin ^b	8	0,08 ± 0,01*	0,3 ± 0,2**
I3,II8-Biapigenin ^b	8	0,17 ± 0,09*	0,2 ± 0,2**
Ranitidin ^b	20	0,5 ± 0,3**	0,5 ± 0,3**

Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost ± S.D. (n=6); ^a Suncokretovo ulje, *p.o.*; ^b Doza referentnog leka i pojedinačnih komponenti izražena je u mg/kg; * $p < 0,05$ značajno različito u poređenju sa kontrolnom grupom (Mann-Whitney *U* test); ** $p < 0,01$ značajno različito u poređenju sa kontrolnom grupom (Mann-Whitney *U* test)

ZAKLJUČCI

1. U doktorskoj disertaciji izvršena je hemijska i farmakološka karakterizacija ekstrakata herbi sedam vrsta roda *Hypericum* L. sa teritorije Srbije i Crne Gore: *H. richeri* Vill., *H. perforatum* L., *H. barbatum* Jacq., *H. hirsutum* L., *H. androsaemum* L., *H. acutum* Mnch. i *H. maculatum* Crantz. Posebna pažnja posvećena je ispitivanju vrste *H. richeri*, s obzirom da je, među odabranim, jedna od manje hemijski proučavanih i da je u okviru terenskih istraživanja zabeležena njena upotreba u tradicionalnoj medicini u iste svrhe kao i vrste *H. perforatum*.

2. U okviru preliminarnе hemijske analize, u herbama odabranih vrsta roda *Hypericum* i njihovim vodeno-etanolnim ekstraktima određen je sadržaj ukupnih naftodiantrona, ukupnih fenola i tanina. Uzorci vrste *H. barbatum* bili su najbogatiji naftodiantronima. Po količini slede uzorci vrste *H. perforatum* (u herbi je sadržaj bio oko četiri puta veći od minimalnog koji propisuje Ph. Eur. 7.0 za ovu drogu, dok je ekstrakt bio oko dva puta bogatiji u odnosu na ekstrakt oficinalan u Ph. Eur. 7.0). Sličan sadržaj naftodiantrona određen je u uzorcima vrste *H. richeri*; u uzorcima vrsta *H. maculatum*, *H. acutum* i *H. hirsutum* sadržaj je bio znatno niži, dok u vrsti *H. androsaemum* naftodiantroni nisu detektovani. Uzorci vrsta *H. acutum* i *H. maculatum* bili su najbogatiji ukupnim fenolima i taninima, po količini slede uzorci vrsta *H. hirsutum* i *H. perforatum*, a najmanji sadržaj je detektovan u uzorcima vrsta *H. androsaemum*, *H. richeri* i *H. barbatum*.

3. U cilju izolovanja fenolnih sastojaka iz vrste *H. richeri*, metanolni ekstrakt herbe je suspendovan u vodi i sukcesivno ekstrahovan hloroformom, etilacetatom i *n*-butanolom. Iz etilacetatne i *n*-butanolne frakcije, primenom različitih tehnika kolonske hromatografije, izolovano je devet flavonoida: tri glikozida miricetina (miricetin 3-*O*-rutinozid, miricetin 3-*O*-galaktozid, miricetin 3-*O*-glukozid) i 13,118-biapigenin, koji u ovoj vrsti nisu bili ranije identifikovani, kvercetin i njegovi glikozidi (rutin, hiperozid, izokvercitrin, kvercitrin). Strukture izolovanih jedinjenja utvrđene su na osnovu analize njihovih UV, ¹H NMR i ¹³C NMR spektralnih podataka.

4. U metanolnom ekstraktu herbe *H. richeri*, etilacetatnoj i *n*-butanolnoj frakciji, pomoću LC-UV-MS tehnike, pored prethodno izolovanih jedinjenja, identifikovana su i dva naftodiantrona (pseudohipericin i hipericin) i dve kafeoilhina kiseline (pored 3-*O*-izomera i 5-*O*- izomer koji je prvi put identifikovan u ovoj vrsti). Identifikovana jedinjenja bila su prisutna u svim ispitivanim uzorcima, osim I3,II8-biapigenina koji nije bio prisutan u *n*-butanolnoj frakciji.

5. Kvantitativna analiza metanolnog ekstrakta herbe *H. richeri*, kao i etilacetatne i *n*-butanolne frakcije, izvršena je pomoću HPLC-UV tehnike. Ustanovljeno je da *n*-butanolna frakcija sadrži znatno veće količine polarnijih flavonoida (rutin i miricetin 3-*O*-rutinozid), dok su u etilacetatnoj frakciji bili zastupljeniji flavonoidi manje polarnosti (kvercitrin, kvercetin i I3,II8-biapigenin).

6. Uporedna kvalitativna hemijska analiza vodeno-etanolnih ekstrakata svih ispitivanih vrsta roda *Hypericum* izvršena je LC-UV-MS tehnikom, pri čemu su kao standardi korišćena i jedinjenja prethodno izolovana iz vrste *H. richeri*. U analiziranim ekstraktima identifikovano je ukupno 17 jedinjenja: pored onih prethodno detektovanih u vrsti *H. richeri*, takođe i 4-*O*-kafeoilhina kiselina, flavonoidni *C*-glikozidi - orijentin i njegov 2"-*O*-acetil-derivat, i flavanonolni glikozid astilbin.

7. Od tri identifikovane kafeoilhina kiseline, 3-*O*-izomer nije bio prisutan samo u ekstraktu vrste *H. barbatum*, 5-*O*-izomer samo u ekstraktu vrste *H. maculatum*, dok je 4-*O*-kafeoilhina kiselina detektovana samo u ekstraktu vrste *H. barbatum*. Orijetin i njegov 2"-*O*-acetil derivat bili su prisutni samo u ekstraktu vrste *H. hirsutum*, sva tri glikozida miricetina samo u ekstraktu vrste *H. richeri*, a astilbin samo u ekstraktu vrste *H. acutum*. Hiperozid, izokvercitrin i kvercetin detektovani su u ekstraktima svih ispitivanih vrsta. Rutin je bio prisutan samo u ekstraktima vrsta *H. richeri*, *H. perforatum* i *H. hirsutum*. Kvercitrin nije identifikovan jedino u ekstraktima vrsta *H. hirsutum* i *H. androsaemum*, a I3,II8-biapigenin samo u ekstraktu vrste *H. androsaemum*. Ni LC-UV-MS tehnikom naftodiantroni nisu detektovani u ekstraktu vrste *H. androsaemum*; u ekstraktu vrste *H. hirsutum* identifikovan je samo hipericin, dok su u svim ostalim analiziranim ekstraktima bili prisutni hipericin i pseudohipericin.

LC-UV-MS tehnikom prvi put su identifikovani: u vrsti *H. barbatum* 4-*O*- i 5-*O*-kafeoilhina kiselina i I3,I18-biapigenin; u vrsti *H. hirsutum* 5-*O*-kafeoilhina kiselina, a u vrsti *H. acutum* 5-*O*-kafeoilhina kiselina, I3,I18-biapigenin, izokvercitrin, astilbin, pseudohipericin i hipericin.

