

UNIVERZITET U BEOGRADU

FARMACEUTSKI FAKULTET

Violeta M. Milutinović

**ISPITIVANJE SEKUNDARNIH METABOLITA I
FARMAKOLOŠKE AKTIVNOSTI ODABRANIH
VRSTA RODA *HIERACIUM* L. (ASTERACEAE)
SA BALKANSKOG POLUOSTRVA**

Doktorska disertacija

Beograd, 2021

UNIVERZITET U BEOGRADU

FARMACEUTSKI FAKULTET

Violeta M. Milutinović

**ISPITIVANJE SEKUNDARNIH METABOLITA I
FARMAKOLOŠKE AKTIVNOSTI ODABRANIH
VRSTA RODA *HIERACIUM* L. (ASTERACEAE)
SA BALKANSKOG POLUOSTRVA**

Doktorska disertacija

Beograd, 2021

UNIVERSITY OF BELGRADE

FAKULTY OF PHARMACY

Violeta M. Milutinović

**INVESTIGATION OF SECONDARY
METABOLITES AND PHARMACOLOGICAL
ACTIVITY OF SELECTED SPECIES OF THE
GENUS *HIERACIUM* L. (ASTERACEAE) FROM
THE BALKAN PENINSULA**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2021

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

Deo eksperimenata urađen je na Katedri za medicinsku hemiju i farmakognoziju Univerziteta Illinois u Čikagu - Farmaceutskog fakulteta, SAD; Katedri za organsku hemiju i Katedri za farmakologiju Univerziteta u Beogradu - Farmaceutskog fakulteta; Institutu za prehrambenu tehnologiju i biohemiju Univerziteta u Beogradu - Poljoprivrednog fakulteta, Institutu za biološka istraživanja "Siniša Stanković" i Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije.

Mentor:

Dr sc. Silvana Petrović, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet

Članovi Komisije:

Dr sc. Marjan Niketić, naučni i muzejski savetnik,
Prirodnjački muzej, Beograd

Dr sc. Ljuboš Ušjak, naučni saradnik
Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet

Dr sc. Miloš Petković, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet

Dr sc. Maja Tomić, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet

U Beogradu, _____ .

Najveću zahvalnost dugujem svom mentoru prof. dr. Silvani Petrović na pruženoj prilici da se bavim ovom tematikom u okviru svog naučno-istraživačkog rada. Poštovanoj profesorki neizmerno zahvaljujem na prenetom znanju, stručnom vođenju, trudu, razumevanju i svesrdnoj pomoći koju mi je pružala tokom celokupnog procesa izrade doktorske disertacije.

Sa posebnim zadovoljstvom zahvaljujem dr. sc. Dejanu Nikoliću, višem naučnom saradniku na Katedri za medicinsku hemiju i farmakognoziju Univerziteta Illinois u Čikagu - Farmaceutskog fakulteta, SAD, na snimanju masenih spektara visoke rezolucije (HR-MS) odabranih izolata, stručnoj pomoći prilikom interpretacije dobijenih podataka i utvrđivanja strukture izolovanih jedinjenja. Veliko hvala na svom znanju o masenoj spektrometriji koje mi je pružio tokom ovih godina.

Najtoplije zahvaljujem dr. sc. Marjanu Niketiću, naučnom i muzejskom savetniku Prirodnjačkog muzeja u Beogradu, na sakupljanju i identifikaciji biljnog materijala, na velikom angažovanju, prenetom znanju i nesebičnoj pomoći naročito u sprovođenju multivarijantne statističke analize, tumačenju rezultata i tokom pisanja doktorske disertacije.

Veliku zahvalnost dugujem svom kolegi sa Katedre za farmakognoziju Univerziteta u Beogradu - Farmaceutskog fakulteta, dr. sc. Ljubošu Ušjaku, naučnom saradniku, na izuzetnoj pomoći tokom izrade i pisanja doktorske disertacije, kao i na značajnom zalaganju tokom višegodišnje saradnje.

Zahvaljujem dr. sc. Alekseju Kruniću, višem naučnom saradniku na Katedri za medicinsku hemiju i farmakognoziju Univerziteta Illinois u Čikagu - Farmaceutskog fakulteta, SAD i dr. sc. Milošu Petkoviću, vanrednom profesoru Katedre za organsku hemiju Univerziteta u Beogradu - Farmaceutskog fakulteta, na snimanju i stručnoj pomoći prilikom tumačenja NMR spektara odabranih izolata, a dr. sc. Milošu Petkoviću i na korisnim sugestijama prilikom pisanja doktorske disertacije.

Posebnu zahvalnost izražavam prof. dr. Maji Tomić i dr. sc. Urošu Pecikozi, sa Katedre za farmakologiju Univerziteta u Beogradu - Farmaceutskog fakulteta, na ispitivanju antihiperlgezijske i antiedematozne aktivnosti odabranih izolata, kao i na korisnim smernicama i savetima prilikom pisanja doktorske disertacije. Takođe, veliku zahvalnost dugujem prof. dr. Radici Stepanović-Petrović, rukovodiocu projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja (br. projekta 175045), na pruženoj mogućnosti da se deo farmakoloških ispitivanja u okviru ove doktorske disertacije sprovede.

Izjavljujem veliku zahvalnost dr. sc. Marini Soković i dr. sc. Ani Ćirić sa Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, na ispitivanju antimikrobne aktivnosti, i dr. sc. Tatjani Stanojković i dr. sc. Ivani Matić, sa Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije, na ispitivanju citotoksične aktivnosti odabranih izolata. Prof. dr. Aniti Klaus, sa Instituta za prehrambenu tehnologiju i biohemiju Univerziteta u Beogradu - Poljoprivrednog fakulteta, zahvaljujem na ukazanom poverenju i pruženoj mogućnosti za ispitivanje antiholinesterazne i dela antioksidantne aktivnosti izolata.

Dragom prijatelju i kolegi, dr. sc. Predragu Petroviću, naučnom saradniku u Inovacionom centru Univerziteta u Beogradu - Tehnološko-metalurškog fakulteta, dugujem veliku zahvalnost na nesebičnoj pomoći u izvođenju dela eksperimentalnog rada i diskusiji rezultata, kao i na podršci tokom izrade celokupne disertacije.

Kolektivu Katedre za farmakognoziju izražavam veliku zahvalnost na prijatnoj i radnoj atmosferi i prijateljskoj podršci. Posebno bih želela da zahvalim dr. sc. Milici Drobac, vanrednom profesoru, na znanjima i iskustvima koje sam sticala u eksperimentalnom radu na samom početku mog naučno-istraživačkog angažovanja. Iskreno zahvaljujem i kolegama, dr. sc. Jeleni Arsenijević, dr. sc. Ivanu Pavloviću, dr. sc. Stevanu Samardžiću, naučnim saradnicima, na kreativnim diskusijama, deljenju iskustava i korisnim savetima tokom sveukupnog eksperimentalnog rada.

Poštovanoj prof. dr. Nadi Kovačević izjavljujem neizmernu zahvalnost na poverenju i pruženoj prilici da se bavim istraživanjem u okviru ove doktorske disertacije kroz učešće na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja (br. projekta 173021), kojim rukovodi.

Disertaciju posvećujem porodici, majci Zorici, ocu Mikici i sestri Vesni. Njihova ljubav i podrška bili su najbitniji pokretači tokom višegodišnjeg rada.

Ispitivanje sekundarnih metabolita i farmakološke aktivnosti odabranih vrsta roda *Hieracium* L. (Asteraceae) sa Balkanskog poluostrva

Sažetak

Predmet doktorske disertacije je 28 vrsta roda *Hieracium* s. str. (12 nehibridogenih i 16 hibridogenih).

Semipreparativnim LC-MS metodama, iz MeOH ekstrakta cvasti *H. calophyllum* izolovana su četiri seskviterpenska laktona (krepizid E i tri nova jedinjenja: 8-epi-ikserisamin A, kalofilamin A i kalofilamin B), a iz MeOH ekstrakta podzemnih organa *H. scheppigianum* pet fenolkarboksilnih (mono- ili di-*O*-kafeoilhina) kiselina (identifikacija na osnovu NMR i MS spektara).

Ukupno četiri seskviterpenska laktona, sedam mono- ili di-*O*-kafeoilhina kiselina i 19 flavonoida (luteolin, apigenin, diosmetin, 15 njihovih heterozida i heterozid kvercetina) kvantifikovani su u suvim MeOH ekstraktima ispitivanih podzemnih organa dve vrste i herbi 28 vrsta LC-MS metodama, i pet triterpena (derivata ursana, oleana i lupana) u suvim CH₂Cl₂ ekstraktima herbi 28 vrsta GC-FID-MS metodom (identifikacija pomoću standarda, NMR, MS i/ili UV spektara). Hemosistematski značaj jedinjenja identifikovanih u herbama 28 vrsta utvrđen je multivarijantnim statističkim metodama (PCA, nMDS i UPGMA).

Suvi MeOH ekstrakti herbi su *in vitro* pokazali značajan ukupni antioksidantni potencijal i sposobnost neutralizacije slobodnih DPPH•, ABTS•• i OH• radikala (28 vrsta) i inhibicije acetilholinesteraze (27 vrsta) i butirilholinesteraze (7 vrsta). Među testiranih 12 jedinjenja, najbolju antiholinesteraznu aktivnost ispoljila su tri flavonoidna aglikona i 8-epi-ikserisamin A. Odabrani suvi MeOH i CH₂Cl₂ ekstrakti herbi šest vrsta pokazali su antimikrobnu aktivnost prema 18, a 8-epi-ikserisamin A i krepizid E prema 4 mikroorganizma. Isti odabrani izolati ispoljili su citotoksični efekat prema tri, odnosno jednoj tumorskoj ćelijskoj liniji, uz zanemarljivu inhibiciju rasta zdravih ćelija. Tri odabrana MeOH i CH₂Cl₂ ekstrakta su u modelu inflamacije šape pacova izazvane karageninom pokazala antihiperalgezijsku, ali ne i antiedematoznu aktivnost; bezbednost primene dva ekstrakta koji su ispoljili značajnu antihiperalgezijsku aktivnost pokazana je *in vivo* rotarod i testom akutne toksičnosti.

Ključne reči: 28 vrsta roda *Hieracium*, seskviterpenski laktoni, polifenoli (flavonoidi, fenolkarboksilne kiseline), triterpeni, hemosistematski značaj, antioksidantna, antimikrobna, citotoksična, antiholinesterazna, antihiperalgezijska aktivnost.

Naučna oblast: Farmacija.

Uža naučna oblast: Farmakognozija.

Investigation of secondary metabolites and pharmacological activity of selected species of the genus *Hieracium* L. (Asteraceae) from the Balkan Peninsula

Abstract

The focus of this doctoral dissertation is on 28 species of the genus *Hieracium* s. str. (12 non-hybridogenous and 16 hybridogenous).

Using semipreparative LC-MS methods, four sesquiterpene lactones (crepiside E and three new compounds: 8-epiixerisamine A, calophyllamine A and calophyllamine B) were isolated from the MeOH extract of *H. calophyllum* flowering heads, and five phenolic (mono- or di-*O*-caffeoylquinic) acids from the MeOH extract of *H. scheppigianum* underground parts (identification based on NMR and MS spectra).

Total of four sesquiterpene lactones, seven mono- or di-*O*-caffeoylquinic acids and 19 flavonoids (luteolin, apigenin, diosmetin, their 15 glycosides and one quercetin glycoside) were quantified in the dried MeOH extracts of the investigated underground parts of two species and herbs of 28 species, using LC-MS methods, and five triterpenes (ursane, oleanane and lupane derivatives) in the dried CH₂Cl₂ extracts of the herbs of 28 species, using GC-FID-MS method (identification using standards, NMR, MS and/or UV spectra). Chemosystematic significance of the compounds identified in the herbs of 28 species was determined using multivariate statistics (PCA, nMDS and UPGMA).

Dried MeOH herb extracts *in vitro* exhibited significant total antioxidant activity and scavenging of DPPH[•], ABTS^{•+} and OH[•] radicals (28 species), as well as the ability to inhibit acetylcholinesterase (27 species) and butyrylcholinesterase (7 species). Among 12 tested compounds, three flavonoid aglycones and 8-epiixerisamine A exhibited the highest anticholinesterase activity. Selected dried MeOH and CH₂Cl₂ herb extracts of six species showed antimicrobial activity against 18, whereas 8-epiixerisamine A and crepiside E against four microorganisms. The same selected isolates exhibited cytotoxic activity against three and one cancer cell lines, respectively, with negligible inhibition of the normal cells growth. In the carrageenan-induced localized inflammation model in rats, three selected MeOH and CH₂Cl₂ extracts exhibited antihyperalgesic, but not antiedematous activity; safety of the oral administration of two extracts that exhibited significant antihyperalgesic activity was demonstrated *in vivo* in rotarod test and acute oral toxicity study.

Keywords: 28 *Hieracium* species, sesquiterpene lactones, polyphenols (flavonoids, phenolic acids), triterpenes, chemosystematic significance, antioxidant, antimicrobial, cytotoxic, anticholinesterase, antihyperalgesic activity.

Scientific field: Pharmacy.

Scientific subfield: Pharmacognosy.

SADRŽAJ

UVOD	1
1. Opšte karakteristike roda <i>Hieracium</i> L.....	1
2. Taksonomska pripadnost i karakteristike 28 ispitivanih vrsta roda <i>Hieracium</i>	3
2.1. <i>Hieracium gymnocephalum</i> Griseb. ex Pant.....	5
2.2. <i>Hieracium orieni</i> A. Kern.....	6
2.3. <i>Hieracium blecicii</i> Niketić, nom. inval.....	7
2.4. <i>Hieracium paratrichum</i> Niketić, nom. inval.....	8
2.5. <i>Hieracium spirocaule</i> Niketić, nom. inval.....	8
2.6. <i>Hieracium anastrum</i> (Degen & Zahn) Niketić, comb. inval.....	9
2.7. <i>Hieracium calophyllum</i> R. Uechtr.....	10
2.8. <i>Hieracium scheppigianum</i> Freyn.....	11
2.9. <i>Hieracium durmitoricum</i> (Rohlena & Zahn) Niketić.....	12
2.10. <i>Hieracium guentheri-beckii</i> Zahn.....	13
2.11. <i>Hieracium mirificissimum</i> Rohlena & Zahn.....	14
2.12. <i>Hieracium coloriscapum</i> Rohlena & Zahn.....	15
2.13. <i>Hieracium pyricephalum</i> Niketić, nom. inval.....	15
2.14. <i>Hieracium mokragorae</i> (Nägeli & Peter) Freyn.....	17
2.15. <i>Hieracium pannosum</i> Boiss. s.l.....	17
2.16. <i>Hieracium plumulosum</i> A. Kern.....	19
2.17. <i>Hieracium albopellitum</i> (Zahn) Niketić.....	20
2.18. <i>Hieracium pseudoschenkii</i> (Rohlena & Zahn) Niketić.....	21
2.19. <i>Hieracium villosum</i> Jacq.....	22
2.20. <i>Hieracium pilosum</i> Schleich. ex Froel.....	23
2.21. <i>Hieracium glabratum</i> Willd.....	24
2.22. <i>Hieracium scorzonerifolium</i> Vill. s.l.....	24
2.23. <i>Hieracium valdepilosum</i> Vill. s.l.....	25
2.24. <i>Hieracium dentatum</i> Hoppe s.l.....	26
2.25. <i>Hieracium neilreichii</i> Beck.....	26
2.26. <i>Hieracium naegelianum</i> Pančić.....	28
2.27. <i>Hieracium tommasinianum</i> K. Malý.....	29
2.28. <i>Hieracium macrodontoides</i> (Zahn) Zahn.....	30
3. Sekundarni metaboliti taksona roda <i>Hieracium</i>	31
3.1. Fenolkarboksilne kiseline.....	31
3.2. Flavonoidi.....	31
3.3. Seskviterpenski laktoni.....	33
3.4. Triterpeni.....	33
3.5. Kumarini.....	33
4. Upotreba vrsta roda <i>Hieracium</i>	34
5. Farmakološka aktivnost vrsta roda <i>Hieracium</i>	35
CILJ	37
MATERIJAL I METODE	38
1. Aparatura.....	38
2. Biljni materijal.....	40
3. Izrada ekstrakata.....	41
3.1. Izrada i frakcionisanje MeOH ekstrakta cvasti <i>Hieracium calophyllum</i>	41
3.2. Izrada MeOH ekstrakata podzemnih organa <i>Hieracium scheppigianum</i> i <i>H. naegelianum</i>	41
3.3. Izrada ekstrakata herbi 28 ispitivanih vrsta.....	41
4. Hemijska ispitivanja.....	43
4.1. Ispitivanje seskviterpenskih laktona.....	43

4.1.1. Izolovanje seskviterpenskih laktona iz vodene frakcije MeOH ekstrakta cvasti <i>Hieracium calophyllum</i> i metode njihove strukturne karakterizacije	43
4.1.2. Kvalitativna i kvantitativna analiza seskviterpenskih laktona u MeOH ekstraktima podzemnih organa (<i>Hieracium scheppigianum</i> i <i>H. naegelianum</i>) i herbi (svih 28 vrsta).....	44
4.2. Ispitivanje fenolkarboksilnih kiselina i flavonoida.....	46
4.2.1. Izolovanje fenolkarboksilnih kiselina iz MeOH ekstrakta podzemnih organa <i>Hieracium scheppigianum</i> i metode njihove strukturne karakterizacije.....	46
4.2.2. Kvalitativna i kvantitativna analiza fenolkarboksilnih kiselina u MeOH ekstraktima podzemnih organa (<i>Hieracium scheppigianum</i> i <i>H. naegelianum</i>) i fenolkarboksilnih kiselina i flavonoida u MeOH ekstraktima herbi (svih 28 vrsta)	47
4.2.3. Kvalitativna analiza flavonoida u <i>n</i> -BuOH frakciji MeOH ekstrakta cvasti <i>Hieracium calophyllum</i>	49
4.3. Ispitivanje triterpena	50
4.3.1. Identifikacija triterpena u CH ₂ Cl ₂ ekstraktu herbe <i>Hieracium gymnocephalum</i>	50
4.3.2. Kvalitativna i kvantitativna analiza triterpena u CH ₂ Cl ₂ ekstraktima herbi 28 vrsta	51
4.4. Statistička analiza rezultata ispitivanja sekundarnih metabolita herbi u cilju procene njihovog homosistematskog značaja za 28 vrsta.....	51
4.5. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih polifenola u MeOH ekstraktima herbi 28 vrsta..	52
5. Farmakološka ispitivanja	52
5.1. Ispitivanje antioksidantne aktivnosti MeOH ekstrakata herbi 28 vrsta	52
5.1.1. Ispitivanje ukupnog antioksidantnog potencijala.....	52
5.1.1.1. FRAP test	52
5.1.1.2. CUPRAC test	53
5.1.2. Ispitivanje sposobnosti neutralizacije slobodnih radikala.....	53
5.1.2.1. DPPH test	53
5.1.2.2. 2-Dezoksiriboza test.....	53
5.1.2.3. ABTS test	54
5.2. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti odabranih MeOH i CH ₂ Cl ₂ ekstrakata herbi i izolovanih metabolita.....	54
5.2.1. Ispitivanje antibakterijske aktivnosti.....	55
5.2.2. Ispitivanje antifungalne aktivnosti	55
5.3. Ispitivanje citotoksične aktivnosti odabranih MeOH i CH ₂ Cl ₂ ekstrakata herbi i izolovanih metabolita.....	56
5.3.1. Određivanje ćelijskog preživljavanja – MTT test.....	56
5.4. Ispitivanje sposobnosti MeOH ekstrakata herbi 28 vrsta i odabranih metabolita da inhibiraju enzime acetilholinesterazu i butirilholinesterazu.....	56
5.5. Ispitivanje antihiperalgezijske i antiedematozne aktivnosti odabranih MeOH i CH ₂ Cl ₂ ekstrakata herbi	57
5.5.1. Ispitivanje antihiperalgezijske aktivnosti.....	58
5.5.2. Ispitivanje antiedematozne aktivnosti.....	59
5.6. Ispitivanje uticaja odabranih MeOH i CH ₂ Cl ₂ ekstrakata herbi na motornu spretnost eksperimentalnih životinja	60
5.7. Ispitivanje akutne toksičnosti odabranih MeOH i CH ₂ Cl ₂ ekstrakata herbi	60
REZULTATI I DISKUSIJA	61
1. Hemijska analiza	61
1.1. Ispitivanje seskviterpenskih laktona	61
1.1.1. Strukturna karakterizacija seskviterpenskih laktona izolovanih iz MeOH ekstrakta cvasti <i>Hieracium calophyllum</i>	61
1.1.1.1. Jedinjenje 1.....	61
1.1.1.2. Jedinjenje 2.....	67
1.1.1.3. Jedinjenje 3.....	71
1.1.1.4. Jedinjenje 4.....	79

1.1.2. Kvalitativna i kvantitativna analiza seskviterpenskih laktona u MeOH ekstraktima podzemnih organa (<i>Hieracium scheppigianum</i> i <i>H. naegelianum</i>) i herbi (svih 28 vrsta).....	80
1.2. Ispitivanje fenolkarboksilnih kiselina i flavonoida.....	85
1.2.1. Strukturna karakterizacija fenolkarboksilnih kiselina izolovanih iz MeOH ekstrakta podzemnih organa <i>Hieracium scheppigianum</i>	85
1.2.2. Kvalitativna i kvantitativna analiza fenolkarboksilnih kiselina u MeOH ekstraktima podzemnih organa (<i>Hieracium scheppigianum</i> i <i>H. naegelianum</i>) i fenolkarboksilnih kiselina i flavonoida u MeOH ekstraktima herbi (svih 28 vrsta)	92
1.3. Ispitivanje triterpena	106
1.3.1. Identifikacija triterpena u CH ₂ Cl ₂ ekstraktu herbe <i>Hieracium gymnocephalum</i>	106
1.3.2. Kvalitativna i kvantitativna analiza triterpena u CH ₂ Cl ₂ ekstraktima herbi 28 vrsta	114
1.4. Hemosistematski značaj seskviterpenskih laktona, flavonoida, fenolkarboksilnih kiselina i triterpena za 28 vrsta	116
1.4.1. Hemosistematski značaj seskviterpenskih laktona	117
1.4.2. Hemosistematski značaj flavonoida i fenolkarboksilnih kiselina	123
1.4.3. Hemosistematski značaj triterpena	135
2. Farmakološka ispitivanja	140
2.1. Ispitivanje antioksidantne aktivnosti MeOH ekstrakata herbi 28 vrsta	140
2.2. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti odabranih MeOH i CH ₂ Cl ₂ ekstrakata herbi i izolovanih metabolita	144
2.3. Ispitivanje citotoksične aktivnosti odabranih MeOH i CH ₂ Cl ₂ ekstrakata herbi i izolovanih metabolita.....	149
2.4. Ispitivanje sposobnosti MeOH ekstrakata herbi 28 vrsta i odabranih metabolita da inhibiraju enzime acetilholinesterazu i butirilholinesterazu.....	152
2.5. Ispitivanje antihiperalgezijske i antiedematozne aktivnosti odabranih MeOH i CH ₂ Cl ₂ ekstrakata herbi	155
2.6. Ispitivanje uticaja odabranih MeOH i CH ₂ Cl ₂ ekstrakata herbi na motornu spretnost eksperimentalnih životinja	162
2.7. Ispitivanje akutne toksičnosti odabranih MeOH i CH ₂ Cl ₂ ekstrakata herbi	162
ZAKLJUČCI	163
LITERATURA	167
PRILOZI	183

UVOD

1. Opšte karakteristike roda *Hieracium* L.¹

Hieracium L. s. str. (Asteraceae Durm., Cichorieae Lam. et DC., Hieraciine Dum.) je jedan od najvećih i sistematski najsloženijih rodova skrivenosemenica. Autohton je na teritoriji Evroazije, severne Afrike i Severne Amerike, sa centrima najvećeg diverziteta u Alpima, zapadnim delovima Evrope, na Balkanskom poluostrvu i Srednjem istoku. Naturalizovan je u južnoj Africi, Australiji i na Novom Zelandu (Kilian i sar., 2009). Tradicionalne klasifikacije roda uključivale su i podrod *Pilosella* (Hill) S. F. Gray i nekoliko manjih podrodova i sekcija (Zahn, 1921–1923), koji se danas uglavnom smatraju zasebnim rodovima (Greuter 2006+; Greuter i Raab-Straube, 2008; Kilian i sar., 2016; Sell i Vest, 1974; Sennikov i Illarionova, 2002).

Opis

Predstavnici ovog roda su višegodišnje zeljaste biljke sa belim mlečnim sokom (*latex*). Podzemno formiraju rizom, koji je ± izdužen, uspravan ili koso položen, bez stolona, ± debeo, pokriven ostacima listova. Stabljika je jednostavna, nekada razgranata, gola ili pokrivena retkim žlezdastim i često brojnim nežlezdastim dlakama različitog izgleda. Listovi su naizmenično raspoređeni duž stabljike; ako postoje bazalni listovi, mogu formirati rozetu (filopoda)² ili pseudorozetu pri osnovi stabljike (hipofilopoda). Celog su oboda ili mogu biti plitko do duboko testerasto nazubljeni.

Cvast je glavica izgrađena od brojnih žutih, dvopolnih jezičastih cvetova, sa po pet zubaca pri vrhu. Veličina glavica kod različitih vrsta varira u opsegu od 6 do 20 mm dužine. Glavice mogu biti pojedinačne ili grupisane u složenim račvastim ili metličastim cvastima (tzv. antelama). Drška terminalne glavice (tzv. akladijum) može biti različite dužine. Involukrum je cilindričnog ili loptastog oblika. Listići involukruma (tzv. filarije) poređani su ± crepasto u nekoliko nepravilnih nizova. Plod je ahenija (tzv. cipsela), obkoničnog oblika sa zašiljenom bazom, bez kljuna, najčešće sa deset rebara. Papsus je sačinjen od 1–2 reda jednostavnih dlaka, prljavobeke, retko čisto bele boje.

Brojnost trihoma i priroda indumentuma, naročito kod listića involukruma, su specifični unutar vrsta. Dlake mogu biti retke, pa čak ih može biti svega nekoliko; takođe mogu biti brojne ili čak guste tako da formiraju kontinuirani indumentum. Kod biljaka ovog roda, indumentum uključuje dve vrste dlaka: proste i razgranate. Proste dlake mogu biti žlezdaste (retke) i nežlezdaste, a boja im varira od snežnobeke do crne. Dužina i tip nežlezdastih dlaka zavisi od taksonomske pripadnosti, a mogu biti maljave, kosmate do rutave. Razgranate dlake se prema morfologiji dele na ± zvezdaste (tzv. pahuljaste), peraste ili delimično peraste (Gajić, 1975; Sell i West, 1974, 1976; Zahn, 1909, 1921–1923, 1930, 1936). Peraste dlake mogu biti upredene ili grupisane u krpolike pramenove.

¹Narodni nazivi na teritoriji bivše Jugoslavije za čitav rod *Hieracium* L. (prema tradicionalnoj klasifikaciji): jastrebnik, runjavica, kosmurica (srb.), runjika (hr.). Vrste roda *Pilosella* se u nekim krajevima Crne Gore nazivaju i lišajevica, zlatnik, mišje uvo, mišja ovčica, slavak, jandrašika. Latinski naziv roda *Hieracium* izveden je iz grčke reči *hierax* = jastreb, najverovatnije, jer ove biljke rastu na velikim nadmorskim visinama (Simonović, 1959; Gajić, 1975). Na engleskom govornom području zajednički naziv za pripadnike rodova *Hieracium* i *Pilosella* je *hawkweed* = jastrebova trava, uz dodatno označavanje prema morfološkim karakteristikama, npr. *mouse-hawkweed* (*Pilosella officinarum* Vaill.).

² U tradicionalnim monografijama roda (Zahn, 1921–1923), Flori Evrope (Sell i West, 1976) i Flori SR Srbije (Gajić, 1975), u okviru ključeva i opisa vrsta familije Asteraceae, primenjuje se specifična morfološka terminologija.

Razmnožavanje

Dve bitne karakteristike roda *Hieracium* s. str. odnose se na evolutivno poreklo taksona i preovlađujući tip reprodukcije, budući da je najveći broj vrsta hibridogenog porekla i da se one najčešće razmnožavaju aseksualno, putem semena (agamospermija, tj. apomiksis). Samo diploidne vrste karakteriše seksualna reprodukcija (Mráz i Zdvořák, 2019; Sell i Vest, 1976).

Apomiksis je proces kojim se skrivenosemenice razmnožavaju aseksualno, putem neoplođenih semena, stvarajući na taj način potomstvo genetski identično materinskim biljkama. U oko 2,2% rodova skrivenosemenica zabeležen je ovaj vid klonalne reprodukcije. Od toga oko 75% svih vrsta pripada dikotiledonim familijama Asteraceae i Rosaceae i monokotiledonoj familiji Poaceae. Uglavnom se javlja kod samoniklih biljaka, retko kod gajenih (Carman, 1997). Pojava je usko povezana sa poliploidijom i hibridizacijom. Gotovo svi poznati apomiktični taksoni su poliploidi i obično poseduju visoki stepen heterozigotnosti. Sa biosistematskog stanovišta klasifikacija apomiktičnih taksona je veoma kompleksna i glavni fokus istraživanja usmeren je ka njihovom razgraničenju. Frekvencija apomiktičnih taksona veća je u arktičkim i borealnim predelima i klimatima, verovatno usled većeg uspeha u kolonizaciji hladnih područja.

Osnovni broj hromozoma za sve taksone ovog roda je $x = 9$ (Bräutigam i Schuhwerk 2002; Sell i West 1976; Zahn 1921–1923, 1930). U srednjoj Evropi većina taksona roda *Hieracium* s. str. je triploidna ($2n = 3x = 27$) i tetraploidna ($2n = 4x = 36$) i apomiktična i pretpostavlja se da su nastali drevnom hibridizacijom (Fehrer i sar., 2009; Mráz i Zdvořák, 2019). U novije vreme hibridizacija je retka i do sada je zabeležena samo u taksonima južne i istočne Evrope (Mráz i sar., 2005, Mráz i sar., 2011).

Uobičajena je pretpostavka da su mnogi taksoni roda *Hieracium* s. str. nastali tokom i nedugo nakon ledenog doba, kada je hibridizacija između seksualnih „osnovnih“ vrsta bila veoma učestala (Fehrer i sar., 2009). Hibridizacija se definiše kao ukrštanje između jedinki koje pripadaju različitim vrstama ili genetski divergentnim populacijama unutar vrste (Soltis i Soltis, 2009). Hibridizacija može imati različite evolutivne posledice uključujući povećanu intraspecijsku genetsku raznolikost, genetske adaptacije, kao i diverzifikaciju koja obuhvata pojavu novih ekotipova i/ili vrsta (Rieseberg, 1997).

Pojavu hibridizacije kod vrsta ovog roda uslovljavaju određene njihove osobine. Cvetovi mogu abortirati degeneracijom prašnika, čime postaju jednopolni (ženski) (Gajić, 1975). Dodatno, za mnoge apomiktične taksone se zna da poseduju sterilne prašnike i uopšte ne proizvode polen. Ovakve promene se primećuju kod starih hibrida i biljaka koje se apomiktički razmnožavaju generacijama (Štorchová i sar., 2002).

Taksonomija

Tradicionalna klasifikacija posmatra rod *Hieracium* s.l. kao celinu, uključujući i srodne taksonomske grupe koje imaju status podroda ili sekcija (Zahn, 1921–1923). U najnovijim klasifikacijama su rangovi nekih taksona podignuti na status roda u okviru podtribusa Hieraciine (**Tabela 1**).

Tabela 1. Nomenklturni tretmani nekih taksona podtribusa Hieraciine u tradicionalnoj i savremenoj klasifikaciji

Zahn (1921–1923)	Sennikov i Illarionova (2002), Kilian i sar. (2016)
<i>H.</i> subgen. <i>Hieracium</i> („ <i>Euhieracium</i> “, „ <i>Archieracium</i> “)	<i>Hieracium</i> L. s. str.
<i>H.</i> sect. <i>Intybacea</i> W. D. J. Koch	<i>Schlagintweitia</i> Griseb.
<i>H.</i> subgen. <i>Pilosella</i> (Hill) Gray	<i>Pilosella</i> Hill
<i>H.</i> subgen. <i>Stenotheca</i> (Monier) Fr.	<i>Stenotheca</i> Monnier

U Flori Srbije (Gajić, 1975) i u Flori Evrope (Sell i West, 1976) *Hieracium* i *Pilosella* zadržavaju status podroda zbog nomenklaturne jednostavnosti. U Flori Turske (Sell i West, 1974) *Pilosella* Hill ima status roda. U zavisnosti od taksonomskog koncepta, u rod *Hieracium* uključuje se različiti broj vrsta, od 500 do 5000 (Mráz i Zdvořák, 2019). Prema novijim klasifikacijama, srodni taksoni *Hieracium*, *Pilosella* Hill, *Stenotheca* Monnier, *Schlagintweitia* Griseb., *Andryala* L. i *Hispidella* Lam. imaju status roda i pripadaju istom podtribusu Hieraciine (Greuter 2006+; Greuter i Raab-Straube, 2008; Kilian i sar., 2016; Sennikov i Illarionova, 2002). Prema ovim klasifikacijama, rod *Hieracium* s. str. obuhvata 3850 (Flann, 2009-) do 4540 (Greuter, 2006+) prihvaćenih vrsta i podvrsta. Prema tradicionalnoj klasifikaciji (Zahn, 1921–1923) postoje 443 vrste koje se u današnje vreme mogu alternativno smatrati mikrospecijskim agregatima (Chrtek, 1997; Niketić i sar., 2006; Sell i Vest, 1976; Tyler, 2001). Zahn je u svojim monografijama, od ukupnog broja opisanih vrsta, samo 38 taksona (8,58%) tretirao kao „glavne“ (osnovne) vrste (“*species principales*”) koje nisu nastale putem hibridizacije, dok je prema istom autoru njihova višestruka hibridizacija u prošlosti dovela do pojave 405 novih „intermedijarnih“ (hibridogenih) vrsta (91,42%). Osnovne vrste su klasifikovane u 25 sekcija, a velika većina intermedijarnih vrsta nastala je intersekcijским ukrštanjem (Zahn, 1921–1923).

Rasprostranjenje

Rod *Hieracium* je autohton u Evroaziji, severnoj Africi i Severnoj Americi, a velika većina vrsta rasprostranjena je u Evropi. Glavne centre diverziteta ovog roda čine planinski venci u centralnoj i zapadnoj Evropi, poput Alpa, Pirineja, Karpata, kao i planine Balkanskog poluostrva i Srednjeg Istoka (Kilian i sar., 2009). Takođe, postoje mnogi sekundarni centri za određene taksonomske grupe, poput Balkanskog poluostrva za *H. sect. Pannosa* (Zahn) Zahn, *Glauciformia* (Freyn) Zahn, *Naegeliana* Zahn ex Szelağ i *Cernua* R. Uechtr.

Balkansko poluostrvo je takođe i najbogatije u pogledu zastupljenosti drevnih diploidnih vrsta (Niketić i sar., 2006). Najveći diverzitet taksona konstatovan je u Dinaridima, a posebno na planini Durmitor (Crna Gora), sa više od šezdeset vrsta (u užem smislu) (Niketić i sar., 2003). Na ovom lokalitetu različite vrste obično koegzistiraju na istom staništu, sa istim tipom supstrata, što je posebno pogodno za komparativna hemosistematska ispitivanja. Stoga je za potrebe istraživanja u okviru ove doktorske disertacije većina vrsta (24 od 28) prikupljeno na planini Durmitor.

2. Taksonomska pripadnost i karakteristike 28 ispitivanih vrsta roda *Hieracium*

U okviru ove doktorske disertacije, hemijska i farmakološka istraživanja obuhvatila su nehibridogene vrste koje pripadaju sekcijama *Pannosa*, *Drepanoidea* Monnier, *Villosa* (Griseb.) Greml i *Naegeliana*, kao i hibridogene vrste koje su nastale ukrštanjem vrsta iz sekcija *Pannosa*, *Naegeliana*, *Drepanoidea*, *Prenanthoidea* W. D. J. Koch, *Villosa*, *Glauciformia*, *Hieracium* i/ili *Italica* (Fr.) Arv.-Touv. Lista ispitivanih vrsta roda *Hieracium* s. str. sa infrageneričkom klasifikacijom i poreklom data je u **Tabeli 2**. Za razliku od tradicionalne klasifikacije (Zahn, 1921–1923), koja je većinu taksona tretirala kao podvrste (trinominalno), zbog značajnih morfoloških razlika koje postoje među ispitivanim taksonima, u ovoj doktorskoj disertaciji primenjen je taksonomski binominalni koncept Niketića i sar. (2003; 2006).

Tabela 2. Spisak 28 ispitivanih vrsta roda *Hieracium* s. str. sa njihovom infrageneričkom klasifikacijom i pretpostavljenim poreklom

Sekcija	Akr. ^a Agregat	Hibridogeno poreklo (između agregata)	Akr. ^a Binominalna nomenklatura taksona	Hibridogeno poreklo (između vrsta)
<i>H. sect. Pannosa</i>	gym	<i>H. gymnocephalum</i>	gym <i>H. gymnocephalum</i> Griseb. ex Pant.	-
		-	ori <i>H. orienti</i> A. Kern.	-
		-	ble <i>H. bleicii</i> Niketić	-
		-	par <i>H. paratrichum</i> Niketić	-
		-	spi <i>H. spirocaule</i> Niketić	-
<i>Pannosa–Naegelianae–Pannosa</i>	<i>H. anastrum</i>	<i>gymnocephalum-pannosum</i>	ana <i>H. anastrum</i> (Degen & Zahn) Niketić	<i>coloriscapum–mokratorae</i>
<i>Pannosa–Prenanthoidea</i>	<i>H. calophyllum</i>	<i>gymnocephalum-prenanthoides</i>	cal <i>H. calophyllum</i> R. Uechtr.	<i>gymnocephalum–prenanthoides</i>
<i>Pannosa–Drepanoidea</i>	<i>H. scheppegianum</i>	<i>gymnocephalum-bupleuroides</i>	sch <i>H. scheppegianum</i> Freyn	<i>gymnocephalum–schenkii</i>
<i>Pannosa–Villosa–Prenanthoidea</i>	gymh <i>H. durmitoricum</i>	<i>gymnocephalum-valdepilosum</i>	dur <i>H. durmitoricum</i> (Rohlena & Zahn) Niketić	<i>gymnocephalum–willdenowianum</i>
<i>Pannosa–Villosa</i>	<i>H. guentheri-beckii</i>	<i>gymnocephalum-villosum</i>	gue <i>H. guentheri-beckii</i> Zahn	<i>gymnocephalum–villosum</i>
<i>Pannosa–Villosa–Drepanoidea</i>	<i>H. mirificissimum</i>	<i>gymnocephalum-scorzonerifolium</i>	mir <i>H. mirificissimum</i> Rohlena & Zahn	<i>gymnocephalum–scorzonerifolium</i>
<i>Pannosa–Naegelianae</i>	<i>H. coloriscapum</i>	<i>gymnocephalum-naegelianum</i>	col <i>H. coloriscapum</i> Rohlena & Zahn	<i>gymnocephalum–naegelianum</i>
	<i>H. pyricephalum</i>	<i>gymnocephalum-naegelianum</i>	pyr <i>H. pyricephalum</i> Niketić	<i>gymnocephalum–naegelianum</i>
<i>H. sect. Pannosa</i>	pan <i>H. pannosum</i>	-	mok <i>H. mokratorae</i> (Nägeli & Peter) Nägeli & Peter-	-
	-	-	pan <i>H. pannosum</i> Boiss. s.l.	-
	wal <i>H. waldsteinii</i>	-	plu <i>H. plumulosum</i> A. Kern.	-
<i>Pannosa–Glauciformia–Hieracium</i>	wal <i>H. guglerianum</i>	<i>thapsiformoides-murorum</i>	alb <i>H. albopellitum</i> (Zahn) Niketić	<i>thapsiformoides–murorum</i> s.l.
<i>H. sect. Drepanoidea</i>	bup <i>H. bupleuroides</i>	-	bup ^b <i>H. pseudoschenkii</i> (Rohlena & Zahn) Niketić	-
<i>H. sect. Villosa</i>	vil	<i>H. villosum</i>	vil <i>H. villosum</i> Jacq.	-
		-	pil <i>H. pilosum</i> Schleich. ex Froel.	-
<i>Villosa–Drepanoidea</i>	<i>H. glabratum</i>	<i>villosum-glaucum</i>	gla <i>H. glabratum</i> Willd.	<i>villosum–glaucum</i>
<i>Villosa–Drepanoidea</i>	<i>H. scorzonerifolium</i>	<i>villosum-bupleuroides</i>	sco <i>H. scorzonerifolium</i> Vill. s.l.	<i>villosum–schenkii</i>
<i>Villosa–Prenanthoidea</i>	vilh <i>H. valdepilosum</i>	<i>villosum-bifidum</i>	val <i>H. valdepilosum</i> Vill. s.l.	<i>villosum–prenanthoides</i>
<i>Villosa–Hieracium</i>	<i>H. dentatum</i>	<i>villosum-prenanthoides</i>	den <i>H. dentatum</i> Hoppe s.l.	<i>villosum–bifidum</i> s.l.
<i>Villosa–Hieracium</i>	<i>H. neilreichii</i>	<i>dentatum-bifidum</i>	nei <i>H. neilreichii</i> Beck	<i>dentatum</i> s.l.– <i>bifidum</i> s.l.
<i>H. sect. Naegelianae</i>	nae <i>H. naegelianum</i>	-	nae <i>H. naegelianum</i> Pančić	-
<i>Glauciformia–Italica</i>	tom <i>H. tommasinianum</i>	<i>heterogynum-racemosum</i>	tom <i>H. tommasinianum</i> K. Malý	<i>heterogynum–racemosum</i>
<i>Glauciformia–Italica–Hieracium</i>	<i>H. macrodontoides</i>	<i>tommasinianum-murorum</i>	mac <i>H. macrodontoides</i> (Zahn) Zahn	<i>tommasinianum–murorum</i> s.l.

^aAkr./Akr. – skraćeno ime vrsta/grupa. U grupama (agregatima) dodatne neformalne grupe su povezane akronimom (Akr.), a svaka sadrži jedan ili više agregata; **gymh** i **vilh** uključuju hibridogene taksone nastale od *H. gymnocephalum* i *H. villosum*. ^bManje poznata vrsta *H. pseudoschenkii* zadržala je akronim svoje grupe (**bup**).

Hieracium sect. Pannosa (Zahn) Zahn

Balkanska subendemična sekcija *Pannosa* naročito je bogata vrstama u orosubmediteranskom bioklimatskom području. Rasprostranjena je naročito na Balkanskom poluostrvu i na teritoriji Male Azije, kao i u predelima istočnog Mediterana (Gajić, 1975; Zahn 1921–1923), a jedan takson i na teritoriji južne Italije (Gajić, 1975).

Biljke ove sekcije se karakterišu stabljikom bez bazalnih listova, tj. bez rozete (afilopoda), eventualno sa donjim listovima sakupljenim u pseudorozetu (hipofilopoda). Listovi su eliptični do objajasti, blago nazubljenog ili skoro ravnog oboda, gustog indumentuma (pustenasto do vunasto dlakavi) kojeg čine karakteristične peraste nežlezdaste dlake koje su često upredene ili grupisane u krpolike pramenove. Ponekad se dodatno na naličju listova, u predelu peteljke i glavnog nerva, mogu javiti i mikrožlezde.

Cvetovi su jezičasti, hermafroditni, žuti, sakupljeni u krupne glavičaste cvasti, a ove u račvaste ili metličaste složene cvasti. Akladijum je \pm granat. Zupci krunice su uglavnom goli. Involukrum \pm cilindričan. Listići involukruma \pm zašiljeni, najčešće pravilno raspoređeni u više nizova (kao crepovi na krovu). Indumentum involukruma se razlikuje kod pripadnika ove sekcije; involukrum može biti sa vunastim ili pahuljastim dlakama ili sasvim go, sa ili bez žlezdastih dlaka. Ahenija je slamaste boje, svetlo do žutosmeđa (Gajić, 1975; Schischkin i Bobov, 2002; Zahn, 1921–1923).

Prema Zahn-u (1921–1923) unutar ove sekcije razlikuju se tri “*species principales*”, koje Sell i West (1976) definišu kao grupe (tj. agregate) i koji obuhvataju sledeće nehibridogene tipske vrste:

- *H. gymnocephalum* Griseb. ex Pant.,
- *H. waldsteinii* Tausch,
- *H. pannosum* Boiss.

Navedena tri agregata se morfološki razlikuju na osnovu građe antela i tipa indumentuma involukruma, a takođe su utvrđene i razlike u kariološkom pogledu.

Vrste agregata *H. gymnocephalum* karakterišu pojedinačne glavice ili mali broj glavica u anteli, kao i \pm goli involukrum i drške glavica, retko pokriveni mikrožlezdama. Agregat *H. waldsteinii* poseduje razređeno metličastu antelu, involukrum \pm pokriven pahuljastim dlakama i mikrožlezdama, bez perastih dlaka, ponekad sa kratkim prostim dlakama. Kod biljaka *H. pannosum* agregata, involukrum i drške glavica su gusto obrasli vunastim razgranatim dlakama (Gajić, 1975).

Do sada su unutar *H. gymnocephalum* agregata konstatovane samo triploidne vrste (osim na Prokletijama gde su zabeleženi diploidi), dok su unutar *H. waldsteinii* i *H. pannosum* grupa detektovani i drugi nivoi ploidije, uključujući kako diploidne tako i tri- i tetraploidne taksone (Chrtk i sar. 2009; Schuhwerk i Lippert, 1998; Vladimirov, 2000; Vladimirov i Szeląg, 2006).

AGREGAT *HIERACIUM GYMNOCEPHALUM*

Hieracium gymnocephalum agregat obuhvata pet nezavisnih nehibridogenih vrsta (Niketić, 2002), uključujući tipsku vrstu *H. gymnocephalum* Griseb. ex Pant. Centar diverziteta ove grupe čine planine Crne Gore (Niketić i sar., 2003), naročito planina Durmitor.

2.1. Hieracium gymnocephalum Griseb. ex Pant.³

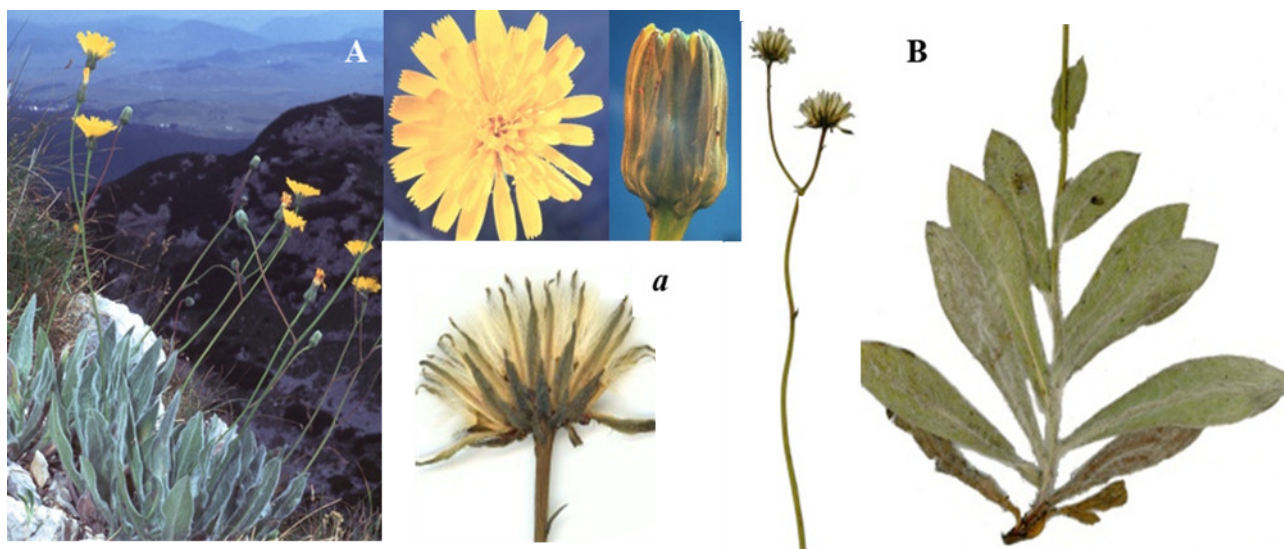
Oesterr. Bot. Z. 23: 266 (Pantocsek, 1873)

Hipo- do afilopoda, visine 25–45(70) cm, često sa više stabljika koje su uspravne ili ustajuće, sa brojnim dugim vunastim dlakama pri osnovi, a pri vrhu bez dlaka. Listovi su krupni, dimenzija 20 × 4 cm, sa peteljka. Liska je široko eliptična ili duguljasta, retko lancetasta, ravna, \pm celog oboda do blago nazubljena, pri osnovi sužena. Listovi su gusto obrasli sivim do beličastim upredenim perasto vunastim dlakama; osnova lista plavičasta do svetlozelena. Antela je često

³ Narodni naziv: gologlavičasta runjika (hr.) (Greuter, 2006+). Latinski naziv *gymnocephalum* potiče od reči *gymno* (grč.) – golo i *kephaios* (grč.) – glava.

visoko račvasta, sa 2–4(–9) glavica. Akladijum je dugačak 2–5(–15) cm. Drške glavica gole. Involukrum je dugačak 9–12(–15) mm, sačinjen od linearno lancetastih listića, uglavnom golih ili sa nekoliko jednostavnih žlezdastih dlaka svetle boje, na dugim tankim drškama. Jezičasti cvetovi glatki, bez dlaka, sa žutim žigovima. Ahenije bledosmeđe, papus prljavobeo (Gajić, 1975; Sell i West, 1976; Zahn, 1921–1923). $2n = 3x = 27$; $2n = 2x = 18$ (Chrtek i sar. 2009; Niketić i sar., 2006).

Rasprostranjenje. Ilirsko i skardopindsko područje, subkontinentalne i orosubmediteranske planine zapadnog dela Balkanskog poluostrva na teritoriji Bosne i Hercegovine, Crne Gore, Kosova i Metohije, Albanije, Severne Makedonije i severne Grčke (Gajić, 1975; Sell i West, 1976).



Slika 1. *H. gymnocephalum*, habitus i stanište (A), cvast (a), herbarski primerak (B)⁴.

2.2. *Hieracium orieni* A. Kern.

Oesterr. Bot. Z. 24: 170 (Kerner, 1874)

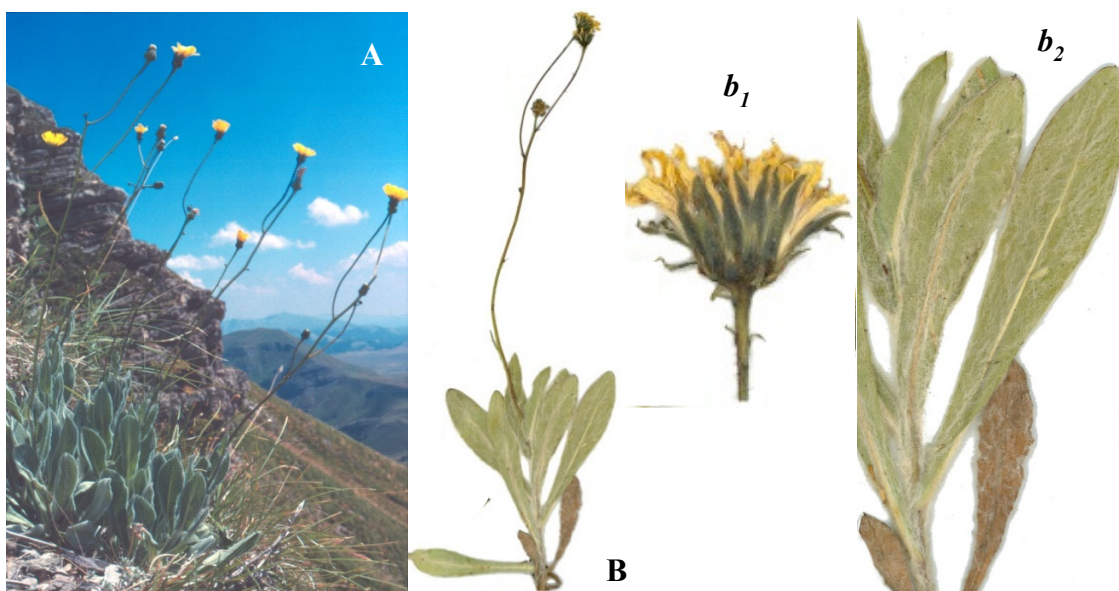
6th *Hieracium* Workshop, Contribution Abstracts: 28 (Niketić, 2002)

Prvi put opisana u statusu vrste (Kerner, 1874), da bi kasnije bila tretirana kao podvrsta [*H. gymnocephalum* subsp. *orien* (A. Kerner) Murr & Zahn], varijetet ili sinonim od *H. gymnocephalum* (Greuter 2006+; Greuter i Raab-Straube, 2008). Međutim Niketić (2002) prihvata status vrste *H. orieni* A. Kern., koji je usvojen i u okviru ove doktorske disertacije.

Afilopoda, retko pseudofilopoda, čija je stabljika uspravna, visoka 25–35(–60) cm, u donjoj polovini gusto obrasla dlakama. Listovi pri osnovi stabljike krupni, liske duguljasto do izduženo lancetaste, ravne, postepeno sužene pri osnovi, gusto obrasle beličastim do sivim upredenim perasto vunastim dlakama; osnova lista plavičastozelena. Antelu čini (2–)3–6(–9) vrlo udaljenih glavica, akladijum dužine 2–6(–16) cm, obično sa proređenim tamnim žlezdama. Drške glavica umereno obrasle tamnim žlezdama. Involukrum 10–12(–15) mm dužine, najčešće bez dlaka, sa ± gustim tamnim žlezdama. Ahenije su blede do žutosmeđe, papus prljavobeo. $2n = 3x = 27$ (Niketić i sar., 2006).

Rasprostranjenje. Oromediteranske, ređe subkontinentalne planine u Bosni i Hercegovini (Velež, Porim, Maglić) i Crnoj Gori (Orjen, Golija, Maganik, Prekornica, Sinjavina). (Niketić, person. komunik.; Zahn, 1921–1923).

⁴ Izvor fotografija – Prirodnački muzej u Beogradu. Kustos dr sc. Niketić M, naučni savetnik, autor fotografija.

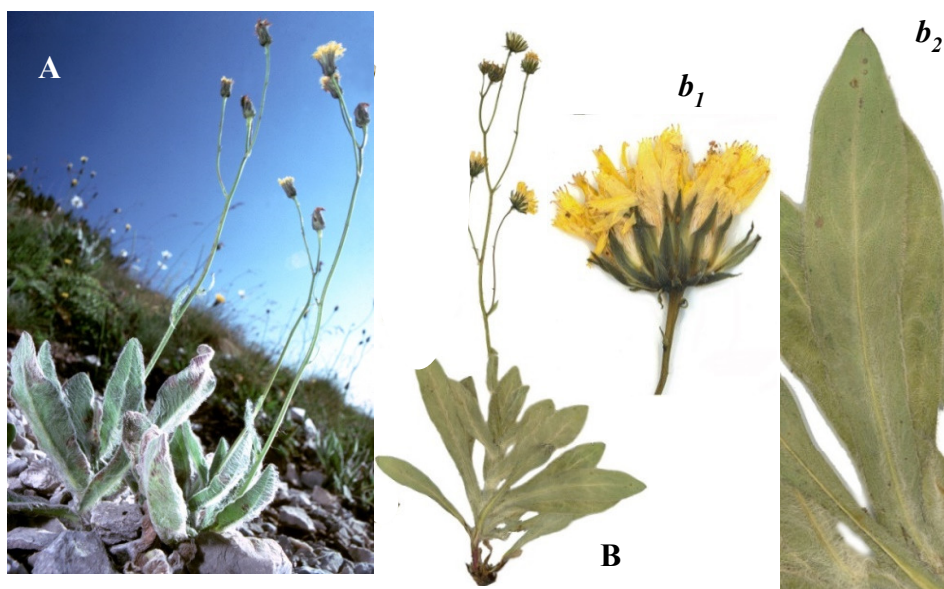


Slika 2. *H. orieni*, habitus i stanište (A), herbarski primerak (B), cvast (b_1), list (b_2)⁵.

2.3. *Hieracium bleicii* Niketić⁶, nom. inval.

VIII Optima meeting, Sevilla, Abstracts: 122 (Niketić, 1995)

Afilopoda, retko pseudofilopoda, čija je stabljika uspravna ili ustajuća, visoka 15–35(–45) cm, gusto obrasla dugačkim perastim dlakama pri osnovi, dok su u gornjim delovima dlake proređene ili je stabljika gola. Listovi su široko eliptični ili izduženi, žućkasto-zelenkaste osnove, dimenzija 5–10 × 2–3 cm, zatupasti ili ± zašiljenog vrha, najčešće celog oboda ili neznatno nazubljeni. Suženi su pri osnovi do skoro sedeći, proređenije obrasli žućkastim perastim dlakama, koje su kraće nego kod *H. gymnocephalum*. Liska često udubljene površine.



Slika 3. *H. bleicii*, habitus i stanište (A), herbarski primerak (B), cvast (b_1), list (b_2)⁷.

Antelu čini (1–)3–5(–12) glavica; akladijum dugačak 2–6(–11) cm, go ili sa nekoliko

⁵ Izvor fotografija – Prirodnjački muzej u Beogradu. Kustos dr sc. Niketić M, naučni savetnik, autor fotografija.

⁶ Vrsta je dobila ime prema prof. dr Blečiću V (1911-1981), Katedra za sistematiku viših biljaka, Biološka grupa Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

⁷ Izvor fotografija – Prirodnjački muzej u Beogradu. Kustos dr sc. Niketić M, naučni savetnik, autor fotografija.

mikrožlezda. Involukrum je dugačak 10–12(–14) mm, sa linearno lancetastim i zašiljenim listićima, koji su goli, veoma retko sa pojedinačnom dlakom. Žig žute boje. Ahenija bledosmeđa do tamnosmeđa, papus prljavobeo (Niketić, 1995; Petrović, 1999). U svim ispitanim populacijama dominiraju jedinke sa cevastim cvetovima. $2n = 3x = 27$ (Niketić i sar., 2006).

Rasprostranjenje. Planine Crne Gore (Durmitor, Moračke planine, Sinjavina, Maganik, Golija) i malog dela jugoistočne Bosne (Maglić, Volujak) (Niketić i sar., 2006). Najbrojnija populacija je konstatovana na Moračkim planinama (Niketić, person. komunik.). Vrsta raste na nešto hladnijim mikrostaništima u poređenju sa ostalim predstavnicima agregata.

2.4. *Hieracium paratrichum* Niketić, nom. inval.

6th *Hieracium* Workshop, Contribution Abstracts: 28 (Niketić, 2002)

Hipo- do afilopoda, sa ustajućim stabljikama visine 30–40(–60) cm, obraslim perastim, ponekad i žlezdastim dlakama na kratkim drškama. Listovi su široko eliptični ili lopatičasti, ± celog oboda, pri osnovi suženi do skoro sedeći; liska često udubljene površine, u osnovi žućkasto do plavičastozelena, gusto obrasla sivkastim do žućkastim dugim i mekim perastim i pustenastim dlakama. Antelu čini (1–)3–5(–15) glavica; akladijum dužine 2–7(–13) cm, sa kraćim perastim dlakama. Drške glavica sa perastim dlakama, ponekad i sa gustim mikrožlezdama. Involukrum je dugačak 10–12(–14) mm, sa linearno lancetastim i zašiljenim listićima, pri osnovi sa pojedinačnim perastim dlakama, retko i sa gustim mikrožlezdama. Žig žute boje. Ahenija bledosmeđa do smeđa, papus svetlije boje. $2n = 3x = 27$ (Niketić i sar., 2006).

Rasprostranjenje. Planine Crne Gore (Durmitor, Moračke planine, Sinjavina, Maganik, Golija) i malog dela jugoistočne Bosne (Maglić, Volujak, Zelengora) (Niketić i sar., 2006). Vrsta raste na nešto termofilnijim mikrostaništima u poređenju sa ostalim predstavnicima agregata.



Slika 4. *H. paratrichum*, habitus i stanište (A), cvast (a), herbarski primerak (B), list (b)⁸.

2.5. *Hieracium spirocaule* Niketić, nom. inval.

6th *Hieracium* Workshop, Contribution Abstracts: 28 (Niketić, 2002)

Pseudofilopoda do afilopoda, sa dugačkom ustajućom stabljikom visokom 30–40(–60) cm, koja je često vijugava, ponekad i spiralno zavijena, bez perastih i žlezdastih dlaka. Listovi su usko eliptični ili izduženi, ravni do udubljeni, ± zašiljenog vrha, najčešće po obodu izraženo talasasti; pri osnovi suženi do skoro sedeći, gusto obrasli beličastim do sivim mekim perastim dlakama; osnovna boja lista modroz zelena. Antelu čini (1–)2–4(–9) glavica; akladijum dužine 2–8(–15) cm, u odnosu na

⁸ Izvor fotografija – Prirodnački muzej u Beogradu. Kustos dr sc. Niketić M, naučni savetnik, autor fotografija.

cvast relativno duži u odnosu na srodne vrste (četiri puta kraći do iste dužine), bez dlaka. Drške glavica gole. Involukrum je dužine 10–12(–14) mm, sa linearno lancetastim zašiljenim listićima, koji su goli ili su prisutne svetle žlezdaste dlake na dugim drškama. Žigovi žuti. Ahenija bledosmeđa do smeđa, papus svetlobeličast. $2n = 3x = 27$ (Niketić i sar., 2006).

Rasprostranjenje. Crna Gora (Durmitor, Orjen, Maganik, Golija, Moračke planine, Sinjavina) i mali deo jugoistočne Bosne (Maglić, Volujak) (Niketić, 2002; Niketić i sar., 2006).



Slika 5. *H. spirocaule*, habitus i stanište (A), cvast (a)⁹.

HIBRIDOGENE VRSTE AGREGATA *HIERACIUM GYMNOCEPHALUM*

Prema Zahn-u (1921–1923; 1936) ovaj kompleks obuhvata 13 vrsta i više podvrsta nastalih običnim ili višestrukim ukrštanjem predstavnika agregata *H. gymnocephalum* sa vrstama iz osam različitih sekcija. Neformalna hibridogena grupa „gymh” (Tabela 2), ispitivana u okviru ove disertacije obuhvata šest interseksijskih hibrida od kojih su neke vrste najverovatnije nastale hibridizacijom kroz dvostruko ukrštanje vrsta koje pripadaju dvema sekcijama (*H. anastrum* (Degen & Zahn) Niketić) ili trima sekcijama (*H. durmitoricum* (Rohlena & Zahn) Niketić i *H. mirificissimum* Rohlena & Zahn). Stace (1998) ukazuje na potrebu da se hibridogene vrste koje potiču iz sekcije *Pannosa* mogu grupisati u odvojenu sekciju *Pilosissima* Stace & P. D. Sell, ali se ipak u okviru ove disertacije primenjuje hibridogena interseksijska kombinacija koju daju Zahn (1921–1923, 1936) i Gajić (1975).

2.6. *Hieracium anastrum* (Degen & Zahn) Niketić, comb. inval.

Phytochem. Anal. 29: 31 (Milutinović i sar., 2018)

≡ *H. gymnocephalum* subsp. *anastrum* Degen & Zahn, Magyar Bot. Lapok 6: 218 (Zahn, 1907)

≡ *H. pichleri* subsp. *anastrum* (Degen & Zahn) Zahn, Syn. Mitteleur. Fl. 12(3): 55 (Zahn, 1936)

Zahn (1921–1923) u monografiji “Das Pflanzenreich. Regni Vegeabilis Conspectus” (Engler, A. ed.) ovoj vrsti daje status podvrste tipske vrste agregata *H. gymnocephalum*. U kasnijoj monografiji (Zahn, 1936) isti autor je vodi kao podvrstu hibridogene vrste *H. pichleri* A. Kern.: *H. pichleri* subsp. *anastrum* (Degen et Zahn) Zahn, uz navođenje njene hibridogene kombinacije *H. gymnocephalum* > *H. pannosum* Boiss. Niketić je (u Milutinović i sar., 2018) ovom taksonu preliminarno dodelio novi status i kombinaciju uz precizniju hibridogenu odrednicu, *H. coloriscapum* Rohlena & Zahn – *H. mokragorae* (Nägeli & Peter) Nägeli & Peter, koja pored predstavnika sekcije *Pannosa* (*H. mokragorae*) uključuje i hibridogenu vrstu *H. coloriscapum* koja

⁹ Izvor fotografija – Prirodnački muzej u Beogradu. Kustos dr sc. Niketić M, naučni savetnik, autor fotografija.

vodi poreklo od *H. gymnocephalum* i *H. naegelianum* Pančić (sect. *Naegeliana*). Isti koncept je prihvaćen i u ovoj doktorskoj disertaciji.

Filopoda, sa stabljikom visokom do 30 cm, bez pahuljastih dlaka, pri osnovi sa perastim dlakama, u gornjem delu skoro gola. Listovi lancetasti, pri osnovi suženi, u bazalnom delu stabljike formiraju rozetu, u ostalim delovima stabljike ih je 7–15; sa proređenim do gustim perastim dlakama koje su često svilenasto upredene. Antelu čine najviše tri dugačke grane, najčešće sa po jednom glavicom. Akladijum je dugačak 4–20 cm. Glavice su umereno do gusto obrasle perastim dlakama, sa retkim mikrožlezdama i bez pahuljastih dlaka. Drške glavica umereno do gusto obrasle perastim dlakama. Involukrum je dugačak 11–14 mm, prilično širok; listići su široki, ± zašiljeni.

Rasprostranjenje. Hrvatska (Velebit), Hercegovina (Prenj), Crna Gora i planina Korab na granici Albanije i Severne Makedonije (Milutinović i sar., 2018; Zahn, 1936).



Slika 6. *H. anastrum*, herbarski primerak, list (a), cvast (b)¹⁰.

2.7. *Hieracium calophyllum* R. Uechtr.

Oesterr. Bot. Z. 24: 106 (Uechtritz, 1874)

Tipaska vrsta agregata *H. calophyllum* je hibridogena vrsta za koju postoje različita tumačenja njenog hibridnog porekla: *H. thapsiforme–prenanthoides* Nägeli & Peter ili *H. waldsteini–prenanthoides* Freyn, dok prema monografiji Zahn (1921–1923) nastaje ukrštanjem vrsta *H. gymnocephalum* i *H. prenanthoides* L. (*juratum*) (sect. *Prenanthoidea*). U Zahn-ovim monografijama (Zahn, 1921–1923, 1936) navode se tri podvrste i nekoliko nižih taksona.

Sekcija *Prenanthoidea* prema nekim autorima vodi poreklo od drevnog progenitora sekcije *Umbellata* Fr. (Fries, 1862), a po drugima od predstavnika sekcije *Vulgata* Griseb. (Stace, 1998). Pripadnici sect. *Prenanthoidea* su često stupali u hibridizaciju i zahvataju široko područje od Grenlanda i istočnog Sibira na severu (odsutni na Arktiku) do najjužnijih delova mediteranskog regiona. To su uglavnom planinske biljke, koje rastu na alpijskim i subalpijskim livadama, šumama i šumskim rubovima, a u severnim predelima se spuštaju na niže nadmorske visine, gde rastu u brdima i u reliktnim šumama (Schischkin i Bobov, 2002). Biljke ove sekcije su uglavnom afilopode sa brojnim listovima koji su skoro bez žlezda, u donjim delovima stabljike su suženi pri osnovi, dok su u središnjem delu stabljike u obliku violine, proširene osnove koja obuhvata stabljiku. Antelu čini obično više glavica, akladijum granat i formira metličastu cvast. Antela i involukrum su gusto pokriveni tamnim žlezdama. Involukrum je manjih dimenzija, sa zatupastim listićima. Zupci jezičastih cvetova dlakavi. Ahenija može biti siva do svetlo ili crvenkastosmeđa (Gajić, 1975).

¹⁰ Izvor fotografije – Prirodjački muzej u Beogradu. Kustos dr sc. Niketić M, naučni savetnik, autor fotografije.

Niketić i sar. (2006) na osnovu analiziranih populacija sa planine Orjen i drugih lokaliteta, utvrdili su hibridogenu kombinaciju *H. gymnocephalum* – *H. schenkii* (Griseb.) Schljakov, koja je i usvojena u okviru ove doktorske disertacije. Roditeljska vrsta *H. schenkii* prema Zahn-u (1921–1923) se vodi kao varijetet, *H. bupleuroides* var. *schenkii* Griseb. (sect. *Drepanoidea*).

Filopoda, sa stabljikom visine 20–40 cm, koja je ± prekrivena mnogobrojnim perastim ili slabo perastim dlakama, bez pahuljastih ili žlezdastih dlaka. Listova na stabljici ima 2–6, sa manje ili više brojnim perastim ili slabo perastim dlakama, ponekad sa sitnim žlezdastim dlakama po obodu; bazalni lopatičasti do lancetasti, ± sedeći, ± nazubljeni, pri osnovi zaobljeni. Antelu čini 1–5 glavica. Akladijum doseže dužinu 1/6 do 1/2 stabljike, račva se na 0–2(–4) grane sa po jednom glavicom na vrhu. Involukrum dužine oko 12 mm, ± prekriven pahuljastim dlakama i mikrožlezdama pri osnovi, retko sa prostim dlakama. Listići involukruma široko lancetasti, unutrašnji ± sedeći. Jezičasti cvetovi su goli. Ahenije su svetlosmeđe. Raste na krečnjačkim planinskim rudinama i kamenjarima. Cveta u julu i avgustu (Zahn, 1921–1923).

Rasprostranjenje. Planine Bosne, Crne Gore i Kosova i Metohije (Niketić i sar., 2003), na severozapad do Velebita u Hrvatskoj (Zahn, 1921–1923). Triploidna vrsta, $2n = 3x = 27$ (Niketić i sar., 2006).

2.9. *Hieracium durmitoricum* (Rohlena & Zahn) Niketić

Bot. Chron. (Patras) 16: 34 (Niketić i sar., 2003)

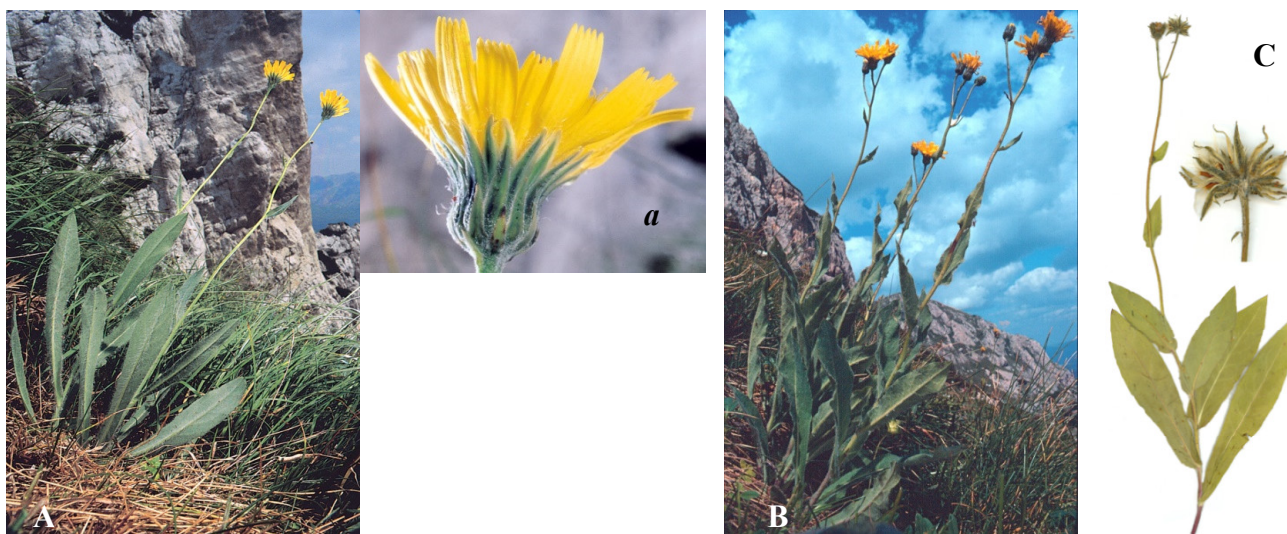
≡ *H. scheppigianum* subsp. *durmitoreum* Rohlena & Zahn, Feddes Repert 6: 232 (Zahn, 1909)

≡ *H. flexicaule* subsp. *durmitoreum* (Rohlena & Zahn) Zahn, Pflanzenr. 77(IV.280): 583 (Zahn, 1921–1923)

≡ *H. flexicaule* var. *durmitoreum* (Rohlena & Zahn) Hayek, Repert. Spec. Nov. Regni. Veg. Beih. 30(2/7): 971 (Hayek, 1929–1933 (1931))

Iako su Rohlena i Zahn (Zahn, 1909) prilikom opisa ovog taksona primetili sličnost sa *H. willdenowianum* P. D. Sell & C. West [„*elongatum* Froel.“] iz agregata *H. valdepilosum* (*H. villosum*–*prenanthoides*, *Villosa*–*Prenanthoidea*), kao i sa *H. parcepilosum* Arv.-Touv. iz *H. cydoniifolium* agregata (*Villosa*–*Prenanthoidea*), on je kasnije bio uključen u heterogenu vrstu *H. scheppigianum* Freyn (*H. gymnocephalum*–*bupleuroides* s.l.), a zatim i kao podvrsta u okviru *H. mirificissimum* Rohlena & Zahn (*H. gymnocephalum*–*scorzonerifolium*) (Zahn, 1921–1923).

Međutim, prema položaju i obliku listova, načinu grananja cvasti i indumentumu, takson je bliži *H. willdenowianum*, nego *H. bupleuroides* ili *H. scorzonerifolium*, što znači da pri razmatranju porekla treba uključiti i sekciju *Prenanthoidea*. U okviru ove doktorske disertacije usvojena je hibridogena kombinacija *H. gymnocephalum*–*willdenowianum* (Niketić i sar., 2006).



Slika 8. *H. scheppigianum*, habitus i stanište (A), cvast (a); *H. durmitoricum*, habitus i stanište (B), herbarski primerak (C)¹².

¹² Izvor fotografija – Prirodnjački muzej u Beogradu. Kustos dr sc. Niketić M, naučni savetnik, autor fotografija.

Stabljike visine 15–45 cm, sa \pm mnogobrojnim perastim ili slabo perastim dlakama, bez pahuljastih ili žlezdastih dlaka, bazalni listovi mogu formirati rozetu (filopoda). Listova na stabljici ima 8–9, sa \pm brojnim perastim ili slabo perastim dlakama, ponekad sa sitnim žlezdastim dlakama po ivici; bazalni lopatičasti do lancetasti, \pm sedeći, \pm nazubljeni, pri osnovi zaobljeni. Antelu čini 4–5 glavica. Akladijum je dugačak 20–45 mm, račva se na 3–4 grane sa 1(–3) glavice, obrastao prostim dlakama (3–5 mm) i proređenim mikrožlezdama. Involukrum dužine 11–13 mm, \pm prekriven dlakama i mikrožlezdama. Listići involukruma su široko lancetasti, unutrašnji \pm sedeći, \pm pokriveni prostim dlakama. Jezičasti cvetovi su žučkastosmeđi. Ahenije su smeđaste (Zahn, 1921–1923). $2n = 3x = 27$ (Niketić i sar., 2006).

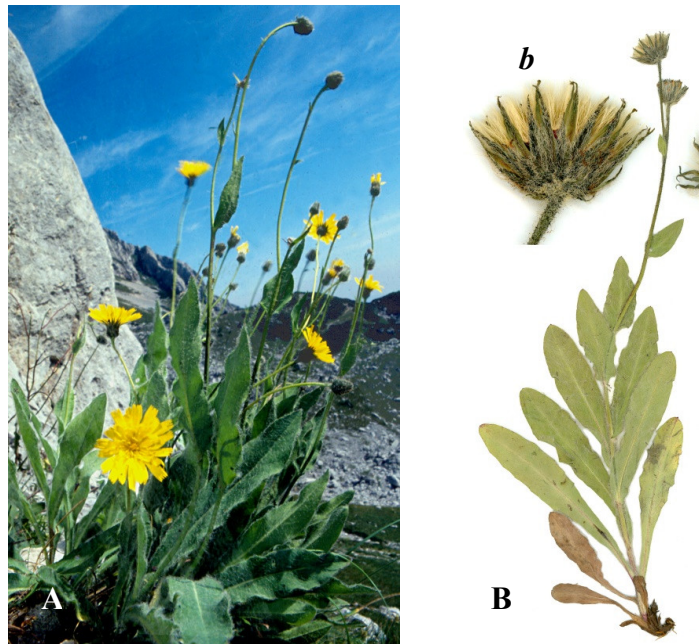
Rasprostranjenje. Oromediterranske planine jugoistočnih Dinarida u Crnoj Gori i zapadnom delu Prokletija u Metohiji (Niketić i sar., 2006; Zahn, 1921–1923). Najverovatnije zastupljen i u albanskom delu Prokletija.

2.10. *Hieracium guentheri-beckii* Zahn

Rchb., Icon. Fl. Germ. 19(2): 116 (Zahn, 1907).

Hibridogena vrsta koja je nastala ukrštanjem *H. gymnocephalum* i *H. villosum* Jacq. (Gajić, 1975; Zahn, 1921–1923) iz sect. *Villosa* (detaljnije u odeljku 2.19). U Flori Evrope je klasifikovana u istoimeni agregat koji broji dva taksona (Sell i West, 1976), uključujući i *H. janchenii* Zahn sa severozapadnih Dinarida, dok se po Greuter-u (2006+) u agregat *H. guentheri-beckii* ubraja šest podvrsta.

Biljke su bez bazalnih listova ili eventualno sa 1–2 prizemna lista tokom cvetanja (afilopoda do hipofilopoda). Stabljike visine 15–50 cm, gusto pokrivene prostim slabo perastim dlakama 4–6 mm dužine, najčešće bez pahuljastih dlaka. Listova je 4–12 na stabljici, lancetasti do duguljasto lancetasti, donji čak i lopatičastog oblika. Zašiljeni su pri vrhu, \pm sedeći, veličine 80–120 \times 15–30 mm, gornji listovi se smanjuju; nekoliko bazalnih se sužavaju u lisni rukavac koji obavija stabljiku, gornji \pm zaobljeni pri osnovi, i obrazuju polurukavac; glatki ili diskretno obrasli slabo perastim dlakama, po obodu celi ili blago nazubljeni. Akladijum je dug 1–10 cm, bogato pokriven prostim, razređeno pahuljastim dlakama i \pm mikrožlezdama.



Slika 9. *H. guentheri-beckii*, habitus i stanište (A), herbarski primerak (B), cvast (b)¹³.

¹³ Izvor fotografija – Prirodnjački muzej u Beogradu. Kustos dr sc. Niketić M, naučni savetnik, autor fotografija.

Antelu čine pojedinačne glavice, ređe se račva pri čemu je čini 2–3(–12) glavica. Involukrum 12–16 × 12–14 mm, bogato pokriven slabo perastim dlakama, sa pahuljastim dlakama i sa mikrožlezdama. Listići involukruma su ± široki, ± šiljati, spoljašnji mogu biti i tupi. Jezičasti cvetovi su goli, bez treplji. Žig tučka je žut, retko tamno obojen. Ahenija je smeđa. Triploidna biljka ($2n = 3x = 27$) (Niketić i sar., 2006).

Rasprostranjenje. Albanija, Bosna, Hercegovina, Hrvatska, Crna Gora, Srbija (Kosovo i Metohija - Paštrik) (Gajić, 1975; Sell i West, 1976; Zahn, 1921–1923). Habitus ove biljke dosta podseća na roditeljsku vrstu *H. gymnocephalum* (Zahn, 1921–1923), ali je nežnije građe, nižeg rasta i proređenijeg indumentuma. Raste na sličnim staništima kao i druge vrste agregata *H. gymnocephalum*, ali izbegava izuzetno suve kamenjare i sipare. Morfološki se često meša sa *H. mirificissimum* Rohlena & Zahn, koji takođe raste u velikom broju uporedo sa ovom vrstom (Niketić i sar., 2003).

2.11. *Hieracium mirificissimum* Rohlena & Zahn

Repert. Spec. Nov. Regni. Veg. 6: 240 (Zahn, 1909)

≡ *H. stirovacense* subsp. *mirificissimum* (Rohlena & Zahn) Greuter, Willdenowia 37: 175 (Greuter i Raab-Straube, 2007)

= *H. flexicaule* Freyn & Vandas, Bull. Herb. Boiss. 3: 645 (Freyn, 1895), nom. illeg., non Tausch

= *H. guentheri-beckii* subsp. *portentosum* Hayek & Zahn, Pflanzenr. 77: 581 (Zahn, 1921–1923)

Smatra se hibridogenom vrstom, nastalom ukrštanjem *H. gymnocephalum* i *H. scorzonifolium* Vill. (*H. villosum–bupleuroides* s.l., *Villosa–Drepanoidea*). Zahn (1921–1923) joj daje status podvrste *H. flexicaule* subsp. *flexicaule* Freyn et Vand. Morfološki je vrlo slična srodnoj vrsti *H. guentheri-beckii*, sa kojom često formira mešovite populacije (Niketić i sar., 2006), kao i sa vrstama *H. durmitoricum* i *H. scheppigianum* (Sell i West, 1976).

Hipofilopoda sa stabljikom visine 15–45 cm, pokrivenom ± perastim ili slabo perastim dlakama, bez pahuljastih dlaka i mikrožlezda. Listova je 6–10 na stabljici, pokriveni perastim ili slabo perastim dlakama, naročito po obodu, bazalni lopaticastog oblika (osnova lista se dugo sužava u dršku), vršni listovi zaobljene baze, izduženo lancetasti, sedeći, ± zašiljeni, celog ili nazubljenog oboda. Akladijum je dugačak 1–8 cm, ± granat sa 0–2(–3) glavice, sa nekoliko jednostavnih dlaka i pojedinačnih mikrožlezda pri vrhu. Antelu čini 1–3(–5) glavica. Involukrum dimenzija 10–13 × 9–12 mm; listići involukruma su široko linearno lancetasti, spoljašnji tupog vrha, unutrašnji ± zašiljeni, ± pokriveni prostim ili slabo perastim dlakama, bez pahuljastih dlaka. Ligule su gole. Ahenija kestenaste boje. Cveti u julu (Sell i West, 1976; Zahn, 1921–1923). $2n = 3x = 27$ (Niketić i sar., 2006).



Slika 10. *H. mirificissimum*, habitus i stanište (A), herbarski primerak (B), cvast (b)¹⁴.

¹⁴ Izvor fotografija – Prirodjački muzej u Beogradu. Kustos dr sc. Niketić M, naučni savetnik, autor fotografija.

Rasprostranjenje. Jugoistočni Dinaridi - Crna Gora, Bosna i Hercegovina, Metohija, centralna i jugozapadna Srbija (Niketić i sar., 2003; 2006; Zahn, 1921–1923). Nađena je i u istočnoj Srbiji na Suvoj planini (Niketić, person. komunik.).

2.12. *Hieracium coloriscapum* Rohlena & Zahn

Feddes. Repert. 6: 240 (Zahn, 1909)

Najverovatnije je nastao ukrštanjem *H. gymnocephalum* i *H. naegelianum*. Prema Greuter-u (2006+) postoji šest podvrsta, dok Sell i West (1976) navode samo ovu vrstu i klasifikuju je u *H. sartorianum* agregat.

Hipofilopoda, stabljike dužine 10–30 cm, sa proređenim jednostavnim ili poluperastim dlakama. Listova ima 8–10, u donjem delu stabljike sakupljeni u pseudorozetu, lancetasti, zašiljeni, ravnog do talasastog oboda, dugačko suženi pri osnovi, sedeći, ± pokriveni poluperastim dlakama, naročito gustog indumentuma u predelu nerva na naličju. Gornji listovi su uglavnom goli i u obliku brakteja. Antelu čine 1–3 glavice. Involukrum je dugačak 13 mm, poluloptast, ± pokriven dlakama, ± mikrožlezdama, bez pahuljastih dlaka. Listići involukruma su lancetasti, zašiljeni pri vrhu. Žig je tamnožut. Cveta u julu i avgustu (Zahn, 1921–1923). Nastanjuje krečnjačke kamenjare, pukotine stena i sipare u subalpijskim i alpijskim planinskim zonama, iznad 1800 m. Tetraploidna biljka, $2n = 4x = 36$ (Niketić i sar., 2006).

Rasprostranjenje. Vrsta je ilirsko-skardopinski planinski endemit. Opisana je sa planine Durmitor u Crnoj Gori. Kasnije je opisano i nekoliko različitih podvrsta (Greuter, 2006+) ovog taksona na planinama Hercegovine, u Albaniji, Kosovu i Metohiji i Severnoj Makedoniji (Niketić i sar., 2003; 2006).



Slika 11. *H. coloriscapum*, habitus i stanište (A), cvast (a)¹⁵.

2.13. *Hieracium pyricephalum* Niketić, nom. inval.

Phytochem. Anal. 29: 31 (Milutinović i sar., 2018)

Pretpostavlja se da je nastala hibridizacijom *H. naegelianum* i *H. paratrichum* (ili *H. spirocaule*). Plavozelena zeljasta biljka bez pahuljastih i žlezdastih dlaka i sa lisnom pseudorozetom iznad osnove stabljike (hipofilopoda). Stabljika visine 30–40 cm, ± gola, sa jednom do nekoliko glavica. Listova 6–10, lancetasti do (ob)jajasto lancetasti, sedeći, 5–10(15) cm dužine i (1)2–3 cm širine, pri

¹⁵ Izvor fotografija – Prirodnjački muzej u Beogradu. Kustos dr sc. Niketić M, naučni savetnik, autor fotografija.

osnovi postepeno suženi, po obodu celi, talasasti, polumesnati, na vrhu šiljati, često srpasto savijeni, prekriveni proređenim poluperastim dlakama, duž glavnog nerva na naličju sa bradasto grupisanim rutavim dlakama, na licu delimično goli; gornji listovi se naglo smanjuju i u okviru akladijuma prelaze u sitne ljuspolike listiće. Biljke sa jednom glavicom ili sa duboko granatom antelom sa 2–4(–6) glavica. Akladijum doseže bar polovinu dužine antele, go ili ponekad pri vrhu sa poluperastim dlakama. Involukrum do 15 mm širine, pre cvetanja kruškastog oblika, pri osnovi sa poluperastim dlakama (koje su deblje i kraće nego kod *H. coloriscapum*), često sa žučkastom nijansom. Listići involukruma lancetasti, crepasto poređani, tamnozeleni, ± šiljati, na vrhu slabo bradasti. Ligule i žigovi žuti. Ahenija svetlosmeđa, sa beličastosivim papusom.

Rasprostranjenje. Za sada je samo konstatovana na planinama jugoistočnih Dinarida (jugozapadna Bosna i Crna Gora: Maglić, Durmitor, Moračke planine, Maganik). Raste na krečnjačkim siparima u subalpijskoj zoni munike i krivulja, ređe i u pukotinama stena, na eksponiranim mestima.



Slika 12. *H. pyricephalum*, habitus i stanište (A), cvast (a)¹⁶.

AGREGAT *HIERACIUM PANNOSUM*

Agregat *H. pannosum*, shodno različitim klasifikacijama, sadrži dve vrste (Sell i West, 1976) ili 16 podvrsta (Greuter, 2006+). Tipska podvrsta je opisana iz zapadne Anadolije, a rasprostranjena je i na Egejskim ostrvima, u Grčkoj i južnim delovima centralnog Balkana.

Biljke ovog agregata su hipo- do afilopode, sa stabljikama visokim 10–50(–80) cm, u donjem delu razređeno, a u vršnim delovima gusto obraslim izduženim, vunastim perastim i mnogobrojnim pahuljastim dlakama, bez mikrožlezda. Listovi pri osnovi zbijeni, skoro da formiraju rozetu. U gornjim delovima stabljike ih je do 12(–20), dimenzija 40–200 × 12–55 mm, duguljasti, objajasti, oblancetasti ili eliptični, tamni, čvrsti, ± šiljati, po obodu celi do nazubljeni, pri osnovi suženi, ponekad i proširene osnove u rukavac, ± sedeći, pokriveni gustim, vunastim, mekim, dugim perastim dlakama koje su često upredene i grupisane u krpolike pramenove, bez mikrožlezda i pahuljastih dlaka. Antelu čini 2–7(–12) glavica. Akladijum je sa 1–5 grana, ± pokriven mikrožlezdama. Involukrum veličine 10–20 × 15–25 mm, debeo i trbušast. Listići su linearno lancetasti, ± zašiljeni pri vrhu, sa ± pahuljastim i sitnim žlezdastim dlakama, gotovo u potpunosti pokriveni gustim, dugim, ± perastim ili jednostavnim dlakama. Jezičasti cvetovi su žuti, bez treplji. Stubić je žut ili tamnije obojen. Ahenije su blede ili žučkastosmeđe. $2n = 36$.

¹⁶ Izvor fotografija – Prirodnjački muzej u Beogradu. Kustos dr sc. Niketić M, naučni savetnik, autor fotografija.

Rasprostranjenje. Balkansko poluostrvo, Egejska ostrva, Mala Azija (Gajić, 1975; Schischkin i Bobov, 2002; Sell i West, 1976; Zahn, 1921–1923). Stenovita mesta i sipari, na krečnjaku, u visinskom dijapazonu 1000–2700 m. Cveta od juna do avgusta.



Slika 13. *H. pannosum*, habitus i stanište (A), herbarski primerak (B).¹⁷

2.14. *Hieracium mokragorae* (Nägeli & Peter) Freyn

Bull. Herb. Boiss. 3: 456 (Freyn, 1895)

≡ *H. pannosum* subsp. *mokragorae* Nägeli & Peter, Hierac. Mitt-Eur. 2: 289 (Nägeli i Peter, 1889)

Gajić (1975) u Flori Srbije ovu vrstu vodi kao *H. pannosum* Boiss. subsp. *mokragorae* Nägeli & Peter.

Stabljika je visoka 10–30 cm. Listovi stabljike 10–35 cm, sa jajastom do izduženom liskom, ± nazubljenog oboda. Antela najčešće sa jednom glavicom na granama. Glavica 1–8(–10), drške glavica u gornjem delu sa mikrožlezdama. Involukrum 10–13 mm dugačak, umereno pokriven dlakama, slabije pokriven vunastim perastim dlakama pri osnovi, skoro go u vršnim delovima, sa mikrožlezdama.

Rasprostranjenje. Srbija, Crna Gora, Bugarska (Rodopske planine, Stara planina) (Gajić, 1975; Zahn, 1921–1923).

2.15. *Hieracium pannosum* Boiss. s.l.

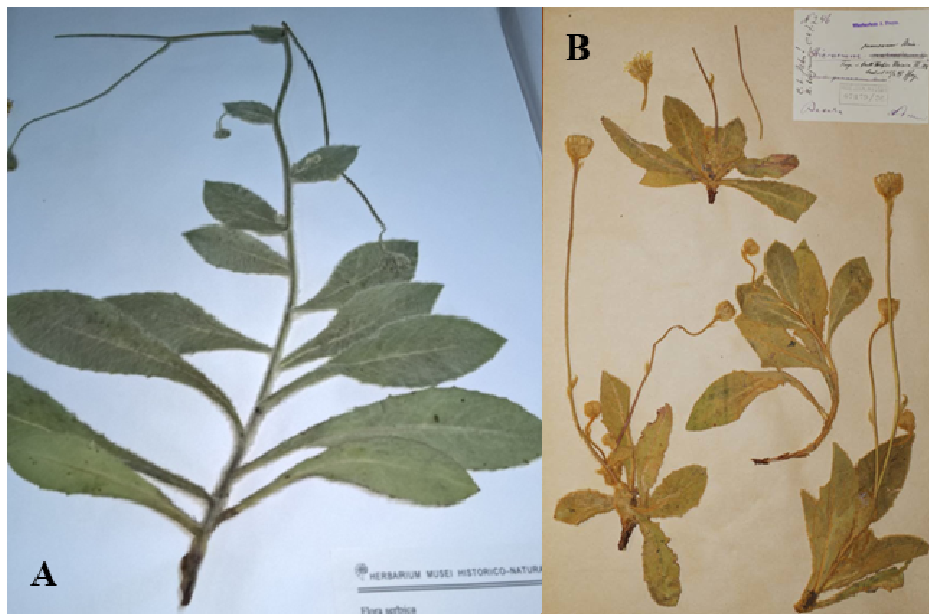
Istraživana populacija vrste *H. pannosum* iz istočne Srbije po aktuelnoj klasifikaciji pripada podvrsti *H. pannosum* subsp. *trojanum* Zahn. Budući da bi se ovom taksonu mogao dodeliti status vrste, zbog taksonomske nerazrešenosti izbegnuta je upotreba nomenklturnih novina, ali i trinominalne nomenklature, tako da se u ovoj doktorskoj disertaciji takson za sada vodi kao *H. pannosum*, s.l. u najširem smislu.

Stabljika je visoka 20–50 cm, račvasta. Listovi su čvrsti, jajasti do oblancetasti, ± nazubljenog oboda sa 4–8 mm dugim testerastim zupcima, po obodu i po srednjem nervu na naličju pokriveni su beličasto svilastim dlakama. Antelu čini 2–5(–8) glavica. Akladijum je dugačak 12–20 cm, sa 1–4(–5), dugačkih grančica, uspravnih, tankih, sa 1(–3) glavice. Drške su bogato do umereno obrasle dlakama (3–5–8 mm dugačke) bez mikrožlezda. Involukrum je dugačak 16–18 mm.

Rasprostranjenje. Srbija (planina Basara kod Pirota na 1500 m), Bugarska (Trojan na planini

¹⁷ Izvor fotografija – Botanic Garden and Botanical Museum Berlin (2017). Herbarium Berolinense, Berlin (B). <https://doi.org/10.15468/dlwwhz> accessed via GBIF.org on 2020-10-27 i <https://www.gbif.org/occurrence/2244184040>.

Balkan, Trnovo, vrh Musala na planini Rila, Konjovo, Kalofer) (Gajić, 1975; Szelađ, 2015; Zahn, 1921–1923).



Slika 14. *H. mokragorae*, herbarski primerak (A)¹⁸, tipski primerak *H. pannosum* subsp. *trojanum*, sa planine Basara u istočnoj Srbiji (B)¹⁹,

AGREGAT *HIERACIUM WALDSTEINII*

Hieracium waldsteinii agregat karakterišu hipofilopodne biljke, stabljike visine 25–50 cm, gusto prekrivene perastim dlakama u donjim delovima stabljike, nešto manje u gornjem delu stabljike.



Slika 15. *H. waldsteinii*, habitus i stanište (A)²⁰, cvast (a), list (b)²¹.

¹⁸ Izvor fotografije – Prirodnjački muzej u Beogradu. Kustos dr sc. Niketić M, naučni savetnik, autor fotografije.

¹⁹ Izvor fotografije – Szelađ (2015).

²⁰ Izvor fotografije – <http://www.freenatureimages.eu/plants/Flora%20D-I/Hieracium%20waldsteinii/index.html#Hieracium%2520waldsteinii%25201%252C%2520Saxifraga-Jasenka%2520To pic.JPG>

²¹ Izvor fotografija – <https://hirc.botanic.hr/fcd/DetailFrame.aspx?IdVrste=27010&taxon=Hieracium+waldsteinii+Tausch>

Listovi dimenzija 20–140 × 5–60 mm, uglavnom na stabljici, najčešće naizmjenični, bazalni se osuše i brzo otpadnu, dok krupni listovi pri osnovi formiraju pseudorozetu. Liska je ± objajastog oblika do eliptična i duguljasto lancetasta, sužena pri osnovi (skoro lopatičastog izgleda), celog oboda ili sitno nazubljena, veoma gusto obrasla perastim dlakama, retko pahuljastim. Listovi su znatno manjih dimenzija u gornjem delu stabljike. Antelu čini (2–)4–7(–25) glavica koje su smeštene na tankim granama sa više brakteja; grane ± sa mikrožlezdama u gornjim delovima, ponekad sa jednostavnim nežlezdastim dlakama. Involukrum je loptast, dimenzija 9–13 × 9–13 mm, sa široko linearno lancetastim braktejama koje su ± naizmjenično poređane, sa nekoliko do mnogo pahuljastih dlaka i po kojom mikrožlezdom, ponekad i sa nekoliko jednostavnih ili perastih dlaka. Jezičasti cvetovi i njihovi stubići su žute boje, sa golim zupcima. Ahenije blede ili žućkastosmeđe. $2n = 3x = 27$; $4x = 36$. Tipična vrsta agregata: *H. waldsteinii* Tausch (Tausch, 1828).

Rasprostranjenje. Agregat je rasprostranjen u ilirskom i skardopindskom regionu, od severozapada bivše Jugoslavije do severnog dela Grčke. Staništa su stenovita mesta u okviru listopadnih šuma, uglavnom na krečnjaku (Gajić, 1975; Sell i West, 1976; Zahn, 1921–1923).

2.16. *Hieracium plumulosum* A. Kern.

Oesterr. Bot. Z. 24: 170 (Kerner, 1874)

≡ *H. waldsteinii* subsp. *plumulosum* (A. Kern.) Freyn, Bull. Herb. Boiss. 3: 652 (Freyn, 1895)

Opisan je u rangu vrste sa planina Orjen i Lovćen u Crnoj Gori. Zahn (1921–1923) i Gajić (1975) ovaj takson svrstavaju u podvrstu *H. waldsteinii* subsp. *plumulosum*, dok mu u Flori Evrope Sell i West (1976) vraćaju status vrste.

Stabljika je visoka 10–60 cm, u celosti bez ili sa veoma malo pahuljastih dlaka u gornjim delovima stabljike. Glavica 1–15, u donjim delovima stabljike najčešće su zakržljale. Involukrum je dugačak 10–12 mm, gusto pokriven pahuljastim dlakama, umereno do prilično pokriven mikrožlezdama, sa ili bez perastih dlaka (Gajić, 1975; Zahn, 1921–1923). Triploidne biljke ($2n = 3x = 27$) su zabeležene u Srbiji i Bosni i Hercegovini (Schuhwerk i Lippert, 1998), diploidne u Crnoj Gori ($2n = 2x = 18$) (Szeląg i sar., 2007).

Rasprostranjenje. Bosna i Hercegovina, Crna Gora, Metohija, zapadna Srbija.



Slika 16. *H. plumulosum*, habitus i stanište (A)²², cvast (a), list (b)²³.

²² Izvor fotografije – Moro A, Nimis PL, Martellos S. (ed.) 2003+ [continuously updated]: Il Cercapiante. <http://dryades.units.it/dryades/plants/foto/TSB44855.jpg>

²³ Izvor fotografija – Moro A, Nimis PL, Martellos S. (ed.) 2003+ [continuously updated]: Il Cercapiante. <http://dryades.units.it/dryades/plants/foto/TSB44852.jpg>

HIBRIDOGENE VRSTE AGREGATA *HIERACIUM WALDSTEINII*

Prema Zahn-u (1921–1923; 1936) ovaj kompleks obuhvata 10 vrsta i više podvrsta nastalih običnim ili višestrukim ukrštanjem taksona vrste *H. waldsteinii* s.l. u širem smislu, sa vrstama iz osam različitih sekcija. Neke od ovih podvrsta kasnije su dignute na rang vrsta (Sell i West, 1974).

2.17. *Hieracium albopellitum* (Zahn) Niketić

Willdenowia 35(2): 230 (Greuter i Raab-Staube, 2005).

≡ *H. plumulosiforme* subsp. *albopellitum* Zahn (Zahn, 1921–1923 (1921)).

≡ *H. thapsiformoides* subsp. *albopellitum* (Zahn) Greuter Willdenowia 37: 175 (Greuter i Raab-Staube, 2007).

Zahn (1921–1923; 1936) i Gajić (1975) opisuju takson sa statusom podvrste *H. plumulosiforme* G. Schneid. subsp. *albopellitum* Zahn, navodeći hibridogenu kombinaciju *H. waldsteinii* – *H. tommasinii*. U saglasnosti sa Niketić u Greuter i Raab-Straube (2005), u okviru ove doktorske disertacije ispitivani takson se nalazi u rangu vrste. Za razliku od tradicionalne klasifikacije koja je takson predstavljala u okviru hibridogene vrste *H. thapsiformoides* G. Schneider ex K. Malý (*H. waldsteinii* – *H. tommasinii* Rchb.), u ovoj disertaciji se *H. albopellitum* vodi kao vrsta u okviru kompleksnog hibridogenog agregata *H. guglerianum* Zahn (*H. thapsiformoides* – *H. murorum* L. s.l. (sect. *Hieracium*)).

Hipofilopoda, stabljika visine 40–50 cm, u donjem delu gusto obrasla dlakama, u gornjem delu bez dlaka i slabije pokrivena pahuljastim dlakama i mikrožlezdama. Listovi u donjem delu stabljike veliki, široko objajasti, blago zašiljeni na vrhu, dok se pri osnovi sužavaju u kratku dršku. Po obodu su sitno do široko nazubljeni, gusto obrasli čupavim, beličastim, ± svilasto vunastim dlakama. U gornjim delovima stabljike je raspoređeno 3–5 listova, koji su mnogo manjih dimenzija, međusobno udaljeni, jajasto lancetasti, pri osnovi suženi, sedeći, gusto obrasli dlakama. Vršni listovi nalik braktejama, ± goli sa pahuljastim dlakama. Akladijum 25–35 mm dugačak, sa 3–6 grančica i najviše oko 13 glavica od kojih donje često abortiraju, bez dlaka, manje obrasle mikrožlezdama. Involukrum je dugačak 10–14 mm, pokriven pahuljastim dlakama. Listići involukruma su široki, mogu biti zašiljeni. Stubić je taman. Ahenija smeđe boje (Gajić, 1975; Zahn, 1936).

Rasprostranjenje. Vrsta je endemična za planinski masiv Prokletija u Metohiji, Albaniji i Crnoj Gori. Raste u rasponu nadmorskih visina od 750 do 2350 m na krečnjaku i dolomitu (Gavrilović i sar., 2017).



Slika 17. *H. albopellitum*, herbarski primerak²⁴.

²⁴ Izvor fotografije – Prirodnjački muzej u Beogradu. Kustos dr sc. Niketić M, naučni savetnik, autor fotografije.

***Hieracium* sect. *Drepanoidea* Monnier**

Sekcija *Drepanoidea* (Stace, 1998) je u starijim monografijama (Zahn, 1921–1923) i u Flori Srbije (Gajić, 1975) navođena kao *H. sect. Glauca* (Griseb.) Greml. Predstavnik ove sekcije morfološki karakteriše stabljika sa malo listova, najčešće filopodna, uglavnom bez dlaka ili sa jako oskudnim indumentumom. Listovi su eliptični do lancetasti najčešće goli i sedeći. Antelu čini jedna ili malo glavičastih cvasti. Involukrum je uglavnom bez dlaka, ± sa pahuljastim dlakama. Zupci jezičastih cvetova su bez treplji. Ahenije su svetlosmeđe do smeđecrvene. Nastanjuju predeo Alpa, Karpata, centralnih Apenina i severozapadni deo Balkanskog poluostrva (Gajić, 1975; Zahn, 1921–1923).

U okviru ove sekcije Zahn (1921–1923) je uključio tri agregata („*species principales*“):

- *H. porrifolium*
- *H. bupleuroides*
- *H. glaucum*.

AGREGAT *HIERACIUM BUPLEUROIDES*

Prema tradicionalnoj klasifikaciji uključuje samo sredenjejužnoevropsku planinsku vrstu *H. bupleuroides* C. C. Gmel., sa više podvrsta. Neke od ovih podvrsta kasnije su dignute na rang vrsta (Sell i West, 1974). Prema Greuter-u (2006+) ovaj agregat broji 33 taksona.

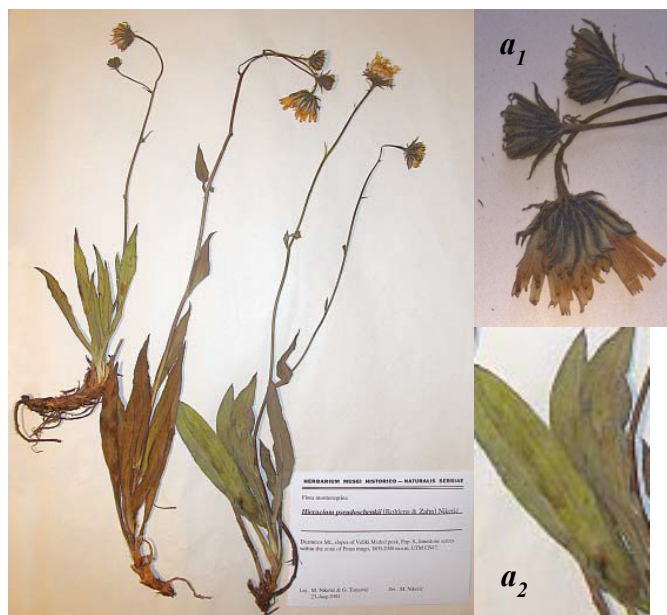
2.18. *Hieracium pseudoschenkii* (Rohlena & Zahn) Niketić

Bot. Chron. (Patras) 16: 39 (Niketić i sar., 2003)

≡ *H. bupleuroides* subsp. *pseudoschenkii* Rohlena & Zahn, Feddes. Repert. Spec. Nov. Regni. Veg. 6: 227 (Zahn, 1909)

≡ *H. bupleuroides* subsp. *crinifolium* var. *pseudoschenkii* (Rohlena & Zahn) Hayek, Repert. Spec. Nov. Regni. Veg. Beih. 30(2/6): 866 (Hayek, 1929-1933 (1931)).

Zahn (1909) je ovaj takson opisao kao podvrstu od *H. bupleuroides*. Niketić i sar. (2003) taksonu dodeljuju status vrste. Morfološki se od ostalih taksona ovog agregata razlikuje po prisustvu mikrožlezda na involukrumu. Vrstu karakteriše stabljika visine 20–40(–60) cm, koja može biti granata iznad polovine, gola ili slabije obrasla dugim, prostim dlakama pri osnovi.



Slika 18. *H. pseudoschenkii*, herbarski primerak, cvast (*a*₁) i list (*a*₂)²⁵.

Bazalni listovi su brojni, veličine 50–160 × 4–45 mm, linearno lancetasti do usko eliptični,

²⁵ Izvor fotografije – Prirodnjački muzej u Beogradu. Kustos dr sc. Niketić M, naučni savetnik, autor fotografije.

sedeći, celog oboda, zašiljeni i suženi ka osnovi, goli ili sa dugačkim, prostim dlakama po obodu i u predelu centralnog nerva. Listova na stabljici je relativno malo, (3–)5–10(–15), linearno lancetasti, pri osnovi ± zaobljeni, smanjuju se ka vrhu stabljike. Antelu čini 2–5(–42) glavica. Drške glavica duge, pokrivene jednostavnim beličastim dlakama. Involukrum je loptast (10–)12–15 × 15–20 mm, razređeno beličasto dlakav, ± sa mikrožlezdama. Listići involukruma široki i zašiljeni pri vrhu, pokriveni prostim dlakama. Stubić tučka je žut do tamnije boje. Ahenije su blede do crnkastosmeđe boje. Do sada su registrovane tetraploidne biljke $2n = 4x = 36$ (Niketić i sar., 2006).

Rasprostranjenje. Vrsta je endemična za jugoistočne Dinaride: Durmitor i okolina Šavnika u Crnoj Gori i Prenj u Hercegovini (Niketić i sar., 2003). Karakteristični lokaliteti na planini Durmitor su Veliki Međed i Crepulj poljana - Žuta greda (1850 m); Timar u opštini Šavnik (1240 m).

***Hieracium* sect. *Villosa* (Griseb.) Greml**

Filopodne biljke koje pripadaju ovoj sekciji karakterišu se stabljikom koja je obično ± uspravna i vijugava, uglavnom niska, veoma retko naraste više od 30 cm. Od sredine ili osnove često je ± račvasto granata, prekrivena brojnim dugim rutavim jednostavnim dlakama, posebno u donjim delovima stabljike. Ponekad su prisutne mikrožlezde u gornjim delovima stabljike. Listovi su tanki, ± glatki, retko sa manje dlaka, bazalni formiraju rozetu, a na prelomu se može uočiti dosta mlečnog soka (*latex*). Na stabljici je obično raspoređeno do 6 listova, koji ± formiraju lisni rukavac. Antela se sastoji obično od jedne velike glavice dužine 14–17 mm, najčešće loptastog oblika. Akladijum je često sa pahuljastim dlakama. Listići involukruma zašiljeni, spoljni širi i gotovo uvek ± stršeće raspoređeni, nalik na brakteje, unutrašnji užji, bez pahuljastih dlaka. Jezičasti cvetovi su ± trepljasti. Stubić tučka je tamnije obojen. Ahenije su tamnocrvenkaste. Period cvetanja biljaka je jun – jul.

Rasprostranjenje. Planine centralne i južne Evrope (Gajić, 1975; Schischkin i Bobov, 2002; Sell i West, 1976; Sell i Murrell, 2006). Centar diverziteta sekcije *Villosa* su Alpi. Tipska vrsta sekcije *H. villosum*, kao i druga ispitivana nehibridogena vrsta, *H. pilosum* Schleich. ex Froel., konstatovane su za Balkansko poluostrvo kao glacijalni relikti.

2.19. *Hieracium villosum* Jacq.

Enum. Stirp. Vindob.:142 (Jacquin, 1762)

≡ *H. morisianum* subsp. *morronense* (Nägeli & Peter) Zahn, Pflanzenr. 75: 87 (Zahn, 1921–1923 (1921))

≡ *H. pilosum* subsp. *morronense* (Nägeli & Peter) Gottschl., Veröff. Tiroler Landesmus. Ferdinandeum 86, Sonderband.: 211 (Gottschlich, 2007)

Hieracium villosum je monotipska vrsta koja broji oko 13 podvrsta (Greuter, 2006+). Stabljika je visoka 15–30(–40) cm, uspravna, račvasta, sa brojnim pahuljastim i vrlo gustim, belim, mekim jednostavnim rutavim nežlezdastim dlakama dužine 4–10(–12) mm. U gornjem delu je pokrivena pahuljastim dlakama. Listovi su sa dugim, gustim dlakama do 8 mm dužine; bazalnih listova ima od nekoliko do mnogo, veličine 45–85 × (10–)12–20(–25) mm, retko su na licu bez dlaka, po obodu sa mikrožlezdama; duguljasti do lancetasti, u gornjem delu stabljike čak i jajasti, tupi do zašiljeni pri vrhu, obično udubljeni, celog do kratko nazubljenog oboda, bez ili sa kratkom drškom, pri osnovi stabljike sedeći, sa dosta mlečnog soka. Antelu čine (1–)2–4 glavice. Akladijum je dugačak 3–10(15) cm, sa udaljenim grančicama koje nose uglavnom po jednu glavicu.

Involukrum je veličine 14–17(–23) × 12–20(–25) mm, loptast, pokriven jednostavnim dlakama i razređeno mikrožlezdama, bez pahuljastih dlaka. Listići involukruma lancetasti do linearni, zašiljenog vrha, sa vrlo gustim, jednostavnim dlakama do 5 mm dužine, bez ili sa nekoliko mikrožlezda. Jezičasti cvetovi sa ili bez treplji, sa žutim do tamnim stubićima. Ahenija svetlosmeđa do crna. Cveta u periodu jul-avgust. Najčešće raste na kamenitim i travnatim mestima i u šumama. $2n = 3x = 27$; $4x = 36$ (Sell i West, 1976).

Rasprostranjenje. Planine centralne i jugoistočne Evrope. Areal se proteže od Karpata do jugozapadnih Alpa, južnog dela Apeninskog poluostrva i dela Balkanskog poluostrva (severni delovi Bugarske) (Gajić, 1975; Sell i West, 1976; Zahn, 1921–1923).

2.20. *Hieracium pilosum* Schleich. ex Froel.

Prodr. 7: 229 (Candolle, 1838)

≡*H. morisianum* Rchb., Icon. Fl. Germ. Helv. 19(1): 67 (Reichenbach, 1859)

Hieracium pilosum broji oko 15 podvrsta (Greuter, 2006+). Zahn (1921–1923), kao i Gajić (1975) u Flori Srbije vrstu opisuju pod imenom *H. morisianum* Rchb. Sell i West (1976) u Flori Evrope usvajaju koncept kolektivne vrste, odnosno grupe ili agregata *H. pilosum*.

Stabljika ovih biljaka je visoka 10–15(–40) cm, tanka, jednostavna ili račvasta, gusto pokrivena prostim rutavim dlakama, u gornjem delu i pahuljastim dlakama, bez žlezdastih dlaka. Listovi su sivozeleni, kako na licu tako i na naličju, obrasli gustim dugačkim finim dlakama. Prizemni listovi su duguljasto lancetasti do lancetasti, mogu biti lopatičastog oblika i tupog vrha, pri osnovi suženi, sedeći ili sa malim drškama, najčešće celog oboda ili blago nazubljeni. Listova u gornjim delovima stabljike ima malo (3–6). Veličina im se smanjuje ka vrhu stabljike i jajasto lancetastog su oblika. Vršni listovi su sedeći, a ponekad formiraju i polurukavac. Antelu čine 2–4 glavice. Akladijum je dugačak, prekriven gustim pahuljastim dlakama, bez žlezdastih dlaka. Involukrum je veličine 5–15 × 2–3 mm, loptast, tamnozeleno do crne boje. Listići involukruma linearno lancetasti ili linearni, gusto pokriveni dugačkim dlakama, bez pahuljastih dlaka, sa po kojom mikrožlezdom na vrhu. Jezičasti cvetovi bleožute boje, stubić je žut. Ahenije su tamnocrvenkaste do crne boje (Gajić, 1975; Sell i West, 1976; Zahn, 1921–1923). Triploidna vrsta (Chrtek i sar., 2004).

Rasprostranjenje. Areal kao i za vrstu *H. villosum*. Na Balkanskom poluostrvu raste na Dinaridima i u centralnim delovima, ka jugu do Severne Makedonije (Sell i West, 1976).



Slika 19. *H. villosum*, habitus i stanište (A), cvast (a); *H. pilosum*, habitus i stanište (B), cvast (b)²⁶.

HIBRIDOGENE VRSTE AGREGATA *HIERACIUM VILLOSUM*

Prema Zahn-u (1921–1923; 1930) ovaj kompleks obuhvata skoro 70 vrsta i više podvrsta nastalih običnim ili višestrukim ukrštanjem taksona vrste *H. villosum*, u širem smislu, sa vrstama iz više različitih sekcija. Neke od ovih podvrsta kasnije su dignute na rang vrsta (Sell i West, 1974). U okviru ove doktorske disertacije proučavano je pet intersekcijskih hibridogenih vrsta sekcije *Villosa* od kojih su četiri vrste nastale ukrštanjem *H. villosum* i vrsta drugih sekcija, dok je jedna nastala naknadnim ukrštanjem hibridogene vrste poreklom od *H. villosum* i nehibridogene vrste *H. bifidum* iz tipske sekcije roda. Sve one su svrstane u neformalnu grupu „vilh” za potrebe ovog istraživanja (**Tabela 2**).

²⁶ Izvor fotografija –

https://www.omnia.ic/index.php?navigation_function=2&navigation_item=0f8371b5f61d59e9a6c78039b7935af1&repid=2

2.21. *Hieracium glabratum* Willd.

