

UNIVERZITET U BEOGRADU

FARMACEUTSKI FAKULTET

Višnja B. Popović

Analiza sekundarnih metabolita i ispitivanje
farmakološke aktivnosti odabranih vrsta
roda *Laserpitium* L. (Apiaceae)

Doktorska disertacija

Beograd, 2013.

UNIVERZITET U BEOGRADU

FARMACEUTSKI FAKULTET



Višnja B. Popović

Analiza sekundarnih metabolita i ispitivanje
farmakološke aktivnosti odabranih vrsta
roda *Laserpitium* L. (Apiaceae)

Doktorska disertacija

Beograd, 2013.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF PHARMACY



Višnja B. Popović

Analysis of secondary metabolites and
investigation of pharmacological activity of
selected species of the genus
Laserpitium L. (Apiaceae)

Doctoral dissertation

Belgrade, 2013.

Doktorska disertacija je urađena na Katedri za farmakognoziju Univerziteta u Beogradu – Farmaceutskog fakulteta.

Deo eksperimenata je urađen na Katedri za farmakologiju i Katedri za mikrobiologiju i imunologiju Univerziteta u Beogradu – Farmaceutskog fakulteta i u Laboratoriji za farmakognoziju i fitohemiju Fakulteta farmaceutskih nauka Univerziteta u Gentu – Belgija (Laboratory for Pharmacognosy and Phytochemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Ghent University, Belgium).

Mentor

Prof. dr Silvana Petrović,
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Članovi komisije

1. _____
Prof. dr Radica Stepanović-Petrović,
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski
fakultet

2. _____
Prof. dr Marina Milenković
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski
fakultet

3. _____
Dr sc. Marjan Niketić, viši naučni saradnik,
Prirodnjački muzej, Beograd

4. _____
Dr sc. Arne Heyerick, naučni saradnik
Fakultet farmaceutskih nauka, Univerzitet u
Gentu

Datum odbrane _____

Mentoru, prof. dr Silvani Petrović, najsrdačnije zahvaljujem na iskrenom i sveobuhvatnom angažovanju, pomoći, savetima i podršci u toku doktorskih studija i izrade ove doktorske disertacije.

Rukovodiocima projekata, prof. dr Nadi Kovačević i prof. dr Radici Stepanović-Petrović zahvaljujem na poverenju, razumevanju i pruženoj mogućnosti da se uključim u projekte Ministarstva prosvete i nauke Republike Srbije.

Erasmus Mundus Action 2 programu Evropske komisije zahvaljujem na dodeljenoj Basileus stipendiji (№ 1011092) za studijski boravak od 10 meseci u Laboratoriji za farmakognoziju i fitohemiju Fakulteta farmaceutskih nauka Univerziteta u Gentu – Belgija (Laboratory for Pharmacognosy and Phytochemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Ghent University, Belgium).

Dr Arne Heyerick-u zahvaljujem na nesebičnoj pomoći, iskrenoj podršci i razumevanju tokom prijave, samog studijskog boravka i izrade ove doktorske disertacije.

Prof. dr Radici Stepanović-Petrović i njenom timu, doc. dr Maji Tomić i asist. dipl. farm. Ani Micov zahvaljujem na velikoj pomoći i strpljenju prilikom eksperimentalnog rada, kao i vrednim smernicama i savetima u vezi sa testiranjem antinociceptivne i antiedematozne aktivnosti.

Prof. dr Marini Milenković veliku zahvalnost dugujem za stručnu pomoć i savete prilikom eksperimentalnog rada testiranja antimikrobne aktivnosti, ali i iskrenu i prijateljsku pomoć i podršku tokom čitavih doktorskih studija.

Dr Marjanu Niketiću, kustosu prirodnjačkog muzeja, dugujem neizmernu zahvalnost na velikoj pomoći u terenskom prikupljanju biljnog materijala i idejama, smernicama i savetima u ovoj oblasti.

Divnim ljudima dobre volje, Jeleni, Jeleni i bratu Vukašinu, koji su učestvovali u prikupljanju biljnog materijala, dugujem veliku zahvalnost za pomoć, podršku i entuzijazam na terenu.

Takođe bih se zahvalila i prof. dr Dieter Deforce-u, prof. dr Serge Van Calenbergh-u i njegovom timu, kao i MSc. Jan Goeman-u za sredstva i pomoć prilikom rada u njihovim laboratorijama. Doc. dr Milici Pavlović-Drobac i prof. dr Maria Couladis dugujem veliku zahvalnost za pomoć u hemijskoj analizi etarskih ulja. Prof. dr Dragiću Bankoviću se zahvaljujem za veliku pomoć u statističkim proračunima.

Kolektivu Katedre za farmakognoziju, Univerziteta u Beogradu – Farmaceutskog fakulteta, zahvaljujem na velikoj podršci i razumevanju u toku doktorskih studija.

Svojim najmilijima, porodici i prijateljima, zahvaljujem za bezrezervnu i najiskreniju podršku i razumevanje, bez koje sve ovo ne bi bilo ni moguće, a ni važno.

Najveću zahvalnost dugujem osobi koja je jako volela farmakognoziju i koja bi bila neizmerno srećna i ponosna da čita ovaj rad. Disertaciju posvećujem mom najvećem uzoru i anđelu čuvaru, majci Milici.

Analiza sekundarnih metabolita i ispitivanje farmakološke aktivnosti odabranih vrsta roda *Laserpitium* L. (Apiaceae)

Rezime

Predmet doktorske disertacije je analiza sekundarnih metabolita i ispitivanje farmakološke aktivnosti hloroformskih i metanolnih ekstrakata i etarskih ulja tri vrste roda *Laserpitium* L. (Apiaceae): *Laserpitium latifolium* L., *Laserpitium zernyi* Hayek i *Laserpitium ochridanum* Micevski.

Laserpitium latifolium je višegodišnja biljka, koja je široko rasprostranjena na evropskom kontinentu. *Laserpitium zernyi* je skardo-pindska endemična vrsta, sa prirodnim staništem na prostorima Srbije (Kosovo), Albanije, Makedonije i Grčke. Ranije je smatrana podvrstom *Laserpitium siler* L., subsp. *zernyi* (Hayek) Tutin. *Laserpitium ochridanum* je stenoendemit planine Galičice u Makedoniji.

Sekundarni metaboliti vrsta roda *Laserpitium* do sada su analizirani samo u nekoliko šire distribuiranih predstavnika. Od biljaka koje predstavljaju predmet ove doktorske disertacije, široko rasprostranjena vrsta *L. latifolium* je do sada samo delimično ispitivana u pogledu hemijskog sastava. Druge dve, endemične biljne vrste - *L. zernyi* i *L. ochridanum*, nisu hemijski i farmakološki proučavane.

Etarska ulja odabranih vrsta roda *Laserpitium* izolovana su destilacijom vodenom parom i hemijski okarakterisana metodama GC-FID i GC-MS. U etarskim uljima podzemnih organa sve tri ispitivane vrste roda *Laserpitium*, α -pinen je predstavljao najzastupljeniju komponentu (44,4%, 33,2% i 31,6% u uljima *L. latifolium*, *L. ochridanum* i *L. zernyi*, redom). U etarskim uljima podzemnih organa *L. zernyi* i *L. ochridanum* utvrđen je i značajan sadržaj α -bisabolola (30,9% i 10,3%, redom), a u etarskom ulju podzemnih organa *L. ochridanum* i hamazulena (14,9%). U etarskim uljima plodova *L. latifolium* i *L. ochridanum* utvrđen je visok sadržaj monoterpenskih ugljovodonika: u etarskom ulju *L. latifolium* α -pinena (44,0%), dok je u etarskom ulju *L. ochridanum* dominantan satojak limonen (57,7%), a u oba etarska ulja detektovan je značajan procenat sabinena (26,8% i 14,4%, u etarskim uljima plodova *L. latifolium* i *L. ochridanum*, redom). U etarskom ulju herbe *L. ochridanum* najzastupljenija komponenta je sabinen (25,9%). U etarskom ulju cvasti *L. zernyi* najzastupljenije komponente su sabinen, limonen i β -felandren (18,5%, 12,0% i 12,0%, redom), a u etarskom ulju herbe *L. zernyi* β -pinen (20,0%). Ova dva ulja su, za razliku od drugih ispitivanih ulja vrsta roda *Laserpitium*, imala relativno visok sadržaj monoterpenskog alkohola terpinen-4-ola (10,6% i 12,0% u etarskom ulju herbe i cvasti *L. zernyi*, redom).

Iz dela hloroformskog ekstrakta podzemnih organa *L. latifolium* rastvorljivog u metanolu, kombinovanjem pogodnih hromatografskih tehnika (hromatografija na koloni silikagela i semipreparativna HPLC) i instrumentalnih metoda za određivanje strukture (1D i 2D NMR i IR spektroskopija i HR-MS ESI⁺ spektrometrija), kao glavni sastojci izolovana su i okarakterisana dva daukanska estra: laserpicin (**1**) i acetildezoksodehidrolaserpicin (**2**), i dva fenilpropana: laserin (**3**) i latifolon (**4**). Uporednom HPLC analizom, u uslovima optimizovanim za razdvajanje terpenoida, uočena je velika kvalitativna sličnost hloroformskih ekstrakata podzemnih organa i herbe *L. latifolium*. Kvantifikacija ekstrakata izvršena je pod istim uslovima, korišćenjem izolovanih jedinjenja kao eksternih standarda. Konstatovano je da je sadržaj sva četiri jedinjenja viši u ekstraktu podzemnih organa u odnosu na ekstrakt herbe *L. latifolium*.

Iz dela hloroformskog ekstrakta podzemnih organa *L. zernyi* rastvorljivog u metanolu, kombinovanjem pogodnih hromatografskih tehnika (hromatografija na koloni, semipreparativna HPLC) i instrumentalnih metoda za određivanje strukture (1D i 2D NMR i IR spektroskopija, HR-MS ESI⁺ spektrometrija), izolovano je i strukturno okarakterisano pet seskviterpenskih laktona slovanolidne strukture, tačnije osnovne strukture 1 β H,5 β H,6 α H,7 α H-gvajjan-3-en-12,6-olida. To su jedinjenja koja su prethodno izolovana iz ekstrakata drugih vrsta roda *Laserpitium*: tarolid (5), acetilizomontanolid (6), acetilmontanolid (7), izomontanolid (9) i montanolid (10), kao i jedan eudezmanolidni lakton - silerolid (8). Iz ekstrakta podzemnih organa *L. zernyi*, u znatno manjoj količini, izolovan je još jedan gvajjanolidni lakton: 8 α -senecioiloksi,10 β -hidroksi-6 α H,7 α H-gvajjan-3-en-12,6-olid (11), koji je po prvi put izolovan iz predstavnika roda *Laserpitium*.

Uporednom HPLC analizom, u uslovima optimizovanim za razdvajanje terpenoida, uz korišćenje izolovanih jedinjenja kao eksternih standarda, utvrđeno je da su ekstrakti cvasti i herbe znatno kompleksnijeg sastava u odnosu na ekstrakt podzemnih organa *L. zernyi*. U tri ekstrakta identifikovani su laktoni tarolid (5), izomontanolid (9) i montanolid (10). Samo u ekstraktima herbe i cvasti utvrđeno je prisustvo laserpicina (1), i to kao jedne od glavnih komponentata, dok je latifolon (4) detektovan samo u ekstraktu podzemnih organa.

Deo hloroformskog ekstrakta podzemnih organa vrste *L. ochridanum* rastvorljiv u metanolu imao je nešto kompleksniji hemijski sastav. Kombinovanjem hromatografskih tehnika (hromatografija na koloni i semipreparativna HPLC) i instrumentalnih metoda za određivanje strukture (1D i 2D NMR i IR spektroskopija i HR-MS ESI⁺ spektrometrija), pored laktone koji su izolovani iz podzemnih organa *L. zernyi*, izolovano je i strukturno okarakterisano još pet novih, visoko hidroksilovanih i esterifikovanih derivata slovanolida od kojih su četiri esterifikovana u položaju 2 β . Novi gvajjanolidi izolovani iz ekstrakta podzemnih organa *L. ochridanum* su: 8 α -acetoksi-2 β ,10 β -diangeloiloksi-6 α H,7 α H-gvajjan-3-en-12,6-olid (12); 2 β ,8 α -diangeloiloksi-10 β -hidroksi-6 α H,7 α H-gvajjan-3-en-12,6-olid (13); 8 α -angeloiloksi-11 α -senecioiloksi-10 β -hidroksi-6 α H,7 α H-gvajjan-3-en-12,6-olid (14); 2 β ,8 α -diangeloiloksi-10 β -hidroksi-6 α H-gvajjan-3,(7-11)-dien-12,6-olid (15), koji, za razliku od ostalih izolovanih laktone, ima dvostruku vezu u laktonskom prstenu i 8 α -acetoksi-2 β ,11 α -diangeloiloksi-10 β -hidroksi-6 α H,7 α H-gvajjan-3-en-12,6-olid (16). Takođe, iz ekstrakta podzemnih organa *L. ochridanum* izolovani su još jedan gvajjanolidni lakton 8 α -angeloiloksi-10 β -acetoksi-6 α H,7 α H-gvajjan-3-en-12,6-olid (17) i eudezmanolid izosilerolid (18), koji su prethodno izolovani iz drugih vrsta roda *Laserpitium*.

Uporednom HPLC analizom u uslovima optimizovanim za razdvajanje terpenoida, uz korišćenje izolovanih jedinjenja kao eksternih standarda, uočena je izvesna kvalitativna sličnost hloroformskih ekstrakata podzemnih organa, herbe i ploda *L. ochridanum*. U svim ovim ekstraktima detektovani su laktoni tarolid (5), izomontanolid (9) i montanolid (10), dok je u ekstraktu herbe detektovan i silerolid (8). Pored laktone, u ekstraktima herbe i ploda detektovan je i laserpicin (1), a u ekstraktu podzemnih organa i latifolon (4).

U metanolnim ekstraktima cvasti i herbe (bez cvasti) *L. zernyi* sadržaj ukupnih polifenola određivan je spektrofotometrijski pomoću Folin-Ciocalteu reagensa. Sadržaj ukupnih polifenola iznosio je 14,32% i 6,83%, preračunato kao galna kiselina, u metanolnom ekstraktu cvasti i herbe, redom. HPLC analizom, metodom eksternog standarda, u odgovarajućem gradijentu sistema, utvrđeno je prisustvo flavona: apigenina,

luteolina i njihovih 7-O glukozi, kao i fenolkarboksilne, hlorogenske kiseline. Sadržaj flavona i hlorogenske kiseline bio je nešto viši u metanolnom ekstraktu cvasti u odnosu na ekstrakt herbe *L. zernyi*.

Antimikrobna aktivnost etarskih ulja izolovanih iz plodova i podzemnih organa *L. latifolium*, herbe, plodova i podzemnih organa *L. ochridanum* i cvasti, herbe i podzemnih organa *L. zernyi* određivana je bujon mikrodilucionim testom prema standardnim sojevima četiri Gram(+) bakterije (*Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Micrococcus luteus* i *Enterococcus faecalis*), tri Gram(-) bakterije (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* i *Pseudomonas aeruginosa*) i dva soja *Candida albicans* i upoređivana sa aktivnošću referentnih supstanci (ampicilin, amikacin i nistatin). Rezultati su izraženi kao minimalne inhibitorne koncentracije (MIK). Najveću antibakterijsku aktivnost ispoljila su etarska ulja plodova *L. latifolium* i *L. ochridanum*, i podzemnih organa *L. ochridanum* i *L. zernyi* prema Gram(+) bakterijama *S. aureus*, *S. epidermidis* i *M. luteus*, kao i etarsko ulje herbe *L. ochridanum* prema *S. aureus*. Etarska ulja podzemnih organa, herbe i ploda *L. ochridanum* pokazala su umeren efekat prema po jednom soju *C. albicans*. Antimikrobna aktivnost etarskog ulja cvasti i herbe *L. zernyi* ispitivana je i agar difuzionim testom prema tri Gram(+) i tri Gram(-) bakterije i jednom soju *C. albicans* i bila je slaba, što je u skladu sa rezultatima dobijenim bujon mikrodilucionim testom.

Etarska ulja podzemnih organa *L. ochridanum* i *L. zernyi* ispitivana su u pogledu antinociceptivnog i antiedematoznog dejstva nakon *per os* (*p.o.*) primene, u modelu karageninog (*i.pl.*) izazvane inflamacije šape u pacova. Ispoljeni efekti upoređivani su sa efektima referentnih lekova ibuprofena i indometacina.

U testu inflamatorne hiperalgezije etarska ulja su dozno- i vremenski-zavisno i statistički značajno smanjivala razliku u pritiscima između zdrave šape i šape sa hiperalgezijom, a izazvani efekat bio je uporediv sa efektom ibuprofena. U najvišoj ispitivanoj dozi (100 mg/kg) maksimalan ispoljen efekat etarskog ulja podzemnih organa *L. zernyi* (61,7%) bio je u intervalu 210 – 240 min, a maksimalan efekat etarskog ulja podzemnih organa *L. ochridanum* (61,4%) postignut je u intervalu 180 – 240 min posle primene. Ibuprofen (100 mg/kg) je ispoljio najjači efekat (82,3%) u 210. min nakon primene.

Etarska ulja podzemnih organa *L. zernyi* i *L. ochridanum* pokazala su dozno- i vremenski-zavisno i statistički značajno antiedematozno dejstvo uporedivo sa efektom indometacina. Testirana etarska ulja smanjivala su edem, odnosno zapreminu šape merene pomoću pletizmometra. Efekat etarskog ulja *L. zernyi* u najvišoj primenjenoj dozi (100 mg/kg) iznosio je 81,3% u intervalu 120 – 150 min nakon primene, dok je efekat iste doze etarskog ulja podzemnih organa *L. ochridanum* iznosio 68,6% u intervalu 120 – 240 min. Maksimalni efekat indometacina (8 mg/kg) dostignut je u 300. min nakon primene i iznosio je 70,6% antiedematozne aktivnosti.

Hloroformski ekstrakti podzemnih organa i herbi *L. latifolium*, *L. zernyi* i *L. ochridanum*, kao i sva iz njih izolovana jedinjenja, izuzev latifolona (4), testirana su u pogledu citotoksične aktivnosti u dva *in vitro* kolorimetrijska testa (MTT i SRB), na dve ćelijske linije humanog adenokarcinoma dojke, MCF 7/6 i MCF 7/AZ, invazivnog i neinvazivnog tipa, redom. Vinblastin-sulfat je korišćen kao referentno jedinjenje. Rezultati su izraženi preko koncentracije ekstrakta/izolovanog jedinjenja/vinblastin-sulfata koja inhibira 50% ćelijskog rasta (IC₅₀ vrednosti). Svi ekstrakti su ispoljili koncentraciono-zavisno citotoksično dejstvo uz konstataciju da su hloroformski ekstrakti podzemnih organa ispoljili generalno jači efekat u odnosu na hloroformske

ekstrakte herbi sve tri ispitivane vrste roda *Laserpitium*. Među testiranim jedinjenjima najjaču aktivnost ispoljilo je jedinjenje **2**, tj. daukanski triestar acetildezoksodehidrolaserpicin (IC₅₀ vrednosti 0,60 μM i 0,50 μM na MCF 7/6 ćelijsku liniju u MTT i SRB testu, redom), a među testiranim laktonima 2β esterifikovani gvajanolid sa dvostrukom vezom u laktonskom prstenu - jedinjenje **15**, tj. 2β,8α-diangeloiloksi-10β-hidroksi-6αH-gvajan-3,(7-11)-dien-12,6-olid (IC₅₀ vrednosti 0,72 μM i 0,71 μM na MCF 7/6 ćelijsku liniju u MTT i SRB testu, redom).

Antioksidantna aktivnost metanolnih ekstrakata cvasti i herbe *L. zernyi* ispitivana je u tri *in vitro* testa: određivanjem ukupnog antioksidantnog potencijala FRAP testom i testovima neutralizacije DPPH i ·OH radikala. Ekstrakt cvasti ispoljio je veću ukupnu antioksidantnu aktivnost (1,55 μmol Fe²⁺/mg suvog ekstrakta cvasti) i jače antiradikalno dejstvo (SC₅₀ vrednosti 38,95 μg/ml i 10,32 μg/ml, u testovima neutralizacije DPPH i ·OH radikala, redom) u odnosu na ekstrakt herbe. Aktivnost ekstrakta cvasti *L. zernyi* ipak je bila slabija u odnosu na kvercetin koji je korišćen kao standard (ukupna antioksidantna aktivnost 7,69 μmol Fe²⁺/mg kvercetina i SC₅₀ vrednosti 2,75 μg/ml i 3,10 μg/ml, u testovima neutralizacije DPPH i ·OH radikala, redom).

Takođe, ispitivana je i antimikrobna aktivnost metanolnih ekstrakata cvasti i herbe *L. zernyi* mikrodilucionim testom prema pet sojeva Gram(+) bakterija, tri soja Gram(-) bakterija i dva soja *C. albicans*, a antimikrobne aktivnosti izražene su preko MIK vrednosti. Oba ekstrakta su ispoljila najjaču aktivnost prema sojevima *C. albicans*, a ekstrakt herbe ispoljio je i jaku aktivnost prema *B. subtilis*. Aktivnost ekstrakta herbe *L. zernyi* prema svim ostalim testiranim sojevima bakterija bila je umerena i identična, dok je ekstrakt cvasti pokazao nešto slabiju aktivnost u odnosu na ekstrakt herbe prema sojevima *M. luteus*, *E. faecalis* i *P. aeruginosa*.

Metanolni ekstrakti cvasti i herbe *L. zernyi* ispitivani su u pogledu antiedematoznog efekta nakon *p.o.* primene u modelu *i.pl.* injekcijom karagenina izazvanog edema u pacova. Testirani metanolni ekstrakti pokazali su dozno-zavisno i statistički značajno smanjenje edema, a ispoljeni efekti su bili uporedivi sa efektom indometacina. Maksimalan efekat ekstrakta cvasti *L. zernyi* nastupio je u 360. min nakon primene i iznosio je 57,5% pri dozi od 100 mg/kg, a maksimalan efekat ekstrakta herbe nastupio je u 300. min nakon primene i iznosio je 43,9% pri dozi od 100 mg/kg. Indometacin, primenjen u dozi od 8 mg/kg, dostigao je maksimalni efekat (70,6%) u 300. min nakon primene.

Ispitivanjem vrsta *L. latifolium*, *L. zernyi* i *L. ochridanum* dobijene su informacije o vrsti i količini pojedinih sekundarnih metabolita i farmakološkoj aktivnosti izolata (ekstrakata, izolovanih jedinjenja i etarskih ulja). Dobijeni rezultati ukazuju na znatan lekoviti potencijal ispitivanih predstavnika roda *Laserpitium*, i time na njihov značaj kao potencijalno novih prirodnih lekovitih sirovina.

Ključne reči: *Laserpitium latifolium*, *L. zernyi*, *L. ochridanum*, sekundarni biljni metaboliti, seskviterpenski laktoni, farmakološka aktivnost.

Naučna oblast: Farmacija.

Uža naučna oblast: Farmakognozija.

UDK broj: 615.322:581.13:582.794.1(043.3)

Analysis of secondary metabolites and investigation of pharmacological activity of selected species of the genus *Laserpitium* L. (Apiaceae)

Abstract

In the scope of the doctoral dissertation are analysis of secondary metabolites and testing of pharmacological activity of chloroform and methanol extracts and essential oils of three species of the genus *Laserpitium* L. (Apiaceae): *Laserpitium latifolium* L., *Laserpitium zernyi* Hayek and *Laserpitium ochridanum* Micevski.

Laserpitium latifolium is perenial species, widely distributed throughout European continent. *Laserpitium zernyi* is scardo-pindic endemic species, that is distributed in Serbia (Kosovo), Albania, Former Yugoslav Republic of Macedonia (FYROM) and Greece. Previously, it was treated as a subspecies of colselly related *Laserpitium siler* L., subsp. *zernyi* (Hayek) Tutin. *Laserpitium ochridanum* is endemic species at Galičica Mountain, FYROM.

Secondary metabolites of *Laserpitium* species have been so far analyzed just in several widely distributed plants. Considering investigation of the species that are in the scope of this dissertation, only widely distributed *L. latifolium* has been partially chemically examined. The other two endemic species - *L. zernyi* and *L. ochridanum* have not been either chemically or pharmacologically investigated before.

Essential oils of selected *Laserpitium* species are isolated by a steam distillation and chemically characterised by GC-FID and GC-MS. In the essential oils of the underground parts of three *Laserpitium* species, the main constituent was α -pinene (44.4%, 33.2% and 31.6% in essential oils of *L. latifolium*, *L. ochridanum* and *L. zernyi*, respectively). In the essential oils of underground parts of *L. zernyi* and *L. ochridanum* certain content of α -bisabolol was found (30.9% and 10.3%), and in essential oil of underground parts of *L. ochridanum* was also detected chamazulene (14.9%). The fruit oils of *L. latifolium* and *L. ochridanum* were rich in monoterpene hydrocarbons: essential oil of *L. latifolium* was rich in α -pinene (44.0%), whilst in essential oil of *L. ochridanum* dominant constituent was limonene (57.7%), and in both oils certain percent of sabinene was detected (26.8% and 14.4%, in fruit oil of *L. latifolium* and *L. ochridanum*, respectively). In herb essential oil of *L. ochridanum* the most abundant constituent was sabinene (25.9%). In the essential oil flower of *L. zernyi* sabinene, limonene and β -phellandrene were detected in higher percent (18.5%, 12.0% and 12.0%, respectively), and in oil of *L. zernyi* herb higher content of β -pinene (20.0%) was detected. Two latter oils, unlike the other oils, were characterised with relatively high content of terpinene-4-ol (12.0% and 10.6% in oils of *L. zernyi* flower and herb, respectively).

From the methanol-soluble part of chloroform extract of the underground parts of *L. latifolium*, by combination of adequate chromatographic techniques (FC and semi-preparative HPLC) and instrumental methods for structure elucidation (1D and 2D NMR and IR spectroscopy and HR-MS (ESI⁺) spectrometry), as the main constituents were isolated and elucidated the two daucane esters: laserpitiin (**1**) and acetyldesoxodehydrolaserpitiin (**2**), as well as the two phenylpropanes: laserin (**3**) and latifolon (**4**). By comparative HPLC analysis in a system optimised for terpenoid separation, a huge qualitative similarity of chloroform extracts of the underground parts and herb of *L. latifolium* was observed. Quantitative analyses was conducted in the same system, using isolated compounds as external standards. It was demonstrated that all compounds were present in higher concentrations in the extract of the underground parts than in the herb extract of *L. latifolium*.

From the methanol-soluble part of chloroform extract of underground parts of *L. zernyi* by combination of chromatographic techniques (FC and semi-preparative HPLC) and spectroscopic and spectrometric techniques (1D and 2D NMR and IR spectroscopy, and HR-MS (ESI⁺) spectrometry), five lactones of slovanolide scaffold i.e. 1 β H,5 β H,6 α H,7 α H-guaian-3-en-12,6-olide, were isolated and elucidated. These are compounds that were previously isolated from other *Laserpitium* species: tarolide (**5**), acetylismontanolide (**6**), acetylmontanolide (**7**), isomontanolide (**9**) and montanolide (**10**), as well as an eudesmanolide lactone silerolide (**8**). Besides mentioned lactones, from the chloroform extract of *L. zernyi*, as a minor constituent was isolated another guaianolide lacton, 8 α -senecioyloxy,10 β -hydroxy-6 α H,7 α H-guaian-3-en-12,6-olide (**11**), that is for the first time isolated from the genus *Laserpitium*.

By comparative HPLC analyses in the system optimised for the terpenoid separation, using the isolated compounds as the external standards, a more complex composition of herb and flower chloroform extracts of *L. zernyi* in comparison to chloroform extract of the underground parts was observed. In three extracts were identified lactones tarolide (**5**), isomontanolide (**9**) and montanolide (**10**). Laserpitin (**1**), being one of the main components, was detected only in the herb and flower extract of *L. zernyi*, whilst latifolon (**4**) was detected in the extract of the underground parts of this plant.

The methanol-soluble part of chloroform extract of underground parts of *L. ochridanum* was shown to be of a more complex composition. By combination of chromatographic techniques (FC and semi-preparative HPLC) and instrumental methods for structure elucidation (1D and 2D NMR and IR spectroscopy and HR-MS (ESI⁺) spectrometry), in addition to lactones isolated from the extract of the underground parts of *L. zernyi*, five novel highly oxygenated and esterified slovanolide derivatives, four of them being additionally 2 β esterified, were isolated and elucidated from the extract of the underground parts of *L. ochridanum*. Novel guaianolide lactones isolated from this extract are: 8 α -acetoxy-2 β ,10 β -diangeloyloxy-6 α H,7 α H-guaian-3-en-12,6-olide (**12**); 2 β ,8 α -diangeloyloxy-10 β -hydroxy-6 α H,7 α H-guaian-3-en-12,6-olide (**13**); 8 α -angeloyloxy-11 α -senecioyloxy-10 β -hydroxy-6 α H,7 α H-guaian-3-en-12,6-olide (**14**); 2 β ,8 α -diangeloyloxy-10 β -hydroxy-6 α H-guaian-3,(7-11)-dien-12,6-olide (**15**), which, unlike the other isolated lactones, has additional double bond in a lactone ring, and 8 α -acetoxy-2 β ,11 α -diangeloyloxy-10 β -hydroxy-6 α H,7 α H-guaian-3-en-12,6-olide (**16**). Also, from the extract of underground parts of *L. ochridanum* were isolated 8 α -angeloyloxy-10 β -acetoxy-6 α H,7 α H-guaian-3-en-12,6-olide (**17**) and eudesmanolide isosilerolide (**18**), both previously isolated from other species of the genus *Laserpitium*.

By comparative HPLC analysis, in the conditions optimised for the terpenoid separation, using isolated compounds as the external standards, certain qualitative similarity of chloroform extracts of underground parts, herb and fruit of *L. ochridanum* was shown. In all these extracts were detected lactones tarolide (**5**), isomontanolide (**9**) and montanolide (**10**), while silerolide (**8**) was also detected in the herb extract. Besides lactones, laserpitin (**1**) was detected in the extracts of herb and fruit, whilst latifolon (**4**) was present in the extract of underground parts of *L. ochridanum*.

Methanol extracts of flower and herb (without flower) of *L. zernyi* contain phenolic compounds, whose total content was determined by spectrophotometric method using Folin-Ciocalteu reagent. Total polyphenol content was 14.32% and 6.83% calculated as gallic acid in methanol extract of flower and herb of *L. zernyi*, respectively. In optimised gradient HPLC system using an external standard method, following flavones: apigenin, luteolin and their 7-O glucosides, as well as chlorogenic acid were

detected and quantified in both extracts. Contents of flavones and chlorogenic acid were higher in methanol extract of flower than in methanol extract of herb of *L. zernyi*.

Antimicrobial activity of isolated essential oils from: fruit and underground parts of *L. latifolium*, fruit, herb and underground parts of *L. ochridanum*, and flower, fruit and underground parts of *L. zernyi* was tested by microdilution method against following microorganisms: four strains of Gram(+) bacteria (*Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Micrococcus luteus* and *Enterococcus faecalis*), three strains of Gram(-) bacteria (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*), and two *Candida albicans* strains, and compared to the effects of reference drugs (ampicillin, amikacin, nystatin). Results were expressed as minimal inhibitory concentrations (MIC). The highest antimicrobial effects exerted essential oils of fruits of *L. latifolium* and *L. ochridanum* and underground parts of *L. zernyi* and *L. ochridanum* against Gram(+) bacteria *S. aureus*, *S. epidermidis*, *M. luteus*, as well as essential oil of herb of *L. ochridanum* against *S. aureus*. Essential oils of underground parts, herb and fruit of *L. ochridanum* exerted moderate effect against one strain of *C. albicans*. Antimicrobial activity of essential oils of flower and herb of *L. zernyi* was also assessed by agar diffusion test and was low, which corresponds to results obtained by microdilution test.

Essential oils of underground parts of *L. ochridanum* and *L. zernyi* were tested for their antinociceptive and antiedematous activity after *per os* (*p.o.*) administration, in a rat model of inflammation induced by *i.pl.* injection of carageenan. Exerted effects were compared to effects of reference drugs ibuprofen and indomethacin.

In the test of inflammation induced hyperalgesia, essential oils of the underground parts of *L. zernyi* and *L. ochridanum* dose- and time-dependently and significantly reduced the difference in the pressure of inflamed and non-inflamed paw, and effect was comparable to the effect of ibuprofen. In the highest tested doses (100 mg/kg) the essential oil of *L. zernyi* exerted highest effect (61.7%) in the interval 210 – 240 min after administration, whilst the maximal effect of *L. ochridanum* essential oil (61.4%) was achieved in the interval 180 – 240 min after administration. Ibuprofen (100 mg/kg) exerted highest effect (82.3%) in 210. min after administration.

The essential oils of underground parts of *L. zernyi* and *L. ochridanum* exerted significant dose- and time-dependent antiedematous activity, comparable to the effect of indomethacin, in a rat model of inflammation induced edema. The tested oils reduce edema i.e. paw volume, which is measured using plethysmometer. Maximal effect of essential oil of *L. zernyi* in highest applied dose (100 mg/kg) was 81.3% in the interval of 120 – 150 min after application, and the highest effect of *L. ochridanum* essential oil in the same dose was 68.6% in the interval of 120 – 240 min after administration. Maximal effect of indomethacin (8 mg/kg) was achieved in 300. min after administration, and it was 70.6% of antiedematous activity.

Chloroform extracts of underground parts and herbs of *L. latifolium*, *L. zernyi* and *L. ochridanum*, as well as the isolated compounds except latifolon (**4**), were tested for their cytotoxic activities in two *in vitro*, colorimetric tests (MTT and SRB), on the two cell lines of human breast adenocarcinoma MCF 7/6 and MCF 7/AZ, invasive and non-invasive type, respectively. Vinblastine sulphate was used as reference compound. Results were expressed as concentration of extract/isolated compound/vinblastine sulphate that inhibited 50% of the cell growth (IC₅₀ values). All extracts exerted concentration-dependent cytotoxic activity and it was observed that the extracts of underground parts generally exerted higher activity in comparison to the chloroform extracts of herbs of the three *Laserpitium* species. Among the tested compounds, the

most active was compound **2**, i.e. daucane triseser acetydesoxodehydrolaserpitine (IC₅₀ values 0.60 μM and 0.50 μM on MCF 7/6 cell line in MTT and SRB test, respectively), and among lactones 2β esterified guaianolide with additional unsaturation in lactone ring - compound **15**, i.e. 2β,8α-diangeloyloxy-10β-hydroxy-6αH-guaian-3,(7-11)-dien-12,6-olide (IC₅₀ values 0.72 μM and 0.71 μM on MCF 7/6 cell line in MTT and SRB test, respectively).

Antioxidant activity of methanol extracts of flower and herb of *L. zernyi* was assessed in three *in vitro* tests: total antioxidant potential was determined in FRAP test and antiradical activity was evaluated in tests of neutralisation of DPPH and ·OH radical. The flower extract exerted higher total antioxidant activity (1.55 μmol Fe²⁺/mg of dry extract) and also higher anti-radical activity (SC₅₀ values 38.95 μg/ml and 10.32 μg/ml, in the tests of neutralisation of DPPH and ·OH radical, respectively) in comparison to the herb extract. Activity of extract of *L. zernyi* was lower than those of quercetine, that was used as standard (total antioxidant potential 7.69 μmol Fe²⁺/mg quercetine and SC₅₀ values 2.75 μg/ml and 3.10 μg/ml, in tests of neutralisation of DPPH and ·OH radical, respectively).

Also, antimicrobial activity of methanol extracts of flower and herb of *L. zernyi* was tested using microdilution test against five Gram(+) bacterial strains, three Gram(-) bacterial strains and two strains of *C. albicans*, and exerted activities were expressed as MIC values. Both extracts exerted highest activity against strains of *C. albicans*, and herb extract also exerted high antibacterial activity against *B. subtilis*. Activities of extract of herb of *L. zernyi* against all other tested bacterial strains was moderate and identical, whilst flower extract showed slightly lower activity than herb extract against bacteria *M. luteus*, *E. faecalis* and *P. aeruginosa*.

Methanol extracts of flower and herb of *L. zernyi* were tested for their antiedematous activity, after *p.o.* administration in a model of *i.pl.* injection of carageenan induced rat paw edema. Tested methanol extracts of flower and herb of *L. zernyi* exerted dose-dependent and significant reduction of the paw edema, and exerted effects are comparable to the effect of indomethacin. The highest antiedematous effect of flower extract of *L. zernyi* (100 mg/kg) was in 360. min after administration, and was 57.5%, and the effect of the same dose of the herb extract of *L. zernyi* was 43.9% in 300. min after administration. Indomethacin (8 mg/kg), exerted maximal effect (70.6%) in 300. min after administration.

By investigation of the species *L. latifolium*, *L. zernyi* and *L. ochridanum* information on chemical structure and content of secondary plant metabolites and pharmacological activities of isolates (extracts, isolated compounds and essential oils) were obtained. Results presented imply certain medicinal potential of analyzed *Laserpitium* species and their importance as novel natural medicinal raw materials.

Keywords: *Laserpitium latifolium*, *L. zernyi*, *L. ochridanum*, secondary plant metabolites, sesquiterpene lactones, pharmacological activity.

Academic expertise: Pharmacy.

Major in: Pharmacognosy.

UDC number: 615.322:581.13:582.794.1(043.3)

SADRŽAJ

UVOD	1
1. ROD <i>LASERPITIUM</i> L.	2
1.1. Opis i rasprostranjenje vrste <i>Laserpitium latifolium</i> L.	6
1.2. Opis i rasprostranjenje vrste <i>Laserpitium zernyi</i> Hayek.....	8
1.3. Opis i rasprostranjenje vrste <i>Laserpitium ochridanum</i> Micevski.	10
2. SEKUNDARNI METABOLITI RODA <i>LASERPITIUM</i>	11
2.1. Seskviterpenski laktoni.....	12
2.1.1. Biosinteza seskviterpenskih laktona.....	13
2.1.2. Važnije klase seskviterpenskih laktona zastupljenih u vrstama roda <i>Laserpitium</i>	15
2.1.3. Hromatografske tehnike u analizi seskviterpenskih laktona.....	17
2.1.4. Metode za određivanje strukture seskviterpenskih laktona.....	19
2.1.5. Biološka aktivnost seskviterpenskih laktona.....	22
2.1.6. Seskviterpenski laktoni izolovani iz vrsta roda <i>Laserpitium</i>	24
2.2. Seskviterpenski estri.....	30
2.2.1. Daukanski estri.....	31
2.3. Etarska ulja.....	34
2.4. Fenilpropani.....	37
2.5. Flavonoidi.....	39
2.6. Kumarini.....	41
3. TRADICIONALNA UPOTREBA VRSTA RODA <i>LASERPITIUM</i>	42
4. FARMAKOLOŠKA AKTIVNOST VRSTA RODA <i>LASERPITIUM</i>	43
CILJ	44
MATERIJAL I METODE	46
1. Biljni materijal.....	47
2. Aparatura.....	48
3. Izolovanje, određivanje sadržaja i analiza sastava etarskih ulja.....	49
3.1. Izolovanje etarskih ulja.....	49
3.2. GC-FID i GC-MS analiza etarskih ulja.....	50
4. Izrada ekstrakata.....	51

5. Izolovanje sekundarnih metabolita iz hloroformskih ekstrakata podzemnih organa <i>L. latifolium</i> , <i>L. zernyi</i> i <i>L. ochridanum</i>	53
5.1. Hloroformski ekstrakt podzemnih organa <i>L. latifolium</i>	53
5.1.1. Hromatografija na stubu silikagela.....	53
5.1.2. Semipreparativna HPLC hromatografija.....	54
5.2. Hloroformski ekstrakt podzemnih organa <i>L. zernyi</i>	55
5.2.1. Hromatografija na stubu silikagela.....	55
5.2.2. Semipreparativna HPLC hromatografija.....	56
5.3. Hloroformski ekstrakt podzemnih organa <i>L. ochridanum</i>	57
5.3.1. Hromatografija na stubu silikagela.....	57
5.3.2. Semipreparativna HPLC hromatografija.....	58
6. HPLC analiza hloroformskih ekstrakata <i>L. latifolium</i> , <i>L. zernyi</i> i <i>L. ochridanum</i>	60
7. Određivanje ukupnih polifenola u metanolnim ekstraktima cvasti i herbe <i>L. zernyi</i> ..	61
8. HPLC analiza metanolnih ekstrakata cvasti i herbe <i>L. zernyi</i>	61
9. Ispitivanje antioksidantne aktivnosti.....	62
9.1. Ispitivanje ukupnog antioksidantnog potencijala – FRAP test.....	63
9.2. Ispitivanje sposobnosti neutralizacije DPPH radikala – DPPH test.....	63
9.3. Ispitivanje sposobnosti neutralizacije ·OH radikala – 2-Dezoksiriboza test.....	64
10. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti.....	66
10.1. Bujon mikrodilucioni test.....	68
10.2. Agar difuzioni test.....	68
11. Ispitivanje citotoksične aktivnosti.....	69
11.1. MTT test.....	69
11.2. SRB test.....	71
12. Ispitivanje antinociceptivne i antiedematozne aktivnosti.....	72
12.1. Ispitivanje antinociceptivne aktivnosti.....	78
12.2. Ispitivanje antiedematozne aktivnosti.....	79
REZULTATI I DISKUSIJA.....	81
HEMIJSKA ANALIZA.....	82
1. Etarska ulja.....	82
1.1. Etarska ulja podzemnih organa i ploda <i>L. latifolium</i>	82
1.2. Etarska ulja podzemnih organa, herbe i cvasti <i>L. zernyi</i>	85

1.3. Etarska ulja podzemnih organa, herbe i ploda <i>L. ochridanum</i>	88
1.4. Usporedna analiza hemijskog sastava etarskih ulja odabranih vrsta roda <i>Laserpitium</i>	91
2. Identifikacija sekundarnih metabolita izolovanih iz hloroformskog ekstrakta podzemnih organa <i>L. latifolium</i>	94
2.1. Jedinjenje 1 (laserpicin).....	94
2.2. Jedinjenje 2 (acetildezoksodehidrolaserpicin).....	97
2.3. Jedinjenje 3 (laserin).....	101
2.4. Jedinjenje 4 (latifolon).....	103
3. Identifikacija sekundarnih metabolita izolovanih iz hloroformskog ekstrakta podzemnih organa <i>L. zernyi</i>	104
3.1. Jedinjenje 5 (tarolid).....	104
3.2. Jedinjenje 6 (acetilizomontanolid).....	109
3.3. Jedinjenje 7 (acetilmontanolid).....	112
3.4. Jedinjenje 8 (silerolid).....	115
3.5. Jedinjenje 9 (izomontanolid).....	117
3.6. Jedinjenje 10 (montanolid).....	119
3.7. Jedinjenje 11 (8 α -senecioiloksi,10 β -hidroksi-6 α H,7 α H-gvajjan-3-en-12,6-olid).....	121
4. Identifikacija sekundarnih metabolita izolovanih iz hloroformskog ekstrakta podzemnih organa <i>L. ochridanum</i>	124
4.1. Jedinjenje 12 (8 α -acetoksi-2 β ,10 β -diangeloiloksi-6 α H,7 α H-gvajjan-3-en-12,6-olid).....	124
4.2. Jedinjenje 13 (8 α ,2 β -diangeloiloksi-10 β -hidroksi-6 α H,7 α H-gvajjan-3-en-12,6-olid).....	130
4.3. Jedinjenje 14 (8 α -angeloiloksi- -11 α -senecioiloksi-10 β -hidroksi-6 α H,7 α H-gvajjan-3-en-12,6-olid).....	133
4.4. Jedinjenje 15 (2 β ,8 α -diangeloiloksi-10 β -hidroksi-6 α H-gvajjan-3,(7-11)-dien-12,6-olid).....	137
4.5. Jedinjenje 16 (8 α -acetoksi-2 β ,11 α -diangeloiloksi- -10 β -hidroksi-6 α H,7 α H-gvajjan-3-en-12,6-olid).....	142
4.6. Jedinjenje 17 (8 α -angeloiloksi-10 β -acetoksi-6 α H,7 α H-gvajjan-3-en-12,6-olid).....	145
4.7. Jedinjenje 18 (izosilerolid).....	147

5. HPLC analiza hloroformskih ekstraktata <i>L. latifolium</i> , <i>L. zernyi</i> i <i>L. ochridanum</i>	150
5.1. Identifikacija i kvantifikacija sekundarnih metabolita u hloroformskim ekstraktima <i>L. latifolium</i>	150
5.2. Identifikacija i kvantifikacija sekundarnih metabolita u hloroformskim ekstraktima <i>L. zernyi</i>	152
5.3. Identifikacija i kvantifikacija sekundarnih metabolita u hloroformskim ekstraktima <i>L. ochridanum</i>	155
5.4. Usporedna analiza rezultata dobijenih HPLC analizom hloroformskih ekstraktata <i>L. latifolium</i> , <i>L. zernyi</i> i <i>L. ochridanum</i>	158
6. Sadržaj ukupnih polifenola u metanolnim ekstraktima cvasti i herbe <i>L. zernyi</i>	162
7. HPLC analiza metanolnih ekstraktata cvasti i herbe <i>L. zernyi</i>	162
7.1. Identifikacija i kvantifikacija sekundarnih metabolita u metanolnim ekstraktima cvasti i herbe <i>L. zernyi</i>	162
FARMAKOLOŠKA ISPITIVANJA	167
1. Antimikrobna aktivnost etarskih ulja <i>L. latifolium</i> , <i>L. zernyi</i> i <i>L. ochridanum</i>	167
1.1. Bujon mikrodilucioni test.....	167
1.2. Agar difuzioni test.....	171
2. Antinociceptivna aktivnost etarskih ulja <i>L. zernyi</i> i <i>L. ochridanum</i>	172
3. Antiedematozna aktivnost etarskih ulja <i>L. zernyi</i> i <i>L. ochridanum</i>	175
4. Citotoksična aktivnost hloroformskih ekstraktata <i>L. latifolium</i> , <i>L. zernyi</i> i <i>L. ochridanum</i> i izolovanih jedinjenja.....	178
4.1. Citotoksična aktivnost hloroformskih ekstraktata <i>L. latifolium</i> i izolovanih jedinjenja.....	178
4.2. Citotoksična aktivnost hloroformskih ekstraktata <i>L. zernyi</i> i <i>L. ochridanum</i> i izolovanih jedinjenja.....	181
5. Antioksidantna aktivnost metanolnih ekstraktata cvasti i herbe <i>L. zernyi</i>	186
6. Antimikrobna aktivnost metanolnih ekstraktata cvasti i herbe <i>L. zernyi</i>	187
7. Antiedematozna aktivnost metanolnih ekstraktata cvasti i herbe <i>L. zernyi</i>	191
ZAKLJUČCI	195
LITERATURA	202
PRILOG	214

UVOD

1. ROD *LASERPITIUM* L.

U biljnoj klasifikaciji (Nikolić, 1973; Tutin, 1968), pripadnost roda *Laserpitium* L.* višim taksonomskim jedinicama može se prikazati na sledeći način:

Klasa:	<i>Dicotyledones</i>
Red:	<i>Apiales</i>
Familija:	<i>Apiaceae (Umbelliferae)</i>
Potfamilija:	<i>Apioidae.</i>

Familija *Apiaceae* Lindley (*Umbelliferae* Juss. 1789. Gen. Plant.: 218) obuhvata oko 300 rodova sa oko 3000 vrsta, rasprostranjenih po čitavoj Zemlji, i to uglavnom u severnoj umerenoj zoni. U Flori Srbije, ova familija je zastupljena sa 55 rodova i 148 vrsta (Nikolić, 1973, 1977; Sarić i Diklić, 1986).

Predstavnici familije *Apiaceae* su uglavnom jednogodišnje, dvogodišnje ili višegodišnje zeljaste biljke (često monokarpne), retko polužbunovi. Stabljike su najčešće sa šupljim internodijama i izraženim kolenhimom, što omogućava dostizanje visine i do 5 m kod nekih predstavnika. Listovi su uglavnom naizmenično raspoređeni, najčešće su jednostruko ili višestruko perasto deljeni na različite načine, tako da lisni režnjevi mogu biti različitih oblika; lisna drška ili liska pri osnovi prelaze u lisni rukavac koji obuhvata stabljiku. Cvetovi su sitni, dvopolni, ređe jednopolni, najčešće aktinomorfni, a ponekad se po obodu javljaju i zigomorfni cvetovi; grupisani su u proste štitove (ponekad u obliku glavica), a mnogo češće u složene štitove, kod kojih se bočne grane ne završavaju cvetovima već prostim štitovima. Pri osnovi cvasti, manji ili veći broj priperaka obrazuje omotač involukrum, a ispod štitića involucelum. Cvetovi se sastoje od 5 čašičnih i pet kruničnih listića, 5 prašnika i 2 oplodna listića. Prašnici su slobodni, a tučak je sa dvookim, retko jednookim, potcvetnim plodnikom sa po jednim semenim zametkom u svakom okcu. Na plodniku se nalaze nektarije u obliku mesnatog jastučića (*discus*) ili se na vrhu nalaze dva manje više istaknuta proširenja (*stylopodium*), sa kojih polaze stubići, često sa lepljivim žigovima. Plod je sušni

* Naziv roda *Laserpitium* potiče od grčkih reči *laser* — sok ili *lasarion* — smola srodne apeninsko-balkanske vrste *Thapsia garganica* (syn. *T. silphium*), koja je u antičko vreme bila cenjena i kao začim i kao lek, i od reči *pitizo* — kapati, curiti, jer iz zasečenog korena ove biljke curi sok, koji se zgruša u smolu (Simonović, 1959).

cepajući šizokarpijum koji se zreo raspada na dva plodića (merikarpije), koji su neko vreme vezani za končast izraštaj — karpofor. Plodići su sa unutrašnje, ventralne strane, gde se dodiruju, većinom pljosnati, a sa suprotne, dorzalne strane ispupčeni. Na svakom plodiću se nalazi obično po pet glavnih, uzdužnih rebara (*juga primaria*) u kojima se nalaze sprovodni snopići, a često se između ovih nalaze i sporedna rebra (*juga secundaria*). Na gornjem kraju plodića nalaze se ostaci čašice i stubića. U zidu plodnika, svuda okolo ili između glavnih rebara u brazdama nalaze se kanali sa etarskim uljem. Seme je različitog oblika i građe, a često prirasta za zid plodnika.

Rod *Laserpitium* L. pripada potfamiliji Apioideae Drude, čiji predstavnici imaju listove bez zalistaka, mekan endokarp, stubiće koji polaze sa vrha stilopodijuma i plod koji nije obrastao ljuspama.

Rodu *Laserpitium* pripadaju dvogodišnje ili višegodišnje, često monokarpne biljke. Koren vretenast, na vrhu prelazi u kratak zadebljali rizom koji je često prekriven končastim čupercima. Stabljika je uspravna, rebrasta ili okrugla i prugasta. Donji listovi su krupni, gornji nekoliko puta perasto deljeni, celog ili nazubljenog oboda. Prisutan je lisni rukavac. Cvetovi su hermafroditni i muški, grupisani u cvasti – štitove. Zupci na čašici su lancetasti ili šilasti. Krunični listići su obrnuto srcasti, na vrhu savijeni. Plod je merikarpijum koji se raspada na dva spljoštena, eliptična šizokarpijuma. Plodovi polukružni na poprečnom preseku; raspadaju se na dva spljoštena eliptična merikarpijuma. U zidu plodnika (perikarpu) u sekundarnim rebrima nalaze se pojedinačni kanali sa etarskim uljem; na ventralnoj strani plodića nalaze se dva kanala (Nikolić, 1973).

Rod *Laserpitium* obuhvata oko 20 vrsta sa rasprostranjenjem od Kanarskih ostrva na zapadu, do Sibira i Irana na istoku (Hartvig, 1986; Nikolić, 1973).

U Flori Evrope, *Flora Europaea* 2 (Tutin, 1968) navedeno je 14 predstavnika ovog roda:

- *L. siler* (*Siler montanum* Crantz), vrsta rasprostranjena u planinskim predelima južne i centralne Evrope, koja obuhvata tri podvrste:
 - *L. s.* subsp. *siler*, sa širokim rasprostranjenjem, izuzev na jugoistoku Evrope;
 - *L. s.* subsp. *garganicum* (Ten.) Arcangeli, sa arealom u južnom delu Balkanskog poluostrva i u južnoj Italiji;

- *L. s.* subsp. *zernyi* (Hayek) Tutin sa arealom u severoistočnoj Albaniji, Grčkoj i južnim delovima bivše Jugoslavije.
- *L. latifolium* L., vrsta rasprostranjena u najvećem delu Evrope, izuzev priobalnog područja i ostrva, rasprostranjena od centralne Španije do 61° s.g.š. na severu u Švedskoj i do centralne Ukrajine, Bugarske i evropskog dela Turske;
- *L. longiradium* Boiss., vrsta iz južne Španije (Sierra Nevada);
- *L. nestleri* Soyer-Willemet, vrsta rasprostranjena u planinskim predelima južne Francuske i Iberijskog poluostrva;
- *L. krapfii* Crantz, vrsta rasprostranjena u planinskim predelima istočnog dela centralne Evrope i na Balkanskom poluostrvu, sa podvrstama:
 - subsp. *krapfii* (*L. marginatum* Waldst. & Kit.; incl. *L. alpinum* Waldst. & Kit.), sa arealom u severnom i centralnom delu Balkanskog poluostrva, severoistočnoj Italiji i na Karpatima;
 - subsp. *gaudinii* (Moretti) Thell., sa arealom u severnoj Italiji, severozapadnim delovima Balkana, zapadnoj Austriji i Švajcarskoj;
- *L. peucedanoides* L., u jugoistočnim Alpima i severozapadnim planinskim područjima bivše Jugoslavije;
- *L. archangelica* Wulfen, u planinskim predelima istočnog dela centralne Evrope i na Balkanskom poluostrvu;
- *L. nitidum* Zanted., sa arealom u severnoj Italiji;
- *L. halleri* Crantz, vrsta rasprostranjena u Alpima i na Korzici;
- *L. gallicum* L., sa arealom u planinskim predelima južne Evrope, od Španije do Italije;
- *L. paradoxum* A. Bolós & Font Quer, opisan kao varijetet vrste *L. gallicum*, sa prirodnim rasprostranjenjem u severoistočnoj Španiji;
- *L. pseudomeum* Orph., Heldr. & Sart. ex Boiss., sa arealom u planinskom području centralne i južne Grčke;
- *L. prutenicum* L., vrsta rasprostranjena u centralnim i istočnim delovima južne Evrope, od severne Nemačke i centralne Rusije, do severa Portugalije, severa Italije i u Bugarskoj. Opisane su dve podvrste:

- subsp. *prutenicum* sa staništem u navedenim oblastima, izuzev jugozapada Francuske i severozapada Španije;
- subsp. *dufourianum* (Roy & Camus) Tutin (*L. prutenicum* forme *dufourianum* Roy & Camus) sa staništem u jugozapadnoj Francuskoj i severozapadnoj Španiji;
- *L. hispidum* Bieb., sa staništem u južnoj i istočnoj Ukrajini. Interesantno je da sve prethodno navedene vrste naseljavaju isključivo evropski kontinent, dok veći deo areala *L. hispidum* obuhvata područje zapadne Azije.

U Flori Srbije (Nikolić, 1973) navedeno je pet vrsta ovog roda: *L. siler* L. (raskovnik*), *L. latifolium* L. (javorak), *L. marginatum* W. K. (sinonim za *L. krapfii* Crantz subsp. *krapfii*), *L. alpinum* W. K. (sinonim za *L. krapfii* subsp. *krapfii*) i *L. prutenicum* L. S obzirom da u botaničkim krugovima danas preovlađuje mišljenje da pomenuta dva imena (*L. marginatum* i *L. alpinum*) zapravo predstavljaju sinonime za *L. krapfii*, moglo se pretpostaviti da su za floru Srbije poznate samo četiri vrste. Međutim, Stevanović i sar. (1993) kao novu vrstu za floru Srbije navode *L. zernyi* Hayek sa područja Šar-planine u Metohiji, tako da je realnija procena da je do sada konstatovano ukupno pet vrsta u flori Srbije: *L. siler*, *L. zernyi*, *L. latifolium*, *L. krapfii* i *L. prutenicum*.

U Flori Makedonije, Флора на Република Македонија (Micevski, 2005), navedene su četiri vrste roda *Laserpitium*:

- *L. garganicum* (Ten.) Bertol, (syn.: *L. siler* L. subsp. *garganicum* (Ten.) Arcangeli; *L. siler* auct. non L.) sa dva varijeteta;
- *L. zernyi* Hayek;
- *L. ochridanum* Micevski, vrsta endemična za planinu Galičicu;
- *L. archangelica* Wulfen.

* Narodno ime "raskovnik" odnosi se na vrste *L. siler* i *Laser trilobum* L., jer se verovalo da ova trava otvara i otključava svaku bravu ili zaklop, kada se njome dodirne. Takođe, u okolini Boljevca se verovalo da raskovnik može da "otvori" i ženu, koja ne može da dobije dete. U Leskovačkoj Moravi postoji verovanje da ova biljka "raskiva mnoge bolesti" kod ljudi i životinja. Čudotvorne moći su delom pripisane i obliku podzemnog dela biljke koji je navodno "debeo kao ruka i mek" i na njemu se raspoznaju delovi kao glava, kosa, vrat, ruke, noge i oči, a ponekad "liči na čoveka s decom" (Čajkanović, 1985.)

1.1. Opis i rasprostranjenje vrste *Laserpitium latifolium* L.

Vrsta *L. latifolium* (Slika 1), u narodu nazvana javorak, je višegodišnja biljka, sa mestimično zadebljalim rizomom, na čijem se gornjem kraju nalaze končasti čuperci. Stabljika je uspravna, visine 60–150 cm, u najvećem delu gola, okrugla, po površini tanko izbrazdana, a u gornjem delu razgranata. Donji listovi su vrlo krupni, na drškama, trostruko perasto deljeni, režnjevi poslednjeg reda su veliki, dužine 3–10 cm i širine 2–6 cm, najčešće široko jajastog oblika, tupi i pri osnovi srcasti, po obodu krupno testerasto nazubljeni (Slika 2), gornji listovi su sedeći, sa izduženim rukavcem i užim režnjevima, često na vrhu sa po tri listića. Svi listovi su goli, a lisne drške mogu biti kratko dlakave. Štitaste cvasti su velike, sa po 20–30 zrakova različite dužine, hrapavih u donjem delu. Štitići su sa velikim brojem cvetova na dugačkim drškama. Involukrum je sastavljen iz većeg broja linearnih, ili linearno lancetastih, golih listića, a involucelum je građen iz linearno končastih listića. Zupci na čašici su šilasti. Krunični listići su beli ili purpurni, dugački 2–2,5 mm, široki 1,5–2 mm, objajasti, pri osnovi manje ili više klinasti. Plod je prošireno-elipsoidnog oblika (Slika 2), dužine 8–9 mm, širine 3–7 mm, sa široko krilatim sporednim rebrima (Slika 2), bočna rebra su sa krilima širine ploda.

Cveta od juna do avgusta.

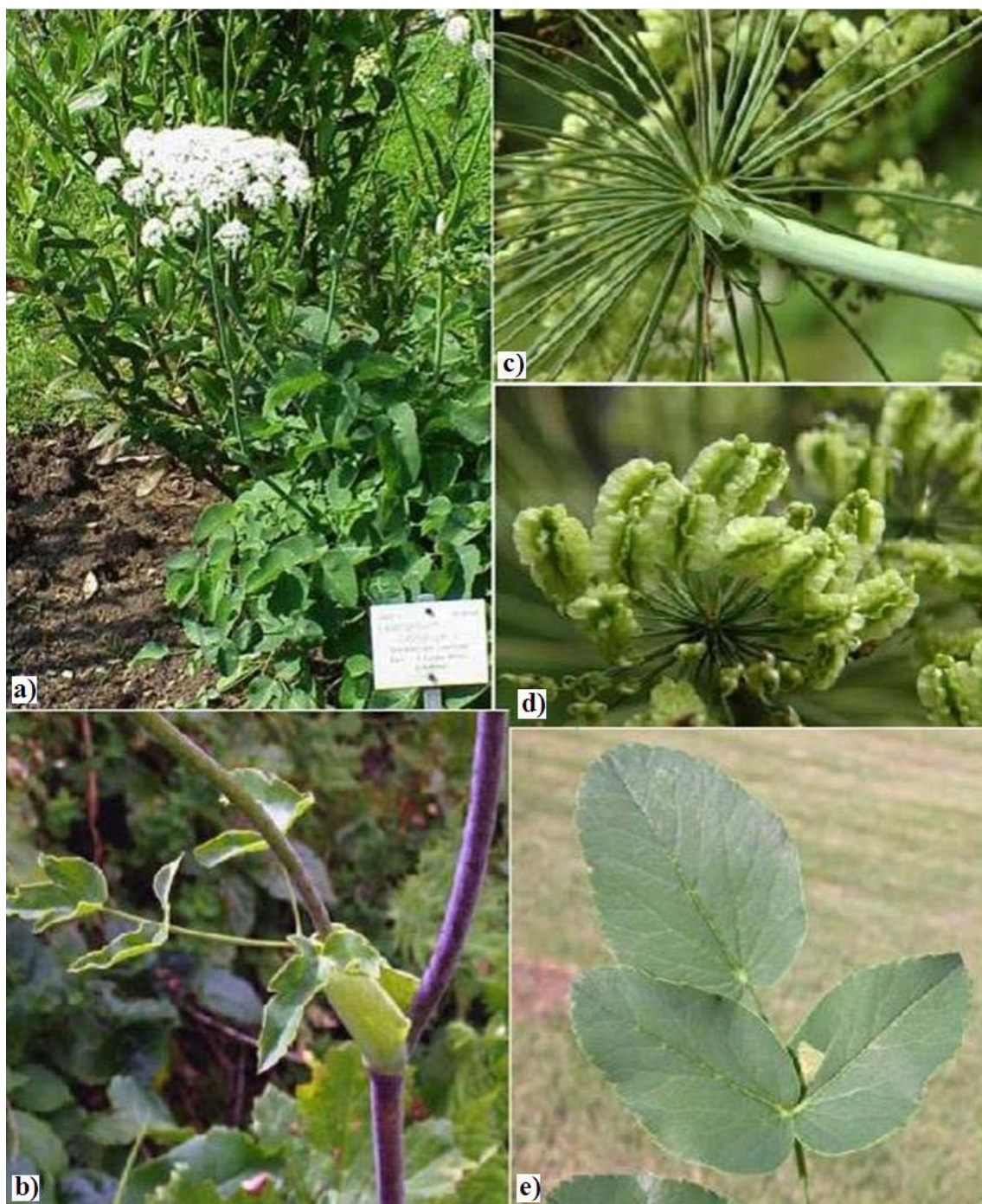
Biljka samoniklo raste na kamenitim mestima, u šikarama, pored potoka, na stepskim livadama, u suvim i svetlim listopadnim šumama; najčešće na krečnjaku, granitnim i bazaltnim stenama (Nikolić, 1973).

Laserpitium latifolium je vrsta široko rasprostranjena na Evropskom kontinentu, i pripada srednjeevropskom (mediteranskom) flornom elementu (Nikolić, 1973; Tutin, 1968).

U Flori Srbije (Nikolić, 1973) navedene su dve forme:

- *L. l. f. latifolium* golih listova koji je rasprostranjen u Vojvodini na Fruškoj gori, u zapadnoj Srbiji u kanjonu Dervente i na Jablaniku, Medvedniku, Stolovima, kao i u jugoistočnoj Srbiji u okolini Pirota*;
- *L. l. f. asperum* (Cr.) Neilr. kod koga su lisne drške i listovi na naličju hrapavo dlakavi i koji se navodi za Đerdapsku klisuru i okolinu Pirota.

* Tokom ovih istraživanja pronađen je i na planini Gučevo u zapadnoj Srbiji.



Slika 1. *Laserpitium latifolium* L. (<http://luirig.altervista.org/flora>) a) habitus; b) lisni rukavac; c) involukrum; d) involucelum; e) lisni režnjevi



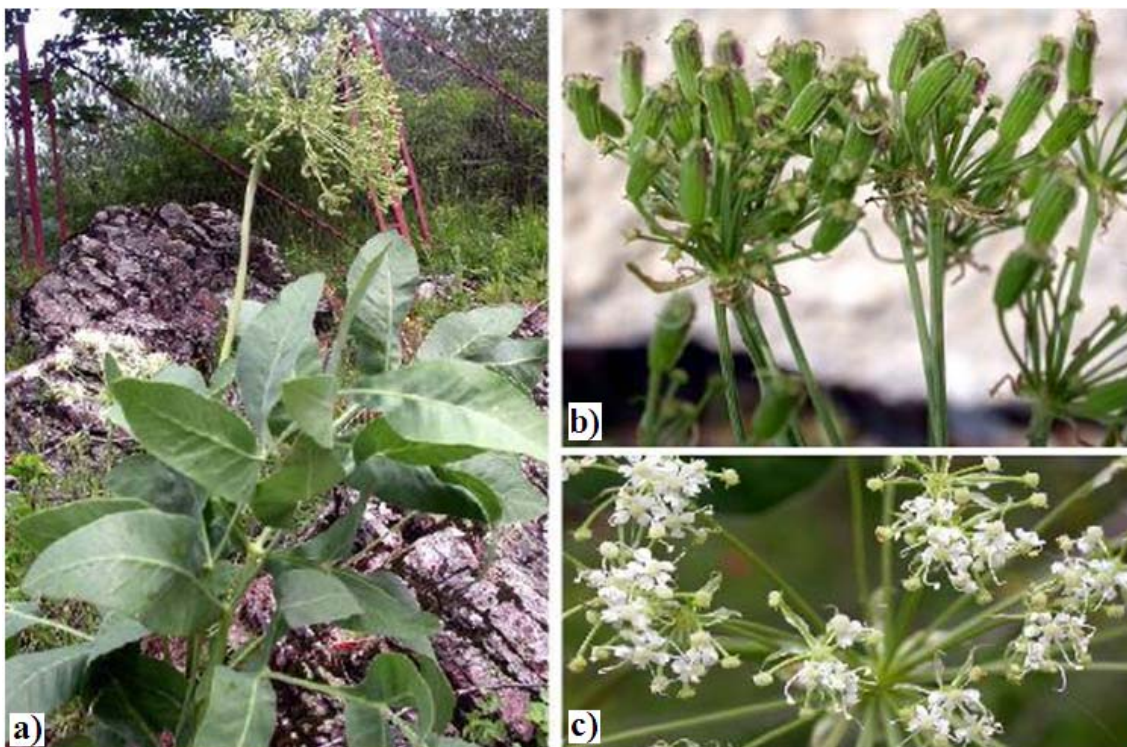
Slika 2. *Laserpitium latifolium* L. 1 – gornji deo stabljike sa listovima i cvetovima; 1a – deo prizemnog lista; 1b – plod; 1c – poprečan presek ploda (Nikolić, 1973)

1.2. Opis i rasprostranjenje vrste *L. zernyi* Hayek

U Flori Evrope, *Flora Europaea* 2 (Tutin, 1968) ova vrsta se smatra podvrstom - *L. siler* L. subsp. *zernyi* (Hayek) Tutin (Slika 3). To je višegodišnja zeljasta biljka, visine 40–60 cm. Stabljika je gola i u gornjem delu granata, snažna, okrugla i gusto

uzdužno isprugana, u osnovi obavijena končastim ostacima osušenih listova. Prizemni listovi su trodelni, 2–3 puta perasto deljeni, režnjevi su celog oboda, 60–90 mm dužine, 10–30 mm širine, lancetastog do izduženo eliptičnog oblika, sa kratkim oštrim vrhom, sa jasno istaknutim centralnim nervom na naličju i izraženom mrežastom nervaturom; prvi par lisnih režnjeva ispod terminalnog režnja se krilasto u obliku klina spušta ka drugom paru, a isto tako i drugi par režnjeva može krilasto da se spušta ka trećem paru lisnih režnjeva; lisne drške prizemnih i listova stabljike mogu biti proširene u rukavac. Štitovi su krupni sa 20–30 štitića, listići involukruma su brojni, jajasto lancetasti do lancetasti, po obodu opnasti, oštih vrhova. Štitići sa drškama dostižu dužinu 30–50 mm, i sačinjeni su od 10–15 cvetova, listići involuceluma su lancetastog oblika, sa opnastim obodom i jednim nervom, postepeno zaoštrenih vrhova, dugački koliko i cvetne drške i sa unutrašnje strane hrapavi. Cvetovi su crvenkastobele boje. Plod je izdužen, oko 8 mm dug, primarna rebra se skoro ne mogu uočiti, a dva leđna sekundarna rebra i dva bočna su sa širokim krilima.

Laserpitium zernyi naseljava planinske krečnjačke kamenjare od 1400-2200 m nadmorske visine. Vrsta je rasprostranjena u pojedinim krajevima Makedonije (Mavrovo, Gornja Radika, Bistra, Korab, Dešat, Jablanica, Luben i Baba Sač), ali raste i u planinskim predelima istočne Albanije, Grčke, kao i na Šar-planini u Srbiji (Hartvig, 1986; Stevanović i sar., 1993).



Slika 3. *Laserpitium zernyi* Hayek a) habitus; b) štitići sa nedozrelim plodovima; c) cvetovi

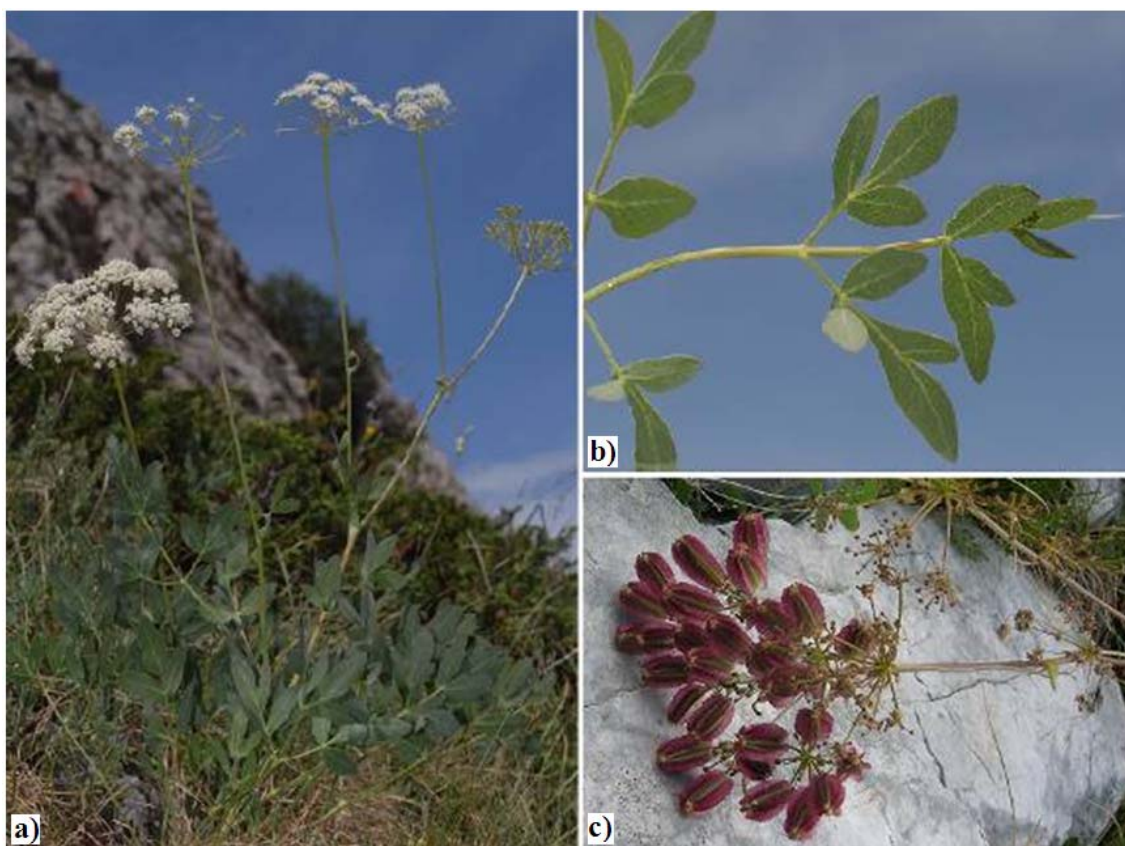
1.3. Opis i rasprostranjenje vrste *L. ochridanum* Micevski

Laserpitium ochridanum je višegodišnja zeljasta biljka visine 40–60 cm. Stabljika je gola, uspravna, celom dužinom izbrazdana uskim i plitkim brazdama, u osnovi sa končastim ostacima osušenih listova; u gornjem delu je slabo razgranata. Prizemni listovi na kratkim drškama, koje su u osnovi proširene u rukavac, trodelni su, dvostruko do trostruko perasto deljeni, lisni režnjevi su kožasti, lancetasti do široko lancetasti, zašiljeni na vrhu, celog oboda, pri osnovi zaobljeni ili se neki delimično krilasto produžavaju prema dršci, dugi su 15–20 mm, široki 5–8 mm. Tri terminalna lisna režnja se spajaju u osnovi i krilasto se spuštaju do donjeg para režnjeva. Štitovi sa 16–25 štitića, na drškama jednake dužine, hrapavi i sa uskim uzdužnim rebrima. Involukrum je sastavljen od 6–8 listića lancetastog oblika povijenih na dole. Listići involukruma su po obodu opnasti, takoreći poluprozračni. Štitići od velikog broja cvetova: listića involuceluma 5–8, široko lancetastog oblika, oštrog vrha, sitno testerastog oboda, sa jednim nervom i skoro poluprozračni. Krunični listići beli. Plod izdužen, dug 9–11 mm, primarna rebra se ne uočavaju, dok su dva leđna i dva bočna

sekundarna rebra sa opnastim krilima. Leđna krila su oko 0,3 mm široka, a bočna 0,5 mm.

Nastanjuje planinske krečnjačke kamenjare, u visinskom dijapazonu od 1600 do 2000 m nadmorske visine.

Stenoendemit planine Galičice u Makedoniji (Micevski, 2005).



Slika 4. *Laserpitium ochridanum* Micevski a) habitus; b) lisni režnjevi; c) štiti sa plodovima

2. SEKUNDARNI METABOLITI VRSTA RODA *LASERPITIUM*

Sekundarni metaboliti biljaka roda *Laserpitium* do sada su analizirani samo u desetak šire distribuiranih vrsta, od kojih je sedam sa evropskog kontinenta, dve iz zapadne Azije, dok je jedna vrsta (*L. hispidum*) rasprostranjena u zapadnoj Aziji i istočnoj Evropi. Vrste ovog roda su aromatične biljke, tako da su pojedini predstavnici do sada ispitivani u pogledu hemijskog sastava etarskog ulja, u kojima su bili detektovani gotovo isključivo monoterpeni.

Analizom ekstrakata različitih organa predstavnika roda *Laserpitium* utvrđeno je uglavnom prisustvo seskviterpenskih jedinjenja, pre svega laktona gvajanolidnog i eudezmanolidnog tipa i daukanskih estara.

Terpeni su najbrojnija grupa sekundarnih metabolita biljaka, a nastaju metabolizmom aktivnih C₅-jedinica, tj. „aktivnog izoprena“. Još je Ružička 1953. god. postavio „biosintetsko izoprensko pravilo“, objašnjavajući nastanak kako malih monoterpenskih, tako i politerpenskih jedinjenja, zajedničkim metaboličkim putevima. Karakteristika ove grupe prirodnih proizvoda je da su nastali metabolizmom iz izopentenilpirofosfata (IPP) i njegovog izomera (DMAPP), pa je prvi korak u biosintetskom putu ovih metabolita biosinteza IPP, odnosno DMAPP jedinice. Sledeći korak uključuje kondenzaciju ove dve jedinice u geranilpirofosfat (GPP). Daljim vezivanjem izopentenilpirofosfat jedinice (IPP) formira se farnezilpirofosfat (FPP). Metabolizam može ići u smeru daljeg dodavanja IPP jedinica na farnezilpirofosfat, pri čemu nastaju veći izoprenski prekursori. Farnezilpirofosfat (FPP), kao C₁₅ jedinica predstavlja osnovni molekul od koga daljim biotransformacijama pod dejstvom terpenoid-sintaza (ciklaza) dolazi do različitih redoks modifikacija, pri čemu nastaje veliki broj seskviterpena (Petrović i sar., 2009; Evans, 2009; Drew i sar., 2009).

U pojedinim predstavnicima roda *Laserpitium* utvrđeno je prisustvo fenilpropana. U ekstraktima herbe *L. latifolium* (Vereskovskii i sar., 1992) utvrđeno je prisustvo flavonoida i fenolkarboksilnih kiselina, dok su iz ekstrakata podzemnih organa i herbe *L. archangelica* Wulfen izolovana po dva kumarina (Bohlmann i Thefeld, 1970).

2.1. Seskviterpenski laktoni

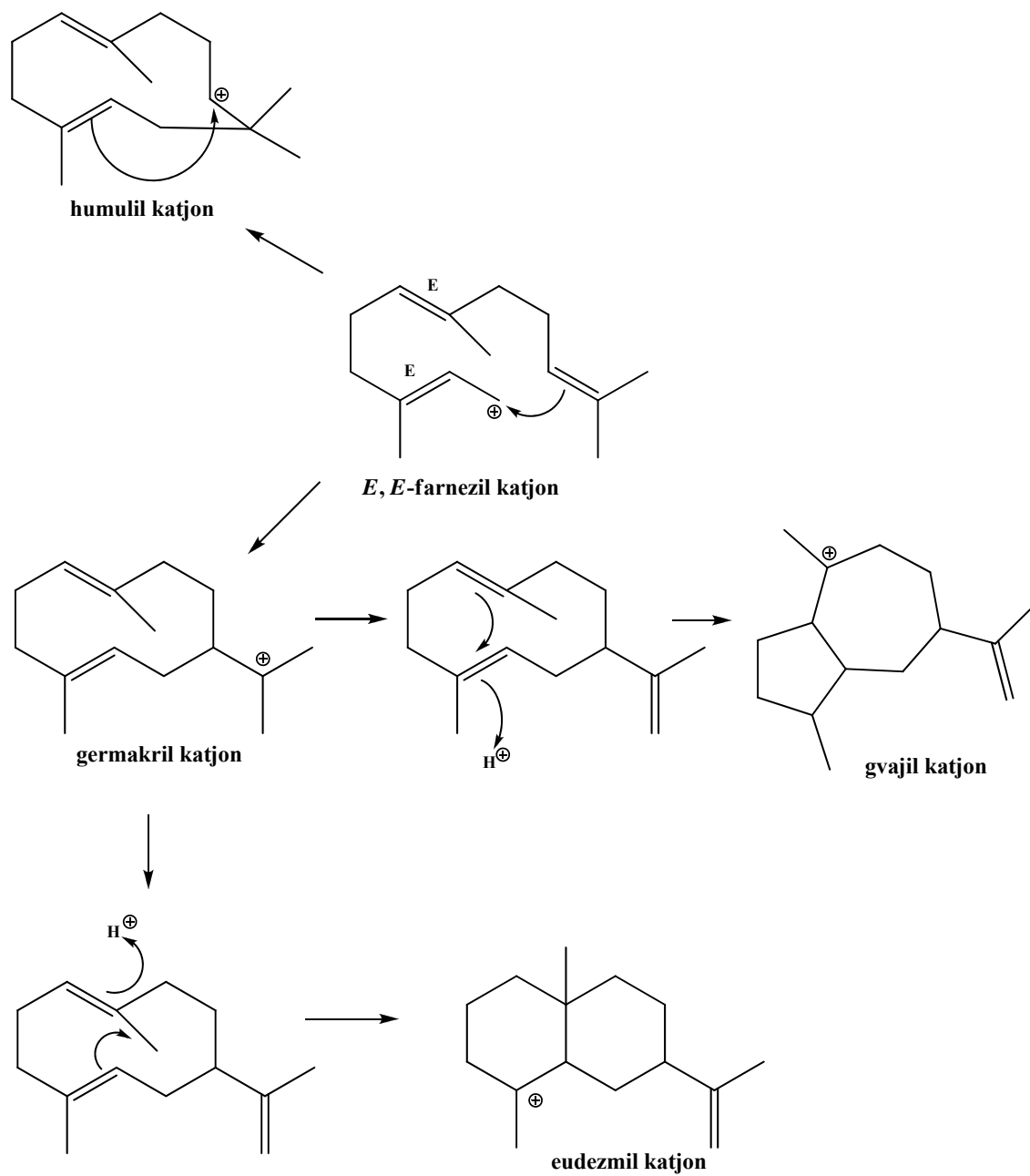
Do sada je iz biljaka izolovano više od 5000 seskviterpenskih laktona, dok je nekoliko stotina dobijeno sintetski. Najveći broj seskviterpenskih laktona izolovan je iz biljaka koje uglavnom pripadaju velikim familijama kao što su Apiaceae i Asteraceae, ali takođe i Lauraceae, Burseraceae i Magnoliaceae. Prema strukturi, seskviterpenski laktoni se mogu podeliti u više od trideset klasa. Seskviterpenski laktoni imaju veliki ekološki značaj, ispoljavaju širok spektar bioloških aktivnosti, a često su i hemotaksonomski markeri. Kao ekološki agensi učestvuju u odbrani biljaka od insekata i životinja, štite biljke od infekcija i učestvuju u alelopatskim interakcijama. Mnogi

deluju antiinflamatorno, antimikrobno i/ili antiproliferativno/citotoksično. Mnogobrojne studije povezanosti aktivnosti i strukture (eng. Structure Activity Relationship Studies - SAR studies) se izvode da bi se okarakterisali specifični strukturni elementi, koji su odgovorni za ispoljene aktivnosti (Drew i sar., 2009; Tadić i sar., 2009; Merfort, 2011).

2.1.1. Biosinteza seskviterpenskih laktona

Kao što je prethodno pomenuto, svi terpeni nastaju metabolizmom IPP i DMAPP, u reakcijama katalizovanim prenil-transferazama, koje su svrstane u četiri grupe, u zavisnosti od veličine terpenskog molekula koji nastaje. Grupa (I) su prenil-sintaze kratkih lanaca, koje su prisutne u svim živim organizmima i stvaraju izoprenske molekule veličine do 20 C atoma. Ovi enzimi zahtevaju samo jone Mg^{2+} ili Mn^{2+} kao kofaktore. Grupa (I) prenil-transferaza stvara u prvom stupnju geranilpirofosfat (GPP), a daljim dodavanjem izoprenske jedinice *trans,trans*-farnesilpirofosfat (*E,E*-FPP), koji je prekursor svih seskviterpenskih laktona (Drew i sar., 2009).

Postoji nekoliko mogućih reakcija ciklizacije *E,E*-FPP kao polaznog molekula, čime nastaje osnovna struktura više od 300 cikličnih seskviterpenskih laktonskih skeleta. Reakcije ciklizacije započinju izomerizacijom *E,E*-FPP (Slika 5). Ovaj prvi korak u biosintezi seskviterpena prati dalja ciklizacija, usled reakcije nastalih karbokacija pod dejstvom specifičnih enzima ciklaza, prisutnih u biljnom tkivu. Tako dolazi do sinteze različitih cikloheksanskih, ciklodekanskih, cikloundekanskih i bicikloheksanskih struktura. Reakcije karbokacija, pre svega elektrofilna adicija na dvostruke veze, premeštanje metil grupe, Wagner-Meerwein-ova premeštanja i pomeranja hidridnog anjona su osnovni hemijski procesi biosinteze velikog broja terpenskih jedinjenja koja nalazimo u prirodi, a od kojih seskviterpenski laktone predstavljaju samo jednu klasu (Dewick, 2009; Drew i sar., 2009; Đermanović, 1990). Na Slici 5 dat je biosintetski put nekoliko osnovnih skeleta seskviterpenskih laktona (Dewick, 2009).



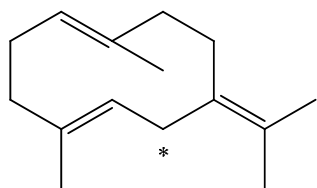
Slika 5. Biosinteza osnovnih struktura (karbokacija) najzastupljenijih strukturnih tipova seskviterpenskih laktona (Dewick, 2009)

2.1.2. Važnije klase seskviterpenskih laktona zastupljene u vrstama roda

Laserpitium

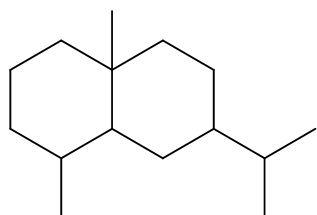
Germakranolidi čine najveću grupu seskviterpenskih laktona, sa oko 300 prirodnih predstavnika. Osnovnu strukturu predstavlja dimetilizopropildekadien, a germakradien B (Slika 6) se smatra jednim od važnijih intermedijera u biosintezi. Položaj C6 predstavlja dvostruki alilni centar, zbog čega se izuzetno lako oksiduje, čime se objašnjava postojanje velikog broja germakranolidnih laktona u prirodi (Đermanović, 1990).

Dva germakranolida izolovana su iz ekstrakata podzemnih organa *L. gallicum* L. (Appendino i sar., 1993). Takođe, iz *Laser trilobum* L., koji pripada istom tribusu Laserpitiae (Holub i Buděšinský, 1986; Smitalova i sar., 1985), izolovano je nekoliko jedinjenja ove klase.



Slika 6. Germakradien B; *C6-dvostruki alilni centar

Eudezmanolidi su seskviterpenski laktoni sa osnovnom strukturom eudezmana (Slika 7). Položaj dvostrukih veza i epoksidnih funkcija je kod većine laktona ovog tipa u položajima C3 – C4, C4 – C5 i C4 – C15, a hidroksilne grupe se uglavnom nalaze u položajima C-1, C-3 i C-8.

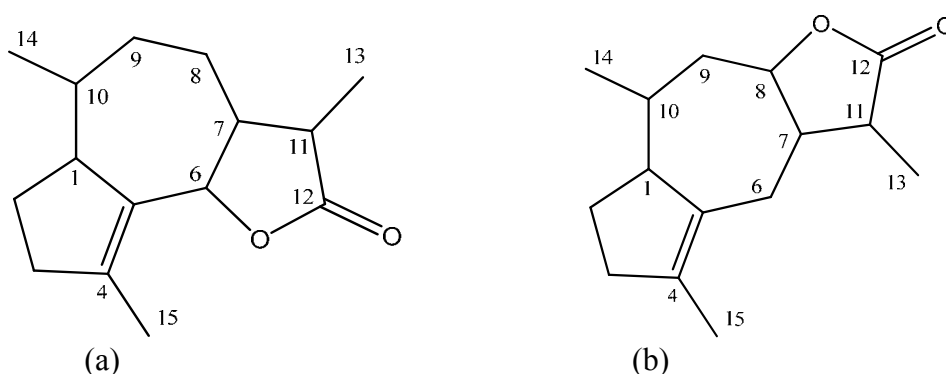


Slika 7. Eudezman

U nekim vrstama roda *Laserpitium* utvrđeno je prisustvo laktona eudezmanolidnog tipa, preciznije 1 β ,11 α -dihidroksi-6 α H,7 α H-eudezman-3en-6,12-olida, odnosno tipa silerolida. NMR i IR spektroskopijom, kao i analizom X zracima, utvrđen je i položaj prstenova, pa se zna da su veze C5-C10 *trans* i C6-C7 *cis*. Karakterističan

način vezivanja laktonskog prstena može se odrediti na osnovu hemijskih pomeranja i konstanti kuplovanja signala za protone na položajima C-6 i C-7 (Đermanović, 1990; Milosavljević i sar., 1999).

Gvajanolidi su velika grupa prirodnih proizvoda od kojih mnogi pokazuju farmakološku aktivnost. U osnovi strukture gvajanolida je seskviterpen gvajan, kondenzovan sa γ -laktonskim prstenom u C-6 i C-7 ili C-7 i C-8 u *cis* ili *trans* položaju (Đermanović, 1990). U ovu grupu spadaju seskviterpenski laktoni koji nastaju iz germakrana A-D. Karakterističnim zatvaranjem prstena gvajanolida nastaju petočlani i sedmočlani prstenovi. Među gvajanolidima, najjednostavniju strukturu imaju slovanolidi, izolovani iz vrsta roda *Laserpitium*. Slovanolide karakteriše odsustvo ili prisustvo samo jedne dvostruke veze unutar ugljeničnih prstenova, a u hemijskom smislu oni su derivati $8\alpha,10\beta,11\alpha$ -trihidroksi- $6\alpha H,7\alpha H$ -gvajan-3-en-6,12-olida. Što se ostalih gvajanolida tiče, u farmakološkom smislu najinteresantniji su tapsigargini. Kod tapsigargina, jedna ili više dvostrukih veza u cikličnom sistemu se u daljim metaboličkim reakcijama hidrosiluje, što dalje povećava broj hirlnih centara molekula (Drew i sar., 2009). Pretpostavlja se da se sinteza gvajanolida odvija ciklizacijom anti-Markovnikov-ljevog tipa. Polazni prekursor farnezilpirofosfat prevodi se u 4,5-epoksi germakrolid stoličaste konformacije, koji se dalje ciklizuje pa oksiduje u položajima C-6 ili C-8. Daljom ciklizacijom, odnosno 6,12 i 8,12 zatvaranjima laktonskih prstenova dobijaju se skeleti dva osnovna strukturna tipa gvajanolidnih laktona (Slike 8a i 8b). Za oba su zajednički prisustvo laktonskog prstena i metil grupe u položaju C-13 (Đermanović, 1990; Drew i sar., 2009).



Slika 8. Glavni strukturni tipovi gvajanolida

Biosintetski put seskviterpenskih laktona u vrstama familije Apiaceae nije još uvek sa sigurnošću utvrđen, jer se konformacija izolovanih laktona razlikuje od

konformacije laktona predstavnika familije Asteraceae. Sekundarni metabolizam i prisustvo specifičnih enzima povećava kompleksnost gvajanolida u stereo hemijskom smislu, naročito u položajima oko laktonskog prstena. Iako postoje sličnosti u metabolizmu, zna se da su različite konformacije gvajanolida izolovanih iz predstavnika familije Apiaceae i Asteraceae posledica prisustva različitih enzima u vrstama ove dve familije. Laktonski prsten zastupljen kod predstavnika familije Apiaceae je ili 6β , 8α ili 6β , 8β , dok su u vrstama familije Asteraceae poznati isključivo gvajanolidi konfiguracije 6α , 8β (Drew i sar., 2009).

2.1.3. Hromatografske tehnike u analizi seskviterpenskih laktona

De novo sinteza seskviterpenskih laktona je izuzetno kompleksna sa stanovišta tradicionalne organske hemije, zbog prisustva velikog broja hiralnih centara. Iz ovog razloga se seskviterpenski laktoni i dalje najčešće dobijaju izolovanjem iz biljnih sirovina, iako su koncentracije u pojedinim biljnim vrstama veoma niske. Seskviterpenski laktoni su jedinjenja male molekulske mase, relativno neisparljiva i većinom termolabilna, što dosta otežava procese razdvajanja i prečišćavanja. Ipak, savremenim hromatografskim tehnikama moguće je izolovanje iz biljnog materijala i kvantifikovanje ovih jedinjenja u biljnim ekstraktima, čak i kada su prisutni u maloj količini (Drew i sar., 2009; Merfort, 2002).

Tečna hromatografija (HPLC)

Tečna hromatografija (HPLC), uglavnom reverzno-fazna, predstavlja metodu izbora kada je u pitanju analiza seskviterpenskih laktona u sirovim ekstraktima. Ipak, moguće je optimizovati i normalno-faznu HPLC odgovarajućim gradijentom mobilne faze (kombinacija *n*-heksan-acetonitri (CH_3CN)-izopropanol), u zavisnosti od hemijske prirode i strukture laktona. Nekada se može koristiti gradijent HPLC sa mobilnim fazama $\text{CH}_3\text{CN} : \text{H}_2\text{O}$ i $\text{MeOH} : \text{H}_2\text{O}$. Da bi se poboljšalo razdvajanje, tj. da bi se izbeglo širenje zona na hromatogramu, naročito kod komponenata koje se relativno brzo eluiraju, potrebno je da uzorci budu rastvoreni u smeši rastvarača što približnijeg sastava početnom sastavu mobilne faze. Zbog relativno niske stabilnosti ove klase sekundarnih metabolita predloženo je da se teži ka što kraćem vremenu analize, pa se

stoga biraju i kraće kolone. U slučajevima gde je to moguće, predlaže se i upotreba mikrokolona.

Veliki problem, kada je HPLC analiza seskviterpenskih laktona u pitanju, je niska UV-apsorptivnost ove klase jedinjenja. Pojava apsorpcionih maksimuma u oblasti 210-220 nm jako otežava HPLC analizu laktona, posebno onih koji su prisutni u malim koncentracijama u sirovom ekstraktu. Derivatizacija pogodnim reagensom može biti rešenje ovog problema. Na primer, laktoni sa α -metilenbutanolnom grupom mogu da se derivatizuju pomoću 9-tiometilantracena (Merfort, 2002).

Tehnike kombinovane sa tečnom hromatografijom: HPLC-MS i HPLC-NMR

UV detekcija, pa samim tim i HPLC sa UV detektorom često nije metoda izbora u analizi seskviterpenskih laktona, zbog slabe apsorptivnosti hromofora ili čak njihovog odsustva u molekulu laktona.

Brojni limitirajući faktori u detekcionim tehnikama uticali su na razvoj primene HPLC u kombinaciji sa masenom spektrometrijom (MS) u analizi seskviterpenskih laktona. Vrlo često se za jonizaciju koristi termosprej jonizacija (TSP). HPLC-TSP dovodi do pojave kvazimolekulskih jona $[M+H]^+$, $[M+NH_4]^+$ kao različitih proizvoda jonizacije rastvarača. Moguće je da se u spektru vide i joni nastali daljom fragmentacijom molekula seskviterpenskog laktona, posle gubitka vode ili kiselinskih ostataka iz estarskih grupa. Neke tehnike koje daju slične rezultate kao TSP su hemijska jonizacija pod atmosferskim pritiskom (eng. Atmospheric Pressure Chemical Ionization – APCI) i elektrosprej jonizacija (eng. Electrospray Ionisation – ESPI) u kombinaciji sa HPLC.

Tečna hromatografija u kombinaciji sa nuklearno magnetno rezonantnom spektroskopijom (LC – NMR) je tehnika koja kombinuje visoko efikasnu separacionu tehniku sa spektroskopskom metodom kojom je moguće utvrditi tačnu strukturu jedinjenja. Ipak, nedostatak ove metode je niska osetljivost zbog interferencije signala rastvarača (Merfort, 2002).

Gasna hromatografija (GC)

Iako za analizu velikog broja seskviterpenskih laktona gasna hromatografija (GC) nije metoda izbora zbog termolabilnosti molekula, ona se može koristiti kod nekih

ekstrakata u rutinskim skriningu prisustva ovih jedinjenja. Često je derivatizacija sa trimetilsilanom neophodna da bi se seskviterpenski laktoni analizirali pomoću GC (Merfort, 2002).

Hromatografija na tankom sloju (TLC)

Hromatografija na tankom sloju (TLC) više nema značaj koji je nekada imala u analizi seskviterpenskih laktona. Ipak, kombinovanjem ove metode sa odgovarajućim reagensima za vizuelizaciju zona, može se dobiti pouzdana informacija o tipu laktona koji se nalazi u ekstraktu. Reagensi za vizuelizaciju su razni, najčešće vanilin-suporna ili vanilin-*o*-fosforna kiselina, anisaldehyd, *p*-dimetilaminobenzaldehid-sumporna kiselina, sumporna kiselina i drugi. Uglavnom, u zavisnosti od strukturnog tipa seskviterpenskih laktona koji se u nekom ekstraktu očekuje, može se odabrati najpogodniji reagens za derivatizaciju. Većina ovih reagenasa nije specifična, ali je izvođenje TLC analize jednostavno i brzo. Često se koristi u kombinaciji sa hromatografijom na koloni za praćenje efikasnosti razdvajanja, kao i za kontrolu kvaliteta ekstrakata koji su deklarirani da sadrže određeni seskviterpenski lakton (Merfort, 2002).

2.1.4. Metode za određivanje strukture seskviterpenskih laktona

Najčešće korišćene metode su nuklearna magnetna rezonantna i infracrvena spektroskopija, ali se u praksi, kada je to moguće, koriste i masena spektrometrija i ultraljubičasta spektroskopija, kao i kristalografska analiza.

Nuklearna magnetna rezonantna spektroskopija (NMR spektroskopija)

NMR spektroskopija, metoda kojom se meri nuklearni magnetizam, odnosno promena nuklearnog magnetizma pri apsorpciji radiofrekventnog zračenja, predstavlja metodu izbora kada je analiza seskviterpenskih laktona u pitanju (Milosavljević, 2004). Jezgra sa neparnim zbirom protona i neutrona (polucelobrojna vrednost spinskog kvantnog broja) kao što su ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{31}P , kao i jezgra kod kojih je broj protona i neutrona neparan, a njihov zbir paran (celobrojna vrednost spinskog kvantnog broja), predstajaju NMR aktivna jezgra.

Pogodnim kombinovanjem metoda jednodimenzionalne (^1H i ^{13}C) NMR spektroskopije, eksperimenata prenosa polarizacije (eng. Distortionless Enhancement by Polarization Transfer – DEPT) i dvodimenzionalnih NMR tehnika:

- homonuklearne 2D razložene spektroskopije (eng. Correlation Spectroscopy – COSY);
- heteronuklearne korelisane 2D NMR spektroskopije (eng. Gradient-selected Heteronuclear Single Quantum Coherence – gHSQC);
- daljinskog ^1H – ^{13}C COSY sprezanja (eng. Gradient-selected Heteronuclear Multiplebond Coherence – gHMBC) i
- Dvodimenzionalne NOE spektroskopije (eng. Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy – NOESY),

moguće je dobiti tačnu informaciju o broju protona, ugljenika, njihovoj međusobnoj vezi, čak i stereochemiji molekula (Milosavljević, 2004).

Analizom protonskih NMR (^1H NMR) spektara dobijamo informaciju o hemijskom pomeranju (δ_{H}) i konstantama kuplovanja (J, u Hz). Hemijsko pomeranje je veličina bez dimenzije, da bi se izbegao uticaj jačine primenjenog magnetnog polja na hemijsko pomeranje. Položaj signala u ^1H NMR spektru se izražava u odnosu na položaj standardnog jedinjenja tetrametilsilana – TMS. Najkarakterističniji signali za seskviterpenske laktone se nalaze na hemijskom pomeranju od 3,60-5,10 ppm, a potiču od protona koji se nalaze ispod laktonskog prstena (Đermanović, 1990).

Analiza NMR spektara ugljenika-13 (^{13}C NMR) daje informaciju o broju hemijski ne-ekvivalentnih ugljenika, u spektralnom opsegu koji je mnogo širi nego kod ^1H NMR spektara, jer ugljenici osećaju znatno jače direktne uticaje supstituenata. Prirodna obilnost ^{13}C ugljenika je manja u odnosu na vodonik ^1H , pa ^{13}C NMR spektroskopija zahteva veću količinu uzorka. Hemijska pomeranja karakteristična za laktonski ugljenik su, u zavisnosti od strukture, u opsegu od 160-185 ppm.

Eksperimenti prenosa polarizacije (DEPT) se koriste za klasifikaciju ^{13}C NMR signala prema protonizovanosti ugljenika. Fenomen prenosa polarizacije je u osnovi prenos polarizacije sa jezgara sa većim žiromagnetnim odnosom (^1H) na jezgra sa manjim žiromagnetnim odnosom (^{13}C) posredstvom heteronuklearnog sprezanja.

Dvodimenzionalni NMR eksperimenti pružaju dodatne informacije o strukturi u odnosu na jednodimenzionalne NMR eksperimente. Položaj svakog signala definiše se

pomoću dve radiofrekventne ose, a na svakoj od osa su hemijska pomeranja određene vrste jezgara. Heteronuklearna korelisana 2D NMR spektroskopija (^1H , ^{13}C NMR COSY, gHSQC), omogućava nedvosmisleni identifikaciju signala protona s kojim se svaki ugljenik u analiziranom molekulu spreže. Svaki signal je definisan pomoću dve ose: na jednoj su hemijska pomeranja iz protonskog (^1H) NMR spektra, a na drugoj signali iz NMR spektra ugljenika-13 (^{13}C), pa svaki korelacioni signal u gHSQC spektru povezuje parove ^1H i ^{13}C signala koji se skalarno sprežu. Daljinsko $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ COSY sprežanje, odnosno gHMBC eksperiment, takođe daje informaciju o skalarnim sprežanjima u molekulu, ali zbog odlaganja u pulsnoj sekvenci (oko 50 ms) signali u 2D spektru su posledica preklapanja ^1H i ^{13}C signala koji su na udaljenosti od 2 do 3, a po nekim autorima i do 5 hemijskih veza. Pošto su signali preklopljeni, nije moguće razgraničiti koliko je tačno rastojanje. Homonuklearna razložena 2D spektroskopija (COSY) predstavlja NMR tehniku kojom se u vezu dovode skalarno spregnuti protoni u molekulu, na rastojanju od 2–3 veze. Slično kao i kod heteronuklearnih tehnika, položaj svakog signala određuju dve skale na kojima se nalaze hemijska pomeranja iz protonskog spektra: signali koji se nalaze na dijagonali ovog spektra su autokorelacioni, a signali van dijagonale dovode u vezu skalarno spregnute protone. NOESY eksperimenti daju 2D spektar koji izgleda slično kao i COSY, samo što signali ovde povezuju protone između kojih postoji dipolarna interakcija, dakle prenos polarizacije nuklearnih spinova se dešava kroz prostor. Metoda je razvijena za analizu biopolimera, ali se danas uspešno koristi i u analizi manjih molekula kao što su seskviterpenski laktoni. Povezuje signale hemijskih grupa koje se konformaciono sporo izmenjuju, pa na taj način pruža informaciju o stereohemiji molekula, što je u analizi seskviterpenskih laktona veoma važno (Williams i Fleming, 1995; Milosavljević, 2004).