8. Kvantitativna analiza vodeno-etanolnih ekstrakata odabranih vrsta roda *Hypericum* izvršena je HPLC-UV tehnikom. Flavonoidima je bio najbogatiji ekstrakt vrste *H. richeri*, pri čemu su miricetin 3-*O*-rutinozid i rutin bili najzastupljeniji. Sledeći po zastupljenosti flavonoida bio je ekstrakt vrste *H. hirsutum* sa najvećim udelom orijentina i njegovog 2"-*O*-acetil derivata. Po sadržaju flavonoida slede ekstrakti vrsta *H. perforatum*, *H. barbatum*, *H. acutum* i *H. maculatum*. U ekstraktima vrsta *H. barbatum* i *H. acutum* dominantan je bio hiperozid, u ekstraktu vrste *H. perforatum* najzastupljeniji su bili rutin i hiperozid, a u ekstraktu vrste *H. maculatum* kvercetin i hiperozid. Ekstrakt vrste *H. androsaemum* se izdvojio po najnižem sadržaju flavonoida, kao i po najvećem sadržaju fenolkarboksilnih kiselina. Sadržaj naftodiantrona bio je najveći u ekstraktima vrsta *H. barbatum*, *H. perforatum* i *H. richeri*. U ekstraktima u kojima su identifikovana oba naftodiantrona, pseudohipericin je bio zastupljeniji od hipericina, što je bilo najizraženije u slučaju ekstrakta vrste *H. richeri*.

9. Pripremljeni su uljani ekstrakti herbi svih sedam vrsta roda *Hypericum* na tri različita načina po tradicionalnim recepturama za uljani ekstrakt herbe kantariona: maceracijom sveže herbe u suncokretovom ulju na direktnoj sunčevoj svetlosti tokom 40 dana; prethodnom maceracijom suve herbe u 96% etanolu, koja se nastavlja ekstrakcijom suncokretovim uljem uz zagrevanje i uklanjanje etanola; i direktnom ekstrakcijom suve herbe suncokretovim uljem uz zagrevanje.

10. Kvalitativna i kvantitativna analiza uljanih ekstrakata izvršena je HPLC-UV tehnikom. U uljanom ekstraktu vrste *H. androsaemum* identifikovan je samo kvercetin, a u svim ostalim ekstraktima pored kvercetina i I3,I18-biapigenin. Ekstrakti dobijeni prethodnom maceracijom suve herbe u etanolu, koja se nastavlja ekstrakcijom suncokretovim uljem uz zagrevanje i uklanjanje etanola, bili su najbogatiji flavonoidima, pri čemu je najveći sadržaj detektovan u ekstraktima vrsta *H. maculatum*,

H. perforatum i *H. richeri*. U svim uljanim ekstraktima, osim u ekstraktu vrste *H. androsaemum*, detektovano je i prisustvo komponenti čiji su UV spektri bili slični UV spektrima hipericina i pseudohipericina, ali čija retenciona vremena nisu odgovarala ovim naftodiantronima. Floroglucinolni derivat hiperforin nije detektovan ni u jednom uljanom ekstraktu.

11. Za vodeno-etanolne ekstrakte svih sedam vrsta roda *Hypericum* ispitivana je sposobnost inhibicije enzima MAO A i MAO B u *in vitro* uslovima. Utvrđena je slaba sposobnost inhibicije ekstrakta herbe *H. perforatum*, što je u skladu sa literaturnim podacima prema kojima se antidepresivno delovanje ovog ekstrakta objašnjava drugim mehanizmima. I za ekstrakte herbi svih ostalih ispitivanih vrsta roda *Hypericum*, koji do sada nisu bili ispitivani u pogledu ove aktivnosti, utvrđena je veoma slaba sposobnost inhibicije enzima MAO ($IC_{50} > 0,30$ mg/ml).

12. Za vodeno-etanolne ekstrakte svih sedam vrsta roda *Hypericum* ispitivana je i sposobnost inhibicije preuzimanja 5-HT u sinaptozomima u *in vitro* uslovima. Ekstrakt herbe *H. perforatum* pokazao je visoku sposobnost inhibicije ($IC_{50} = 6,0$ µg/ml), što je u skladu sa literaturnim podacima prema kojima je ovo jedan od glavnih mehanizama njegovog antidepresivnog delovanja. U slučaju ekstrakata ostalih ispitivanih vrsta roda *Hypericum*, koji do sada nisu bili ispitivani u pogledu ove aktivnosti, sposobnost inhibicije preuzimanja 5-HT je bila izuzetno niska ($IC_{50} = 60,5 - > 1$ mg/ml), što ukazuje da u *in vivo* uslovima koncentracije ovih ekstrakata u plazmi neophodne za ispoljavanje antidepresivnog delovanja ne bi mogle biti dostignute.

13. Antioksidantni potencijal vodeno-etanolnih ekstrakata herbi svih sedam vrsta roda *Hypericum* procenjivan je spektrofotometrijski, na osnovu: sposobnosti redukcije kompleksa Fe^{3+} -tripiridiltriazin (FRAP test), uticaja na inhibiciju lipidne peroksidacije, sposobnosti neutralizacije radikal katjona 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske kiseline) (ABTS^{•+}), superoksid radikal anjona i 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikala. U većini testova najveći antioksidantni potencijal pokazali su ekstrakti vrsta *H. acutum* i *H. maculatum*, za koje je utvrđeno da su i najbogatiji ukupnim fenolima i

taninima. Najmanji antioksidantni potencijal pokazali su ekstrakti vrsta *H. perforatum*, *H. richeri* i *H. barbatum*.

14. Spektrofotometrijski je ispitan i antioksidantni potencijal metanolnog ekstrakta herbe *H. richeri* i svih njegovih frakcija, na osnovu: uticaja na inhibiciju lipidne peroksidacije, neutralizacije ABTS^{•+} i superoksid radikal anjona. Najveću antioksidantnu aktivnost pokazala je etilacetatna frakcija, a najslabiju hloroformska i vodena frakcija.

15. Sposobnost pojedinih sastojaka vodeno-etanolnih ekstrakata herbi svih sedam vrsta roda *Hypericum*, kao i metanolnog ekstrakta herbe *H. richeri* i njegovih frakcija, da neutrališu DPPH radikal prvi put je praćena pomoću post-kolonske HPLC-DPPH derivatizacije, izuzev za vrstu *H. perforatum*. Ustanovljeno je da od svih identifikovanih jedinjenja samo hipericin, pseudohipericin i I3,II8-biapigenin ne pokazuju sposobnost neutralizacije ovog radikala.

16. Antimikrobno delovanje vodeno-etanolnih ekstrakata herbi svih sedam vrsta roda *Hypericum*, kao i metanolnog ekstrakta herbe vrste *H. richeri* i svih njegovih frakcija, ispitivano je agar-difuzionom i mikrodilucionom metodom prema sedam G (-) bakterija, osam G (+) bakterija i gljivici *Candida albicans*. Najveću antimikrobnu aktivnost pokazao je ekstrakt vrste *H. barbatum* (MIC = 0,20-0,30 mg/ml). Po aktivnosti slede ekstrakti vrsta *H. perforatum* i *H. richeri*, a zatim ekstrakti vrsta *H. androsaemum*, *H. acutum* i *H. maculatum*. Ekstrakt vrste *H. hirsutum* ni u jednoj od ispitivanih koncentracija nije inhibirao rast testiranih mikroorganizama. Što se tiče metanolnog ekstrakta vrste *H. richeri* i njegovih frakcija, najveću aktivnost pokazale su *n*-butanolna i etilacetatna frakcija (MIC = 0,12-0,13 mg/ml).

17. Antimikrobna aktivnost uljanih ekstrakata herbi vrsta *H. richeri* i *H. perforatum* određivana je mikrodilucionom metodom prema šest G (-) bakterija, četiri G (+) bakterije i gljivici *C. albicans*. Ekstrakt vrste *H. richeri* pripremljen direktnom ekstrakcijom suve herbe suncokretovim uljem nije pokazao antimikrobnu aktivnost u testiranom opsegu koncentracija (MIC > 60 µl/ml), dok je odgovarajući ekstrakt vrste

H. perforatum inhibirao samo rast *C. albicans* u koncentraciji od 55 μ l/ml. Druga dva tipa uljanih ekstrakata pokazala su aktivnost prema svim testiranim mikroorganizmima (MIC = 40 – 60 μ l/ml), pri čemu je najbolju aktivnost ispoljio ekstrakt vrste *H. perforatum* dobijen prethodnom maceracijom herbe u etanolu, koja se nastavlja ekstrakcijom suncokretovim uljem uz zagrevanje, prema *C. albicans*.