Sp. Pl. 1(3): 1562 (Willdenow, 1803)

≡ *H. villosum* var. *glabrum* Hopp., DC. Prodr. 7: 228 (Candolle, 1838)≡ *H. schraderei* var. *glabratum* Gaud., Sn. Fl. Helv.: 454 (Koch, 1838)

Hibridogena vrsta koja u Flori Evrope pripada istoimenom agregatu *H. glabratum*. Ovaj agregat uključuje četiri vrste (Sell i West, 1976). Prema klasifikaciji Greuter-a (2006+) ne postoji agregat, već samo jedna vrsta sa 13 podvrsta. Gajić (1975) kao hibridogenu kombinaciju navodi *H. villosum* – *H. glaucum* All. Morfološki poseduje karakteristike roditeljskih vrsta. Habitus je sličan pretežno alpskoj vrsti *H. glaucum* iz sect. *Drepanoidea* (Zahn, 1921–1923), tj. agregatu *H. glaucum* (Sell i West, 1976), koja se razlikuje po znatno većem broju glavica u anteli, po dugom loptastom involukrumu i maljavim listićima involukrura. U odnosu na *H. villosum* indumentum je oskudniji i akladijum je manje granat (Sell i West, 1976; Zahn, 1921–1923).

Filopoda. Vrsta se karakteriše stabljikom visine 10–30 cm. Bazalni listovi često goli, sa ± izraženom drškom. Listova na stabljici ima malo (2–5) naglo se smanjuju ka vrhu stabljike. Antelu čini 1–3(5) glavica. Involukrum je dugačak 12–15 mm, loptast, gusto obrastao mekim dugim nežlezdastim dlakama sa uskim i prileglim listićima involukrura. Spoljašnji listići involukrura su zašiljeni, prilično obrasli beličastim dugim rutavim dlakama, sa manje rasutih pahuljastih dlaka, na vrhu sa žlezdama. Jezičasti cvetovi su krupni, retko sa trepljastim zupcima, obrasli prostim nežlezdastim dlakama pri vrhu, sa svetlim do tamnim stubićem tučka. Ahenija je svetlosmeđa. Cveta od jula do avgusta. $2n = 3x = 27$; $4x = 36$ (Schuhwerk, 2010).

Rasprostranjenje. Planine centralnog dela Evrope, južno do Albanije i centralnih Apenina. (Gajić, 1975; Sell i West, 1976).

2.22. *Hieracium scorzonerifolium* Vill. s.l.

Prosp. Pl. Dauph.: 35 (Villars, 1779)

Hieracium scorzonerifolium je hibridogena vrsta i u Flori Evrope je klasifikovana u okviru *H. scorzonerifolium* agregata (Sell i West, 1976). Uključuje tri vrste u Flori Evrope (Sell i West, 1976), kao i 20 podvrsta tipske vrste agregata (Greuter, 2006+). Nastala je ukrštanjem tipske vrste sekcije *Villosa*, *H. villosum*, i *H. schenkii* (Griseb.) Schljakov [sin.: *H. bupleuroides* subsp. *schenkii* (Griseb.) Nägeli & Peter; *H. bupleuroides* var. *schenkii* Griseb. u Greuter (2006+)], koja kao i *H. glaucum* pripada sect. *Drepanoidea*. Vrsta deli areal sa svojim roditeljskim vrstama, kao i morfološke karakteristike. Akladijum je granat kao i kod vrste *H. schenkii*, ali je obod listova uglavnom ceo (Sell i West, 1976). U odnosu na roditeljsku vrstu *H. villosum*, čitava biljka je znatno slabije obrasla dlakama, ali su prisutne karakteristične proste, duge rutave beličaste dlake, naročito na naličju listova i u predelu involukrura (Zahn, 1921–1923).

Filopoda. Vrsta se karakteriše najčešće pojedinačnim uspravnim stabljikama visine 30–60 cm, često obraslim prostim i dugim (do 5 mm), mestimično i zvezdastim dlakama. Listovi su pri osnovi sakupljeni u prividnu rozetu, lancetasti do usko eliptični, na kratkim drškama ili formiraju lisni rukavac, celog do blago nazubljenog oboda, suženi ka osnovi. Bazalni listovi su veći, 30–90 × 4–10 mm, dok se ka vrhu stabljike smanjuju (2–7(42) mm) i naizmenično su postavljeni. Obrasli su prostim dlakama na naličju i po obodu. Antelu čine 1–4(–42) glavice. Involukrum je dimenzija (10–)13–17 × 6–13 mm, gusto obrastao dugim nežlezdastim i pahuljastim dlakama. Listići involukrura linearni do usko linearno lancetasti, sedeći. Jezičasti cvetovi su goli sa žutim stubićima. Ahenija je svetlosmeđa. Period cvetanja biljaka je jul – avgust. Za biljke sa Durmitora, identifikovane kao *H. flexuosum* Waldst. & Kit. ex Willd., konstatovano je da su triploidi ($2n = 3x = 27$) (Niketić i sar., 2006).

Rasprostranjenje. Areal ove vrste se prostire od Karpata i jugozapadnih Alpa na severu, do Crne Gore na jugu (Sell i West, 1976; Zahn, 1921–1923).



Slika 20. *H. glabratum*, herbarski primerak (A)²⁷; *H. scorzonerifolium*, habitus i stanište (B)²⁸, cvast (*b*₁), list (*b*₂).

2.23. *Hieracium valdepilosum* Vill. s.l.

Prosp. Pl. Dauph.: 34 (Villars, 1779)

≡ *H. elongatum* Willd. ex Froel., DC. Prodr. 7: 229 (Candolle, 1838)

≡ *H. ciliolatum* Serres, Bul. Soc. Bot. Fr. 2: 276 (Serres, 1856)

Hieracium valdepilosum je hibridogena vrsta. Pripada *H. valdepilosum* agregatu (Sell i West, 1976). Uključuje oko 27 nižih taksona tipske vrste (Greuter, 2006+), kao i još tri vrste agregata u Flori Evrope (Sell i West, 1976). Nastaje ukrštanjem *H. villosum* i *H. prenanthoides*.

Hipofilopoda do afilopoda. Stabljike visine 30–50 cm, sa brojnim jednostavnim dlakama do 8 mm dužine, a pri vrhu sa nekoliko pahuljastih dlaka. Prizemni listovi mali ili odsutni, lopatičasti do eliptični, dimenzija 50–110 × 10–30 mm, obično ± šiljati, sa peteljkom; listova stabljike 7–13(–20), donji poput bazalnih, ali obično sedeći, srednji i gornji lancetasti do jajasti, ponekad u obliku violine, sedeći, ± obuhvataju stabljiku.

Antelu čini 1–6(–9) glavica na dugim granama, sa gustim pahuljastim dlakama, mnogobrojnim, dugim jednostavnim nežlezdastim dlakama, a ponekad i sa po nekoliko malih žlezdastih dlaka. Involukrum dimenzija 10–15(–18) × 10–15 mm; brakteje šiljate, spoljašnje često proređene i raširene, sa gustim jednostavnim nežlezdastim dlakama, dužine do 5 mm, ponekad sa pahuljastim dlakama i mikrožlezdama. Ligule su ponekad sa kratkim, jednostavnim dlakama. $2n = 3x = 27$ (Niketić i sar., 2006).

Rasprostranjenje. Planine srednje Evrope, centralni Apenini, Dinaridi. (Sell i West, 1976). Centar diverziteta vrste je u Alpima, dok je na Balkanskom poluostrvu zabeleženo nekoliko taksona iz ovog agregata: subsp. *pseudelongatum* (Nageli & Peter) Zahn iz Bosne i subsp. *loschniggi* Zahn iz Hercegovine (prema Zahn-ovoj klasifikaciji), kao i *H. willdenowianum* (Zahn) P. D. Sell & C. Vest, iz istočne Bosne (Niketić i sar., 2003). Na Balkanskom poluostrvu su zabeleženi novi lokaliteti i to, na planini Prokletije Nedžinatska jezera (1400–1500 m) i na Durmitoru Veliki Međed, Velika Kalica (1800–2000 m), Crepulj Poljana – Žuta Greda (1800 m) i Planinica–Škrka (1800–2100 m) (Niketić i sar., 2006).

²⁷ Izvor fotografije – https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Neuch%C3%A2tel_Herbarium_-_Hieracium_glabratum_-_NEU000015203.jpg

²⁸ Izvor fotografije – http://dbiodbs.univ.trieste.it/carso/chivi_pub26?spez=5213



Slika 21. *H. valdepilosum*, habitus i stanište (A)²⁹, cvast (a), herbarski primerak (B)³⁰.

2.24. *Hieracium dentatum* Hoppe s.l.

Deutschl. Fl. 1(10): 159 (Strum, 1817)

Hieracium dentatum je hibridogena vrsta. U Flori Evrope je klasifikovana u okviru *H. dentatum* agregata (Sell i West, 1976). Uključuje oko 52 taksona (Greuter, 2006+), odnosno samo tipsku vrstu agregata u Flori Evrope. Nastala je ukrštanjem *H. villosum* i *H. bifidum* Kit. s.l. (Hornemann, 1815). *Hieracium bifidum* pripada sekciji *Hieracium* i podsekciji *Bifida* (Arv.-Touv.) Pugsley (Stace, 1998), odnosno sekciji *Vulgata* i podsekciji *Caesia* Zahn (Gajić, 1975). Vrsta se morfološki razlikuje od roditeljskih vrsta po oskudnijem indumentumu (u odnosu na *H. villosum*), odnosno po slabije granatom akladijumu (u odnosu na *H. bifidum*) (Sell i West, 1976), ali generalno ima habitus sličniji *H. villosum* (Zahn, 1921–1923).

Hipofilopoda. Stabljike ovih biljaka su visoke 14–40 cm, sa nekoliko do mnogo pahuljastih i prostih dlaka. Listovi su obrasli jednostavnim dlakama po obodu. Bazalni su veći, dimenzija 20–70 × 9–20 mm, ± lopatičastog do objajastog oblika. Listova na stabljici ima 2–10. Eliptični su, duguljasti do lancetasti, celog do plitko nazubljenog oboda, suženi u peteljku, dok pri vrhu mogu biti i sedeći. Antelu čine 1–4 glavice. Akladijum je gusto obrastao pahuljastim i dugim prostim dlakama. Involukrum je dimenzija 11–18 × 10–15 mm, gusto obrastao dugim nežlezdastim dlakama (do 3 mm dužine) i retkim pahuljastim dlakama. Listići involukruma linearni do usko linearno lancetasti, sedeći. Jezičasti cvetovi su goli sa žutim stubićima. Za biljke sa Durmitora, identifikovane kao *H. expallens* (Fr.) Arv.-Touv., konstatovano je da su triploidi ($2n = 3x = 27$) (Niketić i sar., 2006).

Rasprostranjenje. Areal ove vrste obuhvata Alpe, Karpate, centralni deo Apeninskog poluostrva, kao i planine centralnih i južnih delova teritorije bivše Jugoslavije (1300–2500 m) (Sell i West, 1976; Zahn, 1921–1923).

2.25. *Hieracium neilreichii* Beck

Fl. Hernstein: 259 (Beck, 1884)

≡ *H. neilreichii* A. Kerner (Zahn, 1909)

≡ *H. pallescens* subsp. *neilreichii* (Beck) Greuter, Willdenowia 37: 167 (Greuter i Raab-Straube, 2007)

≡ *H. incisum* subsp. *neilreichii* (Beck) Zahn, Pflanzenz. 76: 499 (Zahn, 1921–1923 (1921))

Hibridogena vrsta koja je nastala ukrštanjem agregata *H. bifidum* i *H. villosum* (Beck, 1893; Zahn, 1935). U okviru ove doktorske disertacije usvojena je hibridogena kombinacija *H. dentatum*

²⁹ Izvor fotografija – <http://www.orchid-nord.com/Flore-France/Asteraceae/Hieracium%20valdepilosum/Hieracium-valdepilosum.html>

³⁰ Izvor fotografije – Prirodnački muzej u Beogradu. Kustos dr sc. Niketić M, naučni savetnik, autor fotografije.

s.l. – *H. bifidum* s.l. Po habitusu odgovara roditeljskoj vrsti *H. bifidum*, samo što su listovi gusto obrasli prostim dlakama do 3 mm dužine, a takođe se na involukrumu mogu uočiti i retke mikrožlezde.

Stabljike visine 12–20 cm, sa malo do mnogo pahuljastim dlaka i sa mikrožlezdama u gornjim delovima. Bazalni listovi brojni, veličine 20–150 × 15–70 mm, eliptični ili duguljasti, do jajasti, sedeći; zašiljeni pri vrhu, celog oboda ili plitko nazubljeni. Vršnih listova na stabljici ima malo. Antelu čini najčešće jedna, ali može i više glavica; akladijum je često račvast. Involukrum je dugačak 10 mm, pokriven beličastim prostim dlakama. Listići involukruma su uski i zašiljeni, sedeći, sa malo mikrožlezda. Stubić tučka je žut ili obojen. Jezičasti cvetovi su goli ili sa po kojom prostom dlakom na vrhu i žuti.

Rasprostranjenje. Alpi, Karpati u Slovačkoj i Dinaridi do planina u Hrvatskoj, Vlašića i Maglića u Bosni, Prenja u Hercegovini i Durmitora u Crnoj Gori (Zahn, 1909, 1935).



Slika 22. *H. dentatum*, herbarski primerak³¹, *H. neilreichii*, herbarski primerak³².

Hieracium sect. *Naegelianae* Zahn ex Szeląg

Subendemična balkanska sekcija sa *H. naegelianum* Pančić, kao tipskom vrstom. U okviru ove disertacije primenjuje se klasifikacija Szeląg-a (2003) prema kojoj je vrsta *H. naegelianum* pripadnik sekcije *Naegelianae*, koju je pod istim imenom naveo i Zahn (1906), ali joj nije dao odgovarajući taksonomski (infragenusni) status. Bitno je istaći da je isti autor klasifikovao ovu Pančićevu vrstu u sect. *Hololeion* Zahn, koju kasnije botaničari nisu smatrali validnom, jer se njeno ime zasnivalo na taksonu *H. hololeion* Maxim., klasifikovanom u poseban rod *Hololeion* Kitam. (Szeląg, 2003). U nekim klasifikacijama je *H. naegelianum* bio uključen u *H.* sect. *Pseudostenotheca* (Fr.) Juxip (Stace, 1998), koja prema tim klasifikacijama, kao i sekcija *Hololeion*, obuhvata dva specifična agregata: *H. naegelianum* i *H. sparsum*. Međutim prema novijim klasifikacijama (Stace, 1998), *H. sparsum* Friv. pripada posebnoj sekciji, *H.* sect. *Cernua* R.Uechtr.

Biljke koje pripadaju sekciji *Naegelianae* su filopode do afilopode. Stabljike su uspravne, sa malo do mnogo uskih listova, koji su pri osnovi suženi ili skoro sedeći, najčešće goli, ka vrhu stabljike se smanjuju. Glavica ima malo, uglavnom 1(–3). Listići involukruma su prilegli, ± tupi, vrlo retko zašiljeni, dugački i raspoređeni u dva reda. Jezičasti cvetovi su goli, stubić ± crn, ređe svetao.

³¹ Izvor fotografije – Herbarium: JE 00009766 <http://herbarium.univie.ac.at/database/detail.php?ID=145356>.

³² Izvor fotografije – Prirodnački muzej u Beogradu. Kustos dr sc. Niketić M, naučni savetnik, autor fotografije.

Ahenija smeđa ili tamnija, retko svetlija, sa snežnobelim papusom (Zahn, 1921–1923). Predstavnici ove sekcije pretežno rastu na subalpijskim i alpijskim orosubmediteranskim siparima.

AGREGAT *HIERACIUM NAEGELIANUM*

Sell i West (1976) su prvi pretpostavili da je iz *H. naegelianum* moguće izdvojiti i nekoliko posebnih vrsta. Za sada ovaj agregat, pored tipske vrste *H. naegelianum*, obuhvata i novoopisanu vrstu *H. renatae* Szelağ, iz Severne Makedonije, kao i pet podvrsta (Greuter, 2006+).

2.26. *Hieracium naegelianum* Pančić

Elench. Crna. Gora.: 57 (Pančić, 1875)

≡ *H. undulatum* Boiss., Fl. Orient. 3: 867 (Boissier, 1875)

Filopoda, sa stabljikama dugim 10–25(–40) cm, jednostavnim, tankim, golim ili sa nekoliko pahuljastih i žlezdastih dlaka prema vrhu. Listovi su uglavnom goli sa nekoliko jednostavnih dlaka uglavnom po obodu; bazalnih listova ima 5–8, veličine 30–60 × 7–12 mm, lopatičastog ili lancetastog do linearnog oblika, tupog ili zašiljenog vrha, celog oboda, ponekad valovitog; suženi su pri bazi, sedeći. U gornjim delovima stabljike 2–3 lista, koji su usko linearni do lancetasti. Listovi su obrasli brojnim dugačkim dlakama i proređeno kratkim žlezdastim dlakama. Antela od 1–3 glavice. Akladijum je dugačak 10–15 cm. Involukrum je veličine 9–10 × 7–9 mm. Listići involukrura uski, zašiljeni ili jako šiljati, sa nekoliko do mnogo jednostavnih nežlezdastih dlaka, a ponekad i sa nekoliko pahuljastih dlaka. Stubić je žute boje. Ahenije su smeđe boje.

Rasprostranjenje. Pančićeva subendemična vrsta rasprostranjena je u visokim planinama Balkanskog poluostrva, kao i na planini Abruco u južnoj Italiji. Karakteristična je za krečnjačke sipare u subalpijskim i alpijskim pojasevima, na 1800–2500 m. Vrsta je opisana sa planine Komovi u Crnoj Gori (*locus classicus*, Pančić, 1875). Poznato je nekoliko podvrsta, ali sve populacije ove vrste u Crnoj Gori pripadaju nominalnom taksonu (Niketić i sar., 2006; Stevanović i sar; 2014). Poznate su triploidne populacije ($2n = 3x = 27$) (Niketić i sar., 2006), dok je kod sestrinske vrste *H. renatae* konstatovan diploidan broj hromozoma (Szelağ i Ilnicki, 2011).



Slika 23. *H. naegelianum*, habitus i stanište (A), cvast (a)³³.

³³ Izvor fotografija – Prirodnjački muzej u Beogradu. Kustos dr sc. Niketić M, naučni savetnik, autor fotografija.

***Hieracium* sect. *Glauciformia* Freyn**

Sekcija *Glauciformia* je monotipska endemična balkanska submediteranska sekcija sa vrstom *H. heterogynum* (Froel.) Gutermann i sedam podvrsta (Greuter, 2006+). Po starijoj nomenklaturi ova vrsta se vodi kao *H. stuposum* (Rchb.) Rchb. f. (Zahn 1921–1923). Po morfološkim osobinama predstavnici ove sekcije nalaze se između sekcija *Drepanoidea* i *Italica* Fr. Kao i kod biljaka sect. *Italica* formira se prividna rozeta (hipo- ili afilo- do filopode). Indumentum listova se razlikuje u odnosu na predstavnike sekcija *Drepanoidea* i *Italica*. U poređenju sa predstavnicima sect. *Drepanoidea* listovi su širi i pokriveni srebrnastobelim dugačkim čekinjastim dlakama, dok u odnosu na sect. *Italica* uglavnom izostaju žlezdaste dlake. Involukrum i drške glavica pokrivene su mikrožlezdama. Stubić tučka je žut. Ahenije su blede do žutosmeđe (Gajić, 1975; Zahn 1921–1923).

HIBRIDOGENE VRSTE SEKCIJE *HIERACIUM* SECT. *GLAUCIFORMIA*

Prema tradicionalnoj klasifikaciji (Zahn, 1921–1923) hibridogene vrste sekcije *Glauciformia* uključuju 11 vrsta i više podvrsta koje su nastale običnim ili višestrukim ukrštanjem vrste *H. heterogynum* sa predstavnicima šest drugih sekcija. Neke od ovih podvrsta kasnije su dignute na rang vrsta (Sell i West, 1974). U okviru ove doktorske disertacije biće ispitivane dve hibridogene vrste.

2.27. *Hieracium tommasinianum* K. Malý

Zool-Bot. Ges. Wien. 54: 306 (Malý, 1904)

≡ *H. tommasinii* Rchb. f., Icon. Fl. Germ. Helv. 19(1):100, nom. illeg. (Reichenbach, 1859)

Zahn (1921–1923) ovu hibridogenu vrstu vodi pod imenom *H. tommasinii* Rchb. i daje njenu hibridogenu kombinaciju *H. stuposum* Rchb. > *H. racemosum* Waldst. & Kit. ex Willd., dok je Gajić (1975) navodi kao *H. stuppeum* Gris. > *H. racemosum*. Sell i West (1976) pak u Flori Evrope za *H. tommasinii* Rchb., navode hibridogenu kombinaciju (*H. heterogynum* (Froel.) Gutermann – *H. racemosum*), koja je korišćena u okviru ove disertacije (**Tabela 2**). U Flori Evrope vodi se kao monotipski agregat (Sell i West, 1976). Greuter (2006+) ubraja tri niža taksona u okviru *H. tommasinianum* agregata.

Habitus i stanište ove vrste odgovaraju roditeljskoj vrsti *H. heterogynum* (sin.: *H. stuposum* Rchb.), koja ima nešto niže stabljike (30–70 cm), sa brojnim pahuljastim dlakama i nekoliko do puno jednostavnih dlaka do 18 mm dužine. Listovi *H. heterogynum* su obično goli, sa nekoliko jednostavnih dlaka na naličju, i sa nekoliko do mnogo jednostavnih dlaka na rubu, ponekad sa nekoliko mikrožlezda; bazalni dimenzija 20–90 × 5–20 mm, lancetasti, oblancetasti ili izduženo lancetasto, zašiljenog vrha, po obodu plitko nazubljeni, suženi u dugačku peteljku pri osnovi; na stabljici su manji i lancetasti. Glavica ima 3–40; drške su obično duge, vitke, sa gustim pahuljastim dlakama, a povremeno sa jednostavnim dlakama. Involukrum dimenzija 9–12 × 5–8 mm; listići involukruma sa brojnim pahuljastim dlakama, manje pokriveni mikrožlezdama, povremeno sa nekoliko jednostavnih nežlezdastih dlaka.

Za vrstu *H. racemosum* (sekcija *Italica*), karakteristična je viša stabljika, i do 100 cm. Listovi jajasti do jajasto lancetasti, ± sedeći, skoro celog oboda ili plitko nazubljeni, suženi pri osnovi, delimično formiraju lisni rukavac. Glavica ima nekoliko do mnogo. Jezičasti cvetovi su goli, bez žlezda. Vrsta je rasprostranjena u južnoj i centralnoj Evropi (Sell i West, 1976; Zahn, 1921–1923).

Hieracium tommasinianum je afilopoda. Stabljika je visoka (30–)60–90 cm, mestimično pokrivena pahuljastim dlakama, naročito u donjim delovima stabljika je obrasla dugim prostim dlakama dužine 4–8 mm. Listovi u donjim delovima stabljike brojni, veliki, lancetasti do široko rombični, neznatno nazubljeni, pri osnovi naglo suženi, skoro sedeći, na licu goli, na naličju i sa mikrožlezdama. Akladijum je dugačak do 60 mm, drške glavica u gornjem delu su bez ili sa veoma malo dlaka, sa 2–4 brakteje. Glavica ima puno. Involukrum je dugačak 12–13 mm, loptastog oblika, razređeno prekriven dlakama, slabije ili bogato prekriven mikrožlezdama. Stubići oskudni. Ahenije

su tamne do kestenastosmeđe. Cveta od jula do avgusta. $2n = 3x = 27$ (Chrtak i sar., 2007).

Rasprostranjenje. Konstatovana je na teritoriji zapadnog i centralnog dela Balkanskog poluostrva: Hrvatska, Bosna i Hercegovina, Crna Gora, Albanija, Kosovo i Metohija, zapadna Srbija, Severna Makedonija, severna Grčka, zapadna Bugarska (Gajić, 1975; Sell i West, 1976; Zahn, 1921–1923). Takson je svrstan u trans-regionalne balkanske endemite.

2.28. *Hieracium macrodontoides* (Zahn) Zahn

Repert. Spec. Nov. Regni. Veg. 6: 236 (Zahn, 1909)

≡ *H. macrodon* subsp. *macrodontoides* Zahn, Syn. Deut. Schweiz. Fl., ed. 3: 1794 (Zahn, 1901)

Agregat ove hibridogene vrste obuhvata tri taksona (Greuter, 2006+). Zahn (1922) daje hibridogenu kombinaciju (*H. stuposum* > *H. tommasinii*), prema kojoj se *H. tommasinianum* ukršta sa roditeljskom vrstom *H. heterogynum* (*Glauciformia–Italica–Glauciformia*). Ovu kombinaciju preuzimaju Sell i West (1976) (*H. heterogynum* / *tommasinii*). Gajić (1975) navodi ukrštanje *H. tommasinii* > *H. murorum*. U okviru ove doktorske disertacije usvojena je hibridogena kombinacija *Glauciformia–Italica–Hieracium* (Gajić, 1975).

Filopoda, nekada hipofilopoda sa tankom i uspravnom stabljikom, koja je u donjim delovima manje, a u gornjim delovima više obrasla pahuljastim dlakama i sa po kojom žlezdastom dlakom. Prizemni listovi su veliki na dugim drškama, u manjem broju, jajasti do duguljasto lancetasti, na oba kraja kratko do duže suženi, po obodu sitno nazubljeni, ka osnovi nekada sa malo većim zupcima, svetlozeleni do maslinastozeleni, na licu razređeno dlakavi ili skoro goli, po obodu i predelu oko glavnog nerva na naličju veoma obrasli dlakama dužine 3–8 mm. Listova na stabljici 2–7(–15), brzo se smanjuju ka vrhu stabljike ili izostaju, jajasti do linearno lancetasti, ± sedeći. Vršni listovi su ± pokriveni pahuljastim dlakama. Antelu čini 2–6(–15) glavica. Akladijum 1–4 cm dugačak, granat u sekundarnu metličastu cvast (karakteristika pripadnika sect. *Italica*); drške glavica su ± bogato pokrivene pahuljastim dlakama i ± mikrožlezdama. Involukrum je dugačak 10–13 mm, taman, umereno pokriven pahuljastim dlakama ili bez dlaka. Listići involukrura ± uski, tupi ili zašiljeni. Stubić tučka je taman. Ahenija je kestenaste boje.

Rasprostranjenje. Ilirsko područje, zapadni delovi Balkanskog poluostrva: Crna Gora, Albanija, Hercegovina, Dalmacija, zapadna Srbija (Gajić, 1975; Sell i West, 1976; Zahn, 1921–1923).



Slika 24. *H. tommasinianum*, herbarski primerak (A), cvast (*a*₁), list (*a*₂), *H. macrodontoides*, herbarski primerak (B)³⁴.

³⁴ Izvor fotografija – Prirodnjački muzej u Beogradu. Kustos dr sc. Niketić M, naučni savetnik, autor fotografija.

3. Sekundarni metaboliti taksona roda *Hieracium*

Sekundarni metaboliti su do sada ispitivani u oko 50 taksona roda *Hieracium* s. str. i obuhvataju fenolkarboksilne kiseline, flavonoide, seskviterpenske laktone, triterpenska jedinjenja i kumarine.

3.1. Fenolkarboksilne kiseline

Fenolkarboksilne kiseline su ispitivane u oko 50 taksona roda *Hieracium* s. str., i to nehibridogenih pripadnika sekcija *Alpina* (Griseb.) Greml, *Amplexicaulia* (Griseb.) Scheele, *Barbata* Greml, *Drepanoidea*, *Hieracium*, *Hieracioides* Dumort., *Italica*, *Pannosa*, *Picroidea* (Arv.-Touv.) Greml, *Prenanthoidea*, *Pseudostenotheca* (Fr.) Juxip, *Pulmonarioidea*, *Oreadea* (Fr.) Arv.-Touv., *Sabauda* (Fr.) Arv.-Touv., *Tridentata* (Fr.) Arv.-Touv., *Villosa* i *Vulgata*, kao i hibridogenih taksona koje nastaju ukrštanjem taksona poreklom iz sekcija *Alpina*, *Drepanoidea*, *Hieracium*, *Hieracioides*, *Italica*, *Lanifera* (Fr.) Greml, *Picroidea*, *Prenanthoidea*, *Pseudostenotheca*, *Oreadea*, *Sabauda*, *Tridentata*, *Villosa* i *Vulgata* (Bakar i sar., 2015; Giner i sar., 1992; Gökbulut i sar., 2017; Mañez i sar., 1994; Petrović i sar., 1999a; Švehlíková i sar., 2002; Zidorn i sar., 2002). Analizirani su polarni ekstrakti nadzemnih organa ili delova, a u slučaju dve vrste dodatno i podzemnih organa. U najvećem broju analiziranih taksona identifikovane su hlorogenska (u 53 taksona), 3,5- i 4,5-di-*O*-kafeoilhina kiselina (u 49, odnosno 38 taksona), dok je 1,5-di-*O*-kafeoilhina kiselina identifikovana samo u šest vrsta, i izohlorogenska i 3,4-di-*O*-kafeoilhina kiselina u dve vrste (detaljan pregled je dat u **Tabeli P1** u Prilogu 1, dok su strukture jedinjenja prikazane u **Tabeli 3**).

Pored fenolkarboksilnih kiselina, u metanolnom ekstraktu podzemnih organa *H. murorum* do sada su identifikovana dva jedinjenja iz grupe estara fenolnih kiselina i to: 4- β -D-glukopiranoziloksibenzil estar 4-hidroksicimetne kiseline i 4- β -D-glukopiranoziloksibenzil estar 3-hidroksi-2-[(4-hidroksifenil)-acetoksi]-3-metilbutanske kiseline (Zidorn i sar., 2001).

3.2. Flavonoidi

Dosadašnja ispitivanja flavonoida obuhvatila su iste nehibridogene i hibridogene taksone roda *Hieracium* s. str. u kojima su identifikovane fenolkarboksilne kiseline. Analizirani su polarni ekstrakti nadzemnih organa ili delova, ili celih biljaka. U najvećem broju taksona do sada su identifikovani flavonoidi iz grupe flavona, apigenin (**1**) i luteolin (**11**), uključujući i njihove heterozide: monozide (**2-7** i **12-18**) i biozide (**8-10** i **19-21**) (Bakar i sar., 2015; Haag-Berrurier i Duquenois, 1969; Giner i sar., 1992; Giner i sar., 1992; Gökbulut i sar., 2017; Guppy i Bohm, 1976; Mañez i sar., 1994; Petrović i sar., 1999a; Švehlíková i sar., 2002; Zidorn i sar., 2002). Izoetin 4'-*O*-glukuronid (**24**) do sada je detektovan u šest taksona (Zidorn i sar., 2002), a metil derivati luteolina: diosmetin (**22**) u dve vrste *H. amplexicaule* L. (sect. *Amplexicaulia*) i *H. compositum* Lapeyr (*Lanifera-Italica*) (Giner i sar., 1992; Mañez i sar., 1994) i hrizoeriol (**23**) u *H. umbellatum* L. (sect. *Hieracioides*) (Guppy i Bohm, 1976). Iz grupe flavonola, kvercetin i njegov 3-*O*-glukozid (**25** i **26**) detektovani su u dve vrste: *H. amplexicaule* i *H. umbellatum* (Guppy i Bohm, 1976; Mañez i sar., 1994). Dva metil derivata naringenina (**27** i **28**), kao predstavnika grupe flavanola, identifikovana su samo u *H. amplexicaule* (Wollenweber i sar., 1997). Detaljniji pregled identifikovanih jedinjenja u taksonima ovog roda, uključujući i pregled biljnih organa iz kojih su jedinjenja ekstrahovana, dat je u **Tabeli P2** u Prilogu 1, dok su strukture jedinjenja prikazane u **Tabeli 3**.

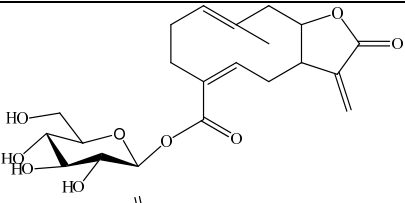
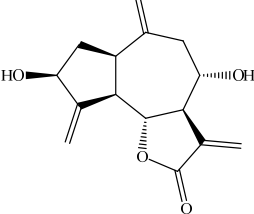
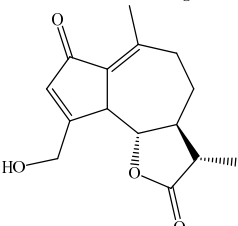
Tabela 3. Struktura flavonoida i fenolkarboksilnih kiselina identifikovanih u taksonima roda *Hieracium* s. str.

#	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	Reference
Flavoni						
1	H	H	OH	H	H	Haag-Berrurier i Duquenois, 1969; Giner i sar., 1992; Guppy i Bohm, 1976; Manez i sar., 1994; Petrović i sar., 1999a; Gökbulut i sar., 2017
2	Ara	H	OH	H	H	Guppy i Bohm, 1976
3	H	H	O Ara	H	H	Guppy i Bohm, 1976
4	Glc	H	OH	H	H	Giner i sar., 1992; Guppy i Bohm, 1976; Manez i sar., 1994; Petrović i sar., 1999a
5	H	H	OGlc	H	H	Guppy i Bohm, 1976; Zidom i sar., 2002
6	Glu	H	OH	H	H	Guppy i Bohm, 1976
7	H	H	OGlu	H	H	Švehlíková i sar., 2002
8	Xyl-Glc	H	OH	H	H	Guppy i Bohm, 1976
9	Ara-Glc	H	OH	H	H	Guppy i Bohm, 1976
10	Rha-Glc	H	OH	H	H	Guppy i Bohm, 1976
11	H	OH	OH	H	H	Haag-Berrurier i Duquenois, 1969; Guppy i Bohm, 1976; Manez i sar., 1994; Petrović i sar., 1999a; Zidom i sar., 2002; Gökbulut i sar., 2017
12	Ara	OH	OH	H	H	Guppy i Bohm, 1976
13	Rha	OH	OH	H	H	Giner i sar., 1992; Manez i sar., 1994
14	H	OH	O Ara	H	H	Guppy i Bohm, 1976
15	Glc	OH	OH	H	H	Haag-Berrurier i Duquenois, 1969; Giner i sar., 1992; Guppy i Bohm, 1976; Manez i sar., 1994; Petrović i sar., 1999a; Švehlíková i sar., 2002; Zidom i sar., 2002; Gökbulut i sar., 2017
16	H	OH	OGlc	H	H	Guppy i Bohm, 1976; Zidom i sar., 2002
17	Glu	OH	OH	H	H	Guppy i Bohm, 1976; Zidom i sar., 2002
18	H	OH	OGlu	H	H	Švehlíková i sar., 2002
19	Xyl-Glc	OH	OH	H	H	Petrović i sar., 1999a
20	Rha-Glc	OH	OH	H	H	Petrović i sar., 1999a
21	Ara-Glc	OH	OH	H	H	Guppy i Bohm, 1976
22	H	OH	OCH ₃	H	H	Giner i sar., 1992; Manez i sar., 1994
23	H	OCH ₃	OH	H	H	Guppy i Bohm, 1976
24	H	OH	OGlu	OH	H	Zidom i sar., 2002
Flavonoli						
25	H	OH	OH	H	OH	Guppy i Bohm, 1976
26	H	OH	OH	H	OGlc	Guppy i Bohm, 1976; Manez i sar., 1994
Flavanoni						
27	OCH ₃	OH	OH	/	/	Wollenweber i sar, 1997
28	OCH ₃	OH	OCH ₃	/	/	Wollenweber i sar, 1997
Fenolkarboksilne kiseline						
29	H	Kafeoil	H	H	/	Giner i sar., 1992; Manez i sar., 1994
30	H	H	H	Kafeoil	/	Giner i sar., 1992; Manez i sar., 1994; Petrović i sar., 1999a; Švehlíková i sar., 2002; Zidom i sar., 2002; Bakar i sar., 2015; Gökbulut i sar., 2017
31	H	Kafeoil	H	Kafeoil	/	Petrović i sar., 1999a; Švehlíková i sar., 2002; Zidom i sar., 2002
32	H	Kafeoil	Kafeoil	H	/	Giner i sar., 1992
33	Kafeoil	H	H	Kafeoil	/	Petrović i sar., 1999a
34	H	H	H	Kafeoil	/	Zidom i sar., 2002

3.3. Seskviterpenski laktoni

Seskviterpenski laktoni su do sada identifikovani u 2 vrste roda *Hieracium* s. str. Iz metanolnog ekstrakta podzemnih organa *H. murorum* izolovan je seskviterpenski lakton germakranolidnog tipa, derivat kostunolida (Zidorn i sar., 2001), dok su iz hloroformskog ekstrakta nadzemnih delova *H. bectauatensis* Kupr. (sect. *Tridentata*) izolovana dva seskviterpenska laktona gvajanolidnog tipa, i to derivat dehidrokostus laktona (Kanafin i sar., 2015) i derivat laktucina (Adenkov, 2015). Strukture identifikovanih seskviterpenskih laktona prikazane su u **Tabeli 4**.

Tabela 4. Strukture seskviterpenskih laktona identifikovanih u vrstama roda *Hieracium* s. str.

Struktura	Jedinjenje	Izvor	Referenca
	(15→1)-β-D-glukopiranozil estar germakra-7αH- 1(10)E,4Z,11(13)-trien- 12,8α-olid-15-karboksilne kiseline	<i>H. murorum</i>	Zidorn i sar., 2001
	dezacilcinaropikrin	<i>H. bectauatensis</i>	Kanafin i sar., 2015
	11,13-dihidro-8- dezoksilaktucin	<i>H. bectauatensis</i>	Adenkov, 2015

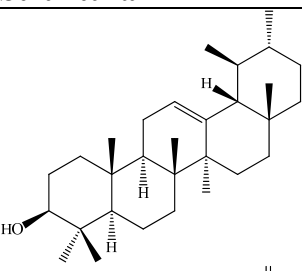
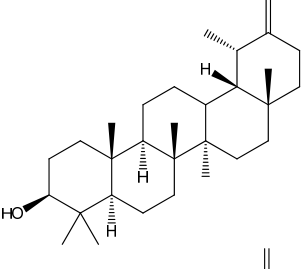
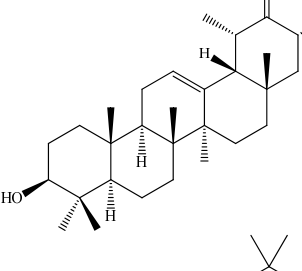
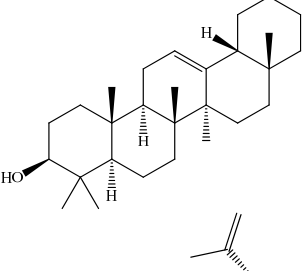
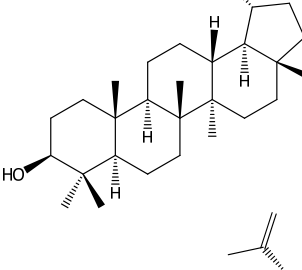
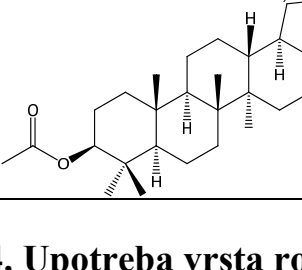
3.4. Triterpeni

Do sada, triterpenska jedinjenja ispitivana su u tri taksona roda *Hieracium* s. str. Iz hloroformskih ekstrakata nadzemnih delova u cvetu *H. plumulosum* (Petrović i sar., 1996) i *H. gymnocephalum* (Petrović i sar., 1999b), izolovani su triterpeni tipa ursana (α -amirin i 21 α -hidroksi-taraksasterol), oleana (β -amirin) i/ili lupana (lupeol-acetat). Prethodno su triterpeni ispitivani i u hloroformskim ekstraktima podzemnih organa i nadzemnih delova u cvetu *H. umbellatum* subsp. *umbellatum* (autori su u ovim radovima koristili sinonime *H. canadense* Michx. i *H. kalmii* L.) u kojima su pored već navedenih α - i β -amirina identifikovani i taraksasterol (triterpen tipa ursana) i lupeol (triterpen tipa lupana) (Hooper i Chandler, 1984). Strukture identifikovanih triterpena prikazane su u **Tabeli 5**.

3.5. Kumarini

Kumarini su do sada identifikovani u dve vrste roda *Hieracium* s. str.: skopoletin u metanolnim ekstraktima herbi *H. compositum* i umbeliferon u *H. murorum* (Giner i sar., 1992).

Tabela 5. Strukture triterpena identifikovanih u taksonima roda *Hieracium* s. str.

Struktura	Jedinjenje	Izvor	Referenca
	α -amirin	<i>H. gymnocephalum</i>	Petrović i sar., 1999b
	taraksasterol	<i>H. umbellatum</i> subsp. <i>umbellatum</i>	Hooper i Chandler, 1984
	21 α -hidroksi-taraksasterol	<i>H. gymnocephalum</i>	Petrović i sar., 1999b
	β -amirin	<i>H. gymnocephalum</i>	Petrović i sar., 1999b
	lupeol	<i>H. umbellatum</i> subsp. <i>umbellatum</i>	Hooper i Chandler, 1984
	lupeol-acetat	<i>H. plumulosum</i>	Petrović i sar., 1996

4. Upotreba vrsta roda *Hieracium*

Pojedine vrste roda *Hieracium* koristile su se ili se koriste u narodnoj medicini. Kada su u pitanju vrste koje su ispitivane u ovoj doktorskoj disertaciji, zabeleženo je da se osušeni sok iz korena *H. pannosum* u Turskoj (zapadna Anadolija) koristi za žvakanje u cilju prevencije oboljenja usne duplje i održavanja njene higijene (Ari i sar., 2015), dok se herba *H. plumulosum* u Crnoj Gori (oblast Prokletija) koristi kao sredstvo za lečenje rana (Petrović, 1995). Što se tiče ostalih vrsta ovog roda, u

zapisima koji potiču iz centralne Evrope, iz perioda renesanse, zabeležena je oralna primena *H. murorum* i *H. caesium* Fr. kod epilepsije (Adams i sar., 2012). Dodatno, *H. murorum* se koristio kao antihelmintik, kod bolesti pluća (zato se ova biljka naziva i francuski plućnjak) i kod bolesti dojki, kao i spolja za zarastanje rana (Schneider i sar., 1974). *Hieracium umbellatum* se takođe koristio kod respiratornih bolesti, tj. za ublažavanje kašlja (Schneider i sar., 1974). Infuz listova *H. amplexicaule* u južnim delovima Španije (Granada) primenjivan je oralno kod želudačnih poremećaja i za ublažavanje menstrualnih tegoba. Zabeležena je i topikalna primena masti spravljene od listova ove biljke i kozjeg loja za lečenje rana i čireva i kao analgetika, kao i za uklanjanje bradavica (González-Tejero i sar., 1995). U Južnoj Americi, u Peruu, dekokt herbe *H. neoherreriae* Zahn koristi se spolja za ispiranje rana, dok se infuz herbe iste biljke primenjuje oralno kod respiratornih i bubrežnih infekcija (De Feo i Soria, 2012). Svež nadzemni deo u cvetu *H. umbellatum* bio je oficinalan prema nemačkoj Homeopatskoj farmakopeji (HAB, drugo izdanje iz 1934. godine) kao diuretik i sredstvo protiv gripa (Hoppe, 1958; Petrović, 1999).

Treba naglasiti da u ovom odeljku, kao i u prethodnom (odeljak 3) i narednom (odeljak 5), nisu obuhvaćeni predstavnici roda *Pilosella*, uključujući i *P. officinarum* (zečja loboda) (Greuter 2006+; Greuter i Raab-Straube, 2008; Simonović, 1959), koja je nekada bila klasifikovana u okviru roda *Hieracium*, pod imenom *H. pilosella* L. (Zahn, 1921–1923; Sell i West, 1976), koje se još uvek navodi u nekim savremenim literaturnim izvorima (EMA/HMPC, 2015).

5. Farmakološka aktivnost vrsta roda *Hieracium*

Antioksidantna aktivnost je najčešće ispitivana farmakološka aktivnost različitih izolata vrsta roda *Hieracium* s. str. Ispitivanja su vršena spektrofotometrijskim *in vitro* testovima. Ukupni antioksidantni potencijal određivan je FRAP testom (engl. *Ferric Reducing Antioxidant Power*) koji se zasniva na redukciji Fe^{3+} do Fe^{2+} jona uz odgovarajuću promenu boje reakcione smeše. Takođe je analizirana sposobnost neutralizacije slobodnih radikala koja je isto tako bila praćena promenom boje reakcione smeše. Najviše je ispitivana sposobnost neutralizacije 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH[•]) radikala, a zatim i 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) (ABTS^{•+}), hidroksil ([•]OH), kao i peroksidnih radikala nastalih iz linolne kiseline koji reaguju sa β -karotenom u β -karoten/linolna kiselina testu. Ispitivana je i sposobnost inhibicije lipidne peroksidacije u lipozomima pomoću Fe^{2+} jona TBA testom (engl. *Thiobarbituric Acid assay*). Rezultati su izražavani kao procenat neutralizacije slobodnog radikala S (%), kao koncentracija ekstrakta koja dovodi do neutralizacije 50% slobodnih radikala (SC₅₀) ili preko broja ekvivalenata nekog poznatog antioksidansa.

Od vrsta roda *Hieracium* koje su predmet ove doktorske disertacije do sada je ispitivana antioksidantna aktivnost ekstrakata *H. gymnocephalum* (Petrović i sar., 2008) i *H. pannosum* (Gökbulut i sar., 2017). Suvi dihlormetanski ekstrakt herbe *H. gymnocephalum* (ekstrakcija tokom 72 h na sobnoj temperaturi) pokazao je umerenu sposobnost neutralizacije [•]OH radikala u 2-dezoksiriboza testu (maksimalnih 39,3% neutralizacije u koncentraciji 2,5% *m/V*), i slabu sposobnost neutralizacije DPPH[•] radikala (SC₅₀=60 mg/mL) i inhibicije lipidne peroksidacije u lipozomima (12,9% inhibicije u najvišoj testiranoj koncentraciji 10% *m/V*) (Petrović i sar., 2008). Sa druge strane, suvi metanolni ekstrakti korena, cvasti i listova *H. pannosum* (ekstrakcija tokom 1 h na 50 °C) pokazali su značajnu sposobnost neutralizacije DPPH[•] radikala (SC₅₀ vrednosti 0,455, 0,767 i 0,776 mg/mL) i ABTS^{•+} katjonskog radikala (SC₅₀ vrednosti 0,101, 0,258 i 0,240 mg/mL) (Gökbulut i sar., 2017).

Kada su u pitanju druge vrste ovog roda, liofilizovan metanolni ekstrakt turske endemične vrste *H. cappadocicum* Freyn, izrađen u aparaturi po Soxhlet-u (6 h na 60 °C), neutralisao je DPPH[•] radikal (SC₅₀=30 µg/mL) i inhibirao oksidaciju linolne kiseline u β -karoten/linolna kiselina testu (55,1% inhibicije, testirana koncentracija 2 mg/mL) (Tepe i sar., 2006). Metanolni ekstrakti (80%, *V/V*; ekstrakcija tokom 8 h na sobnoj temperaturi) korena i nadzemnih delova *H. bornmuelleri* Freyn pokazali su sposobnost neutralizacije DPPH[•] radikala (SC₅₀ vrednosti 0,461 i 0,939 mg/mL) i sposobnost inhibicije lipidne peroksidacije u TBARS (engl. *Thiobarbituric acid reactive substance*) testu (37,74 i 24,56 nmol malonildialdehida/mL) (Bakar i sar., 2015). Takođe su ispitivani antiradikalska aktivnost i ukupni antioksidantni potencijal etilacetatnog i metanolnog ekstrakta listova *H. waldsteinii*

Tausch. (dobijenih u aparaturi po Soxhlet-u). Metanolni ekstrakt je pokazao značajniju sposobnost neutralizacije radikala u DPPH testu ($SC_{50}=0,515$ mg/mL) i ABTS testu ($SC_{50}=0,118$ mg/mL), kao i bolji ukupni antioksidantni potencijal (FRAP vrednost 0,411 mmol Fe^{2+} /g) (Janačković i sar., 2018).

Za navedeni suvi dihlormetanski ekstrakt herbe *H. gymnocephalum* ispitivane su i *in vivo* antiedematozna i gastroprotektivna aktivnost. Antiedematozna aktivnost je pokazana u modelu inflamacije šape pacova indukovane karageninom, uz upotrebu indometacina kao referentnog leka. Aktivnost je računata iz razlike u masi tretirane i netretirane šape pacova (Petrović i sar., 2008). Pri izazivanju inflamacije intraplantarnom injekcijom karagenina gotovo istovremeno se javljaju ključni znaci inflamacije: edem, hiperalgezija i eritem (Morris, 2003). Ekstrakt primenjen u dozama 25, 50, 100 i 200 mg/kg *per os* (*p.o.*) *Wistar* pacovima, 1 h pre injektovanja karagenina (0,1 mL supkutano, 0,5%, *m/V*) ispoljio je antiedematozni efekat od 5,9%, 11,7%, 31,2% i 44,1%, redom. Indometacin, standardni antiinflamatorni lek, primenjen kontrolnoj grupi životinja u dozama 1, 2, 4 i 8 mg/kg *p.o.*, ispoljio je antiedematozni efekat od 27,1%, 50,4%, 58,1% i 73,4%, redom. Gastroprotektivna aktivnost je ispitivana u okviru istog eksperimenta, u modelu akutnog gastričnog ulkusa u pacova indukovanog indometacinom. Životinje koje su primile samo indometacin u dozi 8 mg/kg, *p.o.* (kontrolna grupa) i koje su primile ekstrakt u dozi 200 mg/kg *p.o.* neposredno nakon indometacina (8 mg/kg, *p.o.*), žrtvovane su 4 h nakon tretmana, uklonjen im je želudac i u njemu je ispitivana pojava i veličina lezija. Indometacin primenjen pacovima u dozi 8 mg/kg *p.o.*, izazvao je jak antiedematozni efekat, ali je istovremeno izazvao velike gastrične lezije. Kod test grupe (životinje koje su primile ekstrakt neposredno nakon indometacina), došlo je do značajnog smanjenja: udela životinja sa pojavom lezija (sa 100 na 60%), prosečne širine lezija (sa 32,6 na 3,7 mm), prosečne površine lezija (sa 6 na 0,1 mm²) i prosečnog gastričnog skora (sa 3,6 na 0,5) (Petrović i sar., 2008).

Citotoksična aktivnost *n*-heksanske, dihlormetanske i vodene frakcije metanolnog ekstrakta (50%, *V/V*), kao i vodenog ekstrakta nadzemnih delova u cvetu *H. umbellatum* prema ćelijskim linijama humanih tumora: epitelnog adenokarcinoma cerviksa (HeLa), epitelnog epidermoidnog karcinoma kože (A-431) i epitelnog adenokarcinoma dojke (MCF7) ispitivana je *in vitro* MTT testom (engl. *Microculture Tetrazolium Test*), u kome se 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolijum bromid (MTT reagens) koristi kao indikator rasta ćelija. Ekstrakti su pokazali slabu aktivnost prema ispitivanim ćelijskim linijama. Naime, pri najvećoj testiranoj koncentraciji od 10 µg/mL i vremenu izlaganja ćelija ekstraktima od 72 h, ni jedan ekstrakt nije postigao 50% inhibicije rasta ćelija HeLa (1,44-5,26%), A-431 (2,46-14,11%) i MCF7 (3,04-15,20%) (Csupor-Löffler i sar., 2009).

Za *n*-heksanske ekstrakte korena, lista i stabljike *H. umbellatum* ispitivana je antimikrobna aktivnost. Ekstrakti nisu pokazali značajnu inhibiciju rasta bakterija *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* i *Pseudomonas aeruginosa* i kvasnice *Candida albicans*, na čvrstoj hranljivoj podlozi u disk difuzionom testu (Kuluev i sar., 2019). U mikrodilucionom testu autori su procenjivali aktivnost merenjem optičke gustine bakterijske kulture tretirane ekstraktom u bunariću (rast bakterija dovodi do zamućenja) i pokazali da ovi nepolarni ekstrakti zanemarljivo inhibiraju rast *E. coli* (Shvets i sar., 2019).

Takođe, suvi metanolni ekstrakt cele biljke *H. umbellatum* pokazao je 15,0% inhibicije HIV-1 proteaze u koncentraciji 100 µg/mL. Inhibicija aktivnosti enzima određena je kvantitativnom HPLC analizom rezidualne količine supstrata (His-Lys-AlaArg-Val-Leu-(pNO₂-Phe)-Glu-Ala-Nle-Ser-NH₂), upotrebom njegove kalibracione krive. Kao pozitivna kontrola korišćen je acetil pepstatin ($IC_{50}=29$ µg/mL) (Min i sar., 1999).

In vitro, spektrofotometrijski, ispitivana je i sposobnost ekstrakata *H. pannosum* da inhibiraju enzime α -glukozidazu i α -amilazu. Ovi enzimi učestvuju u digestiji ugljenih hidrata u gastrointestinalnom traktu. Zato se njihovom inhibicijom može postići smanjenje postprandijalne koncentracije cirkulišuće glukoze, što je naročito značajno u pacijenata sa tipom 2 dijabetesa (Tundis i sar., 2010). Suvi metanolni ekstrakti cvasti, listova i korena ove vrste (u koncentraciji 3 mg/mL) veoma slabo su inhibirali aktivnost α -glukozidaze (5,82-9,24%), dok je inhibicija aktivnosti α -amilaze bila značajnija (21,05-37,90%). Akarboza, koja je korišćena kao pozitivna kontrola (u koncentraciji 1 mg/mL), pokazala je snažniju inhibiciju aktivnosti α -glukozidaze (98,88%) i α -amilaze (44,72%) u odnosu na ekstrakte (Gökbulut i sar., 2017).

CILJ

Predmet ove doktorske disertacije je 28 vrsta roda *Hieracium* s. str. sa Balkanskog poluostrva, i to 12 nehibridogenih vrsta (osam iz sekcije *Pannosa*, dve iz sekcije *Villosa* i po jedne iz sekcija *Drepanoidea* i *Naegeliana*), i 16 hibridogenih vrsta (nastalih ukrštanjem vrsta iz sekcija *Pannosa*, *Naegeliana*, *Drepanoidea*, *Prenanthoidea*, *Villosa*, *Glauciformia*, *Hieracium* i/ili *Italica*).

Prvi cilj istraživanja je hemijska karakterizacija 28 vrsta roda *Hieracium*:

- izolovanje seskviterpenskih laktona iz odabranog metanolnog (MeOH) ekstrakta cvasti i utvrđivanje njihove strukture;
- kvalitativna i kvantitativna analiza seskviterpenskih laktona u odabranim MeOH ekstraktima podzemnih organa i MeOH ekstraktima herbi svih 28 vrsta;
- izolovanje fenolkarboksilnih kiselina iz odabranog MeOH ekstrakta podzemnih organa i utvrđivanje njihove strukture;
- kvalitativna i kvantitativna analiza fenolkarboksilnih kiselina u odabranim MeOH ekstraktima podzemnih organa i fenolkarboksilnih kiselina i flavonoida u MeOH ekstraktima herbi svih 28 vrsta;
- kvalitativna i kvantitativna analiza triterpena u dihlormetanskim (CH₂Cl₂) ekstraktima herbi svih 28 vrsta;
- multivarijantna statistička analiza rezultata hemijskih ispitivanja herbi u cilju procene hemosistematskog značaja analiziranih sekundarnih metabolita.

Drugi cilj je skrining farmakološke aktivnosti odabranih izolata ispitivanih vrsta roda *Hieracium*:

- ispitivanje antioksidantnog potencijala MeOH ekstrakata herbi svih 28 vrsta;
- ispitivanje antimikrobne i citotoksične aktivnosti odabranih MeOH i CH₂Cl₂ ekstrakata herbi i izolovanih seskviterpenskih laktona;
- ispitivanje sposobnosti MeOH ekstrakata herbi svih 28 vrsta i odabranih metabolita (flavonoida, fenolkarboksilnih kiselina i seskviterpenskih laktona) da inhibiraju enzime acetilholinesterazu i butirilholinesterazu;
- ispitivanje antinociceptivne i antiedematozne aktivnosti, uticaja na motornu spretnost eksperimentalnih životinja i akutne toksičnosti odabranih MeOH i CH₂Cl₂ ekstrakata herbi.

MATERIJAL I METODE

1. Aparatura

Ekstrakcija

U postupku izrade ekstrakata (maceracijom ili bimaceracijom), mešanje smeše droga/ekstrakciono sredstvo vršeno je na automatskoj mešalici Compact Shaker KS 15 A control (Edmund Bühler GmbH, Nemačka). Rastvarači su uklanjani uparavanjem pod sniženim pritiskom na vakuum uparivaču Rotavapor R-II (Büchi Labortechnik AG, Švajcarska).

Liofilizacija

Vodena frakcija metanolnog (MeOH) ekstrakta cvasti *H. calophyllum* liofilizovana je u liofilizatoru Alpha 1-4 LD plus (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Nemačka).

Hromatografija

Tečna hromatografija u koloni. Preparativno hromatografsko razdvajanje dihlormetanskog (CH₂Cl₂) ekstrakta *H. gymnocephalum* izvedeno je hromatografijom u koloni na stubu silikagela Kieselgel Merck Typ 0,063-0,200 mm, 60A (Merck, Nemačka).

Tečna hromatografija sa masenom spektrometrijom (LC-MS). Semipreparativno hromatografsko razdvajanje MeOH ekstrakata cvasti *H. calophyllum* i podzemnih organa *H. scheppigianum*, kao i kvalitativna i kvantitativna analiza MeOH ekstrakata podzemnih organa *H. scheppigianum* i *H. naegelianum* i herbi svih 28 vrsta roda *Hieracium* izvedeni su na tečnom hromatografu Agilent LC/MSD 1260/6130 (Agilent Technologies, SAD), opremljenom kvaternarnom pumpom (G1311B/1260), autosampler-om (G1329B), frakcionim kolektorom (G1364C), diodnim detektorom (engl. *diode array detector*, DAD) (G4212B) i kompjuterskim programom ChemStation Rev. B.04.03-SP1, za obradu prikupljenih hromatografskih i spektralnih podataka. Sistem je spregnut sa masenim detektorom API-ESI MSD (6130), koji se sastoji od elektrosprej jonskog izvora (engl. *electrospray ionization*, ESI) i jednostrukog kvadrupol analizatora (engl. *single quadrupole*, SQ) (G1968D), u daljem tekstu ESI/SQ MSD.

Za semipreparativno hromatografsko razdvajanje MeOH ekstrakata cvasti *H. calophyllum* i podzemnih organa *H. scheppigianum*, u cilju dobijanja frakcija i/ili izolovanja jedinjenja, korišćene su dve Zorbax SB-C₁₈ kolone različite dužine (250 × 9,4 mm i 50 × 9,4 mm; veličina čestica 5 μm, Agilent Technologies).

Za kvalitativnu i kvantitativnu analizu MeOH ekstrakata podzemnih organa *H. scheppigianum* i *H. naegelianum* i herbi svih 28 vrsta roda *Hieracium*, korišćene su dve različite kolone, tj. stacionarne faze:

- Zorbax SB-Aq (150 × 3,0 mm; veličina čestica 3,5 μm, Agilent Technologies), za hromatografsko razdvajanje seskviterpenskih laktona,
- Zorbax SB-C₁₈ (250 × 4,6 mm; veličina čestica 5 μm, Agilent Technologies), za hromatografsko razdvajanje flavonoida i fenolkarboksilnih kiselina.

Tečna hromatografija sa Q-TOF masenom spektrometrijom (LC-Q-TOF-MS/MS). Za dobijanje HR-MS podataka izolovanih jedinjenja (tj. precizne mase protonovanih molekula i njihovih fragmentacionih jona masenom spektrometrijom visoke rezolucije, engl. *high resolution-mass spectrometry*, HR-MS) korišćen je tečni hromatograf Waters Alliance 2695 LC sistem spregnut

sa Waters SYNAPT quadrupole/time-of-flight³⁵ (Q-TOF) masenim spektrometrom (Waters Corporation, SAD). Sistem je opremljen kompjuterskim programom MassLynx v.4.1, za obradu sakupljenih masenih podataka. Hromatografsko razdvajanje vršeno je na YMC AQ C₁₈ koloni (2 × 100 mm, veličina čestica 3 μm, YMC CO., LTD., Japan).

Gasna hromatografija (GC-FID-MS). Kvalitativna i kvantitativna analiza dihlormetanskih (CH₂Cl₂) ekstrakata vršena je na gasnom hromatografu Agilent 6890N (Agilent Technologies, SAD), opremljenom plameno-jonizujućim detektorom (engl. *flame ionization detector*, FID) i spregnutom sa masenim detektorom Agilent 5975C, čiji jonski izvor funkcioniše na principu elektronske jonizacije (engl. *electron ionization*, EI). Za hromatografsko razdvajanje korišćena je kapilarna kolona HP-5MS (30 m × 0,32 mm; debljina filma stacionarne faze 0,25 μm, Agilent Technologies, SAD).

NMR spektroskopija

Snimanje 1D (¹H, ¹³C) i 2D (HSQC, HMBC, COSY, NOESY/ROESY) NMR spektara izolovanih i polusintezom dobijenih jedinjenja vršeno je na Bruker (Nemačka) NMR spektrometrima, opremljenim probom širokog opsega (engl. *Broad band*, BBO):

- Ascend 400 (frekvencije 400 MHz za ¹H jezgro i 101 MHz za ¹³C jezgro);
- Avance III (frekvencije 500 MHz za ¹H jezgro i 125 MHz za ¹³C jezgro).

Uzorci su rastvarani u deuterijum oksidu (D₂O), deuterisanom metanolu (MeOH-*d*₄), deuterisanom dimetilsulfoksidu (DMSO-*d*₆) i deuterisanom hloroformu (CHCl₃-*d*) sa tetrametilsilanom kao internim standardom.

Spektrofotometrija

Za merenje apsorbancija korišćeni su:

- spektrofotometar Evolution 300 (Thermo Scientific, SAD) za ispitivanje antioksidantne aktivnosti;
- spektrofotometar, čitač apsorbancija mikrotitarskih ploča BioTek ELx808 (Winooski, VT, SAD) za ispitivanje sposobnosti uzoraka da inhibiraju enzime acetilholinesterazu i butirilholinesterazu;
- ELISA čitač Multiskan FC (Thermo Scientific, SAD) za ispitivanje citotoksične aktivnosti MTT testom.

Refraktometrija

Optička rotacija jedinjenja merena je na AUTOPOL IV automatskom polarimetru (Rudolph Research Analytical, SAD).

In vivo farmakološka ispitivanja

Merenje bolne preosetljivosti inflamirane šape pacova pri mehaničkoj stimulaciji vršeno je primenom *Von Frey* anesteziometra (IITC Life Science, SAD), u cilju procene antihiperalgzijske aktivnosti uzoraka.

Merenje volumena šape pacova vršeno je primenom pletizmometra 7141 (Ugo Basile S. R. L, Italija), u cilju procene antiedematoznog efekta uzoraka.

Rotarod aparat (*Treadmill* 7600 za pacove, Ugo Basile, Italija) korišćen je za procenu uticaja uzoraka na motornu spretnost pacova.

³⁵ Spregnuti kvadripol (engl. *quadrupole*, Q) analizator i analizator na bazi vremena preleta (engl. *time-of-flight*, TOF).

2. Biljni materijal

U okviru ove doktorske disertacije ispitivani su:

- nadzemni delovi u cvetu (herbe) svih 28 odabranih vrsta roda *Hieracium*,
- u slučaju *H. calophyllum* i cvast,
- a u slučaju *H. scheppigianum* i *H. naegelianum* i podzemni organi (koren sa rizomom).

Vreme i lokaliteti sakupljanja biljnog materijala, kao i kolektorski brojevi, prikazani su u **Tabeli 6**. Biljni materijal je identifikovao naučni i muzejski savetnik dr sc. Marjan Niketić, kustos Prirodnjačkog muzeja u Beogradu. Herbarski primerci deponovani su u Herbarijumu Prirodnjačkog muzeja u Beogradu (BEO).

Očišćen biljni materijal je osušen na senovitom, dobro provetrenom mestu, na sobnoj temperaturi i čuvan u papirnim kesama ili vrećama do ekstrakcije.

Tabela 6. Vreme sakupljanja biljnog materijala, lokaliteti i kolektorski brojevi (Br.). Sakupljeni su nadzemni delovi u cvetu svih 28 vrsta, u slučaju *H. calophyllum* i cvast, a u slučaju *H. scheppigianum* i *H. naegelianum* i podzemni organi (koren sa rizomom)

Vrsta	Akronim	Datum	Lokalitet	GPS koordinate	Br.
<i>H. gymnocephalum</i>	gym	08/2013	Durmitor, Veliki Međed ^a	19,001828 E; 42,933681 N	H23
<i>H. orieni</i>	ori	08/2013	Vojnik ^a	19,001828 E; 42,933681 N	H28
<i>H. blecicii</i>	ble	08/2013	Durmitor, Veliki Međed	19,071645 E; 43,130612 N	H24
<i>H. paratrichum</i>	par	08/2013	Durmitor, Veliki Međed	19,071645 E; 43,130612 N	H25
<i>H. spirocaule</i>	spi	08/2013	Durmitor, Veliki Međed	19,071645 E; 43,130612 N	H26
<i>H. anastrum</i>	ana	08/2013	Durmitor, Veliki Međed	19,071645 E; 43,130612 N	H12
<i>H. calophyllum</i>	cal	08/2013	Durmitor, Veliki Međed	19,071645 E; 43,130612 N	H27
<i>H. scheppigianum</i>	sch	08/2013	Durmitor, Veliki Međed	19,071645 E; 43,130612 N	H05
<i>H. durmitoricum</i>	dur	08/2013	Durmitor, Veliki Međed	19,071645 E; 43,130612 N	H21
<i>H. guentheri-beckii</i>	gue	08/2013	Durmitor, Veliki Međed	19,071645 E; 43,130612 N	H22
<i>H. mirificissimum</i>	mir	08/2013	Durmitor, Veliki Međed	19,071645 E; 43,130612 N	H20
<i>H. coloriscapum</i>	col	08/2013	Durmitor, Veliki Međed	19,071645 E; 43,130612 N	H10
<i>H. pyricephalum</i>	pyr	08/2015	Durmitor, Veliki Međed	19,071645 E; 43,130612 N	H09
<i>H. mokragorae</i>	mok	08/2015	Užice, Đetina, Stari Grad ^b	19,827167 E; 43,85582 N	H18
<i>H. pannosum</i>	pan	09/2015	Pirot, Greben ^b	22,643874 E; 42,945996 N	H03
<i>H. plumulosum</i>	plu	08/2015	Durmitor, Đurđevića Tara ^a	19,302078 E; 43,137938 N	H02
<i>H. albopellitum</i>	alb	08/2015	Prokletije, Ropojana ^a	19,790344 E; 42,487021 N	H13
<i>H. pseudoschenkii</i>	bup	08/2015	Durmitor, Veliki Međed	19,071645 E; 43,130612 N	H14
<i>H. villosum</i>	vil	08/2015	Durmitor, Veliki Međed	19,071645 E; 43,130612 N	H15
<i>H. pilosum</i>	pil	08/2014	Durmitor, Sedlena Greda ^a	19,05869 E; 43,092816 N	H04
<i>H. glabratum</i>	gla	08/2014	Durmitor, Sedlena Greda	19,05869 E; 43,092816 N	H06
<i>H. scorzonerifolium</i>	sco	08/2014	Durmitor, Sedlena Greda	19,05869 E; 43,092816 N	H07
<i>H. dentatum</i>	den	08/2015	Durmitor, Sedlena Greda	19,05869 E; 43,092816 N	H11
<i>H. neilreichii</i>	nei	08/2015	Durmitor, Sedlena Greda	19,05869 E; 43,092816 N	H08
<i>H. valdepilosum</i>	val	08/2015	Durmitor, Sedlena Greda	19,05869 E; 43,092816 N	H19
<i>H. naegelianum</i>	nae	08/2015	Durmitor, Sedlena Greda	19,056135 E; 43,095333 N	H01
<i>H. tommasinianum</i>	tom	08/2015	Durmitor, Đurđevića Tara	19,294704 E; 43,152138 N	H16
<i>H. macrodontoides</i>	mac	08/2015	Durmitor, Đurđevića Tara	19,294704 E; 43,152138 N	H17

^aLokalitet u Crnoj Gori. ^bLokalitet u Srbiji.

3. Izrada ekstrakata

3.1. Izrada i frakcionisanje MeOH ekstrakta cvasti *Hieracium calophyllum*

Osušena i usitnjena cvast *H. calophyllum* (13 g) ekstrahovana je najpre dihlometanom (CH_2Cl_2), postupkom maceracije tokom 48 h, uz kontinuirano mešanje. Nakon filtriranja, biljni materijal je osušen na sobnoj temperaturi i re-ekstrahovan metanolom (MeOH), postupkom bimaceracije (2×48 h). Odnos suvi biljni materijal/rastvarač iznosio je 1:15 (*m/V*) u obe sukcesivne ekstrakcije. CH_2Cl_2 i spojeni MeOH ekstrakti uparavani su pod sniženim pritiskom pomoću vakuum uparivača. Rastvarači su u potpunosti uklonjeni, a osušeni ekstrakti su dalje čuvani pod vakuumom u eksikatoru iznad silikagela, na hladnom i tamnom mestu do hemijskih i farmakoloških ispitivanja.

Dobijeni suvi MeOH ekstrakt (3 g, prinos 23,08% *m/m*) suspendovan je u vodi (300 mL) i sukcesivno ekstrahovan rastvaračima različite polarnosti u levku za odvajanje. Najpre je ekstrahovan dihlometanom (CH_2Cl_2) (300 mL), zatim etilacetatom (EtOAc) (1:2 *V/V*) i na kraju *n*-butanolom (*n*-BuOH) (1:2 *V/V*). Kao rezultat dobijene su četiri frakcije: CH_2Cl_2 , EtOAc, *n*-BuOH i vodena. Rastvarači CH_2Cl_2 , EtOAc i *n*-BuOH uklonjeni su uparavanjem pod sniženim pritiskom.

Suva *n*-BuOH frakcija (1,7 g) rastvorena je u MeOH (10 mg/mL), filtrirana kroz membranski filter (0,45 μm) i razdvajana semipreparativnom tečnom hromatografijom sa masenom detekcijom (LC-MS, engl. *liquid chromatography-mass spectrometry*) u cilju dobijanja frakcija bogatih flavonoidima.

Vodena frakcija je liofilizovana. Dobijeni liofilizat (0,5 g), rastvoren je u vodi (8 mg/mL), filtriran kroz membranski filter (0,45 μm) i razdvajan semipreparativnom tečnom hromatografijom sa masenom detekcijom (LC-MS) u cilju izolovanja seskviterpenskih laktona.

3.2. Izrada MeOH ekstrakata podzemnih organa *Hieracium scheppigianum* i *H. naegelianum*

Osušeni i usitnjeni podzemni organi (koren sa rizomom) *H. scheppigianum* i *H. naegelianum* ekstrahovani su najpre dihlometanom (CH_2Cl_2), postupkom maceracije, a zatim re-ekstrahovani metanolom (MeOH), postupkom bimaceracije, na isti način kako je ekstrahovana cvast *H. calophyllum* (detaljan postupak opisan je u odeljku 3.1.). Prinos suvog MeOH ekstrakta *H. scheppigianum* iznosio je 21,03% *m/m* (iz 7,61 g droge dobijeno je 1,6 g suvog ekstrakta), a prinos suvog MeOH ekstrakta *H. naegelianum* 6,89% *m/m* (iz 12,43 g droge dobijeno je 2,1 g suvog ekstrakta). Iz suvog MeOH ekstrakta *H. scheppigianum* semipreparativnom tečnom hromatografijom sa masenom detekcijom (LC-MS) izolovane su fenolkarboksilne kiseline, a u oba ekstrakta izvršena je kvalitativna i kvantitativna LC-MS analiza seskviterpenskih laktona, fenolkarboksilnih kiselina i flavonoida.

Za potrebe hemijskih ispitivanja ekstrakti su rastvoreni u MeOH i filtrirani. Za analizu seskviterpenskih laktona korišćen je rastvor finalne koncentracije 8,5 mg/mL, a za analizu flavonoida i fenolkarboksilnih kiselina rastvor finalne koncentracije 15 mg/mL.

3.3. Izrada ekstrakata herbi 28 ispitivanih vrsta

Osušeni i usitnjeni nadzemni delovi u cvetu (herbe) 28 ispitivanih vrsta roda *Hieracium* ekstrahovani su najpre dihlometanom (CH_2Cl_2), postupkom maceracije, a zatim re-ekstrahovani metanolom (MeOH), postupkom bimaceracije, na isti način kako je ekstrahovana cvast *H. calophyllum* (detaljan postupak opisan je u odeljku 3.1.).

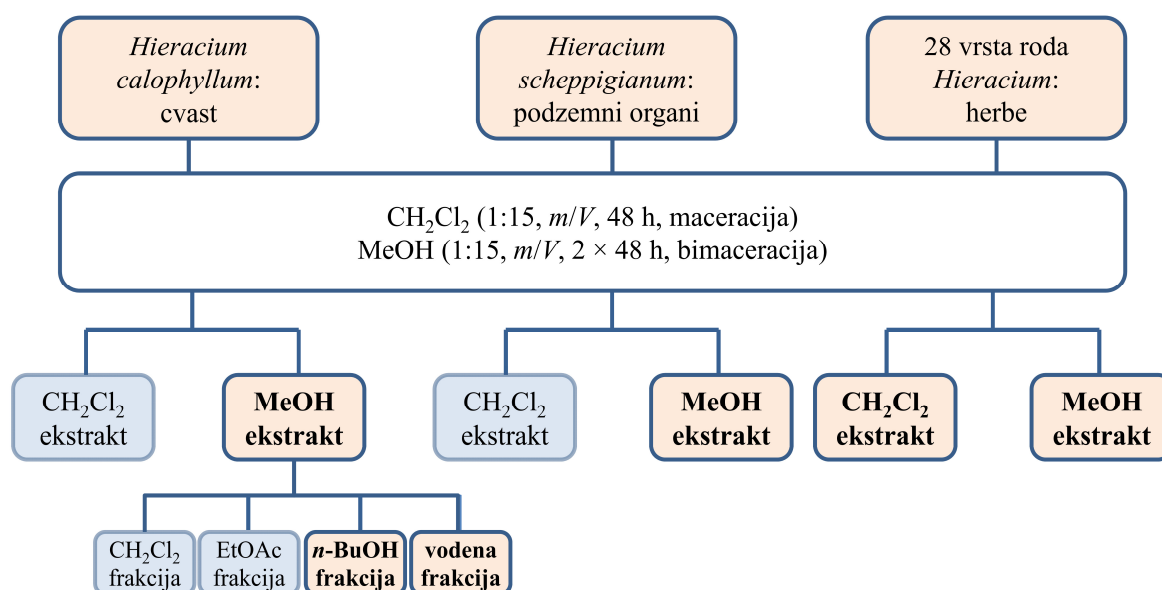
Masa osušenog biljnog materijala (herbi), kao i masa i prinos dobijenih suvih CH_2Cl_2 i MeOH ekstrakata prikazani su u **Tabeli 7**.

Dobijeni suvi MeOH ekstrakti korišćeni su za uporednu kvalitativnu i kvantitativnu LC-MS analizu seskviterpenskih laktona, kao i flavonoida i fenolkarboksilnih kiselina, a suvi CH_2Cl_2 ekstrakti za uporednu kvalitativnu i kvantitativnu GC-FID i GC-MS analizu triterpena. Neposredno pre navedenih hemijskih analiza suvi MeOH ekstrakti su rastvarani u MeOH (u koncentracijama 8,5 i 15 mg/mL), a suvi CH_2Cl_2 ekstrakti u CH_2Cl_2 (u koncentraciji 10 mg/mL) i filtrirani kroz membranski filter (0,45 μm).

Tabela 7. Masa osušenog biljnog materijala (herbi), masa i prinos dobijenih suvih dihlormetanskih (CH_2Cl_2) i metanolnih (MeOH) ekstrakata

Vrsta	masa biljnog materijala (g)	Suvi CH_2Cl_2 ekstrakt		Suvi MeOH ekstrakt	
		masa (g)	prinos (% m/m)	masa (g)	prinos (% m/m)
<i>H. gymnocephalum</i>	6,16	0,13	2,04	1,05	17,04
<i>H. orieni</i>	21,88	0,20	0,91	2,67	12,20
<i>H. blecicii</i>	20,02	0,16	0,79	2,87	14,34
<i>H. paratrichum</i>	20,13	0,31	1,52	4,16	20,67
<i>H. spirocaule</i>	16,71	0,28	1,66	2,31	13,82
<i>H. anastrum</i>	6,74	0,07	1,05	1,42	21,07
<i>H. calophyllum</i>	21,73	0,40	1,83	3,31	15,23
<i>H. scheppigianum</i>	20,95	0,45	2,16	3,77	18,00
<i>H. durmitoricum</i>	22,24	1,58	7,09	3,94	17,72
<i>H. guentheri-beckii</i>	22,34	0,47	2,12	3,94	17,64
<i>H. mirificissimum</i>	4,95	0,08	1,58	0,65	13,13
<i>H. coloriscapum</i>	13,92	0,27	1,97	3,05	21,91
<i>H. pyricephalum</i>	20,29	0,41	2,03	3,43	16,90
<i>H. mokragorae</i>	15,01	0,86	5,74	2,87	19,12
<i>H. pannosum</i>	9,59	0,21	2,14	1,71	17,83
<i>H. plumulosum</i>	18,53	0,38	2,07	3,19	17,22
<i>H. albopellitum</i>	7,90	0,20	2,58	1,70	21,52
<i>H. pseudoschenkii</i>	7,27	0,19	2,67	1,62	22,28
<i>H. villosum</i>	12,45	0,65	5,18	2,15	17,27
<i>H. pilosum</i>	4,22	0,06	1,39	0,49	11,61
<i>H. glabratum</i>	4,59	0,06	1,31	0,50	10,89
<i>H. scorzonerifolium</i>	8,87	0,17	1,93	1,71	19,28
<i>H. dentatum</i>	8,02	0,16	2,00	1,34	16,71
<i>H. neilreichii</i>	11,05	0,30	2,76	2,54	22,99
<i>H. valdepilosum</i>	9,50	0,24	2,50	1,98	20,84
<i>H. naegelianum</i>	4,19	0,07	1,63	0,57	13,60
<i>H. tommasinianum</i>	1,83	0,05	2,75	0,42	22,95
<i>H. macrodontoides</i>	11,28	0,40	3,58	2,02	17,91

Na **Slici 25** prikazana je shema prethodno opisanih postupaka ekstrakcije cvasti *H. calophyllum*, podzemnih organa *H. scheppigianum* i *H. naegelianum* i herbi 28 vrsta roda *Hieracium*, kao i frakcionisanja suvog MeOH ekstrakta cvasti *H. calophyllum*. Masnim slovima (**bold**) istaknuti su ekstrakti koji su hemijski i farmakološki ispitivani u okviru ove doktorske disertacije.

**Slika 25.** Shema ekstrakcije biljnog materijala.

4. Hemijska ispitivanja

4.1. Ispitivanje seskviterpenskih laktona

4.1.1. Izolovanje seskviterpenskih laktona iz vodene frakcije MeOH ekstrakta cvasti *Hieracium calophyllum* i metode njihove strukturne karakterizacije

U cilju izolovanja seskviterpenskih laktona, liofilizovana vodena frakcija MeOH ekstrakta cvasti *H. calophyllum* rastvorena je u vodi (8 mg/mL) i frakcionisana semipreparativnom tečnom hromatografijom uz masenu detekciju na tečnom hromatografu Agilent LC/MSD 1260/6130. Uslovi hromatografskog razdvajanja optimizovani su za kolonu Zorbax SB-C₁₈ (250 × 9,4 mm; 5 μm).

Mobilna faza se sastojala od 0,1% mravlje kiseline (HCOOH) (A) i MeOH (B). Režim primenjenog gradijentnog eluiranja prikazan je u **Tabeli 8**. Brzina protoka mobilne faze bila je 2 mL/min, radna temperatura kolone 25 °C, a zapremina injektovanog uzorka (V_{inj}) 100 μL; spliter je podešen na 1000:1. Uslovi rada masenog detektora (ESI/SQ MSD): pozitivan mod jonizacije (ESI⁺), napon fragmentora 200 V, brzina protoka gasa za raspršivanje 9 L/min, temperatura gasa za raspršivanje 350 °C, pritisak nebulizera 40 psi i kapilarni napon 3000 V. Mod masenog analizatora je podešen na snimanje masenih spektara celog opsega (engl. *full-scan*) m/z (engl. *mass-to-charge*) 80-700 Da.

Frakcije su prikupljane u određenim vremenskim intervalima (engl. *time-based fraction collection*), definisanim na osnovu retencionih vremena (R_t) komponenti detektovanih masenim detektorom. Prikupljeno je jedanaest frakcija HF1-11, i to:

- frakcije HF1-3 prikupljene su u vremenskim intervalima od po 0,5 min,
- frakcije HF4-6 i 9 od po 1 min, i
- frakcije HF7, 8, 10 i 11 od po 3 min.

Čista jedinjenja izolovana su iz sledećih frakcija:

- HF4 – jedinjenje **1** (kalofilamin B; $R_t=14,32$ min),
- HF6 – jedinjenje **2** (kalofilamin A; $R_t=15,55$ min),
- HF7 – jedinjenje **3** (8-epi-ikserisamin A; $R_t=16,72$ min),
- HF9 – jedinjenje **4** (krepizid E; $R_t=31,25$ min).

Tabela 8. Režim eluiranja [mobilna faza: A – HCOOH (0,1% *V/V*); B – MeOH], optimizovan za semipreparativno LC-MS razdvajanje seskviterpenskih laktona vodene frakcije MeOH ekstrakta cvasti *H. calophyllum*

Vreme (min)	% A	% B
0	90	10
5	80	20
10	70	30
13	70	30
20	80	20
24	50	50
30	90	90

U cilju snimanja NMR spektara, jedinjenja **2** i **3** su rastvorena u D₂O i tom prilikom je primećeno da se ona spontano i postepeno razlažu stajanjem na temperaturi 29,85 °C tokom nedelju dana. Naime, snimljeni NMR spektri su sadržali signale kako ispitivanih jedinjenja, tako i njihovih degradacionih proizvoda, što je potvrđeno i LC-MS analizom, te se pristupilo njihovom semipreparativnom LC-MS razdvajanju. U tu svrhu je korišćena kraća preparativna Zorbax SB-C₁₈ kolona (50 × 9,4 mm; 5 μm). Mobilna faza je bila ista kao i u slučaju izolovanja frakcija HF1-11, dok je režim gradijentnog eluiranja prilagođen polarnosti jedinjenja i prikazan u **Tabeli 9**. Ostali

hromatografski uslovi razdvajanja (osim $V_{inj}=60 \mu\text{L}$) i uslovi rada masenog detektora podešeni su kao u slučaju razdvajanja vodene frakcije.

Frakcije su sakupljane u vremenskim intervalima od po 1 min. Na ovaj način izolovano je jedinjenje **2a** (dezacilinaropikrin; $R_t=5,65$ min; 0,5 mg), kao degradacioni proizvod jedinjenja **2**, a takođe je ponovo izolovano jedinjenje **4** ($R_t=7,02$ min; 1 mg), ovoga puta kao degradacioni proizvod jedinjenja **3**.

Tabela 9. Režim eluiranja [mobilna faza: A – HCOOH (0,1% *V/V*); B – MeOH], optimizovan za semipreparativno LC-MS razdvajanje smeše jedinjenja **2** i **2a**, i smeše jedinjenja **3** i **4**

Smeša 2 i 2a			Smeša 3 i 4		
Vreme (min)	% A	% B	Vreme (min)	% A	% B
0	80	20	0	80	20
5	70	30	5	70	30
6	50	50	10	80	20
12	10	90	11	50	50
15	80	20	13	10	90
/	/	/	14	80	20

Metode strukturne karakterizacije izolovanih seskviterpenskih laktona (**1-4**)

$1D$ (^1H , ^{13}C) i $2D$ (HSQC, HMBC, COSY, NOESY/ROESY) NMR spektri izolovanih jedinjenja (**1-4**) snimljeni su na NMR spektrometrima: Bruker Ascend 400 u slučaju jedinjenja **1**, **3** i **4**, i Bruker Avance III u slučaju jedinjenja **2** i **2a**, primenom standardnog pulsno program. Jedinjenja **1**, **2**, **2a** i **3** rastvorena su u D_2O , a jedinjenje **4** u MeOH-d_4 i u DMSO-d_6 . Referentni signali, pored TMS-a prisutnog u ovim rastvaračima, bili su i rezidualni signali samih rastvarača D_2O (δ_{H} 4,81), MeOH-d_4 (δ_{H} 3,31; δ_{C} 49,15) i DMSO-d_6 (δ_{H} 2,50; δ_{C} 39,51).

Hemijska pomeranja (δ) data su u ppm, a konstante sprezanja (J) izražene su u Hz. Dvodimenzionalni NMR spektri (COSY, NOESY, ROESY, HSQC, HMBC) su dobijeni primenom odgovarajućih pulsnih programa i obrađeni kompjuterskim programom Bruker Topspin™ (v3.2). Zbog male količine uzoraka, NMR spektri jedinjenja **2** i **2a** snimani su u *Shigemi* mikrokivetama spoljašnjeg prečnika od 5 mm, dok su za snimanje NMR spektara jedinjenja **1**, **3** i **4** korišćene standardne kivete *Wilmad* prečnika 5 mm (Sigma-Aldrich, SAD).

U cilju određivanja precizne mase (HR-MS analize) izolovanih jedinjenja (**1-4**) i istovremeno njihove LC-Q-TOF-MS/MS analize, hromatografsko razdvajanje vršeno je na YMC AQ C₁₈ koloni (2 × 100 mm, 3 μm), termostatoranoj na 30 °C. Mobilna faza sastojala se od 0,1% HCOOH (A) i acetonitrila (MeCN; B) i primenjen je linearni gradijent (10 do 95% B tokom 30 min, pri brzini protoka od 0,2 mL/min). Uzorci su injektovani u zapremini od 2 μL . Kao eksterni standard za kalibraciju sistema pri određivanju precizne mase, upotrebljen je leucin-enkefalin (C₂₈H₃₇N₅O₇), poznate precizne mase (engl. *lock-mass*) sa signalom protonovanog molekula u ESI⁺ modu na m/z 556,2771, pri rezoluciji od 10000 Da. U MS/MS analizi, fragmentacija je postignuta disocijacijom izazvanom sudarima (engl. *collision induced dissociation*, CID), a kao inertni kolizionni gas korišćen je argon pri kolizionnoj energiji od 15 eV (niskoenergetski sudari < 100 eV). MS¹ spektri su snimani u opsegu masa 120-1000 Da (detaljni pregled parametara HR-MS analize prikazan je u **Tabeli 10**).

Za refraktometrijsko merenje, jedinjenja su rastvarana u odgovarajućim rastvaračima (**1**, **3** i **2a** u vodi, a **4** u MeOH). Vrednosti specifične optičke rotacije $[\alpha]_{\text{D}}$ su izražene u mL/gdm.

4.1.2. Kvalitativna i kvantitativna analiza seskviterpenskih laktona u MeOH ekstraktima podzemnih organa (*Hieracium scheppigianum* i *H. naegelianum*) i herbi (svih 28 vrsta)

Izolovana jedinjenja (**1-4**) korišćena su za kvalitativnu i kvantitativnu analizu seskviterpenskih laktona u suvim MeOH ekstraktima podzemnih organa *H. scheppigianum* i *H. naegelianum*, kao i

u suvim MeOH ekstraktima herbi svih 28 ispitivanih vrsta. Analiza je vršena na tečnom hromatografu Agilent LC/MSD 1260/6130. U te svrhe suvi ekstrakti su rastvoreni u MeOH (8,5 mg/mL). Kako tri od četiri izolovana seskviterpenska laktona imaju u svojoj strukturi aminokiselinu prolin što doprinosi njihovoj polarnosti (lako su rastvorni u vodi), bilo je neophodno prilagoditi strukturu i polarnost stacionarne faze i pH vrednost mobilne faze (pI prolina je 6,3), kako bi jedinjenja bila u molekulskom obliku, a ne u obliku dipolarnog jona, koji bi polarna mobilna faza brzo eluirala. Ovo je postignuto primenom LC-MS kolone Zorbax SB-Aq (150 × 3,0 mm; 3,5 μm) sa polarnijom stacionarnom fazom (polarno modifikovana C₁₈) u odnosu na stacionarnu fazu korišćenu za semipreparativnu analizu, i dodatkom amonijum-acetata (NH₄COOH) u mobilnu fazu, čijom hidrolizom se postiže optimalna pH.

Tabela 10. Eksperimentalni uslovi HR-MS analize

Eksperimentalni instrumentalni parametri		TOF-MS funkcionalni parametri	
Polarnost	ES ⁺	Vreme snimanja (s)	1
Analizer	V-Mod	Vreme između snimanja (s)	0,02
Kapilarni napon (kV)	3,5	Najniža masa (početna) (Da)	1,3
Manji napon na konusu (V)	4	Najviša masa (Da)	900
Ekstrakcioni napon na konusu (V)	25	Početno vreme (min)	15
Temperatura izvora (°C)	105	Završno vreme (min)	35
Temperatura uparavanja (°C)	320	Referentni napon konusa (V)	35
Protok gasa na konusu (L/h)	20	Koliziona energija (eV)	6
Protok gasa za uparavanje (L/h)	300	<i>EDC-Mass</i> (Da)	556,2000
LM rezolucija	4,7	<i>Lock-Mass</i> (Da)	556,2771
HM rezolucija	15		
Koliziona energija trapa (eV)	6		
Koliziona energija transfera (eV)	4		
Protok gasa u trapu (mL/min)	1,5		
Protok gasa u jonskom izvoru (mL/min)	2,5		

Režim eluiranja optimizovan je kombinovanjem segmenata izokratskog i gradijentnog eluiranja uz porast polarnosti mobilne faze (**Tabela 11**). Brzina protoka mobilne faze bila je 0,3 mL/min, temperatura kolone 25 °C, a zapremina injektovanog uzorka (V_{inj}) 3 μL. DAD spektri su snimani na 210 i 254 nm. Uslovi rada ESI/SQ MSD bili su isti kao i u slučaju metode korišćene za semipreparativnu LC-MS, osim što su u slučaju kvantitativne analize promenjeni napon fragmentora jonskog izvora i mod analizatora.

Tabela 11. Režim eluiranja [mobilna faza: A – 5 mM NH₄COOH; B – MeOH], optimizovan za kvalitativnu i kvantitativnu LC-MS analizu seskviterpenskih laktona (**1-4**) u MeOH ekstraktima podzemnih organa *Hieracium scheppigianum* i *H. naegelianum* i herbi svih 28 ispitivanih vrsta

Vreme (min)	%A	% B
0	95	5
8	90	10
13	70	30
15	70	30
17	80	20
19	80	20
23	70	30
27	60	40
29	5	95

Kvalitativna analiza

U cilju identifikacije komponenti snimani su *TIC* hromatogrami (engl. *Total Ion Chromatogram*) u pozitivnom modu (*full-scan* režim rada) u opsegu *m/z* 80-700 Da i pri naponu fragmentora od 200 V. Pri ovom naponu proces jonizacije je jak tako da protonovani molekuli dalje formiraju fragmentacione jone sa dovoljnom unutrašnjom energijom koja dovodi do dalje fragmentacije. Identifikacija komponenti ekstrakata izvršena je poređenjem njihovih retencionih vremena (*Rt*) i masenih spektara sa odgovarajućim podacima dobijenim za izolovana jedinjenja.

Kvantitativna analiza

U cilju kvantifikacije identifikovanih komponenti, snimani su *SIM* hromatogrami (engl. *Selected Ion Monitoring*) u pozitivnom modu pri naponu fragmentora 100 V. Pri ovom naponu signal najvećeg intenziteta u masenom spektru najčešće odgovara *m/z* protonovanog molekula. *SIM* mod analizatora ESI/SQ MSD je bio podešen na praćenje protonovanih molekula $[M+H]^+$ na *m/z* 540,20 (za jedinjenja **1** i **3**) i 378,10 (**2**), odnosno adukta $[M+NH_4]^+$ na *m/z* 442,20 (**4**).

Kvantitativna analiza seskviterpenskih laktona izvršena je metodom eksternog standarda. Izolovana jedinjenja (**1-4**) su korišćena kao standardne supstance, i u te svrhe su rastvorena u MeOH (početna koncentracija 0,2 mg/mL). Za izradu kalibracionih krivih korišćeno je po deset različitih koncentracija. Rezultati su izraženi u mg/g suvog ekstrakta, kao srednje vrednosti rezultata dobijenih u tri nezavisne analize \pm standardne devijacije.

Linearnost, linearni opsezi koncentracija, limit detekcije (engl. *limit of detection*, LOD) i limit kvantifikacije (engl. *limit of quantification*, LOQ) određivani su prema smernicama Međunarodne konferencije za harmonizaciju Međunarodnog veća za usklađivanje tehničkih uslova za lekove za ljudsku upotrebu (ICH, 2005). Za evaluaciju linearnosti korišćen je koeficijent korelacije (r^2) kalibracionih krivih, dok su LOD i LOQ izračunati prema formulama:

$$\text{LOD} = 3,3 \times \sigma/a \quad (1)$$

$$\text{LOQ} = 10 \times \sigma/a \quad (2)$$

u kojima su: σ – standardna devijacija odsečka na ordinati kalibracione krive; a – nagib kalibracione krive.

Jednačine kalibracionih krivih, vrednosti koeficijenata korelacije (r^2), linearni opseg testiranih koncentracija, kao i LOD i LOQ vrednosti izolovanih jedinjenja **1-4** prikazani su u **Tabeli 12**.

Tabela 12. Jednačine kalibracionih krivih, koeficijenti korelacije (r^2), linearni opsezi testiranih koncentracija, limiti detekcije (LOD) i kvantifikacije (LOQ) jedinjenja (**1-4**)

Jedinjenje	Jednačina kalibracione krive	r^2	Opseg ($\mu\text{g/mL}$)	LOD ($\mu\text{g/mL}$)	LOQ ($\mu\text{g/mL}$)
1 Kalofilamin B	$y = 529229356,0171x + 58166,2636$	0,9958	0,002-9,00	0,002	0,006
2 Kalofilamin A	$y = 255151319,4621x + 626243,0366$	0,9919	0,002-240	0,006	0,018
3 8-Epi-ikserisamin A	$y = 132615963,9662x + 456732,2378$	0,9987	0,002-560	0,013	0,040
4 Krepizid E	$y = 31045659,4625x - 7415,5283$	0,9971	0,400-690	0,102	0,400

4.2. Ispitivanje fenolkarboksilnih kiselina i flavonoida

4.2.1. Izolovanje fenolkarboksilnih kiselina iz MeOH ekstrakta podzemnih organa *Hieracium scheppigianum* i metode njihove strukturne karakterizacije

Izolovanje fenolkarboksilnih kiselina iz suvog MeOH ekstrakta podzemnih organa *H. scheppigianum* vršeno je metodom semipreparativne tečne hromatografije uz DAD detekciju na tečnom hromatografu Agilent LC/MSD 1260/6130. U te svrhe korišćena je kolona Zorbax SB-C₁₈ (250 × 9,4 mm; 5 μm). Ekstrakt je rastvoren u MeOH (10 mg/mL). Optimizovan sastav mobilne faze bio je HCOOH (0,2% *V/V*),

2-propanol (10% *V/V*) i acetonitril (2,5% *V/V*) (A) i MeOH (B). Režim gradijentnog eluiranja prikazan je u **Tabeli 13**. Brzina protoka mobilne faze bila je 2 mL/min, radna temperatura kolone 25 °C, zapremina injektovanog uzorka (V_{inj}) 70 μ L, a talasna dužina detekcije 320 nm.

Tabela 13. Režim eluiranja [mobilna faza: A – HCOOH (0,2% *V/V*), 2-propanol (10% *V/V*) i acetonitril (2,5% *V/V*); B – MeOH], optimizovan za semipreparativno LC-MS razdvajanje fenolkarboksilnih kiselina MeOH ekstrakta podzemnih organa *H. scheppigianum* i flavonoida *n*-BuOH frakcije MeOH ekstrakta cvasti *H. calophyllum*, kao i za kvalitativnu i kvantitativnu analizu ovih jedinjenja u ekstraktima podzemnih organa i herbi

Vreme (min)	% A	% B
0	90	10
10	86	14
16	85	15
18	84	16
19	82	18
21	80	20
22	77	23
25	76	24
27	74	26
28	76	24
34	73,6	26,4
37	45	55
42	20	80
50	10	90
52	0	100

Fracionisanje je izvršeno na osnovu R_t vrednosti komponenata (engl. *time-based fraction collection*). Frakcije su prikupljane u vremenskim intervalima od po 1 min. Kao rezultat, čiste fenolkarboksilne kiseline izolovane su iz sledećih frakcija:

- HS1 – jedinjenje **5** (hlorogenska kiselina; $R_t=5,54$ min),
- HS2 – jedinjenje **6** (1,3-di-*O*-kafeoilhina kiselina; $R_t=6,63$ min),
- HS3 – jedinjenje **7** (3,4-di-*O*-kafeoilhina kiselina; $R_t=17,08$ min),
- HS4 – jedinjenje **8** (3,5-di-*O*-kafeoilhina kiselina; $R_t=19,49$ min),
- HS5 – jedinjenje **9** (1,5-di-*O*-kafeoilhina kiselina; $R_t=28,54$ min).

Metode strukturne karakterizacije izolovanih fenolkarboksilnih kiselina

1D (^1H , ^{13}C) i 2D (HSQC, HMBC, COSY, NOESY/ROESY) NMR spektri izolovanih fenolkarboksilnih kiselina (**6**, **7** i **8**) snimljeni su na NMR spektrometru Bruker Ascend 400 (frekvencije 400 MHz za ^1H i 101 MHz za ^{13}C). Jedinjenja su rastvarana u MeOH- d_4 . Hemijska pomeranja (δ) data su u ppm, a konstante sprezanja (J) su izražene u Hz. Za snimanje i obradu spektara korišćen je kompjuterski program Bruker Topspin™ (v3.2). Jedinjenja **5** (hlorogenska kiselina) i **8** (3,5-di-*O*-kafeoilhina kiselina) su identifikovana LC-MS metodom, poređenjem njihovih R_t vrednosti, UV i masenih spektara sa odgovarajućim podacima dobijenim za komercijalne standarde.

4.2.2. Kvalitativna i kvantitativna analiza fenolkarboksilnih kiselina u MeOH ekstraktima podzemnih organa (*Hieracium scheppigianum* i *H. naegelianum*) i fenolkarboksilnih kiselina i flavonoida u MeOH ekstraktima herbi (svih 28 vrsta)

Kvalitativna i kvantitativna LC-MS analiza fenolkarboksilnih kiselina u suvim MeOH ekstraktima podzemnih organa *H. scheppigianum* i *H. naegelianum*, kao i fenolkarboksilnih

kiselina i flavonoida u suvim MeOH ekstraktima herbi svih 28 ispitivanih vrsta izvršena je na tečnom hromatografu Agilent LC/MSD 1260/6130. Ekstrakti su rastvoreni u MeOH (15 mg/mL). Korišćena je kolona Zorbax SB-C₁₈ (250 × 4.6 mm; 5 μm, Agilent Technologies), radna temperatura kolone 25 °C, V_{inj} iznosila je 10 μL, dok je protok mobilne faze bio 0,8 mL/min.

Mobilna faza i režim eluiranja bili su isti kao u slučaju izolovanja fenolkarboksilnih kiselina iz MeOH ekstrakta podzemnih organa *H. scheppigianum*. Mobilna faza je sadržala HCOOH (0,2% V/V), 2-propanol (10% V/V) i acetonitril (2,5% V/V) (A) i MeOH (B). Režim gradijentnog eluiranja prikazan je u **Tabeli 13**. Treba istaći da je uključivanje 2-propanola u mobilnu fazu A obezbedilo dobru efikasnost razdvajanja diglikozida flavona, dok je promena gradijenta ka smanjenju polarnosti mobilne faze (27-34 min) omogućila bolje razdvajanje glikozida apigenina (25-35 min).

DAD spektri snimani su na 320 i 350 nm, dok su ESI-MS spektri snimani u negativnom modu jonskog izvora i u *full-scan* modu (u cilju dobijanja *TIC* hromatograma) u opsegu *m/z* 80-900 Da ili u *SIM* modu analizatora. Optimizovani parametri jonskog izvora bili su: napon fragmentora 100 ili 250 V, protok N₂ 10 L/min, temperatura nosećeg gasa 350 °C, pritisak raspršivača 40 psi i kapilarni napon 3500 V.

Kvalitativna analiza

Jedinjenja (**5-9, 13, 15-17, 19, 22, 23, 25, 26, 28-30**) su identifikovana poređenjem njihovih Rt vrednosti, kao i UV i MS spektara (dobijenih u *full-scan* režimu uz napon fragmentora 250 V) sa odgovarajućim podacima dobijenim za standardne supstance. Kratka specifikacija priložena je u **Tabeli P3** u Prilogu 1.

Od fenolkarboksilnih kiselina identifikovane su hlorogenska (**5**) i 3,5-di-*O*-kafeoilhina (**8**), a od flavonoida: luteolin 7-*O*-rutinozid (**15**), luteolin 7-*O*-glukozid (**16**), luteolin 7-*O*-glukuronid (**17**), kvercetin 3-*O*-glukozid (**19**), apigenin 7-*O*-rutinozid (**22**), apigenin 7-*O*-glukozid (**23**), apigenin 7-*O*-glukuronid (**25**), luteolin (**28**), diosmetin (**29**) i apigenin (**30**), upotrebom komercijalnih standarda.

Fenolkarboksilne kiseline 1,3-di-*O*-kafeoilhina (**6**), 3,4-di-*O*-kafeoilhina (**7**) i 1,5-di-*O*-kafeoilhina kiselina (**9**) identifikovane su primenom jedinjenja prethodno izolovanih iz MeOH ekstrakta podzemnih organa *H. scheppigianum* u okviru ove doktorske disertacije. Za identifikaciju flavonoida luteolin 7-*O*-glukoksilozida (**13**) i luteolin 4'-*O*-glukozida (**26**) korišćena su jedinjenja prethodno izolovana iz MeOH ekstrakta herbe *H. gymnocephalum* (Petrović i sar., 1999a), odnosno *Leontodon hispidus* L. (Zidorn i Stuppner, 2001).

Identifikacija detektovanih flavonoida **18, 20** i **27** opisana je u sledećem odeljku (odeljak 4.2.3.).

Struktura detektovanih fenolkarboksilnih kiselina **10** i **11** i flavonoida **12, 14, 21** i **24** opisana je do nivoa koliko je to bilo moguće korišćenjem dostupne literature.

Kvantitativna analiza

U cilju kvantifikacije DAD spektri su snimani na 320 (fenolkarboksilne kiseline) i 350 nm (flavonoidi). ESI maseni spektri snimani su u *SIM* modu analizatora na *m/z* 447,10 i *m/z* 461,10 uz napon fragmentora od 100 V. Površine pikova DAD ili MSD (*SIM*) hromatograma korišćene su za kvantitativnu analizu primenom metode eksternog standarda. Kalibracione krive su dobijene iz po sedam različitih koncentracija 14 standarda (komercijalni standardi i izolovana jedinjenja).

Za izradu kalibracionih krivih standardne supstance su rastvorene u MeOH u početnoj koncentraciji: 0,2 mg/mL (luteolin 7-*O*-glukozid, luteolin 7-*O*-glukuronid, luteolin 4'-*O*-glukozid, apigenin 7-*O*-rutinozid, kvercetin 3-*O*-glukozid, luteolin, apigenin i diosmetin), 0,5 mg/mL (apigenin 7-*O*-glukozid), 0,6 mg/mL (luteolin 7-*O*-rutinozid), 0,8 mg/mL (luteolin 7-*O*-glukoksilozid) i 1 mg/mL (apigenin 7-*O*-glukuronid, hlorogenska i 3,5-di-*O*-kafeoilhina kiselina).

Jednačine kalibracionih krivih, vrednosti koeficijenata korelacije (r^2), linearni opsezi testiranih koncentracija, LOD i LOQ vrednosti standardnih supstanci prikazani su u **Tabeli 14**. Sadržaj ostalih jedinjenja izražen je preko nekog od gore navedenih standarda (zavisno od sličnosti

struktura). Rezultati su izraženi u mg/g suvog ekstrakta, kao srednje vrednosti rezultata dobijenih u tri nezavisne analize \pm standardne devijacije.

Tabela 14. Jednačine kalibracionih krivih, koeficijenti korelacije (r^2), linearni opseg testiranih koncentracija, limit detekcije (LOD) i kvantifikacije (LOQ) 14 jedinjenja korišćenih za kvantifikaciju

Jedinjenje	Jednačina kalibracione krive	r^2	Linearni opseg ($\mu\text{g/mL}$)	LOD ($\mu\text{g/mL}$)	LOQ ($\mu\text{g/mL}$)
5 Hlorogenska kiselina	$y = 14554,6547x + 137,2164$	0,999	10-1000	0,079	0,241
8 3,5-Di- <i>O</i> -kafeoilhina kiselina	$y = 16131,9210x - 197,3090$	0,998	10-1000	0,069	0,209
13 Luteolin 7- <i>O</i> -glukoksilozid	$y = 1448,529x - 17,0901$	0,996	80-800	0,971	2,941
15 Luteolin 7- <i>O</i> -rutinozid	$y = 12732,3591x + 26,2628$	0,999	60-600	0,098	0,250
16 Luteolin 7- <i>O</i> -glukozid	$y = 23855888,4586x + 5548,0295$	0,999	0,3-200	0,00002	0,0002
17 Luteolin 7- <i>O</i> -glukuronid	$y = 16416996,5096x + 6967,5361$	0,999	0,3-200	0,00006	0,0002
19 Kvercetin 3- <i>O</i> -glukozid	$y = 9346,3130x - 25,8097$	0,999	10-200	0,195	0,590
22 Apigenin 7- <i>O</i> -rutinozid	$y = 11699,5975x + 13,5691$	0,999	6-200	0,099	0,3017
23 Apigenin 7- <i>O</i> -glukozid	$y = 29626,4120x + 81,6110$	0,999	5-500	0,045	0,136
25 Apigenin 7- <i>O</i> -glukuronid	$y = 31714,8688x + 118,5121$	0,999	30-1000	0,038	0,115
26 Luteolin 4'- <i>O</i> -glukozid	$y = 134744841,7819x + 4832,4173$	0,999	0,3-200	0,00001	0,00003
28 Luteolin	$y = 49527,9916x + 29,4619$	0,999	10-200	0,034	0,104
29 Diosmetin	$y = 18841,5368x - 75,6093$	0,999	10-200	0,083	0,252
30 Apigenin	$y = 14715,7920x - 13,6918$	0,999	10-200	0,085	0,258

4.2.3. Kvalitativna analiza flavonoida u *n*-BuOH frakciji MeOH ekstrakta cvasti *Hieracium calophyllum*

Za potrebe identifikacije flavonoida **18**, **20** i **27** vršeno je semipreparativno hromatografsko razdvajanje suve *n*-BuOH frakcije MeOH ekstrakta cvasti *H. calophyllum* na tečnom hromatografu Agilent LC/MSD 1260/6130 uz DAD detekciju (350 nm). Frakcija je rastvorena u MeOH (15 mg/mL). Kolona (Zorbax SB-C₁₈; 250 × 9,4 mm; 5 μm), mobilna faza i metoda (režim gradijentnog eluiranja prikazan u **Tabeli 13**) bili su isti kao u slučaju semipreparativnog izolovanja fenolkarboksilnih kiselina iz MeOH ekstrakta podzemnih organa *H. scheppegianum*. Frakcije su prikupljane u definisanim vremenskim intervalima. Prikupljeno je 18 frakcija BF1 do BF18:

- frakcije BF1-F3, BF12, BF14, BF17 i BF18 prikupljane su u vremenskim intervalima od po 1 min, u zapreminama od po 2 mL;
- frakcije BF4-11, BF13, BF15 i BF16 u vremenskim intervalima od po 4 min i u zapreminama od po 8 mL.

LC-MS analizom prikupljenih frakcija, utvrđeno je da BF11 sadrži flavonoide **18** i **20**, a BF14 flavonoid **27**.

U cilju identifikacije aglikona detektovanih jedinjenja, frakcija BF11 (1 mg) je rastvorena u maloj zapremini MeOH i podvrgnuta kiseloj hidrolizi (HCl, 6% *V/V*, 2,5 mL) zagrevanjem 45 min uz povratni hladnjak. Nakon hlađenja smeša je ekstrahovana dietiletom (Marby i sar., 1970). Suvi etarski ostatak sadržao je aglikon jedinjenja **18** i **20**, koji je identifikovan kao diosmetin LC-MS metodom uz primenu komercijalno dostupnog standarda.

U slučaju frakcije BF14 izvršena je enzimaska hidroliza β -glukuronidazom čime je potvrđena šećerna komponenta (glukuronska kiselina vezana za aglikon β -*O*-glikozidnom vezom) jedinjenja **27** (Pugliese i sar., 2013). Naime, reakciona smeša koja je sadržala 0,5 mL rastvora BF14 frakcije u MeOH (50%, *V/V*) (1 mg/mL), 0,25 mL rastvora CH₃COONa (0,1 M, pH 5,2) i β -glukuronidaze (88,500 U/mL) inkubirana je 8 h na 37 °C, nakon čega je ekstrahovana EtOAc i uparena do suva. U

suvom ostatku aglikon je identifikovan kao luteolin LC-MS metodom poređenjem sa standardnom supstancom (**28**).

4.3. Ispitivanje triterpena

4.3.1. Identifikacija triterpena u CH₂Cl₂ ekstraktu herbe *Hieracium gymnocephalum*

Suvi CH₂Cl₂ ekstrakt herbe *H. gymnocephalum* frakcionisan je tehnikom preparativne hromatografije u koloni na stubu silikagela (Kieselgel Merck Typ 0,063-0,2 mm, 60A), dimenzija 47 × 3 cm. Kondicioniranje stacionarne faze je izvršeno sa 2 zapremine *n*-heksan:EtOAc (95:5 *V/V*, 332 mL). Ekstrakt (3,14 g) je suspendovan u 10 mL CH₂Cl₂ i nanesen na stub silikagela. Eluiranje je vršeno uz promenu sastava mobilne faze sa postupnim povećanjem polarnosti kako je navedeno u **Tabeli 15**. Brzina protoka mobilne faze bila je 3 mL/min.

Prikupljeno je 350 frakcija, zapremine od po 10 mL. Razdvajanje na stubu silikagela je praćeno hromatografijom na tankom sloju silikagela (TLC 60 F254, 5 × 3 cm, Merck, Nemačka), uz korišćenje mobilne faze čiji je sastav bio identičan sastavu mobilne faze kojom je frakcija eluirana sa kolone. Reagens vanilin-sumporna kiselina korišćen je za posthromatografsku derivatizaciju. Spajanje frakcija je vršeno prema sličnosti. Dodatno, 20 frakcija je testirano na gasnom hromatografu Agilent 6890N opremljenom FID detektorom i spregnutim sa masenim detektorom Agilent 5975C.

Jedinjenja **31** i **32** nalazila su se u frakcijama 50-140, a jedinjenja **33-35** u frakcijama 20-30. Jedinjenja su identifikovana u smeši, bez daljeg razdvajanja. Naime, snimljeni su ¹H i HSQC NMR spektri ovih frakcija na NMR spektrometru Bruker Ascend 400, kao i maseni spektri jedinjenja razdvojenih gasnom hromatografijom. U cilju dodatne potvrde identiteta jedinjenja **31** (β -amirin) i **32** (α -amirin) korišćeni su komercijalni standardi, a u slučaju jedinjenja **33-35** polusintetski dobijena jedinjenja. Naime, jedinjenja **33-35** predstavljala su acetate jedinjenja **31**, **32** i lupeola i dobijena su prema sledećem postupku: 0,0015 mmol lupeola, 0,001 mmol β -amirina i 0,002 mmol α -amirina acetilovani su 0,01 mmol/L acetanhidridom u prisustvu 0,01 mmol/L piridina, na sobnoj temperaturi tokom noći. Višak reagenasa je uparen, a jedinjenja **33-35** rekristalisala su u MeOH. Udeo jedinjenja **33-35** u rezultujućim smešama određen je gasnom hromatografijom sa FID i MS detekcijom uz upotrebu α -amirina, β -amirina i lupeola kao eksternih standarda.

Tabela 15. Hromatografski uslovi frakcionisanja CH₂Cl₂ ekstrakta herbe *H. gymnocephalum* hromatografijom u koloni

Mobilna faza (% <i>V/V</i>)		
<i>n</i> -Heksan	EtOAc	MeOH
95	5	/
90	10	/
80	20	/
70	30	/
10	10	/
30	70	/
10	90	/
/	90	10
/	70	30
/	30	70
/	10	10

Za frakcije, standarde i polusintetski dobijena jedinjenja snimljeni su 1D (¹H i ¹³C) i 2D NMR spektri (2D COSY, NOESY, HSQC i HMBC) na NMR spektrometru Bruker Ascend 400 (frekvencije 400 MHz za ¹H i 101 MHz za ¹³C). Jedinjenja su rastvarana u CHCl₃-*d*. Hemijska pomeranja (δ) su izražena u ppm, a konstante sprežanja (*J*) u Hz.

4.3.2. Kvalitativna i kvantitativna analiza triterpena u CH₂Cl₂ ekstraktima herbi 28 vrsta

Kvalitativna i kvantitativna analiza triterpena u suvim CH₂Cl₂ ekstraktima 28 vrsta roda *Hieracium* izvršena je gasnom hromatografijom sa FID i MS detekcijom na gasnom hromatografu Agilent 6890N, spregnutom sa masenim detektorom Agilent 5975C. Hromatografsko razdvajanje je vršeno na kapilarnoj koloni HP-5MS (30 m × 0,25 mm; debljina filma 0,25 μm). Eksperimentalni uslovi: temperatura injektora 280 °C; temperaturni program 60 do 280 °C brzinom od 10 °C/min, zatim do 300 °C brzinom od 3 °C/min; noseći gas He (1,0 mL/min); zapremina injektovanog uzorka 1,0 μL; radna temperatura FID detektora 300 °C; temperatura *split/splitless* injektora 200 °C; temperatura transfer linije 250 °C; split mod 1:10; tehnika jonizacije: EI, 70 eV.

Kvalitativna analiza

Identifikacija triterpena izvršena je poređenjem njihovih Rt vrednosti i masenih spektara sa odgovarajućim podacima za komercijalne standarde (**31** i **32**) i polusintetski dobijene supstance (**33-35**).

Kvantitativna analiza

Kvantitativna analiza izvršena je metodom eksternog standarda pomoću jedinjenja **31-35**. Površine pikova FID hromatograma korišćene su za izradu kalibracionih krivih (**Tabela 16**). Rezultati su izraženi u mg/g suvog ekstrakta, kao srednje vrednosti rezultata dobijenih u tri nezavisne analize ± standardne devijacije. Linearnost, LOD i LOQ određivani su kao u slučaju LC-MS analiza.