Infracrvena spektroskopija (IR)

Infracrvena spektroskopija se koristi za analizu prečišćenih prirodnih proizvoda i daje informaciju o prisutnim funkcionalnim grupama. Jedna od najkarakterističnijih traka seskviterpenskih laktona je između 1760 cm^{-1} i 1800 cm^{-1} , koja potvrđuje prisustvo γ -laktonskog karbonila u molekulu. Traka karbonila, pa samim tim i laktonska ili estarska, je obično najintenzivnija u IR spektru. Na položaj maksimuma utiču i ostali supstituenti, koji mogu uzrokovati pomeranje ka višem ili nižem polju. Zbog relativno

niske osetljivosti ove metode i mogućeg preklapanja traka maksimuma, IR spektroskopija se u analizi seskviterpenskih laktona koristi u kombinaciji sa NMR spektroskopijom i MS spektrometrijom (Đermanović, 1990; Milosavljević 2004; Williams i Fleming, 1995).

2.1.5. Biološka aktivnost seskviterpenskih laktona

Seskviterpenski laktoni su sekundarni metaboliti odgovorni za farmakološku aktivnost nekih biljaka. Savremena istraživanja su usmerena na pronalaženje strukturnih karakteristika koje su odgovorne, pre svega, za antitumorsko i antiinflamatorno delovanje (Siedle i sar., 2004; Ghantous i sar., 2010).

U nekoliko *in vivo* studija pokazano je da seskviterpenski laktoni inhibiraju enzime ili oslobađanje medijatora inflamacije, koji su uključeni u zapaljenski proces. Neki seskviterpeni inhibiraju migraciju i hemotaksu neutrofila, egzocitozu granula polimorfonuklearnih leukocita ili oslobađanje histamina iz mast ćelija (Merfort, 2011). Ipak, najvažnijim mehanizmom antiinflamatornog dejstva seskviterpenskih laktona se smatra njihova sposobnost inhibicije nuklearnog transkripcionog faktora- κ B (NF- κ B). On ima centralnu ulogu u kontrolisanju ekspresije gena koji kodiraju medijatore inflamacije, koji dalje mogu biti uključeni u etiologiju toksičnog šoka, astme, reumatoidnog artritisa i karcinoma. U odgovoru na zapaljenske stimuluse, NF- κ B faktor reguliše ekspresiju preko 150 ciljnih gena, koji su odgovorni za sintezu medijatora, kao što su interleukini: IL-1, IL-2 i IL-6 ili tumorski faktor- α (TNF- α), za sintezu imunoreceptora, ćelijskih adhezionih molekula i enzima, kao što su ciklooksigenaza II (COX-II) i inducibilna NO-sintaza (iNOS). Zbog centralne uloge NF- κ B faktora u regulisanju zapaljenskog odgovora, inhibicija njegove aktivnosti dovodi do ispoljavanja antiinflamatornog dejstva (Siedle i sar., 2004).

Ispitivanjem povezanosti strukture i aktivnosti prirodnih seskviterpenskih laktona različitih klasa, ustanovljeno je da postoji direktna korelacija visoke inhibicije NF- κ B faktora i broja reaktivnih centara u molekulu laktona. Reaktivni centri su delovi strukture kao što su metilenski lakton ili konjugovane keto ili aldehidne funkcionalne grupe, koje Michael-ovom adicijom stupaju u reakciju sa ćelijskim nukleofilima. Pored α -metilen- γ -laktona i broja α,β -nezasićenih karbonilnih grupa, elektronski i sterni efekti, kao što su geometrija molekula i prisustvo i položaj određenih funkcionalnih grupa imaju znatan uticaj na ispoljenu aktivnost (Siedle i sar., 2004; Merfort, 2011).

Karcinom je skup bolesti i poremećaja u osnovi kojih je nekontrolisana deoba i širenje abnormalnih formi sopstvenih ćelija po organizmu. Pojmovi karcinom, maligna neoplazma i maligni tumor se koriste da opišu grupe ćelija koje karakterišu smanjena mogućnost diferencijacije, velika invazivnost i sposobnost da metastaziraju, što ova patološka stanja odvađa od benignih tumora. Pojava ovih abnormalnih formi ćelija je posledica izmenjene ekspresije gena u ćelijama kancera, odnosno genetskih mutacija u njima. Hemioterapija karcinoma je kompleksan terapijski proces, kako zbog toksičnosti samog leka po zdrave ćelije u organizmu, tako i zbog rezistencije, koju tumorske ćelije vremenom razvijaju. Zbog toga je iznalaženje novih antitumorskih agenasa veoma aktuelno u farmaceutskoj industriji, koja se sve više okreće prirodnim agensima sa potencijalnom terapijskom primenom (Rang i sar., 2003).

Smatra se da je citotoksična i antiproliferativna aktivnost seskviterpenskog laktona, slično antiinflamatornoj aktivnosti, posledica prisustva reaktivnog alkilacionog centra u strukturi, lipofilnosti bočnog lanca i specifične geometrije molekula. Hartwell i Abbott su 1969. god., testirali oko 50 laktona za koje je bilo poznato da ispoljavaju citotoksičan efekat na različite ćelije tumora i dobili indirektan dokaz o vezi biološke aktivnosti i prisustva α -metilen- γ -laktona. α -Metilen- γ -lakton se adira Michael-ovom adicijom na bio-nukleofile, od kojih su najreaktivniji oni sa reziduama cisteina koji sadrže tiolne grupe, formirajući pri tom stabilne adukte. Dalja proučavanja su pokazala da analozi helenalina koji sadrže endocikličnu α,β -nezasićenu keto grupu imaju jači citotoksični efekat od α -metilen- γ -laktona. Prisustvo nezasićene karbonilne, odnosno "en-onske" grupe, bilo u laktonu ciklopentenonskog prstena ili u estarskom bočnom lancu, povećava citotoksičnost seskviterpenskog laktona prema ćelijama tumora.

Dalje studije su potvrdile da su ovi "en-onski" sistemi, koji su odgovorni za ispoljenu citotoksičnost *in vitro*, odgovorni i za inhibiciju rasta tumora *in vivo*. Ipak, za neke od seskviterpenskog laktona je utvrđeno da se vezuju za proteine krvi koji sadrže sulfhidrilne grupe, što smanjuje njihovu biorasploživost i onemogućava dostizanje koncentracije koja je neophodna za citotoksičan efekat. Smatra se da su iste ove strukture, sličnim mehanizmima dejstva, odgovorne i za alergijske reakcije, tipa kontaktnog dermatitisa (Ghantous i sar., 2010).

Pretpostavlja se da je inhibicija NF- κ B faktora odgovorna za citotoksično dejstvo pojedinih seskviterpenskog laktona. Neki seskviterpenski laktoni, npr.

artemizinin, tapsigargin i partenolid, kao i njihovi polusintetski derivati (Tabela 1), su u različitim fazama kliničkih ispitivanja zbog svojih antiproliferativnih i citotoksičnih dejstava. Ova jedinjenja su selektivna prema tumorskim ćelijama, jer kao ciljno mesto dejstva imaju signalne puteve, i to ih čini vodećom klasom jedinjenja u kliničkim studijama karcinoma (Ghantous i sar., 2010).

Tabela 1. Seskviterpenski laktoni koji se nalaze u različitim fazama kliničkih ispitivanja (Ghantous i sar., 2010)

Seskviterpenski lakton/derivat	Karcinom ili inflamatorno stanje
Artemizinin	Lupus nefritis Metastatski karcinom dojke Kolorektalni karcinom
Artesunat	Makrocitni karcinom pluća Metastatski uvealni melanom Karcinom skvamoznih ćelija larinksa
Artemeter	Makroadenom hipofize
Dimetilaminopartenolid	AML, ALL i ostali tumori krvnih ćelija
Tapsigargin	Uznapredovali tumori čvrstih tkiva

2.1.6. Seskviterpenski laktoni izolovani iz vrsta roda *Laserpitium*

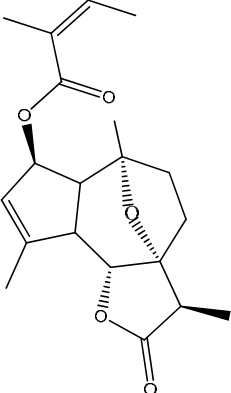
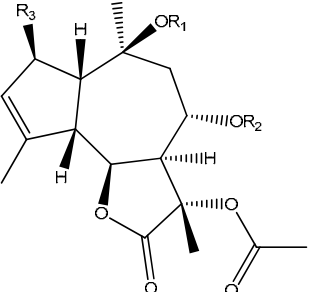
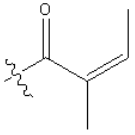
Iako široko rasprostranjene na evropskom kontinentu, vrste roda *Laserpitium* su do sada samo delimično ispitivane u pogledu hemijskog sastava. U vrstama *L. siler*, *L. siler* subsp. *garganicum* (sub *L. garganicum*), *L. krapfii* subsp. *krapfii* (sub *L. alpinum*), *L. gallicum* i *L. latifolium* identifikovani su seskviterpenski laktoni gvajanolidnog, eudezmanolidnog i germakranolidnog tipa (Đermanović i sar., 1994; Appendino i sar., 1993; Appendino i sar., 1986; Holub i Buděšinský, 1986; Đermanović i sar., 1982; Stefanović i sar., 1977).

Najveći broj seskviterpenskih laktona izolovanih iz vrsta roda *Laserpitium* pripada gvajanolidnom tipu, i uglavnom su to derivati slovanolida, osnovnog skeleta $8\alpha,10\beta,11\alpha$ -trihidroksi- $6\alpha H,7\alpha H$ -gvajan-3-en-6,12-olida. Najčešće su oksidovani u položajima C-2, C-3, C-4, C-8, C-10 i C-11 (Holub i Buděšinský, 1986; Đermanović, 1990).

Laktoni eudezmanolidnog tipa izolovani iz vrsta roda *Laserpitium* najčešće su derivati silerolida, tj. $1\beta,11\alpha$ -dihidroksi- $6\alpha H,7\alpha H$ -eudezman-3-en-6,12-olida (Holub i sar., 1986; Milosavljević i sar., 1999).

U Tabeli 2 dat je pregled struktura seskviterpenskih laktona do sada izolovanih iz vrsta roda *Laserpitium*.

Tabela 2. Seskviterpenski laktoni izolovani iz vrsta roda *Laserpitium*

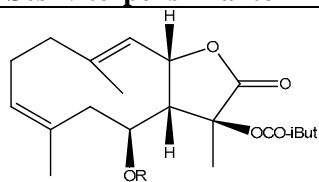
Seskviterpenski lakton	Biljna vrsta	Biljni organ/ deo biljke	Referenca
 <p>2β-angeloiloksi-7α,10α-epoksi-6βH-gvajjan-3-en-6,12-olid</p>	<p><i>L. krapfii</i> subsp. <i>krapfii</i> (sub <i>L. alpinum</i>)</p>	herba	Đermanović, i sar., 1982
 <p>R₁=Ac; R₂=i-But; R₃=Ang</p>	<p><i>L. archangelica</i></p>	rizom, koren	Holub i Samek, 1973
<p>Ang* =</p> 			

* Ang – angeloil grupa

Tabela 2. (nastavak)
Seskviterpenski lakton

Biljna vrsta

Biljni organ/ Referenca
deo biljke



R=Ang

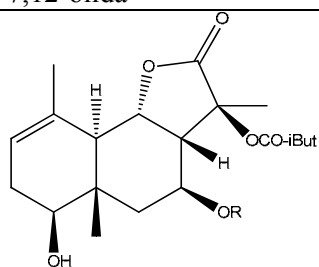
R=Sen

6β esterifikovani derivati 11β-(2'-metil) butiriloksi-7βH,8βH-germakra-3,9-dien-7,12-olida

L. gallicum

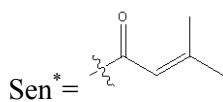
rizom, koren

Appendino i sar., 1993.



R=Ang

R=Sen

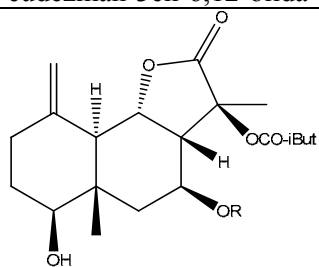


8α esterifikovani derivati 11α-(2'-metil)butiriloksi-1β-hidroksi-6αH,7αH-eudezman-3-en-6,12-olida

L. gallicum

rizom, koren

Appendino i sar., 1993



R=Ang

R=Sen

8α esterifikovani derivati 3-metilen-11α-(2'-metil)butiriloksi-1β-hidroksi-6αH,7αH-eudezman-6,12-olida

L. gallicum

rizom, koren

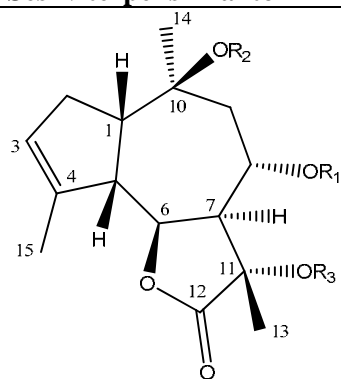
Appendino i sar., 1993

* Sen – Senecioil grupa

Tabela 2. (nastavak)
Seskviterpenski lakton

Biljna vrsta

Biljni organ/ Referenca
deo biljke



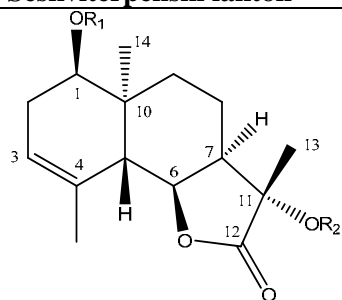
Slovanolid: $8\alpha,10\beta,11\alpha$ -trihidroksi- $6\alpha H,7\alpha H$ -gvajan-3-en-6,12-olid

$R_1=Ang$ $R_2=Ac$ $R_3=Ang$	<i>L. siler</i> subsp. <i>garganicum</i> (sub <i>L. garganicum</i>)	rizom, koren	Appendino i sar., 1986
Acetilizomontanolid: $R_1= Ang$ $R_2=Ac$ $R_3=Ac$	<i>L. siler</i>	rizom, koren	Holub i sar., 1978
Tarolid (gradolid): $R_1=Ang$ $R_2=H$ $R_3=Ang$	<i>L. siler</i> subsp. <i>garganicum</i> (sub <i>L. garganicum</i>)	rizom, koren	Appendino i sar., 1986
	<i>L. siler</i>	herba	Đermanović, 1990
Izomontanolid: $R_1=Ang$ $R_2=H$ $R_3=Ac$	<i>L. siler</i> subsp. <i>garganicum</i> (sub <i>L. garganicum</i>)	rizom, koren	Appendino i sar., 1986
	<i>L. siler</i>	plod	Holub i sar., 1972
		rizom, koren	Holub i sar., 1978
		herba	Stefanović i sar., 1977
$R_1= R_2=H$ $R_3=Ac$	<i>L. siler</i>	rizom, koren	Smitalova i sar., 1984
$R_1=R_3=Ac$ $R_2=H$			
$R_1=H$ $R_2=iBu$ $R_3=Ac$			
$R_1=H$ $R_2=MeBu$ $R_3=Ac$			
Montanolid: $R_1=H$ $R_2=Sen$ $R_3=Ac$	<i>L. siler</i>	rizom, koren	Holub i sar., 1978
$R_1=R_3=Ac$ $R_2=iBut$	<i>L. siler</i>	plod	Holub i sar., 1972

Tabela 2. (nastavak)
Seskviterpenski lakton

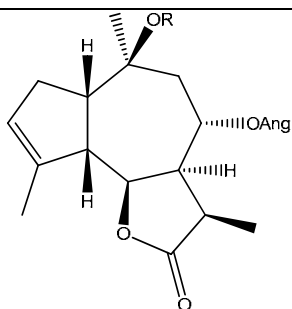
Biljna vrsta

Biljni organ/ Referenca
deo biljke



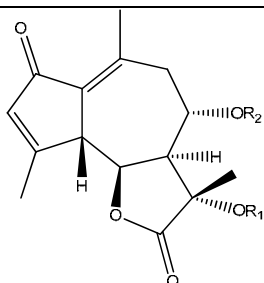
Silerolid: $1\beta,11\alpha$ -dihidroksi- $6\alpha\text{H},7\alpha\text{H}$ -eudezman-3-en-6,12-olid

Izosilerolid: $R_1=\text{Ac}$ $R_2=\text{Ang}$	<i>L. siler</i> subsp. <i>garganicum</i> (sub <i>L. garganicum</i>) <i>L. siler</i>	rizom, koren	Appendino i sar., 1986 Holub i sar., 1986
Silerolid: $R_1=\text{Ac}$ $R_2=\text{Sen}$	<i>L. siler</i>	herba rizom, koren	Stefanović i sar., 1977 Holub i sar., 1986



$8\alpha,10\beta$ -dihidroksi- $6\alpha\text{H},7\alpha\text{H}$ -gvajjan-3-en-6,12-olid

$R=\text{Ac}$	<i>L. krapfii</i> subsp. <i>krapfii</i> (sub <i>L. alpinum</i>)	herba	Holub i Buděšinský, 1986
$R=\text{H}$	<i>L. krapfii</i> subsp. <i>krapfii</i> (sub <i>L. marginatum</i>) <i>L. latifolium</i>	herba herba	Milosavljević i sar., 1999 Milosavljević i sar., 1999



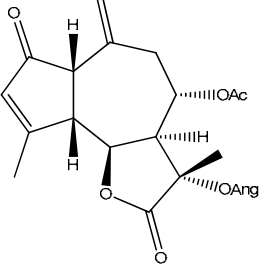
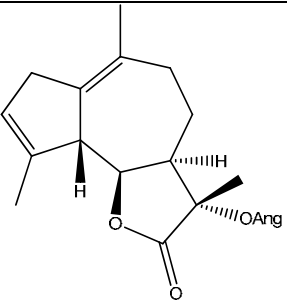
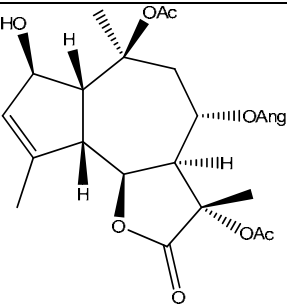
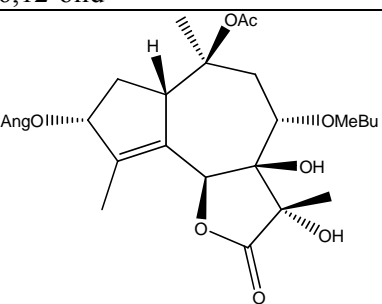
2-okso- $8\alpha,11\alpha$ -dihidroksi- $6\alpha\text{H},7\alpha\text{H}$ -gvajjan-3,10-dien-6,12-olid
 $R_1=\text{Ac}$; $R_2=\text{Ang}$
 $R_1=\text{Ac}$; $R_2=\text{Ang}$
 $R_1=\text{Ang}$; $R_2=\text{Ang}$

L. prutenicum

koren, rizom

Rychlewska i sar., 1985

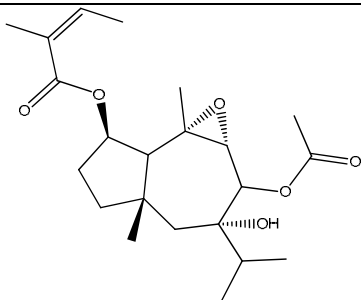
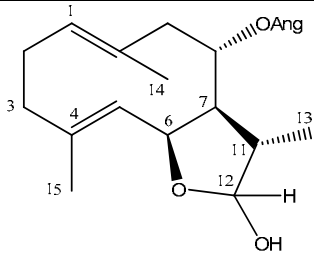
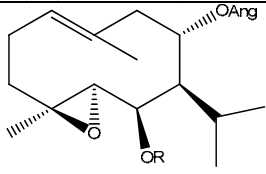
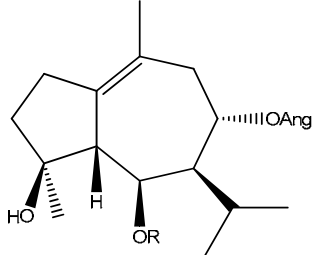
Tabela 2. (nastavak)
Seskviterpenski lakton

	Biljna vrsta	Biljni organ/ deo biljke	Referenca
	<i>L. prutenicum</i>	koren, rizom	Holub i Buděšinský, 1986
	<i>L. prutenicum</i>	koren, rizom	Holub i Budešinský, 1986
	<i>L. siler</i>	rizom, koren	Smitalova i sar., 1984
	<i>L. siler</i> <i>L. archangelica</i>	rizom, koren rizom, koren	Smitalova i sar., 1984 Kmonickova i sar., 2009

2.2. Seskviterpenski estri

Iz vrsta roda *Laserpitium* izolovani su seskviterpenski estri sa osnovnom strukturom germakrana, pseudogvajana (Tabela 3), i karotana (daukana), koji su obrađeni u narednom poglavlju (Đermanović, 1990).

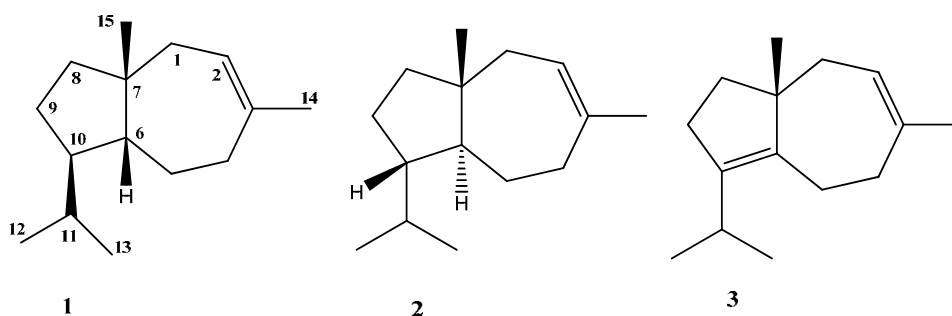
Tabela 3. Seskviterpenski estri izolovani iz vrsta roda *Laserpitium*

Seskviterpenski estar	Biljna vrsta	Biljni organ/ deo biljke	Referenca
 <p>8-acetoksi-2β-angeloiloksi-9α,10α-epoksi-7α-hidroksi-pseudogvajana</p>	<i>L. krapfii</i> subsp. <i>krapfii</i> (sub <i>L. alpinum</i>)	herba	Đermanović i sar., 1982
 <p>Halerin: derivat furano-germakra-1(10),4-diena (anomerni γ-laktoli)</p>	<i>L. halleri</i> subsp. <i>halleri</i>	koren	Appendino i sar., 1986
 <p>6-acetoksi, 8-angeloiloksi, 4β,5α-epoksigermakra-1(10)-en</p>	<i>L. halleri</i> subsp. <i>halleri</i>	plod	Appendino i sar., 1986
 <p>Gvajanski estri, derivati cikolširomodiol-8-O-angelata</p> <p>R=Ac; R=H</p>	<i>L. halleri</i> subsp. <i>halleri</i>	plod	Appendino i sar., 1986

2.2.1. Daukanski estri

Daukanska klasa seskviterpena je relativno mala grupa sekundarnih biljnih metabolita, za koju se dugo smatralo da je ograničena samo na vrste porodice Apiaceae. Novija istraživanja su pokazala da i pojedine vrste porodica Asteraceae, Rosaceae, ali i pojedine gljive i morski organizmi sintetišu daukanske metabolite (Ghisalberti, 1994).

Osnovne strukture daukanskih derivata date su na Slici 9. Numerisanje položaja u daukanskom skeletu je u saglasnosti sa brojanjem u acikličnom C₁₅ prekursoru.

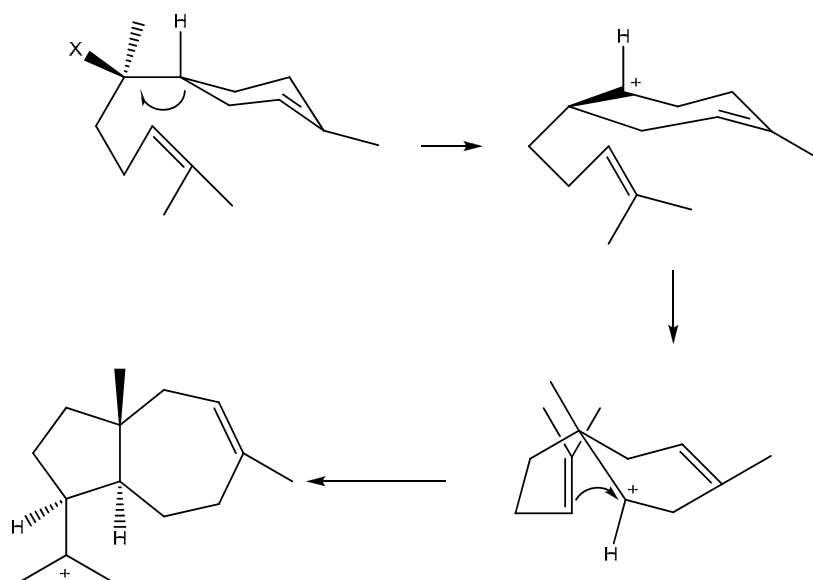


Slika 9. Osnovne strukture daukanskih derivata

Biosinteza

Uprkos relativno jednostavnoj strukturi daukanskog skeleta, biosinteza daukanskih estara u biljnim vrstama nije do kraja razjašnjena. Daukani vode poreklo od *cis*, *trans* farnezilpirofosfata (*Z,E*-FPP) i njihova biosinteza ne uključuje sintezu makrocikličnog germakrana kao intermedijernog molekula. U mnogim biljnim vrstama daukanski derivati su prisutni pored drugih tipova seskviterpena, kao što su geramakrani, gvajani, humulani ili selinani, ali nijedan od navedenih strukturnih tipova ne može da se dovede u vezu sa cikličnim perhidroazulenskim skeletom daukana. Sa druge strane, postoje pretpostavke da postoji biosintetska korelacija između bisabolana i akorana i daukana. Pretpostavljeni biosintetski put dat je na Slici 10.

Prva struktura na Slici 10 nastaje ciklizacijom farnezilpirofosfata, pa može biti prekursor bisabolen alkohola ili akroen jona ili cikoheptenil jona od kojih poslednji predstavlja intermedijer u biosintezi daukana. Formiranje ciklopentanskog prstena uključuje stvaranje tercijernog karbonijum jona, sa *trans* spojenim prstenovima (Ghisalberti, 1994).



Slika 10. Pretpostavljena biosinteza daukana u biljnoj ćeliji (Ghisalberti, 1994)

Biolška aktivnost

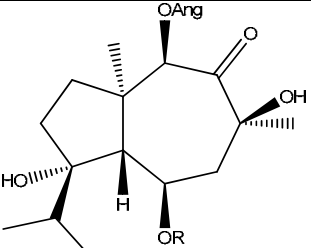
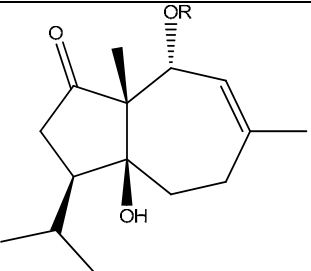
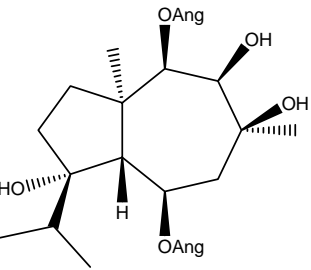
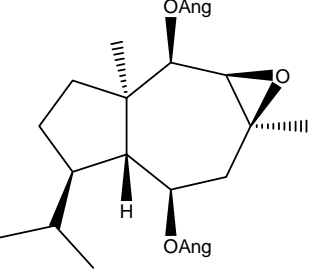
Uzevši u obzir relativno ograničenu rasprostranjenost daukanskih derivata u prirodi, njihova biološka aktivnost je samo delimično ispitivana. Neki daukanski estri deluju antimikrobno, repelentno i citotoksično (Ghisalberti, 1994).

Daukanski estri izolovani iz vrsta roda *Laserpitium*

Prvi izolovani daukanski estar je laserpicin, gorka kristalna supstanca iz korena *L. latifolium* (Hegi, 1906; Ghisalberti, 1994). Kasnije su iz podzemnih organa *L. latifolium* izolovana još dva daukanska estra (Tabela 4). Iz ekstrakata ploda *L. halleri* subsp. *halleri* izolovan je jedan daukanski estar, vaginatin, prethodno izolovan iz korena *Selinum vaginatum* C. B. Clarke (Appendino i sar., 1986).

U Tabeli 4 dat je pregled struktura daukanskih estara izolovanih iz vrsta roda *Laserpitium*.

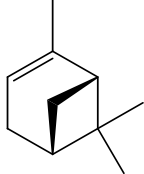
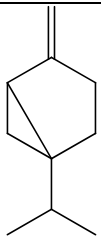
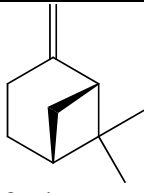
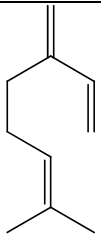
Tabela 4. Daukanski estri izolovani iz vrsta roda *Laserpitium*

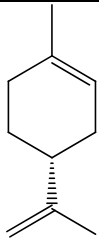
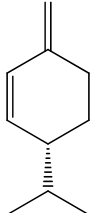
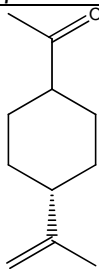
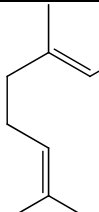
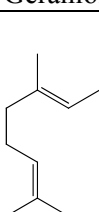
Daukanski estar	Biljna vrsta	Biljni organ/ deo biljke	Referenca
 <p>R=Ang, laserpicin R=iBut</p>	<i>L. latifolium</i>	rizom, koren	Moldt i sar., 1987. Holub i sar., 1967.
 <p>R=Ang, vaginatin</p>	<i>L. halleri</i> subsp. <i>halleri</i>	plod	Appendino i sar., 1986.
 <p>Laserpicinol</p>	<i>L. latifolium</i>	rizom, koren	Holub i sar., 1967.
 <p>1β,5β-diangeloiloksi-2,3-epoksi- daukan</p>	<i>L. latifolium</i>	rizom, koren	Holub i sar., 1959.

2.3. *Etarska ulja*

Do sada je ispitivan hemijski sastav etarskih ulja vrsta *L. archangelica*, *L. gallicum*, *L. siler* subsp. *garganicum* (sub *L. garganicum*), *L. glaucum*, *L. halleri*, *L. hispidum*, *L. krapfii*, *L. latifolium*, *L. petrophilum* Boiss. et Heldr., *L. prutenicum* i *L. siler* (Tirillini i sar., 2009; Kapetanos i sar., 2008; Chizzola, 2007; Chizzola i Novak, 1999; Baser i Duman, 1997; Timchuk, 1981; Adcock i Betts, 1974; Motl, 1973; Rutovskii i Makarova-Zemlyanska, 1930). U ovim etarskim uljima najzastupljenije komponente su uglavnom iz grupe monoterpenskih ugljovodonika i oksidovanih monoterpena (Tabela 5).

Tabela 5. Pregled najzastupljenijih komponenata u do sada analiziranim etarskim uljima vrsta roda *Laserpitium*

Jedinjenje	Biljna vrsta	Biljni organ/ deo biljke	Udeo u etarskom ulju (%)	Referenca
 α -Pinen	<i>L. gallicum</i>	plod	17,0; 28,5%	Chizzola, 2007
	<i>L. glaucum</i>		do 45,0%	Adcock i Betts, 1974
	<i>L. latifolium</i>		do 76,0%	
	<i>L. siler</i>		13,9%	Kapetanos i sar., 2008
	<i>L. petrophilum</i>	herba	48,9%	Baser i Duman, 1997
	<i>L. gallicum</i>	list	20,1%	Chizzola, 2007
 Sabinen	<i>L. gallicum</i>	plod	17,2%	Chizzola, 2007
	<i>L. siler</i> subsp. <i>garganicum</i> (sub <i>L. garganicum</i>)		9,7%	Tirillini i sar., 2009
	<i>L. petrophilum</i>	herba	25,9%	Baser i Duman, 1997
	<i>L. gallicum</i>	list	10,4%	Chizzola, 2007
 β -Pinen	<i>L. gallicum</i>	plod	14,8; 38,5%	Chizzola, 2007
	<i>L. archangelica</i>		do 100,0%	Adcock i Betts, 1974
	<i>L. glaucum</i>		do 48%	
	<i>L. hispidum</i>		do 30,0%	
	<i>L. krapfii</i>		do 19,0%	
	<i>L. latifolium</i>		do 96,0%	
	<i>L. prutenicum</i>	do 14,0%		
	<i>L. hispidum</i>	herba	25,5%	Timchuk, 1981
	<i>L. gallicum</i>	list	24,0%	Chizzola, 2007
 Mircen	<i>L. siler</i> subsp. <i>garganicum</i> (sub <i>L. garganicum</i>)	plod	15,7%	Tirillini i sar., 2009
	<i>L. gallicum</i>		11,8%	Chizzola, 2007
	<i>L. gallicum</i>	list	14,6%	Chizzola, 2007

	<i>L. siler</i>	plod	22,0% 10,5% 16,9%	Chizzola i Novak, 1999 Motl, 1973 Kapetanos i sar., 2008
	<i>L. halleri</i> <i>L. krapfii</i> <i>L. latifolium</i>		do 100,0% do 77,0% do 73,0%	Adcock i Betts, 1974
	Limonen			
	<i>L. siler</i> subsp. <i>garganicum</i> (sub <i>L. garganicum</i>)	plod	14,4%	Tirillini, 2009
	β-Felandren			
	<i>L. siler</i>	plod	89,5% 75,0% 41,1%	Motl, 1973 Chizzola i Novak, 1999 Kapetanos i sar., 2008
	Perilaldehid			
	<i>L. hispidum</i>	plod	do 42,0%	Rutovskii i Makarova- Zemlyanska, 1930
	Geraniol			
	<i>L. hispidum</i>	herba	45,7%	Timchuk, 1981
	<i>L. hispidum</i> <i>L. prutenicum</i>	plod	do 65,0% do 90,0%	Adcock i Betts, 1974
Geranylacetat				

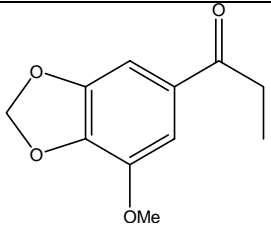
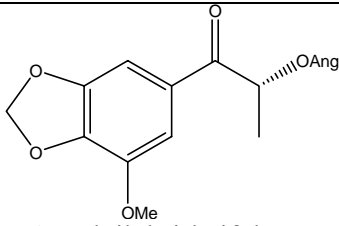
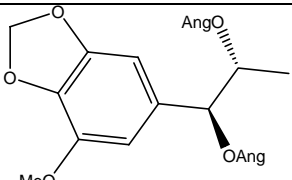
2.4. Fenilpropani

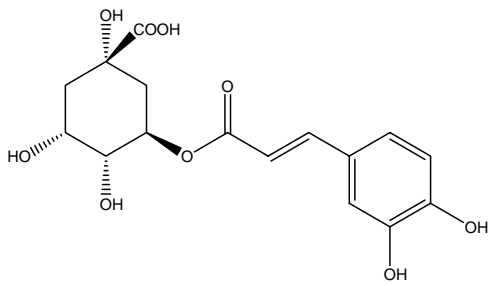
Fenilpropani su jedinjenja sa karakterističnom C6-C3 strukturnom jedinicom u svom molekulu. Obuhvataju više različitih klasa jedinjenja i u prirodi su široko zastupljeni (Petrović i sar., 2009; Dewick, 2009).

U vrstama roda *Laserpitium* utvrđeno je prisustvo fenilpropanskih jedinjenja i derivata (Tabela 6). Neka su široko rasprostranjena u predstavnicima familije Apiaceae (latifolon, fenolkarboksilne kiseline hlorogenska i neohlorogenska), dok su pojedina karakteristična za nekoliko rodova.

U etanolnim ekstraktima lista *L. latifolium* identifikovane su hlorogenska i neohlorogenska kiselina (Vereskovskii i sar., 1992). Pošto su fenolkarboksilne kiseline po hemijskoj prirodi polifenolna jedinjenja, biološka aktivnost i farmakološki efekti biće pomenuti u odeljku koji se tiče farmakološke aktivnosti polifenola.

Tabela 6. Fenilpropanska jedinjenja vrsta roda *Laserpitium*

Fenilpropansko jedinjenje	Biljna vrsta	Biljni organ/ deo biljke	Referenca
 Latifolon	<i>L. archangelica</i> <i>L. latifolium</i> <i>L. siler</i>	rizom i koren rizom, koren rizom, koren	Holub i Samek, 1973 Holub i sar., 1959 Holub i sar., 1970
 α-Angeloiloksi-latifolon	<i>L. siler</i>	herba	Đermanović, 1990
 Laserin	<i>L. archangelica</i> <i>L. siler</i> subsp. <i>garganicum</i> (sub <i>L. garganicum</i>)	rizom, koren rizom, koren	Holub i Samek, 1973 Appendino i sar., 1986

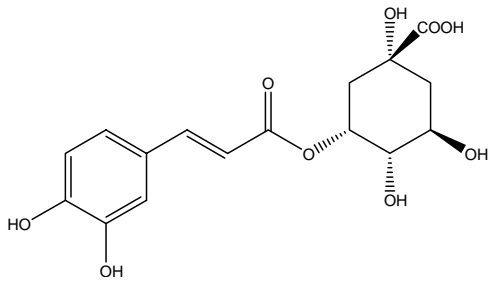


Hlorogenska kiselina
(5'-kafeoilhina kiselina)

L. latifolium

list

Vereskovskii
i sar., 1992



Neohlorogenska kiselina
(3'-kafeoilhina kiselina)

L. latifolium

list

Vereskovskii
i sar., 1992

2.5. Flavonoidi

Flavonoidi, sa oko 9000 u prirodi otkrivenih struktura, predstavljaju jednu od brojnijih grupa sekundarnih metabolita biljaka i najbrojniju grupu prirodnih polifenola. Naziv su dobili od latinske reči *flavus*, što znači žut, jer su korišćeni za bojenje tkanina u žuto. Danas se u klasu flavonoida svrstavaju i neka jedinjenja koja su bezbojna (katehini, leukoantocijanidini), kao i antocijanidini koji su u zavisnosti od pH sredine obojeni crveno, plavo ili ljubičasto (Martens i Mithöfer, 2005; Petrović i sar., 2009, Evans, 2009).

Biosintetski flavonoidi nastaju iz tri acetatne i jedne fenilpropanske jedinice. U hemijskom smislu predstavljaju derivate benzo- γ -pirona. Sastoje se iz dva benzenova prstena povezana C-3 mostom. U zavisnosti od stepena oksidacije, odnosno strukture C-3 mosta, flavonoidi su podeljeni na veći broj potklasa. Aromatični prstenovi mogu biti supstituisani u različitim položajima. Supstituenti su najčešće hidroksilne ili metoksi grupe, ali se sreću i C-alkil derivati, naročito u položajima 6 i 8 koji su izuzetno reaktivni (Petrović i sar., 2009; Evans, 2009).

Biološka aktivnost

Flavonoidi ispoljavaju širok spektar farmakoloških aktivnosti. Droge koje sadrže flavonoide tradicionalno se primenjuju u terapiji mnogih stanja i poremećaja. Flavonoidi vrlo često deluju i kao sinergisti u sadejstvu sa drugim prirodnim jedinjenjima. Flavonoidne droge imaju diuretično ili spazmolitično dejstvo, često ispoljavajući istovremeno i antibakterijsko ili antifungalno dejstvo. Ispitivanjem farmakološke aktivnosti izolovanih jedinjenja, utvrđeno je da su flavonoidi sekundarni biljni metaboliti koji su odgovorni za antialergijsko, antivirusno, antiinflamatorno, hepatoprotektivno, antioksidantno, vazodilatatorno i antikancerogeno dejstvo u živim organizmima. Antioksidantno i antiradikalsko dejstvo su aktivnosti koje se intenzivno proučavaju u poslednje vreme, a posledica su prisustva specifičnih struktura u molekulu flavonoida koje imaju sposobnost smanjivanja produkcije slobodnih radikala, kao i sposobnost „hvatanja“, odnosno neutralizacije već formiranih radikala (eng. radical scavenging activity). Flavonoidi, slično nekim drugim polifenolnim jedinjenjima, su u hemijskom smislu veoma aktivni donori protona ili elektronskog para, što je jedno od

objašnjenja visoke antiradikalske aktivnosti ispoljene u *in vitro* i *in vivo* testovima (Seyoum i sar., 2006; Chirumbolo, 2012).

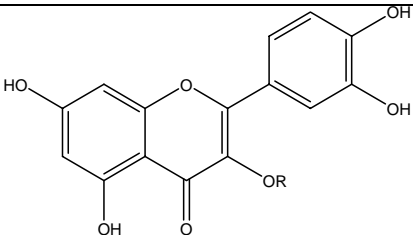
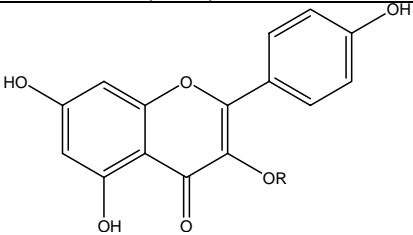
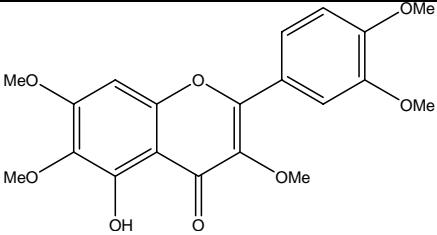
Iako je *in vivo* ispitivanjem u različitim modelim potvrđena antiinflamatorna aktivnost flavonoida, njihova bioraspoloživost nakon oralne primene je umanjena usled intenzivnog metabolizma (Chirumbolo, 2012).

Flavonoidi identifikovani i izolovani iz vrsta roda *Laserpitium*

U etanolnom ekstraktu lista *L. latifolium* utvrđeno je prisustvo heterozida kvercetina i kemferola (Vereskovskii i sar., 1992).

Iz hloroformskog ekstrakta herbe *L. siler* izolovan je artemetin (Đermanović, 1990) (Tabela 7).

Tabela 7. Flavonoidi identifikovani i izolovani iz vrsta roda *Laserpitium*

Flavonoid	Biljna vrsta	Biljni organ/ deo biljke	Referenca
 <p>Kvercetin-3-O- R=arabinoza (avikularin); R=glukoza (izokvercitrin); R=ramnoza (kvercitrin); R=rutinoza (rutin).</p>	<i>L. latifolium</i>	list	Vereskovskii i sar., 1992
 <p>Astragalin: kemferol-3-O-glukozid</p>	<i>L. latifolium</i>	list	Vereskovskii i sar., 1992
 <p>Artemetin</p>	<i>L. siler</i>	herba	Đermanović, 1990

2.6. Kumarini

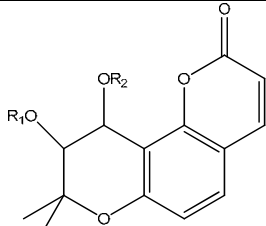
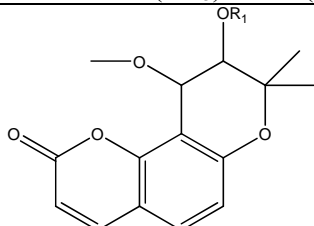
Kumarini u hemijskom smislu predstavljaju derivate benzo- α -pirona ili glikozide O-hidroksi-cimetne kiseline. Oko 1300 različitih kumarinskih struktura je izolovano iz viših biljaka, gljiva i bakterija. Mnogi predstavnici familije Apiaceae su izvori ovih jedinjenja, naročito furanokumarina. Kumarini mogu biti sastojci etarskih ulja. Mnogi jednostavni kumarini imaju prijatan miris nalik mirisu pokošenog sena.

Neka jedinjenja kompleksne strukture, kao što su antikoagulansi dikumarol (C3-C3' kondenzacioni derivat dva kumarinska molekula) i varfarin, aflatoksin, ili fotosenzibilišući agensi psoraleni, u osnovi imaju kumarinsku strukturu. *In vivo* studijama na životinjama i ljudima pokazano je da kumarin izaziva smanjenje edema nastalih usled povrede tkiva ili nekog poremećaja (Evans, 2009).

Kumarini izolovani iz vrsta roda *Laserpitium*

Iz *L. archangelica* izolovana su četiri kumarina, derivata dihidroseselina (Bohlmann i Thefeld, 1970): dva iz ekstrakata podzemnih organa i dva iz ekstrakata herbe (Tabela 8).

Tabela 8. Kumarini, derivati dihidroseselina izolovani iz *L. archangelica* (Bohlmann i Thefeld, 1970)

Kumarin	Biljni organ/ deo bilje
	
R ₁ =Ang; R ₂ =CO(CH ₃)COCH(CH ₃)	herba
R ₁ =Ac; R ₂ =CO(CH ₃)COCH(CH ₃)	koren, rizom
R ₁ =R ₂ =CO(CH ₃)COCH(CH ₃)	herba
	
R ₁ =Ang	koren, rizom

3. TRADICIONALNA UPOTREBA VRSTA RODA *LASERPITIUM*

Pojedine, široko rasprostranjene vrste roda *Laserpitium* koriste se u tradicionalnoj medicini nekih evropskih naroda. Infuz pripremljen od osušenih plodova raskovnika, *L. siler* (*Siler montanum* Crantz) je korišćen kod nadimanja i drugih gastrointestinalnih poremećaja, dismenoreje, kao diuretik i nakon ujeda zmija. Takođe, u Austriji i Nemačkoj, plod ove biljke je korišćen kao začim, zbog svog gorkog i aromatičnog ukusa i arome nalik aromi mešavine kima i korijandera. U nekim krajevima (Alpi) od ploda ove biljke izrađuje se alkoholni liker. Podzemni organi vrste *L. siler* su korišćeni za izradu tonika zbog karakterističnog gorkog i oštrog ukusa, kao i lokalno za ublažavanje zubobolje. Nadzemni delovi *L. siler* su smatrani izuzetno kvalitetnom stočnom hranom (Hegi, 1906). Upotreba vrste *L. latifolium* je takođe poznata u nemačkoj narodnoj medicini, gde su podzemni organi korišćeni za izradu tonika za osvežavanje i jačanje, kao i zbog emenagognog i diuretičnog dejstva. Sprašeni rizom i koren su korišćeni i kao dodaci pivu zbog stomahičnog i antacidnog dejstva (Hoppe, 1958). U ruskoj tradicionalnoj medicini alkoholni ekstrakti podzemnih organa korišćeni su u slične svrhe, a takođe i kod želudačnih tegoba, bolesti srca, jetre, plućne tuberkuloze, reumatizma i spolja kod nekih upalnih procesa, kao što su prurične dermatomikoze (Kuprevič, 1974; Vereskovskii i sar., 1992).

4. FARMAKOLOŠKA AKTIVNOST VRSTA RODA *LASERPITIUM*

I pored činjenice da su iz ekstrakata vrsta roda *Laserpitium* izolovani metaboliti od značaja za medicinu i farmaciju, farmakološka aktivnost biljaka ovog roda, kao i njihovih sekundarnih metabolita do sada je vrlo malo ispitivana.

Tirillini i saradnici (2009) su analizirali antifungalno dejstvo etarskog ulja ploda *L. siler* subsp. *garganicum* (sub *L. garganicum*). Ovo etarsko ulje je pokazalo jaku *in vitro* aktivnost prema šest sojeva fitopatogena i patogeno koji izazivaju oportunističke infekcije kod ljudi: *Aspergillus niger*, *A. terreus*, *Chaetomium globosum*, *Penicillium chrysogenum*, *P. pinophilum* i *Trichoderma viride*.

Hemijska sličnost seskviterpenskog laktona trilobolida i tapsigargina koji se nalazi u kliničkim studijama uznapredovalih tumora čvrstih tkiva, dovela je do povećanog naučnog interesa za proučavanje farmakoloških efekata trilobolida i optimizovanja procesa njegovog izolovanja iz podzemnih organa *L. siler* i *L. archangelica*. Trilobolid je ireverzibilni inhibitor Ca^{2+} pumpe sarko/endoplazmatskog retikuluma (eng. SERCA inhibitor), pa dovodi do povećanja intracelularnog nivoa kalcijuma (Ca^{2+}) i izmenjene ćelijske signalizacije. Kao rezultat ovih promena, dolazi do pojačane sekrecije interferona gama ($IFN-\gamma$). *In vitro* testovi na ćelijama imunskog sistema (peritonealne makrofage miša i pacova i humani monociti), pokazali su da trilobolid u nanomolarnim koncentracijama izaziva pojačanu sekreciju interferona gama ($IFN-\gamma$), ključnog medijatora Th1 ćelijskog imunskog odgovora. Kompromitovan Th1 ćelijski odgovor može dovesti do razvoja infekcije ili karcinoma. Takođe, ispituje se uloga trilobolida kao adjuvantnog agensa u tretmanu rezistentnih sojeva mikroorganizama standardnim antibioticima, odnosno antimikoticima, kao i potencijalna primena ovog laktona u terapiji neinvazivnih, sporo-proliferišućih karcinoma, kao što je karcinom prostate (Kmonickova i sar., 2009).

CILJ

Cilj doktorske disertacije je hemijska i farmakološka karakterizacija tri vrste roda *Laserpitium*:

- *Laserpitium latifolium* L.
- *Laserpitium zernyi* Hayek i
- *Laserpitium ochridanum* Micevski.

Iako je upotreba vrste *L. latifolium* zabeležena u tradicionalnoj medicini u nekim delovima Evrope, ova vrsta je do sada samo delimično hemijski ispitivana. U dosadašnjim ispitivanjima vrste *L. latifolium* hemijski je okarakterisano etarsko ulje ploda, i utvrđeno je prisustvo pojedinih klasa sekundarnih metabolita (daukanski estri, fenilpropani, seskviterpenski laktoni, flavonoidi i fenolkarboksilne kiseline) u ekstraktima podzemnih organa i herbe. Endemične vrste *L. ochridanum* i *L. zernyi* nisu do sada hemijski okarakterisane.

Hemijska analiza odabranih vrsta roda *Laserpitium* obuhvatiće izolovanje i strukturnu karakterizaciju sekundarnih metabolita od značaja za medicinu i farmaciju, kao i kvalitativnu i kvantitativnu analizu hloroformskih i metanolnih ekstrakata i izolovanih etarskih ulja.

Nijedna od vrsta roda *Laserpitium* koje su predmet ove doktorske disertacije nije do sada ispitivana u pogledu farmakoloških efekata.

Farmakološka karakterizacija obuhvatiće ispitivanje antimikrobnog, antinociceptivnog i antiedematoznog dejstva izolovanih etarskih ulja, citotoksičnog dejstva hloroformskih ekstrakata i jedinjenja izolovanih iz njih, kao i antioksidantne aktivnosti, antimikrobnog i antiedematoznog dejstva metanolnih ekstrakata.

MATERIJAL I METODE

1. Biljni materijal

Biljni materijal za istraživanja u okviru ove doktorske disertacije predstavljaju podzemni organi (rizom i koren), herba, cvast i plod tri vrste roda *Laserpitium*: *L. latifolium*, *L. ochridanum* i *L. zernyi*.

Identifikaciju biljnog materijala izvršio je dr sc. Marjan Niketić, kustos Prirodnjačkog muzeja u Beogradu. Herbarski primerci su deponovani u Herbarijumu Prirodnjačkog muzeja u Beogradu (BEO).

Lokaliteti, vreme sakupljanja biljnog materijala, kao i herbarski podaci, dati su u Tabeli 9.

Sakupljen biljni materijal je osušen na senovitom, dobro provetrenom mestu, na sobnoj temperaturi, i čuvan na tamnom i hladnom mestu do ekstrakcije/destilacije vodenom parom.

Tabela 9. Ispitivane vrste roda *Laserpitium* – lokaliteti i vreme sakupljanja

Biljna vrsta	Lokalitet i vreme sakupljanja	Kolektorski broj (BEO)
<i>L. latifolium</i>	Gučevo (Srbija), oktobar 2008. god.	ko03102008
	Basara - Planinica (Srbija), maj 2011. god.	ko20110507/15
<i>L. ochridanum</i>	Galičica (Makedonija), avgust 2008. god.	ko2008070215
	Galičica (Makedonija), oktobar 2009. god.	ko2008070215
<i>L. zernyi</i>	Jablanica (Makedonija), jul 2006. god.	ko20060702/1
	Šar-Planina - Ošljak (Srbija), jul 2008. god.	ko20080709

2. Aparatura

GC-FID analiza etarskih ulja izvedena je na gasnom hromatografu SRI 8610C opremljenom FID detektorom, *split-splitless* injektorom i kapilarnom kolonom DB-5 (30 m × 0,32 mm; debljina filma 0,25 μm). Helijum (He) je korišćen kao noseći gas. Temperature injektora i detektora iznosile su 280 °C.

GC-MS analiza etarskih ulja urađena je na gasnom hromatografu HP 6890 sa MS detektorom HP 5973, *split-splitless* injektorom i kapilarnom kolonom HP-5MS (30 m × 0,25 mm; debljina filma 0,25 μm). Helijum (He) korišćen je kao noseći gas. Temperaturni program je bio identičan programu za GC analizu.

HPLC analiza hloroformskih ekstrakata izvršena je na Waters 2695 Alliance HPLC-DAD uređaju sa 996 Photodiode Array detektorom (Waters, Milford, MA) i Varian Omnispher C₁₈ kolonom (250 × 4,6 mm; veličina čestica 5 μm).

HPLC analiza metanolnih ekstrakata izvršena je na uređaju Agilent 1100 sa DAD detektorom, uz upotrebu Zorbax Eclipse XDB C₁₈ kolone (250 × 4,6 mm; veličina čestica 10 μm).

Semipreparativna hromatografija je izvođena na Gilson instrumentu sa 506 C sistemskim interfejsom, sistemom pumpi Gilson 322 i 156 UV-vis detektorom i Gilson 206 skupljačem frakcija (Gilson, Middleton, Sjedinjene Američke Države), koristeći Varian Omnisphere C₁₈ kolonu (250 × 21,4 mm; veličina čestica 10 μm, Varian, St. Katelijne-Wawer, Belgija).

Hromatografija na koloni izvođena je na stubu silikagela Kiesselgel Merck Typ 9385, 230 – 400 mesh, 60A (Merck, Nemačka). Kao adsorbens je korišćen celit, Celite 545 (Acros Organics, Geel, Belgija).

Hromatografija na tankom sloju silikagela je izvođena na silikagel TLC pločama 60 F₂₅₄ (Merck, Nemačka).

IR spektri su snimani na spektrometru Perkin Elmer FT-IR Spectrometer SPECTRUM 1000.

Jednodimenzionalni (¹H NMR, ¹³C NMR) i dvodimenzionalni NMR spektri, (gHSQC, gHMBC, COSY i NOESY) snimljeni su na Varian Mercury 300 spektrometru. Uzorci su rastvarani u deuterohloroformu (CDCl₃) koristeći tetrametilsilan (Sigma-Aldrich, Bornem, Belgija) kao interni standard.

Maseni spektri i precizna masa (MS) su snimani na Waters LCT Premier XE Orthogonal Acceleration Time Of Flight (TOF) masenom spektrometru. Uzorci su analizirani pri pozitivnom modu elektrosprej jonizacije, ESI⁺ (eng. Electrospray Ionisation).

Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih polifenola, kao i merenje apsorbancije u testovima ispitivanja antioksidantne aktivnosti (FRAP test i ispitivanje neutralizacije DPPH i ·OH radikala) urađeno je na spektrofotometru SPECOL 11 (Carl Zeiss, Jena).

U *in vitro* citotoksičnim testovima, za merenje apsorbancije korišćen je ELISA čitač (eng. ELISA plate reader, Safire2TM, Tecan, Männedorf, Švajcarska) na transparentnim mikrotitracionim pločama sa 96 bazena ravnog dna (Nunc A/S, Roskilde, Danska).

U ispitivanju antinociceptivne aktivnosti, pritisak na zadnje šape pacova („paw pressure“ test) meren je pomoću aparata Hugo Sachs Elektronik (March-Hugstetten, Nemačka).

U ispitivanju antiedematozne aktivnosti, za merenje zapremine šape pacova korišćen je pletizmometar (Ugo Basile, Italija).

3. Izolovanje, određivanje sadržaja i analiza sastava etarskih ulja

3.1. Izolovanje etarskih ulja

Etarska ulja su izolovana iz:

- podzemnih organa (rizom i koren) *L. latifolium* sakupljenih na planini Gučevo, Srbija, oktobra 2008. god., *L. zernyi* sakupljenih na planini Ošljak, Srbija, jula 2008. god., i *L. ochridanum* sakupljenih na planini Galičica, Makedonija, avgusta 2008. god.
- herbi (bez cvasti) *L. zernyi* sakupljenih na planini Jablanica, Makedonija, jula 2006. god., i *L. ochridanum* sakupljenih na planini Galičica, Makedonija, avgusta 2008. god.
- cvasti *L. zernyi* sakupljenih na planini Jablanica, Makedonija, jula 2006. god.
- plodova *L. latifolium* sakupljenih na planini Gučevo, Srbija, oktobra 2008. god., i *L. ochridanum* sakupljenih na planini Galičica, Makedonija, avgusta 2008. god.

Neposredno pre izolovanja etarskih ulja osušen biljni materijal usitnjen je do stepena grubog praška (zbog endogene lokalizacije etarskog ulja).

Etarska ulja su izolovana postupkom destilacije vodenom parom u aparaturi po Clevenger-u, po propisu datom u Ph. Eur. 6, uz dodatak *n*-heksana (1 ml) u bočnu cev. Etarska ulja podzemnih organa i plodova *L. latifolium* dobijena su destilacijom vodenom parom u trajanju od 2 h, dok su etarska ulja *L. ochridanum* i *L. zernyi*, koja su bila obojena plavo od prisutnih azulena, dobijena postupkom koji je trajao 4 h. Zapremina izolovanih etarskih ulja merena je nakon otparavanja *n*-heksana na sobnoj temperaturi.

Sadržaj etarskih ulja određivan je gravimetrijski (*m/m*) i izračunavan prema formuli:

$$\% (m) \text{ etarskog ulja} = b/a \times 100$$

a – masa osušenog biljnog materijala (g);

b – masa etarskog ulja (g).

3.2. GC-FID i GC-MS analiza etarskih ulja

Kvalitativna i kvantitativna analiza etarskih ulja urađena je GC-FID i GC-MS metodama.

Uslovi GC-FID analize:

- gasni hromatograf: SRI 8610C;
- kapilarna kolona DB-5 (30 m × 0,32 mm; debljina filma 0,25 μm);
- FID detektor (280 °C);
- temperatura injektora 280 °C;
- noseći gas helijum (1,2 ml/min);
- temperaturni program 60-280 °C, linearan porast 3 °C/min.

Uslovi GC-MS analize:

- aparat HP 6890- 5973 GC-MS;
- kapilarna kolona HP 5MS (30 m × 0,25 mm; debljina filma 0,25 μm);
- *split-splitless* injektor (200 °C), split mod (1:10);
- temperatura transfer linije 250 °C;
- noseći gas He (1,0 ml/min);

- tehnika jonizacije: EI, 70 eV;
- zapremina injektovanog uzorka 1,0 μ l.

Za GC-FID i GC-MS analizu pripremani su rastvori etarskih ulja u *n*-heksanu (10% V/V).

Identifikacija komponenata analiziranih etarskih ulja izvršena je poređenjem njihovih retencionih vremena, Kovačevih indeksa (RI) i masenih spektara sa odgovarajućim podacima za referentne supstance i/ili jedinjenja iz kompjuterske datoteke (Wiley, NIST/NBS) i literature (Adams, 2001; SDBS). Linearni retencioni indeksi (Kovačevi indeksi, RI) određivani su u odnosu na homologi niz *n*-alkana (C₉-C₂₄) pod istim eksperimentalnim uslovima (Van den Dool i Kratz, 1963).

Procentualni sadržaj pojedinačnih komponenti određivan je metodom normalizacije integrisanih površina pikova.

4. Izrada ekstrakata

Osušen, sprasšen biljni materijal ekstrahovan je u tamnim bocama tokom 48 h uz mešanje u ravnomernim vremenskim intervalima. Odnos droga : ekstrakciono sredstvo iznosio je 1:10 (*m/V*). Posle završene ekstrakcije, vršena je i re-ekstrakcija u toku 48 h, pod istim uslovima. Biljni materijal je ekstrahovan najpre hloroformom, a zatim, nakon filtriranja, na isti način metanolom. Rastvarači su uklonjeni uparavanjem pod sniženim pritiskom.

Mase dobijenih suvih hloroformskih (CHCl₃) i metanolnih (MeOH) ekstrakata koji su korišćeni za dalju analizu, kao i prinos ekstrakcije dati su u Tabeli 10.

Hloroformski ekstrakti su, neposredno pre separacije hromatografijom na koloni silikagela i HPLC analize, rastvarani u metanolu u odnosu 1 : 10 (*m/V*) u ultrazvučnom kupatilu tokom 30 min, i filtrirani u cilju odstranjivanja masti, voskova i drugih lipofilnih materija, koje bi ometale dalju analizu ekstrakata. Za dalju hemijsku analizu korišćeni su u metanolu rastvorljivi delovi hloroformskih ekstrakata.

Tabela 10. Masa i prinos suvih hloroformskih (CHCl₃) i metanolnih (MeOH) ekstrakata ispitivanih vrsta roda *Laserpitium*

Biljna vrsta (lokalitet i vreme sakupljanja)	Biljni organ/deo biljke	Masa biljnog materijala	Masa suvog CHCl ₃ ekstrakta	Prinos suvog CHCl ₃ ekstrakta	Masa suvog MeOH ekstrakta	Prinos suvog MeOH ekstrakta
<i>L. latifolium</i> (Gučevo, 2008. god.)	rizom i koren	632,0 g	31,8 g	5,0%	52,7 g	8,3%
<i>L. latifolium</i> (Basara, 2011. god.)	herba	24,4 g	1,1 g	4,5%	2,1 g	8,6%
<i>L. ochridanum</i> (Galičica, 2009. god.)	rizom i koren	49,4 g	6,1 g	12,4%	6,2 g	12,6%
<i>L. ochridanum</i> (Galičica, 2008. god.)	herba	504,1 g	17,5 g	3,5%	54,8 g	19,9%
<i>L. ochridanum</i> (Galičica, 2008. god.)	plod	75,2 g	8,9 g	11,8%	8,8 g	11,7%
<i>L. zernyi</i> (Ošljak, 2008. god.)	rizom i koren	417,9 g	28,5 g	6,8%	50,2 g	12,0%
<i>L. zernyi</i> (Ošljak, 2008. god.)	herba	522,1 g	18,1 g	3,5%	47,6 g	9,11%
<i>L. zernyi</i> (Jablanica, 2006. god.)	herba	324,1 g	10,1 g	3,1%	41,9 g	12,9%
<i>L. zernyi</i> (Jablanica, 2006. god.)	cvast	289,2 g	7,7 g	2,7%	3,4 g	1,2%

5. Izolovanje sekundarnih metabolita iz hloroformskih ekstrakata podzemnih organa L. latifolium, L. zernyi i L. ochridanum

5.1. Hloroformski ekstrakt podzemnih organa L. latifolium

5.1.1. Hromatografija na stubu silikagela

U cilju izolovanja sekundarnih metabolita iz hloroformskog ekstrakta podzemnih organa *L. latifolium* izvedeno je hromatografsko razdvajanje na stubu silikagela (Kieselgel Merck Typ 9385, 230 – 400 mesh, 60A), dimenzija 65×5 cm. Hloroformski ekstrakt (4,81 g) je prethodno rastvaran u metanolu u toku 30 min u ultrazvučnom kupatilu i filtriran kako bi se uklonile masti, voskovi i druge lipofilne materije, koje bi ometale dalju analizu. Nakon filtriranja, metanol je uklonjen uparavanjem pod sniženim pritiskom. Dobijeni suvi ostatak (4,46 g) rastvoren je u minimalnoj količini metanola, a zatim adsorbovan na celit (19,7 g). Metanol je ponovo uklonjen uparavanjem pod sniženim pritiskom, a suvi ostatak nanet na vrh stuba silikagela. Eluiranje je vršeno gradijent sistemom mobilnih faza sa postupnim povećanjem polarnosti: početo je smešom heksan-etilacetat (EtOAc) u odnosu 5:1 (V/V) do čistog EtOAc, uz dalje eluiranje smešom EtOAc-MeOH, u odnosu 1:1 (V/V) do čistog MeOH. Brzina eluiranja iznosila je 3 ml/min. Prikupljeno je 120 frakcija, zapremine od po 20 ml. Razdvajanje na koloni je praćeno hromatografijom na tankom sloju silikagela (TLC 60 F₂₅₄, 5×3 cm, Merck, Nemačka), korišćenjem mobilne faze identičnog sastava onoj kojom je frakcija eluirana sa kolone. Vanilin-sumporna kiselina reagens korišćen je za posthromatografsku derivatizaciju. Frakcije su spajane na osnovu sličnosti njihovih TLC hromatograma.

Jedinjenje **1** nalazilo se u frakcijama 71-99, dobijenih sa kolone eluiranjem smešom heksan-EtOAc 3:2 (V/V). Zona na TLC hromatogramu koja potiče od jedinjenja **1** boji se smeđecrveno nakon derivatizacije vanilin-sumporna kiselina reagensom.

Jedinjenje **2** je sa kolone eluirano smešom heksan-EtOAc 5:1 (V/V) u frakcijama 63-68. Zona na TLC hromatogramu koja potiče od jedinjenja **2** se boji tamnoplavo nakon derivatizacije vanilin-sumporna kiselina reagensom.

Jedinjenje **3** je sa kolone eluirano u frakcijama 58-64 smešom heksan-EtOAc 5:1 (V/V). Zona na TLC hromatogramu koja potiče od jedinjenja **3** se boji sivo nakon derivatizacije vanilin-sumporna kiselina reagensom.

Jedinjenje **4** sa kolone je eluirano smešom heksan-EtOAc 5:1 (V/V) u frakcijama 34-42. Jedinjenje **4** je na TLC hromatogramu gasilo fluorescenciju na 365 nm, i nije se uočavala obojena zona nakon derivatizacije vanilin-sumporna kiselina reagensom.

5.1.2. Semipreparativna HPLC hromatografija

Semipreparativno prečišćavanje spojenih frakcija eluiranih sa kolone silikagela vršeno je na Gilson semipreparativnom HPLC hromatografu sa UV detektorom i Omnisphere C18 kolonom. Protok mobilne faze bio je 10 ml/min, zapremina injektovanja 250 µl, a detekciona talasna dužina 225 nm.

Frakcije 71-99 u kojima se nalazilo jedinjenje **1** su spojene i eluent je uparen pod sniženim pritiskom. Suvi ostatak je rastvoren u metanolu u koncentraciji 50 mg/ml i prečišćavan u semipreparativnom HPLC sistemu, uz izokratsko eluiranje (70% MeOH : 30% H₂O). Nakon spajanja odgovarajućih frakcija, rastvarač je uklonjen pod sniženim pritiskom, a jedinjenje **1** (1577,8 mg) je iskristalisalo u obliku igličastih kristala.

Suvi ostatak dobijen nakon spajanja frakcija 63-68 i uparavanja eluenta pod sniženim pritiskom, rastvoren je u metanolu u koncentraciji 50 mg/ml i prečišćavan u semipreparativnom HPLC sistemu, uz izokratsko eluiranje (75% MeOH : 25% H₂O). Nakon uparavanja rastvarača pod sniženim pritiskom, dobijeno je 90,8 mg bezbojne tečnosti (jedinjenje **2**).

Frakcije 58-63 u kojima se nalazilo jedinjenje **3** su spojene, i eluent je uparen pod sniženim pritiskom. Suvi ostatak je rastvoren u metanolu u koncentraciji 35 mg/ml i prečišćavan u semipreparativnom HPLC sistemu, uz izokratsko eluiranje (72% MeOH : 28% H₂O). Nakon uparavanja rastvarača pod sniženim pritiskom dobijeno je 66,1 mg bezbojne tečnosti (jedinjenje **3**).

Nakon spajanja frakcija 34-42 u kojima se nalazilo jedinjenje **4**, i uparavanja eluenta pod sniženim pritiskom, dobijen je suvi ostatak, koji je rastvoren u metanolu u koncentraciji 20 mg/ml i prečišćavan u semipreparativnom HPLC sistemu, uz izokratsko eluiranje (50% MeOH : 50% H₂O). Nakon uparavanja rastvarača pod sniženim pritiskom dobijeno je 56,8 mg beličaste amorfne supstance (jedinjenje **4**).

5.2. Hloroformski ekstrakt podzemnih organa *L. zernyi*

5.2.1. Hromatografija na stubu silikagela

U cilju izolovanja sekundarnih metabolita iz hloroformskog ekstrakta podzemnih organa *L. zernyi*, izvršeno je hromatografsko razdvajanje na stubu silikagela (Kieselgel Merck Typ 9385, 230 – 400 mesh, 60A), dimenzija 65×5 cm. Hloroformski ekstrakt (5,16 g) je prethodno rastvaran u metanolu u toku 30 min u ultrazvučnom kupatilu i filtriran. Nakon filtriranja, metanol je uparen pod sniženim pritiskom. Dobijeni suvi ostatak (4,76 g) rastvoren je u minimalnoj količini metanola, a zatim adsorbovan na celit (21,2 g). Metanol je uklonjen uparavanjem pod sniženim pritiskom, a suvi ostatak nanet na stub silikagela. Kolona je eluirana gradijent sistemom mobilnih faza sa postupnim povećanjem polarnosti: početo je smešom heksan-etilacetat (EtOAc) u odnosu 5:1 (V/V) do čistog EtOAc, uz dalje eluiranje smešom EtOAc-MeOH, u odnosu 1:1 (V/V) do čistog metanola. Brzina eluiranja iznosila je 1 ml/min. Prikupljeno je 135 frakcija, zapremine od po 20 ml. Razdvajanje na koloni praćeno je hromatografijom na tankom sloju silikagela (TLC 60 F₂₅₄, 5×3 cm, Merck, Nemačka), korišćenjem mobilne faze identičnog sastava onoj kojom je frakcija eluirana sa kolone. Vanilin-sumporna kiselina reagens korišćen je za posthromatografsku derivatizaciju. Frakcije su spajane na osnovu sličnosti njihovih TLC hromatograma.

Jedinjenje **5** je sa kolone eluirano smešom heksan-EtOAc 3:2 (V/V) u frakcijama 81-90, zajedno sa još nekim terpenskim jedinjenjima. Zona na TLC hromatogramu koja potiče od jedinjenja **5** se bojila mrkocrveno nakon derivatizacije vanilin-sumporna kiselina reagensom.

Jedinjenje **6** je sa kolone eluirano smešom heksan-EtOAc 5:1 (V/V) u frakcijama 71-78, zajedno sa jedinjenjem **8**. Zona na TLC hromatogramu koja potiče od jedinjenja **6** bojila se mrkosmeđe nakon derivatizacije vanilin-sumporna kiselina reagensom.

Jedinjenje **7** je sa kolone eluirano u frakcijama 80-88 smešom heksan-EtOAc 3:2 (V/V). Zona na TLC hromatogramu koja potiče od jedinjenja **7** bojila se mrkosmeđe nakon derivatizacije vanilin-sumporna kiselina reagensom.

Jedinjenje **8** je sa kolone eluirano u frakcijama 71-78 smešom heksan-EtOAc 5:1 (V/V), zajedno sa jedinjenjem **6**. Na TLC hromatogramu, zona koja potiče od jedinjenja **8** bojila se smeđe nakon derivatizacije vanilin-sumporna kiselina reagensom.

Jedinjenje **9** je sa kolone eluirano u frakcijama 99-105 smešom heksan-EtOAc 3:2 (V/V). Na TLC hromatogramu nakon derivatizacije vanilin-sumporna kiselina reagensom, zona koja potiče od jedinjenja **9** bojila se crveno.

Jedinjenje **10** eluirano je sa kolone u frakcijama 90-98 smešom heksan-EtOAc 3:2 (V/V). Zona na TLC hromatogramu koja potiče od jedinjenja **10** bojila se mrkosmeđe nakon derivatizacije vanilin-sumporna kiselina reagensom.

Jedinjenje **11** je sa kolone eluirano u frakcijama 91-95 smešom heksan-EtOAc 3:2 (V/V), zajedno sa jedinjenjem **10**. Zona na TLC hromatogramu koja potiče od jedinjenja **11** bojila se smeđe nakon derivatizacije vanilin-sumporna kiselina reagensom.

5.2.2. Semipreparativna HPLC hromatografija

Semipreparativno prečišćavanje spojenih frakcija eluiranih sa kolone silikagela, u cilju izolovanja jedinjenja **5-11**, vršeno je na Gilson semipreparativnom HPLC hromatografu sa UV detektorom i Omnisphere C18 kolonom. Protok mobilne faze bio je 10 ml/min, zapremina injektovanja 250 µl, a detekciona talasna dužina 225 nm.

Frakcije 81-90 u kojima su se nalazila jedinjenja **5** i **7** su spojene, eluent je uparen pod sniženim pritiskom, a dobijeni suvi ostatak rastvoren u metanolu u koncentraciji 50 mg/ml. Ovako dobijen rastvor je prečišćavan u semipreparativnom HPLC sistemu. Komponente su razdvajane izokratskim eluiranjem (73% MeOH : 27% H₂O). Prikupljene su frakcije koje sadrže jedinjenje **5**, odnosno jedinjenje **7**. Nakon uklanjanja rastvarača uparavanjem pod sniženim pritiskom dobijeno je 117,3 mg jedinjenja **5** u obliku igličastih, bezbojnih kristala i 226,6 mg jedinjenja **7** u obliku beličastog praška.

U suvom ostatku koji je dobijen spajanjem frakcija 71-78 i uparavanjem eluenta pod sniženim pritiskom, nalazila su se jedinjenja **6** i **8**. Ostatak je rastvoren u metanolu u koncentraciji 50 mg/ml, pa potom izokratski eluiran (35% MeCN* : 35% MeOH : 30% H₂O) u semipreparativnom HPLC sistemu. Iz odgovarajućih frakcija, nakon uparavanja rastvarača pod sniženim pritiskom, dobijeno je 346,6 mg beličastog praška (jedinjenje **6**) i 136,1 mg bezbojne tečnosti (jedinjenje **8**).

Frakcije 99-105 u kojima se nalazilo jedinjenje **9** su spojene i eluent uparen pod sniženim pritiskom. Suvi ostatak je rastvoren u metanolu u koncentraciji 50 mg/ml.

* MeCN – acetonitril

Ovako dobijen rastvor je injektovan na semipreparativnu HPLC kolonu i eluiran izokratski (65% MeOH : 35% H₂O). Nakon uparavanja rastvarača pod sniženim pritiskom dobijeno je 142,2 mg bezbojnih igličastih kristala (jedinjenje **9**).

Nakon spajanja frakcija 90-98 u kojima se nalazilo jedinjenje **10** kao glavna komponenta i jedinjenje **11** u nižoj koncentraciji, eluent je uparen pod sniženim pritiskom. Suvi ostatak je rastvoren u metanolu u koncentraciji 50 mg/ml. Ovako pripremljen uzorak dalje je razdvajan u semipreparativnom HPLC sistemu, uz izokratsko eluiranje (65% MeOH : 35% H₂O). Nakon uparavanja rastvarača pod sniženim pritiskom dobijeno je 440,0 mg bezbojne tečnosti koja se lepila po zidovima suda (jedinjenje **10**) i 6,7 mg bezbojne tečnosti (jedinjenje **11**).

5.3. Hloroformski ekstrakt podzemnih organa *L. ochridanum*

5.3.1. Hromatografija na stubu silikagela

Hloroformski ekstrakt podzemnih organa *L. ochridanum* bio je kompleksnijeg sastava u odnosu na hloroformski ekstrakt podzemnih organa *L. zernyi*. U ovom ekstraktu utvrđeno je prisustvo svih komponenata koje su izolovane iz ekstrakta podzemnih organa *L. zernyi* (jedinjenja **5-10**), kao i još nekoliko drugih jedinjenja. U cilju izolovanja onih komponenata koje nisu bile izolovane iz ekstrakta *L. zernyi*, izvršeno je hromatografsko razdvajanje hloroformskog ekstrakta podzemnih organa *L. ochridanum* na stubu silikagela (Kieselgel Merck Typ 9385, 230 – 400 mesh, 60A), dimenzija 40×4 cm. Hloroformski ekstrakt (2,61 g) je prethodno rastvaran u metanolu u toku 30 min u ultrazvučnom kupatilu i filtriran. Nakon filtriranja, metanol je uparen pod sniženim pritiskom. Dobijeni suvi ostatak (2,22 g) rastvoren je u minimalnoj količini metanola, a zatim adsorbovan na celit (10,8 g). Metanol je uklonjen uparavanjem pod sniženim pritiskom, a suvi ostatak nanet u kolonu silikagela. Kolona je eluirana gradijent sistemom mobilnih faza sa postupnim povećanjem polarnosti: početo je smešom heksan-etilacetat (EtOAc) u odnosu 5:1 (V/V) do čistog EtOAc, uz dalje eluiranje smešom EtOAc-MeOH, u odnosu 1:1 (V/V) do čistog metanola. Brzina eluiranja iznosila je 1 ml/min. Prikupljeno je 135 frakcija, zapremine od po 20 ml. Razdvajanje na koloni praćeno je hromatografijom na tankom sloju silikagela (TLC 60 F₂₅₄, 5×3 cm, Merck, Nemačka), korišćenjem mobilne faze identičnog sastava onoj

kojom je frakcija eluirana sa kolone. Vanilin-sumporna kiselina reagens korišćen je za posthromatografsku derivatizaciju.

Jedinjenje **12** je sa kolone silikagela eluirano u frakcijama 64-74, mobilnom fazom heksan-EtOAc 5:1 (V/V). Zona koja potiče od jedinjenja **12** se nakon derivatizacije vanilin-sumporna kiselina reagensom bojila crvenkasto.

Jedinjenja **13**, **14** i **15** su sa kolone silikagela eluirana smešom heksan-EtOAc 3:2 (V/V) u frakcijama 93-98. Odgovarajuće zone jedinjenja **13**, **14** i **15** na TLC hromatogramu su se nakon derivatizacije vanilin-sumporna kiselina reagensom bojile crvenkasto, smeđocrveno i crveno, redom.

Jedinjenje **16** se nalazilo u frakcijama 99-101, prikupljenim eluiranjem kolone silikagela smešom heksan-EtOAc 3:2 (V/V). Zona na TLC hromatogramu koja potiče od jedinjenja **16** bojila se mrkocrveno nakon derivatizacije vanilin-sumporna kiselina reagensom.

Jedinjenje **17** se nalazilo u frakcijama 48-51, dobijenim eluiranjem kolone silikagela smešom heksan-EtOAc 5:1 (V/V). Na TLC hromatogramu, nakon derivatizacije vanilin-sumporna kiselina reagensom, zona koja potiče od jedinjenja **17** bojila se mrkocrveno.

Jedinjenje **18** je sa kolone silikagela eluirano smešom mobilnih faza heksan-EtOAc 5:1 (V/V), u frakcijama 57-60. Zona na TLC hromatogramu koja potiče od jedinjenja **18**, nakon derivatizacije vanilin-sumporna kiselina reagensom bojila se mrkocrveno.

5.3.2. Semipreparativna HPLC hromatografija

Semipreparativno prečišćavanje spojenih frakcija eluiranih sa kolone silikagela, u cilju izolovanja jedinjenja **12-18**, vršeno je na Gilson semipreparativnom HPLC hromatografu sa UV detektorom i Omnisphere C18 kolonom. Protok mobilne faze bio je 10 ml/min, zapremina injektovanja 100 µl, a detekciona talasna dužina 225 nm.

U suvom ostatku koji je dobijen nakon spajanja frakcija 64-74 i uparavanja eluenta pod sniženim pritiskom, nalazilo se jedinjenje **12**. Ostatak je rastvoren u metanolu u koncentraciji 10 mg/ml, a zatim prečišćavan u semipreparativnom HPLC sistemu, uz izokratsko eluiranje (70% MeOH : 30% H₂O). Nakon uparavanja rastvarača pod sniženim pritiskom dobijeno je 5,1 mg beličaste čvrste supstance (jedinjenje **12**).

Frakcije 93-98 u kojima su se nalazila jedinjenja **13**, **14** i **15** su spojene i eluent uparen pod sniženim pritiskom. Suvi ostatak je rastvoren u metanolu u koncentraciji 20 mg/ml. Ovako dobijen rastvor je injektovan na semipreparativnu HPLC kolonu i eluiran izokratski (35% MeCN : 35% MeOH : 30% H₂O). Iz prikupljenih frakcija koje sadrže izolovana jedinjenja, rastvarač je uklonjen pod sniženim pritiskom. Dobijeno je 14,2 mg jedinjenja **13** u obliku finog kristalnog praška, 7,8 mg jedinjenja **14** u obliku beličastog kristalnog praška i 7,6 mg jedinjenja **15** u obliku bezbojne čvrste supstance.

U suvom ostatku koji je dobijen nakon spajanja frakcija 99-101 i uparavanja eluenta pod sniženim pritiskom, nalazilo se jedinjenje **16**. Suvi ostatak je rastvoren u metanolu u koncentraciji 10 mg/ml i prečišćavan u semipreparativnom HPLC sistemu, uz izokratsko eluiranje (60% MeOH : 40% H₂O). Nakon uparavanja rastvarača pod sniženim pritiskom dobijeno je 6,4 mg čvrste bezbojne supstance (jedinjenje **16**).

Suvi ostatak dobijen nakon spajanja frakcija 48-51 i uparavanja eluenta pod sniženim pritiskom, rastvoren je u metanolu u koncentraciji 10 mg/ml i prečišćavan u semipreparativnom HPLC sistemu, uz izokratsko eluiranje (60% MeOH : 40% H₂O). Nakon uparavanja rastvarača pod sniženim pritiskom, dobijeno je 8,3 mg bezbojne čvrste supstance (jedinjenje **17**).

Frakcije 57-60 u kojima se nalazilo jedinjenje **18** su spojene i eluent uparen pod sniženim pritiskom. Suvi ostatak je rastvoren u metanolu u koncentraciji 10 mg/ml i prečišćavan u semipreparativnom HPLC sistemu, uz izokratsko eluiranje (70% MeOH : 30% H₂O). Nakon uparavanja rastvarača pod sniženim pritiskom dobijeno je 8,9 mg beličaste praškaste supstance (jedinjenje **18**).

6. HPLC analiza hloroformskih ekstrakata *L. latifolium*, *L. zernyi* i *L. ochridanum*

U metanolu rastvorljivi delovi hloroformskih ekstrakata podzemnih organa (koren i rizom) i herbi svih odabranih vrsta roda *Laserpitium*, kao i cvasti *L. zernyi* i ploda *L. ochridanum* analizirani su tečnom hromatografijom (HPLC) sa DAD detektorom (Waters 2695 Alliance uređaj i 996 Photodiode Array detektor), metodom koja je optimizovana za razdvajanje terpenoida. Uzorci su rastvarani u metanolu, a potom profiltrirani kroz membranski filter (0,45 µm). Brzina protoka mobilne faze bila je 0,7 ml/min; radna temperatura 35 °C, zapremina injektovanja 20 µl, a talasna dužina detekcije 225 nm. Sastav mobilne faze ovog gradijent sistema dat je u Tabeli 11, pri čemu je

- eluent A: 0,025% HCOOH u H₂O
- eluent B: 0,025% HCOOH u smeši MeCN i MeOH 50 : 50 (V/V).

Dalje je, u istom sistemu i pod istim eksperimentalnim uslovima, izvršena kvantifikacija prethodno izolovanih i strukturno okarakterisanih komponenata, koristeći izolovana jedinjenja kao eksterne standarde, u opsegu koncentracija 0,06-1,00 mg/ml. Linearnost kalibracionih krivih je potvrđena odgovarajućim faktorima korelacije.

Tabela 11. Režim eluiranja (gradijent sistem) optimizovan za razdvajanje terpenoida (daukanskih estara i seskviterpenskih laktona) u metanolu rastvorljivih delova hloroformskih ekstrakata odabranih vrsta roda *Laserpitium*

Vreme (min)	Gradijent A (%)	Gradijent B (%)
0	35	65
3	35	65
25	15	85
28	0	100
30	0	100
32	35	65
35	35	65

7. Određivanje ukupnih polifenola u metanolnim ekstraktima cvasti i herbe

L. zernyi

Sadržaj ukupnih polifenola određivan je u metanolnim ekstraktima cvasti i herbe *L. zernyi*, koji su dobijeni ekstrakcijom biljnog materijala sakupljenog na planini Jablanica (Makedonija) u julu 2006. god.

Spektrofotometrijsko određivanje sadržaja ukupnih polifenola zasniva na reakciji polifenolnih jedinjenja sa Folin-Ciocalteu (FC) reagensom (fosfomolibdovolframova kiselina) u baznoj sredini, pri čemu polifenoli redukuju W^{6+} -jon do W^{4+} -jona i Mo^{6+} -jon do Mo^{4+} jona (volfram molibdensko plavo), a sami se oksiduju do *o*-hinona (Velioglu i sar., 1998; Petrović i sar., 2009).

Metanolni ekstrakti cvasti i herbe *L. zernyi* rastvoreni su u metanolu u koncentraciji 1 mg/ml. Po 100 μ l ovako pripremljenih rastvora pomešano je sa 750 μ l 10 puta razblaženog komercijalnog FC reagensa i ostavljeno na 22 °C u toku 5 min. Zatim je dodato 750 μ l rastvora Na_2CO_3 (60 g/l). Posle 90 min merena je apsorbancija rastvora na 725 nm. Rezultati su izraženi kao % galne kiseline, odnosno mg galne kiseline/100 mg suvog ekstrakta.

8. HPLC analiza metanolnih ekstrakata cvasti i herbe *L. zernyi*

Metanolni ekstrakti cvasti i herbe *L. zernyi* prikupljeni na planini Jablanica (Makedonija) analizirani su tečnom hromatografijom sa DAD detektorom. Radni protok mobilne faze na 35 °C bio je 0,7 ml/min, a talasne dužine na kojima su detektovane komponente 250, 320, 330, 350 i 370 nm. Svi ekstrakti su analizirani u sistemu optimizovanom za separaciju polifenola (flavonoida i fenolkarboksilnih kiselina). Sastav mobilnih faza ovog gradijent sistema dat je u Tabeli 12. Eluent A predstavlja 0,033% H_3PO_4 u H_2O , dok je eluent B 10% eluenta A u MeCN.

Pri istim eksperimentalnim uslovima izvedena je i kvantitativna analiza koristeći metodu eksternog standarda. Kao eksterni standardi korišćeni su komercijalni standardi jedinjenja identifikovanih u ekstraktima. Opsezi koncentracija eksternih standarda bili su: 0,50-4,00 mg/ml za apigenin; 0,25-2,00 mg/ml za apigenin 7-O-glukozid, luteolin 7-O-glukozid i luteolin, i 1,00-10,00 mg/ml za hlorogensku kiselinu. Linearnost kalibracionih krivih je potvrđena odgovarajućim faktorima korelacije.

Tabela 12. Režim eluiranja (gradijent sistem) optimizovan za separaciju polifenola (flavonoida i fenolkarboksilnih kiselina)

Vreme (min)	Gradijent A (%)	Gradijent B (%)
0	90	10
5	75	25
15	75	25
20	70	30
25	50	50
30	30	70
35	90	10

9. Ispitivanje antioksidantne aktivnosti

Veliki broj patoloških procesa kao što su kardiovaskularna oboljenja, neurodegenerativni procesi i poremećaji imunskog sistema, kao i sam proces fiziološkog starenja su posledica oksidativne degradacije aminokiselina, razgradnje peptida usled reakcije sa slobodnim radikalima i razgradnje ćelijskih membrana usled peroksidacije lipida. Slobodni radikali su atomi, molekuli ili joni sa nesparenim elektronima koji su izuzetno nestabilni i lako stupaju u reakciju sa biomolekulima. Potiču od tri elementa: kiseonika, azota i sumpora, od kojih nastaju reaktivni kiseonični radikali (eng. Reactive Oxygen Species – ROS), reaktivni azotni radikali (eng. Reactive Nitrogen Species – RNS) i reaktivni sumporni radikali (eng. Reactive Sulfur Species – RSS). Reaktivni kiseonični radikali su najviše proučavani, i tu spadaju superoksidni anjon ($O_2^{\cdot-}$), vodonik-peroksidni radikal (HO_2^{\cdot}), hidroksi radikal ($\cdot OH$), azot-monoksid (NO), vodonik-peroksid (H_2O_2) i dr.

Dovođenjem nekih od najučestalijih poremećaja i bolesti u vezu sa oksidativnim stresom, povećano je interesovanje za ispitivanje prirodnih jedinjenja sa antioksidantnim svojstvima. Danas se zna da su mnogi predstavnici iz klase polifenola, kao što su flavonoidi, antocijanidini, katehini, oligomerni proantocijanidini i fenolkarboksilne kiseline nosioci antioksidantnog dejstva, primenjeni u određenim koncentracijama (Carocho i Ferreira, 2013).

Za ispitivanje antioksidantne aktivnosti metanolnih ekstrakata cvasti i herbe *L. zernyi* korišćena su tri *in vitro* testa:

- FRAP test, koji se koristi za određivanje ukupne antioksidantne aktivnosti;
- DPPH test, kojim se određuje sposobnost neutralizacije DPPH radikala i

- 2-dezoksiriboza test, za ispitivanje sposobnosti neutralizacije $\cdot\text{OH}$ radikala.

9.1. Ispitivanje ukupnog antioksidantnog potencijala – FRAP test

FRAP test (eng. Ferric Reducing Antioxidant Power) se koristi za određivanje ukupnog antioksidantnog potencijala, a zasniva se na redukciji Fe^{3+} - TPTZ kompleksa (Fe^{3+} -2,4,6-tripiridil-S-triazin) do plavo obojenog Fe^{2+} oblika, čiji se intenzitet boje meri na 593 nm (Szöllösi i Szöllösi Varga, 2002; Luximon-Ramma i sar., 2002).

Postupak

Uzeto je 5 μl i 10 μl rastvora ekstrakta cvasti *L. zernyi* (5 mg/ml) u metanolu, i 10 μl i 20 μl rastvora ekstrakta herbe *L. zernyi* (5 mg/ml) u metanolu. Svaka od zapremina je dopunjena do 100 μl odgovarajućom količinom metanola, i u tako pripremljene rastvore je dodato po 3 ml FRAP reagensa. Apsorbancija je merena posle 5 min na 593 nm, a kao slepa proba (rastvor za kompenzaciju) korišćen je FRAP reagens.

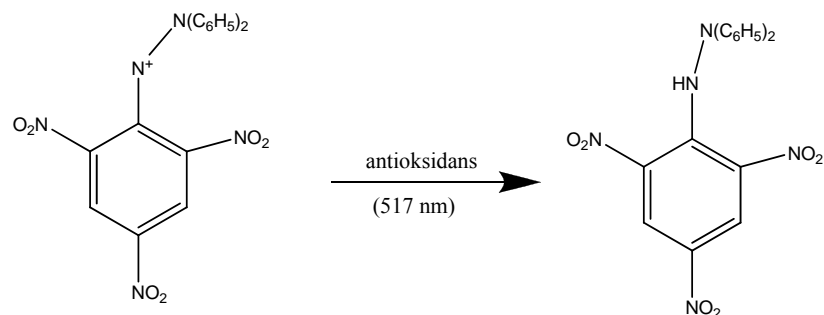
Priprema FRAP reagensa

Pomeša se 25 ml acetatnog pufera (300 mM, pH=3,6) sa 2,5 ml rastvora TPTZ (10 mM TPTZ u 40 mmol/l HCl) i 2,5 ml FeCl_3 (20 mM u vodi).

Rezultati se izražavaju kao $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{mg}$ suvog ekstrakta (FRAP vrednost), a za izračunavanje ovih vrednosti koriste se kalibracione krive konstruisane pomoću rastvora FeSO_4 u opsegu koncentracija 100-1000 $\mu\text{mol/l}$. Aktivnost ekstrakata je upoređivana sa aktivnošću L-askorbinske kiseline.

9.2. Ispitivanje sposobnosti neutralizacije DPPH radikala – DPPH test

Princip testa je merenje intenziteta promene boje ljubičastog 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikala u reakciji sa „scavenger“-ima slobodnih radikala do žuto obojenog difenilpikrilhidrazina. Ova promena boje predstavlja meru jačine antiradikalske aktivnosti i određuje se spektrofotometrijski, na 517 nm (Slika 11) (Cuendet i sar., 1997).



Slika 11. Redukcija stabilnog ljubičasto obojenog DPPH radikala u prisustvu antioksidansa, pri čemu nastaje žuto obojeni difenilpikrilhidrazin

Postupak

Metanolni ekstrakti herbe i cvasti *L. zernyi* rastvoreni su u metanolu u koncentracijama 5,14 mg/ml i 5,10 mg/ml, redom. Korišćeno je po 2,5 ml ovako pripremljenih rastvora. Svakom od uzoraka dodato je po 1 ml 0,5 mM metanolnog rastvora DPPH. Smeše su potom snažno promućkane i ostavljene 30 min u mraku na sobnoj temperaturi. Apsorbancije su merene na 517 nm, uz metanol kao slepu probu (poredbeni rastvor), a kao kontrola je korišćen 1 ml 0,5 mM metanolnog rastvora DPPH kome je dodato 2,5 ml metanola.

Neutralizacija DPPH radikala se izračunava korišćenjem sledeće formule:

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

gde je A_k apsorbancija kontrole, a A_a apsorbancija analize.

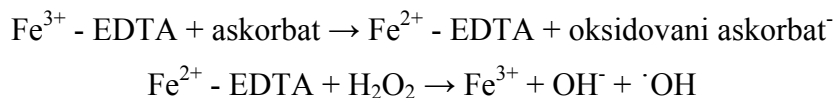
Rezultati se izražavaju kao neutralizacija DPPH radikala (%) i kao SC_{50} vrednost ($\mu\text{g/ml}$), odnosno kao koncentracija uzorka koja dovodi do 50% neutralizacije DPPH radikala.

9.3. Ispitivanje sposobnosti neutralizacije $\cdot\text{OH}$ radikala – 2-Dezoksiriboza test

Smatra se da je ovo jedan od najčešće formiranih slobodnih radikala u ljudskom organizmu i nastaje u reakciji:



2-Dezoksiriboza test se koristi za procenu sposobnosti neutralizacije $\cdot\text{OH}$ radikala, a princip reakcije je razgradnja 2-dezoksiriboze posredstvom $\cdot\text{OH}$ radikala, nastalog iz vodonik-peroksida u askorbat/ Fe^{2+} indukovanoj reakciji:



$\cdot\text{OH}$ radikal se vezuje za 2-dezoksiribozu i dovodi do njene razgradnje. Proizvodi ove reakcije reaguju dalje sa tiobarbiturnom kiselinom gradeći purpurno obojene komplekse sa apsorpcionim maksimumom na 532 nm (Lee i Lim, 2000).

Priprema reagensa

Reagens se priprema od sledećih sastojaka:

fosfatni pufer (pH=7,4, I=0,1)

EDTA (0,004 M)

FeCl_3 (0,004 M)

2-dezoksiriboza (0,05 M)

H_2O_2 (1,5%)

L-askorbinska kiselina (0,004 M)

trihlorsirćetna kiselina (TCA, 2,8% u vodi)

tiobarbiturna kiselina (TBA, 1% u 0,05 M NaOH).

Postupak

Metanolni ekstrakti *L. zernyi* su rastvoreni u metanolu u određenim koncentracijama (ekstrakt herbe u koncentraciji 39,11 mg/ml i ekstrakt cvasti u koncentraciji 38,15 mg/ml), i po 20 μl ovako pripremljenih rastvora je korišćeno za pripremu rastvora opadajućih koncentracija koji su dalje korišćeni u testu.

Svaka reakciona smeša je sadržavala reagense (u finalnim koncentracijama): FeCl_3 (100 μM), EDTA (100 μM), H_2O_2 (2,2 mM), 2-dezoksiriboza (2,5 μM) i L-askorbinska kiselina (100 μM).

Fosfatni pufer (pH = 7,4; I = 0,1), dodat je do konačne zapremine od 4 ml. Mešavine su inkubirane 60 min na 37 °C, zatim je u svaku smešu dodato po 1 ml 1% (m/V) tiobarbiturne kiseline (TBA) u 0,05 M NaOH i po 1 ml 2,8% (m/V) trihlorsirćetne

kiseline (TCA), a smeše su potom zagrevane 15 min na 100 °C. Nakon hlađenja na ledu merena je apsorbancija rastvora na 532 nm, u odnosu na odgovarajuću slepu probu (rastvor za kompenzaciju) i kontrolu (Lee i Lim, 2000).

Procenat neutralizacije se izračunava prema formuli:

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

gde je A_k apsorbancija kontrole, a A_a apsorbancija analize.

Rezultati se izražavaju kao neutralizacija ·OH radikala (%) i kao SC_{50} vrednost ($\mu\text{g/ml}$), odnosno kao koncentracija uzorka koja dovodi do 50% neutralizacije ·OH radikala.

10. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti

Etarska ulja su kompleksne smeše isparljivih sastojaka, i nastaju procesima sekundarnog metabolizma u biljnim tkivima. Etarska ulja se od davnina koriste zbog svojih baktericidnih, virucidnih, fungicidnih, antiparazitskih i insekticidnih svojstava. Takođe, neka etarska ulja, kao i droge koje ih sadrže (aromatične droge), koriste se kao začini za poboljšanje arome i konzerviranje hrane, ali i za saniranje manjih rana i infekcija. Biološka aktivnost etarskog ulja donekle je određena prisutnim glavnim komponentama, ali sinergistički efekat pojedinih komponenti koje su prisutne u manjim koncentracijama nije zanemariv (Bakkali i sar., 2008; Ulrich-Merzenich i sar., 2010).

Antimikrobno dejstvo etarskih ulja potvrđeno je *in vitro* na velikom broju patogenih Gram(+) i Gram(–) bakterija, virusima i gljivama, uključujući i kvasce. Ispitivanja su pokazala da su mikroorganizmi koji se brzo dele osetljiviji na dejstvo etarskih ulja, a generalno jači antimikrobni efekat pokazuju etarska ulja sa većim sadržajem fenola, aldehida i alkohola (Bakkali i sar., 2008).

Za utvrđivanje antimikrobne aktivnosti etarskih ulja izolovanih iz odabranih vrsta roda *LasERPitium*, kao i metanolnih ekstrakata cvasti i herbe *L. zernyi* korišćeni su *in vitro* testovi: agar difuzioni (Acar i Goldstein, 1996) i bujon mikrodilucioni (Candan i sar., 2003).

Standardni sojevi mikroorganizama

U eksperimentalnom radu korišćeni su standardni mikroorganizmi iz kolekcija:

- ATCC (American Type of Culture Collection)
- NCIMB (National Collection of Industrial Bacteria, Aberdeen).

Svi standardni sojevi su nabavljeni iz Instituta za imunologiju i virusologiju Torlak u Beogradu.

Ispitivanje antimikrobne aktivnosti etarskih ulja sprovedeno je na sedam standardnih sojeva bakterija.

Gram(+) bakterije:

- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228
- *Micrococcus luteus* ATCC 9341
- *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

Gram(-) bakterije:

- *Escherichia coli* ATCC 25922
- *Klebsiella pneumoniae* NCIMB 9111
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Ispitivanje je, takođe, sprovedeno na dva standardna soja kandidate:

- *Candida albicans* ATCC 10259
- *Candida albicans* ATCC 24433.

Antibakterijska aktivnost metanolnih ekstrakata ispitivana je na osam sojeva bakterija: sedam navedenih i Gram(+) soju *Bacillus subtilis* ATCC 6633. Antifungalna aktivnost takođe je ispitivana na dva navedena soja kandidate.

Kultivacija mikroorganizama

Sve bakterije korišćene u eksperimentima prvo su presejane u 10 ml hranljive Müller-Hinton bujon podloge i dalje inkubirane na 37 °C. Posle 24 h bakterije su presejane na 10 ml sveže tečne podloge, pa inkubirane 18 h. Dobijena kultura mikroorganizama presejana je na agar.

Identičan postupak korišćen je pri kultivaciji sojeva *C. albicans*, ali je u tom slučaju korišćen Sabouraud bujon.

Standardni antibiotici

Standardne antibiogram tablete proizvedene su u Institutu za imunologiju i virusologiju Torlak iz Beograda. Korišćeni su sledeći antibiotici:

- ampicilin (10 µg/disk)

- amikacin (30 µg/disk)
- nistatin (100 IJ/disk).