18. Za sva tri tipa uljanih ekstrakata vrsta *H. perforatum* i *H. richeri*, kao i za kvercetin i I3,II8-biapigenin, ispitivana je antiedematozna aktivnost na modelu karageninom akutno izazvanog edema šapice pacova, posle *per os* primene. Svi ekstrakti vrste *H. perforatum* pokazali su bolju antiedematoznu aktivnost u poređenju sa ekstraktima vrste *H. richeri*. U slučaju svake pojedinačne biljne vrste najizraženiji efekat ispoljili su ekstrakti dobijeni prethodnom maceracijom herbe u etanolu, koja se nastavlja ekstrakcijom suncokretovim uljem uz zagrevanje i uklanjanje etanola. Ovaj ekstrakt vrste *H. perforatum* u najvećoj testiranoj dozi (1,25 ml/kg) pokazao je statistički značajno veći antiedematozni efekat u odnosu na referentni lek indometacin (95,24% u odnosu na 61,90%), dok je efekat ovog ekstrakta vrste *H. richeri* bio oko dva puta manji u odnosu na indometacin.

19. Gastroprotektivna aktivnost sva tri tipa uljanih ekstrakata vrsta *H. perforatum* i *H. richeri*, kao i kvercetina i I3,II8-biapigenina, ispitivana je na modelu akutnog ulkusa pacova, posle *per os* primene. I u ovom slučaju ekstrakti vrste *H. perforatum* pokazali su bolju aktivnost u poređenju sa ekstraktima vrste *H. richeri*. Najaktivniji je bio isti tip uljanog ekstrakta, kao i u slučaju ispitivanja antiedematoznog delovanja. Ovaj tip ekstrakta vrste *H. perforatum* je već u dozi od 0,75 ml/kg pokazao delovanje identično delovanju referentnog leka ranitidina (indeks oštećenja zida želuca 0,5). Odgovarajući ekstrakt vrste *H. richeri* u istoj dozi ispoljio je slabije delovanje (indeks oštećenja želuca 0,9).

20. S obzirom da su izolovani flavonoidi kvercetin i I3,II8-biapigenin ispoljili visok antiedematozni i gastroprotektivni efekat koji je bio uporediv sa delovanjem primenjenih referentnih lekova, kao i da su uljani ekstrakti vrsta *H. perforatum* i *H. richeri* najbogatiji ovim flavonoidima pokazali i najveću antiedematoznu i

gastroprotektivnu aktivnost, može se pretpostaviti da kvercetin i I3,II8-biapigenin doprinose pokazanom delovanju ekstrakata.

21. Generalno se može zaključiti da doktorska disertacija daje uvid u detaljan hemijski sastav vodeno-etanolnih ekstrakata herbi sedam vrsta roda *Hypericum*, kao i njihov antioksidantni i antimikrobni potencijal. Uljani ekstrakti herbi svih sedam vrsta roda *Hypericum* definisani su u pogledu sastava i sadržaja flavonoida. Pokazana antiedematozna i gastroprotektivna aktivnost uljanih ekstrakata herbi *H. perforatum* i *H. richeri*, predstavljaju dobru osnovu za dalja istraživanja u cilju opravdanja tradicionalne upotrebe ekstrakta vrste *H. perforatum*, odnosno otvaranja mogućnosti primene ekstrakta vrste *H. richeri* kod različitih inflamatornih stanja i oštećenja želudačne sluzokože.

LITERATURA

1. Takhtajan A. Evolution und Ausbreitung der Blütenpflanzen. Stuttgart: G. Fischer Verlag; 1973.
2. Stjepanović-Veselčić L.: *Hypericaceae*. U: Josifović M. Flora SR Srbije III. Beograd: SANU; 1972.
3. Robson NKB. *Hypericum* L. U: Tutin TG, Heywood VH, Burges NA, Moore DM, Valentine DH, Walters SM, Webb DA. Flora Europaea, Vol. 2. Cambridge: University Press; 1968.
4. Rohlena J. Conspectus florae Montenegrinae. Praha: Preslia; 1941-2.
5. Greuter, W., Burdet, H.M. Long, G. (1986): Med-checklist, Dicotyledones (Convolvulaceae-Labiatae), Jardin botaniques de la Ville de Geneve.
6. Gustafsson MHG, Bittrich V, Stevens PF. Phylogeny of clusiaceae based on *rbcl*. sequences. Int J Plant Sci. 2002; 163:1045-54.
7. Meusel H, Jäger EJ, Rauschert SW, Weiner E. Vergleichende Chorologie der zentraleuropäischen Flora, Karten, Band II. Jena: VEB Fischer; 1978.
8. Metclafe CR, Chalk L. Anatomy of Dicotyledones. London: Oxford at the Clarendon press; 1950.
9. Fox LR, Ribeiro SP, Brown VK, Masters GJ, Clarke IP. Direct and indirect effects of climate change on St John's wort, *Hypericum perforatum* L. (Hypericaceae). Oecologia. 1999; 120:113-22.
10. Maggi F, Ferretti G, Poceschi N, Menghini L, Ricciutelli M. Morphological, histochemical and phytochemical investigation of the genus *Hypericum* of the Central Italy. Fitoterapia. 2004; 75:702-11.
11. Šmelcerović A, Spitteller M. Phytochemical analysis of nine *Hypericum* L. species from Serbia and the FYR Macedonia. Pharmazie. 2006; 61:251-2.
12. Maffi L, Benvenuti S, Fornasiero, R, Baroni Bianchi, A, Melegari, M. Inter-population variability of secondary metabolites in *Hypericum* spp. (Hypericaceae) of the Northern Apennines, Italy. Nord J Bot. 2001, 21:585-93.
13. Maggi F, Cecchini C, Cresci A, Coman MM, Tirillini B, Sagratini G, Papa F, Vittori S. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils

- from several *Hypericum* taxa (Guttiferae) growing in Central Italy (Appennino Umbro-Marchigiano). *Chem Biodiv.* 2010; 7:447-66.
14. Šmelcerović A, Spiteller M, Ligon AP, Šmelcerović Z, Raabe N. Essential oil composition of *Hypericum* L. species from Southeastern Serbia and their chemotaxonomy. *Biochem Syst Ecol.* 2007; 35:99-113.
 15. Bilia AR, Bergonzi MC, Karioti A, Isacchi B. St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.). *Rec Prog Med Plants.* 2010; 28:235-70.
 16. Zhang Y, Liu C, Yu M, Zhang Z, Qi Y, Wang J, Wu G, Li S, Yu J, Hu Y. Application of accelerated solvent extraction coupled with high-performance counter-current chromatography to extraction and online isolation of chemical constituents from *Hypericum perforatum* L. *J Chrom A.* 2011; 1218:2827–34.
 17. Ferrari F, Pasqua G, Monacelli B, Cimino P, Botta B. Xanthenes from calli of *Hypericum perforatum* subsp. *perforatum*. *Nat Prod Res.* 2005; 19:171-6.
 18. Blumenthal M. *The ABC clinical guide to herbs.* Austin: American Botanical Council; 2003.
 19. Ploss O, Petereit F, Nahrstedt A. Procyanidins from the herb of *Hypericum perforatum*. *Pharmazie.* 2001; 56:509-11.
 20. Chatzopoulou PS, Marković T, Radanović D, Koutsos TV, Katsiotis ST. Essential oil composition of Serbian *Hypericum perforatum* local population cultivated in different ecological conditions. *J Essent Oil Bear Plants.* 2009; 12:666-73.
 21. Edita Bagdonaite, Pavol Mártonfi, Miroslav Repčák, Juozas Labokas. Variation in concentrations of major bioactive compounds in *Hypericum perforatum* L. from Lithuania. *Industrial Crops and Products* 2012; 35:302–8.
 22. Greeson JM, Sanford B, Monti DA. St. John's wort (*Hypericum perforatum*): a review of the current pharmacological, toxicological, and clinical literature. *Psychopharmacol.* 2001; 153:402–14.
 23. *European Pharmacopoeia, 3rd Edition.* Strasbourg: Council of Europe; 1997.
 24. *European Pharmacopoeia, 7th Edition.* Strasbourg: Council of Europe; 2011.
 25. Makovets'ka O. Yu. Research on biologically active substances of *Hypericum* L. species. Report VII. Sections *Drosocarpium* Spach., *Oligostema* (Boiss.) Stef., *Thasia* Boiss. and *Crossophyllum* Spach *Farmatsevtichnii Zhurnal.* 2000; 3:53-9.