Tabela 16. Jednačine kalibracionih krivih FID, r^2 , linearni opseg, LOD i LOQ jedinjenja **31-35**

Jedinjenje	Jednačina kalibracione krive	r^2	Opseg (μg/mL)	LOD (μg/mL)	LOQ (μg/mL)
31 β-Amirin	$y = 1799365,8924x - 17296,8806$	0,9970	3-1000	0,023	0,070
32 α-Amirin	$y = 555204,9506x - 28739,7016$	0,9885	20-2000	0,138	0,419
33 β-Amirin-acetat	$y = 168520,9094x + 6140,0205$	0,9927	50-1300	0,082	0,248
34 Lupeol-acetat	$y = 608582,0921x - 6004,2886$	0,9982	70-900	0,028	0,085
35 α-Amirin-acetat	$y = 821929,0888x + 5356,3831$	0,9996	10-700	0,015	0,048

4.4. Statistička analiza rezultata ispitivanja sekundarnih metabolita herbi u cilju procene njihovog hemosistematskog značaja za 28 vrsta

U okviru ove doktorske disertacije evaluiran je hemosistematski značaj seskviterpenskih laktona, fenolkarboksilnih kiselina i flavonoida suvih MeOH ekstrakata, kao i triterpena suvih CH₂Cl₂ ekstrakata herbi 28 vrsta roda *Hieracium*. Za poređenje hemijskih profila ispitivanih taksona primenjene su multivarijantne statističke metode, analiza glavnih komponenti (PCA), nemetričko multidimenzionalno skaliranje (nMDS) i klaster analiza (UPGMA). Za sve ove analize korišćen je kompjuterski program Statistica 6.0 (StatSoft, Inc., SAD), a za nMDS analizu dodatno i Syn-Tax 2000 (J. Podani, Mađarska).

Podaci dobijeni kvantitativnom analizom seskviterpenskih laktona, polifenola (flavonoida i fenolkarboksilnih kiselina) i triterpena (apsolutni sadržaj pojedinačnih jedinjenja izražen u mg/g suvog ekstrakta), značajno su se razlikovali između vrsta. Iz tog razloga je apsolutni sadržaj preveden u procentualni sadržaj jedinjenja (izražen na četiri i/ili pet decimala) u odnosu na ukupan sadržaj svih jedinjenja detektovanih u okviru pojedinačnih klasa (seskviterpenskih laktona, polifenola ili triterpena) i zatim su ovi podaci transformisani postupkom kodiranja. Dobijene matrice odnosno skupovi objekata (taksoni roda *Hieracium*) i varijabli (kodirane vrednosti procentualnog sadržaja jedinjenja) korišćene su u daljoj analizi.

PCA (engl. *Principal Components Analysis*) analiza, deskriptivna multivarijantna statistička metoda, primenjena je u cilju pronalaženja varijabli (jedinjenja) koje najviše doprinose razlikama

između objekata (taksona). Izbor metode zasniva se na njenoj sposobnosti da pojednostavi matricu smanjivanjem njene dimenzionalnosti u trodimenzionalni prostor, opisan prvom, drugom i trećom (PCA1, PCA2, PCA3) osom bez značajnog gubitka informacija (Wold i sar., 1987). Kao rezultat dobijaju se dvodimenzionalni grafici koji omogućavaju vizuelizaciju razlika između taksona, njihovog grupisanje i doprinosa varijabli (jedinjenja).

Dvodimenzionalno i višedimenzionalno nemetričko skaliranje (nMDS) (engl. *non-Metric Multidimensional Scaling*) i UPGMA (engl. *Unweighted Pair-Group Arithmetic Averages clustering*) hijerarhijska klaster analiza, izvršene su korišćenjem *Bray-Curtis* matrice različitosti. nMDS je primenjena u cilju grafičkog prikazivanja grupisanja i udaljenosti taksona u dvodimenzionalnom i/ili trodimenzionalnom prostoru (2D i 3D nMDS grafikoni). UPGMA klaster analiza je primenjena u cilju udruživanja objekata na osnovu njihovih sličnosti odnosno razlika. Kao rezultat analize dobija se grafički prikaz, dendrogram, u kome rastojanja između dva klastera predstavljaju srednje vrednosti rastojanja svih mogućih parova objekata ovih klastera. Razdaljine u ovoj analizi se mogu zasnovati na jednoj ili na više dimenzija (Kovačić, 1994).

4.5. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih polifenola u MeOH ekstraktima herbi 28 vrsta

Sadržaj ukupnih polifenola u suvim MeOH ekstraktima herbi 28 vrsta roda *Hieracium* određen je primenom Folin-Ciocalteu (FC) reagensa prema Velioğlu i sar. (1998). MeOH ekstrakti su za potrebe ovog testa rastvoreni u MeOH (0,5 mg/mL). Reakciona smeša sadržala je 0,75 mL rastvora FC reagensa (10% *V/V*) i 0,1 mL rastvora ispitivanih ekstrakata i inkubirana je na sobnoj temperaturi 5 min. Nakon inkubacije u svaku reakcionu smešu dodato je 0,75 mL rastvora NaCO₃ (60 g/L, voda). Slepa proba je umesto rastvora ekstrakata sadržala 0,1 mL MeOH.

Smeša je zatim inkubirana 90 min na 25 °C na tamnom mestu, nakon čega je apsorbancija izmerena na 725 nm. Sadržaj ukupnih polifenola izračunat je iz kalibracione krive galne kiseline (GA; 10-100 µg/mL). Rezultati su izraženi kao mg GA ekvivalenta (GAE)/g suvog ekstrakta i predstavljaju srednju vrednost tri nezavisna eksperimenta.

5. Farmakološka ispitivanja

5.1. Ispitivanje antioksidantne aktivnosti MeOH ekstrakata herbi 28 vrsta

Antioksidantna aktivnost suvih MeOH ekstrakata herbi 28 vrsta roda *Hieracium* ispitivana je *in vitro* spektrofotometrijskim testovima. Ukupan antioksidantni potencijal procenjuvan je testovima FRAP (engl. *Ferric Reducing Antioxidant Power*) (Benzie i Strains, 1996) i CUPRAC (engl. *Cupric Reducing Antioxidant Capacity*) (Apak i sar., 2004; Özyürek i sar., 2011). Sposobnost neutralizacije slobodnih radikala ispitivana je DPPH testom (u cilju procene sposobnosti neutralizacije 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil, DPPH[•] radikala), 2-dezoksiriboza testom (za procenu sposobnosti neutralizacije [•]OH radikala) (Kukić i sar., 2006) i ABTS testom (za procenu sposobnosti neutralizacije 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina, ABTS^{•+} radikala) (Re i sar., 1999).

5.1.1. Ispitivanje ukupnog antioksidantnog potencijala

5.1.1.1. FRAP test

FRAP test se zasniva na redukciji [Fe(III)-(TPTZ)₂]³⁺, kompleksa Fe³⁺ sa TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazinom), do plavo obojenog [Fe(II)-(TPTZ)₂]²⁺. Za potrebe eksperimenta FRAP reagens je napravljen tako što je u 80 mL acetatnog pufera (300 mmol/L, pH=3,6) dodato 8 mL rastvora TPTZ (10 mmol/L u 40 mmol/L HCl) i 8 mL rastvora FeCl₃ × 6H₂O (20 mmol/L). Ekstrakti su

rastvarani u MeOH (0,5 mg/mL). Kao pozitivna kontrola upotrebljen je rastvor askorbinske kiseline (0,02 mg/mL). U epruvete je dodato 0,1 mL rastvora ekstrakata ili pozitivne kontrole i 3 mL FRAP reagensa. Slepa proba je sadržala 0,1 mL MeOH i 3 mL FRAP reagensa.

Reakciona smeša je inkubirana 30 min na 37 °C. Apsorbancija je merena na 593 nm. Ukupna antioksidantna aktivnost ekstrakata je izražena kao mmol Fe²⁺/g suvog ekstrakta i predstavljala je srednju vrednost tri merenja. Za izračunavanje je korišćena kalibraciona kriva konstruisana pomoću rastvora FeSO₄ (200-1000 mmol/L). Aktivnost ekstrakata je upoređivana sa aktivnošću.

5.1.1.2. CUPRAC test

CUPRAC test se zasniva na redukciji Cu²⁺ do Cu⁺ uz promenu boje kompleksa sa neokuproinom iz plave u stabilnu narandžastu boju. Zapremina reakcione smeše, a time i količine njenih komponenti prilagođeni su mikrotitarskim pločama sa 96 bunarića. U bunariće ploča odmereno je 40 µL rastvora ekstrakata u MeOH koncentracije 0,156–10 mg/mL, zatim 50 µL rastvora CuCl₂ × 2H₂O (10 mmol/L), 60 µL rastvora amonijum-acetata (1 mol/L, pH=7,0) i 50 µL rastvora neokuproina (7,5 mmol/L u MeOH). Kao pozitivna kontrola upotrebljen je rastvor Troloksa (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilroman-2-karboksilna kiselina, 5 mmol/L u MeOH). U slučaju slepe probe odmeren je MeOH (40 µL) umesto rastvora ekstrakata.

Reakciona smeša je inkubirana tokom 1 h na 30 °C. Apsorbancija je merena u čitaču mikrotitarskih ploča na 450 nm. Rezultati predstavljaju srednju vrednost tri ponavljanja i izraženi su kao mmol Troloks ekvivalenata po gramu suvog ekstrakta (mmol *Trol. eq./g*), pomoću kalibracione krive ovog standardnog antioksidansa koja je izrađena upotrebom pet koncentracija.

5.1.2. Ispitivanje sposobnosti neutralizacije slobodnih radikala

5.1.2.1. DPPH test

Za potrebe ove analize ekstrakti su rastvarani u MeOH (5 mg/mL). Rastvor askorbinske kiseline (0,08-0,14 mg/mL) korišćen je kao pozitivna kontrola. Različite zapremine 10-90 µL rastvora ekstrakata ili pozitivne kontrole dopunjene su metanolom do 2 mL, a zatim je dodato po 0,5 mL rastvora DPPH reagensa u MeOH (0,5 mmol/L). Smeše su snažno promućkane i inkubirane 30 min na tamnom mestu, nakon čega je merena apsorbancija na 517 nm. Kao negativna kontrola korišćen je rastvor dobijen razblaživanjem DPPH rastvora (0,5 mmol/L) metanolom do ukupno 2,5 mL. Slepa proba je bio MeOH.

Sposobnost neutralizacije DPPH^{*} radikala, S(%), izračunata je prema formuli:

$$S(\%) = \frac{A_0 - A_s}{A_0} \times 100 \quad (3)$$

gde su: A₀ – apsorbancija negativne kontrole; A_s – apsorbancija reakcione smeše koja sadrži testirane ekstrakte.

Rezultati su izraženi kao SC₅₀ (µg/mL), odnosno koncentracije ekstrakata koje su neutralisale 50% DPPH^{*} radikala, i predstavljaju srednju vrednost tri merenja.

5.1.2.2. 2-Dezoksiriboza test

Rastvori FeCl₃ × 6H₂O (4,0 mmol/L), EDTA (4,0 mmol/L), 2-dezoksiriboze (50,0 mmol/L), H₂O₂ (1,5%, *V/V*) i L-askorbinske kiseline (4,0 mmol/L), kao i fosfatni pufer (KH₂PO₄/Na₂HPO₄ pH=7,4; I=0,1) pripremljeni su *ex tempore*. Ekstrakti su rastvarani u MeOH (koncentracije 0,175-40 mg/mL). Po 20 µL rastvora ekstrakata različitih koncentracija, 200 µL rastvora 2-dezoksiriboze, 100 µL EDTA, 100 µL FeCl₃, 20 µL H₂O₂ i 100 µL rastvora L-askorbinske kiseline odmereno je u epruvete, koje su dopunjene sa po 3,46 mL fosfatnog pufera. Slepa proba sadržala je 20 µL MeOH, 200 µL 2-dezoksiriboze i 3,78 mL fosfatnog pufera. U negativnu kontrolu dodato je 20 µL MeOH umesto rastvora ekstrakata.

Reakciona smeša inkubirana je na 37 °C tokom 1 h, nakon čega su dodati 1 mL 1% (*m/V*) tiobarbiturne kiseline (TBA) rastvorene u 0,05 mol/L NaOH i 1 mL trihlorsirćetne kiseline 2,8% (*m/V*). Smeša je zatim zagrevana (na 100 °C, 15 min) i tom prilikom došlo je do građenja crvenog hromogena, adukta tiobarbiturne kiseline i malonilaldehida. Smeša je zatim hlađena na ledu, nakon čega je merena apsorbanacija na 532 nm.

Sposobnost neutralizacije $\cdot\text{OH}$ radikala, $S(\%)$, izračunata je prema jednačini:

$$S(\%) = \frac{A_0 - A_s}{A_0} \times 100 \quad (4)$$

gde su: A_0 – apsorbanacija negativne kontrole; A_s – apsorbanacija reakcione smeše testiranih ekstrakata.

Rezultati su izraženi kao SC_{50} ($\mu\text{g/mL}$), odnosno koncentracije ekstrakata koje su neutralisale 50% $\cdot\text{OH}$ radikala, i predstavljaju srednju vrednost tri merenja.

5.1.2.3. ABTS test

ABTS test prilagođen je za rad u mikrotitarskim pločama sa 96 bunarića. Osnovni ABTS rastvor izrađen je mešanjem 88 μL rastvora kalijum peroksodisulfata (7,8 mmol/L) i 5 mL rastvora ABTS (2,45 mmol/L). Ostavljen je da stoji 16 h da se proizvedu $\text{ABTS}^{\cdot+}$ radikali nakon čega je razblažen metanolom u cilju dobijanja radnog rastvora apsorbanacije $A_{(734\text{nm})} = 0,700$. MeOH ekstrakti su rastvoreni u MeOH (koncentracije 0,0625–4 mg/mL). Kvercetin (pozitivna kontrola) rastvoren je u MeOH (0,01–1 mg/mL). U 200 μL radnog ABTS rastvora dodato je 20 μL rastvora ekstrakata ili pozitivne kontrole svake pojedinačne koncentracije. Umesto rastvora ekstrakata za izradu slepe probe upotrebljen je MeOH (20 μL). Reakciona smeša je inkubirana 20 min na tamnom mestu, nakon čega su apsorbanacije merene na 630 nm.

Sposobnost neutralizacije $\text{ABTS}^{\cdot+}$ radikala, $S(\%)$, izračunata je prema jednačini:

$$S(\%) = \frac{A_0 - A_s}{A_0} \times 100 \quad (5)$$

gde su: A_0 – apsorbanacija negativne kontrole; A_s – apsorbanacija reakcione smeše testirane supstance.

Rezultati su izraženi kao SC_{50} ($\mu\text{g/mL}$), odnosno koncentracije ekstrakata koje su neutralisale 50% $\text{ABTS}^{\cdot+}$ radikala, i predstavljaju srednju vrednost tri merenja.

5.2. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti odabranih MeOH i CH_2Cl_2 ekstrakata herbi i izolovanih metabolita

U okviru ove doktorske disertacije ispitivana je antimikrobna aktivnost suvih MeOH ekstrakata herbi *H. calophyllum*, *H. coloriscapum*, *H. pseudoschenkii*, *H. valdepilosum* i *H. glabratum*, suvog CH_2Cl_2 ekstrakta herbe *H. schepigianum*, kao i dva seskviterpenska laktona, 8-epi-ikserisamina A (3) i krepizida E (4), koja su izolovana iz MeOH ekstrakta cvasti *H. calophyllum*. Ispitivane bakterije su obuhvatale četiri soja Gram-pozitivnih bakterija i četiri soja Gram-negativnih bakterija, a ispitivane mikromicete osam sojeva plesni i dva soja kvasnica (Tabela 17).

Kulture mikroorganizama korišćenih u eksperimentima deponovane su u laboratorijskoj kolekciji kultura u Mikološkoj laboratoriji Odeljenja za biljnu fiziologiju Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ Univerziteta u Beogradu. Bakterijski sojevi su održavani na podlozi *Müller-Hinton*, plesni na malt-agar podlozi, a sojevi *Candida* spp. na podlozi *Sabourand* dekstrozni agar, na 4 °C i presejavani jednom mesečno.

Tabela 17. Testirani mikroorganizmi

Gram-pozitivne bakterije	Gram-negativne bakterije	Mikromicete (plesni)	Mikromicete (kvasnice)
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538)	<i>Salmonella typhimurium</i> (ATCC 13311)	<i>Aspergillus fumigatus</i> (klinički izolat)	<i>Candida albicans</i> (ATCC 10231)
<i>Bacillus cereus</i> (klinički izolat)	<i>Escherichia coli</i> (ATCC 35210)	<i>A. versicolor</i> (ATCC 11730)	<i>C. krusei</i> (H1/16 klinički izolat)
<i>Listeria monocytogenes</i> (NCTC 7973)	<i>Enterobacter cloacae</i> (klinički izolat)	<i>A. ochraceus</i> (ATCC 12066)	
<i>Micrococcus flavus</i> (ATCC 10240)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)	<i>A. niger</i> (ATCC 6275)	
		<i>Trichoderma viride</i> (IAM 5061)	
		<i>Penicillium funiculosum</i> (ATCC 36839)	
		<i>P. ochrochloron</i> (ATCC 9112)	
		<i>P. verrucosum</i> var. <i>cyclopium</i> (izolat iz hrane)	

5.2.1. Ispitivanje antibakterijske aktivnosti

Minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) i minimalne baktericidne koncentracije (MBK) odabranih izolata vrsta roda *Hieracium*, određivane su modifikovanom mikrodilucionom metodom (CLSI, 2009; Tsukatani i sar., 2012) u mikrotitarskim pločama sa 96 bunarića. Kulture bakterija su gajene u 2 mL TSB (engl. *Tryptic Soy Broth*) tečnog medijuma, 24 h na 37 °C, nakon čega su razblažene sterilnim fiziološkim rastvorom do $1,0 \times 10^5$ CFU/mL (engl. *colony-forming units/mL*). Analizirani izolati rastvarani su u TSB hranjivoj podlozi uz dodatak DMSO (5,0%, *V/V*) i Tween 80 (0,1%, *V/V*) i nanošeni na ploče zajedno sa inokulumom bakterija ($1,0 \times 10^4$ CFU/bunariću). Finalne koncentracije izolata u bunarićima bile su 0,12-50 mg/mL (MeOH i CH₂Cl₂ ekstrakti) i 0,013-1 mg/mL (izolovana jedinjenja). Ploče su inkubirane 24 h na 37 °C. Najniža koncentracija izolata bez mikroskopski vidljivog rasta bakterija u bunariću definisana je kao MIK. MBK su određene serijskom reinokulacijom 2 µL sadržaja iz bunarića korišćenog za određivanje MIK u 100 µL hranljive podloge, nakon dodatne inkubacije 24 h na 37 °C. Koncentracija pri kojoj je izostao mikroskopski vidljiv rast bakterija definisana je kao MBK. Pri ovoj koncentraciji dolazi do uginuća 99,5% prvobitno zasejanih bakterija u hranljivoj podlozi. Poređenje rasta je vršeno u odnosu na negativnu kontrolu (Ušjak i sar., 2016). Dodatna potvrda MIK i MBK vrednosti vršena je dodatkom *p*-jodonitrotetrazolijum hlorida (INT) kao indikatora rasta bakterijskih ćelija (Tsukatani i sar., 2012). U svaki bunarić dodato je 40 µL INT (0,2 mg/mL) i ploče su inkubirane 30 min na 37 °C. U bunarićima u kojima je bilo rasta bakterija došlo je do pojave intenzivne crvenoljubičaste boje. Streptomycin (0,04-0,52 mg/mL) i ampicilin (0,25-1,24 mg/mL) su korišćeni kao pozitivna kontrola.

5.2.2. Ispitivanje antifungalne aktivnosti

MIK i minimalne fungicidne koncentracije (MFK) odabranih izolata vrsta roda *Hieracium* ispitivane su modifikovanom mikrodilucionom metodom (Espinel-Ingroff, 2001; Hänel i Raether, 1988), u mikrotitarskim pločama sa 96 bunarića. Za ispitivanje korišćene su suspenzije spora mikromiceta, spirane sa kultura starih 21 dan, u sterilnom fiziološkom rastvoru uz dodatak Tween 80 (0,1%, *V/V*), u koncentraciji od 1×10^5 CFU/bunariću. Razblaženja rastvora testiranih izolata su pripremljena na isti način kao u slučaju ispitivanja antibakterijske aktivnosti. Ploče su inkubirane 5 dana na 25 °C. Najniže koncentracije bez mikroskopski vidljivog rasta su definisane kao MIK. Vrednosti MFK, pri kojima dolazi do uginuća 99,5% početnog inokuluma, su određene serijskom reinokulacijom 2 µL u 100 µL

sterilne hranljive podloge malt-agar, i ponovnom inkubacijom u trajanju 72 h na 25 °C. Poređenje rasta je vršeno u odnosu na negativnu kontrolu. Kao pozitivna kontrola korišćeni su komercijalni antimikotici bifonazol (0,10-0,25 mg/mL) i ketokonazol (0,20-3,50 mg/mL).

5.3. Ispitivanje citotoksične aktivnosti odabranih MeOH i CH₂Cl₂ ekstrakata herbi i izolovanih metabolita

Citotoksična aktivnost odabranih izolata biljaka roda *Hieracium* (identičnih kao u slučaju ispitivanja antimikrobne aktivnosti) testirana je na tri humane tumorske ćelijske linije: HeLa (ćelijska linija karcinoma grlića materice), LS174 (ćelijska linija adenokarcinoma debelog creva) i A549 (ćelijska linija nesitnoćelijskog karcinoma pluća), kao i na jednoj normalnoj ćelijskoj liniji MRC-5 (ćelijska linija fetalnih fibroblasta pluća) u cilju ispitivanja selektivnosti efekta. Ćelijske linije su održavane u kulturi u vidu monosloja u hranljivom medijumu RPMI 1640 (engl. *Roswell Park Memorial Institute medium*), na 37 °C, u sredini obogaćenoj sa 5% CO₂ na vlažnosti vazduha od 95%.

5.3.1. Određivanje ćelijskog preživljavanja – MTT test

Citotoksični efekat ekstrakata i izolovanih jedinjenja na tumorske i normalne ćelije određen je spektrofotometrijskim MTT testom (engl. *Microculture Tetrazolium Test*) po Mosmann-u (1983), uz modifikacije koje su opisali Ohno i Abe (1991). Ovaj test se zasniva na redukciji tetrazolijumske soli 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolijum bromid (MTT reagensa) NAD(P)H zavisnom oksidoreduktazom vijabilnih ćelija do nerastvornog ljubičasto obojenog formazana.

Ispitivani ekstrakti najpre su rastvoreni u DMSO, dok su jedinjenja rastvorena u vodi. Dalje razblaživanje vršeno je u hranljivom medijumu. Ćelije su ravnomerno zasejane u bunarićima u odgovarajućoj gustini. Gustina HeLa ćelija bila je 2000 ćelija po bunariću, gustina LS174 7000 ćelija po bunariću, a gustina A549 i MRC-5 5000 ćelija po bunariću (u 100 µL podloge). Hranljivi medijum korišćen je kao slepa proba. Cisplatin je korišćen kao pozitivna kontrola. Nakon zasejavanja, sledila je inkubacija ćelija u medijumu (24 h), a zatim su rastvori izolata odmeravani u bunariće do finalnih koncentracija od 0,12-1 mg/mL (MeOH i CH₂Cl₂ ekstrakti) i 12,5-200 µg/mL (izolovana jedinjenja). Ploče su inkubirane 72 h na 37 °C, u sredini obogaćenoj sa 5% CO₂. Nakon toga, u svaki bunarić dodato je po 20 µL MTT reagensa rastvorenog u fosfatnom puferu (5 mg/mL). Uzorci su zatim inkubirani još 4 h pod istim uslovima, nakon čega je u svaki bunarić dodato 100 µL rastvora 10% natrijum-dodecilsulfata u cilju rastvaranja nastalog formazana. Nakon 24 h, apsorbcija je merena na ELISA čitaču na 570 nm. (Ušnjak i sar., 2016). Smatra se da je apsorbcija u direktnoj korelaciji sa brojem živih, metabolički aktivnih ćelija.

Preživljavanje ćelija, I(%), izračunato prema formuli:

$$I(\%) = \frac{A_{\tau} - A_s}{A_{\kappa} - A_s} \times 100 \quad (6)$$

gde su: A_τ – apsorbcija tretiranih uzoraka; A_s – apsorbcija slepe probe; A_κ – apsorbcija kontrolnih uzoraka.

Koncentracije izolata koje su izazvale smanjenje broja ćelija za 50% (IC₅₀) u poređenju sa negativnim kontrolama, određivane su iz krivih rasta ćelijskih linija.

5.4. Ispitivanje sposobnosti MeOH ekstrakata herbi 28 vrsta i odabranih metabolita da inhibiraju enzime acetilholinesterazu i butirilholinesterazu

Sposobnost suvih MeOH ekstrakata herbi 28 vrsta roda *Hieracium*, kao i odabranih sekundarnih metabolita ovih vrsta, tj. flavonoida luteolina (**28**), luteolin 7-*O*-glukozida (**16**), luteolin 7-*O*-glukuronida (**17**), apigenina (**30**), apigenin 7-*O*-glukozida (**23**), apigenin 7-*O*-glukuronida (**25**) i diosmetina (**29**), fenolkarboksilnih kiselina hlorogenske kiseline (**5**), 1,3-di-*O*-kafeoilhina kiseline (**6**) i 3,5-di-*O*-kafeoilhina kiseline (**8**), kao i seskviterpenskih laktona 8-epi-ikserisamina A (**3**) i

krepizida E (4), da inhibiraju enzime acetilholinesterazu (AChE) i butirilholinesterazu (BuChE) ispitana je *in vitro* spektrofotometrijskim Ellman-ovim testom (Ellman, 1958). Ovaj test se zasniva na građenju žuto obojenog jona 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzojevoe kiseline (DTNB) u reakciji sa tioholinom, čiji se intenzitet boje meri spektrofotometrijski na 412 nm. Tioholin u reakcionoj smeši nastaje razgradnjom acetilholina, odnosno butirilholina, posredstvom enzima AChE, odnosno BuChE. Test je prilagođen ispitivanju antiholinesterazne aktivnosti biljnih ekstrakata prema Fadaeinasab i sar. (2013).

Enzimi AChE i BuChE (0,09 U/mL), supstrati acetilholin jodid i butirilholin jodid (0,014 mol/L), DTNB (0,01 mol/L), suvi MeOH ekstrakti, standardi flavonoida i fenolkarboksilnih kiselina i galantamin (pozitivna kontrola) su rastvoreni u fosfatnom puferu (0,1 mol/L, pH=8). Seskviterpenski laktoni su rastvoreni u destilovanoj vodi. Po 20 µL rastvora ispitivanih ekstrakata (0,313-20 mg/mL), jedinjenja (0,1-1,6 mg/mL) ili galantamina (0,01-0,5 mg/mL) i 20 µL enzima (AChE ili BuChE; 0,09 U/mL) odmereno je u mikrotitarsku ploču. U smeše je dodato po 140 µL fosfatnog pufera, nakon čega su one inkubirane na 25 °C tokom 15 min, uz lagano mešanje ploča. Nakon inkubacije u svaku reakcionu smešu dodato je po 10 µL rastvora supstrata (acetilholin jodida ili butirilholin jodida) i DTNB, nakon čega je inkubacija produžena za dodatnih 40 min na 25 °C. Apsorbancija je merena na 412 nm.

Bunarići sa 100% aktivnosti enzima pripremljeni su na isti način, ali su umesto rastvora ekstrakata/jedinjenja sadržali dodatnu količinu fosfatnog pufera. U bunariće sa 0% aktivnosti enzima dodati su fosfatni pufer (180 µL), rastvor supstrata (10 µL) i DTNB (10 µL). Slepe probe uzoraka sastojale su se od rastvora ekstrakata/jedinjenja (20 µL), fosfatnog pufer (180 µL), supstrata (10 µL) i DTNB (10 µL).

Procenat inhibicije aktivnosti enzima I(%) računa se za svaku testiranu koncentraciju uzorka, prema sledećoj formuli:

$$I(\%) = [(A-B)-(C-D)]/(A-B) \times 100 \quad (7)$$

gde su: A – apsorbcija bunarića sa 0% aktivnosti enzima,

B – apsorbcija bunarića sa 100% aktivnosti enzima,

C – apsorbcija bunarića koji su sadržali enzim i ekstrakt/jedinjenje

D – apsorbcija slepe probe uzorka.

Rezultati su izraženi kao koncentracije uzoraka koje inhibiraju 50% enzimske reakcije (IC₅₀, mg/mL ili µg/mL).

5.5. Ispitivanje antihiperalgezijske i antiedematozne aktivnosti odabranih MeOH i CH₂Cl₂ ekstrakata herbi

Antihiperalgezijska i antiedematozna aktivnost suvih MeOH ekstrakata herbi *H. glabratum* i *H. calophyllum* i suvog CH₂Cl₂ ekstrakta herbe *H. scheppegianum* ispitana je *in vivo* nakon oralne primene, u modelu lokalizovane infamacije u pacova, izazvane intraplantarnom (*i.pl.*) injekcijom karagenina. Infamacija indukovana karageninom karakteriše se crvenilom, edemom i bolnom preosetljivošću (hiperalgezijom) (Morris, 2003; Stepanović-Petrović i sar., 2012; Vivancos i sar., 2004). Supstance koje mogu da redukuju bolnu preosetljivost izazvanu inflamacijom, u poređenju sa kontrolnom grupom, poseduju antihiperalgezijsku aktivnost u modelu inflamatornog bola (Morris, 2003; Tomić i sar., 2004), dok supstance koje mogu da redukuju edem izazvan karageninom, u poređenju sa kontrolnom grupom, poseduju antiedematoznu aktivnost (Helyes i sar., 2004).

Eksperimentalne životinje

U eksperimentu su korišćeni mužjaci pacova *Wistar* soja mase 250-300 g. Životinje su čuvane pod standardnim laboratorijskim uslovima, na 23 ± 1 °C, pri relativnoj vlažnosti vazduha 60%, i dan/noć ciklusu (12/12 h). 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. Hrana i voda su im bili dostupni *ad libitum*. Eksperimenti su izvođeni između 8 i 16 h, uvek u isto vreme, da bi se izbegle diurnalne varijacije. Pacovi su ostavljani da se adaptiraju u komorama od pleksiglasa, 30 min pre početka eksperimenta. Protokol eksperimenta je odobren od strane Etičkog komiteta za rad sa eksperimentalnim životinjama Univerziteta u Beogradu - Farmaceutskog fakulteta, u okviru projekta u oblasti osnovnih istraživanja (ON 175045), koji ima odgovarajuće odobrenje, koje podrazumeva i etičnost rada sa oglednim životinjama. Eksperimenti su sprovedeni u skladu sa Direktivom 2010/63/EU o zaštiti životinja koje se koriste u naučne svrhe.

Eksperimentalne procedure

Ispitivani ekstrakti su suspendovani u mešavini Tween 80/destilovana voda, i aplikovani životinjama oralnom sondom, u zapremini od 2 mL/kg (na prazan želudac), neposredno pre injekcije karagenina (test grupe; 50-200 mg/kg u slučaju ekstrakata *H. scheppigianum* i *H. glabratum*; 200 mg/kg u slučaju ekstrakta *H. calophyllum*). Rastvor karagenina je pripremljen dispergovanjem komercijalno dostupnog karagenina u fiziološkom rastvoru (154 nM NaCl) u koncentraciji od 1% *m/V*. Primenjen je supkutano (*s.c.*) u zadnju desnu šapu eksperimentalnih životinja (za ovaj način primene korišćen je naziv intraplantarno davanje, *i.pl.*), u zapremini od 0,1 mL/šapi, u cilju indukcije lokalizovane inflamacije. Kao referentni lek (pozitivna kontrola) korišćen je ibuprofen (100 mg/kg). Tretman životinja detaljnije je opisan u **Tabeli 18**. Injekcija karagenina uzrokovala je pojavu inflamatornog somatskog bola i edema tretirane šape životinja.

5.5.1. Ispitivanje antihiperlgezijske aktivnosti

Antihiperlgezijska aktivnost određena je korišćenjem električnog *Von Frey* uređaja, merenjem mehaničke sile kojom se deluje na šapu i koja izaziva reakciju životinje (povlačenje šape). Na inflamiranu šapu postavljan je, pod pravim uglom, vrh plastičnog filameta i pritisak je postepeno povećavan, sve do povlačenja šape. Sila potrebna da izazove reakciju životinje potom je beležena na digitalnom ekranu.

Tabela 18. Tretman životinja

Grupe	Tretman
Kontrolna grupa n=8 ^a	Vehikulum (<i>p.o.</i>) + 1% rastvor karagenina (100 µL, <i>s.c.</i> , <i>i.pl.</i>)
Test grupa I n=6	SCH (200 mg/kg, <i>p.o.</i>) + rastvor karagenina (1%, 100 µL, <i>s.c.</i> , <i>i.pl.</i>)
Test grupa II n=8	SCH (100 mg/kg, <i>p.o.</i>) + 1% rastvor karagenina (100 µL, <i>s.c.</i> , <i>i.pl.</i>)
Test grupa III n=6	SCH (50 mg/kg, <i>p.o.</i>) + 1% rastvor karagenina (100 µL, <i>s.c.</i> , <i>i.pl.</i>)
Test grupa IV n=6	GLA (200 mg/kg, <i>p.o.</i>) + 1% rastvor karagenina (100 µL, <i>s.c.</i> , <i>i.pl.</i>)
Test grupa V n=6	GLA (100 mg/kg, <i>p.o.</i>) + 1% rastvor karagenina (100 µL, <i>s.c.</i> , <i>i.pl.</i>)
Test grupa VI n=6	GLA (50 mg/kg, <i>p.o.</i>) + 1% rastvor karagenina (100 µL, <i>s.c.</i> , <i>i.pl.</i>)
Test grupa VII n=6	CAL (200 mg/kg, <i>p.o.</i>) + 1% rastvor karagenina (100 µL, <i>s.c.</i> , <i>i.pl.</i>)
Pozitivna kontrola n=6	ibuprofen (100 mg/kg, <i>p.o.</i>) + 1% rastvor karagenina (100 µL, <i>s.c.</i> , <i>i.pl.</i>)

^aVeličina grupe

Merenja ishoda

Razvoj hiperalgezije i antihiperalgezijski efekat ispitivanih ekstrakata procenjeni su merenjem praga povlačenja šape pacova (engl. *paw withdrawal threshold* - PWT). PWT je meren pre indukcije inflamacije (bazalne vrednosti PWT), kao i u sedam vremenskih tačaka u toku 300 min, nakon injektovanja karagenina (Vivancos i sar., 2004). Rezultati su izraženi kao razlika (dP) između bazalnih vrednosti PWT i PWT posle tretmana (Stepanović-Petrović i sar., 2012; Vivancos i sar., 2004):

$$dP = \text{bazalni PWT pre tretmana (g)} - \text{PWT posle tretmana (g)} \quad (8)$$

Bazalni PWT predstavlja srednju vrednost četiri merenja. PWT posle tretmana (karagenin + vehikulum/karagenin + rastvor ekstrakta ili referentne supstance) meren je u sedam vremenskih tačaka (srednja vrednost četiri merenja za svaku vremensku tačku), tokom 300 min od primene tretmana. Za procenu antihiperalgezijske aktivnosti, dP vrednosti su prevedene u procenat antihiperalgezijske aktivnosti (%AH) prema formuli:

$$\%AH = \frac{\text{srednja vrednost } dP \text{ kontrolne grupe} - dP \text{ pojedinačne životinje u test grupi}}{\text{srednja vrednost } dP \text{ kontrolne grupe}} \times 100 \quad (9)$$

Ako je dP pojedinačne životinje u test grupi bila veća od srednje dP kontrolne grupe, uzeto je da %AH iznosi 0, tj. da se antihiperalgezijsko dejstvo nije ispoljilo. Vrednosti %AH računane su za svaku dP vrednost. ED_{50} (doza koja ispoljava 50% antihiperalgezijske aktivnosti) sa intervalom pouzdanosti od 95% računata je primenom linearne regresione analize odnosa log doze i antihiperalgezijskog efekta.

Statističke metode

Pri statističkoj analizi korišćeni su kompjuterski programi SigmaPlot 11 i SPSS 20.0 za Windows. Rezultati određivanja izraženi su kao srednja vrednost (aritmetička sredina) \pm standardna greška (SEM). Razlike između odgovarajućih srednjih vrednosti u eksperimentima procenjene su korišćenjem dvofaktorske analize varijanse (*ANOVA*) za ponovljena merenja i *Tukey HSD* testa za *post hoc* poređenje (vrsta tretmana bila je nezavisni faktor, a vreme proteklo od primene tretmana je bilo zavisni faktor). Vrednost $P < 0,05$ smatrana je statistički značajnom.

5.5.2. Ispitivanje antiedematozne aktivnosti

Antiedematozna aktivnost ispitivanih ekstrakata određivana je merenjem zapremine šape pletizmometrom (Stepanović-Petrović i sar., 2012).

Merenja ishoda

Zapremina šape merena je pre indukcije inflamacije (bazalne vrednosti) i u sedam vremenskih tačaka u toku 300 min, nakon injektovanja karagenina. Šapa pacova je uranjana u tečnošću (vodeni rastvor elektrolita i sredstva za kvašenje) ispunjen cilindar i zapremina istisnute tečnosti (jednaka zapremini šape) je direktno očitavana na digitalnom displeju. Rezultati su izraženi kao razlika (dV) između bazalnih vrednosti volumena šape i volumena posle tretmana, dok su za procenu antiedematozne aktivnosti, dV (mL) vrednosti prevedene u procenat antiedematozne aktivnosti (%AE) (Stepanović-Petrović i sar., 2012), prema formulama:

$$dV = \text{zapremina šape nakon indukcije inflamacije (mL)} - \text{bazalna zapremina šape (mL)} \quad (10)$$

$$\%AE = \frac{\text{srednja vrednost } dV \text{ kontrolne grupe} - dV \text{ pojedinačne životinje u test grupi}}{\text{srednja vrednost } dV \text{ kontrolne grupe}} \times 100 \quad (11)$$

Ako je dV vrednost životinje u test grupi bila veća od srednje dV vrednosti kontrolne grupe, uzeto je da %AE iznosi 0, tj. da se antiedematozno dejstvo nije ispoljilo. Vrednosti %AE računane su za svaku dP vrednost. Statistička obrada rezultata izvedena je kao i u slučaju ispitivanja antihiperlgezijske aktivnosti.

5.6. Ispitivanje uticaja odabranih MeOH i CH₂Cl₂ ekstrakata herbi na motornu spretnost eksperimentalnih životinja

U rotarod testu sprovedenom u cilju procene uticaja analiziranih ekstrakata na motornu spretnost pacova i validacije testa bola, korišćen je rotarod aparat sa konstantnom brzinom obrtanja 15 rpm (engl. *rounds per minute*) (Stepanović-Petrović i sar., 2008; 2014). Životinjama test grupa primenjena je oralno najveća doza (200 mg/kg) MeOH ekstrakta *H. glabratum* i CH₂Cl₂ ekstrakta *H. scheppigianum*, za koju su ispitivane antihiperlgezijska i antiedematozna aktivnost, dok je u kontrolnoj grupi bila primenjena ista zapremina vehikuluma. U eksperimentu su korišćeni mužjaci pacova Wistar soja. Do izvođenja eksperimenta životinje su čuvane u uslovima opisanim u odeljku 5.5. Životinje su pre eksperimenta trenirane dva uzastopna dana da održavaju ravnotežu na rotirajućem cilindru aparature. Trećeg dana, samo one životinje koje su uspele da se zadrže na rotirajućem cilindru 180 s tokom dva uzastopna perioda hodanja, korišćene su u daljem eksperimentu.

Merenje ishoda

Dužina zadržavanja na rotirajućem cilindru nakon tretmana merena je u sedam vremenskih tačaka, što odgovara vremenskim tačkama kada su mereni antihiperlgezijski i antiedematozni efekat ekstrakata u modelu inflamacije šape pacova izazvane karageninom. Maksimalno vreme zadržavanja životinje na rotarodu (engl. *cut off*) je postavljeno da bude 180 s. Dakle, životinja koja i nakon dobijanja tretmana može da se zadrži na rotirajućem vretenu 180 s (kao što je mogla pre tretmana), nema narušenu motornu sposobnost i sklanja se sa aparata. Statistička obrada rezultata izvedena je na isti način kao u slučaju ispitivanja antihiperlgezijske i antiedematozne aktivnosti.

5.7. Ispitivanje akutne toksičnosti odabranih MeOH i CH₂Cl₂ ekstrakata herbi

Akutna toksičnost suvog MeOH ekstrakta *H. glabratum* i suvog CH₂Cl₂ ekstrakta *H. scheppigianum* ispitana je na miševima, nakon jednokratne primene velike doze (2000 mg/kg, *p.o.*) ekstrakata. U eksperimentu su korišćeni mužjaci miševa *Swiss Webster* soja, mase 20-30 g. Do izvođenja eksperimenta životinje su čuvane u uslovima opisanim u odeljku 5.5. Miševima su, nakon primene ekstrakata, praćeni položaj tela i repa, nakostrešenost dlake, sekrecija iz nosa i oka, unošenje hrane i vode, ponašanje i mortalitet. Posmatranje je vršeno kontinuirano tokom prvih 30 min, periodično prvih 24 h nakon tretmana, a zatim ujutru i uveče narednih 14 dana. U toku trajanja eksperimenta hrana i voda su životinjama bili dostupni *ad libitum*.

REZULTATI I DISKUSIJA

1. Hemijska analiza

1.1. Ispitivanje seskviterpenskih laktona

1.1.1. Strukturna karakterizacija seskviterpenskih laktona izolovanih iz MeOH ekstrakta cvasti *Hieracium calophyllum*

Iz liofilizovane vodene frakcije suvog MeOH ekstrakta cvasti *H. calophyllum*, primenom semipreparativne tačne hromatografije sa masenom spektrometrijom (LC-MS), prikupljanjem frakcija u vremenskim intervalima definisanim na osnovu retencionih vremena (Rt) komponenti, izolovana su četiri seskviterpenska laktona (**1-4**): jedinjenje **1** (frakcija HF4; Rt=14,32 min), jedinjenje **2** (HF6; Rt=15,55 min), jedinjenje **3** (HF7; Rt=16,72 min) i jedinjenje **4** (HF9; Rt=31,25 min) (odjeljak 4.1.1 u poglavlju Materijal i metode).

Njihova struktura je utvrđena primenom NMR spektroskopije, masene spektrometrije i refraktometrije. 1D i 2D NMR spektri jedinjenja **4** su snimani u MeOH-*d*₄ i DMSO-*d*₆, a jedinjenja **1-3** u D₂O. 1D i 2D NMR spektri jedinjenja **1-4** dati su u Prilogu 2 (**Slike P2.1-2.22**).

Kao rezultat, identifikovana su tri nova, tj. do sada neopisana jedinjenja koja predstavljaju konjugate seskviterpenskih laktona i prolina, i to jedan glukozid eudezmanolida (**1**) osnovne strukture koja odgovara tuberiferinu i dva gvajanolida osnovne strukture dehidrokostus laktona (**2** i njegov glukozid **3**). Takođe je identifikovan i jedan poznati glukozid gvajanolida, derivat dehidrokostus laktona, krepizid E (**4**), i to po prvi put u vrstama roda *Hieracium*.

1.1.1.1. Jedinjenje 1

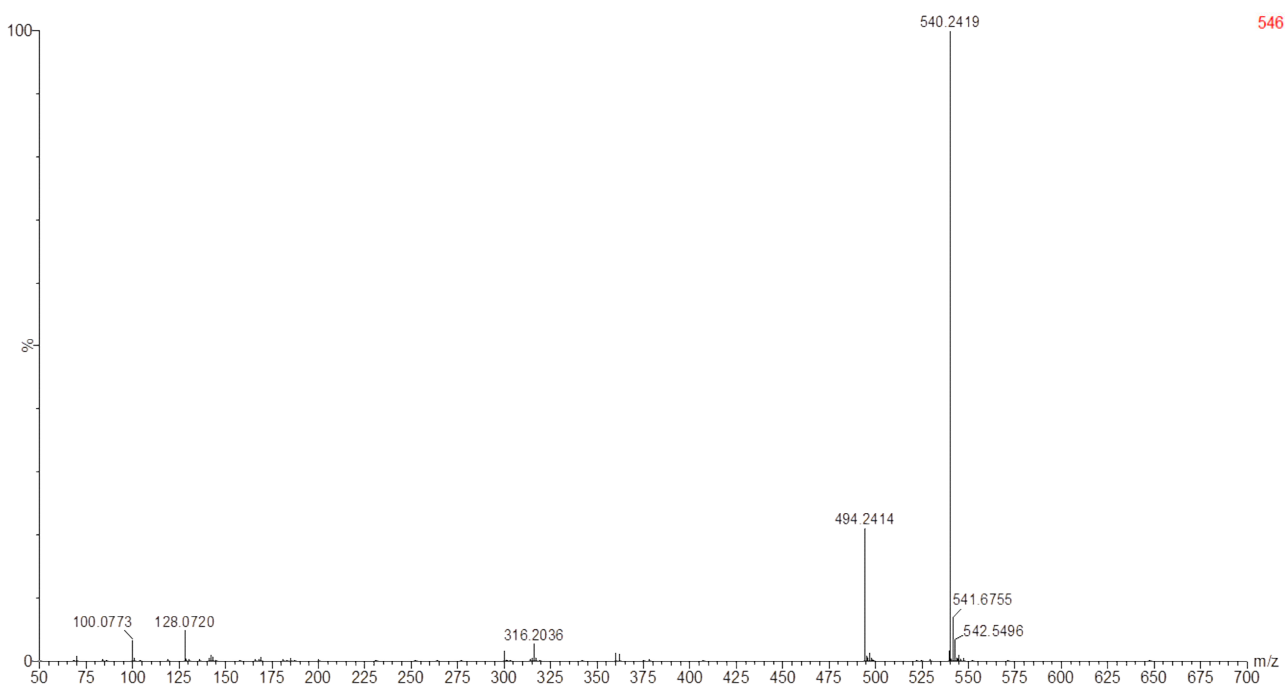
Jedinjenje **1** je izolovano u obliku belih amorfnih kristala (1 mg), $[\alpha]_{D+106}$ (c=0,5 mol/L, voda). Molekulska formula jedinjenja **1**, C₂₆H₃₇NO₁₁ određena je na osnovu *m/z* vrednosti 540,2456 protonovanog molekula [M+H]⁺ (izračunato kao 540,2439 za [M+H]⁺ C₂₆H₃₈NO₁₁), analizom HR-MS (ESI⁺) spektra snimljenog u pozitivnom modu (ESI/Q-TOF). U Q-TOF-MS/MS spektru (**Slika 26**) zabeleženi su: fragmentni jon na *m/z* 494,2445, koji nastaje otpuštanjem fragmenta mase 46 Da iz protonovanog molekula što odgovara ekvivalentu mravlje kiseline (ovo je karakteristično za molekule sa laktonskom funkcionalnom grupom), kao i fragmentni joni manjih masa i to na *m/z* 128,0718 i 100,0759, kojima odgovaraju formule C₆H₁₀NO₂, odnosno C₅H₁₀NO, što ukazuje na prisustvo N-metilprolinske strukture u molekulu jedinjenja **1**.

Interpretacija NMR spektara jedinjenja 1

Broj signala uočenih u ¹H i ¹³C NMR spektrima (**Tabela 19**, **Slika 27** i **Slika P2.1** u Prilogu 2) ukazuje na prisustvo 29 protona i 26 ugljenikovih atoma u strukturi jedinjenja **1**, što je u saglasnosti sa prethodno ustanovljenom molekulskom formulom jedinjenja. Analizom ¹H, ¹³C-NMR i HSQC spektara (**Slika 28**) uočeni su signali koji ukazuju na prisustvo određenih funkcionalnih grupa i/ili delova molekula u strukturi jedinjenja **1**, karakterističnih za seskviterpenske laktone eudezmanolidne strukture i to:

- 1) tercijarne metil grupe (H-14, C-14) koju karakteriše protonski singlet na 0,87 ppm skalarno spregnut sa ugljenikom na hemijskom pomeranju od 20,86 ppm;
- 2) *sp*³ metilenske grupe (H-9 α/β , C-9) od koje potiču protonski signali višeg reda, triplet i dublet dubleta na 1,41 i 2,01 ppm koji su spregnuti sa ugljenikom C-9 [δ_C 45,05];
- 3) *sp*² egzociklične metilenske grupe (H-15a, H-15b, C-15) koju karakterišu dva protonska singleta na 4,95 i 5,48 ppm spregnuta sa ugljenikom C-15 [δ_C 107,85];

- 4) dvostruke veze (H-1, C-1; H-2, C-2) od koje potiču protonski signali višeg reda, dubleti dubleta na 5,59 i 5,71 ppm spregnuti sa ugljenicima na hemijskim pomeranjima od 125,61, odnosno 140,41 ppm;
- 5) četiri kvaternarna ugljenikova atoma [δ_C 39,41 (C-10); 141,26 (C-4); 173,88 (C-12); 177,32 (C-1')].



Slika 26. Q-TOF-MS/MS (ESI⁺) spektar jedinjenja 1.

Analiza specifičnih HMBC korelacija (signala skalarno spregnutih protona i ugljenika kroz dve ili više veza) i to: H-3 [δ_H 4,89]/C-1 [δ_C 140,41], H-14 [δ_H 0,87]/C-7 [δ_C 55,82], H-14/C-5 [δ_C 50,39] i H-14/C-9 [δ_C 45,05] (Tabela 19) je takođe ukazala na eudezmanolidnu strukturu jedinjenja 1. Da jedinjenje 1 ima tuberiferinski skelet zaključeno je na osnovu poređenja njegovih ¹H i ¹³C NMR spektralnih podataka sa literaturnim podacima za irazunolid i 3 β -D-glukopiranozil-oksi-eudezma-1,4(15),11(13)-trien-12,6-olid (Hasbun i sar., 1982; Grass i sar., 2004). Irazunolid je izolovan iz CH₂Cl₂ ekstrakta nadzemnih delova *H. irazuense* Benth. ex Oerst., vrste koju su autori analizirali pod nazivom *H. irazuensis* L. (Hasbun i sar., 1982). Bitno je istaći da je prema ranijoj klasifikaciji ova vrsta pripadala podrođu *H.* subgen. *Chionoracium* Schultz-Bip. [= *H.* subgen. *Stenotheca* (Monnier) Fr.] (Beaman, 1990; Zahn, 1921-1923), dok bi prema novijoj klasifikaciji ova vrsta trebalo da pripada nezavisnom rodu *Stenotheca* Monnier (Kraak i Mráz, 2008; Sennikov i Illarionova, 2002), ali do sada niko od taksonoma još nije publikovao novu kombinaciju za ovu centralnoameričku vrstu. 3 β -D-Glukopiranozil-oksi-eudezma-1,4(15),11(13)-trien-12,6-olid je izolovan iz CH₂Cl₂ ekstrakta podzemnih organa vrste *Schlagintweitia intybacea* (All.) Griseb. (Grass i sar., 2004), koju su autori analizirali pod nazivom *H. intybaceum* All. Prema aktuelnoj klasifikaciji ova vrsta pripada rodu *Schlagintweitia* koji sa rodovima *Stenotheca* i *Hieracium* deli isti podtribus Heraciinae (Gottschlich i sar., 2017; Greuter i Raab-Straube, 2008).

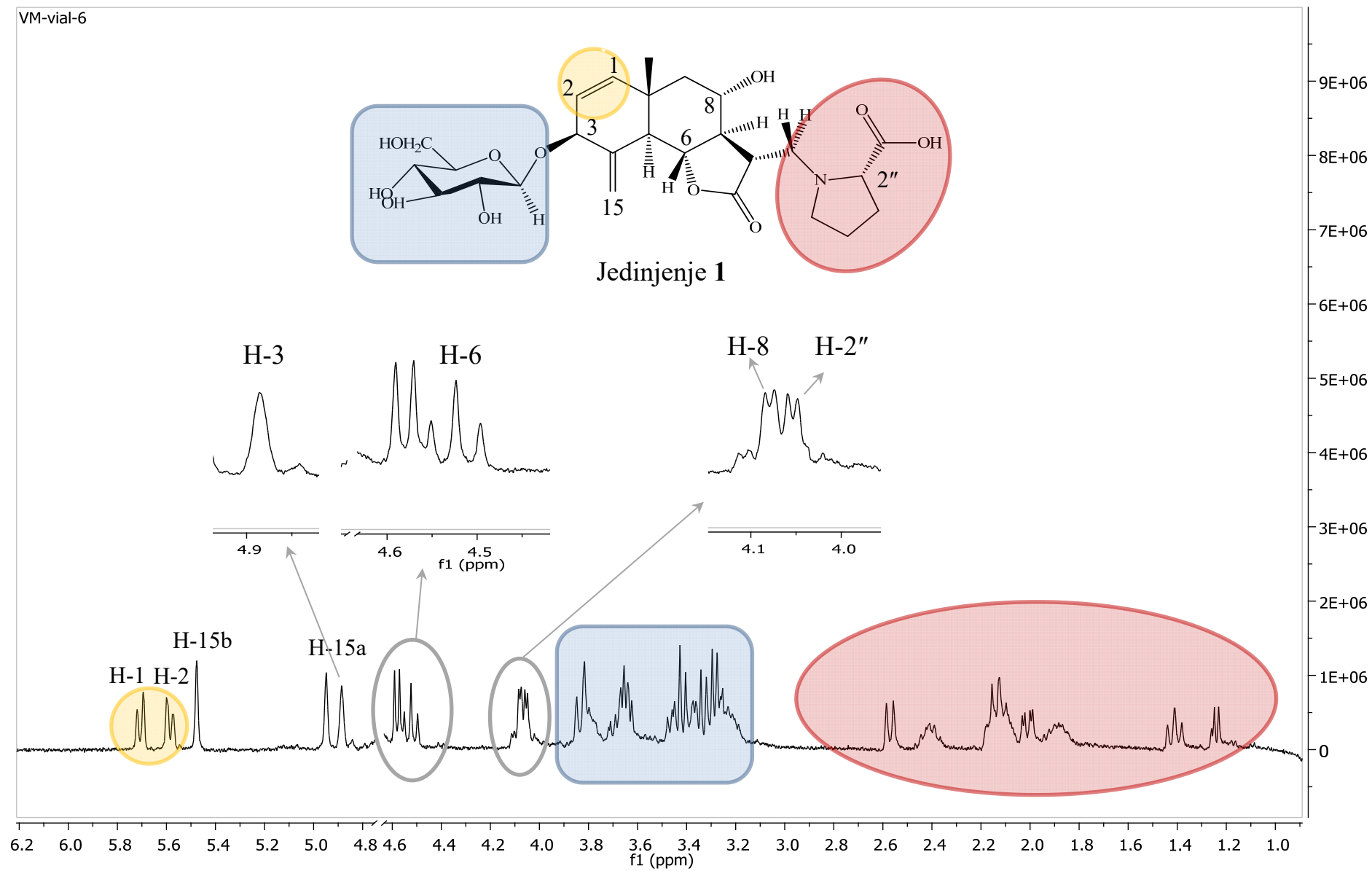
Osnovni eudezmanolidni skelet jedinjenja 1 supstituisan je u položajima C-3 i C-8 uvođenjem po jedne sekundarne OH grupe. Položaj OH grupa utvrđen je poređenjem hemijskih pomeranja protona H-3 i ugljenikovog atoma C-3 [δ_H 4,89; δ_C 78,05] sa odgovarajućim spektralnim podacima istih atoma [δ_H 4,87; δ_C 78,4] u strukturi 3 β -D-glukopiranozil-oksi-eudezma-1,4(15),11(13)-trien-12,6-olida, kao i na osnovu paramagnetnog efekta, tj. promene hemijskih pomeranja signala H-8 i C-8 prema nižem magnetnom polju za $\Delta_H = -2$ ppm (kod 1 [δ_H 4,10; δ_C 66,54], a kod gore navedenog prethodno izolovanog irazunolida [δ_H 2,10; δ_C 22,0]). Do navedene promene dolazi usled prisustva alkoholne grupe u položaju C-8 (tj. grupe sa negativnim induktivnim efektom), umesto *sp*³ metilenske grupe

prisutne u molekulu 3β -D-glukopiranozil-oksi-eudezma-1,4(15),11(13)-trien-12,6-olida (Grass i sar., 2004). Signali protona H-3 i H-8 jedinjenja **1** prikazani su na **Slici 27**.

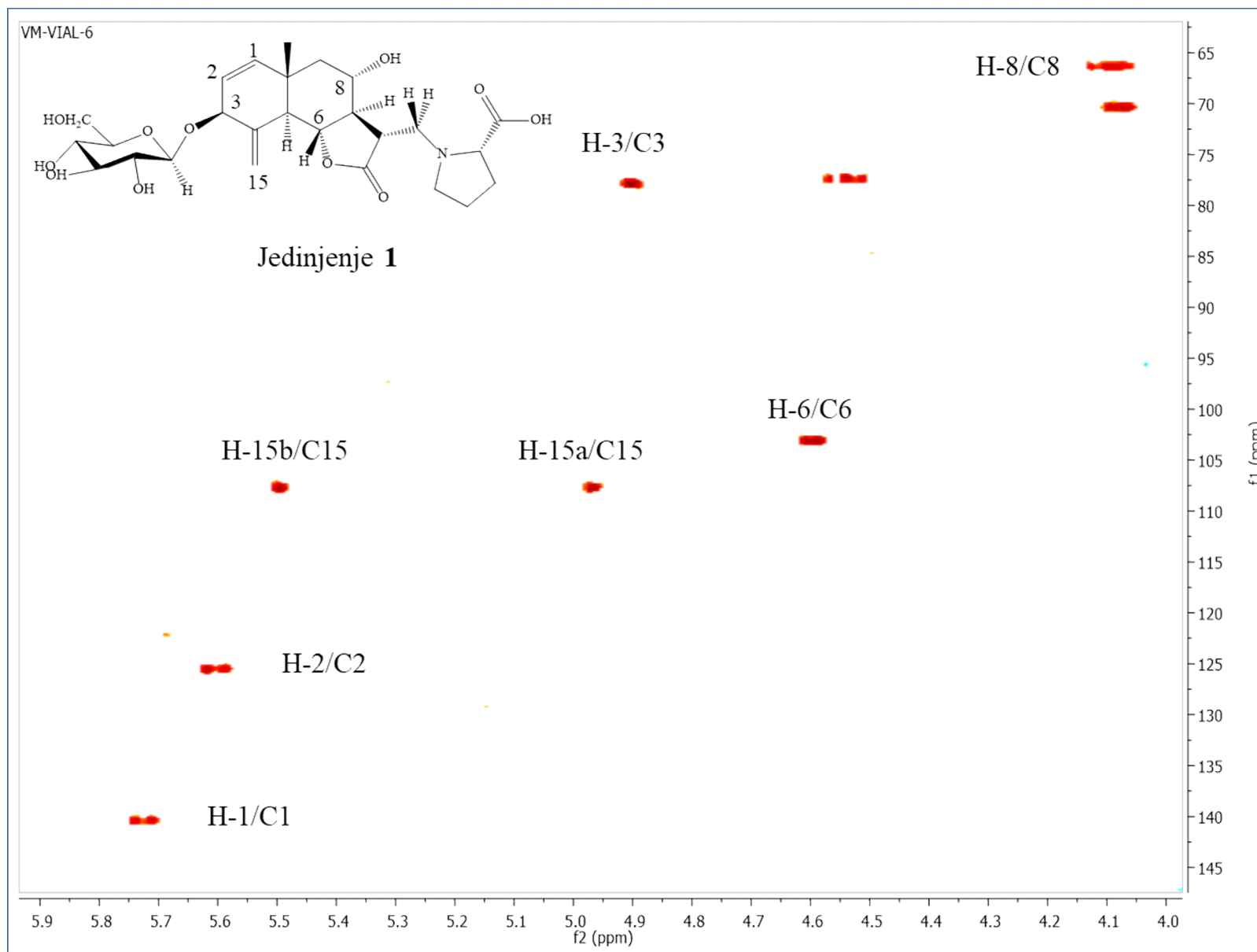
Uočeno je i prisustvo karakterističnih signala molekula glukoze (H-1', C-1'; H-2', C-2'; H-3', C-3'; H-4', C-4'; H-5', C-5'; H-6' α/β , C-6') na hemijskim pomeranjima u opsegu δ_H 3,29-4,58 i δ_C 60,72-103,25 u 1D i 2D NMR spektrima jedinjenja **1** (**Tabela 19** i **Slika 27**). Položaj glikozilacije molekula (C-3) određen je na osnovu HMBC korelacija (**Tabela 19**, **Slika P2.3** u Prilogu 2) anomernog protona glukoze [δ_H 4,58] na C-1' [δ_C 103,25] i C-3 [δ_C 78,05] seskviterpenskog dela molekula. Hemijska pomeranja atoma H-3, C-3, H-1' i C-1' odgovarala su literaturnim podacima za eudezmanolidni glukozid (Grass i sar., 2004). β -Konfiguracija glikozidne veze određena je dekuplovanjem i određivanjem konstante sprežanja anomernog protona (7,9 Hz), što je bilo u saglasnosti sa vrednostima određenim za 8-epi-dezacilinaropikrin-3-O- β -D-glukozid (integrifolin 3-O- β -D-glukozid), glukozid gvajanolida, koji je izolovan iz EtOH ekstrakta podzemnih organa *Crepis pyrenaica* (L.) W. Greuter, Asteraceae (Kisiel i Barszcz, 1995).

Tabela 19. 1H (400 MHz), ^{13}C (101 MHz), DEPT, HMBC, COSY i NOESY spektralni podaci jedinjenja **1** snimani u D_2O

Položaj	δ_H (J izražena u Hz)	δ_C	HMBC	COSY	NOESY
Aglikon					
1	5,71 (dd, 9,8; 2,0)	140,41	3, 14	2	2
2	5,59 (dd, 9,6; 2,5)	125,61		3	1
3	4,89 (s)	78,05	1, 5, 15a, 1'	15a, 15b	1, 5, 1'
4	-	141,26	5		
5	2,57 (d, 11,1)	50,39	14,15a	6, 15a	3, 9 α
6	4,52 (t, 11,0)	77,52	5	7	8, 11, 14, 15a
7	2,16 (q, 11,5)	42,34	1, 13 β , 14		
8	4,10 (dd, 12,1; 4,4)	66,54	9 β	9	6, 14
9 α	1,41 (t, 11,7)		14	8	5, 8, 9 β , 11
9 β	2,01 (dd, 12,6; 4,5)	45,05			9 α , 14
10	-	39,41	1, 2, 5, 9 β		
11	3,26 (d, 9,3)	55,82	13 β		5, 9
12	-	173,88	13 α		
13 α	3,47 (t, 10,1)		5''b	13 β	13 β
13 β	3,68 (t, 8,9)	55,03		13 α	13 α
14	0,87 (s)	20,86	5	9 α	1, 6, 8
15a	4,95 (s)		3,5	5	6, 15b
15b	5,48 (s)	107,85			15a, 1'
Glukoza					
1'	4,58 (d, 7,9)	103,25	2'	2'	3, 15b, 3', 5'
2'	3,29 (t, 7,9)	73,57		1'	
3'	3,43 (d, 1,8)	75,98	2'		1', 5'
4'	3,35 (d, 1,8)	69,63	2', 3', 6' β		
5'	3,37 (d, 1,9)	75,90	3', 6' β	6' α	1', 3'
6' α	3,64 (dd, 12,6; 2,20)			5	
6' β	3,85 (dd, 12,4; 1,9)	60,72			
Prolin					
1''	-	177,32			
2''	4,05 (d, 9,5)	70,48	13 α		3''b, 4''b
3''a	2,16 (m)			3'' β	3''b
3''b	2,43 (m)	29,08		3'' α	2'', 3''a
4''a	1,91 (m)			4'' β	4''b
4''b	2,14 (m)	23,55		4'' α	2'', 4''a, 5''b
5''a	3,82 (d, 6,0)			5'' β	
5''b	3,23 (d, 5,8)	55,03		5'' α	



Slika 27. ^1H (400 MHz) NMR spektar jedinjenja 1 snimljen u D_2O , sa uvećanim kakarakterističnim signalima.

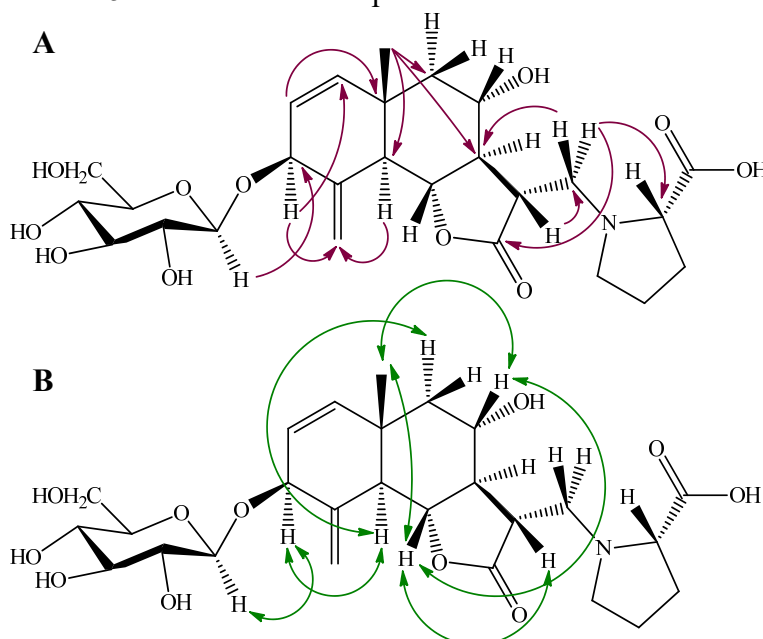


Slika 28. Karakteristične korelacije u HSQC spektru jedinjenja 1.

Signali koji odgovaraju protonima i ugljenikovim atomima egzociklične metilenske grupe, koji potiču iz α -metilen- γ -laktonske strukture, a koji su karakteristični za prethodno pomenute eudezmanolide (Grass i sar., 2004; Hasbun i sar., 1982), nisu uočeni u odgovarajućim spektrima jedinjenja **1**. Nasuprot tome uočeni su karakteristični signali sa hemijskim pomeranjima u opsegu δ_H 1,91-4,05 i δ_C 23,55-177,32 (**Tabela 19** i **Slika 27**), koji odgovaraju protonima i ugljenicima prolina (C-1"; H-2", C-2"; H-3"a/b, C-3"; H-4"a/b, C-4"; H-5"a/b, C-5"), što je ukazalo na to da je prolin reakcijom Michael-ove adicije (azot kao donor elektrona) adiran na egzocikličnu metilensku grupu položaja C-11 α -metilen- γ -laktona. Ovi podaci su u saglasnosti sa literaturnim navodima za slična jedinjenja, konjugate seskviterpenskikh laktona i aminokiselina, saussureamine i pulhelamine, izolovane iz više vrsta roda *Saussurea* DC., Asteraceae (Matsuda i sar., 2003; Yang i sar., 2008). Prisustvo prolina je potvrđeno na osnovu karakterističnih HMBC korelacija (engl. *crosspeaks*) (**Tabela 19**, **Slika P.2.3** u Prilogu 2) protona H-11 [δ_H 3,26] i sekundarnog C-13 [δ_C 55,03], zatim H-13 β [δ_H 3,68] i terciarnog C-7 [δ_C 55,82], kao i H-13 α [δ_H 3,47] i terciarnog C-2" atoma [δ_C 70,48] u prolinskom ostatku. Navedene korelacije ukazivale su na 11,13-dihidroeudefzma-1-en-12,6-olidnu strukturu aglikona jedinjenja **1**.

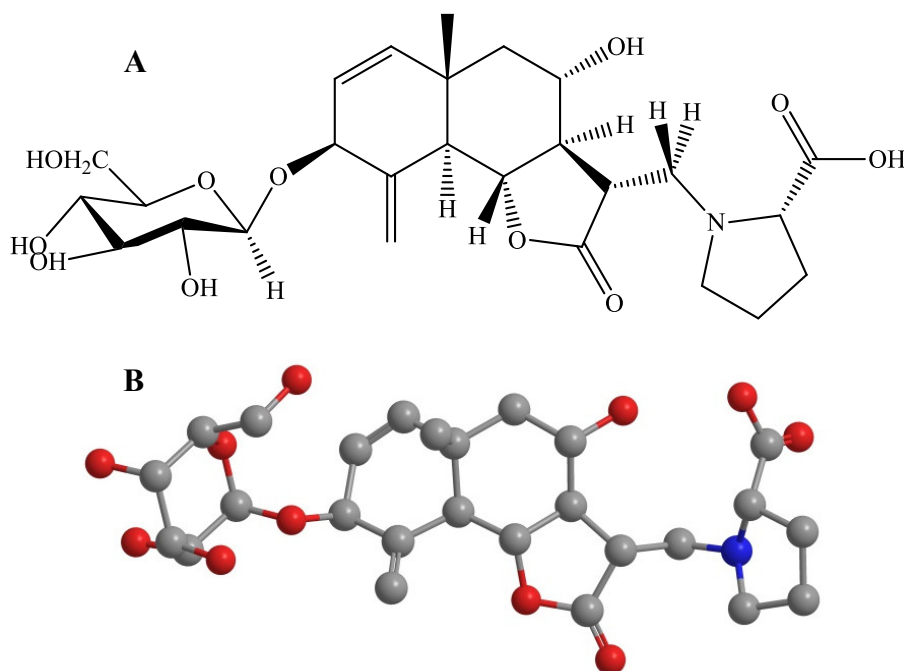
Relativna stereohemija jedinjenja 1

Relativna stereohemija jedinjenja **1** utvrđena je eksperimentima dekuplovanja i određivanjem vrednosti konstante spreznja protona H-5, H-6, H-7, H-8, H-9 α/β i H-11, kao i analizom njegovog NOESY spektra. Za razliku od male konstante vicinalnog spreznja protona (2 Hz) u strukturama sa *cis*-konfiguracijom vodonikovih atoma H-7 i H-8, npr. kod 8- β -hidroksi-dehidrozaluzanina C izolovanog iz ekstrakta (dietiletar:petroletar 1:3, *V/V*) korena *Andryala pinnatifida* Ait., Asteraceae (Bohlmann i Gupta, 1982), za jedinjenje **1** utvrđene su relativno visoke vrednosti konstanti J_{5-6} , J_{6-7} , J_{7-8} , J_{9-8} , J_{7-11} (9,3-12,6 Hz), što je ukazalo na veliko transdiaksialno spreznje, odnosno na H-5 (α), H-6 (β), H-7 (α), H-8 (β) konfiguraciju. Ovo je potvrđeno poređenjem sa vrednostima konstanti spreznja odgovarajućih protona (11,0-12,6 Hz) gutenbergina, eudezmanolida izolovanog iz CHCl₃ ekstrakta listova *Gutenbergia cordifolia* Benth. ex Oliv., Asteraceae (Fujimoto i sar., 1987). Transdiaksijalna konfiguracija H-5 do H-8 je dodatno potvrđena na osnovu NOESY spektra (**Slika P2.6** u Prilogu 2; **Slika 29**) analizom korelacija između H-5 [δ_H 2,57] i H-9 α [δ_H 1,41], H-6 [δ_H 4,52] i H-11, kao i H-6 i H-8. NOESY korelacije H-8 β i H-6 β sa protonima metil grupe (14-H₃) vezane u položaju C-10, kao i njihove međusobne korelacije, ukazuju na β -orijentaciju CH₃ grupe, odnosno α -orijentaciju OH grupe u položaju C-8. α -Orijentacija protona H-3 utvrđena je na osnovu korelacije ovog i protona H-5 u navedenom 2D spektru.



Slika 29. Odabrane HMBC (A, \rightarrow) i NOESY (B, \leftrightarrow) korelacije jedinjenja **1**.

Na osnovu navedenih podataka dobijenih analizom NMR i MS spektara, zaključeno je da je jedinjenje **1**: 3β -(β -glukopiranozil)-oksi- 8α -hidroksi- 13α -(N-prolil)-eudezma-1,4(15)-dien- $5\alpha,6\beta,7\alpha,11\beta$ H-12,6-olid. Ovo jedinjenje je prvi put izolovano i identifikovano u okviru ove doktorske disertacije i nazvano kalofilamin B po vrsti *H. calophyllum*. Na **Slici 30** prikazane su 2D i predložena 3D struktura ovog jedinjenja.



Slika 30. Struktura kalofilamina B (**1**), 2D (A) i 3D prikaz (B).

1.1.1.2. Jedinjenje 2

Jedinjenje **2** izolovano je u obliku belih čvrstih kristala (1,5 mg). Molekulska formula $C_{20}H_{27}NO_6$ određena je na osnovu m/z vrednosti 378,1916 protonovanog molekula $[M+H]^+$ (izračunato kao 378,1911 za $[M+H]^+ C_{20}H_{28}NO_6$), analizom HR-MS (ESI⁺) spektra (**Slika 31**). Analizom Q-TOF-MS/MS spektralnih podataka uočeni su signali fragmentnog jona na m/z 332,1865 $[M+H-HCOOH]^+$, kao i istih fragmentnih jona detektovanih u masenom spektru kalofilamina B (**1**) na m/z 128,0898 i 100,0950, koji odgovaraju N-metilprolinskoj strukturi. Analizom masenog spektra jedinjenja **2** takođe je uočena i jedna značajna razlika u odnosu na spektar jedinjenja **1**, a to je odsustvo glikozidne komponente (razlika u m/z vrednosti protonovanih molekula jedinjenja **1** i **2** iznosi 162 Da).

Kao što je navedeno u odeljku 4.1.1 dela Materijal i metode, jedinjenje **2** se tokom izvođenja NMR eksperimenata postepeno raspadalo. Snimani su 1D i 2D NMR spektri smeše jedinjenja **2** i njegovog degradacionog proizvoda **2a**, kao i spektri izolovanog degradacionog proizvoda **2a** što je olakšalo utvrđivanje strukture jedinjenja **2**.

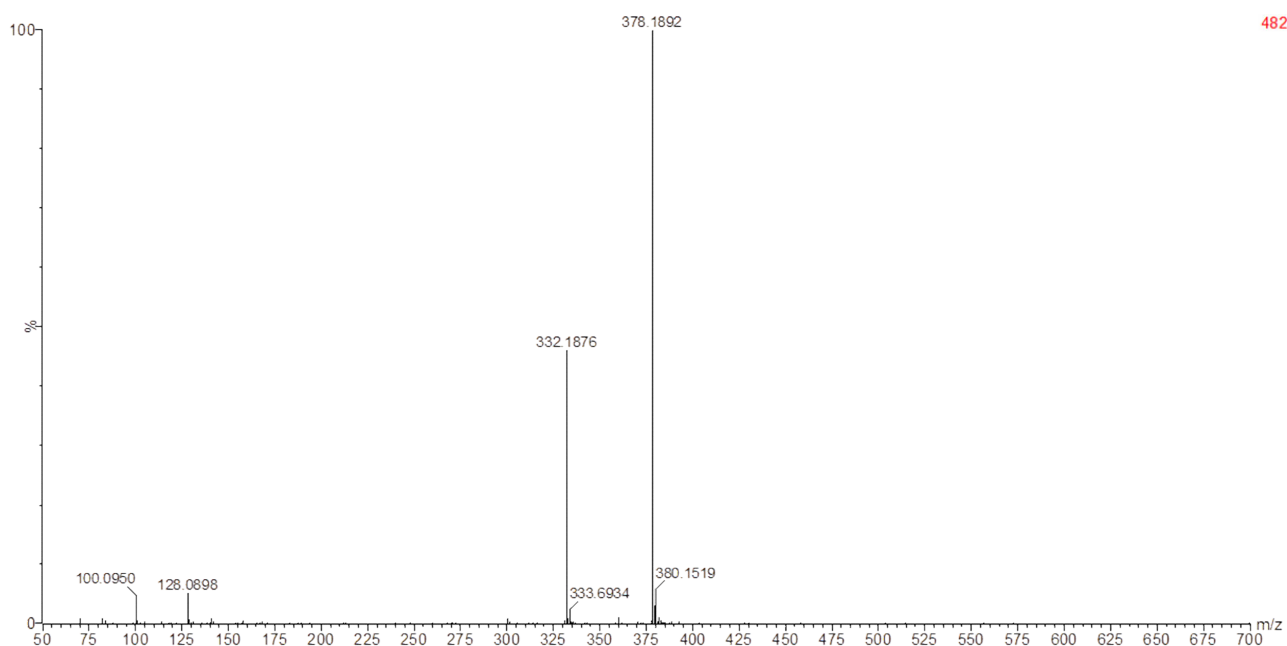
Interpretacija NMR spektara jedinjenja 2

U 1H i 2D NMR (HSQC i HMBC) spektrima smeše **2** i **2a** (**Tabela 20**³⁶, **Slike P2.7-10** u Prilogu 2) i 1H i 2D NMR (HSQC i HMBC) spektrima degradacionog proizvoda **2a** (**Tabela 21**) uočeni su karakteristični signali sledećih funkcionalnih grupa i/ili delova molekula:

- 1) dve sp^3 metilenske grupe (H- $2\alpha/\beta$, C-2; H- $9\alpha/\beta$, C-9) od kojih potiču protonski signali višeg reda (triplet dubleta i dublet dubleta) na 1,71-1,76; 2,22-2,35 i 2,33-2,79 ppm spregnuti sa

³⁶ U **Tabeli 20** su dati samo signali koji potiču od jedinjenja **2**.

- ugljenikovim atomima na hemijskim pomeranjima δ_C 36,98 (C-2 u jedinjenju **2**), 37,6 (C-2 u jedinjenju **2a**), 40,2 (C-9 u jedinjenju **2a**) i 42,87 (C-9 u jedinjenju **2**);
- dve sp^2 egzociklične metilenske grupe (H-14a/b, C-14; H-15a/b, C-15) koje karakterišu singlet na δ_H 5,10 spegnut sa ugljenikom C-14 [δ_C 115,34] i dva protonska singleta na δ_H 5,30 i 5,34 spregnuta sa ugljenikom C-15 [δ_C 110,59] u strukturi jedinjenja **2**; po dva protonska singleta na δ_H 5,04 i 5,16 spregnuta sa ugljenikom C-14 [δ_C 116,8], odnosno na δ_H 5,34 i 5,45 spregnuta sa ugljenikom C-15 [δ_C 112,4] u strukturi jedinjenja **2a**;
 - četiri kvaternarna ugljenikova atoma [δ_C 143,08 (C-10); 152,39 (C-4); 174,59 (C-1''); 177,75 (C-12); jedinjenje **2**];
 - dve sekundarne alkoholne grupe (H-3, C-3; H-8, C-8) koje se karakterišu protonskim tripletom na 4,63 ppm koji je spegnut sa ugljenikovim atomom na δ_C 72,25 (C-3; jedinjenje **2**), odnosno protonskim tripletom na 4,64 ppm spegnutim sa ugljenikovim atomom na δ_C 72,6 (C-3; jedinjenje **2a**); kao i protonskim signalima višeg reda na 4,09 (jedinjenje **2**), odnosno 4,06 ppm (jedinjenje **2a**) koji su spegnuti sa C-8 atomom na δ_C 71,2 (**2**), odnosno δ_C 70,93 (**2a**).



Slika 31. Q-TOF-MS/MS (ESI⁺) spektar jedinjenja **2**.

Utvrđeno je da je jedinjenje **2a** gvajanolid, čija struktura odgovara $3\beta,8\alpha$ -dihidroksi-gvajaja-4(15),10(14),11(13)-trien- $5\alpha,6\beta,7\alpha$ -12,6-olidu, odnosno dezacilcinaropikrinu, koji je prethodno izolovan iz EtOH ekstrakata nadzemnih delova *Sonchus leptocephalus* Cass., *S. microcarpus* (Boulos) U. Reifenb. & A. Reifenb., *S. arboreus* DC. i *S. capillaris* Svent.³⁷ (González i sar., 1985), iz MeOH ekstrakta nadzemnih delova *Crepis newii* subsp. *oliveriana* (Kuntze) C. Jeffrey & H. J. Beentje³⁸ (Ndom i sar., 2006), i iz EtOAc frakcije MeOH ekstrakta cele biljke *Himalaiella deltoidea* (Wall. ex DC.) Raab-Straube³⁹ (Xu i sar., 2012). ¹H i ¹³C NMR podaci dobijeni za dezacilcinaropikrin u okviru ove doktorske disertacije bili su u saglasnosti sa literaturnim podacima (Choi i sar., 2005).

Korelacije u HMBC spektru (Tabela 20, Slika P2.7 u Prilogu 2) između H-15a/b [δ_H 5,30; 5,34] i C-3 [δ_C 72,25], H-14a/b [δ_H 5,10; br s] i C-9 [δ_C 42,87], i H-9 α/β [δ_H 2,33; 2,79] i C-8 [δ_C 70,93], omogućile su da se potvrdi sličnost u gvajanolidnoj strukturi jedinjenja **2** i njegovog degradacionog produkta **2a**, kao i položaj sekundarnih alkoholnih grupa (C-3 i C-8) u strukturi oba jedinjenja.

³⁷ Autori su za ove vrste koristili sinonime *Taeckholmia pinnuta* (L. fil) Boulos, *T. microcarpa* Boulos, *T. arborea* (DC.) Boulos, odnosno *T. capillaris* (Svent.) Boulos (Greuter, 2006+).

³⁸ Autori su za ovu vrstu koristili sinonim *Crepis cameroonica* Bab. (Hassier, 2019).

³⁹ Autori su za ovu vrstu koristili sininim *Saussurea deltoidea* (DC.) Schulz-Bip. (Hassier, 2019).

Dodatno, na osnovu jasno vidljive korelacije H-6 [δ_H 4,37] i C-12 [δ_C 177,75] u istom spektru potvrđeno je prisustvo 6,12-laktonskih veza.

U NMR spektrima smeše jedinjenja **2** i **2a**, pored signala koji ukazuju na sličnosti u strukturi ova dva jedinjenja, uočeni su i signali koji odgovaraju samo određenim delovima molekula jedinjenja **2**, i to signali prolina (**Tabela 20**), sp^3 metinskog protona [δ_H 3,34] na C-11 [δ_C 43,03] i sp^3 metilenske grupe [δ_H 3,72 (H-13 α), 3,58 (H-13 β), δ_C 55,20 (C-13)], kao i signali koji odgovaraju samo određenim delovima molekula jedinjenja **2a**, i to signali sp^2 egzometilenske grupe iz α -metilen- γ -laktona [δ_H 6,16, 6,25; δ_C 123,7].

Tabela 20. 1H (500 MHz), ^{13}C (HSQC), HMBC, ROESY i COSY podaci jedinjenja **2** u D₂O

Položaj	δ_H (J izražena u Hz)	δ_C	HMBC	ROESY	COSY
Aglikon					
1	3,04 (d, 4,0)	43,95	2 α , 2 β , 5, 9 β		2 α , 2 β
2 α	1,71 (m)	36,98			1, 3
2 β	2,35 (m)			6, 9 β	3
3	4,63 (t, 8,2)	72,25	2 α , 15a, 15b	2 β , 5	2 α , 2 β , 15a
4	-	152,39 ^a	2 β , 3, 5, 15b		
5	3,01 (d, 11,6)	49,26	1, 2 α	7, 9 α , 15b	6, 8
6	4,37 (t, 9,6)	80,14	1, 5, 7	2 β , 8, 9 β , 11	7
7	2,49 (d, 9,5)	52,65	9 α , 9 β , 13 β	13 α	8
8	4,09 (m)	70,93	6, 9 α , 9 β	6, 9 β , 11, 13 α	5, 7
9 α	2,33 (dd, 14,6; 7,6)	42,87	14a, 14b		8
9 β	2,79 (dd, 13,1; 4,8)			2 β , 6, 8	8
10	-	143,08	1, 2 β , 5, 9 β		
11	3,34 (t, 7,7)	43,03	13 β		7, 13b
12	-	177,75	6, 11		
13a	3,72 (q, 7,7)	55,20	7, 11		11
13b	3,58 (q, 6,7)				11
14a	5,10 (br s)	115,34	9 α		
14b	5,10 (br s)				
15a	5,30 (s)	110,59			5
15b	5,34 (s)				3
Prolin					
1''	-	174,59	2''		
2''	4,15	70,15			
3''a	2,26 (q, 8,0)	28,50	2''		
3''b	2,45 (d, 9,9)				
4''a	2,01 (m)	23,31	3''a	3''a	5''a
4''b	2,22 (m)				5''b
5''a	3,32 (m)	55,01		13 α	4''b
5''b	3,93 (m)				

^aUstanovljeno iz HMBC spektra.

Relativna stereochemija jedinjenja 2

Analizom ROESY spektra smeše jedinjenja **2** i **2a** utvrđeno je da ova dva jedinjenja imaju istu relativnu stereochemiju. Korelacioni pikovi, uočeni u ROESY spektru jedinjenja **2**, između H-5 [δ_H 3,01] i H-9 α , H-5 i H-7 [δ_H 2,49], H-6 [δ_H 4,37] i H-11, H-6 i H-8 [δ_H 4,09], i H-8 i H-9 β ukazali su na H-5(α), H-6(β), H-7(α), H-8(β) konfiguraciju, na osnovu čega je utvrđena α -orijentacija OH grupe u poziciji C-8, kao i u slučaju jedinjenja **1**. Na osnovu korelacija H-5 i H-3 u ovom spektru utvrđena je i α -orijentacija H-3 protona (**Tabela 20**, **Slika 32**).

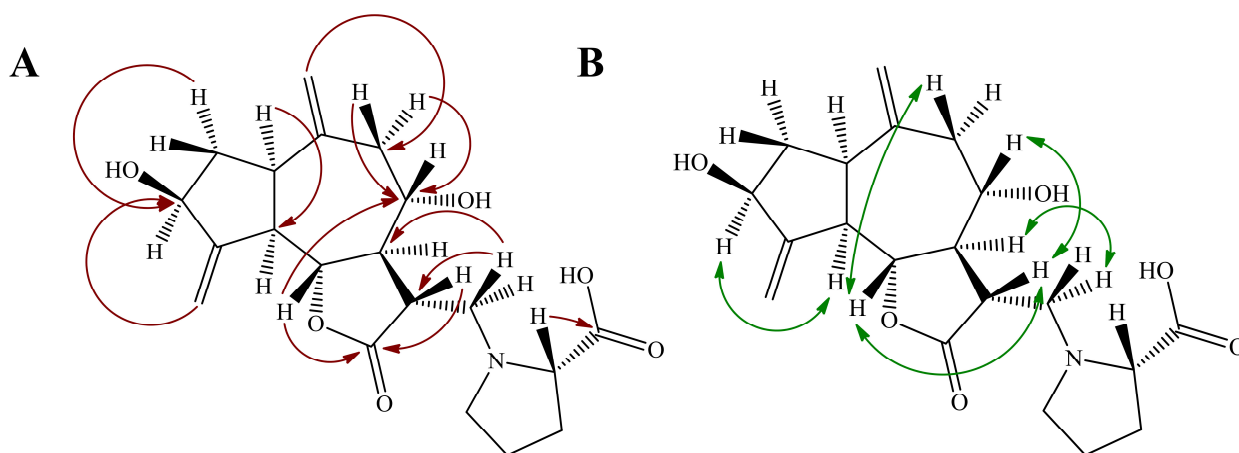
Protonski i ugljenični spektralni podaci jedinjenja **2** su slični odgovarajućim literaturnim podacima za strukturno bliska jedinjenja, pulhelamine A-G, aminokiselinske konjugate gvajanolida

izolovane iz *n*-BuOH frakcije MeOH ekstrakta herbe *Saussurea pulchella* (Fisch.) Fisch. ex Colla (Yang i sar., 2008). U slučaju pulhelamina A, B i D-G razlika se ogleda u tome što su signali koji potiču od ostataka L-asparaginske kiseline, 4-aminobutanske kiseline, fenilalanina, valina, triptofana i izoleucina, redom (sve aminokiseline su L-konfiguracije), kod jedinjenja **2** zamenjeni signalima prolina koji je vezan za sp^3 metilenski ugljenik C-13. U molekulu pulhelamina C (konjugat 8α -*O*-(2',3'-dihidroksi-3'-metilbutiril)-dezacilcinaropikrina i L-prolina), elektroni kiseonika iz supstituisane sekundarne OH grupe su rezonantno stabilizovani karbonilnom grupom (aciloksi grupa u pulhelaminu C u položaju C-8), čime je smanjena lokalna dijamagnetna zaštita protona H-8. U strukturi jedinjenja **2**, usled prisustva deacilovane OH grupe, gubi se rezonantna stabilnost elektrona kiseonika te na proton i ugljenik deluje jače magnetno polje, što biva praćeno dijamagnetnim efektom. Sve je to uslovalo da se u odgovarajućim spektrima jedinjenja **2** signali H-8 i C-8 uočavaju na nižim hemijskim pomeranjima ($\Delta_H = -1,25$ ppm; $\Delta_C = -7,1$ ppm) u odnosu na spektre pulhelamina C.

Tabela 21. ^1H (500 MHz), ^{13}C (HSQC) i HMBC podaci jedinjenja **2a** u D_2O

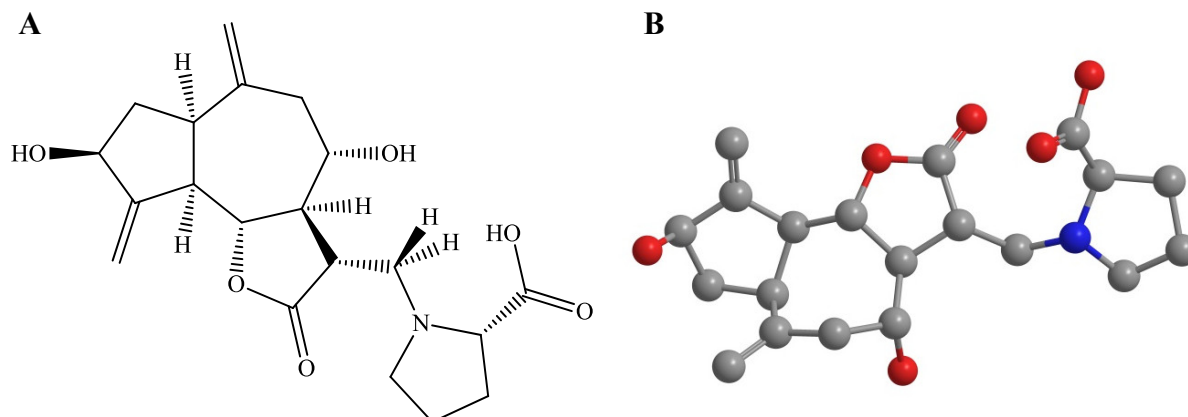
Položaj	δ_H (J izražena u Hz)	δ_C	HMBC
1	3,06 (m)	44,7	9α , 14a, 14b
2α	1,76 (td, 11,9; 9,2)	37,6	1
2β	2,22 (td, 13,5; 7,0)		
3	4,64 (t, 6,2)	72,6	
4	-	151,6 ^a	2β
5	2,99 (q, 9,9)	50,1	2β , 15a
6	4,36 (t, 9,8)	79,6	8
7	3,00 (t, 9,8)	49,3	6, 13a, 13b
8	4,06 (dd, 7,6; 4,7)	71,2	
9α	2,33 (dd, 14,6; 3,8)	40,2	14a, 14b
9β	2,72 (dd, 13,6; 4,9)		
10	-	141,6 ^a	9β
11	-	140,7 ^a	7
12	-	173,0 ^a	13a, 13b
13a	6,16 (d, 3,0)	123,7	
13b	6,25 (d, 3,4)		
14a	5,04 (s)	116,8	
14b	5,16 (s)		
15a	5,34 (s)		
15b	5,45 (s)	112,4	

^aUstanovljeno iz HMBC spektra.



Slika 32. Odabrane HMBC (A, →) i ROESY (B, ↔) korelacije jedinjenja **2**.

Utvrđeno je da jedinjenje **2** predstavlja $3\beta,8\alpha$ -dihidroksi- 13α -(N-prolil)-gvaja-4(15),10(14)-dien- $5\alpha,6\beta,7\alpha,11\beta$ H-12,6-olid. Jedinjenje **2** je, kao i jedinjenje **1**, novo za nauku i nazvano je kalofilamin A po biljnoj vrsti iz koje je izolovano. Na **Slici 33** prikazane su 2D i predložena 3D struktura ovog jedinjenja.

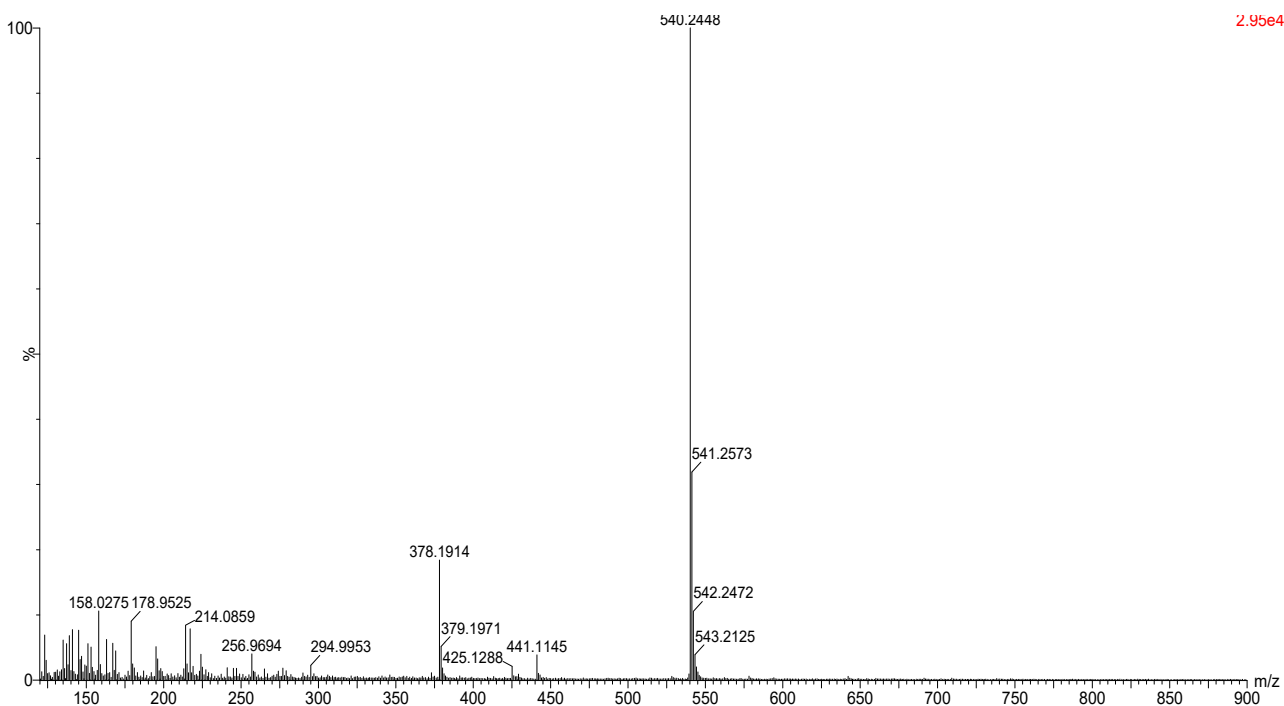


Slika 33. Struktura kalofilamina A (**2**), 2D (**A**) i 3D prikaz (**B**).

1.1.1.3. Jedinjenje 3

Jedinjenje **3** izolovano je kao beli kristalni prah (3 mg), $[\alpha]_D = -3,6$ ($c=1,2$ mol/L; voda). HR-MS analizom određena je molekulska formula jedinjenja **3**, $C_{26}H_{37}NO_{11}$ na osnovu m/z vrednosti 540,2456 protonovanog molekula $[M+H]^+$ (izračunato kao 540,2439 za $[M+H]^+$ $C_{26}H_{38}NO_{11}$), analizom HR-MS (ESI⁺) spektra.

Fragmentaciona shema jedinjenja **3** slična je jedinjenju **1**, ali je zastupljenost fragmentnih jona veća u tandem masenom spektru jedinjenja **3**. S obzirom da su spektri snimani pod istim eksperimentalnim uslovima ova razlika može biti od značaja za dijagnostiku. Signal na m/z 378,1885 (**Slika 34**) odgovara fragmentnom jonu koji nastaje nakon gubitka dehidroglukoze (neutralni gubitak 162 Da), dok signal na m/z 425,1288 potiče od fragmentnog jona koji nastaje gubitkom prolinskog dela molekula i u osnovi predstavlja deprotonovani molekul jedinjenja **4**.



Slika 34. Q-TOF-MS/MS (ESI⁺) spektar jedinjenja **3**.

Interesantno je istaći da molekul jedinjenja **4** u jonskom izvoru gradi adukt⁴⁰ jon sa Na⁺ umesto protonovanog molekula i da njegova fragmentacija uključuje klasične gubitke ugljovodoničnih ostataka, kao i gubitke molekula vode (neutralni gubitak od 18 Da), koji su zastupljeni u fragmentaciji laktona i alifatičnih, cikličnih alkohola (Pretsch i sar., 2000).

U istom masenom spektru jedinjenja **3**, signali na m/z 128,0696 i 100,0950 odgovaraju, kao i u slučaju jedinjenja **1** i **2**, sp^3 metilenprolinskom (Pro(N)-CH₂-) delu molekula, pri čemu signal na m/z 100,0950 potiče od neutralnog gubitka 28 Da, što odgovara formuli CH₂N. Analiza masenog spektra jedinjenja **3** ukazuje na to da je u pitanju, kao i u slučaju jedinjenja **1**, konjugat heksozida seskviterpenskog laktona i aminokiseline prolina, ali i da se struktura aglikona, odnosno seskviterpenskog jezgra razlikuje u odnosu na jedinjenje **1**. Poređenjem sa masenim spektrom jedinjenja **2**, uočena je strukturna sličnost nešećernog dela molekula jedinjenja **3** i jedinjenja **2**.

Jedinjenje **3** se, kao i jedinjenje **2**, postepeno raspadalo u D₂O tokom snimanja NMR spektara. LC-MS semipreparativno razdvajanje smeše degradacionih proizvoda jedinjenja **3** rezultovalo je izolovanjem jedinjenja **4**, koje je na osnovu NMR i MS podataka identifikovano kao 3 β -(β -D-glukopiranozil)-oksi-8 α -hidroksi-gvaja-4(15),10(14),11(13)-trien-5 α ,6 β ,7 α -12,6-olid, tj. krepizid E (Fontanel i sar., 1999; Miyase i sar., 1985; 1987). Jedinjenje **4** je prvi put izolovano iz MeOH ekstrakta cele biljke *Youngia japonica* (L.) DC., Asteraceae (Miyase i sar., 1985). Analiza 1D i 2D NMR spektara jedinjenja **4** pomogla je utvrđivanju strukture jedinjenja **3**. ¹H, ¹³C, i odgovarajući 2D NMR spektralni podaci jedinjenja **3** dati su u **Tabeli 22** (**Slike P2.11-16** u Prilogu 2), a jedinjenja **4** u **Tabeli 23** (**Slike P2.17-22** u Prilogu 2).

Interpretacija NMR spektara jedinjenja 3

U ¹H i ¹³C NMR spektrima jedinjenja **2** i **3**, kao i **3** i **4**, uočena su značajna preklapanja signala. Na **Slikama 35** i **36** istaknute su sličnosti i razlike u slučaju ¹H spektara jedinjenja **2** i **3**, odnosno **3** i **4**. Naime, ovi spektri, kao i odgovarajući 2D NMR spektri jedinjenja **3** sadrže dodatne signale u odnosu na spektre jedinjenja **2**, i to signale protona sekundarnih alkoholnih grupa (H-1', C-1'; H-2', C-2'; H-3', C-3'; H-4', C-4'; H-5', C-5'; H-6' α/β , C-6') na hemijskim pomeranjima u opsegu δ_H 3,28-4,53 i δ_C 60,87-100,99, koji ukazuju na prisustvo glukoze (kao što je to slučaj i kod jedinjenja **1** i **4**). Na osnovu ovih podataka može se pretpostaviti da je jedinjenje **3** glukozid kalofilamina A (**2**). U odnosu na spektre jedinjenja **4**, spektri jedinjenja **3** sadrže signale koji se odnose na N-metilprolin (C-13, H-13 α/β ; C-1"; H-2", C-2"; H-3"a/b, C-3"; H-4"a/b, C-4"; H-5"a/b, C-5"), sa hemijskim pomeranjima δ_H 1,98-3,64 i δ_C 23,53-175,21, umesto signala egzometilenske grupe α -metilen- γ -laktona [δ_H 6,10 (H-13 α), 6,13 (H-13 β), δ_C 121,04 (C-13)].

Kao i u slučaju kalofilamina A (**2**), HSQC, HMBC i ROESY korelacije (**Tabela 22**, **Slike 37** i **P2.11**, **P2.12** i **P2.16** u Prilogu 2) snimljene za jedinjenje **3**, ukazuju na gvajanolidnu strukturu dehidrokostus laktona tipa. Osnovni ugljovodonični ciklus je oksidovan u položajima C-3 [δ_C 80,93] i C-8 [δ_C 70,35]. Prolin je uveden u molekul seskviterpenskog laktona Michael-ovom adicijom na egzometilensku grupu u položaju C-13 α -metilen- γ -laktona, što se može zaključiti na osnovu HMBC korelacije H-13 β [δ_H 3,84] iz seskviterpenskog i C-2" [δ_C 69,75] iz prolinskog dela molekula.

Relativna stereochemija jedinjenja 3

Zbog značajne sličnosti u NMR spektralnim podacima kalofilamina A (**2**) i jedinjenja **3** moglo se pretpostaviti da ova dva jedinjenja imaju istu relativnu stereochemiju. Ova pretpostavka je potvrđena eksperimentima dekuplovanja i određivanjem vrednosti konstante vicinalnog sprezanja protona H-5, H-6, H-7, H-8 i H-9 α/β u ¹H NMR spektru jedinjenja **3** (**Tabela 22**), kao i postojanjem karakterističnih korelacija u njegovom ROESY spektru (**Slika 38**), i to između H-5 [δ_H 2,30] i H-7

⁴⁰ HR-MS m/z : 447,1645 [M + Na]⁺ (izračunato kao 447,1625 za [M + Na]⁺ C₂₁H₂₈O₉Na), Q-TOF-MS/MS (25 eV) m/z (rel. int.): 263,1304 (29); 245,1204 (16); 227,1058 (100); 217,1268 (57); 209,1308 (14); 201,1261 (14); 199,1140 (62); 183,1078 (11); 181,104 (72); 175,0810 (5); 171,1170 (55); 143,0926 (12); 131,0869 (19).

$[\delta_{\text{H}} 2,89]$, i između H-7 i H-11 $[\delta_{\text{H}} 3,24]$. Dodatno ROESY korelacija H-8 β $[\delta_{\text{H}} 4,01]$ i H-9 β $[\delta_{\text{H}} 2,69]$ ukazala je na α -orijentaciju OH grupe u položaju C-8. α -Orijentacija protona H-3 utvrđena je postojanjem korelacije ovog i protona H-5 u istom 2D spektru.

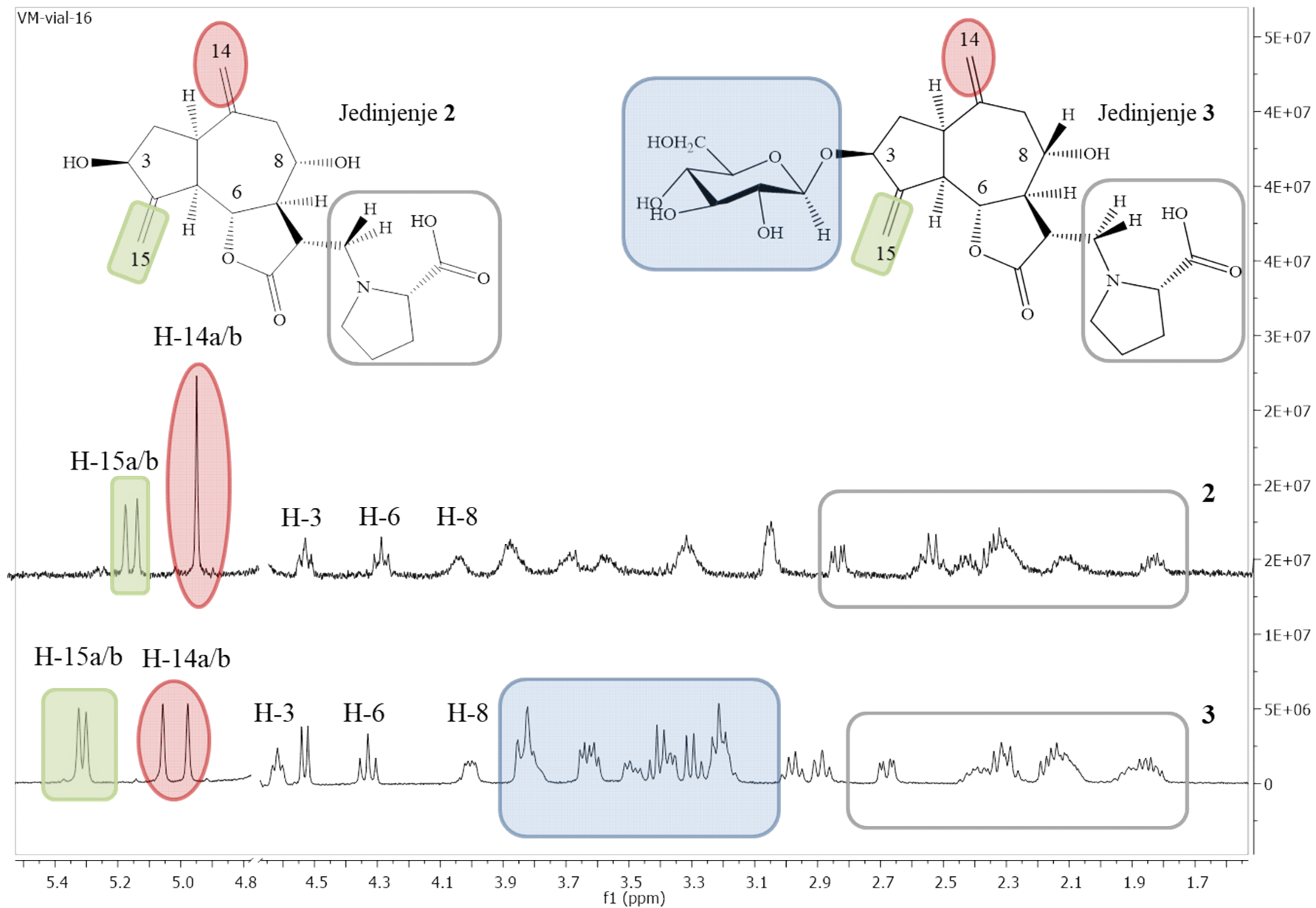
Slično kao u slučaju kalofilamina B (1), položaj glikozilacije određen je na osnovu HMBC korelacija anomernog protona H-1' $[\delta_{\text{H}} 4,53]$ u molekulu glukoze i C-3 atoma $[\delta_{\text{C}} 80,93]$ seskviterpenskog jezgra, dok je na osnovu velike konstante kuplovanja (7,9 Hz) anomernog protona određena njegova β -konfiguracija. To je dodatno potvrdila i jasna ROESY korelacija između H-1' $[\delta_{\text{H}} 4,53]$ i H-3 $[\delta_{\text{H}} 4,62]$.

Tabela 22. ^1H (400 MHz), ^{13}C (101 MHz), DEPT, ROESY i HMBC podaci jedinjenja 3 u D₂O

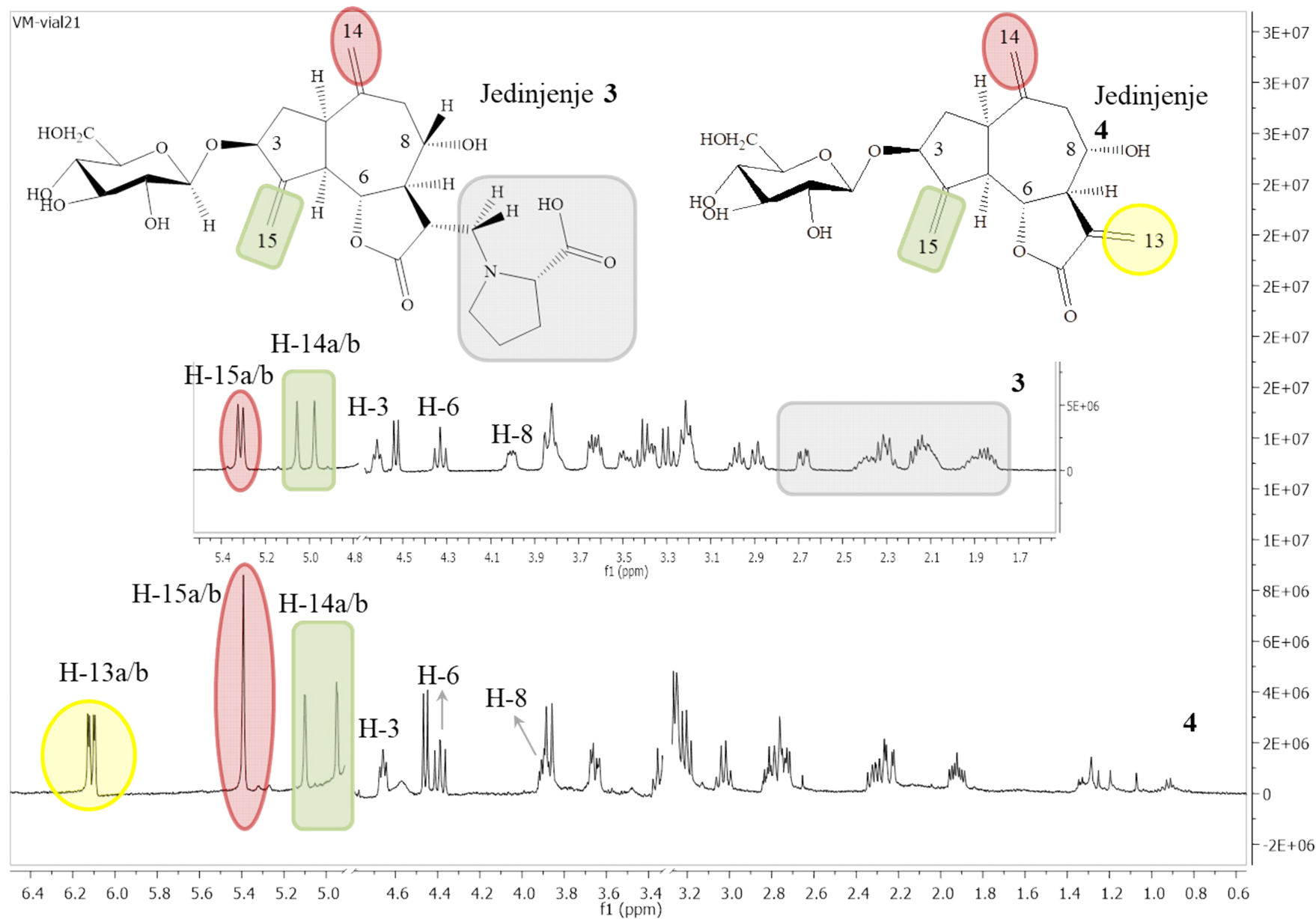
Položaj	δ_{H} (J u Hz)	δ_{C}	ROESY	HMBC
Aglikon				
1	2,97 (q, 8,2)	43,90	1, 2 β , 14b	2 α , 3, 7, 9 β , 14a, 14b
2 α	1,84 (td, 14,17; 7,2)	36,48	9 α	1
β	2,31 (td, 13,2; 8,1)		3	
3	4,62 (t, 6,7)	80,93	5, 15b, 1'	1, 2 α , 2 β , 15a, 15b, 1'
4	-	148,81		3, 6, 7, 15a, 15b
5	2,30 (t, 9,3)	53,20	1, 3, 7, 11,	
6	4,33 (t, 10,1)	80,29	15a, 5''b	9 β
7	2,89 (t, 9,8)	49,67	5, 15b	1, 5, 6, 9 β , 15a, 15b
8	4,01 (dd, 9,7; 4,0)	70,35	9 β	
9 α	2,21 (dd, 13,9; 4,9)	42,80		
β	2,69 (dd, 14,0; 4,8)		14a, 6' β	
10	-	143,25		1, 2 α , 9 α , 9 β , 14b
11	3,24 (t, 8,4)	43,18	7, 9 β	13 α
12	-	177,61		11
13 α	3,23 (dd, 11,2; 2,3)	55,33		
β	3,84 (dd, 8,4; 1,8)			
14 a	4,98 (s)	116,33	9 β , 3''a	1, 9 α , 9 β
b	5,06 (s)		1, 2 α , 3	
15 a	5,37 (s)	114,64	6	3
b	5,40 (s)		3, 5, 1'	
Glukoza				
1'	4,53 (d, 7,9)	100,99	1, 15b 3', 5'	3, 3', 4'
2'	3,34 (d, 9,4)	75,87		1', 3', 4', 6' α
3'	3,88	73,18	1'	1', 4'
4'	3,40 (t, 8,9)	70,44		
5'	3,28 (t, 9,2)	73,23		
6' α	3,63 (t, 5,2)	60,87		4'
β	3,89 (dd, 13,6; 1,3)		6, 9 β	
Prolin				
1''	-	175,21		
2''	3,36 (dd, 6,9; 1,8)	69,75		13 β , 5''a, 5''b
3'' a	2,20 (m)	28,90		4''a, 4''b
b	2,47 (m)		4''b	
4'' a	1,98 (m)	23,53		
b	2,16 (m)		3''b	
5'' a	3,49 (dd, 12,7; 6,5)	55,51		
b	3,64 (dd, 11,3; 6,2)			

Tabela 23. ^1H (400 MHz), ^{13}C (101 MHz), DEPT, HMBC, TOCSY, COSY i NOESY podaci jedinjenja 4

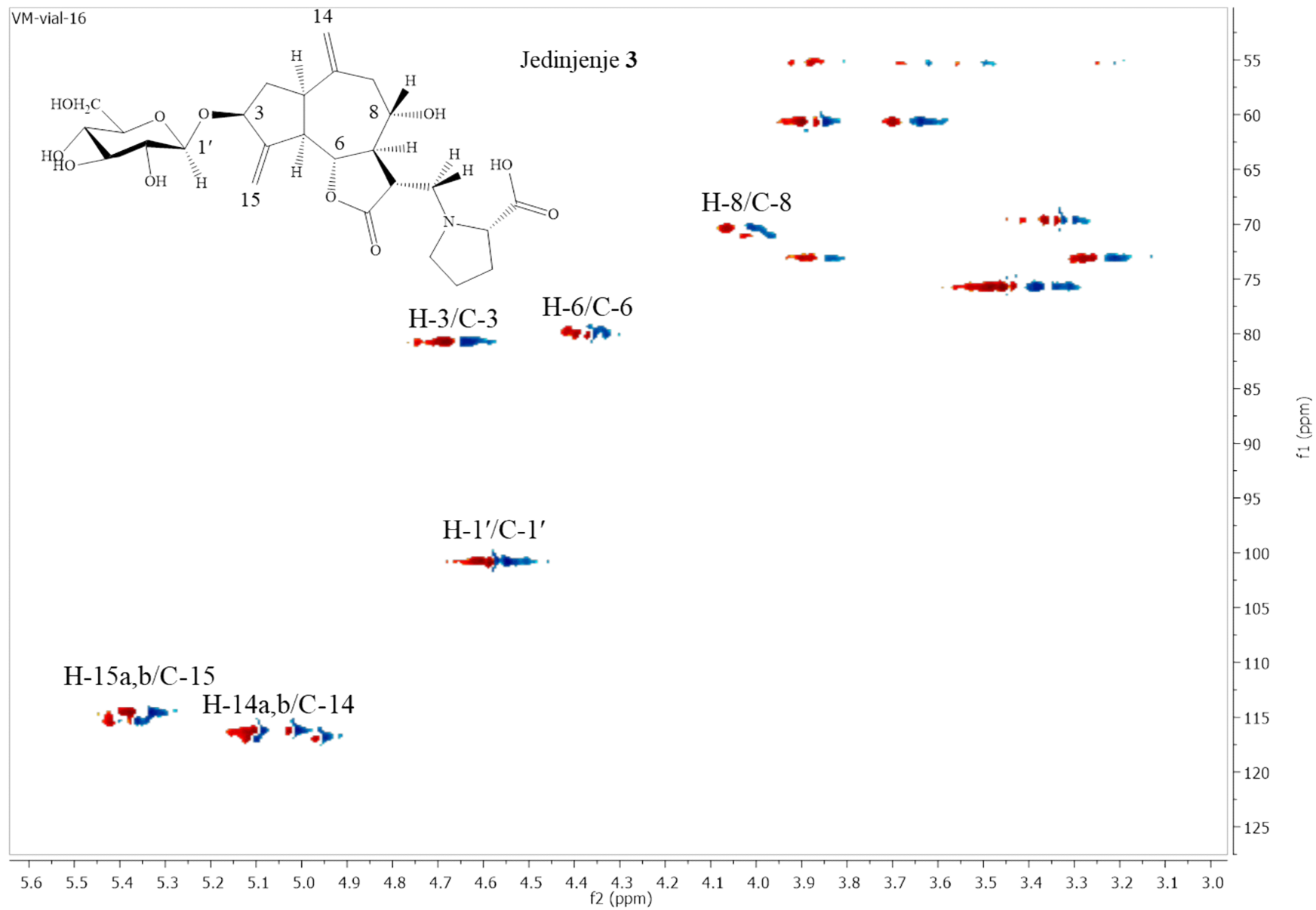
Položaj	(DMSO-d ₆)					(MeOH-d ₄) (298K)			
	δ_{H} (J u Hz)	δ_{C}	HMBC	TOCSY	COSY	δ_{H} (J u Hz)	δ_{C}	HMBC	NOESY
1	2,91 (dd, 17,8; 9,0)	45,11	9 α/β , 14a/b	2 α , 9 α , 5, 6, 8, 3, 15a/b, 13a/b	2 α/β , 5, 14b	3,03 (q, 9,2)	46,14	2, 14a/b	
2	A 1,72 (dd, 20,1; 9,9)	37,71			2 β , 3, 5, 6, 8, 15a/b	2 β , 1, 3, 6'	1,92 (m)		9 α
	B 2,18 (dd, 20,7; 6,7)				2 α , 1, 5, 8	2 α , 1, 3	2,28 (m)	37,42	14a/b
3	4,47 (t, 6,8)	79,69	6, 15a/b	2 α/β , 1, 5, 6, 8, 15a/b	2 α/β , 15a/b	4,66 (t, 6,2)	79,56	15a/b	2 α
4	-	149,80	2 β , 3, 5, 6, 15a/b			-	148,77	15a/b	
5	2,75 (dd, 12,1; 6,6)	50,82	1, 15a, 15b		1, 8, 6, 13a/b, 15a/b	2,76 (t, 9,8)	52,44	15a/b	
6	4,25 (dd, 15,9; 8,9)	78,78	3, 5, 7, 1', 2'	2 α , 9 α , 5, 6, 8, 3, 15a/b, 13a/b	5, 14a	4,39 (t, 9,8)	78,78	1, 7, 15a/b	
7	2,91 (dd, 17,8; 9,0)	50,02	8, 9 α/β , 13a/b			2,81 (dt, 9,0; 3,3)	50,18	13a	
8	3,77 (s)	71,16	6, 9 α/β	3, 6, 7, 9 α/β , 13a/b	7, 9 α/β	3,89 (dd, 11,4; 6,5)	71,56	6	9 α , 6
9	A 2,23-2,07 (m)	41,80			9 β , 5, 6, 8, 13a/b, 14a/b	9 β , 8	2,24 (dd, 13,7; 3,8)	40,61	2 α
	B 2,59 (dd, 13,3; 4,9)				9 α , 6, 8, 13a/b, 14a/b	9 α , 8	2,73 (dd, 13,1; 4,8)		
10	-	144,23	1, 2 α/β , 8, 9 α/β			-	143,44	9 α	
11	-	140,13	7, 8, 13a/b			-	139,70	13a	
12	-	169,95	13a/b			-	170,68	13a	
13	a 6,02 (d, 14,3)	121,62	7		5, 6, 7, 8, 9 α/β	6,10 (d, 3,0)	121,04		
	b 6,02 (d, 14,3)					6,13 (d, 3,5)			
14	a 5,00 (s)	116,24	1, 2 β , 9 α/β			4,95 (d, 1,7)	115,87		
	b 4,86 (s)					5,10 (d, 1,5)			
15	a 5,34 (s)	113,44			2 α/β , 1, 3, 5	5,39 (br s)	114,36		
	b 5,25 (s)				2 α/β , 1, 3, 5	5,39 (br s)			
1'	4,25 (dd, 15,9; 8,9)	102,12	3, 2'			4,46 (d, 7,8)	100,64	3'	3', 5'
2'	3,00 (dd, 18,9; 9,3)	73,95			1'	3,20 (t, 8,5)	73,84	4'	
3'	3,14 (d, 6,0)	77,28	1', 4'		6' α	3,23 (d, 18,7)	76,50	2'	
4'	3,02 (dd, 18,9; 9,3)	70,65				3,27 (t, 9,4)	70,43	5'	
5'	3,17 (s)	77,32				3,35 (t, 9,5)	76,82		
6'	α 3,67 (d, 11,5)	61,62	5'			6' β	3,65 (d, 9,6)	61,45	
	β 3,42 (dd, 11,5; 5,5)				6' α	3,87 (d, 9,8)			



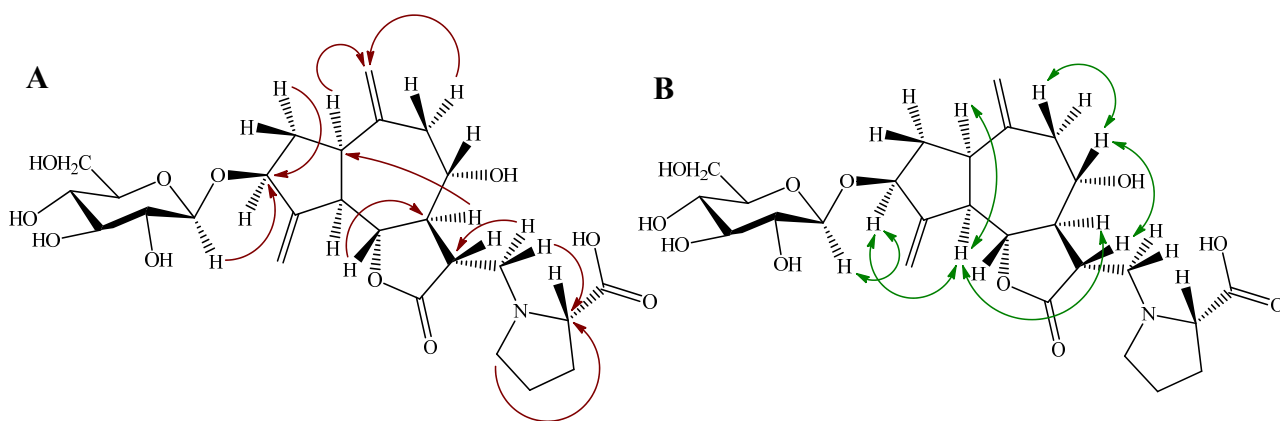
Slika 35. Uporedni prikaz karakterističnih ^1H (500 MHz) NMR signala jedinjenja 2 i ^1H (400 MHz) NMR signala jedinjenja 3, snimljenih u D_2O .