10.1. Bujon mikrodilucioni test

Minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) etarskih ulja i metanolnih ekstrakata određena je primenom bujon mikrodilucionog testa (Candan i sar., 2003) u mikrotitracionim pločama sa ravnim dnom i 96 mesta.

Korišćene su osamnaestočasovne kulture navedenih bakterijskih sojeva (gustine 5×10^5 bakterija/ml) u Müller-Hinton bujonu (za ispitivane bakterijske sojeve) i Sabouraud bujonu (za dva soja kandidate) sa dodatkom Tween 80 (finalna koncentracija 0,5% V/V). Za ispitivanje su korišćeni rastvori etarskih ulja u dimetilsulfoksidu (DMSO) i rastvori ekstrakata u MeOH.

Etarska ulja ispitivana su u pogledu antimikrobnog dejstva u pet koncentracija u rasponu od 2,0-146,0 µg/ml, a metanolni ekstrakti herbe, odnosno cvasti vrste *L. zernyi* u pet koncentracija u rasponu od 31,3-500,0 µg/ml. Pozitivnu kontrolu su predstavljale bakterije inkubirane sa odgovarajućom količinom DMSO, odnosno MeOH.

Ploče su inkubirane u termostatu u aerobnoj atmosferi na 37 °C u toku 24 h za bakterije, odnosno na 30 °C u toku 48 h za dva soja kandidate. Nakon toga je semikvantitativno očitavan porast broja mikroorganizama na osnovu zamućenja tečne podloge i formiranja taloga na dnu bazenčića.

10.2. Agar difuzioni test

Agar difuzioni test (Acar i Goldstein, 1996) kojim je takođe ispitivana antimikrobna aktivnost etarskih ulja cvasti i herbe *L. zernyi*, izveden je na Müller-Hinton agaru debljine 4 mm (za bakterijske sojeve) i Sabouraud agaru (za kandidu). Navedene podloge zasejane su inokulumom gustine 10^6 bakterija, odnosno gljiva/ml, u cilju postizanja semikonfluentnog rasta.

Etarska ulja su nanošena na diskove, a kao standardi, odnosno kontrola osetljivosti mikroorganizama korišćeni su diskovi ampicilina (10 µg/disk), amikacina (30 µg/disk), kao i nistatina (100 IJ/disk) za dva soja kandidate.

Na zasejane podloge naneti su diskovi sa uzorcima etarskog ulja, a ispitivanja za svaki uzorak su rađena u triplikatu. Inkubacija je vršena u aerobnim uslovima 18 h na 37 °C za bakterije, odnosno 48 h na 26 °C za dva soja kandidate, a potom su mereni dijometri zona inhibicije u mm.

11. Ispitivanje citotoksične aktivnosti

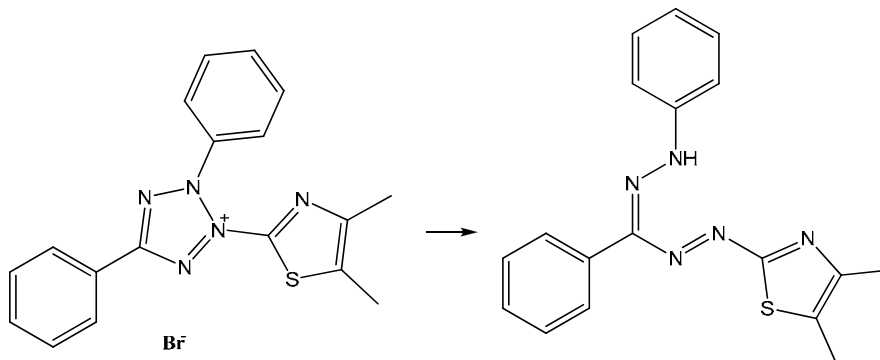
Ćelijske linije

U testovima ispitivanja citotoksične aktivnosti korišćene su dve ćelijske linije humanog adenokarcinoma dojke, invazivni (MCF 7/6) i neinvazivni tip (MCF 7/AZ). Ćelijske linije je obezbedila Laboratorija za eksperimentalna istraživanja karcinoma, Univerzitetske Bolnice u Gentu, Belgija (eng. Experimental Cancer Research, Ghent University Hospital, Belgija). Ćelije su kultivisane u medijumu dobijenom mešanjem jednakih zapremina Dulbecco modifikovanog Eagle medijuma i Ham F12 medijuma (DMEM/F12, Invitrogen, Merelbeke, Belgija) sa L-glutaminom u koji je dodato 10% fetalnog govedeg seruma, FBS (Greiner Bio-One, Wemmel, Belgija), 50 IU/ml penicilina i 50 µg/ml streptomocina (Invitrogen, Merelbeke, Belgija). Ćelijske kulture su čuvane na 37 °C u atmosferi sa 5% CO₂ i vlažnošću vazduha 95%. Subkonfluentne ćelije (ćelijske kulture koje prekrivaju 80% dna bočice za kultivaciju) tretirane su rastvorom koji je sadržao 1% tripsina i 0,02% EDTA. Nakon ove operacije, ćelije su se odvajale od zidova bočice za kultivaciju, i bilo ih je moguće dalje podeliti, prebrojati i prebaciti u mikrotitracione ploče sa 96 bazena ravnog dna. Ćelije su deljene najviše 10 puta, nakon čega su za testove korišćene nove ćelijske kulture.

11.1. MTT test

MTT test je *in vitro*, spektrofotometrijski test koji je korišćen za ispitivanje citotoksične aktivnosti hloroformskih ekstrakata podzemnih organa i herbi sve tri odabrane vrste roda *Laserpitium*, kao i svih izolovanih jedinjenja, osim latifolona. MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoliumbromid) je žuta, hidrosolubilna so. U metabolički aktivnim ćelijama ona se konvertuje u liposolubilni, plavoljubičasti formazan, reduktivnim otvaranjem tetrazolijum prstena (Slika 12). Redukcija MTT reagensa, koja se uočava kao promena boje, proporcionalna je broju živih, metabolički aktivnih ćelija u toku eksponencijalne faze rasta ćelija u kulturi (Mosmann, 1983).

Ranije je smatrano da se redukcija MTT reagensa dešava u mitohondrijama, ali je kasnije pokazano da se ova redukcija najvećim delom dešava van mitohondrija, preko NAD(P)H – zavisnih oksidoreduktaza (Berridge i Tan, 1993). Na taj način se u MTT testu, merenjem intenziteta boje pomoću ELISA čitača (ELISA plate reader), određuje broj metabolički aktivnih, živih ćelija, tj. test se koristi za procenu ćelijske vijabilnosti.



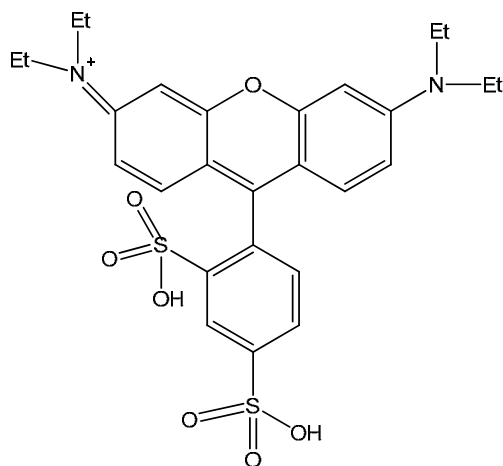
Slika 12. Redukcija MTT do tamnoljubičastog formazana (Kim i sar., 2009)

Postupak

Nakon enzimskog razdvajanja i brojanja ćelija, one su zasejavane (5×10^3 ćelija po bazenu) u providne mikrotitracione ploče sa 96 bazena ravnog dna (Nunc A/S, Roskilde, Danska). Korišćen je MTT reagens (Sigma-Aldrich, Bornem, Belgija). Kao referentna supstanca korišćen je vinblastin-sulfat (Sigma-Aldrich, Bornem, Belgija). Nakon zasejavanja, sledila je inkubacija ćelija u medijumu (48 h), a zatim su ekstrakt/izolovano jedinjenje/vinblastin-sulfat dodavani u određenoj koncentraciji, pa su mikrotitracione ploče pod istim uslovima inkubirane dodatnih 48 h. Nakon isteka ovog vremena, medijum je uklonjen pomoću vakuma i 100 μ l rastvora MTT boje (koncentracije 5 mg/ml u PBS-u) dodato je u svaki bazen. Mikrotitracione ploče su dalje inkubirane narednih 2 h. Nakon tog vremena, zaostali medijum je uklonjen, a kristali formazana su rastvarani u 100 μ l DMSO. Apsorbancije rastvora su očitavane na ELISA čitaču na talasnim dužinama 570 i 560 nm. Smatra se da je apsorbancija u direktnoj korelaciji sa brojem živih, metabolički aktivnih ćelija. Koncentracije izolata/supstanci koje su izazvale smanjenje broja ćelija za 50% (IC_{50}) u poređenju sa negativnim kontrolama (grupe koje su inkubirane u čistom medijumu, predstavljaju 100% ćelijskog rasta u datim eksperimentalnim uslovima), određivane su iz krivih rasta ćelijskih linija.

11.2. SRB test

Za procenu citotoksične aktivnosti hloroformskih ekstrakata podzemnih organa i herbi sve tri odabrane vrste roda *Laserpitium*, kao i svih izolovanih jedinjenja, osim latifolona, korišćen je sulforhodamin B (SRB) test, još jedan *in vitro* spektrofotometrijski test, koji su Skehan i saradnici razvili 1990. god. SRB test je brz i osetljiv test koji se koristi za određivanje ćelijskog proteinskog sadržaja. SRB reagens hemijski predstavlja ružičastu aminoksantonsku boju (Slika 13), koja se u blago kiseloj sredini vezuje za rezidue aminokiselina, i na taj način predstavlja reagens koji je "osetljivo merilo" proteinskog sadržaja u ćelijama. Proteinski sadržaj je u korelaciji sa brojem ćelija, i na taj način se dobija informacija o broju živih ćelija, bez obzira na njihovu metaboličku aktivnost (Skehan et al., 1990).



Slika 13. Sulforhodamin B reagens

Postupak

SRB so, glacijalna sirćetna kiselina, trihlorsirćetna kiselina i trizma baza kupljeni su od Sigma-Aldrich (Bornem, Belgija). Kao referentna supstanca korišćen je vinblastin-sulfat (Sigma-Aldrich, Bornem, Belgija). Nakon enzimskog razdvajanja i brojanja ćelija, one su zasejavane (5×10^3 ćelija po bazenu) u providne mikrotitracione ploče sa 96 bazena ravnog dna (Nunc A/S, Roskilde, Danska). Sledila je inkubacija ćelija u medijumu (48 h), pa su zatim dodati ekstrakt/izolovano jedinjenje/vinblastin-sulfat u određenoj koncentraciji i mikrotitracione ploče su pod istim uslovima inkubirane dodatnih 48 h na 37 °C. Nakon isteka ovog vremena, medijum je uklonjen pomoću vakuuma i dodato je 50 µl 50% rastvora trihlorsirćetne kiseline, radi selektivnog fiksiranja ćelijskih proteina i mikrotitracione ploče su ostavljene tokom 1 h u

frižideru. Nakon toga, ploče su isprane pet puta pomoću destilovane vode, da bi se uklonili nefiksirani proteini i ostatak trihlorsirćetne kiseline. Ploče su zatim sušene u sušnici, a potom je u svaki bazen mikrotitracione ploče dodato 200 μ l 0,4% rastvora SRB boje u 1% sirćetnoj kiselini i ploče su ostavljene na tamnom mestu u toku sledećih 30 min. Nakon uklanjanja viška SRB boje (ploče se ispiraju uzastopno četiri puta sa po 200 μ l glacijalne sirćetne kiseline), ploče su osušene i u svaki bazen je dodato po 200 μ l 10 mM rastvora trizma baze. Apsorbancija je merena na ELISA čitaču na talasnim dužinama 570 i 650 nm. Izmerena apsorbancija je u direktnoj korelaciji sa sadržajem proteina u ćelijama. Koncentracije ekstrakata/izolovanih jedinjenja/vinblastin-sulfata koje su izazvale smanjenje broja ćelija za 50% (IC_{50}) u poređenju sa negativnim kontrolama (grupe koje su primale čist medijum, predstavljaju 100% ćelijskog rasta u datim eksperimentalnim uslovima), određivane su iz krivih rasta ćelijskih linija.

Statistička analiza

Statistički značajne razlike ispoljene citotoksične aktivnosti testiranih ekstrakata/izolovanih jedinjenja/vinblastin-sulfata i odgovarajućih negativnih kontrola (ćelije koje su inkubirane u odgovarajućim zapreminama čistog medijuma), računane su uz pomoć nelinearne regresione analize (ANOVA) uz Bonferonijevu korekciju za višestruka poređenja (SPSS 15.0). Statistički značajna razlika u inhibiciji određivana je u poređenju sa kontrolnim grupama za nivoe značajnosti * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$. Korelacija između broja ćelija i izmerene apsorbancije procenjena je iz odgovarajućih krivih ćelijskog rasta, uz korišćenje softvera za numeričku nelinearnu analizu (Wolfram Matematika 7.0).

12. Ispitivanje antinociceptivne i antiedematozne aktivnosti

Antinociceptivna aktivnost

Bol se definiše kao neprijatan osećaj i emocionalno iskustvo izazvano stvarnim ili potencijalnim oštećenjem tkiva (Međunarodno udruženje za proučavanje bola). Ukoliko je visokog intenziteta i/ili dugotrajan (hroničan), bol značajno narušava kvalitet života i radnu sposobnost pacijenta.

Prema mehanizmu nastanka bol možemo klasifikovati kao nociceptivni (može biti somatski ili visceralni) i neuropatski bol, dok po dužini trajanja, bol može biti akutni i hronični.

Razumevanje neuralnih mehanizama bolne senzacije veoma je važno za terapiju bola, jer se potencijalni analgetici i biraju tako da deluju na ključne događaje u nastanku osećaja bola.

Nociceptivni bol je posledica aktivnosti nervnog sistema kojom se mozak upozorava da na organizam deluje bolni stimulus (noksa). Nokse mogu biti mehaničke, toplotne ili hemijske. Sa aspekta lečenja bola najvažnije su hemijske nokse, koje se oslobađaju iz ishemičnog ili povređenog tkiva u toku zapaljenja, i to su bradikinin, serotonin, histamin, mlečna kiselina i drugi medijatori. Oni prouzrokuju stvaranje nervnih impulsa u nociceptorima - ogoljenim nervnim završecima primarnih senzornih neurona. Stvoreni nervni impulsi prenose se duž aksona ovih neurona do zadnjih rogova kičmene moždine, gde informaciju, posredstvom neurotransmitera prenose sekundarnim neuronima bolnog puta. Ovi neuroni ushodno sprovode bolne impulse do tercijarnih senzornih neurona smeštenih u talamusu, posredstvom kojih informacija stiže u somatosenzorni korteks (kada bol možemo lokalizovati i opisati) i limbički sistem (kada nastaje emocionalno doživljavanje bola) (Tomić i Stepanović-Petrović, 2011).

Pored sistema za transmisiju bola, u nervnom sistemu funkcioniše i sistem za modulaciju bola. Modulacija bola je neuralna aktivnost koja kontroliše prenos bolnih impulsa na svim nivoima nociceptivnog puta. Na nivou primarnih neurona bolnog puta modulatorno deluju prostaglandini. Oni snižavaju prag za generisanje impulsa u nociceptorima i tako ih čine pojačano osetljivim za dejstvo različitih stimulusa, odnosno dovode do njihove senzitivizacije. O značaju ovog procesa govori i činjenica da najčešće korišćeni analgetici – nesteroidni antiinflamatorni lekovi smanjuju stvaranje prostaglandina, a samim tim i senzitivizaciju nociceptora u inflamiranom tkivu. Drugo važno mesto za modulaciju bola su zadnji rogovi kičmene moždine, gde se susreću pronociceptivni uticaji sa periferije (koji ushodnim putevima nose informaciju o bolu prema CNS-u) i antinociceptivni uticaji iz viših nervnih centara (koji iz CNS-a nishodnim putevima suprimiraju bol). Postoji nekoliko teorija o prenošenju bolne senzacije kroz kičmenu moždinu, kao što je teorija kapije ili „gate theory“ koju su postavili Melzack i Wall. Oni su pretpostavili da se transmisija bolnih impulsa modulira

mehanizmom „nociceptivne kapije“ u *substantia gelatinosa*. Da li će informacija o bolu „proći“ kroz zadnje robove kičmene moždine i stići u mozak ili ne (tj. da li će „nociceptivna kapija“ biti otvorena ili zatvorena), zavisi od toga koja komponenta preovladava. Nishodni inhibitorni putevi polaze iz CNS-a i kože transmisiju bola u zadnjim rogovima kičmene moždine. Iz njihovih završetaka oslobađaju se endogeni opioidi (enkefalini i endorfini), serotonin i noradrenalin (Sweetman, 2007; Tomić i Stepanović-Petrović, 2011).

Poznavanje kompleksnih mehanizama u nastanku i transmisiji bola je od velikog značaja, a jedan od osnovnih koraka u istraživanju novog antinociceptivnog agensa je pogodan test na životinjskom modelu. U testovima se koriste različiti tipovi nociceptivnih stimulusa (električni, termički, mehanički ili hemijski), uz napomenu da nijedna vrsta nociceptivnog stimulusa nije idealna, iako neki autori smatraju da je hemijska nocicepcija najpribližnija stvarnom stanju kod akutnog bola. Reakcije životinja koje se prate u modelima bola su gotovo uvek motorne reakcije – od spinalnih refleksa do kompleksnih bihevioralnih manifestacija (Le Bars et al., 2001).

Za ispitivanje antinociceptivnog dejstva etarskih ulja podzemnih organa *L. zernyi* i *L. ochridanum* korišćen je model inflamatorne hiperalgezije u pacova. Inflamatorni bol (inflamatorna hiperalgezija) je bol koji se javlja u stanjima u kojima se razvija inflamatorni proces, i smatra se da su prostaglandini najznačajniji medijatori u ovoj vrsti bola. Neki od najefikasnijih analgetika su upravo inhibitori sinteze prostaglandina.

Bolna preosetljivost zadnje desne šape pacova izaziva se intraplantarnom injekcijom pro-inflamatorne supstance, a meri se modifikovanim testom pritiska na zadnje šape pacova („paw pressure“ test) pomoću posebnog aparata (Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Nemačka). Supstance sposobne da redukuju bolnu preosetljivost izazvanu inflamacijom, u poređenju sa kontrolnom grupom, poseduju antinociceptivnu aktivnost u modelu inflamatornog bola (Tomić i sar., 2004; Randall i Selitto 1957; Morris, 2003).

Antiedematozna aktivnost

Za ispitivanje antiedematozne aktivnosti korišćen je model inflamacije proinflamatornom supstancom, karageninom, u pacova. Pri izazivanju inflamacije

zadnje desne šape pacova intraplantarnom injekcijom karagenina, gotovo istovremeno se javljaju ključni znaci inflamacije – edem, hiperalgezija i eritem. Znaci inflamacije se javljaju pod dejstvom proinflammatory supstanci – bradikinina, histamina, tahikinina, komplementa i reaktivnih kiseoničnih i azotnih radikala. Inflammatory odgovor se najčešće kvantifikuje uvećanjem (edemom) tretirane šape, koje dostiže maksimum oko 5 h nakon injekcije karagenina, a koji se može moduirati inhibitorima specifičnih molekula unutar inflammatory kaskade. Model inflamacije izazvane karageninom je dobro proučen i visoko reproducibilan, pa ima važnu ulogu u proučavanju antiinflammatory aktivnosti i razvoju novih lekova (Morris, 2003).

Model inflamacije izazvane proinflammatory supstancom, karageninom, u pacova korišćen je za ispitivanje antiedematozne aktivnosti etarskih ulja podzemnih organa *L. zernyi* i *L. ochridanum* i metanolnih ekstrakata cvasti i herbe *L. zernyi* korišćen je. Inflamacija zadnje desne šape pacova izazivana je intraplantarnom (*i.pl.*) injekcijom karagenina, a nastali edem meren je pletizmometrom (Ugo Basile, Italija). Supstance sposobne da redukuju edem izazvan karageninom, u poređenju sa kontrolnim vrednostima, poseduju antiedematoznu aktivnost (Helyes i sar., 2004).

Ekperimentalne životinje

U eksperimentima su korišćeni albino pacovi muškog pola “Wistar“ soja, mase od 180 do 220 g. Životinje su čuvane u vivarijumu na temperaturi 20-25 °C i relativnoj vlažnosti vazduha 60%, u toku tri dana radi aklimatizacije na uslove identične eksperimentalnim. U toku boravka smeštani su u kaveze od pleksiglasa (42,5 cm × 27 cm × 19 cm), sa žičanom rešetkom postavljenom odozgo. Kao podloga u kavezima korišćena je sterilisana strugotina od drveta. U jednom kavezu je smeštano po 6-8 pacova. Voda i hrana (specijalni briketi za hranjenje životinja, Vetzavod, Subotica), bile su im dostupne u toku čitavog dana (24 h), osim u toku trajanja eksperimenta. Životinje su čuvane u uslovima sa prirodnom ciklusom dan/noći (12/12 h svetlost–mrak režim), a svetla su paljena u 6:00 h. Eksperimenti su izvođeni u isto vreme, između 8:00 i 16:00 h, da bi se izbegla cirkardijalna varijabilnost u biheviornalnim testovima.

Za svaku vrstu eksperimenta postojala je test grupa koja je dobijala biljni izolat (etarsko ulje ili ekstrakt), grupa koja je dobijala standardni lek (ibuprofen ili indometacin) i grupa koja je u istoj zapremini dobijala vehikulum za rastvaranje ili

suspendovanje ispitivanih supstanci. Sve tri grupe su bile podvrgnute identičnom eksperimentalnom protokolu. Svaka životinja korišćena je u eksperimentu samo jednom. Nakon završenog eksperimenta, životinje su žrtvovane etrom.

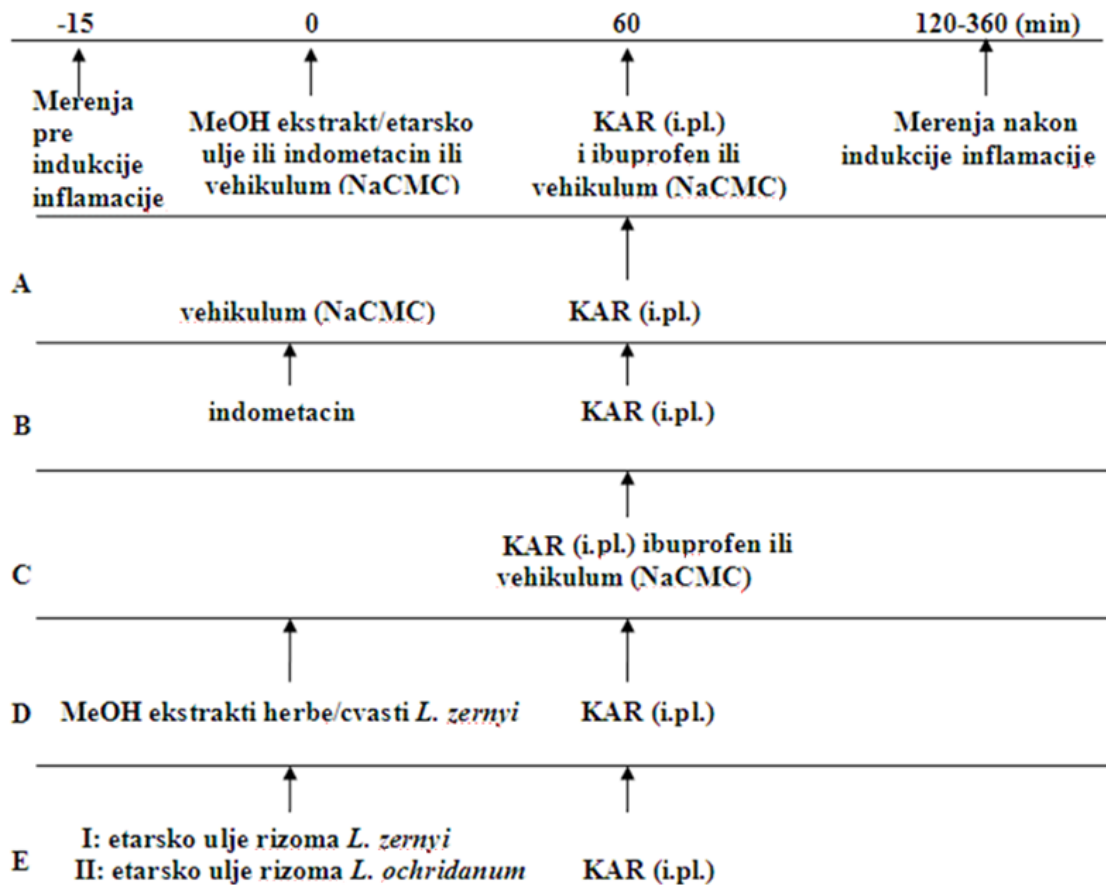
Životinje su kupljene od Farme Vojnomedicinske akademije u Beogradu, Srbija. Tokom rukovanja eksperimentalnim životinjama i izvođenja eksperimenata primenjivani su etički Pravilnik o čuvanju i korišćenju laboratorijskih životinja (eng. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals) koji je izdao Američki Nacionalni Institut zdravlja (eng. US National Institutes of Health, NIH publication no. 85 –23, revised 1996) i takođe bili odobreni od strane Etičkog komiteta Univerziteta u Beogradu - Farmaceutskog fakulteta.

Način primene testiranih etarskih ulja/ekstrakata

Ibuprofen (Aliapharm, GmbH, Nemačka) i indometacin (Belupo, Koprivnica, Hrvatska), kao referentni lekovi, odnosno etarska ulja/ekstrakti, suspendovani su u vehikulumu, koji je predstavljao 0,5% rastvor natrijum-karboksimetilceluloze, NaCMC (PP1000 Lucel®, „Milan Blagojević“, Lučani, Srbija) u destilovanoj vodi, i sonifikovani 15 min u ultrazvučnom kupatilu, radi ravnomerne distribucije. Lekovi, odnosno etarska ulja/ekstrakti, aplikovani su gladnim pacovima oralnom sondom (*p.o.*) u zapremini od 2 ml/kg. Karagenin (Sigma-Aldrich Chemie, Nemačka) je suspendovan u fiziološkom rastvoru 24 h pre eksperimenta, u koncentraciji od 1%, i injektovan *i.pl.* u zadnju desnu šapu svih eksperimentalnih životinja, u zapremini 0,1 ml/šapi, koristeći špric od 1 ml i iglu (0,45 × 12 mm).

Eksperimentalni protokol

Test grupama “Wistar“ pacova muškog pola, etarska ulja ili metanolni ekstrakti aplikovani su per os (*p.o.*) u tri doze (25, 50 i 100 mg/kg). Jedan sat kasnije, rastvorom karagenina (1%) koji je aplikovan intraplantarno (*i.pl.*) u zadnju desnu šapu izazvana je inflamacija. U skladu sa istim eksperimentalnim protokolom, dve grupe pacova su dobile indometacin (8 mg/kg; *p.o.*), odnosno ibuprofen (100 mg/kg; *p.o.*) kao standardne lekove. Kao što je već pomenuto, za svaki eksperiment je korišćena i grupa koja je u istoj zapremini dobijala vehikulum za rastvaranje ili suspendovanje ispitivanih supstanci, koja je smatrana kontrolom (Slika 14).



Slika 14. Eksperimentalni protokol ispitivanja antiedematozne i antinociceptivne aktivnosti etarskih ulja podzemnih organa *L. zernyi* i *L. ochridanum* i ispitivanja antiedematozne aktivnosti metanolnih ekstrakata herbe i cvasti *L. zernyi* u modelu karageninom izazvane inflamacije u pacova

12.1. Ispitivanje antinociceptivne aktivnosti

Akutna inflamacija je izazivana intraplantarnom (*i.pl.*) injekcijom karagenina u zadnju desnu šapu pacova, što je prouzrokovalo nociceptivnu (bolnu) preosetljivost i razvoj edema (Morris, 2003). Bolna preosetljivost je merena modifikovanim „paw-pressure“ testom (Randall i Selitto, 1957; Tomić i sar. 2004). Korišćen je aparat za merenje sile pritiska (izražene u gramima) aplikovanih na zadnje šape pacova u cilju određivanja razlike u pritisku desne i leve šape (šape pod inflamacijom i neinflamirane). Pacov se postavlja tako da se zadnjim šapama osloni na dve platforme, koje su preko transdjusera povezane sa kućištem aparata. Blagim pokretom pacov se gura na dole vodeći računa da se pritisci rasporede ravnomerno na obe šape, sve dok se ne dostigne najveća vrednost sile („trigger level“) od 100 g na jednoj od šapa. U tom trenutku se čuje zvučni signal, merenje se prekida i vrednosti sile pritiska (sa tačnošću 0,1 g) aplikovanih na desnu i levu šapu se očitavaju na kontrolnoj ploči. Ova vrednost „okidača“, odnosno najveće sile izabrana je tako da odražava blag nociceptivni stimulus koji je potreban da bi se detektovala nociceptivna hiperosetljivost (hiperalgezija). Kako je desna šapa inflamirana i bolna, pacov se više oslanja na levu (zdravu) šapu, „štedeći“ šapu koja je pod inflamacijom. To rezultuje smanjenjem sile pritiska primenjene na inflamiranu šapu. Razlika između sila pritiska (df) koje su primenjene na zdravu i inflamiranu šapu, smatrane su merom bolne preosetljivosti (hiperalgezije) izazvane inflamacijom, i određivane su nakon svakog merenja koristeći sledeću jednačinu (Tomić i sar., 2004):

$$df = \text{sila (g) primenjena na neinflamiranu šapu} - \text{sila (g) primenjena na inflamiranu šapu.}$$

Merenja su ponavljana četiri puta, u svim vremenskim intervalima (tačkama merenja) i srednja vrednost df za svaku eksperimentalnu životinju ponaosob korišćena je za dalje proračune. Za svaku dozu etarskog ulja/ibuprofena ili kontrole formirana je grupa od 6-8 pacova. Vrednost df pre tretmana je određivana pre aplikacije karagenina ili karagenina i etarskog ulja/ibuprofena. Vrednosti df posle aplikacije karagenina i etarskih ulja/ibuprofena su merene 120, 150, 180, 210, 240, 300 i 360 min posle primene etarskih ulja/ibuprofena (Slika 14).

Agensi koji izazivaju smanjenje razlike u pritiscima šapa (df) imaju antinociceptivno dejstvo. U cilju izražavanja vrednosti smanjenja df koja se javlja nakon primene antinociceptivnog agensa u test (karagenin + etarsko ulje/ibuprofen tretiranim) grupama životinja u odnosu na df vrednosti kontrolnih grupa kojima je aplikovan samo karagenin, procenat antinociceptivne aktivnosti (%AA) je računat prema sledećoj formuli (Tomić i sar., 2004):

$$\%AA = [(srednja\ vrednost\ df\ kontrolne\ grupe - izmerena\ vrednost\ df\ pojedinačne\ životinje) / (srednja\ vrednost\ df\ kontrolne\ grupe)] \times 100.$$

Ako je df vrednost test grupe bila veća u odnosu na df vrednost kontrolne grupe, znači da u toj grupi nema antinociceptivnog dejstva i beleži se vrednost od 0%AA.

12.2. Ispitivanje antiedematozne aktivnosti

Antiedematozna aktivnost je određivana merenjem edema šape pacova pomoću pletizmometra. Pletizmometar se sastoji od dva vertikalna Perspex cilindra koji su međusobno povezani i napunjeni rastvorom elektrolita. U veći cilindar se uranja šapa pacova, a u drugom se nalazi čitač. Kada se šapa pacova potopi do tibio-tarzalnog zgloba (Bianchi i sar., 1995), nivoi tečnosti se promene u oba cilindra i čitač detektuje zapreminu istisnute tečnosti koja odgovara zapremini šape. Zapremina šape (u mililitrima) se prikazuje na digitalnom displeju.

Bazalna zapremina šape je očitana opisanim postupkom, pre primene karagenina ili karagenina+etarskih ulja/ekstrakata/indometacina. Zapremina šape merena je 120, 150, 180, 210, 240, 300 i 360 min posle primene etarskog ulja/ekstrakta/indometacina (Slika 14). Posle merenja zapremine šape u svakoj vremenskoj tački navedenih vremenskih intervala, razlika u zapremini (dv) između tretirane (inflamirane) i bazalne zapremine šape računata je prema izrazu:

$$dv = zapremina\ inflamirane\ šape\ (ml) - bazalna\ zapremina\ šape\ (ml).$$

Merenja su ponovljena dva puta u svakoj vremenskoj tački navedenih intervala i srednja vrednost dv je korišćena za svaku eksperimentalnu životinju za dalja preračunavanja.

Agensi koji su smanjivali vrednost dv su smatrani agensima sa antiedematoznom aktivnošću. U cilju izražavanja smanjenja vrednosti dv koju je izazvala primena antiedematoznih agenasa u test (karagenin + etarsko ulje/ekstrakt/indometacin tretiranim) grupama u odnosu na vrednost dv kontrolnih (karageninom tretiranih) grupa, procenat antiedematozne aktivnosti (%AE) je računat prema sledećem izrazu (Stepanović-Petrović i sar., 2012):

$$\%AE = \frac{[(\text{srednja vrednost dv kontrolne grupe} - \text{srednja vrednost dv test grupe}) / (\text{srednja vrednost dv kontrolne grupe})] \times 100.}$$

Ako je srednja vrednost dv test grupe bila viša od srednje vrednosti dv kontrolne grupe, znači da u toj grupi nema antiedematozne aktivnosti test supstance i dodeljivana joj je vrednost od 0%AE

Izražavanje i statistička obrada rezultata ispitivanja antinociceptivne i antiedematozne aktivnosti

Vrednost ED₅₀ (doza koja ispoljava 50%AA, odnosno 50%AE) sa 95%-nim intervalima poverenja je računata pomoću odgovarajući logaritamskih krivih odnosa doza i efekata (Tallarida i Murray, 1986). Pri merenju sile pritiska šapa i razlike u zapreminama, eksperimentator nije znao kojoj grupi eksperimentalne zivotinje pripadaju. Vrednosti %AA i %AE su računate nakon svakog merenja df, odnosno dv vrednosti, da bi se odredio maksimalan efekat primenjenog agensa.

Pri statističkoj obradi rezultata korišćeni su jednosmerna ANOVA i Tukey HSD test. Podaci su statistički obrađivani i prikazivani uz pomoć kompjuterskih programa SPSS for Windows i Microsoft Excel.

REZULTATI I DISKUSIJA

HEMIJSKA ANALIZA

1. Etarska ulja

Vrste roda *Laserpitium* su aromatične biljke, koje sintetišu etarsko ulje u endogeno lokalizovanim sekretornim strukturama. Etarska ulja odabranih vrsta ovog roda izolovana su destilacijom vodenom parom u aparaturi po Clevenger-u, postupkom koji propisuje Evropska farmakopeja 6 (Ph. Eur. 6). Osušen biljni materijal usitnjen je do stepena grubog praška neposredno pre izolovanja etarskog ulja.

Sadržaj etarskog ulja u biljnim organima/delovima *L. latifolium*, *L. zernyi* i *L. ochridanum*, kao i lokaliteti i vreme sakupljanja biljnog materijala dati su u Tabeli 13.

Tabela 13. Sadržaj etarskog ulja u ispitivanim vrstama roda *Laserpitium*

Biljna vrsta	Biljni organ/ deo biljke	Lokalitet i vreme sakupljanja	Sadržaj etarskog ulja (% m/m)
<i>L. latifolium</i>	rizom i koren	Gučevo, oktobar 2008. god.	0,63
<i>L. latifolium</i>	plod	Gučevo, oktobar 2008. god.	2,67
<i>L. zernyi</i>	rizom i koren	Ošljak, jul 2008. god.	1,74
<i>L. zernyi</i>	herba	Jablanica, jul 2006. god.	0,14
<i>L. zernyi</i>	cvast	Jablanica, jul 2006. god.	0,22
<i>L. ochridanum</i>	rizom i koren	Galičica, avgust 2008. god.	1,21
<i>L. ochridanum</i>	herba	Galičica, avgust 2008.god.	0,33
<i>L. ochridanum</i>	plod	Galičica, avgust 2008. god.	7,55

1.1. Etarska ulja podzemnih organa i ploda *L. latifolium*

Etarska ulja izolovana iz podzemnih organa i ploda *L. latifolium* su lako pokretljive, bezbojne tečnosti, specifičnog mirisa koji podseća na koren peršuna.

Etarsko ulje podzemnih organa *L. latifolium* nije do sada hemijski analizirano. GC-FID i GC-MS analizom ovog etarskog ulja utvrđeno je prisustvo trideset devet komponenata, koje čine 83,9% ulja. Monoterpenska frakcija je dominantna (69,5%), dok su seskviterpenska jedinjenja prisutna u manjem procentu (14,4%). Najzastupljenija komponenta ispitivanog etarskog ulja je monoterpen α -pinen (44,4%), a po količini

slede β -felandren (11,8%) i 14-hidroksi- α -murolen (6,9%). Sva ostala jedinjenja su prisutna u količini manjoj od 3,5% ili u tragovima (Tabela 14).

U etarskom ulju ploda *L. latifolium* identifikovano je dvadeset sedam komponenata, koje predstavljaju 99,0% ukupnog sadržaja ulja, od čega monoterpenški ugljovodonici čine čak 96,1%. Najzastupljenije komponente su α -pinen (44,0%), sabinen (26,8%) i β -pinen (13,9%), a po količini sledi limonen (5,2%). Seskviterpenški ugljovodonici čine svega 1,6% ukupnog sadržaja (Tabela 14).

Tabela 14. Sastav etarskih ulja podzemnih organa i plodova *L. latifolium*

Jedinjenje	KI Lit ^a	KI Exp ^b	Etarsko ulje podzemnih organa ^c	Etarsko ulje ploda ^c
Triciklen	927	925	tr	tr ^d
α -Pinen	939	937	44,4	44,0
Kamfen	954	953	3,1	1,8
Sabinen	975	971	1,4	26,8
β -Pinen	979	978	3,3	13,9
Mircen	991	989	3,4	2,2
<i>n</i> -Oktanal	999	997	-	0,7
α -Felandren	1003	1001	0,6	0,2
α -Terpinen	1017	1015	tr	tr
<i>p</i> -Cimen	1025	1022	1,0	0,3
Limonen	1029	1027	-	5,2
β -Felandren	1030	1028	11,8	1,0
(<i>E</i>)- β -Ocimen	1050	1049	tr	-
γ -Terpinen	1060	1058	0,5	0,7
<i>n</i> -Oktanol	1068	1066	-	0,6
Terpinolen	1089	1085	tr	tr
6-Kamfenon	1097	1095	tr	-
1,3,8- <i>p</i> -Mentatrien	1110	1108	tr	-
α -Kamfolenal	1126	1124	tr	tr
1,5,8- <i>p</i> -Mentatrien	-	1142	tr	-
Pinokarvon	1165	1164	-	tr
Kripton	1186	-	tr	-
Mirtenol	1196	1193	tr	-
Mirtenal	1196	1194	tr	-
<i>n</i> -Dekanal	1202	1199	-	tr
Verbenon	1205	1202	tr	-

Bornilacetat	1289	1285	-	tr
Mirtenilacetat	1327	1325	tr	-
α -Terpinilacetat	1349	1347	tr	-
α -Kopaen	1377	1375	tr	0,4
β -Kubeben	1388	1387	1,0	tr
β -Elemen	1391	1389	tr	-
(<i>E</i>)-Kariofilen	1419	1418	tr	tr
β -Gurjunen	1434	1430	tr	tr
α -Humulen	1455	1450	tr	-
(<i>E</i>)- β -Farnezen	1457	1454	tr	tr
γ -Murolen	1480	1476	1,2	tr
γ -Himahalen	1483	1479	tr	-
γ -Kurkumen	1483	1479	-	1,2
Germakren D	1485	1481	0,8	-
α -Murolen	1500	1498	1,6	-
Kuparen	1505	1501	-	tr
β -Bisabolen	1506	1511	0,6	-
δ -Kadinen	1523	1520	1,0	-
14-hidroksi- α -Murolen	1780	-	6,9	-
Ukupno			99,0	83,9
Monoterpenski ugljovodonici			96,1	69,5
Oksidovani monoterpeni			tr	tr
Seskviterpenski ugljovodonici			1,6	7,5
Oksidovani seskviterpeni			-	6,9
Ostalo			1,3	-

^a KI lit – Retencioni indeksi dati u literaturi

^b KI exp – Relativni retencioni indeksi izračunati preko serije homologih n-alkana na HP-5MS koloni.

^c % – Relativni udeo komponente (procenat površine pika) u odnosu na ukupnu površinu pikova hromatograma detektovanog FID detektorom.

^d Komponenta u tragu (< 0,05 %).

Dobijeni podaci, pre svega izuzetno visok sadržaj monoterpena, u skladu su sa literaturnim podacima za etarsko ulje ploda *L. latifolium*. Naime, Adcock i Betts (1974) su ispitali hemijski sastav etarskih ulja ekstrahovanih etrom iz petnaest uzoraka ploda *L. latifolium*, sakupljenih u botaničkim baštama širom Evrope. U svim ovim etarskim uljima kao glavne komponente identifikovani su α -pinen, β -pinen i limonen, ali je njihov sadržaj varirao od uzorka do uzorka.

1.2. Etarska ulja podzemnih organa, herbe i cvasti *L. zernyi*

Endemična vrsta *L. zernyi* do sada nije ispitivana u pogledu sadržaja i sastava etarskog ulja. Etarska ulja izolovana iz podzemnih organa, herbe i cvasti *L. zernyi* u okviru ove doktorske disertacije bila su svetloplave boje i slabog, prijatnog aromatičnog mirisa.

U etarskom ulju izolovanom iz podzemnih organa *L. zernyi* detektovane su četrdeset tri komponente (čine 94,0% ukupnog sadržaja ulja) (Tabela 15). Sadržaj monoterpenke i seskviterpenke frakcije bio je približno isti (42,6% i 41,4%, redom). Najzastupljenije komponente bile su α -pinen (31,6%) i α -bisabolol (30,9%). U nešto nižem procentu su detektovani monoterpeni 1,5,8-*p*-mentatrien (6,3%) i β -felandren (4,3%). Sve ostale detektovane komponente bile su zastupljene u količini nižoj od 3%.

U etarskom ulju herbe *L. zernyi* detektovano je pedeset osam komponenata, koje predstavljaju 89,4% ukupnog sadržaja ulja (Tabela 15). Udeo monoterpenke frakcije (59,1%) bio je veći u odnosu na seskviterpensku frakciju (29,2%). Najzastupljenije komponente su β -pinen (20,0%) i terpinen-4-ol (12,0%), dok su β -felandren i α -pinen zastupljeni u nižim koncentracijama (4,7 i 3,8%, redom). Od seskviterpena, α -bisabolol je najzastupljeniji sastojak (6,4%), a po količini slede spatulenol (4,1%), biciklogermakren (3,8%) i (*E*)-kariofilen (2,5%). Svetloplava boja izolovanog ulja potiče od hamazulena (1,8%).

U etarskom ulju cvasti *L. zernyi* identifikovano je pedeset pet komponenata (96,8% ukupnog sadržaja ulja) (Tabela 15). Sadržaj monoterpena je bio viši (75,6%) u odnosu na seskviterpene (21,2%). Najzastupljenije komponente bile su monoterpeni: sabinen (18,5%), β -felandren (12,4%), limonen (12,0%) i terpinen-4-ol (10,6%). Po količini slede α -pinen (8,0%) i γ -terpinen (5,8%). Od seskviterpenskih jedinjenja, u nešto većem procentu bili su zastupljeni (*E*)-kariofilen (6,8%) i α -bisabolol (4,0%). U etarskom ulju cvasti *L. zernyi* prisutan je takođe hamazulen (1,1%) od koga potiče njegova svetloplava boja.

Tabela 15. Sastav etarskih ulja podzemnih organa, herbe i cvasti *L. zernyi*

Jedinjenje	KI Lit ^a	KI Exp ^b	Etarsko ulje podzemnih organa ^c	Etarsko ulje herbe ^c	Etarsko ulje cvasti ^c
α -Tujen	930	929	-	tr	0,2
α -Pinen	939	937	31,6	3,8	8,0
Kamfen	954	953	0,2	-	-
Verbenen	968	966	0,4	-	-
Sabinen	975	971	0,7	1,0	18,5
β -Pinen	979	978	2,2	20,0	1,1
Mircen	991	989	0,6	0,5	0,7
α -Felandren	1003	1001	0,4	tr	tr
α -Terpinen	1017	1015	tr	1,1	1,7
<i>p</i> -Cimen	1025	1022	0,5	0,5	0,6
Limonen	1029	1027	-	0,5	12,0
β -Felandren	1030	1028	4,3	4,7	12,0
(<i>E</i>)- β -Ocimen	1050	1049	-	tr	tr
γ -Terpinen	1060	1058	tr	3,2	5,7
<i>cis</i> -Sabinen hidrat	-	1069	-	1,7	1,0
Terpinolen	1089	1085	-	0,9	1,0
6-Kamfenon	1097	1095	1,1	tr	tr
Linalol	1097	1096	-	tr	tr
<i>trans</i> -Sabinen hidrat	1098	1097	-	1,2	0,6
1,3,8- <i>p</i> -Mentatrien	1110	1108	tr	-	-
<i>cis-p</i> -Ment-2-en-1-ol	-	1120	-	0,8	0,6
α -Kamfolenal	1126	1124	0,3	0,6	tr
<i>trans</i> -Pinokarveol	1139	1137	-	0,5	0,2
<i>trans-p</i> -Ment-2-en-1-ol	1141	1138	-	1,2	0,5
1,5,8- <i>p</i> -Mentatrien	-	1142	6,3	-	-
<i>trans</i> -Verbenol	1145	1143	-	2,5	0,3
Pinokarvon	1165	1164	tr	tr	tr
<i>p</i> -Menta-1,5-dien-8-ol	1170	1168	1,2	-	-
Terpinen-4-ol	1177	1175	-	12,0	10,6
α -Terpineol	1189	1187	-	0,7	0,3
Mirtenol	1196	1193	-	0,9	-
Mirtenal	1196	1194	-	0,8	-
<i>cis</i> -Piperitol	1193	1195	-	-	tr
Verbenon	1205	1202	0,5	-	-
<i>trans</i> -Karveol	1217	1215	-	tr	-
Bornilacetat	1289	1285	-	tr	tr

Mirtenilacetat	1327	1325	1,0	-	-
Bicikloelemen	1339	1332	tr	-	-
α -Longipinen	1351	1350	-	tr	tr
α -Julangen	1375	1373	tr	-	-
α -Kopaen	1377	1375	0,4	1,3	0,3
Daucen	1382	1379	-	0,9	0,3
<i>trans</i> -Mirtanolacetat	1387	1385	1,6	-	-
β -Burbonen	1387	1386	-	tr	-
β -Kubeben	1388	1387	0,2	0,4	tr
β -Elemen	1391	1389	0,3	tr	tr
7- <i>epi</i> -Seskvitujen	1391	1390	tr	-	-
Seskvitujen	1417	1415	tr	-	-
(<i>E</i>)-Kariofilen	1419	1418	tr	2,5	6,8
β -Gurjunen	1434	1430	tr	tr	tr
α - <i>trans</i> -Bergamoten	1435	1432	-	tr	tr
α -Humulen	1455	1450	tr	0,3	0,8
(<i>E</i>)- β -Farnezen	1457	1454	0,9	1,2	0,5
γ -Murolen	1480	1476	0,4	-	-
Germakren D	1485	1481	0,5	0,9	0,3
(<i>E</i>)- β -Jonon	1485	1485	-	tr	tr
Biciklogermakren	1500	1497	2,4	3,8	1,0
α -Murolen	1500	1498	tr	-	-
Kuparen	1505	1501	tr	-	-
β -Bisabolen	1506	1501	0,7	tr	tr
β -Himahalen	1511	1511	-	0,9	tr
δ -Kadinen	1523	1520	0,5	tr	tr
β -Sekvifelandren	1523	1521	tr	-	-
Kesan	1528	1535	-	0,8	0,2
(<i>Z</i>)-Nerolidol	1534	1529	-	tr	-
Spatulenol	1578	1575	2,7	4,1	2,0
Kariofilen oksid	1583	1580	-	1,8	2,1
Gvajol	1601	1596	tr	-	-
Humulen epoksid II	1608	1604	-	tr	tr
Kariofila-4(14),8(15)-dien-5 α -ol	-	1637	-	tr	0,3
Kariofila-4 (14),8(15)-dien-5 β -ol	-	1638	-	-	0,7
<i>epi</i> - α -Murolol	1641	1638	-	tr	0,3
α -Murolol	1646	1642	1,5	2,1	0,5

α -Kadinol	1653	1650	-	tr	tr
α -Bisabolol	1686	1682	30,9	6,4	4,0
Hamazulen	1732	1728	-	1,8	1,1
Neofitadien	-	2216	-	1,1	tr
Ukupno			94,3	89,4	96,8
Monoterpenski ugljovodonici			47,2	36,2	61,5
Oksidovani monoterpeni			5,7	22,9	14,1
Seskviterpenski ugljovodonici			6,3	14,0	11,1
Oksidovani seskviterpeni			35,1	15,2	10,1
Ostalo			-	1,1	-

^a KI lit – Retencioni indeksi dati u literaturi

^b KI exp – Relativni retencioni indeksi izračunati preko serije homologih n-alkana na HP-5MS koloni.

^c % – Relativni udeo komponente (procenat površine pika) u odnosu na ukupnu površinu pikova hromatograma detektovanog FID detektorom.

^d Komponenta u tragu (< 0,05 %).

1.3. Etarska ulja podzemnih organa, herbe i ploda *L. ochridanum*

Endemična vrsta *L. ochridanum* do sada nije ispitivana u pogledu sadržaja i sastava etarskog ulja. Etarska ulja izolovana iz podzemnih organa, herbe i ploda ove biljke su tamnoplave boje i izuzetno prijatnog, aromatičnog mirisa.

U etarskom ulju podzemnih organa (rizoma i korena) *L. ochridanum* identifikovane su četrdeset četiri komponente (čine 94,0% ukupnog sadržaja ulja) (Tabela 16). Za razliku od ostalih etarskih ulja analiziranih u okviru ove doktorske disertacije, seskviterpeni su bili zastupljeni u višem procentu (51,4%), u odnosu na monoterpene (42,6%). Seskviterpenski ugljovodonici čine 33,0% ukupnog sadržaja ulja, dok su oksidovani seskviterpeni zastupljeni sa 18,4%. Najzastupljeniji je bio α -pinen (33,2%), a u značajnoj količini bili su zastupljeni i hamazulen (14,9%), α -bisabolol (10,3%) i biciklogermakren (8,7%).

U etarskom ulju herbe *L. ochridanum* identifikovane su četrdeset četiri komponente (čine 87,1% ukupnog sadržaja ulja) (Tabela 16). Udeo monoterpenske frakcije bio je 55,3%, a seskviterpenske 30,2%. Glavna komponenta je sabinen (25,9%). Po količini slede α -pinen (7,4%), spatulenol (6,4%), kariofilen oksid (6,1%), terpinen-4-ol (5,5%) i (*E*)-kariofilen (5,3%). U ulju je detektovan i hamazulena (4,1%), od koga potiče njegova plava boja.

Etarsko ulje ploda *L. ochridanum* takođe je bilo plavo. Karakteriše ga izuzetno visok udeo monoterpenske frakcije (87,8%), dok seskviterpenska jedinjenja čine samo 8,8% ulja (Tabela 16). U ovom ulju je identifikovano dvadeset šest komponenata, od kojih su najzastupljenije limonen (57,7%), sabinen (14,4%), i peril aldehid (9,3%). Od seskviterpena,

jedino je (*E*)-kariofilen prisutan u nešto višem procentu (4,1%). I u ovom ulju *L. ochridanum* je bio prisutan plavi hamazulen (0,4%).

Tabela 16. Sastav etarskih ulja herbe, plodova i podzemnih organa *L. ochridanum*

Jedinjenje	KI Lit ^a	KI Exp ^b	Etarsko ulje podzemnih organa ^c	Etarsko ulje herbe ^c	Etarsko ulje ploda ^c
α -Tujen	930	929	-	tr	0,2
α -Pinen	939	937	33,2	7,4	2,8
Kamfen	954	953	tr	tr	-
Verbenen	968	966	tr	-	-
Sabinen	975	971	1,0	25,9	14,4
β -Pinen	979	978	2,8	1,0	0,4
Mircen	991	989	1,0	-	1,0
α -Felandren	1003	1001	tr	-	-
α -Terpinen	1017	1015	tr	1,4	-
<i>p</i> -Cimen	1025	1022	0,1	1,2	-
Limonen	1029	1027	0,8	2,2	57,7
β -Felandren	1030	1028	tr	0,3	-
(<i>E</i>)- β -Ocimen	1050	1049	-	tr	tr
γ -Terpinen	1060	1058	tr	2,4	1,0
Terpinolen	1089	1085	-	0,9	0,1
6-Kamfenon	1097	1095	tr	tr	-
Linalol	1097	1096	-	0,9	-
1,3,8- <i>p</i> -Mentatrien	1110	1108	tr	-	0,2
α -Kamfolenal	1126	1124	tr	0,8	-
1,5,8- <i>p</i> -Mentatrien	-	1142	1,5	-	-
Pinokarvon	1165	1164	tr	0,6	-
<i>p</i> -Menta-1,5-dien-8-ol	1170	1168	tr	-	-
Terpinen-4-ol	1177	1175	-	5,5	0,7
Kripton	1186	1184	-	0,5	-
α -Terpineol	1189	1187	-	1,3	-
Mirtenol	1196	1193	-	0,8	-
Mirtenal	1196	1194	-	0,7	-
Verbenon	1205	1202	tr	0,9	-
Kumin aldehyd	1242	1240	-	tr	-
Peril aldehyd	1268	1272	-	-	9,3
Bornilacetat	1289	1285	-	0,6	-
<i>p</i> -Cimen-7-ol	1291	-	-	tr	-

Mirtenilacetat	1327	1325	0,5	-	-
Bicikloelemen	1339	1332	tr	-	-
α -Terpinilacetat	1349	1347	-	tr	-
α -Julangen	1375	1373	tr	-	-
α -Kopaen	1377	1375	1,5	tr	0,1
Daucen	1382	1379	-	2,4	0,7
<i>trans</i> -Mirtanolacetat	1387	1385	1,7	-	-
β -Kubeben	1388	1387	2,3	0,3	0,3
β -Elemen	1391	1389	tr	-	tr
7- <i>epi</i> -Seskvitujen	1391	1390	tr	-	-
Seskvitujen	1417	1415	tr	-	-
(<i>E</i>)-Kariofilen	1419	1418	0,6	5,3	4,1
β -Gurjunen	1434	1430	tr	-	-
α -Humulen	1455	1450	tr	0,7	0,5
(<i>E</i>)- β -Farnezen	1457	1454	tr	tr	tr
γ -Murolen	1480	1476	0,8	-	tr
γ -Himahalen	1483	1479	-	2,0	0,2
Germakren D	1485	1481	3,2	1,5	0,6
(<i>E</i>)- β -Jonon	1485	1485	-	tr	-
Biciklogermakren	1500	1497	8,7	1,1	1,3
α -Murolen	1500	1498	tr	-	-
β -Bisabolen	1506	1511	tr	tr	-
δ -Kadinen	1523	1520	1,0	tr	tr
α -Kalakoren	1542	-	-	tr	-
Spatulenol	1578	1575	2,7	6,4	0,6
Kariofilen oksid	1583	1580	-	6,1	-
Gvajol	1601	1596	2,0	-	-
Humulen epoksid II	1608	1604	-	0,7	-
α -Murolol	1646	1642	2,8	-	-
Blunezol	1672	1668	0,6	-	-
α -Bisabolol	1686	1682	10,3	-	-
Hamazulen	1732	1728	14,9	4,1	0,4
Neofitadien	-	2216	-	1,2	-
Ukupno			94,0	87,1	96,6
Monoterpenski ugljovodonici			40,4	42,7	77,8
Oksidovani monoterpeni			2,2	12,6	10,0
Seskviterpenski ugljovodonici			33,0	17,4	8,2
Oksidovani seskviterpeni			18,4	13,2	0,6
Ostalo			-	1,2	-

^a KI lit – Retencioni indeksi dati u literaturi

^b KI exp – Relativni retencioni indeksi izračunati preko serije homologih n-alkana na HP-5MS koloni.

^c % – Relativni udeo komponente (procenat površine pika) u odnosu na ukupnu površinu pikova hromatograma detektovanog FID detektorom.

^d Komponenta u tragu (< 0,05 %).

1.4. Uporedna analiza hemijskog sastava etarskih ulja ispitivanih vrsta roda *Laserpitium*

Već nakon izolovanja destilacijom vodenom parom mogle su se uočiti razlike u karakteristikama etarskih ulja ispitivanih vrsta roda *Laserpitium*. Sadržaj etarskih bio je najveći u plodovima *L. ochridanum* i *L. latifolium*: 7,55% i 2,67% (V/m), redom. Po količini etarskih ulja sledili su podzemni organi sve tri ispitivane vrste sa prinosima 1,74% (V/m) u *L. zernyi*, 1,21% (V/m) u *L. ochridanum* i 0,63% (V/m) u *L. latifolium*. Herbe *L. ochridanum* i *L. zernyi*, i cvast *L. zernyi* sadržale su najmanju količinu etarskog ulja: 0,33%, 0,14% i 0,22% (V/m), redom.

Prethodna ispitivanja etarskih ulja vrsta roda *Laserpitium* su uglavnom obuhvatala šire rasprostranjene predstavnike ovog roda. Hemijski su analizirana etarska ulja izolovana iz ploda, herbe i lista, dok etarska ulja iz cvasti i podzemnih organa nisu ispitivana.

Adcock i Betts (1974) su analizirali etarska ulja ekstrahovana etrom iz plodova devet vrsta ovog roda: *L. archangelica*, *L. gallicum*, *L. glaucum*, *L. halleri*, *L. hispidum*, *L. krapfii*, *L. latifolium*, *L. prutenicum* i *L. siler*, prikupljenih sa više lokaliteta. Navedena etarska ulja, izuzev etarskog ulja ploda *L. siler*, bila su sličnog hemijskog sastava, sa izrazitom dominacijom monoterpenskih sastojaka, i to cikličnih monoterpenskih ugljovodonika, kao što su limonen, α -pinen i β -pinen, ili su, kao jedan od glavnih sastojaka imali, sa biosintetskog aspekta još “primitivniji” sastojak – geranilacetat. Konstatovali su, takođe, da je etarsko ulje ploda *L. siler*, zbog relativno visokog sadržaja peril aldehida i limonena, hemijski bliže etarskom ulju ploda *Laser trilobum*.

Rezultati novijih istraživanja etarskih ulja vrsta roda *Laserpitium* idu u prilog prethodno pretpostavljenim sličnostima i razlikama. Glavni sastojci etarskog ulja ploda *L. siler* subsp. *garganicum* (sub *L. garganicum*) iz Italije (Tirillini i sar., 2009), su mircen (15,7%), β -felandren (14,4%) i sabinen (9,7%), dok su seskviterpeni zastupljeni u manjem procentu (25,0%), sa γ -murolenom kao glavnim sastojkom. U plodu i listu *L. gallicum* prikupljenom na dva staništa u Francuskoj, glavni sastojci su α -pinen (17,0–28,5%) i β -pinen (14,8–38,5%). U uzorcima sa jednog staništa (Rougon), pored pinena, detektovane su i

značajne količine sabinena (17,2 i 10,4%) i mircena (11,8 i 14,6%) (Chizzola, 2007). I etarsko ulje ploda *L. petrophilum* (endemične vrste koja raste u Anatoliji), ima najviši sadržaj α -pinena (48,9%) i sabinena (25,9%) (Baser i Duman, 1997). Sa druge strane, etarsko ulje ploda *L. siler*, prikupljenog u Francuskoj, kao glavne komponente sadrži peril aldehid (75,0%) i limonen (22,0%) (Chizzola i Novak, 1999).

Rezultati hemijske analize etarskih ulja vrsta roda *Laserpitium* dobijeni u okviru ove doktorske disertacije pružaju dodatni uvid u bogatstvo struktura isparljivih metabolita vrsta ovog roda. Etarska ulja izolovana iz ploda i podzemnih organa *L. latifolium* imaju izuzetno visok procenat monoterpena (96,1% i 69,5%, redom) i najzastupljenija komponenta je α -pinen (44,0% i 44,4%, redom). U etarskom ulju ploda u nešto višem procentu zastupljeni su još i sabinen (26,8%) i β -pinen (13,9%). Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa rezultatima koje su dobili Adcock i Betts (1974), da etarsko ulja ploda *L. latifolium* pripada pinenskom tipu. Sa druge strane, u etarskom ulju ploda *L. ochridanum*, gde su monoterpeni takođe dominantna frakcija (87,8%), najzastupljenije komponente su sabinen (14,4%), limonen (57,7%) i peril aldehid (9,3%), tako da je u pogledu hemijskog sastava etarsko ulje ploda *L. ochridanum* sličnije etarskom ulju ploda *L. siler*.

Etarsko ulje herbe *L. ochridanum* karakteriše manja razlika u sadržaju monoterpenске (55,3%) i seskviterpenске (30,2%) frakcije, sa relativno visokim sadržajem sabinena (25,9%) i α -pinena (7,4%), ali i seskviterpena kao što su spatulenol (6,4%), kariofilen oksid (6,1%) i (*E*)-kariofilen (5,3%). Etarsko ulje herbe *L. zernyi* ima odnos monoterpenске (59,1%) i seskviterpenске frakcije (29,2%), sličan ulju herbe *L. ochridanum*, sa najzastupljenijim komponentama β -pinenom (20,0%) i terpinen-4-olom (12,0%). Najzastupljeniji seskviterpenски sastojak etarskog ulja herbe *L. zernyi* je α -bisabolol (6,4%). U etarskom ulju cvasti *L. zernyi* sadržaj monoterpena takođe je bio viši (75,6%) u odnosu na seskviterpene (21,2%). Pored glavnih komponentata sabinena (18,5%), limonena (12,0%) i β -felandrena (12,4%), u ulju cvasti *L. zernyi* takođe je detektovan α -bisabolol u značajnoj količini (4,0%). U etarskom ulju herbe *L. ochridanum* i u uljima herbe i cvasti *L. zernyi* detektovan je i hamazulen (4,1%, 1,1% i 1,8%, redom).

Za razliku od prethodnih, etarska ulja podzemnih organa *L. ochridanum* i *L. zernyi* karakteriše visok udeo seskviterpenске frakcije: 51,4% u ulju *L. ochridanum* i 41,4% u ulju *L. zernyi*. Najzastupljenija komponenta u ovim etarskim uljima je α -pinen (33,2% i 31,6%,

redom), ali je u relativno visokoj količini prisutan i sekviterpenski alkohol α -bisabolol (10,3 i 30,9%, redom). U etarskom ulju podzemnih organa *L. ochridanum* detektovan je i hamazulen u značajnom procentu (14,9%).

Kao što je pomenuto, etarska ulja podzemnih organa endemičnih vrsta *L. ochridanum* i *L. zernyi* sadrže značajnu količinu α -bisabolola, aktivnog sastojka etarskog ulja kamilice, *Matricariae aetheroleum*. Cvast kamilice se tradicionalno koristi kod različitih gastrointestinalnih poremećaja, kao što su bolni spazmi, upalni procesi i poremećaji varenja. Takođe, cvast kamilice je česta sirovina u kozmetičkoj industriji zbog svog umirujućeg i antiinflamatornog dejstva (smanjuje crvenilo kože) (Blumenthal i sar., 2003). Ispitivanja su pokazala da farmakološkoj aktivnosti cvasti kamilice doprinosi njeno etarsko ulje bogato upravo α -bisabololom, kao i njegovim oksidima, hamazulenom i spiroetrima (Della Loggia i sar., 1990; Blumenthal i sar., 2003; Sticher, 2007). α -Bisabolol je prirodni seskviterpenski alkohol, koji je u širokoj upotrebi u kozmetičkim i dermatološkim preparatima, zbog protektivnog i umirujućeg dejstva na kožu, ali i zbog svojstva pospešivanja penetracije drugih aktivnih supstanci, kao što je 5-fluorouracil (De Andrade, 2004; Madhavan, 1999). Različitim *in vitro* i *in vivo* testovima potvrđena je antiinflamatorna, antibakterijska i antialergijska aktivnost α -bisabolola (Kamatou i Viljoen, 2010). Zbog njegove relativno široke upotrebe sprovedene su i odgovarajuće studije bezbednosti, na osnovu kojih je od strane Američke agencije za hranu i lekove (FDA - eng. Food and Drug Administration), dobio GRAS status (eng. Generally Regarded As Safe) (Kamatou i Viljoen, 2010).

α -Bisabolol je izuzetno vredan kozmetički sastojak, koji je prema Evropskoj farmakopeji 7 (*European Pharmacopoeia* 7.0), u etarskom ulju kamilice zastupljen u količini 10–65%, u zavisnosti od hemotipa. Njegova zastupljenost u komercijalnim uzorcima etarskih ulja u proseku iznosi oko 17% (Viljoen i sar., 2006). Visoka cena etarskog ulja kamilice i relativno velika varijabilnost sadržaja α -bisabolola doprineli su velikom naučnom interesu za iznalaženje novih etarskih ulja sa visokim sadržajem ovog jedinjenja (De Andrade i sar., 2004). Rezultati hemijske analize etarskih ulja podzemnih organa *L. zernyi* i *L. ochridanum* ukazuju da ona predstavljaju nove biljne izvore ovog seskviterpenskog alkohola.

2. Identifikacija sekundarnih metabolita izolovanih iz hloroformskog ekstrakta podzemnih organa *L. latifolium*

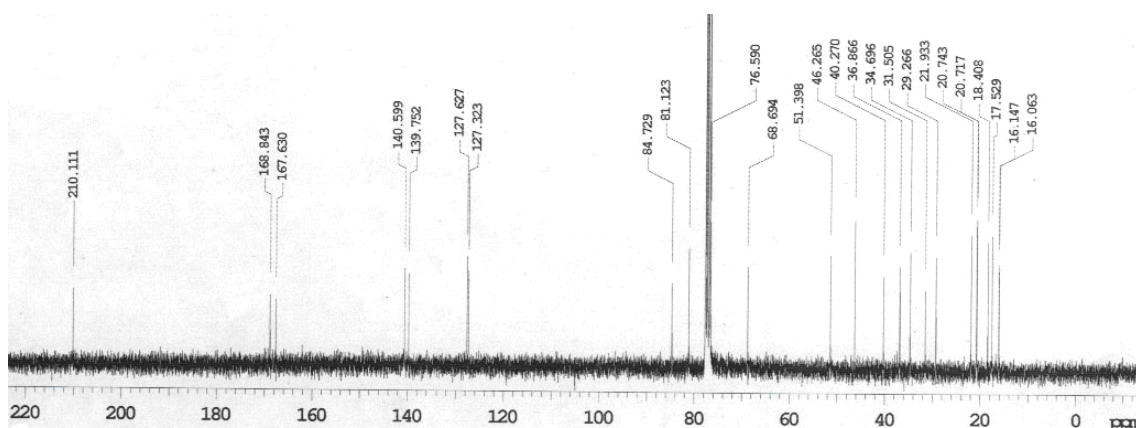
2.1. Jedinjenje 1 (laserpicin)

Jedinjenje **1** eluirano je sa kolone silikagela u frakcijama 71-99. Dalje prečišćavanje spojenih frakcija izvršeno je na semipreparativnom HPLC uređaju, uz izokratski režim eluiranja (70% MeOH : 30% H₂O). Po uparavanju rastvarača, jedinjenje **1** je iskristalisalo u vidu belih igličastih kristala.

Analizom HR-MS (ESI⁺) spektra jedinjenja **1** (Slika 58 u Prilogu), na osnovu pojave molekulskog jona na *m/z* 451,2759 (preračunato 451,2690 za [M + H]⁺), utvrđeno je da jedinjenju **1** odgovara molekulska formula C₂₅H₃₈O₇.

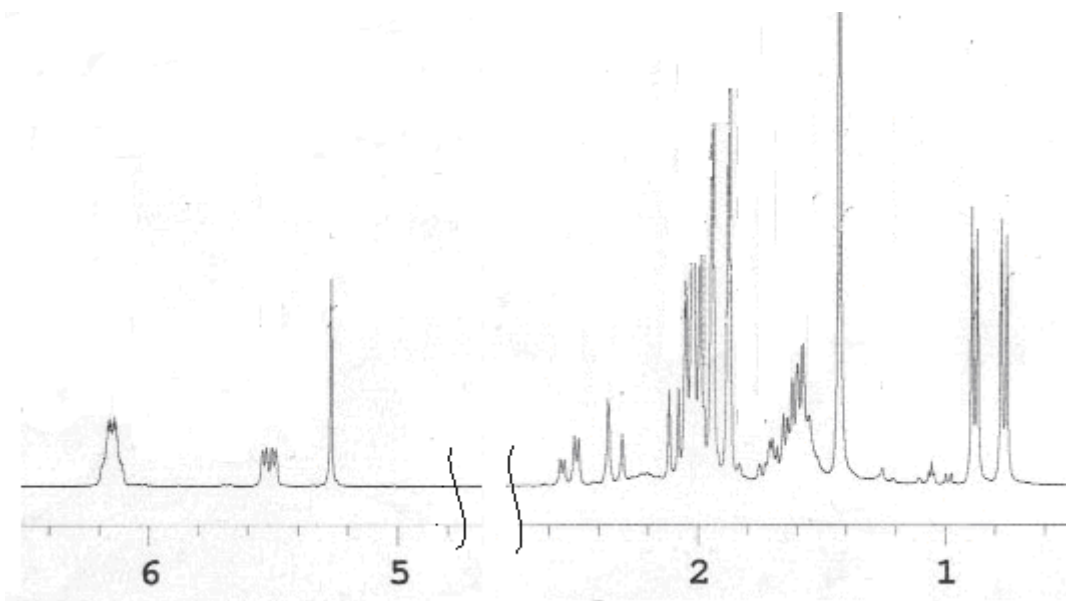
U IR spektru (Slika 76 u Prilogu), najintenzivnija traka na 1711,1 cm⁻¹ odgovara valencionim C=O vibracijama zasićenog ketona. Dva signala u IR spektru ukazuju na prisustvo slobodne hidroksilne grupe: širok signal na 3368,6 cm⁻¹ za intramolekularne vodonične veze slobodne OH grupe i 1144,0 cm⁻¹ za deformacionu vezu C—O hidroksilne grupe (Williams i Fleming, 1995).

U ¹³C NMR spektru (Slika 15) vidljivo je dvadeset pet signala, što ukazuje na prisustvo istog broja ugljenikovih atoma u strukturi i odgovara predloženoj molekularnoj formuli. Izvesni signali se javljaju “u paru“, tj. na veoma sličnim hemijskim pomeranjima (168,8 i 167,6 ppm; 140,6 i 139,7 ppm; 127,6 i 127,3 ppm; 20,7 i 20,7 ppm; 16,1 i 16,1 ppm), što ukazuje na prisustvo dve strukturno identične jedinice.



Slika 15. ¹³C NMR spektar jedinjenja **1** (75 MHz)

U protonskom NMR spektru uočeno je dvadeset različitih signala, za koje je integraljenjem utvrđeno da potiču od trideset osam protona. Uočeni su signali višeg reda (*m*) na hemijskim pomeranjima δ_H 6,16 ppm i δ_H 6,13 ppm. Na hemijskom pomeranju 2,02 ppm nalazi se multiplet za koji je integraljenjem utvrđeno da potiče od šest protona. Na pomeranjima δ_H 1,87 ppm i δ_H 1,94 ppm uočavaju se složeni multipleti, koji potiču od po tri protona. Delovi 1H NMR spektra jedinjenja **1** dati su na Slici 16.



Slika 16. Delovi 1H NMR (300 MHz) spektra jedinjenja **1**

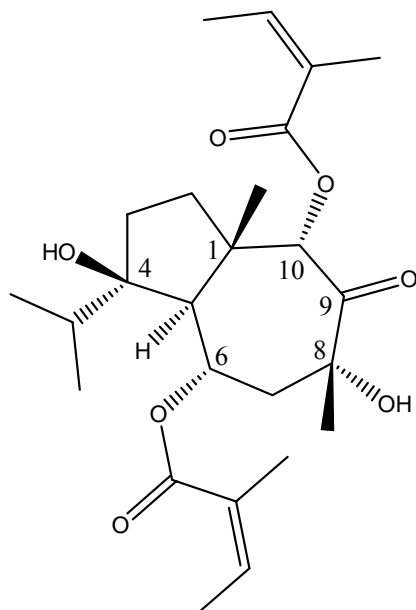
U dvodimenzionalnom gHSQC spektru uočavaju se vandijagonalni, korelacioni signali, koji spajaju direktno vezane, skalarno spregnute C i H atome. U gHMBC spektru uočavaju se vandijagonalni signali koji daju informaciju o skalarno spregnutim ^{13}C i 1H signalima na udaljenosti od 2 do čak 4-5 veza. Analizom gHSQC i gHMBC spektara jedinjenja **1** ustanovljeno je signali koji se javljaju “u paru“ potiču od dva estra angelične kiseline (Moldt i sar., 1987; Holub i sar., 1967). Daljom analizom dvodimenzionalnih NMR spektara, uključujući i COSY spektar (koji daje informacije o homonuklearnom H-H sprezanju na udaljenosti od 2-3 veze), dobijeni su podaci dati u Tabeli 17.

Tabela 17. Podaci dobijeni iz NMR spektara: ^1H (300 MHz), ^{13}C (75 MHz), gHMBC i COSY, za jedinjenje **1**

Položaj	δ_{H} (J u Hz)	δ_{C}	gHMBC	COSY
1	-	46,3	5, 10, 11	-
2	α : 1,65 <i>d</i> (4,8) β : 1,59 <i>d</i> (6,3)	34,7	10, 11	geminalno kuplovanje
3	α : 1,99 <i>m</i> β : 1,60 <i>m</i>	31,5	-	geminalno kuplovanje
4	-	84,7	12, 13, 14	-
5	2,09 <i>d</i> (11,1)	51,4	6, 7, 11	-
6	5,51 <i>dd</i> (11,1; 4,8)	68,7	5, 7	-
7	α : 2,26 <i>d</i> (16,9) β : 2,52 <i>dd</i> (17,0; 4,8)	40,3	15	geminalno kuplovanje
8	-	76,6	7, 15	-
9	-	210,1	7, 15	-
10	5,26 <i>s</i>	81,1	11	-
11	1,42 <i>s</i>	21,9	5	-
12	1,61 <i>m</i>	36,9	13, 14	13, 14
13	0,76 <i>d</i> (6,5)	18,4	12, 14	12
14	0,88 <i>d</i> (6,7)	17,5	12, 13	12
15	1,42 <i>s</i>	29,2	-	-
Angeloil grupa				
-C=O	-	168,8	-C(CH ₃)=	
	-	167,6		
-C(CH ₃)=	-	127,6	-C=CH-	
	-	127,2	-C(CH ₃)=	
-C=CH-	6,16 <i>m</i> , (<i>ql</i>)	140,6	-CH(CH ₃)	
	6,13 <i>m</i> , (<i>ql</i>)	139,7	-C(CH ₃)	
-CH(CH ₃)	2,02 <i>m</i>	16,1		
	2,02 <i>m</i>	16,1		
-C(CH ₃)	1,87 <i>m</i>	20,7		
	1,94 <i>m</i>	20,7		

Zaključeno je da jedinjenje **1** predstavlja laserpicin, diestar laserola i dva molekula angelične ((*Z*)-2-metil-2-butenske) kiseline (Slika 17). Laserpicin, tj. 6 α ,10 α -diangeloiloksi-4 β -hidroksi-dihidroaukan-9-on je prvi izolovani daukanski estar (Ghisalberti, 1994), opisan još početkom dvadesetog veka kao gorka supstanca koja

kristališe iz ekstrakata podzemnih organa *L. latifolium* (Hegi, 1906), a čija je struktura sa sigurnošću utvrđena tek posle nekoliko revizija (Holub i sar., 1967).



Slika 17. Jedinjenje **1** (laserpicin)

2.2. Jedinjenje 2 (acetildezoksodehidrolaserpicin)

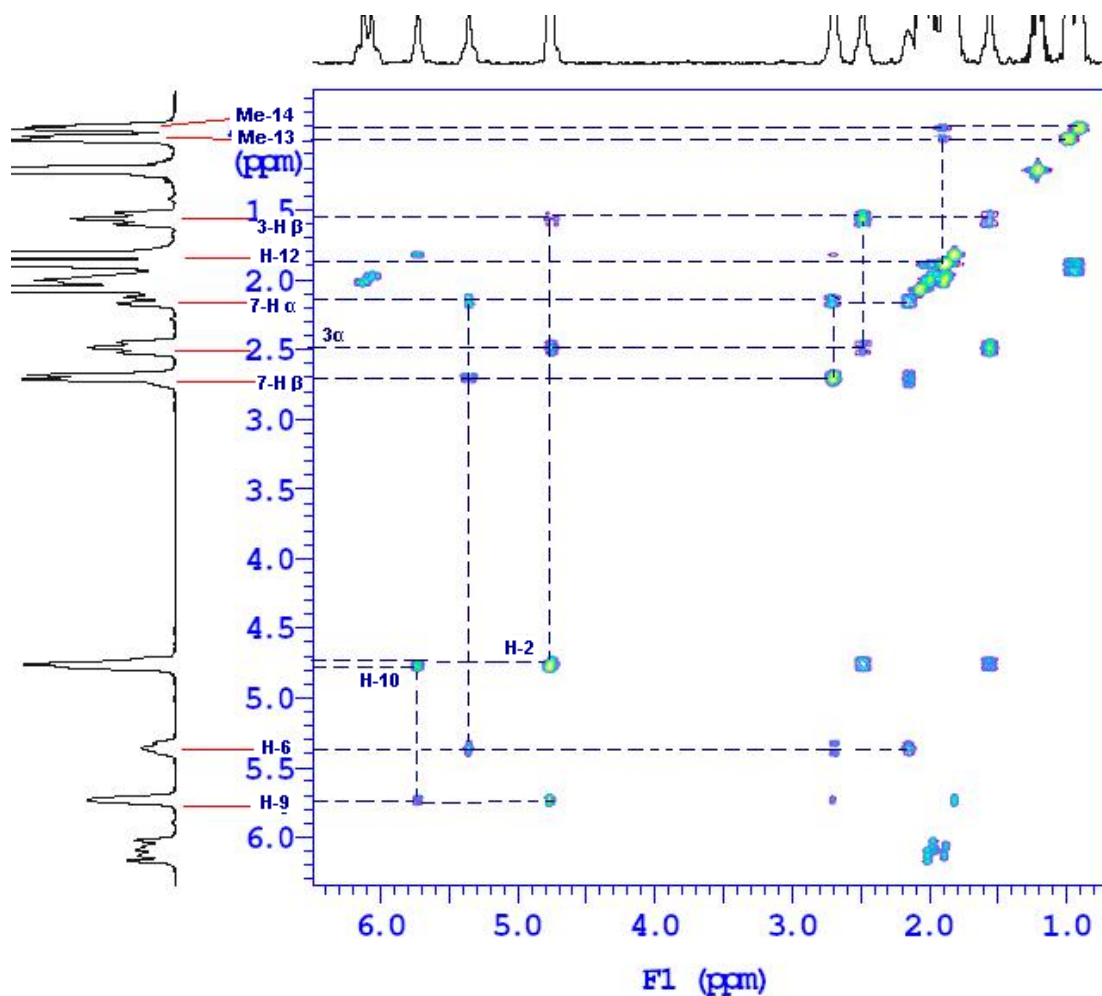
Jedinjenje **2** eluirano je sa kolone silikagela u frakcijama 63-68, koje su spojene i dalje prečišćavane na HPLC semipreparativnoj koloni u izokratskom režimu eluiranja (75% MeOH : 25 % H₂O). Nakon uparavanja rastvarača, dobijeno je jedinjenje **2**, bezbojna, lepljiva tečnost koja se sakupljala na zidovima epruveta.

Analizom HR-MS (ESI⁺) spektra (Slika 59 u Prilogu), uočavaju se molekularni jon na m/z 477,2843 (preračunato 477,2847 za [M + H]⁺) i signal kvazimolekularnog jona na m/z 499,2658 (preračunato 499,2666 za [M + Na]⁺), što odgovara jedinjenju molekulske formule C₂₇H₄₀O₇.

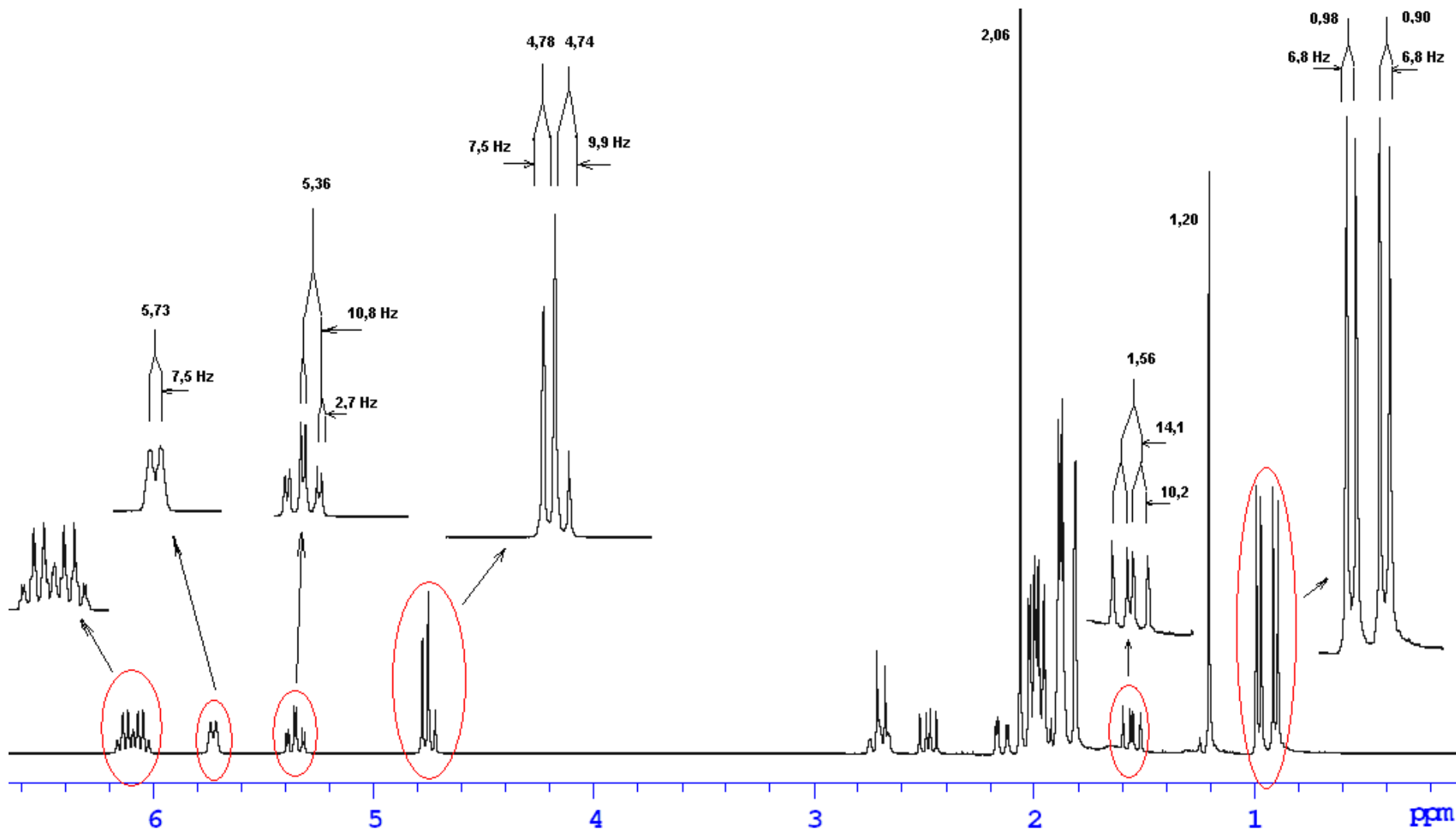
Najintenzivnija traka u IR spektru (Slika 77 u Prilogu) je na 1228,5 cm⁻¹ i potiče od C—O valencione vibracije alkoholne grupe. Druga, nešto slabija traka je na 1710,6 cm⁻¹ i potiče od valencionih vibracija C=O veze estara (Williams i Fleming, 1995).

U ¹H NMR spektru (Slika 18) jedinjenja **2** su, slično kao kod laserpicina, uočeni spektri višeg reda na karakterističnim pomeranjima (δ_H 6,13 i 6,06 ppm, *m*; i složeni multipleti višeg reda na δ_H 1,88 ppm i δ_H 2,02 ppm, koji predstavljaju signale šest protona), što su karakteristična pomeranja za protone estara angelične kiseline (Slika

18). Pored toga, singlet na δ_H 2,06 ppm koji odgovara protonima metil grupe (δ_C 48,8 ppm), ima karakteristično pomeranje za metil grupu acetata (Miski i Mabry, 1986; Smitalova i sar., 1984). Pored karakterističnih signala za dva angelična i jedan acetatni estar, ostala hemijska pomeranja ukazuju na daukanski skelet. Podaci iz 1D (1H i ^{13}C) i 2D NMR spektara, dati su u Tabeli 18.



Slika 19. COSY spektar jedinjenja 2. Na spektru su označeni vandijagonalni, homonuklearni korelacioni signali, koji spajaju skalarno spregnute protone preko 2–3 hemijske veze



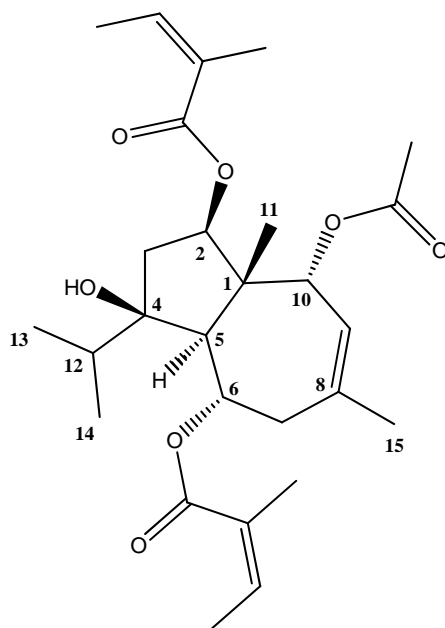
Slika 18. ^1H NMR (300 MHz) spektar jedinjenja 2 sa označenim karakterističnim hemijskim pomeranjima (δ_{H} ppm) i konstantama kuplovanja (Hz)

Tabela 18. Podaci dobijeni iz NMR spektara: ^1H (300 MHz), ^{13}C (75 MHz), gHMBC i COSY, za jedinjenje 2

Položaj	δ_{H} (J u Hz)	δ_{C}	gHMBC	COSY
1	-	48,0	2, 3, 11	-
2	4,74 <i>d</i> (9,9)	74,2	3, 11	3
3	α : 2,48 <i>dd</i> (14,4; 8,7) β : 1,56 (14,1; 10,2)	36,7	12	3
4	-	82,0	3, 12, 13, 14	-
5	2,70 <i>bm</i>	48,8	2, 11	-
6	5,36 <i>td</i> (10,8; 2,7)	69,7		7
7	α : 2,14 <i>dd</i> (14,4; 3,3) β : 2,71 <i>d</i> (11,1)	40,5	15	6
8	-	138,2	10, 15	-
9	5,73 <i>d</i> (7,5)	124,1	10, 15	10
10	4,78 <i>d</i> (7,5)	71,4	7, 8, 9	9
11	1,20 <i>s</i>	21,9	-	-
12	1,88 <i>m</i>	37,1	13, 14	13, 14
13	0,98 <i>d</i> (6,8)	18,4	12, 14	12
14	0,90 <i>d</i> (6,8)	17,3	12, 13	12
15	1,81 <i>s</i>	27,6	-	-
Angeloil grupa				
-C=O	-	168,2	-C(CH ₃)=	
	-	167, 8		
-C(CH ₃)=	-	127,9	-C=CH-	
	-	127,7		-C(CH ₃)=
-C=CH-	6,13 <i>m</i>	139,9	-CH(CH ₃)	
	6,06 <i>m</i>	138,7	-C(CH ₃)	
-CH(CH ₃)	2,02 <i>m</i>	16,1	-C(CH ₃)=	
	2,02 <i>m</i>	16,1		
-C(CH ₃)	1,88 <i>m</i>	20,9	-C=CH-	
	1,88 <i>m</i>	20,7	-C(CH ₃)=	
Acetil grupa				
-C=O	-	170,4	10	
-CH ₃	2,06 <i>s</i>	21,1	-	

Analiza COSY spektra (Slika 19) omogućila je određivanje rasporeda unutar samog daukanskog prstena, a gHSQC spektar povezivanje direktno vezanih, skalarno spregnutih ugljenika i vodonika.

Analizom dobijenih podataka i poređenjem sa literaturnim podacima, zaključeno je da je jedinjenje **2** acetildezoksodehidrolaserpicin, tj. 2 β ,6 α -diangeloiloksi-10 α -acetoksi-daukan-4-ol (Slika 20), retko jedinjenje, do sada izolovano samo iz korena *Ferula tingitana* L. (Miski i Mabry, 1986). ^1H NMR podaci odgovaraju ranije publikovanim vrednostima hemijskih pomeranja i konstanti kuplovanja za ovo jedinjenje (Miski i Mabry, 1986). U okviru ove doktorske disertacije ^{13}C NMR i 2D NMR spektri snimljeni su po prvi put (Slike 94-97 u Prilogu).



Slika 20. Jedinjenje **2** (acetildezoksodehidrolaserpicin)

2.3. Jedinjenje 3 (laserin)

Jedinjenje **3** je sa kolone silikagela eluirano u frakcijama 58–64, koje su dalje prečišćavane na semipreparativnoj koloni u izokraskom režimu eluiranja (72% MeOH : 28 % H₂O). Izolovano jedinjenje **3** je bezbojna tečnost.

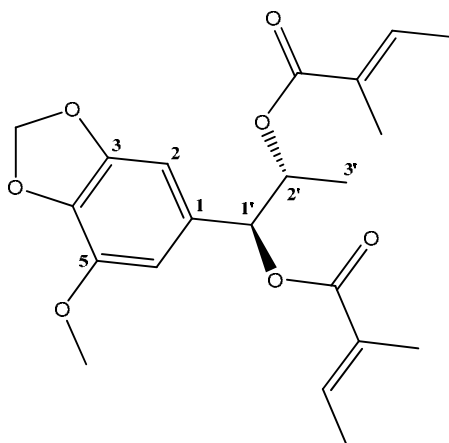
U HR-MS (ESI⁺) spektru (Slika 60 u Prilogu), uočavaju se dominantni signali na m/z 413,1584 i m/z 429,1335, koji odgovaraju kvazimolekulskim jonima jedinjenja molekulske formule C₂₁H₂₆O₇ (preračunate m/z 413,1600 i 429,1300 za [M + Na]⁺ i [M + K]⁺, redom).

Traka u IR spektru (Slika 78 u Prilogu) na 1710,7 cm⁻¹ potiče od valencionih vibracija C=O veze estera (Williams i Fleming, 1995).

^1H , ^{13}C NMR i 2D NMR (COSY, gHSQC i gHMBC) spektralni podaci (Tabela 19) su u skladu sa prethodno objavljenim spektralnim podacima za laserin, tj. 1-[3,4-metilendioksi-5-metoksi-fenil]-1,2-diangeloiloksi-propan (Yang i sar., 2008).

Tabela 19. Podaci dobijeni iz NMR spektara: ^1H (300 MHz), ^{13}C (75 MHz), gHMBC i COSY, za jedinjenje **3**

Položaj	δ_{H} (J u Hz)	δ_{C}	gHMBC	COSY
1	-	101,8	6, 1'	
2	6,57 <i>d</i> (1,2)	101,9	6, 1'	
3	-	135,5		
4	-	149,2	—OCH ₂ O—	
5	-	143,7	6, —OCH ₃	
6	6,55 <i>d</i> (1,5)	107,4	2, 1'	
1'	5,76 <i>d</i> (7,2)	77,7	6, 3'	2'
2'	5,34 <i>ql</i> (6,9)	71,4	1', 3'	1'
3'	1,16 <i>d</i> (7,0)	17,0	-	2'
—OCH ₂ O—	5,95 <i>s</i>	131,2		
—OCH ₃	3,88 <i>s</i>	56,8		
Angeloil grupa				
—C=O	-	167,4		
	-	166,9		
—C(CH ₃)=	-	128,1		
	-	127,0		
—C=CH—	6,08 <i>m</i>	139,2		
	6,05 <i>m</i>	138,4		
—CH(CH ₃)	1,95 <i>m</i>	16,0		
	1,95 <i>m</i>	15,9		
—C(CH ₃)	1,87 <i>m</i>	20,8		
	1,84 <i>m</i>	20,8		



Slika 21. Jedinjenje **3** (laserin)

Laserin (Slika 21) je fenilpropansko jedinjenje prethodno izolovano iz podzemnih organa *L. archangelica* (Holub i Samek, 1973) i *L. siler* subsp. *garganicum* (sub *L. garganicum*) (Appendino i sar., 1986). Ovo jedinjenje izolovano je iz još nekoliko biljaka familije Apiaceae, npr. iz korena šargarepe, *Daucus carota* L. (Yang i sar., 2008), podzemnih organa nekih vrsta roda *Ferula* (Fraga i sar., 1989; Gonzalez i sar., 1988; Appendino i sar., 1990), herbe *Seseli vayredanum* L. (Barrero i sar., 1992) i korena *Laser trilobum* (Holub i sar., 1968).

2.4. Jedinjenje 4 (latifolon)

Jedinjenje **4** eluirano je u frakcijama 34-42 sa kolone silikagela. Nakon prečišćavanja prikupljenih frakcija na semipreparativnoj koloni, u izokratskom sistemu eluiranja (50% MeOH : 50% H₂O), izolovano je amorfno jedinjenje beličaste boje.

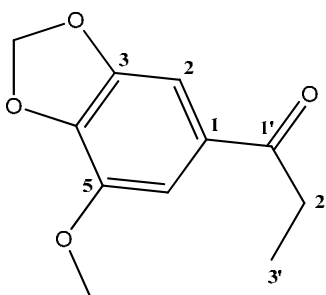
U HR-MS (ESI⁺) spektru (Slika 61 u Prilogu), signal molekuskog jona nalazi se na m/z 209,0826 (preračunato za $[M + H]^+$, 209,0736), pa je zaključeno da jedinjenju **4** odgovara molekulska formula C₁₁H₁₂O₄.

U IR spektru (Slika 79 u Prilogu) preklapljene trake u oblasti od 1679,3 cm⁻¹ do 1095,7 cm⁻¹ potiču od aromatičnog prstena i C–O valencionih vibracija (Williams i Fleming, 1995).

Analizom ¹H i ¹³C NMR spektara uočena je podudarnost sa spektralnim karakteristikama latifolona, tj. 3,4-metilendioksi-5-metoksi-propiofenona (Slika 22), jedinjenja koje je prethodno već izolovano iz podzemnih organa *L. latifolium* (Holub i sar., 1958). Snimljeni 1D i 2D NMR spektralni podaci dati su u Tabeli 20.

Tabela 20. Podaci dobijeni iz NMR spektara: ^1H (300 MHz), ^{13}C (75 MHz), gHMBC i COSY za jedinjenje 4

Položaj	δ_{H} (J u Hz)	δ_{C}	gHMBC	COSY
1	-	132,1	-	
2	7,21 <i>d</i> (1,5)	188,8	6	
3	-	139,7	-	
4	-	149,1	—OCH ₂ O—	
5	-	143,7	—OCH ₃	
6	7,21 <i>d</i> (1,5)	102,9	2	
1'	-	199,1	2, 2', 3'	
2'	2,85 <i>q</i> (7,2)	31,8	3'	3'
3'	1,14 <i>m</i>	8,7	2'	2'
—OCH ₂ O—	6,02 <i>s</i>	102,5	-	
—OCH ₃	3,88 <i>s</i>	56,9	-	



Slika 22. Jedinjenje 4 (latifolon)

3. Identifikacija sekundarnih metabolita izolovanih iz hloroformskog ekstrakta podzemnih organa *L. zernyi*

3.1. Jedinjenje 5 (tarolid)

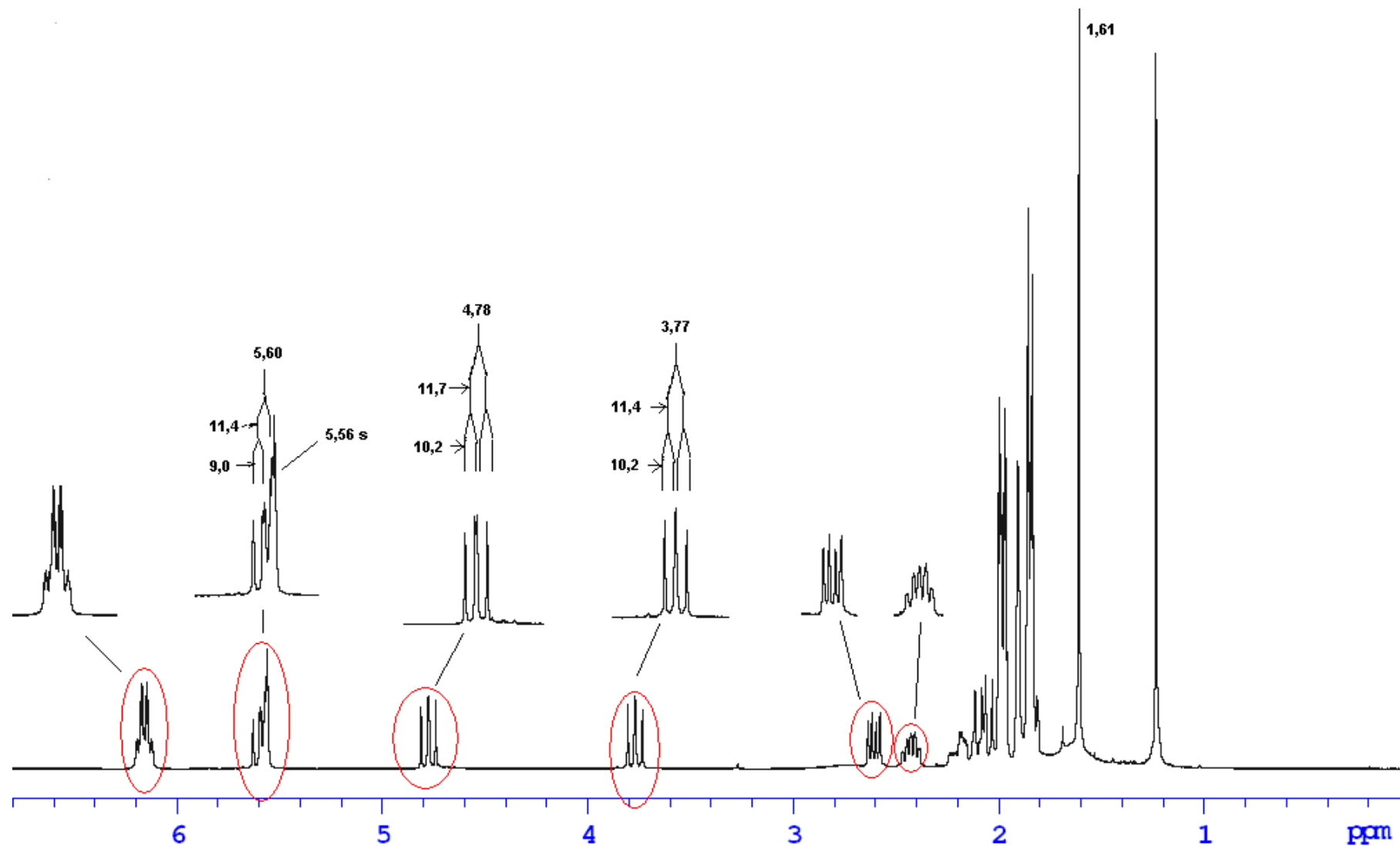
Jedinjenje 5 je sa kolone silikagela eluirano u frakcijama 81-90, zajedno sa još nekim terpenskim jedinjenjima. Jedinjenja u spojenim frakcijama razdvajana su na semipreparativnoj HPLC koloni izokratskim eluiranjem (73% MeOH : 27% H₂O). Nakon uparavanja rastvarača, jedinjenje 5 je iskristalisalo u vidu bezbojnih, igličastih kristala.

U HR-MS (ESI⁺) spektru (Slika 62 u Prilogu), javljaju se signal molekuskog jona na m/z 447,2400 (preračunato m/z 477,2377 za $[\text{M} + \text{H}]^+$) i dva signala kvazimolekulskih jona na m/z 469,2214 i 485,1693 (preračunato m/z 469,2197 i

485,1936 za $[M + Na]^+$ i $[M + K]^+$, redom), što odgovara jedinjenju molekulske formule $C_{25}H_{34}O_7$.