26. Saroglou V, Marin PD, Rancic A, Veljic M, Skaltsa H. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of six *Hypericum* species from Serbia. *Biochem Syst Ecol.* 2007; 35:146-52.
27. Sagratini G, Ricciutelli M, Vittori S, Oeztuerk N, Oeztuerk Y, Maggi F. Phytochemical and antioxidant analysis of eight *Hypericum* taxa from Central Italy. *Fitoterapia.* 2008; 79:210-3.
28. Šmelcerović A, Zuehlke S, Spiteller M, Raabe N, Oezen T. Phenolic constituents of 17 *Hypericum* species from Turkey. *Biochem Syst Ecol.* 2008; 36:316-9.
29. Umek A, Kreft S, Kartnig T, Heydel B. Quantitative phytochemical analyses of six hypericum species growing in slovenia. *Planta Med.* 1999; 65(4):388-90.
30. Kitanov G, Blinova KF, Akhtardzhiev Kh. Acetylorientin - C-glycosylflavone from *Hypericum hirsutum*. *Khim Prirod Soed.* 1979; 2:154-8.
31. Gudžić BT, Šmelcerović A, Đorđević S, Mimica-Dukić N, Ristić M. Essential oil composition of *Hypericum hirsutum* L. *Flav Fragr J.* 2007; 22:42-3.
32. Valentao P, Dias A, Ferreira M, Silva B, Andrade PB; Bastos ML, Seabra RM. Variability in phenolic composition of *Hypericum androsaemum*. *Nat Prod Res.* 2003; 17:135-40.
33. Seabra RM, Correia AA. Mangiferin and chlorogenic acid from *Hypericum* species. *Planta Med.* 1989; 55:404.
34. Nielsen H, Arends P. Xanthone constituents of *Hypericum androsaemum* L. *J Nat Prod.* 1979; 42:303-6.
35. Morteza-Semnani K, Saeedi M. The essential oil composition of *Hypericum androsaemum* L. leaves and flowers from Iran. *Flav Fragr J.* 2005; 20:332-4.
36. Martonfi P, Repcak M, Zanvit P. Secondary metabolites variation in *Hypericum maculatum* and its relatives. *Biochem Syst Ecol.* 2006; 34:56-9.
37. Bagdonaite E, Janulis V, Ivanauskas L, Labokas J. Between species diversity of *Hypericum perforatum* and *H. maculatum* by the content of bioactive compounds. *Nat Prod Commun.* 2012; 7(2):199-200.
38. Gudžić B, Djoković D, Vajs V, Palić R, Stojanović G. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Hypericum maculatum* Crantz. *Flav Fragr J.* 2002; 17:392-4.

39. Kolodziejski J, Gill S. Flavonoids in species of the genus *Hypericum*. I. Chromatographic analysis of flavones Dissertationes Pharmaceuticae. 1960; 12:311-23.
40. Weber ND, Murray BK, North JA, Wood SG. The antiviral agent hypericin has in vitro activity against HSV-1 through nonspecific association with viral and cellular membranes. Antivir Chem Chemother. 1994; 5:83-90.
41. Schinazi RF, Chung KC, Ramesh Babu J, Oswald BJ, Saalman V, Cannon DL, Eriksson B FH, Nasr M. Anthraquinones as a new class of antiviral agents against human immunodeficiency virus. Antivir Res. 1990; 13:265-72.
42. Dobrić S, Popov V, Runjajić-Antić D. Farmakološka dejstva i terapijska primena kantariona U: Kantarion (*Hypericum perforatum* L.) i druge vrste roda *Hypericum* L. Radanović D, Nastovski T, Menković N. Beograd: Institut za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić“; 2006.
43. Herbal Medicines, 3rd Edition, Chicago: London Pharmaceutical Press; 2007.
44. Blumenthal M. St. John's Wort. U: The Complete German Commission E Monographs, CD-ROM. Austin: American Botanical Council; 1998.
45. Tucakov J. Lečenje biljem. Beograd: Rad; 1996.
46. Weiss RF, Fintelmann V. Herbal Medicines. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2000.
47. Gruenwald J, Brendler T, Jaenicke C. PDR for Herbal Medicines. Montvale: Medical Economics Company; 2004.
48. Wichtl M. Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals. Stuttgart: Medpharm scientific publishers; 2004.
49. WHO Monographs on Selected Plants, Vol 2. Geneva: World Health Organization; 2002.
50. Pahlow M.. Great book of medicinal plants (in croatian). Zagreb: Cankarjeva založba; 1989.
51. Maisenbacher P, Kovar KA. Analysis and stability of *Hyperici oleum*. Planta Med. 1992; 58:351-4.
52. Miraldi E, Biagi M, Giachetti D. Chemical constituents and effects of topical application of Oleum Hyperici on skin sensitivity to simulated sun exposure. Nat Prod Commun. 2006; 1:209-13.

53. Lavagna SM, Secci D, Chimenti P, Bonsignore L, Ottaviani A, Bizzarri B. Efficacy of Hypericum and Calendula oils in the epithelial reconstruction of surgical wounds in childbirth with caesarean section. *Farmaco*. 2001; 56:451-3.
54. Süntar IP, Akkol EK, Yilmazer D, Baykal T, Kirmizibekmez H, Alper M, Yeşilada E. Investigations on the in vivo wound healing potential of *Hypericum perforatum* L. *J Ethnopharmacol*. 2010 ; 127(2):468-77.
55. Peeva-Naumovska V, Panovski N, Grdanovska T, Fredro-Kumbaradži E. Formulation of St.John's Wort Oil Ointment and Evaluation of Its Antibacterial Effect. 2010. http://www.amapseec.org/cmapseec.1/papers/pap_p067.htm
56. British Pharmacopoeia, Volume III. London: British Pharmacopoeia Commission; 2008.
57. American Herbal Pharmacopoeia. Santa Cruz California: Published Monographs; 1997.
58. ESCOP Monographs on the Medicinal Uses of Plant Drugs. Exeter: European Scientific Cooperative on Phytotherapy; 2003.
59. Doc. Ref. EMEA/HMPC/101304/2008. Final: Community herbal monograph on *Hypericum perforatum* L., herba (Well-established use). London: European Medicines Agency; 12 November 2009.
60. Doc. Ref. EMEA/HMPC/745582/2009. Final: Community herbal monograph on *Hypericum perforatum* L., herba (Traditional use). London: European Medicines Agency; 12 November 2009.
61. Doc. Ref. EMEA/HMPC/101303/2008. Assessment report on *Hypericum perforatum* L., herba. London: European Medicines Agency; 12 November 2009.
62. Terapijske smernice za lečenje depresije. Nacionalni vodič. Republička stručna komisija za izradu i implementaciju vodiča u kliničkoj praksi. Beograd: Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu; 2004.
63. Kasper S, Caraci F, Forti B, Drago F, Aguglia E. Efficacy and tolerability of *Hypericum* extract for the treatment of mild to moderate depression. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2010; 20:747-65.
64. Petrović S, Kukić-Marković J, Pavlović-Drobac M. Biljni lekoviti proizvodi: uslovi za bezbednu primenu. *Arhiv za farmaciju*. 2012; 62:119-136.