Slika 36. Uporedni prikaz karakterističnih ^1H (400 MHz) NMR signala jedinjenja **3**, snimljenih u D_2O i **4**, snimljenih u MeOH-d_4 .

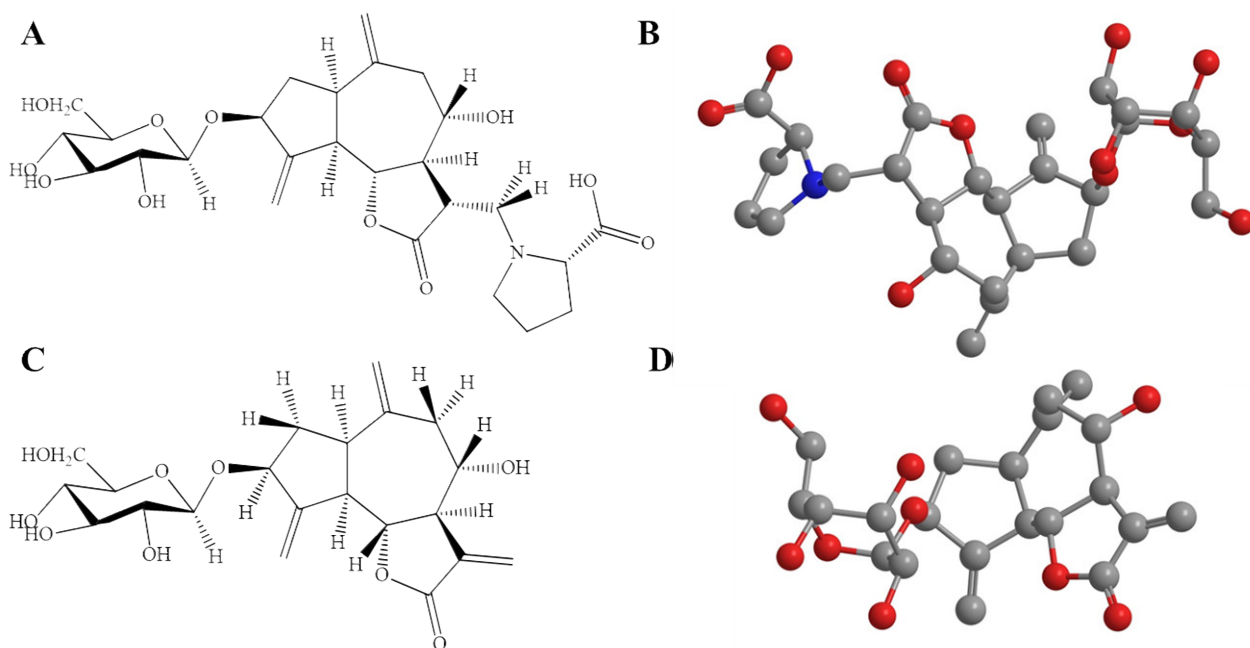


Slika 37. Karakteristične korelacije u HSQC spektru jedinjenja 3.



Slika 38. Odabrane HMBC (A, →) i ROESY (B, ↔) korelacije jedinjenja **3**.

Jedinjenje **3** ima istu molekulsku formulu kao i ikserisamin A, seskviterpenski lakton koji je prethodno izolovan iz MeOH ekstrakta cele biljke *Ixeris dentata* (Thunb. ex Thunb.) Nakai (Cha i sar., 2012). Detaljnom analizom NMR spektara jedinjenja **3** zaključeno je da je ovo novo (do sada neopisano) jedinjenje zapravo 8-epimer ikserisamina A, tj. 3 β -(β -glukopiranozil)-oksi-8 α -hidroksi-13 α -(N-prolil)-gvaja-4(15),10(14)-dien-5 α ,6 β ,7 α ,11 β H-12,6-olid i stoga je nazvano 8-epi-ikserisamin A.



Slika 39. Strukture 8-epi-ikserisamina A (**3**) (A - 2D, B - 3D prikaz) i krepizida E (**4**) (C - 2D, D - 3D prikaz).

U strukturi jedinjenja **1** i **3** ostatak glukoze je najverovatnije D-konfiguracije, dok je prolin u strukturi jedinjenja **1**, **2** i **3** L-konfiguracije, uzimajući u obzir strukture sličnih seskviterpenskih laktona identifikovanih u vrstama drugih rodova porodice Asteraceae (Cha i sar., 2012; Demir i sar., 2017; Labeled i sar., 2019; Matsuda i sar., 2003; Perveen i sar., 2018; Shi i sar., 2011; Yang i sar., 2008, 2016; Yoshikawa i sar., 1993; Yu i Zhong-Jian, 1989; Zaima i sar., 2014). Naime, iz MeOH ekstrakta cele biljke *I. dentata*, pored ikserisamina A, izolovan je i ikserisamin B, glukozid adukta gvajanolida i L-alanina (3 β -(β -glukopiranozil)-8 β -hidroksi-13-(N-L-alanil)-gvaja-4(15),10(14)-dien-1 α ,5 α ,6 β ,7 α ,11 β H-12,6 α -olid) (Cha i sar., 2012). Amino derivati partenolida, garcinamin A (13-L-fenilalanin-9 α -hidroksipartenolid), garcinamin B (13-L-valin-9 α -hidroksipartenolid), garcinamin C (13-L-prolin-9 α -

hidroksipartenolid) i garcinamin D (13-L-prolin-9 β -hidroksipartenolid) izolovani su iz EtOH (80%, *V/V*) ekstrakta lista *Anvillea garcinii* (Burm. f.) DC. (Perveen i sar., 2018), a centaureolidi A (13-L-prolin derivat salonitenolida) i B (13-L-prolin derivat artemiziiifolina) iz MeOH (70%, *V/V*) ekstrakta cvasti *Centaurea pungens* Pomel (Labeđ i sar., 2019). Iz EtOH (95%, *V/V*) ekstrakta korena vrste *Scorzonera divaricata* Turcz. izolovan je sulfoskorzonin C (1R,5S,6S,7R,8S,13S)-8-sulfoksi-13-(L-prolil)-gvaja-4(15),10(14)-dien-6 α ,12-olid (Yang i sar., 2016). Iz MeOH ekstrakta korena *Aucklandia costus* Falc.⁴¹ izolovani su sausureamini A-E: 13-amino adukti L-prolina i kostunolida (germakranolid; A), dehidrokostus laktona (gvajanolid; B), santamarina (eudezmanolid; D) i rejnozina (eudezmanolid; E), kao i L-asparaginske kiseline i dehidrokostus laktona (C) (Matsuda i sar., 2003; Yoshikawa i sar., 1993), dok je iz EtOH ekstrakta herbe *Saussurea involucreta* (Kar. & Kir.) Sch. Bip. izolovan involukratin (13-amino adukt prolina i dehidrokostus laktona, sa nepoznatom konfiguracijom na C-13) (Yu i Zhong-Jian, 1989). Iz EtOH (70%, *V/V*) ekstrakta cele biljke *Crepidiastrum sonchifolium* subsp. *sonchifolium*⁴² izolovani su 11,13-dihidro-13-prolil-ikserin Z i 11,13-dihidro-13-prolil-ikserin Z₁ (glukozidi gvajanolida) (Shi i sar., 2011). Iz MeOH ekstrakta korena *Inula helenium* L. izolovan je izohelprolin, adukt izohelenina i L-prolina (Zaima i sar., 2014), dok je iz MeOH ekstrakta herbe *Centaurea polyclada* DC. izolovan 13-N-prolin melitenzin (Demir i sar., 2017).

U eksperimentima izvedenim u okviru ove doktorske disertacije, kao što je već navedeno, jedinjenja **2** i **3** su se spontano razgradila, a analiza njihovih degradacionih proizvoda značajno je doprinela identifikaciji izolovanih jedinjenja. Ranije je identifikacija određenih konjugata aminokiseline i seskviterpenskih laktona takođe delom izvršena na osnovu strukture proizvoda njihove razgradnje (u tim slučajevima degradacioni proizvodi dobijeni su namerno indukovanim hemijskim reakcijama) (Cha i sar., 2012; Demir i sar., 2017; Perveen i sar., 2018; Yang i sar., 2016).

1.1.1.4. Jedinjenje 4.

Jedinjenje **4**, tj. 3 β -(β -D-glukopiranozil)-oksi-8 α -hidroksi-gvaja-4(15),10(14),11(13)-trien-5 α ,6 β ,7 α -12,6-olid, trivijalnog imena krepizid E, osim što je izolovano i identifikovano kao razgradni proizvod jedinjenja **3**, izolovano je i iz vodene frakcije MeOH ekstrakta cvasti *H. calophyllum*. Krepizid E je izolovan kao braonkasta masa polučvrste konzistencije (5 mg) [α]_D = +24,3 (c=1,2 mol/L; MeOH). Struktura ovog jedinjenja je utvrđena analizom njegovih MS i NMR spektara, kao i poređenjem ovih spektralnih podataka sa podacima iz literature (Fontanel i sar., 1999; Miyase i sar., 1985, 1987). Relativna stereohemija je utvrđena na osnovu karakterističnih korelacija u HMBC i NOESY spektrima (**Tabela 23**, **Slike P2.19** i **22** u Prilogu 2). Eksperimentalno određena optička rotacija odgovarala je literaturno dostupnoj vrednosti za krepizid E (Miyase i sar., 1985). Krepizid E prethodno je identifikovan u samo šest vrsta familije Asteraceae, tj. u nepolarnom ekstraktu (cikoheksan:Et₂O:H₂O 1:1:1, *V/V/V*) herbe *Crepis incana* Sibth. & Sm. (Barda i sar., 2018), MeOH ekstraktu cele biljke *Youngia japonica*⁴³ (Lee i sar., 2015; Miyase i sar., 1985), vodenom ekstraktu (dekoktu) sveže biljke *Nabalus acerifolius* Maxim.⁴⁴ (Miyase i sar., 1987), acetonskom ekstraktu mlečnog soka *Lapsana communis* L. subsp. *communis* (Fontanel i sar., 1999), zatim u EtOH ekstraktu (95%, *V/V*) cele biljke *Ainsliaea macrocephala* (Mattf.) Y.C. Tseng (Wu i sar., 2011), i EtOH ekstraktu korena *Elephantopus scaber* L. (Hisham i sar., 1992).

⁴¹ Autori su za ovu vrstu koristili sinonim *Saussurea lappa* (DC.) Sch. Bip. (Hassler, 2019).

⁴² Autori su za ovu vrstu koristili sinonim *Ixeris sonchifolia* (Maxim.) Hance (Hassler, 2019).

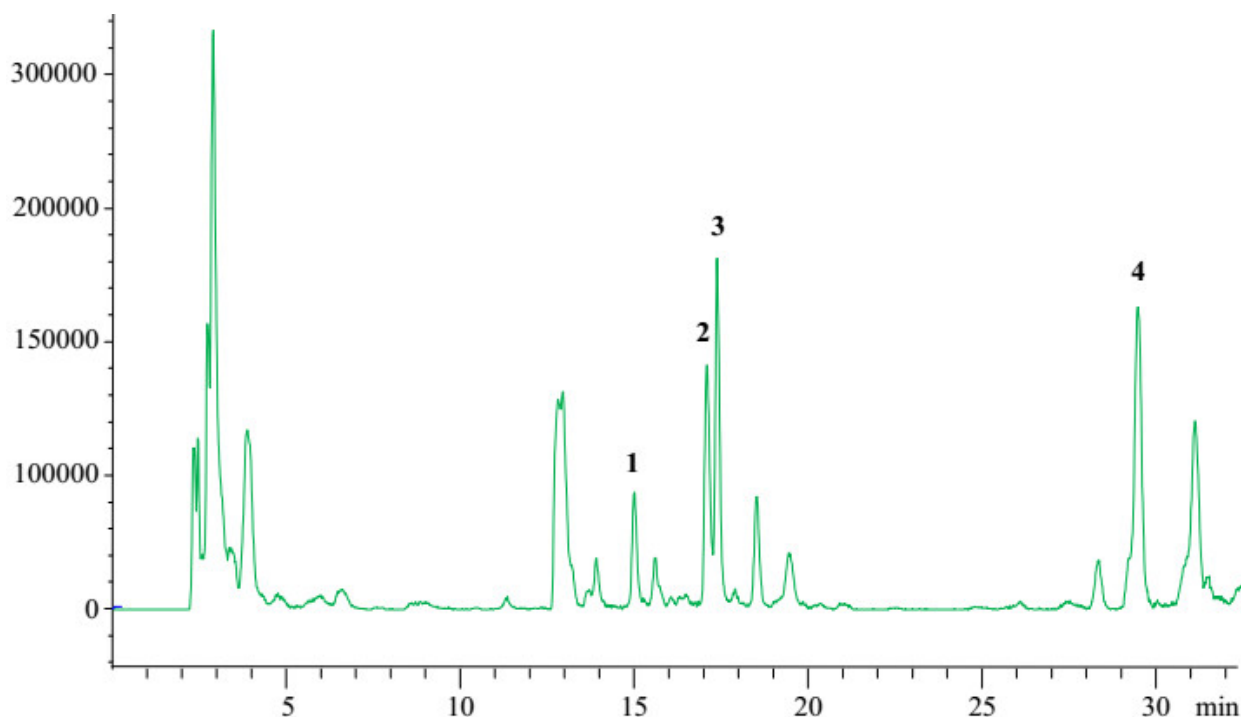
⁴³ Autori su za ovu vrstu koristili sinonim *Crepis japonica* (L.) Benth. (Hassler, 2019).

⁴⁴ Autori su za ovu vrstu koristili sinonim *Prenanthes acerifolia* Benth. (Hassler, 2019).

1.1.2. Kvalitativna i kvantitativna analiza seskviterpenskikh laktona u MeOH ekstraktima podzemnih organa (*Hieracium scheppigianum* i *H. naegelianum*) i herbi (svih 28 vrsta)

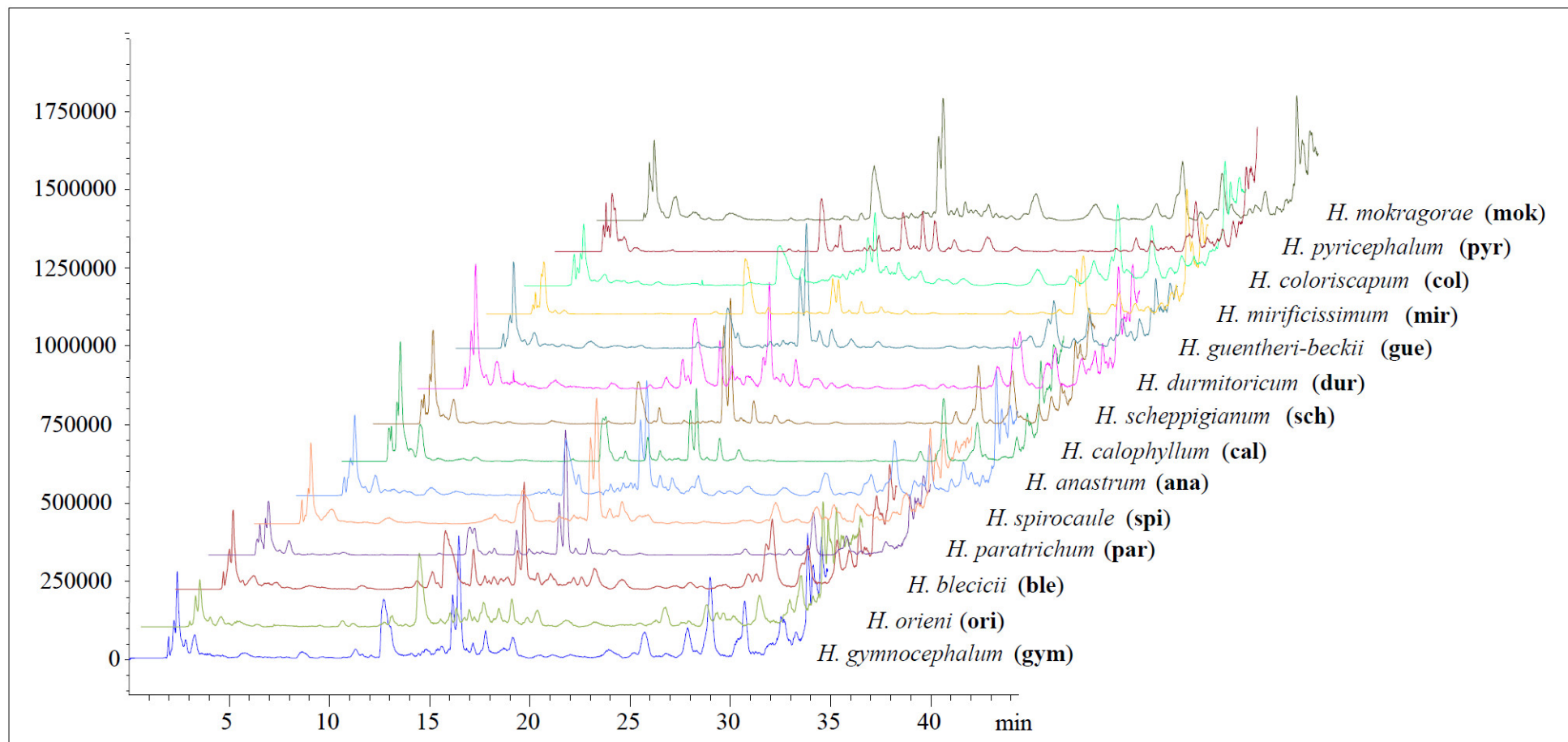
Kvalitativna i kvantitativna LC-MS analiza seskviterpenskikh laktona u suvim MeOH ekstraktima podzemnih organa *H. scheppigianum* i *H. naegelianum* i herbi svih 28 ispitivanih vrsta roda *Hieracium* sprovedena je u metodi optimizovanoj za razdvajanje polarnih derivata ovih jedinjenja koji u strukturi sadrže prolin i/ili glukozu. Identifikacija seskviterpenskikh laktona u analiziranim ekstraktima izvršena je poređenjem njihovih retencionih vremena (Rt) i MS spektra sa odgovarajućim podacima dobijenim za izolovana jedinjenja **1-4**, koji su snimani u pozitivnom modu ESI jonskog izvora (*full-scan* režim rada kvadripol analizatora, tj. snimanje *TIC* hromatograma, u opsegu m/z 80-700 Da) i pri naponu fragmentora od 200 V.

U ekstraktima podzemnih organa *H. scheppigianum* i *H. naegelianum* identifikovan je samo gvajanolidni glukozid krepizid E (**4**), dok su u ekstraktima herbi ove dve vrste, pored krepizida E identifikovani i konjugati sa prolinom gvajanolidne strukture, kalofilamin A (**2**) i njegov glukozid 8-epi-ikserisamin A (**3**). Kalofilamin A (**2**) i 8-epi-ikserisamin A (**3**), bili su zapravo prisutni u ekstraktima herbi svih 28 ispitivanih vrsta, dok je krepizid E (**4**) detektovan u ekstraktima 26 vrsta (izuzev u *H. orieni* i *H. macrodontoides*). Kalofilamin B (**1**), konjugat sa prolinom eudezmanolidne strukture, detektovan je u ekstraktima samo 14 vrsta. Generalno, u ekstraktima herbi, identifikovano je od dva (u slučaju *H. orieni*) do sva četiri seskviterpenska laktona (u slučaju 13 vrsta). Na **Slici 40** prikazan je *TIC* hromatogram MeOH ekstrakta herbe *H. calophyllum*, dok su na **Slikama 41** i **42** uporedno prikazani *TIC* hromatogrami MeOH ekstrakata herbi svih 28 vrsta.

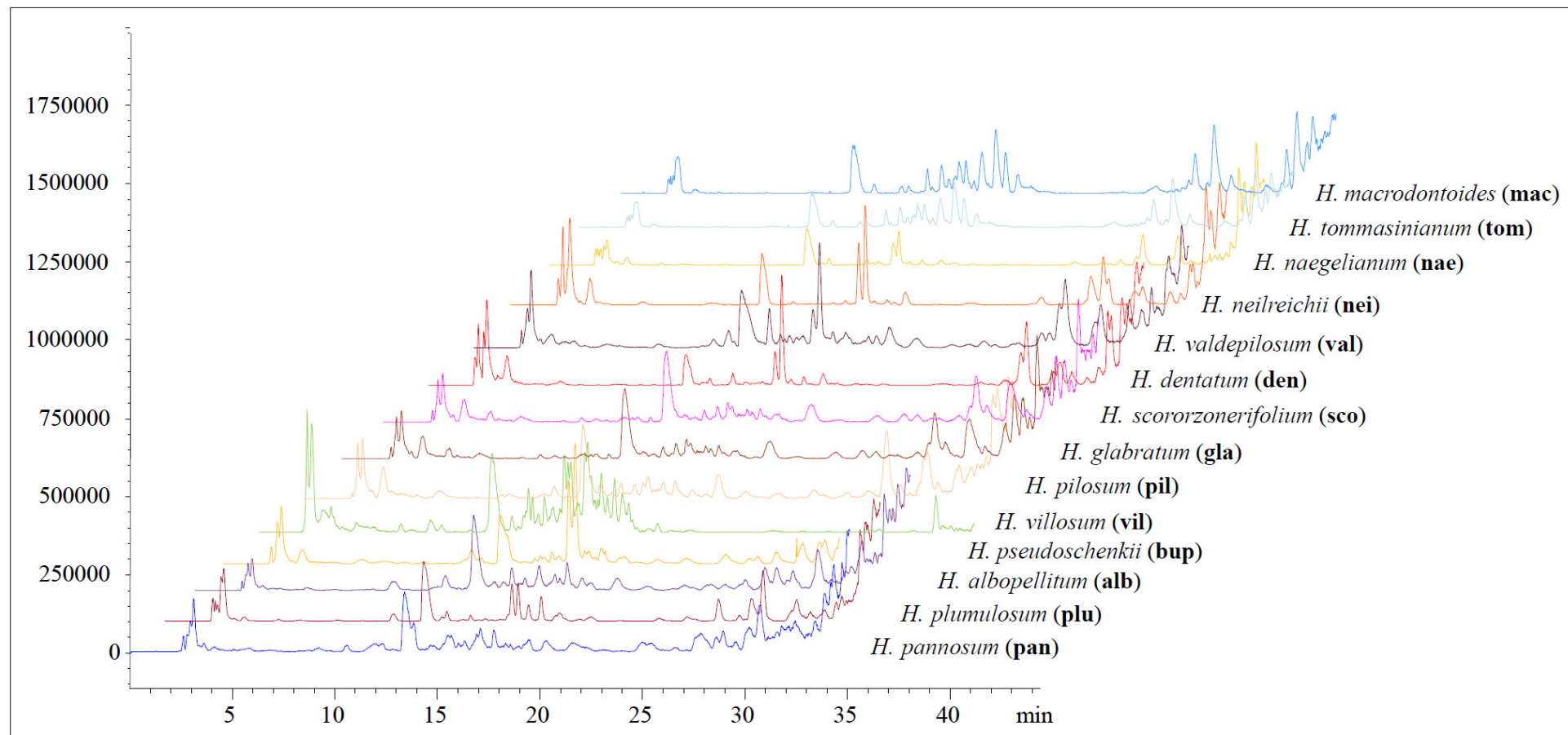


Slika 40. LC-MS (*TIC*, m/z 90-800 Da) hromatogram MeOH ekstrakta herbe *H. calophyllum*. Seskviterpenski laktioni: kalofilamin B (**1**), kalofilamin A (**2**), 8-epi-ikserisamin A (**3**), krepizid E (**4**).

Kvantifikacija seskviterpenskikh laktona u ekstraktima izvedena je metodom eksternog standarda. U te svrhe korišćene su površine pikova iz SIM hromatograma protonovanih molekula $[M+H]^+$ na m/z 540,20 (u slučaju **1** i **3**) i na m/z 378,10 (**2**), odnosno adukta $[M+NH_4]^+$ na m/z 442,20 (**4**), snimanih pri naponu fragmentora 100 V. Primeri SIM hromatograma dati su na **Slikama P3.1-10** u Prilogu 3. Sadržaj krepizida E u ekstraktima podzemnih organa *H. scheppigianum* i *H. naegelianum* bio je $126,88 \pm 3,58$ i $116,58 \pm 2,32$ mg/g suvog ekstrakta. Sadržaj pojedinačnih i ukupnih seskviterpenskikh laktona u suvim MeOH ekstraktima herbi 28 vrsta roda *Hieracium*, izražen u mg/g suvog ekstrakta, prikazan je u **Tabeli 24**.



Slika 41. Uporedni LC-MS (TIC) hromatogrami MeOH ekstrakata herbi 14 vrsta roda *Hieracium*.



Slika 42. Uporedni LC-MS (TIC) hromatogrami MeOH ekstrakata herbi narednih 14 vrsta roda *Hieracium*.

Tabela 24. Sadržaj pojedinačnih (1-4) i ukupnih seskviterpenskih laktona u suvim MeOH ekstraktima herbi 28 vrsta roda *Hieracium*, izražen kao mg/g suvog ekstrakta

Akr. ^a	Ekstrakt	1	2	3	4	SUSL ^b
gym	<i>H. gymnocephalum</i>	-	0,11 ± 0,06	8,19 ± 0,55	14,20 ± 0,20	22,50 ± 0,88
ori	<i>H. orieni</i>	-	tr ^d	tr	-	tr
ble	<i>H. blecicii</i>	-	0,65 ± 0,10	8,59 ± 0,32	15,57 ± 0,88	24,81 ± 0,92
par	<i>H. paratrichum</i>	0,01 ± 0,00 ^c	2,08 ± 0,09	4,24 ± 0,29	9,24 ± 0,35	15,57 ± 0,58
spi	<i>H. spirocaule</i>	-	4,53 ± 0,19	9,96 ± 0,58	0,90 ± 0,08	15,39 ± 0,32
ana	<i>H. anastrum</i>	-	5,31 ± 0,28	10,37 ± 1,00	13,22 ± 0,12	28,90 ± 1,20
cal	<i>H. calophyllum</i>	0,88 ± 0,09	2,84 ± 0,13	8,47 ± 0,65	10,10 ± 0,09	22,29 ± 0,75
sch	<i>H. scheppigianum</i>	-	4,97 ± 0,15	9,43 ± 0,22	11,00 ± 0,18	25,40 ± 0,60
dur	<i>H. durmitoricum</i>	0,67 ± 0,12	0,92 ± 0,02	4,73 ± 0,18	5,54 ± 0,05	11,86 ± 0,21
gue	<i>H. guentheri-beckii</i>	-	4,58 ± 0,33	11,14 ± 0,72	10,44 ± 0,56	26,16 ± 0,78
mir	<i>H. mirificissimum</i>	-	0,63 ± 0,10	2,40 ± 0,09	10,08 ± 0,23	13,11 ± 0,38
col	<i>H. coloriscapum</i>	0,01 ± 0,00	0,26 ± 0,02	5,45 ± 0,15	18,23 ± 0,38	23,95 ± 0,50
pyr	<i>H. pyricephalum</i>	-	0,37 ± 0,04	10,37 ± 0,85	12,02 ± 0,11	22,76 ± 0,69
mok	<i>H. mokragorae</i>	-	tr	tr	0,30 ± 0,02	0,30 ± 0,02
pan	<i>H. pannosum</i> s.l.	-	0,11 ± 0,00	0,57 ± 0,13	1,74 ± 0,15	2,42 ± 0,41
plu	<i>H. plumulosum</i>	-	0,91 ± 0,05	2,64 ± 0,45	7,51 ± 0,10	11,06 ± 0,20
alb	<i>H. albobellitum</i>	tr	tr	tr	0,46 ± 0,04	0,46 ± 0,04
bup	<i>H. pseudoschenkii</i>	-	5,15 ± 0,18	10,40 ± 0,65	1,88 ± 0,09	17,43 ± 0,71
vil	<i>H. villosum</i>	0,05 ± 0,00	0,93 ± 0,06	1,30 ± 0,32	2,34 ± 0,14	4,62 ± 0,33
pil	<i>H. pilosum</i>	0,02 ± 0,00	0,56 ± 0,00	0,27 ± 0,01	0,26 ± 0,05	1,11 ± 0,05
gla	<i>H. glabratum</i>	0,02 ± 0,00	0,05 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,61 ± 0,02	0,69 ± 0,01
sco	<i>H. scorzonerifolium</i> s.l.	0,21 ± 0,05	0,34 ± 0,02	2,71 ± 0,24	9,14 ± 0,09	12,40 ± 0,20
den	<i>H. dentatum</i> s.l.	0,19 ± 0,01	0,79 ± 0,05	6,13 ± 0,35	8,68 ± 0,13	15,79 ± 0,38
val	<i>H. valdepilosum</i> s.l.	0,76 ± 0,05	1,57 ± 0,08	6,51 ± 0,09	11,10 ± 0,25	19,94 ± 0,25
nei	<i>H. neilreichii</i>	tr	1,72 ± 0,12	5,74 ± 0,28	3,48 ± 0,02	10,94 ± 0,18
nae	<i>H. naegelianum</i>	-	0,16 ± 0,01	3,75 ± 0,05	7,87 ± 0,32	11,78 ± 0,22
tom	<i>H. tommasinianum</i>	0,01 ± 0,00	tr	tr	0,58 ± 0,00	0,59 ± 0,00
mac	<i>H. macrodontoides</i>	0,02 ± 0,00	tr	tr	-	0,02 ± 0,00

^aAkronim vrste. ^bSUSL – sadržaj ukupnih seskviterpenskih laktona. ^cRezultati predstavljaju srednje vrednosti tri određivanja ± standardne devijacije. ^dtr – jedinjenje prisutno u tragovima (< 0,01 mg/g). Seskviterpenski laktone: kalofilamin B (1), kalofilamin A (2), 8-epi-ikserisamin A (3), krepizid E (4).

Može se primetiti da je u ekstraktima podzemnih organa *H. scheppigianum* i *H. naegelianum* sadržaj krepizida E bio viši ne samo u odnosu na njegov sadržaj u ekstraktima herbi ove dve vrste (11,00 i 7,87 mg/g suvog ekstrakta), već čak viši i u odnosu na sadržaj ukupnih seskviterpenskih laktona u ekstraktima herbi ove dve vrste (25,40 i 11,78 mg/g), kao i u odnosu na sadržaj ukupnih seskviterpenskih laktona u ekstraktima herbi ostalih 26 vrsta.

Među ekstraktima herbi, najveći sadržaj ukupnih seskviterpenskih laktona određen je u slučaju *H. valdepilosum*, *H. calophyllum*, *H. gymnocephalum*, *H. pyricephalum*, *H. coloriscapum*, *H. bleicii*, *H. scheppigianum*, *H. guentheri-beckii* i *H. anastrum* (19,94-28,90 mg/g suvog ekstrakta). Sa druge strane, ekstrakti *H. macrodontoides*, *H. mokragorae*, *H. albopellitum* i *H. tommasinianum* karakterisali su se veoma niskim sadržajem ukupnih seskviterpenskih laktona (0,02-0,59 mg/g), a u ekstraktu *H. orieni* ova jedinjenja su bila prisutna samo u tragovima.

Krepizid E (4) bio je najzastupljeniji seskviterpenski lakton u 21 vrsti. Njegov sadržaj se kretao u rasponu od 0,26 mg/g u *H. pilosum* do 18,23 mg/g u *H. coloriscapum*.

8-Epi-ikserisamin A je bio dominantan seskviterpenski lakton u ekstraktima *H. spirocaule*, *H. pseudoschenkii* i *H. guentheri-beckii* (9,96, 10,40, i 11,14 mg/g suvog ekstrakta), a u značajnoj količini bio je prisutan i u još šest ekstrakata (8,19-10,37 mg/g). U pet od ovih devet ekstrakata, kalofilamin A bio je takođe zastupljen u nešto višim količinama (4,53-5,31 mg/g). U ekstraktima *H. orieni*, *H. mokragorae*, *H. albopellitum*, *H. tommasinianum* i *H. macrodontoides* oba jedinjenja su bila zastupljena u tragovima.

Kalofilamin B (1) je detektovan u samo 14 vrsta i bio je pri tom zastupljen u veoma malim količinama. U najvećoj količini (0,88 mg/g) bio je prisutan u ekstraktu herbe *H. calophyllum*, iz čijih cvasti je i izolovan. Treba istaći da je kalofilamin B bio najzastupljeniji seskviterpenski lakton u ekstraktu *H. macrodontoides*, ali u vrlo niskoj količini (0,02 mg/g), tj. ostali seskviterpenski laktoni u ovom ekstraktu bili su prisutni u tragovima ili nisu identifikovani.

Posmatrajući taksonomsku pripadnost ispitivanih vrsta, uočene su određene sličnosti u pogledu zastupljenosti seskviterpenskih laktona (1-4). Vrste *H. villosum* i *H. pilosum* koje pripadaju sekciji *Villosa*, kao i najveći broj hibridogenih vrsta agregata *H. villosum* (osim *H. neilreichii*) sadržali su kalofilamin B (1), za razliku od pripadnika sekcije *Pannosa* (izuzev *H. paratrichum*), *H. pseudoschenkii* iz sekcije *Drepanoidea* i *H. naegelianum* iz sect. *Naegeliana*. Vrste *H. tommasinianum* i *H. macrodontoides* sadržale su navedeno jedinjenje, ali za obe je bio karakterističan nizak ukupni sadržaj seskviterpenskih laktona.

Od taksona roda *Hieracium* s. str., seskviterpenski laktoni su praktično do sada identifikovani samo u MeOH ekstraktu podzemnih organa *H. murorum* iz koga je izolovan derivat kostunolida: (15→1)-β-D-glukopiranozil estar germakra-7αH-1(10)E,4Z,11(13)-trien-12,8α-olid-15-karboksilne kiseline (Zidorn i sar., 2001) i u CHCl₃ ekstraktu nadzemnih delova *H. bectautensis* iz koga su izolovana dva seskviterpenska laktona: dezacilcinaropikrin i 11,13-dihidro-8-dezoksilaktucin (Adenekov, 2015; Kanafin i sar., 2015). Što se tiče *H. irasuense*, iz čijih je nadzemnih delova izolovan irazunolid, već je prethodno rečeno da bi prema novijoj klasifikaciji ova vrsta trebalo da pripada nezavisnom rodu *Stenotheca* (Krak i Mráz, 2008; Sennikov i Illarionova, 2002), ali do sada niko od taksonoma još nije publikovao novu kombinaciju za ovu centralnoameričku vrstu.

Može se zaključiti da su u okviru ove doktorske disertacije izolovana tri nova, tj. do sada neopisana, konjugata seskviterpenskih laktona sa prolinom: eudezmanolidni glukozid kalofilamin B, gvajanolid kalofilamin A i gvajanolidni glukozid 8-epi-ikserisamin A. Izolovan je i gvajanolidni glukozid krepizid E i to po prvi put iz vrsta roda *Hieracium*.

Takođe je po prvi put izvršena kvalitativna i kvantitativna analiza seskviterpenskih laktona u MeOH ekstraktima podzemnih organa *H. scheppigianum* i *H. naegelianum*, i herbi svih 28 ispitivanih vrsta. Herbe svih 28 vrsta predstavljaju izvore od dva do četiri izolovana seskviterpenska laktona, dok su se podzemni organi pomenute dve vrste pokazali kao bogati izvori krepizida E.

1.2. Ispitivanje fenolkarboksilnih kiselina i flavonoida

1.2.1. Strukturna karakterizacija fenolkarboksilnih kiselina izolovanih iz MeOH ekstrakta podzemnih organa *Hieracium scheppigianum*

Iz suvog MeOH ekstrakta podzemnih organa *H. scheppigianum*, primenom semipreparativne tečne hromatografije sa masenom spektrometrijom (LC-MS), prikupljanjem frakcija u vremenskim intervalima definisanim na osnovu retencionih vremena (R_t) komponenti, izolovano je pet fenolkarboksilnih kiselina: jedinjenje **5** (frakcija HS1; $R_t=5,54$ min; 5 mg), **6** (HS2; $R_t=6,63$ min; 3 mg), **7** (HS3; $R_t=17,08$ min; 1,5 mg), **8** (HS4; $R_t=19,49$ min; 5 mg) i **9** (HS5; $R_t=28,54$ min; 1,5 mg), sva kao žućkasti amorfnii praškovi (odjeljak 4.2.1 u poglavlju Materijal i metode).

Strukture jedinjenja **6**, **7** i **9** utvrđene su analizom njihovih UV, masenih (ESI/SQ) i odgovarajućih 1D i 2D NMR spektara, koji su snimani u MeOH- d_4 , dok je identitet jedinjenja **5** i **8** utvrđen poređenjem njihovih UV i MS spektralnih podataka sa odgovarajućim podacima dobijenim za komercijalne autentične standarde.

UV spektri (**Tabela 25**, **Slike P4.1-5** u Prilogu 4) jedinjenja **5-9** karakterišu se postojanjem specifične trake I sa apsorpcionim maksimumom na λ_{max} 328-330 nm i prevojem na 298 nm što ukazuje da su ova jedinjenja derivati hidroksicimetine kiseline (Harborne, 1973). Maseni spektar jedinjenja **5** sadrži signal deprotonovanog molekula $[M-H]^-$ na m/z 353, koji je karakterističan za monokafeoilhina kiselinu, kao i signal fragmentnog jona na m/z 191, koji potiče od deprotonovanog molekula hina kiseline. MS spektri jedinjenja **6-9** su slični. Naime, ovi spektri sadrže signale deprotonovanog molekula $[M-H]^-$ na m/z 515, karakterističnog za dikafeoilhina kiseline, kao i fragmentnih jona na m/z 353 i 191, koji potiču od deprotonovanog molekula kafeoilhina, odnosno hina kiseline. Dodatni fragmentni jon na m/z 173 dominantno nastaje premeštanjem vodonika u deprotonovanom molekulu hina kiseline uz posledični gubitak molekula vode (**Slika 43**) (Clifford i sar., 2003; Tolonen i sar., 2002). Poređenjem LC-MS hromatografskih i spektralnih podataka (R_t vrednosti, UV i MS spektri) sa podacima dobijenim za autentične komercijalne standarde, jedinjenja **5** i **8** identifikovana su kao hlorogenska kiselina (5-*O*-kafeoilhina kiselina) i 3,5-di-*O*-kafeoilhina kiselina (**Tabela 25**).

Tabela 25. UV (λ_{max}) i MS (m/z) spektralni podaci fenolkarboksilnih kiselina identifikovanih u MeOH ekstraktu podzemnih organa vrste *H. scheppigianum* snimljeni u ESI/SQ-MS negativnom modu pri naponu fragmentora 100 V i 250 V

λ_{max} (nm)	m/z (100 V)	m/z (250 V)	Jedinjenje
328	353,10	353,10 (10), 191,10 (100), 161,00 (4)	Hlorogenska kiselina (5)
295 (sh), 308, 328	515,10	515,10 (100), 353,10 (86), 191,00 (49), 179,00 (38), 161,10 (6), 135,10 (14)	1,3-Di- <i>O</i> -kafeoilhina kiselina (6)
295 (sh), 318, 330	515,10	515,10 (100), 353,10 (33), 191,00 (8), 179,00 (10), 173,10 (7)	3,4-Di- <i>O</i> -kafeoilhina kiselina (7)
295 (sh), 318, 330	515,10	515,10 (100), 353,10 (53), 191,10 (36), 179,10 (21), 173,00 (3), 161,00 (3), 135,10 (17)	3,5-Di- <i>O</i> -kafeoilhina kiselina (8)
295 (sh), 318, 330	515,10	515,10 (100), 353,20 (77), 191,00 (46), 179,00 (61), 173,10 (49), 135,10 (38)	1,5-Di- <i>O</i> -kafeoilhina kiselina (9)

Identifikacija jedinjenja **6**, **7** i **9** izvršena je analizom njihovih NMR spektara. U 1D i 2D NMR spektrima jedinjenja **6**, **7** i **9** (**Tabela 26**; **Slike P4.6-25** u Prilogu 4) uočavaju se signali koji odgovaraju strukturnim komponentama ostatka hina kiseline (Tolonen i sar., 2002), tj. signali koji potiču od:

- dve sp^3 metilenske grupe (H-2a/e, C-2; H-6a/e, C-6), čiji se protonski signali višeg reda (dd) u oblasti 1,99-2,86 ppm sprežu sa signalima ugljenika u oblasti 31,76-39,55 ppm, pri čemu se na osnovu visoke konstante geminalnog kuplovanja ($J=12-15,7$ Hz) protonskih signala na δ_H 2,74-2,88 može identifikovati aksijalni proton H-6a i razlikovati od preostala tri protona pomenutih metilenskih grupa [δ_H 2,10-2,49 (H-2a/e); 1,90-2,11 (H-6e)] (Tolonen i sar., 2002);

- 2) kvaternarnog ugljenikovog atoma iz šestočlanog ugljovodoničnog prstena (C-1), koji daje signale sa hemijskim pomeranjem u oblasti δ_C 70,27-80,47 usled prisustva tercijarne alkoholne grupe (tj. grupe sa negativnim induktivnim efektom);
- 3) karbonilnog ugljenikovog atoma (C-7) sa signalima na δ_C 171,94, 172,38 i 174,24;
- 4) tri sekundarne alkoholne grupe (H-3, C-3; H-4, C-4; H-5, C-5) sa signalima u opsegu δ_H 3,39-4,23 i δ_C 66,76-73,81.

Pored signala koji odgovaraju protonima i ugljenicima hina kiseline, u 1D i 2D NMR spektrima jedinjenja **6**, **7** i **9** uočeni su i signali koji se odnose na delove strukture dva ostatka kafene kiseline (Tolonen i sar., 2002). U pitanju su:

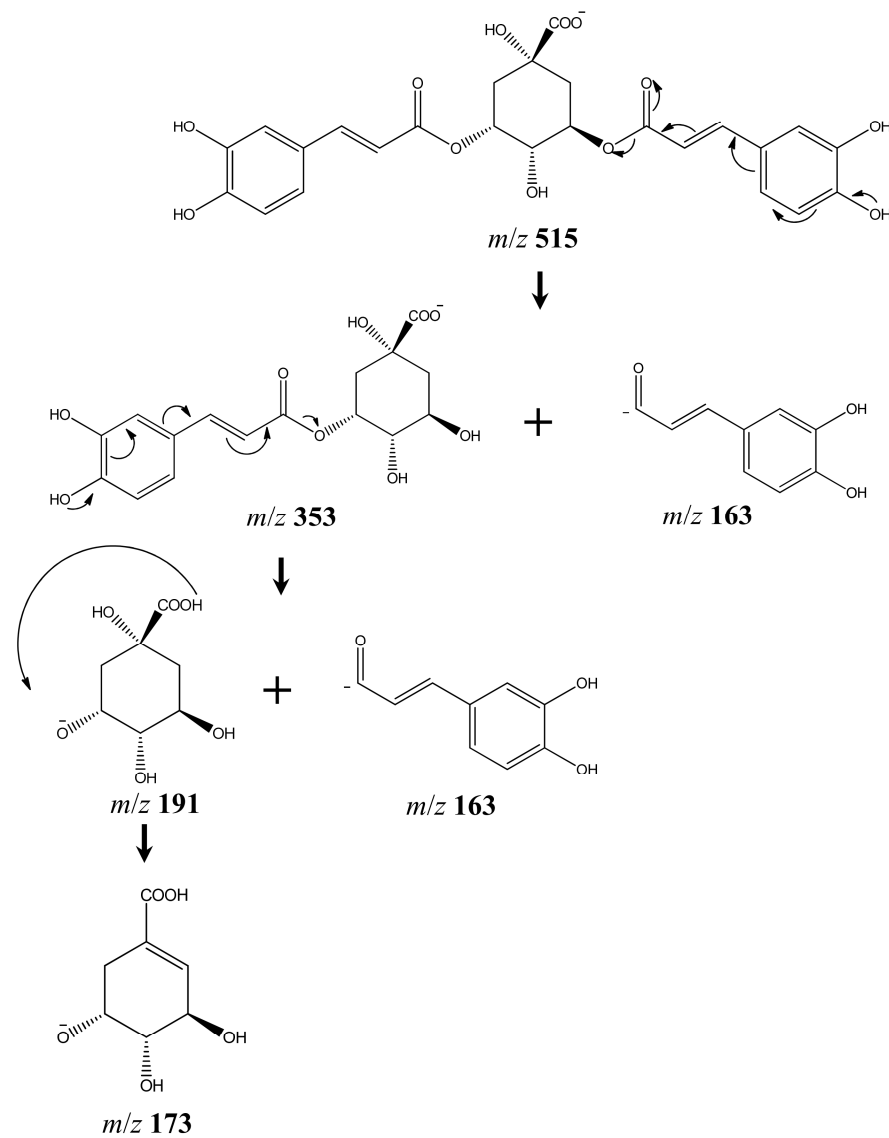
- 1) dve sp^2 metilenske grupe čiji su protonski dubleti na δ_H 6,10-7,63 (H-2', H-2'', H-3', H-3'') spregnuti sa C-2', C-2'' [δ_C 113,74-114,23], odnosno sa C-3', C-3'' [δ_C 145,65-146,21], što usled velike konstante vicinalnog spreznja ($J=15,9$ Hz) ukazuje na postojanje dve dvostruke veze *trans*-konfiguracije;
- 2) atomi supstituisanog fenola, koji daju signale pomerene ka višem magnetnom polju u odnosu na signale atoma nesupstituisanog fenola⁴⁵. Naime, uvođenjem dodatne fenolne grupe u položaj C-6'/6'' povećana je elektronska gustina u orto položajima (H-5'/5'', C-5'/5''; H-8'/8'', C-8'/8'') [δ_H 6,56-7,06; δ_C 113,61-114,63] u odnosu na fenolne grupe na C-6'/6'' i C-7'/7'', kao i u para položaju (H-9'/9'', C-9'/9'') [δ_H 6,61-7,00; δ_C 120,65-121,81] u odnosu na fenolnu grupu na C-6'/6'' (pozitivan rezonantni i negativan induktivni efekat);
- 3) dva karbonilna ugljenika C-1' i C-1'' [δ_C 166,50-167,42];
- 4) šest kvaternarnih ugljenikovih atoma aromatičnog prstena sa signalima u opsegu δ_C 126,20-148,23 (C-4', 4''; C-6', 6''; C-7', 7'').

Signali protona koji se nalaze na α položaju u odnosu na jednu (jedinjenja **6** i **9**) ili dve (jedinjenje **7**) sekundarne alkoholne grupe ostataka hina kiseline su zbog paramagnetnog efekta pomereni ka nižem polju (nalaze se u opsegu hemijskih pomeranja 5,10-5,63 ppm) i spregnuti su sa signalima ugljenikovih atoma na hemijskim pomeranjima u opsegu δ_C 65,33-75,21. Paramagnetni efekat se javlja kao posledica esterifikacije alkoholnih grupa hina kiseline kafenom kiselinom. Naime, karbonilni kiseonik iz estarske veze dodatno rezonantno stabilizuje slobodan elektronski par hidroksilnog kiseonika, usled čega smanjuje elektronsku gustinu oko α -protona. Posledično, u odnosu na 1H spektar nesupstituisane hina kiseline [δ_H 4,12 (H-3), 3,5 (H-4), 4,0 (H-5)] (Tolonen i sar., 2002) u 1H spektru jedinjenja **6** primećeno je pomeranje signala H-3 [δ_H 5,37] ka nižem magnetnom polju za $\Delta_H = -1,25$ ppm, u 1H spektru jedinjenja **7** signali H-3 [δ_H 5,63] i H-4 [δ_H 5,10] su pomereni za Δ_H vrednosti $-1,41$ i $-1,60$ ppm, dok je u 1H spektru jedinjenja **9** značajno pomeren samo signal koji odgovara protonu H-5 [δ_H 5,11] za $\Delta_H = -1,59$ ppm. Dodatno, usled rezonantne stabilizacije elektronskog para kiseonika OH grupe u položaju C-1 (jedinjenja **6** i **9**) karbonilnom grupom iz ostatka kafene kiseline kojom je navedena OH grupa esterifikovana, zabeležen je isti efekat na ugljenik u položaju C-1 [δ_C 80,47 (**6**) i 80,80 (**9**)] i pomeranje signala u ^{13}C spektrumu u odnosu na signale slobodne hina kiseline, kao i u odnosu na signal C-1 ugljenika [δ_C 70,27] u jedinjenju **7**, čija OH grupa hina kiseline u položaju C-1 nije esterifikovana.

HMBC korelacije protona H-3 sa C-1 i C-1'/1'' atomima jedinjenja **6**, H-5 sa C-4 i C-1'/1'' atomima jedinjenja **9**, kao i H-3 i H-4 sa C-1'/1'' atomima jedinjenja **7**, dodatno potvrđuju položaj acilovanja OH grupe, odnosno postojanje kafeoil grupe u položaju C-3 (**6**), C-5 (**9**), odnosno C-3 i C-4 (**7**) hina kiseline.

Relativna stereohemija protona H-3 i H-5 može se utvrditi na osnovu njihovih međusobnih ROESY korelacija (jedinjenja **6** i **9**), kao i korelacija između protona H-3 i H-2e, odnosno protona H-3 i H-4 (jedinjenje **7**). Na **Slikama 44-46** prikazane su navedene korelacije u ROESY spektrima, karakteristične korelacije H-3/C-3, H-4/C-4 i H-5/C-5 atoma u HSQC spektrima, kao i korelacije koje odgovaraju kafeoil ostacima molekula jedinjenja **6**, **7** i **9**. Na osnovu navedenih podataka jedinjenja su identifikovana kao 1,3-di-*O*-kafeoilhina kiselina (**6**), 3,4-di-*O*-kafeoilhina kiselina (**7**) i 1,5-di-*O*-kafeoilhina kiselina (**9**).

⁴⁵ Hemijska pomeranja protona i ugljenika nesupstituisanog fenola: δ_H 7,26; δ_C 128,5.

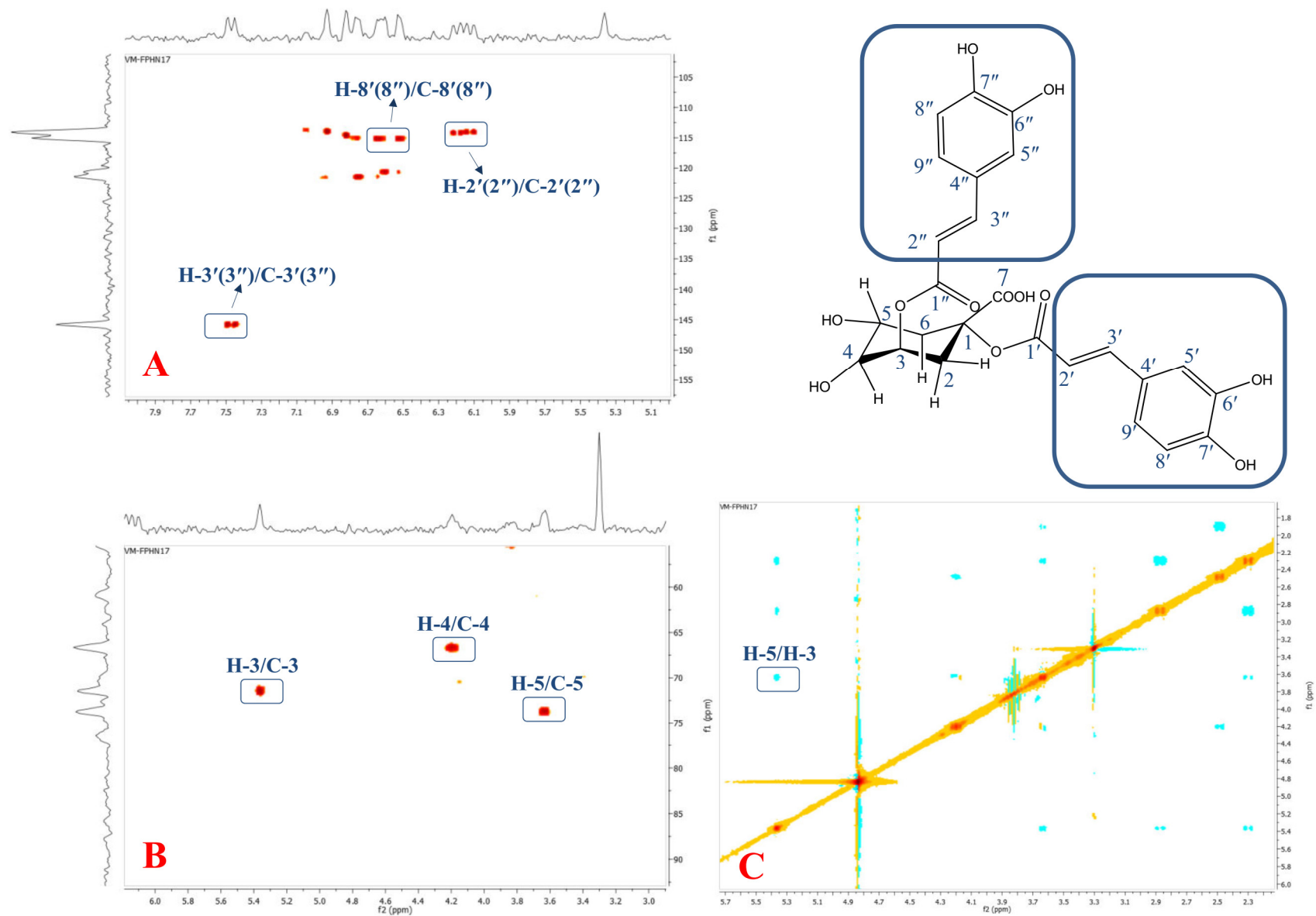


Slika 43. Fragmentacija 3,5-di-*O*-kafeoilhina kiseline (**8**) u ESI jonskom izvoru (izrađena na osnovu literaturnih podataka Clifford i sar., 2003; 2005; 2007; 2008).

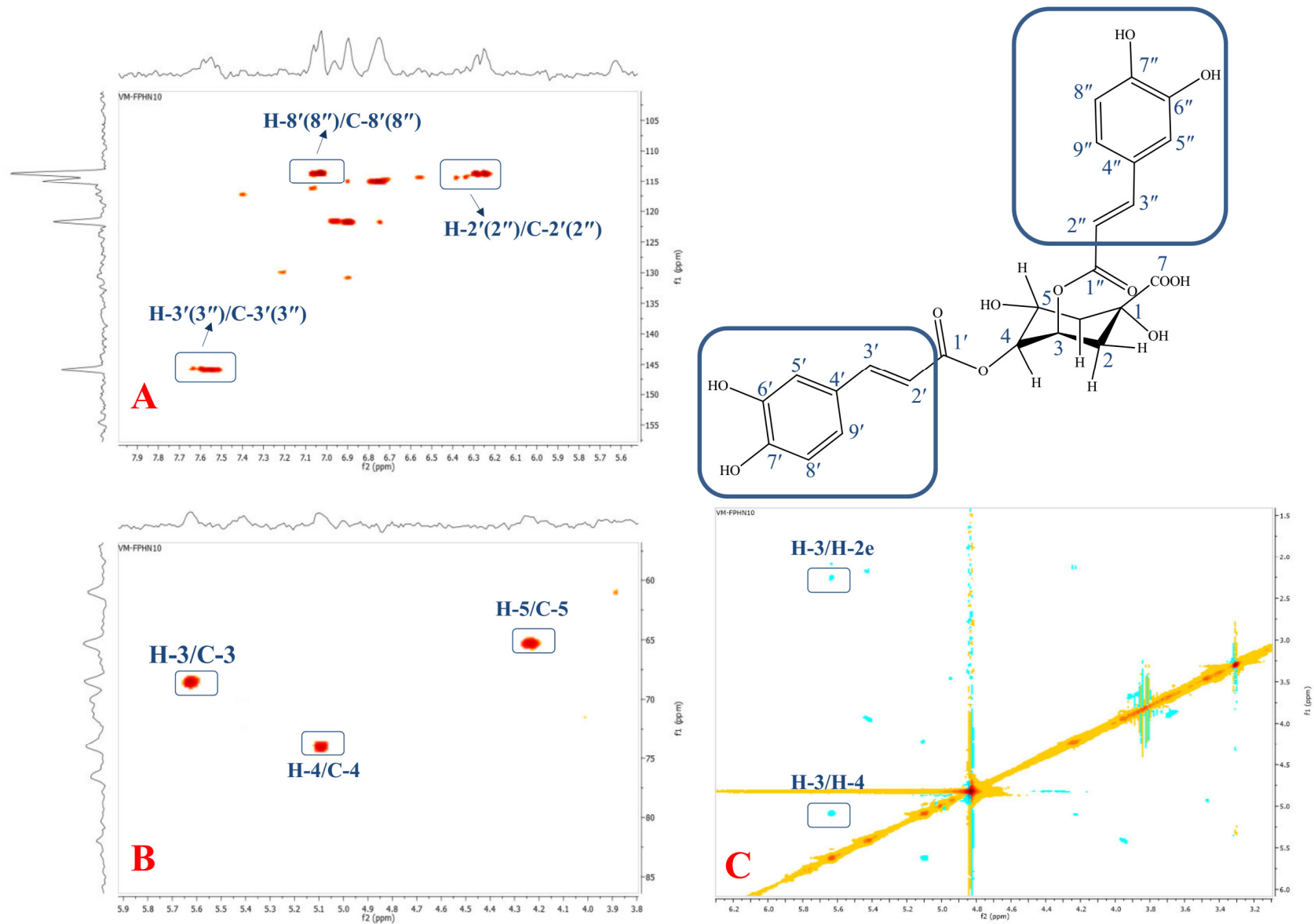
Tabela 26. ¹H NMR (400 MHz), ¹³C NMR (101 MHz), DEPT, HSQC, HMBC, COSY i ROESY spektralni podaci za 1,3-di-*O*-kafeoilhina kiselinu (**6**), 3,4- di-*O*-kafeoilhina kiselinu (**7**) i 1,5-di-*O*-kafeoilhina kiselinu (**9**), snimani u MeOH-*d*₄

Položaj	1,3-Di- <i>O</i> -kafeoilhina kiselina (6)					3,4- Di- <i>O</i> -kafeoilhina kiselina (7)					1,5-di- <i>O</i> -kafeoilhina kiselina (9)			
	δ_H	δ_C	COSY	ROESY	HMBC	δ_H	δ_C	COSY	ROESY	HMBC	δ_H	δ_C	COSY	HMBC
1	-	80,47			3	-	70,27			3	-	80,80		
2a	2,31 (dd,15,7; 2,8)	39,55	2e, 3	4		2,10 (m)	36,22	3	6a		2,25	39,23	6a	
2e	2,49 (d, 13,1),		2a, 3			2,26 (m)		3	6e		2,25			
3	5,37 (d, 3,3)	71,54	4	4, 2a		5,63(ddd, 9,35; 8,93)	68,66			2e, 4	4,34 (d, 1,9)	69,97	5	
4	3,64 (dd, 9,1; 3,4)	73,81	5		5	5,10 (dd, 7,4; 2,7)	73,98	5			3,89 (dd, 12,0; 1,9)	73,52		
5	4,20 (td, 10,1; 4,4)	66,76	6 a, 6e		3, 4	3,95 (dd, 8,0; 3,2)	65,33	4; 6a,e			5,11 (dd, 9,3; 2,8)	75,21	3, 4	
6a	2,88 (d, 15,6)	31,76	6 e	4		2,74 (dd,13,6; 4,6)	39,19	5	2a		2,80 (m)			
6e	1,90 (m)		6 a			2,10 (dd, 12,6; 6,9)			2e		2,11m			
7	-	172,38				-	174,24				-	171,94		5
1'/1'' ^a	-	166,50			3, 2', 3'	-	167,04			3, 4, 2', 3'	-	167,23		5, 3'
		167,42					167,10					167,29		
2'/2''	6,20 (d, 15,9)	114,08	3'	8', 9'	3'	6,29 (d, 4,9)	113,71	3'	9'		6,27 (d, 15,8)	113,47		3'
	6,13 (d, 15,9)	114,23				6,25 (d,4,8)	113,77				6,18 (d, 15,9)	113,76		
3'/3''	7,49 (d, 2,4)	145,65	2'		5'	7,59 (d, 6,0)	145,74	2'	9'	5'	7,58 (d, 15,8)	146,04		
	7,45 (d, 2,4)	145,88				7,55 (d, 6,2)	145,84				7,50 (d, 15,9)	146,21		
4'/4''	-	126,15			2'	-	126,36			2', 5'	-	126,30		8', 5'
		126,20					126,44					126,36		
5'/5''	6,93 (d, 1,7)	114,63				6,56 (m)	114,34				6,70 (m)	114,75		
	6,83 (d, 1,6)	113,99					114,38				6,72 (m)	114,88		
6'/6''	-	145,10				-	145,38				-	145,34		5', 7'
		145,31					145,40					145,35		
7'/7''	-	147,85			5'	-	148,16			8'	-	148,21		5'
		148,13					148,23					148,23		
8'/8''	6,52 (d, 8,2)	114,63	9'	3', 9'	9'	7,06 (m)	113,61			3', 9'	7,25 (d, 8,6)	129,66		9'
	6,64 (d, 8,2)	113,99				7,03 (m)	113,65				7,06 (d, 8,6)	130,11		
9'/9''	6,76 (dd, 8,0; 1,8)	120,65	3', 8'		3', 8'	6,96 (m)	121,69		2', 3'	8'	7,00 (dd, 8,9;1,4)	121,69		
	6,61 (dd, 8,3; 1,6)	121,44				6,89 (m)	121,81				6,92 – 6,86 (m)	121,71		

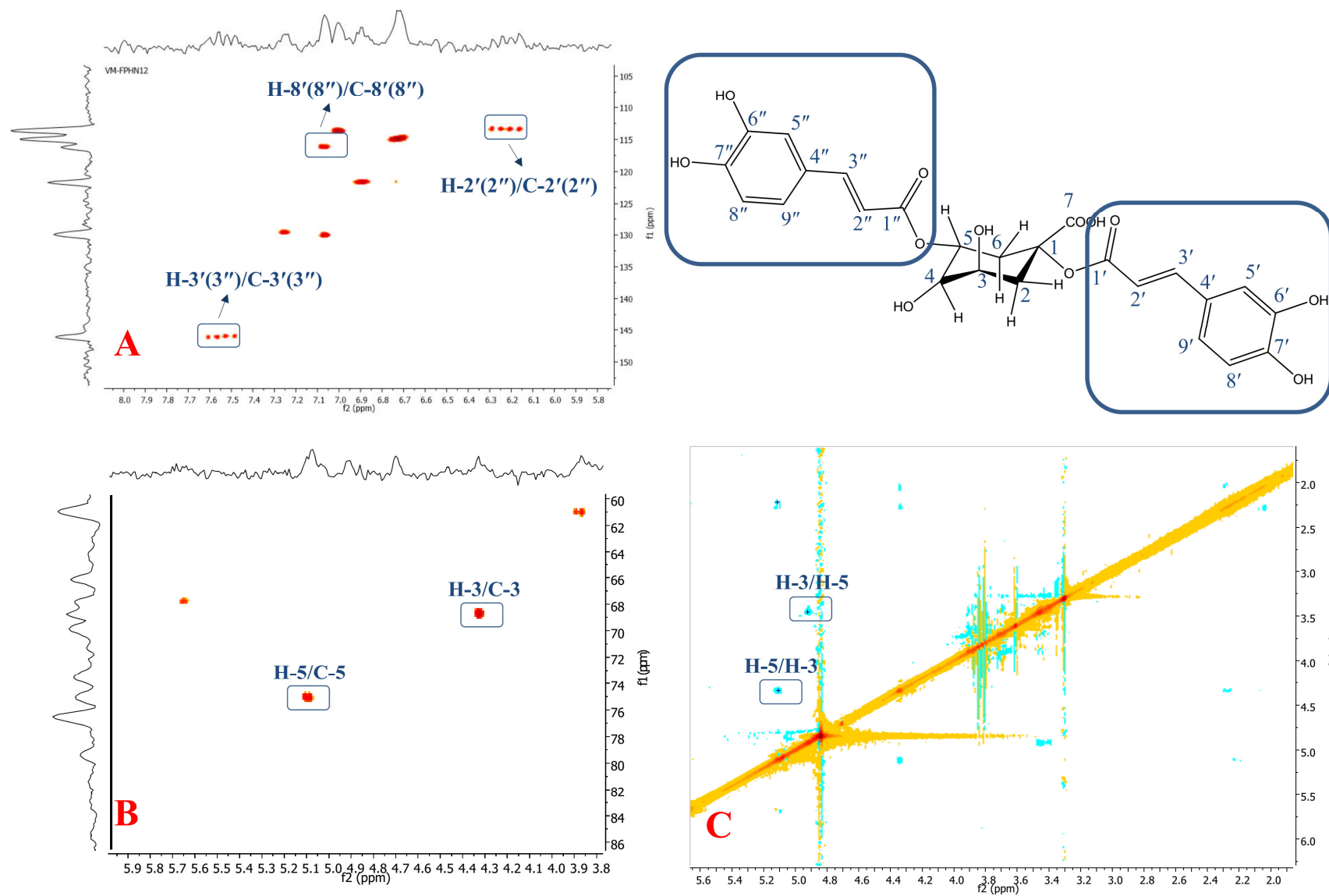
^aSignali protona i ugljenika (istih poticija) na bliskim hemijskim pomeranjima su manje ili više preklapljeni.



Slika 44. Karakteristične HSQC korelacije protona i ugljenikovih atoma kafeoil grupa (**A**), protona i ugljenikovih atoma ostatka hina kiseline (**B**) i ROESY korelacije (**C**) 1,3-di-*O*-kafeoilhina kiseline (**6**).



Slika 45. Karakteristične HSQC korelacije protona i ugljenikovih atoma kafeoil grupa (A), protona i ugljenikovih atoma ostatka hina kiseline (B) i ROESY korelacije (C) 3,4-di-*O*-kafeoilhina kiseline (7).



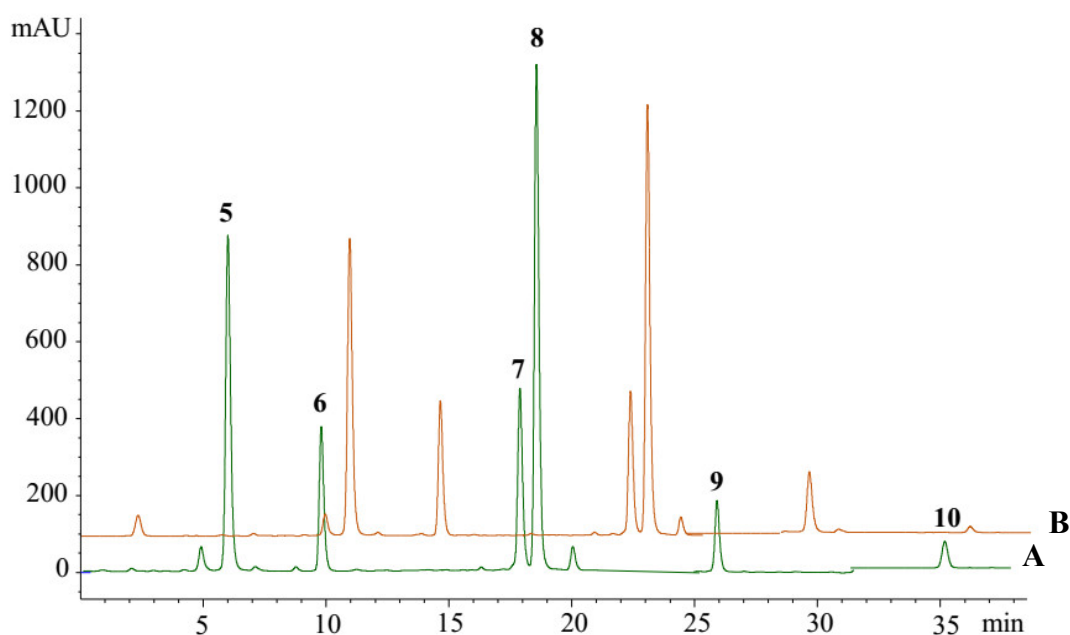
Slika 46. Karakteristične HSQC korelacije protona i ugljenikovih atoma kafeoil grupa (A), protona i ugljenikovih atoma ostatka hina kiseline (B) i ROESY korelacije (C) 1,5-di-O-kafeoilhina kiseline (9).

1.2.2. Kvalitativna i kvantitativna analiza fenolkarboksilnih kiselina u MeOH ekstraktima podzemnih organa (*Hieracium scheppigianum* i *H. naegelianum*) i fenolkarboksilnih kiselina i flavonoida u MeOH ekstraktima herbi (svih 28 vrsta)

U okviru ove doktorske disertacije izvršena je uporedna kvalitativna i kvantitativna analiza fenolkarboksilnih kiselina u suvim MeOH ekstraktima podzemnih organa *H. scheppigianum* i *H. naegelianum* i fenolkarboksilnih kiselina i flavonoida u suvim MeOH ekstraktima herbi 28 vrsta roda *Hieracium* primenom LC-MS metode, optimizovane za razdvajanje ovih polifenola. U te svrhe UV spektri su snimani na 320 nm za fenolkarboksilne kiseline, odnosno 350 nm za flavonoide, dok su maseni spektri snimani u ESI⁻ modu jonskog izvora i u *full-scan* ili *SIM* modu kvadripol analizatora, na dva napona fragmentora (100 i 250 V). U ekstraktima podzemnih organa pomenute dve vrste i herbi 28 vrsta detektovano je ukupno šest fenolkarboksilnih kiselina (**5-11**). U ekstraktima herbi svih 28 vrsta detektovano je i ukupno 19 flavonoida (**12-30**), od čega 18 flavonske strukture i to luteolin i 9 njegovih heterozida, apigenin i četiri njegova heterozida i diosmetin i dva njegova heterozida, kao i jedan flavonolni heterozid. Identifikacija jedinjenja detektovanih u ispitivanim ekstraktima izvršena je analizom njihovih UV i masenih (ESI/SQ) spektara. Podaci dobijeni ovom analizom predstavljeni su u **Tabelama 25 i 27**. Za 17 polifenolnih jedinjenja identitet je potvrđen poređenjem njihovih retencionih vremena (Rt) i UV i MS spektralnih podataka sa odgovarajućim podacima snimljenim za prethodno izolovana jedinjenja (**6, 7, 9, 13 i 26**) i dostupne komercijalne standarde (**5, 8, 15-17, 19, 22, 23, 25, 28-30**). Uporedni LC-MS hromatogrami ($\lambda_{\max}=320$ nm) suvih MeOH ekstrakata podzemnih organa *H. naegelianum* i *H. scheppigianum* prikazani su na **Slici 47**, a hromatogrami ($\lambda_{\max}=350$ nm) suvih MeOH ekstrakata herbi dve odabrane vrste (*H. bleicicii* i *H. scheppigianum*) dati su na **Slici 48**.

Identifikacija fenolkarboksilnih kiselina u MeOH ekstraktima podzemnih organa i herbi

Pet fenolkarboksilnih kiselina, hlorogenska kiselina (**5**), 1,3-di-*O*-kafeoilhina kiselina (**6**), 3,4-di-*O*-kafeoilhina kiselina (**7**), 3,5-di-*O*-kafeoilhina kiselina (**8**) i 1,5-di-*O*-kafeoilhina kiselina (**9**), koje su izolovane iz MeOH ekstrakta podzemnih organa *H. sheppigianum*, takođe su identifikovane i u MeOH ekstraktu podzemnih organa *H. naegelianum*. Dodatno, u oba ekstrakta detekovana je još jedna fenolkarboksilna kiselina čiji su UV i maseni spektralni podaci ukazali na strukturu dikafeoilhina kiseline (**10**) (**Tabela 27, Slika 47**).



Slika 47. LC-MS hromatogrami ($\lambda_{\max}=320$ nm) MeOH ekstrakata podzemnih organa *H. naegelianum* (A) i *H. scheppigianum* (B).

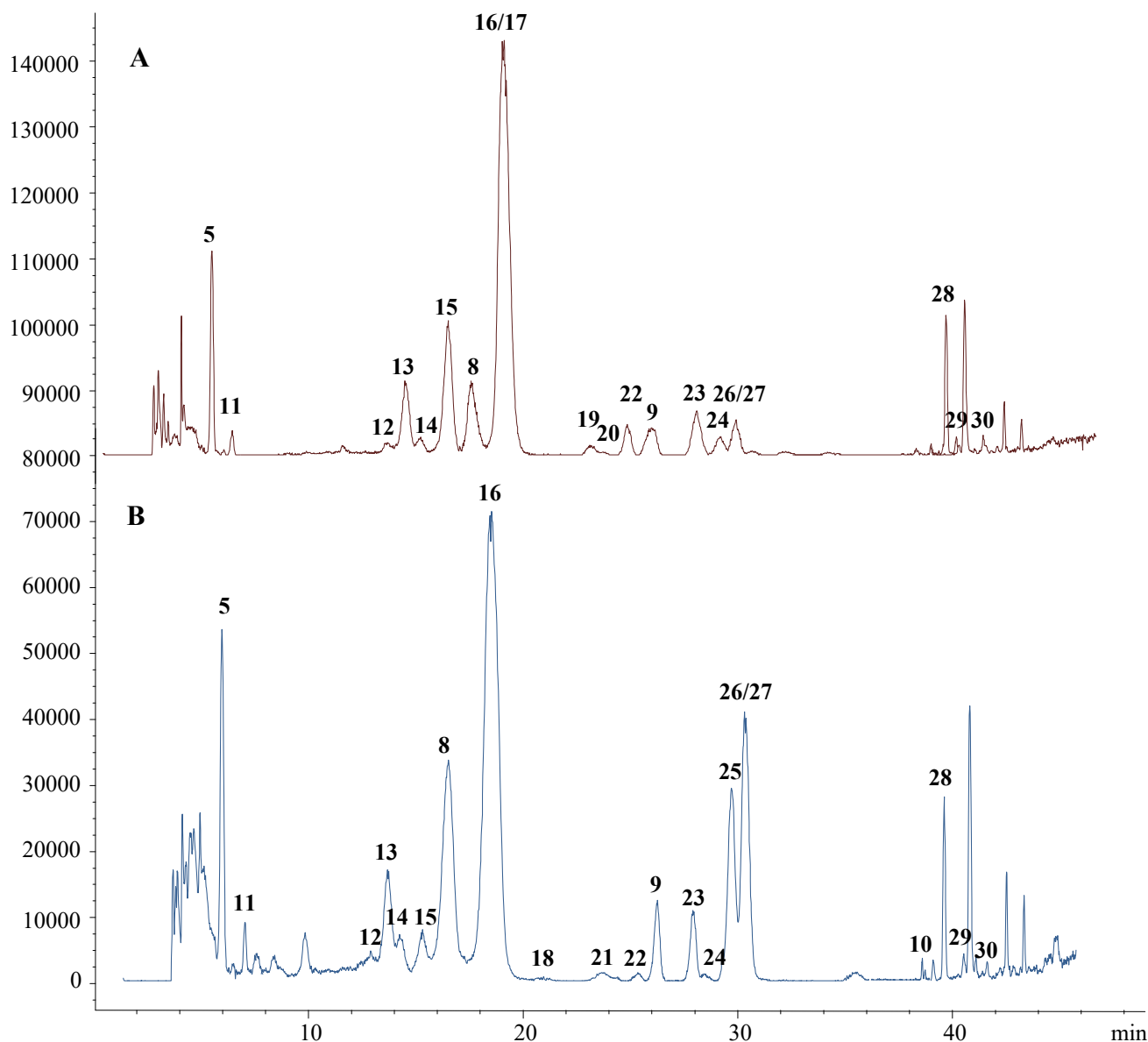
Tabela 27. UV (λ_{\max}) i MS (m/z) spektralni podaci fenolkarboksilnih kiselina (**10-11**) i flavonoida (**12-30**) detektovanih u suvim MeOH ekstraktima herbi 28 vrsta roda *Hieracium*

#	Rt (min)	λ_{\max} (nm)	m/z [M-H] ⁻ (100 V)	m/z (250 V)	Jedinjenje
11	6,69	328	353,10	353,10 (18), 191,10 (100), 179,00 (3), 173,10 (2), 161,00 (6), 133,10 (3)	Kafeoilhina kiselina
12	15,97	256, 264, 350	579,20	579,20 (100), 447,20 (14), 286,00 (7), 285,00 (25), 191,00 (17), 179,00 (7), 135,00 (7)	Luteolin heksozilpentozid
13	16,76	256, 264, 350	579,20	579,20 (100), 447,10 (4), 285,10 (18), 190,80 (2), 179,00 (2), 135,00 (1)	Luteolin 7- <i>O</i> -glukoksilozid
14	17,37	n. d. ^b	593,20	593,20 (100), 447,10 (17), 285,00 (28), 190,90 (12), 179,00 (8), 161,00 (4), 135,00 (7)	Luteolin heksozildezoksiheksozid
15	17,73	256, 264, 350	593,20	593,20 (100), 447,10 (18), 285,00 (22), 190,90 (3)	Luteolin 7- <i>O</i> -rutinozid
16	20,62	256, 264, 350	447,10	447,10 (100), 448,10 (23), 285,10 (12)	Luteolin 7- <i>O</i> -glukozid
17	20,62	254, 266, 350	461,10	461,10 (100), 285,10 (31)	Luteolin 7- <i>O</i> -glukuronid
18	21,34	n. d.	461,10	461,10 (100), 299,10 (53)	Diosmetin heksozid
19	21,59	256, 264, 298, 354	463,10	463,10 (100), 301,10 (70), 285,00 (30)	Kvercetin 3- <i>O</i> -glukozid
20	24,37	n. d.	607,20	607,20 (100), 299,00 (39), 284,80 (14), 284,00 (14)	Diosmetin heksozilpentozid
21	25,12	266, 338	563,10	563,10 (100), 431,10 (16), 269,10 (96)	Apigenin heksozilpentozid
22	26,50	266, 338	577,10	577,10 (100), 431,10 (6), 269,90 (5), 269,10 (22)	Apigenin 7- <i>O</i> -rutinozid
23	29,85	266, 338	431,10	431,10 (100), 269,00 (7), 268,10 (26)	Apigenin 7- <i>O</i> -glukozid
24	30,60	n. d.	533,20	533,20 (20), 489,20 (100), 447,10 (28), 285,00 (28), 284,10 (13), 268,00 (2)	Luteolin 6''-acilheksozid
25	32,32	266, 338	445,10	445,10 (100), 269,00 (47), 179,00 (1)	Apigenin 7- <i>O</i> -glukuronid
26	33,61	250, 268, 340	447,10	447,10 (28), 286,00 (21), 285,00 (100), 283,80 (4), 133,10 (3)	Luteolin 4'- <i>O</i> -glukozid
27	33,61	250, 268, 340	461,10	461,10 (68), 286,10 (17), 285,10 (100), 151,00 (3), 133,00 (4)	Luteolin 4'- <i>O</i> -glukuronid
10	40,27	295 (sh), 318, 330	515,10	515,10 (100), 353,20 (62), 191,00 (50), 151,00 (35)	Dikafeoilhina kiselina
28	42,65	254, 266, 350	285,10	285,10 (100), 151,00 (6), 133,00 (24)	Luteolin
29	43,14	252, 267, 344	299,10	299,10 (100), 283,60 (96), 267,00 (30), 151,00 (27)	Diosmetin
30	43,31	268, 340	269,10	269,10 (100), 227,00 (7), 151,00 (7), 117,00 (35)	Apigenin

^aU zagradama su predstavljeni relativni intenziteti fragmentnih jona; ^bn. d. – spektralni podaci nisu dostupni.

U suvim MeOH ekstraktima herbi svih 28 vrsta roda *Hieracium* detektovano je ukupno pet fenolkarboksilnih kiselina, od kojih su četiri (**5**, **8**, **9**, **10**) prethodno identifikovane i u pomenutim ekstraktima podzemnih organa *H. sheppiganum* i *H. naegelianum*, dok je jedna (**11**) detektovana u ekstraktima herbi samo pojedinih ispitivanih vrsta ovog roda. UV spektralni podaci jedinjenja **11** ukazali su na to da je i ono derivat kafeine kiseline. Njegov MS spektar karakteriše se prisustvom najintenzivnijeg signala deprotonovanog molekula $[M-H]^-$ na m/z 353 i signala fragmentnog jona na m/z 191, koji potiče od deprotonovanog molekula hina kiseline (Tolonen i sar., 2002). Ovi podaci su ukazali na to da je jedinjenje **11** po strukturi monokafeoilhina kiselina.

Na osnovu sličnosti MS spektara hlorogenske kiseline (**5**) i jedinjenja **11**, kao i redosleda eluiranja sa C_{18} kolone, može se pretpostaviti da je jedinjenje **11** *cis* izomer hlorogenske kiseline (**5**) (Clifford i sar., 2003; 2008).



Slika 48. LC-MS (TIC u opsegu m/z 80-900 Da) hromatogram MeOH ekstrakata herbi *H. bleicii* (A) i *H. sheppiganum* (B); fenolkarboksilne kiseline: hlorogenska kiselina (**5**), 3,5-di-*O*-kafeoilhina kiselina (**8**), 1,5-di-*O*-kafeoilhina kiselina (**9**), dikafeoilhina kiselina (**10**), monokafeoilhina kiselina (**11**); flavonoidi: luteolin heksozilpentozid (**12**), luteolin 7-*O*-glukoksilozid (**13**), luteolin heksozildezoksiheksozid (**14**), luteolin 7-*O*-rutinozid (**15**), luteolin 7-*O*-glukozid (**16**), luteolin 7-*O*-glukuronid (**17**), diosmetin heksozid (**18**), kvercetin 3-*O*-glukozid (**19**), diosmetin heksozilpentozid (**20**), apigenin heksozilpentozid (**21**), apigenin 7-*O*-rutinozid (**22**), apigenin 7-*O*-glukozid (**23**), luteolin 6''-acilheksozid (**24**), apigenin 7-*O*-glukuronid (**25**), luteolin 4'-*O*-glukozid (**26**), luteolin 4'-*O*-glukuronid (**27**), luteolin (**28**), diosmetin (**29**), apigenin (**30**).

Identifikacija flavonoida u MeOH ekstraktima herbi

U MS spektrima flavonoida detektovanih u MeOH ekstraktima herbi svih 28 ispitivanih vrsta karakteristični su bili signali m/z deprotonovanih molekula $[M-H]^-$, čiji je relativni intenzitet pri nižem naponu fragmentora (100 V) za sva detektovana jedinjenja bio 100%. Pri višem naponu fragmentora (250 V) maseni spektri su pored protonovanog molekula sadržali i signale fragmentnih jona (engl. *in-source fragmentation*), koji nastaju neutralnim gubicima šećernih komponenti (prisutan je signal na m/z aglikona), ali i Retro-Diels-Alder-ovim (RDA) premeštanjem, pomeranjem radikala i dodatnim neutralnim gubicima (CO, CO₂) (Cuyckens i Claeys, 2004; Ferreres i sar., 2004; Rijke i sar., 2006).

Identifikacija luteolina i njegovih heterozida. UV spektre jedinjenja **12-17**, **24** i **26-28** karakterišu traka I (apsorpcioni maksimumi na 350 nm) i traka II (apsorpcioni maksimumi na 256 i 264 nm). U masenim spektrima (ESI/SQ na 250 V) ovih flavonoida karakteristično je prisustvo signala koji odgovara deprotonovanom molekulu aglikona $[L-H]^-$ na m/z 285, kao i signala fragmentnih jona m/z vrednosti 191 i 151, koji nastaju RDA mehanizmom raspada prstena C (Rijke i sar., 2006). Fragmentacija luteolina prikazana je na **Slici 49**. Na osnovu navedenih podataka, ali i primenom komercijalnog standarda, jedinjenje **28** identifikovano je kao luteolin. Takođe, zaključeno je da je luteolin aglikon jedinjenja **12-17**, **24** i **26-27**. Iz sheme fragmentacije ovih jedinjenja zaključeno je da jedinjenja **12-15** predstavljaju biozide luteolina, dok jedinjenja **16**, **17**, **24**, **26** i **27** predstavljaju monozide luteolina.

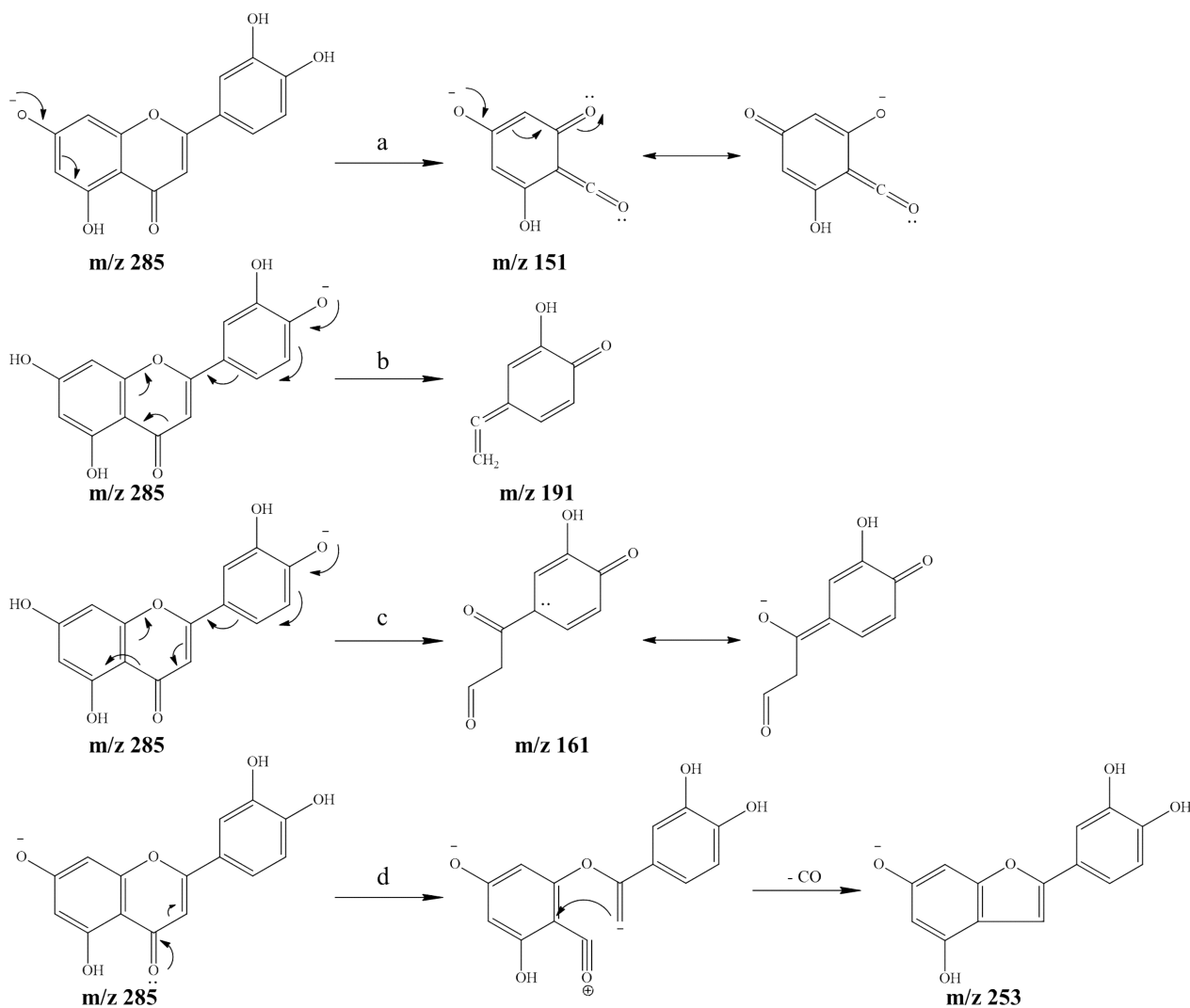
Jedinjenja **12** i **13** poseduju strukturu luteolin heksozilpentozida. Deprotonovanom molekulu ova dva jedinjenja $[L+162+132-H]^-$ odgovara signal na m/z 579 u masenim spektrima. On se dalje fragmentiše do karakterističnih jona $[L+162-H]^-$ na m/z 447 i $[L-H]^-$ na m/z 285, uz neutralne gubitke od 132 odnosno 162 Da, koji odgovaraju gubitku dehidropentoze i dehidroheksoze, redom. Jedinjenje **13** je identifikovano kao luteolin 7-*O*- β -D-glukoksilozid pomoću prethodno izolovanog jedinjenja iz suvog MeOH ekstrakta herbe *H. gymnocephalum* (Petrović i sar., 1999a).

Jedinjenjima **14** i **15** odgovara struktura luteolin heksozildezoksiheksozida. U masenim spektrima uočava se signal deprotonovanih molekula $[L+162+146-H]^-$ na m/z 593, kao i fragmentnih jona $[L+162-H]^-$ na m/z 447 i $[L-H]^-$ na m/z 285, koji nastaju gubitkom dehidrodezoksiheksoze (146 Da) i dehidroheksoze (162 Da). Jedinjenje **15** identifikovano je kao luteolin 7-*O*- β -D-rutinozid pomoću komercijalnog standarda.

U slučaju jedinjenja **12** i **14**, na osnovu niske relativne zastupljenosti (tj. intenziteta) signala fragmentnog jona na m/z 447 u masenim spektrima, pretpostavlja se da su šećerne komponente vezane (1 \rightarrow 6) glikozidnom vezom. Ovo je primećeno i kod standardnih supstanci slične strukture (**13** i **15**) i u saglasnosti je sa podacima iz literature (Cuyckens i sar., 2001; Ferreres i sar., 2004).

U masenim spektrima luteolin heksozida (**16** i **26**) zabeležen je signal deprotonovanog molekula $[L+162-H]^-$ na m/z 447. Jedinjenje **16** je identifikovano kao luteolin 7-*O*- β -D-glukozid pomoću komercijalnog standarda, a jedinjenje **26** kao luteolin 4'-*O*- β -D-glukozid pomoću jedinjenja izolovanog iz (MeOH:aceton:voda 3:1:1, *V/V/V*) ekstrakta cvasti *Leontodon hispidus* L. (Zidorn i Stuppner, 2001).

U masenim spektrima luteolin heksuronida (**17** i **27**) signal deprotonovanih molekula $[L+176-H]^-$ nalazio se na m/z 461. Jedinjenje **17** identifikovano je kao luteolin 7-*O*- β -D-glukuronid pomoću komercijalnog standarda. U cilju identifikacije jedinjenja **27**, frakcija BF14, dobijena razdvajanjem *n*-BuOH frakcije MeOH ekstrakta cvasti *H. calophyllum* koja je sadržala ovo jedinjenje, podvrgnuta je enzimskoj hidrolizi pomoću β -glukuronidaze. Ovaj postupak je omogućio identifikaciju šećernog dela jedinjenja **27**, tipa veze između molekula šećera i aglikona, a takođe, nakon LC-MS analize pomoću standarda, i identifikaciju luteolina kao aglikona. Poređenjem UV spektra jedinjenja **27** koji se karakteriše položajem apsorpcionog maksimuma trake II na 268 nm, sa spektralnim podacima luteolin 3'- i 4'-*O*-glukuronida do kojih su došli Markham i Poter (1974), utvrđeno je da je u strukturi jedinjenja **27** glukuronska kiselina vezana za 4'-OH grupu luteolina. Primećena je i sličnost sa spektralnim podacima luteolin 4'-*O*-glukozida (**Tabela 27**). Na osnovu svega navedenog jedinjenje **27** je identifikovano kao luteolin 4'-*O*-glukuronid.



Slika 49. Shema fragmentacije luteolina u ESI jonskom izvoru [izrađena na osnovu literaturnih podataka Cuyckens i sar. (2001) i Ferreres i sar. (2004)].

Struktura jedinjenja **24**, sa signalom deprotonovanog molekula $[L+248-H]^-$ na m/z 533 u masenom spektru, odgovara luteolin acilheksozidu. Naime, osnovni signal masenog spektra (pri naponu fragmentora 250 V) ovog jedinjenja odgovara fragmentnom jonu na m/z 489 i nastaje najverovatnije dekarboksilacijom acil ostatka i smanjenjem mase za 44 Da (Kachlicki i sar., 2008). Fragmentni jon na m/z 447, koji nastaje neutralnim gubitkom od 86 Da i odgovara luteolin heksozidu, takođe pokazuje da je u strukturi jedinjenja **24** ostatak šećera acilovan. Masa acil ostatka zapravo odgovara malonil grupi (Cuyckens i Claeyss, 2004). Na osnovu raspoloživih spektralnih podataka nije bilo moguće precizno utvrditi položaj OH grupe heksoze koja je učestvovala u reakciji supstitucije. Najverovatnije je u pitanju pozicija 6'' na šta ukazuju literaturni podaci (Cuyckens i Claeyss, 2004), kao i primeri malonilglikozida flavonoida prethodno izolovanih iz vrsta rodova *Lactuca* L. i *Cichorium* L. (DuPont i sar., 2000), koji su taksonomski srodni rodu *Hieracium* (pripadaju istom tribusu).

Identifikacija apigenina i njegovih heterozida. UV spektri (traka I sa apsorpcionim maksimumom na 338 nm i traka II na 266 nm) (Marby i sar., 1970) i karakterističan signal u ESI/SQ MS spektrima (pri naponu fragmentora od 250 V) na m/z 269 $[A-H]^-$ bili su zajednički za jedinjenja **21-23**, **25** i **30**. Jedinjenje **30** je identifikovano kao apigenin pomoću komercijalnog standarda. Utvrđeno je takođe da je apigenin aglikon jedinjenja **21-23** i **25**. Iz shema fragmentacija zaključeno je da jedinjenja **21** i **22** predstavljaju biozide apigenina, a da jedinjenja **23** i **25** predstavljaju monozide apigenina. Jedinjenju **21** odgovara struktura apigenin heksozilpentozida. Njegov maseni spektar se karakteriše signalima koji odgovaraju deprotonovanom molekulu

$[A+162+132-H]^-$ na m/z 563, kao i fragmentnim jonima $[A+162-H]^-$ na m/z 431 i $[A-H]^-$ na m/z 269. Preostala tri heterozida apigenina su identifikovana pomoću komercijalnih standarda. Jedinjenje **22** je apigenin 7-*O*- β -D-rutinozid, kod koga su zabeleženi signali deprotonovanog molekula $[A+162+146-H]^-$ na m/z 577 i fragmentnih jona $[A+162-H]^-$ na m/z 431 i $[A-H]^-$ na m/z 269 u masenom spektru. Jedinjenje **23** je identifikovano kao apigenin 7-*O*- β -D-glukozid, a jedinjenje **25** kao apigenin 7-*O*- β -D-glukuronid. Pored fragmentnog jona na m/z 269, koji odgovara deprotonovanom aglikonu $[A-H]^-$, ova dva jedinjenja u masenom spektru poseduju signale deprotonovanih molekula $[A+162-H]^-$ na m/z 431 (**23**), odnosno $[A+176-H]^-$ na m/z 445 (**25**).

Identifikacija diosmetina i njegovih heterozida. Jedinjenje **29** identifikovano je kao diosmetin pomoću komercijalnog standarda. Frakcija BF11, dobijena semipreparativnim razdvajanjem *n*-BuOH frakcije MeOH ekstrakta cvasti *H. calophyllum*, sadržala je jedinjenja **18** i **20**. U cilju što preciznijeg utvrđivanja njihove strukture, ova frakcija je podvrgnuta kiseloj hidrolizi (Marby i sar., 1970). LC-MS metodom je utvrđeno da se u hidrolizatu nalazio diosmetin, kao aglikon ova dva jedinjenja. MS spektri jedinjenja **18** i **20** karakterišu se signalima koji odgovaraju deprotonovanom molekulu $[D+162-H]^-$ na m/z 461 (**18**), odnosno $[D+162+146-H]^-$ na m/z 607 (**20**), kao i fragmentnacionom jonu na m/z 299, koji nastaje otpuštanjem molekula šećera (gubitak 162, odnosno 146+162 Da) i potiče od deprotonovanog aglikona $[D-H]^-$. Dakle, struktura ovih jedinjenja odgovara diosmetin heksozidu (**18**) i diosmetin heksozilpentozidu (**20**).

Identifikacija kvercetin 3-*O*- β -D-glukozida. Jedinjenje **19**, sa signalima deprotonovanog molekula $[Q+glukozil-H]^-$ na m/z 463 i fragmentnacionog jona $[Q-H]^-$ na m/z 301 u masenom spektru, identifikovano je kao kvercetin 3-*O*- β -D-glukozid, primenom komercijalnog standarda.

LC-MS analiza fenolkarboksilnih kiselina i flavonoida ukazala je na kvalitativnu sličnost, ali i na odgovarajuće razlike, suvih MeOH ekstrakata herbi svih 28 ispitivanih vrsta. Od ukupno pet detektovanih fenolkarboksilnih kiselina (**5**, **8-11**), u svim vrstama bile su prisutne hlorogenska (**5**), 3,5- i 1,5-di-*O*-kafeoilhina kiselina (**8** i **9**). Dva od devet detektovanih heterozida luteolina, i to luteolin 7-*O*-glukoksilozid (**13**) i luteolin 7-*O*-glukozid (**16**) i jedan od četiri detektovana heterozida apigenina, tj. apigenin 7-*O*-glukozid (**23**), bili su prisutni u svim ispitivanim vrstama. Aglikoni, luteolin (**28**) i apigenin (**30**), identifikovani su u 27 vrsta (nisu detektovani samo u *H. naegelianum*). Luteolin 7-*O*-glukuronid (**17**) i apigenin 7-*O*-glukuronid (**25**), kao i apigenin 7-*O*-rutinozid (**22**) nisu bili detektovani u po dve vrste. Kvercetin 3-*O*-glukozid (**19**) bio je prisutan u devetnaest vrsta. Dodatno, diosmetin (**29**) nije registrovan u pet vrsta, dok su njegovi heterozidi **18** i **20** detektovani u dvanaest, odnosno u dve vrste.

Kvantitativna analiza fenolkarboksilnih kiselina u MeOH ekstraktima podzemnih organa i fenolkarboksilnih kiselina i flavonoida u MeOH ekstraktima herbi

Sadržaj fenolkarboksilnih kiselina u suvim MeOH ekstraktima podzemnih organa *H. scheppegianum* i *H. naegelianum*, kao i fenolkarboksilnih kiselina i flavonoida u suvim MeOH ekstraktima herbi svih 28 vrsta, određen je na osnovu površina pikova LC-MS hromatograma snimanih DAD detektorom na 320 nm (fenolkarboksilne kiseline) i 350 nm (flavonoidi). Upporedni prikaz LC-MS hromatograma (350 nm) MeOH ekstrakata herbi svih 28 vrsta dat je na **Slikama 50** i **51**.

Zbog koeluiranja flavonoida **16** i **17**, kao i **26** i **27**, kvantifikacija ova četiri jedinjenja izvršena je korišćenjem podataka dobijenih iz *SIM* hromatograma deprotonovanih molekula $[M-H]^-$ na m/z 447,10 (**16** i **17**) i m/z 461,10 (**26** i **27**). Upporedni prikaz *SIM* hromatograma (m/z 447,10 i 461,10) MeOH ekstrakata herbi svih 28 vrsta dat je na **Slikama P5.1** i **P5.2** u Prilogu 5.

Kao referentne supstance za određivanje sadržaja korišćeni su autentični standardi jedinjenja **5**, **8**, **13**, **15-17**, **22** i **29**. Zavisno od sličnosti njihovih struktura, ovih osam standarda korišćeno je i za kvantifikaciju preostalih 12 detektovanih polifenola. Sadržaj dikafeoilhina kiselina (**6-10**) izražen je preko 3,5-di-*O*-kafeoilhina kiseline (**8**), kafeoilhina kiseline (**11**) preko hlorogenske kiseline (**5**), flavonoida **12** preko luteolin 7-*O*-glukoksilozida (**13**), **14** preko luteolin 7-*O*-rutinozida (**15**), **18** i **20**

preko diosmetina (**29**), **21** preko apigenin 7-*O*-rutinozida (**22**), **24** preko luteolin 7-*O*-glukozida (**16**) i **27** preko luteolin 7-*O*-glukuronida (**17**).

Rezultati kvalitativne i kvantitativne analize fenolkarboksilnih kiselina u suvim MeOH ekstraktima podzemnih organa dve navedene vrste i fenolkarboksilnih kiselina i flavonoida u suvim MeOH ekstraktima herbi svih 28 vrsta predstavljeni su u **Tabelama 28-32**.

Pored toga što su bili kvalitativno slični, suvi MeOH ekstrakti podzemnih organa *H. sheppigianum* i *H. naegelianum* pokazali su sličnost i u pogledu sadržaja identifikovanih jedinjenja (**Tabela 28**). Sadržaj ukupnih fenolkarboksilnih kiselina iznosio je 139,77 mg/g suvog ekstrakta *H. sheppigianum* i 156,62 mg/g suvog ekstrakta *H. naegelianum*. 3,5-Di-*O*-kafeoilhina kiselina (**8**) bila je najzastupljenije jedinjenje u ova dva ekstrakta sa čak dva puta većim sadržajem (72,86 mg/g u *H. naegelianum* i 62,01 u *H. sheppigianum*) u poređenju sa hlorogenskom kiselinom (**5**), koja je u oba ekstrakta bila druga po zastupljenosti (36,90 mg/g u *H. naegelianum* i 35,61 u *H. sheppigianum*).

Tabela 28. Sadržaj pojedinačnih (**5-10**) i ukupnih fenolkarboksilnih kiselina u suvim MeOH ekstraktima podzemnih organa *H. sheppigianum* i *H. naegelianum*, izražen kao mg/g suvog ekstrakta

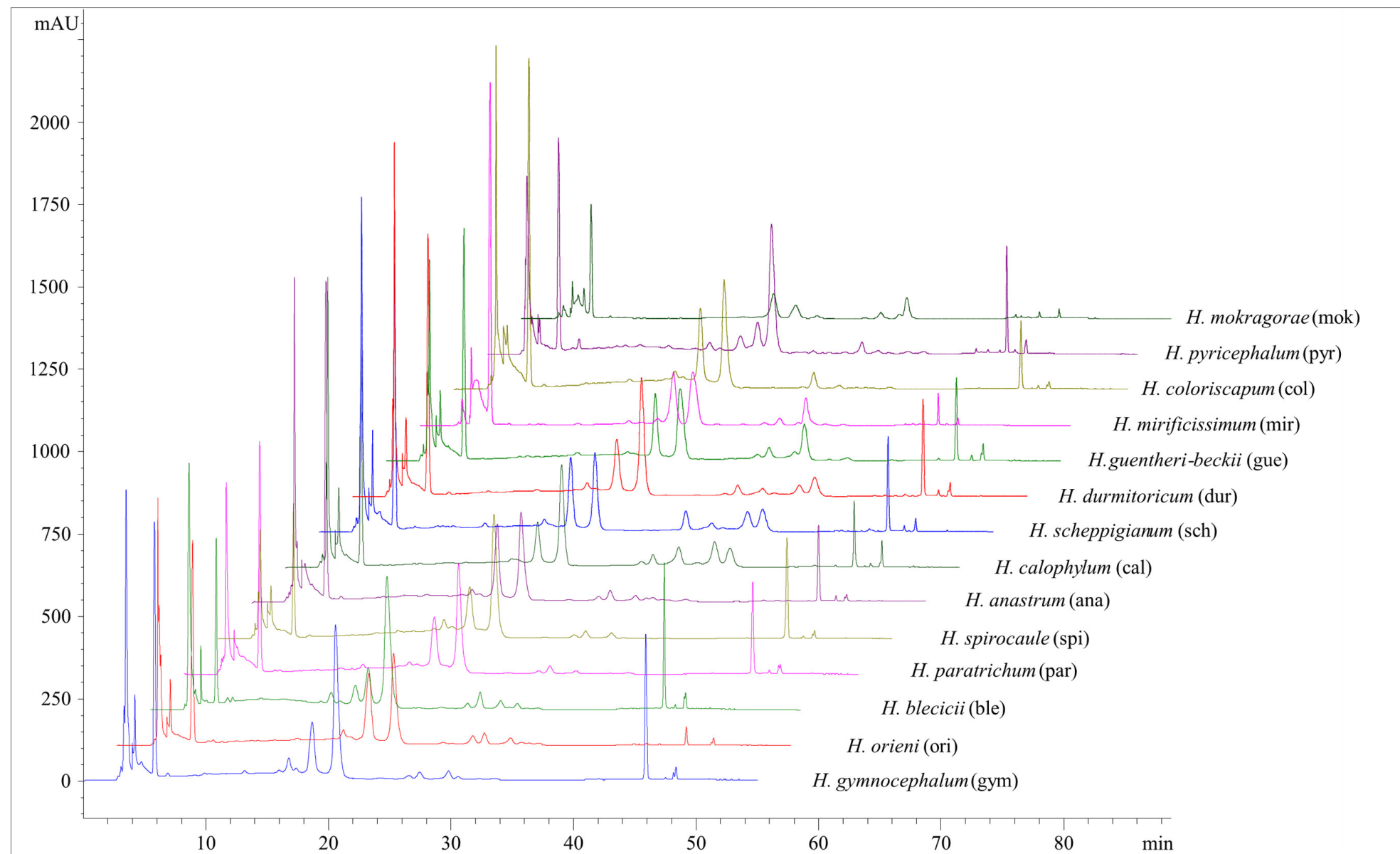
Jedinjenje	<i>H. sheppigianum</i>	<i>H. naegelianum</i>
Hlorogenska kiselina (5)	35,61 ± 1,41	36,90 ± 1,02 ^a
1,3-Di- <i>O</i> -kafeoilhina kiselina (6)	10,75 ± 0,20	13,23 ± 0,18
3,4-Di- <i>O</i> -kafeoilhina kiselina (7)	18,49 ± 0,25	19,74 ± 0,14
3,5-Di- <i>O</i> -kafeoilhina kiselina (8)	62,01 ± 2,02	72,86 ± 2,59
1,5-Di- <i>O</i> -kafeoilhina kiselina (9)	10,62 ± 0,23	11,25 ± 0,15
Dikafeoilhina kiselina (10)	2,29 ± 0,10	2,64 ± 0,03
SUFK^b	139,77 ± 2,03	156,62 ± 1,84

^aRezultati predstavljaju srednje vrednosti tri određivanja ± standardne devijacije.