U IR spektru (Slika 80 u Prilogu), traka na $1764,5\text{ cm}^{-1}$ potiče od valencionih vibracija C=O veze laktorskog prstena. Izražena traka na $1695,3\text{ cm}^{-1}$ ukazuje na estarsku vezu, gde je karbonilna grupa estra konjugovana sa dvostrukom vezom, a široka traka na $3495,1\text{ cm}^{-1}$ ukazuje na prisustvo hidroksilne grupe u molekulu (Williams i Fleming, 1995).

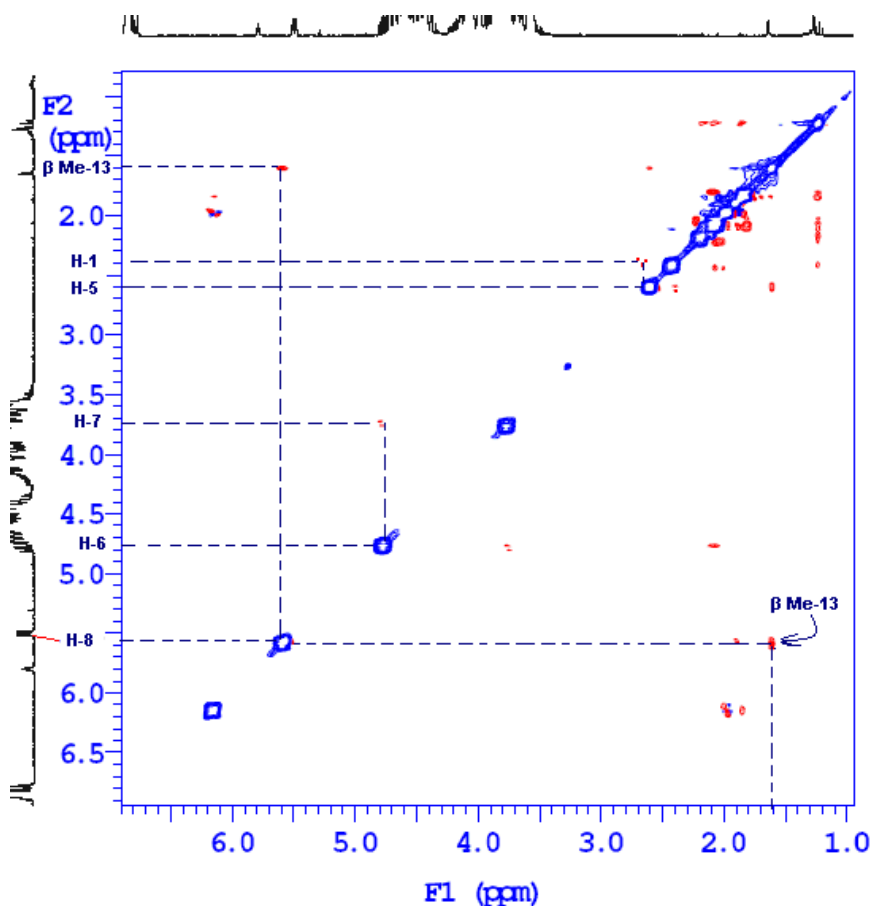
^1H NMR spektar jedinjenja **5** prikazan je na Slici 23.



Slika 23. ^1H NMR (300 MHz) spektar jedinjenja **5**. Karakteristični signali su uveličani i prikazane su konstante kuplovanja (Hz).

Signali na δ_H 4,78 ppm (*dd*: 11,7 i 10,2 Hz) i δ_H 3,77 ppm (*dd*: 11,4 i 10,2 Hz) su karakteristični za protone koji se nalaze ispod laktonskog prstena (Đermanović, 1990). U ^{13}C NMR spektru vidljivi su signali dvadeset pet ugljenikovih atoma. Slično kao kod laserpicina i acetildezoksodehidrolaserpicina, određeni signali javljaju se “u paru“, što zajedno sa pojavom karakterističnih složenih multiplleta na δ_H 6,13 ppm i δ_H 6,18 ppm, kao i signala višeg reda na δ_H 1,84 ppm i δ_H 1,86 ppm, odnosno δ_H 2,00 ppm i δ_H 1,97 ppm, ukazuje na prisustvo dva angelična estra u strukturi.

Da bi se odredila struktura i povezali određeni signali iz 1D NMR spektara, izvedeni su dalje 2D NMR eksperimenti: gHSQC i gHMBC, koji daju uvid u heteronuklearna sprezanja, kao i COSY koji povezuje skalarno spregnute protone. NOESY eksperiment je izvršen sa ciljem da se odredi stereochemijska struktura, naročito položaj prstenova, jer NOESY spektar daje informaciju o dipolarno spregnutim, prostorno bliskim protonima. NOESY spektar sa naznačenim spregnutim protonima dat je na Slici 24. 1D i 2D NMR spektralni podaci dati su u Tabeli 21.



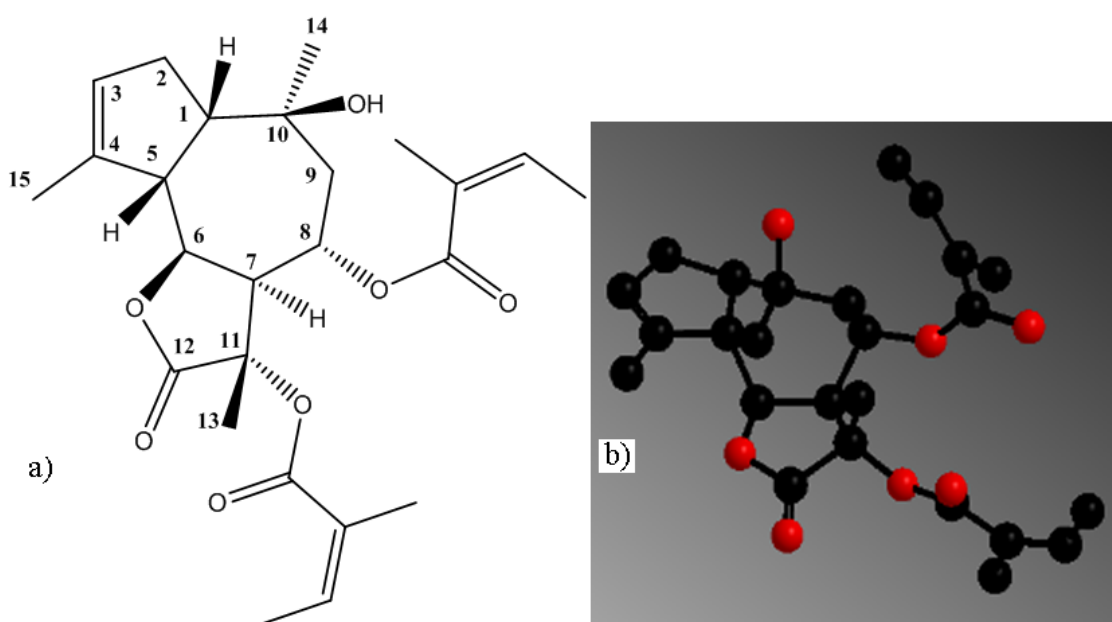
Slika 24. NOESY spektar jedinjenja **5** sa označenim karakterističnim dipolarnim sprezanjima prostorno bliskih protona

Tabela 21. Podaci dobijeni iz NMR spektara: ^1H (300 MHz), ^{13}C (75 MHz), gHMBC, COSY i NOESY, za jedinjenje **5**

Položaj	δ_{H} (J u Hz)	δ_{C}	gHMBC	COSY	NOESY
1	2,43 <i>qui</i> (5,4)	56,1	9 β	5	5
2	α : 2,13 <i>m</i> β : 2,19 <i>m</i>	32,4	-	geminalno kuplovanje	-
3	5,56 <i>bs</i>	125,9	5, 15	2	-
4	-	147,5	15	-	-
5	2,61 <i>q</i> (5,7)	48,6	-	1, 6	1
6	4,78 <i>dd</i> (11,7; 10,2)	78,4	5, 7	5, 7	7
7	3,77 <i>dd</i> (11,4; 10,2)	47,7	9, 13	6	6
8	5,60 <i>dd</i> (11,4; 9,0)	67,1	9 β	-	13
9	α : 2,07 <i>pt</i> β : 1,83 <i>m</i>	43,9	14	geminalno kuplovanje	-
10	-	71,5	9, 14	-	-
11	-	78,5	7, 13	-	-
12	-	174,5	13	-	-
13	1,61 <i>s</i>	20,3	-	-	8
14	1,23 <i>s</i>	31,3	-	-	-
15	1,91 <i>s</i>	19,0	-	-	-
Angeloil grupa					
-C=O	-	168,1	-C(CH ₃)=	-	-
	-	166,8			
-C(CH ₃)=	-	127,3	-CH(CH ₃)	-	-
	-	126,9	-C(CH ₃)		
-C=CH-	6,18 <i>m</i>	141,1	-CH(CH ₃)	-	-
	6,13 <i>m</i>	140,5	-C(CH ₃)		
-CH(CH ₃)	2,00 <i>m</i>	16,2	-C=CH-	-	-
	2,00 <i>m</i>	16,1			
-C(CH ₃)	1,84 <i>m</i>	20,5	-C=CH-	-	-
	1,86 <i>m</i>	20,4			

Analizom dobijenih spektara zaključeno je da je jedinjenje **5** tarolid, tj. 8 α ,11 α -diangeloiloksi-10 β -hidroksi-6 α H,7 α H-gvajen-3-en-12,6-olid (Slika 36), seskviterpenski lakton slovanolidne strukture, čija je karakteristična 1 β H,5 β H,6 α H,7 α H-gvajen-3-en-12,6-olidna struktura potvrđena izvedenim NOESY eksperimentom. Ovaj lakton je po prvi put izolovan iz herbe *L. siler* (Stefanović i sar., 1977), i dobio je trivijalan naziv po planini (Tara, Srbija) sa koje je sakupljen biljni materijal. Tarolid je kasnije izolovan i iz

podzemnih organa ove biljke (Smitalova i sar., 1984), kao i iz korena *L. siler* subsp. *garganicum* (sub *L. garganicum*) (Appendino i sar., 1985). Do sada publikovani ^1H i ^{13}C NMR spektri za tarolid odgovaraju spektrima jedinjenja **5**, a snimljeni 2D spektri su u saglasnosti sa predloženom strukturom (Tabela 21). Predložen 3D model (Slika 25) je nacrtan u ChemBioOffice 2008 programu, uz opciju preračuna minimalne energije. Vodonikovi atomi su zbog preglednosti izostavljeni, a kiseonikovi atomi su, zbog razlikovanja od ugljeničnih, obojeni crveno.



Slika 25. Jedinjenje **5** (tarolid): a) hemijska i b) 3D struktura minimalne energije (atomi kiseonika prikazani su crvenom bojom, atomi vodonika su, zbog preglednosti, izostavljeni)

3.2. Jedinjenje 6 (acetilizomontanolid)

Jedinjenje **6** je sa kolone silikagela eluirano u frakcijama 71-78, zajedno sa jedinjenjem **8**. Spojene frakcije (71-78) razdvajane su dalje na semipreparativnoj HPLC koloni u izokratskom režimu (35% MeCN : 35% MeOH : 30% H₂O). Nakon uparavanja rastvarača, jedinjenje **6** se izdvojilo kao beličasta praškasta supstanca.

Na osnovu pojave signala kvazimolekulskog jona na m/z 471,2002 (preračunato m/z 471,1984 za $[\text{M} + \text{Na}]^+$) u HR-MS (ESI⁺) spektru (Slika 63 u Prilogu), zaključeno je da jedinjenju **6** odgovara molekulska formula C₂₄H₃₂O₈.

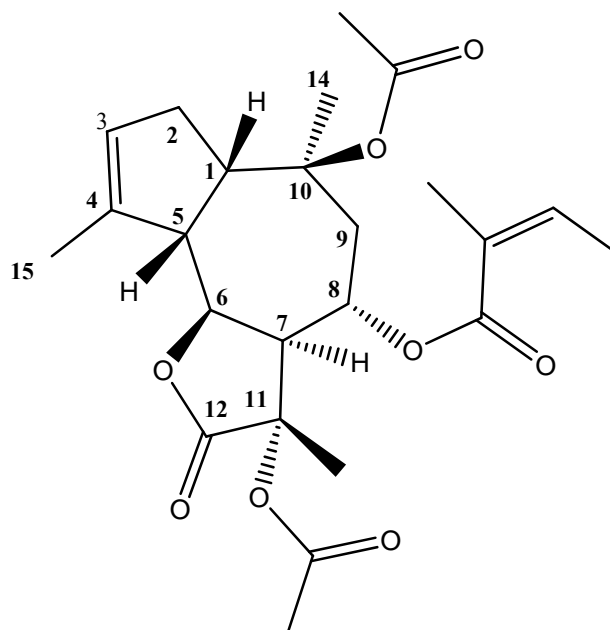
U IR spektru (Slika 81 u Prilogu), traka na $1787,5\text{ cm}^{-1}$ potiče od valencionih vibracija C=O veze laktonskog prstena. Izražena traka na $1713,3\text{ cm}^{-1}$ ukazuje na estarsku vezu, gde je karbonilna grupa estra konjugovana sa dvostrukom vezom (Williams i Fleming, 1995).

Podaci dobijeni 1D i 2D NMR eksperimentima ukazuju da jedinjenje **6** ima strukturu slovanolida, odnosno gvajanolida sa $1\beta\text{H}, 5\beta\text{H}, 6\alpha\text{H}, 7\alpha\text{H}$ -gvajan-3-en-12,6-olidnom strukturom, sa dva acetatna estra i jednim estrom angelične kiseline. Analizom gHMBC spektara zaključeno je da se radi o 8α -angeloiloksi- $11\alpha, 10\beta$ -diacetoksi- $6\alpha\text{H}, 7\alpha\text{H}$ -gvajan-3-en-12,6-olidu, tj. acetilizomontanolidu (Slika 26). Holub i saradnici (1972) su ovo jedinjenje prvi put izolovali iz ploda *L. siler* i pretpostavili strukturu na osnovu fizičko-hemijskih (tačka topljenja i hemijska derivatizacija) i spektroskopskih karakteristika (^1H NMR, IR i MS spektri). Stefanović i saradnici (1977) su ga izolovali i iz herbe ove biljke, a nekoliko godina kasnije $1\beta\text{H}, 5\beta\text{H}, 6\alpha\text{H}, 7\alpha\text{H}$ -gvajan-3-en-12,6-olidna struktura slovanolida je potvrđena kristalografskim metodama (Rychlewska i sar. 1984).

Dobijeni 1D i 2D NMR podaci prikazani su u Tabeli 22. Hemijska formula acetilizomontanolida data je na Slici 26.

Tabela 22. Podaci dobijeni iz NMR spektara: ^1H (300 MHz), ^{13}C (75 MHz), gHMBC i COSY, za jedinjenje **6**

Položaj	δ_{H} (J u Hz)	δ_{C}	gHMBC	COSY
1	2,77 <i>m</i>	53,5	9, 14	
2	α : 2,20 <i>m</i> β : 2,31 <i>m</i>	31,8	1, 5	3
3	5,57 <i>bs</i>	125,7	5, 15	2
4	-	146,2	5, 15	
5	2,60 <i>q</i> (6,0)	49,3	1, 7, 15	6
6	4,73 <i>dd</i> (11,7; 10,8)	78,3	7, 13	5, 7
7	3,67 <i>t</i> (10,5)	48,0	8, 9, 13	6, 8
8	5,67 <i>t</i> (10,2)	64,2	7, 9, 14	7, 9
9	α : 2,66 <i>bm</i> β : 2,16 <i>bd</i> (2,1)	41,1	14	geminalno kuplovanje
10	-	82,7	1, 8, 9, 14	
11	-	77,7	5, 7, 13	
12	-	174,0	6, 13	
13	1,60 <i>s</i>	20,3	-	-
14	1,54 <i>s</i>	24,8	9	
15	1,90 <i>s</i>	18,6	-	
Angeloil grupa				
-C=O	-	166,2	-C(CH ₃)=	
-C(CH ₃)=	-	127,4	-CH(CH ₃)	
-C=CH-	6,08 <i>m</i>	138,7	-C(CH ₃)=	
-CH(CH ₃)=	1,98 <i>m</i>	15,7		
-C(CH ₃)	1,86 <i>m</i>	20,3		
Acetil grupa				
-C=O	-	170,4	-CH ₃ (Ac)	-
	-	169,7		
-CH ₃	2,13 <i>s</i>	22,7	-	-
	2,02 <i>s</i>	20,9		



Slika 26. Jedinjenje 6 (acetilizomontanolid)

3.3. Jedinjenje 7 (acetilmontanolid)

Jedinjenje 7 je sa kolone silikagela eluirano u frakcijama 80-88, zajedno sa jedinjenjem 5. Spojene frakcije (80-88) razdvajane su dalje na semipreparativnoj koloni u izokratskom režimu eluiranja (73% MeOH : 27% H₂O). Već po retencionim karakteristikama, i reakciji bojenja sa vanilin-sumporna kiselina reagensom, uočena je znatna sličnost sa jedinjenjem 6.

Jedinjenje 7 je, kao i jedinjenje 6, beličasta praškasta supstanca kojoj odgovara molekulska formula C₂₄H₃₂O₈, na osnovu pojave signala kvazimolekulskih jona na *m/z* 471,2025 i 487,1774 (preračunate *m/z* su 471,1984 i 487,1729, za [M + Na]⁺ i [M + K]⁺, redom) u HR-MS (ESI⁺) spektru (Slika 64 u Prilogu).

U IR spektru (Slika 82 u Prilogu), traka na 1785,1 cm⁻¹ potiče od valencionih vibracija veze C=O grupe u laktoskom prstenu. Izražena traka na 1720,3 cm⁻¹ ukazuje na estarsku vezu, gde je karbonilna grupa estra konjugovana sa dvostrukom vezom (Williams i Fleming, 1995).

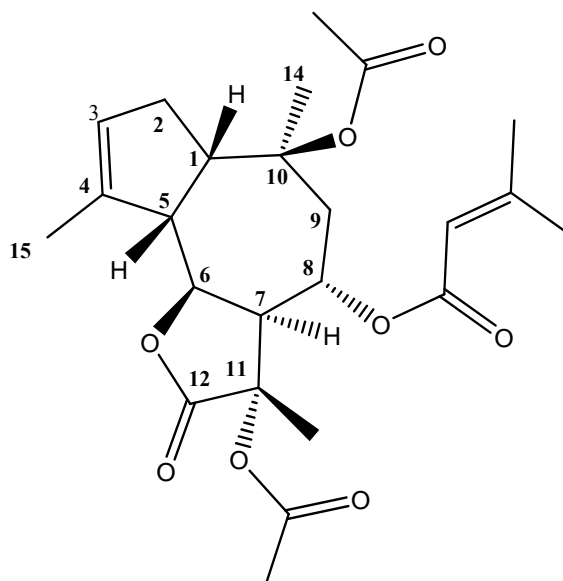
¹H i ¹³C NMR spektri ukazuju da se radi o derivatu slovanolida sa 1βH,5βH,6αH,7αH-gvajjan-3-en-12,6-olidnom strukturom, sa dva acetatna estra, kod koga, za razliku od acetilizomontanolida, treći estar potiče od kiseline koja ima pet ugljenikovih atoma (δ_C 165,0; 158,1; 115,8; 27,7 i 20,6 ppm), ali nešto drugačijih

pomeranja u ^{13}C NMR spektru od angelične kiseline. Pojava multiplleta na δ_{H} 5,59 ppm i dva široka singleta na δ_{H} 1,91 i 2,18 ppm koji odgovaraju metil grupama, ukazuju na prisustvo senecioil estra (β,β -dimetilakroiloksi) (Slika 27).

Poređenjem ^1H NMR spektra sa prethodno publikovanim podacima za slovanolide slične strukture, zaključeno je da je jedinjenje **7** acetilmontanolid, odnosno 8α -senecioiloksi- $11\alpha,10\beta$ -diacetoksi- $6\alpha\text{H},7\alpha\text{H}$ -gvajan-3-en-12,6-olid, prethodno izolovan iz ploda (Holub i sar., 1972) i podzemnih organa *L. siler* (Holub i sar. 1978), a čija je predložena struktura potvrđena kristalografskom analizom (Rychlewska i sar., 1984). Podaci dobijeni iz 1D i 2D NMR eksperimenata za jedinjenje **7** dati su u Tabeli 23.

Tabela 23. Podaci dobijeni iz NMR spektara: ^1H (300 MHz), ^{13}C (75 MHz), gHMBC i COSY, za jedinjenje 7

Položaj	δ_{H} (J u Hz)	δ_{C}	gHMBC	COSY
1	2,78 <i>m</i>	53,5	14	
2	α : 2,19 <i>m</i> β : 2,25 <i>m</i>	32,0	-	3
3	5,57 <i>bs</i>	125,9	15	2
4	-	146,4	15	
5	2,58 <i>m</i>	49,5	-	6
6	4,72 <i>dd</i> (11,4; 9,9)	78,5	7, 13	5, 7
7	3,63 <i>t</i> (10,5)	48,1	8, 13	6, 8
8	5,61 <i>t</i> (10,2)	63,7	7	7, 9
9	α : 2,62 <i>bm</i> β : 1,97 <i>bd</i> (4,8)	41,3	14	geminalno kuplovanje
10	-	83,0	9, 14	
11	-	78,1	13	
12	-	174,4	13	
13	1,59 <i>s</i>	20,6	-	-
14	1,53 <i>s</i>	25,2	-	
15	1,90 <i>s</i>	18,7	-	
Senecioil grupa				
-C=O	-	165,0	-C(CH ₃)=	
-CH=	5,59 <i>m</i>	115,8	=C(CH ₃) ₂	
-C=C(CH ₃) ₂	-	158,1	-CH=	
=C(CH ₃) ₂	1,91 <i>bs</i>	15,7	-CH=	
=C(CH ₃) ₂	2,18 <i>bs</i>	20,3	-CH=	
Acetil grupa				
-C=O	-	170,6	-CH ₃ (Ac)	-
	-	169,9		
-CH ₃	2,12 <i>s</i>	22,9		
	2,03 <i>s</i>	21,1		



Slika 27. Jedinjenje 7 (acetilmontanolid)

3.4. Jedinjenje 8 (silerolid)

Jedinjenje **8** je sa kolone silikagela eluirano u frakcijama 71-78, zajedno sa jedinjenjem **6**. Spojene frakcije su dalje razdvajane na semipreparativnoj HPLC koloni u izokratskom režimu eluiranja (35% MeCN : 35% MeOH : 30% H₂O).

Jedinjenje **8** je bezbojna tečna supstanca, koja se lepi po zidovima sudova. Ovom jedinjenju odgovara molekulska formula C₂₂H₃₀O₆ na osnovu pojave molekulskog jona na m/z 391,2126 (preračunato m/z 391,2115 za [M + H]⁺) i kvazimolekulskog jona na m/z 413,1944 (preračunato m/z 413,1936 za [M + Na]⁺) u HR-MS (ESI⁺) spektru (Slika 65 u Prilogu).

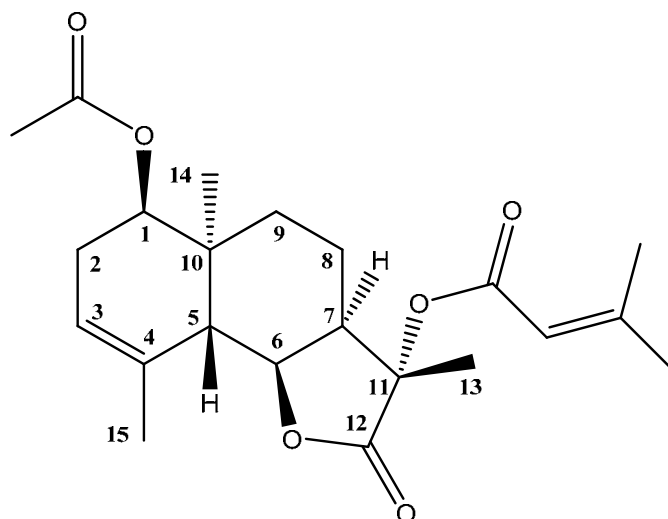
U IR spektru (Slika 83 u Prilogu), traka na 1759,1 cm⁻¹ potiče od valencionih vibracija veze C=O u laktonu. Izražena traka na 1720,1 cm⁻¹ ukazuje na estarsku vezu, gde je karbonilna grupa estra konjugovana sa dvostrukom vezom (Williams i Fleming, 1995).

U 1D i 2D NMR spektrima uočeni su karakteristični signali koji potiču od acetatnog i senecioil estra, ali za razliku od prethodnih jedinjenja, ¹H i ¹³C NMR spektri ukazuju da jedinjenje **8** nije lakton gvajanolidne strukture. Hemijsko pomeranje u ¹³C NMR spektru za karbonilnu grupu laktona je na 175,2 ppm, dok protonima H-6 i H-7 odgovaraju signali na δ_H 4,84 ppm (*dd*: 11,1; 8,7 Hz) i 3,25 ppm (*m*), što ukazuje na eudezmanolidnu strukturu (Holub i sar., 1986). Analizom 1D i 2D spektara

ustanovljeno je da je jedinjenje **8**: 1 β -acetoksi,11 α -senecioiloksi-6 α H,7 α H-eudezman-3-en-6,12-olid, odnosno silerolid (Slika 28), prethodno izolovan iz podzemnih organa (rizom i koren) *L. siler* (Holub i sar., 1986). Kompletni 1D i 2D NMR podaci dati su u Tabeli 24.

Tabela 24. Podaci dobijeni iz NMR spektara: ^1H (300 MHz), ^{13}C (75 MHz), gHMBC i COSY, za jedinjenje **8**

Pozicija	δ_{H} (J u Hz)	δ_{C}	gHMBC	COSY
1	4,62 <i>d</i> (4,2)	75,2	14	
2	α : 2,11 <i>m</i> β : 2,36 <i>m</i>	29,0	-	3
3	5,34 <i>bs</i>	119,8	15	2
4	-	133,6	15	
5	2,43 <i>bs</i>	42,1	14	6
6	4,84 <i>dd</i> (11,1; 8,7)	78,4	-	5, 7
7	3,25 <i>m</i>	39,6	13	6
8	α : 1,85 <i>m</i> β : 1,78 <i>m</i>	19,0	-	
9	α : 1,64 <i>m</i> β : 1,20 <i>m</i>	30,7	14	geminalno kuplovanje
10	-	36,2	14	
11	-	79,7	13	
12	-	175,2	13	
13	1,57 <i>s</i>	20,3	-	-
14	0,88 <i>s</i>	18,2	-	
15	1,91 <i>s</i>	23,2	-	
Senecioil grupa				
-C=O	-	165,3	-C(CH ₃)=	
-CH=	5,34 <i>bs</i>	115,3	=C(CH ₃) ₂	
-C=C(CH ₃) ₂	-	160,0	-CH=	
=C(CH ₃) ₂	1,91 <i>bs</i>	27,8	-CH=	
=C(CH ₃) ₂	2,15 <i>bs</i>	20,6	-CH=	
Acetil grupa				
-C=O	-	170,6	-CH ₃ (Ac)	-
-CH ₃	2,05 <i>s</i>	21,5	-	-



Slika 28. Jedinjenje 8 (silerolid)

3.5. Jedinjenje 9 (izomontanolid)

Jedinjenje 9 je sa kolone eluirano u frakcijama 99–105, i dalje prečišćavano na semipreparativnoj HPLC koloni u izokraskom sistemu mobilnih faza (65% MeOH : 35% H₂O). Po uparavanju rastvarača, jedinjenje 9 je iskristalisalo u vidu bezbojnih, igličastih kristala.

Na osnovu pojave signala kvazimolekulskih jona na m/z 429,1892 (preračunato 429,1884 za $[M + Na]^+$) i 445,1619 (preračunato 445,1623 za $[M + K]^+$) u HR-MS (ESI⁺) spektru (Slika 66 u Prilogu), zaključeno je da jedinjenju 9 odgovara molekulska formula C₂₂H₃₀O₇.

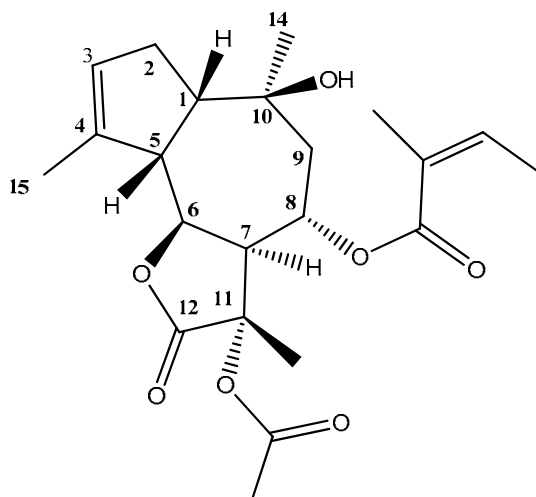
U IR spektru (Slika 84 u Prilogu), traka na 1758,9 cm⁻¹ potiče od valencionih vibracija veze C=O u laktonu. Izražene trake na 1745,2 i 1692,2 cm⁻¹ ukazuju na prisustvo estarskih grupa, od kojih je jedna konjugovani sistem (Williams i Fleming, 1995).

¹H i ¹³C NMR spektri takođe ukazuju da je jedinjenje 9 derivat slovanolida sa 1βH,5βH,6αH,7αH-gvajjan-3-en-12,6-olidnom strukturom, vrlo sličnom strukturi acetilizomontanolida (jedinjenje 6), ali sa jednim acetatnim i jednim angeličnim estrom. Poređenjem dobijenih ¹H i ¹³C NMR podataka sa odgovarajućim literaturnim podacima zaključeno je da je jedinjenje 9: 8α-angeloiloksi,11α-acetoksi-10β-hidroksi-6αH,7αH-gvajjan-3-en-12,6-olid, odnosno izomontanolid (Slika 29). Ovaj slovanolidni derivat prethodno je izolovan iz podzemnih organa (Holub i sar., 1978), herbe (Milosavljević i

sar., 1999) i ploda (Holub i sar., 1972) *L. siler*. 1D i 2D NMR podaci jedinjenja **9** prikazani su u Tabeli 25.

Tabela 25. Podaci dobijeni iz NMR spektara: ^1H (300 MHz), ^{13}C (75 MHz), gHMBC i COSY, za jedinjenje **9**

Položaj	δ_{H} (J u Hz)	δ_{C}	gHMBC	COSY
1	2,42 <i>m</i>	56,1	14	-
2	α : 2,05 <i>m</i> β : 2,11 <i>m</i>	32,4	-	3
3	5,57 <i>bs</i>	126,0	15	2
4	-	147,3	15	-
5	2,58 <i>q</i> (5,7)	49,5	-	6
6	4,72 <i>dd</i> (11,4; 9,9)	78,4	-	5, 7
7	3,67 <i>dd</i> (11,4; 9,6)	47,6	13	6, 8
8	5,54 <i>dd</i> (11,4; 9,0)	67,1	9	7
9	α : 2,10 <i>m</i> β : 1,85 <i>m</i>	43,7	14	geminalno kuplovanje
10	-	71,5	9, 14	-
11	-	78,6	13	-
12	-	174,3	13	-
13	1,55 <i>s</i>	20,3	-	-
14	1,23 <i>s</i>	31,3	-	-
15	1,89 <i>s</i>	19,0	-	-
Angeloil grupa				
-C=O	-	168,0	-C(CH ₃)=	
-C(CH ₃)=	-	127,1	-CH(CH ₃)	
-C=CH-	6,02 <i>m</i>	141,1	-C(CH ₃)=	
-CH(CH ₃)=	2,03 <i>m</i>	16,1		
-C(CH ₃)	1,89 <i>m</i>	20,6		
Acetil grupa				
-C=O	-	170,0	-CH ₃ (Ac)	-
-CH ₃	2,06 <i>s</i>	21,2	-	-



Slika 29. Jedinjenje 9 (izomontanolid)

3.6. Jedinjenje 10 (montanolid)

Jedinjenje 10 je sa kolone eluirano u frakcijama 90 – 98, i dalje prečišćavano na HPLC semipreparativnoj koloni u izokratskom sistemu mobilnih faza (65% MeOH : 35% H₂O). Jedinjenje 10 je bezbojna tečnost, koja se lepi za zidove sudova.

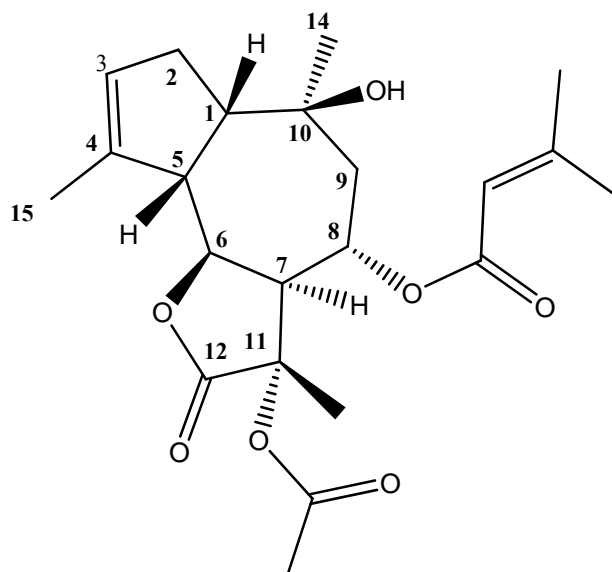
Jedinjenju 10 odgovara molekulska formula C₂₂H₃₀O₇, na osnovu pojave signala kvazimolekulskih jona na *m/z* 429,1910 (preračunato 429,1884 za [M + Na]⁺) i *m/z* 445,1649 (preračunato 445,1623 za [M + K]⁺) u HR-MS (ESI⁺) spektru (Slika 67 u Prilogu).

U IR spektru (Slika 85 u Prilogu), traka na 1784,6 cm⁻¹ potiče od valencionih vibracija veze C=O u laktonu. Izražena traka na 1711,6 cm⁻¹ potiče od estarske grupe (Williams i Fleming, 1995).

¹H i ¹³C NMR spektri ukazuju da se radi o derivatu slovanolida sa 1βH,5βH,6αH,7αH-gvajjan-3-en-12,6-olidnom strukturom, vrlo sličnom strukturi izomontanolida (9), samo što se u spektrima vide karakteristična pomeranja za senecioiloksi grupu, umesto angeloiloksi grupe, prisutne u strukturi izomontanolida. Na osnovu prethodno objavljenih podataka, zaključeno je da je jedinjenje 10: 8α-senecioiloksi,11α-acetoksi-10β-hidroksi-6αH,7αH-gvajjan-3-en-12,6-olid, trivijalno nazvan montanolid (Slika 30), slovanolidni derivat prethodno izolovan iz podzemnih organa (Holub i sar., 1978; Smitalova i sar., 1984), herbe (Milosavljević i sar., 1999) i ploda (Holub i sar., 1972) *L. siler*. 1D i 2D NMR podaci jedinjenja 10 dati su u Tabeli 26.

Tabela 26. Podaci dobijeni iz NMR spektara: ^1H (300 MHz), ^{13}C (75 MHz), gHMBC i COSY za jedinjenje **10**

Položaj	δ_{H} (J u Hz)	δ_{C}	gHMBC	COSY
1	2,40 <i>m</i>	56,1	2, 9, 14	5
2	α : 2,04 <i>m</i> β : 2,12 <i>d</i> (9,6)	32,4	1, 5	3
3	5,56 <i>bs</i>	126,0	5, 15	2
4	-	147,3	5, 15	-
5	2,58 <i>q</i> (5,7)	49,4	6, 7, 15	6
6	4,71 <i>dd</i> (11,4; 10,2)	78,5	5, 7	5, 7
7	3,61 <i>dd</i> (11,1; 10,2)	47,5	9, 13	6, 8
8	5,52 <i>dd</i> (11,1; 9,6)	66,2	7, 9	7, 9
9	α : 1,99 <i>d</i> (9,6) β : 1,82 <i>m</i>	43,7	14	geminalno kuplovanje
10	-	71,4	1, 9, 14	-
11	-	78,6	6, 7, 13	-
12	-	174,4	6, 13	-
13	1,55 <i>s</i>	20,3	-	-
14	1,22 <i>s</i>	31,3	-	-
15	1,88 <i>s</i>	19,0	-	-
Senecioil grupa				
-C=O	-	166,8	-C(CH ₃)=	
-CH=	5,62 <i>m</i>	115,6	-CH(CH ₃)	
-C=C(CH ₃) ₂	-	159,4	-C(CH ₃)=	
=C(CH ₃) ₂	2,20 <i>bd</i> (1,2)	20,7		
=C(CH ₃) ₂	1,94 <i>bd</i> (1,2)	27,9		
Acetil grupa				
-C=O	-	170,0	-CH ₃ (Ac)	-
-CH ₃	2,08 <i>s</i>	21,2	-	-



Slika 30. Jedinjenje 10 (montanolid)

3.7. Jedinjenje 11 (8 α -senecioiloksi,10 β -hidroksi-6 α H,7 α H-gvajan-3-en-12,6-olid)

Jedinjenje **11** je u hloroformskom ekstraktu podzemnih organa *L. zernyi* prisutno u veoma niskoj koncentraciji. Sa kolone silikagela eluirano je u frakcijama 91–95, zajedno sa jedinjenjem **10**. Dalje razdvajanje spojenih frakcija vršeno je na semipreparativnoj HPLC koloni u izokratskom režimu eluiranja (65% MeOH : 35% H₂O). Jedinjenje **11** je bezbojna tečnost, koja se lepi za zidove sudova.

U HR-MS (ESI⁺) spektru (Slika 68 u Prilogu), uočavaju se dva signala kvazimolekulskih jona na m/z 371,0713 (preračunato 371,1829 za [M + Na]⁺) i m/z 387,0435 (preračunato 387,1568 za [M + K]⁺), što odgovara jedinjenju molekulske formule C₂₀H₂₈O₅.

U IR spektru jedinjenja **11** (Slika 86 u Prilogu), traka na 1759,1 cm⁻¹ potiče od valencionih vibracija veze C=O u laktonu. Traka na 3498,1 cm⁻¹ potiče od deformacionih vibracija slobodne hidroksilne grupe (Williams i Fleming, 1995).

Analizom 1D i 2D NMR spektara utvrđeno je prisustvo slobodne hidroksilne grupe na C-10 (δ_C 71,7 ppm u ¹³C NMR spektru). Multiplet na δ_H 2,73 ppm odgovara protonu na položaju C-11 (δ_C 36,6 ppm). To znači da jedinjenje **11** nema ester na položaju 11 β . Takođe, signal tri protona metil grupe na položaju C-13 (δ_H 1,31 ppm) ima oblik dubleta, sa konstantom kuplovanja 7,8 Hz, što potvrđuje prisustvo protona na položaju C-11.

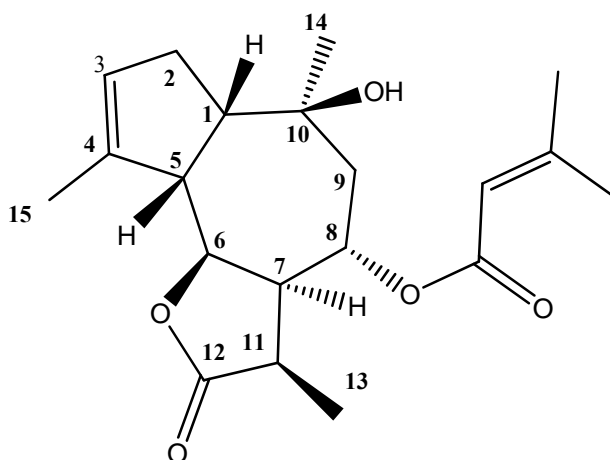
Analizom NMR spektara zaključeno je da je jedinjenje **11**: 12 (Slika 31), lakton koji je prethodno izolovan iz herbe *Seseli vayredanum* (Barrero i sar., 1994). U okviru ove doktorske disertacije ovo jedinjenje je prvi put izolovano iz vrste roda *Laserpitium* – ekstrakta podzemnih organa *L. zernyi*.

Podaci dobijeni 1D i 2D NMR eksperimentima za jedinjenje **11** dati su u Tabeli 27.

Tabela 27. Podaci dobijeni iz NMR spektara: ^1H (300 MHz), ^{13}C (75 MHz), gHMBC i COSY, za jedinjenje 11

Položaj	δ_{H} (J u Hz)	δ_{C}	gHMBC	COSY
1	2,43 <i>m</i>	55,9	14	5
2	α : 2,06 <i>m</i> β : 2,14 <i>m</i>	32,5	1	3
3	5,53 <i>bs</i>	125,5	5, 15	2
4	-	147,3	5, 15	-
5	2,62 <i>q</i> (5,7)	50,3	-	6
6	4,58 <i>dd</i> (11,4; 9,3)	81,0	5, 7	5, 7
7	3,07 <i>m</i>	45,7	13	6, 8
8	5,42 <i>dd</i> (10,5; 9,6)	66,7	-	7
9	α : 2,01 <i>m</i> β : 1,84 <i>m</i>	43,5	14	geminalno kuplovanje
10	-	71,7	14	-
11	2,73 <i>m</i>	36,6	13	13
12	-	179,8	13	-
13	1,31 <i>d</i> (7,8)	13,7	-	11
14	1,23 <i>s</i>	31,4	-	-
15	1,88 <i>s</i>	18,9	-	-

Senecioil grupa			
-C=O	-	167,1	-C(CH ₃)=
-CH=	5,66 <i>m</i>	115,7	-CH(CH ₃)
-C=C(CH ₃) ₂	-	159,3	-C(CH ₃)=
=C(CH ₃) ₂	2,19 <i>bd</i> (1,2)	20,6	
=C(CH ₃) ₂	1,93 <i>bd</i> (1,2)	27,8	



Slika 31. Jedinjenje 11 (8 α -senecioiloksi,10 β -hidroksi-6 α H,7 α H-gvajen-3-en-12,6-olid)

4. Identifikacija sekundarnih metabolita izolovanih iz hloroformskog ekstrakta podzemnih organa *L. ochridanum*

Ekstrakt podzemnih organa *L. ochridanum* imao je nešto kompleksniji hemijski sastav u odnosu na ekstrakt podzemnih organa *L. zernyi*. Iz njega je izolovano pet novih visoko hidroksilovanih i esterifikovanih derivata slovanolida (jedinjenja **12-16**). Jedinjenja **12**, **13**, **15** i **16** su slovanolidni derivati sa dodatnom esterifikacijom u položaju 2 β , po strukturi slični nekim visoko hidroksilovanim laktonima izolovanim iz korena *Thapsia villosa* L. i *Laser trilobum* (Smitalova i sar., 1985; Wagner Smitt i sar., 1990). Takođe, iz ekstrakta podzemnih organa *L. ochridanum* izolovani su i jedan gvajanolidni i jedan eudezmanolidni lakton (jedinjenja **17** i **18**), koji su prethodno izolovani iz nekih drugih vrsta roda *Laserpitium* (Stefanović i sar., 1977; Đermanović 1990; Milosavljević i sar., 1999).

4.1. Jedinjenje 12 (8 α -acetoksi-2 β ,10 β -diangeloiloksi-6 α H,7 α H-gvajan-3-en-12,6-olid)

Jedinjenje **12** je sa kolone silikagela eluirano u frakcijama 64-74, i dalje prečišćavano na semipreparativnoj HPLC koloni u izokratskim uslovima (70% MeOH : 30% H₂O). Jedinjenje **12** je bezbojna čvrsta supstanca, koja se lepi za zidove sudova.

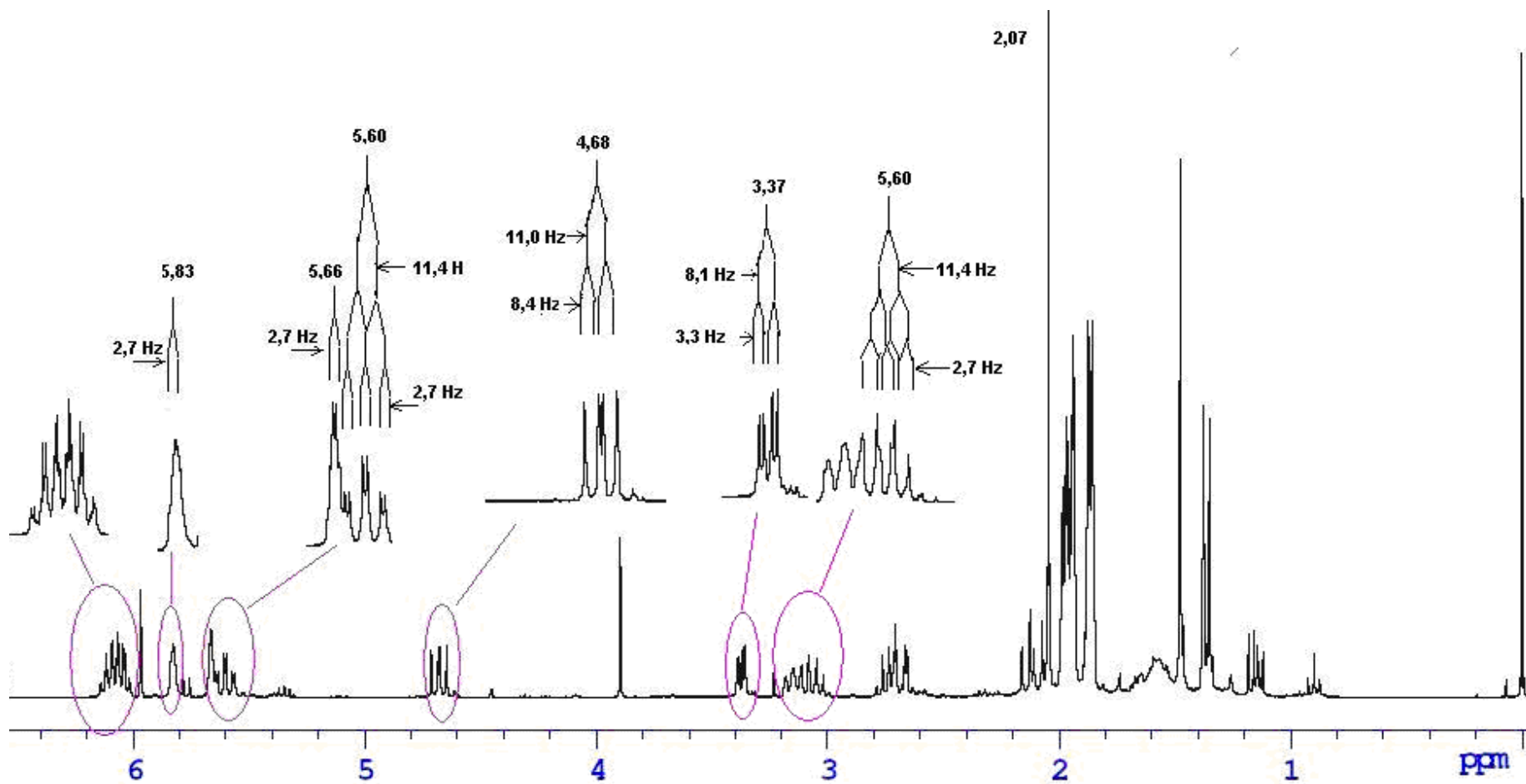
U HR-MS (ESI⁺) spektru (Slika 69 u Prilogu), uočava se pojava signala kvazimolekuskog jona na m/z 511,2315 (preračunato 511,2302 za [M + Na]⁺), na osnovu čega je zaključeno da jedinjenju **12** odgovara molekulska formula C₂₇H₃₆O₈.

U IR spektru jedinjenja **12** (Slika 95 u Prilogu), traka na 1777,0 cm⁻¹ koja potiče od valencionih vibracija veze C=O ukazuje na prisustvo laktonskog prstena (Williams i Fleming, 1995).

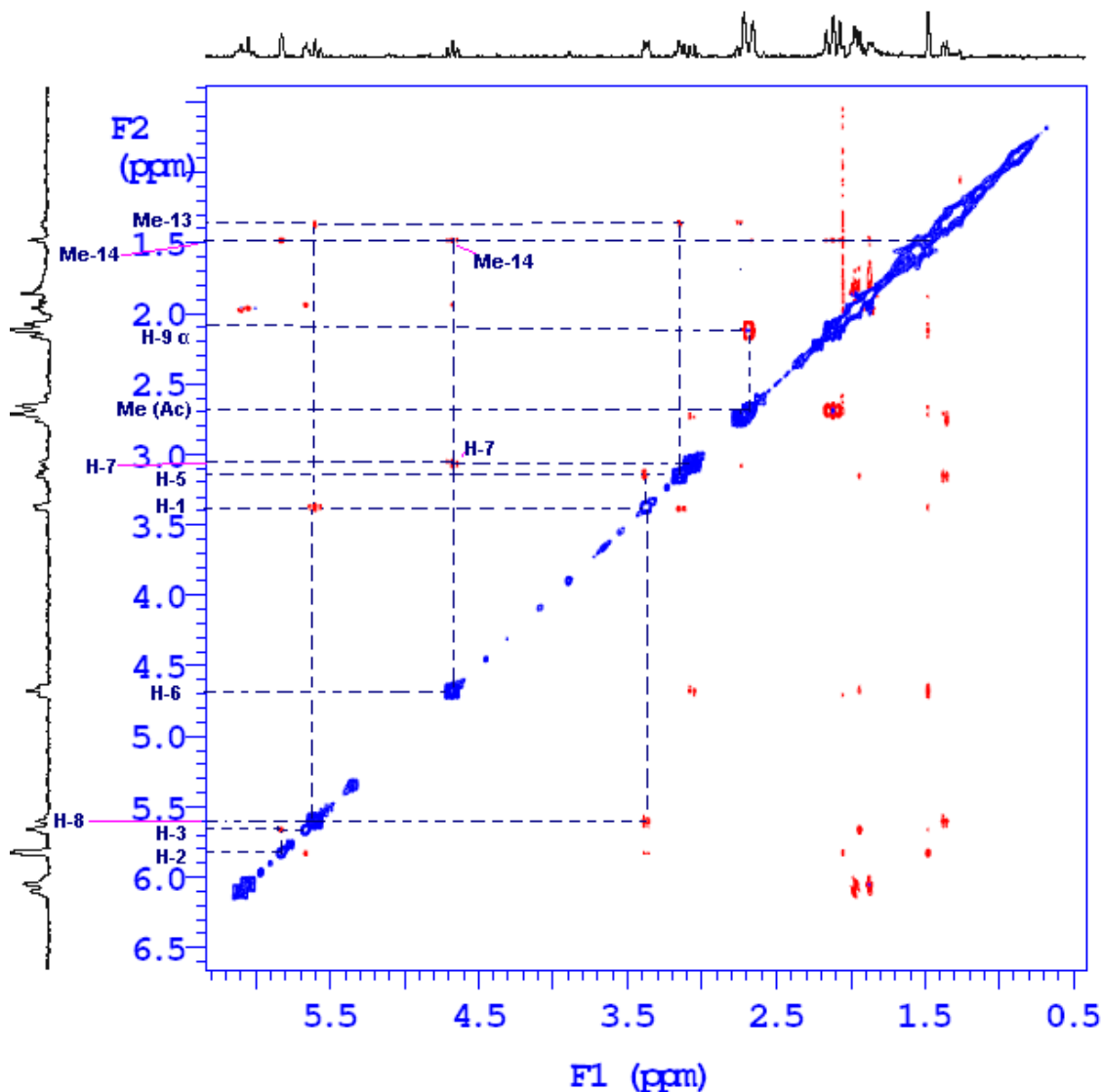
Analizom ¹H (Slika 32) i ¹³C NMR spektara, uočeni su karakteristični signali za dva angelična i jedan acetatni estar (Tabela 28). U COSY spektru su uočljivi vandijagonalni signali skalarnog sprezanja protona na položajima C-1 sa protonima na C-2 i C-5, i protona na C-6 sa protonima na C-5 i C-7. Dalje, u NOESY spektru (Slika 33), vidi se sprezanje protona na C-1 (δ_H 3,37 ppm, dd : 8,1 i 3,3 Hz) i na C-5 (δ_H 3,15 ppm, m), kao i protona na C-6 (δ_H 4,68 ppm, dd : 11,0; 8,4 Hz), protona na C-7 (δ_H 3,06 ppm, dt : 10,5 i 9,0 Hz) i protona metil grupe C-14 (δ_H 1,48 ppm). Navedeni spektralni podaci ukazuju na 1 β H,5 β H,6 α H,7 α H-gvajan-3-en-12,6-olidni skelet,

identičan prethodno opisanoj strukturi slovanolida (Smitalova i sar., 1984). Vandijagonalni signal za magnetno sprežanje (kroz prostor) protona na C-8 (δ_{H} 5,60 ppm, td : 11,4 i 2,7 Hz) i protona na C-1, ukazuje na β orijentaciju protona na C-8. Multiplet na δ_{H} 2,74 ppm koji se heteronuklearno spreže sa signalom ugljenikovog atoma C-11 (δ_{C} 36,9 ppm) u gHSQC spektru ukazuje da, kao i kod jednjenja **11**, položaj 11 nije hidroksilovan i esterifikovan, kao što je to slučaj sa slovanolidima koji su ranije izolovani iz vrsta roda *Laserpitium* (Smitalova i sar., 1984; Stefanović i sar., 1977). U NOESY spektru uočen je vandijagonalni signal za dipolarno sprežanje protona na C-11 i na C-7, što ukazuje α orijentaciju protona na C-11. Takođe, u NOESY spektru uočava se i signal za dipolarno sprežanje protona na C-5, C-8 i protone metil grupe C-13 (1,36 ppm, d : 7,5 Hz), što ukazuje na β orijentaciju metil grupe C-13. Ovo je potvrđeno i 1D NOE eksperimentima: ozračivanje protona na hemijskom pomeranju 1,36 ppm utiče na signale protona na C-5 i C-8.

Razlika u hemijskom pomeranju za C-2 (δ_{C} 79,6 ppm) u ^{13}C NMR spektru jedinjenja **12** u odnosu na hemijsko pomeranje za C-2 u ^{13}C NMR spektru izomontanolida (δ_{C} 31,9 ppm) (Appendino i sar., 1985), posledica je esterifikacije položaja C-2. Signal protona na C-2 je širok dublet (δ_{H} 5,83 ppm) sa konstantom kuplovanja 2,7 Hz, što je u saglasnosti sa objavljenim konstantama kuplovanja za proton na položaju C-3 i α orijentisan proton na C-2 u molekulu slovanolida (Smitalova i sar., 1984). Dalje, u NOESY spektru se uočava vandijagonalni signal za dipolarno sprežanje protona α orijentisane metil grupe C-14 i protona na položaju C-2, što potvrđuje njegovu α orijentaciju. U 1D NOE eksperimentu, ozračivanje signala na δ_{H} 2,07 ppm, s , koji odgovara metil grupi acetatnog estra utiče na signal α orijentisanog protona na C-9 (δ_{H} 2,69 ppm), što ukazuje na α položaj acetatnog estra na C-8.



Slika 32. ^1H NMR (300 MHz) spektar jedinjenja 12. Karakteristični signali su uveličani i date su konstante kuplovanja (Hz).



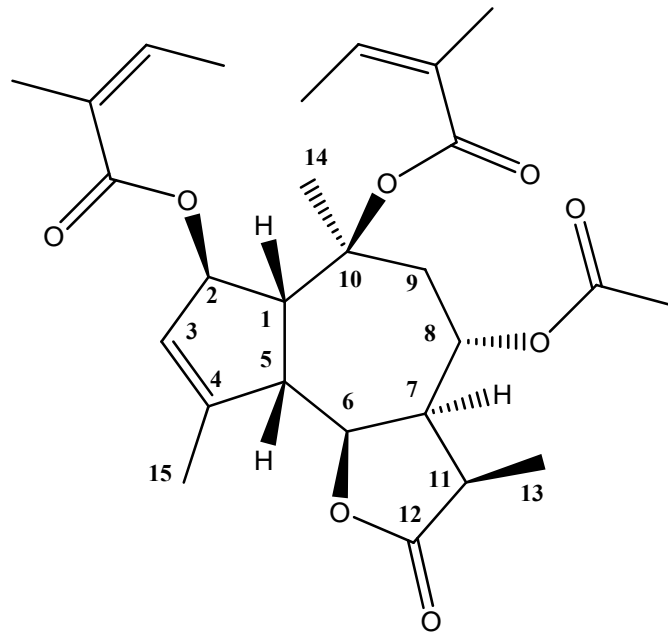
Slika 33. NOESY spektar jedinjenja **12** sa obeleženim karakterističnim interakcijama

Analizom 1D i 2D NMR spektara (Slike 100-104 u Prilogu) zaključeno je da je jedinjenje **12**: 8 α -acetoksi-2 β ,10 β -diangeloiloksi-6 α H,7 α H-gvajjan-3-en-12,6-olid (Slika 34). Hemijska pomeranja i konstante kuplovanja ovog jedinjenja u skladu su sa prethodno objavljenim rezultatima za 2 β -esterifikovane gvajjanolidne laktone (Appendino i sar., 1985; Smitalova i sar., 1985; Wagner Smit i sar., 1990).

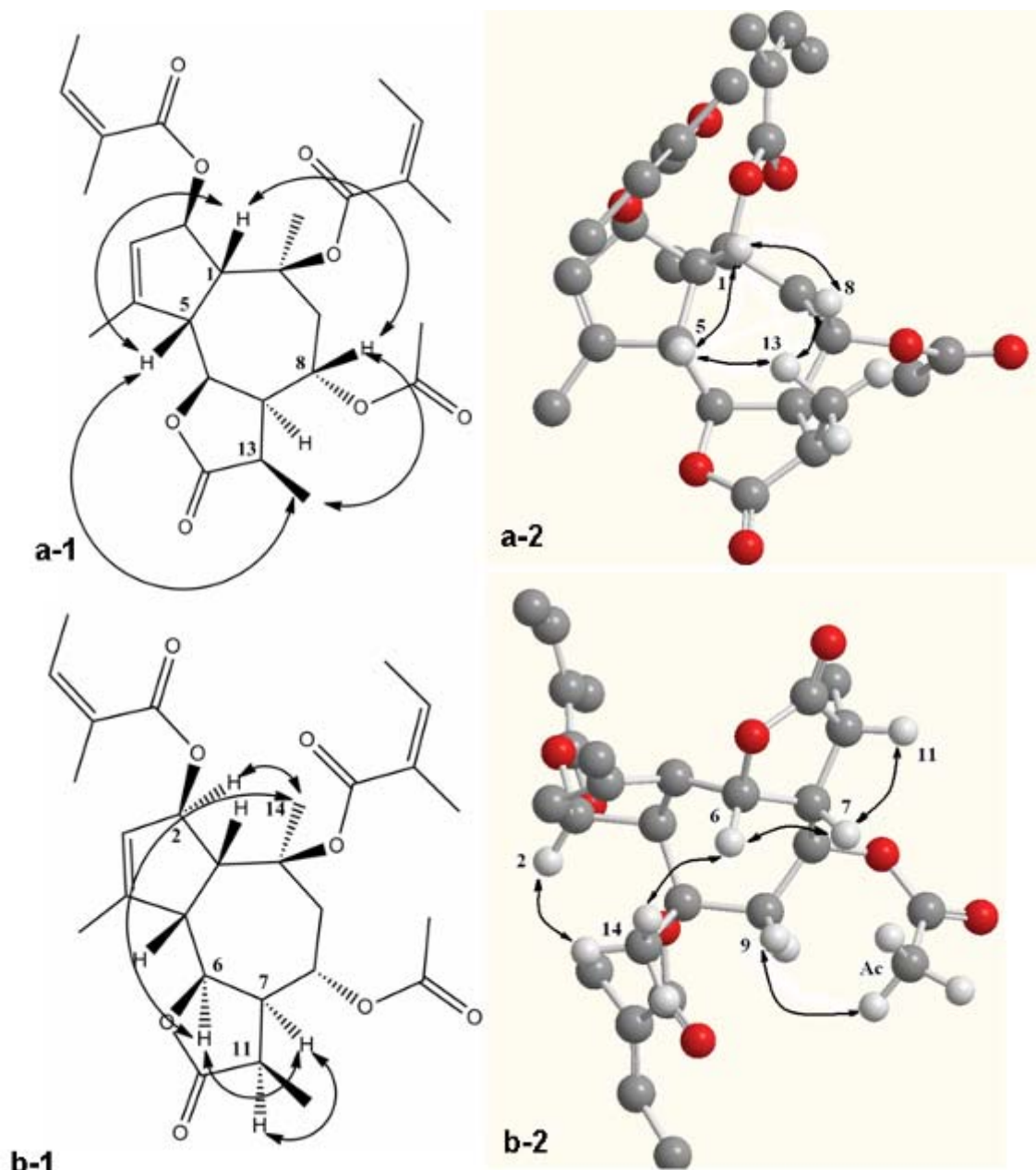
Podaci dobijeni iz 1D i 2D NMR spektara dati su u Tabeli 28. Odabrane NOESY interakcije su prikazane na 3D strukturi minimalne energije, nacrtane u Chem3D programu (Slika 35).

Tabela 28. Podaci dobijeni iz NMR spektara: ^1H (300 MHz), ^{13}C (75 MHz), gHMBC, COSY i NOESY, za jedinjenje **12**

Položaj	δ_{H} (J u Hz)	δ_{C}	gHMBC	COSY	NOESY
1	3,37 <i>dd</i> (8,1; 3,3)	52,8	14	2,5	5,8
2	5,83 <i>bd</i> (2,7)	79,6	1	1, 3	3,14
3	5,66 <i>bd</i> (2,7)	127,0	15	2	2,15
4	-	149,1	15	-	-
5	3,15 <i>m</i>	51,2	15	1, 6	1, 13
6	4,68 <i>dd</i> (11,0; 8,4)	79,6	-	5, 7	7,14
7	3,06 <i>dt</i> (10,5; 9,0)	47,3	13	6	6, 11
8	5,60 <i>td</i> (11,4; 2,7)	66,2	9	-	1, 13
9	α : 2,69 <i>dd</i> (15,0; 2,7) β : 2,14 <i>d</i> (15,3)	44,1	14	8, geminalno kuplovanje	α : Ac (-CH ₃)
10	-	81,5	1, 9 α , 14	-	-
11	2,74 <i>m</i>	36,9	13	13	7
12	-	179,0	13	-	-
13	1,36 <i>d</i> (7,5)	13,9	-	11	5, 8, 11
14	1,48 <i>s</i>	26,8	-	-	2, 6
15	1,91 <i>s</i>	19,0	-	-	3
Angeloil grupa					
-C=O	-	167,8	-C(CH ₃)=	-	-
	-	166,5			
-C(CH ₃)=	-	128,1	-CH(CH ₃)	-	-
	-	127,0	-C(CH ₃)		
-C=CH-	6,09 <i>m</i>	139,3	-CH(CH ₃)	-	-
	6,04 <i>m</i>	138,1	-C(CH ₃)		
-CH(CH ₃)	1,96 <i>m</i>	16,1	-C=CH-	-	-
	1,98 <i>m</i>	16,0			
-C(CH ₃)	1,89 <i>m</i>	20,8	-C=CH-	-	-
	1,85 <i>m</i>	20,8			
Acetil grupa					
-C=O	-	170,5	-CH ₃ (Ac)	-	-
-CH ₃	2,07 <i>s</i>	22,6	-	-	9 α



Slika 34. Jedinjenje 12 (8α -acetoksi- 2β , 10β -diangeloiloksi- 6α H, 7α H-gvajan-3-en-12,6-olid)



Slika 35. Odabrane NOESY interakcije jedinjenja **12**, prikazne na 3D strukturi minimalne energije, nacrtane u Chem3D programu: (a) naznačene su interakcije između β orjentisanih protona (1-hemijska fomula; 2-predložen 3D model); (b) naznačene su interakcije između α orjentisanih protona (1-hemijska fomula; 2-predložen 3D model)

4.2. Jedinjenje **13** (2 β ,8 α -diangeloiloksi-10 β -hidroksi-6 α H,7 α H-gvajen-3-en-12,6-olid)

Jedinjenje **13** je sa kolone silikagela eluirano u frakcijama 93 – 98, zajedno sa jedinjenjima **14** i **15**. Ova tri jedinjenja su iz spojenih frakcija dalje razdvajana na

semipreparativnoj HPLC koloni u izokratskim uslovima (35% MeCN : 35% MeOH : 30% H₂O). Po uparavanju rastvarača, jedinjenje **13** iskristalisalo je u vidu finog kristalnog praška bele boje.

Na osnovu pojave signala kvazimolekulskih jona na m/z 469,2212 i 485,1936 (preračunate m/z 469,2197 i 485,1936 za $[M + Na]^+$ i $[M + K]^+$, redom) u HR-MS (ESI⁺) spektru (Slika 70 u Prilogu), zaključeno je da jedinjenju **13** odgovara molekulska formula C₂₅H₃₄O₇.

U IR spektru (Slika 88 u Prilogu), traka na 1770,1 cm⁻¹ koja potiče od valencionih vibracija C=O veze, ukazuje na prisustvo laktonskog prstena, a široka traka na 3458,1 cm⁻¹ ukazuje na prisustvo hidroksilne grupe u molekulu (Williams i Fleming, 1995).

Analizom ¹H i ¹³C NMR spektara ustanovljena je velika sličnost jedinjenja **13** sa prethodno okarakterisanim jedinjenjem **12** (8 α -acetoksi-2 β ,10 β -diangeloiloksi-6 α H,7 α H-gvajan-3-en-12,6-olidom). U NMR spektrima jedinjenja **13** (Slike 103-107 u Prilogu), uočljivi su karakteristični signali koji potiču od dve angeloiloksi grupe. Hemijska pomeranja u protonskom i ugljeničnom NMR spektru ukazivala su na strukturu slovanolida sa identično vezanim prstenovima kao kod jedinjenja **12**. Kao i u slučaju jedinjenja **12**, prisustvo protona (δ_H 2,75 ppm, *m*) na C-11 ukazuje da ni jedinjenje **13** nije esterifikovano u ovom položaju. U NOESY spektru jedinjenja **13** uočeni su vandijagonalni signali sprežanja protona metil grupe C-13 (δ_H 1,33 ppm, *d*: 7,8 Hz) sa β orjentisanim protonom na C-5 (δ_H 3,00 ppm, *dd*: 11,5 i 6,9 Hz) i C-8 (δ_H 5,45 ppm, *td*: 9,3 i 2,4 Hz), kao i vandijagonalni signali sprežanja α protona na C-7 (δ_H 3,13 ppm, *dt*: 10,8 i 9,0 Hz) i na C-11. Sa druge strane, hemijsko pomeranje u ¹³C NMR spektru za C-10 (δ_C 71,2 ppm) ukazuje na prisustvo slobodne hidroksilne grupe na

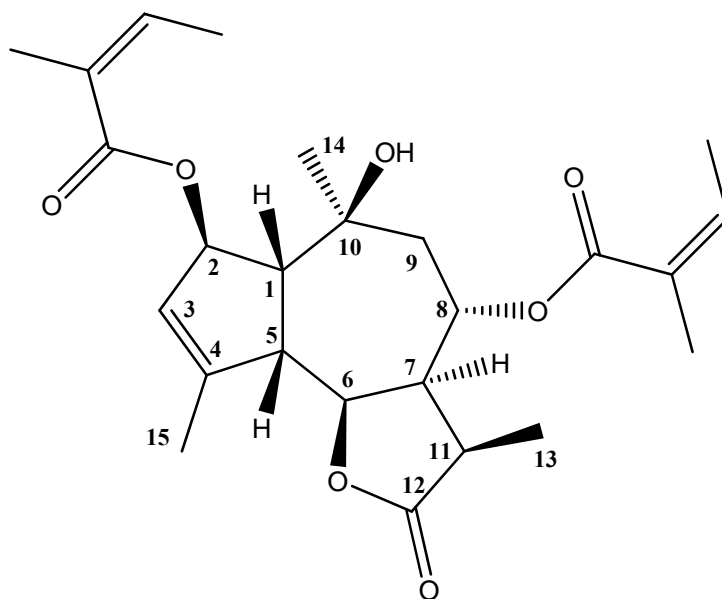
C-10, što objašnjava i veću polarnost ovog jedinjenja u odnosu na jedinjenje **12**. Hemijsko pomeranje protona na C-2 (δ_H 5,70 ppm, *bdd*: 5,7 i 1,8 Hz), kao i COSY spektar ukazuju, kao i u slučaju jedinjenja **12**, na esterifikaciju položaja 2. U NOESY spektru, proton na C-2 daje vandijagonalne signale sa protonima na C-6 i α orjentisanom metil grupom C-14, što ukazuje da su ovi protoni prostorno bliski, odnosno da je proton na C-2 α orjentisan. Takođe, odgovarajući spektralni podaci i

konstante kuplovanja su u saglasnosti sa spektrima za 2 β -esterifikovane gvajanolide (Smitalova i sar., 1985; Bruno i sar., 1997; Vajs i sar., 2000; Wagner Smitt i sar., 1990).

Zaključeno je da je jedinjenje **13**: 8 α ,2 β -diangeloiloksi-10 β -hidroksi-6 α H,7 α H-gvajan-3-en-12,6-olid (Slika 36). 1D i 2D NMR podaci jedinjenja **13** dati su u Tabeli 29.

Tabela 29. Podaci dobijeni iz NMR spektara: ^1H (300 MHz), ^{13}C (75 MHz), gHMBC, COSY i NOESY, za jedinjenje **13**

Položaj	δ_{H} (J u Hz)	δ_{C}	gHMBC	COSY	NOESY
1	2,76 <i>m</i>	57,9	5, 9, 14	2, 5	5, 8, 13
2	5,70 <i>bdd</i> (5,7; 1,8)	79,1	1	1, 3	3, 6, 14
3	5,57 <i>bd</i> (1,8)	126,6	5, 15	2	2, 15
4	-	150,1	5, 15	-	-
5	3,00 <i>dd</i> (11,5; 6,9)	51,2	1, 15	1, 6	1, 13
6	4,58 <i>dd</i> (11,7; 8,7)	81,4	1, 5, 7	5, 7	2, 7, 14
7	3,13 <i>dt</i> (10,8; 9,0)	46,8	9, 13	6	6, 11
8	5,45 <i>td</i> (9,3; 2,4)	66,5	7, 9, 14	9	1, 13
9	α : 2,14 <i>dd</i> (15,0; 2,4) β : 2,08 <i>d</i> (15,3)	46,2	1, 14	8, geminalno kuplovanje	α : 14
10	-	71,2	1, 9, 14	-	-
11	2,75 <i>m</i>	36,3	13	13	7
12	-	179,1	13	-	-
13	1,33 <i>d</i> (7,8)	13,8	11	11	1, 5, 8
14	1,24 <i>s</i>	30,5	1	-	2, 6, 9 α
15	1,95 <i>s</i>	18,3	3	-	3
Angeloil grupa					
-C=O	-	168,5	-C(CH ₃)=	-	-
	-	167,8			
-C(CH ₃)=	-	127,7	-CH(CH ₃) -C(CH ₃)	-	-
	-	127,4			
-C=CH-	6,16 <i>m</i>	139,8	-CH(CH ₃) -C(CH ₃)	-	-
	6,12 <i>m</i>	139,3			
-CH(CH ₃)	2,00 <i>m</i>	16,1	-C=CH-	-	-
	1,98 <i>m</i>	16,1			
-C(CH ₃)	1,87 <i>m</i>	20,7	-C=CH-	-	-
	1,88 <i>m</i>	20,7			



Slika 36. Jedinjenje **13** ($8\alpha,2\beta$ -diangeloiloksi- 10β -hidroksi- $6\alpha\text{H},7\alpha\text{H}$ -gvajan-3-en-12,6-olid)

4.3. Jedinjenje **14** (8α -angeloiloksi- 11α -senecioiloksi- 10β -hidroksi- $6\alpha\text{H},7\alpha\text{H}$ -gvajan-3-en-12,6-olid)

Jedinjenje **14** je sa kolone silikagela eluirano u frakcijama 93 – 98, zajedno sa jedinjenjima **13** i **15**. Spojene frakcije su razdajane na semipreparativnoj HPLC koloni u izokratskim uslovima (35% MeCN : 35% MeOH : 30% H₂O). Jedinjenje **14** je iskristalisalo u vidu beličastog kristalnog praška.

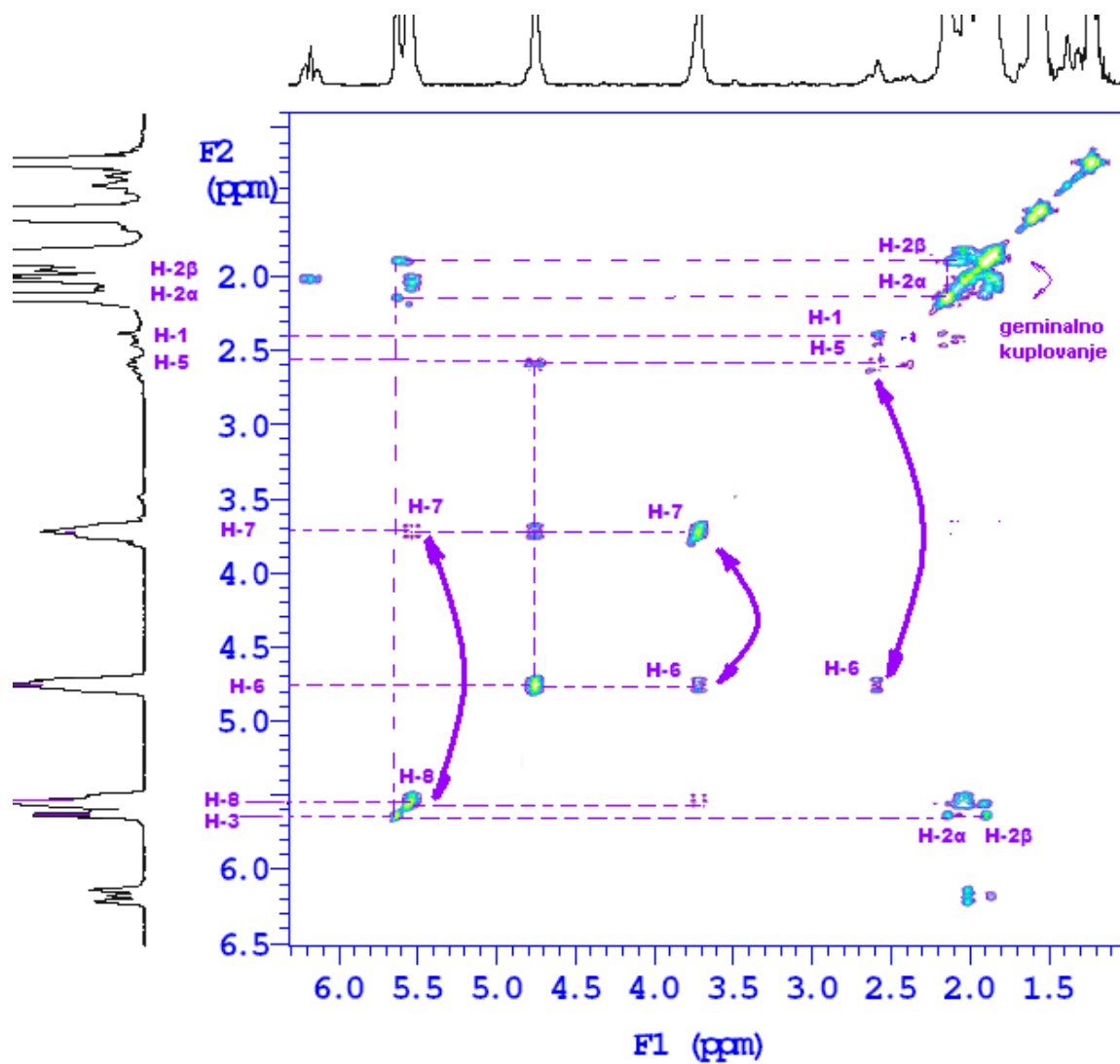
U HR-MS (ESI⁺) spektru (Slika 71 u Prilogu), uočavaju se molekularni jon na m/z 447,2411 (preračunato 447,2377 za [M + H]⁺) i kvazimolekularni joni na m/z 469,2241 i 485,1982 (preračunato 469,2197 i 485,1936 za [M + Na]⁺ i [M + K]⁺, redom), iz čega sledi da jedinjenju **14** odgovara molekulska formula C₂₅H₃₄O₇.

U IR spektru jedinjenja **14** (Slika 89 u Prilogu), traka na 1783,5 cm⁻¹ potiče od valencionih vibracija veze C=O u laktonskom prstenu (Williams i Fleming, 1995).

Analizom 1D (¹H i ¹³C) i 2D (COSY, gHSQC, gHMBC) NMR spektara, zaključeno je da je jedinjenje **14** lakton slovanolidne strukture sa karakterističnim esterifikacijama u položajima C-8 i C-11, i slobodnom hidroksilnom grupom u položaju C-10. Karakteristična skalarna spreznja protona označena su u COSY spektru jedinjenja **14** (Slika 37).

Analizom karakterističnih hemijskih pomeranja u 1D NMR spektrima (protonski NMR spektar je dat na Slici 110 u Prilogu), zaključeno je da je jedinjenje **14** veoma

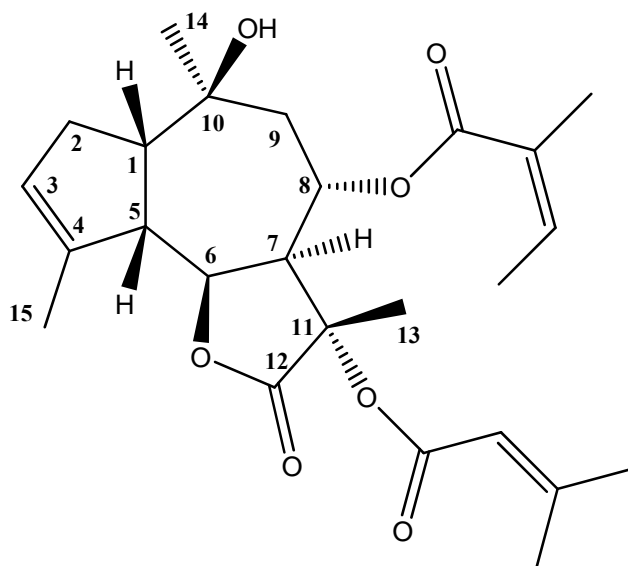
slično prethodno okarakterisanom tarolidu (Odeljak 3.1), čija je 1 β H,5 β H,6 α H,7 α H-gvajjan-3-en-12,6-olidna struktura potvrđena NOESY eksperimentom. U 1D NOE eksperimentu, ozračivanje signala na δ_H 4,75 ppm (*dd*: 11,4 i 9,9 Hz) koji je signal protona na C-6, pogađa i signal protona na C-7 (δ_H 3,71 ppm, *dd*: 11,1 i 9,9 Hz), što je u saglasnosti sa podacima za *cis* položaj laktorskog prstena u strukturi slovanolida. Jedinjenje **14** i tarolid razlikuju se po estarski vezanom bočnom lancu: u slučaju tarolida za osnovni skelet vezane su dve angeloiloksi grupe, dok jedinjenje **14** ima jednu angeloiloksi i jednu senecioiloksi grupu. Potvrda prisustva senecioil estra je pojava multipleta alkenkog protona na δ_H 5,63 ppm i signala po tri protona metil grupa (δ_H 1,89 ppm *bs* i δ_H 2,14 ppm *bd*: 1,6 Hz), što je zajedno sa drugim 1D NMR podacima u saglasnosti sa prethodno objavljenim podacima za senecioil ester (Wagner Smitt i sar., 1990). 1D (1H i ^{13}C) i 2D (COSY i gHMBC) NMR podaci jedinjenja **14** dati su u Tabeli 30. U gHMBC spektru uočava se korelacioni signal između karbonilnog ugljenika angeloil estra i β orjentisanog protona na C-9 (δ_H 1,79 ppm *m*), iz čega se zaključuje da je jedinjenje **14**: 8 α -angeloiloksi,11 α -senecioiloksi-10 β -hidroksi-6 α H,7 α H-gvajjan-3-en-12,6-olid (Slika 38).



Slika 37. COSY spektar jedinjenja **14** sa karakterističnim skalarnim spreznjima protona koja ukazuju na strukturu slovanolida

Tabela 30. Podaci dobijeni iz NMR spektara: ^1H (300 MHz), ^{13}C (75 MHz), gHMBC i COSY, za jedinjenje 14

Položaj	δ_{H} (J u Hz)	δ_{C}	gHMBC	COSY
1	2,41 <i>m</i>	56,1	9 β	5
2	α : 2,04 <i>m</i> β : 2,12 <i>m</i>	32,4	-	geminalno kuplovanje
3	5,55 <i>bd</i> (1,9)	125,9	5, 15	2
4	-	147,5	15	-
5	2,59 <i>q</i> (5,7)	49,6	-	1, 6
6	4,75 <i>dd</i> (11,4; 9,9)	78,4	5, 7	5, 7
7	3,71 <i>dd</i> (11,1; 9,9)	47,8	9, 13	6
8	5,54 <i>bt</i> (10,1)	67,2	9 β	-
9	α : 2,09 <i>dd</i> (16,8; 2,7) β : 1,79 <i>m</i>	43,8	14	-
10	-	71,5	9, 14	-
11	-	77,8	7, 13	-
12	-	174,8	13	-
13	1,55 <i>s</i>	20,4	-	-
14	1,22 <i>s</i>	31,3	-	-
15	1,85 <i>s</i>	19,0	-	-
Angeloil grupa				
-C=O	-	168,1	-C(CH ₃)=	-
-C(CH ₃)=	-	127,3	-CH(CH ₃) -C(CH ₃)	-
-C=CH-	6,17 <i>m</i>	140,8	-CH(CH ₃) -C(CH ₃)	-
-CH(CH ₃)	1,99 <i>m</i>	16,1	-C=CH-	-
-C(CH ₃)	1,85 <i>m</i>	20,5+	-C=CH-	-
Senecioil grupa				
-C=O	-	165,4	-C(CH ₃)=	-
-CH=	5,63 <i>m</i>	115,0	-CH(CH ₃)	-
-C=C(CH ₃) ₂	-	160,3	-C(CH ₃)=	-
=C(CH ₃) ₂	1,89 <i>bs</i>	27,8		
=C(CH ₃) ₂	2,19 <i>bd</i> (1,2)	20,6		



Slika 38. Jedinjenje **14** (8α -angeloiloksi- 11α -senecioiloksi- 10β -hidroksi- 6α H, 7α H-gvajjan-3-en-12,6-olid)

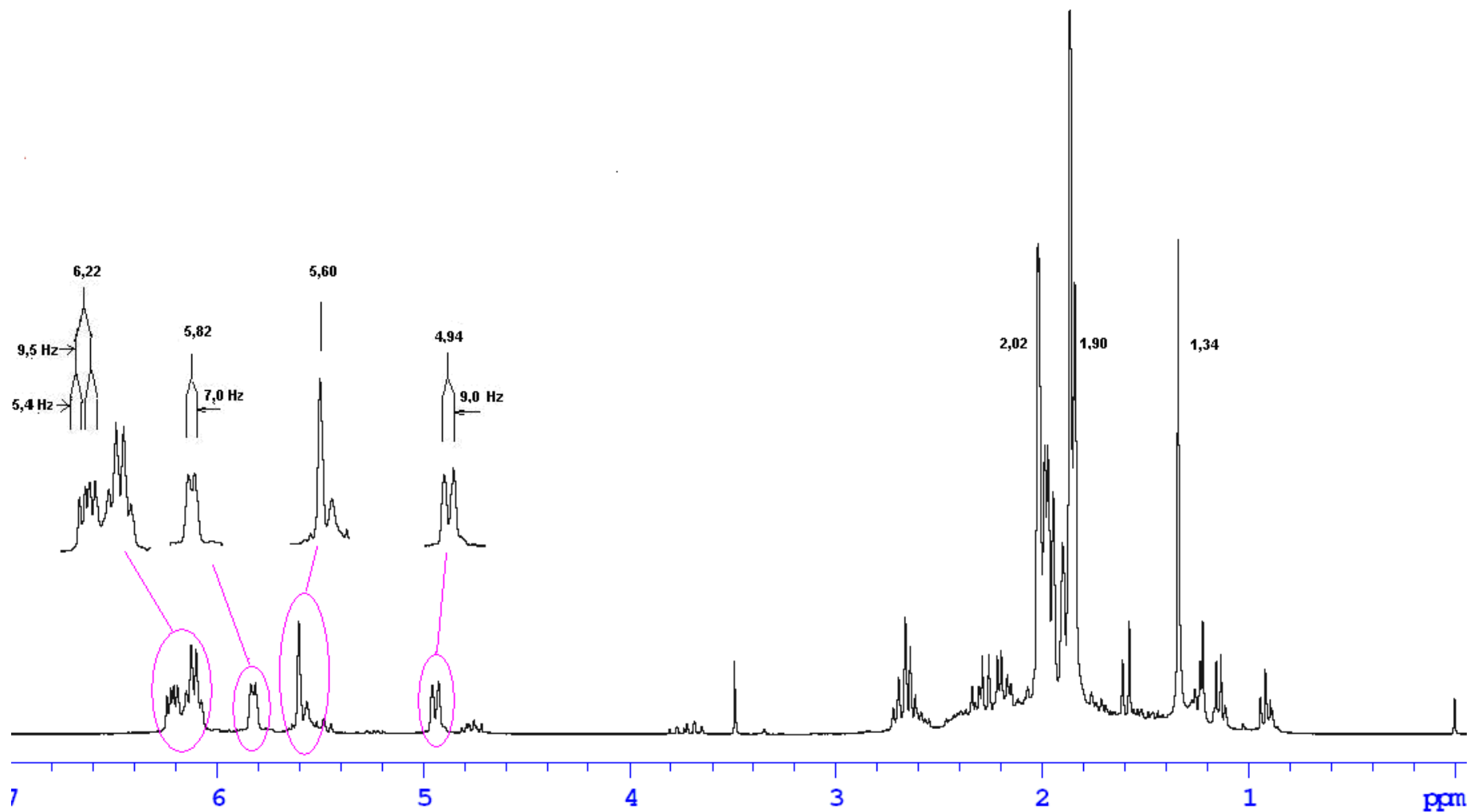
4.4. Jedinjenje **15** (2β , 8α -diangeloiloksi- 10β -hidroksi- 6α H-gvajjan-3,(7-11)-dien-12,6-olid)

Jedinjenje **15** je sa kolone silikagela eluirano u frakcijama 93 – 98, zajedno sa jedinjenjima **13** i **14**. Dalje prečišćavanje vršeno je na semipreparativnoj HPLC koloni u izokratskim uslovima (35% MeCN : 35% MeOH : 30% H₂O). Po uparavanju rastvarača, jedinjenje **15** se u vidu bezbojne čvrste supstance lepilo po zidovima suda.

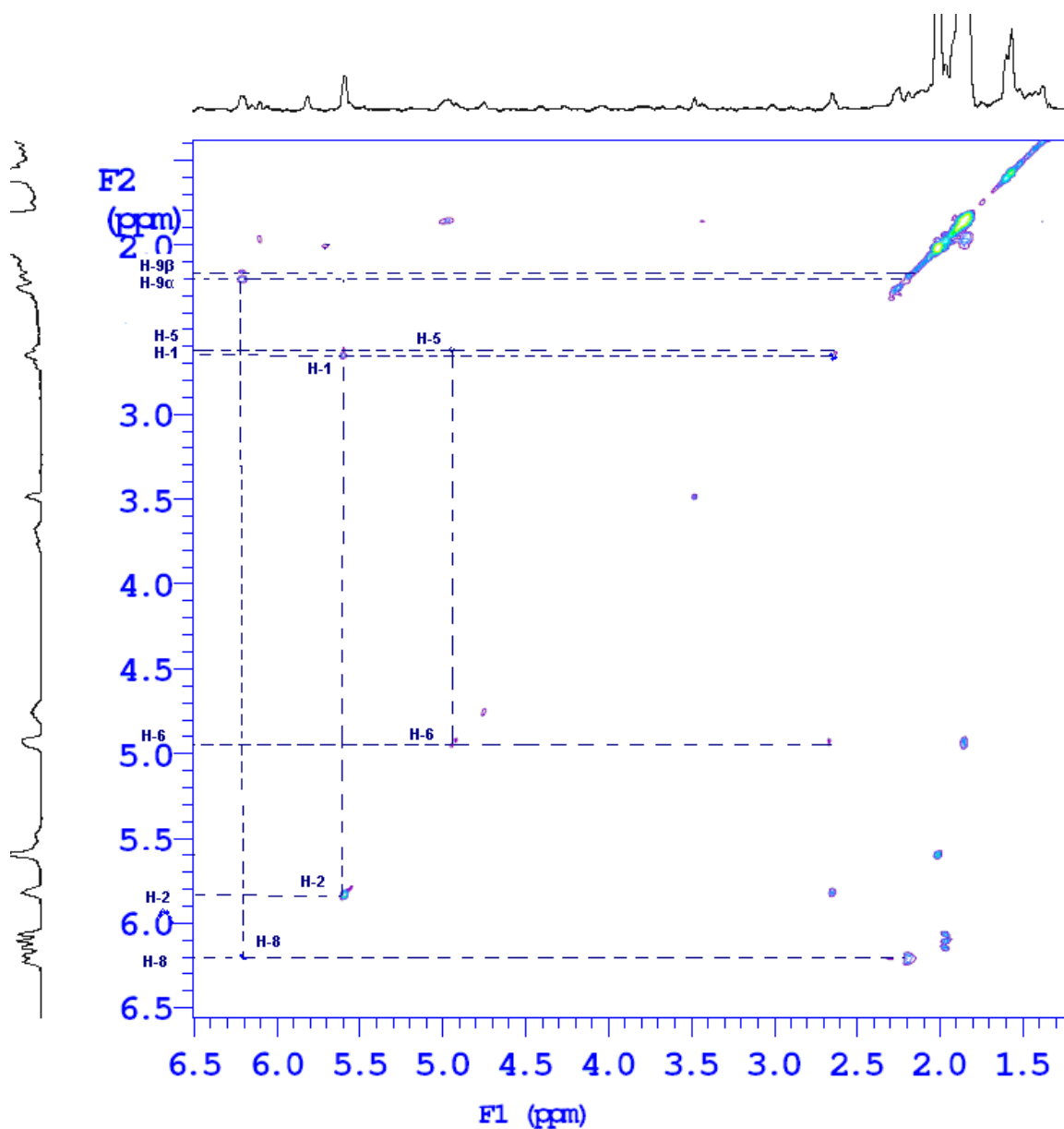
U HR-MS (ESI⁺) spektru (Slika 72 u Prilogu), na osnovu pojave dva signala kvazimolekulskih jona na m/z 467,2043 i 483,1810 (preračunate m/z 467,2040 i 483,1780 za [M + Na]⁺ i [M + K]⁺, redom), zaključeno je da jedinjenju **15** odgovara molekulska formula C₂₅H₃₂O₇.

U IR spektru (Slika 90 u Prilogu), traka na 1740,9 cm⁻¹ ukazuje na prisustvo α,β -nezasićenog petočlanog laktorskog prstena (Williams i Fleming, 1995). Pojava apsorpcione trake na pomeranju karakterističnom za nezasićene laktone, ali i ¹³C NMR spektar (Tabela 31), koji je bio sličan prethodno objavljenim spektrima za gvajjanolide sa nezasićenjem u laktorskom prstenu (Smitalova i sar., 1984), kao i razlika u molekulskoj formuli, navela je na zaključak da jedinjenje **15** ima jednu dvostruku vezu više u odnosu na prethodno izolovana i strukturno okarakterisana jedinjenja. Takođe, karakteristični signali u ¹H NMR spektru (Slika 39) nisu imali oblik i hemijska pomeranja kao kod prethodno izolovanih i okarakterisanih slovanolidnih derivata, a u

COSY spektru (Slika 40) nije bilo karakterističnih skalarnih sprežanja između protona na C-6 i C-7, kao ni između protona C-7 i C-8, što je ukazalo na odsustvo protona na položaju C-7. U NOESY spektru uočava se vandijagonalni korelacioni signal za sprežanje protona na položaju C-6 (δ_{H} 4,94 ppm, *bd*: 9,0 Hz) i protona metil grupe C-14 (δ_{H} 1,34 ppm, *s*), što ukazuje na činjenicu da su ovi protoni α orjentisani. Navedeni podaci ukazuju na prisustvo još jedne dvostruke veze u strukturi gvajanolida između položaja C-7 i C-11, što potvrđuju signali na δ_{C} 158,8 i 128,2 ppm za C-7 i C-11, redom u ^{13}C NMR spektru. Signal na δ_{C} 71,7 ppm (C-10) u ^{13}C NMR spektru odgovara ugljeniku C-10 za koji je vezana hidroksilna grupa (Appendino i sar., 1985). Takođe, u NMR spektrima uočljivi su karakteristični signali za dva angelična estra. Slično jedinjenjima **12** i **13**, gHSQC spektar (Slika 114 u Prilogu) jedinjenja **15** ukazuje na skalarno heteronuklearno sprežanje protona (δ_{H} 5,82 ppm, *bd*: 7,0 Hz) i C-2 ugljenika (δ_{C} 78,9 ppm), zbog prisustva estra na položaju C-2. U NOESY spektru (Slika 116 u Prilogu) prisutni su vandijagonalni signali sprežanja protona na položaju C-6, protona metil grupe C-14 i protona na položaju C-2, što ukazuje na β orjentaciju estra na C-2. Ovi podaci su u saglasnosti sa prethodno objavljenim podacima za C-2 β esterifikovane gvajanolide (Smitalova i sar., 1985; Wagner Smit i sar., 1990). Takođe, u NOESY spektru uočava se i vandijagonalni signal sprežanja protona na C-8 (δ_{H} 6,22 ppm) i β protona na C-9 (δ_{H} 2,20 ppm). Iz svega navedenog zaključeno je da je jedinjenje **15**: 2 β ,8 α -diangeloiloksi-10 β -hidroksi-6 α H-gvajan-3,(7-11)-dien-12,6-olid (Slika 41).



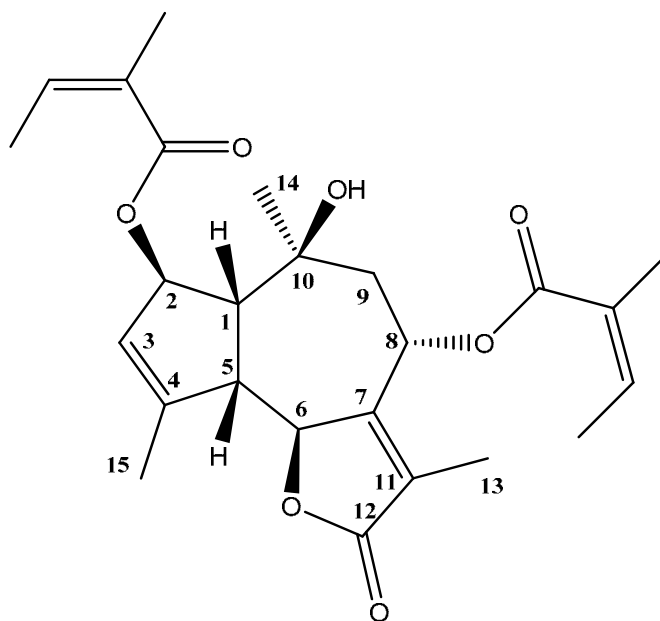
Slika 39. ^1H NMR (300 MHz) spektar jedinjenja **15**. Karakteristični signali su uveličani i označene su konstante kuplovanja (u Hz).



Slika 40. COSY spektar jedinjenja **15**. Na spektru su označena karakteristična skalarna sprezanja.

Tabela 31. Podaci dobijeni iz NMR spektara: ^1H (300 MHz), ^{13}C (75 MHz), gHMBC, COSY i NOESY, za jedinjenje **15**

Položaj	δ_{H} (J u Hz)	δ_{C}	gHMBC	COSY	NOESY
1	2,66 <i>m</i>	60,0	3, 9, 14	2,5	5
2	5,82 <i>bd</i> (7,0)	78,9	1,3	1	3, 6, 9 α , 14
3	5,60 <i>bs</i>	126,9	15	-	2, 15
4	-	149,3	3, 15	-	-
5	2,61 <i>m</i>	54,5	1, 3, 15	1, 6	1
6	4,94 <i>bd</i> (9,0)	84,0	5, 8	5	2, 9 α , 14
7	-	158,8	8, 9, 13	-	-
8	6,22 <i>dd</i> (9,5; 5,4)	64,3	9	9	9 β , 13
9	α : 2,34 <i>d</i> (9,5) β : 2,20 <i>d</i> (15,3)	40,1	14	8, geminalno kuplovanje	α : 2, 6, 14 β : 8
10	-	71,7	1, 9, 14	-	-
11	-	128,2	13	-	-
12	-	173,6	13	-	-
13	1,90 <i>s</i>	20,5	8	-	8
14	1,34 <i>s</i>	31,9	9	-	2, 6, 9 α
15	2,02 <i>s</i>	17,8	-	-	3
Angeloil grupa					
-C=O	-	168,3	-C(CH ₃)=	-	-
	-	166,7			
-C(CH ₃)=	-	127,6	-CH(CH ₃)	-	-
	-	127,2	-C(CH ₃)		
-C=CH-	6,12 <i>m</i>	139,9	-CH(CH ₃)	-	-
	6,12 <i>m</i>	139,5	-C(CH ₃)		
-CH(CH ₃)	1,98 <i>m</i>	16,1	-C=CH-	-	-
	1,97 <i>m</i>	16,1			
-C(CH ₃)	1,90 <i>m</i>	20,8	-C=CH-	-	-
	1,89 <i>m</i>	20,7			



Slika 41. Jedinjenje **15** (2 β ,8 α -diangeloiloksi-10 β -hidroksi-6 α H-gvajan-3,(7-11)-dien-12,6-olid)

4.5. Jedinjenje **16** (8 α -acetoksi-2 β ,11 α -diangeloiloksi-10 β -hidroksi-6 α H,7 α H-gvajan-3-en-12,6-olid)

Jedinjenje **16** je sa kolone silikagela eluirano u frakcijama 99 – 101. Dalje prečišćavanje spojenih frakcija vršeno je na semipreparativnoj HPLC koloni u izokraskim uslovima (60% MeOH : 40% H₂O). Po uparavanju rastvarača, jedinjenje **16** se istaložilo kao prozirna čvrsta supstanca.

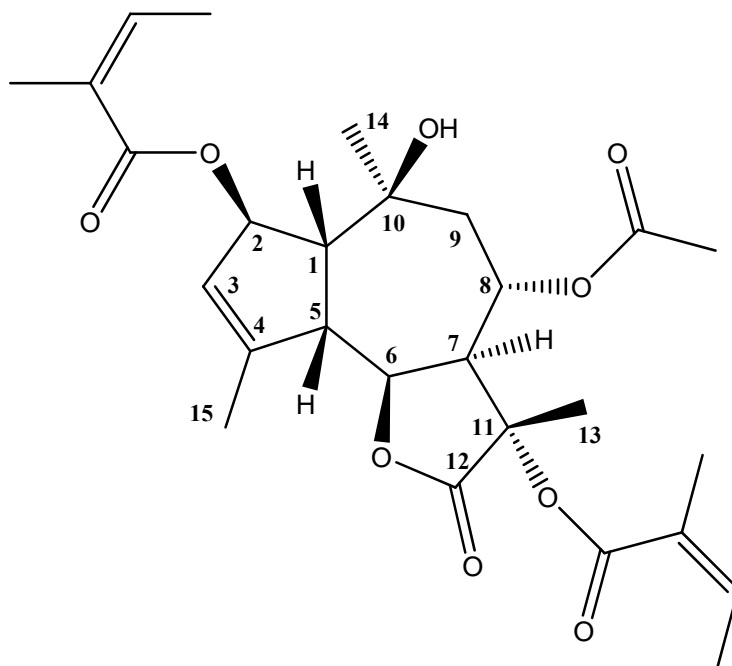
U HR-MS (ESI⁺) spektru (Slika 73 u Prilogu), na osnovu pojave dva signala kvazimolekulskih jona na m/z 527,2263 i 543,2035 (preračunate m/z 527,2252 i 543,1991 za [M + Na]⁺ i [M + K]⁺, redom), zaključeno je da jedinjenju **16** odgovara molekulska formula C₂₇H₃₆O₉.

U IR spektru jedinjenja **16** (Slika 91 u Prilogu), traka na 1781,9 cm⁻¹ ukazuje na prisustvo petočlanog laktorskog prstena (Williams i Fleming, 1995). To potvrđuje i prisustvo signala na δ_c 178,6 ppm u ¹³C NMR spektru. NMR podaci (Tabela 32) ukazuju na prisustvo dva angelična i jednog acetatnog estera u strukturi. NMR spektri jedinjenja **16** (Slike 117-121, u Prilogu), u izvesnoj meri su slični NMR spektrima jedinjenja **12**, ali i prethodno objavljenim NMR spektrima za lakton tarolid. Takođe, NOESY spektar jedinjenja **16** ukazivao je na karakterističnu strukturu slovanolida. Odsustvo signala u ¹H NMR spektru za proton na položaju C-11 (δ_c 73,6 ppm), ukazuje

na esterifikaciju tog položaja. Hemijsko pomeranje protona na C-2 (δ_H 5,82 ppm, *bm*) ukazuje na prisustvo estra na položaju C-2. Korelacioni signal protona na položaju C-2 i protona na položaju C-6 (δ_H 4,68 ppm, *dd*: 12,0 i 9,6 Hz) i protona metil grupe C-14 (δ_H 1,43 ppm, *s*) u NOESY spektru, ukazuje na α orijentaciju protona na položaju C-2. Protoni acetatnog estra daju korelacione signale sa α orijentisanim protonom na položaju C-9 (δ_H 2,70 ppm, *dd*: 15,4 i 2,0 Hz), ali i sa protonima metil grupe C-14, što ukazuje na α orijentaciju acetatnog estra na položaju C-8. Analizom gHSQC i gHMBC spektara jedinjenja **16**, kao i poređenjem sa podacima prethodno analiziranih jedinjenja, zaključeno je da je jedinjenje **16**: 8 α -acetoksi-2 β ,11 α -diangeloiloksi-10 β -hidroksi-6 α H,7 α H-gvajen-3-en-12,6-olid (Slika 42).