65. Almeida IF, Fernandes E, Lima JLFC, Costa PC, Bahia MF. *In vitro* protective effect of *Hypericum androsaemum* extract against oxygen and nitrogen reactive species. *Basic Clin Pharmacol*. 2009; 105:222-7.
66. Valentao P, Fernandes E, Carvalho F, Andrade PB, Seabra RM, De Lourdes Bastos M. Antioxidant activity of *Hypericum androsaemum* infusion: scavenging activity against superoxide radical, hydroxyl radical and hypochlorous acid. *Biol Pharm Bull*. 2002; 25:1320-3.
67. Radulovic N, Stankov-Jovanovic V, Stojanovic G, Smelcerovic A, Spiteller M, Asakawa Y. Screening of in vitro antimicrobial and antioxidant activity of nine *Hypericum* species from the Balkans. *Food Chem*. 2007; 103:15-21.
68. Jalali H, Nejad ASM, Ebadi AG, Laey G. Ethnobotany and folk pharmaceutical properties of major trees or shrubs in northeast of Iran. *Asian J Chem*. 2009; 21:5632-8.
69. Shikov A, Makarov VG, Ryzhenkov VE. *Rastitel'nye masla i maslyanye ekstrakty: tehnologiya, standardizatsiya, svoistva*. Moskva: Ryskii vratch; 2004.
70. *European Pharmacopoeia, 6th Edition*. Strasbourg: Council of Europe; 2004.
71. Singleton VL, Rossi JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Viticult*. 1965; 16:144-53.
72. Wagner H, Bladt S. *Plant drug analysis. A thin layer chromatography atlas, second edition*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag; 1996.
73. Holt A, Sharman DF, Baker GB, Palcic MM. A continuous spectrophotometric assay for monoamine oxidase and related enzymes in tissue homogenates. *Anal Biochem*. 1997; 244(2):384-92.
74. Yu PH, Hertz L. Differential expression of type A and type B monoamine oxidase of mouse astrocytes in primary cultures. *J Neurochem*. 1982; 39:1492-5.
75. Vogel GH, Vogel WH. *Drug Discovery and Evaluation – Pharmacological Assays*. New York, Berlin: Springer-Verlag, Heidelberg; 1997.
76. Szöllősi I, Szöllősi V. Total antioxidant power in some species of Labiatae (Adaptation of FRAP method). *Acta Biol Szeged*. 2002; 46:125-7.
77. Cuendet M, Hostetmann K, Potterat O. Iridoid glucosides with free radical scavenging properties from *Fagraea blumei*. *Helv Chim Acta* 1997, 80:1144-52.

78. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med.* 1999; 26:1231-7.
79. Valentao P, Fernandes E, Carvalho F, Andrade PB, Seabra RM, Bastos ML. Antioxidative properties of cardoon (*Cynara cardunculus* L.) infusion against superoxide radical, hydroxyl radical, and hypochlorous acid. *J Agric Food Chem.* 2002; 50:4989-93.
80. Liu F, Ooi VEC, Chang ST. Free radical scavenging activities of mushroom polysaccharide extracts. *Life Sci.* 1997; 60:763-71.
81. Koleva II, Niederlander HA, van Been TA. An on-line HPLC method for detection of radical scavenging compounds in complex mixtures. *Anal Chem.* 2000; 72:2323-8.
82. Verpoorte R, Van Beek TA, Thomassen PHAM, Aandewiel J, Svendsen AB. Screening of antimicrobial activity of some plants belonging to the Apocynaceae and Loganiaceae. *J. Ethnopharmacol.* 1983; 8:287-302
83. Daouk D, Dagher S, Sattout E. Antifungal activity of the essential oil *Origanum syriacum* L. *J Food Protect.* 1995; 58:1147-9.
84. Hanel H, Raether W. A more sophisticated method of determining the fungicidal effect of water-insoluble preparations with a cell harvester, using miconazole as an example. *Mycoses.* 1988; 31:148-54.
85. Oyanagui Y, Sato S. Inhibition by nilvadipine of ischemic and carrageenan paw edema as well as of superoxide radical production from neutrophils and xanthine oxidase. *Arzneimittelforsch Drug Res.* 1991; 41:5.
86. Petrović SD, Dobrić S, Bokonjić D, Niketić M, Garcia-Pineros A, Merfort I. Evaluation of *Tanacetum larvatum* for an anti-inflammatory activity and for the protection against indomethacin-induced ulcerogenesis in rats. *J Ethnopharmacol.* 2003; 87:109-13.
87. Adami E, Marazzi-Uberti E, Turba C. Pharmacological research on gefarnate, a new synthetic isoprenoid with an anti-ulcer action. *Arch Int Pharmacodyn Ther.* 1964; 147:113-45.
88. Kitanov GM. Hypericin and pseudohypericin in some *Hypericum* species. *Biochem Syst Ecol.* 2001; 29:171-8.

89. Kitanov GM. The dynamics and content of hypericins in *Hypericum perforatum* L. and *Hypericum maculatum* Crantz growing in Bulgaria. *Acta Pharm.* 2000; 50:65-8.
90. Girzu-Amblard M, Carnat A, Fraisse D, Carnat AP, Lamaison JL. Flavonoid and dianthranoid levels of the St.-John's-wort flowering tops. *Ann Pharm Fr.* 2000; 58(5):341-5.
91. Ćorović M, Stjepanović L, Nikolić R.; Pavlović S, Živanović, P. Content of hypericin and tannin in various species of *Hypericum* on Tara mountain. *Arhiv za Farmaciju.* 1965; 15(6):439-51.
92. Šavikin K, Dobrić S, Tadić V, Zdunić G. Antiinflammatory activity of ethanol extracts of *Hypericum perforatum* L., *H. barbatum* Jacq., *H. hirsutum* L., *H. richeri* Vill. and *H. androsaemum* L. in rats. *Phytother Res.* 2007; 21(2):176-80.
93. Kosuth J, Smelcerovic A, Borsch T, Zuehlke S, Karppinen K, Spiteller M, Hohtola A, Cellarova E. *Funct. Plant Biol.* 2011; 38:35-43.
94. Crozier A, Jaganath IB, Clifford MN. Phenols, polyphenols and tannins: An overview. U: Crozier A, Clifford M, Ashihara H. *Plant secondary metabolites: occurrence, structure and role in the human diet.* Oxford: Blackwell; 2006.
95. de Pascual-Teresa S, Moreno DA, Garcia-Viguera C. Flavanols and anthocyanins in cardiovascular health: a review of current evidence. *Int J Mol Sci.* 2010; 11:1679-703.
96. Cushnie TP, Lamb AJ. Antimicrobial activity of flavonoids. *Int J Antimicrob Agents.* 2005; 26:343-56.
97. Chu YH, Chang CL, Hsu HF. Flavonoid content of several vegetables and their antioxidant activity. *J Sci Food Agric.* 2000; 80:561-6.
98. Cartea ME, Francisco M, Soengas P, Velasco P. Phenolic Compounds in *Brassica* Vegetables. *Molecules* 2011; 16:251-80.
99. Hernandez MF, Fale PLV, Araejo MEM, Serralheiro MLM. Acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of the water extracts of several *Hypericum* species. *Food Chem.* 2010; 120: 1076-82.
100. Zheleva-Dimitrova D, Nedialkov P, Kitanov G. Radical scavenging and antioxidant activities of methanolic extracts from *Hypericum* species growing in Bulgaria. *Pharmacogn Mag.* 2010; 6(22):74–8.