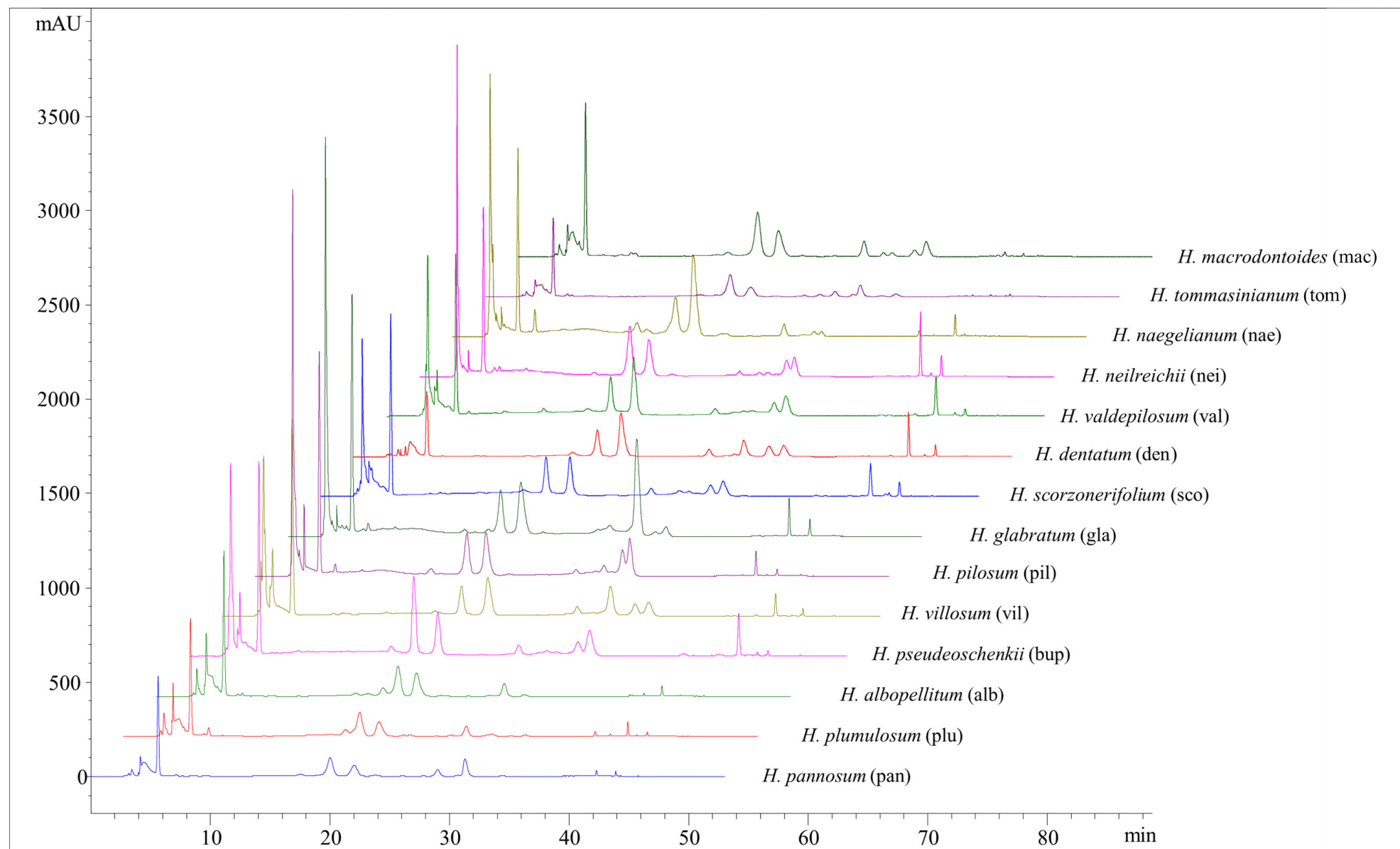
^bSUFK – Sadržaj ukupnih fenolkarboksilnih kiselina.

Ispitivani suvi MeOH ekstrakti podzemnih organa *H. sheppigianum* i *H. naegelianum* imali su veći sadržaj ukupnih fenolkarboksilnih kiselina u poređenju sa MeOH ekstraktima herbi ove dve vrste (44,37 i 58,52 mg/g suvog ekstrakta), ali i u poređenju sa ekstraktima herbi ostalih 26 vrsta (u kojima se ukupni sadržaj ovih jedinjenja kretao od 20,17 mg/g suvog ekstrakta *H. spirocaule* do 64,17 mg/g suvog ekstrakta *H. glabratum*). Fenolkarboksilne kiseline predstavljaju najzastupljeniju klasu jedinjenja samo u ekstraktu herbe *H. neilreichii* (59,11 mg/g). Treba istaći da su hlorogenska kiselina (**5**) i 3,5-di-*O*-kafeoilhina kiselina (**8**), koje su bile dominantne u ekstraktima podzemnih organa *H. sheppigianum* i *H. naegelianum*, bile najzastupljenije fenolkarboksilne kiseline i u ekstraktima njihovih herbi, kao i u ekstraktima herbi ostalih 26 vrsta. Za razliku od ekstrakata podzemnih organa, u ekstraktima herbi hlorogenska kiselina bila je zastupljenija od 3,5-di-*O*-kafeoilhina kiseline kako u slučaju *H. sheppigianum* i *H. naegelianum* [21,91 i 26,57 mg/g (**5**); 15,88 i 25,12 mg/g (**8**)], tako i u slučaju većine (**20**) od preostalih 26 vrsta. Naime, sadržaj hlorogenske kiseline kretao se od 10,65 mg/g u *H. bleicii* do 34,65 mg/g u *H. glabratum*, a sadržaj 3,5-di-*O*-kafeoilhina kiseline od 4,48 mg/g u *H. gymnocephalum* do 33,13 mg/g u *H. neilreichii*.

Pored toga što je sadržao najviše fenolkarboksilnih kiselina, ekstrakt *H. glabratum* bio je ujedno i najbogatiji flavonoidima (205,19 mg/g), kao i ukupnim polifenolima (269,36 mg/g). Najniži sadržaj ukupnih flavonoida (31,48 mg/g) i polifenola (58,62 mg/g) zabeležen je u slučaju ekstrakta *H. mokragorae*. Luteolin (**28**) i njegovi heterozidi (**12-17**, **24**, **26** i **27**) predstavljaju dominantnu grupu flavonoida i uopšte polifenolnih jedinjenja u slučaju ekstrakata 25 vrsta (od 34,16 mg/g u ekstraktu *H. pannosum* do 173,52 mg/g u ekstraktu *H. glabratum*). Najmanje zastupljena jedinjenja u ekstraktima bili su diosmetin i njegovi heterozidi (**18**, **20**, **29**) i kvercetin 3-*O*-glukozid (**19**). U ekstraktima u kojima su detektovani bili su prisutni u malim količinama ($\leq 2,88$ mg/g).



Slika 50. Uporedni LC-MS hromatogrami ($\lambda_{\max}=350$ nm) MeOH ekstrakata herbi 14 vrsta roda *Hieracium*.



Slika 51. Uporedni LC-MS hromatogrami ($\lambda_{\max}=350$ nm) MeOH ekstrakata herbi narednih 14 vrsta roda *Hieracium*.

Tabela 29. Sadržaj pojedinačnih (**5, 8-11**) i ukupnih fenolkarboksilnih kiselina u suvim MeOH ekstraktima herbi 28 ispitivanih vrsta roda *Hieracium*, izražen kao mg/g suvog ekstrakta

Akr. ^a	Ekstrakt	5	8	9	10	11	SUFK ^b
gym	<i>H. gymnocephalum</i>	15,29 ± 0,01 ^c	4,48 ± 0,10	1,33 ± 0,01	-	2,01 ± 0,14	23,11 ± 0,10
ori	<i>H. orieni</i>	18,88 ± 1,13	12,52 ± 0,09	2,61 ± 0,03	-	tr ^d	34,01 ± 0,99
ble	<i>H. bleicicii</i>	10,65 ± 1,21	11,57 ± 0,31	3,25 ± 0,08	-	0,16 ± 0,02	25,63 ± 1,03
par	<i>H. paratrichum</i>	19,46 ± 0,55	8,48 ± 0,03	2,17 ± 0,01	-	0,67 ± 0,03	30,78 ± 0,50
spi	<i>H. spirocaule</i>	10,69 ± 1,22	8,06 ± 0,20	1,34 ± 0,11	-	0,08 ± 0,01	20,17 ± 1,25
ana	<i>H. anastrum</i>	18,58 ± 0,29	7,45 ± 0,02	1,20 ± 0,01	-	1,23 ± 0,04	28,46 ± 0,30
cal	<i>H. calophyllum</i>	17,94 ± 2,33	8,94 ± 0,09	4,05 ± 0,09	-	0,32 ± 0,04	31,25 ± 1,14
sch	<i>H. schepigianum</i>	21,91 ± 0,81	15,88 ± 0,37	5,34 ± 0,01	0,63 ± 0,00	0,61 ± 0,03	44,37 ± 0,92
dur	<i>H. durmitoricum</i>	13,47 ± 0,05	9,71 ± 0,35	2,43 ± 0,01	0,50 ± 0,01	1,23 ± 0,04	27,34 ± 0,28
gue	<i>H. guentheri-beckii</i>	19,83 ± 0,93	12,11 ± 0,19	4,22 ± 0,03	-	1,34 ± 0,08	37,50 ± 0,98
mir	<i>H. mirificissimum</i>	30,29 ± 0,21	14,47 ± 0,04	2,03 ± 0,00	-	0,10 ± 0,01	46,89 ± 0,23
col	<i>H. coloriscapum</i>	20,97 ± 0,09	7,65 ± 0,03	2,27 ± 0,03	0,63 ± 0,00	1,18 ± 0,00	32,70 ± 0,10
pyr	<i>H. pyricephalum</i>	17,41 ± 0,43	10,64 ± 0,76	2,72 ± 0,50	-	0,60 ± 0,02	31,37 ± 0,83
mok	<i>H. mokragorae</i>	12,68 ± 0,36	12,76 ± 0,16	1,70 ± 0,00	tr	tr	27,14 ± 0,40
pan	<i>H. pannosum</i> s.l.	14,22 ± 0,01	7,43 ± 0,03	1,50 ± 0,00	0,45 ± 0,01	0,18 ± 0,00	23,78 ± 0,03
plu	<i>H. plumulosum</i>	17,79 ± 0,04	9,46 ± 0,03	3,61 ± 0,01	0,72 ± 0,00	0,59 ± 0,01	32,17 ± 0,04
alb	<i>H. albopellitum</i>	14,64 ± 0,07	9,80 ± 0,01	4,15 ± 0,06	0,54 ± 0,00	1,75 ± 0,05	30,88 ± 0,11
bup	<i>H. pseudoschenkii</i>	22,33 ± 0,18	22,26 ± 0,33	3,51 ± 0,06	-	0,87 ± 0,06	48,97 ± 0,41
vil	<i>H. villosum</i>	24,57 ± 0,56	12,52 ± 0,29	2,62 ± 0,00	-	0,58 ± 0,02	40,29 ± 0,70
pil	<i>H. pilosum</i>	31,74 ± 0,07	28,12 ± 0,01	2,55 ± 0,00	-	0,44 ± 0,07	62,85 ± 0,12
gla	<i>H. glabratum</i>	34,65 ± 0,10	27,31 ± 0,04	2,21 ± 0,02	-	-	64,17 ± 0,10
sco	<i>H. scorzonerifolium</i>	21,15 ± 0,24	11,37 ± 0,03	2,75 ± 0,04	-	1,53 ± 0,09	36,80 ± 0,21
den	<i>H. dentatum</i> s.l.	13,15 ± 0,50	13,62 ± 0,23	5,58 ± 0,29	-	0,49 ± 0,04	32,84 ± 0,70
val	<i>H. valdepilosum</i> s.l.	18,37 ± 0,22	7,90 ± 0,12	1,67 ± 0,01	-	0,31 ± 0,01	28,25 ± 0,20
nei	<i>H. neilreichii</i>	23,51 ± 1,29	33,13 ± 0,08	1,82 ± 0,00	-	0,65 ± 0,03	59,11 ± 1,28
nae	<i>H. naegelianum</i>	26,57 ± 0,26	25,12 ± 0,22	3,38 ± 0,04	1,07 ± 0,01	2,38 ± 0,36	58,52 ± 0,28
tom	<i>H. tommasinianum</i>	15,66 ± 0,05	17,75 ± 0,08	2,69 ± 0,01	-	0,08 ± 0,00	36,18 ± 0,08
mac	<i>H. macrodontoides</i>	24,79 ± 0,11	28,65 ± 0,09	6,83 ± 0,01	-	tr	60,27 ± 0,10

^aAkronim vrste. ^bSUFK – sadržaj ukupnih fenolkarboksilnih kiselina. ^cRezultati predstavljaju srednje vrednosti tri određivanja ± standardne devijacije. ^dtr – jedinjenje prisutno u tragovima (< 0,01 mg/g). Fenolkarboksilne kiseline: hlorogenska kiselina (**5**), 3,5-di-*O*-kafeoilhina kiselina (**8**), 1,5-di-*O*-kafeoilhina kiselina (**9**), dikafeoilhina kiselina (**10**), monokafeoilhina kiselina (**11**).

Tabela 30. Sadržaj flavonoida (**12-18**) u suvim MeOH ekstraktima herbi 28 ispitivanih vrsta roda *Hieracium*, izražen kao mg/g suvog ekstrakta

Akr. ^a	Ekstrakt	12	13	14	15	16	17	18
gym	<i>H. gymnocephalum</i>	2,59 ± 0,02 ^b	25,06 ± 0,10	0,64 ± 0,02	4,48 ± 0,09 ^b	20,24 ± 0,07	11,86 ± 0,01	-
ori	<i>H. orieni</i>	14,00 ± 0,01	16,76 ± 0,01	0,79 ± 0,01	7,64 ± 0,08	17,47 ± 0,01	17,75 ± 0,01	0,16 ± 0,00
ble	<i>H. blecicii</i>	17,70 ± 0,14	23,62 ± 0,31	0,60 ± 0,01	4,38 ± 0,04	37,62 ± 0,31	20,72 ± 0,01	-
par	<i>H. paratrichum</i>	5,65 ± 0,05	5,92 ± 0,08	0,32 ± 0,00	7,96 ± 0,15	40,68 ± 0,67	16,01 ± 0,00	-
spi	<i>H. spirocaule</i>	17,94 ± 0,06	18,65 ± 0,39	0,58 ± 0,00	5,91 ± 0,15	23,21 ± 0,03	11,00 ± 0,01	-
ana	<i>H. anastrum</i>	3,46 ± 0,06	13,02 ± 0,00	0,55 ± 0,01	2,83 ± 0,18	24,59 ± 0,05	22,42 ± 0,01	0,15 ± 0,00
cal	<i>H. calophyllum</i>	3,66 ± 0,06	6,58 ± 0,06	0,50 ± 0,01	1,81 ± 0,05	33,62 ± 0,31	tr ^c	-
sch	<i>H. scheppegianum</i>	8,54 ± 0,04	14,27 ± 0,02	0,27 ± 0,01	0,66 ± 0,05	30,55 ± 0,04	-	0,29 ± 0,02
dur	<i>H. durmitoricum</i>	13,17 ± 0,01	16,40 ± 0,04	0,38 ± 0,00	2,11 ± 0,10	34,00 ± 0,54	tr	-
gue	<i>H. guentheri-beckii</i>	5,15 ± 0,06	9,15 ± 0,01	0,29 ± 0,01	0,59 ± 0,03	15,16 ± 0,01	48,32 ± 0,02	-
mir	<i>H. mirificissimum</i>	tr	13,16 ± 0,04	0,28 ± 0,00	2,29 ± 0,05	16,95 ± 0,08	74,46 ± 0,06	-
col	<i>H. coloriscapum</i>	1,24 ± 0,01	15,28 ± 0,01	1,15 ± 0,00	2,31 ± 0,07	22,95 ± 0,07	23,70 ± 0,01	-
pyr	<i>H. pyricephalum</i>	14,38 ± 0,21	23,72 ± 0,23	0,64 ± 0,01	4,40 ± 0,32	24,99 ± 0,03	tr	-
mok	<i>H. mokragorae</i>	-	4,71 ± 0,01	-	0,45 ± 0,01	2,18 ± 0,01	18,53 ± 0,00	tr
pan	<i>H. pannosum</i> s.l.	0,87 ± 0,01	9,14 ± 0,03	0,07 ± 0,01	-	2,52 ± 0,36	21,56 ± 0,05	-
plu	<i>H. plumulosum</i>	tr	8,23 ± 0,03	-	1,40 ± 0,01	14,69 ± 0,15	35,92 ± 0,11	tr
alb	<i>H. albopellitum</i>	2,05 ± 0,05	8,49 ± 0,18	0,38 ± 0,00	3,54 ± 0,43	16,28 ± 0,13	26,44 ± 0,06	tr
bup	<i>H. pseudoschenkii</i>	0,92 ± 0,03	18,67 ± 0,62	0,36 ± 0,00	1,04 ± 0,04	12,74 ± 0,20	2,39 ± 0,00	tr
vil	<i>H. villosum</i>	-	11,47 ± 0,03	0,36 ± 0,01	0,34 ± 0,02	15,08 ± 0,05	45,77 ± 0,10	tr
pil	<i>H. pilosum</i>	10,35 ± 0,02	33,38 ± 0,05	1,51 ± 0,01	-	19,10 ± 0,02	16,53 ± 0,01	tr
gla	<i>H. glabratum</i>	7,61 ± 0,01	20,01 ± 0,01	1,30 ± 0,00	2,34 ± 0,12	18,02 ± 0,08	118,94 ± 0,12	tr
sco	<i>H. scorzonerifolium</i>	-	18,88 ± 0,20	tr	1,08 ± 0,10	19,70 ± 0,04	4,30 ± 0,00	0,15 ± 0,00
den	<i>H. dentatum</i> s.l.	10,02 ± 0,00	15,82 ± 0,36	0,40 ± 0,00	0,70 ± 0,05	20,24 ± 0,30	25,62 ± 0,01	-
val	<i>H. valdepilosum</i> s.l.	0,53 ± 0,03	8,04 ± 0,19	0,18 ± 0,01	-	35,19 ± 0,02	10,16 ± 0,00	-
nei	<i>H. neilreichii</i>	-	17,32 ± 0,02	0,17 ± 0,00	tr	9,05 ± 0,01	-	-
nae	<i>H. naegelianum</i>	40,82 ± 0,23	34,82 ± 0,17	2,50 ± 0,01	0,32 ± 0,00	49,20 ± 0,18	tr	-
tom	<i>H. tommasinianum</i>	tr	16,14 ± 0,05	-	tr	3,14 ± 0,01	15,28 ± 0,10	tr
mac	<i>H. macrodontoides</i>	3,39 ± 0,02	19,31 ± 0,02	-	-	21,03 ± 0,03	26,90 ± 0,01	-

^aAkronim vrste. ^bRezultati predstavljaju srednje vrednosti tri određivanja ± standardne devijacije. ^ctr – jedinjenje prisutno u tragovima (< 0,01 mg/g). Flavonoidi: luteolin heksozilpentozid (**12**), luteolin 7-*O*-glukoksilozid (**13**), luteolin heksozildezoksiheksosid (**14**), luteolin 7-*O*-rutinozid (**15**), luteolin 7-*O*-glukozid (**16**), luteolin 7-*O*-glukuronid (**17**), diosmetin heksozid (**18**).

Tabela 31. Sadržaj flavonoida (**19-25**) u suvim MeOH ekstraktima herbi 28 ispitivanih vrsta roda *Hieracium*, izražen kao mg/g suvog ekstrakta

Akr. ^a	Ekstrakt	19	20	21	22	23	24	25
gym	<i>H. gymnocephalum</i>	1,36 ± 0,00 ^b	-	0,13 ± 0,00	0,83 ± 0,02	0,92 ± 0,01	0,05 ± 0,00	tr ^c
ori	<i>H. ori</i>	-	-	0,20 ± 0,00	3,32 ± 0,03	0,78 ± 0,01	0,10 ± 0,00	tr
ble	<i>H. bleicicii</i>	0,94 ± 0,00	0,07 ± 0,00	-	1,37 ± 0,06	0,75 ± 0,05	0,07 ± 0,01	-
par	<i>H. paratrichum</i>	tr	-	0,11 ± 0,01	0,75 ± 0,05	0,60 ± 0,01	-	tr
spi	<i>H. spirocaule</i>	-	-	0,40 ± 0,03	1,40 ± 0,01	0,67 ± 0,03	-	tr
ana	<i>H. anastrum</i>	-	-	2,46 ± 0,12	0,98 ± 0,05	0,42 ± 0,01	0,04 ± 0,01	tr
cal	<i>H. calophyllum</i>	-	-	tr	1,32 ± 0,00	2,78 ± 0,05	0,07 ± 0,00	3,62 ± 0,01
sch	<i>H. schepigianum</i>	-	-	0,28 ± 0,00	0,25 ± 0,04	0,71 ± 0,01	tr	2,32 ± 0,01
dur	<i>H. durmitoricum</i>	0,81 ± 0,01	-	-	1,16 ± 0,00	0,66 ± 0,02	0,07 ± 0,01	1,00 ± 0,02
gue	<i>H. guentheri-beckii</i>	-	0,03 ± 0,00	0,56 ± 0,03	1,36 ± 0,03	1,25 ± 0,05	-	4,58 ± 0,03
mir	<i>H. mirificissimum</i>	0,58 ± 0,00	-	1,23 ± 0,01	0,87 ± 0,03	0,23 ± 0,01	-	3,01 ± 0,00
col	<i>H. coloriscapum</i>	-	-	tr	0,61 ± 0,02	0,40 ± 0,01	0,04 ± 0,00	tr
pyr	<i>H. pyricephalum</i>	0,20 ± 0,00	-	0,36 ± 0,01	0,62 ± 0,03	0,27 ± 0,02	0,05 ± 0,00	-
mok	<i>H. mokragorae</i>	1,01 ± 0,00	-	tr	tr	0,70 ± 0,00	-	3,20 ± 0,00
pan	<i>H. pannosum</i> s.l.	0,52 ± 0,01	-	tr	2,43 ± 0,03	tr	-	2,02 ± 0,00
plu	<i>H. plumulosum</i>	-	-	tr	tr	0,39 ± 0,01	0,10 ± 0,01	tr
alb	<i>H. albopellitum</i>	0,15 ± 0,01	-	tr	0,35 ± 0,02	0,35 ± 0,02	0,03 ± 0,00	tr
bup	<i>H. pseudoschenkii</i>	0,76 ± 0,01	-	1,86 ± 0,06	1,13 ± 0,09	0,76 ± 0,00	tr	2,11 ± 0,00
vil	<i>H. villosum</i>	1,83 ± 0,02	-	-	0,23 ± 0,03	0,29 ± 0,01	-	2,83 ± 0,00
pil	<i>H. pilosum</i>	0,76 ± 0,00	-	tr	tr	0,34 ± 0,00	-	4,43 ± 0,00
gla	<i>H. glabratum</i>	1,25 ± 0,01	-	0,47 ± 0,03	2,15 ± 0,02	0,51 ± 0,00	-	25,77 ± 0,00
sco	<i>H. scorzonerifolium</i> s.l.	0,25 ± 0,01	-	0,96 ± 0,07	3,51 ± 0,04	0,68 ± 0,04	0,06 ± 0,00	2,32 ± 0,00
den	<i>H. dentatum</i> s.l.	0,13 ± 0,00	-	0,84 ± 0,03	0,83 ± 0,04	0,25 ± 0,03	-	2,66 ± 0,18
val	<i>H. valdepiosum</i> s.l.	tr	-	-	tr	0,17 ± 0,00	-	1,12 ± 0,00
nei	<i>H. neilreichii</i>	2,46 ± 0,01	-	2,39 ± 0,02	-	0,69 ± 0,02	tr	3,03 ± 0,00
nae	<i>H. naegelianum</i>	2,88 ± 0,00	-	-	0,54 ± 0,01	0,28 ± 0,03	0,22 ± 0,01	1,07 ± 0,00
tom	<i>H. tommasinianum</i>	-	-	0,90 ± 0,01	2,07 ± 0,05	0,25 ± 0,00	tr	1,76 ± 0,00
mac	<i>H. macrodontoides</i>	1,55 ± 0,01	-	0,23 ± 0,00	-	1,33 ± 0,00	-	0,48 ± 0,00

^aAkronim vrste. ^bRezultati predstavljaju srednje vrednosti tri određivanja ± standardne devijacije. ^ctr – jedinjenje prisutno u tragovima (< 0,01 mg/g). Flavonoidi: kvercetin 3-*O*-glukozid (**19**), diosmetin heksozilpentozid (**20**), apigenin heksozilpentozid (**21**), apigenin 7-*O*-rutinozid (**22**), apigenin 7-*O*-glukozid (**23**), luteolin 6"-acilheksozid (**24**), apigenin 7-*O*-glukuronid (**25**).

Tabela 32. Sadržaj pojedinačnih (26-30) i ukupnih flavonoida (12-30), kao i ukupnih polifenola (5, 8-30) u suvim MeOH ekstraktima herbi 28 ispitivanih vrsta roda *Hieracium*, izražen kao mg/g suvog ekstrakta

Akr. ^a	Ekstrakt	26	27	28	29	30	SUFL ^b	SUP ^c
gym	<i>H. gymnocephalum</i>	-	tr	3,88 ± 0,00 ^d	0,06 ± 0,00	0,34 ± 0,00	72,44 ± 0,10	95,55 ± 0,09
ori	<i>H. orienti</i>	-	-	tr	0,18 ± 0,00	0,07 ± 0,00	79,22 ± 0,09	113,23 ± 0,98
ble	<i>H. bleicicii</i>	tr ^c	1,00 ± 0,00	2,11 ± 0,04	0,49 ± 0,01	0,62 ± 0,06	112,06 ± 0,40	137,69 ± 1,11
par	<i>H. paratrichum</i>	0,57 ± 0,00	2,40 ± 0,00	1,27 ± 0,03	0,49 ± 0,02	0,41 ± 0,00	83,14 ± 0,70	113,92 ± 0,70
spi	<i>H. spirocaule</i>	-	0,29 ± 0,00	1,77 ± 0,00	0,35 ± 0,05	0,35 ± 0,01	82,52 ± 0,40	102,69 ± 1,19
ana	<i>H. anastrum</i>	0,50 ± 0,00	1,40 ± 0,00	1,34 ± 0,05	0,17 ± 0,00	0,32 ± 0,02	74,65 ± 0,19	103,11 ± 0,25
cal	<i>H. calophyllum</i>	0,49 ± 0,01	19,19 ± 0,01	0,60 ± 0,00	0,18 ± 0,01	1,21 ± 0,01	75,63 ± 0,33	106,88 ± 1,01
sch	<i>H. scheppigianum</i>	1,17 ± 0,00	16,11 ± 0,01	1,13 ± 0,01	0,14 ± 0,00	0,53 ± 0,00	77,22 ± 0,05	121,59 ± 0,90
dur	<i>H. durmitoricum</i>	1,17 ± 0,00	13,69 ± 0,01	2,30 ± 0,00	0,17 ± 0,01	0,45 ± 0,01	87,54 ± 0,50	114,88 ± 0,64
gue	<i>H. guentheri-beckii</i>	1,27 ± 0,00	6,99 ± 0,00	1,02 ± 0,03	0,36 ± 0,01	0,69 ± 0,00	96,77 ± 0,10	134,27 ± 0,97
mir	<i>H. mirificissimum</i>	tr	tr	0,04 ± 0,00	-	0,62 ± 0,01	113,72 ± 0,08	160,61 ± 0,24
col	<i>H. coloriscapum</i>	tr	0,70 ± 0,00	1,33 ± 0,00	0,06 ± 0,00	0,08 ± 0,00	69,85 ± 0,10	102,55 ± 0,10
pyr	<i>H. pyricephalum</i>	tr	3,17 ± 0,01	0,96 ± 0,01	0,33 ± 0,01	0,28 ± 0,00	74,37 ± 0,43	105,74 ± 0,79
mok	<i>H. mokragorae</i>	tr	-	tr	tr	0,70 ± 0,00	31,48 ± 0,01	58,62 ± 0,38
pan	<i>H. pannosum</i> s.l.	tr	-	tr	-	0,66 ± 0,00	39,79 ± 0,38	63,57 ± 0,32
plu	<i>H. plumulosum</i>	tr	6,97 ± 0,00	tr	tr	0,41 ± 0,00	68,11 ± 0,15	100,28 ± 0,15
alb	<i>H. albopellitum</i>	-	-	tr	tr	0,57 ± 0,00	58,63 ± 0,52	89,51 ± 0,53
bup	<i>H. pseudoschenkii</i>	0,48 ± 0,00	17,22 ± 0,00	tr	tr	tr	60,44 ± 0,21	109,41 ± 0,41
vil	<i>H. villosum</i>	0,58 ± 0,00	21,73 ± 0,00	0,33 ± 0,01	0,11 ± 0,00	0,02 ± 0,00	100,97 ± 0,10	141,26 ± 0,65
pil	<i>H. pilosum</i>	1,40 ± 0,00	28,53 ± 0,00	0,25 ± 0,01	tr	0,68 ± 0,01	117,26 ± 0,03	180,11 ± 0,10
gla	<i>H. glabratum</i>	3,21 ± 0,00	1,64 ± 0,00	0,49 ± 0,00	0,11 ± 0,02	1,37 ± 0,02	205,19 ± 0,19	269,36 ± 0,10
sco	<i>H. scorzonrifolium</i> s.l.	1,13 ± 0,00	20,44 ± 0,00	0,29 ± 0,01	-	0,89 ± 0,01	74,64 ± 0,22	111,44 ± 0,22
den	<i>H. dentatum</i> s.l.	0,76 ± 0,01	14,59 ± 0,00	2,25 ± 0,11	0,21 ± 0,01	2,06 ± 0,01	97,38 ± 0,40	130,22 ± 0,82
val	<i>H. valdepilosum</i> s.l.	1,09 ± 0,00	41,20 ± 0,01	1,54 ± 0,03	0,06 ± 0,01	0,84 ± 0,00	100,12 ± 0,20	128,37 ± 0,20
nei	<i>H. neilreichii</i>	tr	tr	1,57 ± 0,04	0,06 ± 0,00	1,55 ± 0,02	38,29 ± 0,02	97,40 ± 1,14
nae	<i>H. naegelianum</i>	-	-	-	-	-	132,65 ± 0,35	191,17 ± 0,50
tom	<i>H. tommasinianum</i>	1,15 ± 0,00	tr	tr	tr	tr	40,69 ± 0,09	76,87 ± 0,09
mac	<i>H. macrodontoides</i>	tr	16,68 ± 0,01	tr	-	tr	90,90 ± 0,03	151,17 ± 0,10

^aAkronim vrste. ^bSUFL – sadržaj ukupnih flavonoida. ^cSUP – sadržaj ukupnih polifenola. ^dRezultati predstavljaju srednje vrednosti tri određivanja ± standardne devijacije. ^etr – jedinjenje prisutno u tragovima (< 0,01 mg/g). Flavonoidi luteolin 4'-O-glukozid (26), luteolin 4'-O-glukuronid (27), luteolin (28), diosmetin (29), apigenin (30).

Što se tiče sadržaja pojedinačnih flavonoida u suvim MeOH ekstraktima herbi 28 vrsta, on se u nekim slučajevima značajno međusobno razlikovao, a najveće varijacije su uočene za sledeća jedinjenja (Tabele 30-32):

- sadržaj luteolin 7-*O*-glukozida (**16**) i 7-*O*-glukoksilozida (**13**) kretao se od 2,18 i 4,71 mg/g u *H. mokragorae* do 49,20 i 34,82 mg/g u *H. naegelianum*;
- luteolin 7-*O*-glukuronida (**17**) od tragova (u četiri vrste) do 118,94 mg/g u *H. glabratum* (u ekstraktima dve vrste nije detektovan);
- luteolin 4'-*O*-glukuronida (**27**) od tragova (u četiri vrste) do 41,20 mg/g u *H. valdepilosum* (u ekstraktima pet vrsta nije detektovan);
- apigenin 7-*O*-glukuronida (**25**) od tragova (u osam vrsta) do 25,77 u *H. glabratum* (u ekstraktima dve vrste nije detektovan).

Od 28 vrsta roda *Hieracium*, koje su predmet ove doktorske disertacije, do sada je u pogledu kvalitativnog i/ili kvantitativnog sastava fenolkarboksilnih kiselina i flavonoida ispitivano samo osam: MeOH ekstrakti herbi *H. gymnocephalum*, *H. bleicii*, *H. guentheri-beckii*, *H. coloriscapum* i *H. naegelianum*, MeOH ekstrakti korena, listova i cvasti *H. pannosum*, i polarni (MeOH:aceton:voda 3:1:1, V/V/V) ekstrakti cvasti *H. villosum* i *H. pilosum* (Gökbulut i sar., 2017; Petrović i sar., 1999a; Zidorn i sar., 2002). U preostalim 20 vrsta, kompozicija ovih sekundarnih metabolita do sada nije ispitivana. U MeOH ekstraktima herbi *H. gymnocephalum*, *H. bleicii*, *H. guentheri-beckii*, *H. coloriscapum* i *H. naegelianum* (Petrović i sar., 1999a), pored tragova kafene kiseline, prethodno su, kao i u okviru ove doktorske disertacije, identifikovane hlorogenska (**5**) i 3,5-di-*O*-kafeoilhina kiselina (**8**), a u ekstraktima *H. gymnocephalum*, *H. bleicii*, *H. guentheri-beckii* i *H. naegelianum* i 1,5-di-*O*-kafeoilhina kiselina (**9**). U okviru ove doktorske disertacije, 1,5-di-*O*-kafeoilhina kiselina detektovana je i u ekstraktu *H. coloriscapum*. U prethodno ispitivanim polarnim ekstraktima cvasti *H. villosum* i *H. pilosum* (Zidorn i sar., 2002), pored 4,5-di-*O*-kafeoilhina kiseline, detektovane su, kao i u MeOH ekstraktima herbi ovih vrsta u okviru ove doktorske disertacije, hlorogenska i 3,5-di-*O*-kafeoilhina kiselina. U okviru ove doktorske disertacije, u ekstraktima herbi identifikovana je dodatno i 1,5-di-*O*-kafeoilhina kiselina. Kao i u MeOH ekstraktu herbe *H. pannosum* ispitivanom u okviru ove doktorske disertacije, u prethodno ispitivanim MeOH ekstraktima listova i cvasti ove biljke takođe je identifikovana hlorogenska kiselina (pored kafene kiseline) (Gökbulut i sar., 2017). U ekstraktu herbe su, u okviru ove doktorske disertacije, dodatno identifikovane 3,5- i 1,5-di-*O*-kafeoilhina kiselina.

U MeOH ekstraktima herbi *H. gymnocephalum*, *H. bleicii*, *H. guentheri-beckii*, *H. coloriscapum* i *H. naegelianum* prethodno su identifikovani luteolin 7-*O*-glukoksilozid (**13**), luteolin 7-*O*-rutinozid (**15**), luteoin 7-*O*-glukozid (**16**), i luteolin (**28**), a u ekstraktima *H. gymnocephalum*, *H. bleicii*, *H. guentheri-beckii* i *H. coloriscapum* takođe i apigenin 7-*O*-glukozid (**23**) (Petrović i sar., 1999a). U okviru ove doktorske disertacije, apigenin 7-*O*-glukozid je detektovan i u ekstraktu *H. naegelianum*, a dodatno, identifikovani su i luteolin 7-*O*-glukuronid (**17**) i apigenin 7-*O*-rutinozid (**22**) (u svih pet navedenih vrsta), luteolin 4'-*O*-glukuronid (**27**), diosmetin (**29**) i apigenin (**30**) (u četiri vrste; izuzev *H. naegelianum*), apigenin 7-*O*-glukuronid (**25**, u četiri vrste; izuzev *H. bleicii*), luteolin 4'-*O*-glukozid (**26**, u *H. bleicii*, *H. guentheri-beckii* i *H. coloriscapum*) i kvercetin 3-*O*-glukozid (**19**, u *H. gymnocephalum*, *H. bleicii* i *H. naegelianum*). Zidorn i sar. (2002) su u polarnim ekstraktima cvasti *H. villosum* i *H. pilosum* identifikovali luteolin, luteoin 7-*O*-glukozid, luteolin 7-*O*-glukuronid i luteolin 4'-*O*-glukozid, čije prisustvo je potvrđeno i u okviru ove disertacije u MeOH ekstraktima herbi ovih biljaka. U ekstraktima herbi obe biljke dodatno su identifikovani apigenin, diosmetin, luteolin 7-*O*-glukoksilozid, luteolin 4'-*O*-glukuronid, apigenin 7-*O*-rutinozid, apigenin 7-*O*-glukozid, apigenin 7-*O*-glukuronid i kvercetin 3-*O*-glukozid, a u ekstraktu herbe *H. villosum* i luteolin 7-*O*-rutinozid. Sa druge strane, Zidorn i sar. (2002) su u ekstraktima cvasti obe vrste identifikovali i izoetin 4'-*O*-glukuronid, koji nije detektovan u ekstraktima herbi u okviru ove doktorske disertacije. Kao i u slučaju MeOH ekstrakta herbe *H. pannosum* ispitivanom u okviru ove doktorske disertacije, u prethodno ispitivanim ekstraktima listova i cvasti ove biljke identifikovani su apigenin, luteolin i luteolin 7-*O*-glukozid (Gökbulut i sar., 2017). U okviru ove doktorske disertacije, u ekstraktu herbe

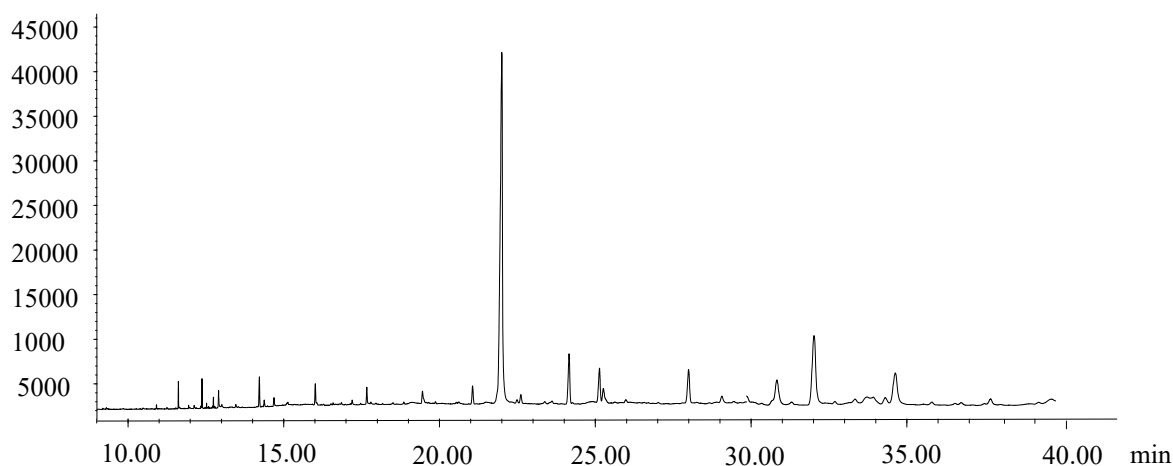
ove biljke dodatno su identifikovani luteolin 7-*O*-glukoksilozid, luteolin 7-*O*-glukuronid, luteolin 4'-*O*-glukozid, apigenin 7-*O*-rutinozid, apigenin 7-*O*-glukozid, apigenin 7-*O*-glukuronid i kvercetin 3-*O*-glukozid.

Kvalitativna i kvantitativna analiza fenolkarboksilnih kiselina u ekstraktima podzemnih organa *H. scheppigianum* i *H. naegelianum*, kao i fenolkarboksilnih kiselina i flavonoida u ekstraktima herbi 20 vrsta ovog roda izvršena je po prvi put u okviru ove doktorske disertacije. Za preostalih osam vrsta, podaci o sastavu ove dve klase sekundarnih metabolita su značajno upotpunjeni (u njima je dodatno identifikovano od sedam do deset jedinjenja). Treba istaći da je 1,3-di-*O*-kafeoilhina kiselina identifikovana po prvi put u vrstama roda *Hieracium* u okviru ove doktorske disertacije. MeOH ekstrakti većine ispitivanih vrsta pokazali su se kao bogati izvori ove dve klase jedinjenja, naročito ekstrakti podzemnih organa *H. scheppigianum* i *H. naegelianum* (kao izvori fenolkarboksilnih kiselina) i ekstrakt herbe *H. glabratum* (kao izvor flavonoida).

1.3. Ispitivanje triterpena

1.3.1. Identifikacija triterpena u CH₂Cl₂ ekstraktu herbe *Hieracium gymnocephalum*

Iz suvog CH₂Cl₂ ekstrakta herbe *H. gymnocephalum*, primenom hromatografije u koloni na stubu silikagela, dobijene su frakcije bogate triterpenima. Primenom gasne hromatografije (GC-FID-MS) i NMR spektroskopije, utvrđena je struktura pet jedinjenja (**31-35**). Identitet ovih jedinjenja potvrđen je pomoću komercijalnih standarda β -amirina (**31**) i α -amirina (**32**), kao i polusintetski dobijenih acetil derivata β -amirina, lupeola i α -amirina, tj. β -amirin-acetata (**33**), lupeol-acetata (**34**) i α -amirin-acetata (**35**). 1D i/ili 2D NMR spektri jedinjenja **31-35** snimani su u CHCl₃-*d*. Na **Slici 52** prikazan je GC-FID hromatogram CH₂Cl₂ ekstrakta *H. gymnocephalum*.



Slika 52. GC-FID hromatogram CH₂Cl₂ ekstrakta *H. gymnocephalum*

Analiza masenih spektara jedinjenja (31-35)

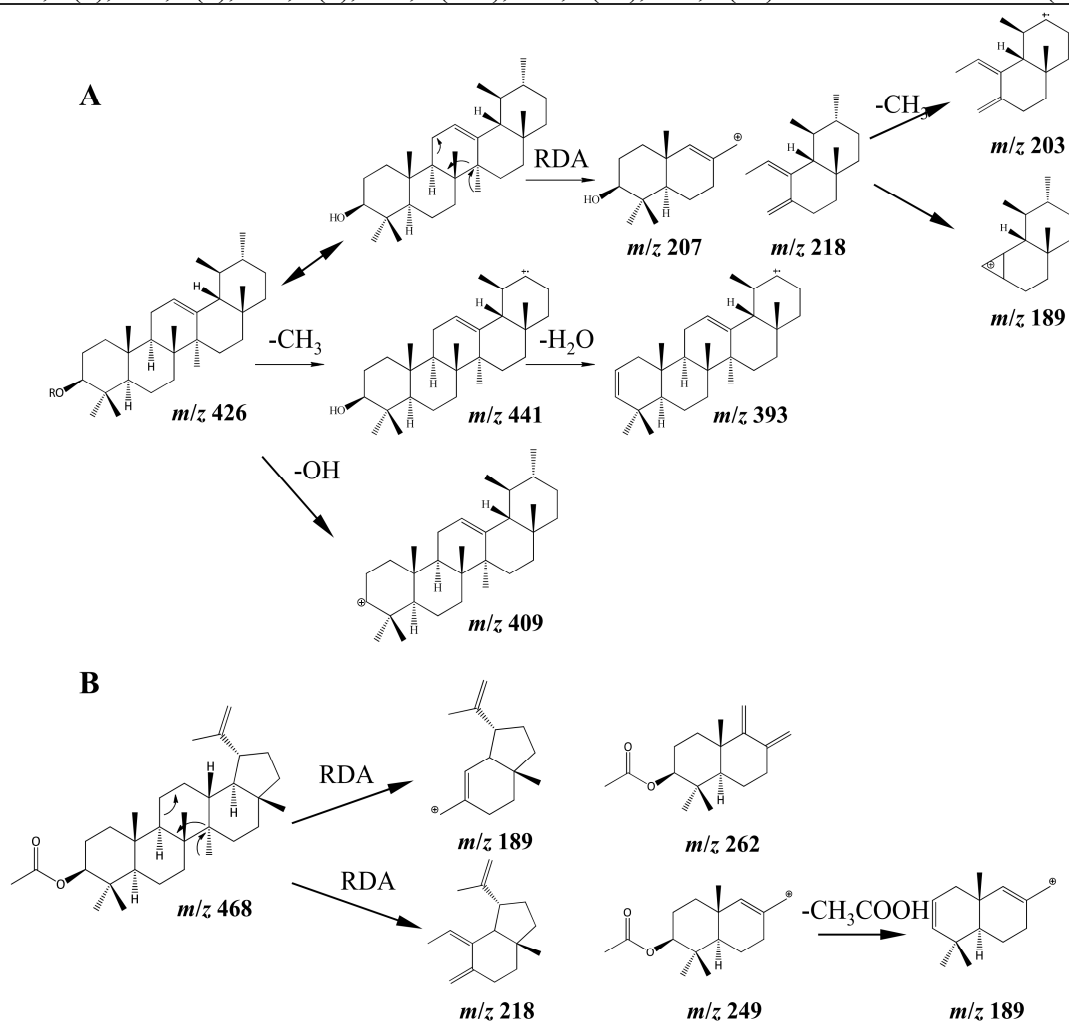
Tokom GC-FID-MS analize ekstrakata, frakcija ekstrakata i standardnih supstanci, maseni spektri snimani su uz EI tehniku jonizacije na 70 eV. Detaljan pregled masenih spektralnih podataka jedinjenja **31-35** dat je u **Tabeli 33**.

U masenim spektrima jedinjenja **31** i **32**, prisutan je molekulski jon na m/z 426 [M]⁺, koji odgovara molekulskoj formuli C₃₀H₅₀O i ukazuje na pentaciklično triterpensko jezgro molekula. Molekulski jon jedinjenja **33**, **34** i **35** na m/z 468 [M]⁺ odgovara acetil derivatima jedinjenja navedene molekulске formule. Poređenjem masenih spektara jedinjenja **31-33** i **35** (**Slike P6.1-5**, Prilog 6) može se zaključiti da je fragmentacija ovih jedinjenja slična. Karakterističan najintenzivniji signal u masenim spektrima ova četiri jedinjenja odgovara fragmentnom jonu na m/z 218 koji nastaje Retro-Diels-Alder-ovim (RDA) raspadom pentacikličnog triterpenskog jezgra sa

12,13-dvostrukom vezom u prstenu C i ukazuje na oleansku ili ursansku strukturu. Nastali RDA fragment sadrži D i E prsten i njegova struktura se u jedinjenjima **31** i **33**, odnosno **32** i **35** razlikuje samo u položaju C-29 metil grupe (ova grupa je na položaju C-20 kod **31** i **33**, odnosno na C-19 kod **32** i **35**). Fragmentni jon na m/z 207, koji nastaje u istom RDA premeštanju usled cepanja veza C9-C11 i C8-C14 uz premeštanje vodonika sa metil grupe u položaju C-8, i jon na m/z 203, koji nastaje otpuštanjem metil grupe sa položaja C-20, dodatno potvrđuju triterpensku strukturu (Slika 53). Naime, primećeno je da je zastupljenost signala na m/z 203 u masenim spektrima jedinjenja **31** i **33** veća u odnosu na jedinjenja **32** i **35**, što je uslovljeno formiranjem stabilnijeg terciarnog karbonilnog jona (na položaju C-20) u jedinjenjima oleanskog tipa u odnosu na sekundarni karbonilni jon u jedinjenjima tipa ursana (Bekana i sar., 2014).

Tabela 33. GC-MS podaci identifikovanih triterpena (**31-35**)

Rt	m/z (EI, 70eV)	Jedinjenje
30,86	426,4 (7), 393,3 (1), 281,0 (12), 257,1 (5), 218,2 (100), 207,1 (10), 203,0 (45), 189,1 (15)	β -Amirin (31)
31,79	426,3 (5), 355,1 (2), 327,0 (2), 281,0 (7), 218,2 (100), 207,1 (35), 203,0 (22), 189,1 (20)	α -Amirin (32)
32,80	468,2 (2), 393,1 (2), 281,0 (17), 218,2 (100), 207,1 (23), 203,0 (40), 189,1 (15)	β -Amirin-acetat (33)
33,35	468,3 (30), 454,0 (18), 408,3 (15), 393,3 (15), 357,2 (15), 281,0 (40), 218,0 (50), 189,1 (100)	Lupeol-acetat (34)
33,79	468,4 (7), 408,4 (2), 257,1 (2), 218,2 (100), 203,1 (22), 189,1 (25)	α -Amirin-acetat (35)



Slika 53. Shema fragmentacije α -amirina (**32**; **A**) i lupeol-acetata (**34**; **B**) u EI jonskom izvoru (izrađena na osnovu literaturnih podataka Bekana i sar. (2014); Petrović (1995)).

Za razliku od ova četiri jedinjenja, u masenom spektru jedinjenja **34** najintenzivniji signal je na m/z 189. Ovaj signal potiče od dva fragmentna jona koji nastaju RDA raspadanjem prstena C. Jedan sadrži prsten A i B bez acetiloksi grupe (neutralni gubitak od 60 Da), a drugi se sastoji od prstena D i E, uz prisustvo izopropenil grupe u prstenu E. Iz svega navedenog se može zaključiti da pentaciklična struktura ovog triterpena odgovara tipu lupana (Petrović, 1995).

Interpretacija NMR spektara jedinjenja 31-35

Na sličnosti i razlike u strukturi jedinjenja **31** i **32** ukazuju 1D i 2D NMR signali (**Tabela 34**; **Slike P6.6-13** u Prilogu 6) koji potiču od:

- 1) osam sp^3 metilenskih grupa (H-1a/e, C-1; H-2a/e, C-2; H-6a/e, C-6; H-7a/e, C-7; H-15a/e, C-15; H-16a/e, C-16; H-21a/e, C-21; H-22a/e, C-22) u strukturi oba jedinjenja;
- 2) dodatne sp^3 metilenske grupe (H-19, C-19) čiji su signali na δ_H 1,66 i 1,03 i δ_C 46,88 karakteristični za oleansku strukturu jedinjenja **31**;
- 3) dvostruke veze (H-12, C-12) čiji su protonski tripleti na δ_H 5,13 (**32**) i 5,18 (**31**) (spregnuti sa ugljenikovim atomima na 124,43, odnosno 121,77 ppm) karakteristični za strukture urs-12-ena jedinjenja **32**, odnosno olean-12-ena jedinjenja **31** (**Slike 54** i **55**);
- 4) osam tercijarnih metil grupa sa karakterističnim singletima na δ_H 0,79-1,13 i δ_C 15,52-33,36 (u strukturi oba jedinjenja);
- 5) pet kvaternarnih ugljenikovih atoma (C-4; C-8, C-10; C-14; C-17) (u strukturi oba jedinjenja);
- 6) dodatnog kvaternarnog ugljenikovog atoma u oleanskoj strukturi (C-20) jedinjenja **31** [δ_C 39,84];
- 7) sekundarne alkoholne grupe (H-3, C-3) čiji protonski signal višeg reda na δ_H 3,20 usled transdiaksijalnog sprežanja ($J=10,5$ Hz) i vicinalnog sprežanja ($J=3,9$ Hz) sa protonima u C-2 položaju, ukazuje na strukturu olean-12-en-3-ola (**31**), odnosno urs-12-en-3-ola (**32**) (**Slike 54** i **55**).

Detaljnijom analizom NMR (**Slike P.6-13**, Prilog 6) i masenih spektara i poređenjem sa podacima dobijenim GC-FID-MS analizom komercijalno dostupnih standarda, jedinjenje **31** je identifikovano kao β -amirin (3 β -hidroksi-olean-12-en-3-ol), a jedinjenje **32** kao α -amirin (3 β -hidroksi-urs-12-en-3-ol).

1H NMR spektralni podaci β -amirin-acetata (**33**) slični su spektralnim podacima β -amirina (**31**), a spektralni podaci α -amirin-acetata (**35**) spektralnim podacima α -amirina (**32**) (**Slike P6.14** i **15** u Prilogu 6). Paramagnetno pomeranje protonskih signala H-3 u slučaju β - i α -amirin-acetata (**33** i **35**) prema nižem magnetnom polju za $\Delta_H = -1,3$ ppm [δ_H 4,50] u poređenju sa odgovarajućim signalima β -amirina (**31**) i α -amirina (**32**) (usled smanjenja lokalne dijamagnetne zaštite), kao i pojava dodatnog protonskog singleta na δ_H 2,04 [u spektru β -amirin-acetata **33**] i 2,02 [u spektru α -amirin-acetata (**35**)] ukazali su na prisustvo i položaj (C-3) acetil grupe u slučaju jedinjenja **33** i **35**. Ova grupa uslovlila je i nešto slabije paramagnetno pomeranje protona H-5 [δ_H 0,86 (**33**) i 0,81 (**35**)]. Dakle, strukture jedinjenja **33** i **35** odgovaraju β -amirin-acetatu i α -amirin-acetatu, što je potvrđeno i GC-FID-MS analizom pomoću polusintezom dobijenih standardnih supstanci.

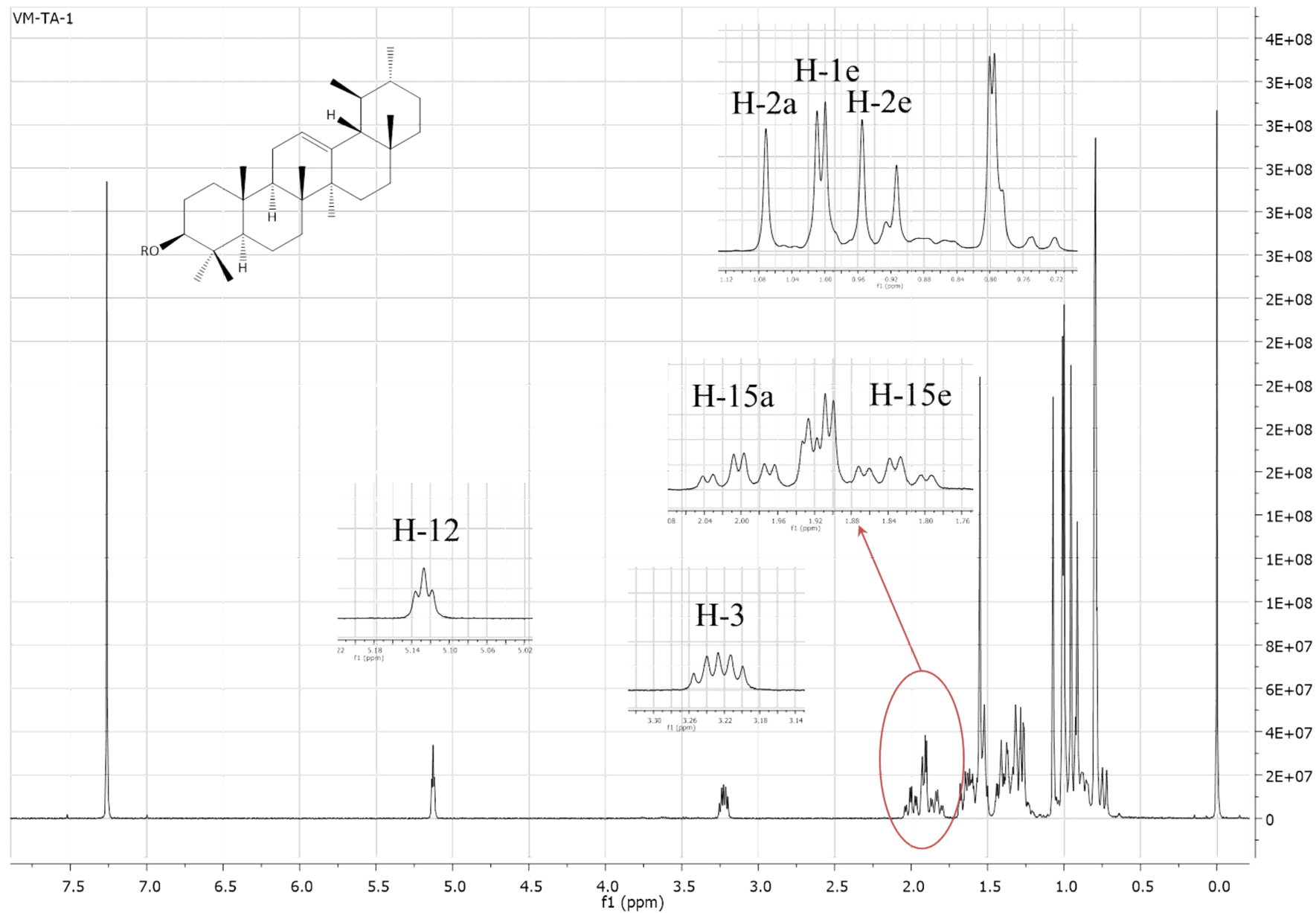
Za razliku od jedinjenja **31-33** i **35**, u 1H NMR spektru jedinjenja **34** uočeni su protonski signali karakteristični za lupansku strukturu, koji potiču od: sp^3 metilenske grupe (H-12a/e) [δ_H 1,65 i 1,03] i sp^2 egzociklične metilenske grupe (H-29) [δ_H 4,68 i 4,56]. Analogno gore pomenutim jedinjenjima **33** i **35**, 1H NMR spektar jedinjenja **34** u velikoj meri je bio sličan spektru komercijalnog standarda lupeola (**Slika 56**), a razlike su se ogledale u pomeranju protonskog signala H-3 prema nižem magnetnom polju za $\Delta_H = -1,5$ ppm [δ_H 4,47] u poređenju sa odgovarajućim signalom u spektru lupeola, kao i u prisustvu dodatnog signala, protonskog singleta H-2' [δ_H 2,02] terminalne metil grupe iz acetata u spektru jedinjenja **34** (Al-Musayeib i sar., 2013; Burns i sar., 2000; Shan i sar., 2014). Navedeni podaci ukazuju da je jedinjenje **34** lupeol-acetat, što je i potvrđeno GC-FID-MS analizom pomoću polusintezom dobijenog standarda. Hemijske strukture jedinjenja **31-35** prikazane su na **Slici 57**.

Tabela 34. ^1H NMR (400 MHz) i ^{13}C NMR (101 MHz) podaci za jedinjenja **31-35**, simani u CHCl_3-d

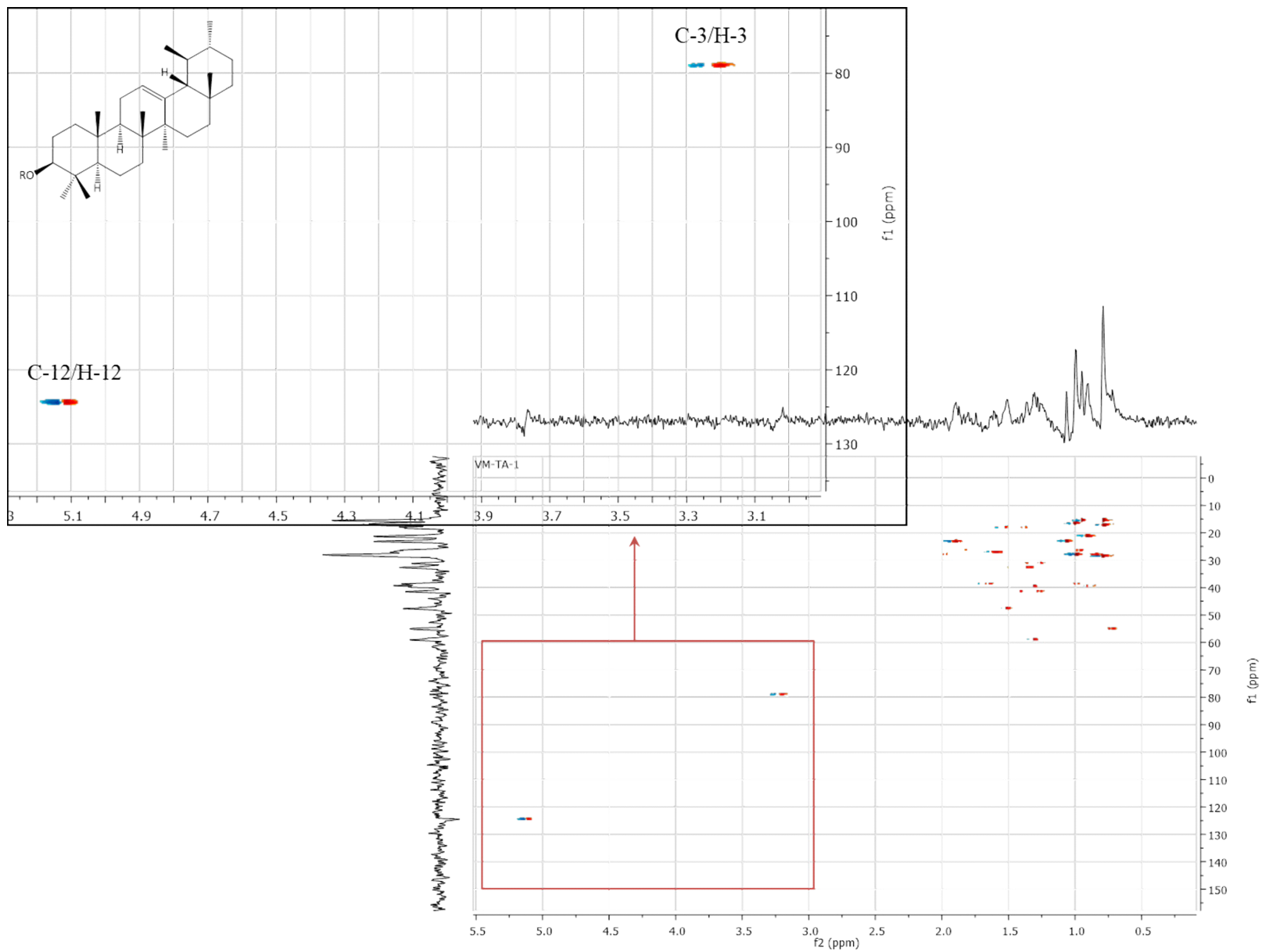
α -amirin (32)			β -amirin (31)			α -amirin-acetat (35)		β -amirin-acetat (33)	lupeol	lupeol-acetat (34)
Poz.	δ_{H}	δ_{C}	HMBC	δ_{H}	δ_{C}	HMBC	δ_{H}	δ_{H}	δ_{H}	δ_{H}
1a	1,64 t(3,4)	38,80	25	1,61	38,53	25	1,64 t(3,4)	1,61	1,58 dd(11,7; 3,2)	1,58 dd(11,7; 3,2)
1e	1,00 m			0,97			1,00 m	0,97	1,54	1,54
2a	1,92 dd(10,4; 3,1)	23,38	1	1,54 d(11,8)	23,57	1	1,92 dd(10,4;3,1)	1,54 d(11,8)	1,90 m	1,90 m
2e	1,07			0,81			1,07	0,81	1,65	1,65
3	3,20 dd(11,5; 4,4)	79,27		3,19 dd(10,5; 3,9)	79,06		4,48 t(3,5)	4,50 t(3,5)	3,19 dd(11,1; 5,2)	4,47 m
4	-	36,91	24	-	36,99	24	-	-	-	-
5	0,72	55,20	1; 23, 24, 25	0,74	55,23	1; 23, 24, 25	0,81	0,86	0,89 dd(12,5; 3,5)	0,89 dd(12,5; 3,5)
6a	1,37 dd(6,8; 3,8)	18,36		1,54	18,41		1,37 dd(6,8; 3,8)	1,56	1,42 m	1,42 m
6e	1,52 m			1,42			1,52 m	1,42	1,23 m	1,23 m
7a	1,36	31,27	25	1,51	32,70	25	1,36	1,52	1,42 m	1,42 m
7e	1,25			1,35			1,25	1,34	-	-
8	-	39,70	26	-	37,70	26	-	-	-	-
9a	1,51	47,56	25, 26	1,55 t(3,5)	47,69	25, 26	1,51	1,57 t(3,5)	1,23 m	1,23 m
9e										
10	-	36,80	11	-	38,81	11	-	-	-	-
11a	1,98	28,13		1,86 dd(6,3; 3,8)	26,95		1,98	1,86 dd(6,3; 3,8)	1,28 m	1,28 m
11e	0,84			0,87			0,84	0,87		
12	5,13 t(3,5)	124,43		5,18 t(3,5)	121,77		5,10 t(3,6)	5,18 t(3,5)	1,65 m	1,65 m
									1,03 m	1,03 m
13	-	139,32	11	-	146,23	11	-	-	1,08 d(4,5)	1,08 d(4,5)
14	-	41,84		-	41,77		-	-	-	-
15a	1,55	27,28		1,76 td(14,0; 4,6)	26,20		1,55	1,79 td(14,0; 4,6)	1,65 m	1,65 m
15e				0,98				0,95		
16a	1,81 td(13,3; 4,7)	26,58		1,99 dd(13,5; 4,4)	27,28		1,81 td(13,3; 4,7)	1,99	1,44 m	1,44 m
16e	0,96 m			1,61			0,96 m	0,82	1,35 m	1,35 m
17	-	33,70	28, 29 lr	-	32,52	28, 29 lr	-	-	-	-
18	1,52 m	59,02		1,96	47,29		1,52 m	1,93	1,35 m	1,35 m
19	0,91 m	39,68		1,66 d(13,5)	46,88		1,38 m	1,70	2,38 dd(16,4; 10,7)	2,38 dd(16,4; 10,7)
				1,03 d				1,02		
20	1,31 m		39,68	-	39,84	39,68	1,98	-	-	-

Tabela 34. ^1H NMR (400 MHz) i ^{13}C NMR (101 MHz) podaci za jedinjenja **31-35**, simani u CHCl_3-d (nastavak)

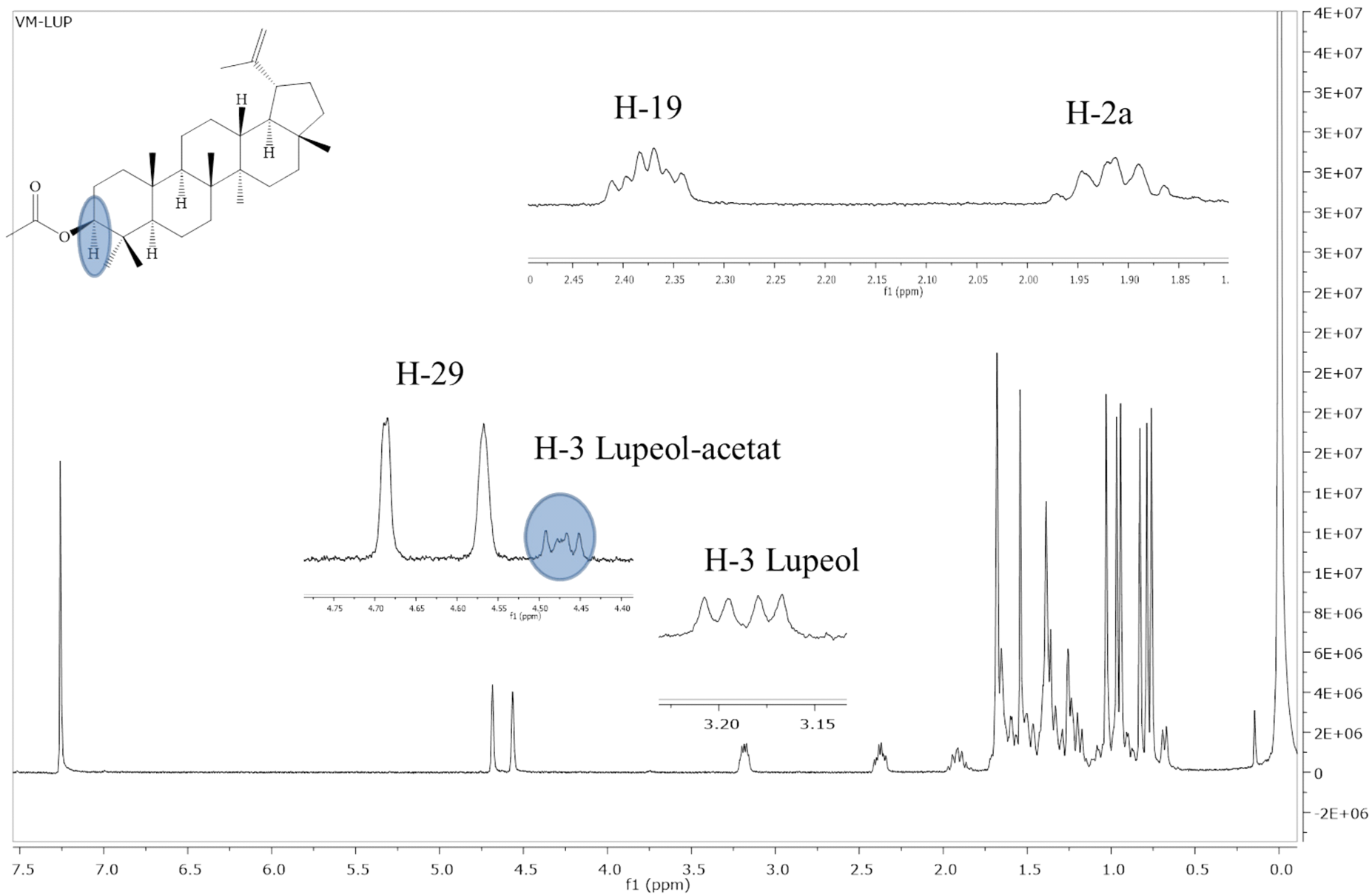
α -amirin (32)			β -amirin (31)			α -amirin-acetat (35)		β -amirin-acetat (33)	lupeol	lupeol-acetat (34)
Poz.	δ_{H}	δ_{C}	HMBC	δ_{H}	δ_{C}	HMBC	δ_{H}	δ_{H}	δ_{H}	δ_{H}
21	1,37 d (2,9)	31,35		1,33	34,77		1,37 d (2,9)	1,33	1,91 m	1,91 m
	1,26 dd (6,8;3,8)			1,10			1,26 dd (6,8;3,8)	1,11		
22	1,26 t (2,9)	41,58	28	1,21 dd (9,3; 6,2)	37,18	28	1,26 t (2,9)	1,43	1,19 d (10,7)	1,19 d (10,7)
	1,41			1,41			1,41	1,23	1,39 s	1,39 s
23	1,00 s	28,25		1,00	28,12		0,85 s	0,83	0,83 s	0,83 s
24	0,96 s	15,70	24	0,94 s	15,52	24	0,84 s	0,96	0,83 s	0,83 s
25	0,79 s	15,66		0,79 s	15,59		0,96 s	0,86	0,94 s	0,94 s
26	1,01 s	16,93		0,97 s	16,84		0,98 s	0,97	1,03 s	1,03 s
27	1,07 s	25,93		1,13 s	26,01		1,04 s	1,13	0,97 s	0,97 s
28	0,84 s	28,13		0,83 s	28,42		0,78 s	0,83	0,79 s	0,79 s
29	0,79 s	17,48		0,87 s	33,36		0,77 s	0,87	4,68 s / 4,56 s	4,68 s / 4,56 s
30	0,91 s	21,58		0,87 s	23,71		0,83 s	0,87	1,68 s	1,68 s
31	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CH_3	-	-	-	-	-	-	2,02 s	2,04 s	-	2,03 s



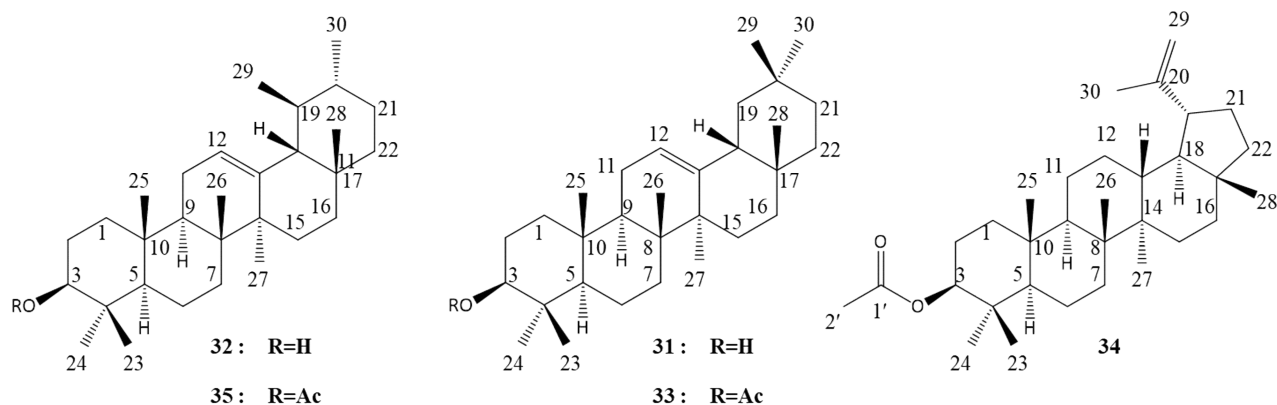
Slika 54. ^1H (400 MHz) NMR spektar α -amirina (**32**), snimljen u $\text{CHCl}_3\text{-}d$.



Slika 55. Odabrane HSQC korelacije α -amirina (32).



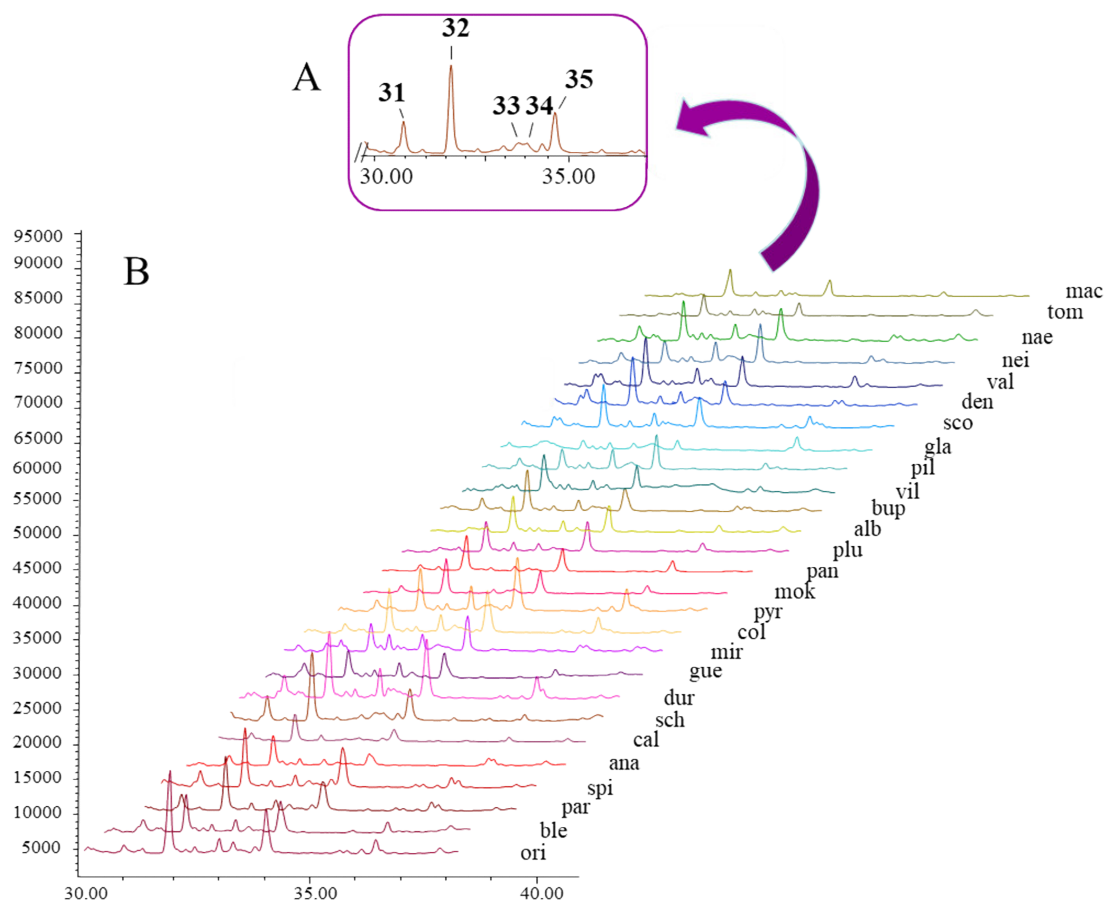
Slika 56. ^1H (400 MHz) NMR spektar lupeola i karakteristični signali lupeol-acetata (**34**), snimljeni u CHCl_3-d .



Slika 57. Strukture jedinjenja 31-35.

1.3.2. Kvalitativna i kvantitativna analiza triterpena u CH_2Cl_2 ekstraktima herbi 28 vrsta

Primenom gasne hromatografije sa FID i MS detekcijom izvršena je kvalitativna i kvantitativna analiza triterpena u suvim CH_2Cl_2 ekstraktima herbi svih 28 vrsta koje su predmet ove doktorske disertacije. Kvalitativna analiza izvršena je pomoću standardnih supstanci, poređenjem retencionih vremena (R_t) i masenih spektra. Kvantifikacija jedinjenja metodom eksternog standarda izvršena je na osnovu površine pikova GC-FID hromatograma, čiji je uporedni prikaz dat na Slici 58.

Slika 58. Uporedni prikaz GC-FID hromatograma suvog CH_2Cl_2 ekstrakta herbe *H. gymnocephalum* (A) i preostalih 27 suvih CH_2Cl_2 ekstrakata ispitivanih vrsta roda *Hieracium* (B).

Kao standardne supstance korišćeni su komercijalni standardi β -amirin (31) i α -amirin (33), i polusintezom dobijeni acetati α - i β -amirina (32 i 35) i lupeola (34). Sadržaj identifikovanih triterpena (31-35) u CH_2Cl_2 ekstraktima herbi 28 vrsta roda *Hieracium* prikazan je u Tabeli 35.

Tabela 35. Sadržaj pojedinačnih (31-35) i ukupnih triterpena u suvim CH₂Cl₂ ekstraktima herbi 28 vrsta roda *Hieracium*, izražen kao mg/g suvog ekstrakta

Akr. ^a	Ekstrakt	31	32	33	34	35	SUT
gym	<i>H. gymnocephalum</i>	8,17 ± 0,72 ^b	57,93 ± 1,98	2,54 ± 0,14	4,41 ± 0,23	21,99 ± 1,01	95,04 ± 1,72
ori	<i>H. orieni</i>	5,34 ± 0,41	88,92 ± 3,20	4,24 ± 0,38	7,03 ± 0,57	41,37 ± 1,99	146,9 ± 3,09
ble	<i>H. blecicii</i>	6,18 ± 0,48	44,70 ± 1,85	3,57 ± 0,26	-	30,26 ± 1,50	84,71 ± 1,75
par	<i>H. paratrichum</i>	7,27 ± 0,50	62,97 ± 2,31	2,72 ± 0,17	5,41 ± 0,32	30,54 ± 1,13	108,91 ± 1,99
spi	<i>H. spirocaule</i>	7,62 ± 0,63	70,89 ± 2,65	3,59 ± 0,30	6,87 ± 0,46	41,70 ± 2,00	130,67 ± 2,36
ana	<i>H. anastrum</i>	4,95 ± 0,30	36,91 ± 1,78	1,46 ± 0,01	5,14 ± 0,27	11,92 ± 0,92	60,38 ± 1,53
cal	<i>H. calophyllum</i>	2,73 ± 0,10	36,08 ± 1,32	-	-	11,23 ± 0,84	50,04 ± 1,22
sch	<i>H. scheppegianum</i>	10,40 ± 0,89	81,02 ± 3,05	3,00 ± 0,20	8,03 ± 0,48	29,05 ± 1,38	131,5 ± 2,87
dur	<i>H. durmitoricum</i>	8,31 ± 0,79	80,30 ± 3,16	8,63 ± 0,80	-	51,35 ± 1,07	148,59 ± 0,95
gue	<i>H. guentheri-beckii</i>	6,53 ± 0,51	38,51 ± 1,61	3,67 ± 0,17	-	25,25 ± 1,21	73,96 ± 1,52
mir	<i>H. mirificissimum</i>	5,04 ± 0,35	34,56 ± 1,38	4,22 ± 0,37	-	26,72 ± 1,01	70,54 ± 1,30
col	<i>H. coloriscapum</i>	4,43 ± 0,20	57,94 ± 2,20	2,59 ± 0,23	2,83 ± 0,12	42,18 ± 1,71	109,97 ± 1,97
pyr	<i>H. pyricephalum</i>	5,52 ± 0,29	53,29 ± 1,91	7,05 ± 0,65	4,77 ± 0,38	48,93 ± 2,16	119,56 ± 2,01
mok	<i>H. mokragorae</i>	3,40 ± 0,16	43,31 ± 2,01	1,03 ± 0,09	-	18,37 ± 1,00	66,11 ± 1,53
pan	<i>H. pannosum</i> s.l.	4,26 ± 0,19	45,77 ± 1,99	1,59 ± 0,19	-	20,57 ± 0,99	72,19 ± 1,79
plu	<i>H. plumulosum</i>	6,16 ± 0,42	65,01 ± 2,35	3,95 ± 0,22	10,14 ± 0,91	41,68 ± 1,52	126,94 ± 2,05
alb	<i>H. albopellitum</i>	5,74 ± 0,38	83,19 ± 3,38	5,91 ± 0,50	6,54 ± 0,62	42,18 ± 1,89	143,56 ± 3,20
bup	<i>H. pseudoschenkii</i>	6,59 ± 0,50	59,15 ± 1,23	3,47 ± 0,19	-	25,49 ± 1,23	94,70 ± 1,16
vil	<i>H. villosum</i>	5,57 ± 0,39	57,29 ± 1,15	2,54 ± 0,08	-	14,01 ± 0,99	79,41 ± 1,00
pil	<i>H. pilosum</i>	5,43 ± 0,30	26,00 ± 0,99	5,82 ± 0,40	-	24,97 ± 1,15	62,22 ± 1,07
gla	<i>H. glabratum</i>	-	26,54 ± 1,11	0,86 ± 0,01	-	4,38 ± 0,34	31,78 ± 0,97
sco	<i>H. scorzonrifolium</i> s.l.	3,59 ± 0,22	50,75 ± 1,22	3,49 ± 0,30	-	23,30 ± 1,20	81,13 ± 1,18
den	<i>H. dentatum</i> s.l.	6,19 ± 0,53	54,31 ± 1,36	3,22 ± 0,19	-	16,98 ± 1,03	80,70 ± 1,24
val	<i>H. valdepilosum</i> s.l.	5,10 ± 0,27	59,07 ± 1,20	5,09 ± 0,42	-	21,53 ± 0,98	90,79 ± 0,99
nei	<i>H. neilreichii</i>	5,85 ± 0,43	26,54 ± 1,05	5,55 ± 0,35	-	25,72 ± 1,31	63,66 ± 1,28
nae	<i>H. naegelianum</i>	7,10 ± 0,68	39,45 ± 1,23	3,11 ± 0,21	-	22,19 ± 1,15	71,85 ± 1,12
tom	<i>H. tommasinianum</i>	1,42 ± 0,09	22,72 ± 1,01	1,38 ± 0,05	-	8,37 ± 0,75	33,89 ± 0,85
mac	<i>H. macrodontoides</i>	3,13 ± 0,28	43,43 ± 1,40	2,54 ± 0,10	-	20,16 ± 1,12	69,26 ± 1,38

^aAkronim vrste. ^bRezultati predstavljaju srednje vrednosti tri određivanja ± standardne devijacije.

Triterpeni: β -amirin (31), α -amirin (32), β -amirin-acetat (33), lupeol-acetat (34), α -amirin-acetat (35).

Triterpeni ursanske strukture, α -amirin i njegov acetat (32 i 35), detektovani su u svih 28 vrsta. Triterpeni oleanske strukture, β -amirin i njegov acetat (31 i 33), detektovani su u većini analiziranih vrsta, tj. jedinjenje 31 nije bilo prisutno u ekstraktu *H. glabratum*, a jedinjenje 33 u ekstraktu *H. calophyllum*. Derivat lupana, lupeol-acetat (34), detektovan je u svega 10 vrsta.

Najveći sadržaj ukupnih triterpena (148,59 mg/g suvog ekstrakta) imao je ekstrakt *H. durmitoricum*, a najniži ekstrakt *H. glabratum* (31,78 mg/g). Ursani su generalno bili najzastupljenija grupa triterpena u analiziranim ekstraktima. Sadržaj α -amirina, dominantnog triterpena u svih 28 vrsta, bio je najviši u ekstraktu *H. orieni* (88,92 mg/g), a najniži u ekstraktu *H. tommasinianum* (22,72 mg/g), u kome je zabeležen i generalno nizak sadržaj ukupnih triterpena (33,89 mg/g). Drugo jedinjenje po zastupljenosti je bio α -amirin-acetat, čiji se sadržaj kretao od 4,38 mg/g u ekstraktu *H. glabratum* do 51,35 mg/g u ekstraktu *H. durmitoricum*. Sadržaj β -amirina iznosio je 6,0-22,04% sadržaja α -amirina, sa najizraženijom razlikom zabeleženom u ekstraktu *H. orieni* (5,34 mg β -amirina/g, odnosno 88,92 mg α -amirina/g). Sadržaj β -amirin-acetata iznosio je 5,6-23,6% sadržaja α -amirin-acetata, sa najizraženijom razlikom zabeleženom u ekstraktu *H. valdepilosum* (5,09 mg β -amirin-acetata/g, odnosno 21,53 mg α -amirin-acetata/g). Od ekstrakata 10 vrsta u kojima je detektovan, najveći sadržaj lupeol-acetata imali su ekstrakti *H. plumulosum* (10,14 mg/g) i *H. scheppegianum* (8,03 mg/g), dok je najniža količina ovog jedinjenja zabeležena u ekstraktu *H. coloriscapum* (2,83 mg/g).

Do sada su u pogledu sastava triterpena ispitivana tri taksona ovog roda od kojih su dva predmet i ove doktorske disertacije. U CHCl₃ ekstraktima herbi identifikovano je ukupno šest jedinjenja

triterpenske strukture, i to: lupeol-acetat i β -amirin u *H. plumulosum* (Petrović i sar., 1996), α - i β -amirin i 21- α -hidroksi-taraksasterol (triterpen tipa ursana) u *H. gymnocephalum* (Petrović i sar., 1999b), kao i α - i β -amirin, taraksasterol i lupeol u *H. umbellatum* subsp. *umbellatum* (Hooper i Chandler, 1984).

Kvalitativna i kvantitativna analiza triterpena u CH_2Cl_2 ekstraktima herbi 26 vrsta ovog roda izvršena je po prvi put u okviru ove doktorske disertacije. U ekstraktima dve prethodno ispitivane vrste (*H. gymnocephalum* i *H. plumulosum*) dodatno su identifikovana dva triterpena, acetati α - i β -amirina. Generalno, CH_2Cl_2 ekstrakti pojedinih vrsta pokazali su se kao naročito bogati izvori triterpenskih jedinjenja.

1.4. Hemosistematski značaj seskviterpenskih laktona, flavonoida, fenolkarboksilnih kiselina i triterpena za 28 vrsta

Hemosistematski značaj flavonoida i fenolkarboksilnih kiselina (ubikvitarnih klasa sekundarnih metabolita) i naročito seskviterpenskih laktona zastupljenih u ne tako velikom broju familija skrivenosemenica, do sada je dokazan kroz brojna istraživanja, naročito za biljke iz familije Asteraceae (Granica i Zidorn, 2015; Mendiondo i sar., 1997; Michalska i sar., 2009; Sareedenchai i Zidorn, 2010; Zidorn i Stuppner, 2001; Zidorn i sar., 2002; 2008; Zidorn, 2008). U taksonima roda *Hieracium*, seskviterpenski laktoni su prethodno slabo ispitivani, zbog čega do sada nije rađena njihova hemosistematska evaluacija. Flavonoidi su hemijski veoma stabilni, razlike u njihovoj hemijskoj strukturi su uglavnom genetski uslovljene (Emerenciano i sar., 2001; Harborne, 1977), stoga se ispitivanje ove grupe jedinjenja pokazalo od izuzetnog značaja, naročito u taksonomski kompleksnim rodovima kao što je to rod *Hieracium*. Prethodna hemosistematska ispitivanja flavonoida i fenolkarboksilnih kiselina u taksonima ovog roda obuhvatila su pripadnike (hibridogene i nehibridogene taksone) sekcija *Alpina*, *Amplexicaulia*, *Barbata*, *Drepanoidea*, *Hieracium*, *Hieracioides*, *Italica*, *Pannosa*, *Picroidea*, *Prenanthoidea*, *Pseudostenotheca*, *Pulmonarioidea*, *Oreadea*, *Sabauda*, *Tridentata*, *Villosa* i *Vulgata* (Guppy i Bohm, 1976; Mañez i sar., 1994; Petrović i sar., 1999a; Švehlíková i sar., 2002; Zidorn i sar., 2002). Hemosistematska ispitivanja triterpena u rodovima familije Asteraceae su nešto manje zastupljena (Alvarenga i sar., 2001; Ferreira i sar., 2005). Opsežna ispitivanja sprovedli su Jovanović i sar. (2016) na predstavnicima familije Crassulaceae DC. prikupljenim na Balkanskom poluostrvu, i Kim i sar. (2017) na predstavnicima familije Campanulaceae Juss. poreklom iz Južne Koreje.

Rod *Hieracium* s. str. je taksonomski veoma kompleksan. Naprednim filogenetskim analizama Fehrer (2009), Krak (2013) sa svojim saradnicima, kao i Tyler i Jönsson (2013), nisu uspeli da razreše odnose između većine grupa i sekcija ovog roda. Jedan od ciljeva ispitivanja 28 vrsta roda *Hieracium* u okviru ove doktorske disertacije je evaluacija hemosistematskog značaja sekundarnih metabolita iz klasa seskviterpenskih laktona, flavonoida, fenolkarboksilnih kiselina i triterpena, identifikovanih i kvantifikovanih u ekstraktima herbi. U te svrhe rezultati hemijskih kvalitativnih i kvantitativnih analiza transformisani su postupkom kodiranja i obrađeni odgovarajućim multivarijantnim statističkim metodama: analizom glavnih komponenti (PCA), nemetričkim multidimenzionalnim skaliranjem (nMDS) i hijerarhijskom klaster analizom (UPGMA). nMDS i UPGMA klaster analiza izvršene su korišćenjem *Bray-Curtis* matrice različitosti. PCA analiza sprovedena je u cilju pronalaženja seskviterpenskih laktona, fenolkarboksilnih kiselina, flavonoida i triterpena koji značajno doprinose razlikovanju vrsta. nMDS i klaster analiza sprovedene su u cilju praćenja grupisanja vrsta na osnovu sličnosti i razlika u hemijskom sastavu ekstrakata.

Bitno je istaći da je najveći broj ispitivanih vrsta (24 od 28) sakupljen na planini Durmitor (centar biodiverziteta roda na Balkanskom poluostrvu), gde različite vrste obično koegzistiraju na istom prirodnom staništu, što je posebno pogodno za ovo hemosistematsko istraživanje (uticaj geografskih faktora i/ili varijacija staništa na varijabilnost taksona je minimalan). Pored grupa [agregata (gym, pan, bup, vil i nae)] kojima pripadaju ispitivane nehibridogene vrste, za potrebe ovog istraživanja formirane su i neformalne grupe (gymh, wal, vilh i tom) koje obuhvataju hibridogene vrste grupisane prema poretku (Tabela 2 u odeljku 2, poglavlja Uvod).

1.4.1. Hemosistematski značaj seskviterpenskih laktona

U cilju međusobnog upoređivanja 28 ispitivanih vrsta roda *Hieracium*, sadržaj pojedinačnih seskviterpenskih laktona u suvim MeOH ekstraktima herbi izražen je kao relativni, odnosno procentualni sadržaj u odnosu na sadržaj ukupnih seskviterpenskih laktona u svakom pojedinačnom ekstraktu (**Tabela 36, Slika 59**).

Tabela 36. Relativni sadržaj pojedinačnih seskviterpenskih laktona u odnosu na ukupni sadržaj ovih jedinjenja u suvim MeOH ekstraktima 28 vrsta roda *Hieracium*

Akr.g. ^a	Akr. ^b	Vrsta	1	2	3	4	Ukupno
gym	gym	<i>H. gymnocephalum</i>	-	0,0048	0,3640	0,6312	1,0000
	ori	<i>H. orieni</i>	-	0,1445	0,8555	-	1,0000
	ble	<i>H. blecicii</i>	-	0,0261	0,3462	0,6277	1,0000
	par	<i>H. paratrichum</i>	0,0005	0,1337	0,2721	0,5937	1,0000
	spi	<i>H. spirocaule</i>	-	0,2942	0,6474	0,0584	1,0000
	ana	<i>H. anastrum</i>	-	0,1839	0,3588	0,4573	1,0000
gymh	cal	<i>H. calophyllum</i>	0,0395	0,1276	0,3801	0,4529	1,0000
	sch	<i>H. scheppigianum</i>	-	0,1956	0,3714	0,4330	1,0000
	dur	<i>H. durmitoricum</i>	0,0562	0,0778	0,3990	0,4671	1,0000
	gue	<i>H. guentheri-beckii</i>	-	0,1751	0,4258	0,3991	1,0000
	mir	<i>H. mirificissimum</i>	-	0,0479	0,1832	0,7689	1,0000
	col	<i>H. coloriscapum</i>	0,0006	0,0109	0,2275	0,7610	1,0000
pan	pyr	<i>H. pyricephalum</i>	-	0,0162	0,4558	0,5281	1,0000
	mok	<i>H. mokragorae</i>	-	0,0008	0,0025	0,9968	1,0000
	pan	<i>H. pannosum</i> s.l.	-	0,0437	0,2350	0,7213	1,0000
wal	plu	<i>H. plumulosum</i>	-	0,0822	0,2387	0,6791	1,0000
	alb	<i>H. albopellitum</i>	0,0028	0,0001	0,0005	0,9966	1,0000
bup	bup	<i>H. pseudoschenkii</i>	-	0,2956	0,5967	0,1077	1,0000
vil	vil	<i>H. villosum</i>	0,0113	0,2003	0,2822	0,5062	1,0000
	pil	<i>H. pilosum</i>	0,0207	0,5002	0,2453	0,2338	1,0000
	gla	<i>H. glabratum</i>	0,0281	0,0760	0,0209	0,8751	1,0000
	sco	<i>H. scorzonerifolium</i> s.l.	0,0173	0,0274	0,2186	0,7368	1,0000
vilh	den	<i>H. dentatum</i> s.l.	0,0120	0,0500	0,3885	0,5495	1,0000
	val	<i>H. valdepilosum</i> s.l.	0,0380	0,0785	0,3267	0,5568	1,0000
	nei	<i>H. neilreichii</i>	0,0004	0,1568	0,5244	0,3184	1,0000
nae	nae	<i>H. naegelianum</i>	-	0,0133	0,3183	0,6684	1,0000
tom	tom	<i>H. tommasinianum</i>	0,0239	0,0001	0,0003	0,9757	1,0000
	mac	<i>H. macrodontoides</i>	0,9723	0,0096	0,0181	-	1,0000

^aAkr.g. – akronim agregata ili neformalne grupe; ^bAkr. – akronim vrsta;

Seskviterpenski laktoni: kalofilamin B (1); kalofilamin A (2); 8-epi-ikserisamin A (3); krepizid E (4).

Relativni sadržaj identifikovanih seskviterpenskih laktona u ekstraktima najvećeg broja ispitivanih vrsta opadao je sledećim redosledom: krepizid E (4), 8-epi-ikserisamin A (3), kalofilamin A (2), kalofilamin B (1) (**Tabela 36; Slika 59**). U pogledu hemijskih klasa, gvajanolidi (2, 3 i 4) su bili dominantni seskviterpenski laktoni u gotovo svim ispitivanim vrstama, izuzev *H. macrodontoides*. U MeOH ekstraktu ove vrste zabeležen je nizak ukupni apsolutni sadržaj seskviterpenskih laktona, tako da je relativni sadržaj eudezmanolida kalofilamina B (iako prisutan u ekstraktu u maloj količini) iznosio 97,23%. Kodirane vrednosti relativnog sadržaja seskviterpenskih laktona 1-4 korišćene su u PCA, nMDS i klaster analizi.

Rezultati PCA analize (**Slika 60**) su pokazali da su sva četiri seskviterpenska laktona bila u korelaciji sa varijansom, bez obzira na njihov prosečni relativni sadržaj. Tri jedinjenja koja pripadaju grupi gvajanolida imala su najveće opterećenje duž prve glavne ose, što je objašnjavalo

56,32% ukupne varijanse. Unutar ove grupe seskviterpenskih laktona, krepizid E (4) bio je pozitivno (0,83), dok su 8-epi-ikserisamin A (3) (-0,89) i kalofilamin A (2) (-0,86) bili negativno korelisani. Eudezmanolid kalofilamin B (1) najviše je doprineo drugoj glavnoj osi, koja objašnjava manji udeo varijacije (29,80%) i bio je sa njom negativno korelasan (-0,96). Na osnovu rezultata PCA analize može se zaključiti da su sva četiri seskviterpenska laktona manje-više ravnopravno uticala na varijansu i da su bila distribuirana u blizini korelacijskog kruga, ne odstupajući previše od ortogonalnosti.

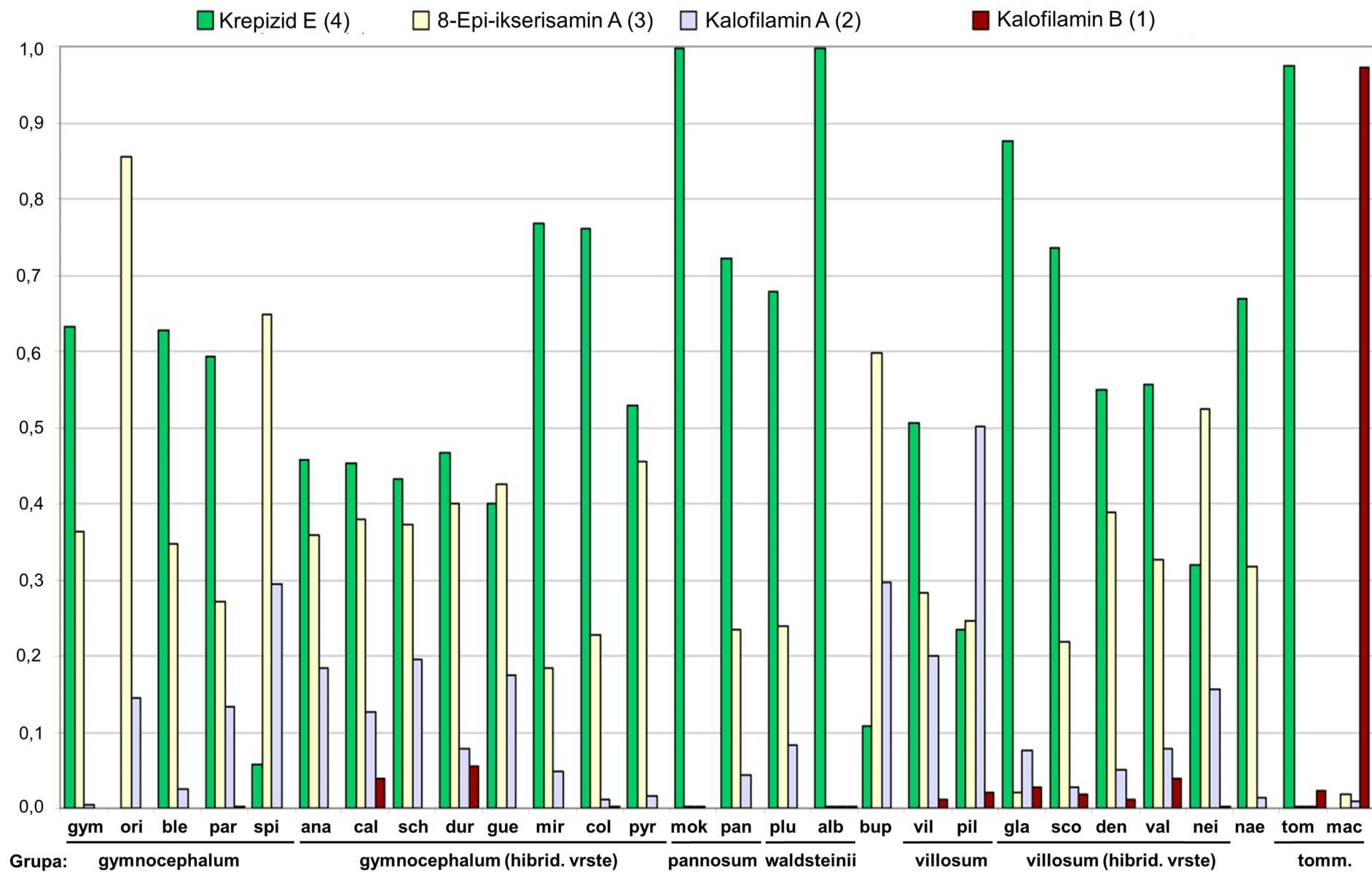
Zajedničko za većinu ispitivanih vrsta je da su grupisane u blizini centra koordinantnih osa u grafikonima dobijenim kako PCA, tako i nMDS metodom (Slika 61). Ova statistički značajna sličnost proističe iz pomenute sličnosti u pogledu hemijskog sastava njihovih MeOH ekstrakata herbi. Vrste koje nisu u potpunosti sledile opadajući redosled procentualnog sadržaja seskviterpenskih laktona (4→1) izdvajale su se na sledeći način na PCA i nMDS grafikonima:

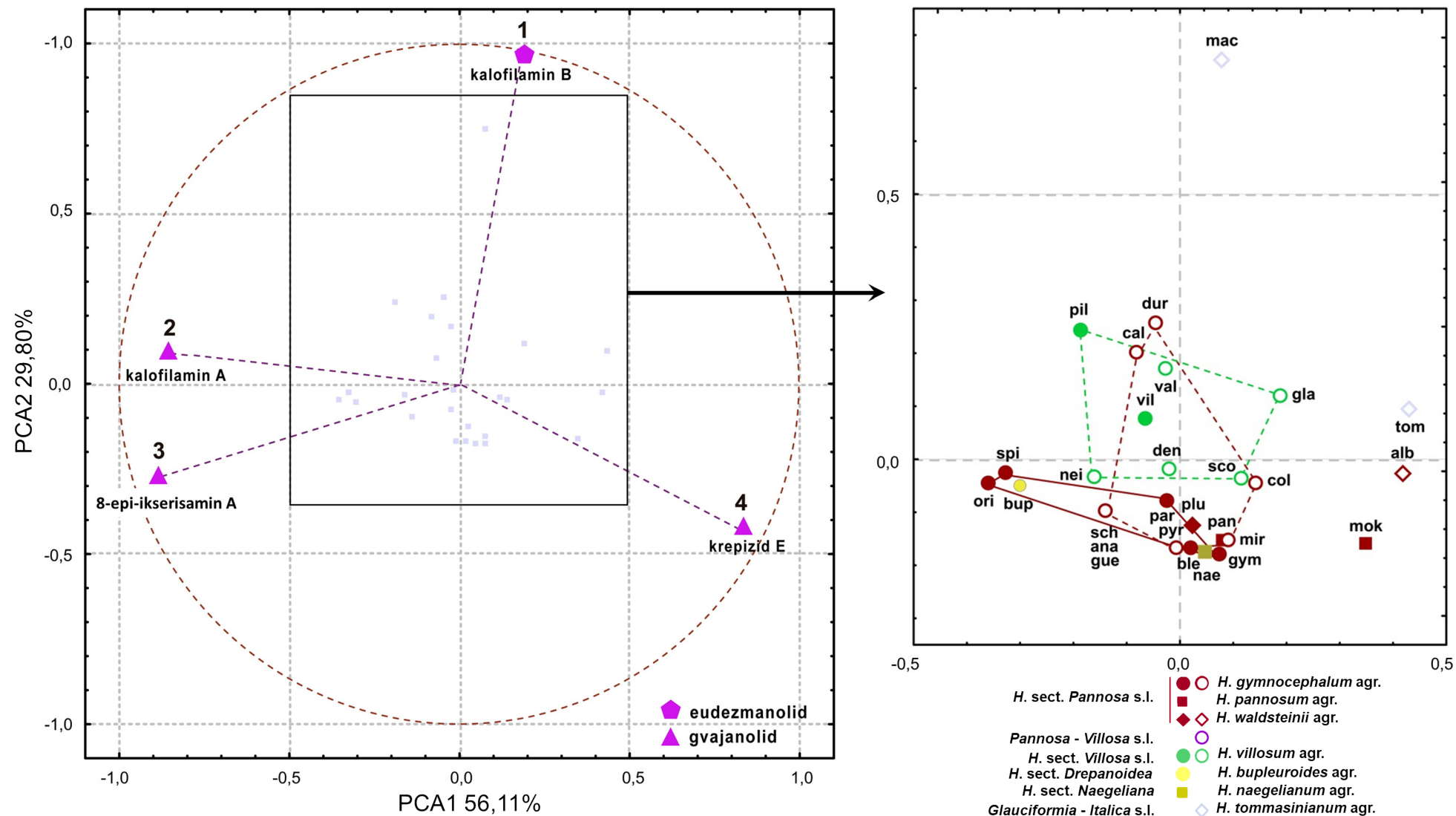
- opterećenje po prvoj osi na PCA i nMDS grafikonima (Slike 60 i 61) pokazuju vrste *H. orienti*, *H. spirocaule* i *H. pseudoschenkii*, koje sadrže mnogo više 8-epi-ikserisamina A (3) od krepizida E (4) (Slika 59, Tabela 36);
- opterećenje po prvoj osi takođe pokazuju i vrste *H. mokragorae*, *H. albopellitum* i *H. tommasinianum*, koje sadrže izuzetno veliku relativnu količinu krepizida E (4) (Slika 59, Tabela 36), ali koje se nalaze na suprotnim stranama u odnosu na navedene prethodne tri vrste (*H. orienti*, *H. spirocaule* i *H. pseudoschenkii*) duž prve ose na PCA i nMDS grafikonima (Slike 60 i 61);
- *Hieracium pilosum* se izdvaja zbog najvišeg relativnog sadržaja kalofilamina A (2) (Slike 59, 60 i 61);
- *Hieracium macrodontoides* je jasno odvojen duž druge ose u PCA grafikonu (Slika 60), i karakteriše se izuzetno visokim procentualnim sadržajem eudezmanolida kalofilamina B (1) (Slika 59), iako u niskom apsolutnom sadržaju (Tabela 36). Kalofilamin B, iako je u vrstama u kojima je detektovan bio zastupljen u niskim količinama, mogao bi biti dobar hemosistematski marker za neke grupe. Naime, ovaj seskviterpensi lakton je prisutan u većini vrsta koje pripadaju ili potiču od vrsta iz *H. sect. Villosa* (osim *H. neilreichii*) i *H. sect. Glauciformia-Italica* (*H. tommasinianum* grupa), dok sa druge strane izostaje u nehibridogenim vrstama sekcija *Pannosa*, *Drepanoidea* i *Naegelianana*, kao i kod više od polovine hibridogenih vrsta koje nastaju ukrštanjem vrsta iz *H. sect. Pannosa*.

Rezultati PCA i nMDS analiza relativnog sadržaja seskviterpenskih laktona ispitivanih vrsta i glavnih taksonomskih grupa u više slučajeva odražavali su razlike između taksona. Međutim, njihov položaj ukazuje i na očigledno preklapanje između grupa (Slike 60 i 61). Nakon eliminisanja rezultata dve hibridogene vrste (*H. calophyllum* i *H. durmitoricum*) u nMDS analizi, preklapanje nije bilo naročito značajno i predstavnici sekcija *Pannosa* i *Villosa* (uključujući hibridogene vrste koje nastaju ukrštanjem vrsta koje vode poreklo iz navedenih sekcija) su bili dobro razdvojeni duž druge ose (Slike 61b). Ove razlike mogu se objasniti izostankom eudezmanolida kalofilamina B (1) u slučaju pripadnika sekcije *Pannosa* (izuzev *H. paratrichum* i *H. albopellitum* u kojima je registrovan u tragovima) (Slika 59, Tabela 24). Ovo jedinjenje takođe nije detektovano ni u *H. pseudoschenkii*, nehibridogenoj vrsti iz agregata *H. bupleuroides* (sect. *Drepanoidea*), i *H. naegelianum* (sect. *Naegelianana*) (Tabele 24 i 36), pa su ove vrste imale sličan položaj na grafikonima kao i predstavnici agregata *H. gymnocephalum* (Slike 61).

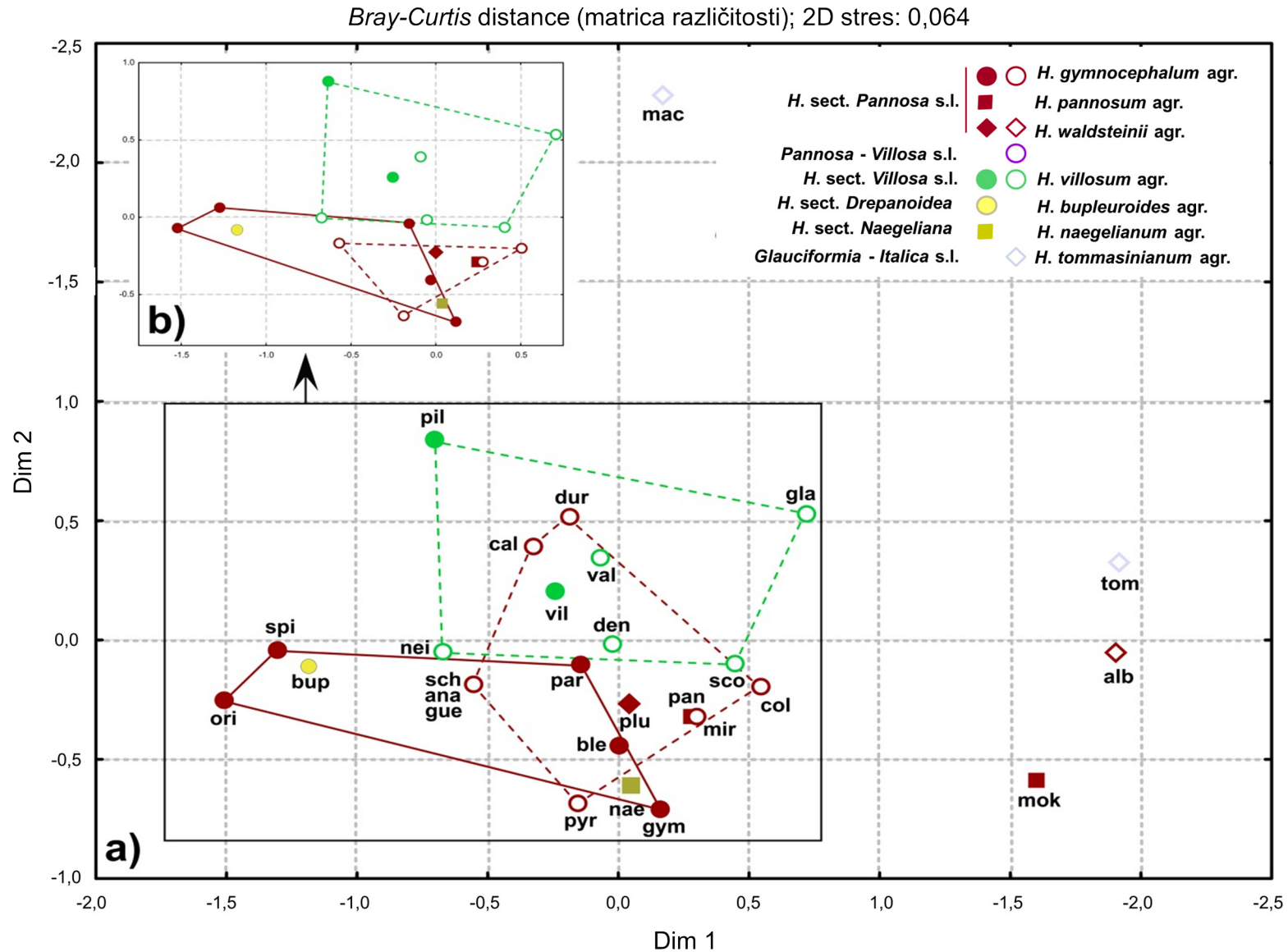
UPGMA dendrogram ispitivanih grupa (Slika 62) pokazao je da je neformalna grupa *H. tommasinianum* (*Glauciformia-Italica*), posebno pod uticajem izolovanog položaja *H. macrodontoides*, jasno odvojena od predstavnika drugih sekcija i grupa.

Predstavnik sect. *Drepanoidea* (*H. bupleuroides* agregat) takođe se razlikuje od ostatka uzorka. Grupe hibridogenih vrsta gymh i vilh dele isti klaster, zajedno sa *H. naegelianum* (sect. *Naegelianana*). Rezultati ove analize nisu bili u skladu sa taksonomskom pripadnošću predstavnika agregata *H. gymnocephalum* (gym) sekciji *Pannosa*, tj. grupa gym nije delila isti klaster sa grupama pan i wal.

Slika 59. Relativni sadržaj seskviterpenskih laktona u suvim MeOH ekstraktima herbi 28 vrsta roda *Hieracium*.

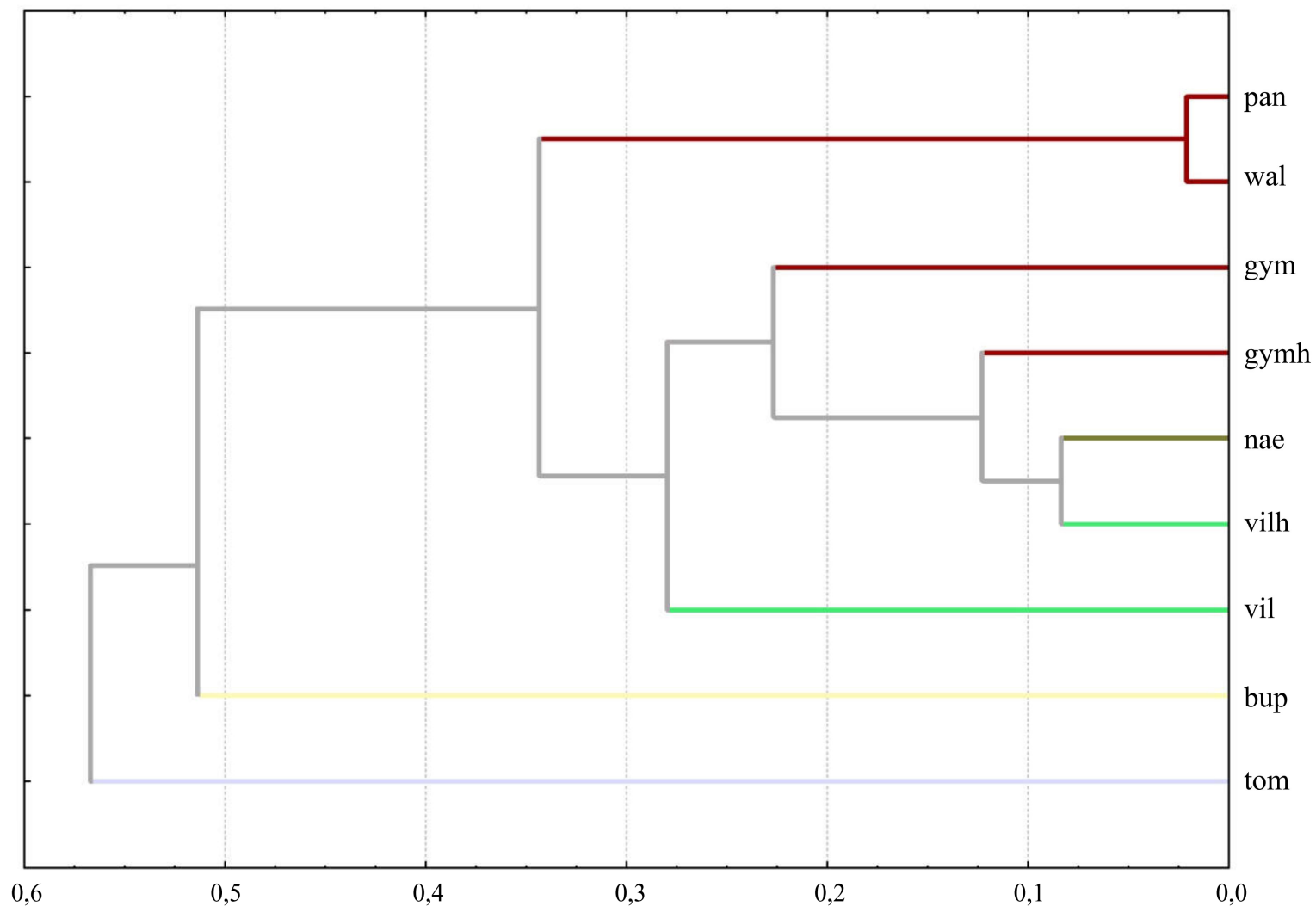


Slika 60. PCA analiza kodiranih vrednosti relativnog sadržaja seskviterpenskih laktona (1-4) u suvim MeOH ekstraktima herbi 28 vrsta roda *Hieracium* (2D grafikon, faktori opterećenja duž prve dve glavne komponente za navedena četiri jedinjenja). Legenda: pune tačke predstavljaju osnovne (nehibridogene) taksone; prazne tačke predstavljaju hibridogene taksone. Akronimi vrsta dati su u **Tabeli 36**.