Tabela 32. Podaci dobijeni iz NMR spektara: ^1H (300 MHz), ^{13}C (75 MHz), gHMBC, COSY i NOESY, za jedinjenje **16**

Položaj	δ_{H} (J u Hz)	δ_{C}	gHMBC	COSY	NOESY
1	3,33 <i>q</i> (3,6)	52,8	14	2, 5	5, 8
2	5,82 <i>bm</i>	79,1	-	1, 3	3, 14
3	5,67 <i>bd</i> (2,7)	127,3	15	2	2, 15
4	-	149,0	15	-	-
5	3,11 <i>m</i>	49,6	15	1, 6	1, 13
6	4,68 <i>dd</i> (12,0; 9,6)	77,6	-	5, 7	2, 7, 14
7	3,06 <i>dd</i> (10,5; 9,3)	53,9	13	6	6
8	5,80 <i>td</i> (10,8; 1,8)	65,2	9	7, 9	1, 13
9	α : 2,70 <i>dd</i> (15,4; 2,0) β : 2,19 <i>d</i> (15,4)	44,3	14	8, geminalo kuplovanje	α : Ac (-CH ₃)
10	-	81,3	9, 14	-	-
11	-	73,6	13	-	-
12	-	178,6	13	-	-
13	1,60 <i>s</i>	23,1	-	-	5, 8
14	1,43 <i>s</i>	26,9	-	-	2, 6
15	1,93 <i>s</i>	17,7	-	-	3
Angeloil grupa					
-C=O	-	167,7	-C(CH ₃)=	-	-
	-	166,7			
-C(CH ₃)=	-	128,0	-CH(CH ₃)	-	-
	-	127,7	-C(CH ₃)		
-C=CH-	6,12 <i>m</i>	139,3	-CH(CH ₃)	-	-
	6,07 <i>m</i>	138,2	-C(CH ₃)		
-CH(CH ₃)	1,99 <i>m</i>	16,1	-C=CH-	-	-
	1,97 <i>m</i>	16,0			
-C(CH ₃)	1,88 <i>m</i>	20,8	-C=CH-	-	-
	1,87 <i>m</i>	20,6			
Acetil grupa					
-C=O	-	170,5	-CH ₃ (Ac)	-	-
-CH ₃	2,06 <i>s</i>	22,6	-	-	9 α



Slika 42. Jedinjenje **16** (8α -acetoksi- 2β , 11α -diangeloiloksi- 10β -hidroksi- 6α H, 7α H-gvajan-3-en-12,6-olid)

4.6. Jedinjenje **17** (8α -angeloiloksi- 10β -acetoksi- 6α H, 7α H-gvajan-3-en-12,6-olid)

Jedinjenje **17** je sa kolone silikagela eluirano u frakcijama 48 – 51. Dalje prečišćavanje vršeno je na semipreparativnoj HPLC koloni u izokratskim uslovima (60% MeOH : 40% H₂O). Jedinjenje **17** izolovano je kao prozirna čvrsta supstanca koja se lepila po zidovima suda.

U HR-MS (ESI⁺) spektru (Slika 74 u Prilogu), na osnovu pojave signala molekulskog jona m/z 391,2177 (preračunato 319,2115 za [M + H]⁺) i pojave dva signala kvazimolekulskih jona na m/z 413,1970 i 429,1727 (preračunate m/z 413,1935 i 4429,1674 za [M + Na]⁺ i [M + K]⁺, redom), zaključeno je da jedinjenju **17** odgovara molekulska formula C₂₂H₃₀O₆.

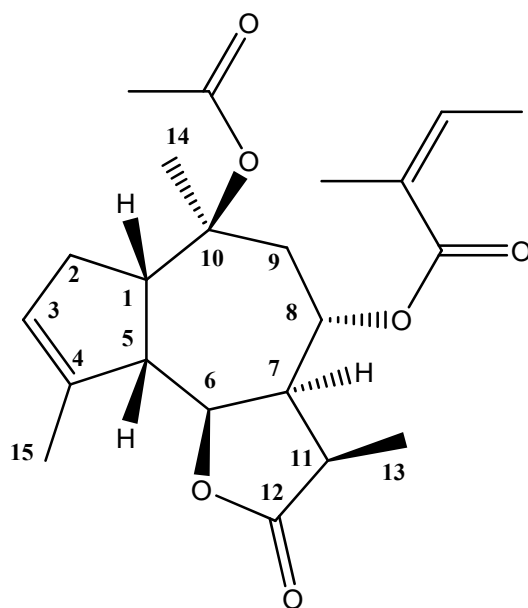
U IR spektru jedinjenja **17** (Slika 92 u Prilogu), traka na 1773,7 cm⁻¹ ukazuje na prisustvo petočlanog laktonskog prstena u strukturi. Traka na 1715,1 cm⁻¹ potiče od karbonilne grupe α,β -konjugovanog estra (Williams i Fleming, 1995).

Analizom 1D i 2D NMR spektara utvrđeno je da se radi o laktonu gvajanolidne strukture. U NMR spektrima uočeni su karakteristični signali jedne angeloiloksi i jedne acetoksi grupe. Prisustvo multipleta u ¹H NMR spektru (δ _H 2,69 ppm) koji u gHSQC spektru daje korelacioni signal sa C-11 (δ _C 36,7 ppm), ukazuju da položaj C-11 nije

esterifikovan. Signal u ^{13}C spektru za ugljenik C-10 je na δ_{C} 83,2 ppm, što ukazuje na esterifikaciju položaja C-10. Daljom analizom COSY, gHSQC i gHMBC spektara (Tabela 33), zaključeno je da je jedinjenje **17**: 8 α -angeloiloksi-10 β -acetoksi-6 α H,7 α H-gvajjan-3-en-12,6-olid (Slika 43). Ovaj lakton je ranije izolovan iz herbe *L. krapfii* subsp. *krapfii* (sub *L. marginatum*) (Đermanović, 1990; Milosavljević i sar., 1999).

Tabela 33. Podaci dobijeni iz NMR spektara: ^1H (300 MHz), ^{13}C (75 MHz), gHMBC i COSY, za jedinjenje **17**

Položaj	δ_{H} (J u Hz)	δ_{C}	gHMBC	COSY
1	2,81 <i>m</i>	53,1	5, 14	2, 5
2	α : 2,20 <i>m</i> β : 2,29 <i>m</i>	32,3	-	2, 3, geminalno kuplovanje
3	5,54 <i>bm</i>	125,5	15	2
4	-	146,3	15	-
5	2,63 <i>m</i>	50,5	15	1, 6
6	4,61 <i>dd</i> (11,4; 9,0)	80,6	5	5, 7
7	3,06 <i>ql</i> (9,0)	47,0	5, 9, 13	6
8	5,58 <i>dd</i> (10,8; 9,9)	65,2	9	-
9	α : 2,68 <i>d</i> (12,0) β : 2,06 <i>m</i>	41,0	14	geminalno kuplovanje
10	-	83,2	14	-
11	2,69 <i>m</i>	36,7	13	13
12	-	179,4	13	-
13	1,37 <i>d</i> (7,8)	14,0	-	11
14	1,56 <i>s</i>	25,3	-	-
15	1,89 <i>bs</i>	18,6	-	-
Angeloil grupa				
-C=O	-	166,7	-C(CH ₃)=	-
-C(CH ₃)=	-	127,8	-CH(CH ₃) -C(CH ₃)	-
-C=CH-	6,05 <i>m</i>	138,2	-CH(CH ₃) -C(CH ₃)	-
-CH(CH ₃)	1,95 <i>m</i>	16,0	-C=CH-	-
-C(CH ₃)	1,85 <i>m</i>	20,7	-C=CH-	-
Acetil grupa				
-C=O	-	170,7	-CH ₃ (Ac)	-
-CH ₃	2,12 <i>s</i>	22,9	-	-



Slika 43. Jedinjenje **17** (8α -angeloiloksi- 10β -acetoksi- 6α H, 7α H-gvajan-3-en-12,6-olid)

4.7. Jedinjenje **18** (izosilerolid)

Jedinjenje **18** je sa kolone silikagela eluirano u frakcijama 57 – 60. Dalje prečišćavanje vršeno je na semipreparativnoj HPLC koloni u izokraskim uslovima (70% MeOH : 30% H₂O). Jedinjenje **18** izolovano je kao beličasta praškasta supstanca.

U HR-MS (ESI⁺) spektru (Slika 75 u Prilogu), javljaju se signali molekulskog jona na m/z 319,2120 (preračunato 319,2115 za [M + H]⁺) i dva kvazimolekulska jona na m/z 413,1944 i 429,1689 (preračunate m/z 413,1935 i 429,1674 za [M + Na]⁺ i [M + K]⁺, redom), što znači da jedinjenju **18** odgovara molekulska formula C₂₂H₃₀O₆.

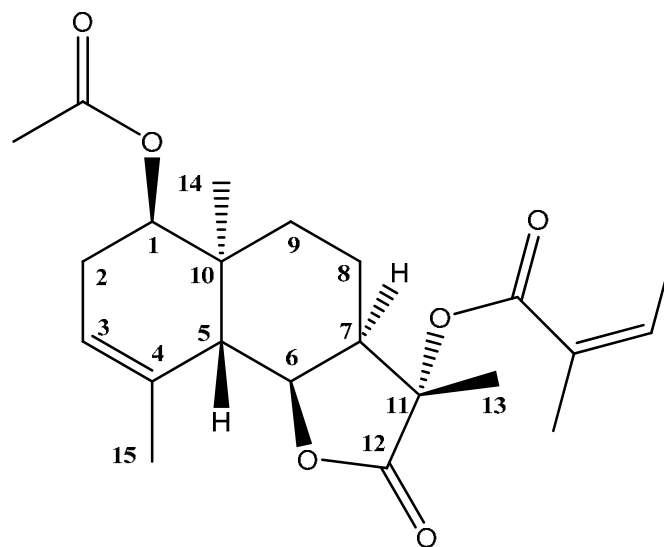
U IR spektru jedinjenja **18** (Slika 93 u Prilogu), traka na 1780,6 cm⁻¹ ukazuje na prisustvo laktonskog prstena. Traka na 1724,0 cm⁻¹ potiče od karbonilne grupe estra sa konjugovanom dvostrukom vezom (Williams i Fleming, 1995).

Analizom 1D i 2D NMR spektara utvrđeno je da se radi o laktonu eudezmanolidne strukture, tačnije sa strukturom 6α H, 7α H-eudezman-3-en-6,12-olida, esterifikovnog u položajima 1β i 11α . U NMR spektrima je uočena izvesna podudarnost sa strukturom silerolida. Ali, na osnovu prisustva multiplata na δ_H 6,15 ppm i signala protona dve metil grupe na δ_H 1,88 ppm (*m*) i 1,98 ppm (*m*), utvrđeno je prisustvo jedne angeloiloksi grupe, pored jedne acetoksi grupe. Daljom analizom NMR spektara (podaci dati u Tabeli 34), zaključeno je da je jedinjenje **18** izosilerolid, odnosno

1 β -acetoksi,11 α -angeloiloksi-6 α H,7 α H-eudezman-3-en-6,12-olid (Slika 44), prethodno izolovan iz podzemnih organa *L. siler* (Smitalova i sar., 1984; Milosavljević i sar., 1999).

Tabela 34. Podaci dobijeni iz NMR spektara: ^1H (300 MHz), ^{13}C (75 MHz), gHMBC i COSY, za jedinjenje **18**

Položaj	δ_{H} (J u Hz)	δ_{C}	gHMBC	COSY
1	4,61 <i>d</i> (3,6)	75,3	14	2
2	α : 2,04 <i>m</i> β : 2,37 <i>m</i>	29,0	-	1, 3, geminalno kuplovanje
3	5,33 <i>bs</i>	119,8	15	2
4	-	133,5	15	-
5	2,42 <i>bs</i>	42,1	14	6
6	4,85 <i>dd</i> (11,1; 8,7)	78,5	-	5, 7
7	3,24 <i>dd</i> (14,7; 6,6)	39,6	13	6
8	α : 1,81 <i>m</i> β : 1,68 <i>m</i>	19,0	-	geminalno kuplovanje
9	α : 1,65 <i>m</i> β : 1,21 <i>m</i>	30,7	14	geminalno kuplovanje
10	-	36,3	14	-
11	-	80,3	13	-
12	-	174,9	13	-
13	1,60 <i>s</i>	20,3	-	-
14	0,87 <i>s</i>	18,3	-	-
15	1,90 <i>s</i>	23,2	-	-
Angeloil grupa				
-C=O	-	166,6	-C(CH ₃)=	-
-C(CH ₃)=	-	127,2	-CH(CH ₃) -C(CH ₃)	-
-C=CH-	6,15 <i>m</i>	140,7	-CH(CH ₃) -C(CH ₃)	-
-CH(CH ₃)	1,98 <i>m</i>	16,2	-C=CH-	-
-C(CH ₃)	1,88 <i>m</i>	20,6	-C=CH-	-
Acetil grupa				
-C=O	-	170,9	-CH ₃ (Ac)	-
-CH ₃	2,04 <i>s</i>	21,5	-	-



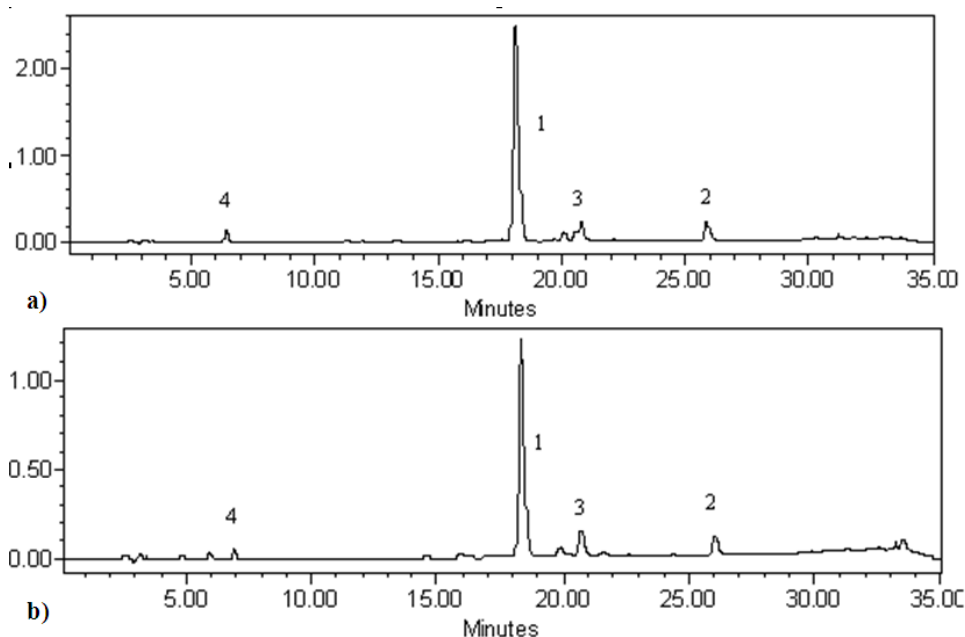
Slika 44. Jedinjenje **18** (izosilerolid, tj. 1 β -acetoksi,11 α -angeloiloksi-6 α H,7 α H-eudezman-3-en-6,12-olid)

5. HPLC analiza hloroformskih ekstraktata *L. latifolium*, *L. zernyi* i *L. ochridanum*

5.1. Identifikacija i kvantifikacija sekundarnih metabolita u hloroformskim ekstraktima *L. latifolium*

HPLC analizom hloroformskih ekstraktata (u metanolu rastvorljivih delova) podzemnih organa i herbe *L. latifolium* utvrđena je njihova međusobna sličnost u pogledu glavnih sastojaka. HPLC hromatogrami dobijeni u uslovima optimizovanim za razdvajanje terpenoida (detekciona talasna dužina 225 nm) dati su na Slici 45. Glavna jedinjenja ovih ekstraktata obeležena su brojevima 1-4.

Dominantan pik (retenciono vreme 18,22 min) na oba HPLC hromatograma odgovara laserpicinu (jedinjenje **1**). Pik na retencionom vremenu 25,84 min potiče od acetildezoksodehidrolaserpicina (jedinjenje **2**), a pik na 20,86 min potiče od laserina (jedinjenje **3**). Pik na znatno kraćem retencionom vremenu (6,47 min) potiče od latifolona (jedinjenje **4**).



Slika 45. HPLC hromatogrami u metanolu rastvorljivih delova hloroformskih ekstraktata (1 mg/ml) *L. latifolium* (225 nm) u uslovima optimizovanim za razdvajanje terpenoida:

- a) HPLC hromatogram ekstrakta podzemnih organa;
- b) HPLC hromatogram ekstrakta herbe.

Određivanje sadržaja laserpicina (**1**), acetildezoksodehidrolaserpicina (**2**), laserina (**3**) i latifolona (**4**), izvršena je u gradijent HPLC uslovima optimizovanim za

razdvajanje terpenoida, na detekcionoj talasnoj dužini 225 nm. Kvantifikacija je izvršena metodom eksternog standarda. Izolovana jedinjenja korišćena su kao eksterni standardi u opsegu koncentracija 6,75–100 µg/ml. Konstruisane su kalibracione krive (linearnost potvrđena koeficijentima korelacije) i iz njih je preračunavan sadržaj jedinjenja u ekstraktima.

Sadržaj jedinjenja **1-4** u hloroformskom ekstraktu podzemnih organa *L. latifolium*, kao i u delu hloroformskog ekstrakta rastvorljivom u metanolu, dat je u Tabeli 35.

Tabela 35. Sadržaj jedinjenja **1-4** u hloroformskom (CHCl₃) ekstraktu podzemnih organa *L. latifolium* i u delu hloroformskog ekstrakta rastvorljivom u metanolu (MeOH). Koncentracije su izražene u mg jedinjenja/g suvog ekstrakta.

Jedinjenje	Naziv	Koncentracija u CHCl ₃ ekstraktu (mg/g)	Koncentracija u delu CHCl ₃ ekstrakta rastvorljivom u MeOH (mg/g)
1	laserpicin	327,91	353,73
2	acetildezoksi-dehidrolaserpicin	18,86	20,35
3	laserin	13,33	14,38
4	latifolon	11,74	12,76

Sadržaj jedinjenja **1-4** određen u hloroformskom ekstraktu herbe *L. latifolium*, kao i u delu hloroformskog ekstrakta rastvorljivom u metanolu, dat je u Tabeli 36.

Tabela 36. Sadržaj jedinjenja **1-4** u hloroformskom (CHCl₃) ekstraktu herbe *L. latifolium* i u delu hloroformskog ekstrakta rastvorljivom u metanolu (MeOH). Koncentracije su izražene u mg jedinjenja/g suvog ekstrakta.

Jedinjenje	Naziv	Koncentracija u CHCl ₃ ekstraktu (mg/g)	Koncentracija u delu CHCl ₃ ekstrakta rastvorljivom u MeOH (mg/g)
1	laserpicin	237,77	263,31
2	acetildezoksi-dehidrolaserpicin	15,20	16,83
3	laserin	12,37	13,70
4	latifolon	8,42	9,32

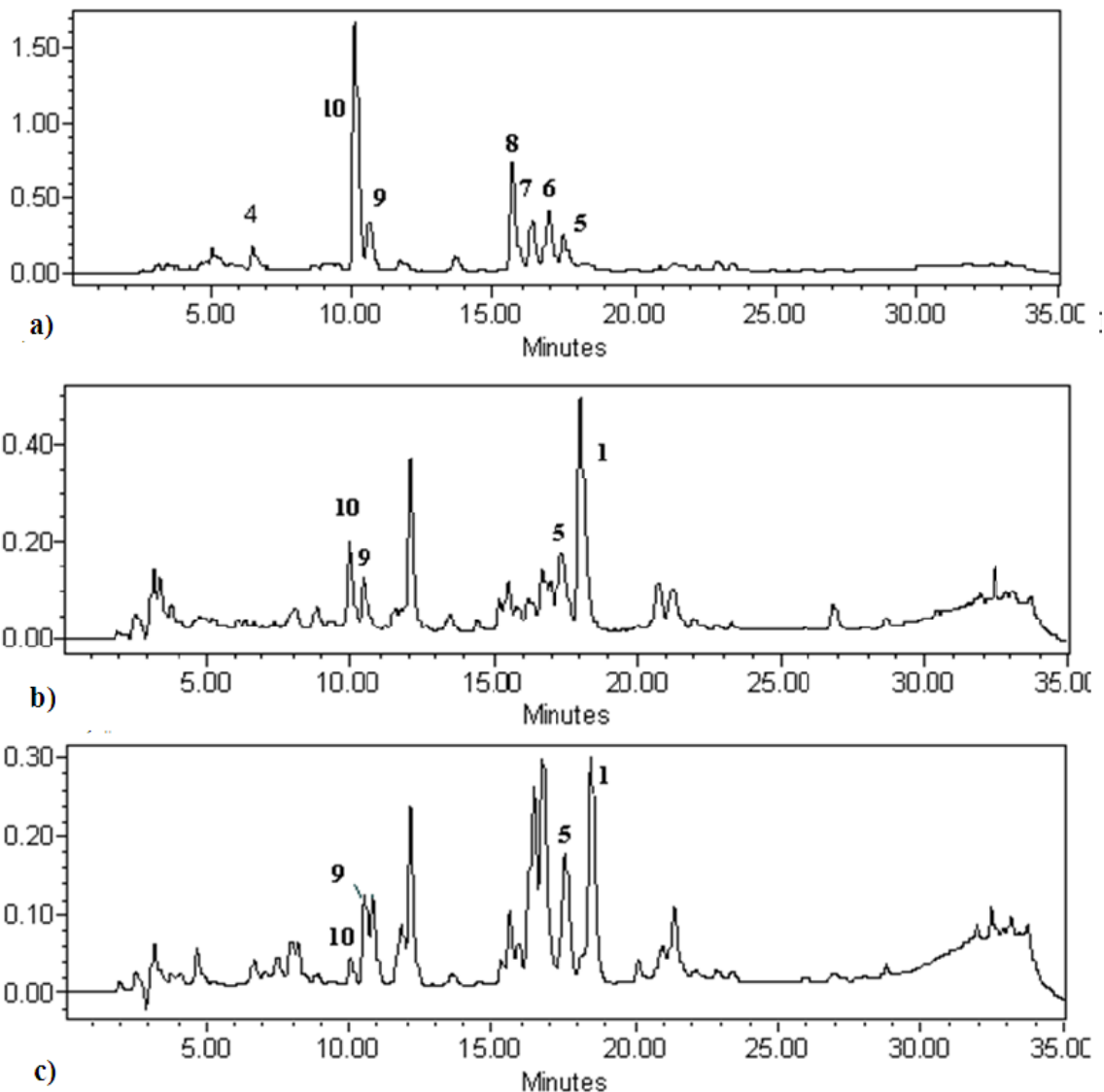
5.2. Identifikacija i kvantifikacija sekundarnih metabolita u hloroformskim ekstraktima *L. zernyi*

HPLC analizom hloroformskih ekstrakata podzemnih organa, herbe i cvasti vrste *L. zernyi* (u metanolu rastvorljivih delova), uočena je izvesna sličnost u pogledu njihovih glavnih sastojaka. HPLC hromatogrami dobijeni u uslovima optimizovanim za razdvajanje terpenoida na detekcionoj talasnoj dužini 225 nm dati su na Slici 46. U Tabeli 37 dat je zbirni prikaz jedinjenja identifikovanih u svim ekstraktima *L. zernyi*, zajedno sa njihovim retencionim vremenima.

Iz hloroformskog ekstrakta podzemnih organa *L. zernyi* u okviru ove doktorske disertacije, izolovano je i jedinjenje **11** (8 α -senecioiloksi,10 β -hidroksi-6 α H,7 α H-gvajjan-3-en-12,6-olid), ali je njegova koncentracija u sirovom ekstraktu bila suviše niska da bi se uočio odgovarajući pik na HPLC hromatogramu. Inače, izolovano jedinjenje **11** na HPLC hromatogramu dobijenom u uslovima optimizovanim za razdvajanje terpenoida daje pik na retencionom vremenu 10,81 min.

Tabela 37. Trivijalni nazivi i retenciona vremena jedinjenja identifikovanih u hloroformskim ekstraktima *L. zernyi* u HPLC uslovima optimizovanim za razdvajanje terpenoida. Oznake pikova na HPLC hromatogramima odgovaraju brojevima jedinjenja

Jedinjenje	Trivijalan naziv	Retenciono vreme
1	laserpicin	18,22 min
4	latifolon	6,47 min
5	tarolid	17,49 min
6	acetilizomontanolid	16,92 min
7	acetilmontanolid	16,40 min
8	silerolid	15,76 min
9	izomontanolid	10,60 min
10	montanolid	10,81 min



Slika 46. HPLC hromatogrami delova hloroformskih ekstrakata *L. zernyi* rastvorljivih u metanolu (1 mg/ml), u sistemu optimizovanom za razdvajanje terpenoida ($\lambda=225$ nm):
 a) HPLC hromatogram ekstrakta podzemnih organa;
 b) HPLC hromatogram ekstrakta herbe;
 c) HPLC hromatogram ekstrakta cvasti.
 Oznake pikova na HPLC hromatogramima odgovaraju brojevima jedinjenja datim u Tabeli 37.

Kvantifikacija najzastupljenijih komponenata izvršena je u HPLC uslovima optimizovanim za razdvajanje terpenoida, na detekcionoj talasnoj dužini 225 nm. Kvantifikacija je izvršena metodom eksternog standarda. Kao eksterni standardi korišćena su jedinjenja **5-10**, prethodno izolovana iz hloroformskog ekstrakta podzemnih organa *L. zernyi*, kao i jedinjenja **1** i **4**, prethodno izolovana iz hloroformskog ekstrakta podzemnih organa *L. latifolium*. Svi eksterni standardi korišćeni su u opsegu

koncentracija 6,75–100 µg/ml. Konstruisane su kalibracione krive (linearnost potvrđena koeficijentima korelacije) i iz njih je preračunavan sadržaj.

Sadržaj jedinjenja **4-10** u hloroformskom ekstraktu podzemnih organa *L. zernyi*, kao i delu hloroformskog ekstrakta rastvorljivom u metanolu, dat je u Tabeli 38.

Tabela 38. Sadržaj jedinjenja **4-10** u hloroformskom ekstraktu podzemnih organa *L. zernyi* i u delu hloroformskog ekstrakta rastvorljivom u metanolu (MeOH). Koncentracije su izražene u mg jedinjenja/g suvog ekstrakta.

Jedinjenje	Naziv	Koncentracija u CHCl ₃ ekstraktu (mg/g)	Koncentracija u delu CHCl ₃ ekstrakta rastvorljivom u MeOH (mg/g)
4	latifolon	3,02	3,28
5	tarolid	22,73	24,65
6	acetilizomontanolid	66,46	72,08
7	acetilmontanolid	43,89	47,60
8	silerolid	26,37	28,60
9	izomontanolid	27,57	29,90
10	montanolid	88,17	95,63

Sadržaj najzastupljenijih jedinjenja u hloroformskom ekstraktu herbe *L. zernyi*, kao i u delu hloroformskog ekstrakta rastvorljivom u metanolu, dat je u Tabeli 39.

Tabela 39. Sadržaj najzastupljenijih jedinjenja u hloroformskom (CHCl₃) ekstraktu herbe *L. zernyi* i u delu hloroformskog ekstrakta rastvorljivom u metanolu (MeOH). Koncentracije su izražene u mg jedinjenja/g suvog ekstrakta.

Jedinjenje	Naziv	Koncentracija u CHCl ₃ ekstraktu (mg/g)	Koncentracija u delu CHCl ₃ ekstrakta rastvorljivom u MeOH (mg/g)
1	laserpicin	37,64	45,31
5	tarolid	n. o. ^a	n. o.
9	izomontanolid	n. o.	n. o.
10	montanolid	3,11	3,75

^an. o.-sadržaj jedinjenja nije bilo moguće odrediti zbog suviše niske koncentracije

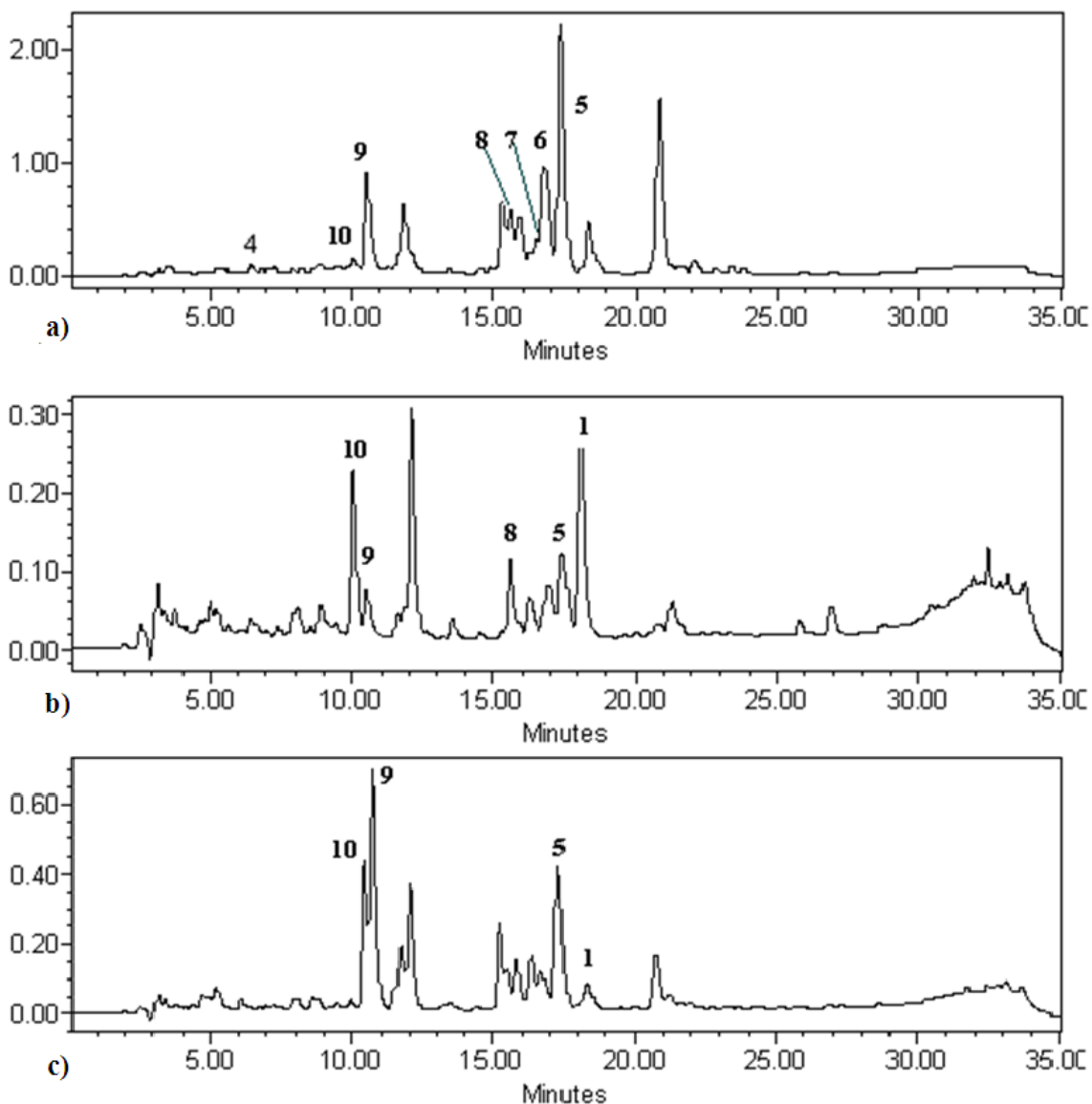
U hloroformskom ekstraktu cvasti *L. zernyi* detektovani su laserpicin, montanolid, izomontanolid i tarolid, ali su njihovi sadržaji bili previše niski da bi im se utvrdila tačna koncentracija.

5.3. Identifikacija i kvantifikacija sekundarnih metabolita u hloroformskim ekstraktima *L. ochridanum*

HPLC analizom hloroformskih ekstrakata podzemnih organa, herbe i ploda vrste *L. ochridanum* (u metanolu rastvorljivih delova), uočena je njihova izvesna međusobna sličnost u pogledu glavnih sastojaka. HPLC hromatogrami dobijeni u uslovima optimizovanim za razdvajanje terpenoida na detekcionoj talasnoj dužini 225 nm dati su na Slici 47.

Zbirni prikaz jedinjenja identifikovanih u svim ekstraktima *L. ochridanum* i njihovih retencionih vremena identičan je onom datom za ekstrakte *L. zernyi* u Tabeli 37.

Iz hloroformskog ekstrakta podzemnih organa *L. ochridanum* u okviru ove doktorske disertacije, izolovana su i jedinjenja **12-18**, ali je njihova koncentracija u sirovom ekstraktu bila suviše niska da bi se uočili njihovi pikovi na HPLC hromatogramu. Inače, izolovana jedinjenja **12, 13, 14, 15, 16, 17** i **18** na HPLC hromatogramu dobijenom u uslovima optimizovanim za razdvajanje terpenoida, daju pikove na retencionim vremenima 20,90, 15,50, 17,50, 18,51, 16,62, 16,62 i 15,92 min, redom.



Slika 47. HPLC hromatogrami delova hloroformskih ekstrakata *L. ochridanum* rastvorljivih u metanolu (1 mg/ml), u sistemu optimizovanom za razdvajanje terpenoida ($\lambda=225$ nm):

- a) HPLC hromatogram ekstrakta podzemnih organa;
- b) HPLC hromatogram ekstrakta herbe;
- c) HPLC hromatogram ekstrakta ploda.

Oznake pikova na HPLC hromatogramima odgovaraju brojevima jedinjenja u Tabeli 37.

Kvantifikacija najzastupljenijih komponenata izvršena je u HPLC uslovima optimizovanim za razdvajanje terpenoida, na detekcionoj talasnoj dužini 225 nm, metodom eksternog standarda. Kao eksterni standardi korišćena su jedinjenja **5-10**, prethodno izolovana iz hloroformskog ekstrakta podzemnih organa *L. zernyi*, kao i jedinjenja **1** i **4**, prethodno izolovana iz hloroformskog ekstrakta podzemnih organa

L. latifolium. Svi eksterni standardi korišćeni su u opsegu koncentracija 6,75–100 µg/ml. Konstruisane su kalibracione krive (linearnost potvrđena koeficijentima korelacije) i iz njih je preračunavan sadržaj.

Sadržaj najzastupljenijih jedinjenja u hloroformskom ekstraktu podzemnih organa *L. ochridanum*, kao i u delu hloroformskog ekstrakta rastvorljivog u metanolu, dat je u Tabeli 40.

Tabela 40. Sadržaj najzastupljenijih jedinjenja u hloroformskom (CHCl₃) ekstraktu podzemnih organa *L. ochridanum* i u delu hloroformskog ekstrakta rastvorljivom u metanolu (MeOH). Koncentracije su izražene u mg jedinjenja/g suvog ekstrakta.

Jedinjenje	Naziv	Koncentracija u CHCl ₃ ekstraktu (mg/g)	Koncentracija u delu CHCl ₃ ekstrakta rastvorljivom u MeOH (mg/g)
4	latifolon	1,34	1,58
5	tarolid	174,34	205,11
6	acetilizomontanolid	79,48	93,50
7	acetilmontanolid	n. o. ^a	n. o.
8	silerolid	n. o.	n. o.
9	izomontanolid	34,56	40,66
10	montanolid	2,17	2,55

^an. o.- sadržaj jedinjenja nije bilo moguće odrediti zbog suviše niske koncentracije

Sadržaj najzastupljenijih jedinjenja u hloroformskom ekstraktu herbe *L. ochridanum*, kao i u delu hloroformskog ekstrakta rastvorljivom u metanolu, dat je u Tabeli 41.

Tabela 41. Sadržaj najzastupljenijih jedinjenja u hloroformskom (CHCl₃) ekstraktu herbe *L. ochridanum* i u delu hloroformskog ekstrakta rastvorljivom u metanolu (MeOH). Koncentracije su izražene u mg jedinjenja/g suvog ekstrakta.

Jedinjenje	Naziv	Koncentracija u CHCl ₃ ekstraktu (mg/g)	Koncentracija u MeOH rastvorljiv deo CHCl ₃ ekstrakta (mg/g)
1	laserpicin	24,44	30,17
5	tarolid	n. o. ^a	n. o.
8	silerolid	n. o.	n. o.
9	izomontanolid	n. o.	n. o.
10	montanolid	4,15	5,12

^an. o.- sadržaj jedinjenja nije bilo moguće odrediti zbog suviše niske koncentracije

Sadržaj najzastupljenijih jedinjenja u hloroformskom ekstraktu ploda *L. ochridanum*, kao i u delu hloroformskog ekstrakta rastvorljivom u metanolu, dat je u Tabeli 42.

Tabela 42. Sadržaj najzastupljenijih jedinjenja u hloroformskom (CHCl₃) ekstraktu ploda *L. ochridanum* i u delu hloroformskog ekstrakta rastvorljivom u metanolu (MeOH). Koncentracije su izražene u mg jedinjenja/g suvog ekstrakta.

Jedinjenje	Naziv	Koncentracija u CHCl ₃ ekstraktu (mg/g)	Koncentracija u MeOH rastvorljiv deo CHCl ₃ ekstrakta (mg/g)
1	laserpicin	n. o. ^a	n. o.
5	tarolid	n. o.	n. o.
9	izomontanolid	21,96	24,40
10	montanolid	14,65	16,28

^an. o.- sadržaj jedinjenja nije bilo moguće odrediti zbog suviše niske koncentracije

5.4. Uporedna analiza rezultata dobijenih HPLC analizom hloroformskih ekstrakata *L. latifolium*, *L. zernyi* i *L. ochridanum*

HPLC analizom, u uslovima optimizovanim za razdvajanje terpenoida, može se uočiti sličnost u pogledu hemijskog sastava hloroformskih ekstrakata podzemnih organa i herbe *L. latifolium*. Najzastupljenije komponente, odnosno jedinjenja 1-4, identične su u oba ekstrakta, samo je koncentracija svih detektovanih komponenata viša u hloroformskom ekstraktu podzemnih organa u odnosu na ekstrakt herbe *L. latifolium*.

Na HPLC hromatogramima hloroformskih ekstrakata podzemnih organa *L. zernyi* i *L. ochridanum*, uočava se prisustvo identičnih najzastupljenijih komponenata, jedinjenja **4-10**, ali je dobijeni HPLC hromatogram podzemnih organa *L. ochridanum* kompleksnijeg izgleda. Pored seskviterpenskih laktona, u oba hloroformska ekstrakta podzemnih organa detektovan je latifolon (jedinjenje **4**). Ekstrakti herbi vrsta *L. zernyi* i *L. ochridanum*, cvasti *L. zernyi* i ploda *L. ochridanum* su nešto kompleksnijeg sastava u odnosu na ekstrakte podzemnih organa. Zanimljivo je da je u ekstraktima herbi *L. zernyi* i *L. ochridanum*, kao i u ekstraktima cvasti *L. zernyi* i ploda *L. ochridanum* prisutan laserpicin (jedinjenje **1**), glavni sastojak ekstrakata podzemnih organa i herbe *L. latifolium*. Laserpicin nije detektovan u ekstraktima podzemnim organima vrsta *L. zernyi* i *L. ochridanum*. Uporedni prikaz komponenata detektovanih HPLC analizom u analiziranim hloroformskim ekstraktima odabranih vrsta roda *Laserpitium* dat je u Tabeli 43.

Tabela 43. Uporedni prikaz rezultata kvalitativne i kvantitativne HPLC-DAD analize delova hloroformskih ekstraktata rastvorljivih u metanolu u odabranim vrstama roda *Laserpitium*

Jedinjenje	Naziv	Sadržaj jedinjenja (%)							
		<i>L. latifolium</i>		<i>L. zernyi</i>			<i>L. ochridanum</i>		
		podzemni organi	herba	podzemni organi	herba	cvast	podzemni organi	herba	plod
1	laserpicin	35,37	26,33	-	4,53	+	-	3,02	+
2	acetildezoksodehidrolaserpicin	2,03	1,68	-	-	-	-	-	-
3	laserin	1,44	1,37	-	-	-	-	-	-
4	latifolon	1,28	0,93	0,33	-	-	0,16	-	-
5	tarolid	-	-	2,47	+	+	20,51	+	+
6	acetilizomontanolid	-	-	7,21	-	-	9,35	-	-
7	acetilmontanolid	-	-	4,76	-	-	+	-	-
8	silerolid	-	-	2,86	-	-	+	+	-
9	izomontanolid	-	-	2,99	+	+	4,07	+	2,44
10	montanolid	-	-	9,59	0,38	+	0,26	0,51	1,63
11	8 α -senecioiloksi,10 β -hidroksi-6 α H,7 α H-gvajjan-3-en-12,6-olid	-	-	+	-	-	-	-	-
12	8 α -acetoksi,2 β ,10 β -diangeloiloksi-6 α H,7 α H-gvajjan-3-en-12,6-olid	-	-	-	-	-	+	-	-
13	2 β ,8 α -diangeloiloksi-10 β -hidroksi-6 α H,7 α H-gvajjan-3-en-12,6-olid	-	-	-	-	-	+	-	-
14	8 α -angeloiloksi-11 α -senecioiloksi-10 β -hidroksi-6 α H,7 α H-gvajjan-3-en-12,6-olid	-	-	-	-	-	+	-	-

Tabela 43 (nastavak)

Sadržaj jedinjenja (%)

Jedinjenje	Naziv	<i>L. latifolium</i>		<i>L. zernyi</i>			<i>L. ochridanum</i>		
		podzemni organi	herba	podzemni organi	herba	cvast	podzemni organi	herba	plod
15	2β,8α-diangeloiloksi-10β-hidroksi-6αH-gvajjan-3,(7-11)-dien-12,6-olid	-	-	-	-	-	+	-	-
16	8α-acetoksi-2β,11α-diangeloiloksi-10β-hidroksi-6αH,7αH-gvajjan-3-en-12,6-olid	-	-	-	-	-	+	-	-
17	8α-angeloiloksi-10β-acetoksi--6αH,7αH-gvajjan-3-en-12,6-oli	-	-	-	-	-	+	-	-
18	izosilerolid	-	-	-	-	-	+	-	-

„+“ – nije kvantifikovano, „-“ – nije detektovano.

6. Sadržaj ukupnih polifenola u metanolnim ekstraktima cvasti i herbe *L. zernyi*

Sadržaj ukupnih polifenola određen je u metanolnim ekstraktima cvasti i herbe bez cvasti vrste *L. zernyi* prikupljenih na planini Jablanica u Makedoniji u julu 2006. godine.

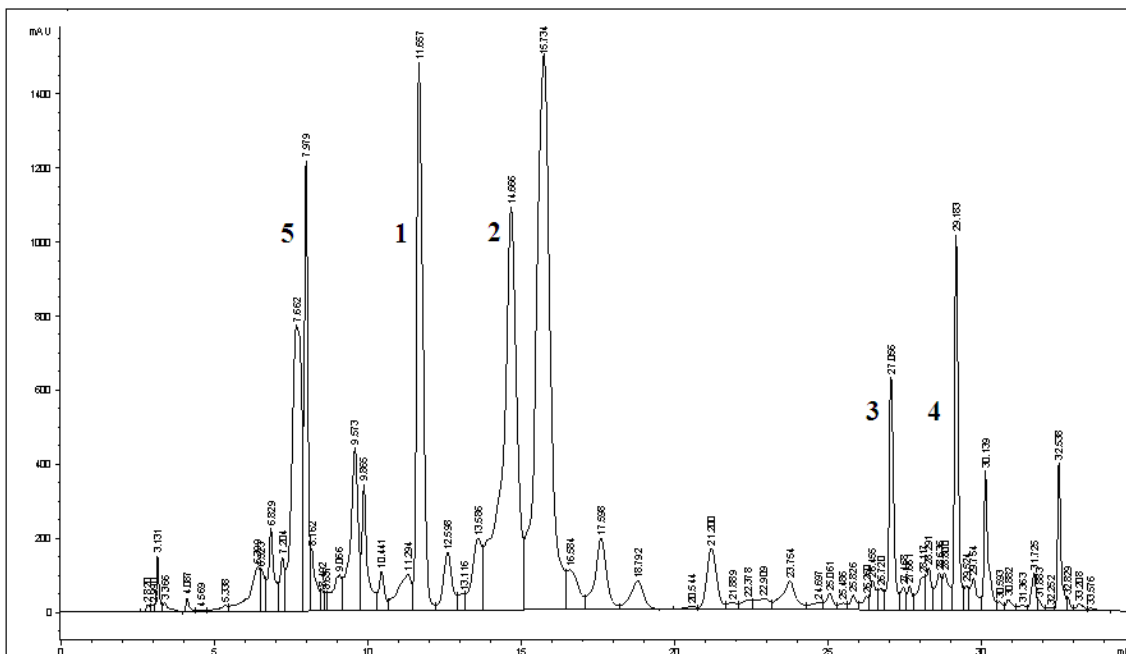
Sadržaj ukupnih polifenola u metanolnim ekstraktima cvasti određen je spektrofotometrijskim postupkom koji se zasniva na reakciji polifenolnih jedinjenja sa Folin-Ciocalteu reagensom (FC) u baznoj sredini, a rezultati su izraženi kao % galne kiseline, tj. kao mg galne kiseline u 100 mg suvog ekstrakta. Sadržaj ukupnih polifenola u metanolnim ekstraktima cvasti i herbe (bez cvasti) *L. zernyi* iznosio je 14,32% i 6,83%, redom, preračunato kao galna kiselina.

7. HPLC analiza metanolnih ekstrakata cvasti i herbe *L. zernyi*

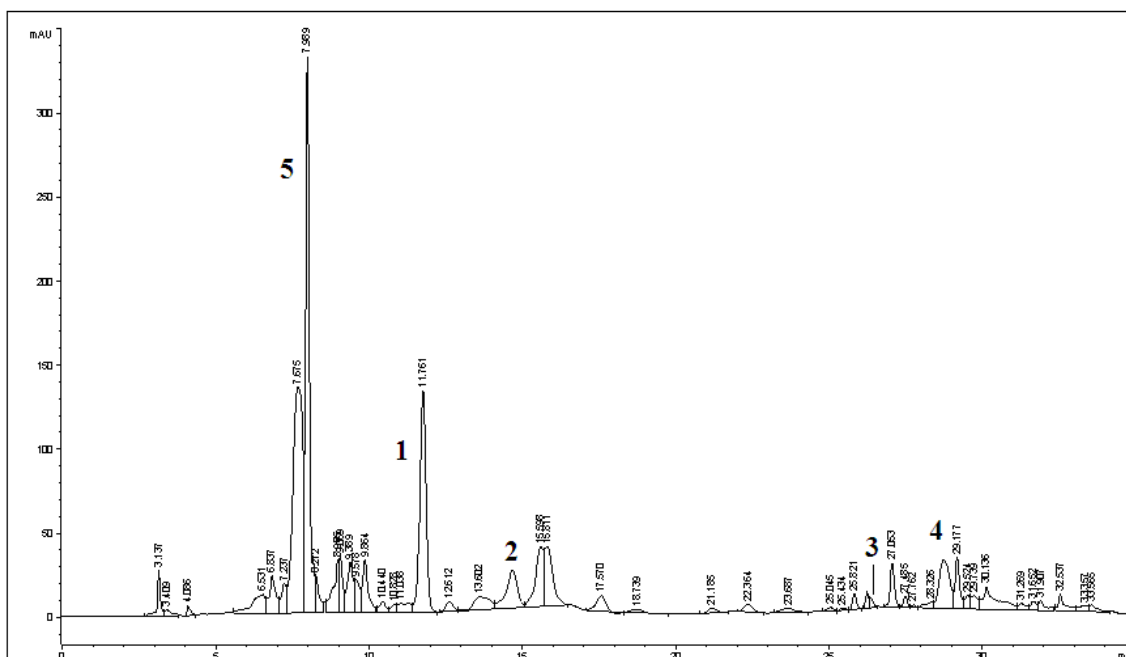
7.1. Identifikacija i kvantifikacija sekundarnih metabolita u metanolnim ekstraktima cvasti i herbe *L. zernyi*

HPLC analiza metanolnih ekstrakata cvasti i herbe (bez cvasti) vrste *L. zernyi*, prikupljene na planini Jablanica 2006. godine, izvršena je u gradijent sistemu optimizovanom za separaciju polifenolnih jedinjenja (flavonoida i fenolkarboksilnih kiselina).

Hromatogrami metanolnih ekstrakata cvasti (5 mg/ml) i herbe (10 mg/ml) u sistemu optimizovanom za separaciju polifenola dati su na Slikama 48 i 49 (detekciona talasna dužina 330 nm).

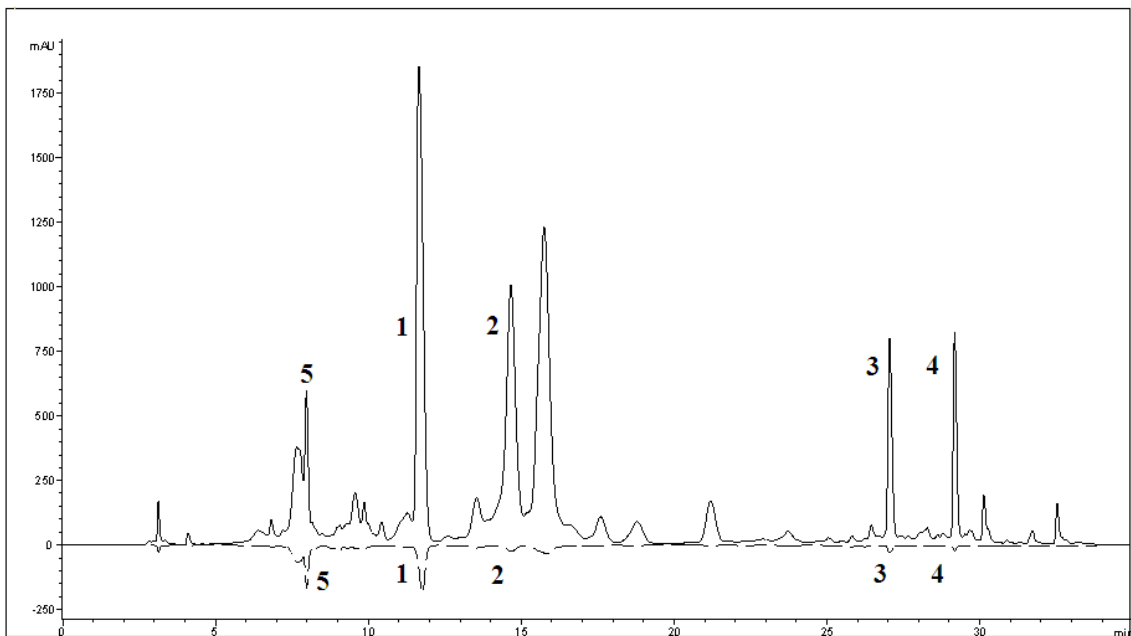


Slika 48. Hromatogram metanolnog ekstrakta cvasti *L. zernyi* u sistemu optimizovanom za separaciju polifenola, detekcija na 330 nm. Jedinjenja: 1) luteolin 7-O-glukozid, 2) apigenin 7-O-glukozid, 3) luteolin, 4) apigenin, 5) hlorogenska kiselina



Slika 49. HPLC hromatogram metanolnog ekstrakta herbe *L. zernyi* u sistemu optimizovanom za separaciju polifenola, detekcija na 330 nm. Jedinjenja: 1) luteolin 7-O-glukozid, 2) apigenin 7-O-glukozid, 3) luteolin, 4) apigenin, 5) hlorogenska kiselina

Uporedni prikaz HPLC hromatograma metanolnih ekstrakata cvasti i herbe *L. zernyi* pri identičnim koncentracijama (5 mg/ml) dat je na Slici 50.

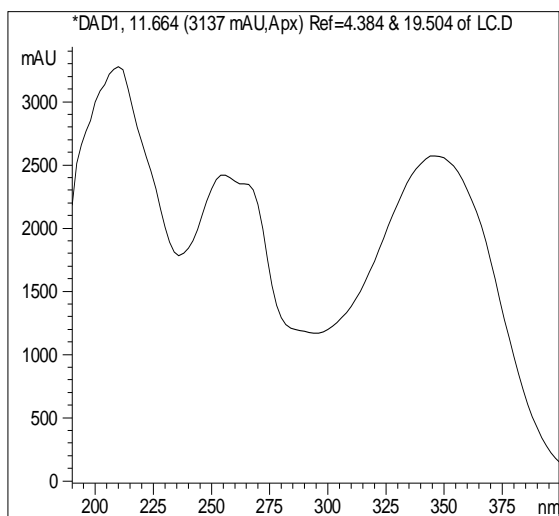


Slika 50. Uporedni prikaz hromatograma metanolnih ekstrakata A) cvasti i B) herbe *L. zernyi* (5 mg/ml). Jedinjenja: 1) luteolin 7-O-glukozid, 2) apigenin 7-O-glukozid, 3) luteolin, 4) apigenin, 5) hlorogenska kiselina

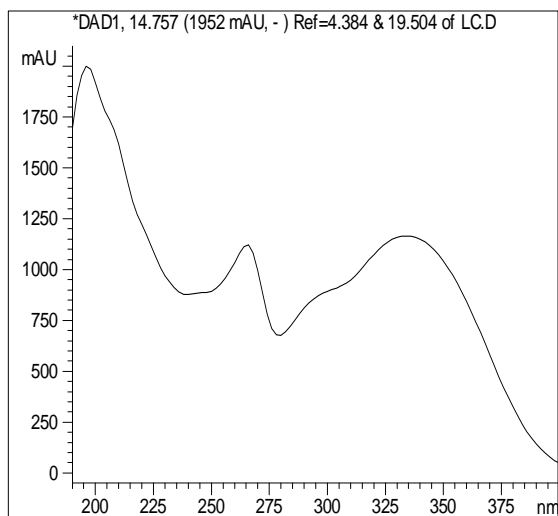
HPLC analizom, uz korišćenje standardnih supstanci, u oba uzorka konstatovano je prisustvo hlorogenske kiseline ($R_t=7,84$ min) i flavona: apigenina ($R_t=28,85$ min), luteolina ($R_t=26,62$ min), apigenin 7-O-glukozida ($R_t=14,94$ min) i luteolin 7-O-glukozida ($R_t=11,34$ min) (Slike 53, 54 i 55). UV spektri identifikovanih jedinjenja su dati na Slici 51, a hemijske strukture flavonoida na Slici 52.

Identifikovani flavoni i hlorogenska kiselina su pod istim eksperimentalnim uslovima kvantifikovani metodom eksternog standarda (opsezi koncentracija korišćeni za konstruisanje kalibracionih krivih: 0,50-4,00 mg/ml za apigenin; 0,25-2,00 mg/ml za apigenin 7-O-glukozid, luteolin 7-O-glukozid, i luteolin i 1,00-10,00 mg/ml za hlorogensku kiselinu). Linearost kalibracionih krivih je potvrđena odgovarajućim faktorima korelacije.

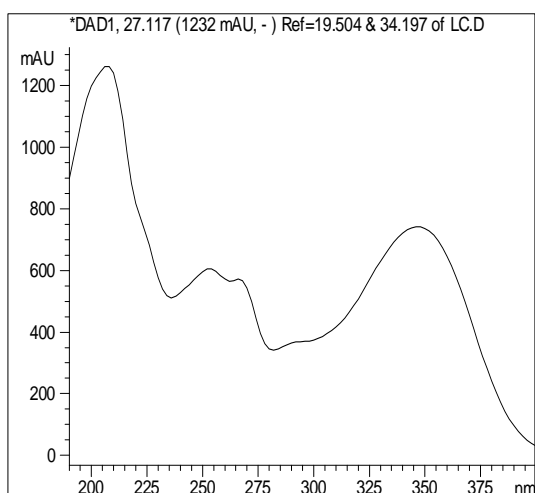
Sadržaj identifikovanih flavona i hlorogenske kiseline dat je u Tabeli 44.



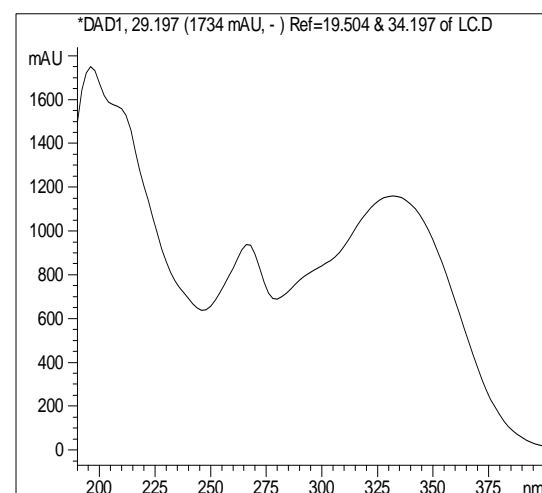
UV spektar luteolin 7-O-glukoziada



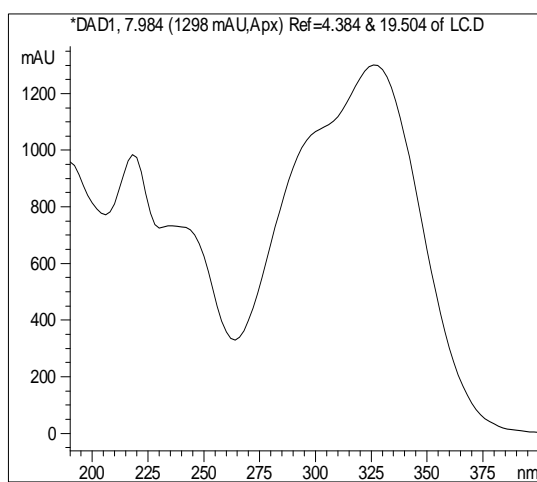
UV spektar apigenin 7-O-glukoziada



UV spektar luteolina

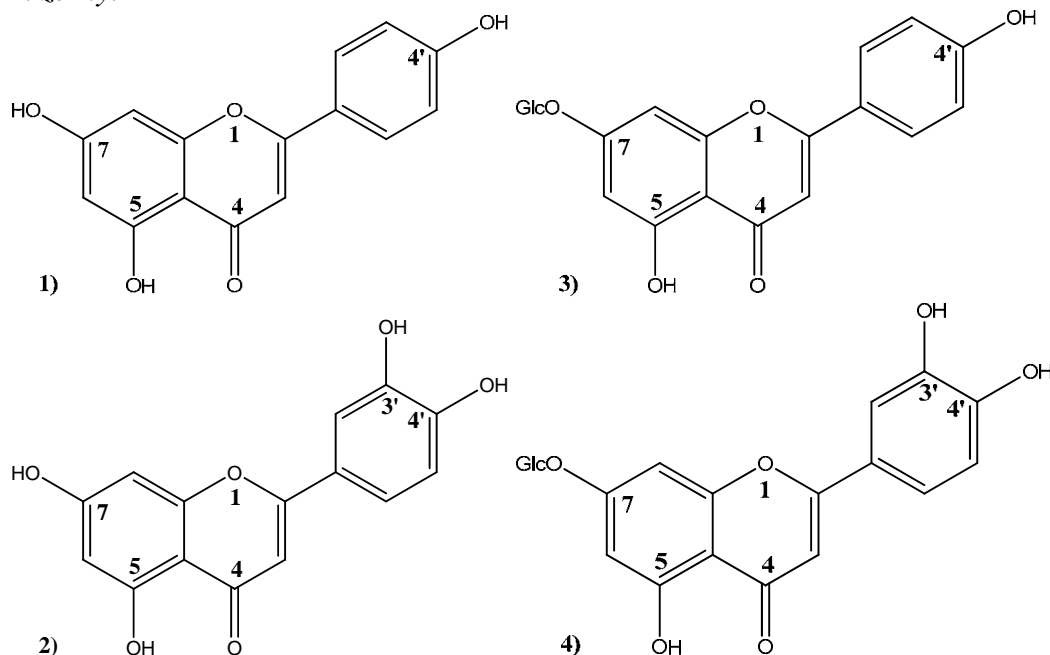


UV spektar apigenina



UV spektar hlorogenske kiseline

Slika 51. UV spektri jedinjenja identifikovanih u metanolnim ekstraktima cvasti i herbe *L. zernyi*



Slika 52. Flavoni identifikovani u metanolnim ekstraktima cvasti i herbe *L. zernyi*: 1) apigenin, 2) luteolin, 3) apigenin 7–O–glukozid, 4) luteolin 7–O–glukozid

Tabela 44. Sadržaj identifikovanih flavona i hlorogenske kiseline u metanolnim ekstraktima cvasti i herbe *L. zernyi*

Jedinjenje	MeOH ekstrakt cvasti <i>L. zernyi</i> (%)	MeOH ekstrakt herbe <i>L. zernyi</i> (%)
luteolin 7–O–glukozid	34,40	10,20
apigenin 7–O–glukozid	4,45	0,26
luteolin	0,19	n. o. ^a
apigenin	2,21	0,09
hlorogenska kiselina	1,46	1,33

^a n. o. sadržaj jedinjenja nije bilo moguće odrediti zbog suviše niske koncentracije

Za razliku od etanolnih ekstrakata lista *L. latifolium* u kojima je, pored hlorogenske i neohlorogenske kiseline, detektovano prisustvo flavonola, odnosno heterozida kemferola i kvercetina (Vereskovskii i sar., 1992), metanolne ekstrakte cvasti i herbe vrste *L. zernyi* karakteriše, pored hlorogenske kiseline, i prisustvo flavona, tačnije apigenina i luteolina i njihovih 7–O–glukozida.

FARMAKOLOŠKA ISPITIVANJA

1. Antimikrobna aktivnost etarskih ulja L. latifolium, L. zernyi i L. ochridanum

Antimikrobna aktivnost aromatičnih biljaka često je posledica antibakterijskog i antifungalnog dejstva njihovih etarskih ulja. Postoje brojne *in vitro*, *in vivo* i kliničke potvrde da etarska ulja, naročito ona bogata fenolima, deluju antimikrobno na različite sojeve Gram(+), Gram(-) bakterija i gljiva (Edris, 2007).

Antimikrobni efekat, slično ostalim biološkim aktivnostima etarskih ulja, najverovatnije je posledica nekoliko istovremenih procesa, kao što su prolazak fenolnih sastojaka ulja kroz lipidni sloj membrane i povećanje membranske propustljivosti. Ovi procesi dovode do daljeg gubitka intracelularnog sadržaja i promene potencijala ćelijske membrane mikroorganizma. Takođe, neka etarska ulja menjaju sastav ćelijskih membrana, uključujući i bakterijske, pa to dovodi do gubitka integriteta i lize ćelije (Bevilacqua i sar., 2012).

1.1. Bujon mikrodilucionni test

Antimikrobna aktivnost etarskih ulja izolovanih iz: ploda i podzemnih organa *L. latifolium*, herbe, ploda i podzemnih organa *L. ochridanum* i cvasti, herbe i podzemnih organa *L. zernyi* ispitivana je bujon mikrodilucionim testom, koristeći seriju razblaženja etarskih ulja u DMSO i odgovarajuće rastvore standardnih antibiotika: ampicilina i amikacina za ispitivanje antibakterijskog, i nistatina za ispitivanje antifungalnog dejstva.

Minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) ispitivanih uzoraka određivana je kao najmanja primenjena koncentracija etarskog ulja ili antibiotika/antimikotika, koja je dovela do inhibicije rasta mikroorganizma.

Rezultati ispitivanja antibakterijske aktivnosti etarskih ulja i referentnih antibiotika ampicilina, amikacina i nistatina prema standardnim sojevima: četiri Gram(+) bakterije: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *S. epidermidis* ATCC 12228, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Enterococcus faecalis* ATCC 29121, kao i tri Gram(-) bakterije: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* NCIMB 9111 i *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 i dva soja kandidate: *Candida albicans* (ATCC 10259 i 24433) dati su u Tabeli 45.

Tabela 45. Antimikrobna aktivnost etarskih ulja odabranih vrsta roda *Laserpitium* i referentnih antibiotika ispitivana bujon mikrodilucionim testom

Mikroorganizam	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	<i>M. luteus</i> ATCC 9341	<i>E. faecalis</i> ATCC 29121	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>K. pneumoniae</i> NCIMB 91116	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 278537	<i>C. albicans</i> ATCC 10259	<i>C. albicans</i> ATCC 24433
Etarsko ulje	MIK (µg/ml)								
<i>L. latifolium</i> - podzemni organi	>133,0	133,0	>133,0	>133,0	>133,0	>133,0	>133,0	>133,0	>133,0
<i>L. latifolium</i> - plod	36,5	73,0	18,3	>146,0	>146,0	>146,0	>146,0	>146,0	>146,0
<i>L. ochridanum</i> - podzemni organi	55,3	55,3	55,3	>110,7	>110,7	>110,7	>110,7	>110,7	27,7
<i>L. ochridanum</i> - herba	63,0	>126,0	>126,0	>126,0	>126,0	>126,0	>126,0	126,0	63,0
<i>L. ochridanum</i> - plod	13,0	13,0	52,1	>104,3	>104,3	>104,3	>104,3	52,1	104,3
<i>L. zernyi</i> - podzemni organi	63,7	31,8	63,7	>127,33	>127,33	>127,33	>127,33	127,3	>127,33
<i>L. zernyi</i> - herba	>0,6×10 ³	>0,6×10 ³	0,6×10 ³	n. t.	0,6×10 ³	>0,6×10 ³	>0,6×10 ³	>0,6×10 ³	n. t.
<i>L. zernyi</i> - cvast	1,2×10 ³	0,6×10 ³	1,2×10 ³	n. t.	0,6×10 ³	0,6×10 ³	1,2×10 ³	0,6×10 ³	n. t.
Ampicilin^a	1,0	n. t.	n. t.	n. t.	8,0	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.
Amikacin	2,0	n. t.	n. t.	n. t.	4,0	n. t.	2	n. t.	n. t.
Nistatin	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.	3,0	n. t.

n. t. – nije testirano

Najjaču antibakterijsku aktivnost ispoljila su etarska ulja: ploda *L. latifolium* prema *M. luteus* (MIK=18,3 µg/ml), *S. aureus* (MIK=36,5 µg/ml) i *S. epidermidis* (MIK=73,0 µg/ml); ploda *L. ochridanum* prema *S. aureus* i *S. epidermidis* (MIK=13,0 µg/ml) i *M. luteus* (MIK=52,1 µg/ml); podzemnih organa *L. ochridanum* prema *S. aureus*, *S. epidermidis* i *M. luteus* (MIK=55,3 µg/ml) i podzemnih organa *L. zernyi* prema *S. epidermidis* (MIK=31,8 µg/ml) i *S. aureus* i *M. luteus* (MIK=63,7 µg/ml). Etarsko ulje herbe *L. ochridanum* ispoljilo je umeren antimikrobni efekat prema bakteriji *S. aureus* (MIK=63,0 µg/ml).

Etarsko ulje ploda *L. latifolium*, kao i etarska ulja podzemnih organa *L. zernyi* i *L. ochridanum* bogata su α -pinenom (44,0, 31,6 i 33,2%), dok je u etarskom ulju herbe *L. ochridanum* detektovan nešto niži sadržaj ovog monoterpena (7,4%). Antimikrobna aktivnost α -pinena potvrđena je brojnim *in vitro* testovima (Ojeda-Sana i sar., 2013; Rivas da Silva i sar., 2012; Stojković i sar., 2011). Ojeda-Sana i saradnici (2013) testirali su antibakterijsku aktivnost etarskog ulja lista ruzmarina, *Rosmarinus officinalis* L., i njegovih najzastupljenijih komponenata, među kojima je i α -pinen. U ovom ispitivanju α -pinen je ispoljio jak *in vitro* antibakterijski efekat prema *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli* i *K. pneumoniae* (MIK=0,8-8,0 µl/ml). Stojković i saradnici (2011) utvrdili su za α -pinen jaku antibakterijsku aktivnost prema Gram(+) bakterijama: *S. aureus*, *M. luteus* i *B. subtilis*, kao i prema Gram(–) sojevima *E. coli* i *Salmonella typhimurium* (MIK=5-10 µg/ml). Ovo jedinjenje je uz sabinen i 1,8-cineol najzastupljeniji sastojak etarskog ulja nedozrelih plodova i lista vrste *Vitex agnus castus* L., pa je u istom ispitivanju i ispoljena aktivnost etarskih ulja objašnjena delom i aktivnošću α -pinena. U etarskom ulju ploda *L. latifolium* detektovan je, u nešto višem sadržaju, i β -pinen (13,3%). U jednom istraživanju pokazano je da i (+)- β -pinen, pored (+)- α -pinena, ispoljava antimikrobno dejstvo na meticilin-rezistentni *S. aureus* (MRSA) i tri gljivična soja: *C. albicans*, *Cryptococcus neoformans* i *Rhizopus oryzae* (Rivas da Silva i sar., 2012). Ispoljeno antimikrobno dejstvo etarskog ulja ploda *L. latifolium* može se, dakle, dovesti u vezu sa relativno visokim sadržajem α - i β -pinena u njemu.

Etarsko ulje ploda *L. ochridanum* izuzetno je bogato limonenom (57,7%). Ovaj monoterpenski ugljovodonik pokazao je izuzetno visoku aktivnosti prema četiri soja biljnih patogenih gljiva: *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium digitatum* i *Asperigallus niger* (Rasoul i sar., 2012). Za neka etarska ulja koja kao glavnu

komponentu sadrže limonen, kao što su etarska ulja lista i stabla *Chloroxylon swietenia* D.C., pokazana je *in vitro* jaka antimikrobna aktivnost prema četiri bakterijska i četiri soja gljiva agar difuzionim i mikrodilucionim testom (Kiran i sar., 2008). Limonen se smatra aktivnim sastojkom ekstrakata vrsta roda *Citrus*, jer zajedno sa bioflavonoidima doprinosi njihovom jakom antimikrobnom efektu. Da bi se ispitala potencijalna upotreba limonena kao konzervansa u prehrambenoj industriji, testirana je *in vitro* antifungalna aktivnost na *Saccharomyces bayanus*, koja dovodi do fermentativnog kvarenja soka jabuke. Izolovan limonen, kao i “biocitro“ ekstrakt pripremljen od vrsta roda *Citrus* koji sadrži limonen, dovode do značajnog smanjenja brojnost kolonije *S. bayanus* ispod detekcionog limita u toku šest dana (Bevilacqua i sar., 2012).

Etarska ulja podzemnih organa vrsta *L. zernyi* i *L. ochridanum* pokazala su antimikrobnu aktivnost prema Gram(+) bakterijskim sojevima *S. aureus*, *S. epidermidis* i *M. luteus*. Ova etarska ulja imaju, pored visokog sadržaja α -pinena, i relativno visok sadržaj α -bisabolola (30,9% i 10,3% u etarskom ulju podzemnih organa *L. zernyi* i *L. ochridanum*, redom), koji je čest sastojak kozmetičkih preparata zbog svojih antiiritantnih, antiinflamatornih i antibakterijskih svojstava (Kamatou i Viljoen, 2010). Van Zyl i saradnici (2006) su bujon mikrodilucionim testom utvrdili da α -bisabolol ima relativno nisku aktivnost prema *S. aureus*, *Bacillus cereus* i *E. coli*, i značajnu antifungalnu aktivnost (MIK=36 mM) prema *C. albicans*. Etarsko ulje lista *Salvia rucinata* L. (sa oko 60% α -bisabolola) ispoljilo je *in vitro* antibakterijsku aktivnost prema sojevima *S. aureus*, *S. epidermidis*, *B. cereus* i *B. subtilis* (MIK=1,6–3,1 mg/ml) (Kamatou i sar., 2005).

Ispoljene aktivnosti etarskih ulja podzemnih organa *L. latifolium*, kao i aktivnosti etarskih ulja cvasti i herbe *L. zernyi* prema svim testiranim sojevima bile relativno slabe (MIK>100 μ g/ml).

Rezultati testiranja antifungalne aktivnosti prema dva soja kandidate pokazuju da su najjači efekat ispoljila etarska ulja podzemnih organa i herbe *L. ochridanum* prema soju *C. albicans* ATCC 24433 (MIK=27,7 i 63,0 μ g/ml, redom) i etarsko ulje ploda *L. ochridanum* prema soju *C. albicans* ATCC 10259 (MIK=52,1 μ g/ml). Antifungalno dejstvo svih ostalih ispitivanih etarskih ulja bilo je slabo (MIK>100 μ g/ml).

U prethodnim istraživanjima α -pinen je pokazao izuzetno jak antifungalni efekat (MIK=5-8 μ g/ml) na osam gljivičnih sojeva (Stojković i sar., 2011). Za

α -bisabolol, prisutan u višem procentu u etarskim uljima podzemnih organa *L. zernyi* i *L. ochridanum*, utvrđeno je da inhibira rast micelijuma gljive *Botrytis cinerea* čak pri koncentraciji 50 ppm (Nuñez i sar., 2007). Ranije potvrđeni antifungalni efekti α -pinena i α -bisabolola ukazuju na njihov mogući doprinos ispoljenom antifungalnom efektu ispitivanih etarskih ulja vrsta roda *Laserpitium*.

Generalno se može zaključiti da su najsnažniji efekat ispoljila etarska ulja plodova *L. latifolium* i *L. ochridanum* i etarska ulja podzemnih organa *L. ochridanum* i *L. zernyi* prema Gram(+) bakterijama *S. aureus*, *S. epidermidis* i *M. luteus*, kao i etarsko ulje herbe *L. ochridanum* prema bakteriji *S. aureus*. Etarska ulja podzemnih organa, herbe i ploda *L. ochridanum* inhibirala su rast po jednog soja *C. albicans*. Ispoljena antimikrobna aktivnost etarskih ulja se može objasniti prisustvom komponenata za koje je ranije utvrđeno da ispoljavaju antibakterijsko dejstvo kao što su α -pinen, detektovan u znatnoj količini u etarskim uljima ploda *L. latifolium* i podzemnih organa *L. ochridanum* i *L. zernyi*, limonen, koji je dominantan sastojak etarskog ulja ploda *L. ochridanum*, kao i α -bisabolol u etarskim uljima podzemnih organa *L. zernyi* i *L. ochridanum*.

1.2. Agar difuzioni test

Antimikrobna aktivnost etarskih ulja cvasti i herbe *L. zernyi* ispitivana je i agar difuzionim testom, a rezultati su dati u Tabeli 46. Prečnici zona inhibicije za referentne antibiotike (ampicilin i amikacin) i antimikotik nistatin, dati su takođe u Tabeli 46. Etarska ulja su primenjena u koncentraciji 225 μ g po disku.

Dobijeni rezultati, odnosno relativno mali prečnici zona inhibicije ukazuju na nisku antimikrobnu aktivnost etarskih ulja cvasti i herbe *L. zernyi*, što je u skladu sa rezultatima bujom mikrodilucionog testa, u kome su oba ulja ispoljila relativno nizak efekat prema svim mikroorganizmima.

Tabela 46. Antimikrobna aktivnost etarskih ulja cvasti i herbe *L. zernyi* ispitivana agar difuzionim testom. Prečnici zona inhibicije izraženi su u milimetrima.

Mikroorganizam	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	<i>M. luteus</i> ATCC 9341	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>K. pneumoniae</i> NCIMB 9111	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>C. albicans</i> ATCC 10259
Etarsko ulje	Zona inhibicije (mm)						
<i>L. zernyi</i> - cvast 225 µg/disk	12,0±2,0	19,2±1,7	18,2±2,5	13,7±3,4	18,0±2,4	17,7±0,9	17,5±1,5
<i>L. zernyi</i> - herba 225 µg/disk	13,7±3,5	15,5±2,5	20,5±4,1	13,2±0,9	15,0±3,5	20,7±1,5	18,5±1,5
Ampicilin 10 µg/disk	27,0±0,5	n. t.	n. t.	n. t.	12,0±0,0	18,0±0,0	n. t.
Amikacin 30 µg/disk	26,0±0,0	n. t.	n. t.	26,5±0,5	23,0±0,0	24,0±0,0	n. t.
Nistatin 100 IU/disk	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.	20,8±0,8

n. t. – nije testirano

2. Antinociceptivna aktivnost etarskih ulja podzemnih organa

L. zernyi i *L. ochridanum*

Etarska ulja podzemnih organa *L. ochridanum* i *L. zernyi* ispitivana su u pogledu antinociceptivnog dejstva u modelu inflamatornog bola u pacova.

Etarska ulja *L. ochridanum* i *L. zernyi*, primenjena u dozama 25 - 100 mg/kg (*p.o.*), dozno-zavisno i statistički značajno smanjuju razliku u pritiscima između zdrave šape i šape sa hiperalgezijom izazvanom *i.pl.* injekcijom karagenina, df (g) ($p < 0,01$, 120-360 min nakon primene etarskog ulja *L. zernyi* i $p < 0,05$ u dozi 25 mg/kg 120 min nakon primene etarskog ulja *L. ochridanum* i $p < 0,01$, u svim dozama i ostalim vremenskim tačkama intervala 120-360 min nakon primene etarskog ulja *L. ochridanum*, jednosmerna ANOVA) u testu pritiska na šapu pacova (Slika 53, veliki grafikon).

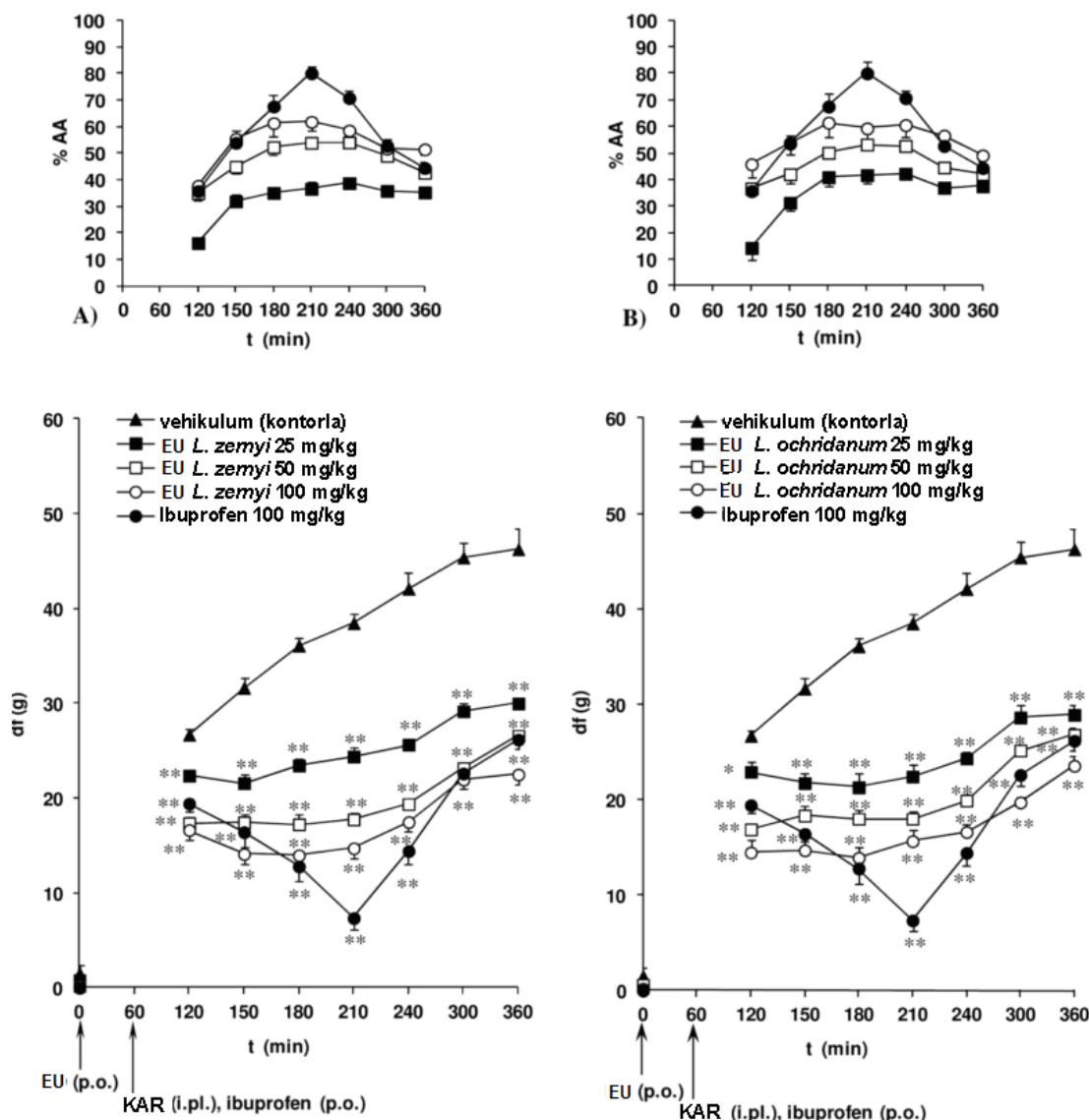
Antinociceptivni efekat etarskog ulja podzemnih organa *L. zernyi* dostiže svoj maksimum u intervalu 210–240 min nakon primene. Vrednosti ispoljenog antinociceptivnog dejstva su 38,6, 53,9 i 61,7% u dozama 25, 50 i 100 mg/kg, redom (mali grafikon A na Slici 53). Srednja efektivna doza ($ED_{50} \pm SEM$, sa 95%-nim intervalom poverenja) etarskog ulja podzemnih organa *L. zernyi* pri maksimalnom efektu je $45,9 \pm 4,9$ (11,7–179,8) mg/kg. Maximum antinociceptivnog dejstva etarskog ulja

podzemnih organa *L. ochridanum* dostignut je u intervalu 180–240 min posle primene. Odgovarajuće vrednosti maksimuma ovog efekta bile su 42,2, 53,2 i 61,4% za doze 25, 50 i 100 mg/kg, redom (mali grafikon B na Slici 53). Srednja efektivna doza ($ED_{50} \pm SEM$, sa 95%-nim intervalom poverenja) etarskog ulja podzemnih organa *L. ochridanum* pri maksimalnom efektu je $42,4 \pm 2,1$ (22,7–79,1) mg/kg. Ibuprofen, NSAID lek u dozi 100 mg/kg *p.o.*, korišćen je radi poređenja. Maksimum antinociceptivnog dejstva ibuprofena iznosio je 82,3% u 210. min nakon primene.

U ovom ispitivanju pokazano je da etarska ulja podzemnih organa vrsta *L. zernyi* i *L. ochridanum* ispoljavaju dozno-zavisno i statistički značajno antinociceptivno dejstvo, koje je uporedivo sa efektom ibuprofena, referentnog NSAID, u modelu inflamatorne hiperalgezije u pacova.

Od komponenata ispitivanih etarskih ulja, do sada su jedino α -pinen i ($-$)- α -bisabolol testirani u pogledu antinociceptivnog dejstva. α -Pinen (500 mg/kg, *p.o.*) je ispitivan u testu *p*-benzohinonom izazvanih abdominalnih kontrakcija u miša, modelu akutne nocicepcije sa zapaljenskom komponentom, pri čemu je pokazan neznatan antinociceptivni efekat ovog jedinjenja (Orhan i sar., 2006). Rocha i sar. (2011) su pokazali da ($-$)- α -bisabolol u dozama 25–200 mg/kg, *p.o.*, statistički značajno smanjuje mehaničku, inflamatornu hiperalgeziiju šape miša, izazvanu karageninom, kao i da smanjuje manifestacije bola (nocicepcije) u testu abdominalnih kontrakcija izazvanih sirćetnom kiselinom u miša, kao i u drugoj, inflamatornoj fazi formalinskog testa na šapi miša.

U skladu sa literaturnim podacima, antinociceptivno dejstvo etarskih ulja podzemnih organa *L. zernyi* i *L. ochridanum*, je najverovatnije povezano sa relativno visokim sadržajem α -bisabolola u oba ispitivana ulja (30,9% i 10,3%, redom). Zna se da različiti proinflamatorni medijatori učestvuju u nocicepciji, odnosno bolnoj senzaciji koja se javlja nakon injekcije karagenina: histamin, 5-hidroksitriptamin, bradikinin, prostaglandini (PGs) i drugi (Moris, 2003). Ranije je pokazano da ($-$)- α -bisabolol inhibira ciklooksigenazu (COX), enzim koji je uključen u sintezu prostaglandina (PGs) (Ammon i sar., 1996; Kim i sar., 2011). Takođe je pokazano da ($-$)- α -bisabolol smanjuje ekscitabilnost *n. ischiadicus-a* u miša, najverovatnije ireverzibilnom blokadom voltažno-zavisnih natrijumovih kanala (Alves i sar., 2010). Smanjenje bolne preosetljivosti koje su izazvala oba testirana ulja, najverovatnije se može, u izvesnoj meri povezati sa smanjenom ekscitabilnošću neurona i inhibicijom sinteze prostaglandina, efektima koje ispoljava ($-$)- α -bisabolol.



Slika 53. Vremenski tok antinociceptivnih dejstava etarskih ulja podzemnih organa *L. zernyi* (A) i *L. ochridanum* (B), nakon peroralne primene u pacova, izraženih kao razlika u pritiscima (df) oslanjanja na zdravu šapu i šapu sa hiperalgezijom (izraženu u gramima, veliki grafikon), odnosno kao procenat antinociceptivne aktivnosti (%AA) (mali grafikon). Na velikom grafikonu bazalna razlika u pritiscima prikazana je na y-osi, a merena je neposredno pre primene leka. Etarska ulja su davana 60 min pre, a ibuprofen neposredno pre izazivanja inflamacije (označeno strelicom). Svaka tačka predstavlja aritmetičku sredinu \pm SEM u razlici u pritiscima (df) (veliki grafikon) ili %AA (mali grafikon) dobijenu testiranjem 5 životinja. Statistička značajnost ($*p < 0,05$, $**p < 0,01$; jednosmerna ANOVA i dalje korišćenje Tukey's HSD testa) je određivana u odnosu na kontrolnu grupu (vehikulum). EU - etarsko ulje; KAR - karagenin, *i.pl.* - intraplantarno, *p.o.* - *per os*. Napomena: simboli na malom grafikonu odgovaraju legendi prikazanoj na velikom grafikonu.

3. Antiedematozna aktivnost etarskih ulja podzemnih organa *L. ochridanum* i *L. zernyi*

Etarska ulja podzemnih organa *L. ochridanum* i *L. zernyi*, primenjena u dozama 25–100 mg/kg (*p.o.*), dozno-zavisno i statistički značajno smanjuju edem šape izazvan *i.pl.* injekcijom karagenina u odnosu na kontrolu (zapreminu zdrave šape) u testu merenja edema pletizmometrom (Slika 54, A i B) ($p < 0,01$, 120-360 min nakon primene etarskog ulja *L. zernyi* u dozama 50 i 100 mg/kg, i u dozi 25 mg/kg u intervalu 240 – 360 min; $p < 0,01$ u svim tačkama vremenskog intervala pri primeni etarskog ulja *L. ochridanum* u dozi 100 mg/kg, i u intervalu 180 – 360 min za doze 25 i 50 mg/kg, i $p < 0,05$ u intervalu 120 – 150 min za doze 25 i 50 mg/kg, jednosmerna ANOVA).

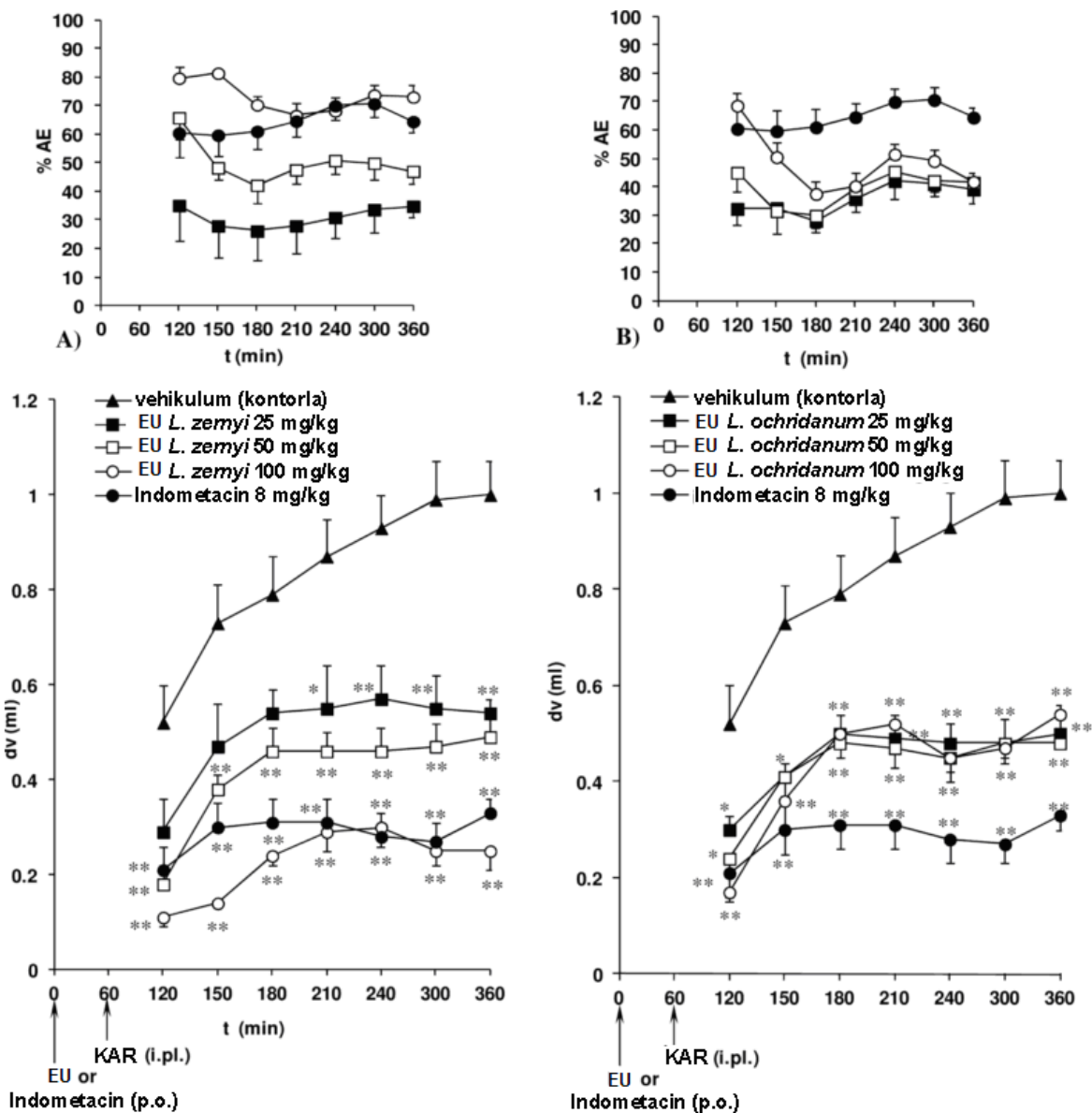
Antiedematozni efekat etarskog ulja podzemnih organa *L. zernyi* bio je najveći 120 - 150 min nakon primene, posle čega je usledio pad aktivnosti koji je održavan do 360. min. Efekat ulja *L. zernyi* u 120. min nakon primene iznosio je 35,0, 65,7 i 81,3% u dozama od 25, 50 i 100 mg/kg (mali grafikoni A na Slici 54). Srednja efektivna doza ($ED_{50} \pm SEM$, sa 95%-nim intervalom poverenja) pri maksimalnom efektu je $36,3 \pm 4,5$ (6,0-220,7) mg/kg.

Antiedematozni efekat etarskog ulja podzemnih organa *L. ochridanum* bio je najveći nakon 120–240 min od primene ulja, i iznosio je 42,1, 45,3 i 68,6% za doze 25, 50 i 100 mg/kg, redom (mali grafikoni B na slici Slici 54). Odgovarajuća srednja efektivna doza ($ED_{50} \pm SEM$, sa 95%-nim intervalom poverenja) pri maksimalnom efektu je $45,1 \pm 11,3$ (1,9-1085,6) mg/kg.

Maksimalni efekat indometacina, referentnog antiinflamatornog leka u dozi 8 mg/kg, *p.o.* iznosio je 70,6% antiedematozne aktivnosti u 300. min nakon primene.

U ovom ispitivanju pokazano je da etarska ulja podzemnih organa vrsta *L. zernyi* i *L. ochridanum* ispoljavaju dozno- i vremenski-zavisno i statistički značajno smanjenje inafamacijom izazvanog edema, koje je uporedivo sa efektom indometacina. Etarska ulja, pored prethodno pokazanog antinociceptivnog dejstva u modelu inflamatorne hiperalgezije, ispoljavaju i antiedematoznu aktivnost, smanjujući otok koji je još jedna karakteristika inflamatorne reakcije. U prethodnim istraživanjima je pokazano da (-)- α -bisabolol i hamazulen, primenjeni u dozama 350 – 1400 mg/kg *p.o.* pokazuju antiedematozno dejstvo u modelu lokalizovane inflamacije u pacova

(Jakovlev i sar., 1983). Orhan i saradnici (2006) su pokazali da α -pinen (500 mg/kg, *p.o.*) ispoljava umerenu antiedematoznu aktivnost u karageninom izazvanoj inflamaciji šape u miša. Doze etarskih ulja podzemnih organa *L. zernyi* i *L. ochridanum* koje su efikasne u gore navedenom eksperimentu, su značajno niže (između 25 i 100 mg/kg, *p.o.*) nego doze (-)- α -bisabolola, hamazulena i α -pinena koje su korišćene u eksperimentima Jakovleva i sar. (1983) i Orhana i sar. (2006). Pokazani antiedematozni efekat testiranih etarskih ulja je najverovatnije posledica dejstva minimalnih efektivnih doza (-)- α -bisabolola i α -pinena u oba etarska ulja, kao i hamazulena u etarskom ulju podzemnih organa vrste *L. ochridanum*, ili moguće sinergističke interakcije između aktivnih sastojaka u etarskim uljima. Poznato je, da kada je u dejstvo smeše uključen sinergistički efekat aktivnih komponenata, da su efektivne doze pojedinačnih aktivnih komponenata u smeši značajno niže. Nastanak edema nakon injekcije karagenina je posledica dejstva medijatora, kao što su histamin, 5-hidroksitriptamin, bradikinin, prostaglandini i druge porinflamatorne supstance (Morris, 2003). Leukotrijeni (LT) su takođe uključeni u ovaj proces, pošto je pokazano da inhibitori 5-lipooksigenaze (5-LOX), enzima koji je uključen u njihovu sintezu, redukuju karageninom izazvan edem (Thabrew i sar., 2003; Singh i sar., 2008). *In vitro* eksperimentima pokazano je da su (-)- α -bisabolol i hamazulen 5-LOX inhibitori (Ammon i sar., 1996). Zbog ovoga, antiedematozni efekat ispitivanih ulja podzemnih organa *L. zernyi* i *L. ochridanum* može biti povezan sa smanjenom produkcijom leukotrijena. Dodatni mehanizam bi mogao biti u vezi sa smanjenom produkcijom prostaglandina (PG) usled inhibicije COX enzima izazvane (-)- α -bisabololom (Ammon i sar., 1996; Kim i sar., 2011), što je takođe moguće objašnjenje ispoljene antiedematozne aktivnosti oba testirana ulja.



Slika 54. Vremenski tok antiedematoznih dejstava etarskih ulja podzemnih organa *L. zernyi* (A) i *L. ochridanum* (B), nakon peroralne primene u pacova, izraženih kao razlika u zapreminama u ml (dv) između inflamirane desne šape i zdrave desne šape, odnosno zapremine posle i pre izazivanja inflamacije (veliki grafikon), odnosno kao procenat antiedematozne aktivnosti (%AE) (mali grafikon). Bazalna zapremina, odnosno zapremina šape pre primene etarskog ulja/indometacina i izazivanja inflamacije karageninom (označeno strelicama). Etarska ulja/indometacin su davani 60 min pre izazivanja inflamacije (označeno strelicom). Svaka tačka predstavlja aritmetičku sredinu ± SEM razlike u zapreminama (dv) (veliki grafikon) ili %AE (mali grafikon) dobijenu testiranjem na 6-7 životinja. Statistička značajnost (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; jednosmerna ANOVA i dalje korišćenje Tukey's HSD testa) je određivana u odnosu na kontrolnu grupu (vehikulum). Skraćenice: EU - etarsko ulje; KAR - karagenin, *i.pl.* - intraplantarno, *p.o.* - *per os*. Napomena: simboli na malom grafikonu odgovaraju legendi prikazanoj na velikom grafikonu.

4. Citotoksična aktivnosti hloroformskih ekstrakata *L. latifolium*, *L. zernyi* i *L. ochridanum* i izolovanih jedinjenja

Karcinom je jedan od vodećih uzroka rane smrti u razvijenim zemljama, a u osnovi je skup poremećaja koji uključuju nekontrolisanu deobu i metastaziranje abnormalnih ćelijskih formi u čovečijem organizmu (Saklani i Kutty, 2008). Rezistencija malignih ćelija je veliki problem u hemioterapiji karcinoma, naročito učestalih tipova kao što je humani adenokarcinom dojke, što povećava naučni interes za iznalaženje novih citostatika. Jedinjenja izolovana iz biljaka imaju važnu ulogu u otkrivanju i razvoju novih hemioterapijskih agenasa, jer su biljke izvori velikog broja jedinjenja različite hemijske strukture i mehanizama citotoksičnih i antitumorskih dejstava. Terpenoidi, kako je ranije pomenuto, su moćni citotoksični agensi, koji svoju aktivnost ispoljavaju kroz interakciju sa nekoliko regulatornih proteina i inhibicijom NF- κ B signalizacije, koji se smatraju ključnim činiocima u patogenezi poremećaja kao što su inflamacija i karcinom (Wu i sar., 2012; Newman i Cregg, 2012; Salminen i sar., 2008).

Humani adenokarcinom dojke je najučestaliji tip karcinoma u ženskoj populaciji širom sveta, za koji je često vezana "multidrug" rezistencija, što dalje rezultuje većim morbiditetom i troškovima lečenja (Wu i sar., 2012). U okviru ove doktorske disertacije za ispitivanje citotoksične aktivnosti ekstrakata i izolovanih jedinjenja korišćene su dve ćelijske linije humanog karcinoma dojke MCF 7/6 i MCF 7/AZ, invazivni i neinvazivni tip, redom. Ispitivanja su sprovedena *in vitro* korišćenjem: MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid) testa, kojim se može odrediti broj živih, metabolički aktivnih ćelija (Mosmann, 1983), i SRB (sulforhodamin B) testa za određivanje ćelijskog proteinskog sadržaja (Skehan i sar., 1990).

4.1. Citotoksična aktivnost hloroformskih ekstrakata *L. latifolium* i izolovanih jedinjenja

Ispitivana je citotoksična aktivnosti hloroformskog ekstrakata podzemnih organa i herbe *L. latifolium* i izolovanih jedinjenja **1-3**. Hloroformski ekstrakti podzemnih organa i herbe *L. latifolium* testirani su u pet koncentracija u opsegu: 7,5-750 μ g/ml, dok su laserpicin (jedinjenje **1**), acetildezoksodehidrolaserpicin (jedinjenje **2**) i laserin

(jedinjenje 3) testirani u pet koncentracija u opsegu 0,5-100 μM . Vinblastin-sulfat je korišćen kao referentna supstanca (pozitivna kontrola), u pet koncentracija u opsegu 0,1 – 40 nM. Rezultati su izraženi kao IC_{50} vrednosti (koncentracija koje inhibira 50% ćelijskog rasta) i dati su u Tabeli 47. Negativnu kontrolu su predstavljale ćelijske kulture pripremljene na isti način, tretirane samo odgovarajućom zapreminom medijuma, i predstavljaju 100% ćelijskog rasta.

Tabela 47. *In vitro* citotoksična aktivnost hloroformskih ekstrakata podzemnih organa i herbe *L. latifolium*, izolovanih jedinjenja (1-3) i referentne supstance (vinblastin-sulfata). Aktivnost je izražena preko IC_{50} vrednosti.