101. Agrawal PK. Carbon-13 NMR of flavonoids. Amsterdam: Elsevier; 1989.
102. Mabry TJ, Markham KR, Thomas MB. The systematic Identification of Flavonoids. New York: Springer-Verlag; 1970.
103. Baroni Fornasiero R, Maffi L, Benvenuti S, Bianchi A. Morphological and phytochemical features of secretory structures in *Hypericum richeri* (Clusiaceae). Nord J Bot. 2000; 20:427–34.
104. Wurglics M, Schubert-Zsilavecz M. *Hypericum perforatum*: a 'modern' herbal antidepressant: pharmacokinetics of active ingredients. Clin Pharmacokinet. 2006; 45(5):449-68.
105. Butterweek V, Schmidt M. St. John's wort: role of active compounds for its mechanism of action and efficacy. Wien Med Wochenschr. 2007; 13-14:356-61.
106. Nahrstedt A. Antidepressant constituents of *Hypericum perforatum*. U: Chrubasik S, Roufogalis BD. Herbal medicinal products for the treatment of pain. Lismore: South- activern Cross University Press; 2000.
107. Guilhermano LG, Ortiz L, Ferigolo M, Barros HMT. Commercially available *Hypericum perforatum* extracts do not decrease immobility of rats in the forced swimming test. Prog in Neuro-Psychoph. 2004; 28:49-55.
108. Pisani L, Catto M, Leonetti F, Nicolotti O, Stefanachi A, Campagna F, Carotti A. Targeting monoamine oxidases with multipotent ligands: an emerging strategy in the search of new drugs against neurodegenerative diseases. Curr Med Chem. 2011; 18(30):4568-87.
109. Wimbiscus M, Kostenko O, Malone D. MAO inhibitors: risks, benefits, and lore. Cleve Clin J Med. 2010;77(12):859-82.
110. Hauser RA. Early pharmacologic treatment in Parkinson's disease. Am J Manag Care. 2010; 16:S100-7.
111. Thiede HM, Walper A. Inhibition of MAO and COMT by *Hypericum* extracts and hypericin. J Geriatr Psychiatry Neurol. 1994; 7:S54-6.
112. Bladt S, Wagner H. Inhibition of MAO by fractions and constituents of *Hypericum* extract. J Geriatr Psychiatry Neurol. 1994; 7:S57-9.
113. Müller WE, Rolli M, Schäfer C, Hafner U. Effects of *Hypericum* extract (LI 160) in biochemical models of antidepressant activity. Pharmacopsychiatry. 1997; 30:102-7.

114. Suzuki O, Katsumata Y, Oya M, Bladt S, Wagner H. Inhibition of monoamine oxidase by hypericin. *Planta Med.* 1984; 50(3):272-4.
115. Bladt S, Wagner H. Inhibition of MAO by fractions and constituents of *hypericum* extract. *J Geriatr Psychiatry Neurol.* 1994; 7:S57-9.
116. Cott JM. In vitro receptor binding and enzyme inhibition by *Hypericum perforatum* extract. *Pharmacopsychiatry.* 1997;30:108-12.
117. Thiede HM, Walper A. Inhibition of MAO and COMT by hypericum extracts and hypericin. *J Geriatr Psychiatry Neurol.* 1994; 7:S54-6.
118. Jürgenliemk G, Nahrstedt A. Phenolic compounds from *Hypericum perforatum*. *Planta Med.* 2002; 68(1):88-91.
119. Radna grupa za izradu vodiča, rukovodilac Paunović VR. Terapijske smernice za lečenje depresije. Beograd: Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu; 2004.
120. Kocsis JH, Zisook S, Davidson J, Shelton R, Yonkers K, Hellerstein DJ, Rosenbaum J, Halbreich U. Double-blind comparison of sertraline, imipramine, and placebo in the treatment of dysthymia: psychosocial outcomes. *Am J Psychiatry.* 1997; 154(3):390-5.
121. Hirschfeld RM. Efficacy of SSRIs and newer antidepressants in severe depression: comparison with TCAs. *J Clin Psychiatry.* 1999; 60(5):326-35.
122. Nelson JC, Kennedy JS, Pollock BG, Laghrissi-Thode F, Narayan M, Nobler MS, Robin DW, Gergel I, McCafferty J, Roose S. Treatment of major depression with nortriptyline and paroxetine in patients with ischemic heart disease. *Am J Psychiatry.* 1999; 156(7):1024-8.
123. Müller WE, Singer A, Wonnemann M. Hyperforin antidepressant activity by a novel mechanism of action. *Pharmacopsychiatry.* 2001; 34:S98-102.
124. Schulte-Löbber S, Holoubek G, Müller WE, Schubert-Zsilavec M, Wurglics M. Comparison of the synaptosomal uptake inhibition of serotonin by St John's wort products. *J Pharm Pharmacol.* 2004; 56(6):813-8.
125. Müller WE, Singer A, Wonnemann M, Hafner U, Rolli M, Schäfer C. Hyperforin represents the neurotransmitter reuptake inhibiting constituent of *hypericum* extract. *Pharmacopsychiatry.* 1998; 31:16-21..

126. Chatterjee SS, Bhattacharya SK, Wonnemann M, Singer A, Müller WE. Hyperforin as a possible antidepressant component of hypericum extracts. *Life Sci.* 1998; 63(6):499-510.
127. Butterweck V, Winterhoff H, Herkenham M. Hyperforin-containing extracts of St John's wort fail to alter gene transcription in brain areas involved in HPA axis control in a long-term treatment regimen in rats. *Neuropsychopharmacology.* 2003; 28(12):2160-8.
128. Müller WE. Current St John's wort research from mode of action to clinical efficacy. *Pharmacol Res.* 2003; 47:101-9.
129. Singer A, Wonnemann M, Müller WE. Hyperforin, a major antidepressant constituent of St. John's Wort, inhibits serotonin uptake by elevating free intracellular Na⁺. *J Pharmacol Exp Ther.* 1999; 290(3):1363-8.
130. Wonnemann M, Singer A, Siebert B, Müller WE. Evaluation of synaptosomal uptake inhibition of most relevant constituents of St. John's wort. *Pharmacopsychiatry.* 2001; 34:S148-51.
131. Baureithel KH, Büter KB, Engesser A, Burkard W, Schaffner W. Inhibition of benzodiazepine binding in vitro by amentoflavone, a constituent of various species of Hypericum. *Pharm Acta Helv.* 1997; 72(3):153-7.
132. Nielsen M, Frøkjær S, Braestrup C. High affinity of the naturally-occurring biflavonoid, amentoflavon, to brain benzodiazepine receptors in vitro. *Biochem Pharmacol.* 1988; 37(17):3285-7.
133. Butterweck V, Nahrstedt A, Evans J, Hufeisen S, Rauser L, Savage J, Popadak B, Ernsberger P, Roth BL. In vitro receptor screening of pure constituents of St. John's wort reveals novel interactions with a number of GPCRs. *Psychopharmacology.* 2002; 162(2):193-202.
134. Shen S, Callaghan D, Juzwik C, Xiong H, Huang P, Zhang W. ABCG2 reduces ROS-mediated toxicity and inflammation: a potential role in Alzheimer's disease. *J Neurochem.* 2010; 114:1590-604.
135. Mullen W, Marks SC, Crozier A. Evaluation of phenolic compounds in commercial fruit juices and fruit drinks. *J Agric Food Chem.* 2007; 55:3148-57.

136. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med.* 1996; 20(7):933-56.
137. Nakatani N, Kayano S, Kikuzaki H, Sumino K, Katagiri K, Mitani T. Identification, quantitative determination, and antioxidative activities of chlorogenic acid isomers in prune (*Prunus domestica* L.). *J Agric Food Chem.* 2000; 48(11):5512-6.
138. Fukumoto LR, Mazza G. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *J Agric Food Chem.* 2000; 48(8):3597-604.
139. Robak J, Gryglewski RJ. Bioactivity of flavonoids. *Pol J Pharmacol.* 1996; 48(6):555-64.
140. Loughton MJ, Evans PJ, Moroney MA, Hoult JR, Halliwell B. Inhibition of mammalian 5-lipoxygenase and cyclo-oxygenase by flavonoids and phenolic dietary additives. Relationship to antioxidant activity and to iron ion-reducing ability. *Biochem Pharmacol.* 1991; 42(9):1673-81.
141. Marzouk MS, Moharram FA, Haggga EG, Ibrahima MT, BadaryOA. Antioxidant flavonol glycosides from *Schinus molle*. *Phytother Res.* 2006; 20:200–5.
142. Farombi EO, Fakoya A. Free radical scavenging and antigenotoxic activities of natural phenolic compounds in dried flowers of *Hibiscus sabdariffa* L. *Mol Nutr Food Res.* 2005; 49:1120–8.
143. Gerhauser C, Klimo K, Heiss E, Neumann I, Gamal-Eldeen A, Knauff J et al. Mechanism-based in vitro screening of potential cancer chemopreventive agents. *Mutat Res.* 2003; 523/524:163–72.
144. Haenen GRMM, Paquay JBG, Korthouwer REM, Bast A. Peroxynitrite scavenging by flavonoids. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997; 236:591–3.
145. Nakatani N, Kayano S, Kikuzaki H, Sumino K, Katagiri K, Mitani T. Identification, quantitative determination, and antioxidative activities of chlorogenic acid isomers in prune (*Prunus domestica* L.). *J Agric Food Chem,* 2000; 48:5512–6.
146. Cos P, Rajan P, Vedernikova I, Calomme M, Pietres L, Vlietinck AJ et al. In vitro antioxidant profile of phenolic acid derivatives. *Free Radic Res.* 2002; 36:711–6.

147. Zang LY, Cosma G, Gardner H, Castranova V, Vallyathan V. Effect of chlorogenic acid on hydroxyl radical. *Mol Biol Cell*. 2003; 247:205–10.
148. Komes D, Horžić D, Belščak A, Kovačević Ganić K, Vulić I. Green tea preparation and its influence on the content of bioactive compounds. *Food Res Int*. 2010; 43:167–76.
149. Orčić DZ, Mimica-Dukić NM, Francišković MM, Petrović SS, Jovin ED. Antioxidant activity relationship of phenolic compounds in *Hypericum perforatum* L. *Chem Cent J*. 2011; 5:34.
150. Joong Yoon H, Sang Kim C, Young Lee K, Yeul Yang S. Antioxidant activity of *Rubus coreanus* fruit extract: in comparison to green tea extract. *Chonnam Med J*. 2010; 46:148-55.
151. Silva BA, Ferreres F, Malva JO, Dias ACP: Phytochemical and antioxidant characterization of *Hypericum perforatum* alcoholic extracts. *Food Chem*. 2005; 90:157-67.
152. Samaniego-Sanchez C, Inurreta-Salinas Y, Quesada-Granados JJ, Blanca-Herrera R, Villalon-Mir M, Lopez-Garcia de la Serrana H, Lopez Martinez MC. The influence of domestic culinary processes on the Trolox Equivalent Antioxidant Capacity of green tea infusions. *J Food Comp Anal*. 2011; 24:79-86.
153. Dhal MK, Richardson T. Photogenesis of superoxide anion in serum of bovine milk and in model system containing riboflavin and amino acids. *J Dairy Sci*. 1978; 61:400-7.
154. Nabasree D, Bratati D. Antioxidant activity of *Piper betle* L. leaf extract *in vitro*. *Food Chem*. 2004; 88:219-24.
155. Zou Y, Lu Y, Wei D. Antioxidant activity of a flavonoid-rich extract of *Hypericum perforatum* L. *in vitro*. *J Agric Food Chem*. 2004; 52(16):5032-9.
156. Halliwell B, Chirico S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am J Clin Nutr*. 1993; 57:715S-25S.
157. Prior RL, Wu X, Schaich K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J Agric Food Chem*. 2005; 53:4290-302.

158. Silva BA, Malva JO, Dias ACP. St. John's Wort (*Hypericum perforatum*) extracts and isolated phenolic compounds are effective antioxidants in several in vitro models of oxidative stress. *Food Chem* 2008; 110:611-9.
159. Baggett S, Protiva P, Mazzola EP, Yang H, Ressler ET, Basile MJ, Weinstein IB, Kennelly EJ. Bioactive benzophenones from *Garcinia xanthochymus* fruits. *J Nat Prod*. 2005; 68:354-60.
160. Gioti EM, Fiamegos YC, Skalkos DC, Stalikas CD. Antioxidant activity and bioactive components of the aerial parts of *Hypericum perforatum* L. from Epirus, Greece. *Food Chem*. 2009; 117(3):398-404.
161. Cai YZ, Mei Sun, Jie Xing, Luo Q, Corke H. Structure-radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. *Life Sci*. 2006; 78(25):2872-88.
162. Halliwell B, Aeschbach R, Löliger J, Aruoma OI. The characterization of antioxidants. *Food Chem Toxicol*. 1995; 33(7):601-17.
163. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med*. 1996; 20(7):933-56.
164. Burda S, Oleszek W. Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *J Agric Food Chem*. 2001; 49(6):2774-9.
165. Rates SMK Plants as source of drugs. *Toxicon*. 2001; 39:603–13.
166. Reichling J, Weseler A, Saller R. A current review of the antimicrobial activity of *Hypericum perforatum* L. *Pharmacopsychiatry*. 2001; 34:S116-8.
167. Saddiqe Z, Naeem I, Maimoona A. A review of the antibacterial activity of *Hypericum perforatum* L. *J Ethnopharmacol*. 2010; 131(3):511-21.
168. Bombardelli E, Morazzoni P. *Hypericum perforatum*. *Fitoterapia*. 1995; 66:43–58.
169. Rocha L, Marston A, Potterat O, Kaplan MA, Stoeckli-Evans H, Hostettmann K. Antibacterial phloroglucinols and flavonoids from *Hypericum brasiliense*. *Phytochemistry*. 1995; 40(5):1447-52.
170. Dall'Agnol R, Ferraz A, Bernardi AP, Albring D, Nör C, Sarmento L, Lamb L, Hass M, von Poser G, Schapoval EE. Antimicrobial activity of some *Hypericum* species. *Phytomedicine*. 2003; 10(6-7):511-6.

171. Trifunović S, Vajs V, Macura S, Juranić N, Djarmati Z, Jankov R, Milosavljević S. Oxidation products of hyperforin from *Hypericum perforatum*. *Phytochemistry*. 1998; 49(5):1305-10.
172. Maleš Ž, Brantner AH, Sović K, Pilepić KH, Plazibat M. Comparative phytochemical and antimicrobial investigations of *Hypericum perforatum* L. subsp. *perforatum* and *H. perforatum* subsp. *angustifolium* (DC.) Gaudin. *Acta Pharm*. 2006; 56:359-67.
173. Avato P, Raffo F, Guglielmi G, Vitali C, Rosato A. Extracts from St John's Wort and their antimicrobial activity. *Phytother Res*. 2004; 18(3):230-2.
174. Conforti F, Statti GA, Tundis R, Bianchi A, Agrimonti C, Sacchetti G, Andreotti E, Menichini F, Poli F. Comparative chemical composition and variability of biological activity of methanolic extracts from *Hypericum perforatum* L. *Nat Prod Res*. 2005; 19(3):295-303.
175. Adwan K, Abu-Hasan N. Gentamicin resistance in clinical strains of Enterobacteriaceae associated with reduced gentamicin uptake. *Folia Microbiol*. 1998; 43:438-40.
176. Alvarez Mde L, Debattista NB, Pappano NB. Synergism of flavonoids with bacteriostatic action against *Staphylococcus aureus* ATCC 25 923 and *Escherichia coli* ATCC 25 922. *Biocell*. 2006; 30(1):39-42.
177. Alvarez MA, Debattista NB, Pappano NB. Antimicrobial activity and synergism of some substituted flavonoids. *Folia Microbiol*. 2008; 53(1):23-8.
178. Rios JL, Recio MC, Villar A. Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature. *J Ethnopharmacol*. 1988; 23(2-3):127-49.
179. Reece RJ, Maxwell A. DNA gyrase: Structure and function mechanism of DNA topoisomerase II. *Nature*. 1996; 379:225–32.
180. Cecchini C, Cresci A, Coman MM, Ricciutelli M, Sagratini G, Vittori S, Lucarini D, Maggi F. Antimicrobial activity of seven hypericum entities from central Italy. *Planta Med*. 2007; 73(6):564-6.
181. Gaara AH, Nassar MI, Younis M, Elmegeed GA, Mabry TJ Pare PW. Biologically active polyphenolic compounds from *Acacia ehrenbergiana*. *Rev Latinoamer Quím*. 2008; 36(2):52-9.