Slika 61. nMDS grafikon distribucije kodiranih vrednosti procentualnog sadržaja seskviterpenskikh laktona projektovan u dvodimenzionalnom prostoru korišćenjem *Bray-Curtis* matrice različitosti: **a)** uključene sve vrste; **b)** rezultati bez *H. calophyllum* i *H. durmitoricum*. Legenda: pune tačke predstavljaju osnovne (nehibridogene) taksone; prazne tačke predstavljaju hibridogene vrste. Akronimi vrsta dati su u **Tabeli 36**.

Unweighted pair-group average; Bray-Curtis matrica različitosti



Slika 62. UPGMA dendrogram hijerarhijske klaster analize grupa (agregata i neformalnih grupa) vrsta roda *Hieracium* na osnovu *Bray-Curtis* matrice različitosti kodiranih vrednosti relativnog sadržaja četiri identifikovana seskviterpenska laktone u suvim MeOH ekstraktima herbi 28 vrsta. Akronimi grupa dati su u **Tabeli 36**.

1.4.2. Hemosistematski značaj flavonoida i fenolkarboksilnih kiselina

Kao i u slučaju statističke analize sadržaja seskviterpenskih laktona, u cilju ispitivanja hemosistematskog značaja fenolkarboksilnih kiselina i flavonoida detektovanih u suvim MeOH ekstraktima herbi 28 ispitivanih vrsta roda *Hieracium*, primenjene su odgovarajuće multivarijantne statističke metode (PCA, nMDS, klaster analiza). U te svrhe, sadržaj pojedinačnih flavonoida i fenolkarboksilnih kiselina izražen je kao relativni sadržaj u odnosu na sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja (zbir sadržaja ukupnih flavonoida i fenolkarboksilnih kiselina) u pojedinačnim ekstraktima (**Tabele 37 i 38, Slika 63**).

Flavonoidi sa luteolinom kao aglikonom (**12-17, 24, 26-28**) predstavljaju dominantnu klasu polifenola u analiziranim vrstama roda *Hieracium*, kako po broju zastupljenih jedinjenja, tako i u pogledu njihovog sadržaja (**Tabele 37 i 38, Slika 63**). Npr. najveći sadržaj ovih jedinjenja u odnosu na ukupne polifenole zabeležen je u ekstraktu *H. bleicicii* (78,3%). Drugu po zastupljenosti grupu jedinjenja čine fenolkarboksilne kiseline (**5, 8-11**). One su bile najviše zastupljene u ekstraktima vrsta *H. mokragorae*, *H. tommasinianum* i *H. neilreichii* (43,34 do 60,6%). Udeo apigeninskih flavonoida je uglavnom bio manji od 10% (osim u *H. glabratum* 11,2%). Diosmetin (**29**), njegovi heterozidi (**18 i 20**) i kvercetin 3-*O*-glukozid (**19**), bili su prisutni u malim količinama (do 3%) u vrstama u kojima su detektovani. Kodirane vrednosti relativnog sadržaja fenolkarboksilnih kiselina i flavonoida (**5, 8-30**) korišćene su u daljoj statističkoj obradi. Na primeru apigenin 7-*O*-glukuronida (**25**) prikazane su kodirane vrednosti dodeljene na osnovu varijacija u procentualnom sadržaju u odnosu na ukupne detektovane polifenole (**Slika 64**). Naime, relativni sadržaj apigenin 7-*O*-glukuronida (**25**) kretao se od 0,009% u *H. orieni* i *H. paratrichum* do 9,56% u *H. glabratum*, dok kod dve vrste nije bio prisutan (**Tabela 38**). Na osnovu procentualnog sadržaja u uzorcima većina jedinjenja je pokazala potencijalni hemosistematski značaj (**Tabele 37 i 38**). Stoga su jedinjenja klasifikovana na osnovu srednjih vrednosti njihovog procentualnog sadržaja u odnosu na ukupan sadržaj svih detektovanih fenolkarboksilnih kiselina i flavonoida u pojedinačnim ekstraktima (>10%, 1-10%, 0,1-1% i <0,1%) (**Tabela 39**).

U PCA analizi (**Slika 65**), uočeno je da je 80% uglavnom dominantnih jedinjenja (>10% i 1-10%) u korelaciji sa varijansom, nasuprot samo 28,5% manje zastupljenih jedinjenja (0,1-1% i <0,1%). Flavonoidi sa luteolinom kao aglikonom imaju visok faktor opterećenja po nekoj od PCA osa. Drugu klasu polifenola koja pokazuje značajan uticaj na razdvajanje glavnih komponenti predstavljaju fenolkarboksilne kiseline sa tri jedinjenja (**5, 8, 10**) koja značajno doprinose varijansi. Od ostalih polifenola (iz tri grupe), koji su u suvim MeOH ekstraktima vrsta zastupljeni u malim količinama ili čak u tragovima, samo dva značajnije doprinose varijansi. Na PCA grafikonu se može primetiti da najveći doprinos prvoj glavnoj osi pokazuju (**Slika 64**):

- luteolin 7-*O*-glukozid (**16**) - veći sadržaj je zabeležen u ekstraktima predstavnika grupa gym+gymh i nae, dok je niži bio zabeležen u pan,
- luteolin heksozilpentozid (**12**) - veći sadržaj u gym+gymh i nae,
- luteolin 7-*O*-rutinozid (**15**) - veći sadržaj u gym i wal, niži u vil+vilh,
- apigenin 7-*O*-glukuronid (**25**) - viši sadržaj u vil+vilh i pan, niži u gym,
- diosmetin (**29**) - veći sadržaj u gym+gymh, niži u pan, nije detektovan u nae,
- 3,5-dikafeoilhina kiselina (**8**) - veći sadržaj u vil+vilh, bup i tom, niži u gym+gymh,
- luteolin heksozildezoksiheksozid (**14**) - veći sadržaj u nae i gym+gymh, niži u pan, nije detektovan u tom,
- hlorogenska kiselina (**5**) - veći sadržaj u pan,
- luteolin acilglukozid (**24**) - veći sadržaj u nae, niži u vil+vilh, nije detektovan u pan.

Tabela 37. Relativni sadržaj fenolkarboksilnih kiselina (**5**, **8-11**) i flavonoida i (**12-16**) u odnosu na sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u suvim MeOH ekstraktima herbi 28 vrsta roda *Hieracium*

Vrsta	Akr. ^a	5	8	9	10	11	12	13	14	15	16
<i>H. gymnocephalum</i>	gym	0,15999	0,04688	0,01392	0,00000	0,02103	0,02710	0,26222	0,00670	0,04688	0,21178
<i>H. orieni</i>	ori	0,16670	0,11054	0,02304	0,00000	0,00009	0,12361	0,14798	0,00698	0,06746	0,15425
<i>H. blecicii</i>	ble	0,07734	0,08402	0,02360	0,00000	0,00116	0,12854	0,17153	0,00436	0,03181	0,27320
<i>H. paratrichum</i>	par	0,17079	0,07443	0,01905	0,00000	0,00588	0,04959	0,05196	0,00281	0,06986	0,35703
<i>H. spirocaule</i>	spi	0,10409	0,07848	0,01305	0,00000	0,00078	0,17468	0,18160	0,00565	0,05755	0,22600
<i>H. anastrum</i>	ana	0,18018	0,07225	0,01164	0,00000	0,01193	0,03355	0,12626	0,00533	0,02744	0,23846
<i>H. calophyllum</i>	cal	0,16782	0,08363	0,03789	0,00000	0,00299	0,03424	0,06155	0,00468	0,01693	0,31450
<i>H. scheppigianum</i>	sch	0,18018	0,13059	0,04391	0,00518	0,00502	0,07023	0,11735	0,00222	0,00543	0,25123
<i>H. durmitoricum</i>	dur	0,11724	0,08452	0,02115	0,00435	0,01071	0,11463	0,14275	0,00331	0,01837	0,29594
<i>H. guentheri-beckii</i>	gue	0,14769	0,09019	0,03143	0,00000	0,00998	0,03836	0,06815	0,00216	0,00439	0,11291
<i>H. mirificissimum</i>	mir	0,18856	0,09008	0,01264	0,00000	0,00062	0,00006	0,08192	0,00174	0,01426	0,10552
<i>H. coloriscapum</i>	col	0,20443	0,07458	0,02213	0,00614	0,01150	0,01209	0,14896	0,01121	0,02252	0,22373
<i>H. pyricephalum</i>	pyr	0,16462	0,10061	0,02572	0,00000	0,00567	0,13597	0,22428	0,00605	0,04160	0,23629
<i>H. mokragorae</i>	mok	0,21601	0,21738	0,02896	0,00017	0,00017	0,00000	0,08024	0,00000	0,00767	0,03714
<i>H. pannosum</i> s.l.	pan	0,22355	0,11681	0,02358	0,00707	0,00283	0,01368	0,14369	0,00110	0,00000	0,03962
<i>H. plumulosum</i>	plu	0,17726	0,09426	0,03597	0,00717	0,00588	0,00010	0,08200	0,00000	0,01395	0,14637
<i>H. albopellitum</i>	alb	0,16347	0,10942	0,04634	0,00603	0,01954	0,02289	0,09480	0,00424	0,03953	0,18178
<i>H. pseudoschenkii</i>	bup	0,20400	0,20336	0,03207	0,00000	0,00795	0,00840	0,17056	0,00329	0,00950	0,11639
<i>H. villosum</i>	vil	0,17392	0,08862	0,01855	0,00000	0,00411	0,00000	0,08119	0,00255	0,00241	0,10675
<i>H. pilosum</i>	pil	0,17619	0,15609	0,01415	0,00000	0,00244	0,05745	0,18529	0,00838	0,00000	0,10602
<i>H. glabratum</i>	gla	0,12863	0,10138	0,00820	0,00000	0,00000	0,02825	0,07428	0,00483	0,00869	0,06690
<i>H. scorzonerifolium</i> s.l.	sco	0,18977	0,10202	0,02467	0,00000	0,01373	0,00000	0,16940	0,00009	0,00969	0,17676
<i>H. dentatum</i> s.l.	den	0,10098	0,10459	0,04285	0,00000	0,00376	0,07695	0,12149	0,00307	0,00538	0,15543
<i>H. valdepilosum</i> s.l.	val	0,14308	0,06153	0,01301	0,00000	0,00241	0,00413	0,06262	0,00140	0,00000	0,27409
<i>H. neilreichii</i>	nei	0,24128	0,34000	0,01868	0,00000	0,00667	0,00000	0,17775	0,00174	0,00010	0,09288
<i>H. naegelianum</i>	nae	0,13898	0,13139	0,01768	0,00560	0,01245	0,21352	0,18213	0,01308	0,00167	0,25735
<i>H. tommasinianum</i>	tom	0,20351	0,23067	0,03496	0,00000	0,00104	0,00013	0,20975	0,00000	0,00013	0,04081
<i>H. macrodontoides</i>	mac	0,16394	0,18947	0,04517	0,00000	0,00007	0,02242	0,12770	0,00000	0,00000	0,13908

^aAkronim vrste. Fenolkarboksilne kiseline: hlorogenska kiselina (**5**), 3,5-di-*O*-kafeoilhina kiselina (**8**), 1,5-di-*O*-kafeoilhina kiselina (**9**), dikafeoilhina kiselina (**10**), monokafeoilhina kiselina (**11**). Flavonoidi: luteolin heksozilpentozid (**12**), luteolin 7-*O*-glukoksilozid (**13**), luteolin heksozildezoksiheksosid (**14**), luteolin 7-*O*-rutinozid (**15**), luteolin 7-*O*-glukozid (**16**).

Tabela 38. Relativni sadržaj flavonoida (**17-30**) u odnosu na sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u suvim MeOH ekstraktima herbi 28 vrsta roda *Hieracium*

Akr.	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	SUM
gym	0,12410	0,00000	0,01423	0,00000	0,00136	0,00868	0,00963	0,00052	0,00010	0,00000	0,00010	0,04060	0,00063	0,00356	1,00000
ori	0,15672	0,00141	0,00000	0,00000	0,00177	0,02931	0,00689	0,00088	0,00009	0,00000	0,00000	0,00009	0,00159	0,00062	1,00000
ble	0,15047	0,00000	0,00683	0,00051	0,00000	0,00995	0,00545	0,00051	0,00000	0,00007	0,00726	0,01532	0,00356	0,00450	1,00000
par	0,14051	0,00000	0,00009	0,00000	0,00097	0,00658	0,00527	0,00000	0,00009	0,00500	0,02106	0,01115	0,00430	0,00360	1,00000
spi	0,10711	0,00000	0,00000	0,00000	0,00389	0,01363	0,00652	0,00000	0,00010	0,00000	0,00282	0,01723	0,00341	0,00341	1,00000
ana	0,21742	0,00145	0,00000	0,00000	0,02386	0,00950	0,00407	0,00039	0,00010	0,00485	0,01358	0,01299	0,00165	0,00310	1,00000
cal	0,00009	0,00000	0,00000	0,00000	0,00009	0,01235	0,02601	0,00065	0,03386	0,00458	0,17951	0,00561	0,00168	0,01132	1,00000
sch	0,00000	0,00238	0,00000	0,00000	0,00230	0,00206	0,00584	0,00008	0,01908	0,00962	0,13248	0,00929	0,00115	0,00436	1,00000
dur	0,00009	0,00000	0,00705	0,00000	0,00000	0,01010	0,00574	0,00061	0,00870	0,01018	0,11916	0,02002	0,00148	0,00392	1,00000
gue	0,35987	0,00000	0,00000	0,00022	0,00417	0,01013	0,00931	0,00000	0,03411	0,00946	0,05206	0,00760	0,00268	0,00514	1,00000
mir	0,46352	0,00000	0,00361	0,00000	0,00766	0,00542	0,00143	0,00000	0,01874	0,00006	0,00006	0,00025	0,00000	0,00386	1,00000
col	0,23104	0,00000	0,00000	0,00000	0,00010	0,00595	0,00390	0,00039	0,00010	0,00010	0,00682	0,01297	0,00058	0,00078	1,00000
pyr	0,00009	0,00000	0,00189	0,00000	0,00340	0,00586	0,00255	0,00047	0,00000	0,00009	0,02997	0,00908	0,00312	0,00265	1,00000
mok	0,31567	0,00017	0,01721	0,00000	0,00017	0,00017	0,01193	0,00000	0,05451	0,00017	0,00000	0,00017	0,00017	0,01193	1,00000
pan	0,33894	0,00000	0,00817	0,00000	0,00016	0,03820	0,00016	0,00000	0,03176	0,00016	0,00000	0,00016	0,00000	0,01038	1,00000
plu	0,35791	0,00010	0,00000	0,00000	0,00010	0,00010	0,00389	0,00100	0,00010	0,00010	0,06945	0,00010	0,00010	0,00409	1,00000
alb	0,29522	0,00011	0,00167	0,00000	0,00011	0,00391	0,00391	0,00033	0,00011	0,00000	0,00000	0,00011	0,00011	0,00636	1,00000
bup	0,02183	0,00009	0,00694	0,00000	0,01699	0,01032	0,00694	0,00009	0,01928	0,00439	0,15732	0,00009	0,00009	0,00009	1,00000
vil	0,32399	0,00007	0,01295	0,00000	0,00000	0,00163	0,00205	0,00000	0,02003	0,00411	0,15382	0,00234	0,00078	0,00014	1,00000
pil	0,09176	0,00006	0,00422	0,00000	0,00006	0,00006	0,00189	0,00000	0,02459	0,00777	0,15837	0,00139	0,00006	0,00377	1,00000
gla	0,44155	0,00004	0,00464	0,00000	0,00174	0,00798	0,00189	0,00000	0,09567	0,01192	0,00609	0,00182	0,00041	0,00509	1,00000
sco	0,03858	0,00135	0,00224	0,00000	0,00861	0,03149	0,00610	0,00054	0,02082	0,01014	0,18340	0,00260	0,00000	0,00799	1,00000
den	0,19674	0,00000	0,00100	0,00000	0,00645	0,00637	0,00192	0,00000	0,02043	0,00584	0,11204	0,01728	0,00161	0,01582	1,00000
val	0,07913	0,00000	0,00008	0,00000	0,00000	0,00008	0,00132	0,00000	0,00872	0,00849	0,32090	0,01199	0,00047	0,00654	1,00000
nei	0,00000	0,00000	0,02525	0,00000	0,02453	0,00000	0,00708	0,00010	0,03110	0,00010	0,00010	0,01611	0,00062	0,01591	1,00000
nae	0,00005	0,00000	0,01506	0,00000	0,00000	0,00282	0,00146	0,00115	0,00560	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	1,00000
tom	0,19857	0,00013	0,00000	0,00000	0,01170	0,02690	0,00325	0,00013	0,02287	0,01494	0,00013	0,00013	0,00013	0,00013	1,00000
mac	0,17790	0,00000	0,01025	0,00000	0,00152	0,00000	0,00880	0,00000	0,00317	0,00007	0,11031	0,00007	0,00000	0,00007	1,00000

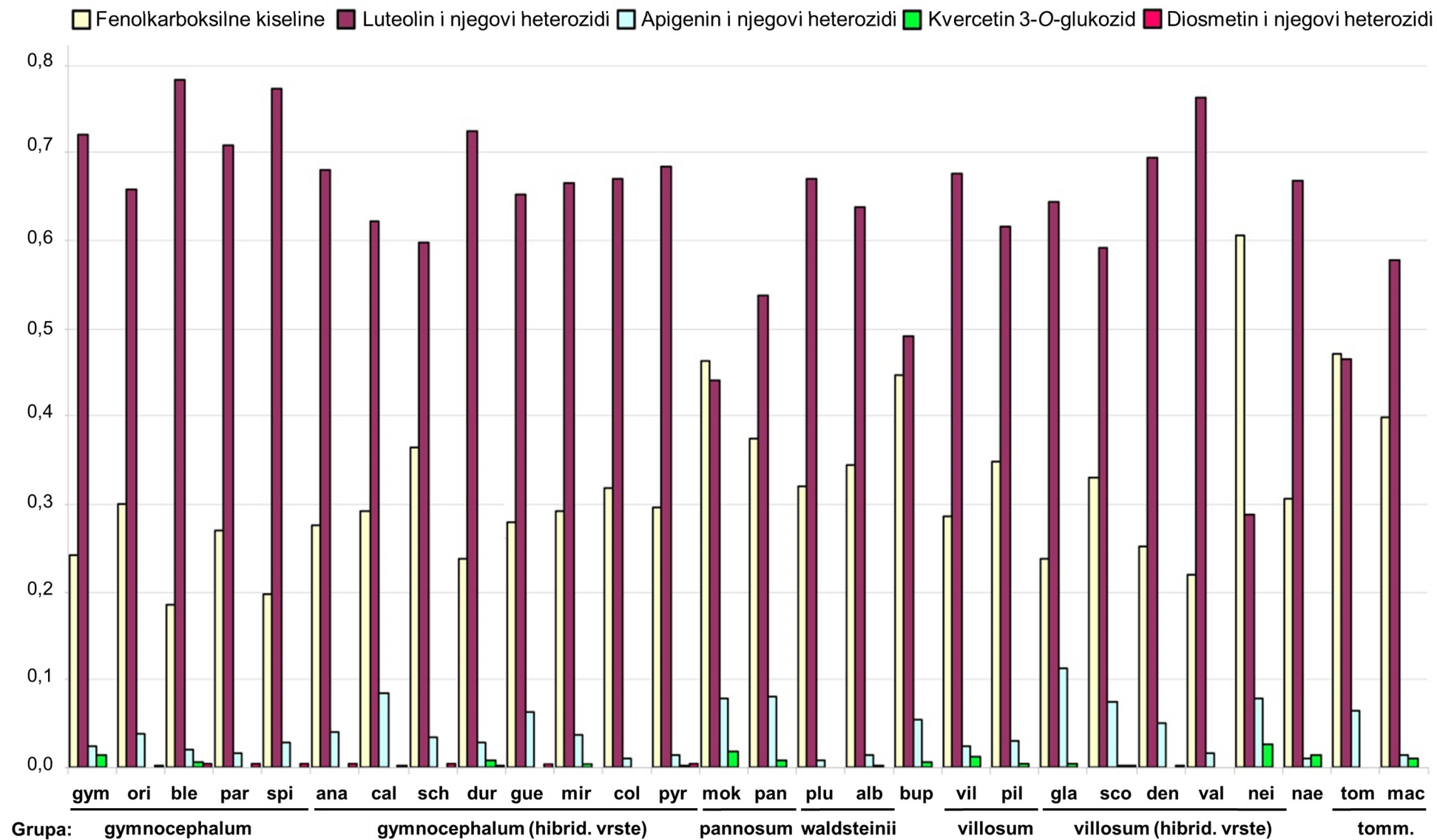
^aAkronim vrste. Flavonoidi: luteolin 7-*O*-glukuronid (**17**), diosmetin heksozid (**18**), kvercetin 3-*O*-glukozid (**19**), diosmetin heksozilpentozid (**20**), apigenin heksozilpentozid (**21**), apigenin 7-*O*-rutinozid (**22**), apigenin 7-*O*-glukozid (**23**), luteolin 6"-acilheksozid (**24**), apigenin 7-*O*-glukuronid (**25**), luteolin 4'-*O*-glukozid (**26**), luteolin 4'-*O*-glukuronid (**27**), luteolin (**28**), diosmetin (**29**), apigenin (**30**).

Tabela 39. Podela ispitivanih grupa (agregata i neformalnih grupa) vrsta roda *Hieracium* na osnovu prosečnog sadržaja detektovanih fenolkarboksilnih kiselina i flavonoida

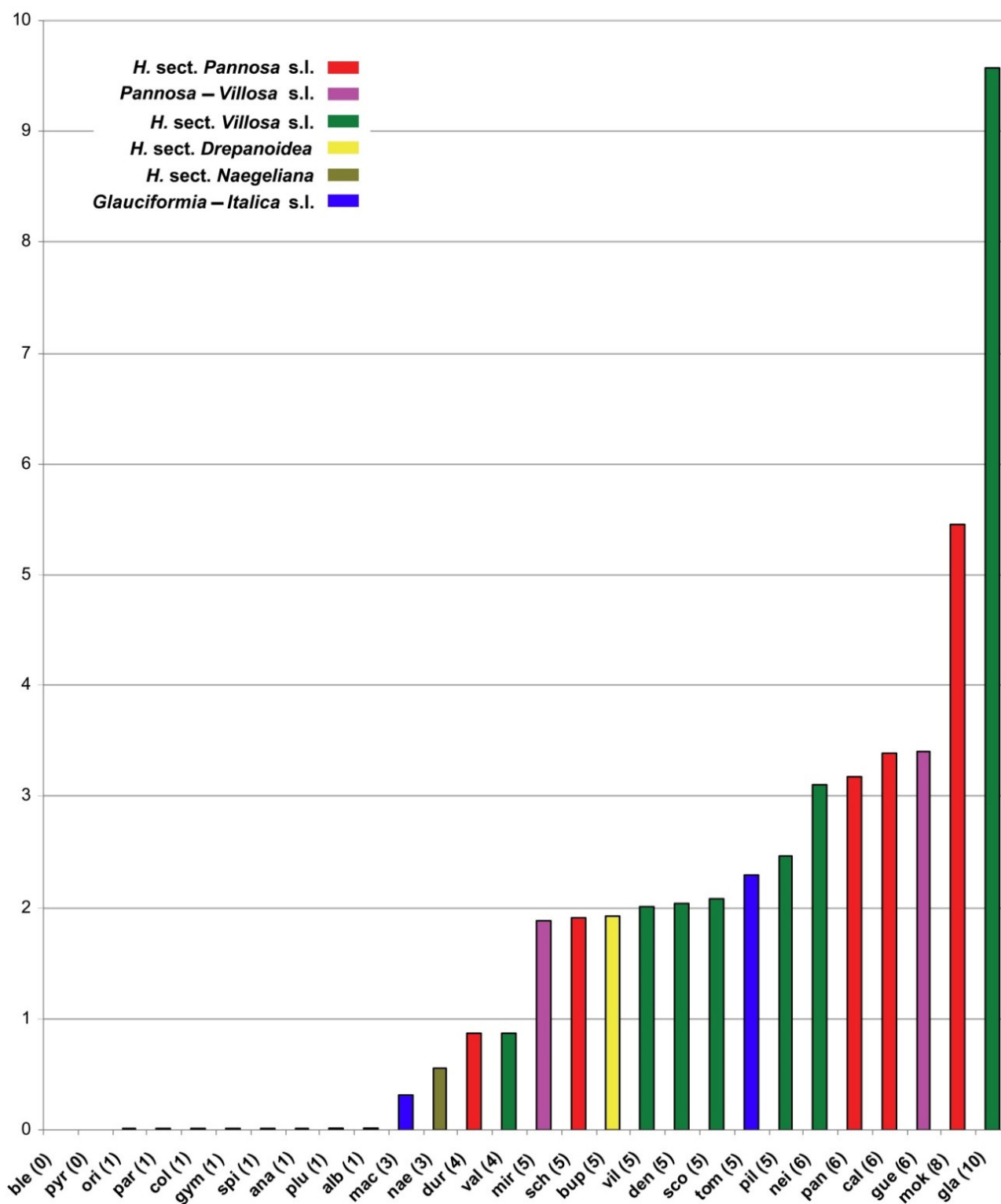
Grupa %	Fenolkarboksilne kiseline					Luteoin i njegovi heterozidi										Diosmetin i njegovi heterozidi			K 19	Apigenin i njegovi heterozidi					
	<u>5</u> >10	<u>11</u> 0,1-1	<u>8*</u> >10	<u>9</u> 1-10	<u>10*</u> 0,1-1	<u>12*</u> 1-10	<u>13</u> >10	<u>14*</u> 0,1-1	<u>15*</u> 1-10	<u>16*</u> >10	<u>17</u> >10	<u>24</u> tr	<u>26</u> 0,1-1	<u>27</u> 1-10	<u>28*</u> 0,1-1	<u>18</u> tr	<u>20</u> tr	<u>29*</u> 0,1-1		<u>19</u> 0,1-1	<u>21</u> 0,1-1	<u>22</u> 0,1-1	<u>23</u> 0,1-1	<u>25*</u> 1-10	<u>30*</u> 0,1-1
gym	--		--	-	nd	+		+	+++	+				-	+++	+	+++	+++				+	+	---	
gymh			-					+		++					+	+++	nd	+	-	+		++			
pan	++	-				--	-	-		--	++	nd	-	nd	-		nd	-	+	-			++	++	
wal		++		++	++				+		++	+	-		-		nd	-	--	-	--		-		
bup	+		++		nd	-	+							++	-		nd	-		+++			+		--
vil+vilh				--	nd							-	++	+			nd						-	+	+
nae	-	++		--	+	+++	++	+++	-	++	---	+++	nd	nd	nd	nd	nd	nd	++	nd	-	--			Nd
tom		--	++	++	nd			nd	---	-					-	-	nd	-		+		+			--

Napomena: * – Jedinjenja koja uslovljavaju varijabilnost grupa; _ – Jedinjenja koja uslovljavaju varijabilnost vrsta; K – kvercetin 3-*O*-glukozid.

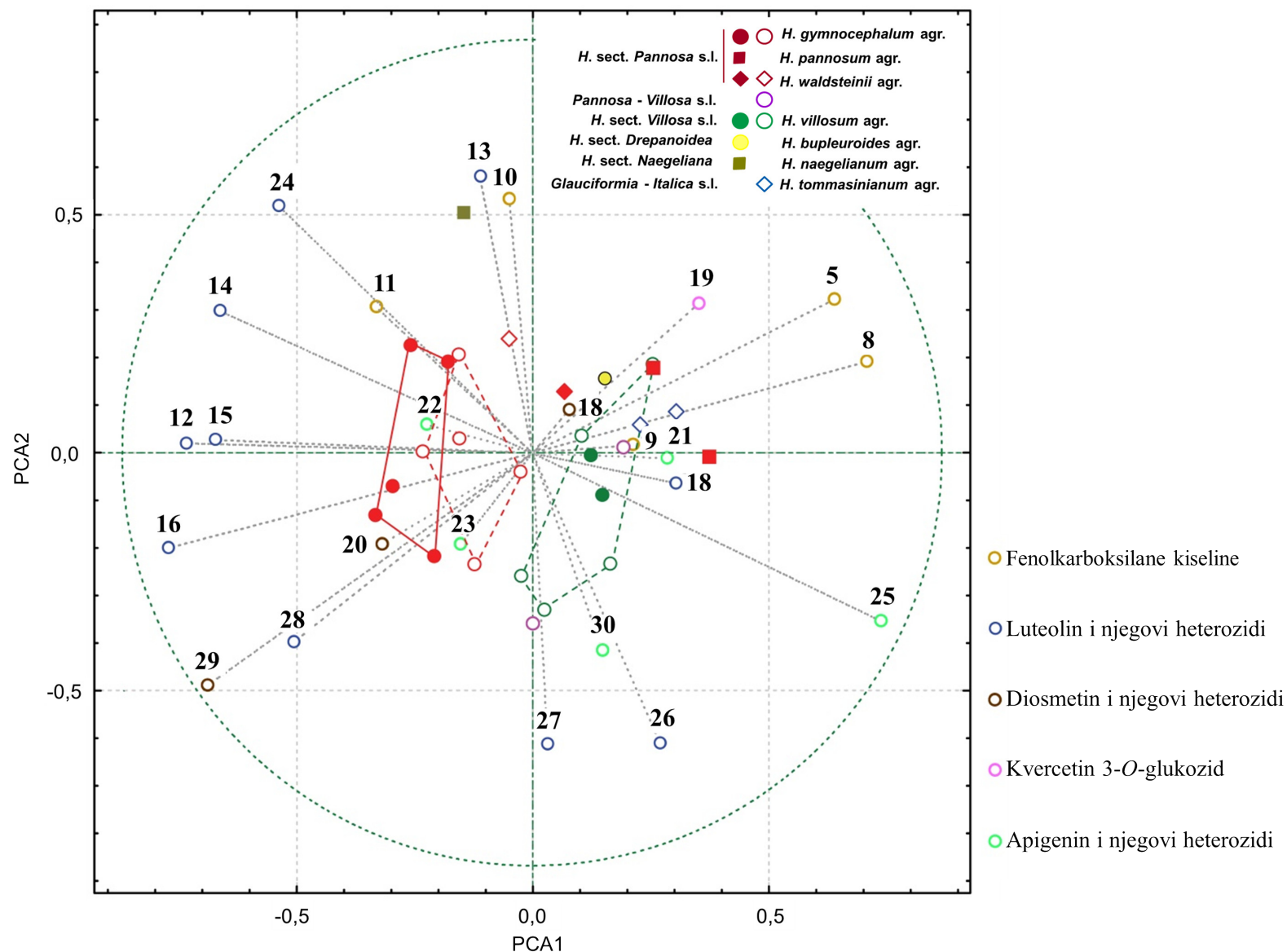
U tabeli je prikazan interval vrednosti procentualnog sadržaja flavonoida i fenolkarboksilnih kiselina u ekstraktima vrsta koje pripadaju naznačenim grupama. Kodiranje relativnog sadržaja jedinjenja (**5**, **8-30**) prema normalnoj raspodeli: “+++” – maksimalna vrednost više od dva puta > Q₃; “++” – maksimalna vrednost > Q₃; “+” – vrednost ± ≥ Q₃; “-” – vrednost ± ≤ Q₁; “--” – minimalna vrednost < Q₁; “---” – minimalna i veoma niska vrednost; “nd” – jedinjenje nije detektovano. Skraćenice grupa su prikazane u **Tabeli 36**. Fenolkarboksilne kiseline: hlorogenska kiselina (**5**), 3,5-di-*O*-kafeoilhina kiselina (**8**), 1,5-di-*O*-kafeoilhina kiselina (**9**), dikafeoilhina kiselina (**10**), monokafeoilhina kiselina (**11**). Flavonoidi: luteolin heksozilpentozid (**12**), luteolin 7-*O*-glukoksilozid (**13**), luteolin heksozildezoksiheksozid (**14**), luteolin 7-*O*-rutinozid (**15**), luteolin 7-*O*-glukozid (**16**), luteolin 7-*O*-glukuronid (**17**), diosmetin heksozid (**18**), kvercetin 3-*O*-glukozid (**19**), diosmetin heksozilpentozid (**20**), apigenin heksozilpentozid (**21**), apigenin 7-*O*-rutinozid (**22**), apigenin 7-*O*-glukozid (**23**), luteolin 6''-acilheksozid (**24**), apigenin 7-*O*-glukuronid (**25**), luteolin 4'-*O*-glukozid (**26**), luteolin 4'-*O*-glukuronid (**27**), luteolin (**28**), diosmetin (**29**), apigenin (**30**).



Slika 63. Relativni sadržaj fenolkarboksilnih kiselina i flavonoida (grupisanih prema strukturi) u suvim MeOH ekstraktima herbi 28 vrsta roda *Hieracium*.



Slika 64. Relativni sadržaj apigenin 7-*O*-glukuronida (**25**) u suvim MeOH ekstraktima herbi 28 vrsta roda *Hieracium*. Dodeljene kodirane vrednosti, prikazane u zagradi, korišćene su u statističkoj analizi. Akronimi vrsta dati su u **Tabeli 36**.



Slika 65. PCA analiza kodiranih vrednosti relativnog sadržaja fenolkarboksilnih kiselina i flavonoida (5, 8-30) u suvim MeOH ekstraktima herbi 28 vrsta roda *Hieracium* (2D grafikon, faktori opterećenja duž prve dve glavne komponente za navedena jedinjenja). Legenda: pune tačke predstavljaju osnovne (nehibridogene) taksone; prazne tačke predstavljaju hibridogene vrste. Nazivi jedinjenja (5, 8-30) dati su u **Tabelama 37 i 38**.

Drugu glavnu osu na PCA grafikonu (**Slika 65**) definišu sledeća jedinjenja:

- luteolin 7-*O*-glukoksilozid (**13**) - veći sadržaj u nae,
- luteolin 4'-*O*-glukozid (**26**) - veći sadržaj u vil+vilh, nije detektovan u nae,
- luteolin 4'-*O*-glukuronid (**27**) - veći sadržaj u vil+vilh i bup, nije detektovan u nae i pan,
- dikafeoilhina kiselina (**10**) - veći sadržaj u nae i wal, nije detektovana u gym, vil+vilh, bup i tom.

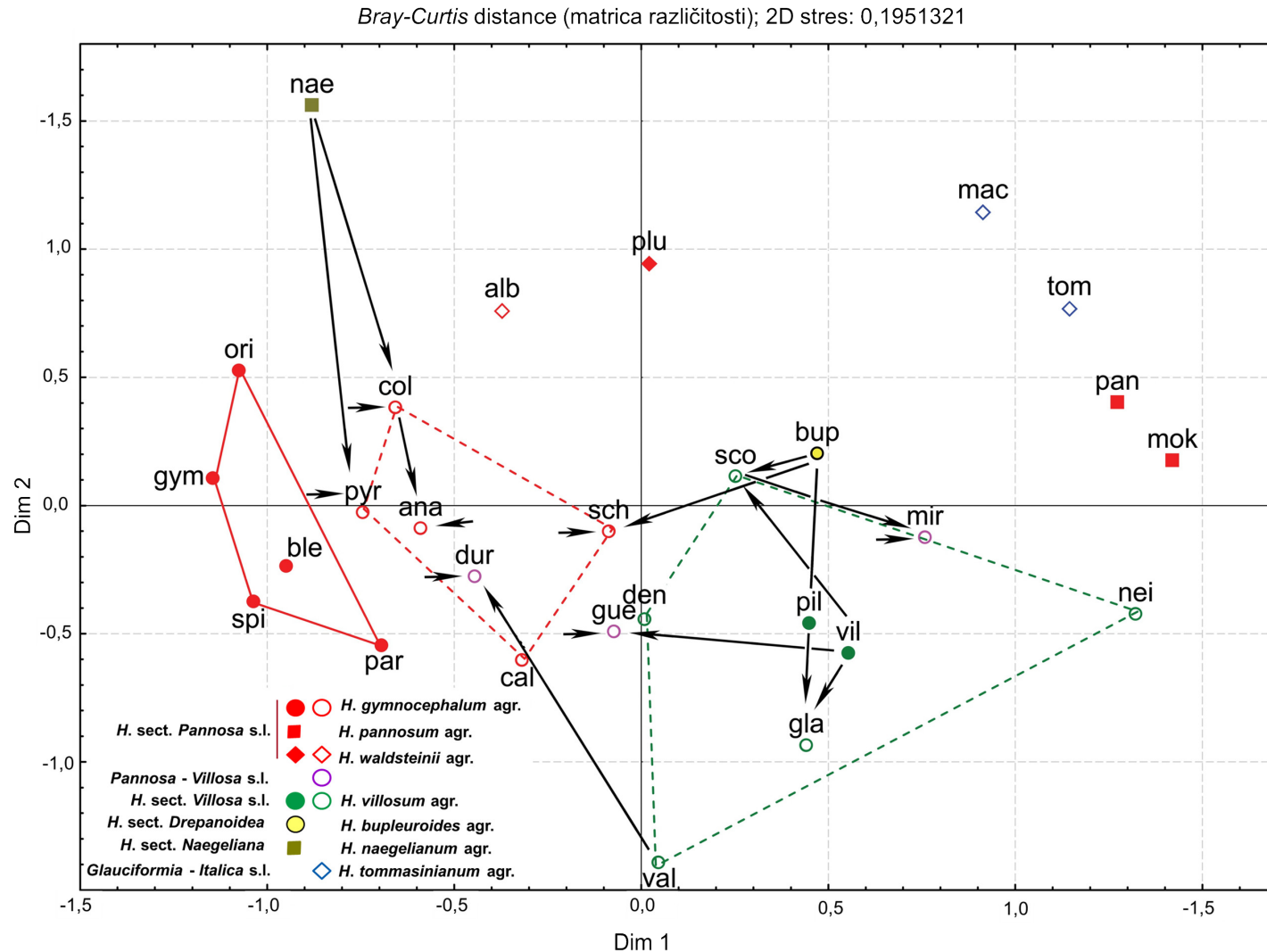
Rezultati nMDS analize u skladu su sa postojećim literaturnim podacima o pripadnosti vrsta glavnim taksonomskim grupama (sekcijama). Na 2D nMDS grafikonu se jasno može videti da su sve neformalne grupe i sekcije jasno odvojene (**Slika 66**), dok su dve hibridogene vrste *Pannosa-Villosa*, i to *H. guentheri-beckii* i *H. mirificissimum*, postavljene bliže sekciji *Villosa*. U okviru sect. *Pannosa*, predstavnici *H. pannosum* grupe odvojeni su od ostatka sekcije duž prve ose i nalaze se u blizini *H. tommasinianum* grupe. Hibridogene vrste su uglavnom distribuirane između roditeljskih vrsta, osim *H. anastrum*, *H. durmitoricum*, *H. glabratum* i *H. mirificissimum*. *Hieracium guentheri-beckii* i *H. mirificissimum* (dve hibridogene vrste *Pannosa-Villosa-Drepanoidea*) bile su bliže sekciji *Villosa* i predstavniku *H. bupleuroides* grupe. Pomalo izolovan položaj *H. neilreichii* (*dentatum-bifidum*) unutar sekcije *Villosa* s.l. ("vil+vilh") može se objasniti pretpostavljenim hibridogenim poreklom (*Villosa-Hieracium-Hieracium*) uz izraženiju i bližu vezu sa sekcijom *Hieracium*.

Dodatno je izvršeno i trodimenzionalno nMDS skaliranje, s obzirom da je kod dvodimenzionalnog stres vrednost iznosila 0,1951, što je blizu praga proizvoljne interpretacije (**Slika 67**). Kako se može videti na 3D nMDS grafikonu, projekcije položaja u prvoj ravni su vrlo slične onima u dvodimenzionalnom prostoru, ali se mogu primetiti novi odnosi duž treće ose. Najznačajniji među njima su odvajanja *H. orienti* u *H. gymnocephalum* grupi, *H. scorzonrifolium* u *H. villosum* grupi i jasna prostorna udaljenost *H. pannosum* i *H. tommasinianum* grupa.

U klaster analizi 28 ispitivanih vrsta, uključujući i intermedijarne, odnosno hibridogene vrste, taksoni nisu savršeno klasifikovani u klaster u poređenju sa njihovom taksonomskom pripadnošću (**Slika 68**). Ipak, kada je izvršena klaster analiza samo osnovnih, odnosno nehibridogenih vrsta, rezultati su u velikoj meri odgovarali očekivanom taksonomskom obrascu (**Slika 69**).

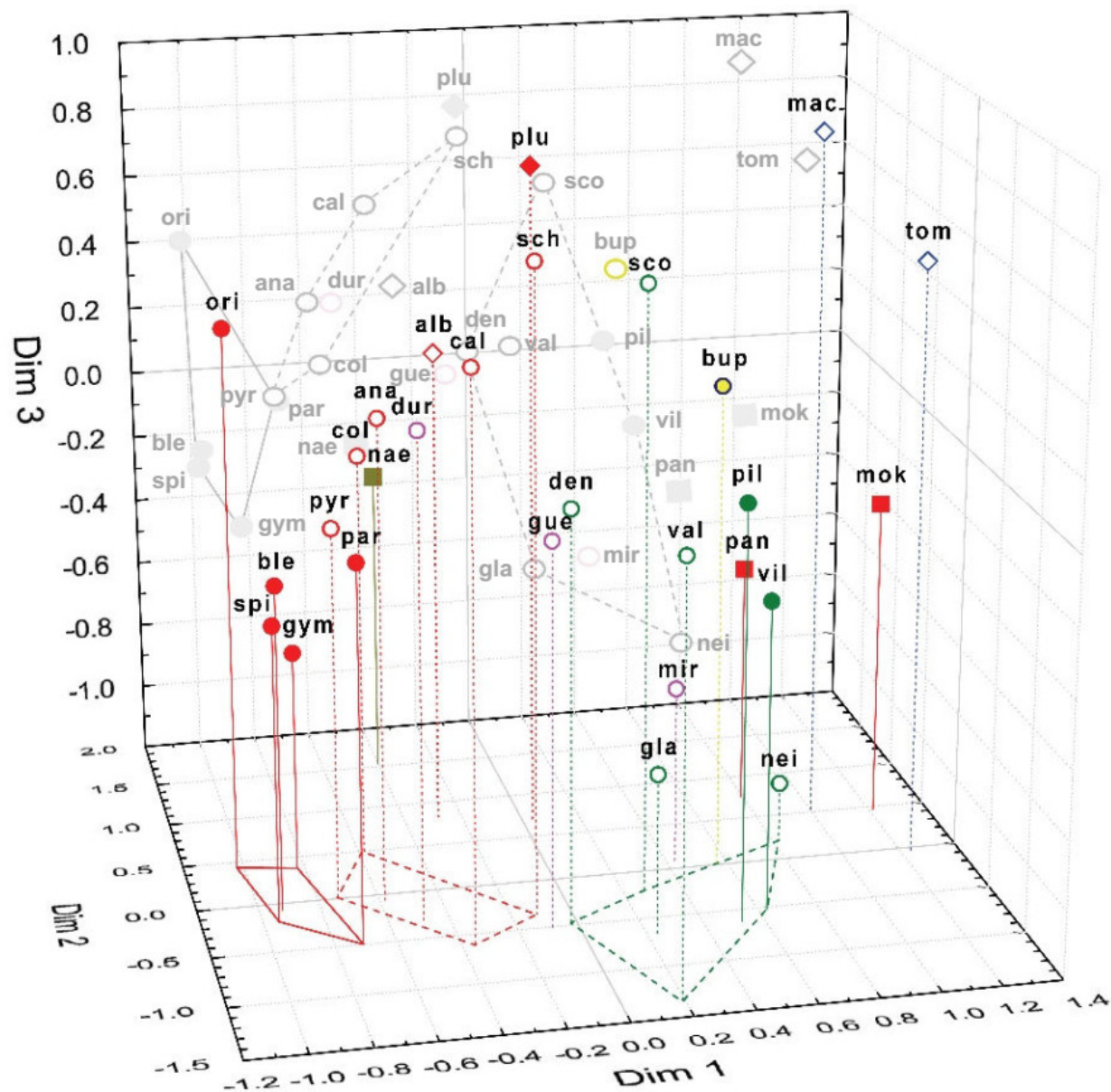
Izvesna odstupanja u sekciji *Pannosa* se mogu objasniti ekološkim i fenološkim faktorima (*H. plumulosum* je sakupljen na nižim nadmorskim visinama) i geografskom udaljenošću u odnosu na planinu Durmitor (*H. mokragorae*, *H. pannosum* i *H. albopellitum*). Pored toga, *H. orienti*, sakupljen na susednoj planini (Vojnik), izdvojen je iz grupe *H. gymnocephalum*. Tendenciju klasterisanja, odnosno grupisanja uzoraka prema njihovom geografskom poreklu, a ne po taksonomiji, takođe su konstatovali Pan i sar. (2016), koji su ispitali vrste iz familije Gentianaceae. Dendrogram ispitivanih grupa taksona roda *Hieracium* (**Slika 69**) bio je sličan dendrogramu klaster analize seskviterpenskih laktona (**Slika 62**), mada su na njemu grupe *H. waldsteinii* i *H. gymnocephalum* delile isti klaster. U oba dendrograma, *H. naegelianum* je jasno odvojen od drugih grupa.

Na osnovu ovog rezultata, prethodno postavljena hipoteza da se *H. naegelianum* može svrstati u sekciju *Drepanoidea* (Sell i Vest, 1976; Stace, 1998) ne može biti prihvaćena. Naime, vrsta *H. naegelianum* se od pripadnika sekcije *Drepanoidea* razlikuje i odvaja u pogledu hemijskog sastava suvog MeOH ekstrakata: po visokom sadržaju luteolin-heksozilpentozida (**12**) i luteolin-heksozildezoksiheksozida (**14**), većoj zastupljenosti kvercetin-3-*O*-glukozida (**19**) u odnosu na apigeninske heterozide, kao i po odsustvu osam jedinjenja, tj. luteolina (**28**) i njegovih 4'-heterozida (**26**, **27**), apigenina (**30**) i njegovog biozida (**21**), kao i diosmetina (**29**) i njegovih heterozida (**18**, **20**).

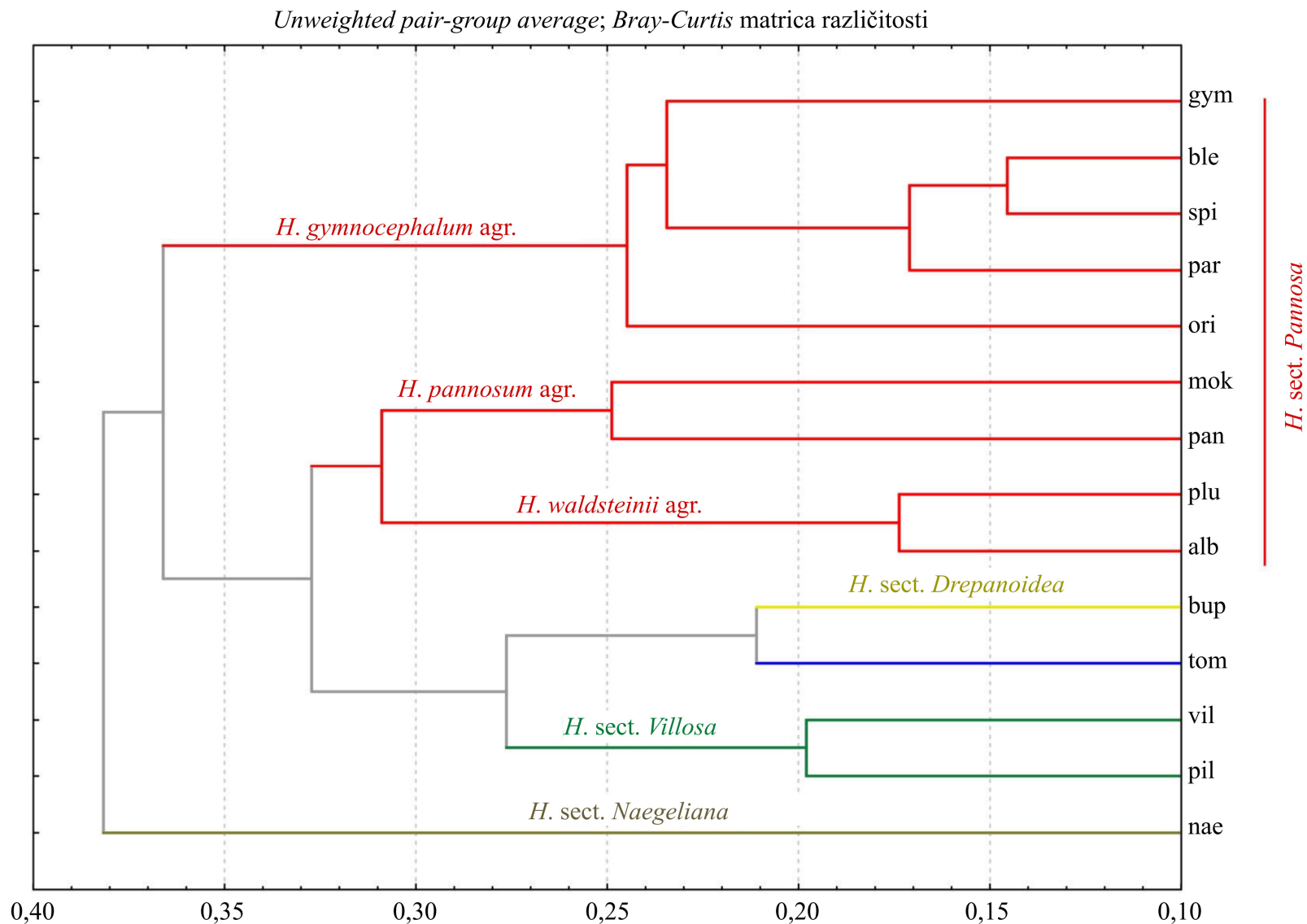


Slika 66. nMDS grafikon distribucije kodiranih vrednosti procentualnog sadržaja detektovanih fenolkarboksilnih kiselina i flavonoida projektovan u dvodimenzionalnom prostoru korišćenjem *Bray-Curtis* matrice različitosti. Legenda: pune tačke predstavljaju osnovne (nehibridogene) taksone; prazne tačke predstavljaju hibridogene vrste. Akronimi vrsta dati su u **Tabeli 36**. Strelice ukazuju na hibridogeno poreklo vrsta; kratke desno orijentisane strelice ukazuju na vrste čija je bar jedna roditeljska vrsta iz agregata *H. gymnocephalum*; kratke levo orijentisane strelice ukazuju na vrste čija je bar jedna roditeljska vrsta iz agregata *H. pannosum*.

Bray-Curtis distance; 3D stress: 0,1384561

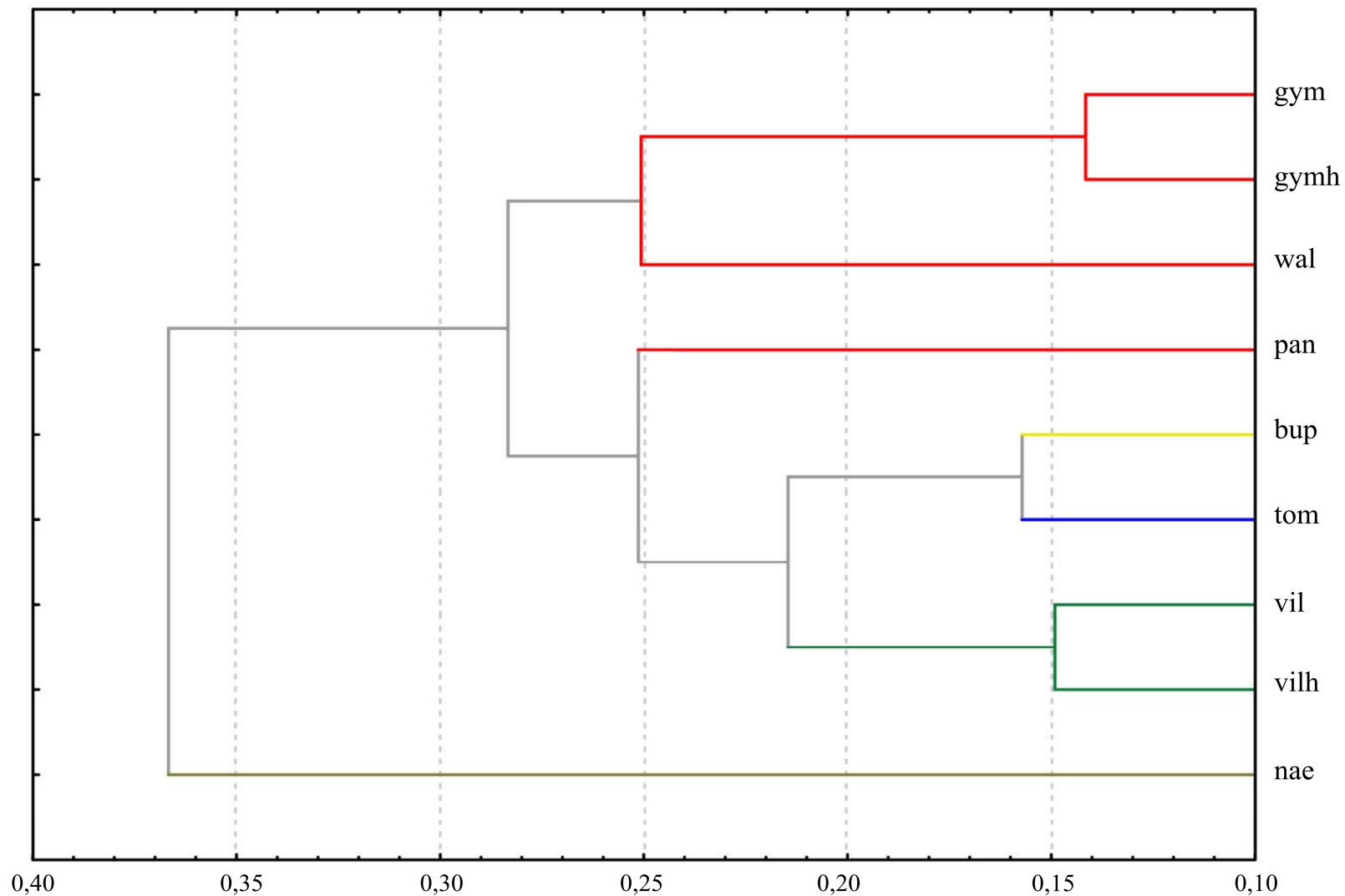


Slika 67. nMDS grafikon distribucije kodiranih vrednosti procentualnog sadržaja detektovanih fenolkarboksilnih kiselina i flavonoida projektovan u trodimenzionalnom prostoru pomoću *Bray-Curtis* matrice različitosti, sa dodatnim projekcijama u dvodimenzionalnom prostoru.



Slika 68. Hijerarhijski UPGMA dendrogram ispitivanih vrsta roda *Hieracium* na osnovu *Bray-Curtis* matrice različitosti kodiranih vrednosti procentualnog sadržaja fenolkarboksilnih kiselina i flavonoida u suvim MeOH ekstraktima. Akronimi vrsta dati su u **Tabeli 36**.

Unweighted pair-group average; Bray-Curtis matrica različitosti



Slika 69. Hijerarhijski UPGMA dendrogram ispitivanih grupa (agregata i neformalnih grupa) vrsta roda *Hieracium* na osnovu *Bray-Curtis* matrice različitosti procentualnog sadržaja fenolkarboksilnih kiselina i flavonoida u suvim MeOH ekstraktima. Akronimi grupa dati su u **Tabeli 36**.

1.4.3. Hemosistematski značaj triterpena

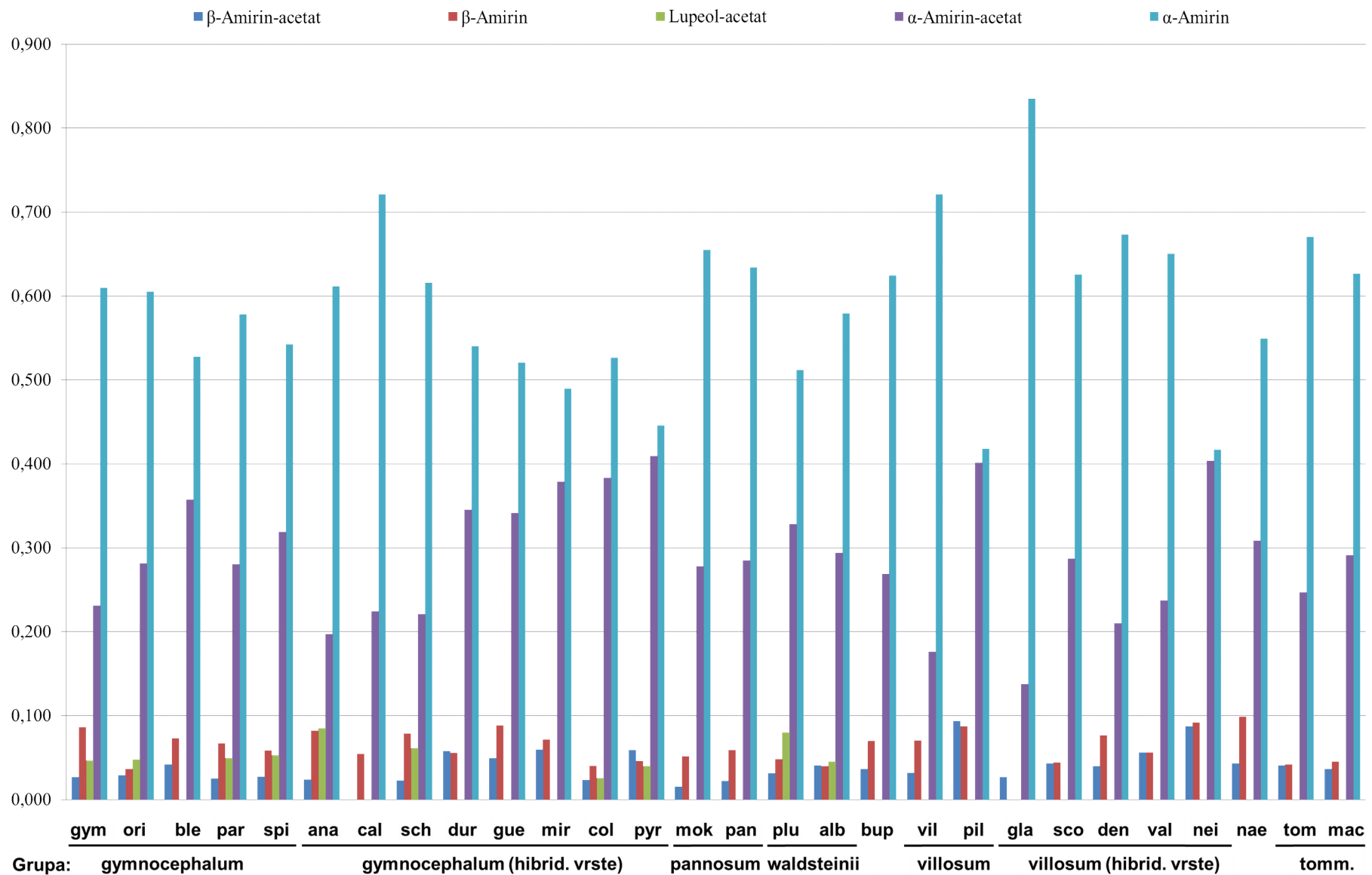
U cilju ispitivanja hemosistematskog značaja triterpena, kao i upoređivanja ispitivanih 28 vrsta roda *Hieracium*, sadržaj pojedinačnih triterpena u suvim CH₂Cl₂ ekstraktima herbi izražen je kao relativni, odnosno procentualni sadržaj u odnosu na sadržaj ukupnih triterpena u ekstraktima (**Tabela 40**; **Slika 70**). Kodirane vrednosti relativnog sadržaja triterpena **31-35** korišćene su u PCA, nMDS i klaster analizi.

Tabela 40. Relativni sadržaj pojedinačnih triterpena (**31-35**) u odnosu na sadržaj ukupnih triterpena u suvim CH₂Cl₂ ekstraktima herbi 28 vrsta roda *Hieracium*

Akr. ^a	31	32	33	34	35	31+33	32+35	U/O ^b	Ukupno
gym	0,0860	0,6095	0,0267	0,0464	0,2314	0,1127	0,8409	7,5	1,0000
ori	0,0364	0,6053	0,0289	0,0479	0,2816	0,0652	0,8869	13,6	1,0000
ble	0,0730	0,5277	0,0421	-	0,3572	0,1151	0,8849	7,7	1,0000
par	0,0668	0,5782	0,0250	0,0497	0,2804	0,0917	0,8586	9,4	1,0000
spi	0,0583	0,5425	0,0275	0,0526	0,3191	0,0858	0,8616	10,0	1,0000
ana	0,0820	0,6113	0,0242	0,0851	0,1974	0,1062	0,8087	7,6	1,0000
cal	0,0546	0,7210	-	-	0,2244	0,0546	0,9454	17,3	1,0000
sch	0,0791	0,6161	0,0228	0,0611	0,2209	0,1019	0,8370	8,2	1,0000
dur	0,0559	0,5404	0,0581	-	0,3456	0,1140	0,8860	7,8	1,0000
gue	0,0883	0,5207	0,0496	-	0,3414	0,1379	0,8621	6,3	1,0000
mir	0,0714	0,4899	0,0598	-	0,3788	0,1313	0,8687	6,6	1,0000
col	0,0403	0,5269	0,0236	0,0257	0,3836	0,0638	0,9104	14,3	1,0000
pyr	0,0462	0,4457	0,0590	0,0399	0,4093	0,1051	0,8550	8,1	1,0000
mok	0,0514	0,6551	0,0156	-	0,2779	0,0670	0,9330	13,9	1,0000
pan	0,0590	0,6340	0,0220	-	0,2849	0,0810	0,9190	11,3	1,0000
plu	0,0485	0,5121	0,0311	0,0799	0,3283	0,0796	0,8405	10,6	1,0000
alb	0,0400	0,5795	0,0412	0,0456	0,2938	0,0812	0,8733	10,8	1,0000
bup	0,0696	0,6246	0,0366	-	0,2692	0,1062	0,8938	8,4	1,0000
vil	0,0701	0,7214	0,0320	-	0,1764	0,1021	0,8979	8,8	1,0000
pil	0,0873	0,4179	0,0935	-	0,4013	0,1808	0,8192	4,5	1,0000
gla	-	0,8351	0,0271	-	0,1378	0,0271	0,9729	36,0	1,0000
sco	0,0442	0,6255	0,0430	-	0,2872	0,0873	0,9127	10,5	1,0000
den	0,0767	0,6730	0,0399	-	0,2104	0,1166	0,8834	7,6	1,0000
val	0,0562	0,6506	0,0561	-	0,2371	0,1122	0,8878	7,9	1,0000
nei	0,0919	0,4169	0,0872	-	0,4040	0,1791	0,8209	4,6	1,0000
nae	0,0988	0,5491	0,0433	-	0,3088	0,1421	0,8579	6,0	1,0000
tom	0,0419	0,6704	0,0407	-	0,2470	0,0826	0,9174	11,1	1,0000
mac	0,0452	0,6271	0,0367	-	0,2911	0,0819	0,9181	11,2	1,0000

^aAkr.- akronimi vrsta (imena vrsta data su u **Tabeli 36**); ^bU/O – Odnos ukupnog relativnog sadržaja triterpena tipa ursana (**32+35**) i ukupnog relativnog sadržaja triterpena tipa oleana (**31+33**). Triterpeni: β -amirin (**31**); α -amirin (**32**); β -amirin-acetat (**33**); lupeol-acetat (**34**); α -amirin-acetat (**35**).

Relativni sadržaj identifikovanih triterpena u ekstraktima najvećeg broja ispitivanih vrsta rastao je sledećim redosledom: β -amirin-acetat (**33**), lupeol-acetat (**34**), β -amirin (**31**), α -amirin-acetat (**35**) i α -amirin (**32**) (**Tabela 40**; **Slika 70**).



Slika 70. Relativni sadržaj triterpena u suvim CH_2Cl_2 ekstraktima herbi 28 vrsta roda *Hieracium*.

U pogledu hemijskih klasa, triterpeni tipa ursana, α -amirin (**32**) i α -amirin-acetat (**35**), prisutni su i dominantni u svim ispitivanim vrstama (**Slika 70**), dok je ukupni procentualni sadržaj triterpena tipa oleana, β -amirina (**31**) i β -amirin-acetata (**33**), od 4,5 (ekstrakt *H. pilosum*) do 36,0 (ekstrakt *H. glabratum*) puta niži u odnosu na triterpene tipa ursana (**Tabela 40**).

Rezultati PCA analize (**Slika 71**) pokazali su da svih pet triterpena (**31-35**) korelišu sa varijansom, bez obzira na njihov procentualni sadržaj. Najveće opterećenje duž prve glavne ose, koja objašnjava 51,41% ukupne varijanse, pokazuju α -amirin (**32**) koji je pozitivno korelisan (0,92), i β -amirin-acetat (**33**) koji je negativno korelisan (-0,88). Negativno korelisani (-0,80) lupeol-acetat (**34**) najviše je doprineo drugoj glavnoj osi, koja objašnjava nešto manju varijaciju podataka (21,92%).

Vrste koje pokazuju najveće opterećenje duž prve glavne ose (PCA grafikon na **Slici 71**) razlikuju se po sledećim karakteristikama (**Tabela 40**):

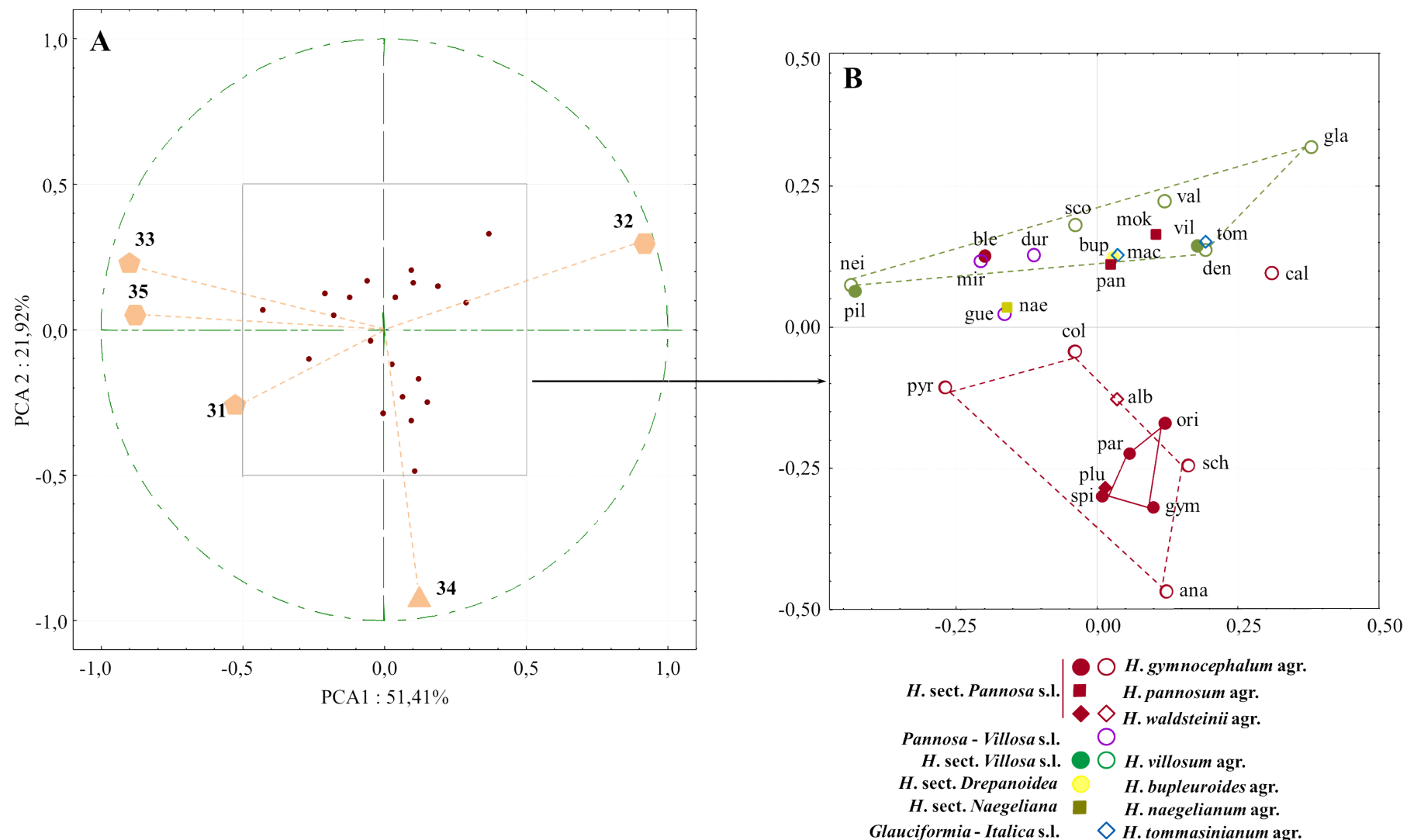
- *H. pilosum* i *H. neilreichii* su negativno korelisani (-0,43) i imaju najniži sadržaj α -amirina (**32**), a najveći sadržaj β -amirina (**31**) u odnosu na ostale vrste vil + vilh grupa;
- *H. glabratum* je pozitivno korelisan (0,38) i pokazuje nizak relativni sadržaj svih acetata i odsustvo β -amirina (**31**) u odnosu na ostale vrste vilh grupe;
- *H. calophyllum* je pozitivno korelisan (0,30) i pokazuje odsustvo β -amirin-acetata (**33**) i lupeol-acetata (**34**) u odnosu na ostale vrste gymh grupe.

Najveće opterećenje po drugoj glavnoj osi na PCA grafikonu (**Slika 71**) pokazuje vrsta *H. anastrum* (-0,48), koja se odlikuje najvišim procentualnim sadržajem lupeol-acetata (**34**).

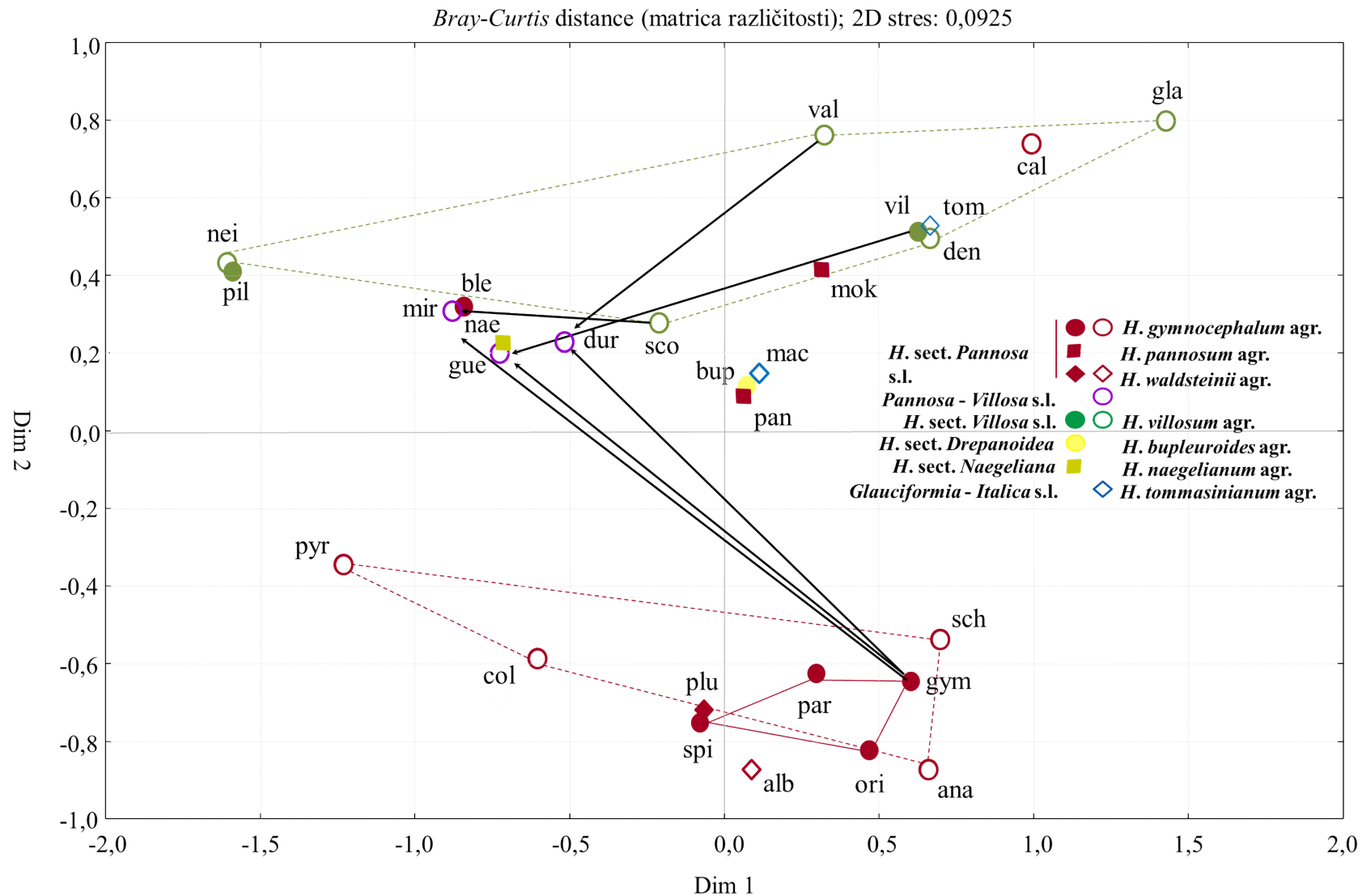
Od identifikovanih triterpena, lupeol-acetat bi mogao biti dobar hemosistematski marker za neke grupe, zbog njegovog izostanka u nehibridogenim vrstama sekcija *Villosa*, *Drepanoidea*, *Naegelianae*, *Glauciformia-Italica* (*H. tommasinianum* grupa), kao i kod više hibridogenih vrsta koje nastaju ukrštanjem vrsta iz *H. sect. Villosa*.

Slično rezultatima PCA i nMDS analize procentualnog sadržaja seskviterpenskih laktona u suvim MeOH ekstraktima (**Slike 60 i 61**), na grafikonima PCA i nMDS analize triterpena (**Slike 71 i 72**) može se primetiti da je većina ispitivanih vrsta grupisana u blizini centra koordinantnih osa. Iz pomenutih grafikona se može primetiti manje-više jasna udaljenost vrsta koje pripadaju grupama: gym + gymh (sect. *Pannosa*) i vil + vilh (sect. *Villosa*). Navedene grupe se odvajaju duž druge ose, što je uslovljeno odsustvom lupeol-acetata (**34**) u vil + vilh grupama. Međutim, ova razlika u hemijskom sastavu uslovlila je takođe i prostornu udaljenost vrste *H. bleicii* od vrsta grupe gym, kao i vrsta *H. calophyllum*, *H. durmitoricum*, *H. guentheri-beckii* i *H. mirificissimum* od gymh. Svih pet vrsta pozicionirane su bliže grupi vilh. Grupe pan i mok (sect. *Pannosa*) prostorno su bliže i dele isti kvadrant sa vilh, iako su od njih sekcijski odvojene, što je slučaj i kod grupe tom. Grupa nae (sect. *Naegelianae*) je pozicionirana između grupa gym + gymh i vil + vilh.

Za razliku od nMDS analize sadržaja fenolkarboksilnih kiselina i flavonoida u suvim MeOH ekstraktima u kojoj su sve neformalne grupe i sekcije jasno odvojene, a hibridogene vrste uglavnom pozicionirane između roditeljskih vrsta (**Slika 65**), na nMDS grafikonu analize sadržaja triterpena u suvim CH₂Cl₂ ekstraktima dolazi do preklapanja grupa gym i gymh, kao i grupa vil i vilh (**Slika 72**). Izuzetak čine tri hibridogene vrste (*Pannosa-Villosa*), i to *H. durmitoricum*, *H. guentheri-beckii* i *H. mirificissimum*, postavljene bliže sekciji *Villosa* (na **Slici 72** je strelicama prikazano njihovo hibridogeno poreklo). Takođe, *H. calophyllum* (*Pannosa-Prenanthoidea*) prostorno je udaljena od roditeljske vrste *H. gymnocephalum*, ali je zato blizu *H. valdepilosum* sa kojom deli roditeljsku vrstu *H. prenanthoides* (koja nije bila predmet ispitivanja ove doktorske disertacije).



Slika 71. PCA analiza kodiranih vrednosti relativnog sadržaja triterpena (31-35) u suvim CH₂Cl₂ ekstraktima herbi 28 vrsta roda *Hieracium* (2D grafikon, faktori opterećenja duž prve dve glavne komponente za navedena jedinjenja). Legenda: pune tačke predstavljaju osnovne (nehibridogene) taksoni; prazne tačke predstavljaju hibridogene vrste. Akronimi vrsta dati su u **Tabeli 36**.



Slika 72. nMDS grafikon distribucije kodiranih vrednosti procentualnog sadržaja identifikovanih triterpena projektovan u dvodimenzionalnom prostoru korišćenjem *Bray-Curtis* matrice različitosti. Legenda: pune tačke predstavljaju osnovne (nehibridogene) taksone; prazne tačke predstavljaju hibridogene vrste. Akronimi vrsta dati su u **Tabeli 36**. Strelice ukazuju na hibridogeno poreklo tri odabrane vrste.

2. Farmakološka ispitivanja

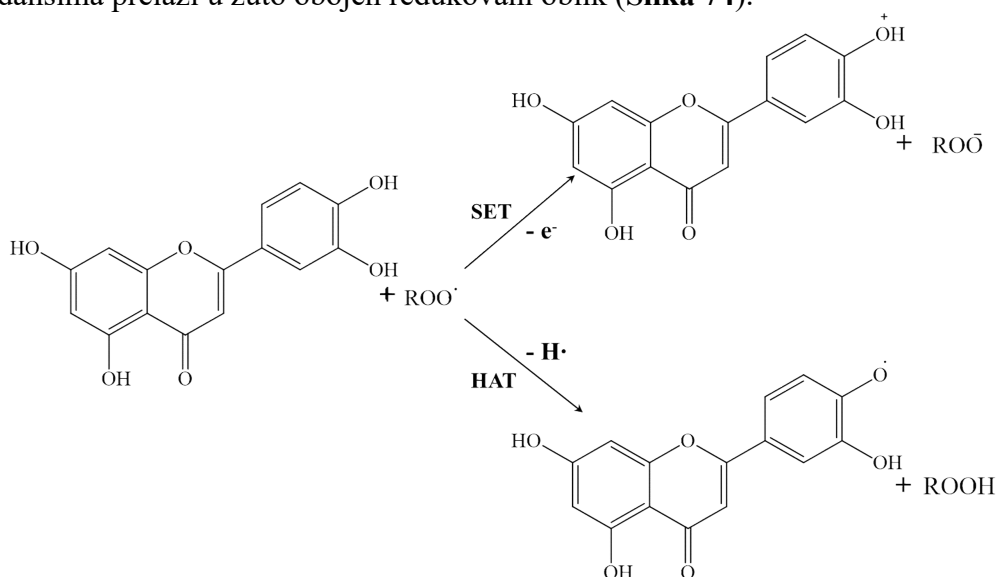
2.1. Ispitivanje antioksidantne aktivnosti MeOH ekstrakata herbi 28 vrsta

U etiologiji brojnih patoloških stanja, uključujući neurodegenerativne bolesti, tumore i koronarnu bolest srca, oksidativni stres ima značajnu ulogu kako za njihov razvoj, tako i za progresiju. Povezan je i sa procesom starenja (Liguori i sar., 2018). Oksidativni stres je uobičajeni termin koji opisuje poremećaj u ravnoteži proizvodnje slobodnih radikala i *in vivo* antioksidativnih odbrambenih mehanizama (Cheng i Breen, 2000; Liang i Kitts, 2014). Antioksidansi dovode do smanjenja stvaranja i/ili vrše neutralizaciju nastalih slobodnih radikala, kao što su reaktivna jedinjenja kiseonika (ROS): superoksid ($O_2^{\cdot-}$), hidroksil ($\cdot OH$), peroksil ($ROO\cdot$) i alkoksil ($RO\cdot$) radikal, kao i reaktivna jedinjenja azota (RNS): azot monoksid radikal ($\cdot NO$), azot peroksid ($ONOO^-$) i azot dioksid radikal ($\cdot NO_2$), kroz različite mehanizme. Najznačajniji antioksidansi biljnog porekla su polifenoli. Osnovu njihove strukture čine dve ili više fenolnih grupa koje mogu biti donori vodonikovog atoma i učestvovati u transferu elektrona. Na taj način ove funkcionalne grupe vrše npr. neutralizaciju slobodnih radikala, redukuju H_2O_2 i lipidne perokside, a dodatno svoj antioksidantni potencijal ispoljavaju i heliranjem jona metala Fe^{3+} i Cu^{2+} uključenih u proizvodnju slobodnih radikala (npr. Fe^{3+} je uključen u stvaranje $\cdot OH$ radikala u Fentonovoj reakciji) (Halliwell i sar., 1987; Harborne, 1989; Li i Pratt, 2015; Niki, 2010). Ispoljavanje antioksidantnog delovanja *in vivo* u velikoj meri zavisi od metabolizma polifenola, koji počinje još u usnoj duplji, zatim se nastavlja hidrolizom u lumenu tankog ili debelog creva, kao i u enterocitima (Walle i sar., 2004). U slučaju flavonoida, ubikvitarne klase polifenola, metabolizam u velikoj meri smanjuje njihov antioksidantni potencijal u poređenju sa efektom početnih jedinjenja zbog blokiranja fenolnih grupa glukuronidacijom ili metilovanjem (Lemańska i sar., 2004; Pollard i sar., 2006).

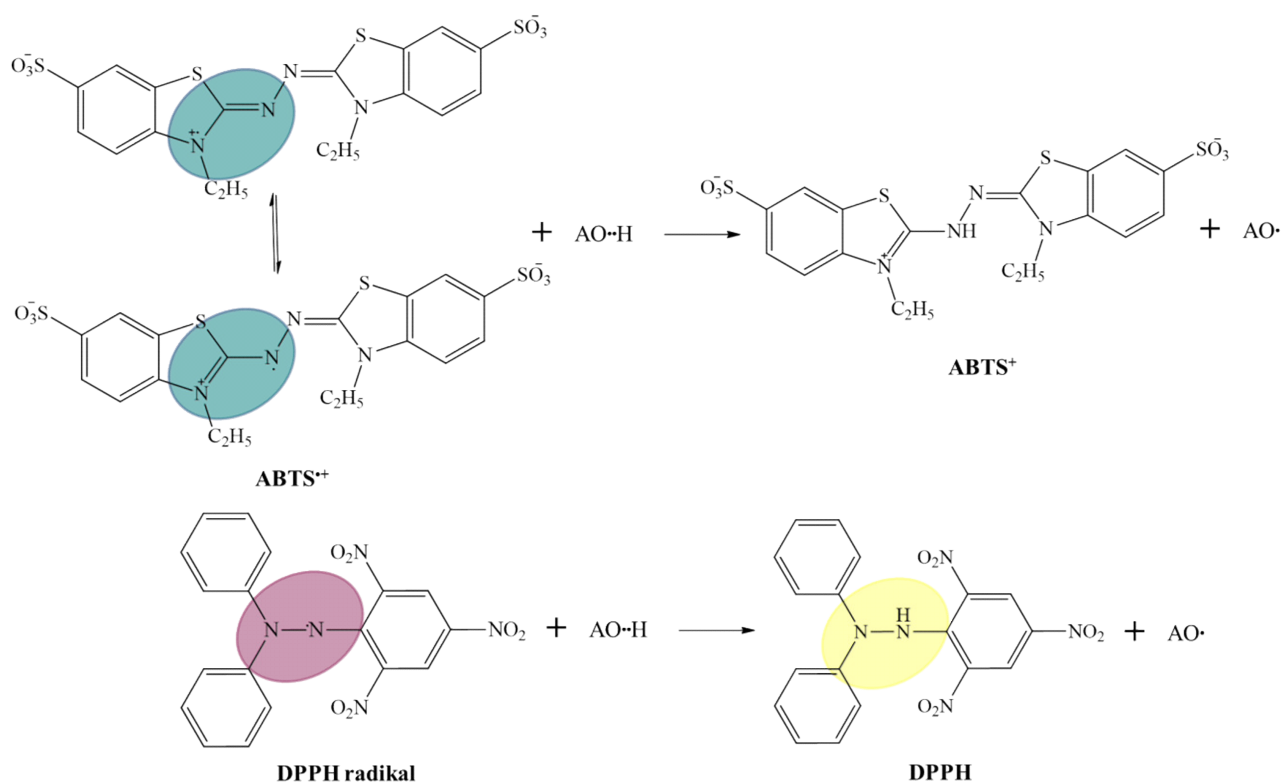
In vitro ispitivanje antioksidantne aktivnosti izolata biljnog porekla najčešće se sprovodi spektrofotometrijskim metodama koje se zasnivaju na: transferu vodonikovog atoma (engl. *hydrogen atoms transfer* - HAT; ispituje se sposobnost antioksidanasa da neutrališu slobodne radikale doniranjem vodonika), u koje spadaju ORAC (engl. *Oxygen Radical Absorbance Capacity*), TRAP (engl. *Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter*), 2-dezoksiriboza i β -karoten-linolna kiselina testovi; kao i na transferu jednog elektrona (engl. *single electron transfer* - SET; ispituje se sposobnost antioksidanasa da redukuju jone metala i stabilizuju slobodne radikale doniranjem jednog elektrona), u koje spadaju FRAP i CUPRAC testovi. Takođe, postoje i metode koje se zasnivaju na mešovitom (HAT/SET) mehanizmu, kao što su ABTS, DPPH i DMPD (N,N-dimetil-p-fenilendiamin dihidrohlorid) testovi (Apak i sar., 2016a, 2016b; Dmitrić Marković i sar., 2014; Prieto i sar., 2015; Sadeer i sar., 2020). Na **Slici 73** prikazan je mehanizam antioksidantnog delovanja polifenola na primeru luteolina i slobodnog peroksidnog radikala, u HAT, odnosno SET metodama (Liang i Kitts, 2014). Koji od ova dva navedena puta neutralizacije slobodnog peroksidnog radikala će biti dominantno zastupljen u testovima koji se zasnivaju na oba mehanizma, zavisi od prirode antioksidanasa, rastvarača i pH vrednosti reakcione smeše (upotreba jonizujućih rastvarača i bazna sredina potencijalno transfer vodonikovog atoma) (Li i Pratt, 2015; Niki, 2010).

U okviru ove doktorske disertacije ispitana je antioksidantna aktivnost suvih MeOH ekstrakata herbi 28 vrsta roda *Hieracium*, primenom metoda koje se zasnivaju na svim gore pomenutim mehanizmima. Određena je ukupna antioksidantna aktivnost ekstrakata FRAP i CUPRAC testovima i njihova sposobnost da neutrališu slobodne radikale DPPH, ABTS i 2-dezoksiriboza testom. Rezultati su upoređivani sa sadržajem ukupnih polifenola određenim uz korišćenje FC reagensa. FRAP i CUPRAC testovi se zasnivaju na evaluaciji sposobnosti komponenti ekstrakata da redukuju jone metala Fe^{3+} i Cu^{2+} , merenjem promene apsorbancije nastalih stabilnih kompleksa Fe(II)-TPTZ, odnosno Cu(I)-neokuproin. U ABTS testu plavo obojeni $ABTS^{\cdot+}$ katjon nastaje oksidacijom 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske kiseline (ABTS) kalijum persulfatom i u reakciji sa antioksidansima prima vodonikov atom/elektron prelazeći u bezbojni katjon. DPPH test se prevashodno zasniva na HAT mehanizmu, ali u zavisnosti od prirode antioksidanasa i uslova

reakcije, neutralizacija se može postići i transferom elektrona (Niki, 2010). 2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH[•]) je stabilan ljubičasto obojen radikal sa nesparenim elektronom koji u reakciji sa antioksidansima prelazi u žuto obojen redukovani oblik (Slika 74).



Slika 73. Mehanizam neutralizacije slobodnih radikala prenosom elektrona (SET) i vodikovog atoma (HAT) na primeru luteolina i peroksidnog radikala (ROO[•]).



Slika 74. Mehanizam neutralizacije DPPH[•] i ABTS^{•+} katjon radikala.

U 2-dezoksiriboza testu antioksidansi neutrališu [•]OH radikal, koji nastaje u Fentonovoj reakciji, transferom vodikovog atoma. Njihov antiradikalski potencijal određuje se spektrofotometrijski, merenjem promene boje kompleksa tiobarbiturine kiseline i malonilaldehda koji nastaje degradacijom 2-dezoksiriboze u prisustvu nagrađenih [•]OH radikala. Rezultati navedenih ispitivanja prikazani su u **Tabeli 41**.

Tabela 41. Sadržaj ukupnih polifenola (SUP), ukupni antioksidantni potencijal (FRAP i CUPRAC) i sposobnost neutralizacije slobodnih radikala (DPPH^{*}, ^{*}OH i ABTS⁺⁺) ispitivanih suvih MeOH ekstrakata (SE) 28 vrsta roda *Hieracium*

Ekstrakt / pozitivna kontrola	SUP	FRAP	CUPRAC	DPPH [*]	[*] OH	ABTS ⁺⁺
	mg GAE/g SE ± SD	mmol Fe ²⁺ /g SE ± SD	mmol Trolox/g	SC ₅₀ (µg/mL)	SC ₅₀ (µg/mL)	SC ₅₀ (µg/mL)
<i>H. gymnocephalum</i>	67,56 ± 0,32 ^a	1,17 ± 0,19	2,07	34,39	22,88	9,47
<i>H. orieni</i>	76,65 ± 0,21	1,24 ± 0,08	1,92	35,28	18,24	11,60
<i>H. bleicicii</i>	82,39 ± 0,65	1,35 ± 0,21	2,94	30,44	16,06	9,16
<i>H. paratrichum</i>	78,28 ± 0,19	1,29 ± 0,15	2,86	34,48	21,76	8,08
<i>H. spirocaule</i>	62,03 ± 0,11	1,16 ± 0,22	1,89	38,88	22,48	9,75
<i>H. anastrum</i>	74,58 ± 0,22	1,21 ± 0,18	1,75	41,37	18,69	9,67
<i>H. calophyllum</i>	60,27 ± 0,17	1,12 ± 0,11	1,80	42,28	23,54	13,02
<i>H. scheppigianum</i>	71,08 ± 0,20	1,20 ± 0,16	2,72	33,19	17,80	9,54
<i>H. durmitoricum</i>	75,93 ± 0,15	1,24 ± 0,09	2,07	31,81	17,67	10,41
<i>H. guentheri-beckii</i>	88,62 ± 0,44	1,39 ± 0,25	3,04	27,26	15,65	8,07
<i>H. mirificissimum</i>	105,12 ± 0,32	2,09 ± 0,38	3,40	21,36	14,85	8,51
<i>H. coloriscapum</i>	71,64 ± 0,23	1,17 ± 0,18	2,71	38,94	19,95	10,40
<i>H. pyricephalum</i>	71,43 ± 0,58	1,19 ± 0,20	2,27	40,17	22,94	10,62
<i>H. mokragorae</i>	54,62 ± 0,33	1,03 ± 0,18	1,53	60,00	n.p.	18,74
<i>H. pannosum</i> s.l.	57,11 ± 0,28	1,05 ± 0,07	1,96	56,60	24,45	16,77
<i>H. plumulosum</i>	71,15 ± 0,56	1,19 ± 0,23	2,48	39,26	n.p. ^b	11,29
<i>H. albopellitum</i>	70,29 ± 0,42	1,18 ± 0,14	1,20	40,82	n.p.	13,45
<i>H. pseudoschenkii</i>	70,04 ± 0,65	1,20 ± 0,20	2,87	33,95	21,65	8,21
<i>H. villosum</i>	81,71 ± 0,35	1,41 ± 0,21	1,72	39,19	23,59	11,23
<i>H. pilosum</i>	101,23 ± 1,11	1,67 ± 0,32	3,13	29,59	18,01	8,12
<i>H. glabratum</i>	168,85 ± 0,89	2,65 ± 0,19	3,33	14,20	12,11	5,58
<i>H. scorzonifolium</i>	68,92 ± 0,36	1,17 ± 0,10	1,81	40,84	23,68	12,13
<i>H. dentatum</i> s.l.	75,80 ± 0,62	1,22 ± 0,11	2,01	33,31	22,97	10,25
<i>H. valdepilosum</i> s.l.	69,22 ± 0,18	1,20 ± 0,19	2,95	35,06	20,58	9,22
<i>H. neilreichii</i>	70,75 ± 0,22	1,21 ± 0,05	1,93	35,92	23,96	10,81
<i>H. naegelianum</i>	102,30 ± 0,73	1,96 ± 0,25	3,25	20,19	15,18	6,84
<i>H. tommasinianum</i>	59,76 ± 0,48	1,05 ± 0,03	1,75	56,82	n.p.	16,72
<i>H. macrodontoides</i>	99,28 ± 0,52	1,52 ± 0,19	3,19	30,65	18,06	8,93
Askorbinska kiselina	-	13,13 ± 0,77	-	3,51	-	-
Kvercetin	-	-	-	-	3,10 ^c	2,32

^aRezultati prikazani u tabeli predstavljaju srednju vrednost tri nezavisna određivanja. ^bn.p. – ekstrakt nije postigao 50% inhibicije ^{*}OH radikala u opsegu testiranih koncentracija 1,3-25 µg/mL. ^cPodatak preuzet iz Kukić i sar. (2006).

MeOH ekstrakti herbi *H. glabratum*, *H. mirificissimum*, *H. naegelianum*, *H. pilosum* i *H. macrodontoides* imali su najveći sadržaj ukupnih polifenola; kretao se u opsegu 99,28-168,85 mg GAE/g suvog ekstrakta. Ovi ekstrakti su pokazali i relativno visok ukupni antioksidantni potencijal u FRAP i CUPRAC testovima. U oba testa najpotentniji su bili MeOH ekstrakti herbi *H. glabratum* i *H. mirificissimum* sa FRAP vrednostima 2,65 i 2,09 mmol Fe²⁺/g suvog ekstrakta i CUPRAC vrednostima 3,33 i 3,40 mmol Trolox/g suvog ekstrakta. Najnižu FRAP vrednost ispoljio je MeOH ekstrakt *H. mokragorae* (1,03 mmol Fe²⁺/g suvog ekstrakta), kod koga je zabeležen i najniži sadržaj ukupnih polifenola (54,62 mg GAE/g suvog ekstrakta), dok je *H. albopellitum*, iako sa nešto većim sadržajem ukupnih polifenola (70,29 mg GAE/g suvog ekstrakta) pokazao najnižu aktivnost u CUPRAC testu (1,20 mmol Trolox/g suvog ekstrakta).

U DPPH testu svi ispitivani ekstrakti su pokazali koncentraciono zavisnu neutralizaciju DPPH^{*} radikala, u rasponu koncentracija 10-120 µg/mL, uz zadovoljavajuću linearnost ($r^2=0,9938-0,9999$). MeOH ekstrakti *H. glabratum*, *H. naegelianum* i *H. mirificissimum* pokazali su najsnažniju anti-DPPH aktivnost, sa $SC_{50}=14,20-21,36$ µg/mL. Ovi rezultati su u skladu sa njihovim značajno visokim ukupnim antioksidantnim potencijalom i sadržajem polifenola. Aktivnost ostalih ekstrakata se kretala do $SC_{50}=60,00$ µg/mL u slučaju ekstrakta *H. mokragorae*, koji je imao i najniži sadržaj ukupnih polifenola (54,62 mg GAE/g suvog ekstrakta).

Što se tiče sposobnosti neutralizacije slobodnih ^{*}OH radikala (u 2-dezoksiriboza testu), ekstrakti koji su postigli 50% inhibicije ($SC_{50}=12,11-24,45$ µg/mL) ispoljili su snažan koncentraciono zavisni efekat u rasponu koncentracija 1,3-25 µg/mL. Kao i u slučaju anti-DPPH aktivnosti, primećena je najjača aktivnost ekstrakata *H. glabratum*, *H. mirificissimum* i *H. naegelianum* sa $SC_{50}=12,11-15,18$ µg/mL. Uočeno je da se efekat smanjivao sa povećanjem koncentracije ekstrakata, prilikom testiranja koncentracija većih od 25 µg/mL. To se može objasniti prooksidativnim efektom nekih sastojaka ekstrakata, što je i ranije pokazano (Kukić i sar., 2006).

Kao i u slučaju ispitivanja sposobnosti neutralizacije DPPH^{*} radikala, ekstrakti su pokazali koncentraciono zavisnu aktivnost prema ABTS⁺⁺ katjonskom radikal (u rasponu koncentracija od 4-60 µg/mL). MeOH ekstrakti *H. glabratum* i *H. naegelianum* pokazali su najveću anti-ABTS aktivnost, sa $SC_{50}=5,58$, odnosno 6,84 µg/mL. Ostali ekstrakti su takođe ispoljili značajnu aktivnost i to u opsegu SC_{50} vrednosti od 8,07 µg/mL za *H. guentheri-beckii* do 18,74 µg/mL za *H. mokragorae*.

Generalno, sadržaj ukupnih polifenola i pokazana antioksidantna aktivnost MeOH ekstrakata herbi ispitivanih vrsta roda *Hieracium* bili su u korelaciji. Značajno je istaći da je i sadržaj pojedinih flavonoida i fenolkarboksilnih kiselina uticao na rezultate ispitivanja antioksidantnog potencijala. Među jedinjenjima identifikovanim u ispitivanim ekstraktima, najbolja antiradikalna aktivnost prethodno je pokazana za 3,5-di-*O*-kafeoilhina kiselinu (**8**, $SC_{50}=2,62$ µg/mL prema DPPH^{*}), luteolin (**28**, $SC_{50}=2,17$ µg/mL prema DPPH^{*} i 2,60 µg/mL prema ABTS⁺⁺), apigenin (**30**, $SC_{50}=2,70$ µg/mL prema DPPH^{*}) i kvercetin 3-*O*-glukozid (**19**, $SC_{50}=5,18$ µg/mL prema DPPH^{*} i 3,80 µg/mL prema ABTS⁺⁺) (Yener i sar., 2020; Zheleva-Dimitrova i sar., 2017). Sposobnost ovih jedinjenja da neutrališu slobodne radikale najviše zavisi od polifenolne strukture molekula. Za flavonoide je uočeno da antioksidantna sposobnost raste sa povećanjem broja fenolnih grupa, a naročito ako su u molekulu prisutne slobodne 7-OH grupa prstena A, kao i 3'- i 4'-OH grupe prstena B (Cheng i Breen, 2000). Glikozilacijom i *O*-metilovanjem blokiraju se fenolne grupe i time se smanjuje njihova sposobnost da učestvuju u transportu elektrona i vodonika ili da heliraju jone metala (Lemańska i sar., 2004; Pollard i sar., 2006). Na ovaj način može se objasniti nešto niža sposobnost luteolin 7-*O*-glukozida (**16**) da inhibira DPPH^{*} radikal ($SC_{50}=3,85$ µg/mL) u odnosu na aglikon (kod glukozida slobodne su 3' i 4'-OH grupe prstena B), kao i značajno niže aktivnosti apigenina i njegovog 7-*O*-glukozida prema ABTS⁺⁺radikal (**30**, $SC_{50}=6,78$ µg/mL; **23**, $SC_{50}=6,88$ µg/mL) odnosno 7-*O*-glukuronida prema DPPH^{*} radikal (**25**, $SC_{50}=111,58$ µg/mL) (Li i sar., 2018; Yener i sar., 2020), koji u strukturi imaju slobodnu samo 4'-OH grupu prstena B.

U skladu sa tim, mogu se objasniti neki izuzeci u odnosima ispoljenih antioksidantnih aktivnosti i sadržaja ukupnih polifenola. Naime, ekstrakti *H. gymnocephalum*, *H. durmitoricum* i *H. bleicii* imali su niži sadržaj ukupnih polifenola (67,56-82,39 mg GAE/g suvog ekstrakta) u odnosu na ekstrakt *H. macrodontoides* (99,28 mg GAE/g suvog ekstrakta), a sva ova četiri ekstrakta pokazala su međusobno sličnu aktivnost u DPPH, ABTS i dezoksiriboza testu. Ova odstupanja mogu se barem delom objasniti većim sadržajem aglikona luteolina u ekstraktima *H. bleicii*, *H. durmitoricum* i *H. gymnocephalum* (2,11-3,88 mg/g suvog ekstrakta) u odnosu na ekstrakt *H. macrodontoides* (luteolin prisutan u tragovima, tj. <0,01 mg/g suvog ekstrakta) (Tabela 32 u odeljku 1.2.2).

Prethodno je ispitivan antioksidantni potencijal suvih polarnih ekstrakata četiri vrste roda *Hieracium*. Ispitivani su MeOH ekstrakti korena, cvasti i listova *H. pannosum*. Uprkos visokom sadržaju ukupnih polifenola od 172,98 (koren), 147,52 (cvast) i 144,25 (list) mg GAE/g suvog ekstrakta, ova tri ekstrakta pokazala su umerenu do slabu sposobnost neutralizacije ABTS⁺⁺ (SC_{50}

vrednosti 0,101; 0,258; 0,240 mg/mL) i DPPH• radikala (SC₅₀ vrednosti 0,455; 0,767; 0,776 mg/mL) (Gökbulut i sar., 2017). MeOH (80%, V/V) ekstrakti korena i herbe *H. bornmuelleri* pokazali su umerenu sposobnost neutralizacije DPPH• radikala (SC₅₀ vrednosti 0,461 mg/mL i 0,939 mg/mL), uporedivu sa propilgalatom kao pozitivnom kontrolom (SC₅₀=0,491 mg/mL). Pokazana aktivnost bila je značajno slabija u odnosu na MeOH ekstrakte ispitivane u okviru ove disertacije, što se može objasniti veoma niskim sadržajem detektovanih polifenola u ekstraktima *H. bornmuelleri*; količina hlorogenske kiseline bila je 2,37 mg/g (koren) i 1,27 mg/g (herba), a količina apigenina 4,21 µg/g (herba). Dodatno je za ove ekstrakte ispitana i sposobnost inhibicije lipidne peroksidacije TBARS testom. MeOH ekstrakt korena pokazao je nešto značajniju aktivnost (24,56 nmol MDA/mL) u odnosu na ekstrakt herbe (37,74 nmol MDA/mL) (Bakar i sar., 2015). MeOH ekstrakt herbe *H. cappadocicum* pokazao je koncentraciono zavisnu neutralizaciju DPPH• radikala (SC₅₀=30 µg/mL), uporedivu sa aktivnošću MeOH ekstrakata ispitivanih u okviru ove disertacije. Isti ekstrakt je u koncentraciji od 0,7 mg/mL pokazao značajnu sposobnost inhibicije oksidacije linolne kiseline (55,1%) u kolorimetrijskom β-karoten-linolna kiselina testu (Tepe i sar., 2006). Za MeOH ekstrakt listova *H. waldsteinii*, sa sadržajem ukupnih polifenola od 55,11 µg/mL i flavonoida od 133,04 µg/mL, takođe je pokazana sposobnost neutralizacije radikala u DPPH testu (SC₅₀=0,515 mg/mL) i ABTS testu (SC₅₀=2,27 mg/mL) i određen ukupni antioksidantni potencijal (FRAP vrednost 0,411 mmol Fe²⁺/g) (Janačković i sar., 2018).

Nepolarni ekstrakti su u pogledu antioksidantne aktivnosti slabije ispitivani. Suvi CH₂Cl₂ ekstrakt herbe *H. gymnocephalum* je u odnosu na polarne ekstrakte ispoljio slabiju koncentraciono zavisnu neutralizaciju radikala u DPPH testu (SC₅₀=60 mg/mL), a takođe je pokazao slabu sposobnost inhibicije lipidne peroksidacije u lipozomima (12,9%) pri maksimalnoj testiranoj koncentraciji 10% (m/V) (Petrović i sar., 2008).

U okviru ove doktorske disertacije po prvi put je ispitivana antioksidantna aktivnost suvih MeOH ekstrakata herbi odabranih 28 vrsta roda *Hieracium*. Ustanovljen antioksidantni potencijal bio je u skladu sa hemijskim sastavom ovih ekstrakata i može se zaključiti da svih 28 vrsta predstavljaju nove izvore jedinjenja (fenolkarboksilnih kiselina i flavonoida) koja su poznati snažni antioksidansi.

2.2. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti odabranih MeOH i CH₂Cl₂ ekstrakata herbi i izolovanih metabolita

Infektivne bolesti predstavljaju jedan od glavnih problema sa kojima se savremena medicina suočava poslednjih nekoliko decenija (Kuete i sar., 2007). Mikroorganizmi koji u humanoj populaciji izazivaju infekcije kardiovaskularnog, respiratornog i urogenitalnog sistema, kao i infekcije i trovanja hranom, razvili su rezistenciju na širok spektar antimikrobnih lekova (WHO, 2016). Struktura sekundarnih metabolita biljaka iz klasa flavonoida, fenolkarboksilnih kiselina, seskviterpenskih laktona i triterpena razlikuje se od standardnih antibiotika i antimikotika. Kao takva, ova jedinjenja najverovatnije neće pokazivati unakrsnu rezistenciju ili će biti potrebno više vremena da se pojave rezistentni sojevi (Chung, 2020). Iz tog razloga skrining antimikrobne aktivnosti proizvoda poreklom iz biljnih izvora jedan je od značajnih pristupa u rešavanju aktuelnog problema rezistencije mikroorganizama.

U okviru ove doktorske disertacije *in vitro* je ispitana antimikrobna aktivnost odabranih izolata vrsta roda *Hieracium* bujon mikrodilucionom metodom (Espinel-Ingroff, 2001; CLSI, 2009). Ispitivanje je obuhvatilo suve ekstrakte odabrane na osnovu njihovog hemijskog sastava, i to CH₂Cl₂ ekstrakt herbe *H. scheppegianum* i MeOH ekstrakte herbi pet vrsta: *H. calophyllum*, *H. coloriscapum*, *H. valdepilosum*, *H. pseudoschenkii* i *H. glabratum*. Odabrani CH₂Cl₂ ekstrakt se karakteriše visokim sadržajem ukupnih triterpena. Svi odabrani MeOH ekstrakti su bogati polifenolima (najveći sadržaj ukupnih polifenola određen je za *H. glabratum*). Ekstrakte *H. calophyllum*, *H. coloriscapum* i *H. valdepilosum* karakteriše dodatno i visok sadržaj ukupnih seskviterpenskih laktona (dominantan je krepizid E, **4**), a ekstrakt *H. pseudoschenkii* umereno visok sadržaj ukupnih seskviterpenskih laktona (dominantan je 8-epi-ikserisamin A, **3**). Takođe,

ispitivana je i antimikrobna aktivnost 8-epi-ikserisamina A i krepizida E, koji su izolovani iz MeOH ekstrakta cvasti *H. calophyllum*.

Antibakterijska aktivnost ispitivana je prema standardnim sojevima po tri vrste Gram-pozitivnih (*Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* i *Micrococcus flavus*) i Gram-negativnih bakterija (*Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* i *Pseudomonas aeruginosa*), kao i prema kliničkim izolatima po jedne vrste Gram-pozitivne (*Bacillus cereus*) i Gram-negativne bakterije (*Enterobacter cloacae*). Antifungalna aktivnost ispitivana je prema standardnim sojevima šest vrsta plesni (*Aspergillus versicolor*, *A. ochraceus*, *A. niger*, *Trichoderma viride*, *Penicillium funiculosum*, *P. ochrochloron*) i jedne vrste kvasnice (*Candida albicans*), zatim prema kliničkim izolatima po jedne vrste plesni (*A. fumigatus*) i kvasnice (*C. krusei*), kao i prema izolatu iz hrane jedne vrste plesni (*P. verrucosum* var. *cyclopium*). Aktivnost ekstrakata ispitivana je prema svim navedenim mikroorganizmima, dok je aktivnost seskviterpenskikh laktona testirana prema dve bakterije (*B. cereus* i *M. flavus*) i četiri mikromicete (*A. ochraceus*, *P. funiculosum*, *C. albicans* i *C. krusei*).

Gram-pozitivne bakterije *S. aureus*, *B. cereus*, *L. monocytogenes* i *M. flavus*, kao i Gram-negativne bakterije *S. typhimurium* i *E. coli* poznati su kontaminanti namirnica. *Staphylococcus aureus* i *B. cereus* proizvode enterotoksine i izazivaju intoksikaciju hranom (Adams i Moss, 2008; Chin, 2000; Martinović i sar., 2016). *Listeria monocytogenes* i *S. typhimurium* unose se hranom i izazivaju infekciju gastrointestinalnog trakta uzrokujući invaziju enterocita (FAO/WHO, 2004; Pan i Yu, 2014), dok *M. flavus* (uglavnom kontaminant namirnica životinjskog porekla) može izazvati oportunističke infekcije (Nuñez, 2014). Sojevi *E. coli* mogu biti enterotoksični ili enteroinvazivni. Izazivaju intoksikaciju ili infekciju nakon sekundarne kontaminacije hrane (Adams i Moss, 2008). Pored gastrointestinalnih poremećaja, *E. coli* je značajan izazivač urinarnih infekcija, a *S. aureus* respiratornih, kardiovaskularnih, urinarnih, kao i infekcija kože, ušiju i očiju (CDC, 2019; David i Daum, 2017). *Listeria monocytogenes* pored gastroenteritisa (neinvazivna listerioza) može uzrokovati i razvoj meningitisa (invazivna listerioza) (FAO/WHO, 2004; Ray i Bhunia, 2014). Gram-negativne bakterije *P. aeruginosa* i *E. cloacae* poznati su uzročnici nozokomijalnih (intra-hospitalnih) infekcija (pneumonije, postoperativne urinarne infekcije i sepse; CDC, 2019; Mezzatesta i sar., 2012).

Pored većine navedenih bakterija, značajan doprinos na polju neispravnosti namirnica imaju i gljive. Plesni najčešće kontaminiraju namirnice životinjskog porekla ili zaostaju u namirnicama poreklom od žitarica usled neadekvatne tehnologije izrade (Ray i Bhunia, 2014). Pored toga, često su prisutne u životnom i radnom okruženju ljudi (CDC, 2020), a udisanje njihovih spora može dovesti do alergijskih reakcija. Plesni koje pripadaju rodovima *Penicillium* i *Aspergillus* u pogodnom okruženju (uključujući i hranu) proizvode mikotoksine. Neki od ovih mikotoksina mogu ispoljiti imunosupresivni, hepatotoksični, nefrotoksični, neurotoksični, mutageni, kancerogeni ili teratogeni efekat (Ray i Bhunia, 2014).

Rezultati ispitivanja antimikrobne aktivnosti odabranih ekstrakata i izolovanih seskviterpenskikh laktona sprovedenih u okviru ove doktorske disertacije izraženi su kao minimalne inhibitorne koncentracije (MIK), minimalne baktericidne koncentracije (MBK), odnosno minimalne fungicidne koncentracije (MFK) i prikazani su u **Tabeli 42**.

Analizirani suvi ekstrakti su u testiranim koncentracijama izazvali inhibiciju rasta svih testiranih sojeva bakterija i mikromiceta. Najbolju antibakterijsku aktivnost ispoljili su CH₂Cl₂ ekstrakt *H. schepigianum* i MeOH ekstrakti *H. calophyllum*, *H. valdepiosum* i *H. coloriscapum* na ukupno četiri bakterije, dve Gram-negativne (*S. typhimurium* i *P. aeruginosa*) i dve Gram-pozitivne (*B. cereus* i *L. monocytogenes*). Prema *S. typhimurium*, CH₂Cl₂ ekstrakt *H. schepigianum* je ispoljio najbolju aktivnost (MIK=1,68 mg/mL; MBK=3,36 mg/mL), dok su MeOH ekstrakti *H. calophyllum*, *H. valdepiosum* i *H. coloriscapum* pokazali dvostruko do trostruko slabiju aktivnost (MIK vrednosti 2,52; 3,4; 4,96 mg/mL; MBK vrednosti 5,04; 6,8; 9,92 mg/mL). Prema *P. aeruginosa*, MeOH ekstrakt *H. calophyllum*, CH₂Cl₂ ekstrakt *H. schepigianum* i MeOH ekstrakt *H. valdepiosum* ispoljili su značajnije aktivnosti (MIK vrednosti 2,52; 3,36; 3,4 mg/mL; MBK vrednosti 5,04; 6,72; 6,8 mg/mL).

Tabela 42. Antimikrobna aktivnost odabranih ekstrakata vrsta roda *Hieracium* i izolovanih seskviterpenskih laktona

Izolat/ pozitivna kontrola		Antibakterijska aktivnost (mg/mL)									Antifungalna aktivnost (mg/mL)									
		<i>S.a.</i>	<i>B.c.</i>	<i>L.m.</i>	<i>M.f.</i>	<i>S.t.</i>	<i>E.c.</i>	<i>En.cl.</i>	<i>P.a.</i>		<i>A.f.</i>	<i>A.n.</i>	<i>A.o.</i>	<i>A.v.</i>	<i>T.v.</i>	<i>P.f.</i>	<i>P.v.c.</i>	<i>P.o.</i>	<i>C.a.</i>	<i>C.k.</i>
SCH	MIK	13,4	9,92	6,7	9,92	1,68	13,4	13,4	3,36	MIK	6,7	13,4	6,7	13,4	6,7	6,7	6,7	6,7	2,48	4,96
	MBK	26,8	19,84	13,4	19,84	3,36	26,8	26,8	6,72	MFK	13,4	26,8	13,4	26,8	13,4	13,4	13,4	13,4	4,96	9,92
CAL	MIK	10,08	15,15	20,16	15,15	2,52	20,16	10,08	2,52	MIK	10,08	20,16	10,08	10,08	5,04	10,08	10,08	10,08	3,74	7,48
	MBK	20,16	30,3	40,32	30,3	5,04	40,32	20,16	5,04	MFK	20,16	40,32	20,16	20,16	10,08	20,16	20,16	20,16	7,48	14,96
COL	MIK	19,84	14,68	4,96	14,68	4,96	9,92	4,96	19,84	MIK	4,96	19,84	4,96	9,92	4,96	9,92	9,92	9,92	3,67	7,34
	MBK	39,68	29,36	9,92	29,36	9,92	19,84	9,92	39,68	MFK	9,92	39,68	9,92	19,84	9,92	19,84	19,84	19,84	7,34	14,68
BUP	MIK	10	15	10	15	5	10	5	5	MIK	20	40	20	20	40	40	20	20	3,7	7,4
	MBK	20	30	20	30	10	20	10	10	MFK	40	80	40	40	80	80	40	40	7,4	14,8
VAL	MIK	13,6	5,04	3,4	10,08	3,4	6,8	6,8	3,4	MIK	3,4	6,8	3,4	3,4	6,8	13,6	6,8	6,8	2,52	5,04
	MBK	27,2	10,08	6,8	20,16	6,8	13,6	13,6	6,8	MFK	6,8	13,6	6,8	6,8	13,6	27,2	13,6	13,6	5,04	10,08
GLA	MIK	20	15	10	15	5	10	10	5	MIK	10	40	10	10	10	10	20	10	3,7	7,4
	MBK	40	30	20	30	10	20	20	10	MFK	20	80	20	20	20	20	40	20	7,4	14,8
3	MIK	-	>0,6	-	>0,6	-	-	-	-	MIK	-	-	>0,8	-	-	0,4	-	-	0,15	0,3
	MBK	-	>0,6	-	>0,6	-	-	-	-	MFK	-	-	>0,8	-	-	0,8	-	-	0,3	0,6
4	MIK	-	>0,6	-	>0,6	-	-	-	-	MIK	-	-	0,4	-	-	0,4	-	-	0,3	0,3
	MBK	-	>0,6	-	>0,6	-	-	-	-	MFK	-	-	0,8	-	-	0,8	-	-	0,6	0,6
STR	MIK	0,05	0,1	0,1	0,025	0,1	0,15	0,1	0,025	MIK	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
	MBK	0,1	0,2	0,2	0,05	0,2	0,3	0,2	0,05	MFK	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
AMP	MIK	0,1	0,1	0,15	0,1	0,3	0,15	0,1	0,1	MIK	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
	MBK	0,15	0,2	0,2	0,15	0,5	0,3	0,15	0,15	MFK	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
BIF	MIK	/	/	/	/	/	/	/	/	MIK	0,15	0,15	0,2	0,1	0,15	0,15	0,1	0,2	/	/
	MBK	/	/	/	/	/	/	/	/	MFK	0,2	0,2	0,25	0,2	0,2	0,2	0,2	0,25	/	/
KET	MIK	/	/	/	/	/	/	/	/	MIK	0,2	0,2	0,2	0,2	1	0,15	0,2	1	0,0031	0,0016
	MBK	/	/	/	/	/	/	/	/	MFK	0,5	0,5	0,5	0,3	1,5	0,2	0,5	1,5	0,0062	0,0032

Ekstrakti: suvi CH₂Cl₂ ekstrakti herbe *H. scheppigianum* (SCH) i suvi MeOH ekstrakti herbe *H. calophyllum* (CAL), *H. coloriscapum* (COL), *H. pseudoschenkii* (BUP), *H. valdepiosum* (VAL), *H. glabratum* (GLA). Standardni antibiotici: streptomycin (STR) i ampicilin (AMP). Jedinjenja: 8-epi-ikserisamin A (3) i krepizid E (4). Standardni antimikotici: bifonazol (BIF) i ketokonazol (KET). Mikroorganizmi: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Micrococcus flavus*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aspergillus fumigatus*, *A. niger*, *A. ochraceus*, *A. versicolor*, *Trichoderma viride*, *Penicillium funiculosum*, *P. verrucosum* var. *cyclopium*, *P. ochrochloron*, *Candida albicans*, *C. krusei*.