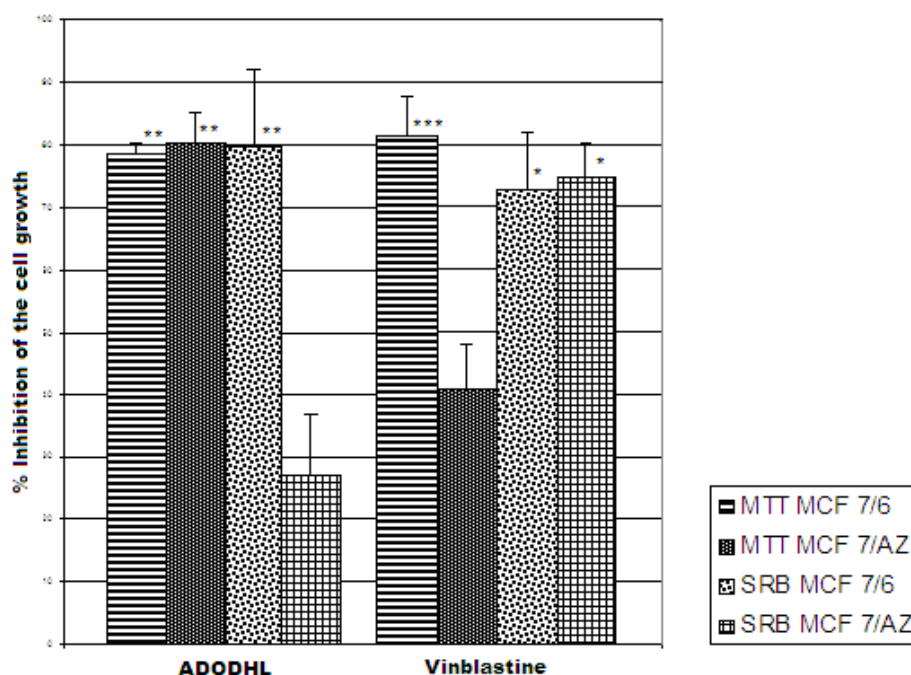
Ispitivani uzorak	MTT test		SRB test	
	MCF 7/6	MCF 7/AZ	MCF 7/6	MCF 7/AZ
Ekstrakt podzemnih organa ^a	184,72	208,94	208,85	397,16
Ekstrakt herbe ^a	253,90	264,79	292,17	277,29
Jedinjenje 1 ^b	31,80	87,13	>100	>100
Jedinjenje 2 ^b	0,60	2,29	0,51	31,87
Jedinjenje 3 ^b	4,57	2,46	62,04	7,36
Vinblastin-sulfat ^b	$5,98 \times 10^{-3}$	$15,41 \times 10^{-3}$	$4,11 \times 10^{-3}$	$3,66 \times 10^{-3}$

^a IC_{50} vrednosti hloroformskih ekstrakata podzemnih organa i herbe *L. latifolium* su date u $\mu\text{g/ml}$;

^b IC_{50} vrednosti za laserpicin (jedinjenje 1), acetildezoksodehidrolaserpicin (jedinjenje 2), laserin (jedinjenje 3) i vinblastin-sulfat (referentno jedinjenje) date su u μM .

Oba ekstrakta *L. latifolium* su pokazala koncentraciono-zavisno citotoksično dejstvo, sa IC_{50} vrednostima u opsegu od 184,72–397,16 $\mu\text{g/ml}$ za hloroformski ekstrakt podzemnih organa, odnosno od 253,90–292,17 $\mu\text{g/ml}$ za hloroformski ekstrakt herbe. Citotoksična aktivnost ekstrakta podzemnih organa je bila nešto izraženija u odnosu na ekstrakt herbe, osim u SRB testu na ćelijskoj liniji MCF 7/AZ (Tabela 47). Među testiranim jedinjenjima, acetildezoksodehidrolaserpicin (jedinjenje 2) je ispoljilo najveću aktivnost (Tabela 47), naročito na visoko invazivnu MCF 7/6 ćelijsku liniju u oba testa. Odgovarajuće IC_{50} vrednosti su u niskom mikromolarnom opsegu (0,51 i 0,60 μM na MCF 7/6 liniji u SRB i MTT testu, redom i 2,29 μM na MCF 7/AZ liniji u MTT testu), izuzev IC_{50} vrednosti u SRB testu na MCF 7/AZ, gde je ispoljena citotoksična aktivnost bila znatno niža (31,87 μM). Procenat inhibicije ćelijskog rasta izazvan acetildezoksodehidrolaserpicinom (jedinjenje 2) (u koncentraciji 5 μM) i vinblastin-

sulfatom (u koncentraciji 10 nM) su dati na Slici 55. Rezultati su izraženi kao srednja vrednost \pm SD četiri nezavisna ponavljanja.



Slika 55. Procenat inhibicije ćelijskog rasta dve linije humanog adenokarcinoma dojke MCF 7/6 i MCF 7/AZ u MTT i SRB testu, u poređenju sa negativnim kontrolama (100% ćelijskog rasta) posle primene 5 μ M acetildezoksodehidrolaserpicina (ADODHL) i 10 nM vinblastin-sulfata kao referentnog jedinjenja. Rezultati su izraženi kao srednje vrednosti \pm SD četiri nezavisna ponavljanja. Statistički značajna razlika u inhibiciji ćelijskog rasta određivana je u poređenju sa kontrolnim grupama za nivoe značajnosti * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

U hloroformskim ekstraktima podzemnih organa i herbe *L. latifolium* utvrđeno je prisustvo dva terpena, tačnije dva daukanska estera: laserpicina (jedinjenje 1) i acetildezoksodehidrolaserpicina (jedinjenje 2), kao i fenilpropana laserina (jedinjenje 3). Daukanski derivati su, kao što je već pomenuto, mala grupa sekundarnih metabolita koja ispoljava različite biološke efekte (Ghisalberti, 1994). Ranija istraživanja su pokazala da neki daukani pojedinih vrsta roda *Ferula*, bar delom, doprinose njihovoj citotoksičnoj aktivnosti (Dall'Acqua i sar., 2011; Jabrane i sar., 2010; Alkhatib i sar., 2008). Eleohitrin A, 6-antraniloil daukanski ester izolovan iz *F. elaeochytris* Korovin je pokazao visoku aktivnost u MTT testu na dve rezistentne ćelijske linije humane (K562R) i mišje (DA1-3b/M2^{BCR-ABL}) leukemije (Alkhatib i sar., 2008), a preračunate IC₅₀ vrednosti su bile 12,4 i 7,8 μ M, redom. U panel istraživanju citotoksičnosti 16 daukanskih estara izolovanih iz dve vrste roda *Ferula* i jedne vrste roda *Ferulago*, na

sedam ćelijskih linija humanih karcinoma, 14 jedinjenja je ispoljilo citotoksićni efekat na bar jednu ćelijsku liniju (Dall'Acqua i sar., 2011). Palinin, 6 α ,10 α -diangeloil daukanski estar, bio je najaktivniji sa ispoljenim IC₅₀ vrednostima u niŹem mikromolarnom opsegu na Źest ćelijskih linija (Dall'Acqua i sar., 2011). Pokazano je da β orijentacija estarske grupe na poloŹaju C-2 znaćajno povećava citotoksićnu aktivnost. Takođe, prisustvo α,β -nezasićenog ketona ("en-ona") u boćnim lancima u strukturi seskviterpena i seskviterpenskih laktona povećava citotoksićnost prema razlićitim tumorskim ćelijskim linijama (Ghantous i sar., 2010). Acetildezoksodehidrolaserpicin (jedinjenje **2**) je triestar, sa dve "en-onske" angeloiloksi grupe u strukturi, od kojih je jedna β orijentisana na poloŹaju C-2, Źto predstavlja nekoliko strukturnih faktora koji doprinose ispoljenoj visokoj citotoksićnoj aktivnosti ovog jedinjenja prema ćelijskim linijama humanog adenokarcinoma. Laserpicin (jedinjenje **1**) nema strukturne elemente koji doprinose citotoksićnom dejstvu, i ispoljio je znatno niŹu citotoksićnu aktivnost u oba testa na obe ćelijske linije (Tabela 47)

Laserin (jedinjenje **3**) je ispoljio znatan koncentraciono-zavisani citotoksićan efekat u oba testa na obe ćelijske linije, a efikasniji je bio u MTT testu (IC₅₀ vrednosti su 4,57 i 2,46 μ M na MCF 7/6 i MCF 7/AZ, redom). Ovaj fenilpropanoid je gorki princip izolovan iz Źargarepe, *Daucus carota*. Laserin, a naroćito njegov *eritro* izomer 2-epilaserin su ispoljili citotoksićnu aktivnost prema HL-60 ćelijama akutne humane promijelocitićne leukemije (Yang i sar., 2008).

Jaće citotoksićno dejstvo hloroformskog ekstrakta podzemnih organa u odnosu na ekstrakt herbe *L. latifolium* moglo bi se objasniti većim sadrŹajem acetildezoksodehidrolaserpicina i laserina (jedinjenja **2** i **3**), za koje je pokazano da ispoljavaju relativno visoko citotoksićno dejstvo na obe ćelijske linije u oba kolorimetrijska testa.

4.2. Citotoksićna aktivnost hloroformskih ekstrakata *L. zernyi* i *L. ochridanum* i izolovanih jedinjenja

Seskviterpenski laktoni su sekundarni metaboliti biljaka sa Źirokim spektrom farmakoloŹkih aktivnosti, kao Źto su antiinflamatorna, antitumorska, citotoksićna, antibakterijska, antihelmintićna, antimalarijska, neurotoksićna i alergena (Merfort, 2011). Neki od seskviterpenskih laktona kao Źto su artemizinin, tapsigargin i dimetilaminopartenolid su jedinjenja koja se nalaze u razlićitim fazama klinićkih studija

kao potencijalni hemioterapeutici u terapiji različitih karcinoma (Ghantous i sar., 2010). Ispoljena dejstva pojedinih seskviterpenskih laktona utiču na veliki naučni interes u oblasti ispitivanja seskviterpenskih laktona u pogledu citotoksičnog dejstva.

U hloroformskim ekstraktima *L. ochridanum* i *L. zernyi* upravo su seskviterpenski laktone glavni sastojci. Iz tog razloga su hloroformski ekstrakti podzemnih organa i herbi ovih vrsta, kao i izolovani seskviterpenski laktone testirani u pogledu citotoksičnog dejstva na dve ćelijske linije humanog adenokarcinoma dojke MCF 7/6 i MCF 7/AZ, invazivnog i neinvazivnog tipa, redom. Citotoksična aktivnost je ispitivana nakon inkubacije ekstrakta/jedinjenja ili vinblastin-sulfata (kao referentnog jedinjenja) u toku 48 h. Ekstrakti su testirani u pet koncentracija u opsegu 8-800 µg/ml, a seskviterpenski laktone u pet koncentracija u opsegu 0,5-100 µM. Vinblastin-sulfat testiran je u pet koncentracija u opsegu 0,1-40 nM. Citotoksična aktivnost je testirana korišćenjem kolorimetrijskih testova: MTT, kojim se određuje broj živih, metabolički aktivnih ćelija (Mosmann, 1983) i SRB, kojim se kvantifikuje ćelijski proteinski sadržaj (Skehan i sar., 1990). Citotoksična aktivnost hloroformskih ekstrakata podzemnih organa i herbi vrsta *L. ochridanum* i *L. zernyi* izražena je preko IC₅₀ vrednosti (koncentracija ekstrakta koja izaziva inhibiciju 50% ćelijskog rasta) i prikazana je u Tabeli 48. Kontrolne grupe (negativna kontrola) su inkubirane u odgovarajućoj količini medijuma i predstavljaju 100% rast ćelija.

Svi ekstrakti su ispoljili koncentraciono-zavisan citotoksičan efekat na obe ćelijske linije. Uočljivo je da je efekat ekstrakata podzemnih organa obe vrste bio jači u odnosu na efekte koje su ispoljili hloroformski ekstrakti herbi, izuzev efekta ekstrakta podzemnih organa *L. ochridanum* u SRB testu na ćelijsku liniju MCF 7/6, koji je bio nešto niži. Ova razlika se može objasniti višim koncentracijama seskviterpenskih laktone u ekstraktima podzemnih organa. Sa druge strane, aktivnost ekstrakta podzemnih organa *L. ochridanum* je bila izraženija u odnosu na ekstrakt podzemnih organa *L. zernyi*, naročito u MTT testu, gde su odgovarajuće IC₅₀ vrednosti bile 66,09 i 65,21 µg/ml na ćelijskim linijama MCF 7/6 i MCF 7/AZ, redom. Jača citotoksična aktivnost ekstrakta podzemnih organa *L. ochridanum* može biti povezana sa prisustvom visoko hidrosilovanih i esterifikovanih gvajanolida.

Tabela 48. *In vitro* citotoksična aktivnost hloroformskih ekstrakata podzemnih organa i herbi *L. zernyi* i *L. ochridanum* na MCF 7/6 i MCF 7/AZ ćelijskim linijama u MTT i SRB testu, izražena preko IC₅₀ vrednosti (µg/ml).

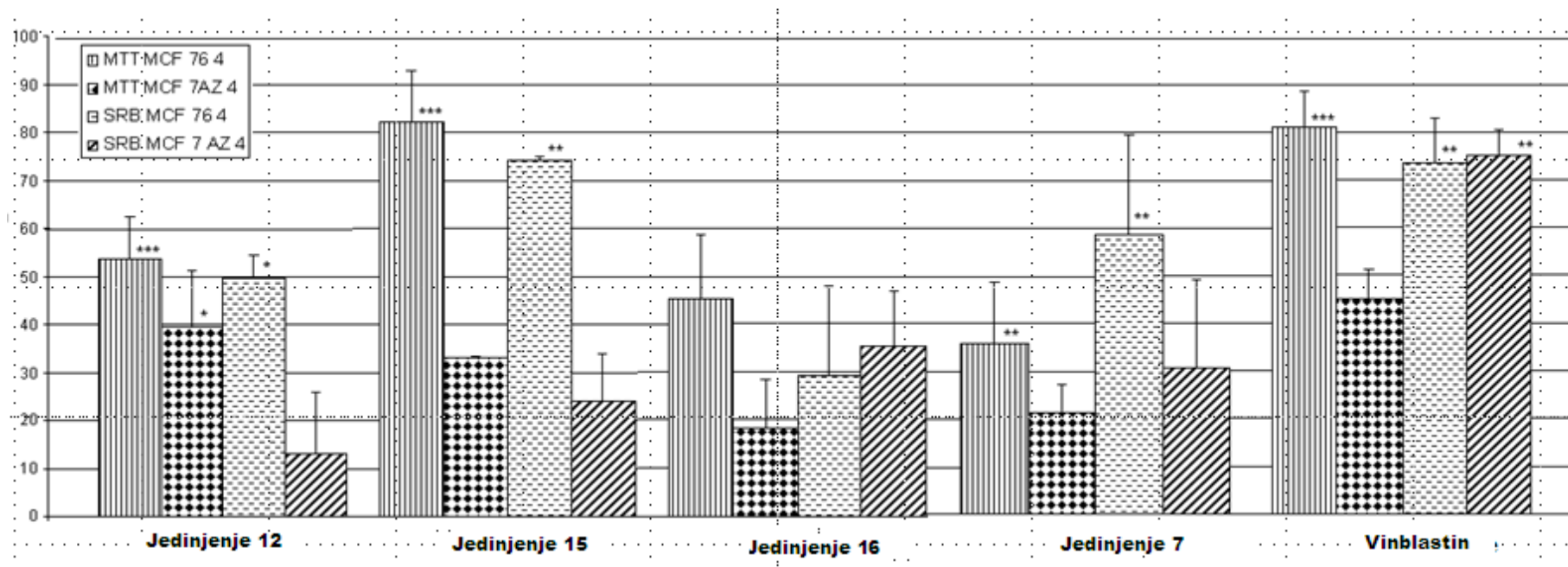
Ekstrakt	MTT test		SRB test	
	MCF 7/6	MCF 7/AZ	MCF 7/6	MCF 7/AZ
Podzemni organi <i>L. zernyi</i>	126,86	95,95	295,06	106,56
Herba <i>L. zernyi</i>	260,76	272,41	329,47	338,15
Podzemni organi <i>L. ochridanum</i>	66,09	65,21	348,25	224,82
Herba <i>L. ochridanum</i>	217,54	277,49	300,79	298,38

Svi seskviterpenski laktoni (jedinjenja **5-18**) su testirani u pogledu citotoksične aktivnosti u MTT i SRB testu. U Tabeli 49 date su IC₅₀ vrednosti za jedinjenja **5-18**.

Tabela 49. *In vitro* citotoksična aktivnost seskviterpenskih laktona izolovanih iz hloroformskih ekstrakata *L. ochridanum* i *L. zernyi* na MCF 7/6 i MCF 7/AZ ćelijskim linijama u MTT i SRB testu izražena kao IC₅₀ vrednost (µM). Vinblastin-sulfat je korišćen kao referentno jedinjenje (pozitivna kontrola).

Jedinjenje	MTT		SRB	
	MCF 7/6	MCF 7/AZ	MCF 7/6	MCF 7/AZ
5	>100	>100	>100	>100
6	97,54	88,95	>100	49,21
7	9,38	33,22	2,70	7,75
8	>100	>100	>100	>100
9	>100	>100	>100	>100
10	>100	>100	>100	>100
11	>100	>100	>100	>100
12	4,32	5,63	5,05	21,24
13	9,03	8,23	>100	>100
14	9,06	57,24	61,41	34,76
15	0,72	5,67	0,71	38,00
16	6,35	16,75	8,35	33,40
17	>100	>100	>100	>100
18	>100	>100	>100	>100
Vinblastin-sulfat	3,96×10 ⁻³	15,41×10 ⁻³	3,05×10 ⁻³	3,16×10 ⁻³

Jedinjenje **15**, odnosno 2 β ,8 α -diangeloiloksi-6 α H-gvajjan-3,(7-11)-dien-12,6-olid, koje ima dvostruku vezu u laktonskom prstenu ispoljilo je najjaču citotoksičnu aktivnost od svih testiranih laktona, sa IC₅₀ vrednostima od 0,72 μ M i 0,71 μ M na invazivnu MCF 7/6 ćelijsku liniju u MTT i SRB testu, redom. Takođe, ovo jedinjenje je imalo relativno nisku IC₅₀ vrednost na MCF 7/AZ ćelijskoj liniji u MTT testu (5,67 μ M). Jedinjenje **12**, odnosno 8 α -acetoksi-2 β ,10 β -diangeloiloksi-6 α H, 7 α H-gvajjan-3-en-12,6-olid takođe je ispoljilo znatan citotoksični efekat na obe ćelijske linije, sa IC₅₀ vrednostima u MTT testu 4,32 μ M i 5,63 μ M na linije MCF 7/6 i MCF 7/AZ, redom, i takođe visok efekat na MCF 7/6 ćelijsku liniju u SRB testu (IC₅₀ 5,05 μ M). I jedinjenje **16**, odnosno 8 α -acetoksi-2 β ,11 α -diangeloiloksi-10 β -hidroksi-6 α H,7 α H-gvajjan-3-en-12,6-olid ispoljilo je visok citotoksični efekat na invazivnu ćelijsku liniju MCF 7/6, sa IC₅₀ vrednostima 6,35 μ M i 8,35 μ M u MTT i SRB testu, redom. Slovanolidi koji u strukturi nemaju estar na položaju C-2, kao što je tarolid (jedinjenje **5**), nisu dostigli 50% inhibicije ćelijskog rasta čak ni u najvećoj primenjenoj koncentraciji od 100 μ M. Ovi rezultati su u skladu sa prethodno objavljenim nalazima da laktoni sa α,β -nezasićenom karbonilnom grupom, bilo u laktonskom prstenu ili estarskom bočnom lancu, kao i laktoni sa većim brojem esterifikacija, imaju jači citotoksični efekat na ćelijske linije karcinoma (Ghantous *et al.*, 2010). Interesantno je da je prethodno izolovan slovanolid acetilmontanolid (jedinjenje **7**) ispoljio jaku aktivnost na obe testirane ćelijske linije u SRB testu, sa IC₅₀ vrednostima od 2,70 μ M i 7,75 μ M na invazivnu i neinvazivnu ćelijsku liniju humanog adenokarcinoma dojke, redom. Gvajjanolidi sa manjim brojem estara u strukturi, kao i eudezmanolidi, nisu dostigli 50% inhibicije ćelijskog rasta čak ni u najvećoj testiranoj koncentraciji (100 μ M). Za najaktivnija jedinjenja ispoljeni citotoksični efekat bio je koncentraciono-zavisan. Na Slici 56, grafički je prikazan procenat inhibicije ćelijskog rasta nakon primene najaktivnijih jedinjenja u koncentraciji 5 μ M. Rezultati su izraženi kao srednja vrednost \pm SD šest nezavisnih ponavljanja.



Slika 56. Procenat inhibicije ćelijskog rasta dve linije humanog adenokarcinoma dojke MCF 7/6 i MCF 7/AZ u MTT i SRB testu, u odnosu na negativne kontrole (ćelije koje su inkubirane u čistom medijumu) posle primene laktona koji su ispoljili najjači citotoksičan efekat u koncentraciji 5 μ M i vinblastin-sulfata (referentnog jedinjenja) u koncentraciji 10 nM. Rezultati su izraženi kao srednja vrednost \pm SD šest nezavisnih ponavljanja. Statistička značajnost inhibicije ćelijskog rasta upoređivana je u odnosu na kontrolne grupe (negativne kontrole) za nivoje značajnosti * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

5. Antioksidantna aktivnost metanolnih ekstrakata cvasti i herbe *L. zernyi*

Biljni polifenoli su brojna grupa sekundarnih metabolita koja predstavlja bogat izvor jedinjenja koja se koriste u terapiji poremećaja kao što su alergijske reakcije, inflamatorna stanja i imunološki poremećaji, a u novije vreme ispituje se njihovo mesto u hemioterapiji karcinoma. Smatra se da polifenolna jedinjenja veći deo farmakoloških efekata ispoljavaju usled jake antioksidantne aktivnosti, ali jednim delom i direktnim vezivanjem za signalne molekule koji su uključeni u zapaljenski proces i karcinogenezu. Na ovaj način, oni su regulatori ćelijske aktivnosti pojedinih ključnih medijatora u različitim patološkim procesima. Generalno, polifenoli mogu da utiču na intracelularne signalne proteine i transkripcione faktore, kao što je NF- κ B. Flavonoidi i fenolkarboksilne kiseline predstavljaju brojnu klasu polifenola (Chirumbolo, 2012; Dos Santos i sar., 2006).

U metanolnim ekstraktima cvasti i herbe (bez cvasti) *L. zernyi* HPLC analizom detektovano je prisustvo polifenolnih jedinjenja: flavona (apigenina, luteolina i njihovih 7-O-glukozida) i hlorogenske kiseline. Zbog toga su ovi ekstrakti testirani u pogledu ukupne antioksidantne aktivnosti i sposobnosti neutralizacije DPPH i \cdot OH radikala, a za poredenje je korišćen kvercetin (Tabela 50).

Tabela 50. Antioksidantna aktivnost metanolnih ekstrakata cvasti i herbe *L. zernyi*

	Antiradikalska aktivnost		Ukupna antioksidantna aktivnost*
	Neutralizacija DPPH radikala (μ g/ml)	Neutralizacija \cdot OH radikala (μ g/ml)	
Ekstrakt cvasti <i>L. zernyi</i>	38,95	10,32	1,55
Ekstrakt herbe <i>L. zernyi</i>	109,54	35,97	0,68
Kvercetin	2,75	3,10	7,69

* – rezultati izraženi u μ mol Fe²⁺/mg ekstrakta/kvercetina

Ukupna antioksidantna aktivnost ekstrakata cvasti *L. zernyi* bila je viša od aktivnosti ekstrakta herbe *L. zernyi*, ali ipak znatno niža od aktivnosti kvercetina. Ovi ekstrakti ispoljili su koncentraciono-zavisnu sposobnost neutralizacije DPPH radikala. Niska vrednost SC₅₀ za ekstrakt cvasti ukazala je na značajnu anti-DPPH aktivnost, ali je ova aktivnost ipak bila manja od

aktivnosti kvercetina. Oba ekstrakta su pokazala visoku sposobnost neutralizacije \cdot OH radikala, pri čemu je ekstrakt cvasti bio nešto efikasniji u odnosu na ekstrakt herbe.

Antioksidantna svojstva flavona apigenina, luteolina i njihovih 7-O-glukozida, kao i hlorogenske kiseline, pokazana su ranije u različitim *in vitro* testovima od strane drugih autora. Za luteolin 7-O-glukozid, najzastupljeniju komponentu u metanolnim ekstraktima cvasti i herbe *L. zernyi* (34,4% i 10,2%, redom), prethodno je pokazano da ispoljava jaku anti-DPPH aktivnost (u koncentraciji 20 μ M inhibira 62,0% DPPH radikala). Ovo jedinjenje je, pored rozmarinske kiseline, pokazalo najjaču antiradikalsku aktivnost među polifenolnim jedinjenjima izolovanim iz butanolne frakcije etanolnog ekstrakta lista žalfije, *Salvia officinalis* L. (Wang i sar., 1998). Süntar i sar. (2013) su iz metanolnog ekstrakta cvasti *Helichrysum graveolens* (Bieb.) Sweet izolovali apigenin kao aktivan princip odgovoran za jaku antioksidantnu aktivnost ovog ekstrakta. Apigenin je, u ovom istraživanju, pokazao jaku aktivnost u testu neutralizacije DPPH radikala (IC_{50} =31,04 μ g/ml). Hlorogenska kiselina, izolovana iz metanolnog ekstrakta ljuske badema *Prunus dulcis* (Mill.) D.A. Webb, pokazala je koncentraciono-zavisnu antioksidantnu aktivnost u testu inhibicije oksidacije metil-linoleata, a antioksidantni efekat ovog jedinjenja u koncentraciji 50 μ g/ml je trajao u toku 4 dana (Takeoka i Dao, 2003)

Jači antioksidantni efekat metanolnog ekstrakta cvasti *L. zernyi* može se objasniti većim sadržajem ukupnih polifenolnih jedinjenja i višim koncentracijama detektovanih flavona i hlorogenske kiseline, u odnosu na ekstrakt herbe *L. zernyi*.

6. Antimikrobna aktivnost metanolnih ekstrakata cvasti i herbe *L. zernyi*

Antimikrobna aktivnost metanolnih ekstrakata cvasti i herbe *L. zernyi* testirana je bujon mikrodilucionim testom prema Gram(+) bakterijama *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *S. epidermidis* ATCC 12228, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, Gram(–) bakterijama: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* NCIMB 9111, *Escherichia coli* ATCC 25922, i dva soja *Candida albicans* (ATCC 10259 i ATCC 24433). Za određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIK), ekstrakti su primenjeni u razblaženjima od 500 do 30 μ g/ml, a rezultati su prikazani u Tabeli 51.

Najveću antimikrobnu aktivnost oba ekstrakta ispoljila su prema *C. albicans*, kao i ekstrakt herbe prema *B. subtilis* (MIK 30 μ g/ml). Aktivnost ekstrakta herbe *L. zernyi* prema svim

ostalim testiranim sojevima bakterija bila je umerena i identična (MIK=62,5 µg/ml). Ekstrakt cvasti pokazao je nešto slabiju aktivnost u odnosu na ekstrakt herbe prema sojevima *M. luteus*, *E. faecalis* i *P. aeruginosa* (MIK=125 µg/ml).

Pojedina polifenolna jedinjenja ispoljavaju antimikrobnu aktivnost, što je potvrđeno različitim *in vitro* i *in vivo* testovima (Chirumbolo, 2012). Smatra se da je ovaj efekat delom posledica antioksidantne aktivnosti, ali i supresivnog delovanja polifenolnih jedinjenja na faktore virulencije mikroorganizama, kao što su inhibicija formiranja biofilma i neutralizacija bakterijskih toksina (Daglia, 2012).

Apigenin, luteolin i njihovi 7-O-glukozidi spadaju u biljne polifenole za koje je antimikrobna aktivnost potvrđena brojnim ispitivanjima (Cushine i Lamb, 2005). U testiranju antimikrobne aktivnosti flavona izolovanih iz herbe *Achillea atrata* L. subsp. *multifida* agar difuzionim testom, apigenin je pokazao znatan efekat prema *B. subtilis*, *E. coli* i *C. albicans* (prečnici zona inhibicije 6 – 10 mm pri primeni apigenina u koncentraciji 1 µg/µl). U bujon mikrodilucionom testu, apigenin je pokazao jaku aktivnost prema *C. albicans*, koja je bila uporediva sa nistatinom, dok je apigenin 7-O-glukozid pokazao umerenu aktivnost prema *B. subtilis* (Aljančić i sar., 1999). Antimikrobna aktivnost hlorogenske kiseline i apigenin 7-O-glukozida, izolovanih iz ekstrakta lista artičoke, *Cynara scolymus* L. (Zhu i sar., 2004), takođe je ispitivana u bujon mikrodilucionom testu. Efekat hlorogenske kiseline bio je najjači prema kvasnicama *Candida albicans* i *C. lusitaniae* (MIK = 50 µg/ml), ali je bio izražen i prema *M. luteus* (MIK = 100 µg/ml). Nešto slabije dejstvo hlorogenska kiselina ispoljila je prema bakterijama *S. aureus*, *B. subtilis* i *P. aeruginosa* (MIK = 200 µg/ml). Apigenin 7-O-glukozid pokazao je jak efekat prema *M. luteus* (MIK = 100 µg/ml) i umeren efekat prema *S. aureus* i *B. subtilis* (MIK = 200 µg/ml), ali nije dovodio do inhibicije rasta ostalih bakterija, kao ni *C. albicans* i *C. lusitaniae* (MIK > 200 µg/ml). Luteolin izolovan iz semena *Senna petersiana* (Bolle) Lock ispoljio je znatan antibakterijski efekat prema tri Gram(+) bakterije, *Bacillus cereus*, *B. pumilus* i *S. aureus* (MIK = 100 µg/ml), dok je efekat prema *B. subtilis* i Gram(-) bakterijama izostao (Tshikalange i sar., 2005). Za apigenin i luteolin, koji su izolovani iz herbe *Scutellaria barbata* D. Don, pokazano je da ispoljavaju aktivnost prema meticilin-rezistentnim i meticilin osetljivim sojevima *S. aureus*, pri čemu je aktivnost apigenina bila nešto izraženija (MIK = 3,9 – 15,6 µg/ml i 62,5 – 125 µg/ml za apigenin i luteolin, redom). Efekti oba flavonola prema *S. epidermidis*, *E. faecalis* i *E. coli* bili su znatno niži (MIK > 250 µg/ml) (Sato i sar., 2000).

U novijem istraživanju, ispitivana je aktivnost hlorogenske kiseline, kao i sva četiri flavona detektovana u metanolnim ekstraktima cvasti i herbe *L. zernyi* prema tri Gram(+) bakterije: *S. aureus*, *S. epidermidis* i *B. subtilis*, i dve Gram(-) bakterije *E. coli* i *Salmonella typhimurium*, kao i aktivnost prema osam sojeva mikromiceta mikrodilucionim testom (Kukić i sar., 2008). Primećeno je da su svi gljivični sojevi bili generalno osetljiviji od bakterijskih na delovanje flavona i hlorogenske kiseline. Najjače dejstvo ispoljio je luteolin prema *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli* i *S. typhimurium* (MIK = 50 µg/ml). Nešto slabiju aktivnost (MIK = 100 µg/ml), ispoljio je luteolin prema *S. epidermidis*, hlorogenska kiselina i apigenin 7-O-glukozid prema *B. subtilis*, *E. coli* i *S. typhimurium* i apigenin i luteolin prema *E. coli* i *S. typhimurium*. Antimikrobne aktivnosti svih jedinjenja bile su niže od streptomicina i mikonazola koji su korišćeni kao referentni antibiotici.

Ispoljeno antimikrobno dejstvo metanolnih ekstrakta cvasti i herbe *L. zernyi* najverovatnije je posledica dejstva flavona i hlorogenske kiseline, koji su detektovani u ovom ekstraktu.

Tabela 51. Antimikrobna aktivnost metanolnih ekstrakata cvasti i herbe *L. zernyi* i referentnih antibiotika ispitivana bujon mikrodilucionim testom

Mikroorganizam	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	<i>M. luteus</i> ATCC 9341	<i>E. faecalis</i> ATCC 29121	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>K. pneumoniae</i> NCIMB 91116	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 278537	<i>C. albicans</i> ATCC 10259	<i>C. albicans</i> ATCC 24433
	MIK (µg/ml)									
Ekstrakt cvasti	62,5	62,5	125	125	62,5	62,5	62,5	125	30	30
Ekstrakt herbe	62,5	62,5	62,5	62,5	30	62,5	62,5	62,5	30	30
Ampicilin^a	0,5	0,25	n. t.*	0,5	n. t.	2	2	3	n. t.	n. t.
Amikacin	2,0	n. t.	n. t.	n. t.		n. t.	n. t.	0,5	n. t.	n. t.
Nistatin	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.	3,0	3

*n. t. – nije testirano

7. Antiedematozna aktivnost metanolnih ekstrakata cvasti i herbe *L. zernyi*

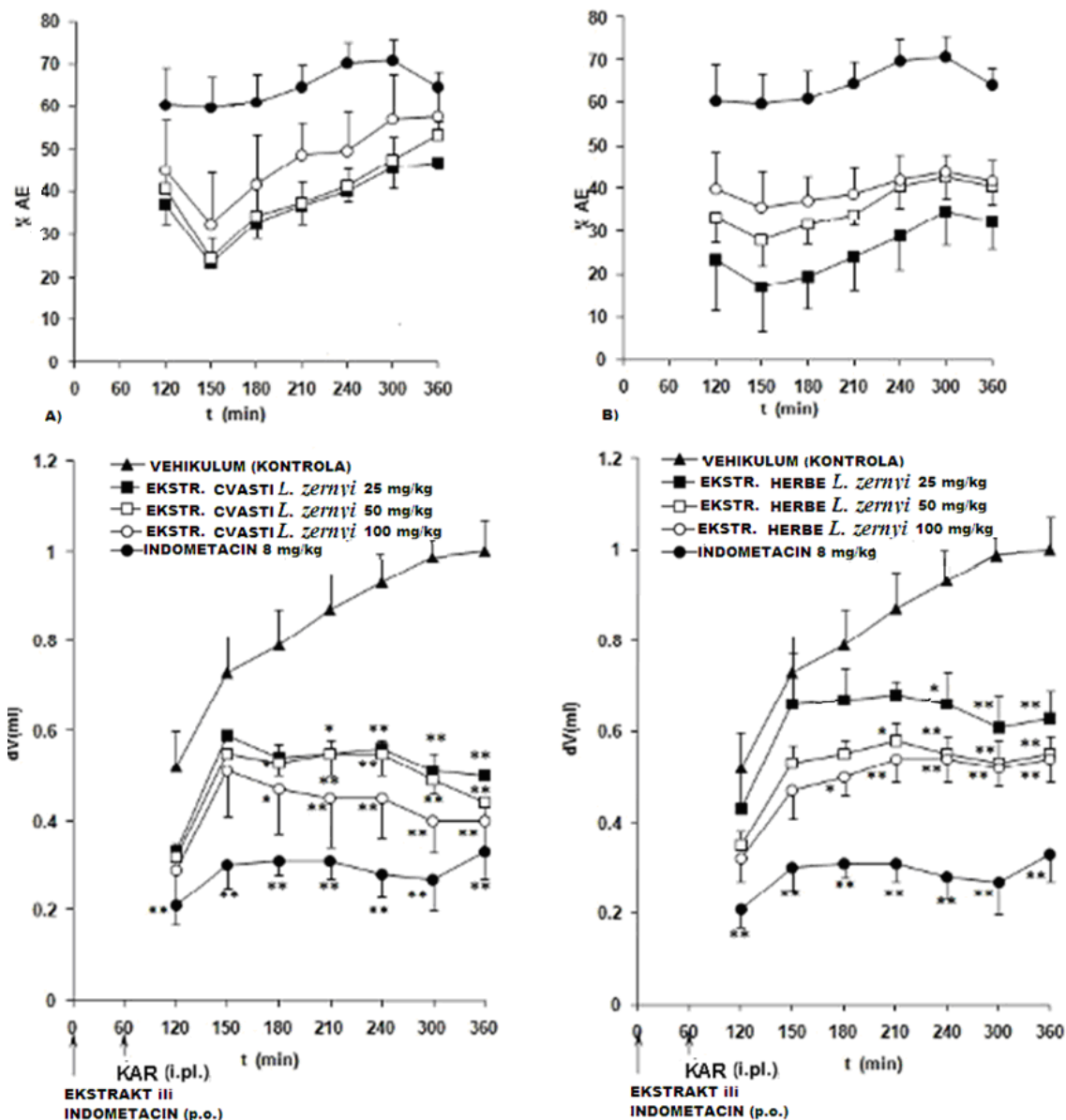
Metanolni ekstrakti cvasti i herbe (bez cvasti) *L. zernyi*, u kojima je utvrđeno prisustvo flavonoida: apigenina, luteolina i njihovih 7-O-glukozida, kao i hlorogenske kiseline, ispitivani su u pogledu antiedematoznog efekta u testu karageninom izazvane inflamacije šape u pacova. Zapremine šapa merene su pomoću pletizmometra.

Oba ekstrakta primenjena u dozama 25 - 100 mg/kg (*p.o.*), dozno-zavisno i statistički značajno smanjuju edem šape izazvan *i.pl.* injekcijom karagenina (Slika 57 A i B).

Antiedematozni efekat metanolnog ekstrakta cvasti *L. zernyi* bio je najveći u 360. min nakon primene i iznosio je 46,7%, 53,2% i 57,5% u dozama od 25, 50 i 100 mg/kg, redom (mali grafikon A na Slici 57). Srednja efektivna doza ($ED_{50} \pm SEM$, sa 95%-nim intervalom poverenja) pri maksimalnom efektu je $36,45 \pm 2,83$ (13,55-98,05) mg/kg.

Antiedematozni efekat metanolnog ekstrakta herbe (bez cvasti) *L. zernyi* bio je najveći nakon 300 min od primene ekstrakta, nakon čega se beleži blag pad. Ovaj maksimalni efekat iznosio je 34,7%, 42,6% i 43,9% za doze 25, 50 i 100 mg/kg, redom (mali grafikon B na slici Slici 57). Odgovarajuću srednju efektivnu dozu (ED_{50}) za metanolni ekstrakt herbe *L. zernyi* nije bilo moguće odrediti.

Indometacin, referentni NSAID, primenjen u dozi od 8 mg/kg *p.o.*, dostigao je maksimalni efekat u 300. min nakon primene i taj efekat je iznosio 70,6% antiedematozne aktivnosti.



Slika 57. Vremenski tok antiedematoznih dejstava metanolnih ekstrakata cvasti (A) i herbe (B) *L. zernyi*, nakon peroralne primene u pacova, izraženih kao razlika u zapreminama u ml (dv) između inflamirane desne šape i zdrave desne šape, odnosno zapremine posle i pre izazivanja inflamacije (veliki grafikon), odnosno kao procenat antiedematozne aktivnosti (%AE) (mali grafikon). Bazalna zapremina, odnosno zapremina šape pre primene ekstrakta/indometacina i izazivanja inflamacije karageninom (označeno strelicama). Ekstrakti/indometacin su davani 60 min pre izazivanja inflamacije (označeno strelicom). Svaka tačka predstavlja aritmetičku sredinu \pm SEM razlike u zapreminama (dv) (veliki grafikon) ili %AE (mali grafikon) dobijenu testiranjem na 6-7 životinja. Statistička značajnost ($*p < 0,05$, $**p < 0,01$; jednosmerna ANOVA i dalje korišćenje Tukey's HSD testa) je određivana u odnosu na kontrolnu grupu (vehikulum). Skraćenice: EKSTR - ekstrakt; KAR - karagenin, *i.pl.* - intraplantarno, *p.o.* - *per os*. Napomena: simboli na malom grafikonu odgovaraju legendi prikazanoj na velikom grafikonu.

Flavonoidi su široka klasa polifenolnih jedinjenja, koji ispoljavaju antiinflamatorno dejstvo, zbog čega se pojedine flavonoidne droge tradicionalno koriste u tretmanu zapaljenskih procesa. Smatra se da je jedan od ključnih mehanizama antiinflamatornog dejstva flavonoida inhibicija enzima koji su uključeni u sintezu eikozanoida: fosfolipaze A₂, COX i 5-lipooksigenaze. Dejstvom na COX smanjuje se sinteza prostaglandina (PG), važnih medijatora inflamatornog procesa. Smanjena sinteza PG modulira i sve ćelijske odgovore u kojima PG učestvuju. Samim tim, ublažavaju se i ostali aspekti inflamacije, kao što su povišena temperatura, bol i oticanje inflamiranog mesta (Harborne i Williams, 2000; Havsteen, 2002; Kelm i sar., 2000; Kim i sar., 2004). Pored inhibicije enzima, flavonoidi, naročito klasa flavona, suprimiraju gensku ekspresiju za COX-2 i inducibilnu NO sintazu, enzime uključene u inflamatornu reakciju. Smatra se da je ova modulirana genska ekspresija delom posledica inhibicije transkripcionog faktora NF-κB (Kim i sar., 2004).

Flavonoidi imaju sposobnost neutralizacije slobodnih radikala koji mogu pokrenuti inflamatornu reakciju aktivacijom redoks-senzitivnog NF-κB faktora, pa mogu imati povoljne terapijske efekte u prevenciji i ranim fazama bolesti u čijoj osnovi leži inflamatorna reakcija (Chirumbolo, 2012; Havsteen, 2002; Menegazzi i sar., 2006).

Apigenin, luteolin i njihovi heterozidi, spadaju u klasu flavona, koji su česti sastojci biljnih namirnica, čija se svakodnevna upotreba u ishrani povezuje sa smanjenim rizikom nastanka različitih hroničnih inflamatornih stanja (Martens, Mithöfer, 2005). Uprkos ovoj činjenici, ograničen je broj podataka o antiinflamatornoj aktivnosti jedinjenja ove klase.

Metanolni ekstrakt vrste *Ficus pumila* L., u kome su kao glavne komponente detektovani upravo apigenin i luteolin, kao i flavonolni heterozid rutin, pokazao je dozno- i vremenski-zavisno, statistički značajno antiedematozno dejstvo u poređenju sa kontrolnom grupom u karageninom (*i.pl.*) izazvanoj inflamaciji šape u miša. Ekstrakt (0,1-1,0 g/kg, *p.o.*) je dat 60 min nakon injektovanja karagenina, a maksimalni efekat je postignut i održavan u toku 3., 4., i 5. sata nakon injektovanja. Ispoljeni antiedematozni efekat ekstrakta u dozama 0,5 i 1,0 mg/kg je uporediv sa efektom indometacina (10 mg/kg, *p.o.*), referentnog leka (Liao i sar., 2012). Luteolin 7-O-glukozid i apigenin 7-O-glukozid izolovani iz herbe *Vrebasium salviifolium* Boiss., primenjeni u dozi 200 mg/kg (*p.o.*) ispoljavaju statistički značajno, vremenski-zavisno antiedematozno dejstvo u modelu karageninom (*i.pl.*) izazvane

inflamacije šape u miša. Prema nekim autorima, nastanak edema izazvanog karageninom je dvofazni proces: prvu fazu karakteriše oslobađanje histamina i serotonina, a kasna faza koja počinje oko 3 h nakon injektovanja posledica je dejstva bradikinina, prostaglandina i proteaza (Olajide i sar., 1999). Efekat oba heterozida je bio izraženiji u kasnoj fazi inflamatorne reakcije (270-360 min nakon injekcije karagenina), kada se u inflamatorni proces uključuju prostaglandini, što je u skladu sa mehanizmom antiinflamatornog dejstva flavonoida. Ipak, efekat oba jedinjenja bio je slabiji od efekta indometacina (10 mg/kg, *p.o.*), koji je korišćen kao referentni lek (Tatli i sar., 2008). Pored podataka o antiedematoznoj aktivnosti flavona *per os* primeni, u jednom testu luteolin i apigenin, injektovani su u šape miša (*i.pl.*) u dozama 25 i 50 mg/kg, 30 min pre *i.pl.* injekcije karagenina. Oba aglikona pokazala su dozno-zavisno i statistički značajano antiedematozno dejstvo u odnosu na kontrolnu grupu, a razlika između inflamirane i neinflamirane šape merena je 16 h nakon injektovanja karagenina (Funakoshi-Tago i sar., 2011).

Hlorogenska kiselina je ubikvitarna fenolkarboksilna kiselina detektovana u oba ekstrakta, koja je takođe ispitivana u pogledu antiedematoznog dejstva. Hlorogenska kiselina je ispoljila dozno-zavisno i statistički značajan antiedematozni efekat, u odnosu na kontrolnu grupu, pri dozama 10-100 mg/kg, *p.o.* u karageninom izazvanom edemu šape u pacova (dos Santos i sar., 2006). Hlorogenska kiselina je data pacovima 60 min pre izazivanja inflamacije, a značajan antiedematozni efekat pri primeni u dozama 50 i 100 mg/kg nastupio je 3. časa nakon primene i održavan tokom naredna dva sata, dok je primenom niže doze (10 mg/kg, *p.o.*) značajan antiedematozni efekat nastupio u 4. i održavan tokom 5. sata. Mehanizam nije u potpunosti razjašnjen, ali se pretpostavlja da je povezan sa inhibicijom oslobađanja i sinteze medijatora inflamacije (dos Santos i sar., 2006).

Metanolni ekstrakti cvasti i herbe *L. zernyi* pokazali su statistički značajnu dozno-zavisnu antiedematoznu aktivnost, koja se najverovatnije može dovesti u vezu sa flavonima i hlorogenskom kiselinom iz oba ekstrakta. Najvećom dozom (100 mg/kg, *p.o.*) metanolnog ekstrakta cvasti *L. zernyi* dobijen je efekat uporediv sa efektom dobijenim sa indometacinom, ali nižeg intenziteta, dok je nakon primene ekstrakta herbe *L. zernyi* u najvećoj dozi efekat bio ispod 50% antiedematozne aktivnosti. Razlika u intenzitetu ispoljenih efekata može se povezati sa značajnom razlikom u sadržajima heterozida: luteolin 7-O-glukozida (34,40% i 10,23% u ekstraktu cvasti i herbe *L. zernyi*, redom), kao i apigenin 7-O-glukozida (4,45% i 0,26% u ekstraktu cvasti i herbe *L. zernyi*, redom).

ZAKLJUČCI

1. U doktorskoj disertaciji ispitivani su sekundarni metaboliti i farmakološka aktivnost izolata tri odabrane vrste roda *Laserpitium*: u Evropi široko rasprostranjene vrste *L. latifolium*, koja je do sada samo delimično ispitivana, i dve vrste endemične za Balkansko poluostrvo: *L. zernyi* i *L. ochridanum*, koje do sada nisu proučavane.
2. Etarska ulja, izolovana destilacijom vodenom parom, hemijski su okarakterisana metodama GC-FID i GC-MS.
3. Bezbojna etarska ulja izolovana iz ploda i podzemnih organa *L. latifolium* karakteriše izuzetno visok procenat monoterpena sa α -pinenom kao najzastupljenijom komponentom (44,0% i 44,4%, redom), a u ulju ploda su u nešto višem procentu zastupljeni sabinen i β -pinen (26,8% i 13,9%, redom).
4. U svetloplavim etarskim uljima cvasti i herbe *L. zernyi* monoterpeni su takođe zastupljeniji u odnosu na seskviterpene. U etarskom ulju cvasti *L. zernyi* najzastupljenije komponente su sabinen, limonen i β -felandren (18,5%, 12,0% i 12,0%, redom), a u etarskom ulju herbe *L. zernyi* β -pinen (20,0%). Ova dva ulja su, u odnosu na druga ispitivana ulja, imala relativno visok sadržaj monoterpenskog alkohola terpinen-4-ola (10,6% i 12,0% u etarskom ulju herbe i cvasti *L. zernyi*, redom). Svetloplavo etarsko ulje podzemnih organa *L. zernyi* imalo je približno isti sadržaj monoterpenske i seskviterpenske frakcije, a α -pinen (31,6%) i α -bisabolol (30,9%) su najzastupljenije komponente.
5. Plavo etarsko ulje podzemnih organa *L. ochridanum*, za razliku od prethodno okarakterisanih etarskih ulja, ima viši sadržaj seskviterpenske frakcije (51,4%) u odnosu na monoterpensku (42,6%). Najzastupljenije komponente ovog etarskog ulja su α -pinen (33,2%), hamazulen (14,9%) i α -bisabolol (10,3%). U plavom etarskom ulju ploda *L. ochridanum* dominiraju monoterpeni, a najzastupljenije komponente su limonen (57,7%) i sabinen (14,4%). Etarsko ulje herbe *L. ochridanum*, takođe je plave boje i bogato je monoterpenima (55,3%), a najzastupljenija komponenta je sabinen (25,9%).
6. S obzirom na široku primenu α -bisabolola u farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji sa jedne strane i njegovu ograničenu zastupljenost u biljnom svetu sa druge strane, etarska ulja podzemnih organa *L. zernyi* i *L. ochridanum*

- imaju poseban značaj kao novi prirodni izvori ovog seskviterpenskog alkohola.
7. Hromatografijom na koloni silikagela i semipreparativnom HPLC hromatografijom, iz hloroformskog ekstrakta podzemnih organa *L. latifolium* izolovana su dva daukanska estra: laserpicin (**1**) i acetildezoksodehidrolaserpicin (**2**), kao i dva fenilpropanska jedinjenja: laserin (**3**) i latifolon (**4**). U okviru ove doktorske disertacije acetildezoksodehidrolaserpicin (**2**) je prvi put izolovan iz vrste roda *Laserpitium*, a laserin (**3**) prvi put iz vrste *L. latifolium*. Struktura izolovanih jedinjenja određivana je IR i NMR spektroskopijom i HR-MS ESI⁺ masenom spektrometrijom.
 8. Uporednom HPLC analizom, korišćenjem izolovanih jedinjenja kao eksternih standarda, uočena je velika kvalitativna sličnost hloroformskih ekstrakata podzemnih organa i herbe *L. latifolium*, pri čemu je konstatovan viši sadržaj sva četiri jedinjenja u ekstraktu podzemnih organa.
 9. Hromatografijom na koloni silikagela i semipreparativnom HPLC hromatografijom, iz hloroformskog ekstrakta podzemnih organa *L. zernyi* izolovano je i strukturno okarakterisano (IR i NMR spektroskopija, i HR-MS ESI⁺ masena spektrometrija) sedam seskviterpenskih laktona. Pet laktona je osnovne strukture slovanolida, tj. 1 β H,5 β H,6 α H,7 α H-gvajjan-3-en-12,6-olida: tarolid (**5**); acetilizomontanolid (**6**); acetilmontanolid (**7**); izomontanolid (**9**) i montanolid (**10**), a izolovan je i jedan eudezmanolidni lakton silerolid (**8**). Takođe izolovan je još jedan lakton: 8 α -senecioiloksi-10 β -hidroksi-6 α H,7 α H-gvajjan-3-en-12,6-olid (jedinjenje **11**), koji je po prvi put izolovan iz vrste roda *Laserpitium*.
 10. Uporednom HPLC analizom, uz korišćenje izolovanih jedinjenja kao eksternih standarda, utvrđeno je da su ekstrakti herbe i cvasti *L. zernyi* nešto kompleksnijeg sastava u odnosu na ekstrakt podzemnih organa. U sva tri ekstrakta detektovani su laktone tarolid (**5**), izomontanolid (**9**) i montanolid (**10**). U ekstraktu podzemnih organa detektovan je i latifolon (**4**), dok je u ekstraktima herbe i cvasti *L. zernyi* utvrđeno i prisustvo laserpicina (**1**).
 11. Hloroformski ekstrakt podzemnih organa *L. ochridanum* imao je nešto kompleksniji sastav u odnosu na hloroformski ekstrakt podzemnih organa

L. zernyi. Iz ovog ekstrakta je, pored laktona slovanolidne strukture i silerolida, prethodno izolovanih iz ekstrakta podzemnih organa *L. zernyi*, izolovano još pet novih, visoko hidroksilovanih i esterifikovanih derivata slovanolida (jedinjenja **12-16**), od kojih četiri karakteriše dodatna esterifikacija u položaju 2 β . Struktura ovih jedinjenja određivana je IR i NMR spektroskopijom i HR-MS ESI⁺ spektrometrijom. Nova jedinjenja izolovana iz podzemnih organa *L. ochridanum* su: 8 α -acetoksi-2 β ,10 β -diangeloiloksi-6 α H,7 α H-gvajjan-3-en-12,6-olid (**12**); 8 α ,2 β -diangeloiloksi-10 β -hidroksi-6 α H,7 α H-gvajjan-3-en-12,6-olid (**13**); 8 α -angeloiloksi-11 α -senecioiloksi-10 β -hidroksi-6 α H,7 α H-gvajjan-3-en-12,6-olid (**14**); 2 β ,8 α -diangeloiloksi-10 β -hidroksi-6 α H-gvajjan-3,(7-11)-dien-12,6-olid (**15**); 8 α -acetoksi-2 β ,11 α -diangeloiloksi-10 β -hidroksi-6 α H,7 α H-gvajjan-3-en-12,6-olid (**16**). Takođe, izolovana su i okarakterisana još dva seskviterpenska laktona: 8 α -angeloiloksi-10 β -acetoksi-6 α H,7 α H-gvajjan-3-en-12,6-olid (**17**) i izosilerolid (**18**).

12. U poređnom HPLC analizom, uz korišćenje izolovanih jedinjenja kao eksternih standarda, uočena je kvalitativna sličnost hloroformskih ekstrakata podzemnih organa, herbe i ploda *L. ochridanum*: komponente prisutne u sva tri ekstrakta su laktoni tarolid (**5**), izomontanolid (**9**) i montanolid (**10**), a u ekstraktu herbe detektovan je i silerolid (**8**). Pored laktona, u ekstraktima herbe i ploda detektovan je i laserpicin (**1**), a u ekstraktu podzemnih organa i latifolon (**4**).
13. U metanolnim ekstraktima cvasti i herbe (bez cvasti) *L. zernyi* sadržaj ukupnih polifenola određivan je spektrofotometrijskim postupkom. Sadržaj ukupnih polifenola bio je nešto viši u metanolnom ekstraktu cvasti (14,32% preračunato kao galna kiselina).
14. HPLC analizom u uslovima optimizovanim za razdvajanje polifenola, uz korišćenje standardnih supstanci, u metanolnim ekstraktima cvasti i herbe *L. zernyi* konstatovano je prisustvo hlorogenske kiseline i flavona: apigenina, luteolina i njihovih 7-O-glukozida. Sadržaj detektovanih flavona bio je viši u metanolnom ekstraktu cvasti u odnosu na metanolni ekstrakt herbe *L. zernyi*.
15. Antimikrobna aktivnost izolovanih etarskih ulja: ploda i podzemnih organa *L. latifolium*, herbe, ploda i podzemnih organa *L. ochridanum* i cvasti, herbe i podzemnih organa *L. zernyi* određivana je bujon mikrodilucionim testom, uz

korišćenje ampicilina, amikacina i nistatina kao referentnih antimikrobnih agenasa. Rezultati su izraženi kao minimalne inhibitorne koncentracije (MIK). Najjaču antibakterijsku aktivnost ispoljila su etarska ulja plodova *L. ochridanum* i *L. latifolium*, i etarska ulja podzemnih organa *L. zernyi* i *L. ochridanum* prema bakterijama *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* i *Micrococcus luteus*, kao i etarsko ulje herbe *L. ochridanum* prema *S. aureus*. Najjači antifungalni efekat ispoljilo je etarsko ulje podzemnih organa i herbe *L. ochridanum* na soj *Candida albicans* ATCC 24433 i etarsko ulje ploda *L. ochridanum* na soj *C. albicans* ATCC 10259. Antimikrobna aktivnost navedenih etarskih ulja prema ostalim mikroorganizmima, kao i aktivnost svih ostalih etarskih ulja bila je slaba.

16. Antimikrobna aktivnost etarskih ulja cvasti i herbe *L. zernyi* ispitivana je i agar difuzionim testom. Ispoljeni efekat bio je slab, što je u skladu sa rezultatima mikrodilucionog testa.
17. Etarska ulja podzemnih organa *L. ochridanum* i *L. zernyi* ispitivana su i u pogledu antinociceptivnog i antiedematoznog dejstva nakon *p.o.* primene u modelu karageninom (*i.pl.*) izazvane inflamacije u pacova.
18. Ova etarska ulja su pokazala dozno- i vremenski-zavisno i statistički značajno antinociceptivno dejstvo uporedivo sa efektom ibuprofena, referentnog leka, u modelu inflamatorne hiperalgezije u pacova. Rezultat ukazuje da testirana etarska ulja mogu biti novi prirodni proizvodi efikasni u terapiji bola u različitim inflamatornim stanjima.
19. Etarska ulja su pokazala dozno- i vremenski-zavisno i statistički značajno antiedematozno dejstvo uporedivo sa efektom indometacina, referentnog leka, u modelu *i.pl.* injekcijom karagenina izazvanog edema u pacova. Etarska ulja podzemnih organa vrsta *L. zernyi* i *L. ochridanum* su efikasna u smanjenju edema, što je još jedna od manifestacija inflamatorne reakcije. Ispitivana etarska predstavljaju nove prirodne sirovine koje mogu biti efektivne protiv edema nastalih u različitim zapaljenskim reakcijama.
20. Ispitivanjem citotoksične aktivnosti hloroformskih ekstrakata podzemnih organa i herbe *L. latifolium* u MTT i SRB kolorimetrijskim testovima utvrđeno je da oba ekstrakta ispoljavaju koncentraciono-zavisnu aktivnost na dve ćelijske linije humanog adenokarcinoma dojke MCF 7/6 i MCF 7/AZ, invazivnom i

- neinvazivnom tipu, redom. Ekstrakt podzemnih organa, u kome je koncentracija daukanskih estara i fenilpropana laserina bila viša, ispoljio je generalno i jaču citotoksičnu aktivnost.
21. Ispitivanjem citotoksičnih aktivnosti daukanskih estara i laserina, utvrđeno je i da ova jedinjenja ispoljavaju koncentraciono-zavisan efekat, te da doprinose, bar delimično, ispoljenoj citotoksičnoj aktivnosti ekstrakata *L. latifolium*. Među izolovanim jedinjenjima, najjači citotoksičan efekat ispoljio je acetildezoksodehidrolaserpicin. Invazivna ćelijska linija MCF 7/6 je bila naročito osetljiva na dejstvo acetildezoksodehidrolaserpicina: preračunate IC₅₀ vrednosti su u niskom mikromolarnom opsegu, a efekat je uporediv sa efektom vinblastin-sulfata, referentnog jedinjenja.
 22. Ekstrakti podzemnih organa i herbi *L. zernyi* i *L. ochridanum*, kao i laktoni izolovani iz njih isptivani su u pogledu citotoksične aktivnosti u istim *in vitro* kolorimetrijskim testovima na istim ćelijskim linijama. Efekat hloroformskih ekstrakata podzemnih organa bio je jači u odnosu na efekte koje su ispoljili ekstrakti herbi, izuzev aktivnosti ekstrakta podzemnih organa *L. ochridanum* u SRB testu na ćelijskoj liniji MCF 7/6.
 23. Među izolovanim laktonima najjači citotoksični efekat ispoljio je, 2β,8α-diangeloiloksi-6αH-gvajjan-3,(7-11)-dien-12,6-olid, koji jedini ima dvostruku vezu u laktonskom prstenu. Gvajjanolidi sa manjim brojem estara u strukturi, kao i eudezmanolidi, nisu dostigli 50% inhibicije ćelijskog rasta čak ni u najvećoj testiranoj koncentraciji (100 μM). Za najaktivnija jedinjenja ispoljeni citotoksični efekat bio je koncentraciono-zavisan.
 24. Antioksidantna aktivnost metanolnih ekstrakata cvasti i herbe *L. zernyi* određivana je *in vitro* testovima: ispitivanjem ukupne antioksidantne aktivnosti i sposobnosti neutralizacije DPPH i ·OH radikala. Metanolni ekstrakt cvasti *L. zernyi*, u kome je konstatovan viši sadržaj ukupnih polifenola, kao i identifikovanih flavona i hlorogenske kiseline, ispoljio je i jači antioksidantni efekat u sva tri testa u odnosu na ekstrakt herbe, ali i slabiji antioksidantni efekat od kvercetina.
 25. Antimikrobna aktivnost metanolnih ekstrakata cvasti i herbe *L. zernyi* testirana je mikrodilucionim testom prema pet sojeva Gram(+) bakterija, tri soja Gram(–)

bakterija i dva soja *C. albicans*. Oba ekstrakta su ispoljila najjaču antimikrobnu aktivnost prema sojevima *C. albicans*, a ekstrakt herbe ispoljio je i jaku aktivnost prema *B. subtilis*. Aktivnost ekstrakta herbe *L. zernyi* prema svim ostalim testiranim sojevima bakterija bila je umerena i identična.

26. Metanolni ekstrakti cvasti i herbe *L. zernyi* ispitivani su i u pogledu entiedematoznog efekta u karageninom (*i.pl.*) izazvanoj inflamaciji šape u pacova nakon *p.o.* primene. Ekstrakti su dozno-zavisno i statistički značajno smanjili edem šape izazvan *i.pl.* injekcijom karagenina. Najvećom dozom metanolnog ekstrakta cvasti *L. zernyi* dobijen je efekat uporediv sa efektom indometacina, dok je nakon primene ekstrakta herbe u najvećoj dozi efekat bio nižeg intenziteta.
27. Hemijskim ispitivanjem vrsta *L. latifolium*, *L. zernyi* i *L. ochridanum* dobijene su informacije o strukturi i sadržaju njihovih sekundarnih metabolita, a poseban značaj ogleda se u izolovanju retkih i novih jedinjenja. Rezultati ispitivanja farmakološke aktivnosti izolata ukazuju na znatan lekoviti potencijal ispitivanih predstavnika roda *Laserpitium*, i time na njihov značaj kao potencijalno novih prirodnih lekovitih sirovina.

LITERATURA

Acar JF, Goldstein FW. Disc susceptibility test. U: Antibiotics in Laboratory Medicine 4th ed. Uredio: Lorain V. Baltimore: Williams & Wilkins, 1996, str. 1-51.

Adams RP. Identification of essential oils by gas chromatography quadrupole mass spectrometry. Carol Stream: Allured publishing corporation, 2001, str. 1-455.

Adcock JW, Betts TJ. A chemotaxonomic survey of essential oil constituents in the tribe *Laserpitiae* (fam Umbelliferae). Planta Med. 1974;26:52-64.

Aljančić I, Vajs V, Menković N, Karadžić I, Juranić N, Milosavljević S, Macura S. Flavones and sesquiterpene lactones from *Achillea atrata* subsp. *multifida*: Antimicrobial activity. J Nat Prod. 1999;62:909-911.

Alkhatib R, Hennebelle T, Joha S, Idziorek T, Preudhomme C, Quesnel B, Sahpaz S, Bailleul F. Activity of elaeochytrin A from *Ferula elaeochytris* on leukemia cell lines. Phytochemistry. 2008;69:2979-2983.

Alves AMH, Gonçalves JCR, Cruz JS, Araújo DAM. Evaluation of the sesquiterpene (-)- α -bisabolol as a novel peripheral nervous blocker. Neurosci Lett. 2010;472:11-15.

Ammon HPT, Sabieraj J, Kaul R. Kamille. Mechanismus der antiphlogistischen Wirkung von Kamillenextrakten und -inhaltsstoffen. Deutsch Apoth Ztg. 1996;136:1821-1834. [Na nemačkom]

Appendino G, Valle MG, Gariboldi P. Structural and conformational studies on sesquiterpenoid esters from *Laserpitium halleri* Crantz subsp. *halleri*. J Chem Soc Perkin Trans. 1986;1:1363-1372.

Appendino G, Valle MG, Caniato R, Capeletti EM. Sesquiterpene lactones from *Laserpitium garganicum*. Phytochemistry. 1985;25:1747-1749.

Appendino G, Tagliapietra S, Paglino L, Nano GM, Monti D, Picci V. Sesquiterpenoid esters from the fruits of *Ferula communis*. Phytochemistry. 1990;29:1481-1484.

Appendino G, Cravotto G, Nano GM. Sesquiterpene lactones from *Laserpitium gallicum*. Phytochemistry. 1993;33:883-886.

Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils — A review. Food Chem Toxicol. 2008;46:446-475.

Barrero AF, Herrador MM, Arteaga P. Sesquiterpene lactones and other constituents of *Seseli vayredanum*. Phytochemistry. 1994;37:1351-1358.

Barrero AF, Herrador MM, Arteaga P. Sesquiterpenes and phenylpropanoids from *Seseli vayredanum*. Phytochemistry. 1992;31:203-207.

Baser KHC, Duman H. Composition of the essential oil of *Laserpitium petrophilum* Boiss. et Heldr. J Essent Oil Res. 1997;9:707-708.

Berridge MV, Tan AS. Characterisation of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular

localization, substrate dependence and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch Biochem Biophys.* 1993;303:474-482.

Bevilacqua A, Corbo MR, Sinigaglia M. Use of natural antimicrobials and high pressure homogenization to control the growth of *Saccharomyces bayanus* in apple juice. *Food Control.* 2012;24:109-115.

Bianchi M, Rossoni G, Sacerdote P, Panerai AE, Berti F. Carbamazepine exerts anti-inflammatory effects in the rat. *Eur J Pharmacol.* 1995;294:71-74.

Blumenthal M, Brinckmann J, Wollschlager B. The ABC Clinical Guide to Herbs. Uredili: Hall T, Goldberg A, Kuntz T, Dinda K. Austin: American Botanical Council; 2003, str. 51-63.

Bohlmann F, Thefeld W. Naturally occurring coumarin derivatives. V. Dihydroseselin derivatives from *Laserpitium archangelica*. *Tetrahedron Lett.* 1970;41:3577-3580.

Bruno M, Bondi ML, Vassallo N, Gedris TE, Herz W. Guaianolides and other terpenoids from *Anthemis aetnensis*. *Phytochemistry.* 1997;37:1351-1358.

Candan F, Unlu M, Tepe B, Daferera D, Polissou M, Sökmen A, Akpulat A. Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of *Achillea millefolium* subsp. *millefolium* Afan. (Asteraceae). *J Ethnopharmacol.* 2003;87:215-20.

Carocho M, Ferreira ICFR. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food Chem Toxicol.* 2013;51:15-25.

Chirumbolo S. Plant phytochemicals as new potential drugs for immune disorders and cancer therapy: really a promising path? *J Sci Food Agric.* 2012;92:1573-1577.

Chizzola R. Composition of the essential oil from *Laserpitium gallicum* grown in the wild in southern France. *Pharm Biol.* 2007;45:182-184.

Chizzola R, Novak J. Fruit oil of *Laserpitium siler* L. grown in France. *J Essent Oil Res.* 1999;11:197-8.

Cuendet M, Hostettmann K, Potterat O. Iridoid glucosides with free radical scavenging properties from *Fagraea blumei*. *Helv Chim Acta.* 1997;80:1144-1152.

Cushine TTP, Lamb AJ. Antimicrobial activity of flavonoids. *Int J Antimicrob Ag.* 2005;26:343-356.

Čajkanović V. Rečnik srpskih narodnih verovanja o biljkama. Uredio: Đurić V. Beograd: Srpska književna zadruka, Srpska akademija nauka i umetnosti; 1985, str. 309-310.

Daglia M. Polyphenols as antimicrobial agents. *Curr Opin Biotechnol.* 2012;23:174-181.

- Dall'Acqua S, Linardi MA, Maggi F, Nicoletti M, Petitto V, Innocenti G, Basso G, Viola G. Natural daucane sesquiterpenes with antiproliferative and proapoptotic activity against human tumor cells. *Bioorgan Med Chem.* 2011;19:5876-5885.
- De Andrade IL, Bezerra JNS, Lima MAA, de Faria RAPG, Lima MAS, Andrade-Neto M. Chemical composition and insecticidal activity of essential oils from *Vanillosmopsis pohlii* against *Bemisia argentifolii*. *J Agr Food Chem.* 2004;52:5879-5881.
- Della Loggia R, Carle R, Sosa S, Tubaro A. Evaluation of the anti-inflammatory activity of chamomile preparations. *Planta Med.* 1990;56:657-658.
- Dewick, PM. *Medicinal Natural Products — A biosynthetic approach*, 3th edition. Chichester: John Wiley and Sons Ltd. 2009, str. 187-247.
- Drew DP, Kirchau N, Reichwald K, Simonsen HT. Guaianolides in Apiaceae: perspectives on pharmacology and biosynthesis. *Phytochem Rev.* 2009;8:581-599.
- Đermanović M, Mladenović S, Ristić N, Stefanović M. Sesquiterpene lactones from *Laserpitium alpinum* L. (Umbelliferae). *Bull Soc Chim Beo.* 1982;47:317-318.
- Đermanović M. Hemijsko ispitivanje biljaka iz roda *Laserpitium* L. (Umbelliferae). Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu - Hemijski fakultet. 1990, str. 1-92.
- Đermanović M, Stefanović M, Đermanović V, Milovanović M. Sesquiterpene lactones from *Laserpitium latifolium* L. *Fitoterapia.* 1994;65:556.
- Edris AE. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: A review. *Phytother Res.* 2007;21:308-323.
- European Pharmacopoeia, Sixth Edition. Strasbourg: Council of Europe, 2007.
- European Pharmacopoeia, Seventh Edition. Strasbourg: Council of Europe, 2011.
- Evans WC. *Pharmacognosy*, Trease and Evans, 16th Edition. Uredio: Evans D. Edinburgh, London, New York, Philadelphia, St Louis, Sydney, Toronto, Saunders Elsevier, 2009.
- Fraga BM, Hernandez MG, Diaz JG. Carotidol esters from *Ferula linkii*. *Phytochemistry.* 1989;28:1649-1652.
- Funakoshi-Tago M, Nakamura K, Tago K, Mashino T, Kasahara T. Anti-inflammatory activity of structurally related flavonoids, apigenin, luteolin and fisetin. *Int Immunopharmacol.* 2011;11:1150-1159.
- Ghantous A, Gali-Muhtasib H, Vuorela H, Saliba NA, Darwiche N. What made sesquiterpene lactones reach cancer clinical trials? *Drug Discov Today.* 2010;15:668-678.
- Ghisalberti EL. The daucane (carotane) class of sesquiterpenes. *Phytochemistry.* 1994;37:597-623.

Gonzalez AG, Bermejo J, Diaz JG, Arancibia L. Humulenes and other constituents of *Ferula latipinna*. J Nat Prod. 1988;51:1140-1147.

Harborne JB, Williams CA. Advances in flavonoid research since 1992. Phytochemistry. 2000;55:481-504.

Hartvig P. *Laserpitium* L. U: Mountain Flora of Greece 1. Uredio: Strid, A. Cambridge: Cambridge University Press; 1986, str. 726–733.

Havsteen BH. The biochemistry and medicinal significance of the flavonoids. Pharmacol Therapeut. 2002;96:67-202.

Hegi G. *Siler* Miller, *Laserpitium* L. U: Illustrierte Flora von Mitteleuropa, Band V (2), Uredio Beger H. Wien: A. Pichler's Witwe & Sohn; 1906, str. 1467-1501.

Helyes Z, Szabo A, Nemeth J, Jakab B, Pinter E, Banvolgyi A, Kereski L, Keri G, Szolcsányi J. Antiinflammatory and analgesic effects of somatostatin released from capsaicin-sensitive sensory nerve terminals in a Freund's adjuvant-induced chronic arthritis model in the rat. Arthritis Rheum. 2004;50:1677-1685.

Holub M, Herout V, Sorm F. Analysis of extractable substances from the root of *Laserpitium latifolium*. Chem Listy. 1958;52:2348-2354.

Holub M, Herout V, Šorm F. Analysis of the extractable substances from the root of *Laserpitium latifolium*. Coll Czech Chem Commun. 1959;24:3926-3933.

Holub M, Samek Z, Herout V, Šorm V. Constitution of isolaserpitin, deoxodehydrolaserpitin and laserpitinol. Monatshefte F Chem. 1967;98:1138-1153.

Holub M, Samek Z, Herout V, Šrom F. The constitution of laserpitine – A sesquiterpenic compound from *Laserpitium latifolium* L. root. Coll Czech Chem Commun. 1967;32:591-609.

Holub M, De Groote R, Herout V, Sorm F. Oxygen-containing components of petroleum ether extract of *Laser trilobum* root. Structure of laserine. Coll Czech Chem Commun. 1968;33:2911-2917.

Holub M, Popa DP, Samek Z, Herout V, Šorm F. Neutral components of the light petroleum extract of the root of *Laserpitium siler* L. The structure of sesquiterpene lactone montanolide. Coll Czech Chem Commun. 1970;35:3296-3308.

Holub M, Motl O, Samek Z, Herout V. The structure of two sesquiterpene lactones isomontanolide and acetylisomontanolide from *Laserpitium siler* L. Coll Czech Chem Commun. 1972;37:1186-1194.

Holub M, Samek Z. The structure of archangelolide, a sesquiterpenic lactone from *Laserpitium archangelica* Wulf. Coll Czech Chem Commun. 1973;38:731-738.

Holub M, Molt O, Samek Z. The structure and relative and absolute configurations of the sesquiterpenic lactones gradolide and pohlovide from *Laserpitium siler* L. Coll Czech Chem Commun. 1978;43:2471-2477.

- Holub M, Buděšinský M, Smitalova Z, Šaman D, Rychlewska U. Structure of isosilerolide, relative and absolute configuration of silerolide and lasolide – sesquiterpene lactones of new stereoisomeric type of eudesmanolides. *Coll Czech Chem Commun.* 1986;51:903-929.
- Holub M, Buděšinský M. Sesquiterpene lactones of the Umbelliferae. *Phytochemistry.* 1986;25:2012-2026.
- Hoppe HA, Drokenkunde. Hamburg: Cram, De Gruyter & Co; 1958, str. 232-233.
- Hoult JRS, Paya M. Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: Natural products with therapeutic potential. *Gen Pharmac.* 1996;27:713-722.
- Jabrane A, Jannet BH, Mighri Z, Mirjolet JF, Duchamp O, Harzallah-Sikhiri F, Lacaille-Dubois MA. Two new sesquiterpene derivatives from the Tunisian endemic *Ferula tunetana* Pom. *Chem Biodivers.* 2010;7:392-399.
- Jakovlev V, Isaac O, Flaskamp E. Pharmakologische Untersuchungen von Kamillen-Inhaltsstoffen. VI. Untersuchungen zur antiphlogistischen Wirkung von Chamazulen und Matricin. *Planta Med.* 1983;49:67-73. [Na nemačkom]
- Kamatou GPP, Viljoen AM, Lourens ACU, Baser KHC, Demrici B, Lindsey KL, Van Staden J, Steenkamp P. The *in vitro* pharmacological activities and a chemical investigation of three South African *Salvia* species. *J Ethnopharmacol.* 2005;102:382-390.
- Kamatou GPP, Viljoen AM. A review of application of α -bisabolol and α -bisabolol-rich oils. *J Am Oil Chem Soc.* 2010;87:1-7.
- Kapetanios C, Karioti A, Bojović S, Marin P, Veljić M, Skaltsa H. Chemical and principal-component analyses of the essential oils of Apioidae taxa (Apiaceae) from Central Balkan. *Chem Biodivers.* 2008;5:101-119.
- Kelm MA, Nair MG, Strazburg GM, DeWitt DL. Antioxidant and cyclooxygenase inhibitory phenolic compounds from *Ocimum sanctum* Linn. *Phytomedicine.* 2000;7:7-13.
- Kim HP, Son KH, Chang HW, Kang SS. Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. *J Pharmacol Sci.* 2004;96:229-245.
- Kim KN, Ham YM, Moon JY, Kim MJ, Kim DS, Lee WJ, Lee NH, Hyun CG. *In vitro* cytotoxic activity of *Sargassum thunbergii* and *Dictyopteris divaricata* (Jeju seaweeds) on the HL-60 tumour cell line. *Int J Pharmacol.* 2009;5:298-306.
- Kim S, Jung E, Kim J-H, Park Y-H, Lee J, Park D. Inhibitory effects of (-)- α -bisabolol on LPS-induced inflammatory response in RAW264.7 macrophages. *Food Chem Tox.* 2011;49:2580-2585.
- Kiran SR, Devi PS, Reddz KJ. Evaluation of *in vitro* antimicrobial activity of leaf and stem essential oils of *Chloroxylon swietenia* DC. *World J Microb Biot.* 2008;24:1909-1914.

- Kmonickova E, Zidek Z, Harmatha J, Budesinsky M, Vokac K. Immunostimulatory activity of trilobolide and method of preparation thereof. International Application Number: PTC/CZ2008/000083; International Publication Number: WO 2009/010021 A1.
- Kukić J, Popović V, Petrović S, Mucaji P, Ćirić A, Stojković D, Soković M. Antioxidant and antimicrobial activity of *Cynara cardunculus* extracts. Food Chem. 2008;107:861-868.
- Kuprevič VF. Lekarstvenije rasteniju i ih primenije. Uredili: Jurkevič ID, Mišenin ID. Minsk: Izdateljstvo „Nauka i tehnika“; 1974, str. 520-521.
- Le Bars D, Gozariu M, Cadden SW. Animal models of nociception. Pharmacol Rev. 2001;53:597-652.
- Lee J-C, Lim K-T. Effects of cactus and ginger extracts as dietary antioxidants on reactive oxidant and plasma lipid levels. Food Sci Biotechnol. 2000;9:83-88.
- Liao CR, Kao CP, Peng WH, Chang YS, Lai SC, Ho YL. Analgesic and anti-inflammatory activities of methanol extract of *Ficus pumila* L. in mice. Evid-Based Compl Alt. 2012;ID340141,9 pages.
- Luximon-Ramma A, Bahorun T, Soobrattee MA, Aruoma OI. Antioxidant activities of phenolic, proanthocyanidin, and flavonoid components in extracts of *Cassia fistula*. J Agric Food Chem. 2002;50:5042-5047.
- Madhavan BN. Final report on the safety assesment of bisabolol. Int J Toxicol. 1999;18:33-40.
- Martens S, Mithöfer A. Flavones and flavone synthases. Phytochemistry. 2005;66:2399-2407.
- Menegazzi M, Di Paola R, Mazzon E, Muia C, Genovese T, Crisafulli C, Suzuki H, Cuzzocrea S. *hypreicum perforatum* attenuates the development of carrageenan-induced lung injuru in mice. Frre Rad Biol Med. 2006;40:740-753.
- Merfort I. Review of the analytical techniques for sesquiterpenes and sesquiterpene lactones. J Chrom A. 2002;967:115-130.
- Merfort I. Perspectives on sesquiterpene lactones in inflammation and cancer. Curr Drug Targets. 2011;12:1560-1573.
- Micevski K, *Laserpitium* L. U: Flora na Republika Makednoija, Tom I (6), Uredio: Matevski V. Skopje: Makednoska Akademija na Naukite i Umetnostite, 2005; str. 1647-1650.
- Milosavljević S, Bulatović V, Stefanović M. Sesquiterpene lactones from the Yugoslavian wild growing plant families Asteraceae and Apiaceae. J Serb Chem Soc. 1999;64:397-442.
- Milosavljević S. Strukturne instrumentalne metode. Beograd: Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu; 2004, str.108-172.

Miski M, Mabry TJ. New daucane esters from *Ferula tingitana*. J Nat Prod. 1986;49:657-660.

Moldt P, Smitt UW, Brogger Christensen S. A new sesquiterpene from *Laserpitium latifolium*. J Nat Prod. 1987;50:974-975.

Morris CJ. Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse. U: Inflammation Protocols (Methods in Molecular Biology), Uredili: Winyard PG, Willoughby DA. New Jersey, Totowa: Humana Press Inc; 2003, str. 115–123.

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods. 1983;65:55-63.

Motl O. Plant substances. XXXVI. Components of *Laserpitium siler* fruits. Coll Czech Chem Comm. 1973;38:3737-3741.

Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over 30 years from 1981 to 2010. J Nat Prod. 2012;75:311-355.

Nikolić V. Rod *Laserpitium* L. U: Flora SR Srbije, Tom V, Uredio: Josifović M. Beograd: Srpska akademija nauka i umetnosti; 1973, str. 308-313.

Nikolić V. Fam. Apiaceae U: Flora SR Srbije, Tom IX, Uredio: Josifović M. Beograd: Srpska akademija nauka i umetnosti; 1977, str. 144-150.

Nuñez ZO, Salabarría IS, Collado IG, Hernaney-Galan R. Sesquiterpenes from the wood of *Juniperus lucayana*. Phytochemistry. 2007;68:2409-2414.

Ojeda-Sana AM, van Baren CM, Elechosa MA, Juarez MA, Moreno S. New insights into antibacterial and antioxidant activities of rosemary essential oils and their main components. Food Control. 2013;31:189-195.

Olajide OA, Makinde JM, Awe SO. Effects of aqueous extract of *Bridelia ferruginea* stem bark on carrageenan-induced oedema and granuloma tissueformation on rats and mice. J Ethnopharm. 1999;66:113-117.

Orhan I, Küpeli E, Aslan M, Kartal M, Yesilada E. Bioassay-guided evaluation of anti-inflammatory and antinociceptive activities of pistachio, *Pistacia vera* L. J Ethnopharm. 2006;105:235-240.

Petrović S, Maksimović Z, Kundaković T. Analiza sastojaka biljnih droga. Beograd: Farmaceutski fakultet Univerziteta u Beogradu; 2009, str. 48-59.

Randall LO, Selitto JJ. A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. Arch Int Pharmacodyn Ther. 1957;111:409–419.

Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK. Pharmacology, Fifth edition. Edinburgh, London, New York, Oxford, Philadelphia, St Louis, Sydney, Toronto: Churchill Livingstone; 2003, str. 217-260.

Rasoul MAA, Marei GIK, Abdelgaleil SAM. Evaluation of antibacterial properties and biochemical effects of monoterpenes on plant pathogenic bacteria. Afr J Microbiol Res. 2012;6:3667-3672.

Rivas da Silva AC, Monteiro Lopes P, Barros de Azevedo MM, Machado Costa DC, Sales Alviano C, Sales Alviano D. Biological activities of α -pinene and β -pinene enantiomers. *Molecules*. 2012;17:6305-6316.

Rocha NF, Rios ER, Carvalho AM, Cerqueira GS, Lopes AA, Leal LK, Dias ML, de Sousa DP, de Sousa FC. Anti-nociceptive and anti-inflammatory activities of (-)- α -bisabolol in rodents. *N-S Arch Pharm*. 2011;384:525-533.

Rutovskii BN, Makarova-Semlyanska N. Investigation of the essential oil of *Laserpitium hispidum* MB. *Trudy Nauchn Khim-Farmatsev Inst*. 1930;22:85-94.

Rychlewska U, Hodgson DJ, Holub M, Buděšinský M, Smitalova Z. The structure of 2-oxo-8 α -angeloyloxy-11 α -acetoxy-5 β H,6 α H,7 α H-guai-1(10),3-dien-6,12-olide, a sesquiterpenic lactone from *Laserpitium prutenicum* L. Revision of the stereostructures of native 2-oxoguai-1(10),3-dien-6,12-olides from the species of the Umbelliferae family. *Coll Czech Chem Commun*. 1985;50:2607-2624.

Saklani A, Kutty SK. Plant-derived compounds in clinical trials. *Drug Discov Today*. 2008;13:161-171.

Salminen A, Lehtonen M, Suuronen T, Kaarniranta K, Huuskonen J. Terpenoids: natural inhibitors of NF- κ B signaling with anti-inflammatory and anticancer potential. *Cell Mol Life Sci*. 2008;65:2979-2999.

Dos Santos MD, Almeida MC, Lopes NP, de Souza GEP. Evaluation of the anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of the natural polyphenol chlorogenic acid. *Biol Pharm Bull*. 2006;29:2236-2240.

Sarić M, Diklić V. (urednici) *Flora SR Srbije*, Tom X Beograd: Srpska akademija nauka i umetnosti; 1986, str. 287-305.

Sato Y, Suzaki S, Nishikawa T, Kihara M, Shibata H, Higuti T. Phytochemical flavones isolated from *Scutellaria barbata* and antibacterial activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Ethnopharmacol*. 2000;72:483-488.

Seyoum A, Asres K, El-Fiky FK. Structure-radical scavenging relationship activity of flavonoids. *Phytochemistry*. 2006;67:2058-2070.

Siedle B, García-Pineros AJ, Murillo R, Schulte-Mönting J, Castro V, Rüngeler P, Klaas CA, Da Costa FB, Kisiel W, Merfort I. Quantitative structure-activity relationship of sesquiterpene lactones as inhibitors of the transcription factor NF- κ B. *J Med Chem*. 2004;47:6042-6054.

Simonović D. *Botanički rečnik*. Beograd: Srpska akademija nauka i umetnosti, Posebna izdanja, knjiga CCCXVIII, Institut za srpskohrvatski jezik, knjiga 3; 1959, str. 262-263.

Singh S, Khajuria A, Taneja SC, Johri RK, Singh J, Qazi GN. Boswellic acids: A leukotriene inhibitor also effective through topical application in inflammatory disorders. *Phytomedicine*. 2008;15:400-407.

- Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, Warren JT, Boeksch HM, Kenney S, Boyd MR. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Natl Cancer I.* 1990;82:1107-1112.
- Smitalova Z, Buděšinský M, Šaman D, Vašičkova S, Holub M. Components of the extract from the underground parts of *Laserpitium siler* L. of slovenian origin, mainly sesquiterpene lactones. *Coll Chech Chem Commun.* 1984;49:852-870.
- Smitalova Z, Buděšinský M, Šaman D, Holub M. Minor sesquiterpenic lactones of *Laser trilobum* (L.) Borkh. species. *Collect Czech Chem Commun.* 1985;51:1323-1339.
- Süntar I, Küpeli Akkol E, Keles H, Yesilada E, Sarker SD. Exploration of the wound healing potential of *Helichrysum graveolens* (Bieb.) Sweet: Isolation of apigenin as an active component. *J Ethnopharmacol.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2013.06.006>
- Stefanović M, Mladenović S, Đermanović M, Jeremić D. Sesquiterpene lactones from *Laserpitium siler* L. (Umbelliferae). *Bull Soc Chim Beo.* 1977;42:639-647.
- Stepanović-Petrović RM, Micov AM, Tomić MA, Ugrešić ND. Local peripheral antihyperalgesic effect of levetiracetam and its mechanism of action in an inflammatory pain model. *Anesth Analg.* 2012;115:1457-1466.
- Stevanović V, Niketić M, Lakušić D. Distribution of the vascular plants in Yugoslavia (Serbia, Montenegro) and Macedonia. I. *Glasnik Instituta za botaniku i Botaničke bašte Univerziteta u Beogradu, Beograd* 1993;24-25:33-54.
- Sticher O. Ätherische Öle und Drogen, die ätherisches Öl enthalten. U: *Pharmacognosie – Phytopharmazie.* Uredili: Hänsel R, Sticher O. Heidelberg: Springer Medizin Verlag. 2007, str. 1086-1087.
- Stojković D, Soković M, Glamočlija J, Džamić A, Ćirić A, Ristić M, Grubišić D. Chemical composition and antimicrobial activity of *Vitex agnus-castus* L. fruits and leaves essential oil. *Food Chem.* 2011;128:1017-1022.
- Szőllősi R, Szőllősi Varga I. Total antioxidant power in some species of Labiatae (Adaptation of FRAP method). *Acta Biol Szeged.* 2002;46:125-127.
- Sweetman SC. *Martindale – The Complete Drug Reference*, 35th edition. London: The Pharmaceutical Press, 2007, str 1-3322.
- Tadić VM, Dobrić S, Marković GM, Bojović D. Analysis of natural products – Sesquiterpene lactones as anti-inflammatory agents. U: *The Analysis of Pharmacologically Active Compounds and Biomolecules in Real Samples.* Uredio: Injac R. Kerala, India: Transworld research Network; 2009, str. 97-128.
- Takeoka GR, Dao LT. Antioxidant constituents of almond (*Prunus dulcis* (Mill.) D.A. Webb) Hulls. *J Agric Food Chem.* 2003;51:496-501.

Tallarida RJ, Murray RB. Manual of Pharmacologic Calculations with Computer Programs, second ed. New York, Berlin, Heidelberg, London, Paris, Tokyo: Springer Verlag. 1986, str. 1-297.

Tatli II, Akdemir ZS, Yesilada E, Kupeli E. Anti-inflammatory and antinociceptive potential of major phenolics from *Verbascum salviifolium* Boiss. Z Naturforsch C. 2008;63:196-202.

Thabrew MI, Dharmasiri MG, Senaratne L. Anti-inflammatory and analgesic activity in the polyherbal formulation Maharasnadhi Quathar. J Ethnopharmacol. 2003;85:261-267.

Timchuk KS. Gas chromatographic study of essential oils from plants. Izvestiya Akademii Nauk Moldavskoi SSR, Biologicheskie i Khimicheskie Nauki. 1981;6:73-77. [Na ruskom]

Tirillini B, Pagiotti R, Angelini P, Pintore G, Chessa M, Menghini L. Chemical composition and fungicidal activity of the essential oil of *Laserpitium garganicum* from Italy. Chem Nat Compd. 2009;45:103-105.

Tomić MA, Vučković SM, Stepanović-Petrović RM, Ugrešić N, Prostran MS, Bošković B. The anti-hyperalgesic effects of carbamazepine and oxcarbazepine are attenuated by treatment with adenosine receptor antagonists. Pain. 2004;111:253-260.

Tomić M. Efekti okskarbazepina u eksperimentalnim modelima fazičnog i toničnog bola u miševa i pacova. Magistarska teza, Univerzitet u Beogradu – Medicinski fakultet, 2004, str. 18-70.

Tomić M, Stepanović-Petrović R. Terapija bola i glavobolje. U: Farmakoterapija za farmaceute. Uredili: Ugrešić N, Stepanović-Petrović R, Savić M. Beograd: Farmaceutski fakultet, 2011, 357-386.

Tshikalange TE, Meyer JJM, Hussein AA. Antimicrobial activity, toxicity and the isolation of a bioactive compound from plants used to treat sexually transmitted diseases. J Ethnopharmacol. 2005;96:515-519.

Tutin TG. *Laserpitium* L. U: Flora Europaea 2. Uredili: Tutin TG, Heywood VH, Burges NA, Moore DM, Valentine DH, Walters SM, Webb DA. Cambridge: Cambridge University Press; 1968, str. 368-370.

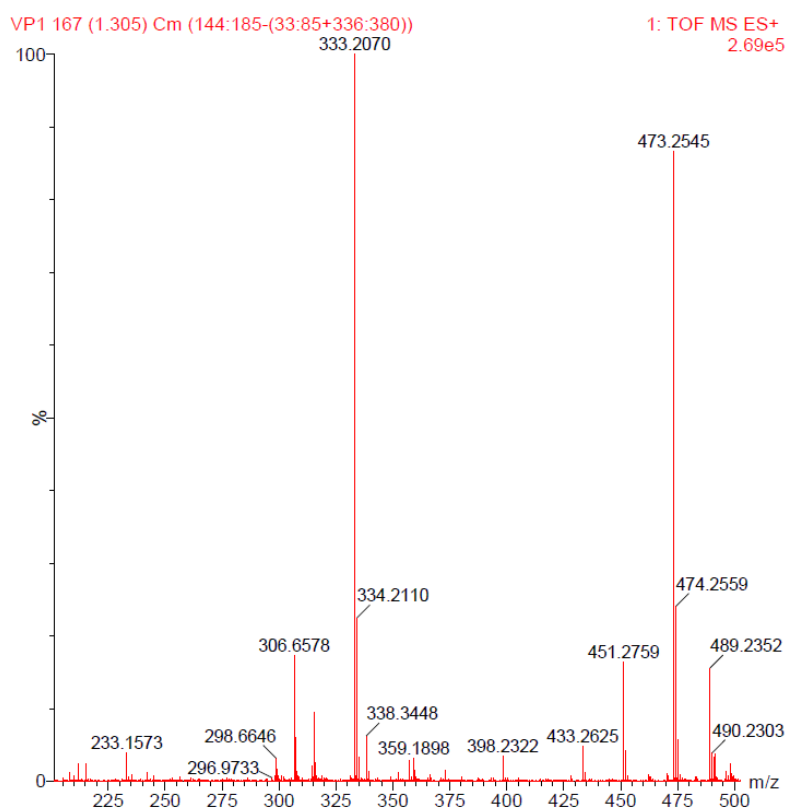
Ulrich-Merzenich G, Panek D, Zeitler H, Vetter H, Wagner H. Drug development from natural products: exploiting synergistic effects. Indian J Exp Biol. 2010;48:208-219.

Vajs V, Todorović N, Bulatović V, Menković N, Macura S, Juranić N, Milosavljević S. Further sesquiterpene lactones from *Anthemis carpatica*. Phytochemistry. 2000;54:625-633.

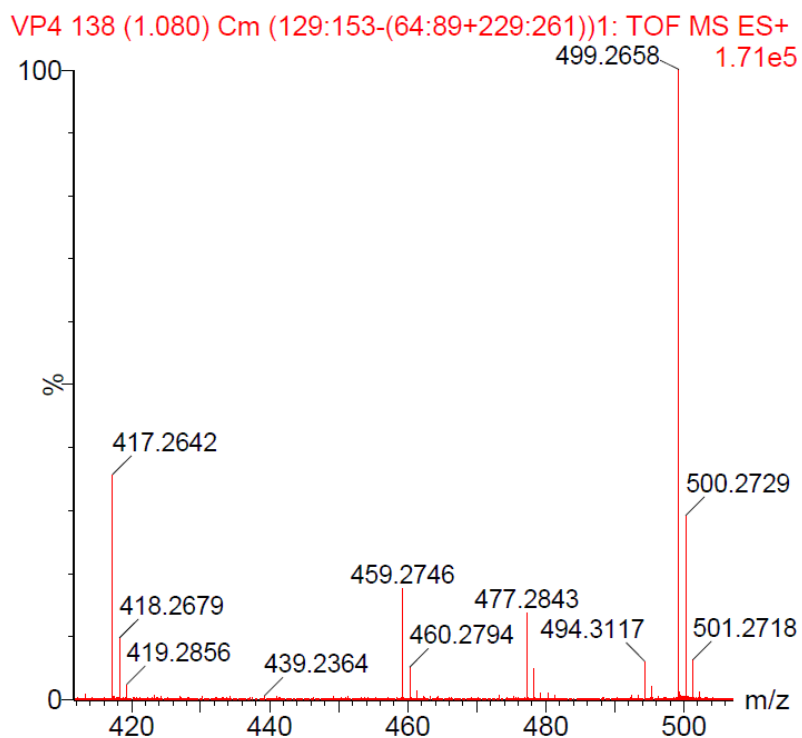
Van den Dool H, Kratz PD. A generalization of retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. J Chrom. 1963;11:463-471.

- Van Zyl RL, Seatholo ST, Van Vuuren SF, Viljoen AM. The biological activities of 20 nature identical essential oil constituents. *J Essent Oil Res.* 2006;129-133.
- Velioglu YS, Mazza G, Gao L, Oomah BD. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables and grain products. *J Agric Food Chem.* 1998;46:4113-4117.
- Vereskovskii VV, Kuznetsova ZP, Loznukho IV, Sokolov IV, Osokin DM. Phenolic compounds of *Laserpitium latifolium*. *Khim Prir Soedin.* 1992;6:724-726.
- Viljoen AM, Gono-Bwalya A, Gamatou GPP, Baser KHC, Demirci B. The essential oil composition and chemotaxonomy of *Salvia stenophylla* and its allies *S. repens* and *S. rucinata*. *J Essent Oil Res.* 2006;18:37-45.
- Wagner Smitt U, Cornett C, Andersen A, Brogger Christensen S. New proazulene guaianolides from *Thapsia villosa*. *J Nat Prod.* 1990;53:1479-1484.
- Wang M, Li J, Rangarajan M, Shao Y, LaVoie EJ, Huang TC, Ho CT. Antioxidative phenolic compounds from sage (*Salvia officinalis*). *J Agric Food Chem.* 1998;46:4869-4873.
- Williams DH, Fleming I. *Spectroscopic Methods in Organic Chemistry*, fifth ed. London: The Mc Graw Hill Companies; 1995, str. 28-169.
- Wu X, Zhang X, Zhang H, Su P, Li W, Li L, Wang Y, Liu W, Gao P, Zhou G. Progesteron receptor downregulates breast cancer resistance protein expression via binding to the progesterone responsive element in breast cancer. *Cancer Sci.* 2012;103:959-967.
- Yang RL, Yan ZH, Lu Y. Cytotoxic phenylpropanoids from carrot. *J Agric Food Chem.* 2008;56:3024-3027.
- Zhu X, Zhang H, Lo R. Phenolic compounds from the extract of artichoke (*Cynara scolymus* L.) and their antimicrobial activities. *J Agric Food Chem.* 2004;52:7272-7278.