182. Pistelli L, Bertoli A, Morelli I, Menichini F, Musmanno RA, Di Maggio T, Coratza G. Chemical and antibacterial evaluation of *Hypericum triquetrifolium* Turra. *Phytother Res.* 2005; 19(9):787-91.
183. Liu H, Mou Y, Zhao J, Wang J, Zhou L, Wang M, Wang D, Han J, Yu Z, Yang F. Flavonoids from *Halostachys caspica* and their antimicrobial and antioxidant activities. *Molecules.* 2010; 15(11):7933-45.
184. Neveen Ghaly S, Melek FR, Nayera Abdelwahed AM. Flavonoids from *Albizia chinensis* of Egypt. *Rev Latinoamer Quím.* 2010; 38:153-8.
185. Basile A, Giordano S, Lopez-Saez A, Cobianchi R. Antibacterial activity of pure flavonoids isolated from mosses. *Phytochemistry.* 1999; 52:1479-82.
186. Gostuški R. Lečenje lekovitim biljem. Beograd: Narodna knjiga; 1979.
187. Pelzer LE, Guardia T, Juarez TG, Guerreiro E. Acute and chronic antiinflammatory effects of plant flavonoids. *Farmaco.* 1998; 53:421-4.
188. Morikawa K, Nonako M, Narahara M, Torii I, Kawaguchi K, Yoshikawa T, Kumazawa Y, Morikawa S. Inhibitory effects of quercetin on carrageenan-induced inflammation in rats. *Life Sci.* 2003; 74:709-721.
189. Min YD, Choi CH, Bark H, Son HY, Park HH, Lee S, Park JW, Park EK, Shin HI, Kim SH. Quercetin inhibits expression of inflammatory cytokines through attenuation of NF- κ B and p38 MAPK in HMC-1 human mast cell line. *Inflam Res.* 2007; 56:210-5.
190. Nair MP, Mahajan S, Reynolds JL, Aalinkeel R, Nair H, Schwartz SA, Kandaswami C. The flavonoid quercetin inhibits proinflammatory cytokine (Tumor Necrosis Factor Alpha) gene expression in normal peripheral blood mononuclear cells via modulation of the NF- κ B system. *Clin. Vaccine Immunol.* 2006; 13:319-28.
191. Graefe EU, Derendorf H, Veit M. Pharmacokinetics and bioavailability of the flavanol quercetin in humans. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 1999; 37:219-33.
192. Azuma K, Ippoushi K, Ito H, Higashio H, Terao J. Combination of lipids and emulsifiers enhances the absorption of orally administered quercetin in rats. *J Agric Food Chem.* 2002; 50:1706-12.
193. Woo E, Pokharel YR, Yang JW, Lee SY, Kang KW. Inhibition of nuclear factor κ B activation by 2',8''-biapigenin. *Biol Pharm Bull.* 2006; 29:976-980.

SPISAK PUBLIKOVANIH RADOVA

1. Zdunić G, Gođevac D, Milenković M, Vučićević D, Šavikin K, Menković N, Petrović S. Evaluation of *Hypericum perforatum* oil extracts for an antiinflammatory and gastroprotective activity in rats. *Phytother Res.* 2009; 23:1559-64.
2. Zdunić G, Gođevac D, Milenković M, Šavikin K, Menković N, Petrović S. Anti-inflammatory and gastroprotective properties of *Hypericum richeri* oil extracts. *Nat Prod Commun.* 2010; 5:1215-8.
3. Zdunić G, Gođevac D, Šavikin K, Novaković M, Milosavljević S, Petrović S. Isolation and identification of phenolic compounds from *Hypericum richeri* Vill. and their antioxidant capacity. *Nat Prod Res.* 2011; 25:175-87.

BIOGRAFIJA

Gordana Zdunić rođena je 18.01.1976. god. u Beogradu, gde je i završila osnovnu školu i gimnaziju. Diplomirala je na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu 2002. god. Za diplomski rad pod nazivom „Statini u terapiji hiperlipoproteinemija i koronarne bolesti srca“, koji je urađen u Institutu za farmakologiju, dobitnik je XXXII Krkine nagrade u oktobru 2002. god. Od februara 2003. god. zaposlena je u Institutu za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić“ u Beogradu u okviru Odseka za farmaceutska istraživanja i razvoj, sektor Nauka. Nakon obavljenog pripravničkog staža u Apoteci „Beograd“, stručni ispit za diplomiranog farmaceuta položila je 2004. god. Doktorske akademske studije iz Farmakognozije na Farmaceutskom fakultetu upisala je 2006. god. Od 2003. god. učestvuje u realizaciji većeg broja internih projekata Instituta, kao i na brojnim naučnim i bilateralnim projektima Ministarstva za prosvetu, nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije. Učestvovala je u radu istraživačkog tima u okviru projekta pod nazivom “Prikupljanje i proučavanje genetičkih resursa lekovitog bilja za potrebe Banke biljnih gena Jugoslavije” Saveznog ministarstva za poljoprivredu, kao i projekta “Farmakognozijsko istraživanje samonikle lekovite i aromatične flore mediteranskih i visokoplaninskih regija Crne Gore” koji je sklopljen između Vlade Republike Crne Gore – Sekretarijata za razvoj i Instituta za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić“. Autor je i koautor preko 30 radova u međunarodnim časopisima, od kojih je 5 publikovano u vrhunskim međunarodnim časopisima. Jedan je od koautora poglavlja u knjigama „Materia Medica for various cancers, Evidence-based anticancer complementary and alternative medicine 2” i „Phytochemicals: Occurrence in Nature, Health Effects and Antioxidant Properties”.

Član je Farmaceutskog društva Srbije i međunarodnog društva za proučavanje lekovitih biljaka - Gesellschaft für Arzneipflanzenforschung/Society for Medicinal Plant Research. Govori engleski jezik, a služi se ruskim jezikom.

Изјава о ауторству

Потписани-а Гордана М. Здунић

број индекса 94/06

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Упоредна хемијска анализа и фармаколошки профил екстраката одабраних
врста рода *Hypericum L.*“

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

Потпис докторанда

У Београду, _____

Здунић Г.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Гордана М. Здунић

Број индекса 94/06

Студијски програм Фармакогнозија

Наслов рада „Упоредна хемијска анализа и фармаколошки профил екстраката
одабраних врста рода *Hypericum L.*“

Ментор Проф. др Силвана Петровић, редовни професор,
Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет

Потписани/а Гордана М. Здунић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

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

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

Потпис докторанда

У Београду, _____

Здунић Г.

Изјава о коришћењу

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

„Упоредна хемијска анализа и фармаколошки профил екстраката одабраних
врста рода *Hypericum L.*“

која је моје ауторско дело.

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

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

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

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, _____

Згоран Т.