Prema *L. monocytogenes*, MeOH ekstrakti *H. valdepiiosum* i *H. coloriscapum* pokazali su značajnije aktivnosti (MIK vrednosti 3,4; 4,96 mg/mL; MBK vrednosti 6,8; 9,92 mg/mL), dok je prema *B. cereus* nešto izraženiju aktivnost pokazao samo MeOH ekstrakt *H. valdepiiosum* (MIK=5,04 mg/mL; MBK=10,08 mg/mL).

Svi ispitivani ekstrakti ispoljili su najbolju antifungalnu aktivnost prema *C. albicans* (MIK vrednosti 2,48-3,74 mg/mL; MFK vrednosti 4,96-7,48 mg/mL) i nešto slabiju aktivnost prema *C. krusei* (MIK vrednosti 4,96-7,48 mg/mL; MFK vrednosti 9,92-14,96 mg/mL). Treba istaći da je MeOH ekstrakt *H. valdepiiosum*, koji je bio među najboljim inhibitorima rasta *C. albicans* (MIK=2,52 mg/mL; MFK=5,04 mg/mL), ispoljio i najznačajniju aktivnost prema još tri soja mikromiceta: *A. fumigatus*, *A. ochraceus* i *A. versicolor* (MIK=3,4 mg/mL; MFK=6,8 mg/mL).

Ustanovljena antimikrobna aktivnost ispitivanih ekstrakata u skladu je sa njihovim hemijskim sastavom. Suvi CH₂Cl₂ ekstrakt *H. scheppigianum* karakteriše se prisustvom triterpena, α - i β -amirina, njihovih acetata i lupeol-acetata (**31-35**; dominantan α -amirin, 81,02 mg/g suvog ekstrakta). Od navedenih jedinjenja, do sada je za smešu α - i β -amirina (1:2) pokazana aktivnost prema *C. albicans* (MIK=0,125 mg/mL) i posebno prema *C. krusei* (MIK=0,03 mg/mL). Smeša α - i β -amirin-acetata je takođe bila aktivna prema *C. krusei* (MIK=0,125 mg/mL) i *C. albicans* (MIK=0,250 mg/mL) (Johann i sar., 2007), dok je α -amirin pokazao slabiju aktivnost prema bakterijama *S. aureus*, *S. typhimurium* i *E. coli* (MIK=0,37 mg/mL; MBK=0,75 mg/mL) (Ekalu i sar., 2019). Za pentaciklične triterpene utvrđeno je da ispoljavaju antimikrobno delovanje tako što narušavaju funkcije ćelijske membrane i utiču na deobu bakterijskih ćelija, kao i na biosintezu masnih kiselina, peptidoglikana i nukleinskih kiselina mikroorganizama (Chung, 2020).

Suvi MeOH ekstrakti *H. calophyllum*, *H. coloriscapum* i *H. valdepiiosum*, koji su generalno pokazali najbolju antimikrobnu aktivnost, bili su kvalitativno i kvantitativno slični i imali su visok sadržaj ukupnih polifenola (flavonoida i fenolkarboksilnih kiselina) i seskviterpenskih laktona (prvenstveno krepizida E). Za pojedine od ovih polifenola pokazana je antimikrobna aktivnost u prethodnim studijama. Luteolin 7-O-glukozid, dominantno jedinjenje u sva tri ekstrakta (**16**, 22,95-35,19 mg/g suvog ekstrakta), prethodno je pokazao aktivnost u mikrodilucionom testu prema tri soja bakterija *S. typhimurium*, *E. coli* (MIK=0,1 mg/mL; MBK=0,1 mg/mL) i *S. aureus* (MIK=0,15 mg/mL; MBK=0,2 mg/mL), i prema pet sojeva plesni *T. viride* (MIK=0,05 mg/mL; MFK=0,1 mg/mL), *A. niger*, *A. ochraceus*, *P. funiculosum* i *P. ochrochloron* (MIK=0,1 mg/mL; MFK=0,1 mg/mL) (Kukić i sar., 2008). Flavonoidi, generalno, svoje antimikrobno delovanje ostvaruju uticajem na ćelijsku membranu mikroorganizama, tako što se ugrađuju u njen lipidni dvosloj (manje polarni flavonoidi) ili grade vodonične veze sa strukturama na njenoj površini (polarniji flavonoidi) i na taj način menjaju njenu permeabilnost. Takođe inhibiraju sintezu nukleinskih kiselina i sprečavaju formiranje biofilma (Górniak i sar., 2019; Xie i sar., 2015). Poznati su antioksidansi, stoga se smatra da i smanjenjem produkcije ROS mogu uticati na rast mikroorganizama (Smiljković i sar., 2017). Antimikrobni efekat ove klase polifenola zavisi od prisustva fenolnih grupa u njihovoj strukturi. Njihovo supstituisanje (npr. O-metilovanje fenolne grupe u položaju 7) može smanjiti aktivnost flavonoida prema mikroorganizmima, što međutim ne mora biti slučaj i sa glikozilacijom (Farhadi i sar., 2019). Naime, primećeno je da apigenin 7-O-glukozid (**23**) pokazuje bolju antibakterijsku aktivnost prema *S. aureus* i *P. aeruginosa*, kao i antifungalnu aktivnost prema *C. albicans* u poređenju sa njegovim aglikonom (Mamadaliieva i sar., 2011).

Druga dva jedinjenja po zastupljenosti u ispitivanim MeOH ekstraktima bila su hlorogenska kiselina (**5**, 17,94-22,33 mg/g suvog ekstrakta) i 3,5-di-O-kafeoilhina kiselina (**8**, 7,95-22,26 mg/g suvog ekstrakta). U prethodnim ispitivanjima, hlorogenska kiselina je, kao i luteolin 7-O-glukozid, ispoljila aktivnost prema bakterijama *S. typhimurium*, *E. coli* (MIK=0,1 mg/mL; MBK=0,1 mg/mL) i *S. aureus* (MIK=0,15 mg/mL; MBK=0,2 mg/mL), i prema sojevima plesni *P. funiculosum*, *P. ochrochloron*, *T. viride* (MIK=0,05 mg/mL; MFK=0,1 mg/mL), *A. niger* i *A. ochraceus* (MIK=0,1 mg/mL; MFK=0,1 mg/mL) (Kukić i sar., 2008), dok je 3,5-di-O-kafeoilhina kiselina pokazala aktivnost prema bakterijama *S. aureus* i *P. aeruginosa* (MIK=0,2 mg/mL) i plesni *A. niger* (MIK=0,1 mg/mL) (Zhu i sar., 2004). Takođe, ove dve fenolkarboksilne kiseline značajno su inhibirale i rast kvasnice *C. albicans* (**5**, MIK=0,05 mg/mL; **8**, MIK=0,2 mg/mL) (Zhu i sar., 2004).

Odabrani izolovani seskviterpenski laktoni 8-epi-ikserisamin A (**3**) i krepizid E (**4**) u testiranim koncentracijama (0,013-0,6 mg/mL) nisu ispoljili aktivnost prema ispitivanim bakterijama, *B. cereus* i *M. flavus*. Sa druge strane, pokazali su antifungalnu aktivnost prema ispitivanim mikromicetama, *A. ochraceus*, *P. funiculosum*, *C. albicans* i *C. krusei* (osim u slučaju 8-epi-ikserisamina A prema *A. ochraceus*). MIK vrednosti su bile u opsegu od 0,15 mg/mL (za 8-epi-ikserisamin A prema *C. albicans*) do 0,4 mg/mL (za oba seskviterpenska laktona prema *P. funiculosum* i krepizid E prema *A. ochraceus*), a MFK u opsegu od 0,3 mg/mL (za 8-epi-ikserisamin A prema *C. albicans*) do 0,8 mg/mL (za oba jedinjenja prema *P. funiculosum* i krepizid E prema *A. ochraceus*). Konstatovano je da su jedinjenja pokazala bolju aktivnost na dve testirane vrste roda *Candida* u poređenju sa ispitivanim *Aspergillus* i *Penicillium* vrstama. 8-Epi-ikserisamin A bio je aktivniji prema *C. albicans* (MIK=0,15 mg/mL; MFK=0,3 mg/mL), dok su prema *C. krusei* jedinjenja ispoljila identičnu aktivnost (MIK=0,3 mg/mL; MFK=0,6 mg/mL). Može se zaključiti da, osim prisustvom polifenola, antifungalna aktivnost ispitivanih MeOH ekstrakata može da se objasni i prisustvom testiranih seskviterpenskih laktona.

Za krepizid E, prethodno izolovan iz nepolarnog ekstrakta (cikoheksan:Et₂O:H₂O 1:1:1, V/V/V) herbe *Crepis incana*, takođe je evaluirana antimikrobna aktivnost i to prema pet sojeva patogenih bakterija i šest sojeva mikromiceta. Zabeležena je značajna aktivnost jedinjenja prema Gram-negativnim bakterijama *Enterococcus faecalis* (MIK=0,02 mg/mL; MBK=0,03 mg/mL) i *P. aeruginosa* (MIK=0,03 mg/mL; MBK=0,06 mg/mL), Gram-pozitivnoj bakteriji *B. cereus* (MIK=0,06 mg/mL; MBK=0,12 mg/mL), i prema dva soja mikromiceta *A. versicolor* (MIK=0,045 mg/mL; MFK=0,3 mg/mL) i *T. viride* (MIK=0,045 mg/mL; MFK=0,3 mg/mL) (Barda i sar., 2018).

U hemijskom pogledu 8-epi-ikserisamin A predstavlja konjugat krepizida E (seskviterpenskog laktona gvajanolidne strukture) i aminokiseline prolin. S obzirom da su ova dva jedinjenja pokazala slične aktivnosti, moglo bi se zaključiti da aminokiselinski deo molekula 8-epi-ikserisamina A nema bitan uticaj na antimikrobnu aktivnost i da ista potiče od seskviterpenskog dela molekula. Naime, moguće je da u *in vitro* uslovima dolazi do otpuštanja prolina iz strukture 8-epi-ikserisamina A (prolin je u strukturi ovog jedinjenja prisutan na α položaju γ -laktona umesto metilenske grupe), tj. do njegovog prevođenja u krepizid E, koji u strukturi sadrži α -metilen- γ -laktonski prsten. Ova pretpostavka je u skladu sa SAR (engl. *Structure-Activity Relationship*) studijama u kojima je ustanovljeno da je za antimikrobno delovanje seskviterpenskih laktona gvajanolidne strukture značajno prisustvo egzociklične α -metilenske grupe na γ -laktonskom prstenu (kao što je to slučaj npr. kod hispidunolida A i B) (Cartagena i sar., 2008; Pickman, 1984). Značaj prisustva slobodne α -metilenske grupe na γ -laktonskom prstenu za ispoljavanje antimikrobne aktivnosti seskviterpenskih laktona ogleda se u činjenici da ovaj deo molekula Michael-ovom adicijom reaguje sa nukleofilnim grupama, tj. vrši alkilovanje komponenata ćelijske membrane i enzima mikroorganizama (Padilla-Gonzalez i sar., 2016). Do navedene degradacije 8-epi-ikserisamina A i oslobađanja krepizida E je upravo dolazilo u vodenoj sredini tokom NMR eksperimenata. Značajno je istaći da Woods (2013) strukture slične 8-epi-ikserisaminu A (tj. seskviterpenske laktone konjugovane sa aminokiselinama) posmatra kao *prodrug* oblike (u različitim *in vitro* testovima pokazali su aktivnost uporedivu sa aktivnošću seskviterpenskih laktona koji čine osnovu njihove strukture) i ističe značaj aminokiselinskog dela pošto bi on potencijalno mogao poboljšati farmakokinetičke karakteristike polaznog jedinjenja.

Što se tiče prethodno ispitivanih konjugata seskviterpenskih laktona i aminokiselina, centaureolida A i B, koji su izolovani iz MeOH ekstrakta cvasti *Centaurea pungenis*, ispoljili su antibakterijsku aktivnost prema Gram-pozitivnim bakterijama *B. cereus* (MIK vrednost 1 mg/mL) i *Listeria innocua* (0,4 i 1 mg/mL), kao i Gram-negativnim bakterijama *P. aeruginosa* (0,1 mg/mL) i *P. fragi* (0,4 i 1 mg/mL) (Labeled i sar., 2019).

Brojne aktivnosti, uključujući i antimikrobnu aktivnost, su ispitivane za dezacilcinaropikrin, jedinjenje koje predstavlja aglikon krepizida E. U agar difuzionom testu, dezacilcinaopikrin (1 mg/mL) je ispoljio antimikrobni efekat prema *E. coli* (9-10 mm) i *S. aureus* (16 mm). Testirana je i aktivnost prema drugim Gram-pozitivnim (*K. pneumoniae*) i Gram-negativnim (*P. aeruginosa*)

bakterijama, kao i prema kvasnici *C. albicans*, ali prema njima ovo jedinjenje nije ispoljilo antimikrobnu aktivnost (Ndom i sar., 2006).

U okviru ove doktorske disertacije antimikrobna aktivnost ekstrakata šest vrsta roda *Hieracium* i 8-epi-ikserisamina A ispitana je po prvi put, dok su postojeći podaci o aktivnosti krepizida E značajno upotpunjeni. Može se zaključiti da, iako su ispitivani izolati ispoljili slabu antimikrobnu aktivnost, dobijeni podaci predstavljaju značajan doprinos ispitivanju konjugata seskviterpenskih laktona sa prolinom kao potencijalnih *prodrug* oblika.

2.3. Ispitivanje citotoksične aktivnosti odabranih MeOH i CH₂Cl₂ ekstrakata herbi i izolovanih metabolita

Prema procenama Svetske zdravstvene organizacije (WHO, 2020), maligne bolesti su drugi vodeći uzrok prevremene smrti pre navršenih 70 godina života u visoko i srednje razvijenim zemljama (posle ishemijske bolesti srca). Prema podacima Međunarodne agencije za proučavanje raka (engl. *International Agency for Research on Cancer*, IARC) za 2020. god. najčešća maligna oboljenja u opštoj populaciji bila su rak pluća i dojke, a sledili su ih po zastupljenosti rak kolorektuma, prostate, želuca, jetre i grlića materice. Rak pluća je tokom 2020. god. ujedno bio vodeći uzrok smrti u onkoloških pacijenata, a sledili su ga po broju smrtnih slučajeva rak kolorektuma, jetre, želuca i dojke. Rak pluća je najčešće i najsmrtonosnije maligno oboljenje kod muškaraca, a rak dojke kod žena (Ferlay i sar., 2020).

Kao preliminarni korak u istraživanju novih onkoloških lekova, citotoksični potencijal supstanci sintetskog ili prirodnog porekla opsežno se ispituje već više od pola veka. Neka od jedinjenja (vinkristin, paklitaksel, aktinomycin D, mitomicin C i bleomicin) izolovana iz prirodnih izvora našla su primenu u savremenoj terapiji različitih vrsta raka (Huang i sar., 2021).

Metabolička aktivnost kao pokazatelj vijabilnosti ćelija uglavnom se procenjuje *in vitro* spektrofotometrijskim MTT testom. 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid (MTT reagens) zahvaljujući pozitivno naelektrisanom azotu lako prodire u viabilne eukariotske ćelije (Buttke i sar., 1993; Riss i sar., 2004-; Wang i sar., 2015) u kojima ga mitohondrijalne NAD(P)H-zavisne oksidoreduktaze redukuju do formazana uzrokujući promenu boje iz žute u ljubičastu. Količina vijabilnih ćelija određuje se spektrofotometrijski, merenjem apsorbancije na 500-600 nm (Mosmann, 1983). Pored MTT reagensa, kao indikatori rasta ćelija mogu se koristiti i druga tetrazolijum jedinjenja, kao što su MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2(4-sulfofenil)-2H-tetrazolijum), XTT (2,3-bis-(2-metoksi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolijum-5-karboksanilid) i WST-1 (2-(4-jodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolijum) (Buttke i sar., 1993; Riss i sar., 2004-).

U okviru ove doktorske disertacije MTT testom ispitana je citotoksična aktivnost istih izolata vrsta roda *Hieracium* za koje je ispitivana i antimikrobna aktivnost, tj. suvog CH₂Cl₂ ekstrakta herbe *H. scheppigianum*, zatim suvih MeOH ekstrakata herbi pet vrsta: *H. calophyllum*, *H. coloriscapum*, *H. pseudoschenkii*, *H. valdepilosum* i *H. glabratum* (odabranih na osnovu hemijskog sastava), kao i dva izolovana seskviterpenska laktona: 8-epi-ikserisamina A (**3**) i krepizida E (**4**).

Ekstrakti su testirani na tri tumorske ćelijske linije: HeLa (ćelijska linija karcinoma grlića materice), LS174 (ćelijska linija karcinoma debelog creva) i A549 (ćelijska linija nesitnoćelijskog karcinoma pluća), dok su izolovana jedinjenja testirana na tumorskoj ćelijskoj liniji HeLa. Selektivnost citotoksičnog efekta je i u slučaju ekstrakata i u slučaju jedinjenja testirana na normalnoj ćelijskoj liniji MRC-5 (ćelijska linija fetalnih fibroblasta pluća). Rezultati ispitivanja citotoksičnog efekta prikazani su u **Tabeli 43**.

Ispitivani ekstrakti ispoljili su citotoksični efekat prema svim testiranim ćelijskim linijama. Najbolju aktivnost na sve tri tumorske ćelijske linije pokazao je CH₂Cl₂ ekstrakt *H. scheppigianum*. Naj snažnije je delovao prema HeLa ćelijama (IC₅₀=148,12 µg/mL), dok je prema A549 i LS174 ćelijama ispoljio dvostruko slabiju aktivnost (IC₅₀ vrednosti 294,04 i 308,86 µg/mL), koja je bila slična aktivnosti na normalnu ćelijsku liniju MRC-5 (IC₅₀=249,81 µg/mL; ovaj efekat na normalne ćelije se može okarakterisati kao prihvatljiv; Boyd, 1997). Sposobnost ovog ekstrakta da inhibira

rast tumorskih ćelija može se bar delom objasniti prisustvom β -amirina (**31**; 10,40 mg/g suvog ekstrakta), koji je prethodno ispoljio aktivnost prema HeLa ćelijskoj liniji ($IC_{50}=19,72 \mu\text{g/mL}$). Takođe je utvrđeno da β -amirin ostvaruje ovaj efekat aktivacijom kaspaza. Sa druge strane, prema A549 ćelijama, aktivnost β -amirina, a takođe i lupeol-acetata (**34**) nije bila značajna (**31**, $IC_{50}>21,34 \mu\text{g/mL}$; **34**, $IC_{50}>23,44 \mu\text{g/mL}$) (Anburaj i sar., 2020; Cmoch i sar., 2008; Csapi i sar., 2010).

Tabela 43. Citotoksična aktivnost odabranih ekstrakata vrsta roda *Hieracium* i izolovanih seskviterpenskih laktona

Izolat / pozitivna kontrola	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)			
	HeLa	LS174	A549	MRC-5
SCH	148,12 \pm 10,80	308,86 \pm 15,88	294,04 \pm 10,45	249,81 \pm 19,88
CAL	162,66 \pm 5,44	585,60	739,77	819,09
COL	152,28 \pm 6,16	667,65	789,01	778,22
BUP	269,05 \pm 26,94	685,53	869,64	724,02
VAL	171,49 \pm 11,80	512,90	693,20	651,72
GLA	303,22 \pm 6,95	689,70	625,20	502,37
8-Epi-ikserisamin A (3)	≈ 100	-	-	129,61 \pm 0,55
Krepizid E (4)	46,19 \pm 0,54	-	-	92,23 \pm 4,13
Cisplatin	0,84 \pm 0,11	2,82 \pm 0,13	4,16 \pm 0,69	15,22 \pm 0,12

Ekstrakti: suvi CH_2Cl_2 ekstrakt herbe *H. scheppigianum* (SCH) i suvi MeOH ekstrakti herbe *H. calophyllum* (CAL), *H. coloriscapum* (COL), *H. pseudoschenkii* (BUP), *H. valdepilosum* (VAL), *H. glabratum* (GLA).

Generalno, MeOH ekstrakti su pokazali najbolju aktivnost prema HeLa ćelijskoj liniji (IC_{50} od 152,28 $\mu\text{g/mL}$ za ekstrakt *H. coloriscapum* do 303,22 $\mu\text{g/mL}$ za ekstrakt *H. glabratum*), zatim prema LS174 ćelijskoj liniji (IC_{50} od 512,90 $\mu\text{g/mL}$ za ekstrakt *H. valdepilosum* do 685,53 i 689,70 $\mu\text{g/mL}$ za ekstrakte *H. pseudoschenkii* i *H. glabratum*), dok je A549 ćelijska linija bila najrezistentnija (IC_{50} od 625,20 $\mu\text{g/mL}$ za ekstrakt *H. glabratum* do 869,64 $\mu\text{g/mL}$ za ekstrakt *H. pseudoschenkii*). Svi ovi ekstrakti su pokazali zadovoljavajuću selektivnost prema HeLa ćelijskoj liniji u odnosu na zdrave MRC-5 ćelije. Ekstrakti su zapravo slabo (Boyd, 1997) inhibirali rast ovih normalnih ćelija (IC_{50} od 502,37 $\mu\text{g/mL}$ za ekstrakt *H. glabratum* do 819,09 $\mu\text{g/mL}$ za ekstrakt *H. calophyllum*).

Za različite polifenole, koji su generalno dominantna klasa jedinjenja ispitivanih MeOH ekstrakata, prethodno je pokazana izvesna antiproliferativna aktivnost prema HeLa i A549 ćelijama. Na primer, luteolin 7-*O*-glukozid (**16**) i apigenin 7-*O*-glukozid (**23**) su ispoljili aktivnost prema HeLa ćelijskoj liniji (**16**, $IC_{50}=66,80 \mu\text{g/mL}$; **23**, $IC_{50}=59,60 \mu\text{g/mL}$) (Mamadaliyeva i sar., 2011), dok hlorogenska kiselina (**5**) nije postigla 50% inhibicije rasta HeLa ćelija ($IC_{50}>70,86 \mu\text{g/mL}$) (Mechikova i sar., 2010; Zhang i sar., 2018). Aglikoni, luteolin (**28**) i apigenin (**30**), koji su u ekstraktima prisutni u niskim količinama, pokazali su značajniju inhibiciju rasta tumorskih HeLa (**28**, $IC_{50}=4,41 \mu\text{g/mL}$; **30**, $IC_{50}=8,99 \mu\text{g/mL}$) i A549 (**30**, $IC_{50}=12,55 \mu\text{g/mL}$; **28**, $IC_{50}=16,91 \mu\text{g/mL}$) ćelijskih linija (Kim i sar., 2014; Li i Yang, 2015; Mamadaliyeva i sar., 2011). Za ova dva jedinjenja je utvrđeno da se citotoksični efekat ostvaruje indukovanjem apoptoze, p53 zavisnim putem u slučaju apigenina (pokazano na HeLa ćelijama; Zheng i sar, 2005) i inhibicijom migracije i aktivacijom kaspaza u slučaju luteolina (pokazano na A549 ćelijama; Meng i sar., 2016).

Može se primetiti da ispoljen citotoksični efekat ispitivanih MeOH ekstrakata nije bio u korelaciji sa sadržajem ukupnih polifenola, kao i sa sadržajima ukupnih fenolkarboksilnih kiselina i flavonoida luteolina (dve dominantne grupe polifenola). Sa druge strane, efekat na HeLa ćelije bio je u korelaciji sa sadržajem luteolin 7-*O*-glukozida. Naime, ekstrakti *H. coloriscapum*, *H. calophyllum* i *H. valdepilosum*, za koje je ustanovljena najveća citotoksičnost na HeLa ćelije, sadržali su i najveće količine ovog flavonoida (22,95-35,19 mg/g suvog ekstrakta).

Od testiranih izolovanih jedinjenja, krepizid E (**4**) je pokazao bolji citotoksični efekat prema HeLa ćelijama ($IC_{50}=46,19 \mu\text{g/mL}$) u poređenju sa 8-epi-ikserisaminom A (**3**) ($IC_{50}=100 \mu\text{g/mL}$). Bitno je napomenuti da je testiranjem citotoksičnosti na normalnoj ćelijskoj liniji MRC-5 pokazan zadovoljavajući bezbedonosni profil u slučaju oba ispitivana seskviterpenska laktona [IC_{50} vrednosti 92,23 (**4**) i 129,61 (**3**) $\mu\text{g/mL}$] (Boyd, 1997). Može se primetiti da je aktivnost ispitivanih MeOH ekstrakata prema HeLa ćelijskoj liniji bila u korelaciji sa sadržajem krepizida E. Najaktivniji bio je ekstrakt *H. coloriscapum* koji je sadržao i najviše krepizida E (18,23 mg/g suvog ekstrakta), a sledili su ga po aktivnosti ekstrakti *H. calophyllum* i *H. valdepiosum* koji su sadržali nešto manje količine ovog seskviterpenskog laktona (10,10 i 11,10 mg/g). Preostala dva ekstrakta sadržala su veoma malo krepizida E (<1,88 mg/g). Citotoksični efekat krepizida E prethodno je ispitivan prema humanim ćelijskim linijama melanoma (SK-MEL-2), kolorektalnog adenokarcinoma (HCT-15) i A549 *in vitro* SRB testom ($IC_{50} > 12,73 \mu\text{g/mL}$; Lee i sar., 2015), kao i prema ćelijskoj liniji limfocitne leukemije miša (L1210) (maksimalna testirana koncentracija 5 $\mu\text{g/mL}$; Fontanel i sar., 1999), ali u opsegu testiranih koncentracija jedinjenje nije postiglo 50% inhibicije rasta ovih ćelija. Međutim, treba istaći da su testirane koncentracije krepizida E u ove dve studije bile vrlo niske.

Ustanovljena razlika u citotoksičnoj aktivnosti krepizida E i 8-epi-ikserisamina A bi mogla da se objasni prisustvom α -metilenske grupe na γ -laktonskom prstenu krepizida E (8-epi-ikserisamin A na ovom položaju ima vezan prolin). Značaj ove strukture za ispoljavanje citotoksične aktivnosti se, kao i u slučaju antimikrobne aktivnosti, ogleda u činjenici da ona reaguje sa nukleofilnim grupama i Michael-ovom adicijom vrši alkilovanje komponenata ćelijske membrane i enzima (Merfort, 2011).

Takođe, prethodno je ispitivana citotoksična aktivnost ikserisamina A, epimera 8-epi-ikserisamina A. Ikserisamin A, koji se razlikuje od 8-epi-ikserisamina A po stereochemiji OH grupe na položaju C-8, nije postigao 50% inhibicije rasta testiranih tumorskih ćelijskih linija sarkoma uterusa (MES-SA), podlinije MES-SA rezistentne na lekove (MES-SA/DX5), kolorektalnog adenokarcinoma HCT-15 i podlinije HCT-15 rezistentne na lekove (HCT-15/CL02) u koncentracijama do 16,20 $\mu\text{g/mL}$ (Cha i sar., 2012). Sa druge strane, dezacilcinaropikrin, čija je struktura u osnovi seskviterpenskog jezgra 8-epi-ikserisamina A i krepizida E, pokazao se kao potentan molekul u pogledu citotoksične aktivnosti prema HeLa ćelijskoj liniji ($IC_{50}=1,4 \mu\text{g/mL}$) (Xu i sar., 2012). Dodatno, dezacilcinaropikrin je ispoljio značajnu antiproliferativnu aktivnost i prema ćelijskim linijama humanog melanoma (SK-MEL-2, $IC_{50}=3,62 \mu\text{g/mL}$), glioblastoma (XF498, $IC_{50}=3,91 \mu\text{g/mL}$), kolorektalnog karcinoma (HCT, $IC_{50}=6,03 \mu\text{g/mL}$), adenokarcinoma (SK-OV-3, $IC_{50}=11,0 \mu\text{g/mL}$) i A549 ($IC_{50}=13,29 \mu\text{g/mL}$) (Choi i sar., 2005), kao i prema ćelijskim linijama sarkoma (S-180, $IC_{50}=1,5 \mu\text{g/mL}$) i karcinoma Ehrlich-Lette ascitesa u miša (EAC, $IC_{50}=1 \mu\text{g/mL}$) (Zong i sar., 1994). Seskviterpenski lakton čija je egzometilenska grupa u položaju C-13 redukovana, 8 α -hidroksi-11,13-dihidrozaluzanin C, ispoljio je nešto slabiju aktivnost prema SK-MEL-2, XF498 i HCT15 (IC_{50} vrednosti 10,31-14,81 $\mu\text{g/mL}$), dok u slučaju A549 ćelija u najvećoj testiranoj koncentraciji nije postigao 50% inhibicije rasta ($IC_{50}>30,0 \mu\text{g/mL}$) (Zong i sar., 1994).

Što se tiče drugih konjugata seskviterpenskih laktona i aminokiselina, Perveen i sar. (2018) su pokazali da garcinamini C i D, 13-L-prolin derivati partenolida, prema ćelijskim linijama HeLa, kolorektalnog karcinoma (HCT-116), hepatocelularnog karcinoma (HepG-2) i A549 ispoljavaju značajnu aktivnost ($IC_{50}=2,23-6,24 \mu\text{g/mL}$), uporedivu sa pozitivnom kontrolom vinblastin sulfatom ($IC_{50}=2,58-6,54 \mu\text{g/mL}$). Sa druge strane, Yang i sar. (2008) su ispitivali citotoksičnu aktivnost pulhelamina, neglikozilovanih kojugata gvajanolida i aminokiselina. Ustanovili su da je pulhelamin C inhibirao rast SK-MEL-2, A549, HCT-15 i SK-OV-3 ćelijskih linija ($IC_{50}=2,75-13,21 \mu\text{g/mL}$) slabije od pozitivne kontrole doksorubicina ($IC_{50}=0,33 \mu\text{g/mL}$), a da pulhelamini A, B i D-G nisu postigli 50% inhibicije rasta ovih tumorskih ćelija. Yang i sar. (2016) su za sulfoskorzonin C, 13-L-prolin derivat 8 α -sufoksi-dehidrokostus laktona, prema HeLa ćelijama pokazali aktivnost ($IC_{50}=63,61 \mu\text{g/mL}$) takođe značajno slabiju od pozitivne kontrole cisplatina ($IC_{50}=2,68 \mu\text{g/mL}$).

Vrste roda *Hieracium* koje su predmet ove doktorske disertacije, do sada nisu ispitivane u pogledu citotoksične aktivnosti. Što se tiče ostalih vrsta ovog roda, citotoksična aktivnost je evaluirana za *n*-heksansku, dihlormetansku i vodenu frakciju metanolnog (50%, *V/V*) ekstrakta, kao

i za vodeni ekstrakt herbe *H. umbellatum* prema humanih ćelijskim linijama HeLa, epitelnog epidermoidnog karcinoma kože A-431 i epitelnog adenokarcinoma dojke MCF7. Pri najvećoj testiranoj koncentraciji od 10 µg/mL i vremenu izlaganja ćelija od 72 h, ni jedan ekstrakt nije postigao 50% inhibicije rasta ćelija HeLa (1,44-5,26%), A-431 (2,46-14,11%) i MCF7 (3,04-15,20%) (Csupor-Löffler i sar., 2009).

Osim u slučaju krepizida E, citotoksična aktivnost ostalih izolata vrsta roda *Hieracium* (šest ekstrakata i 8-epi-ikserisamina A) ispitana je po prvi put u okviru ove doktorske disertacije. Može se zaključiti da je utvrđena relativno slaba citotoksičnost odabranih izolata prema tumorskim ćelijama. Rezultati dobijeni ispitivanjem citotoksičnosti prema normalnim MRC-5 ćelijama ukazuju na potencijalnu bezbednost primene ovih izolata.

2.4. Ispitivanje sposobnosti MeOH ekstrakata herbi 28 vrsta i odabranih metabolita da inhibiraju enzime acetilholinesterazu i butirilholinesterazu

Hidrolitički enzimi acetilholinesteraza (AChE) i butirilholinesteraza (BChE) kontrolišu proces razgradnje neurotransmitera acetilholina (ACh) u holinergičkoj sinapsi do holina i acetata. AChE je primarni hidrolitički enzim u moždanom tkivu, skeletnim mišićima i autonomnom nervnom sistemu (Pope i Brimijoin, 2018; Zimmerman i Soreq, 2006). BChE u normalnim uslovima učestvuje u hidrolizi ACh prevashodno u drugim sistemima, poput glatkih mišića disajnih puteva (Adler i sar., 1991).

Inhibitori holinesteraza primenjuju se u simptomatskoj terapiji blage do umereno teške demencije u okviru Alzheimer-ove bolesti (engl. *Alzheimer disease*, AD) („Službeni glasnik RS“, br. 43/19, 55/19, 56/19-ispravka, 73/19, 87/19, 18/20, 43/20 i 108/20; Stefanova, 2013). AD je najrasprostranjenija neurodegenerativna bolest. Pogađa više od 30 miliona ljudi širom sveta i javlja se u 20-40% populacije starije od 85 godina (Jacobsen i sar., 2005; ADI, 2018). AD je takođe najčešći oblik demencije, tj. čini 60-70% svih demencija (Stefanova, 2013). Smatra se da je poremećaj kognitivnih sposobnosti u pacijenata sa AD rezultat smanjene holinergičke neurotransmisije usled gubitka neurona u korteksu i hipokampusu (Ballinger i sar., 2016; Ritter i sar., 2020; Seeley i Miller, 2018). Inhibicijom enzima AChE postiže se dugotrajnija raspoloživost ACh u preostalim holinergičkim sinapsama. Pored AChE, inhibitori holinesteraza istovremeno inhibiraju i BChE. Ovo je značajno jer u pacijenata sa uznapređovalom AD može doći do dominantnije uloge BChE (Lane i sar., 2006). Značaj ispitivanja novih inhibitora AChE i BChE proizilazi iz činjenice da postojeći lekovi ostvaruju skroman i prolazan efekat na simptome AD (Micov i Pecikoza, 2020) i mogu dovesti do većeg broja neželjenih efekata (dijareja, pojačana salivacija, nauzeja, abdominalni i grčevi u skeletnim mišićima, inkontinencija urina, poremećaj spavanja i dr.) (Khan i sar., 2018; Ugrešić, 2016). Pošto oksidativni stres ima značajnu ulogu kako u razvoju tako i u pogoršanju AD, mnoga istraživanja fokusirana su na biljne polifenole kod kojih je antiholinesterazna aktivnost udružena sa antioksidantnom aktivnošću (Murray i sar., 2013; Yener i sar., 2020).

Osim u tretmanu AD, različiti inhibitori holinesteraza primenjuju se i u tretmanu demencije udružene sa Parkinsonovom bolešću (Olanow i sar., 2018; Seeley i Miller, 2018; Stefanova, 2013), mijastenije gravis, glaukoma (Amato, 2018; Faiq i sar., 2019; Horton, 2018), gastrointestinalnih poremećaja kao što su paralitički ileus, pseudo-opstrukcija tankog i debelog creva i postoperativna atonija creva, kao i u tretmanu postoperativne retencije urina (Hirano i Kahrilas, 2018; Pope i Brimijoin, 2018; Ugrešić, 2016).

U okviru ove doktorske disertacije, modifikovanom Ellman-ovom metodom, *in vitro* je ispitana anti-AChE i anti-BChE aktivnost suvih MeOH ekstrakata herbi 28 vrsta roda *Hieracium* (za koje je utvrđena i antioksidantna aktivnost), kao i 12 odabranih jedinjenja, koja su identifikovana u većini ovih ekstrakata. Ispitivani metaboliti uključuju flavonoide (luteolin i apigenin, njihove 7-*O*-glukozide i 7-*O*-glukuronide, i diosmetin), fenolkarboksilne kiseline (hlorogensku, 3,5- i 1,3-di-*O*-kafeoilhina kiselinu) i seskviterpenske laktone (8-epi-ikserisamin A i krepizid E).

Ispitivani MeOH ekstrakti herbi vrsta roda *Hieracium* (izuzev *H. pyricephalum*) ispoljili su značajnu anti-AChE aktivnost (**Tabela 44**). Naime, u opsegu koncentracija 0,03-2,00 mg/mL, ovi ekstrakti su inhibirali više od 50% aktivnosti AChE ($IC_{50AChE}=0,64-1,39$ mg/mL). Najbolji efekat ustanovljen je za ekstrakt *H. pseudoschenkii*, a sledili su ga po aktivnosti ekstrakti *H. plumulosum*, *H. dentatum*, *H. mirificissimum*, *H. spirocaule*, *H. durmitoricum*, *H. guentheri-beckii*, *H. gymnocephalum*, *H. macrodontoides* i *H. glabratum* ($IC_{50AChE}=0,64-0,78$ mg/mL). Najslabiji inhibitori AChE bili su ekstrakti *H. pilosum* i *H. calophyllum* (IC_{50AChE} vrednosti 1,35 i 1,39 mg/mL), kao i ekstrakt *H. pyricephalum*, koji u maksimalnoj testiranoj koncentraciji (2,00 mg/mL) nije inhibirao 50% (tj. inhibirao je 24,23%) enzimske aktivnosti. Sa druge strane, u navedenom opsegu koncentracija, ekstrakti samo sedam ispitivanih vrsta inhibirali su više od 50% aktivnosti BChE ($IC_{50BChE}=0,56-1,46$ mg/mL). Među ovih sedam ekstrakata, najbolji efekat pokazao je ekstrakt *H. pilosum*, a najslabiji ekstrakt *H. glabratum*. Ekstrakti koji nisu postigli 50% inhibicije BChE, pri maksimalnoj testiranoj koncentraciji (2,00 mg/mL), inhibirali su 20,08-40,03% enzimske aktivnosti.

Tabela 44. Antiholinesterazna aktivnost suvih MeOH ekstrakata herbi 28 vrsta roda *Hieracium*

Ekstrakt / pozitivna kontrola	IC_{50AChE} (mg/mL)	IC_{50BChE} (mg/mL)	Inhibicija AChE (%) ^b	Inhibicija BChE (%) ^b
<i>H. gymnocephalum</i>	0,76	n.p. ^a	87,72	37,20
<i>H. orieni</i>	0,99	n.p.	67,34	38,44
<i>H. blecicii</i>	1,12	n.p.	59,52	35,42
<i>H. paratrichum</i>	1,02	n.p.	65,36	20,65
<i>H. spirocaule</i>	0,73	n.p.	91,32	22,16
<i>H. anastrum</i>	1,00	n.p.	66,67	20,96
<i>H. calophyllum</i>	1,39	n.p.	50,96	20,51
<i>H. scheppigianum</i>	1,20	1,30	55,56	53,79
<i>H. durmitoricum</i>	0,74	n.p.	90,09	21,28
<i>H. guentheri-beckii</i>	0,75	n.p.	88,89	29,04
<i>H. mirificissimum</i>	0,72	n.p.	92,59	21,10
<i>H. coloriscapum</i>	1,16	1,27	57,47	54,88
<i>H. pyricephalum</i>	n.p.	n.p.	24,23	21,19
<i>H. mokragorae</i>	0,96	1,07	69,44	66,27
<i>H. pannosum</i>	0,94	n.p.	70,92	38,35
<i>H. plumulosum</i>	0,71	n.p.	93,90	40,03
<i>H. albopellitum</i>	1,08	n.p.	61,73	37,97
<i>H. pseudoschenkii</i>	0,64	n.p.	95,17	20,81
<i>H. villosum</i>	0,82	n.p.	81,30	30,82
<i>H. pilosum</i>	1,35	0,56	49,38	94,14
<i>H. glabratum</i>	0,78	1,46	85,47	50,56
<i>H. scorzonerifolium</i>	1,10	n.p.	60,61	21,23
<i>H. dentatum</i>	0,71	n.p.	93,90	21,16
<i>H. neilreichii</i>	0,87	0,71	76,63	92,79
<i>H. valdepilosum</i>	0,81	0,65	82,30	93,37
<i>H. naegelianum</i>	0,93	n.p.	71,68	38,15
<i>H. tommasinianum</i>	1,24	n.p.	53,76	20,08
<i>H. macrodontoides</i>	0,76	n.p.	87,72	20,34
Galantamin	0,0035	0,023	99,62	85,98

^an.p. - ekstrakt nije postigao 50% inhibicije enzima. ^b Procenat inhibicije enzima ostvaren pri maksimalnoj testiranoj koncentraciji ekstrakta (2 mg/mL) ili pozitivne kontrole (0,05 mg/mL).

Ustanovljena sposobnost ispitivanih ekstrakata da inhibiraju AChE i BChE može se, makar delom, objasniti prisustvom odabranih testiranih jedinjenja. Najbolja anti-AChE i anti-BChE

aktivnost među ispitivanim jedinjenjima pokazana je za flavonoidne aglikone (**Tabela 45**). Apigenin ($IC_{50AChE}=47,12 \mu\text{g/mL}$; $IC_{50BChE}=18,40 \mu\text{g/mL}$) i luteolin ($IC_{50AChE}=58,82 \mu\text{g/mL}$; $IC_{50BChE}=20,12 \mu\text{g/mL}$) ispoljili su nešto bolji efekat u odnosu na diosmetin ($IC_{50AChE}=89,89 \mu\text{g/mL}$; $IC_{50BChE}=73,44 \mu\text{g/mL}$). Treba istaći da je u slučaju sva tri navedena jedinjenja ustanovljena bolja aktivnost na BChE u odnosu na AChE. Rezultati ispitivanja anti-AChE i anti-BChE aktivnosti apigenina i luteolina dobijeni u okviru ove doktorske disertacije u saglasnosti su sa prethodnim ispitivanjima drugih autora (Conforti i sar. 2010; Yener i sar. 2020).

Sa druge strane, flavonoidni heterozidi pokazali su znatno slabiju aktivnost u odnosu na aglikone, tj. nisu postigli više od 50% inhibicije aktivnosti AChE i BChE u testiranim koncentracijama. Među ispitivanim heterozidima (u koncentraciji $160 \mu\text{g/mL}$), apigenin 7-*O*-glukuronid pokazao je najbolju aktivnost prema AChE (38,47%), a apigenin 7-*O*-glukozid prema BChE (31,74%). Za razliku od aglikona, heterozidi apigenina i luteolina pokazali su nešto bolju aktivnost prema AChE (29,20-38,47%) u odnosu na BChE (12,46-31,74%). Slabija aktivnost diosmetina (metil derivata luteolina) u odnosu na luteolin, kao i heterozida u odnosu na aglikone mogla bi, barem delom, da se objasni prisustvom manjeg broja slobodnih fenolnih grupa u njihovoj strukturi. Naime, prethodno je u *in silico* ispitivanjima pokazano da flavonoidi preko fenolnih grupa (na položajima 5, 6, 7, 3' i 4') i karbonilne grupe (na položaju 4) formiraju snažne vodonične veze sa aminokiselinama aktivnog mesta AChE i BChE. Na ovaj način flavonoidi kompetitivno sprečavaju vezivanje acetilholina za aktivno mesto ova dva enzima, a time i njegovu razgradnju (Das i sar., 2017; Khan i sar., 2018; Yener i sar. 2020).

Tabela 45. Antiholinesterazna aktivnost odabranih flavonoida, fenolkarboksilnih kiselina i seskviterpenskih laktona prisutnih u analiziranim ekstraktima vrsta roda *Hieracium*

Metabolit	IC_{50AChE} ($\mu\text{g/mL}$)	IC_{50BChE} ($\mu\text{g/mL}$)	C_{max} ($\mu\text{g/mL}$)	Inhibicija AChE (%)	C_{max} ($\mu\text{g/mL}$)	Inhibicija BChE (%)
Flavonoidi						
Apigenin (30)	47,12	18,40				
Luteolin (28)	58,82	20,12				
Diosmetin (29)	89,89	73,44				
Apigenin 7- <i>O</i> -glukozid (23)	n.p. ^a	n.p.	160	34,88	160	31,74
Luteolin 7- <i>O</i> -glukozid (16)	n.p.	n.p.	160	29,20	160	12,46
Apigenin 7- <i>O</i> -glukuronid (25)	n.p.	n.p.	160	38,47	-	-
Luteolin 7- <i>O</i> -glukuronid (17)	n.p.	n.p.	160	34,74	-	-
Fenolkarboksilne kiseline						
Hlorogenska kiselina (5)	n.p.	n.p.	160	11,05	160	-
3,5-Di- <i>O</i> -kafeoilhina kiselina (8)	n.p.	n.p.	160	25,00	160	11,83
1,3-Di- <i>O</i> -kafeoilhina kiselina (6)	n.p.	n.p.	160	41,00	160	-
Seskviterpenski laktoni						
8-Epi-ikerisamin A (3)	80,01	n.p.	160			-
Krepizid E (4)	n.p.	n.p.	160	19,32	160	22,79

^an.p. – jedinjenja nisu postigla 50% inhibicije enzima u opsegu testiranih koncentracija do C_{max} ($\mu\text{g/mL}$).

Za sve ispitivane fenolkarboksilne kiseline nije ustanovljeno više od 50% inhibicije aktivnosti AChE i BChE u testiranom opsegu koncentracija. Nešto značajniju inhibiciju enzimske aktivnosti pokazala je samo 1,3-di-*O*-kafeoilhina kiselina prema AChE (41,00%) u koncentraciji $160,00 \mu\text{g/mL}$. U studiji Yener i sar. (2020) takođe je pokazano da su fenolkarboksilne kiseline manje potentni inhibitori AChE u odnosu na flavonoide. Prethodno je utvrđeno i da hlorogenska kiselina može postići više od 50% inhibicije aktivnosti AChE i BChE: $IC_{50AChE}=196,00 \mu\text{g/mL}$ (Hernandez i sar., 2010) i $IC_{50BChE}=672,10 \mu\text{g/mL}$ (Yener i sar., 2020), ali u koncentraciji koja je viša u odnosu na koncentraciju ($160,00 \mu\text{g/mL}$) ispitivanu u okviru ove doktorske disertacije. Slabija aktivnost fenolkarboksilnih kiselina prema AChE i BChE može, barem delom, da se objasni njihovom

hemijском strukturom, odnosno prisustvom negativno naelektrisanih ostataka hina kiseline. Naime, aktivno mesto AChE i BChE karakteriše se prisustvom takođe negativno naelektrisanog ostatka glutaminske kiseline, koji omogućava formiranje jonske veze sa jedinjenjima sa pozitivnim naelektrisanjem, kao što je to acetilholin. Sa druge strane usled prisustva negativno naelektrisanog ostatka u aktivnom mestu, ovi enzimi poseduju slab afinitet za negativno naelektrisanih jedinjenja (Hernandez i sar., 2010; Houghton i sar., 2006).

Među ispitivanim seskviterpenskim laktonima, najbolju antiholinesteraznu aktivnost pokazao je 8-epi-ikserisamin A ($IC_{50AChE}=80,01 \mu\text{g/mL}$). Nasuprot tome, u maksimalnoj testiranoj koncentraciji ($160,00 \mu\text{g/mL}$), ovaj lakton nije inhibirao BChE. Krepizid E je pokazao slabu aktivnost prema oba enzima, inhibirajući 19,32, odnosno 22,79% njihove aktivnosti redom u istoj maksimalnoj testiranoj koncentraciji.

Ustanovljena sposobnost 8-epi-ikserisamina A da inhibira AChE bi se bar delom mogla objasniti prisustvom pozitivno naelektrisanog ostatka prolina, koji bi potencijalno mogao da formira jonsku vezu sa negativno naelektrisanim ostatkom glutaminske kiseline aktivnog mesta enzima (Houghton i sar., 2006). Izostanak aktivnosti prema BChE predstavlja osnovu za dalja istraživanja.

Prethodno je za seskviterpenske laktone amberboin ($IC_{50AChE}=0,21 \mu\text{g/mL}$; $IC_{50BChE}=0,15 \mu\text{g/mL}$) i lipidiol ($IC_{50AChE} 0,14 \mu\text{g/mL}$), izolovane iz vrste *Volutaria abyssinica* (A. Rich.) C. Jeffrey (Asteraceae), utvrđena snažna antiholinesterazna aktivnost, koja je čak bila izraženija u odnosu na aktivnost standardnog inhibitora ova dva enzima galantamina ($IC_{50AChE}=0,72 \mu\text{g/mL}$; $IC_{50BChE}=13,38 \mu\text{g/mL}$) (Elsebai i sar., 2018). Navedena jedinjenja imaju u osnovi vrlo sličnu gvajanolidnu strukturu kao i seskviterpenski laktoni ispitivani u ovoj doktorskoj disertaciji. Razlika u aktivnosti između prethodno i u ovoj doktorskoj disertaciji ispitivanih jedinjenja bi mogla barem delom da se objasni veličinom molekula. Naime, molekulska masa 8-epi-ikserisamin A i krepizida E je veća zbog prisustva glukoze. Nepovoljan uticaj molekulske mase inhibitora na njegov afinitet vezivanja za aktivno mesto enzima prethodno je pokazan u *in vitro* i *in silico* studijama (Yener i sar., 2020).

U okviru ove doktorske disertacije po prvi put je ispitana antiholinesterazna aktivnost izolata vrsta roda *Hieracium*. Ustanovljene značajne razlike u antiholinesteraznoj aktivnosti odabranih sekundarnih metabolita, kao i razlike u aktivnosti pojedinih od ispitivanih jedinjenja prema AChE i BChE, daju dobru osnovu za dalja *in silico* istraživanja odnosa njihove strukture i aktivnosti.

2.5. Ispitivanje antihiperalgzijske i antiedematozne aktivnosti odabranih MeOH i CH₂Cl₂ ekstrakata herbi

Bol se definiše kao neprijatan osećaj i emocionalno iskustvo, koji su povezani sa stvarnim ili potencijalnim oštećenjem tkiva (definicija Svetskog udruženja za proučavanje bola, engl. *International Association for Study of Pain, IASP*; Raja i sar., 2020). Bolna preosetljivost (hiperalgezija) manifestuje se osećajem bola (reakcijom životinje) na inače blage ili ne-bolne draži i uključuje senzitivaciju nociceptivnih nervnih završetaka, kao i olakšavanje prenosa impulsa bola na nivou dorzalnog roga kičmene moždine i talamusa (Ritter i sar., 2020; Fehrenbacher i sar., 2012). U ispitivanju sposobnosti potencijalno lekovitih sintetskih, ali i prirodnih (poreklom iz biljaka) supstanci da smanje hiperalgziju, kao jedan od znakova inflamacije, koriste se odgovarajući životinjski modeli, uključujući model lokalizovane inflamacije šape pacova izazvane karageninom (Micov, 2013). Intraplantarna (*i.pl.*) injekcija karagenina uzrokuje akutnu, neimunsku i visoko reproducibilnu inflamaciju, koja se manifestuje pojavom hiperalgzije, edema, crvenila i toplote tretiranog regiona (Fehrenbacher i sar., 2012; Morris i sar., 2003). Medijatori zapaljenja koji dovode do senzitivacije nociceptora (snižavaju prag okidanja) u ovom modelu su dominantno serotonin, bradikinin i prostaglandin E₂ (PGE₂) (Morris i sar., 2003; Tomić i sar., 2018). Ovo dovodi do povećane osetljivosti tretirane šape na različite nadražaje, uključujući mehaničku stimulaciju (što može da se meri pomoću *Von Frey* anesteziometara) (Tomić i sar., 2018).

U okviru ove doktorske disertacije, model lokalizovane inflamacije šape pacova izazvane karageninom (Vivancos i sar., 2004; Stepanović-Petrović i sar., 2012) korišćen je za testiranje

antihiperalgezijskih, kao i antiedematoznih efekata oralno primenjenih ekstrakata tri vrste roda *Hieracium*, odabranih na osnovu njihovog hemijskog sastava. Ispitivan je suvi CH₂Cl₂ ekstrakt herbe *H. scheppigianum* koji se karakteriše visokim sadržajem ukupnih triterpena i u kome je detektovano svih pet triterpena identifikovanih u analiziranim vrstama roda *Hieracium*. Ispitivani su i suvi MeOH ekstrakti herbi *H. calophyllum* i *H. glabratum* u kojima su detektovana sva četiri seskviterpenska laktona i po 20 od ukupno 24 polifenola, koji su identifikovani u analiziranim vrstama roda *Hieracium*. Ekstrakt *H. calophyllum* karakteriše se i visokim sadržajem ukupnih seskviterpenskih laktona, a ekstrakt *H. glabratum* visokim sadržajem ukupnih polifenola. Tri odabrana ekstrakta primenjena su *per os* (*p.o.*) neposredno pre primene karagenina intraplantarnom (*i.pl.*) injekcijom u zadnju desnu šapu pacova.

Utvrđeno je da je CH₂Cl₂ ekstrakt *H. scheppigianum* izazvao značajnu dozno-zavisnu antihiperalgezijsku aktivnost u testiranom doznom opsegu (50-200 mg/kg; *p.o.*), postigavši maksimalni efekat od 26,9-56,2% u intervalu između 60 i 90 min od primene. MeOH ekstrakt *H. glabratum* takođe je proizveo značajnu dozno-zavisnu antihiperalgezijsku aktivnost u istom testiranom doznom opsegu, postigavši maksimalni efekat od 25,3-51,6%, 60 min nakon tretmana (**Slika 75a i b**). Odgovarajuće vrednosti ED₅₀⁴⁶ ova dva ekstrakta, izračunate iz maksimalnih postignutih efekata svake testirane doze, bile su redom 163,0 ± 26,5 i 211,6 ± 70,6 mg/kg. MeOH ekstrakt *H. calophyllum* je ispoljio znatno slabiju antihiperalgezijsku aktivnost. Testiran je samo u dozi 200 mg/kg (*p.o.*) i pokazao je maksimalno antihiperalgezijsko dejstvo od 38,1%, 60 min nakon tretmana (**Slika 75c**). Kontrolna grupa pacova primila je referentni lek ibuprofen (100 mg/kg; *p.o.*), koji je ispoljio maksimalni antihiperalgezijski efekat od 61,1%, 90 min nakon primene (**Slika 75**). Može se zaključiti da su efekti CH₂Cl₂ ekstrakta *H. scheppigianum* i MeOH ekstrakta *H. glabratum* bili uporedivi sa efektom ibuprofena. Međutim, efekat ibuprofena bio je dugotrajniji (**Slika 75**). Sa druge strane, u istom testiranom doznom opsegu sva tri odabrana ekstrakta nisu ispoljila statistički značajan efekat na edem šape pacova indukovani karageninom (**Slika 76**).

Ustanovljen antihiperalgezijski efekat suvog CH₂Cl₂ ekstrakta *H. scheppigianum* može se, barem delimično, objasniti prisustvom pojedinih identifikovanih triterpena. Naime, prethodno je za smešu α - i β -amirina, kao i β -amirin i lupeol-acetat utvrđena antihiperalgezijska aktivnost u animalnim modelima inflamatorne hiperalgezije (**Tabela 46**). U modelu inflamacije šape pacova indukovane karageninom, koji je korišćen i u okviru ove doktorske disertacije, antihiperalgezijski efekat pokazala je smeša α - i β -amirina (30 mg/kg; *i.p.*). U inflamatornoj fazi formalinskog testa ista smeša ispoljila je inhibiciju bolnog ponašanja pacova (5-100 mg/kg; *p.o.* i 10-100 mg/kg; *i.p.*) i miševa (0,1-10 mg/kg; *i.p.*) (Otuki i sar., 2005; Pinto i sar., 2008). U istom testu analgetički efekat utvrđen je i za izolovan β -amirin (5 i 10 mg/kg; *i.p.*), kao i lupeol-acetat (10-50 mg/kg; *i.p.*) u miševa (Chen i sar., 2012; Lucetti i sar., 2010; Murade i sar., 2017).

Antihiperalgezijski efekti suvih MeOH ekstrakata *H. glabratum* i *H. calophyllum* mogu se, barem delimično, objasniti prisustvom luteolina (**28**), apigenin 7-*O*-glukuronida (**25**) i hlorogenske kiseline (**5**), koji su u prethodnim ispitivanjima pokazali analgetički efekat u inflamatornoj fazi formalinskog testa (**Tabela 46**). U slučaju luteolina (10 mg/kg; *p.o.* i 5 i 10 mg/kg; *i.p.*) i apigenin 7-*O*-glukuronida (10 i 20 mg/kg; *p.o.*) efekat je pokazan u miševa (Ghosh i sar., 2013; Hashemzaei i sar., 2017; Feng i sar., 2019), a u slučaju hlorogenske kiseline (10, 50 i 100 mg/kg; *p.o.*) u pacova (dos Santos i sar., 2006). Rezultati dobijeni u okviru ove doktorske disertacije su u skladu sa navedenim podacima. Naime, MeOH ekstrakt *H. glabratum*, koji je generalno bogatiji polifenolima, a prvenstveno apigenin 7-*O*-glukuronidom i hlorogenskom kiselinom, pokazao je efikasniji antihiperalgezijski efekat od MeOH ekstrakta *H. calophyllum*.

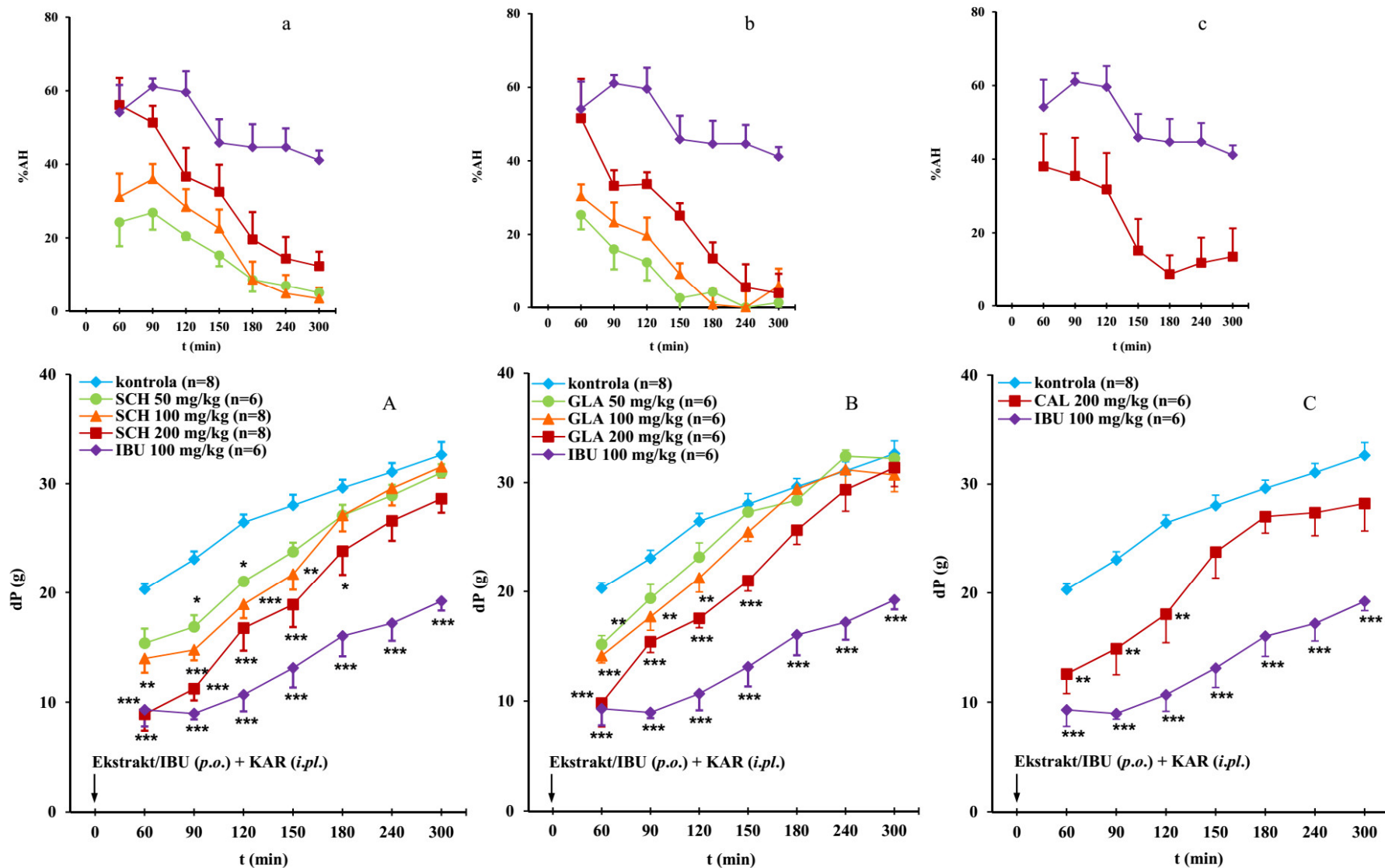
Odabrani testirani ekstrakti (*p.o.*) nisu ispoljili statistički značajan uticaj na inflamatorni edem (u modelu inflamacije šape pacova indukovane karageninom), iako su neka od jedinjenja koja su identifikovana u ovim ekstraktima u prethodnim ispitivanjima pokazala antiedematoznu aktivnost (**Tabela 47**). Naime, u slučaju triterpena, utvrđen je uticaj smeše α - i β -amirina na edem šape indukovani karageninom nakon primene u miševa (25 i 50 mg/kg; *i.p.*) i pacova (100 mg/kg; *p.o.*)

⁴⁶ ED₅₀ je doza koja ispoljava 50% antihiperalgezijske aktivnosti.

(Aragão i sar., 2008), kao i lupeol-acetata u miševa (2-50 mg/kg; *i.p.*) (Lucetti i sar., 2010) i pacova (100 mg/kg; *i.p.*) (Chen i sar., 2012). Što se tiče polifenola, nakon *p.o.* primene pokazan je efekat na edem šape indukovan karageninom u slučaju luteolina (1-100 mg/kg), luteolin 7-*O*-glukozida i apigenin 7-*O*-glukozida (u slučaju oba jedinjenja po 200 mg/kg) u miševa (Li i sar., 2011; Tatli i sar., 2008; Ziyani i sar., 2007) i hlorogenske kiseline (10, 50 i 100 mg/kg) u pacova (dos Santos i sar., 2006). Dodatno, u modelu inflamacije šape pacova indukovane karageninom, prethodno je i za suvi CH₂Cl₂ ekstrakt herbe *H. gymnocephalum* (25-200 mg/kg, *p.o.*) ustanovljen antiedematozni efekat od 5,9-44,1% (Petrović i sar., 2008). Odsustvo statistički značajnog antiedematoznog efekta ekstrakata ispitivanih u okviru ove doktorske disertacije se može pripisati različitim primenjivanim dozama (izolovana jedinjenja su pokazivala antiedematozni efekat obično u dozama većim od onih prisutnih u ekstraktima), načinima primene i/ili testiranim životinjama (korišćene su životinje različite vrste i/ili pola), kao i različitim koncentracijama karagenina kojima je indukovano edem (u slučaju ekstrakta herbe *H. gymnocephalum* bio je primenjen rastvor karagenina dvostruko niže koncentracije u odnosu na ispitivanje sprovedeno u okviru ove doktorske disertacije).

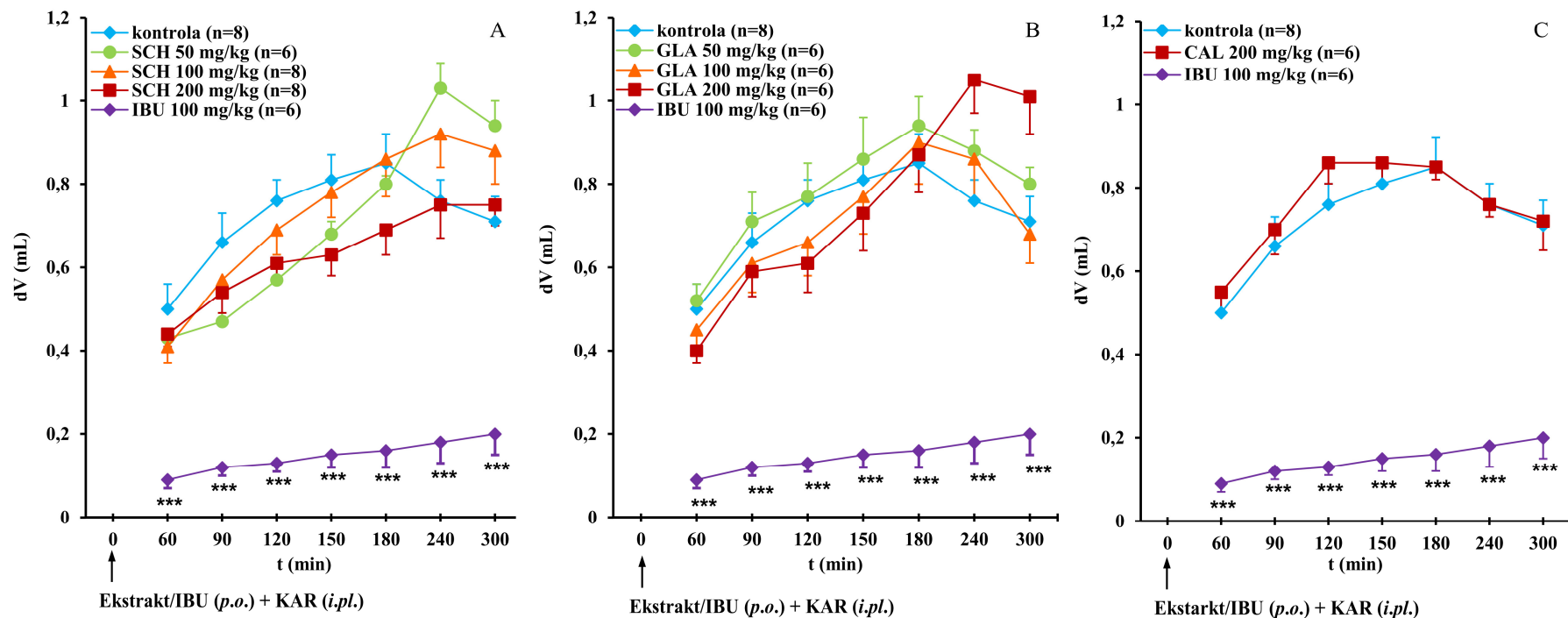
Ispoljavanje analgetičkog uz izostanak antiedematoznog efekta može ukazivati da ekstrakti u ispitivanom rasponu doza uglavnom utiču na centralne mehanizme u modelu inflamatorne hiperalgezije. Može se pretpostaviti da deluju slično paracetamolu i metamizolu koji ispoljavaju analgetički, ali ne i antiinflamatorni efekat, uglavnom inhibiranjem ciklooksigenaze (COX) u centralnom, ali ne i perifernom nervnom sistemu (Moore i McQuay, 2013). U skladu sa gore pomenutom pretpostavkom, da Silva i sar. (2011) pokazali su da smeša α - i β -amirina (sastojaka suvog CH₂Cl₂ ekstrakta *H. schepigianum*) inhibira ekspresiju COX-2 u kičmenoj moždini u miševa sa perifernom neuropatijom i ispoljava antihiperalgezijski efekat. Poznato je da je enzim COX-2 u kičmenoj moždini uključen u odgovor organizma na perifernu inflamaciju i da prostaglandini koji nastaju njegovom aktivnošću olakšavaju prenos bolnih impulsa u mozak. Prema tome, inhibicijom spinalnog COX-2 može se postići antihiperalgezijski efekat (Zeilhofer i Brune, 2006). Da Silva i sar. (2011) takođe su pokazali da smeša α - i β -amirina izaziva antihiperalgezijski efekat direktnom aktivacijom kanabinoidnog CB₁ receptora. Poznato je da stimulacija centralnih kanabinoidnih receptora proizvodi analgeziju u modelima inflamatorne hiperalgezije (Jhaveri i sar. 2007). Lipofilna priroda ovih triterpena ide u prilog pretpostavci da oni prolaze krvno-moždanu barijeru i ostvaruju centralni analgetički efekat.

Najzastupljenija jedinjenja suvih MeOH ekstrakata *H. glabratum* i *H. calophyllum*, flavonoidi luteolin, apigenin (**30**) i/ili njihovi heterozidi, takođe bi mogli delovati na centralnu modulaciju transmisije bolnih impulsa. Primenjen intratekalno, luteolin je ispoljio antihiperalgezijski efekat u pacova sa perifernom neuropatijom, što može ukazati na centralno mesto delovanja (Hara i sar., 2014). Nakon oralne primene luteolina u pacova, aglikon i njegovi glukuronidi detektovani su u moždanom tkivu, što pokazuje da ova jedinjenja mogu da prođu krvno-moždanu barijeru (Deng i sar. 2017). Apigenin je pokazao centralne neuroprotektivne efekte u prekliničkim i kliničkim studijama (Nabavi i sar., 2018). Pored toga, Feng i sar. (2019) pokazali su da je analgetički efekat apigenin 7-*O*-glukuronida, u modelu hiperalgezije indukovane formalinom u miševa, posredovan aktiviranjem spinalnih α_2 receptora, kao dobro poznatog ciljnog mesta za postizanje analgezije (Pertovaara, 2006). Može se zaključiti da odabrani ispitivani ekstrakti vrsta roda *Hieracium* predstavljaju nove izvore jedinjenja sa antihiperalgezijskom aktivnošću.



Slika 75. Efekat suvih MeOH ekstrakata *H. glabratum* (GLA) i *H. calophyllum* (CAL) i suvog CH_2Cl_2 ekstrakta *H. scheppigianum* (SCH) na hiperalgeziju u pacova indukovanu karageninom (KAR). Rezultati su izraženi kao razlika (dP) između bazalnog praga povlačenja šape i praga povlačenja šape nakon indukcije inflamacije i primene tretmana, izražena u gramima (g) (A, B, C) i kao procenat antihiperalgzijske aktivnosti (%AH)

(a, b, c); svaka tačka grafikona predstavlja aritmetičku sredinu \pm SEM dV ili %AH, dobijenu merenjem na 6-8 životinja u grupi. Ekstrakti/ibuprofen (IBU) (*p.o.*) primenjeni su neposredno pre injekcije karagenina (*i.pl.*). Statistička značajnost je određena komparacijom sa krivom kontrolne grupe (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; dvofaktorska ANOVA sa ponovljenim merenjima, praćena *post hoc* Tukey testom). *i.pl.* = intraplantarno; *p.o.* = *per os*. Napomena: simboli na malom grafikonu odgovaraju legendi prikazanoj na velikom grafikonu.



Slika 76. Efekat suvih MeOH ekstrakata herbi *H. glabratum* (GLA) i *H. calophyllum* (CAL) i suvog CH_2Cl_2 ekstrakta herbe *H. scheppigianum* (SCH) na edem šape pacova, indukovano karageninom (KAR). Rezultati su izraženi kao razlika (dV) između bazalnog volumena šape i volumena šape nakon indukcije inflamacije i primene tretmana, izražena u mililitrima (mL) (A, B, C); svaka tačka grafikona predstavlja aritmetičku sredinu \pm SEM dV vrednosti, dobijenu merenjem na 6-8 životinja u grupi. Ekstrakti/ibuprofen (IBU) (*p.o.*) primenjeni su neposredno pre injekcije karagenina (*i.pl.*). Statistička značajnost je određena komparacijom sa krivom kontrolne grupe (***) $P < 0,001$; dvofaktorska ANOVA sa ponovljenim merenjima, praćena *post hoc* Tukey testom). *i.pl.* = intraplantarno; *p.o.* = *per os*.

Tabela 46. Pregled literaturnih podataka o antinociceptivnoj/antihiperalgezijskoj aktivnosti (model inflamatornog bola) sekundarnih metabolita identifikovanih u ispitivanim vrstama roda *Hieracium*

Jedinjenje	Biološki izvor	Testirane doze i način primene	Model bola	Životinje	Referenca
Triterpeni					
Smeša α - i β -amirina	<i>Protium kleinii</i> Cuatrec. (Burseraceae) Et ₂ O ekstrakt kore	30 mg/kg (<i>i.p.</i>)	Hiperalgija šape indukovana karageninom	Wistar pacovi (mužjaci, 200-300 g)	Otuki i sar., 2005
	<i>Protium heptaphyllum</i> (Aubl.) March. MeOH/CH ₂ Cl ₂ (4:1) ekstrakt smole	10, 30, 100 mg/kg (<i>i.p.</i>)	Orofacijalni bol indukovani formalinom	Wistar pacovi (mužjaci, 160-200 g)	Pinto i sar., 2008
Smeša α - i β -amirina	<i>P. kleinii</i> Et ₂ O ekstrakt kore	0,1-10 mg/kg (<i>i.p.</i>) 5-100 mg/kg (<i>p.o.</i>)	Hiperalgija šape indukovana formalinom	Swiss miševi (mužjaci, 25-35 g)	Otuki i sar., 2005
β -Amirin	<i>Ricinus communis</i> L. (Euphorbiaceae) CH ₂ Cl ₂ ekstrakt lista	5 i 10 mg/kg (<i>i.p.</i>)		Swiss albino miševi (oba pola, 20-25 g)	Murade i sar., 2017
Lupeol-acetat	<i>Balanophora laxiflora</i> Hemsl. (Balanophoraceae) MeOH ekstrakt sveže biljke	10, 25, 50 mg/kg (<i>i.p.</i>)		ICR miševi (mužjaci, 20-25 g)	Chen i sar., 2012
	<i>Himatanthus drasticus</i> (Mart.) Plumel (Apocynaceae) EtOAc ekstrakt mlečnog soka	10, 25, 50 mg/kg (<i>i.p.</i>)		Swiss miševi (mužjaci, 25-30 g)	Lucetti i sar., 2010
Flavonoidi i fenolkarboksilne kiseline					
Luteolin	Komercijalni standard	5 i 10 mg/kg (<i>i.p.</i>)	Hiperalgija šape indukovana formalinom	Albino miševi (mužjaci, 20-25 g)	Hashemzaei i sar., 2017
	<i>Pedilanthus tithymaloides</i> (L.) Poit. (Euphorbiaceae) MeOH ekstrakt lista	10 mg/kg (<i>p.o.</i>)		Swiss albino miševi (mužjaci, 20-25 g)	Ghosh i sar., 2013
Apigenin 7-O-glukuronid	<i>Agrimonia pilosa</i> Ledeb. (Rosaceae) EtOH (50% V/V) ekstrakta	10 i 20 mg/kg (<i>p.o.</i>)		ICR miševi (mužjaci, 20-25 g)	Feng i sar., 2019
Hlorogenska kiselina	Komercijalni standard	10, 50, 100 mg/kg (<i>p.o.</i>)		Wistar pacovi (mužjaci, 180-200 g)	dos Santos i sar., 2006

i.p. = intraperitonealno; *p.o.* = per os

Tabela 47. Pregled literaturnih podataka o antiedematoznoj aktivnosti sekundarnih metabolita identifikovanih u ispitivanim vrstama roda *Hieracium*

Jedinjenje	Biološki izvor	Testirane doze i način primene	Model bola	Životinje	Referenca
Triterpeni					
Smeša α - i β -amirina	<i>Protium heptaphyllum</i> CH ₃ Cl ekstrakt smole	25 i 50 mg/kg (<i>i.p.</i>) 100 mg/kg (<i>p.o.</i>)	Edem šape indukovan karageninom	Swiss miševi (mužjaci, 20-30 g) pacovi (mužjaci, 200-250 g)	Aragão i sar., 2008
Lupeol-acetat	<i>Himatanthus drasticus</i> EtOAc ekstrakt mlečnog soka <i>Balanophora laxiflora</i> MeOH ekstrakt sveže biljke	2, 10, 20, 50 mg/kg (<i>i.p.</i>) 100 mg/kg (<i>i.p.</i>)		Swiss miševi (mužjaci, 25-30 g) Wistar pacovi (mužjaci, 200-250 g)	Lucetti i sar., 2010 Chen i sar., 2012
Flavonoidi i fenolkarboksilne kiseline					
Luteolin	<i>Pedilanthus tithymaloides</i> MeOH ekstrakt lista Komercijalni standard Komercijalni standard	10 mg/kg (<i>i.p.</i>) 100 mg/kg (<i>p.o.</i>) 1, 10 i 50 mg/kg (<i>p.o.</i>)	Edem šape indukovan karageninom	Swiss albino miševi (mužjaci, 20-25 g) Swiss albino miševi (mužjaci, 20-25 g) ICR miševi (nema podataka o polu)	Ghosh i sar., 2013 Li i sar., 2011 Ziyan i sar., 2007
Luteolin 7- <i>O</i> -glukozid	<i>Verbascum salviifolium</i> Boiss. (Scrophulariaceae) MeOH ekstrakt herbe	200 mg/kg (<i>p.o.</i>)		Swiss albino miševi (mužjaci, 20-25 g)	Tatli i sar., 2008
Apigenin	<i>Acanthophora spicifera</i> (Vahl) Borgesen (Rhodomelaceae) (Me) ₂ CO ekstrakt crvene alge	25 i 50 mg/kg (<i>p.o.</i>)		Wistar pacovi (mužjaci, 125-175 g)	El Shoubaky i sar., 2016
Apigenin 7- <i>O</i> -glukozid	<i>Verbascum salviifolium</i> MeOH ekstrakt herbe	200 mg/kg (<i>p.o.</i>)		Swiss albino miševi (mužjaci, 20-25 g)	Tatli i sar., 2008
Hlorogenska kiselina	<i>Cheilanthes farinosa</i> (Forssk.) Kaulf. (Adiantaceae) MeOH ekstrakt lista Komercijalni standard	10 mg/kg (<i>p.o.</i>) 10, 50 i 100 mg/kg (<i>p.o.</i>)		Wistar pacovi (oba pola, 125-150 g) Wistar pacovi (mužjaci, 180-200 g)	Yonathan i sar., 2006 dos Santos i sar., 2006

i.p. = intraperitonealno; *p.o.* = *per os*

2.6. Ispitivanje uticaja odabranih MeOH i CH₂Cl₂ ekstrakata herbi na motornu spretnost eksperimentalnih životinja

Uticaj na motornu spretnost pacova, kao potencijalnog neželjenog dejstva suvog CH₂Cl₂ ekstrakta herbe *H. scheppigianum* i suvog MeOH ekstrakta herbe *H. glabratum* koji su pokazali značajan antihiperalgezijski efekat (> 50%; $P < 0,05$), ispitan je u rotarod testu. Primenjena je najveća doza korišćena u modelu inflamatorne hiperalgezije (200 mg/kg, *p.o.*). Tretirane eksperimentalne životinje uspele su da se održe na rotirajućem cilindru rotarod aparata tokom 180 s (u sedam vremenskih tačaka, koje su odgovarale tačkama kada je meren antihiperalgezijski efekat), na osnovu čega je zaključeno da ova dva ekstrakta nisu imala negativan uticaj na njihovu motornu spretnost. Na ovaj način su i validirani rezultati ispitivanja antihiperalgezijske aktivnosti, jer je pokazano da smanjena reakcija na nociceptivne nadražaje (mehanička stimulacija primenom filameta *Von Frey* anesteziometara) nije uzrokovana motornom inkapacitacijom, odnosno nesposobnošću životinja da izmaknu šapu.

Ovaj rezultat bio je u saglasnosti sa rezultatima drugih autora, koji su takođe ukazali na dobar bezbednosni profil pojedinih sastojaka prisutnih u analiziranim ekstraktima: β -amirina (5 i 10 mg/kg, *i.p.*; Swiss albino miševi, 20-25 g), smeše α i β -amirina (10 i 25 mg/kg, *i.p.*; Swiss miševi, 20-30 g), luteolina (5, 10, i 20 mg/kg, *i.p.*; Swiss albino miševi, 18-25 g) i hlorogenske kiseline (0,5 i 1 mg/kg, intratekalno; Sprague-Dawley pacovi, 170-260 g) (Aragão i sar., 2006; Hara i sar., 2014; Murade i sar., 2017; Tambe i sar., 2017).

2.7. Ispitivanje akutne toksičnosti odabranih MeOH i CH₂Cl₂ ekstrakata herbi

Bezbednost ekstrakata koji su pokazali značajan antihiperalgezijski efekat (suvog CH₂Cl₂ ekstrakta herbe *H. scheppigianum* i suvog MeOH ekstrakta herbe *H. glabratum*), ispitana je i testom akutne toksičnosti u miševa. Nakon jednokratne *p.o.* primene ekstrakata u velikoj dozi (2000 mg/kg), tretirane životinje su posmatrane tokom dve nedelje. U navedenom vremenskom periodu nisu zabeležene promene u ponašanju, znakovi toksičnosti i smrtni ishodi, što može ukazati na dobru podnošljivost ovih ekstrakata nakon *p.o.* primene.

ZAKLJUČCI

1. U okviru ove doktorske disertacije ispitivano je 28 vrsta roda *Hieracium* s. str., od čega 12 nehibridogenih vrsta (osam iz sekcije *Pannosa*, dve iz sekcije *Villosa* i po jedna iz sekcija *Drepanoidea* i *Naegeliana*) i 16 hibridogenih vrsta (nastalih ukrštanjem vrsta iz sekcija *Pannosa*, *Naegeliana*, *Drepanoidea*, *Prenanthoidea*, *Villosa*, *Glauciformia*, *Hieracium* i/ili *Italica*). Nadzemni delovi u cvetu (herbe) 28 vrsta, a u slučaju *H. scheppigianum* i *H. naegelianum* i podzemni organi (rizom i koren) sakupljeni su na karakterističnim lokalitetima u Crnoj Gori i Srbiji (24 na planini Durmitor).

2. Iz MeOH ekstrakta cvasti *H. calophyllum*, semipreparativnom tečnom hromatografijom (LC-MS), izolovana su četiri seskviterpenska laktona i strukturno okarakterisana primenom tandem masene spektrometrije (Q-TOF-MS/MS), 1D i 2D NMR spektroskopije i refraktometrije. Izolovani konjugati sa prolinom: eudezmanolidni glukozid kalofilamin B, gvajanolid kalofilamin A i gvajanolidni glukozid 8-epi-ikserisamin A predstavljaju nova, do sada neopisana jedinjenja, dok je gvajanolidni glukozid krepizid E izolovan po prvi put iz vrste roda *Hieracium*.

3. Izolovana jedinjenja korišćena su kao eksterni standardi za uporednu kvalitativnu i kvantitativnu LC-MS analizu seskviterpenskih laktona u suvim MeOH ekstraktima podzemnih organa dve vrste (*H. scheppigianum* i *H. naegelianum*), kao i suvim MeOH ekstraktima herbi svih 28 vrsta. Ova klasa sekundarnih biljnih metabolita je u svih 28 vrsta identifikovana po prvi put. U ekstraktima podzemnih organa *H. scheppigianum* i *H. naegelianum* ustanovljeno je prisustvo samo krepizida E u količini (126,88 i 116,58 mg/g suvog ekstrakta) koja je bila značajno veća ne samo u odnosu na sadržaj ukupnih seskviterpenskih laktona u ekstraktima herbi ove dve vrste (u kojima su identifikovani i kalofilamin A i 8-epi-ikserisamin A), već i u odnosu na sadržaj ukupnih seskviterpenskih laktona u ekstraktima herbi svih 28 vrsta (kretao se od tragova u slučaju jedne vrste do 28,90 mg/g). U ekstraktima herbi svih 28 vrsta identifikovani su 8-epi-ikserisamin A i kalofilamin A (količina se kretala od tragova u pet istih vrsta do 11,14 mg/g, odnosno 5,31 mg/g), krepizid E u 26 vrsta (0,26-18,23 mg/g), a kalofilamin B u 14 vrsta (u tragovima u slučaju dve vrste do 0,88 mg/g).

4. U suvim MeOH ekstraktima podzemnih organa *H. scheppigianum* i *H. naegelianum* ispitivane su po prvi put i fenolkarboksilne kiseline. Semipreparativnom tečnom hromatografijom (LC-MS), iz ekstrakta *H. scheppigianum* izolovane su hlorogenska i 3,5-di-*O*-kafeoilhina kiselina, koje su identifikovane pomoću komercijalnih standarda, kao i 1,3-, 3,4- i 1,5-di-*O*-kafeoilhina kiselina, koje su strukturno okarakterisane primenom ESI/SQ-MS spektrometrije, UV, 1D i 2D NMR spektroskopije. Svih 5 fenolkarboksilnih kiselina, korišćenih kao eksterni standardi, identifikovano je LC-MS metodom i u ekstraktu *H. naegelianum*. 1,3-Di-*O*-kafeoilhina kiselina identifikovana je po prvi put u vrstama roda *Hieracium*. Uporedna LC-MS analiza pokazala je da su ekstrakti *H. scheppigianum* i *H. naegelianum* bili slični i u pogledu kvantitativnog sastava: sadržaj ukupnih fenolkarboksilnih kiselina 139,77 i 156,62 mg/g suvog ekstrakta; u oba je bila dominantna 3,5-di-*O*-kafeoilhina kiselina (62,01 i 72,86 mg/g), a po zastupljenosti je sledila hlorogenska kiselina (35,61 i 36,90 mg/g).

5. U suvim MeOH ekstraktima herbi svih 28 vrsta izvršena je uporedna LC-MS analiza fenolkarboksilnih kiselina i flavonoida. Kvalitativna analiza, sprovedena na osnovu UV i masenih spektara (ESI/SQ-MS), i pomoću standardnih supstanci, omogućila je identifikaciju ukupno 3 fenolkarboksilne kiseline i 13 flavonoida (detektovane su još 2 fenolkarboksilne kiseline i 6 flavonoida). Hlorogenska, 3,5- i 1,5-di-*O*-kafeoilhina kiselina, luteolin 7-*O*-glukoksilozid, luteolin 7-*O*-glukozid i apigenin 7-*O*-glukozid bili su zastupljeni u ekstraktima svih 28 vrsta, luteolin i apigenin u 27 vrsta, luteolin 7-*O*-glukuronid, apigenin 7-*O*-glukuronid i apigenin 7-*O*-rutinozid u 26 vrsta, luteolin 7-*O*-rutinozid u 24 vrste, luteolin 4'-*O*-glukozid, luteolin 4'-*O*-glukuronid i diosmetin u 23 vrste, a kvercetin 3-*O*-glukozid u 19 vrsta. Kvantitativna analiza je pokazala da je

sadržaj ukupnih fenolkarboksilnih kiselina u ekstraktima herbi svih 28 vrsta (20,17-64,17 mg/g suvog ekstrakta) bio značajno niži u odnosu na ekstrakte podzemih organa *H. scheppigianum* i *H. naegelianum*; najzastupljenije su bile hlorogenska (10,65-34,65 mg/g) i 3,5-di-*O*-kafeoilhina kiselina (4,48-33,13 mg/g). Sadržaj ukupnih flavonoida u ekstraktima herbi kretao se od 31,48-205,19 mg/g suvog ekstrakta. Osim u ekstraktu herbe *H. neilreichii*, u ekstraktima herbi ostalih 27 vrsta flavonoidi su bili zastupljeniji polifenoli u odnosu na fenolkarboksilne kiseline. Među flavonoidima, u ekstraktima najvećeg broja (25) vrsta, dominantni su bili luteolin i njegovi heterozidi (34,16-173,52 mg/g suvog ekstrakta), s tim što je sadržaj pojedinačnih jedinjenja među vrstama značajno varirao. Od 28 vrsta koje su predmet ove doktorske disertacije, analiza fenolkarboksilnih kiselina i flavonoida sprovedena je po prvi put za 20, dok su za preostalih osam vrsta podaci o sastavu ove dve klase sekundarnih metabolita značajno upotpunjeni (u njima je dodatno identifikovano od sedam do deset jedinjenja).

6. U odgovarajućim frakcijama suvog CH₂Cl₂ ekstrakta herbe *H. gymnocephalum*, dobijenim tečnom hromatografijom u koloni na stubu silikagela, detektovano je pet triterpena primenom gasne hromatografije (GC-FID-MS). Na osnovu masenih i 1D i 2D NMR spektara ova jedinjenja su identifikovana kao β -amirin, β -amirin-acetat, α -amirin, α -amirin-acetat i lupeol-acetat. Usporedna kvalitativna i kvantitativna GC-FID-MS analiza triterpena u suvim CH₂Cl₂ ekstraktima herbi svih 28 vrsta izvršena je pomoću standardnih supstanci. Analiza triterpena u CH₂Cl₂ ekstraktima herbi 26 vrsta ovog roda izvršena je po prvi put u okviru ove doktorske disertacije, dok su u slučaju dve prethodno ispitivane vrste, *H. gymnocephalum* i *H. plumulosum*, dodatno identifikovani acetati α - i β -amirina.

7. Hemosistematski značaj seskviterpenskih laktona, flavonoida, fenolkarboksilnih kiselina i triterpena identifikovanih u ekstraktima herbi 28 ispitivanih vrsta procenjen je multivarijantnim statističkim metodama (PCA, nMDS i UPGMA). Kao najpouzdaniji hemosistematski markeri pokazali su se flavonoidi i fenolkarboksilne kiseline. Statistička analiza sadržaja ovih polifenola u ekstraktima pokazala je jasno odvajanje pripadnika različitih sekcija i neformalnih grupa, kao i pozicioniranje hibridogenih vrsta uglavnom između roditeljskih vrsta. Statističkom analizom sadržaja seskviterpenskih laktona i triterpena konstatovana su izvesna preklapanja grupa, ali rezultati prevažno PCA i nMDS analiza, generalno podržavaju diferencijaciju između glavnih grupa i u skladu su sa trenutno prihvaćenom taksonomskom klasifikacijom roda *Hieracium*. Takođe je zaključeno da bi kalofilamin B i lupeol-acetat mogli biti dobri hemosistematski markeri za pojedine ispitivane grupe: kalofilamin B za vrste koje pripadaju ili nastaju ukrštanjem vrsta iz sect. *Villosa* (osim *H. neilreichii*), kao i za vrste koje nastaju ukrštanjem vrsta iz sect. *Glauciformia* i sect. *Italica* (*H. tommasinianum* grupa), a lupeol-acetat za većinu nehibridogenih vrsta koje pripadaju sect. *Pannosa*, kao i za pojedine hibridogene vrste koje nastaju ukrštanjem vrste *H. gymnocephalum* iz ove sekcije sa vrstama drugih sekcija.

8. U okviru ove doktorske disertacije po prvi put je ispitana antioksidantna aktivnost suvih MeOH ekstrakata herbi svih 28 vrsta roda *Hieracium*. Za sve ekstrakte, *in vitro* spektrofotometrijski, utvrđen je značajan ukupni antioksidantni potencijal FRAP (1,03-2,65 mmol Fe²⁺/g suvog ekstrakta) i CUPRAC (1,20-3,40 mmol Trolox/g suvog ekstrakta) testom i pokazana snažna koncentraciono zavisna sposobnost neutralizacije DPPH[•] (SC₅₀=14,20-60,00 μ g/mL), ABTS^{•+} (SC₅₀=5,58-18,74 μ g/mL) i [•]OH radikala (SC₅₀=12,11-24,45 μ g/mL; svega četiri ekstrakta nisu postigla 50% inhibicije [•]OH radikala). Rezultati su bili u korelaciji sa sadržajem ukupnih polifenola određenim uz korišćenje FC reagensa (54,62-168,85 mg GAE/g suvog ekstrakta). Primećena su i izvesna odstupanja od ovog pravila koja bi mogla da se objasne sadržajem pojedinih jedinjenja (npr. ekstrakt *H. macrodontoides* je ispoljio nižu antiradikalnu aktivnost od očekivane usled nižeg sadržaja flavonoidnih aglikona na račun heterozida koji su manje aktivni). Može se zaključiti da svih 28 vrsta predstavljaju nove izvore jedinjenja (fenolkarboksilnih kiselina i flavonoida) koja su poznati snažni antioksidansi.

9. Antimikrobna aktivnost na osnovu hemijskog sastava odabranih suvih ekstrakata herbi (CH₂Cl₂ ekstrakta *H. scheppigianum* i MeOH ekstrakata *H. calophyllum*, *H. coloriscapum*, *H.*

pseudoschenkii, *H. valdepilosum* i *H. glabratum*), kao i izolovanog seskviterpenskog laktona 8-epi-ikserisamina A ispitana je po prvi put, dok su postojeći podaci o antimikrobnoj aktivnosti krepizida E značajno upotpunjeni u okviru ove doktorske disertacije. U *in vitro* bujon mikrodilucionom testu, ekstrakti su inhibirali rast svih osam testiranih vrsta bakterija (MIK \geq 1,68 mg/mL; MBK \geq 3,36 mg/mL) i deset vrsta plesni i kvasnica (MIK \geq 2,48 mg/mL; MFK \geq 4,96 mg/mL). Utvrđena antimikrobna aktivnost može se barem delom objasniti prisustvom pojedinih triterpena (u slučaju CH₂Cl₂ ekstrakta) i polifenola (u slučaju MeOH ekstrakata), za koje je aktivnost prema nekim od ispitivanih bakterija i mikromiceta prethodno pokazana. Aktivnost MeOH ekstrakata prema plesnima *Aspergillus ochraceus* i *Penicillium funiculosum*, kao i kvasnicama *Candida albicans* i *C. krusei*, može se dodatno objasniti i prisustvom seskviterpenskih laktona, 8-epi-ikserisamina A i krepizida E, za koje je aktivnost prema ovim mikromicetama pokazana u okviru ove doktorske disertacije (MIK=0,15-0,4 mg/mL; MFK=0,3-0,8 mg/mL, osim u slučaju 8-epi-ikserisamina A prema *A. ochraceus*). Dobijeni podaci za ova dva seskviterpenska laktone (tj. ustanovljena slična aktivnost za jedinjenja koja se razlikuju samo po prisustvu prolina u strukturi 8-epi-ikserisamina A) predstavljaju značajan doprinos ispitivanju konjugata seskviterpenskih laktone sa prolinom kao potencijalnih *prodrug* oblika.

10. Osim u slučaju krepizida E, citotoksična aktivnost odabranih suvih ekstrakata herbi (istih onih za koje je ispitivana i antimikrobna aktivnost), kao i 8-epi-ikserisamina A je po prvi put ispitana u okviru ove doktorske disertacije. U *in vitro* spektrofotometrijskom MTT testu, ekstrakti su bili aktivni prema svim testiranim tumorskim ćelijskim linijama: karcinoma grlića materice (HeLa; IC₅₀=148,12-303,22 µg/mL), karcinoma debelog creva (LS174; IC₅₀ =308,86-689,70 µg/mL) i nesitnoćelijskog karcinoma pluća (A549; IC₅₀ =294,04-869,64 µg/mL), pri čemu je HeLa ćelijska linija bila najosetljivija. Najbolji efekat na sve tri ćelijske linije pokazao je CH₂Cl₂ ekstrakt *H. scheppegianum*, što se može barem delom objasniti prisustvom odgovarajućih triterpena za koje je prethodno pokazan efekat prema nekim od navedenih tumorskih ćelija. Citotoksična aktivnost MeOH ekstrakata na HeLa ćelije bila je u korelaciji sa sadržajem krepizida E. Krepizid E je pokazao bolji citotoksični efekat na ove ćelije u odnosu na 8-epi-ikserisamin A (IC₅₀ vrednosti 46,19 i 100 µg/mL, redom), što je u saglasnosti sa njihovom strukturom, tj. prisustvom prolina kod 8-epi-ikserisamina A umesto aktivne α -metilenske grupe na γ -laktone krepizida E. Ispitivani ekstrakti (IC₅₀ \geq 249,81 µg/mL) i jedinjenja (IC₅₀ \geq 92,23 µg/mL) su vrlo slabo inhibirali rast zdravih ćelija fetalnih fibroblasta pluća (MRC-5), što je ukazalo na potencijalnu bezbednost primene ovih izolata.

11. U okviru ove doktorske disertacije po prvi put je ispitana antiholinesterazna aktivnost izolata vrsta roda *Hieracium*. Primenom modifikovane Elmann-ove metode, *in vitro* spektrofotometrijski pokazano je da su suvi MeOH ekstrakti herbi 27 od 28 ispitivanih vrsta koncentraciono zavisno inhibirali više od 50% aktivnosti enzima acetilholinesteraze (AChE; IC₅₀=0,64-1,39 mg/mL), dok su ekstrakti samo sedam vrsta postigli više od 50% inhibicije enzima butirilholinesteraze (BChE) (IC₅₀=0,56-1,30 mg/mL). Utvrđena aktivnost ekstrakata herbi svih 28 vrsta može se, makar delom, objasniti prisustvom odabranih testiranih jedinjenja. Naime, istom metodom ispitane su anti-AChE i anti-BChE aktivnost luteolina i apigenina i njihovih 7-*O*-glukozida i 7-*O*-glukuronida, diosmetina, hlorogenske, 3,5- i 1,3-di-*O*-kafeoilhina kiseline, 8-epi-ikserisamina A i krepizida E. Ustanovljene značajne razlike u antiholinesteraznoj aktivnosti odabranih sekundarnih metabolita, kao i razlike u aktivnosti pojedinačnih jedinjenja prema AChE i BChE, daju dobru osnovu za dalja *in silico* istraživanja odnosa njihove strukture i aktivnosti.

12. U modelu lokalizovane inflamacije šape pacova indukovane karageninom, ispitane su antihiperalgezijska i antiedematozna aktivnost tri odabrana suva ekstrakta vrsta roda *Hieracium*. CH₂Cl₂ ekstrakt *H. scheppegianum* i MeOH ekstrakt *H. glabratum* (50-200 mg/kg, *p.o.*) pokazali su statistički značajnu i dozna zavisnu antihiperalgezijsku aktivnost (26,9-56,2% i 25,3-51,6%, redom, 60-90 min nakon tretmana; ED₅₀ vrednosti 163,0 \pm 26,5 i 211,6 \pm 70,6 mg/kg, redom), uporedivu sa referentnim lekom ibuprofenom (100 mg/kg; *p.o.*; 61,1%, 90 min nakon primene), koja barem delom može da se objasni prisustvom identifikovanih triterpena u CH₂Cl₂ ekstraktu,

odnosno polifenola (fenolkarboksilnih kiselina i flavonoida) u MeOH ekstraktu. U skladu sa tim, MeOH ekstrakt *H. calophyllum* (200 mg/kg, *p.o.*), koji je u odnosu na MeOH ekstrakt *H. glabratum* imao niži sadržaj polifenola, pokazao je i niži antihiperalgezijski efekat (38,1%, 60 min nakon tretmana). Ispitivani ekstrakti u testiranim dozama nisu pokazali statistički značajan antiedematozni efekat. Ispoljavanje analgetičkog uz izostanak antiedematoznog efekta može ukazivati da ekstrakti u ispitivanom rasponu doza uglavnom utiču na centralne mehanizme transmisije/modulacije bola, što je prethodno pokazano i za pojedine triterpene i flavonoide identifikovane u ovim ekstraktima. Bezbednost primene ekstrakata *H. scheppigianum* i *H. glabratum*, koji su pokazali značajnu antihiperalgezijsku aktivnost, pokazana je rotarod testom u pacova (200 mg/kg, *p.o.*) i testom akutne toksičnosti u miševa (pojedinačna doza 2000 mg/kg, *p.o.*).

13. Generalno se može zaključiti da su rezultati ispitivanja sprovedenih u ovoj doktorskoj disertaciji omogućili uvid u kompoziciju sekundarnih metabolita od značaja za farmaciju - seskviterpenskog laktona, flavonoida, fenolkarboksilnih kiselina i triterpena, u odgovarajućim ekstraktima svih 28 vrsta roda *Hieracium*. Za najveći broj (19) vrsta hemijska karakterizacija je sprovedena po prvi put, dok su za one prethodno hemijski ispitivane podaci o kompoziciji sekundarnih metabolita značajno upotpunjeni. Posebno treba istaći da su u okviru ove doktorske disertacije izolovana tri nova seskviterpenska laktone - konjugata sa prolinom. Konjugati seskviterpenskog laktone sa prolinom su vrlo retki u prirodi i do sada su identifikovani samo u nekoliko vrsta drugih rodova familije Asteraceae. Multivarijantna statistička analiza rezultata hemijskih ispitivanja omogućila je utvrđivanje sistematskog položaja ispitivanih taksona različitog ranga na osnovu kompozicije analiziranih sekundarnih metabolita, tj. utvrđivanje hemosistematskog značaja analiziranih metabolita. Rezultati dobijeni ispitivanjem farmakološke aktivnosti (antioksidantne, antimikrobne, citotoksične, antiholinesterazne, antihiperalgezijske i antiedematozne), kao i rezultati ispitivanja bezbednosti primene za odabrane, prethodno hemijski okarakterisane ekstrakte i/ili sekundarne metabolite vrsta roda *Hieracium* ukazali su na njihov lekoviti potencijal i opravdanost daljih istraživanja u cilju iznalaženja novih biljnih lekovitih sirovina.

LITERATURA

1. Adams MR, Moss MO. Food microbiology. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2008.
2. Adams M, Schneider SH, Kluge M, Kessler M, Hamburger M. Epilepsy in the Renaissance: A survey of remedies from 16th and 17th century German herbals. *J Ethnopharmacol* 2012;143(1):1–13.
3. Adenkov SM. Searching for natural sesquiterpene lactones – sources of new drug substances, in: Proceeding of 2nd Russian Conference on Medicinal Chemistry, 6th Russian-Korean Conference "Current Issues of Biologically Active Compounds Chemistry and Biotechnology", 2nd Youth School-Conference on Medicinal Chemistry, Novosibirsk, Russia, 2015, str. 27.
4. Alzheimer's Disease International. World Alzheimer Report 2018. The state of the art of dementia research: New frontiers. ADI, London, 2018.
5. Adler M, Petrali JP, Moore DH, Filbert MG. Function and distribution of acetyl- and butyrylcholinesterase in canine tracheal smooth muscle. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1991;312:126–139.
6. Al-Musayeib NM, Mohamed GA, Ibrahim SR, Ross SA. Lupeol-3-*O*-decanoate, a new triterpene ester from *Cadaba farinosa* Forssk. growing in Saudi Arabia. *Med Chem Res* 2013;22(11):5297–5302.
7. Alvarenga SAV, Ferreira MJP, Emerenciano V, Cabrol-Bass D. Chemosystematic studies of natural compounds isolated from Asteraceae: characterization of tribes by principal component analysis. *Chemometr Intell Lab* 2001;56(1):27–37.
8. Amato AA. Myasthenia gravis and other diseases of the neuromuscular junction. U: Harrison's principles of internal medicine. Uredili: Jameson JL, Fauci AS, Kasper DI, Hauser SI, Longo DI, Loscalzo J. McGraw-Hill Education, 2018.
9. Anburaj J, Swapna S, Amuthavalli K. Beta-amyrin modulates p38 mapk and jnk pathway to inhibit cell proliferation and induce ros-mediated apoptosis in hela cells. *Indian J Pharm Sci* 2020;82(3):420–428.
10. Apak R, Güçlü K, Özyürek M, Karademir SE. Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *J Agr Food Chem* 2004;52(26):7970–7981.
11. Apak R, Özyürek M, Güçlü K, Çapanoğlu E. Antioxidant activity/capacity measurement. 1. Classification, physicochemical principles, mechanisms, and electron transfer (ET)-based assays. *J Agric Food Chem* 2016a;64(5):997–1027.
12. Apak R, Özyürek M, Güçlü K, Çapanoğlu E. Antioxidant activity/capacity measurement. 2. Hydrogen atom transfer (HAT)-based, mixed-mode (electron transfer (ET)/HAT), and lipid peroxidation assays. *J Agric Food Chem* 2016b;64(5):1028–1045.
13. Aragão GF, Carneiro LMV, Junior APF, Vieira LC, Bandeira PN, Lemos TLG, Viana GS. A possible mechanism for anxiolytic and antidepressant effects of alpha- and beta-amyrin from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. *Pharmacol Biochem Behav* 2006;85:827–834.
14. Aragão GF, Pinheiro MCC, Bandeira PN, Lemos TLG, Viana GSDB. Analgesic and anti-inflammatory activities of the isomeric mixture of alpha-and beta-amyrin from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. *J Herb Pharmacother* 2008;7(2):31–47.
15. Ari S, Temel M, Kargioğlu M, Konuk M. Ethnobotanical survey of plants used in Afyonkarahisar-Turkey. *J Ethnobiol Ethnomed* 2015;11(1):1–15.
16. Ballinger EC, Ananth M, Talmage DA, Role LW. Basal forebrain cholinergic circuits and signaling in cognition and cognitive decline. *Neuron* 2016;91(6):1199–1218.
17. Bakar F, Bahadır Acikara Ö, Ergene B, Nebioğlu S, Saltan Çitoğlu G. Antioxidant activity and phytochemical screening of some Asteraceae plants. *Turk J Pharm Sci* 2015;12(2):123–132.

18. Barda C, Ciric A, Soković M, Tsoukalas M, Skaltsa H. Phytochemical investigation of *Crepis incana* Sm.(Asteraceae) endemic to southern Greece. *Biochem Syst Ecol* 2018;80:59–62.
19. Beaman JH. Revision of *Hieracium* (Asteraceae) in Mexico and Central America. *Syst Bot Monogr* 1990;29:1–77.
20. Beck G. Flora von Hernstein in Niederösterreich und der weiteren Umgebung. Wien Holzhausen, 1884.
21. Beck GR. Flora von Nieder–Oesterreich. Handbuch zur Bestimmung sämmtlicher in diesem Kronlande und den angrenzenden Gebieten wildwachsenden, häufig gebauten und verwildert vorkommenden Samenpflanzen und Führer zu weiteren botanischen Forschungen. Druck und Verlag- von Carl GeroWs Sohn, Wien, 1893, str. 1299.
22. Bekana D, Kebede T, Assefa M, Kassa H. Comparative phytochemical analyses of resins of *Boswellia species* (*B. papyrifera* (Del.) Hochst., *B. neglecta* S. Moore, and *B. rivae* Engl.) from northwestern, southern, and southeastern Ethiopia. *Int Sch Res Notices* 2014:1–9.
23. Benzie IFF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of 'antioxidant power': The FRAP assay. *Anal Biochem* 1996;239:70–76.
24. Bohlmann F, Gupta RK. 8 β -Hydroxy dehydrozaluzanin C from *Andryala pinnatifida*. *Phytochemistry* 1982;21:1799–1800.
25. Boissier PE. Flora Orientalis sive enumeratio plantarum in Oriente a Graecia et Aegypto ad Indiae 3. Lugduni, 1875.
26. Boyd MR. The NCI in vitro anticancer drug discovery screen. U: Anticancer drug development guide. Humana Press, Totowa, New York, 1997:23–42.
27. Bräutigam S, Schuhwerk F. *Hieracium* L. U: Rothmaler, Exkursionsflora von Deutschland 4. Gefäßpflanzen, Kritischer Band, 9. Auflage. Uredili: Jäger EJ, Werner K. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg & Berlin, 2002, str. 709–734.
28. Burns D, Reynolds WF, Buchanan G, Reese PB, Enriquez RG. Assignment of ¹H and ¹³C spectra and investigation of hindered side-chain rotation in lupeol derivatives. *Magn Reson Chem* 2000;38(7):488–493.
29. Buttke TM, McCubrey JA, Owen TC. Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay to measure viability and proliferation of lymphokine-dependent cell lines. *J Immunol Methods* 1993;157:233–240.
30. de Candolle AP. Prodrromus sytematis naturalis regni vegetabilis. Enumeratio contracta ordinum generum specierumque plantarum huc usque cognitarium, juxta methodi naturalis, normas digesta, pars VII. Parisiis, 1838, str. 229.
31. Carman JG. Asynchronous expression of duplicate genes in angiosperms may cause apomixis, bispority, tetraspority, and polyembryony. *Biol J Linn Soc* 1997;61:51–94.
32. Cartagena E, Montanaro S, Bardón A. Improvement of the antibacterial activity of sesquiterpene lactones. *Rev Latinoam Química* 2008;36(2):43–50.
33. Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases (NCEZID), Division of Healthcare Quality Promotion (DHQP). *Pseudomonas aeruginosa* in Healthcare Settings. (last reviewed: November 13, 2019). Digitalni izvor: <https://www.cdc.gov/hai/organisms/pseudomonas.html> (pristup januar 2021. god.) Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases (NCEZID), Division of Healthcare Quality Promotion (DHQP). Basic Facts about Mold and Dampness. (last reviewed: August 11, 2020). Digitalni izvor: <https://www.cdc.gov/hai/organisms/pseudomonas.html> (pristup januar 2021. god.)
34. Cha MR, Choi CW, Lee JY, Kim YS, Yon GH, Choi SU, Kim YH, Ryu SY. Two new amino acid-sesquiterpene lactone conjugates from *Ixeris dentata*. *Bull Korean Chem Soc* 2012;33:337–340.
35. Chen YF, Ching C, Wu TS, Wu CR, Hsieh WT, Tsai HY. *Balanophora spicata* and lupeol acetate possess antinociceptive and anti-inflammatory activities *in vivo* and *in vitro*. *Evid-Based Compl Alt* 2012; 2012:1–11.
36. Cheng IF, Breen K. On the ability of four flavonoids, baicilein, luteolin, naringenin, and

- quercetin, to suppress the Fenton reaction of the iron-ATP complex. *Biometals* 2000;13:77–83.
37. Chin J. Control of communicable diseases manual. 17th ed. American Public Health Association, Washington, 2000.
 38. Choi SZ, Choi SU, Lee KR. Cytotoxic sesquiterpene lactones from *Saussurea calciccola*. *Arch Pharm Res* 2005;28:1142–1146.
 39. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard - eighth edn. M07-A8. CLSI, Wayne, PA, 2009.
 40. Chrtek J. Taxonomy of the *Hieracium alpinum* group in the Sudeten Mts, the Western and the East Ukrainian Carpathians. *Folia Geobot Phytotax* 1997;32:69–97.
 41. Chrtek J, Mráz P, Severa M. Chromosome numbers in selected species of *Hieracium* s. str. (*Hieracium* subgen. *Hieracium*, Compositae) in the Western Carpathians. *Preslia* 2004;76:119–139.
 42. Chrtek J, Jun, Mráz P, Zahradníček J, Mateo G, Szeląg Z. Chromosome numbers and DNA ploidy levels of selected species of *Hieracium* s. str. (Asteraceae). *Folia Geobot* 2007;42(4):411–430.
 43. Chrtek J, Zahradníček J, Krak K, Fehrer J. Genome size in *Hieracium* subgenus *Hieracium* (Asteraceae) is strongly correlated with major phylogenetic groups. *Ann Bot* 2009;104:161–178.
 44. Chung PY. Novel targets of pentacyclic triterpenoids in *Staphylococcus aureus*: a systematic review. *Phytomedicine* 2020;73:152933. Doi: 10.1016/j.phymed.2019.152933.
 45. Clifford MN, Johnston KL, Knight S, Kuhnert N. Hierarchical scheme for LC-MSⁿ identification of chlorogenic acids. *J Agric Food Chem* 2003;51:2900–2911.
 46. Clifford MN, Knight S, Kuhnert N. Discriminating between the six isomers of dicaffeoylquinic acid by LC-MSⁿ. *J Agric Food Chem* 2005;53(10):3821–3832.
 47. Clifford MN, Wu W, Kirkpatrick J, Kuhnert N. Profiling the chlorogenic acids and other caffeic acid derivatives of herbal *Chrysanthemum* by LC-MSⁿ. *J Agric Food Chem* 2007;55(3):929–936.
 48. Clifford MN, Kirkpatrick J, Kuhnert N, Roozendaal H, Salgado PR. LC-MSⁿ analysis of the cis isomers of chlorogenic acids. *Food Chem* 2008;106(1):379–385.
 49. Cmoch P, Pakulski Z, Swaczynová J, Strnad M. Synthesis of lupane-type saponins bearing mannosyl and 3, 6-branched trimannosyl residues and their evaluation as anticancer agents. *Carbohydr Res* 2008;343(6):995–1003.
 50. Conforti F, Rigano D, Formisano C, Bruno M, Loizzo MR, Menichini F, Senatore F. Metabolite profile and *in vitro* activities of *Phagnalon saxatile* (L.) Cass. relevant to treatment of Alzheimer's disease. *J Enzyme Inhib Med Chem* 2010;25(1):97–104.
 51. Csapi B, Hajdú Z, Zupkó I, Berényi Á, Forgo P, Szabó P, Hohmann J. Bioactivity-guided isolation of antiproliferative compounds from *Centaurea arenaria*. *Phytother Res* 2010;24(11):1664–1669.
 52. Csupor-Löffler B, Hajdú Z, Réthy B, Zupkó I, Máthé I, Rédei T, Falkay G, Hohmann J. Antiproliferative activity of hungarian Asteraceae species against human cancer cell lines. Part II. *Phytother Res* 2009;23(8):1109–1115.
 53. Cuyckens F, Claeys M. Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. *J Mass Spectrom* 2004;39:1–15.
 54. Cuyckens F, Rozenberg R, De Hoffmann E, Claeys M. Structure characterization of flavonoid *O*-diglycosides by positive and negative nano-electrospray ionization ion trap mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 2001;36:1203–1210.
 55. David MZ, Daum RS. Treatment of *Staphylococcus aureus* infections. *Curr Top Microbiol Immunol* 2017:325–383.
 56. Das S, Laskar MA, Sarker SD, Choudhury MD, Choudhury PR, Mitra A, Jamil S, Lathiff SMA, Abdullah SA, Basar N, Nahar L, Talukdar AD. Prediction of anti-Alzheimer's activity

- of flavonoids targeting acetylcholinesterase in silico. *Phytochem Anal* 2017;28(4):324–331.
57. De Feo V, Soria RMU. Medicinal plants and phytotherapy in traditional medicine of Paruro Province, Cusco Department, Peru. *Pharmacologyonline* 2012;1:154–219.
 58. Demir S, Karaalp C, Bedir E. Specialized metabolites from the aerial parts of *Centaurea polyclada* DC. *Phytochemistry* 2017;143:12–18.
 59. Dmitrić Marković JM, Milenković D, Amić D, Popović-Bijelić A, Mojović M, Pašti IA, Marković ZS. Energy requirements of the reactions of kaempferol and selected radical species in different media: towards the prediction of the possible radical scavenging mechanisms. *Struct Chem* 2014;25(6):1795–1804.
 60. DuPont MS, Mondin Z, Williamson G, Price KR. Effect of variety, processing, and storage on the flavonoid glycoside content and composition of lettuce and endive. *J Agric Food Chem* 2000;48:3957–3964.
 61. Ekalu MA, Ayo RGO, Habila J, Hamisu I. Bioactivity of phaeophytin a, α -Amyrin and lupeol from *Brachystelma togoense* Schltr. *JOTCSA* 2019;6(3):411–418.
 62. Ellman GL. A colorimetric method for determining low concentrations of mercaptans. *Arch Biochem Biophys* 1958;74(2):443–450.
 63. Elsebai MF, Ghabbour HA, Marzouk AM, Salmas RE, Orhan IE, Senol FS. Amberboin and lipidiol: X-ray crystallographic data, absolute configuration and inhibition of cholinesterase. *Phytochem Let* 2018;27:44–48.
 64. El Shoubaky GA, Abdel-Daim MM, Mansour MH, Salem EA. Isolation and identification of a flavone apigenin from marine red alga *Acanthophora spicifera* with antinociceptive and anti-inflammatory activities. *J Exp Neurosci* 2016;10:21–29.
 65. Emerenciano VP, Miliato JSLT, Campos CC, Romof P, Caplan MAC, Zambon M, Brant AJC. Flavonoids as chemotaxonomic markers of Asteraceae. *Biochem Syst Ecol* 2001;29:947–957.
 66. Espinel-Ingroff A. Comparison of the E-test with the NCCLS M38-P method for antifungal susceptibility testing of common and emerging pathogenic filamentous fungi. *J Clin Microbiol* 2001;39(4):1360–1367.
 67. European Medicines Agency. EMA/HMPC/680374/2013. Final: European Union herbal monograph on *Hieracium pilosella* L., herba cum radice. London: 5 May 2015.
 68. Fadaeinasab M, Hadi AHA, Kia Y, Basiri A, Murugaiyah V. Cholinesterase enzymes inhibitors from the leaves of *Rauvolfia reflexa* and their molecular docking study. *Molecules* 2013;18(4):3779–3788.
 69. Faiq MA, Wollstein G, Schuman JS, Chan KC. Cholinergic nervous system and glaucoma: from basic science to clinical applications. *Prog Retin Eye Res* 2019;72:1–27.
 70. Farhadi F, Khameneh B, Iranshahi M, Iranshahy M. Antibacterial activity of flavonoids and their structure–activity relationship: An update review. *Phytother Res* 2019;33(1):13–40.
 71. Fehrenbacher JC, Vasko MR, Duarte DB. Models of inflammation: Carrageenan- or complete Freund's Adjuvant (CFA)-induced edema and hypersensitivity in the rat. *Curr Protoc Pharmacol* 2012;56(1):5–4.
 72. Fehrer J, Krak K, Chrtek J. Intra-individual polymorphism in diploid and apomictic polyploid hawkweeds (*Hieracium*, Lactuceae, Asteraceae): disentangling phylogenetic signal, reticulation, and noise. *BMC Evol Biol* 2009;9:1–23.
 73. Feng J, Lee HJ, Kim SB, Jung JS, Lim SS, Suh HW. Antinociceptive effect of single components isolated from *Agrimonia pilosa* Ledeb. extract. *Sci Pharm* 2019;87(3):1–11.
 74. Ferlay J, Ervik M, Lam F, et al, udrednici. Global Cancer Observatory: Cancer Today. International Agency for Research on Cancer, 2020. (pristup februar 2020. god.)
 75. Ferreira MJ, Brant AJ, Alvarenga SA, Emerenciano VP. Neural networks in chemosystematic studies of Asteraceae: a classification based on a dichotomic approach. *Chem Biodiver* 2005;2(5):633–644.
 76. Ferreres F, Llorach R, Gil-Izquierdo A. Characterization of the interglycosidic linkage in di-, tri-, tetra- and pentaglycosylated flavonoids and differentiation of positional isomers by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Mass Spectrom*

- 2004;39:312–321.
77. Flann C. 2009-. Global Compositae Checklist, ed. Digitalni izvor: <http://compositae.landcareresearch.co.nz/> (pristup maj 2020. god.).
 78. Fontanel D, Galtier C, Debouzy JC, Gueiffier A, Viel C. Sesquiterpene lactone glycosides from *Lapsana communis* L. subsp. *communis*. *Phytochemistry* 1999;51:999–1004.
 79. Fries E. *Epicrisis generis Hieraciorum*. *Ups Univ Arsskr* 1862:1–158.
 80. Freyn J. Ueber neue und bemerkenswerte orientalische pflanzenarten. *Autran E. Bulletin de l'Herbier Boissier* 1895;3:150–167.
 81. Fujimoto Y, Kinoshita T, Ikekawa N, Mungarulire J. Sesquiterpene lactones from *Gutenbergia cordifolia*. *Phytochemistry* 1987;26:2593–2595.
 82. Gajić M. *Hieracium* L. U: Flora SR Srbije VII. Uredili: Josifović M, i sar. SANU, Odeljenje prirodno-matematičkih nauka, Beograd, 1975; str. 336–465.
 83. Gavrilović B, Tomović G, Niketić M, Milenković M, Simić S, Radovanović M. Geocological characteristics of plant endemism in the Balkan part of Serbia. *Bot Serb* 2017;41(2):177–197.
 84. Giner RM, Recio M, Villalba M, Mañez S, Rios JL. Phenolic compounds of *Hieracium compositum* and *H. amplexicaule*. *Pharmazie* 1992;47(4):308.
 85. Ghosh S, Chattopadhyay D, Mandal A, Kaity S, Samanta A. Bioactivity guided isolation of antiinflammatory, analgesic, and antipyretic constituents from the leaves of *Pedilanthus tithymaloides* (L.). *Med Chem Res* 2013;22(9):4347–4359.
 86. Gökbulut A, Orhan N, Deliorman Orhan DD. Phenolic compounds characterization, carbohydrate digestive enzyme inhibitory and antioxidant activities of *Hieracium pannosum* Boiss. *S Afr J Bot* 2017;108:387–392.
 87. González AG, Barrera JB, Acosta JC, Rosas FE. Guaianolides from *Taekholmia* species. *Phytochemistry* 1985;24:1383–1384.
 88. González-Tejero MR, Molero-Mesa J, Casares-Porcel M, Lirola MM. New contributions to the ethnopharmacology of Spain. *J Ethnopharmacol* 1995;45(3):157–165.
 89. Górniak I, Bartoszewski R, Króliczewski J. Comprehensive review of antimicrobial activities of plant flavonoids. *Phytochem Rev* 2019;18(1):241–272.
 90. Gottschlich G. Die Gattung *Hieracium* L. (Compositae) in Herbarium Rupert Huter (Vinzentinum Brixen, BRIX) in *Veröff Tiroler Landesmus Ferdinandeum* 86, Sonderband. 2007.
 91. Gottschlich G, Domina G, Di Gristina E. *Hieracium umbrosum* subsp. *Abietinum* (Asteraceae), a further example of amphi-Adriatic disjunction. *Plant Biosyst* 2017;151:792–794.
 92. Granica S, Zidorn C. Phenolic compounds from aerial parts as chemosystematic markers in the Scorzonerinae (Asteraceae). *Biochem Syst Ecol* 2015;58:102–113.
 93. Grass S, Zidorn C, Ellmerer EP, Stuppner H. Eudesmane derivatives from *Hieracium intybaceum*. *Chem Biodivers* 2004;1:353–360.
 94. Greuter W, Raab-Straube E von (urednici). *Euro+ Med Notulae*, 1. *Willdenowia* 2005;35(2):223–239.
 95. Greuter W. 2006+. Compositae (pro parte majore). U: Compositae. *Euro+Med Plantbase - the information resource for Euro-Mediterranean plant diversity*. Uredili: Greuter W, Raab-Straube E von. Digitalni izvor: <http://ww2.bgbm.org/EuroPlusMed/PTaxonDetail.asp?NameCache=Hieracium&PTRefFk=70000/> (pristup jun 2020. god.).
 96. Greuter W. Raab-Straube E von (urednici). *Euro+Med Notulae*, 3 [Notulae ad floram euro-mediterraneam pertinentes 25]. *Willdenowia* 2007;37:139–189.
 97. Greuter W, Raab-Straube E von (urednici). *Med-Checklist. A critical inventory of vascular plants of the circum-mediterranean countries* 2, ed. OPTIMA, Palermo, Genève and Berlin, 2008.
 98. Guppy GA, Bohm BA. Flavonoids of five *Hieracium* species of British Columbia. *Biochem Syst Ecol* 1976;4:231–234.