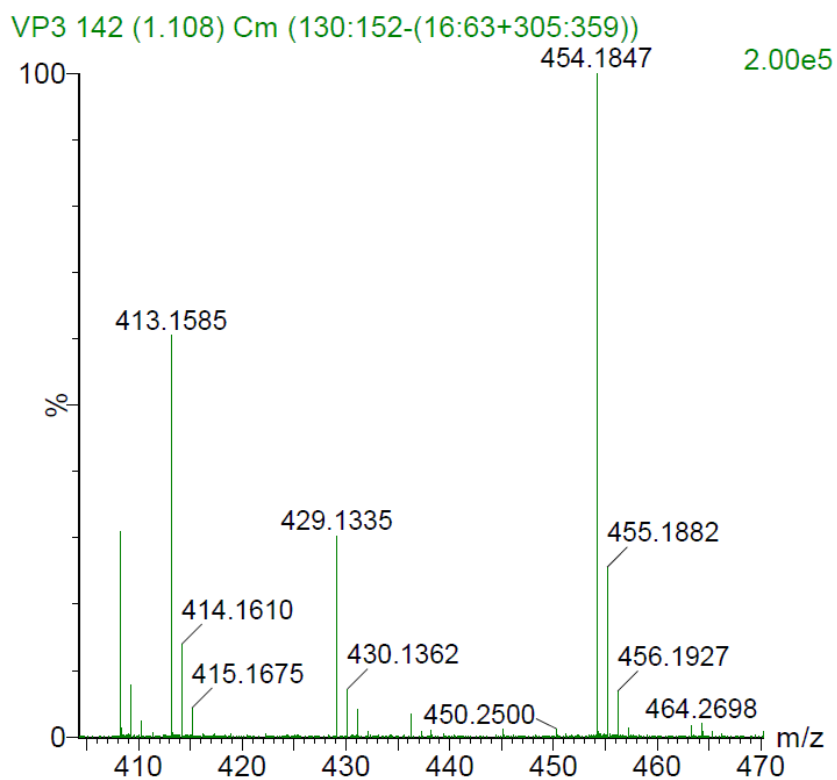
PRILOG



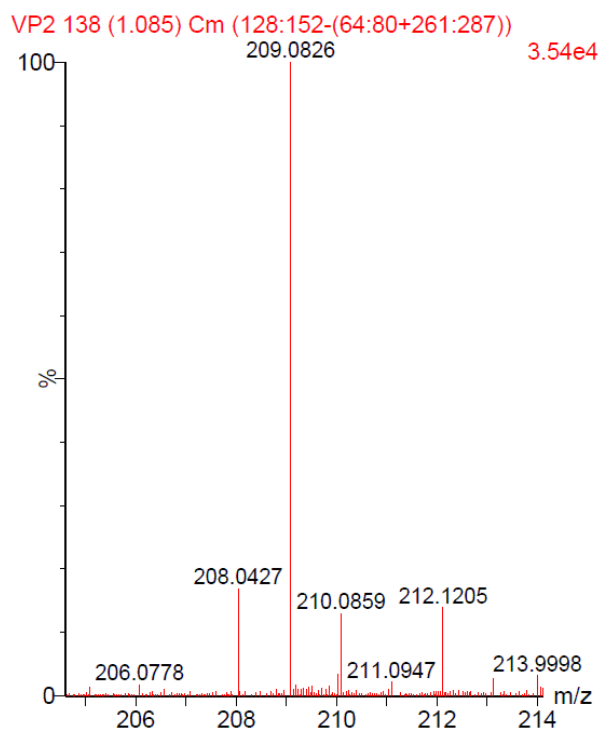
Slika 58. HR-MS (ESI⁺) spektar jedinjenja **1** (laserpicina)



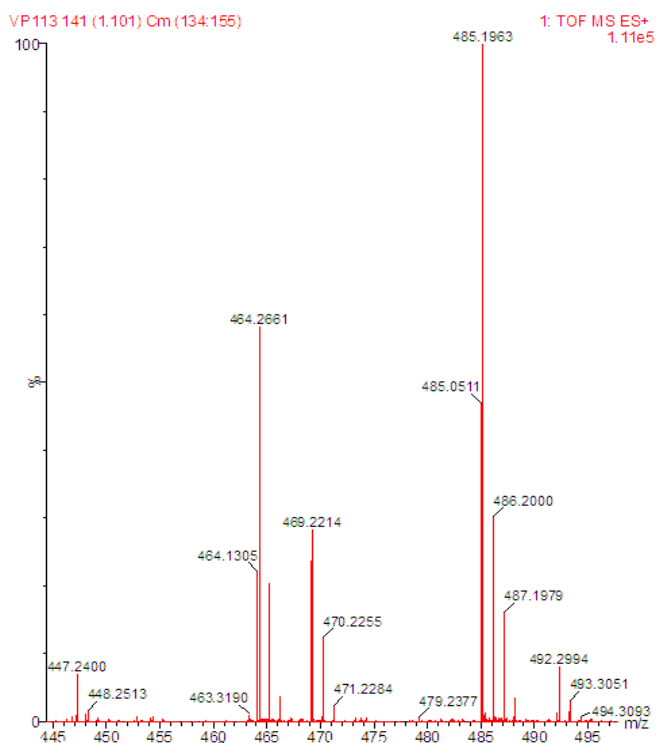
Slika 59. HR-MS (ESI⁺) spektar jedinjenja **2** (acetildezoksodehidrolaserpicina)



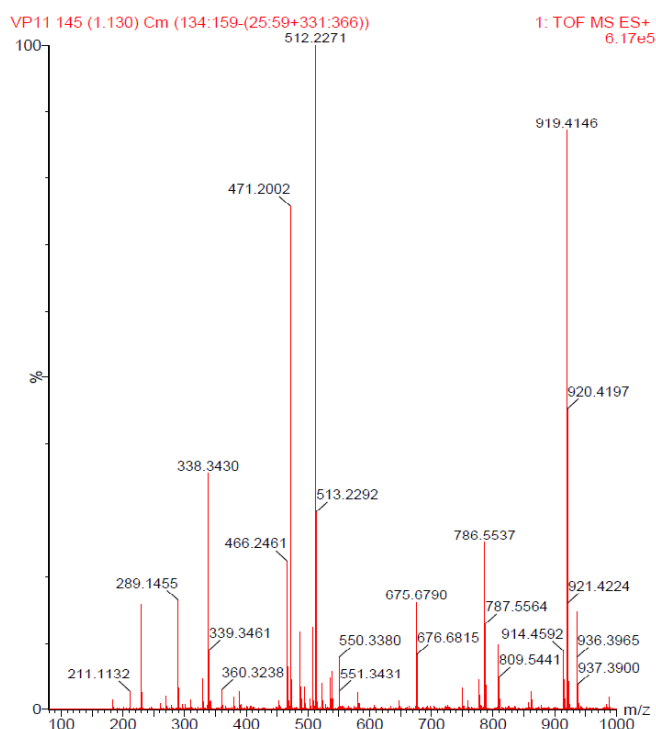
Slika 60. HR-MS (ESI⁺) spektar jedinjenja **3** (laserina)



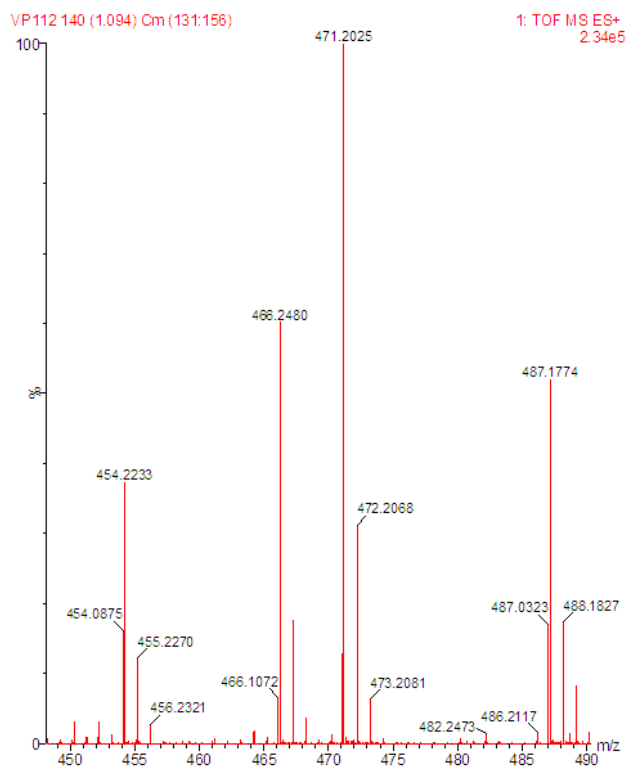
Slika 61. HR-MS (ESI⁺) spektar jedinjenja **4** (latifolona)



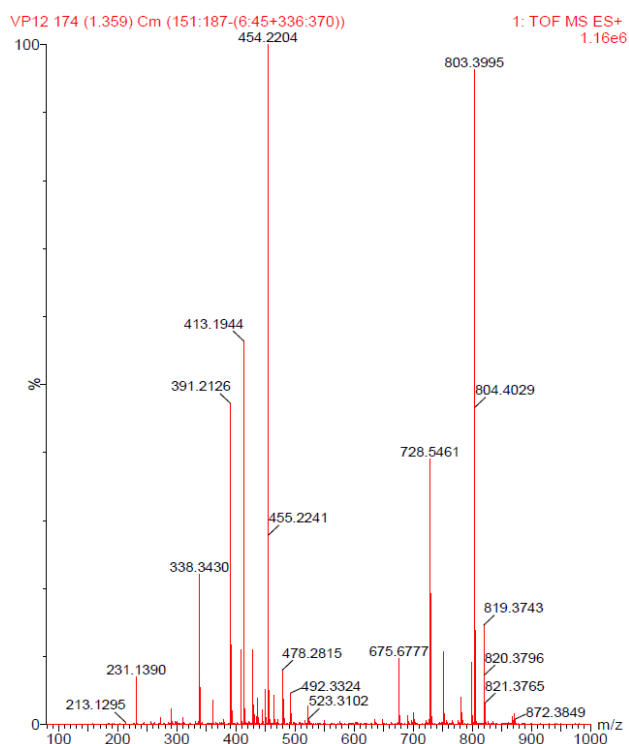
Slika 62. HR-MS (ESI⁺) spektar jedinjenja **5** – tarolida (8 α ,11 α -diangeloiloksi-10 β -hidroksi-6 α H,7 α H-gvajan-3-en-12,6-olid)



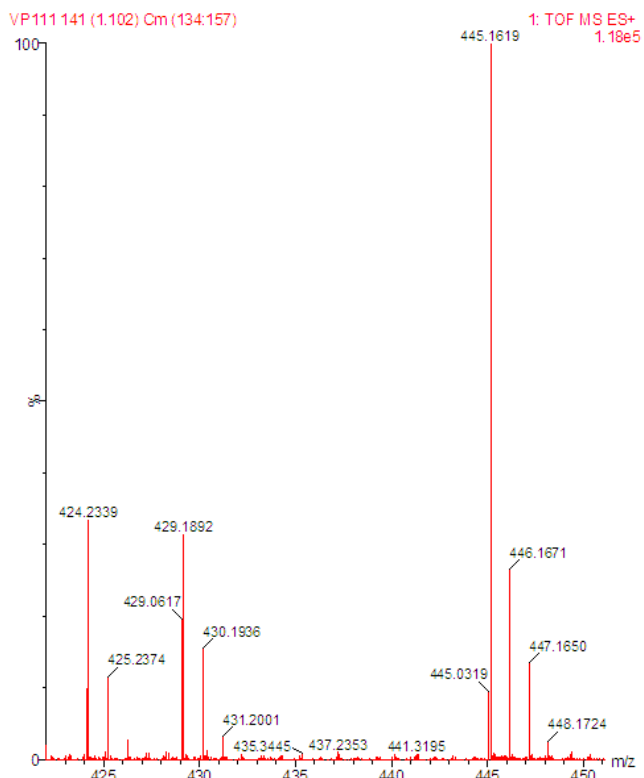
Slika 63. HR-MS (ESI⁺) spektar jedinjenja **6** (acetilizomontanolida, tj. 8 α -angeloiloksi-11 α ,10 β -diacetoksi-6 α H,7 α H-gvajan-3-en-12,6-olida)



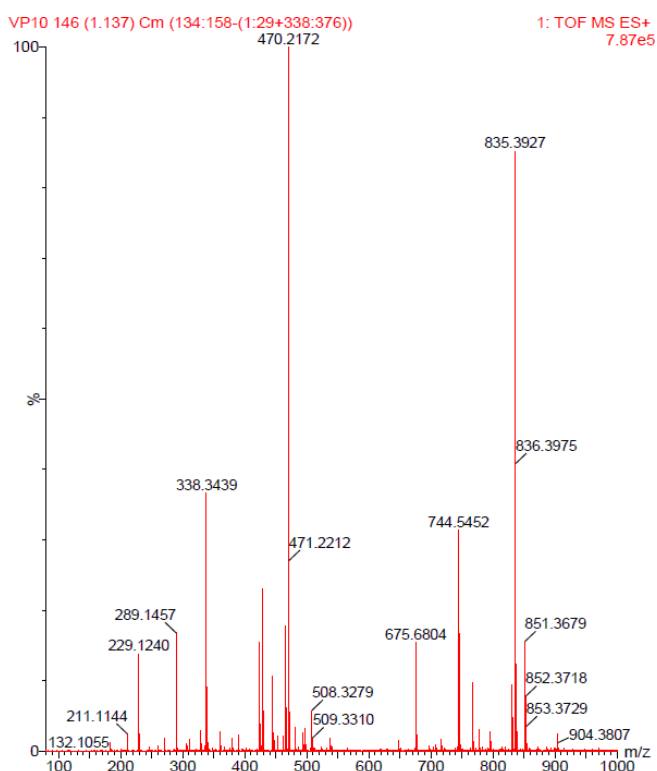
Slika 64. HR-MS (ESI⁺) spektar jedinjenja **7** (acetilmontanolida, tj. 8 α -senecioiloksi-11 α ,10 β -diacetoksi-6 α H,7 α H-gvajjan-3-en-12,6-olida)



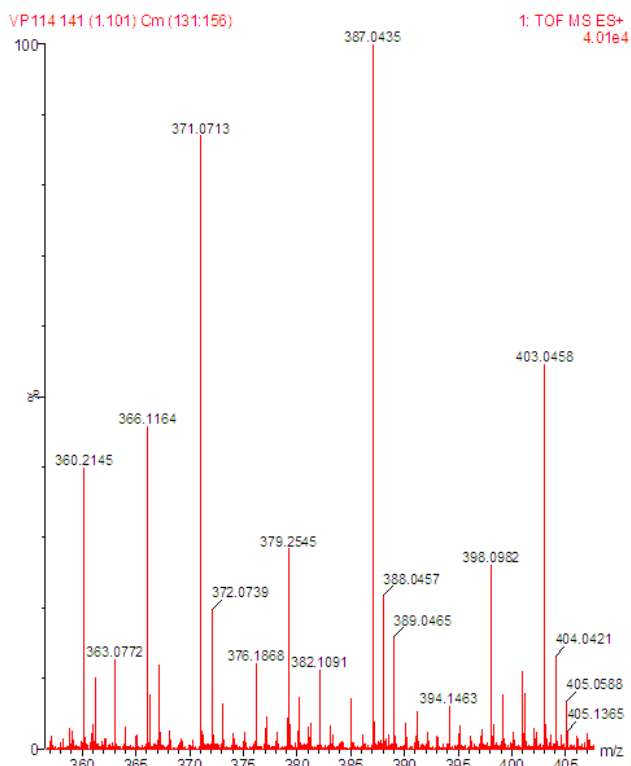
Slika 65. HR-MS (ESI⁺) spektar jedinjenja **8** (silerolida, tj. 1 β -acetoksi,11 α -senecioiloksi -6 α H,7 α H-eudezman-3-en-6,12-olida)



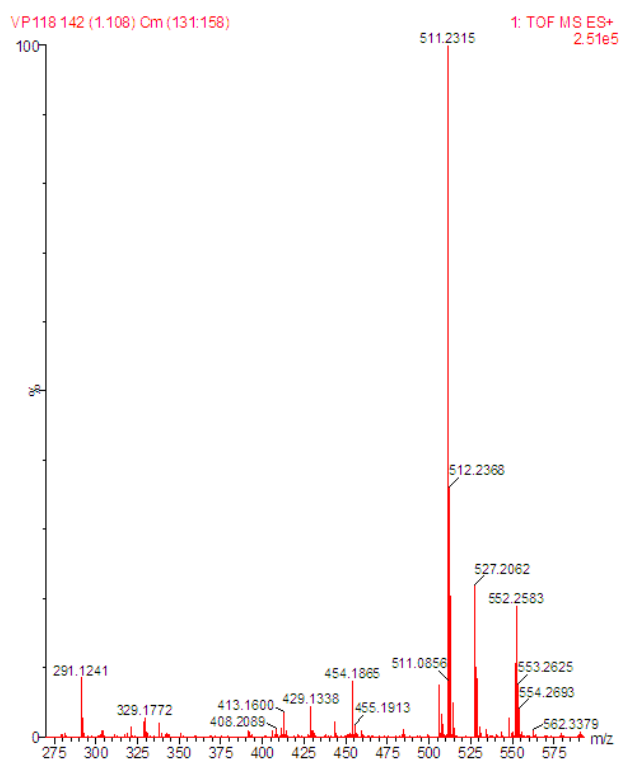
Slika 66. HR-MS (ESI⁺) spektar jedinjenja **9** (izomontanolida, tj. 8 α -angeloiloksi,11 α -acetoksi-10 β -hidroksi-6 α H,7 α H-gvajjan-3-en-12,6-olida)



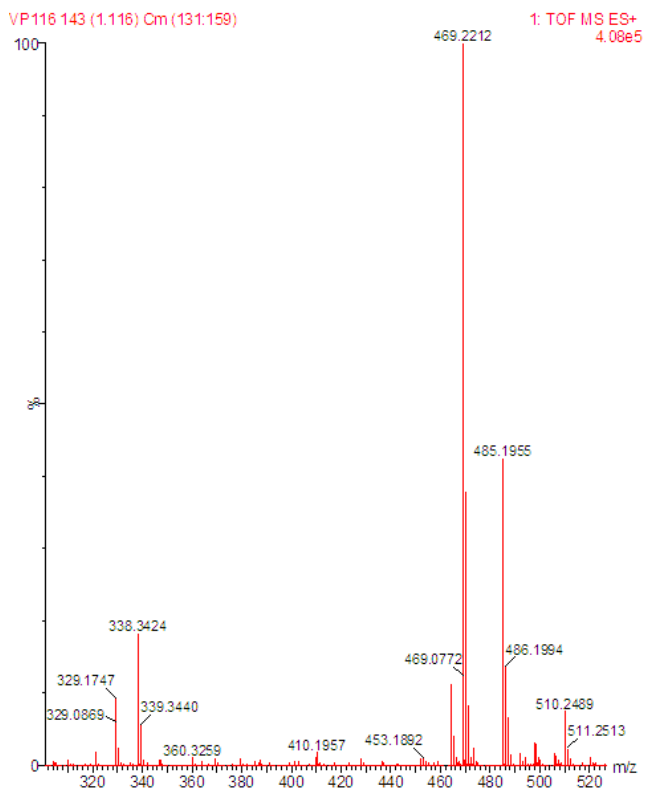
Slika 67. HR-MS (ESI⁺) spektar jedinjenja **10** (montanolida, tj. 8 α -senecioiloksi,11 α -acetoksi-10 β -hidroksi-6 α H,7 α H-gvajjan-3-en-12,6-olida)



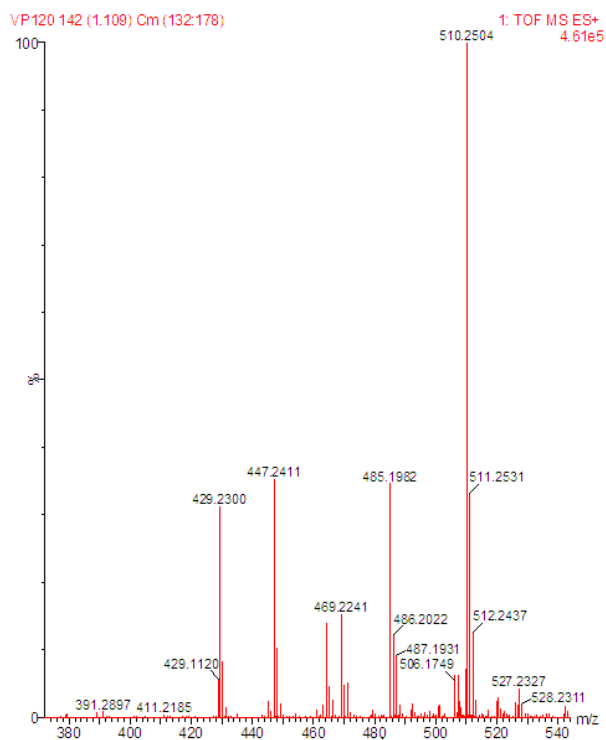
Slika 68. HR-MS (ESI⁺) spektar jedinjenja **11** (8 α -senecioiloksi,10 β -hidroksi-6 α H,7 α H-gvajjan-3-en-12,6-olida)



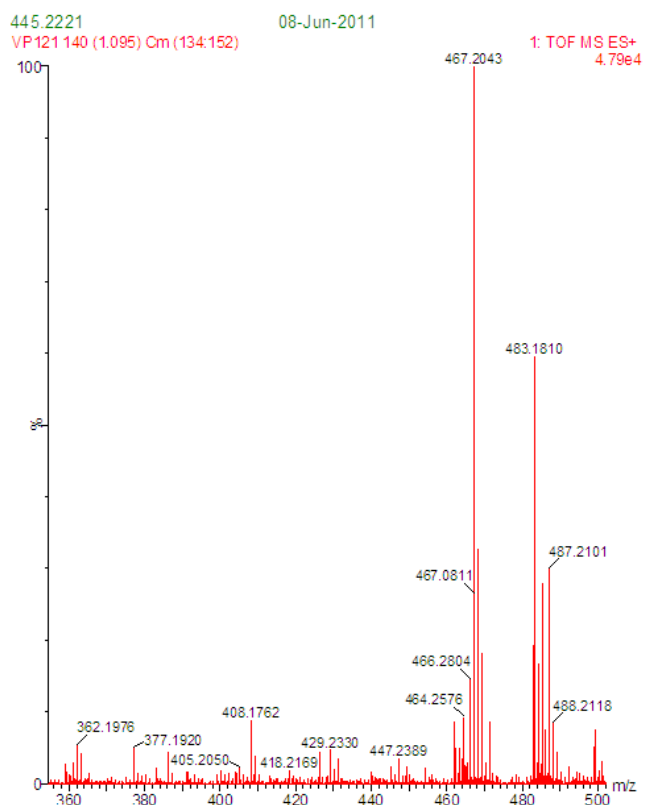
Slika 69. HR-MS (ESI⁺) spektar jedinjenja **12** (8 α -acetoksi-2 β ,10 β -diangeloiloksi-6 α H,7 α H-gvajjan-3-en-12,6-olida)



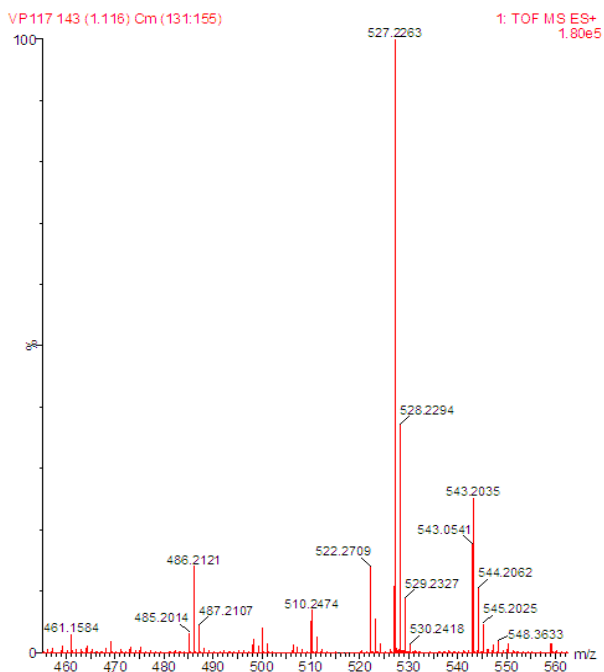
Slika 70. HR-MS (ESI⁺) spekter jedinjenja **13** (8 α ,2 β -diangeloiloksi-10 β -hidroksi-6 α H,7 α H-gvajan-3-en-12,6-olida)



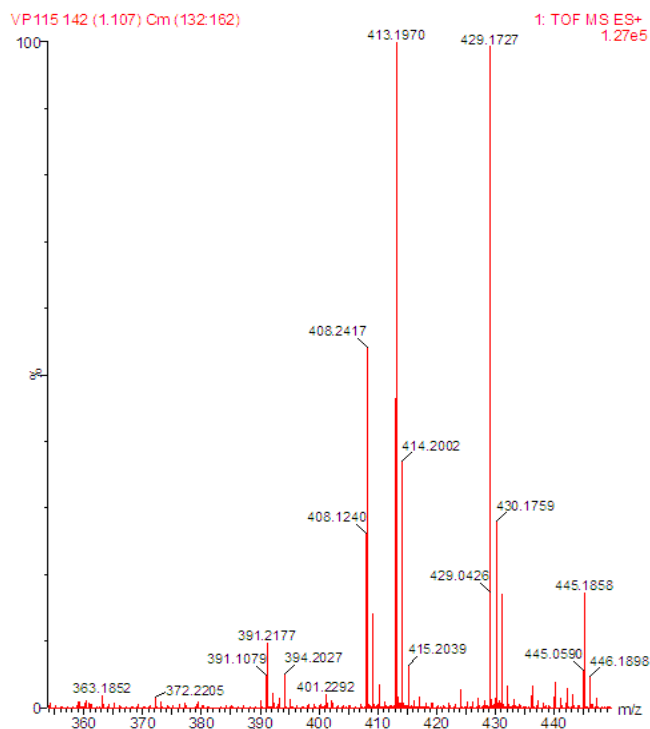
Slika 71. HR-MS (ESI⁺) spekter jedinjenja **14** (8 α -angeloiloksi,11 α -senecioiloksi-10 β -hidroksi-6 α H,7 α H-gvajan-3-en-12,6-olida)



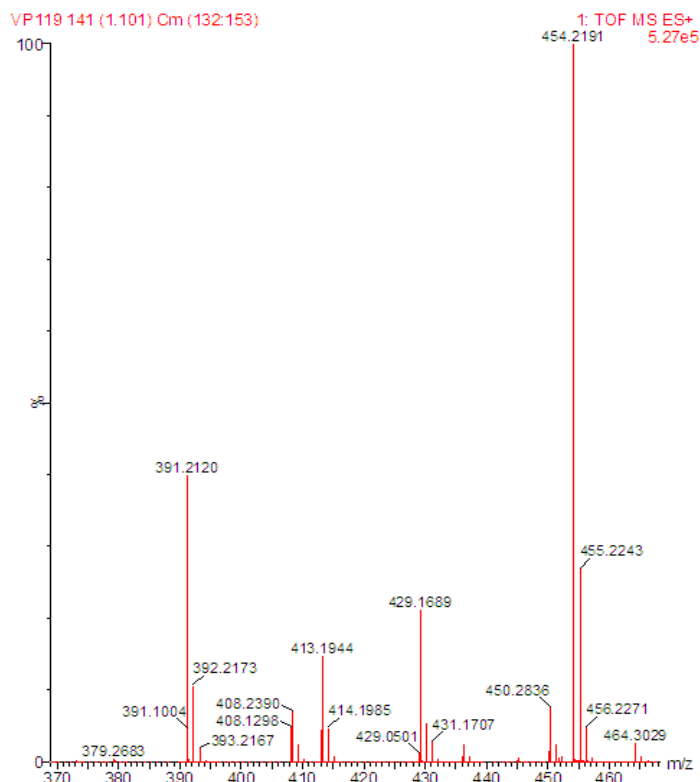
Slika 72. HR-MS (ESI⁺) spektar jedinjenja **15** (2 β ,8 α -diangeloiloksi-10 β -hidroksi-6 α H-gvajan-3,(7-11)-dien-12,6-olida)



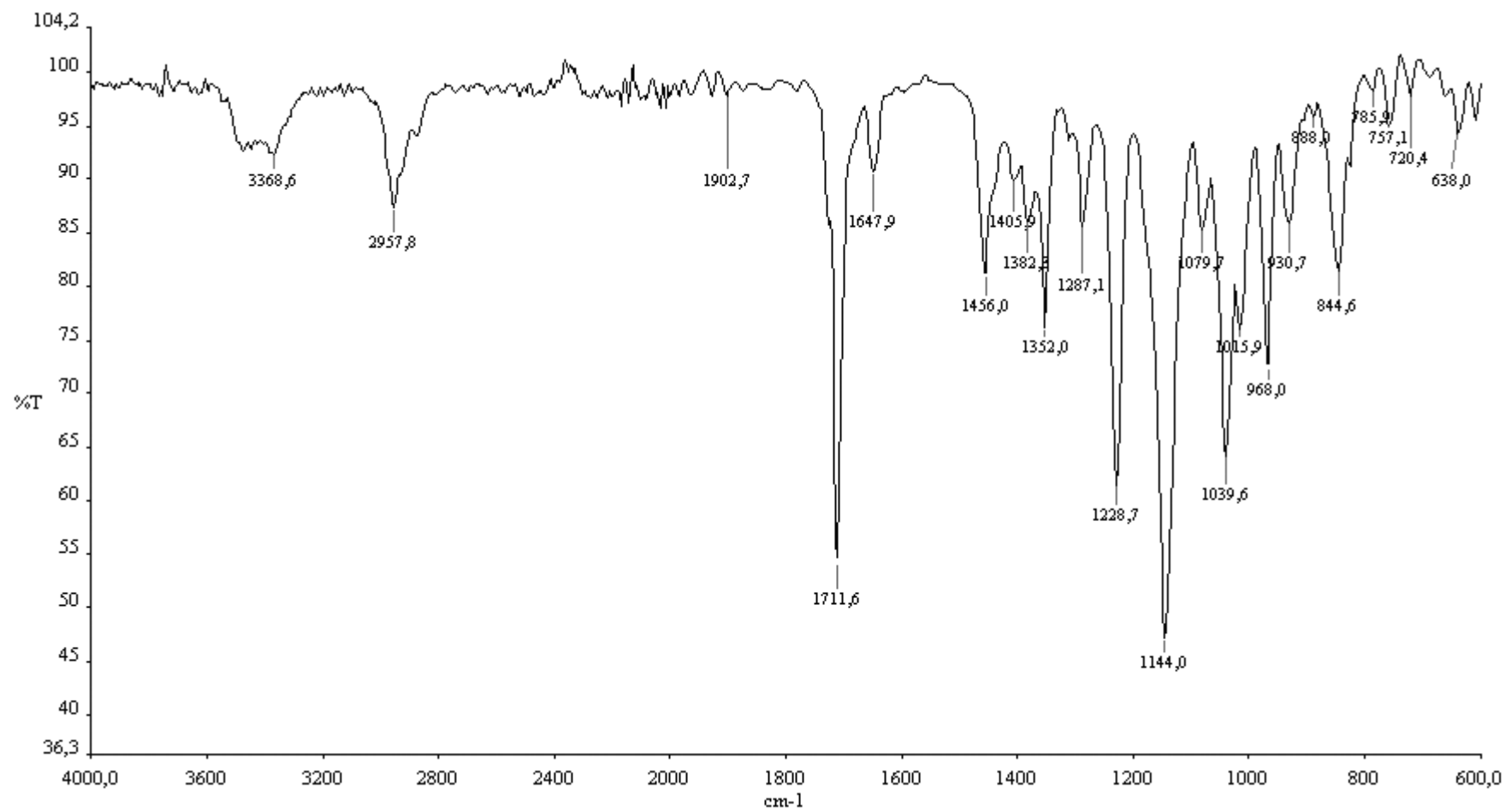
Slika 73. HR-MS (ESI⁺) spektar jedinjenja **16** (8 α -acetoksi-2 β ,11 α -diangeloiloksi-10 β -hidroksi-6 α H,7 α H-gvajan-3-en-12,6-olida)



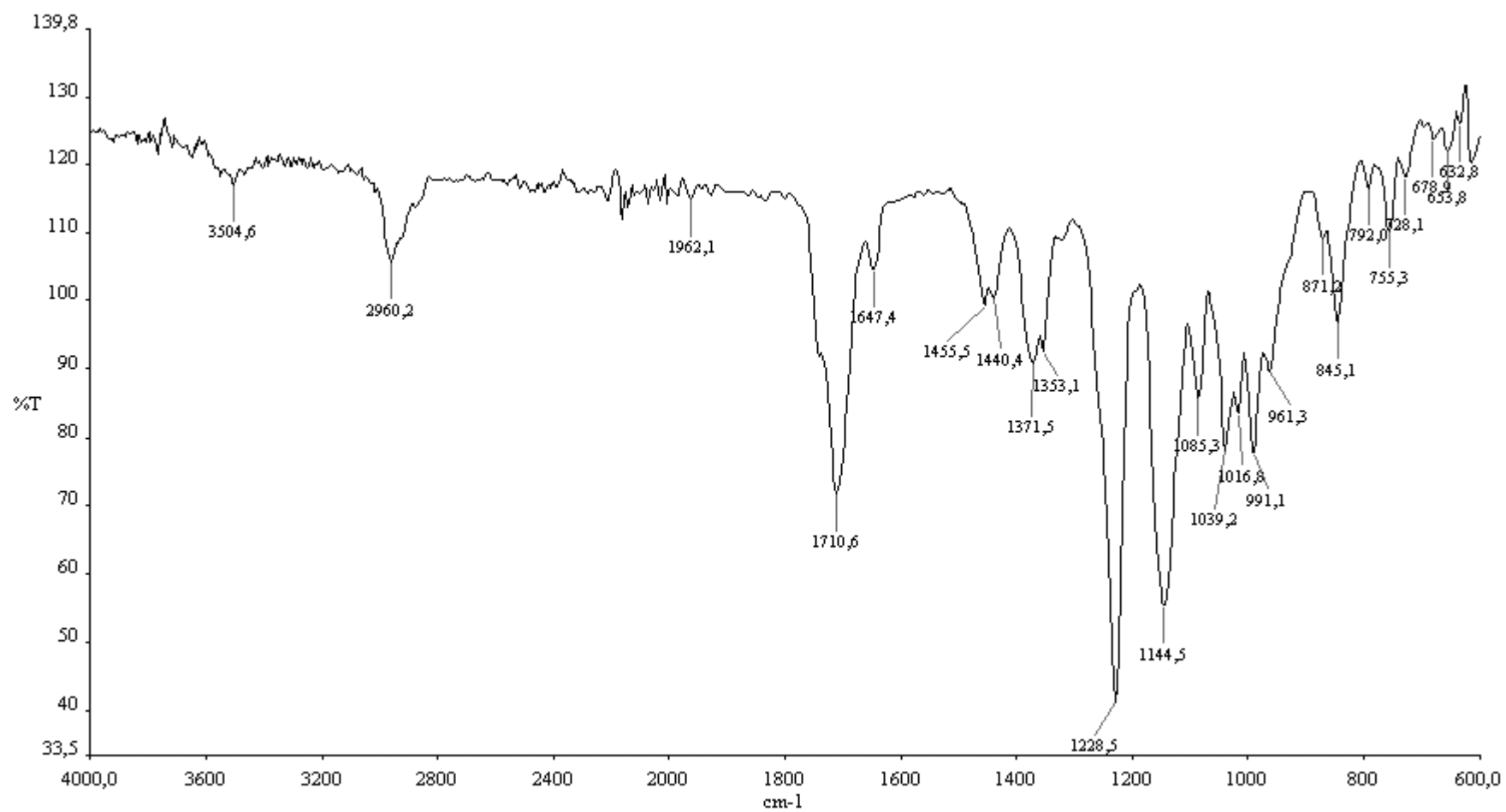
Slika 74. HR-MS (ESI⁺) spektar jedinjenja **17** (8 α -angeloiloksi-10 β -acetoksi-6 α H,7 α H-gvajan-3-en-12,6-olida)



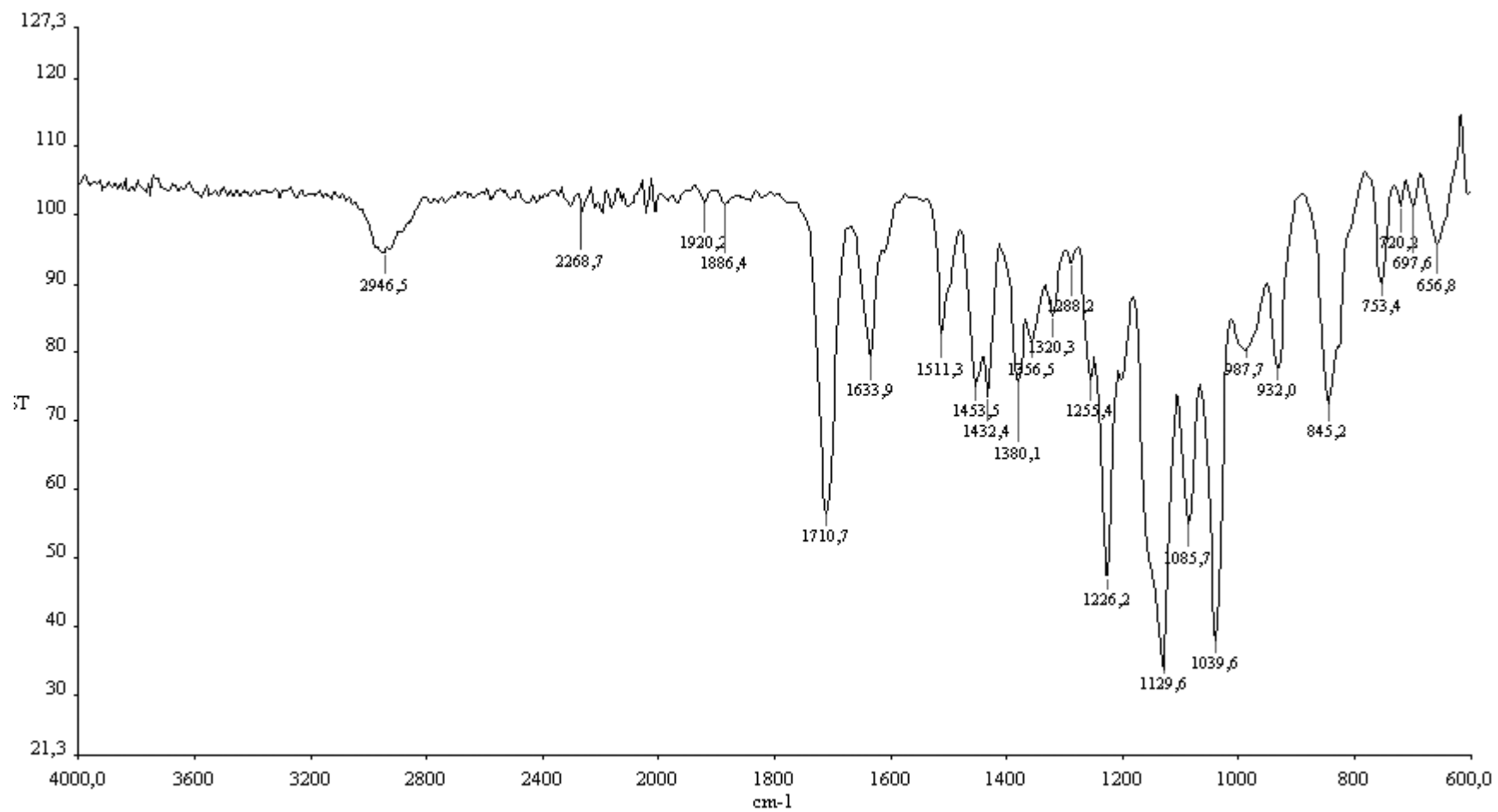
Slika 75. HR-MS (ESI⁺) spektar jedinjenja **18** (izosilerolida, tj. 2 β ,8 α -diangeloiloksi-10 β -hidroksi-6 α H-gvajan-3,(7-11)-dien-12,6-olida)



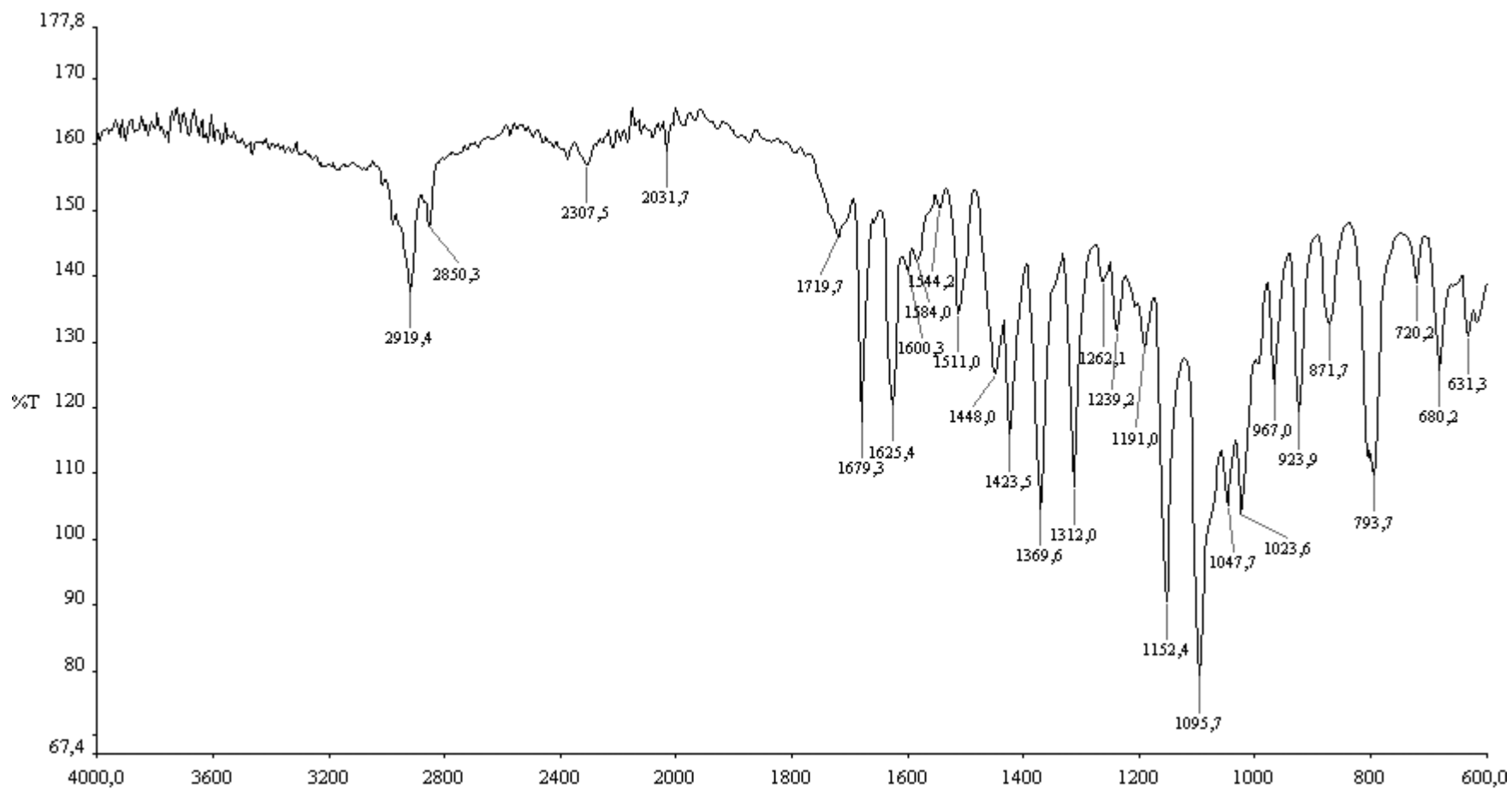
Slika 76. IR spektar jedinjenja 1 (laserpicina)



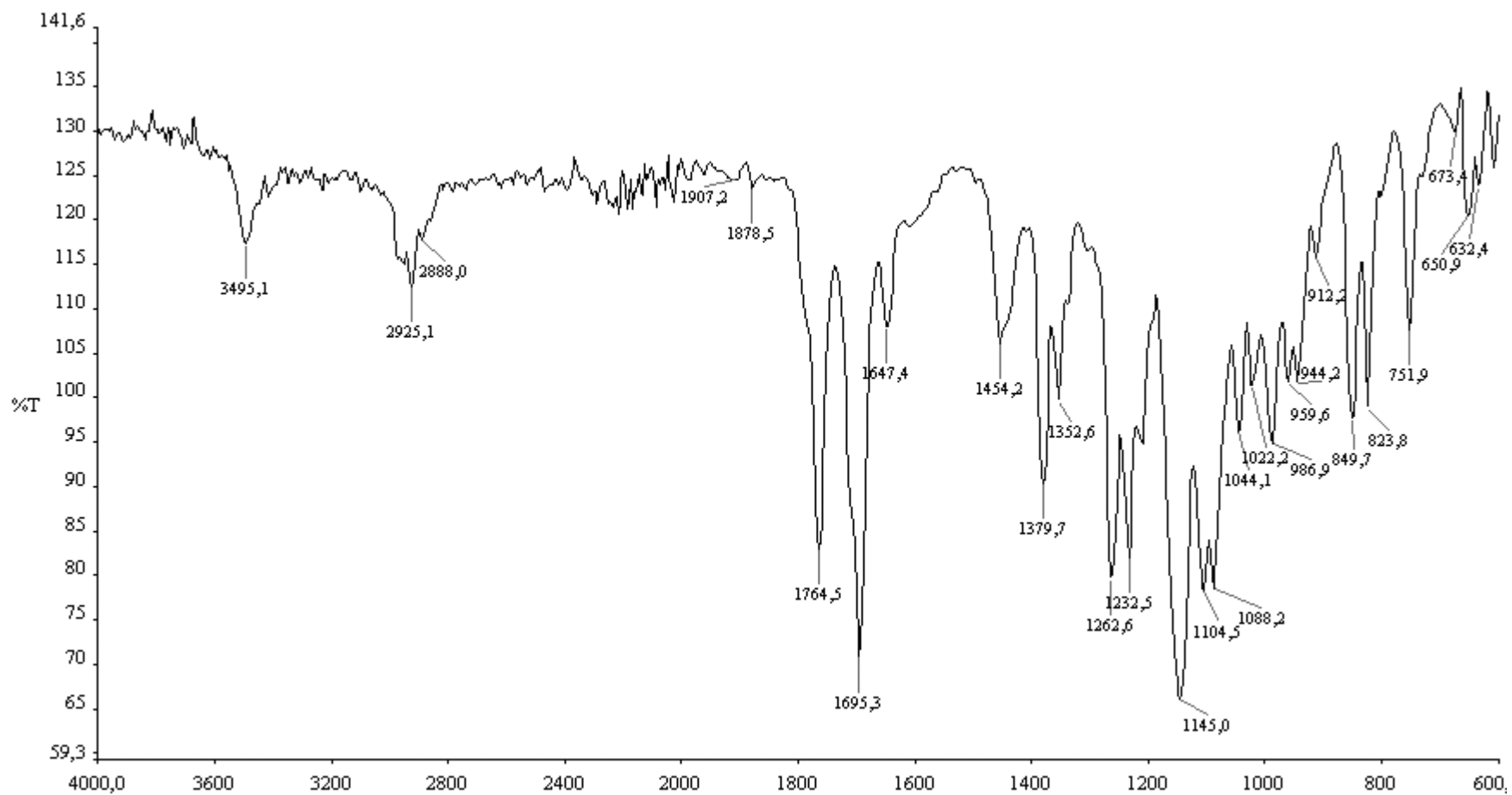
Slika 77. IR spektar jedinjenja 2 (acetildezoksodehidrolaserpicina)



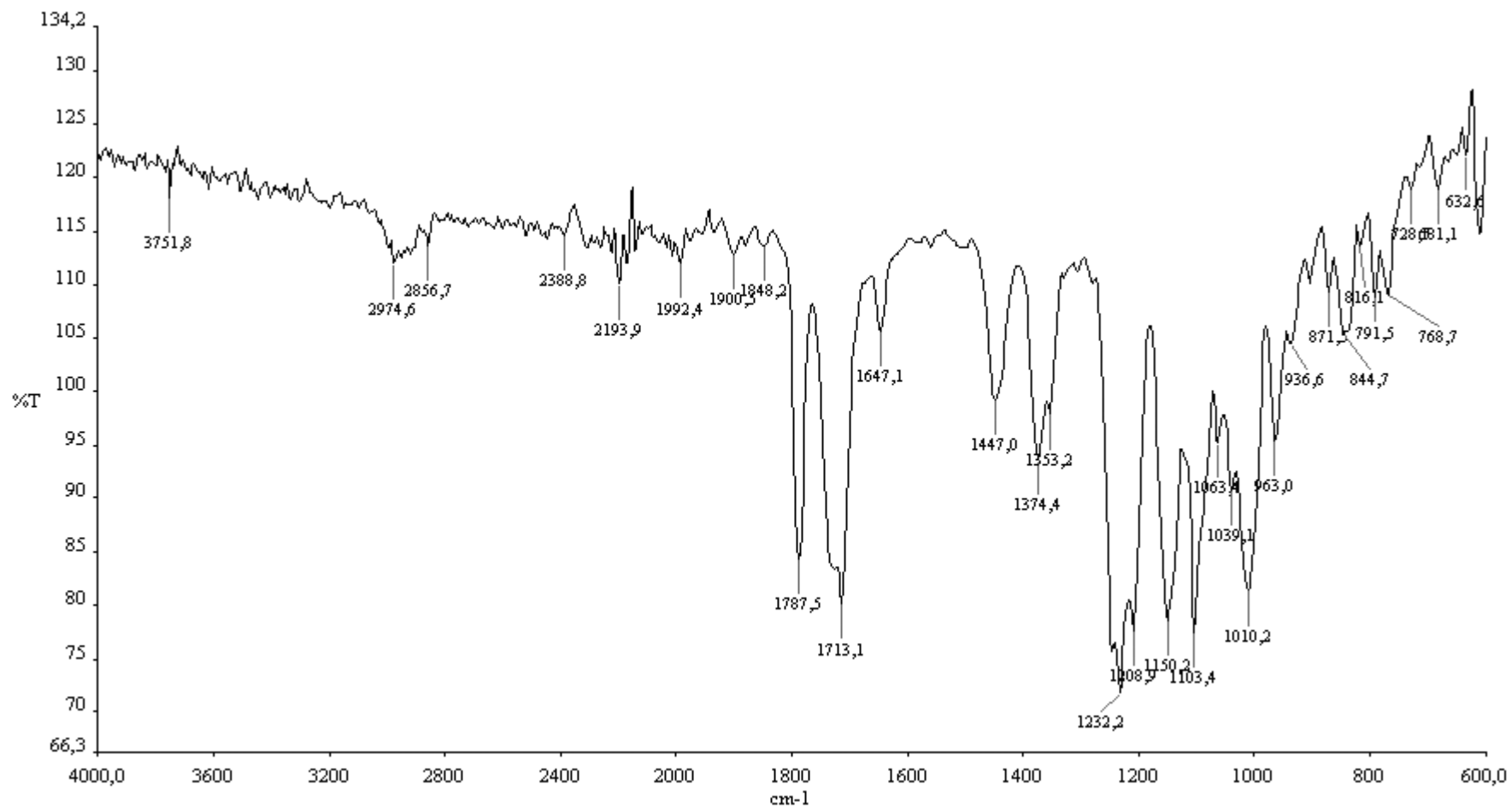
Slika 78. IR spektar jedinjenja 3 (laserina)



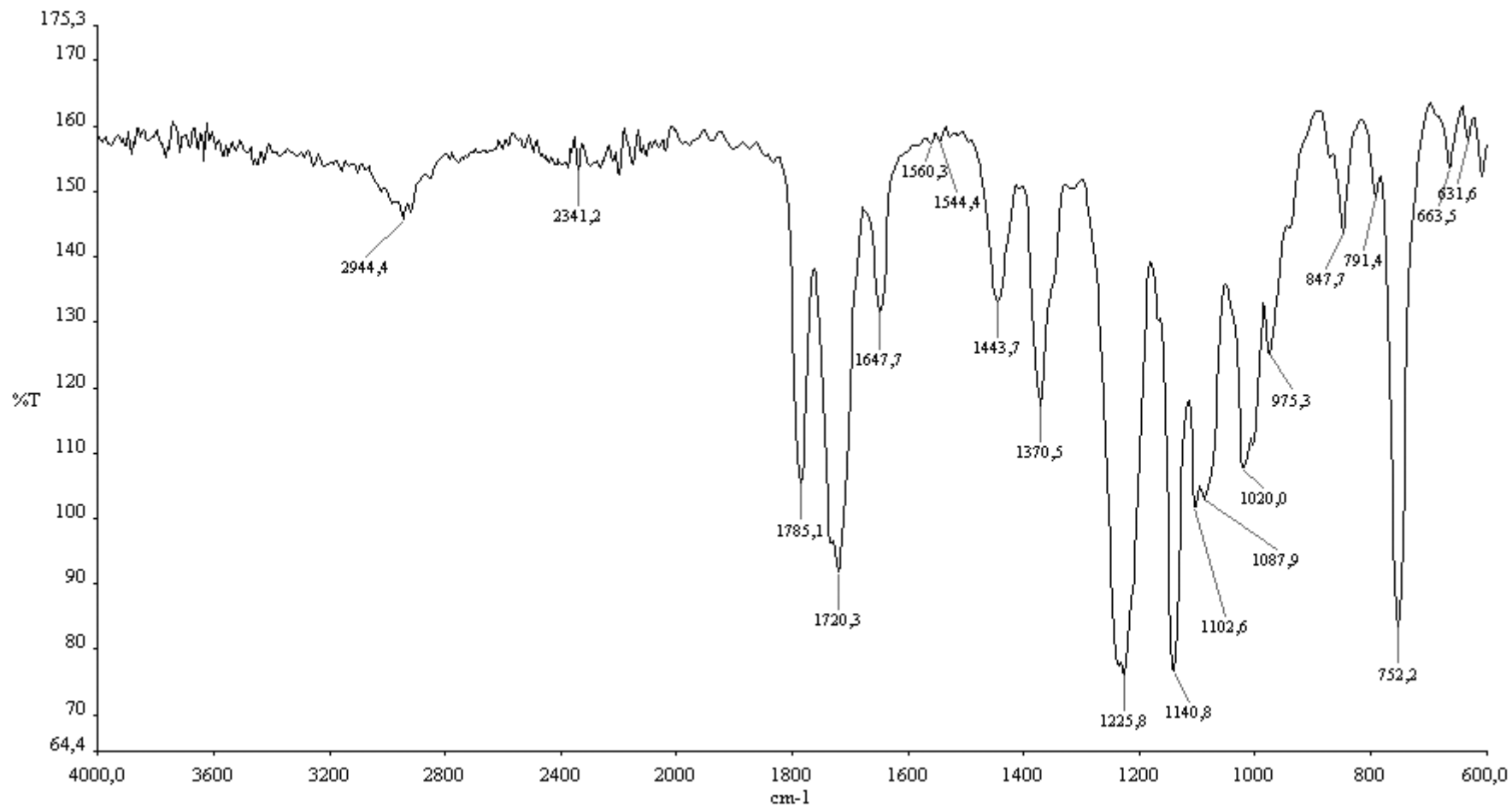
Slika 79. IR spektar jedinjenja **4** (latifolona)



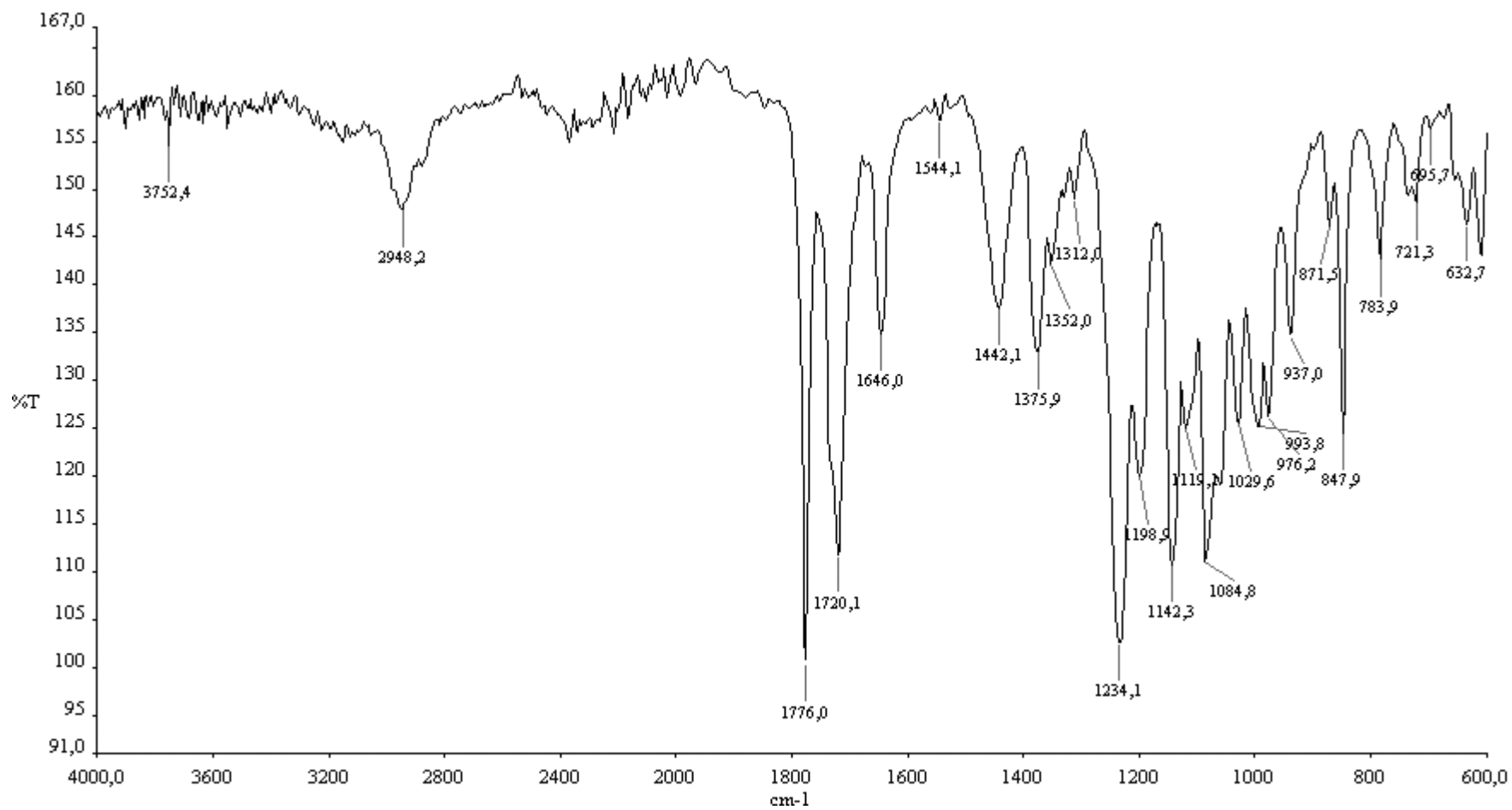
Slika 80. IR spektar jedinjenja **5** (tarolida, tj. $8\alpha,11\alpha$ -diangeloiloksi- 10β -hidroksi- $6\alpha H,7\alpha H$ -gvajan-3-en-12,6-olida)



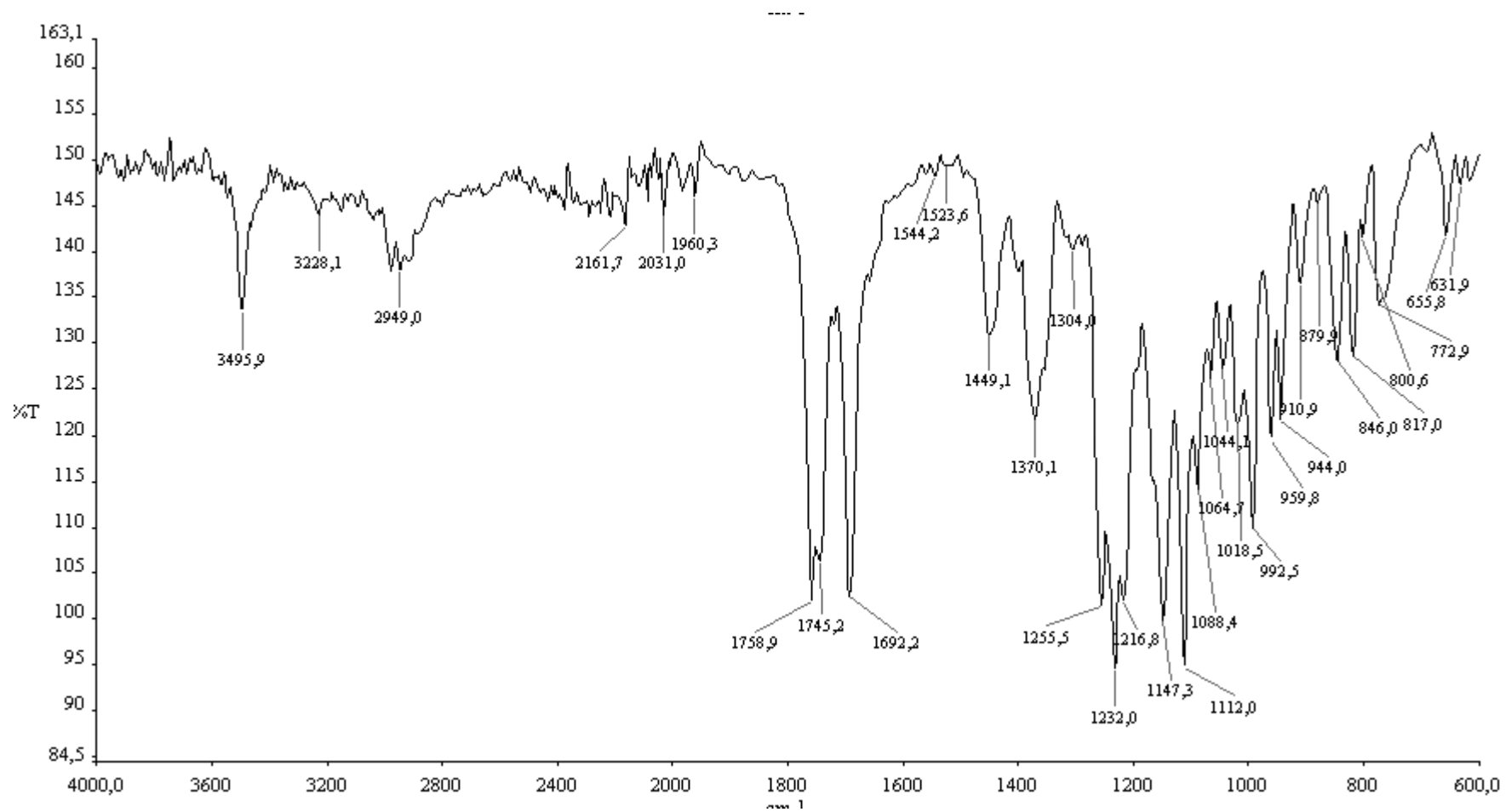
Slika 81. IR spektar jedinjenja **6** (acetilzomontanolida, tl. 8 α -angeloiloksi-11 α ,10 β -diacetoksi-6 α H,7 α H-gvajan-3-en-12,6-olida)



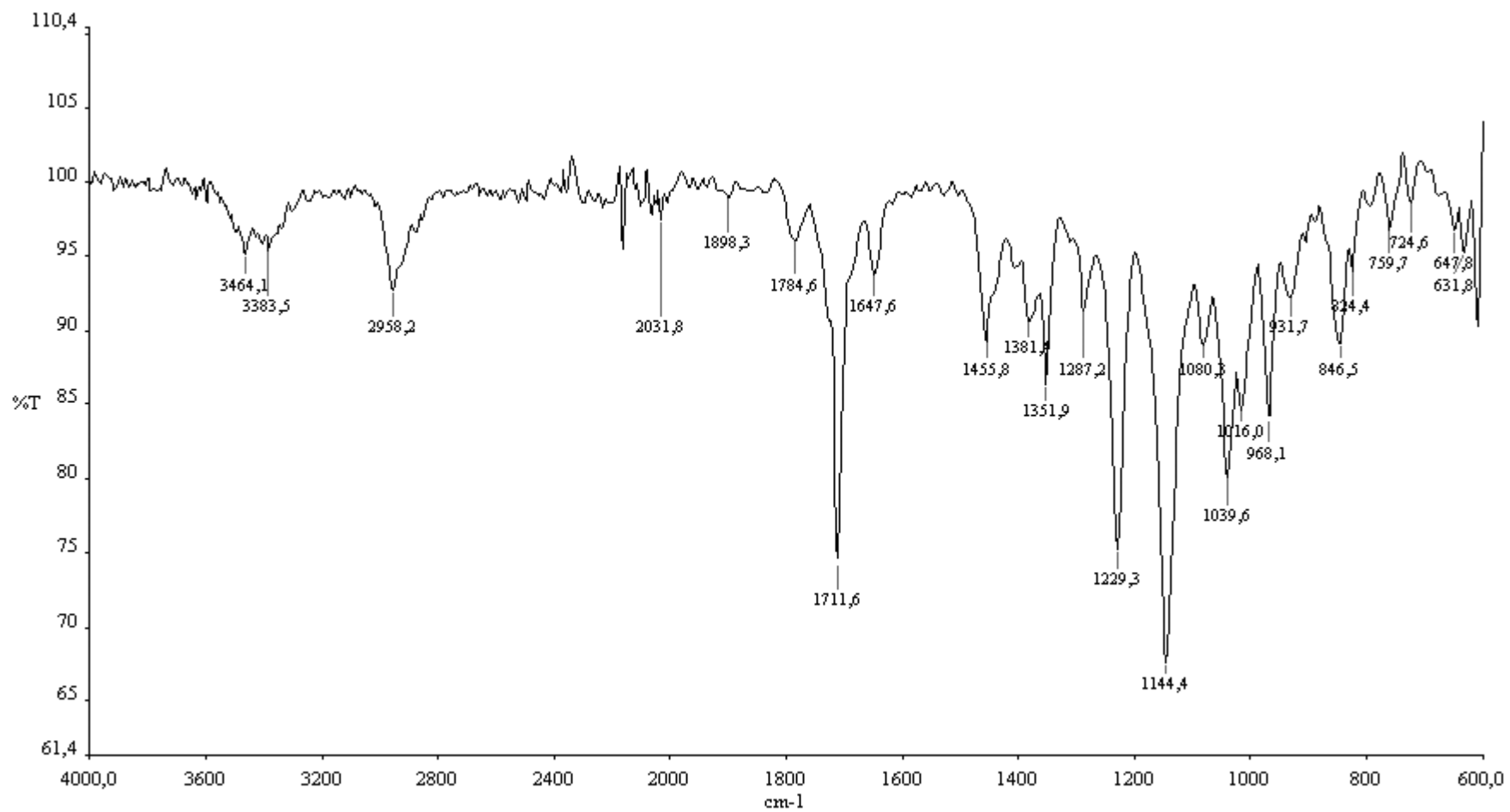
Slika 82. IR spektar jedinjenja **7** (acetilmontanolida, tj. 8α -senecioiloksi- $11\alpha,10\beta$ -diacetoksi- $6\alpha H,7\alpha H$ -gvajan-3-en-12,6-olida)



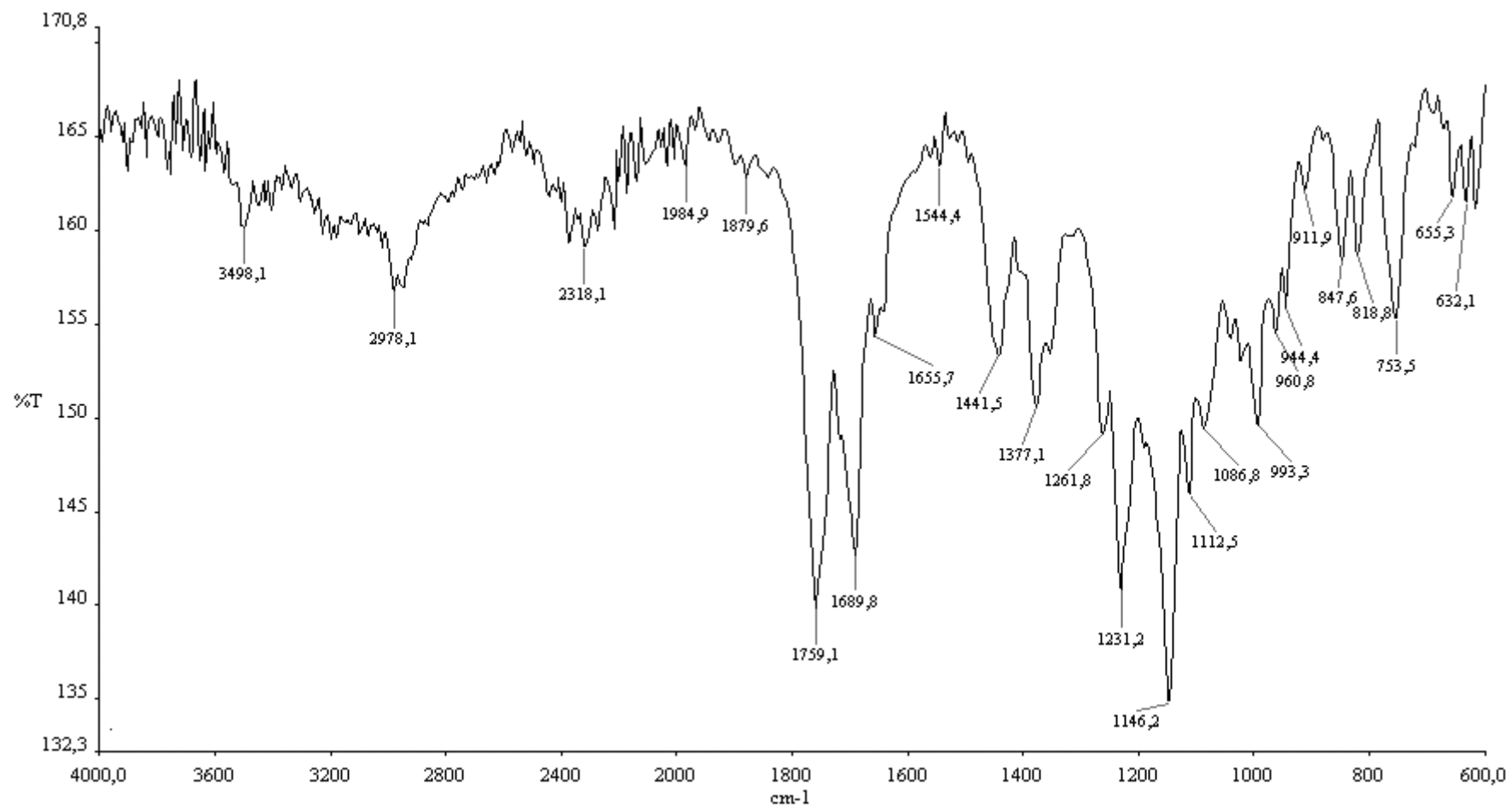
Slika 83. IR spektar jedinjenja **8** (silerolida, tj. 1 β -acetoksi,11 α -senecioiloksi -6 α H,7 α H-eudezman-3-en-6,12-olida)



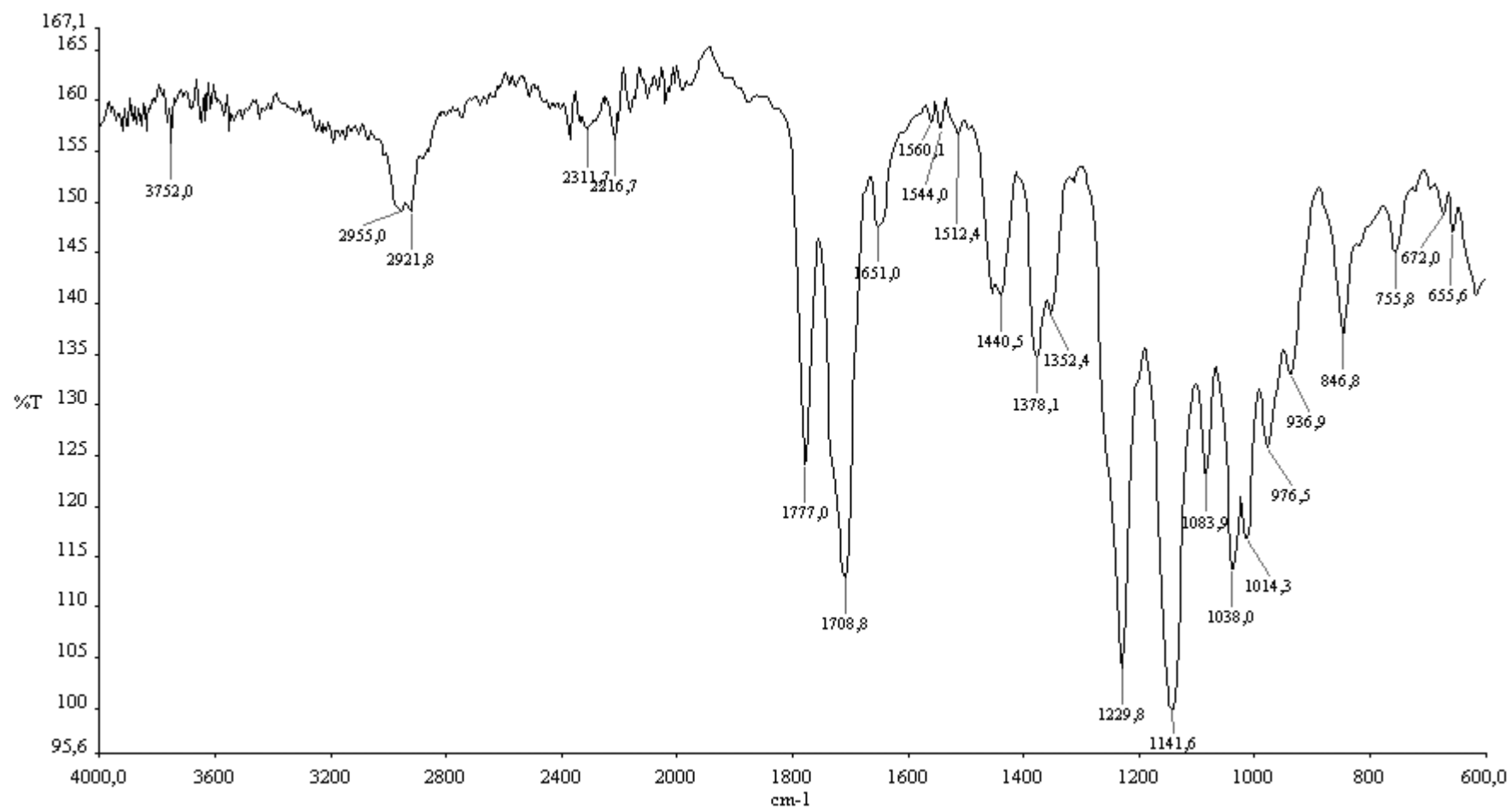
Slika 84. IR spektar jedinjenja **9** (izomontanolida, tj. 8 α -angeloiloksi,11 α -acetoksi-10 β -hidroksi-6 α H,7 α H-gvajjan-3-en-12,6-olida)



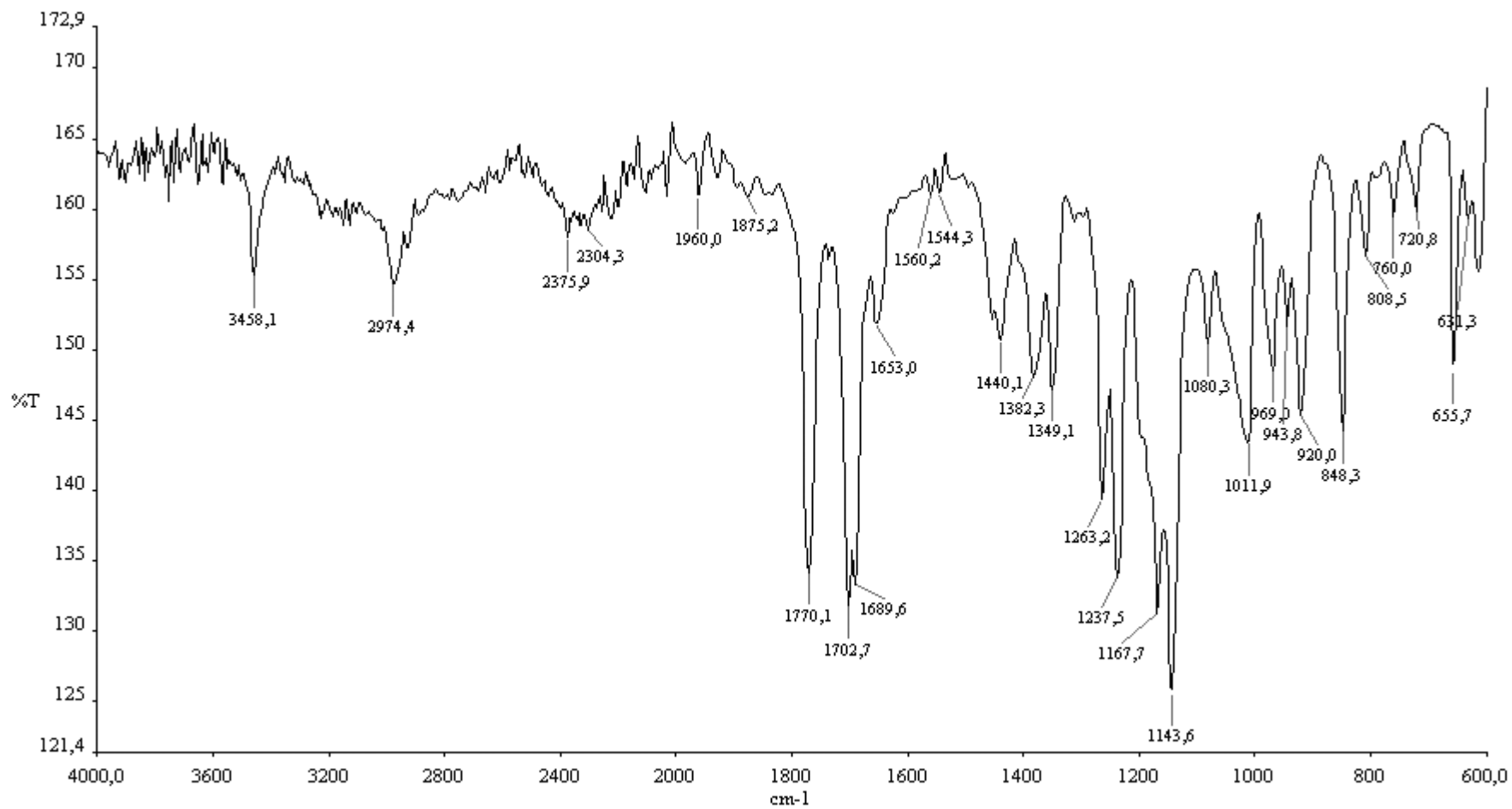
Slika 85. IR spektar jedinjenja **10** (montanolida, tj. 8 α -senecioiloksi,11 α -acetoksi-10 β -hidroksi-6 α H,7 α H-gvajjan-3-en-12,6-olid)



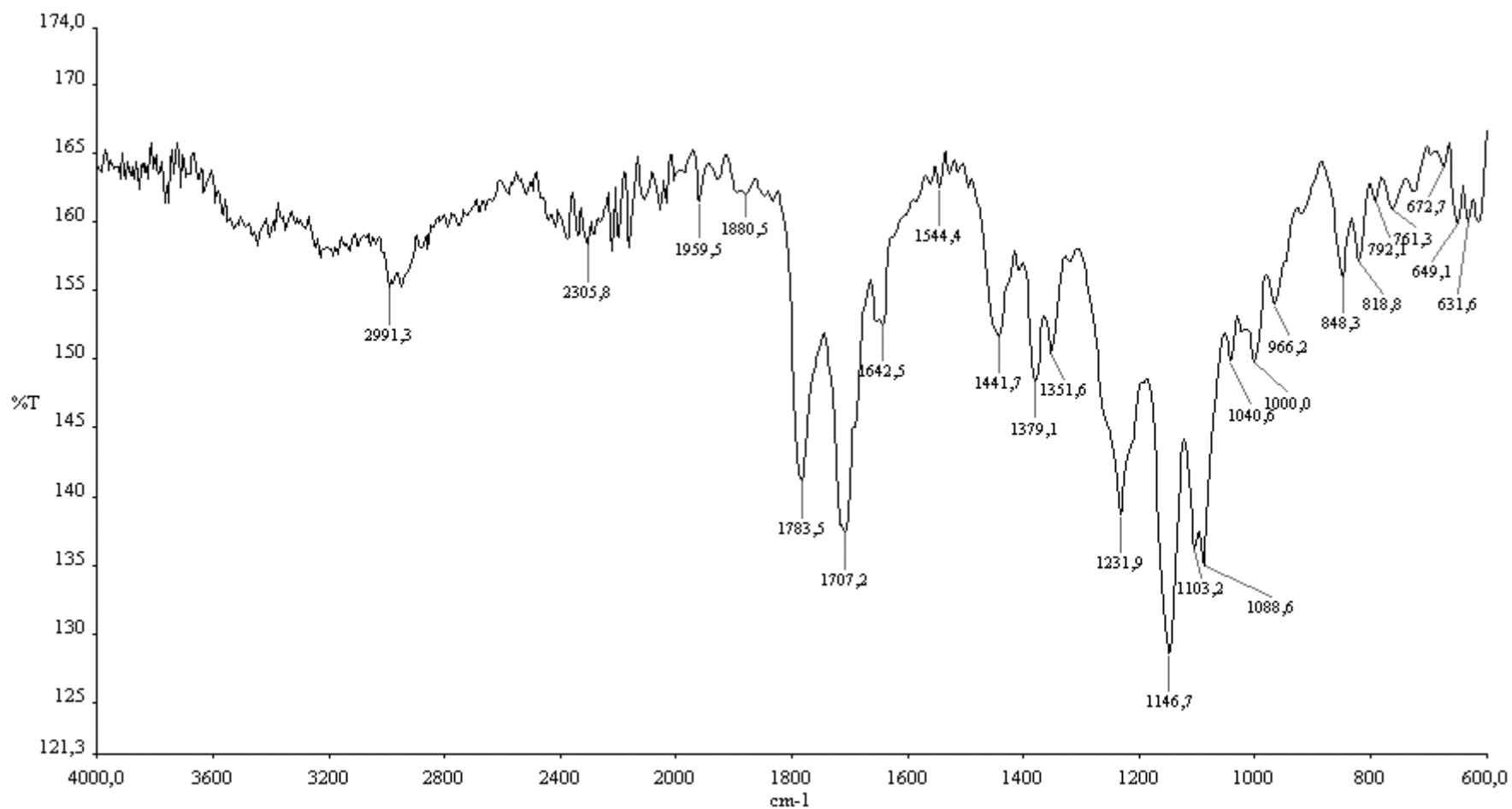
Slika 86. IR spektar jedinjenja **11** (8 α -senecioiloksi,10 β -hidroksi-6 α H,7 α H-gvajan-3-en-12,6-olida)



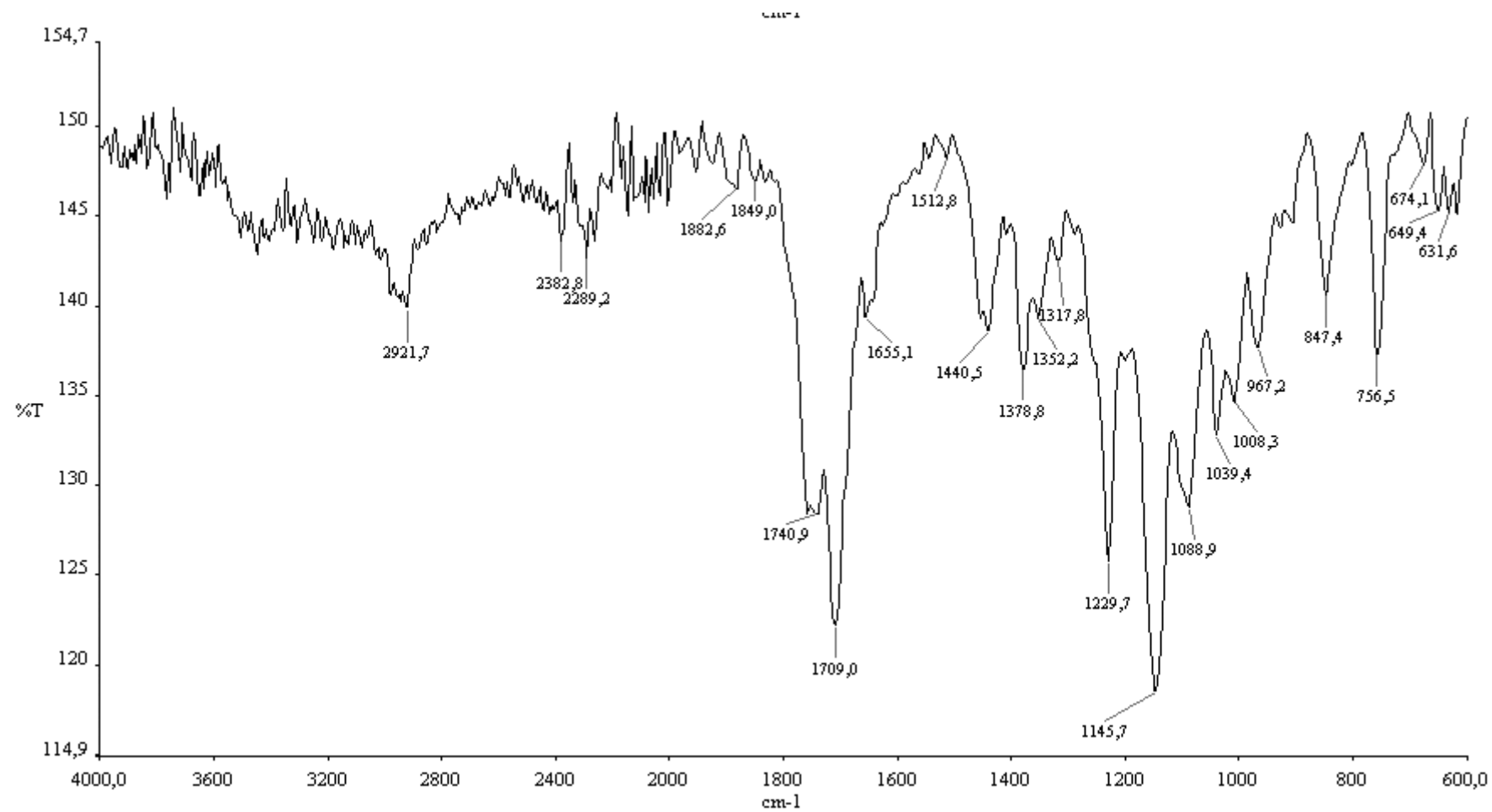
Slika 87. IR spektar jedinjenja **12** (8α -acetoksi- 2β , 10β -diangeloiloksi- 6α H, 7α H-gvajjan-3-en-12,6-olida)



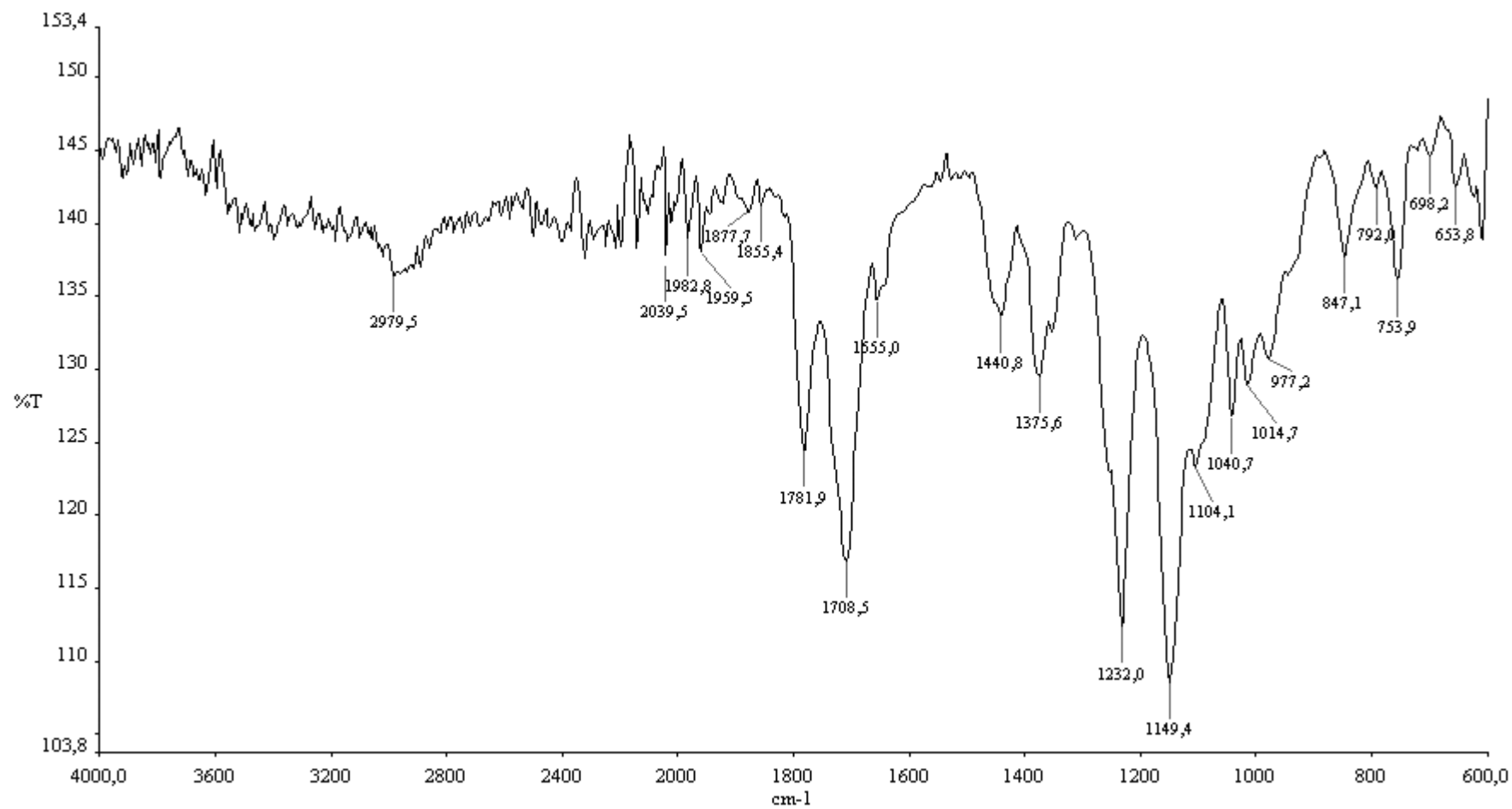
Slika 88. IR spektar jedinjenja **13** ($8\alpha,2\beta$ -diangeloiloksi- 10β -hidroksi- $6\alpha H,7\alpha H$ -gvajan-3-en-12,6-olida)



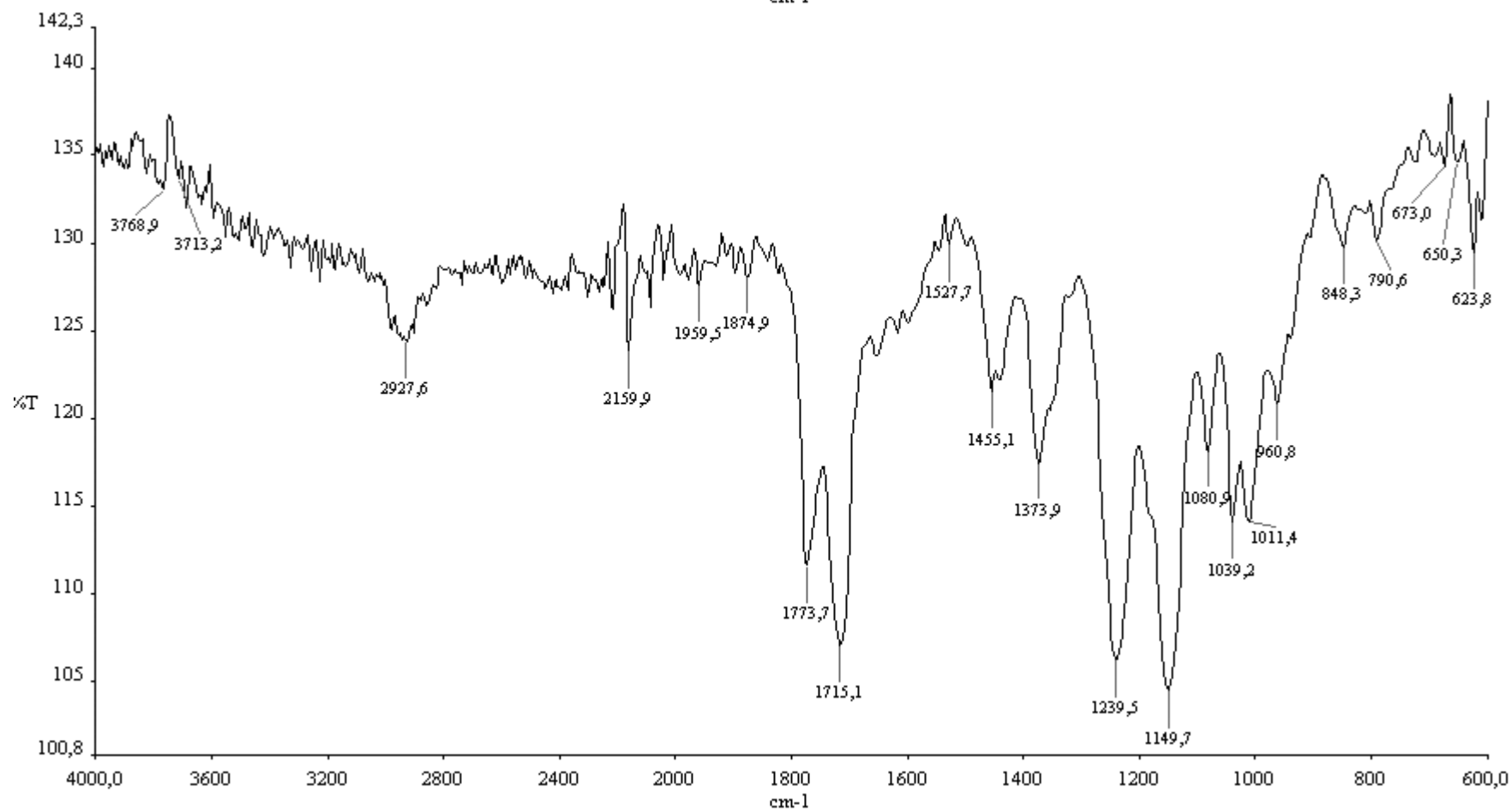
Slika 89. IR spektar jedinjenja **14** (8α -angeloiloksi, 11α -senecioiloksi- 10β -hidroksi- 6α H, 7α H-gvajan-3-en-12,6-olida)



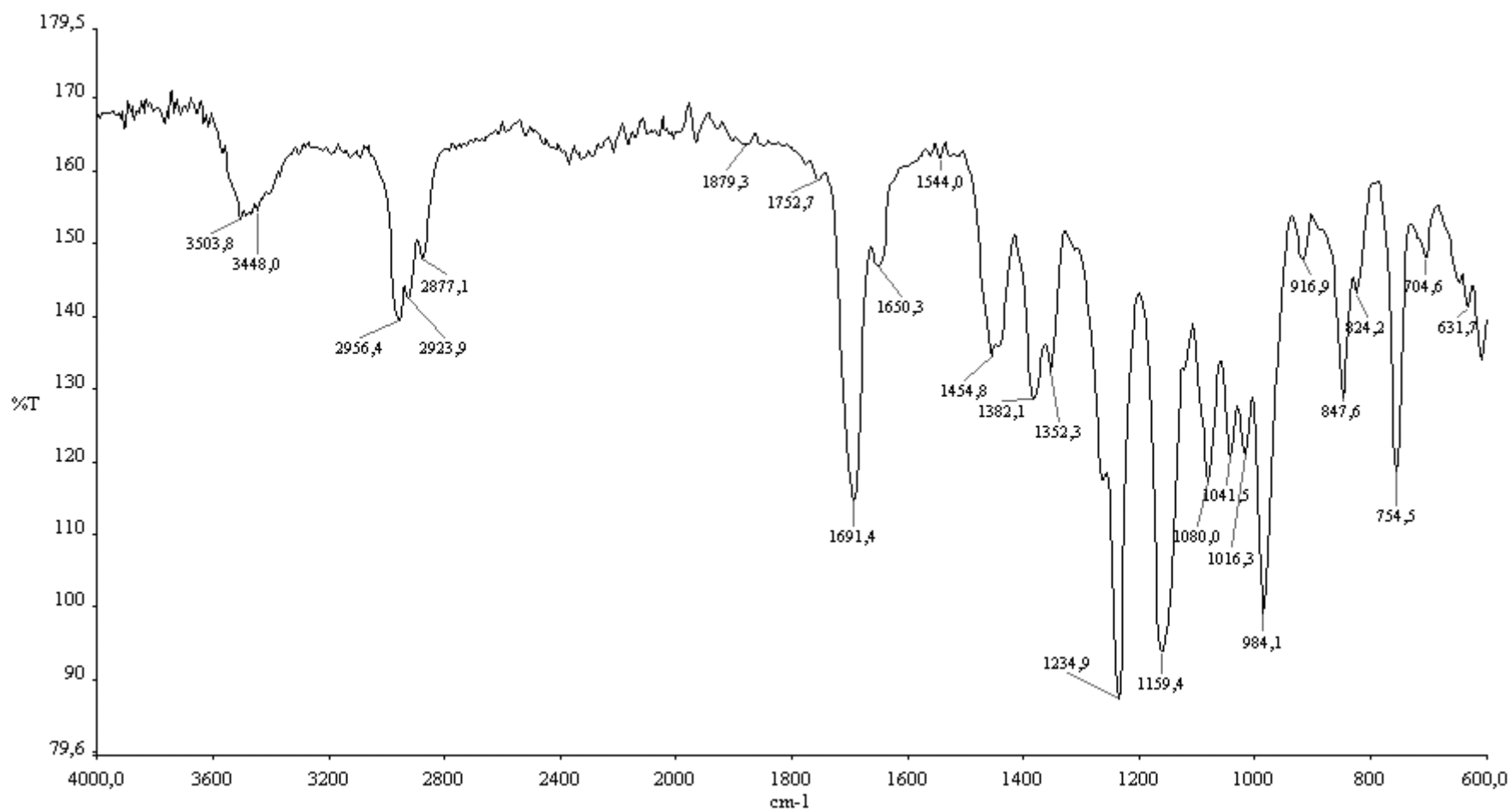
Slika 90. IR spektar jedinjenja **15** ($2\beta,8\alpha$ -diangeloiloksi- 10β -hidroksi- 6α H-gvajan-3,(7-11)-dien-12,6-olida)



Slika 91. IR spektar jedinjenja **16** (8α -acetoksi- 2β , 11α -diangeloiloksi- 10β -hidroksi- 6α H, 7α H-gvajan-3-en-12,6-olida)

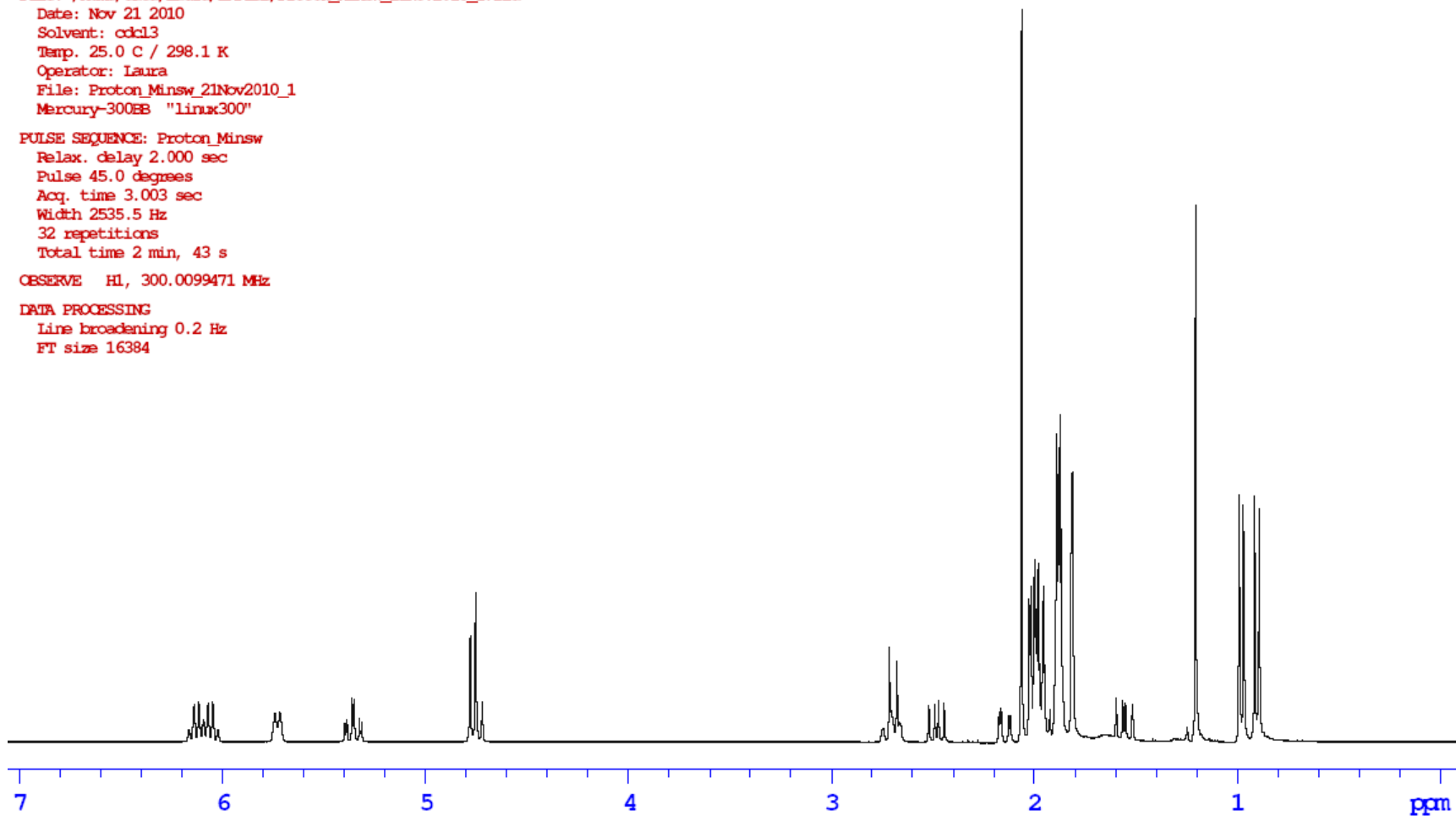


Slika 92. IR spektar jedinjenja **17** (8 α -angeloiloksi-10 β -acetoksi-6 α H,7 α H-gvajan-3-en-12,6-olida)

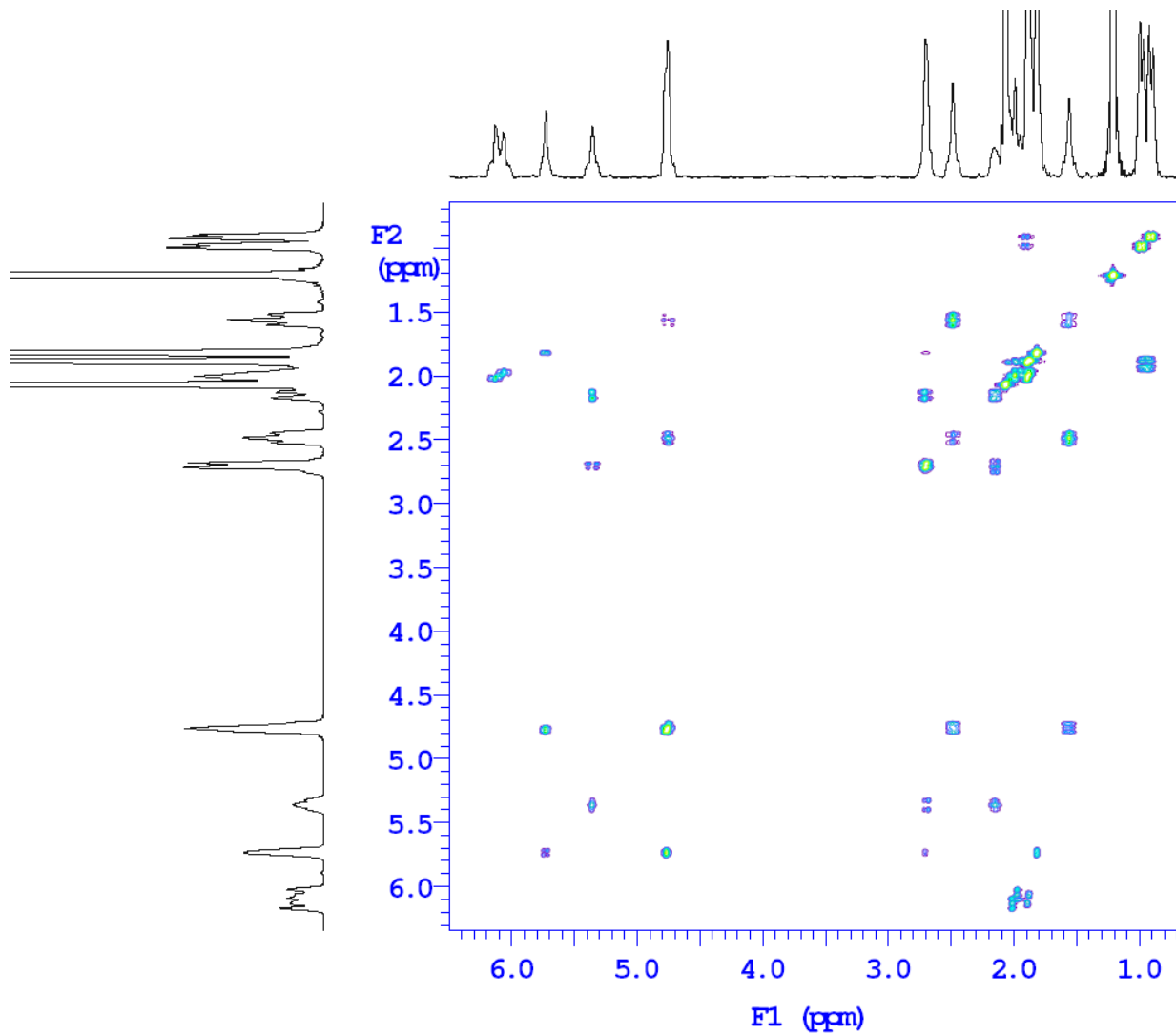


Slika 93. IR spektar jedinjenja **18** – izosilerolida (2 β ,8 α -diangeloiloksi-10 β -hidroksi-6 α H-gvajan-3,(7-11)-dien-12,6-olida)

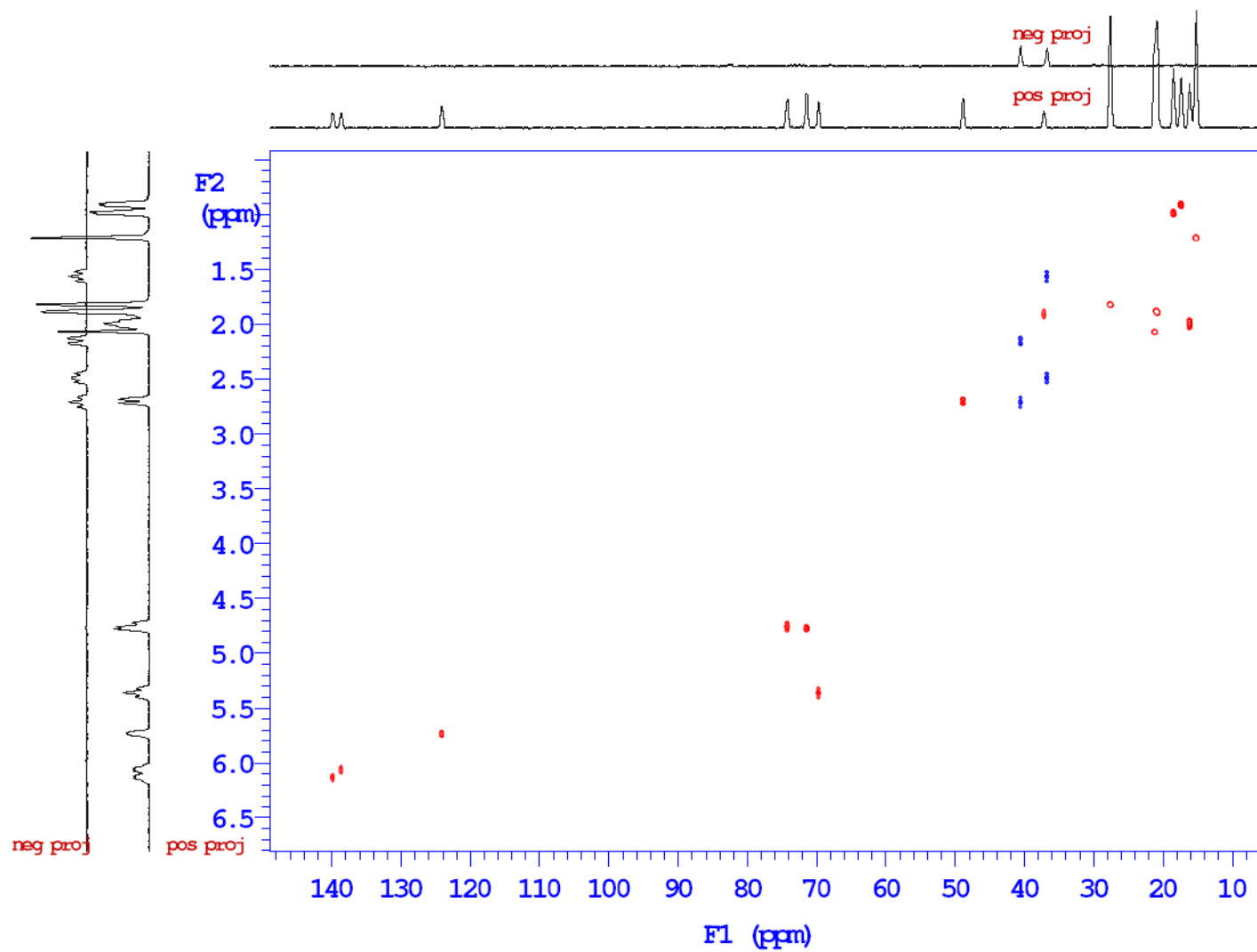
SAMPLE: LRF1DB
File: /home/data/Laura/LRF1DB/Proton_Minsw_21Nov2010_1.fid
Date: Nov 21 2010
Solvent: cdcl3
Temp. 25.0 C / 298.1 K
Operator: Laura
File: Proton_Minsw_21Nov2010_1
Mercury-300EB "Linux300"
PULSE SEQUENCE: Proton_Minsw
Relax. delay 2.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 3.003 sec
Width 2535.5 Hz
32 repetitions
Total time 2 min, 43 s
OBSERVE H1, 300.0099471 MHz
DATA PROCESSING
Line broadening 0.2 Hz
FT size 16384



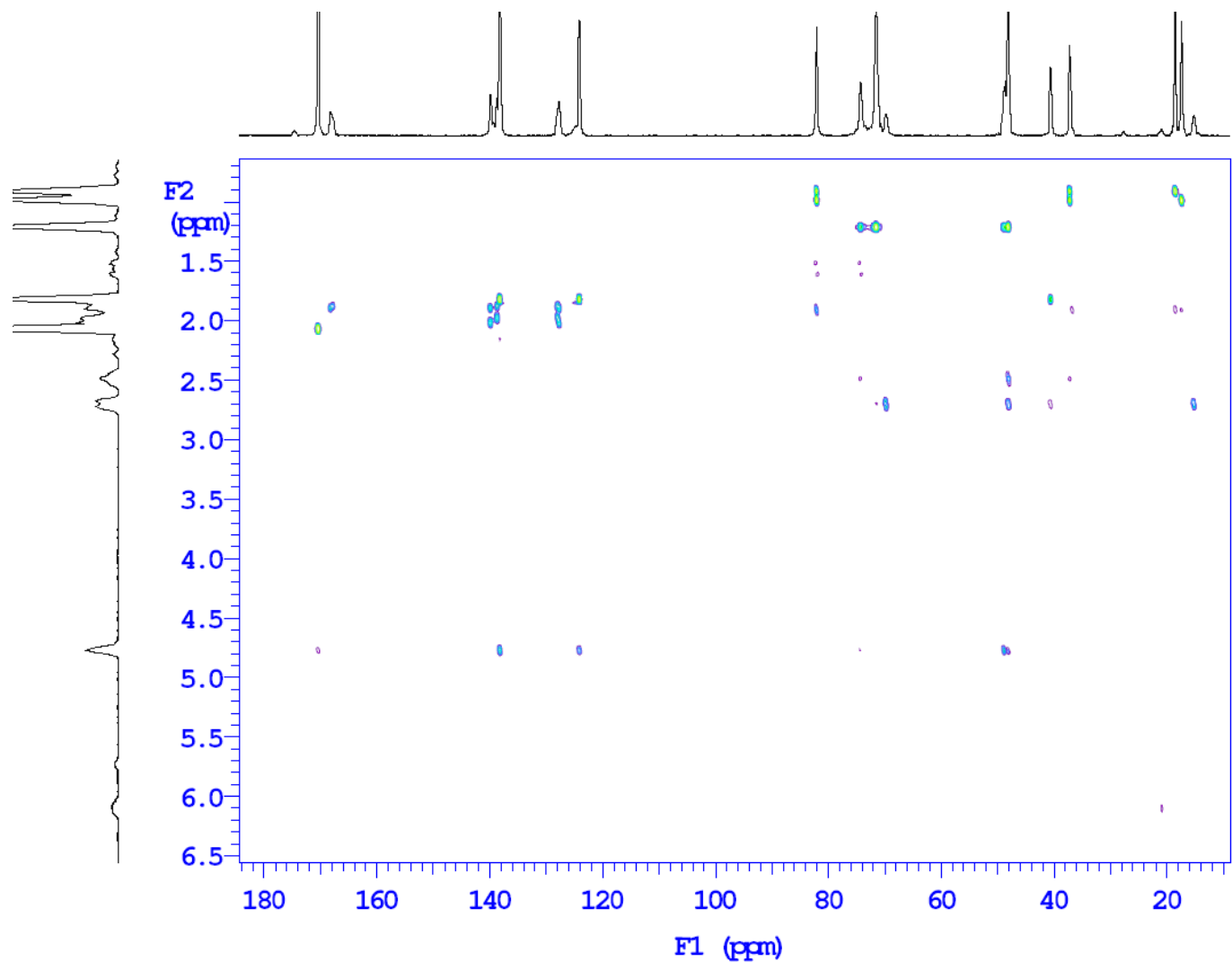
Slika 94. ^1H NMR spektar (300 MHz) jedinjenja **2** (acetildezoksodehidrolaserpicina)



Slika 95. COSY (2D) NMR spektar jedinjenja **2** (acetildezoksodehidrolaserpicina)

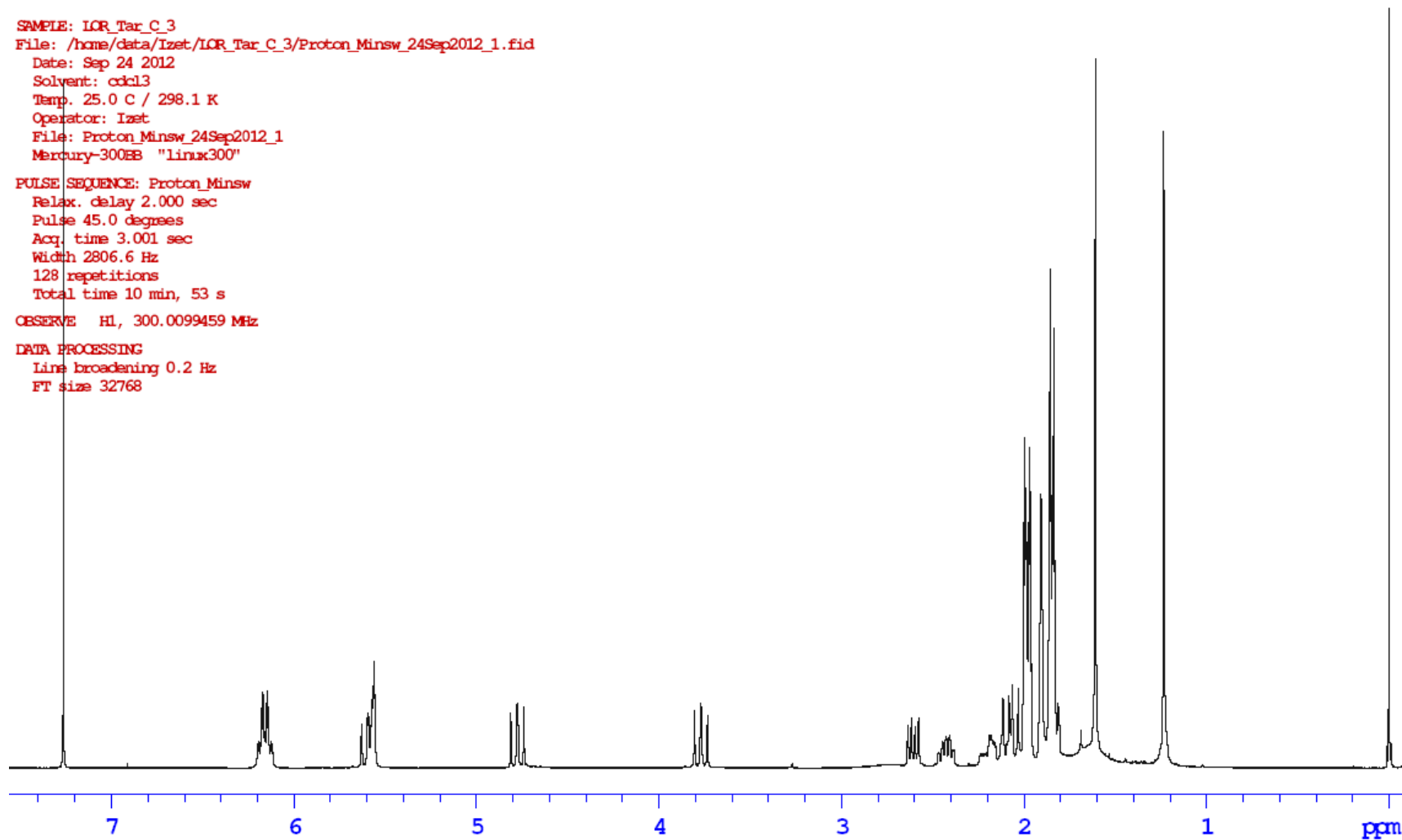


Slika 96. gHSQC (2D) NMR spektar jaidnjenja 2 (acetildezoksodehidrolaserpicina)

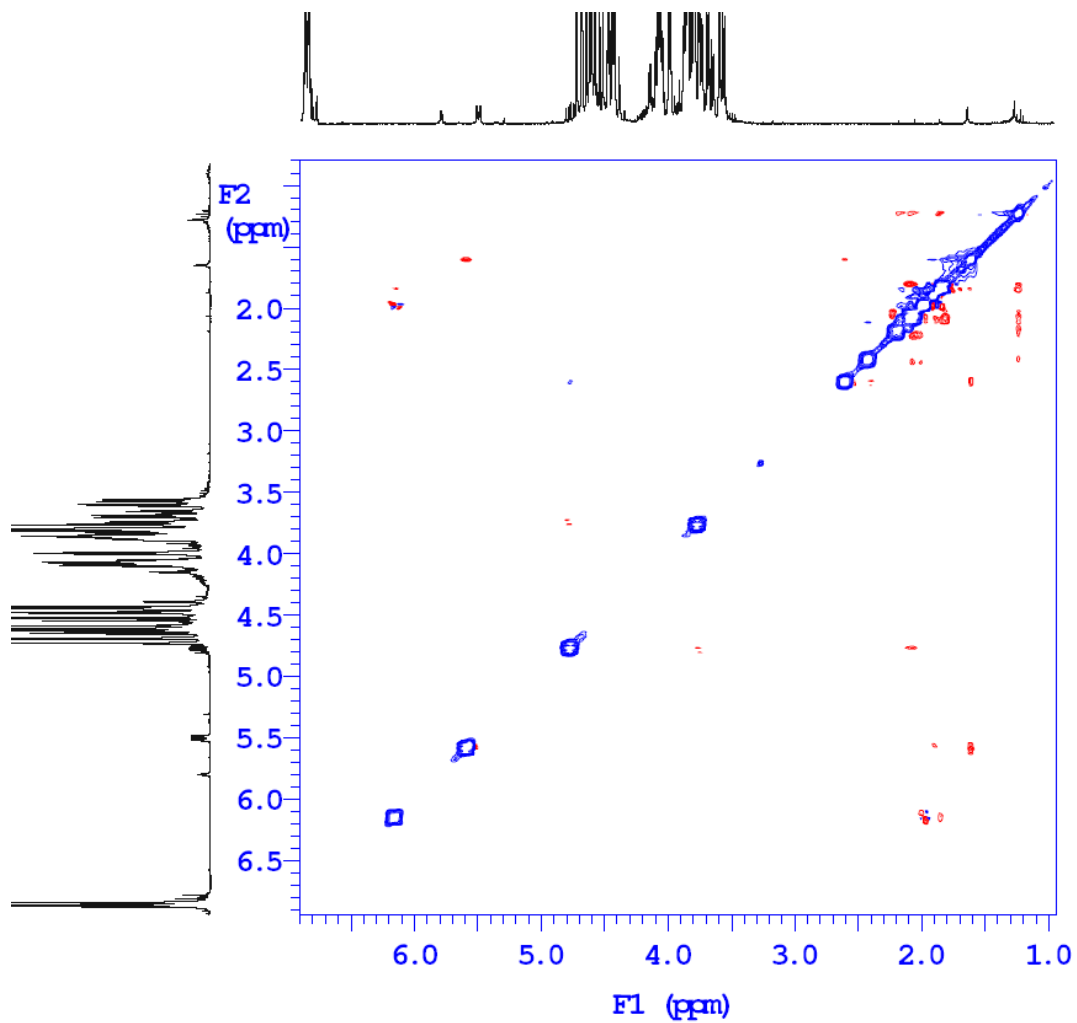


Slika 97. gHMBC (2D) NMR spektar jeidnjenja 2 (acetildezoksodehidrolaserpicina)

SAMPLE: LOR_Tar_C_3
File: /home/data/Izet/LOR_Tar_C_3/Proton_Minsw_24Sep2012_1.fid
Date: Sep 24 2012
Solvent: cdcl3
Temp. 25.0 C / 298.1 K
Operator: Izet
File: Proton_Minsw_24Sep2012_1
Mercury-300EB "Linux300"
PULSE SEQUENCE: Proton_Minsw
Relax. delay 2.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 3.001 sec
Width 2806.6 Hz
128 repetitions
Total time 10 min, 53 s
OBSERVE H1, 300.0099459 MHz
DATA PROCESSING
Line broadening 0.2 Hz
FT size 32768



Slika 98. ¹H NMR spektar (300 MHz) jedinjenja **5** (tarolida, tj. 8 α ,11 α -diangeloiloksi-10 β -hidroksi-6 α H,7 α H-gvajan-3-en-12,6-olida)



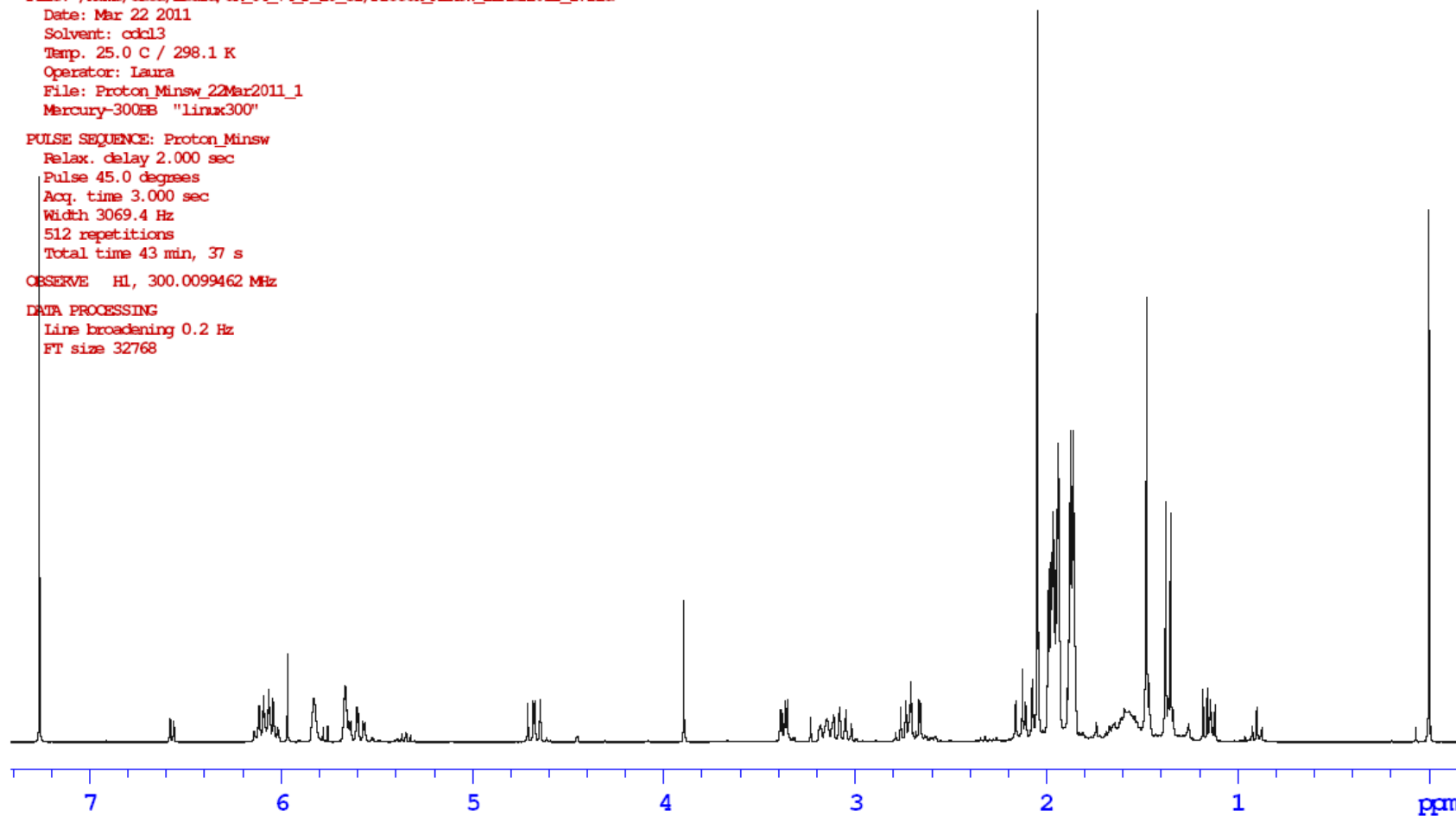
Slika 99. NOESY spektar jedinjenja **5** (tarolida, tj. $8\alpha,11\alpha$ -diangeloiloksi- 10β -hidroksi- $6\alpha\text{H},7\alpha\text{H}$ -gvajan-3-en-12,6-olida)

SAMPLE: OR_64_74_F_29_31
File: /home/data/Laura/OR_64_74_F_29_31/Proton_Minsw_22Mar2011_1.fid
Date: Mar 22 2011
Solvent: ccdl3
Temp. 25.0 C / 298.1 K
Operator: Laura
File: Proton_Minsw_22Mar2011_1
Mercury-300EB "linux300"

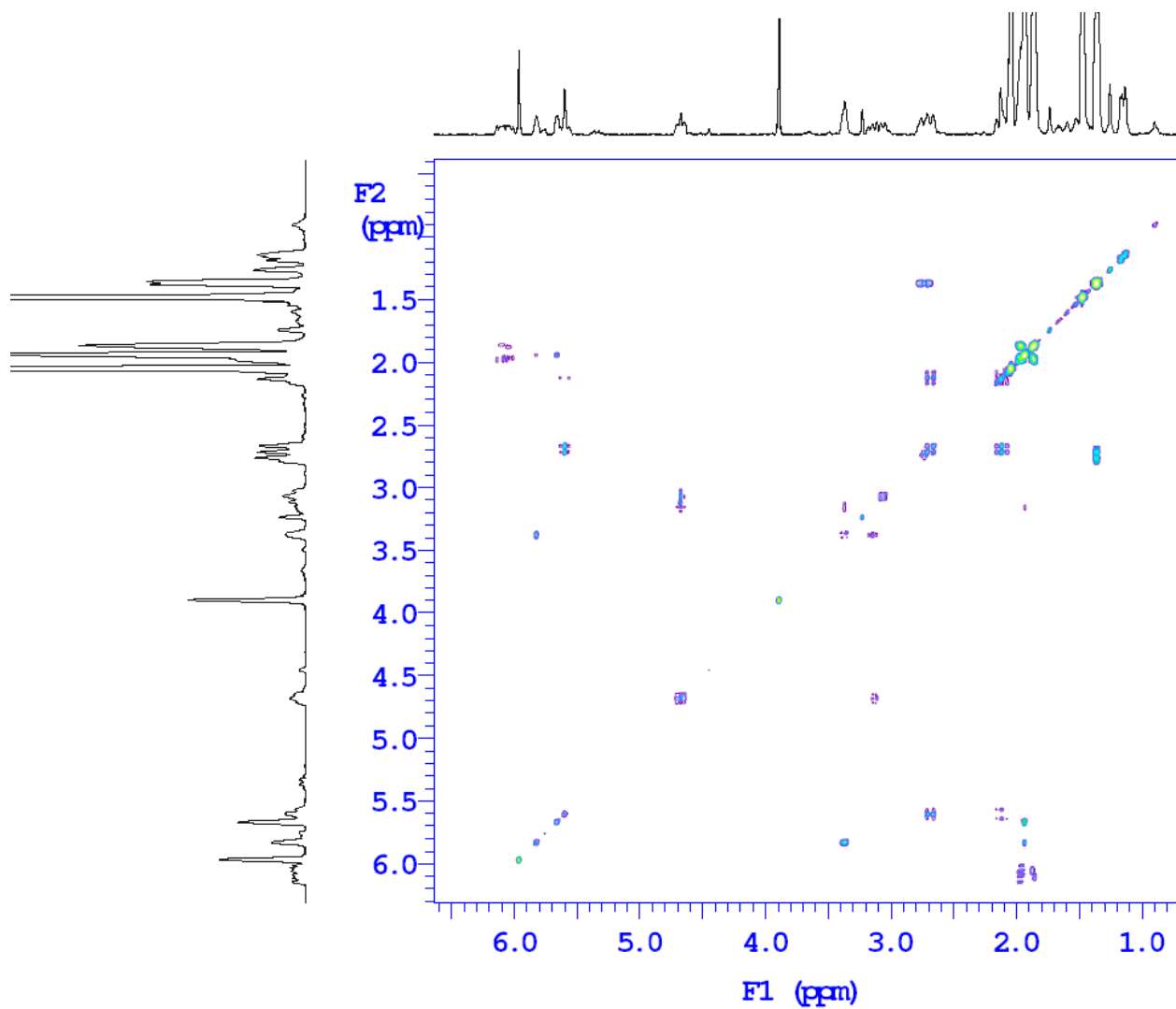
PULSE SEQUENCE: Proton_Minsw
Relax. delay 2.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 3.000 sec
Width 3069.4 Hz
512 repetitions
Total time 43 min, 37 s

OBSERVE H1, 300.0099462 MHz

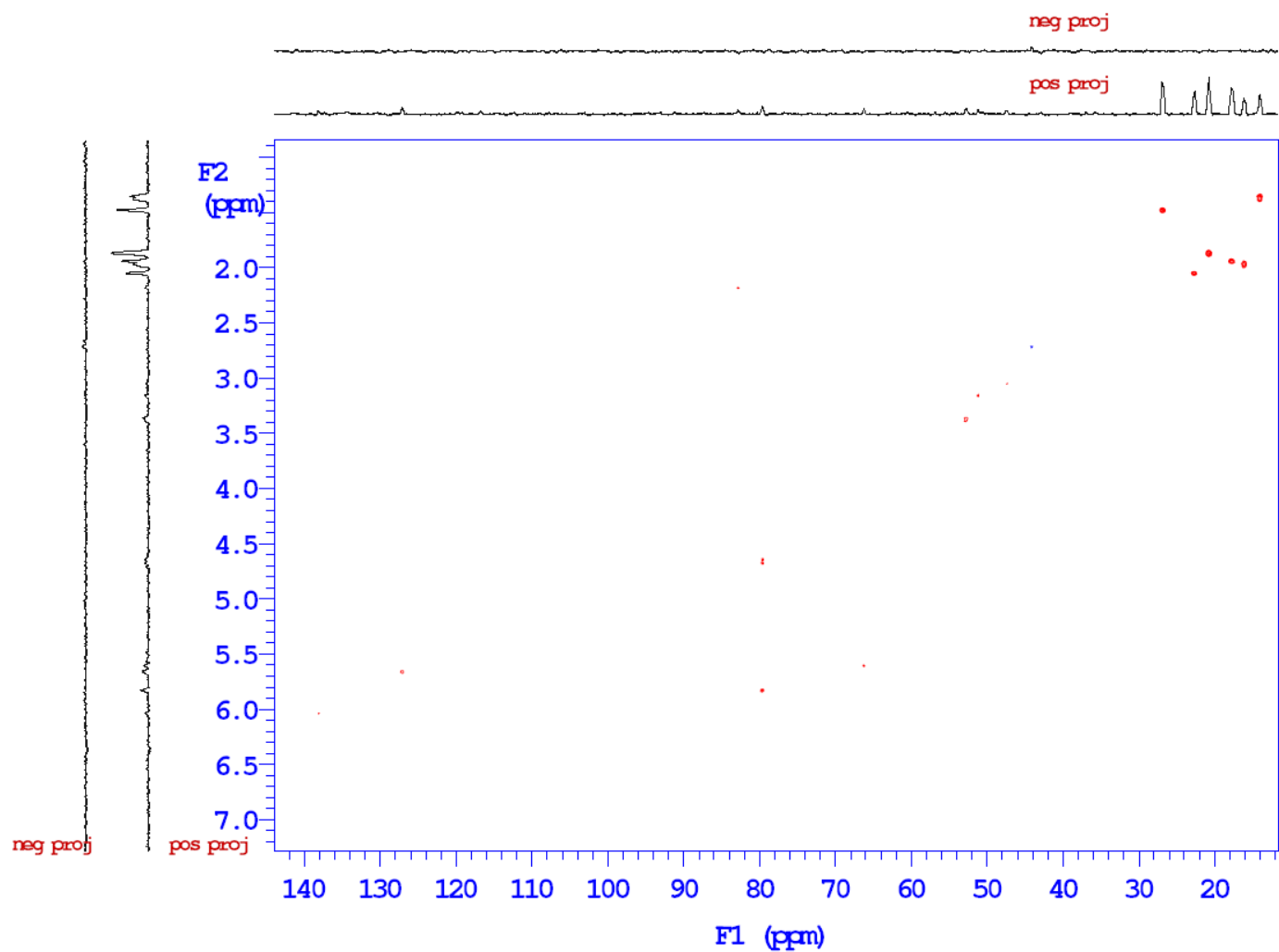
DATA PROCESSING
Line broadening 0.2 Hz
FT size 32768



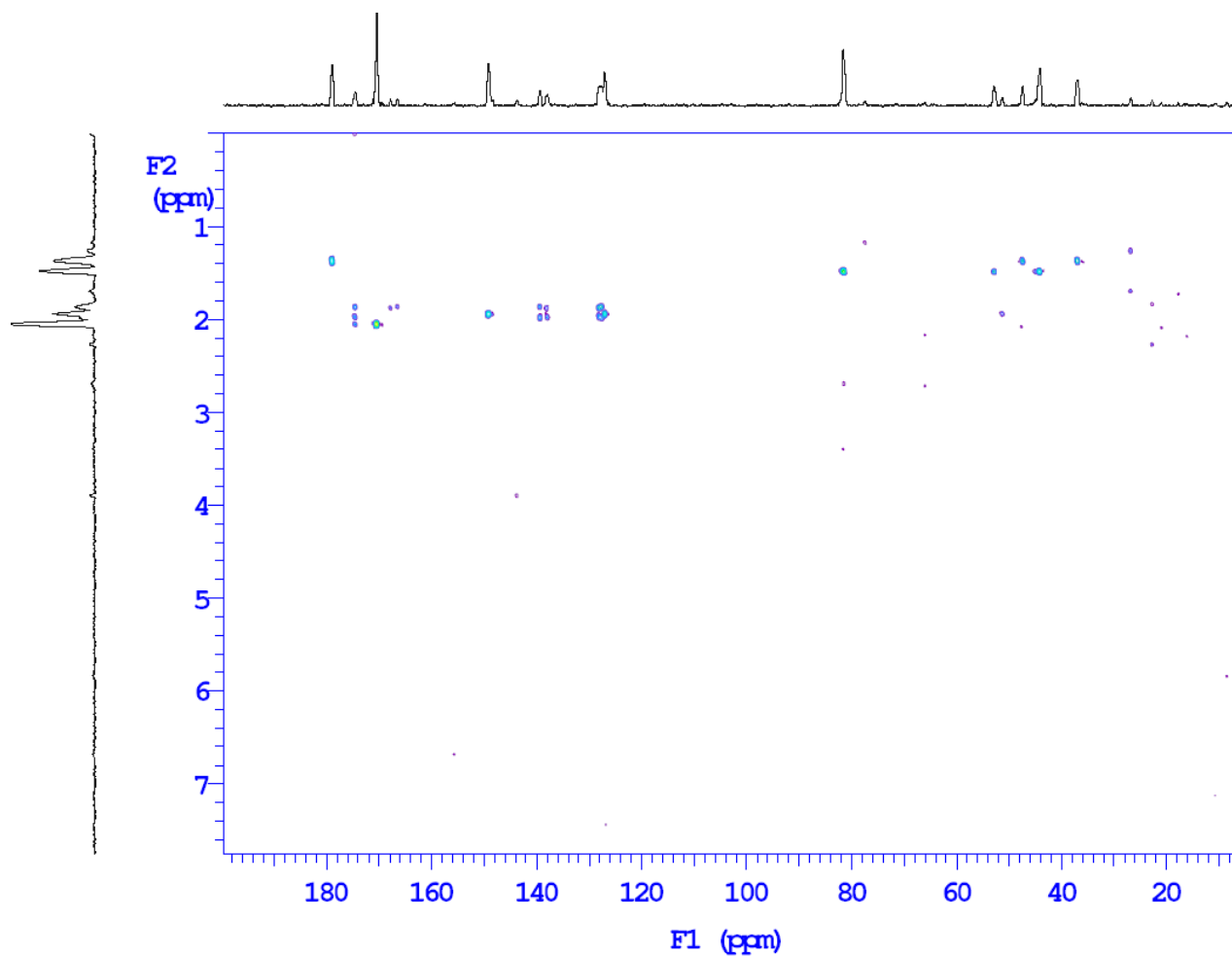
Slika 100. ^1H NMR spektar (300 MHz) jedinjenja **12** (8α -acetoksi- 2β , 10β -diangeloiloksi- $6\alpha\text{H}$, $7\alpha\text{H}$ -gvajan-3-en-12,6-olida)



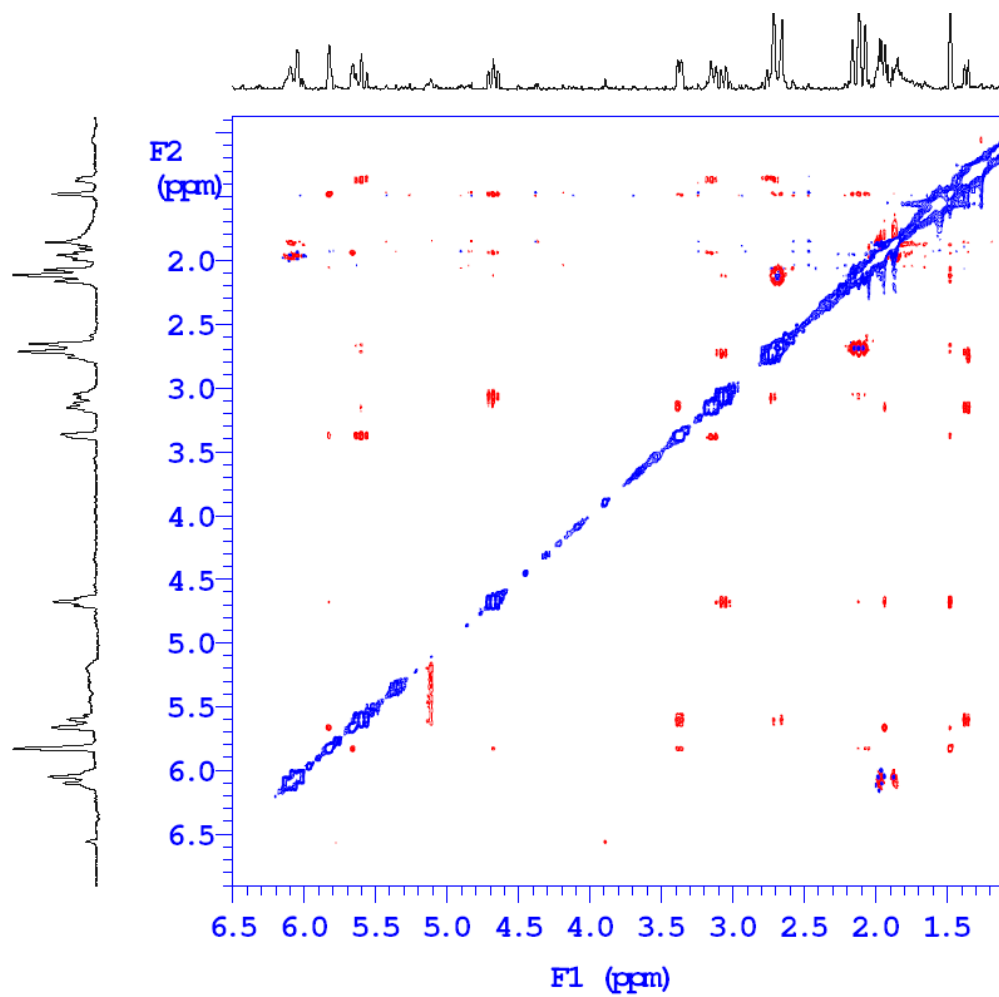
Slika 101. COSY (2D) NMR spektar jedinjenja **12** (8α -acetoksi- 2β , 10β -diangeloiloksi- 6α H, 7α H-gvajan-3-en-12,6-olida)



Slika 102. gHSQC (2D) NMR spektar jedinjenja **12** (8α -acetoksi- 2β , 10β -diangeloiloksi- $6\alpha\text{H}$, $7\alpha\text{H}$ -gvajan-3-en-12,6-olida)



Slika 103. gHMBC (2D) NMR spektar jedinjenja **12** (8α -acetoksi- 2β , 10β -diangeloiloksi- $6\alpha\text{H}$, $7\alpha\text{H}$ -gvajan-3-en-12,6-olida)



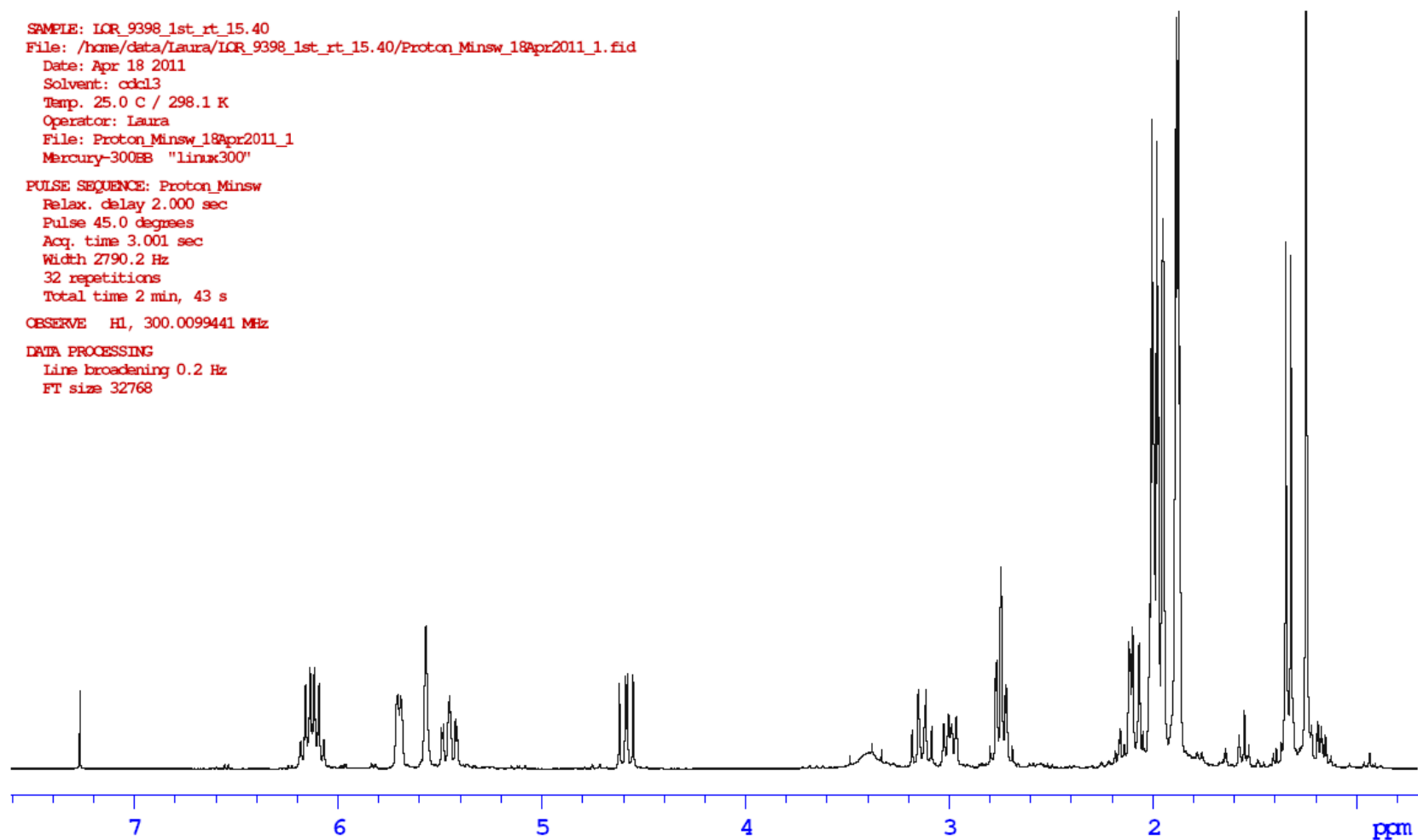
Slika 104. NOESY (2D) NMR spektar jedinjenja **12** (8α -acetoksi- $2\beta,10\beta$ -diangeloiloksi- 6α H, 7α H-gvajan-3-en-12,6-olida)

SAMPLE: ICR_9398_1st_rt_15.40
File: /home/data/Laura/ICR_9398_1st_rt_15.40/Proton_Minsw_18Apr2011_1.fid
Date: Apr 18 2011
Solvent: cdcl3
Temp. 25.0 C / 298.1 K
Operator: Laura
File: Proton_Minsw_18Apr2011_1
Mercury-300EB "linux300"

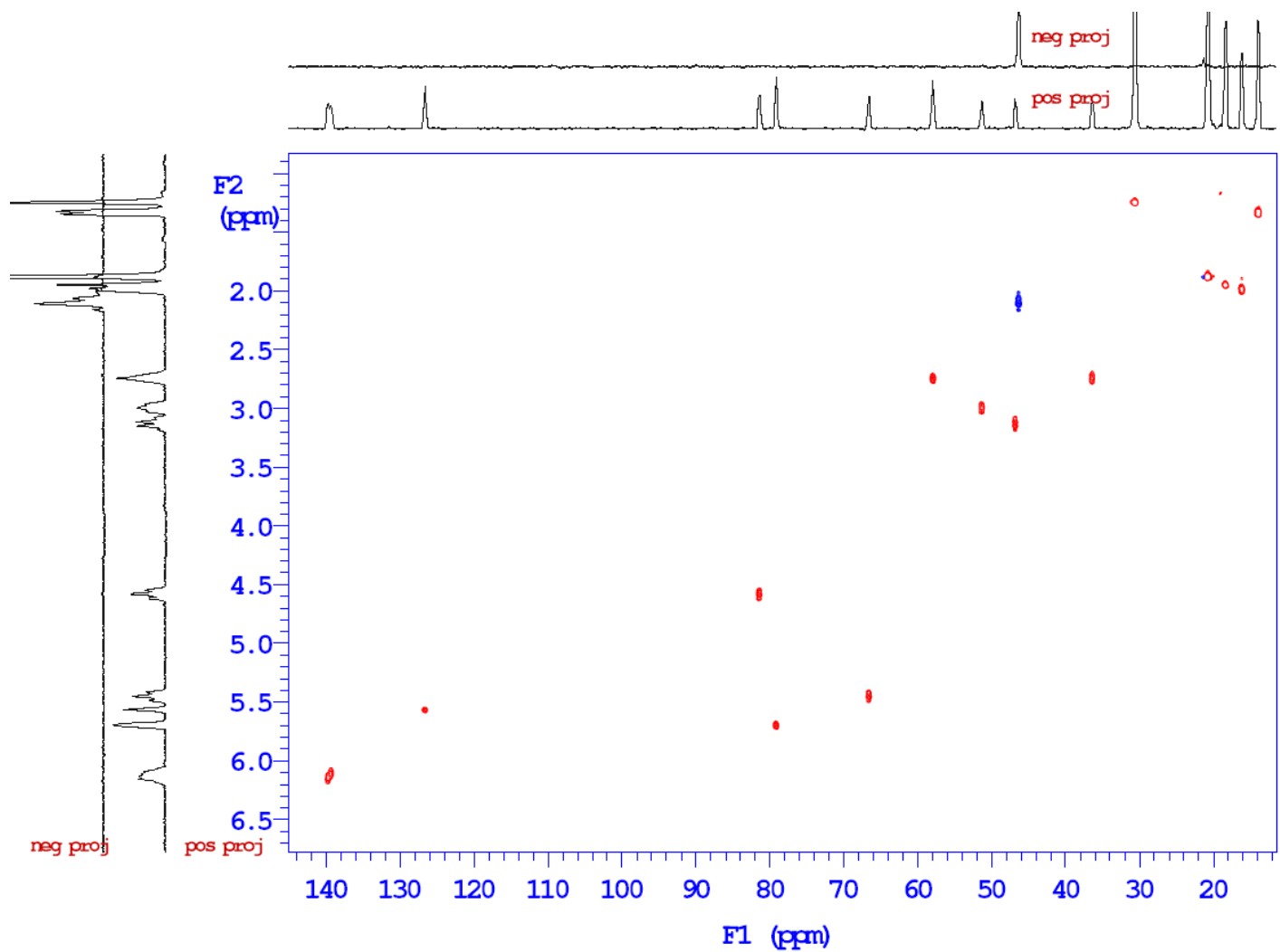
PULSE SEQUENCE: Proton_Minsw
Relax. delay 2.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 3.001 sec
Width 2790.2 Hz
32 repetitions
Total time 2 min, 43 s

OBSERVE H1, 300.0099441 MHz

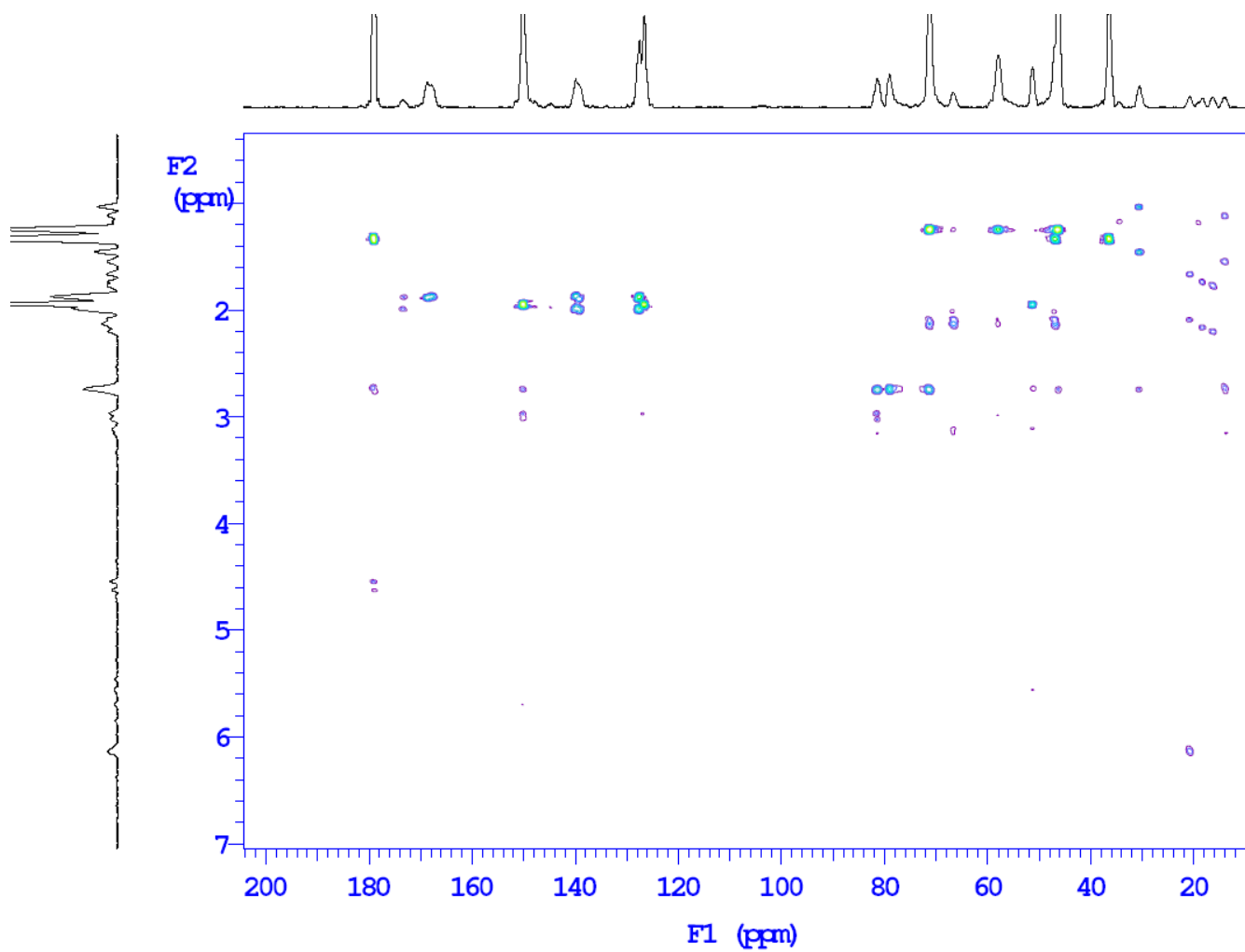
DATA PROCESSING
Line broadening 0.2 Hz
FT size 32768



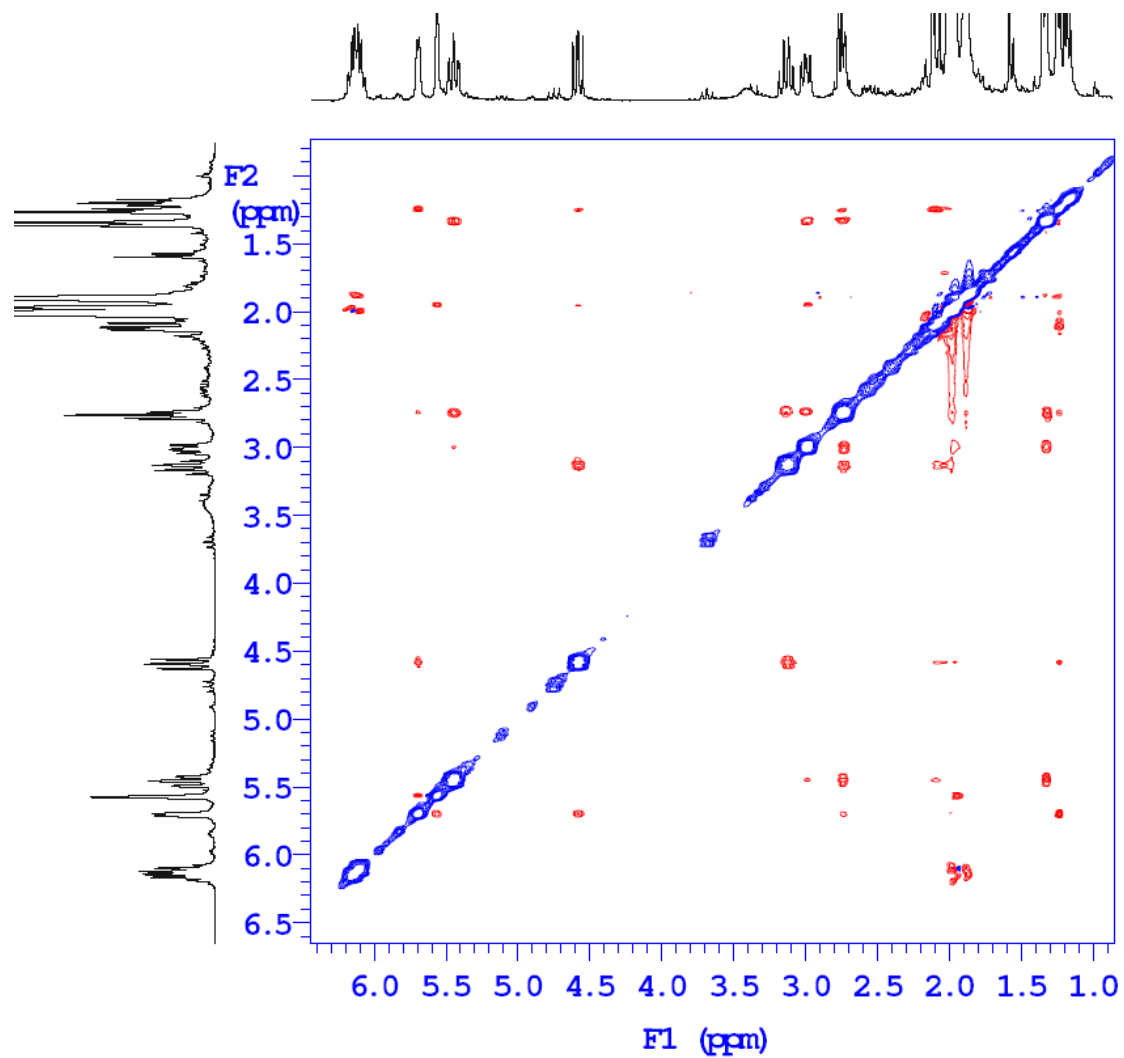
Slika 105. ¹H NMR spektar (300 MHz) jedinjenja **13** (8 α ,2 β -diangeloiloksi-10 β -hidroksi-6 α H,7 α H-gvajan-3-en-12,6-olida)



Slika 107. gHSQC (2D) NMR spektar jedinjenja **13** ($8\alpha,2\beta$ -diangeloiloksi- 10β -hidroksi- $6\alpha\text{H},7\alpha\text{H}$ -gvajan-3-en-12,6-olida)



Slika 108. gHMBC (2D) NMR spektar jedinjenja **13** ($8\alpha,2\beta$ -diangeloiloksi- 10β -hidroksi- $6\alpha\text{H},7\alpha\text{H}$ -gvajan-3-en-12,6-olida)



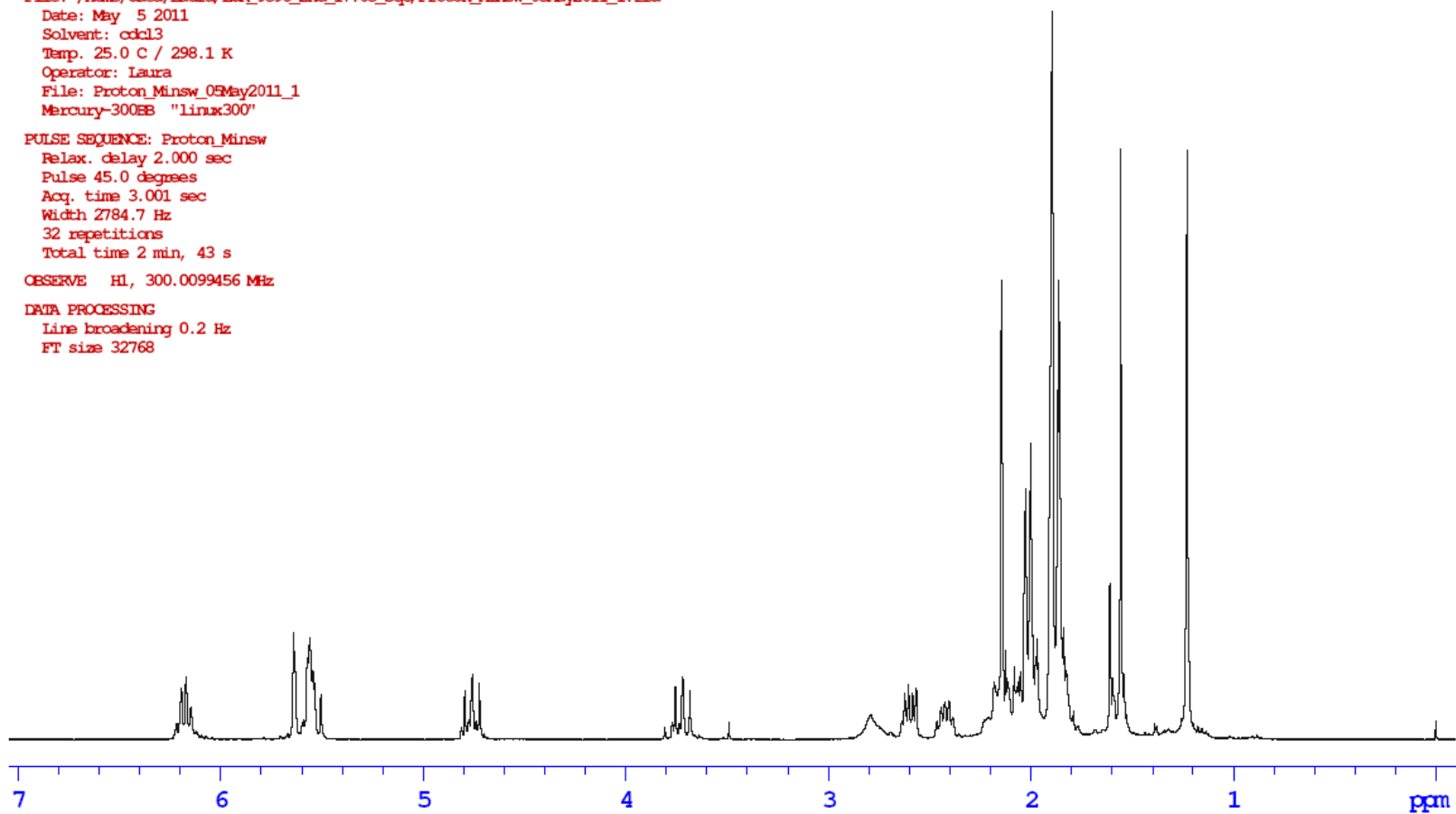
Slika 109. NOESY (2D) NMR spektar jedinjenja **13** ($8\alpha,2\beta$ -diangeoiloksi- 10β -hidroksi- $6\alpha H,7\alpha H$ -gvajan-3-en-12,6-olida)

SAMPLE: LOR_9398_2nd_17.05_sqc
File: /home/data/Laura/LOR_9398_2nd_17.05_sqc/Proton_Minsw_05May2011_1.fid
Date: May 5 2011
Solvent: ccd13
Temp. 25.0 C / 298.1 K
Operator: Laura
File: Proton_Minsw_05May2011_1
Mercury-300EB "linux300"

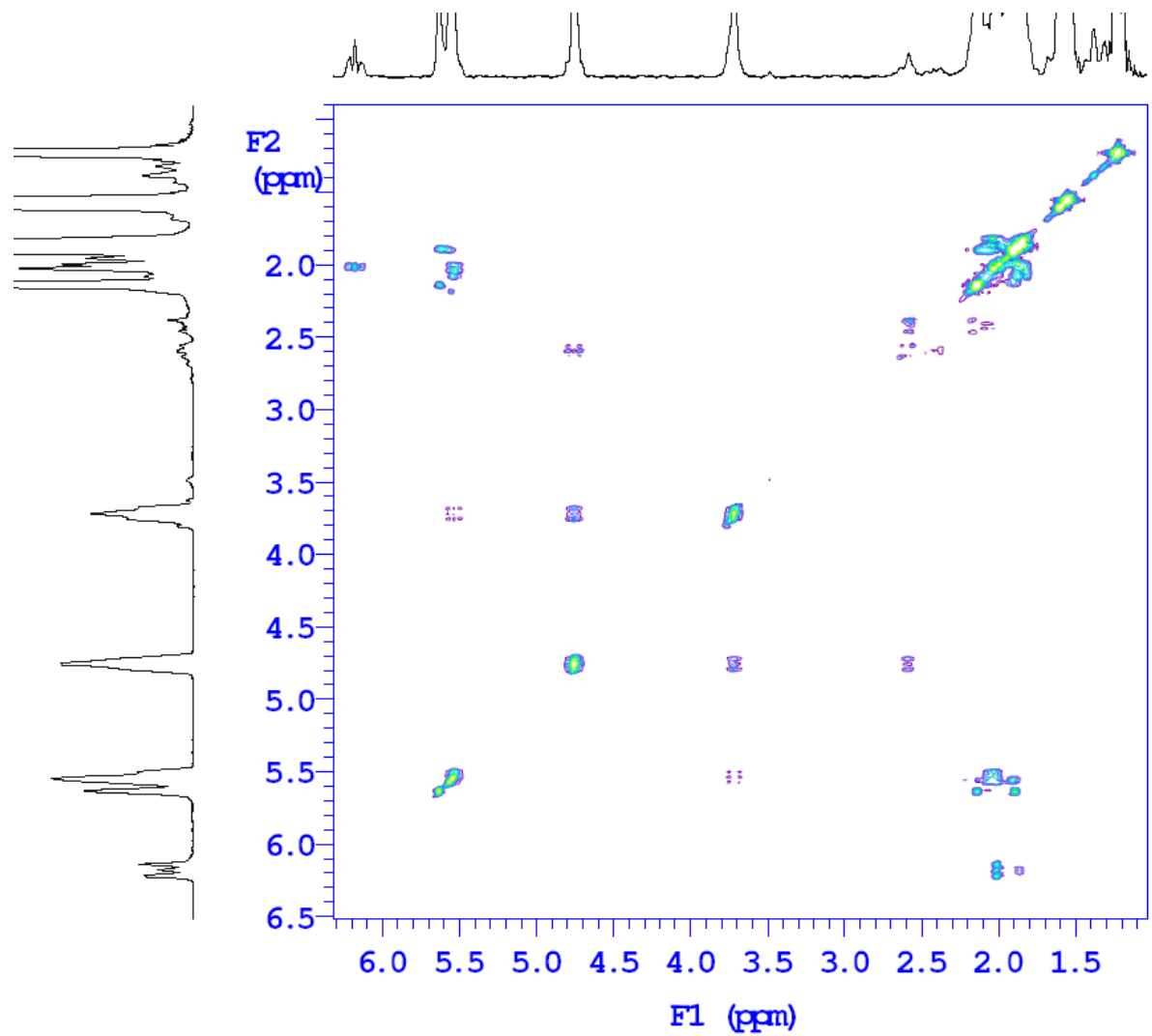
PULSE SEQUENCE: Proton_Minsw
Relax. delay 2.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 3.001 sec
Width 2784.7 Hz
32 repetitions
Total time 2 min, 43 s

OBSERVE H1, 300.0099456 MHz

DATA PROCESSING
Line broadening 0.2 Hz
FT size 32768



Slika 110. ^1H NMR spektar (300 MHz) jedinjenja **14** (8α -angeloiloksi, 11α -senecioiloksi- 10β -hidroksi- $6\alpha\text{H}, 7\alpha\text{H}$ -gvajan-3-en-12,6-olida)



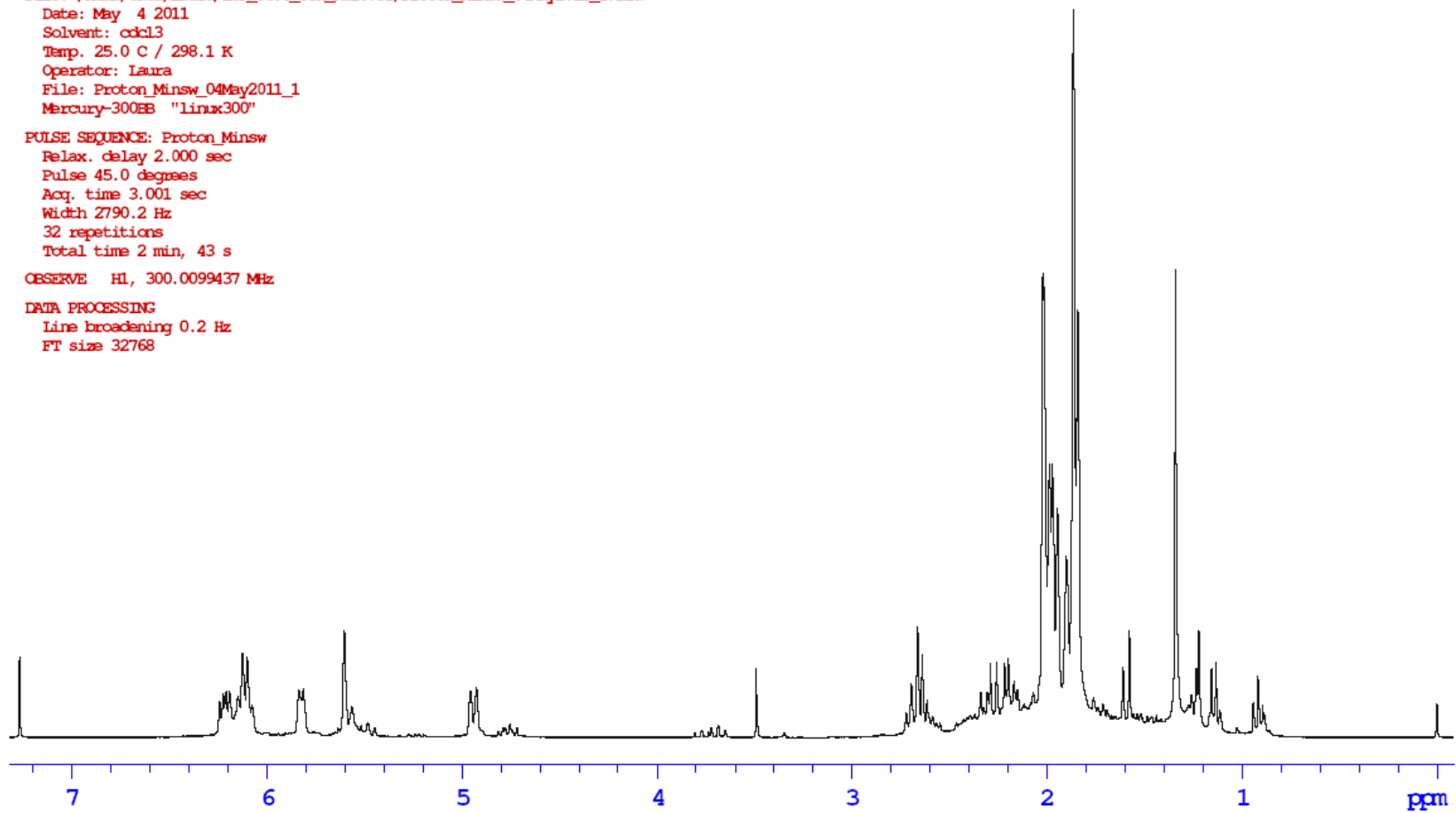
Slika 111. COSY (2D) NMR spektar jedinjenja **14** (8α -angeloiloksi, 11α -senecioiloksi- 10β -hidroksi- 6α H, 7α H-gvajan-3-en-12,6-olida)

SAMPLE: LCR_9398_3th_Rt:18.51
File: /home/data/Laura/LCR_9398_3th_Rt:18.51/Proton_Minsw_04May2011_1.fid
Date: May 4 2011
Solvent: cdcl3
Temp. 25.0 C / 298.1 K
Operator: Laura
File: Proton_Minsw_04May2011_1
Mercury-300EB "linux300"

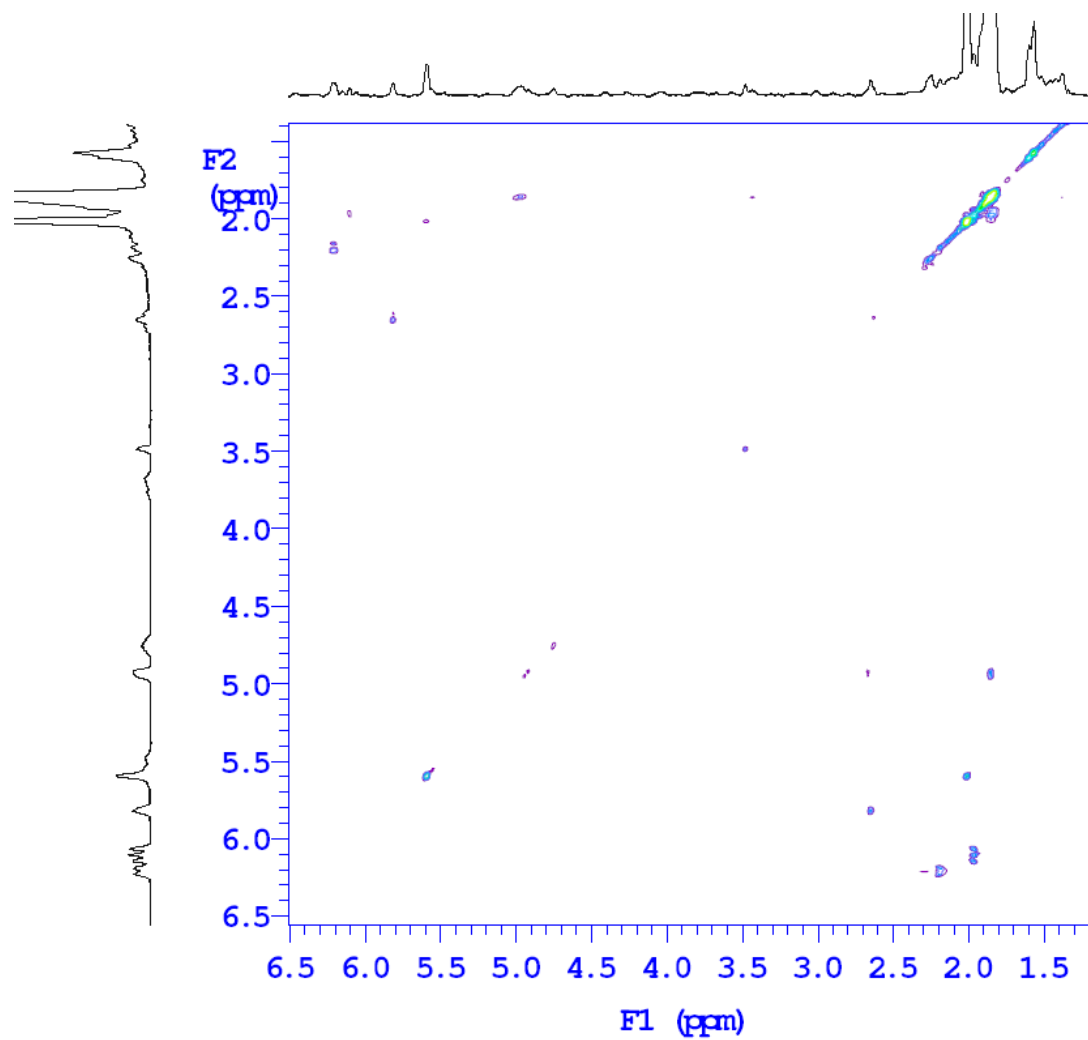
PULSE SEQUENCE: Proton_Minsw
Relax. delay 2.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 3.001 sec
Width 2790.2 Hz
32 repetitions
Total time 2 min, 43 s

OBSERVE H1, 300.0099437 MHz

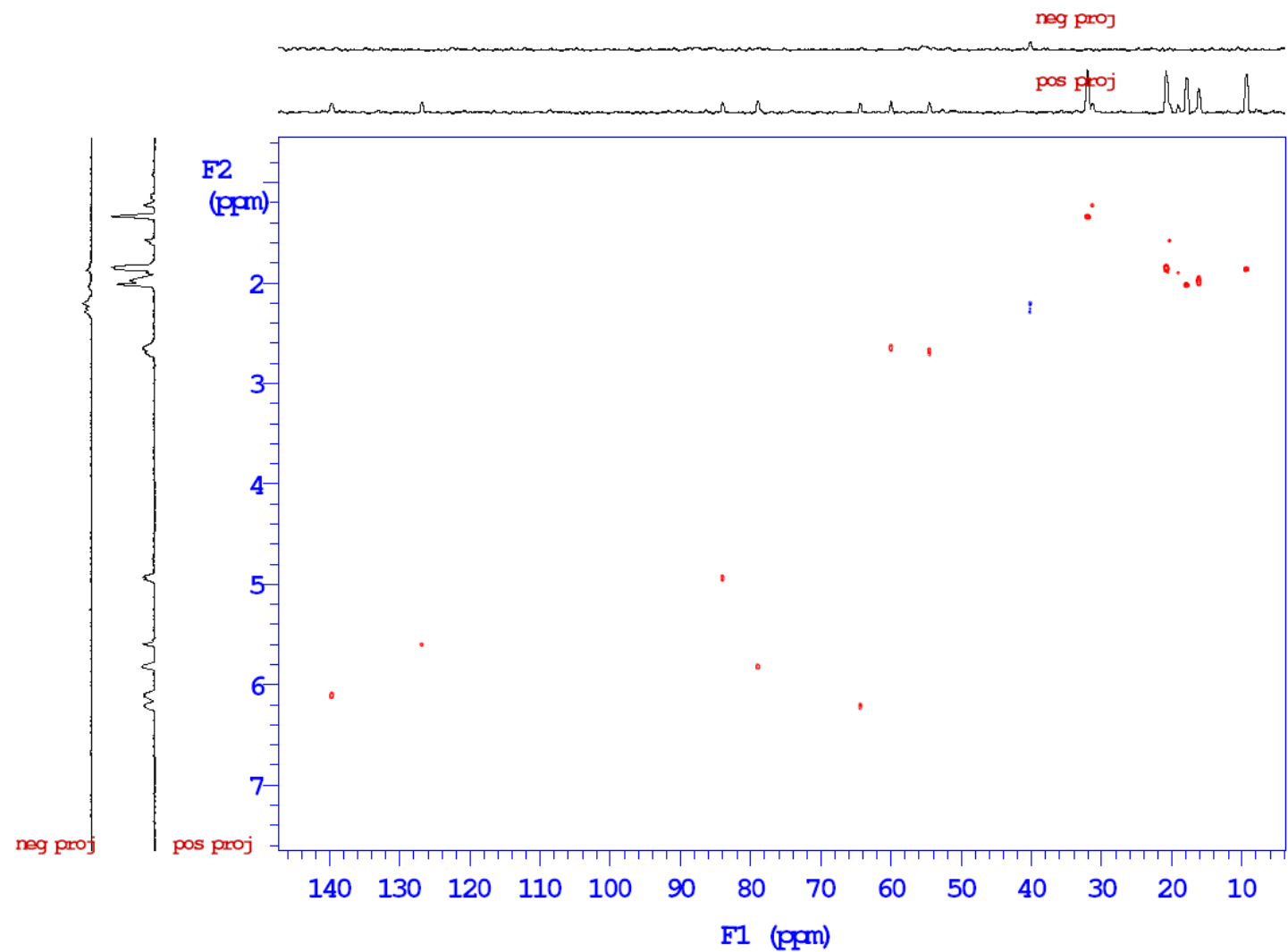
DATA PROCESSING
Line broadening 0.2 Hz
FT size 32768



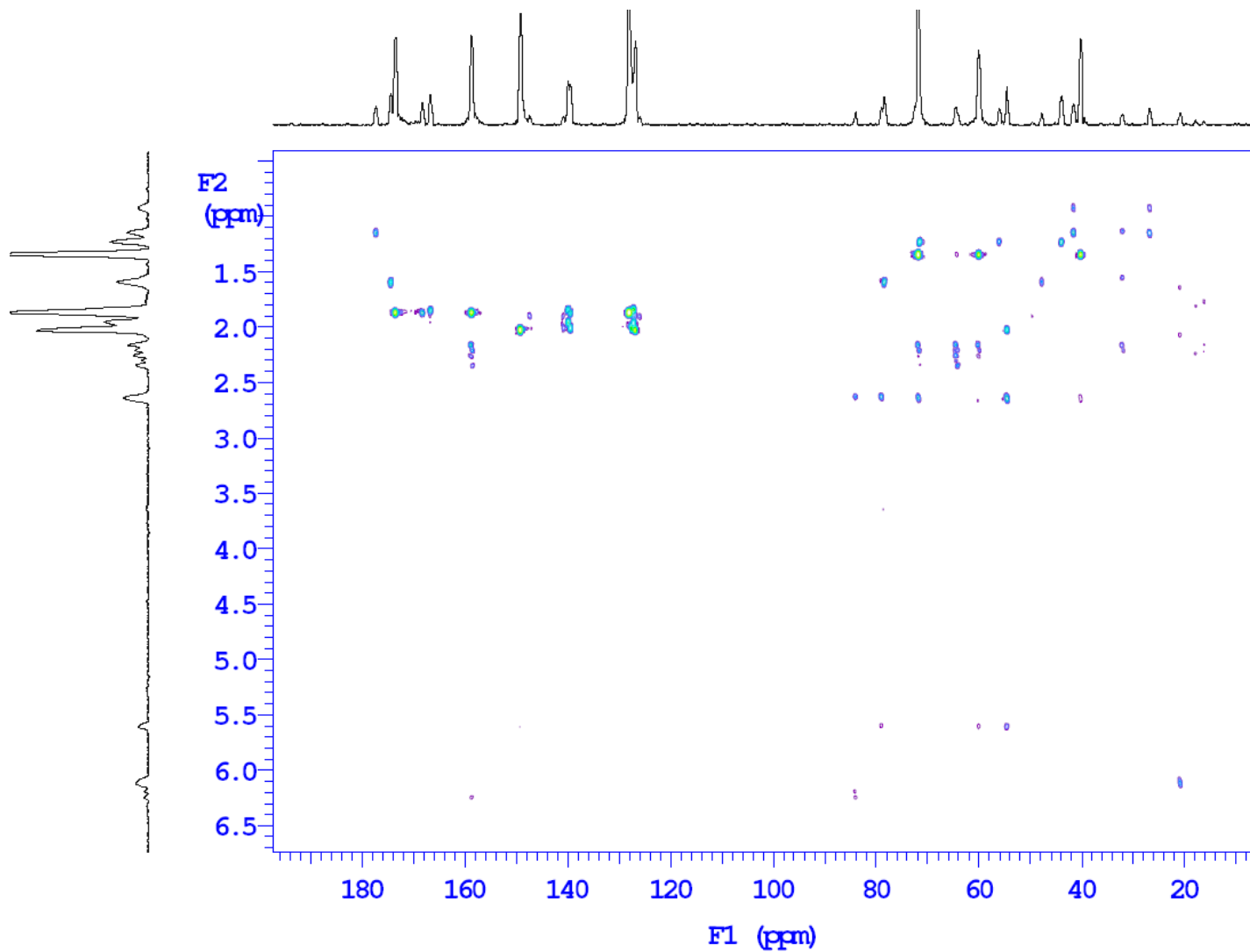
Slika 112. ^1H NMR spektar (300 MHz) jedinjenja **15** ($2\beta,8\alpha$ -diangeloiloksi- 10β -hidroksi- $6\alpha\text{H}$ -gvajan-3,(7-11)-dien-12,6-olida)



Slika 113. COSY spektar jedinjenja **15** ($2\beta,8\alpha$ -diangeloiloksi- 10β -hidroksi- 6α H-gvajan-3,(7-11)-dien-12,6-olida)



Slika 114. gHSQC spektar jedinjenja **15** ($2\beta,8\alpha$ -diangeloiloksi- 10β -hidroksi- $6\alpha\text{H}$ -gvajan-3,(7-11)-dien-12,6-olida)



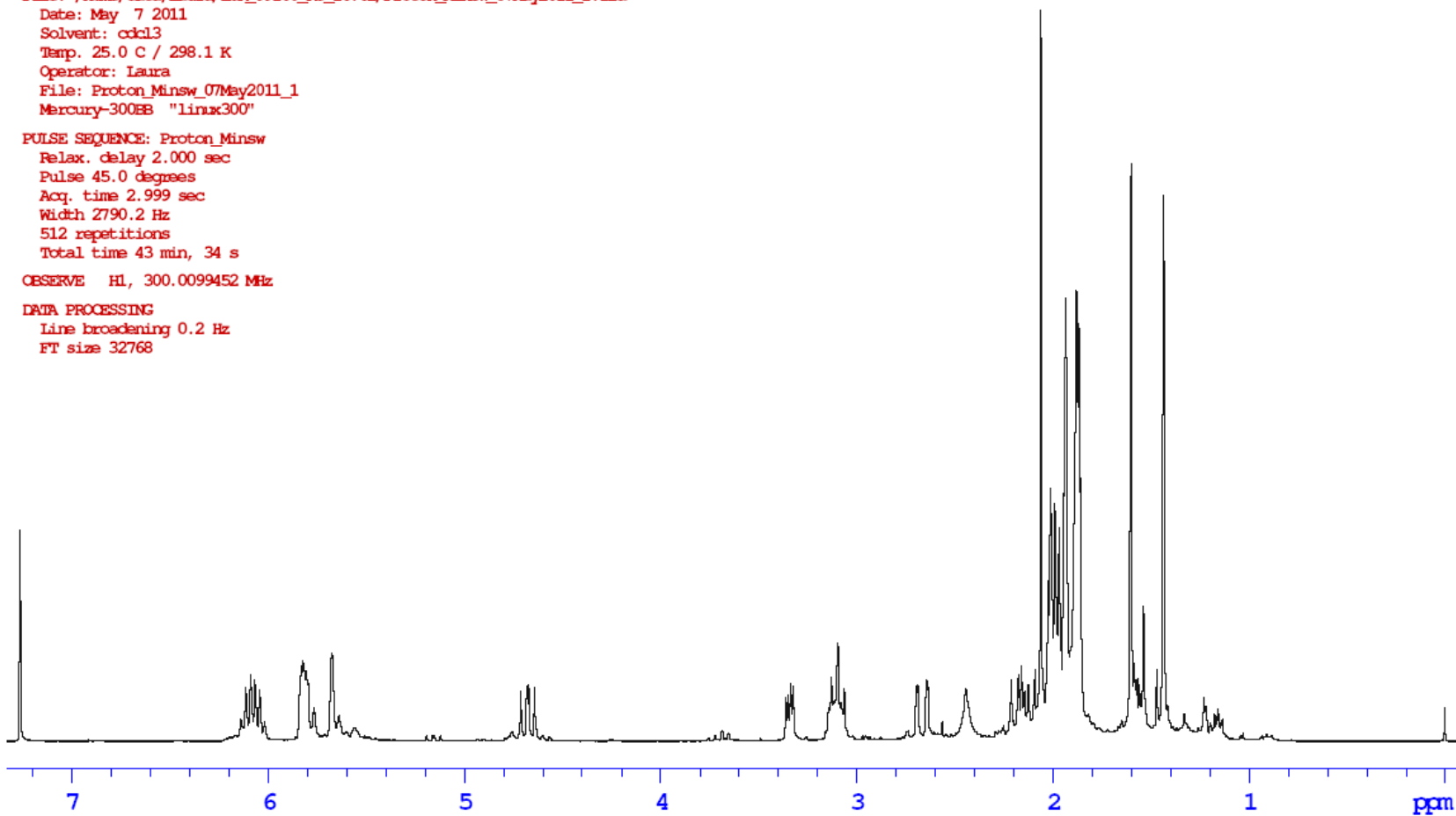
Slika 115. gHMBC spektar jedinjenja **15** ($2\beta,8\alpha$ -diangeloiloksi- 10β -hidroksi- $6\alpha\text{H}$ -gvajan-3,(7-11)-dien-12,6-olida)

SAMPLE: LQR_99100_Rt_16.62
File: /home/data/Laura/LQR_99100_Rt_16.62/Proton_Minsw_07May2011_1.fid
Date: May 7 2011
Solvent: cdcl3
Temp. 25.0 C / 298.1 K
Operator: Laura
File: Proton_Minsw_07May2011_1
Mercury-300EB "Linux300"

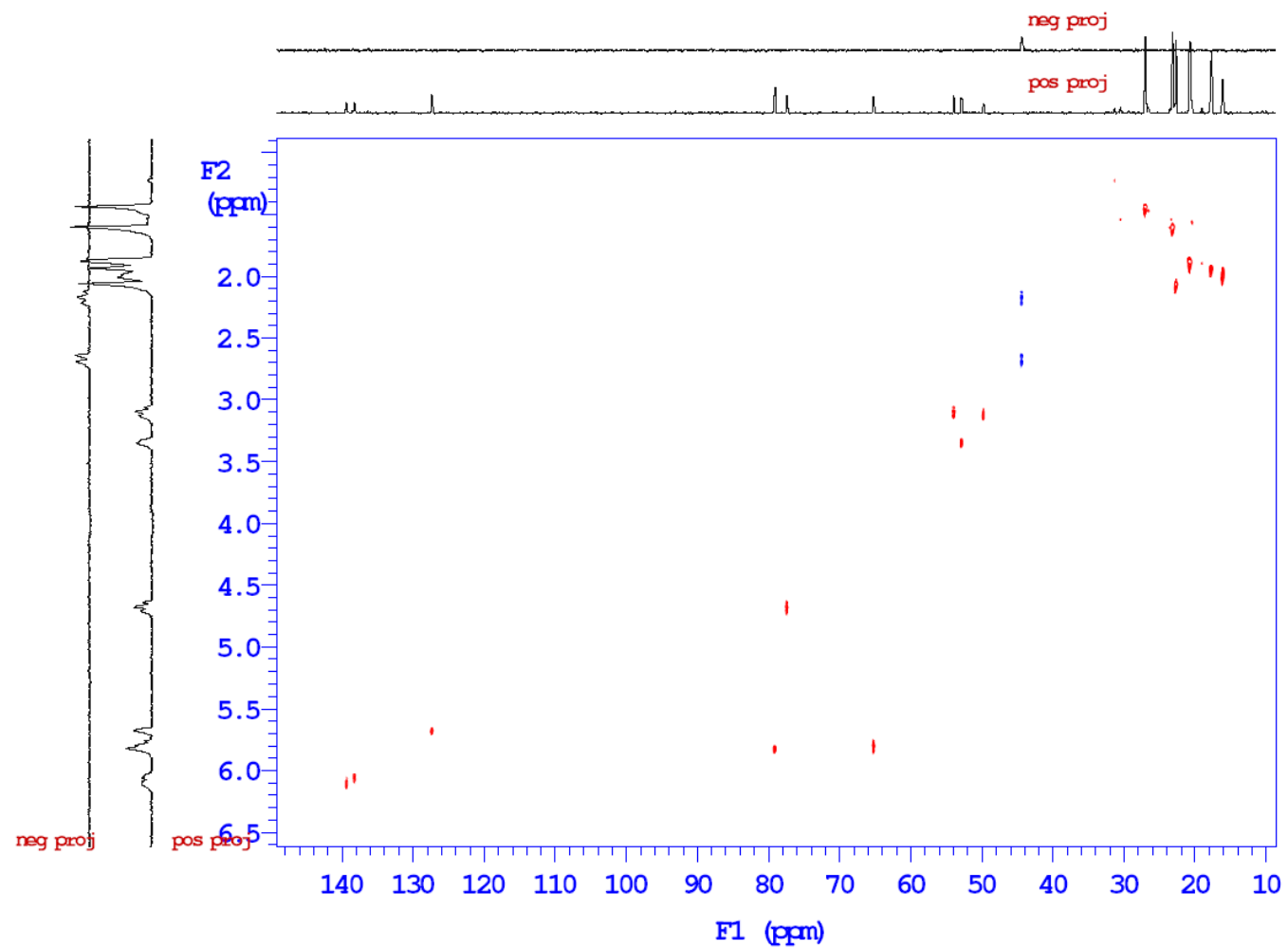
PULSE SEQUENCE: Proton_Minsw
Relax. delay 2.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 2.999 sec
Width 2790.2 Hz
512 repetitions
Total time 43 min, 34 s

OBSERVE H1, 300.0099452 MHz

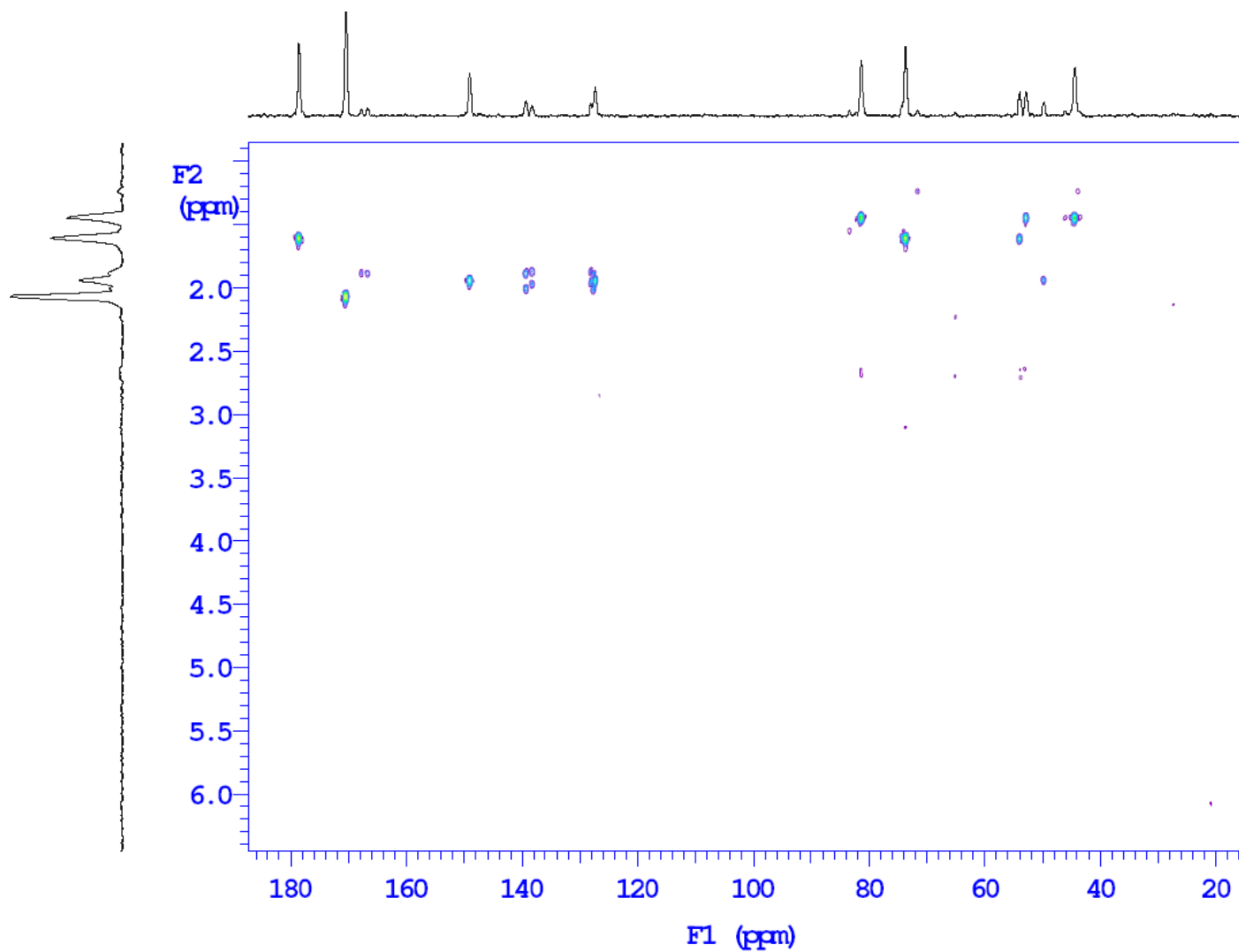
DATA PROCESSING
Line broadening 0.2 Hz
FT size 32768



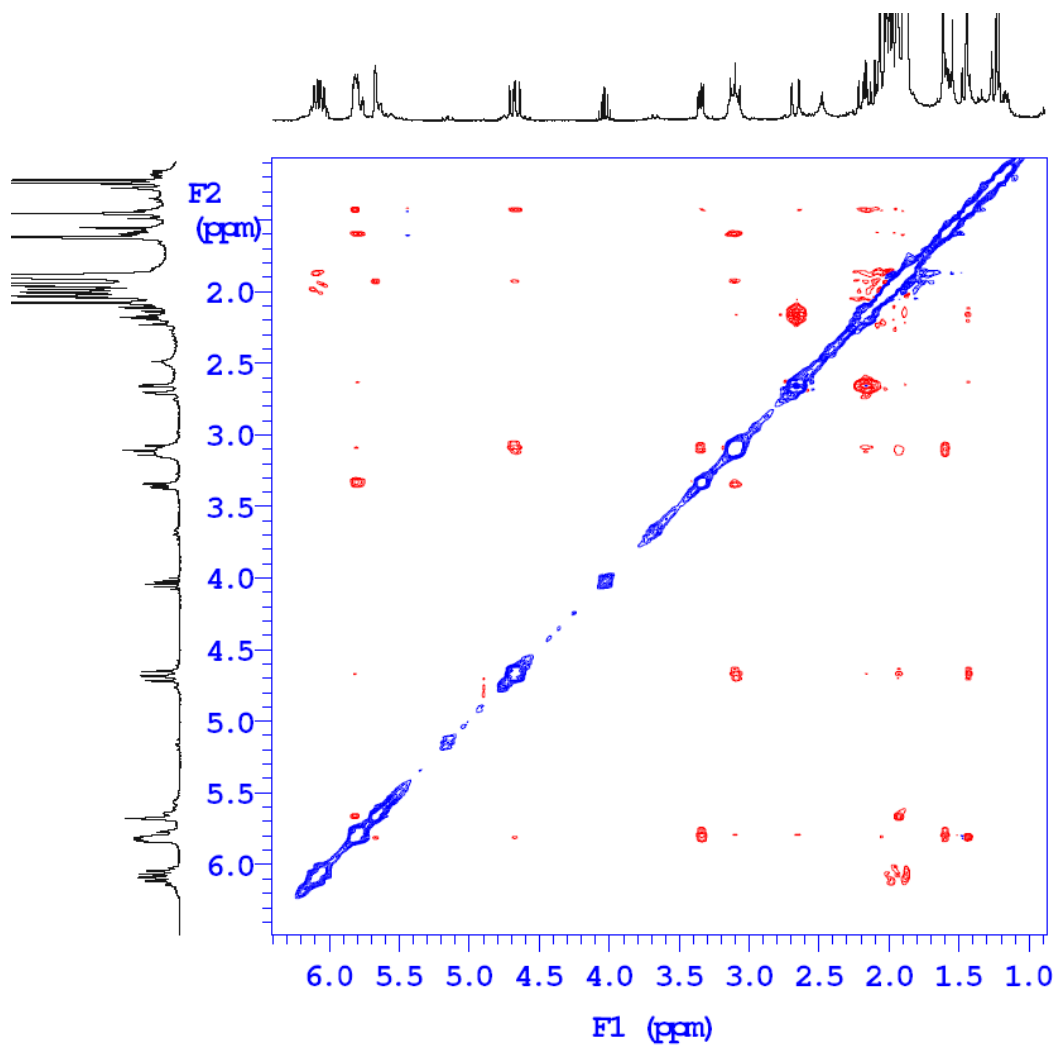
Slika 117. ¹H NMR spektar (300 MHz) jedinjenja **16** (8 α -acetoksi-2 β ,11 α -diangeloiloksi-10 β -hidroksi-6 α H,7 α H-gvajan-3-en-12,6-olida)



Slika 119. gHSQC spektar jedinjenja 16 (8α -acetoksi- 2β , 11α -diangeloiloksi- 10β -hidroksi- $6\alpha\text{H}$, $7\alpha\text{H}$ -gvajan-3-en-12,6-olida)



Slika 120. gHMBC spektar jedinjenja 16 (8α -acetoksi- 2β , 11α -diangeloiloksi- 10β -hidroksi- $6\alpha\text{H}$, $7\alpha\text{H}$ -gvajan-3-en-12,6-olida)



Slika 121. NOESY spektar jedinjenja 16 (8α -acetoksi- 2β , 11α -diangeloiloksi- 10β -hidroksi- 6α H, 7α H-gvajan-3-en-12,6-olida

OBJAVLJENI I SAOPŠTENI REZULTATI KOJI ČINE DEO DOKTORSKE DISERTACIJE

Radovi publikovani u međunarodnim časopisima

1. **Popović V**, Heyerick A, Petrović S, Van Calenbergh S, Karalić I, Niketić M, Deforce D. Sesquiterpene lactones from the extracts of two Balkan endemic *Laserpitium* species and their cytotoxic activity. **Phytochemistry**. 2013;87:102-111.
2. **Popović V**, Heyerick A, Petrović S, Van Calenbergh S, Karalić I, Niketić M, Deforce D. Cytotoxic activity of *Laserpitium latifolium* L. extract and its daucane and phenylpropanoid constituents. **Records of Natural Products**. 2013;7:245-249.
3. **Popović V**, Petrović S, Pavlović M, Milenković M, Couladis M, Tzakou O, Duraki Š, Niketić M. Essential oil from the underground parts of *Laserpitium zernyi*: potential source of α -bisabolol and its antimicrobial activity. **Natural Product Communication**. 2010;5:307-310.
4. Petrović S, Pavlović M, **Popović V**, Couladis M, Tzakou O, Milenković M, Vučićević D, Niketić M. Composition and antimicrobial activity of essential oils from flower and leaf of *Laserpitium zernyi* Hayek. **Journal of Essential Oil Research**. 2009;21:467-470.

Radovi saopšteni na skupovima međunarodnog značaja štampani u izvodima (M34)

1. **Popović V**, Petrović S, Drobac M, Milenković M, Couladis M, Tzakou O, Duraki Š, Niketić M. Composition and antimicrobial activity of essential oils from the underground parts of *Laserpitium zernyi* Hayek (Apiaceae). 5th Balkan Botanical Congress, 07-11.09. 2009, Beograd, Srbija. Book of Abstracts, pp. 149.
2. **Popović V**, Petrović S, Heyerick A, Van Calenbergh S, Deforce D, Niketić M. Sesquiterpene lactones from the extracts of *Laserpitium zernyi* and *L. ochridanum* and their cytotoxic activity. 7th CMAPSEEC - Conference on Medicinal and Aromatic Plants of Southeast European Countries. 27-30.05.2012, Subotica, Srbija. Book of Abstracts, pp. 10.

Radovi saopšteni na skupovima nacionalnog značaja štampani u izvodu (M64)

1. **Popović V**, Petrović S, Milenković M, Tomić A, Niketić M. Antioksidantna, antimikrobna aktivnost i fenolski sastojci metanolnih ekstrakata *Laserpitium zernyi* Hayek (Apiaceae). XXVIII Savetovanje o lekovitim i aromatičnim biljkama. 08-11.10.2008, Vršac, Srbija, Zbornik apstrakata, str. 125-126.
2. **Popović V**, Micov A, Tomić M, Stepanović-Petrović R, Petrović S. Antiedematozna aktivnost etarskih ulja iz podzemnih organa *Laserpitium zernyi* Hayek i cvasti kamilice, *Matricaria recutita* L. V Kongres farmaceuta Srbije sa međunarodnim učešćem. 13-17.10.2010, Beograd, Srbija, Arh farm, 60: 1012-1013.
3. **Popović V**, Petrović S, Pavlović-Drobac M, Milenković M, Couladis M, Niketić M. Hemijski sastav i antimikrobna aktivnost etarskih ulja *Laserpitium latifolium* L. i *Laserpitium ochridanum* Micevski (Apiaceae). V Kongres farmaceuta Srbije sa međunarodnim učešćem. 13-17.10.2010, Beograd, Srbija, Arh farm, 60: 1024-1025.

BIOGRAFIJA

Višnja Popović je rođena 18.03.1981. god. u Beogradu. Osnovnu školu i Prvu kragujevačku gimnaziju završila je u Kragujevcu. Farmaceutski fakultet Univerziteta u Beogradu upisala je školske 2000/01. god., diplomirala je 2006. god., sa ocenom 10 na diplomskom ispitu i prosečnom ocenom 9,03. Stručni ispit za diplomirane farmaceute položila je 2008. god. Doktorske akademske studije iz farmakognozije na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu upisala je školske 2007/08. god.

Tokom studija bila je stipendista Ministarstva prosvete i sporta (2001-02. god.), Republičke fondacije za razvoj naučnog i umetničkog podmlatka (2002-06. god.), kao i fonda "Dragoslav Srejović" (2001-04. god.). Kao član Nacionalne asocijacije studenata farmacije, 2006. god. obavila je jednomesečnu praksu u apoteci u Varšavi, Poljska. Kao stipendista Vlade Slovačke 2005. god. studijski je boravila tri meseca u Institutu za farmakologiju i botaniku Univerziteta Komenski u Bratislavi. Kao stipendista Basileus projekta (Erasmus Mundus Program, European Commission), tokom deset meseci 2010–11. god., studijski je boravila u Laboratoriji za farmakognoziju i fitohemiju Fakulteta farmaceutskih nauka Univerziteta u Gentu.

Dobitnica je Prve Godišnje nagrade 2011. god. za naučnoistraživački rad na posle diplomskim studijama Univerziteta u Beogradu – Farmaceutskog fakulteta.

Od 2011. god. angažovana je na projektima Ministarstva prosvete i nauke Republike Srbije: "Ispitivanje lekovitog potencijala biljaka: morfološka, hemijska i farmakološka karakterizacija" (br. 173021), i "Ispitivanje mehanizama dejstva, interakcija i toksičnih efekata adjuvantnih analgetika" (br. 175045). U periodu od 2007–2013. god. bila je angažovana kao saradnik u nastavi na Katedri za farmakognoziju Univerziteta u Beogradu – Farmaceutskog fakulteta. Autor je i koautor 5 radova u časopisima međunarodnog značaja. Govori engleski, a služi se nemačkim i holandskim jezikom.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Вишња Поповић

број индекса 9/07

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Анализа секундарних метаболита и испитивање фармаколошке активности одабраних врста рода *Laserpitium* L. (Apiaceae)

- 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, 10.06.2013.



Вишња Поповић

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора **Вишња Поповић**

Број индекса **9/07**

Студијски програм **Докторске академске студије из фармакогнозије**

Наслов рада **Анализа секундарних метаболита и испитивање фармаколошке активности одабраних врста рода *Laserpitium* L. (Ariaceae)**

Ментор Проф. др **Силвана Петровић**, редовни професор

Потписани/а **Вишња Поповић**

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, 10.06.2013.



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

Анализа секундарних метаболита и испитивање фармаколошке активности одабраних врста рода *Laserpitium* L. (Ariaceae)

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, 10.06.2013



1. Ауторство - Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.