99. Haag-Berrurier M, Duquénois P. Les Flavonoides de l'*Hieracium murorum* ssp. *grandidens* var. *minoriceps*. *Phytochemistry* 1969;8(3):681–683.
100. Halliwell B, Gutteridge JM, Aruoma OI. The deoxyribose method: a simple “test-tube” assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. *Anal Biochem* 1987;165(1):215–219.
101. Hänel H, Raether W. A more sophisticated method of determining the fungicidal effect of water-insoluble preparations with a cell harvester, using miconazole as an example. *Mycoses* 1988;31(3):148–154.
102. Hara K, Haranishi Y, Terada T, Takahashi Y, Nakamura M, Sata T. Effects of intrathecal and intracerebroventricular administration of luteolin in a rat neuropathic pain model. *Pharmacol Biochem Behav* 2014;125:78–84.
103. Harborne JB. *Phytochemical Methods*. Chapman and Hall Ltd., London, 1973:54.
104. Harborne JB. Flavonoids and the evolution of the angiosperms. *Biochem Syst Ecol* 1977;5(1):7–22.
105. Harborne JB. General procedures and measurement of total phenolics. U: *Methods in plant biochemistry*. Uredili: Dey PM, Harborne JB. Academic Press, London, 1989;1, str. 1–28.
106. Hasbun C, Calvo MA, Poveda LJ, Malcolm A, Delord TJ, Watkins SF, Fronczek FR, Fischer NH. Molecular structure of irazunolide, a new eudesmanolide from *Hieracium irazuensis*. *J Nat Prod* 1982;45:749–753.
107. Hashemzadei M, Abdollahzadeh M, Iranshahi M, Golmakani E, Rezaee R, Tabrizian K. Effects of luteolin and luteolin-morphine co-administration on acute and chronic pain and sciatic nerve ligated-induced neuropathy in mice. *J Complement Integr Med* 2017;14(1):1–7.
108. Hassler M. *World Plants: Synonymic Checklists of the Vascular Plants of the World* (verzija novembar 2018). U: *Species 2000 & ITIS Catalogue of Life, 2019 Annual Checklist*. Uredili: Roskov Y, Ower G, Orrell T, Nicolson D, Bailly N, Kirk PM, Bourgoin T, DeWalt RE, Decock W, Nieukerken E. van, Zarucchi J, Penev L. Digitalni izvor: www.catalogueoflife.org/annual-checklist/2019. *Species 2000: Naturalis*, Leiden, the Netherlands.
109. Hayek A von. *Prodromus florae peninsulae balcanicae*, 2. U: *Repertorium specierum novarum regni vegetabilis*. Beihefte. Dahlem bei Berlin :Verlag des Repertoriums 1928–1931;30(2):577–1152.
110. 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.
111. Hernandez MF, Falé PL, Araújo MEM, Serralheiro MLM. Acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of the water extracts of several *Hypericum* species. *Food Chem* 2010;120:1076–1082.
112. Hirano I, Kahrilas PJ. *Dysphagia*. U: *Harrison's principles of internal medicine*. Uredili: Jameson JL, Fauci AS, Kasper DI, Hauser SI, Longo DI, Loscalzo J. McGraw-Hill Education, New York, 2018.
113. Hisham A, Pieters I, Claeys M, Dommissie R, Berghe DV, Vlietinck A. Guaianolide glucosides from *Elephantopus scaber*. *Planta Med* 1992;58:474–475.
114. Hooper SN, Chandler RF. Herbal remedies of the Maritime Indians: phytosterols and triterpenes of 67 plants. *J Ethnopharmacol* 1984;10(2):181–194.
115. Hoppe HA. *Drogenkunde*. Handbuch der pflanzlichen und tierischen Rohstoffe. De Gruyter, 1958.
116. Hornemann JW. *Hortus regius botanicus Hafniensis, in usum tyronum et botanophilorum*. Hauniae [Copenhagen]: Typis Mölleri EAH, 1813–1819;2:761.
117. Horton JC. *Disorders of the eye*. U: *Harrison's principles of internal medicine*. Uredili: Jameson JL, Fauci AS, Kasper DI, Hauser SI, Longo DI, Loscalzo J. McGraw-Hill Education, 2018.

118. Houghton P, Ren Y, Howes M-J. Acetylcholinesterase inhibitors from plants and fungi. *Natural Products Report* 2006;23:181–199.
119. Huang M, Lu JJ, Ding J. Natural products in cancer therapy: Past, present and future. *Nat Prod Bioprospect* 2021;11:5–13.
120. International Conference on Harmonisation (ICH). *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1)*, in: *ICH Harmonised Tripartite Guideline*. ICH, Geneva, 2005.
121. Jacobsen JS, Reinhart P, Pangalos MN. Current concepts in therapeutic strategies targeting cognitive decline and disease modification in Alzheimer's disease. *NeuroRx* 2005;2(4):612–626.
122. Jacquin NJ. *Enumeratio stirpium plerarumque, quae sponte crescunt in agro vindobonensi, montibusque confinibus*. Vindobonae [Wien], 1762.
123. Janačković P, Novaković J, Gavrilović M, Rajčević N, Marin PD. Antioxidative activity of leaf extracts of *Achillea coarctata* Poir. and *Hieracium waldsteinii* Tausch from Macedonia. 10th Conference on Medicinal and Aromatic Plants of Southeast European Countries (CMAPSEEC 2018), Split, Croatia, 20–24. 05. 2018. Book of Abstracts, str. 117.
124. Jhaveri MD, Richardson D, Chapman V. Endocannabinoid metabolism and uptake: novel targets for neuropathic and inflammatory pain. *Br J Pharmacol* 2007;152(5):624–632.
125. Johann S, Soldi C, Lyon JP, Pizzolatti MG, Resende MA. Antifungal activity of the amyirin derivatives and *in vitro* inhibition of *Candida albicans* adhesion to human epithelial cells. *Lett Appl Microbiol* 2007;45(2):148–153.
126. Jovanović SČ, Zlatković BK, Stojanović GS. Chemotaxonomic approach to the central Balkan *Sedum* species based on distribution of triterpenoids in their epicuticular waxes. *Chem Biodiver* 2016;13(4):459–465.
127. Kanafin EN, Kishkentaeva AS, Kupryanov AN, Adenkov SM. Deacylcynaropicrin from *Hieracium bectauatensis*, U: Proceeding of International scientific and practical conference “Achievements and Prospects for the Development of Phytochemistry”, Karaganda, Kazakhstan, 2015, str. 122.
128. Kachlicki P, Einhorn J, Muth D, Kerhoas L, Stobiecki M. Evaluation of glycosylation and malonylation patterns in flavonoid glycosides during LC/MS/MS metabolite profiling. *J Mass Spectrom* 2008;43:572–586.
129. Kerner A. *Floristische Notizen*. *Oesterr Bot Z* 1874;168–172.
130. Kilian N, Gemeinholzer B, Lack WH. Cichorieae. U: Systematics, evolution and biogeography of Compositae. Uredili: Funk VA, Susanna A, Stuessy TF, Bayer RG. International Association for Plant Taxonomy, Vienna, Austria, 2009, str. 343–383.
131. Kilian N, Gemeinholzer B, Lack HW. "24. Cichorieae" (PDF). U: Systematics, evolution and biogeography of Compositae. Uredili: Funk VA, Susanna A, Stuessy TE, Bayer RJ. International Association for Plant Taxonomy, Vienna, Austria. Digitalni izvor: https://www.bgbm.org/sites/default/files/documents/Cichorieae_Chapter24.pdf (pristup 18.11.2016. god.).
132. Kim YS, Kim SH, Shin J, Harikishore A, Lim JK, Jung Y, Lyu HN, Baek NI, Choi KY, Yoon HS, Kim KT. Luteolin suppresses cancer cell proliferation by targeting vaccinia-related kinase 1. *PloS One* 2014;9(10):1–11.
133. Kim HJ, Son DC, Kim HJ, Choi K, Oh SH, Kang SH. The chemotaxonomic classification of Korean Campanulaceae based on triterpene, sterol, and polyacetylene contents. *Biochem Syst Ecol* 2017;74:11–18.
134. Kisiel W, Barszcz B. Sesquiterpene lactone glycosides from *Crepis pyrenaica*. *Phytochemistry* 1995;39:1395–1397.
135. Khan H, Amin S, Kamal MA, Patel S. Flavonoids as acetylcholinesterase inhibitors: current therapeutic standing and future prospects. *Biomed Pharmacother* 2018;101:860–870.
136. Krak K, Caklová P, Chrtek J, Fehrer J. Reconstruction of phylogenetic relationships in a highly reticulate group with deep coalescence and recent speciation (*Hieracium*, Asteraceae). *Heredity* 2013;110:138–151.

137. Krak K, Mráz P. Trichomes in the tribe Lactuceae (Asteraceae) – taxonomic implications. *Biologia* 2008;63:616–630.
138. Koch WDJ. Synopsis florae Germanicae et Helveticae : exhibens stirpes phanerogamas rite cognitatas, quae in Germania, Helvetia, Borussia et Istria sponte crescunt atque in hominum usum copiosius coluntur. Index generum, specierum et synonymorum. Francofurti ad Moenum : F. Wilmans, 1838, str. 454.
139. Kovačić ZJ. Multivarijaciona analiza. Univerzitet u Beogradu – Ekonomski fakultet, Beograd, 1994.
140. Kuete V, Komguem J, Beng VP, Meli AL, Tangmouo JG, Etoa FX, Lontsi D. Antimicrobial components of the methanolic extract from the stem bark of *Garcinia smeathmannii* Oliver (Clusiaceae). *S Afr J Bot* 2007;73(3):347–354.
141. Kukić J, Petrović S, Niketić M. Antioxidant activity of four endemic *Stachys* taxa. *Biol Pharm Bull* 2006;29:725–729.
142. 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(2):861–868.
143. Kuluev BR, Akhmetova GR, Shvets KY, Muldashev AA, Mavzyutov AR, Chemeris AV. Identification of the antimicrobial activity in extracts of potential rubber-bearing plants of the flora of the Southern Urals. *Biomics* 2019;11(1):71–85.
144. Labeled F, Masullo M, Mirra V, Nazzaro F, Benayache F, Benayache S, Piacente S. Amino acid-sesquiterpene lactone conjugates from the aerial parts of *Centaurea pungens* and evaluation of their antimicrobial activity. *Fitoterapia* 2019;133:51–55.
145. Lane RM, Potkin SG, Enz A. Targeting acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in dementia. *Int J Neuropsychopharmacol* 2006;9:101–124.
146. Lee JY, Cha MR, Kim MR, Lee K, Choi SU, Ryu SY. Two novel guaiane sesquiterpenes from the whole plant of *Youngia japonica*. *Planta Med Lett* 2015;2:31–34.
147. Lemańska K, van der Woude H, Szymusiak H, Boersma MG, Gliszczyńska-Swigło A, Rietjens IM, Tyrakowska B. The effect of catechol *O*-methylation on radical scavenging characteristics of quercetin and luteolin—a mechanistic insight. *Free Radic Res* 2004;38:639–647.
148. Liang N, Kitts DD. Antioxidant property of coffee components: assessment of methods that define mechanisms of action. *Molecules* 2014;19(11):19180–19208.
149. Li K, Fan H, Yin P, Yang L, Xue Q, Li X, Sun L, Liu Y. Structure-activity relationship of eight high content flavonoids analyzed with a preliminary assign-score method and their contribution to antioxidant ability of flavonoids-rich extract from *Scutellaria baicalensis* shoots. *Arab J Chem* 2018;11(2):159–170.
150. Li B, Pratt DA. Methods for determining the efficacy of radical-trapping antioxidants. *Free Radical Bio Med* 2015;82:187–202.
151. Li J, Wang L, Bai H, Yang B, Yang H. Synthesis, characterization, and anti-inflammatory activities of rare earth metal complexes of luteolin. *Med Chem Res* 2011;20(1):88–92.
152. Li RB, Yang JS. Inhibitory effect of apigenin against migration and invasion of human lung cancer A549 cells and the related mechanism. *Acad J Second Mil Med Univ* 2015;36:878–882.
153. Liguori I, Russo G, Curcio F, Bulli G, Aran L, Della-Morte D, Gargiulo G, Testa G, Cacciatore F, Bonaduce D, Abete P. Oxidative stress, aging, and diseases. *Clin Interv Aging* 2018;13:757.
154. Lucetti DL, Lucetti EC, Bandeira MAM, Veras HN, Silva AH, Leal LKA, Lopes AA, Alves VCC, Silva GS, Brito GA, et al. Anti-inflammatory effects and possible mechanism of action of lupeol acetate isolated from *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel. *J Inflamm (Lond)* 2010;7(1):1–11.
155. Malý K. Beiträge zur Kenntnis der Flora Bosniens und der Herzegowina. U: Verhandlungen der Zoologisch-Botanischen Gesellschaft in Österreich. Uredio: Handlirsch A. Herausgegeben von der Gesellschaft. Wien:Die Gesellschaft,1904;54Meng:306.

156. Mamadalieva NZ, Herrmann F, El-Readi MZ, Tahrani A, Hamoud R, Egamberdieva DR, Azimova SS, Wink, M. Flavonoids in *Scutellaria immaculata* and *S. ramosissima* (Lamiaceae) and their biological activity. *J Pharm Pharmacol* 2011;63(10):1346–1357.
157. Mañez S, Recio MC, Giner RM, Sanz MJ, Terencio MC, Peris JB, Stübing G, Rios J. A chemotaxonomic review of the subtribe Crepidinae based on its phenol constituents. *Biochem Syst Ecol* 1994;22:297–305.
158. Marby TJ, Markham KR, Thomas MB. The systematic identification of flavonoids (1st Edn.). Springer-Verlag: New York Inc, 1970; 24.
159. Markham KR, Porter LJ. Luteolin 3',4'-di-*O*- β -D-glucuronide and luteolin 3'-*O*- β -D-glucuronide from *Lunularia cruciata*. *Phytochemistry* 1974;3:1553–1555.
160. Martinović T, Andjelković U, Gajdošik MŠ, Rešetar D, Josić D. Foodborne pathogens and their toxins. *J. Proteomics* 2016;147:226–235.
161. Matsuda H, Toguchida I, Ninomiya K, Kageura T, Morikawa T, Yoshikawa M. Effects of sesquiterpenes and amino acid-sesquiterpene conjugates from the roots of *Saussurea lappa* on inducible nitric oxide synthase and heat shock protein in lipopolysaccharide-activated macrophages. *Bioorganic Med Chem* 2003;11:709–715.
162. Mechikova GY, Kuzmich AS, Ponomarenko LP, Kalinovskiy AI, Stepanova TA, Fedorov SN, Stonik VA. Cancer-preventive activities of secondary metabolites from leaves of the bilberry *Vaccinium smallii* A. Gray. *Phytother Res* 2010;24(11):1730–1732.
163. Mendiondo ME, Juárez BE, Seeligmann P. Flavonoid patterns of some Barnadesioideae (Asteraceae). Eventual chemosystematic significance. *Biochem Syst Ecol* 1997;7(25):673–674.
164. Meng G, Chai K, Li X, Zhu Y, Huang W. Luteolin exerts pro-apoptotic effect and anti-migration effects on A549 lung adenocarcinoma cells through the activation of MEK/ERK signaling pathway. *Chem Biol Interact* 2016;257:26–34.
165. Merfort I. Perspectives on sesquiterpene lactones in inflammation and cancer. *Curr Drug Targets* 2011;12(11):1560-1573.
166. Mezzatesta ML, Gona F, Stefani S. *Enterobacter cloacae* complex: clinical impact and emerging antibiotic resistance. *Future Microbiol* 2012;7(7):887–902.
167. Michalska K, Stojakowska A, Malarz J, Doležalová I, Lebeda A, Kisiel W. Systematic implications of sesquiterpene lactones in *Lactuca* species. *Biochem Syst Ecol* 2009;37:174–179.
168. Micov AM. Antinociceptivni efekat, mehanizam dejstva i interakcije levetiracetama u modelima somatskog, visceralnog i neuropatskog bola (doktorska disertacija). Univerzitet u Beogradu-Farmaceutski fakultet, 2013.
169. Micov A, Pecikoza U. Anti-dementia medications—fighting a losing battle? *Arh Farm* 2020;70(2):55–68.
170. Milutinović V, Niketić M, Ušjak L, Nikolić D, Krunic A, Zidorn C, Petrović S. Methanol extracts of 28 *Hieracium* species from the Balkan Peninsula—Comparative LC–MS analysis, chemosystematic evaluation of their flavonoid and phenolic acid profiles and antioxidant potentials. *Phytochem Anal* 2018;29(1):30–47.
171. Min BS, Bae KH, Kim YH, Miyashiro H, Hattori M, Shimotohno K. Screening of Korean plants against human immunodeficiency virus type 1 protease. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives* 1999;13(8):680–682.
172. Miyase T, Ueno A, Noro T, Kuroyanagi M, Fukushima S. Studies on sesquiterpene glycosides from *Crepis japonica* Benth. *Chem Pharm Bull* 1985;33:4451–4456.
173. Miyase T, Yamada M, Fukushima S. Studies on sesquiterpene glycosides from *Prenanthes acerifolia* Benth. *Chem Pharm Bull* 1987;35:1969–1974.
174. Moore A, McQuay HJ. Cyclooxygenase inhibitors: clinical use. U: Wall and Melzack's textbook of pain. Uredili: McMahon SB, Koltzenburg M, Tracey I, Turk D. Philadelphia (PA), Elsevier Saunders, 2013, str. 455–464.

175. Morris CJ Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse. *Methods Mol Biol* 2003;225:115–121.
176. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983;65(1–2):55–63.
177. Mráz P, Chrtek J, Fehrer J, Placková I. Rare recent natural hybridization in *Hieracium* s. str. – evidence from morphology, allozymes and chloroplast DNA. *Plant Syst Evol* 2005;255(3–4):177–192.
178. Mráz P, Chrtek J, Fehrer J. Interspecific hybridization in the genus *Hieracium* s. str.: evidence for bidirectional gene flow and spontaneous allopolyploidization. *Plant Syst Evol* 2011;293(1–4):237–245.
179. Mráz P, Zdvořák P. Reproductive pathways in *Hieracium* s.s. (Asteraceae): strict sexuality in diploids and apomixis in polyploids. *Ann Bot* 2019;123(2):391–403.
180. Murade V, Deshmukh K, Murade R, Raut D, Chavan M, Hase D. Involvement of opioid receptors in antinociceptive activity of semi purified fraction and β -amyryn isolated from *Ricinus communis* Linn. leaves in mice. *Orient Pharm Exp Med* 2017;17(4):355–364.
181. Murray AP, Faraoni MB, Castro MJ, Alza NP, Cavallaro V. Natural AChE inhibitors from plants and their contribution to Alzheimer's disease therapy. *Curr Neuropharmacol* 2013;11(4):388–413.
182. Nabavi SF, Khan H, D'onofrio G, Šamec D, Shirooie S, Dehpour AR, Argüelles S, Habtemariam S, Sobarzo-Sanchez E. Apigenin as neuroprotective agent: of mice and men. *Pharmacol Res* 2018;128:359–365.
183. Nägeli C, Peter A. Die Hieracien Mittel-Europas. Oldenbourg, München, 1889;2: str. 289. Digitalni izvor:
https://books.google.rs/books?id=ohwiAQAAMAAJ&pg=PA224&hl=sr&source=gbs_toc_r&cad=3#v=onepage&q&f=false
184. Niketić M. *Hieracium blecicii*, a new species from Montenegro. - VIII OPTIMA Meeting, Abstracts, Sevilla, Spain, 1995, str. 122.
185. Niketić M. The *Hieracium gymnocephalum* complex: a taxonomic revision. *Uredio: Guttermann W. Contribution Abstracts of 6th Hieracium Workshop, Wien, 2002, str. 28.*
186. Niketić M, Bareka P, Kamari G. Karyosystematic study of selected *Hieracium* taxa (Compositae) from Durmitor Mt (Montenegro). *Bot Chron* 2003;16:23–45.
187. Niketić M, Vladimirov V, Mráz P. Chromosome numbers and taxonomic-chorological notes on selected species of *Hieracium* s. str. (Asteraceae) from Montenegro. *Phytol Balcan* 2006;12:85–97.
188. Niki E. Assessment of antioxidant capacity *in vitro* and *in vivo*. *Free Radical Bio Med* 2010;49(4):503–515.
189. Ndom JC, Mbafo J.T, Wansi JD, Kamdem AW, Meva LM, Vardamides JC, Toukam F, Pegyemb D, Ngando TM, Laatsch H, Fomum ZT. Sesquiterpene lactones from *Crepis cameroonica* (Asteraceae). *Nat Prod Res* 2006;20:435–442.
190. Nuñez M. *Micrococcus*. U: *Encyclopedia of food microbiology*. Uredili: Batt CA, Tortorello ML. Academic press, London, 2014.
191. Ohno M, Abe T. Rapid colorimetric assay for the quantification of leukemia inhibitory factor (LIF) and interleukin-6 (IL-6). *J Immunol Methods* 1991;145(1–2):199–203.
192. Olanow CW, Klein C, Schapira AHV. Parkinson's Disease. U: *Harrison's principles of internal medicine*. Uredili: Jameson JL, Fauci AS, Kasper DI, Hauser SI, Longo DI, Loscalzo J. McGraw-Hill Education, 2018.
193. Otuki MF, Ferreira J, Lima FV, Meyre-Silva C, Malheiros A, Muller LA, Cani GS, Santos ARS, Yunes RA, Calixto JB. Antinociceptive properties of mixture of α -amyryn and β -amyryn triterpenes: evidence for participation of protein kinase C and protein kinase A pathways. *J Pharmacol Exp Ther* 2005;313(1):310–318.
194. Özyürek M, Güçlü K, Apak R. The main and modified CUPRAC methods of antioxidant measurement. *TRAC-Trend Anal Chem* 2011;30(4):652–664.

195. Padilla-Gonzalez GF, dos Santos FA, Da Costa FB. Sesquiterpene lactones: More than protective plant compounds with high toxicity. *Crit Rev Plant Sci* 2016;35(1):18–37.
196. Pan D, Yu Z. Intestinal microbiome of poultry and its interaction with host and diet. *Gut microbes* 2014;5(1):108–119.
197. Pan Y, Zhang J, Zhao YL, Wang YZ, Jin H. Chemotaxonomic studies of nine Gentianaceae species from western China based on liquid chromatography tandem mass spectrometry and Fourier transform infrared spectroscopy. *Phytochem Anal* 2016;27:158–167.
198. Pančić J. *Elenchus plantarum vascularium quas aestate a. 1873 in Crna Gora*. In typ. status, Belgradi, 1875:57.
199. Pantocsek J. *Plantae novae quas aestate anni 1872 per Hercegovinam et Montenegro collexit et descripsit*. *Oesterr Bot Z* 1873;23:266.
200. Perveen S, Al-Taweel AM, Yusufoglu HS, Fawzy GA, Foudah A, Abdel-Kader MS. Hepatoprotective and cytotoxic activities of *Anvillea garcinii* and isolation of four new secondary metabolites. *J Nat Med* 2018;72:106–117.
201. Petrovaara A. Noradrenergic pain modulation. *Prog Neurobiol* 2006;80(2):53–83.
202. Petrović SD. Farmakognoski proučavanje *Hieracium plumulosum* A. Kerner Asteraceae (magistarska teza). Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet, Beograd, 1995.
203. Petrović SD, Gorunović MS, Vajs V, Đermanović M. Triterpenoids from *Hieracium plumulosum* A. Kerner, L., Asteraceae. *Pharmazie* 1996;51:996–997.
204. Petrović SD. Uperedno farmakognoski ispitivanje vrsta roda *Hieracium* L. (doktorska disertacija). Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet, Beograd, 1999.
205. Petrović SD, Löscher R, Gorunović MS, Merfort I. Flavonoid and phenolic acid patterns in seven *Hieracium* species. *Biochem Syst Ecol* 1999a;27:651–656.
206. Petrović SD, Gorunović MS, Wray V, Merfort I. A taraxasterol derivative and phenolic compounds from *Hieracium gymnocephalum*. *Phytochemistry* 1999b;50:293–296.
207. Petrović S, Dobrić S, Mimica-Dukić N, Simin N, Kukić J, Niketić M. The antiinflammatory, gastroprotective and antioxidant activities of *Hieracium gymnocephalum* extract. *Phyther Res* 2008;22:1548–1551.
208. Pickman AK. Antifungal activity of sesquiterpene lactones. *Biochem Syst Ecol* 1984;12(1):13–18.
209. Pinto SH, Pinto LMS, Guedes MA, Cunha GMA, Chaves MH, Santos FA, Rao VS. Antinociceptive effect of triterpenoid α , β -amyrin in rats on orofacial pain induced by formalin and capsaicin. *Phytomedicine* 2008;15(8):630–634.
210. Pollard SE, Kuhnle GG, Vauzour D, Vafeiadou K, Tzounis X, Whiteman M, Rice-Evans C, Spencer JPE. The reaction of flavonoid metabolites with peroxynitrite. *Biochem Bioph Res Commun* 2006;350:960–968.
211. Pope CN, Brimijoin S. Cholinesterases and the fine line between poison and remedy. *Biochem Pharmacol* 2018;153:205–216.
212. Pravilnik o listi lekova koji se propisuju i izdaju na teret sredstava obaveznog zdravstvenog osiguranja. *Službeni glasnik RS*, br. 43/19, 55/19, 56/19-ispisanka, 73/19, 87/19, 18/20, 43/20 i 108/20.
213. Pretsch E, Bühlmann P, Affolter C, Pretsch E, Bühlmann P, Affolter C. *Structure determination of organic compounds*. Berlin: Springer-Verlag, 2000.
214. Prieto MA, Curran TP, Gowen A, Vázquez JA. An efficient methodology for quantification of synergy and antagonism in single electron transfer antioxidant assays. *Food Res Int* 2015;67:284–298.
215. Pugliese AG, Tomas-Barberan FA, Truchado P, Genovese MI. Flavonoids, proanthocyanidins, vitamin C, and antioxidant activity of *Theobroma grandiflorum* (Cupuassu) pulp and seeds. *J Agric Food Chem* 2013;61:2720–2728.
216. Raja SN, Carr DB, Cohen M, Finnerup NB, Flor H, Gibson S, Keefe FJ, Mogil JS, Ringkamp M, Sluka KA, Song XJ, Stevens B, Sullivan MD, Tutelman PR, Ushida T, Vader K. The revised International Association for the Study of Pain definition of pain: concepts,

- challenges, and compromises. *Pain* 2020;161(9):1976–1982.
217. Ray B, Bhunia A. *Fundamental food microbiology*. CRC press, Taylor & Francis Group, LLC, New York, 2014.
218. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Bio Med* 1999;26(9-10):1231–1237.
219. Rieseberg LH. Hybrid origin of plant species. *Annu Rev Ecol Syst* 1997;28:359–389.
220. Reichenbach HG. *Icones florae Germanicae et Helveticae simul Pedemontanae, Lombardovenetae, Istriacae, Dalmaticae, Hungaricae, Transsylvanicae, Borussicae, Danicae, Belgicae, Hollandicae, Alsaticae, ergo mediae Europae*. *Iconographia et supplementum ad opera Willdenowii, Schkuhrii, Persoonii, Decandollii, Gaudini, Kochii aliorumque, nuperrime detectis novitiis additis exhibens collectionem compendiosam imaginum characteristicarum omnium generum atque specierum quas in Flora Germanica excursoria recensitarum auctoribus*. Lipsiae: sumptibus Ambrosii Abel (Lipsiae, typis J. S. Wassermann), 1859;19(1):100.
221. de Rijke E, Out P, Niessen WM, Ariese F, Gooijer C, Udo AT. Analytical separation and detection methods for flavonoids. *J Chromatogr A* 2006;1112(1–2):31–63.
222. Riss TL, Moravec RA, Niles AL, et al. *Cell Viability Assays*. 2013 May 1 [Updated 2016 Jul 1]. U: Assay Guidance Manual. Uredili: Markossian S, Sittampalam GS, Grossman A, i sar. Bethesda (MD), Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, 2004-. Digitalni izvor: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>
223. Ritter J, Flower RJ, Henderson G, Loke YK, MacEwan DJ, Rang HP. *Rang and Dale's pharmacology*, 9th ed. Churchill Livingstone, 2020.
224. Sadeer BN, Montesano D, Albrizio S, Zengin G, Mahomoodally MF. The versatility of antioxidant assays in food science and safety—chemistry, applications, strengths, and limitations. *Antioxidants* 2020;9(8):1–39.
225. 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(11):2236–2240.
226. Sareedenchai V, Zidorn C. Flavonoids as chemosystematic markers in the tribe Cichorieae of the Asteraceae. *Biochem Syst Ecol* 2010;38(5):935–957.
227. Schischkin BK, Bobov EG. *Hieracium* L. (Compositae Giseke - Asteraceae Dumort). U: *Flora of the USSR*, Volume 30. Uredili: Shetler SG, Fet GN, Unumb EA. Amerind Publishing Co. Pvt. Ltd., New Delhi, 2002:1–683.
228. Schneider W. *Lexicon zur Arzneimittellgeschichte, Band V/2: Pflanzliche Drogen, D-O*, Govi-Verlag GmbH-Pharmazeutischer Verlag, Frankfurt, 1974, str. 171–172.
229. Schuhwerk F. Chromosomenzahlen von *Hieracium*, Teil 5. *Ber Deutsch Bot Ges* 2010;80:141–160.
230. Schuhwerk F, Lippert W. Chromosomenzahlen von *Hieracium* (Compositae, Lactuceae) Teil 2. *Sendtnera* 1998;4:181–206.
231. Seeley WW, Miller BL. *Alzheimer's disease*. U: *Harrison's principles of internal medicine*. Uredili: Jameson JL, Fauci AS, Kasper DI, Hauser SI, Longo DI, Loscalso J. McGraw-Hill Education, 2018.
232. Sell P, Murrell, G. *Hieracium* L. U: *Flora of Great Britain and Ireland: Volume 4, Campanulaceae-Asteraceae*. Cambridge University Press: Cambridge, 2006.
233. Sell PD, West C. Materials for a flora of Turkey XXX. *Hieracium*. *Notes Roy Bot Gard Edinburgh*, 1974;33: str. 241–248.
234. Sell PD, West C. *Hieracium* L. U: *Flora Europaea*, Vol 4. Uredili: Tutin TG, Heywood VH, Burges VH, Moore DM, Valentine DH, Walters SM, Webb DA. Cambridge University Press: Cambridge, 1976, str. 358–410.
235. Sennikov AN, Illarionova ID. Carpological studies in Asteraceae – Cichorieae, 1. subtribe Hieraciinae. *Komarovia* 2002;2:97–125.

236. Serres H. Bull Soc Bot France 1856:276.
237. Shan LY, Thing TC, Ping TS, Awang K, Hashim NM, Nafiah MA, Ahmad K. Cytotoxic, antibacterial and antioxidant activity of triterpenoids from *Kopsia singaporensis* Ridl. J Chem Pharm Res 2014;6(5):815–822.
238. Shi P, Zhang Y, Qu H, Fan X. Systematic characterisation of secondary metabolites from *Ixeris sonchifolia* by the combined use of HPLC-TOFMS and HPLC-ITMS. Phytochem Anal 2011;22:66–73.
239. Shvets KY, Akhmetova GR, Baymiev AH, Mavzyutov AA, Baymiev AH, Khabirova AD, Zakirova GN, Khasanova GF. The microdilution method—universal method for determining the minimum inhibitory concentrations of substances of different nature. Bacteriology 2019;4(3):7–13.
240. da Silva KAS, Paszcuk AF, Passos GF, Silva ES, Bento AF, Meotti FC, Calixto J. B. Activation of cannabinoid receptors by the pentacyclic triterpene α , β -amyrin inhibits inflammatory and neuropathic persistent pain in mice. PAIN 2011;152(8):1872–1887.
241. Simonović D. Botanički rečnik. SANU. Posebna izdanja, knjiga CCCXVIII. Institut za srpskohrvatski jezik. Knjiga 3. Beograd, 1959.
242. Smiljković M, Stanisavljević D, Stojković D, Petrović I, Vicentić JM, Popović J, Golić Grdadolnik S, Marković D, Sankovic-Babice S, Glamoclija J, Stevanović, M, Soković M. Apigenin-7-*O*-glucoside versus apigenin: Insight into the modes of anticandidal and cytotoxic actions. EXCLI J 2017;16:795–807.
243. Soltis PS, Soltis DE. The role of hybridisation in plant speciation. Annu Rev Plant Biol 2009;60:561–588.
244. Stace CA. Sectional names in the genus *Hieracium* (Asteraceae) sensu stricto. Edinb J Bot 1998;55:417–441.
245. Stefanova E, rukovodilac. Nacionalni vodič dobre kliničke prakse za dijagnostikovanje i lečenje Alchajmerove bolesti. Uredio: Čovičković Šternić N. Republička stručna komisija za izradu i implementaciju vodiča dobre kliničke prakse, Beograd, 2013.
246. Stepanović-Petrović RM, Tomić MA, Vučković SM, Paranos S, Ugrešić ND, Prostran MS, Milovanović S, Bošković B. The antinociceptive effects of anticonvulsants in a mouse visceral pain model. Anesth Analg 2008;106:1897–1903.
247. Stepanović-Petrović RM, Micov AM, Tomić MA, Ugrešić ND. The local peripheral antihyperalgesic effect of levetiracetam and its mechanism of action in an inflammatory pain model. Anesth Analg 2012;115:1457–1466.
248. Stepanović-Petrović RM, Micov AM, Tomić MA, Kovačević JM, Bošković BD. Antihyperalgesic/antinociceptive effects of ceftriaxone and its synergistic interactions with different analgesics in inflammatory pain in rodents. Anesthesiology 2014;120:737–775.
249. Stevanović V, Vladimirov V, Niketić M, Vukojičić S, Jakovljević K, Lubarda B, Tomović G. Plant species and subspecies discovered by Dr. Josif Pančić 1—distribution and floristic importance. Bot Serb 2014;38(2):251–268.
250. Strum J. Deutschlands flora in abbildungen nach der natur. Nurnberg :Gedruckt auf kosten des verfassers, 1817;1(10):159.
251. Szeląg Z. Hieracia balcanica II. Taxonomic and nomenclature notes on *Hieracium calophyllum* and its relatives (Asteraceae). Feddes Repert 2002;113(7–8):503–510.
252. Szeląg Z. A synopsis of *Hieracium* sect. *Cernua* (Asteraceae). Polish Bot J 2003;48(2):89–97.
253. Szeląg Z. Hieracia balcanica X. Typification of the *Hieracium* (Asteraceae) names described by KH Zahn from the Balkan Peninsula. Pol Bot J 2015;60(1):41–65.
254. Szelag Z, Ilnicki T. Diploid chromosome numbers in *Hieracium* and *Pilosella* (Asteraceae) from Macedonia and Montenegro. Acta Biol Crac Ser Bot 2011;53(2):124–126.
255. Szeląg Z, Ilnicki T, Niketić M, Tomović G. Diploid chromosome numbers in five *Hieracium* species from Serbia and Montenegro. Acta Biol Crac Ser Bot 2007;49(1):119–121.

256. Švehlíková V, Mráz P, Piacente S, Marhold K. Chemotaxonomic significance of flavonoids and phenolic acids in the *Hieracium rohacsense* group (*Hieracium* sect. *Alpina*; Lactuceae, Compositae). *Biochem Syst Ecol* 2002;30:1037–1049.
257. Štorchová H, Chrtek J, Bartish IV, Tetera M, Kirschner J, Štěpánek J. Genetic variation in agamosperous taxa of *Hieracium* sect. *Alpina* (Compositae) in the Tatry Mts. (Slovakia). *Plant Syst Evol* 2002;235:1–17.
258. Tambe R, Patil A, Jain P, Sancheti J, Somani G, Sathaye S. Assessment of luteolin isolated from *Eclipta alba* leaves in animal models of epilepsy. *Pharm Biol* 2017;55(1):264–268.
259. Tatli II, Akdemir ZS, Yesilada E, Küpeli E. Anti-inflammatory and antinociceptive potential of major phenolics from *Verbascum salviifolium* Boiss. *Z Naturforsch C J Biosci* 2008;63(3–4):196–202.
260. Tausch IF. Bemerkungen über *Hieracium* und einige verwandte Gattungen. *Flora* 11, Ergänzungsblätter 1. 1828:49–81.
261. Tepe B, Sokmen M, Askin Akpulat H, Yumrutas O, Sokmen A. Screening of antioxidative properties of the methanolic extracts of *Pelargonium endlicherianum* Fenzl., *Verbascum wiedemannianum* Fisch. & Mey., *Sideritis libanotica* Labill. subsp. *linearis* (Benth) Borm., *Centaurea mucronifera* DC. and *Hieracium cappadocicum* Freyn from Turkish flora. *Food Chem* 2006;98:9–13.
262. Tolonen A, Joutsamo T, Mattila S, Kämäräinen T, Jalonen J. Identification of isomeric dicaffeoylquinic acids from *Eleutherococcus senticosus* using HPLC-ESI/TOF/MS and 1H-NMR methods. *Phytochem Anal* 2002;13(6):316–328.
263. Tomić M, Pecikoza U, Micov A, Vučković S, Stepanović-Petrović R. Antiepileptic drugs as analgesics/adjuvants in inflammatory pain: current preclinical evidence. *Pharmacol Ther* 2018;192:42–64.
264. 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.
265. Tsukatani T, Suenaga H, Shiga M, Noguchi K, Ishiyama M, Ezoe T, Matsumoto K. Comparison of the WST-8 colorimetric method and the CLSI broth microdilution method for susceptibility testing against drug-resistant bacteria. *J Microbiol Methods* 2012;90(3):160–166.
266. Tyler T. Förslag till ny taxonomisk indelnig ac stångfibblorna (*Pilosella*) i Norden (The genus *Pilosella* in the Nordic countries). *Svensk Botanisk Tidskrift* 2001;95:39–67.
267. Tyler T, Jönsson J. Patterns of plastid and nuclear variation among apomictic polyploids of *Hieracium*: evolutionary processes and taxonomic implications. *Ann Bot* 2013;111:591–609.
268. Tundis R, Loizzo MR, Menichini F. Natural products as α -amylase and α -glucosidase inhibitors and their hypoglycaemic potential in the treatment of diabetes: an update. *Mini Rev Med Chem*, 2010;10(4):315–331.
269. de Uechtritz R. *Hieracium calophyllum* (n. sp.). *Oesterr Bot Z* 1874;106–108.
270. Ugrešić N, urednik. *Farmakoterapijski vodič*. Beograd: Agencija za lekove i medicinska sredstva Srbije, 2016.
271. Ušjak LJ, Petrović SD, Drobac MM, Soković MD, Stanojković TP, Ćirić AD, Grozdanić NĐ, Niketić MS. Chemical composition, antimicrobial and cytotoxic activity of *Heracleum verticillatum* Pančić and *H. ternatum* Velen. (Apiaceae) essential oils. *Chem Biodiver* 2016;13(4):466–476.
272. 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.
273. Villars D. *Prospectus de l'histoire des plantes de Dauphiné: et d'une nouvelle méthode de botanique, suivi d'un catalogue des plantes*. Imprimerie royale, 1779; str. 34.
274. Vivancos GG, Verri WA Jr, Cunha TM, Schivo IR, Parada CA, Cunha FQ, Ferreira SH. An electronic pressure-meter nociception paw test for rats. *Braz J Med Biol Res* 2004;37:391–399.

275. Vladimirov V. Diploid species of genus *Hieracium* s.l. in Bulgaria. Abh Ber Naturkundemus Görnitz 2000;72:1–16.
276. Vladimirov V, Szelağ Z. A new diploid species of *Hieracium* sect. *Pannosa* (Asteraceae) from Bulgaria. Bot J Linn Soc 2006;150(2):261–265.
277. Walle T. Absorption and metabolism of flavonoids. Free Radical Bio Med 2004;36(7):829–837.
278. Wang YJ, Zhou SM, Xu G, Gao YQ. Interference of phenylethanoid glycosides from *Cistanche tubulosa* with the MTT Assay. Molecules 2015;20(5):8060–8071.
279. Willdenow KL. Species plantarum. Editio quarta. Berolini: Impensis G.C. Nauk, 1803;3(3):1562.
280. Wold S, Esbensen K, Geladi P. Principal component analysis. Chemometr Intell Lab Syst 1987;2(1-3):37–52.
281. Wollenweber E, Dörr M, Fritz H, Valant-Vetschera KM. Exudate flavonoids in several Asteroideae and Cichorioideae (Asteraceae). Z Naturforsch C 1997;52:137–143.
282. Woods JR, MoH, Bieberich AA, Alavanja T, Colby DA. Amino-derivatives of the sesquiterpene lactone class of natural products as prodrugs. Med Chem Comm 2013;4:27–33.
283. World Health Organization, FAO. Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods: interpretative summary (No. 4). Food & Agriculture Org, 2004.
284. World Health Organization. National antimicrobial resistance surveillance systems and participation in the Global Antimicrobial Resistance Surveillance System (GLASS): a guide to planning, implementation, and monitoring and evaluation (No. WHO/DGO/AMR/2016.4). 2016.
285. World Health Organization. World health statistics 2020: monitoring health for the SDGs, sustainable development goals. 2020.
286. Wu ZJ, Xu XK, Zeng HW, Shen YH, Tian JM, Su J, Li HL, Shan L, Liu RH, Zhang WD. New sesquiterpenoids from *Ainsliaea macrocephala* and their nitric oxide inhibitory activity. Planta Med 2011;77:1545–1550.
287. Xie Y, Yang W, Tang F, Chen X, Ren L. Antibacterial activities of flavonoids: structure-activity relationship and mechanism. Curr Med Chemi 2015;22(1):132–149.
288. Xu JJ, Huang HQ, Zeng GZ, Tan NH. Cytotoxic sesquiterpenes and lignans from *Saussurea deltoidea*. Fitoterapia 2012;83(6):1125–1130.
289. Yang MC, Choi SU, Choi WS, Kim SY, Lee KR. Guaiane sesquiterpene lactones and amino acid-sesquiterpene lactone conjugates from the aerial parts of *Saussurea pulchella*. J Nat Prod 2008;71:678–683.
290. Yang YJ, Yao J, Jin XJ, Shi ZN, Shen TF, Fang JG, Yao XJ, Zhu Y. Sesquiterpenoids and tirucallane triterpenoids from the roots of *Scorzonera divaricata*. Phytochemistry 2016;124:89–98.
291. Yener I, Kocakaya SO, Ertas A, Erhan B, Kaplaner E, Oral EV, Yilmaz-Ozden T, Abdullah Yilmaz M, Ozturk M, Kolak U. Selective *in vitro* and *in silico* enzymes inhibitory activities of phenolic acids and flavonoids of food plants: relations with oxidative stress. Food Chem 2020;127045:1–9.
292. Yonathan M, Asres K, Assefa A, Bucar F. *In vivo* anti-inflammatory and anti-nociceptive activities of *Cheilanthes farinosa*. J Ethnopharmacol 2006;108(3):462–470.
293. Yoshikawa M, Hatakeyama S, Inoue Y, Yamahara J. Saussureamines A, B, C, D, and E, new anti-ulcer principles from Chinese *Saussureae* radix. Chem Pharm Bull 1993;41:214–216.
294. Yu L, Zhong-Jian J. Guaianolides from *Saussurea involucreta*. Phytochemistry 1989;28:3395–3397.
295. Zahn KH. *Hieracium*. U: Synopsis der Deutschen und Schweizer Flora. 3. Auflage. Bd. 2. Uredio: Koch WDJ. Reisland. Leipzig, 1900-1902: str. 1794.
296. Zahn KH. Beiträge zur Kenntnis der Archhieracien Ungarns und der Balkanländer I. Magyar Botanikai Lapok 1906;5:62–94.

297. Zahn KH. Beiträge zur Kenntnis der Archhieracien Ungarns und der Balkanländer II. Magyar Botanikai Lapok 1907;6:218.
298. Zahn KH. *Hieracia* Montenegrina nova a J. Rohlena in principatu Cerna Gora lecta. U: Repertorium Novarum Specierum Regni Vegetabilis. Uredio: Fedde FKG. Selbstverlag des Herausgebers 1909;6, str. 225–241.
299. Zahn KH. Compositae (*Hieracium*). U: Das Pflanzenreich. Regni Vegeabilis Conspectus, IV. 280. Uredili: Engler A. Wilhelm Engelmann, Leipzig, 1921–1923, str. 1–288, 577–864.
300. Zahn KH. *Hieracium* L. U: Synopsis der mitteleuropäischen Flora, 12(2). Uredili: Ascherson PFA, Graebner KOPP. Leipzig, 1930, str. 1–160.
301. Zahn KH. *Hieracium* L. U: Ergebnisse einer botanischen Reise in den Bertiscus (Nordalbanische Alpen). Uredio: Rechinger KHF. Repertorium specierum novarum regni vegetabilis. Centralblatt für Sammlung und Veröffentlichung von Einzeldiagnosen Neuer Pflanzen. Herausgeber von Just's Botanischen Jahresberichte. Band XXXVIII. Uredio: Fedde F. Berlin-Dahlem: Selbstverlag des Herausgebers, Berlin, 1935;38(13–25), str. 319–389.
302. Zahn KH. Compositae (*Hieracium*). Synopsis der Mitteleuropäischen Flora. Vol. 12(3). Uredio: Graebner P. fil. Gebrüder Borntraeger, Leipzig, 1936, str. 1–320.
303. Zaima K, Wakana D, Demizu Y, Kumeta Y, Kamakura H, Maruyama T, Kurihara M, Goda Y. Isoheleproline: A new amino acid-sesquiterpene adduct from *Inula helenium*. J Nat Med 2014;68:432–435.
304. Zhang J, Zhu WF, Xu J, Kitdamrongtham W, Manosroi A, Manosroi J, Tokuda H, Abe M, Akihisa T, Feng, F. Potential cancer chemopreventive and anticancer constituents from the fruits of *Ficus hispida* L.f. (Moraceae). J Ethnopharmacol 2018;214:37–46.
305. Zheleva-Dimitrova D, Gevrenova R, Zaharieva MM, Najdenski H, Ruseva S, Lozanov V, Balabanova V, Yagi S, Momekov G, Mitev V. HPLC-UV and LC-MS analyses of acylquinic acids in *Geigeria alata* (DC) Oliv. & Hiern. and their contribution to antioxidant and antimicrobial capacity. Phytochem Anal 2017;28:176–184.
306. Zeilhofer HU, Brune K. Analgesic strategies beyond the inhibition of cyclooxygenases. Trends Pharmacol Sci 2006;27(9):467–474.
307. Zheng PW, Chiang LC, Lin CC. Apigenin induced apoptosis through p53-dependent pathway in human cervical carcinoma cells. Life Sci 2005;76(12):1367–1379.
308. Zhu X, Zhang H, Lo R. Phenolic compounds from the leaf extract of artichoke (*Cynara scolymus* L.) and their antimicrobial activities. J Agric Food Chem 2004;52(24):7272–7278.
309. Zidorn C, Ellmerer-Müller EP, Stuppner H. A germacranolide and three hydroxybenzyl alcohol derivatives from *Hieracium murorum* and *Crepis bocconi*. Phytochem Anal 2001;12:281–285.
310. Zidorn C, Stuppner H. Evaluation of chemosystematic characters in the genus *Leontodon* (Asteraceae). Taxon 2001;50:115–133.
311. Zidorn C, Gottschlich G, Stuppner H. Chemosystematic investigations on phenolics from flowerheads of Central European taxa of *Hieracium* sensu lato (Asteraceae). Plant Syst Evol 2002;231:39–58.
312. Zidorn C. Sesquiterpene lactones and their precursors as chemosystematic markers in the tribe Cichorieae of the Asteraceae. Phytochemistry 2008;69:2270–2296.
313. Zidorn C, Schubert B, Stuppner H. Phenolics as chemosystematic markers in and for the genus *Crepis* (Asteraceae, Cichorieae). Sci Pharm 2008;76:743–750.
314. Zimmerman G, Soreq H. Termination and beyond: acetylcholinesterase as a modulator of synaptic transmission. Cell Tissue Res 2006;326:655–669.
315. Ziyang L, Yongmei Z, Nan Z, Ning T, Baolin L. Evaluation of the anti-inflammatory activity of luteolin in experimental animal models. Planta Med 2007;73(3):221–226.
316. Zong Y, Yu M, Huang L, Chang Y, Wang Y, Che CT. Studies of Tibetan medicinal plants II. Antitumour activity of *Saussurea eopygmaea*. Int J Pharmacogn 1994;32(3):284–293.

PRILOZI

Prilog 1.

Tabela P1. Prethodno identifikovane fenolkarboksilne kiseline u taksonima roda *Hieracium* s. str.

Jedinjenje	Takson	Biljni organ	Referenca
Hlorogenska kiselina (29)	<i>H. compositum</i> ; <i>H. amplexicaule</i>	Herba	Manez i sar., 1994; Giner i sar., 1992
	<i>H. gymnocephalum</i> ; <i>H. suborienii</i> ; <i>H. blecicii</i> ; <i>H. coloriscapum</i> ; <i>H. guentheri-beckii</i> ; <i>H. naegelianum</i> ; <i>H. rotundatum</i>	Herba	Petrović i sar., 1999a
	<i>H. rohacsense</i> ; <i>H. borsanum</i>	List	Švehlíková i sar., 2002
	<i>H. ratezaticum</i> <i>H. pseudocaesium</i>		
	<i>H. alpinum</i> ; <i>H. amplexicaule</i> ; <i>H. atratum</i> ; <i>H. bifidum</i> subsp. <i>caesiiflorum</i> ; <i>H. bocconeii</i> subsp. <i>bocconeii</i> ; <i>H. brevifolium</i> ; <i>H. glaucinum</i> ;	Cvast	Zidorn i sar., 2002
	<i>H. glaucinum</i> subsp. <i>basalticum</i> ; <i>H. glaucinum</i> subsp. <i>heteroschistum</i> ; <i>H. gorfenianum</i> ; <i>H. inuloides tridentatifolium</i> ; <i>H. jurassicum</i> ; <i>H. kofelicum</i> ; <i>H. kuekenthalianum</i> ; <i>H. laevigatum</i> subsp. <i>laevigatum</i> ;		
	<i>H. lycopifolium</i> subsp. <i>lycopifolium</i> ; <i>H. macilentum</i> ;		
	<i>H. maculatum</i> subsp. <i>commixtum</i> ; <i>H. maculatum</i> subsp. <i>maculatum</i> ;		
	<i>H. onosmoides</i> subsp. <i>crinigerum</i> ; <i>H. oxyodon</i> subsp. <i>muretii</i> ; <i>H. picroides</i> ;		
	<i>H. piliferum</i> subsp. <i>piliferum</i> ; <i>H. pilosum</i> ; <i>H. porrifolium</i> subsp. <i>porrifolium</i> ;		
<i>H. pospichalii</i> subsp. <i>pospichalii</i> ; <i>H. prenanthoides</i> subsp. <i>bupleurifolioides</i> ;			
<i>H. racemosum</i> ; <i>H. sabaudum</i> ; <i>H. saxifragum</i> subsp. <i>vulpaii</i> ; <i>H. sommerfeltii</i> ;			
<i>H. schmidtii</i> subsp. <i>graniticum</i> ; <i>H. sparsum</i> subsp. <i>vierhapperi</i> ;			
<i>H. umbellatum</i> subsp. <i>umbellatum</i> ; <i>H. venostorum</i> ; <i>H. vetteri</i> ;			
<i>H. villosum</i> subsp. <i>villosum</i> ; <i>H. wiesbaurianum</i> subsp. <i>semicinerascens</i>			
<i>H. bornmuelleri</i>	Herba; podzemni organi	Bakar i sar., 2015	
<i>H. pannosum</i>	List, cvast, koren	Gökbulut i sar., 2017	
Izohlorogenska kiselina (30)	<i>H. compositum</i> ; <i>H. amplexicaule</i>	Herba	Manez i sar., 1994; Giner i sar., 1992
			Petrović i sar., 1999a
3,5-Di-O-kafeoilhina kiselina (31)	<i>H. gymnocephalum</i> ; <i>H. suborienii</i> ; <i>H. blecicii</i> ; <i>H. coloriscapum</i> ; <i>H. guentheri-beckii</i> ; <i>H. naegelianum</i> ; <i>H. rotundatum</i>	Herba	Petrović i sar., 1999a
	<i>H. rohacsense</i> ; <i>H. borsanum</i> ; <i>H. ratezaticum</i> ; <i>H. pseudocaesium</i>	List	Švehlíková i sar., 2002
	<i>H. alpinum</i> ; <i>H. amplexicaule</i> ; <i>H. atratum</i> ; <i>H. bifidum</i> subsp. <i>caesiiflorum</i> ;	Cvast	Zidorn i sar., 2002
	<i>H. bocconeii</i> subsp. <i>bocconeii</i> ; <i>H. brevifolium</i> ; <i>H. glaucinum</i> ;		

Jedinjenje	Takson	Biljni organ	Referenca
	<i>H. glaucinum</i> subsp. <i>basalticum</i> ; <i>H. glaucinum</i> subsp. <i>heteroschistum</i> ; <i>H. gorfenianum</i> ; <i>H. inuloides</i> subsp. <i>tridentatifolium</i> ; <i>H. jurassicum</i> ; <i>H. kofelicum</i> ; <i>H. kuekenthalianum</i> ; <i>H. laevigatum</i> subsp. <i>laevigatum</i> ; <i>H. lycopifolium</i> subsp. <i>lycopifolium</i> ; <i>H. macilentum</i> ; <i>H. maculatum</i> subsp. <i>commixtum</i> ; <i>H. maculatum</i> subsp. <i>maculatum</i> ; <i>H. onosmoides</i> subsp. <i>crinigerum</i> ; <i>H. oxyodon</i> subsp. <i>muretii</i> ; <i>H. picroides</i> ; <i>H. piliferum</i> subsp. <i>piliferum</i> ; <i>H. pilosum</i> ; <i>H. porrifolium</i> subsp. <i>porrifolium</i> ; <i>H. pospichalii</i> subsp. <i>pospichalii</i> ; <i>H. prenanthoides</i> subsp. <i>bupleurifolioides</i> ; <i>H. racemosum</i> ; <i>H. sabaudum</i> ; <i>H. saxifragum</i> subsp. <i>vulpiae</i> ; <i>H. sommerfeltii</i> ; <i>H. schmidtii</i> subsp. <i>graniticum</i> ; <i>H. sparsum</i> subsp. <i>vierhapperi</i> ; <i>H. umbellatum</i> subsp. <i>umbellatum</i> ; <i>H. venostorum</i> ; <i>H. vetteri</i> ; <i>H. villosum</i> subsp. <i>villosum</i> ; <i>H. wiesbaurianum</i> subsp. <i>semicinerascens</i>		
3,4-Di-O-kafeoilhina kiselina (32)	<i>H. compositum</i> ; <i>H. amplexicaule</i>	Herba	Giner i sar., 1992
1,5-Di-O-kafeoilhina kiselina (33)	<i>H. gymnocephalum</i> ; <i>H. suborienii</i> ; <i>H. blecicii</i> ; <i>H. guentheri-beckii</i> ; <i>H. naegelianum</i> ; <i>H. rotundatum</i>	Herba	Petrović i sar., 1999a
4,5-Di-O-kafeoilhina kiselina (34)	<i>H. alpinum</i> ; <i>H. amplexicaule</i> ; <i>H. atratum</i> ; <i>H. bifidum</i> subsp. <i>caesiiflorum</i> ; <i>H. bocconei</i> subsp. <i>bocconei</i> ; <i>H. brevifolium</i> ; <i>H. glaucinum</i> ; <i>H. glaucinum</i> subsp. <i>basalticum</i> ; <i>H. glaucinum</i> subsp. <i>heteroschistum</i> ; <i>H. gorfenianum</i> ; <i>H. inuloides</i> subsp. <i>tridentatifolium</i> ; <i>H. jurassicum</i> ; <i>H. kofelicum</i> ; <i>H. kuekenthalianum</i> ; <i>H. laevigatum</i> subsp. <i>laevigatum</i> ; <i>H. lycopifolium</i> subsp. <i>lycopifolium</i> ; <i>H. macilentum</i> ; <i>H. maculatum</i> subsp. <i>commixtum</i> ; <i>H. maculatum</i> subsp. <i>maculatum</i> ; <i>H. onosmoides</i> subsp. <i>crinigerum</i> ; <i>H. oxyodon</i> subsp. <i>muretii</i> ; <i>H. picroides</i> ; <i>H. piliferum</i> subsp. <i>piliferum</i> ; <i>H. pilosum</i> ; <i>H. porrifolium</i> subsp. <i>porrifolium</i> ; <i>H. pospichalii</i> subsp. <i>pospichalii</i> ; <i>H. prenanthoides</i> subsp. <i>bupleurifolioides</i> ; <i>H. racemosum</i> ; <i>H. sabaudum</i> ; <i>H. saxifragum</i> subsp. <i>vulpiae</i> ; <i>H. sommerfeltii</i> ; <i>H. schmidtii</i> subsp. <i>graniticum</i> ; <i>H. sparsum</i> subsp. <i>vierhapperi</i> ; <i>H. umbellatum</i> subsp. <i>umbellatum</i> ; <i>H. venostorum</i> ; <i>H. vetteri</i> ; <i>H. villosum</i> subsp. <i>villosum</i> ; <i>H. wiesbaurianum</i> subsp. <i>semicinerascens</i>	Cvast	Zidorn i sar., 2002

Tabela P2. Prethodno identifikovani flavonoidi u taksonima roda *Hieracium* s. str

Tip	Jedinjenje	Takson	Biljni organ	Referenca	
Flavon	Apigenin (1)	<i>H. murorum</i> subsp. <i>grandidens</i> var. <i>minoriceps</i>	Herba	Haag-Berrurier i Duquenois, 1969	
		<i>H. umbellatum</i>	Cela biljka	Guppy i Bohm, 1976	
		<i>H. compositum</i> ; <i>H. amplexicaule</i>	Herba	Manez i sar., 1994; Giner i sar., 1992	
		<i>H. suborienii</i> ; <i>H. rotundatum</i>	Herba	Petrović i sar., 1999a	
		<i>H. pannosum</i>	List i cvast	Gökbulut i sar., 2017	
		Apigenin 7- <i>O</i> -arabinozid (2)	<i>H. umbellatum</i>	Cela biljka	Guppy i Bohm, 1976
		Apigenin 4'- <i>O</i> -arabinozid (3)	<i>H. umbellatum</i>	Cela biljka	Guppy i Bohm, 1976
		Apigenin 7- <i>O</i> -glukozid (4)	<i>H. umbellatum</i>	Cela biljka	Guppy i Bohm, 1976
			<i>H. compositum</i> ; <i>H. amplexicaule</i>	Herba	Manez i sar., 1994; Giner i sar., 1992
		Apigenin 4'- <i>O</i> -glukozid (5)	<i>H. gymnocephalum</i> ; <i>H. suborienii</i> ; <i>H. bleicii</i> ; <i>H. coloriscapum</i> ; <i>H. guentheri-beckii</i>	Herba	Petrović i sar., 1999a
<i>H. umbellatum</i>	Cela biljka			Guppy i Bohm, 1976	
<i>H. alpinum</i> ; <i>H. amplexicaule</i> ; <i>H. atratum</i> ;	Cvast			Zidorn i sar., 2002	
<i>H. bifidum</i> subsp. <i>caesiiflorum</i> ; <i>H. bocconei</i> subsp. <i>bocconei</i> ;					
<i>H. brevifolium</i> ; <i>H. glaucinum</i> ; <i>H. glaucinum</i> subsp. <i>basalticum</i> ;					
<i>H. glaucinum</i> subsp. <i>heteroschistum</i> ; <i>H. gorfenianum</i> ;					
<i>H. inuloides</i> subsp. <i>tridentatifolium</i> ; <i>H. jurassicum</i> ; <i>H. kofelicum</i> ;					
<i>H. kuekenthalianum</i> ; <i>H. laevigatum</i> subsp. <i>laevigatum</i> ;					
<i>H. lycopifolium</i> subsp. <i>lycopifolium</i> ; <i>H. macilentum</i> ;					
<i>H. maculatum</i> subsp. <i>commixtum</i> ; <i>H. maculatum</i> subsp. <i>maculatum</i> ;					
<i>H. onosmoides</i> subsp. <i>crinigerum</i> ; <i>H. oxyodon</i> subsp. <i>muretii</i> ;					
<i>H. picroides</i> ; <i>H. piliferum</i> subsp. <i>piliferum</i> ; <i>H. pilosum</i> ;					
<i>H. porrifolium</i> subsp. <i>porrifolium</i> ; <i>H. pospichalii</i> subsp. <i>pospichalii</i> ;					
<i>H. prenanthoides</i> subsp. <i>bupleurifolioides</i> ; <i>H. racemosum</i> ;					
<i>H. sabaudum</i> ; <i>H. saxifragum</i> subsp. <i>vulpii</i> ;					
<i>H. sparsum</i> subsp. <i>vierhapperi</i> ; <i>H. umbellatum</i> subsp. <i>umbellatum</i> ;					
<i>H. venostorum</i> ; <i>H. vetteri</i> ; <i>H. villosum</i> subsp. <i>villosum</i> ;					
<i>H. wiesbaurianum</i> subsp. <i>semicinerascens</i>					
Apigenin 7- <i>O</i> -glukuronid (6)	<i>H. umbellatum</i>	Cela biljka	Guppy i Bohm, 1976		
Apigenin 4'- <i>O</i> -glukuronid (7)	<i>H. rohacsense</i> ; <i>H. borsanum</i>	List	Švehlíková i sar., 2002		
	<i>H. ratezaticum</i> ; <i>H. pseudocaesium</i>				
Apigenin 7- <i>O</i> -arabinozilglukozid (8)	<i>H. umbellatum</i>	Cela biljka	Guppy i Bohm, 1976		
Apigenin 7- <i>O</i> -rutinozid (9)	<i>H. umbellatum</i>	Cela biljka	Guppy i Bohm, 1976		
Apigenin 7,4'- <i>O</i> -dimetil etar (10)	<i>H. amplexicaule</i>	List	Wollenweber i sar, 1984		

Tip	Jedinjenje	Takson	Biljni organ	Referenca
	Luteolin (11)	<i>H. murorum</i> subsp. <i>grandidens</i> var. <i>minoriceps</i> <i>H. umbellatum</i> <i>H. compositum</i> ; <i>H. amplexicaule</i> <i>H. gymnocephalum</i> ; <i>H. suborienii</i> ; <i>H. blecicii</i> ; <i>H. coloriscapum</i> ; <i>H. guentheri-beckii</i> ; <i>H. naegelianum</i> ; <i>H. rotundatum</i> <i>H. alpinum</i> ; <i>H. amplexicaule</i> ; <i>H. atratum</i> ; <i>H. bifidum</i> subsp. <i>caesiiflorum</i> ; <i>H. bocconei</i> subsp. <i>bocconei</i> ; <i>H. brevifolium</i> ; <i>H. glaucinum</i> ; <i>H. glaucinum</i> subsp. <i>basalticum</i> ; <i>H. glaucinum</i> subsp. <i>heteroschistum</i> ; <i>H. gorfenianum</i> ; <i>H. inuloides</i> subsp. <i>tridentatifolium</i> ; <i>H. jurassicum</i> ; <i>H. kofelicum</i> ; <i>H. kuekenthalianum</i> ; <i>H. laevigatum</i> subsp. <i>laevigatum</i> ; <i>H. lycopifolium</i> subsp. <i>lycopifolium</i> ; <i>H. macilentum</i> ; <i>H. maculatum</i> subsp. <i>commixtum</i> ; <i>H. maculatum</i> subsp. <i>maculatum</i> ; <i>H. onosmoides</i> subsp. <i>crinigerum</i> ; <i>H. oxyodon</i> subsp. <i>muretii</i> ; <i>H. picroides</i> ; <i>H. piliferum</i> subsp. <i>piliferum</i> ; <i>H. pilosum</i> ; <i>H. porrifolium</i> subsp. <i>porrifolium</i> ; <i>H. pospichalii</i> subsp. <i>pospichalii</i> ; <i>H. prenanthoides</i> subsp. <i>bupleurifolioides</i> ; <i>H. racemosum</i> ; <i>H. sabaudum</i> ; <i>H. saxifragum</i> subsp. <i>vulpis</i> ; <i>H. sommerfeltii</i> ; <i>H. schmidtii</i> subsp. <i>graniticum</i> ; <i>H. sparsum</i> subsp. <i>vierhapperi</i> ; <i>H. umbellatum</i> subsp. <i>umbellatum</i> ; <i>H. venostorum</i> ; <i>H. vetteri</i> ; <i>H. villosum</i> subsp. <i>villosum</i> ; <i>H. wiesbaurianum</i> subsp. <i>semicinerascens</i> <i>H. pannosum</i>	Herba Cela biljka Herba Herba Cvast	Haag-Berrurier i Duquenois, 1969 Guppy i Bohm, 1976 Manez i sar., 1994 Petrović i sar., 1999a Zidorn i sar., 2002
	Luteolin 7-O-arabinozid (12)	<i>H. umbellatum</i>	List, cvast, koren Cela biljka	Gökbulut i sar., 2017 Guppy i Bohm, 1976
	Luteolin 7-O-ramnozid (13)	<i>H. compositum</i> ; <i>H. amplexicaule</i>	Herba	Manez i sar., 1994; Giner i sar., 1992
	Luteolin 4'-O-arabinozid (14)	<i>H. umbellatum</i>	Cela biljka	Guppy i Bohm, 1976
	Luteolin 7-O-glukozid (15)	<i>H. murorum</i> subsp. <i>grandidens</i> var. <i>minoriceps</i> <i>H. umbellatum</i> <i>H. compositum</i> ; <i>H. amplexicaule</i> <i>H. gymnocephalum</i> ; <i>H. suborienii</i> ; <i>H. blecicii</i> ; <i>H. coloriscapum</i> ; <i>H. guentheri-beckii</i> ; <i>H. naegelianum</i> ; <i>H. rotundatum</i> <i>H. rohacsense</i> ; <i>H. borsanum</i> ; <i>H. ratezaticum</i> ; <i>H. pseudocaesium</i> <i>H. alpinum</i> ; <i>H. amplexicaule</i> ; <i>H. atratum</i> ; <i>H. bifidum</i> subsp. <i>caesiiflorum</i> ; <i>H. bocconei</i> subsp. <i>bocconei</i> ; <i>H. brevifolium</i> ; <i>H. glaucinum</i> ; <i>H. glaucinum</i> subsp. <i>basalticum</i> ;	Herba Cela biljka Herba Herba List Cvast	Haag-Berrurier i Duquenois, 1969 Guppy i Bohm, 1976 Manez i sar., 1994; Giner i sar., 1992 Petrović i sar., 1999a Švehlíková i sar., 2002 Zidorn i sar., 2002

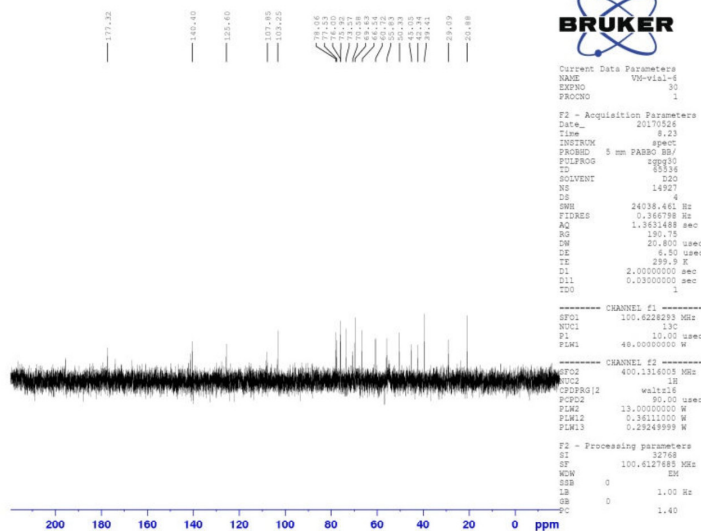
Tip	Jedinjenje	Takson	Biljni organ	Referenca
		<i>H. glaucinum</i> subsp. <i>heteroschistum</i> ; <i>H. gorfenianum</i> ; <i>H. inuloides</i> subsp. <i>tridentatifolium</i> ; <i>H. jurassicum</i> ; <i>H. kofelicum</i> ; <i>H. kuekenthalianum</i> ; <i>H. laevigatum</i> subsp. <i>laevigatum</i> ; <i>H. lycopifolium</i> subsp. <i>lycopifolium</i> ; <i>H. macilentum</i> ; <i>H. maculatum</i> subsp. <i>commixtum</i> ; <i>H. maculatum</i> subsp. <i>maculatum</i> ; <i>H. onosmoides</i> subsp. <i>crinigerum</i> ; <i>H. oxyodon</i> subsp. <i>muretii</i> ; <i>H. picroides</i> ; <i>H. piliferum</i> subsp. <i>piliferum</i> ; <i>H. pilosum</i> ; <i>H. porrifolium</i> subsp. <i>porrifolium</i> ; <i>H. pospichalii</i> subsp. <i>pospichalii</i> ; <i>H. prenanthoides</i> subsp. <i>bupleurifolioides</i> ; <i>H. racemosum</i> ; <i>H. sabaudum</i> ; <i>H. saxifragum</i> subsp. <i>vulpii</i> ; <i>H. sommerfeltii</i> ; <i>H. schmidtii</i> subsp. <i>graniticum</i> ; <i>H. sparsum</i> subsp. <i>vierhapperi</i> ; <i>H. umbellatum</i> subsp. <i>umbellatum</i> ; <i>H. venostorum</i> ; <i>H. vetteri</i> ; <i>H. villosum</i> subsp. <i>villosum</i> ; <i>H. wiesbaurianum</i> subsp. <i>semicinerascens</i>		
	Luteolin 4'-O-glukozid (16)	<i>H. pannosum</i> <i>H. umbellatum</i> <i>H. alpinum</i> ; <i>H. amplexicaule</i> ; <i>H. atratum</i> ; <i>H. bifidum</i> subsp. <i>caesiiflorum</i> ; <i>H. bocconeii</i> subsp. <i>bocconeii</i> <i>H. brevifolium</i> ; <i>H. glaucinum</i> ; <i>H. glaucinum</i> subsp. <i>basalticum</i> ; <i>H. glaucinum</i> subsp. <i>heteroschistum</i> ; <i>H. gorfenianum</i> ; <i>H. inuloides</i> subsp. <i>tridentatifolium</i> ; <i>H. jurassicum</i> ; <i>H. kofelicum</i> ; <i>H. kuekenthalianum</i> ; <i>H. laevigatum</i> subsp. <i>laevigatum</i> ; <i>H. lycopifolium</i> subsp. <i>lycopifolium</i> ; <i>H. macilentum</i> ; <i>H. maculatum</i> subsp. <i>commixtum</i> ; <i>H. maculatum</i> subsp. <i>maculatum</i> ; <i>H. onosmoides</i> subsp. <i>crinigerum</i> ; <i>H. oxyodon</i> subsp. <i>muretii</i> ; <i>H. picroides</i> ; <i>H. piliferum</i> subsp. <i>piliferum</i> ; <i>H. pilosum</i> ; <i>H. porrifolium</i> subsp. <i>porrifolium</i> ; <i>H. pospichalii</i> subsp. <i>pospichalii</i> ; <i>H. prenanthoides</i> subsp. <i>bupleurifolioides</i> ; <i>H. racemosum</i> ; <i>H. sabaudum</i> ; <i>H. saxifragum</i> subsp. <i>vulpii</i> ; <i>H. sparsum</i> subsp. <i>vierhapperi</i> ; <i>H. umbellatum</i> subsp. <i>umbellatum</i> ; <i>H. venostorum</i> <i>H. vetteri</i> ; <i>H. villosum</i> subsp. <i>villosum</i> ; <i>H. wiesbaurianum</i> subsp. <i>semicinerascens</i>	List, cvast Cela biljka Cvast	Gökbulut i sar., 2017 Guppy i Bohm, 1976 Zidorn i sar., 2002
	Luteolin 7-O-glukuronid (17)	<i>H. umbellatum</i>	Cela biljka	Guppy i Bohm, 1976

Tip	Jedinjenje	Takson	Biljni organ	Referenca
		<i>H. alpinum</i> ; <i>H. amplexicaule</i> ; <i>H. glaucinum</i> ; <i>H. glaucinum</i> subsp. <i>basalticum</i> ; <i>H. gorfenianum</i> ; <i>H. inuloides</i> subsp. <i>tridentatifolium</i> ; <i>H. lycopifolium</i> subsp. <i>lycopifolium</i> ; <i>H. macilentum</i> ; <i>H. maculatum</i> subsp. <i>commixtum</i> ; <i>H. maculatum</i> subsp. <i>maculatum</i> ; <i>H. piliferum</i> subsp. <i>piliferum</i> ; <i>H. pilosum</i> ; <i>H. pospichalii</i> subsp. <i>pospichalii</i> ; <i>H. sabaudum</i> ; <i>H. sparsum</i> subsp. <i>vierhapperi</i> ; <i>H. umbellatum</i> subsp. <i>umbellatum</i> ; <i>H. villosum</i> subsp. <i>villosum</i> ; <i>H. wiesbaurianum</i> subsp. <i>semicinerascens</i>	Cvast	Zidorn i sar., 2002
	Luteolin 4'- <i>O</i> -glukuronid (18)	<i>H. rohacsense</i> ; <i>H. borsanum</i> ; <i>H. ratezaticum</i> ; <i>H. pseudocaesium</i>	List	Švehlíková i sar., 2002
	Luteolin 7- <i>O</i> -glukoksilozid (19)	<i>H. gymnocephalum</i> ; <i>H. suborienii</i> ; <i>H. bleicii</i> ; <i>H. coloriscapum</i> ; <i>H. guentheri-beckii</i> ; <i>H. naegelianum</i>	Herba	Petrović i sar., 1999a
	Luteolin 7- <i>O</i> -rutinozid (20)	<i>H. gymnocephalum</i> ; <i>H. suborienii</i> ; <i>H. bleicii</i> ; <i>H. coloriscapum</i> ; <i>H. guentheri-beckii</i> ; <i>H. naegelianum</i>	Herba	Petrović i sar., 1999a
	Luteolin 7- <i>O</i> -arabinozilglukozid (21)	<i>H. umbellatum</i>	Cela biljka	Guppy i Bohm, 1976
	Diosmetin (22)	<i>H. compositum</i> , <i>H. amplexicaule</i>	Herba	Manez i sar., 1994; Giner i sar., 1992
	Hrizoeriol (23)	<i>H. umbellatum</i>	Cela biljka	Guppy i Bohm, 1976
	Izoetin 4'- <i>O</i> -glukuronid (24)	<i>H. alpinum</i> ; <i>H. amplexicaule</i> ; <i>H. bifidum</i> subsp. <i>caesiiflorum</i> ; <i>H. pilosum</i> ; <i>H. porrifolium</i> subsp. <i>porrifolium</i> ; <i>H. villosum</i> subsp. <i>villosum</i>	Cvast	Zidorn i sar., 2002
Flavonol	Kvercetin (25)	<i>H. amplexicaule</i>	Herba	Manez i sar., 1994
	Kvercetin 3- <i>O</i> -glukozid (26)	<i>H. umbellatum</i> <i>H. amplexicaule</i>	Cela biljka Herba	Guppy i Bohm, 1976 Manez i sar., 1994
Flavanon	Naringenin 7- <i>O</i> -metil (27)	<i>H. amplexicaule</i>	List	Wollenweber i sar, 1997
	Naringenin 7,4'-di- <i>O</i> -metil (28)	<i>H. amplexicaule</i>	List	Wollenweber i sar, 1997

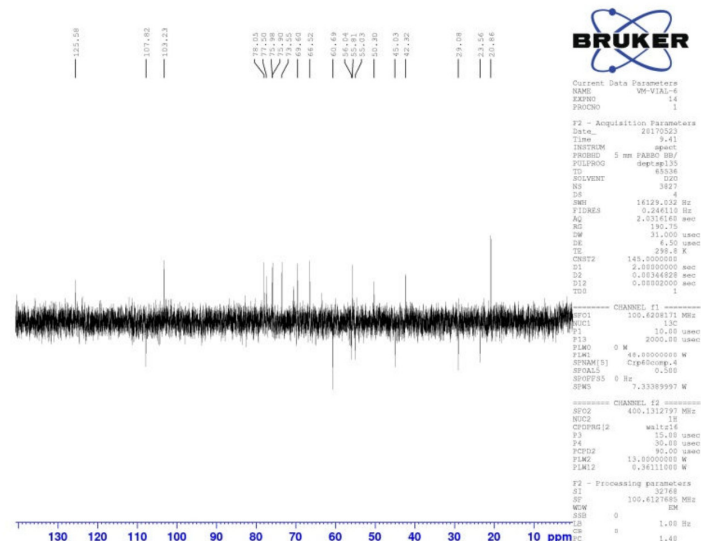
Tabela P3. Hemikalije korišćene u eksperimentalnom radu u okviru ove doktorske disertacije

Supstanca	Stepen čistoće	Proizvođač/Izvor
Rastvarači		
D ₂ O	NMR	Sigma-Aldrich, SAD
MeOH- <i>d</i> ₄		
DMSO- <i>d</i> ₆		
CHCl ₃ - <i>d</i>		
Acetonitril	LC-MS	J.T. Backer Chemicals Co., SAD
MeOH		Sigma-Aldrich, SAD
2-Propanol		
H ₂ O	HPLC	prečišćena TKA sistemom za prečišćavanje
<i>n</i> -Heksan	<i>p.a.</i>	Fischer Scientific, Velika Britanija
EtOAc		
<i>n</i> -BuOH		
CH ₂ Cl ₂		J.T. Backer Chemicals Co., SAD
MeOH		
Adjuvansi		
Mravlja kiselina	LC-MS	Sigma-Aldrich, SAD
Amonijum formijat		Agilent Technologies, Nemačka
Analitički standardi		
α -Amirin	≥ 98% HPLC	Sigma-Aldrich, SAD
β -Amirin	≥ 98,5% HPLC	
Lupeol	≥ 90% GC	Carl Roth, Nemačka
Apigenin	≥ 99% HPLC	Carl Roth, Nemačka
Apigenin 7- <i>O</i> -glukozid	≥ 97% HPLC	Fluka, Švajcarska
Apigenin 7- <i>O</i> -glukuronid	≥ 98% HPLC	HWI analytic, Nemačka
Apigenin 7- <i>O</i> -rutinozid	≥ 95% LC-MS	
3,5-Di- <i>O</i> -kafeoilhina kiselina		Sigma-Aldrich, SAD
Diosmetin	≥ 99% HPLC	Carl Roth, Nemačka
Galna kiselina		Sigma-Aldrich, SAD
Hlorogenska kiselina	≥ 97% HPLC	Carl Roth, Nemačka
Luteolin	≥ 99% HPLC	
Luteolin 4'- <i>O</i> -glukozid	izolat	Izolovan iz vrste <i>Leontodon hispidus</i> L. (Zidorn i Stuppner, 2001)
Luteolin 7- <i>O</i> -glukozid		Carl Roth, Nemačka
Luteolin 7- <i>O</i> -glukuronid	≥ 98% HPLC	HWI analytic, Nemačka
Luteolin 7- <i>O</i> -glukoksilozid	izolat	Izolovan iz MeOH ekstrakta herbe <i>H. gymnocephalum</i> (Petrović i sar, 1999b)
Luteolin 7- <i>O</i> -rutinozid	≥ 98% LC-MS	Sigma-Aldrich, SAD
Kvercetin 3- <i>O</i> -glukozid	≥ 90% HPLC	
Reagensi i supstance korišćeni u ispitivanju farmakoloških aktivnosti		
2-dezoksiriboza	<i>p.a.</i>	Sigma-Aldrich, SAD
Folin-Ciocalteu reagens		
2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil		
FeSO ₄		
Tiobarbiturna kiselina		
2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazin		
Askorbinska kiselina		Acros, Belgija
Trihlorsirćetna kiselina		Fluka, Švajcarska
AChE/BuChE		Sigma-Aldrich, SAD
AChI/BuChI		
DTNB		
Müller-Hinton bujon	podloga	Torlak, Srbija
Tryptic Soy Broth (TSB)		Torlak, Srbija
Dimetilsulfoksid (DMSO)	<i>p.a.</i>	Sigma-Aldrich, SAD
Tween 80		
p-Jodonitrotetrazolijum hlorid		INT, I8377- Sigma, SAD
Streptomycin	<i>a.s.</i>	Sigma P 7794
Ampicilin		Panfarma, Srbija
Malt-agar	podloga	Torlak, Srbija
CHROMagar		Biomerieuk, Francuska
<i>Sabourand</i> dekstrozni agar		Merck, Nemačka
Bifonazol	<i>a.s.</i>	Srbolek, Beograd
Ketokonazol	<i>a.s.</i>	Zorka farma, Šabac
Karagenin	<i>p.a.</i>	Sigma-Aldrich, Nemačka
Ibuprofen	<i>a.s.</i>	Pharmagen GmbH, Nemačka

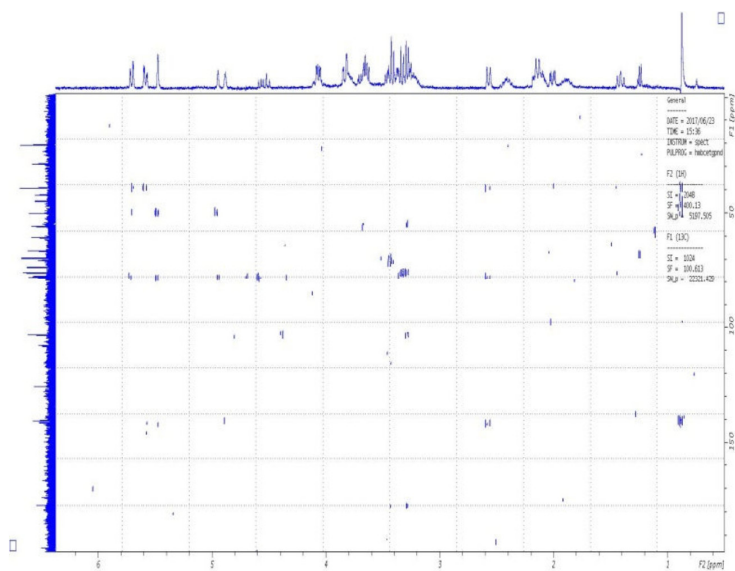
Prilog 2. NMR spektri seskviterskih laktona (1-4)



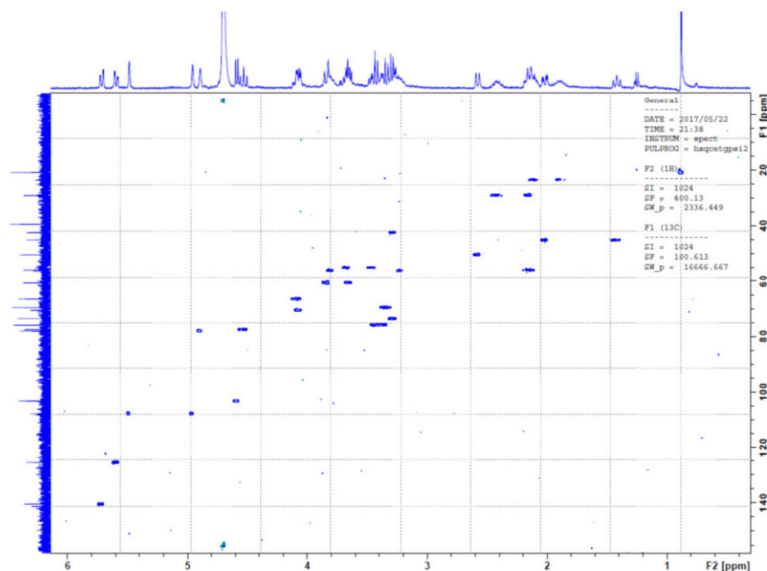
Slika P2.1. ¹³C (101 MHz) NMR spektar kalofilamina B (1).



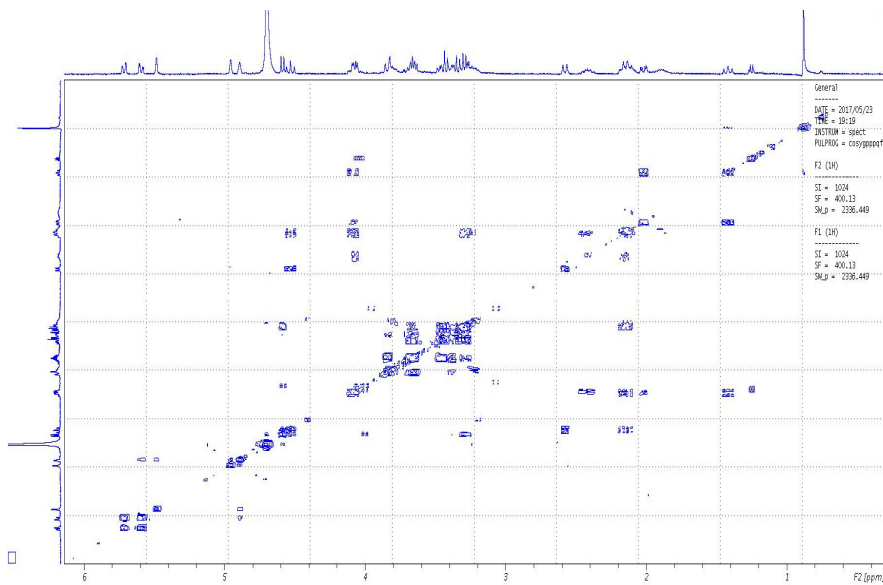
Slika P2.2. DEPT spektar kalofilamina B (1).



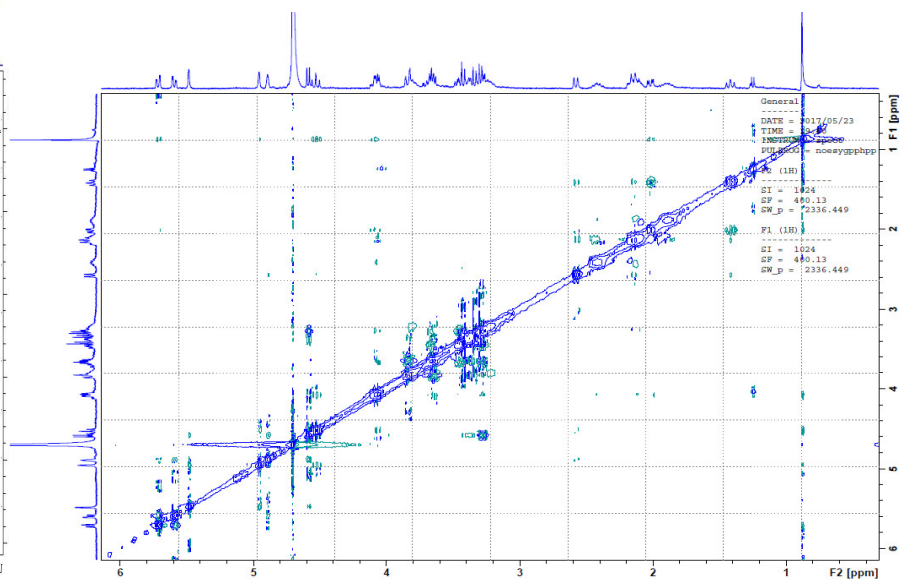
Slika P2.3. HMBC spektar kalofilamina B (1).



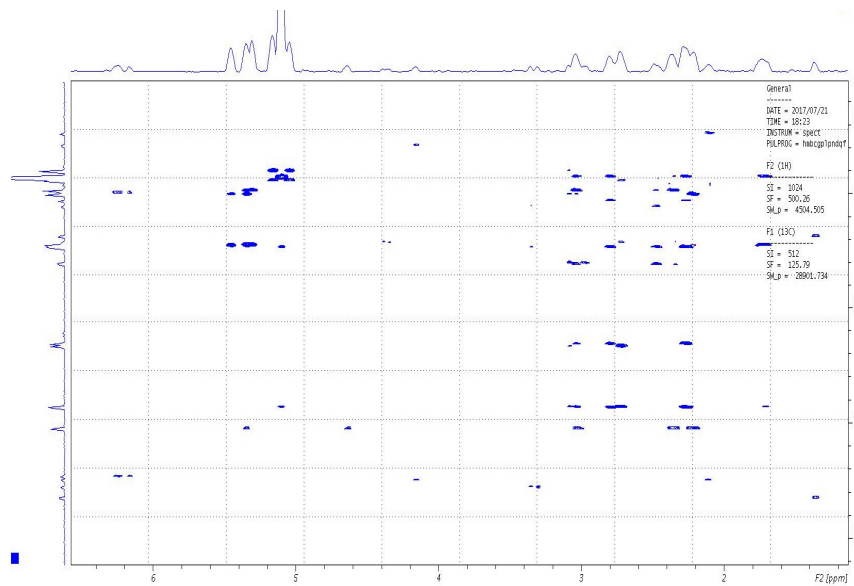
Slika P2.4. HSQC spektar kalofilamina B (1).



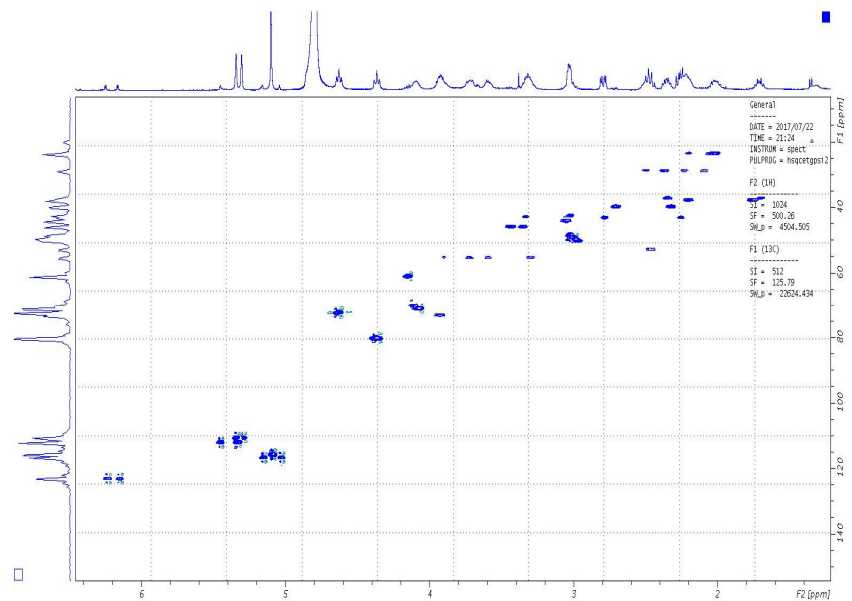
Slika P2.5. COSY spektar kalofilamina B (1).



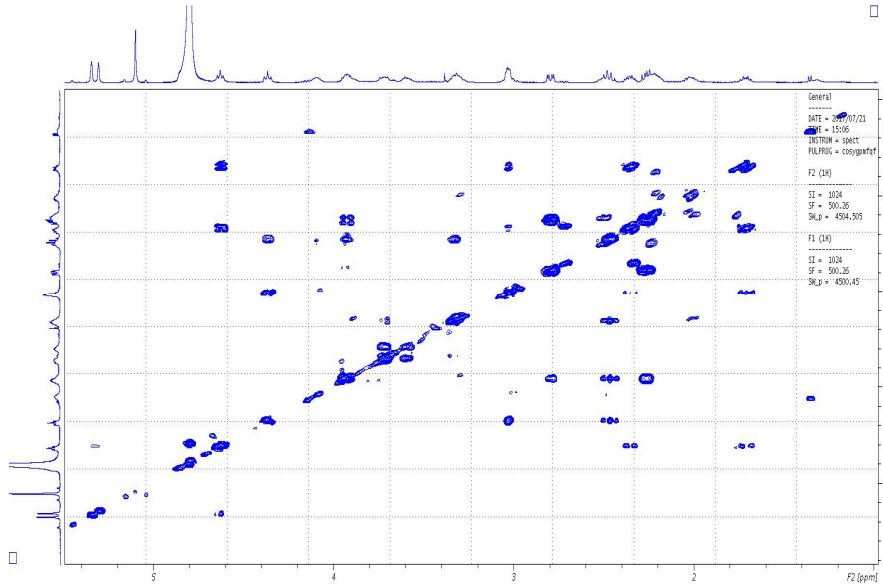
Slika P2.6. NOESY spektar kalofilamina B (1).



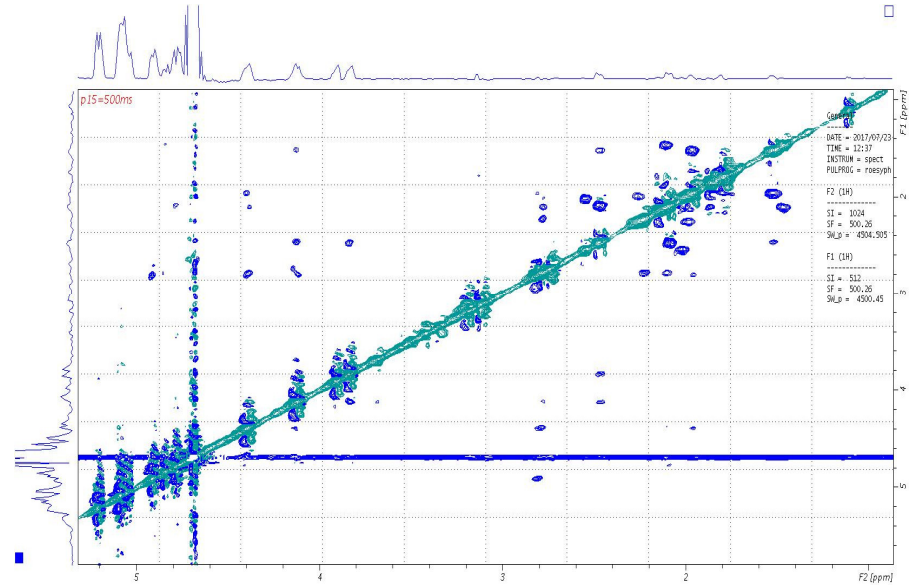
Slika P2.7. HMBC spektar kalofilamina A (2).



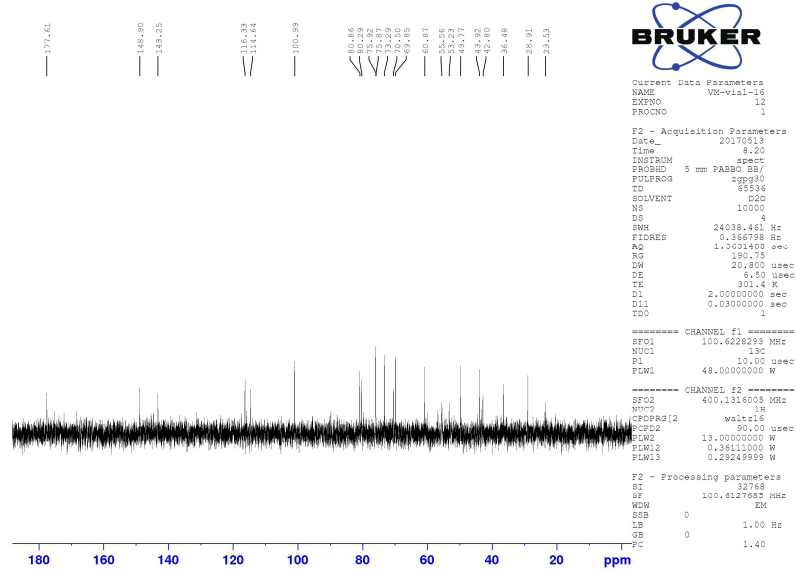
Slika P2.8. HSQC spektar kalofilamina A (2).



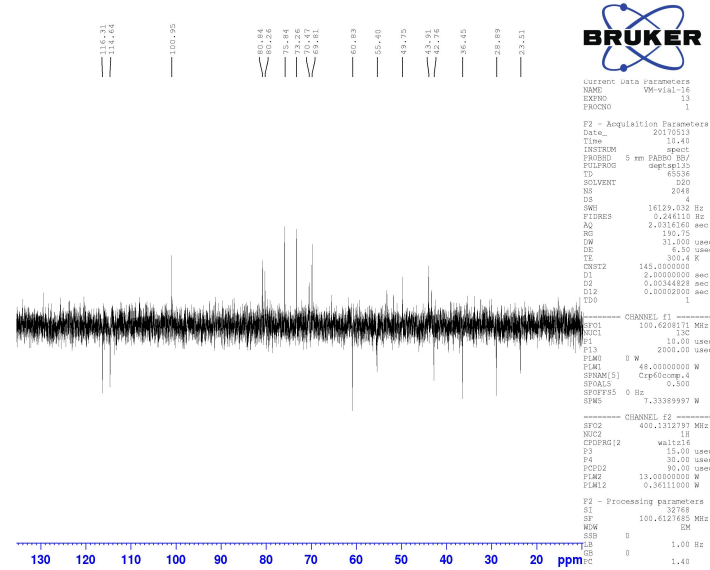
Slika P2.9. COSY spektar kalofilamina A (2).



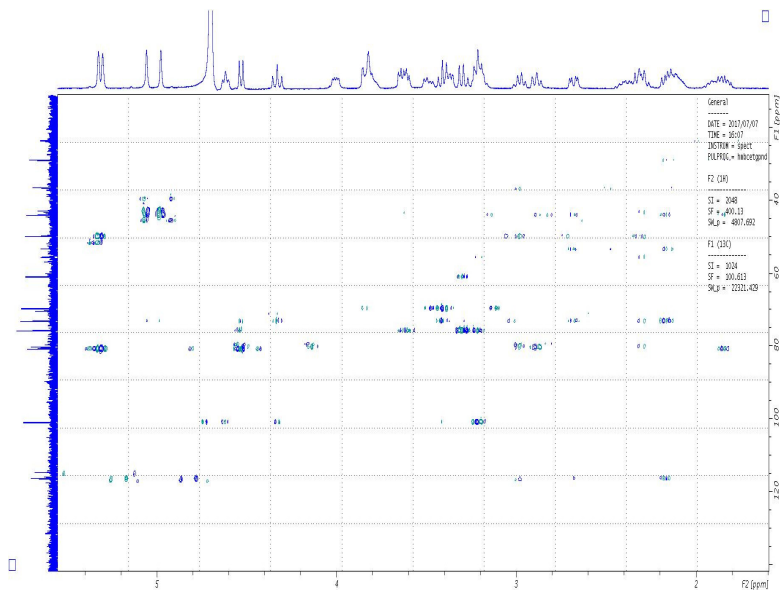
Slika P2.10. ROESY spektar kalofilamina A (2).



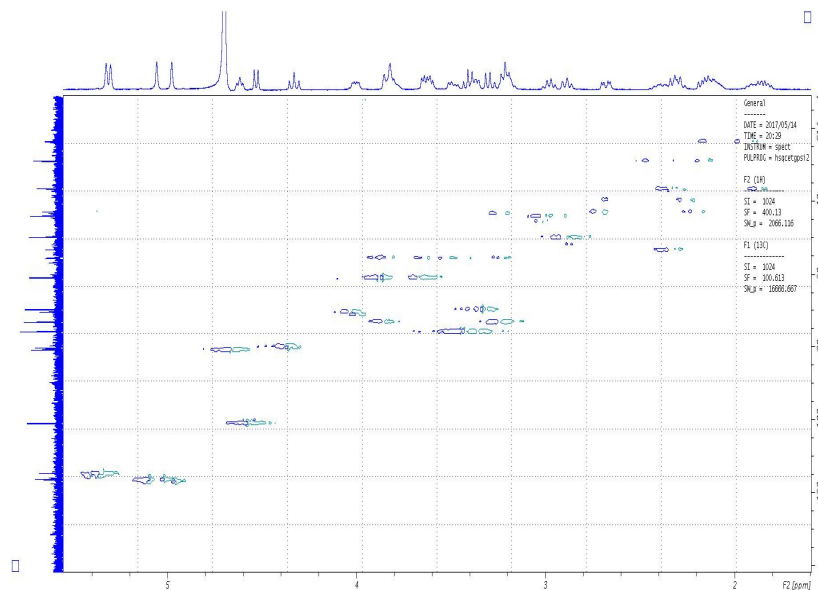
Slika P2.11. ¹³C (101 MHz) NMR spektar 8-epi-ikserisamina A (3).



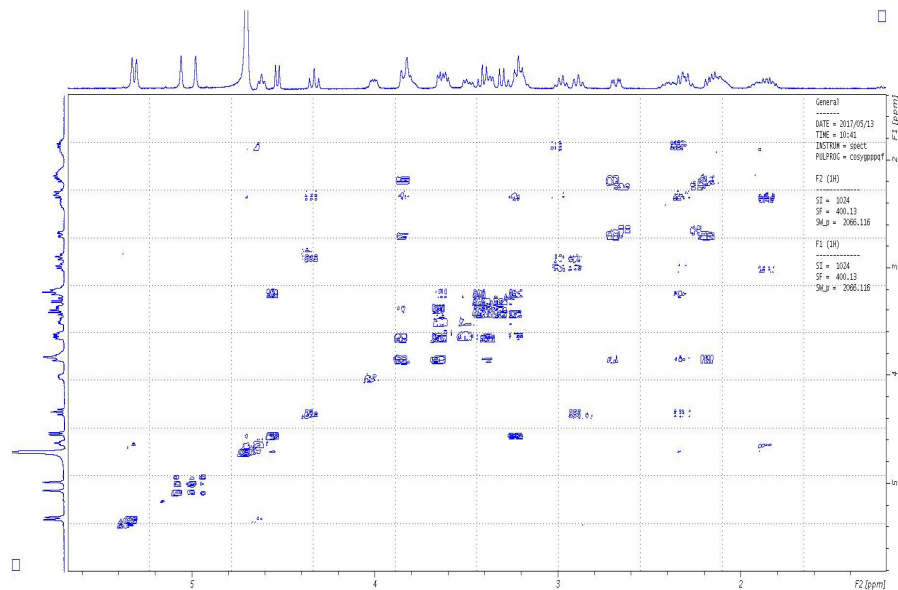
Slika P2.12. DEPT spektar 8-epi-ikserisamina A (3).



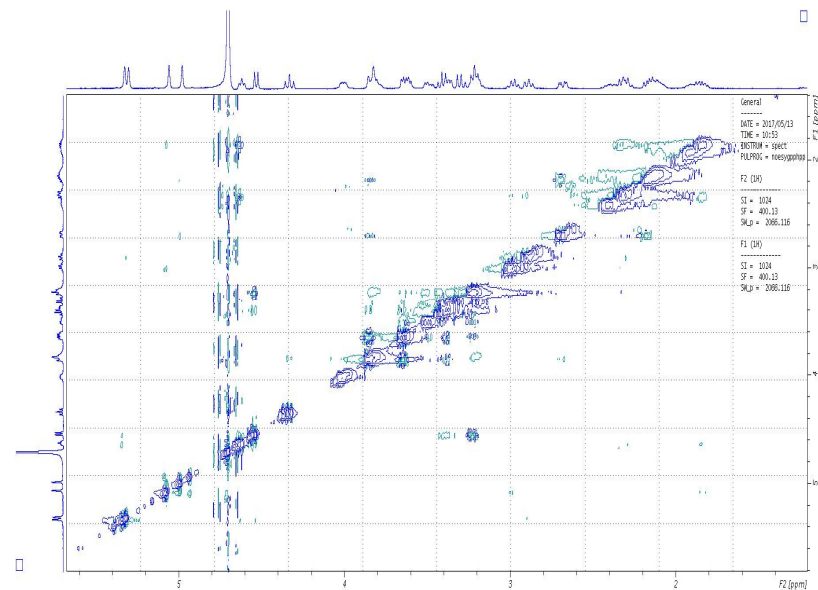
Slika P2.13. HMBC spektar 8-epi-ikserisamina A (3).



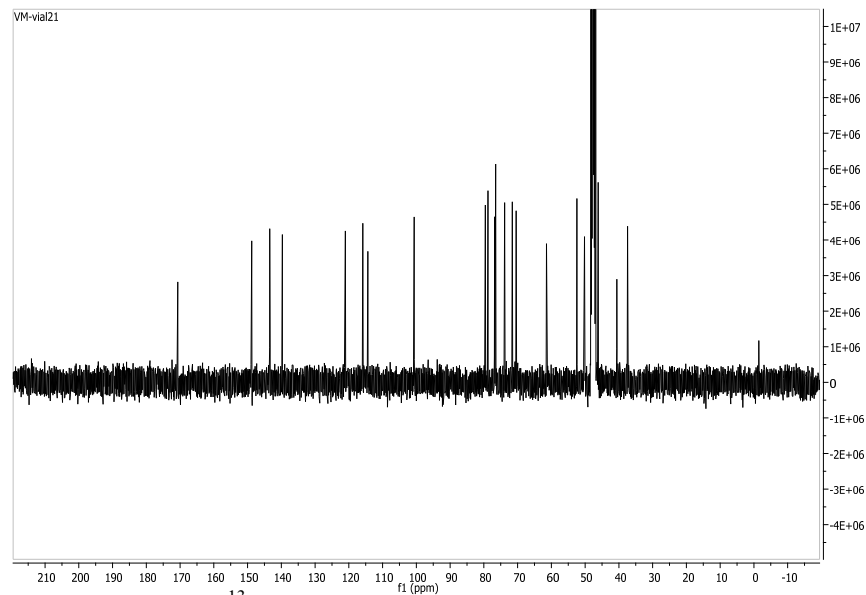
Slika P2.14. HSQC spektar 8-epi-ikserisamina A (3).



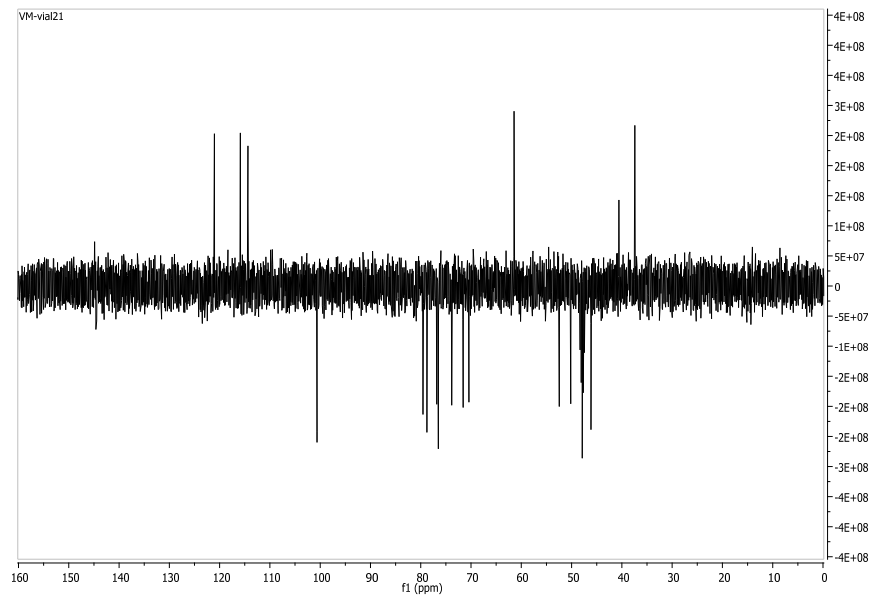
Slika P2.15. COSY spektar 8-epi-ikserisamina A (3).



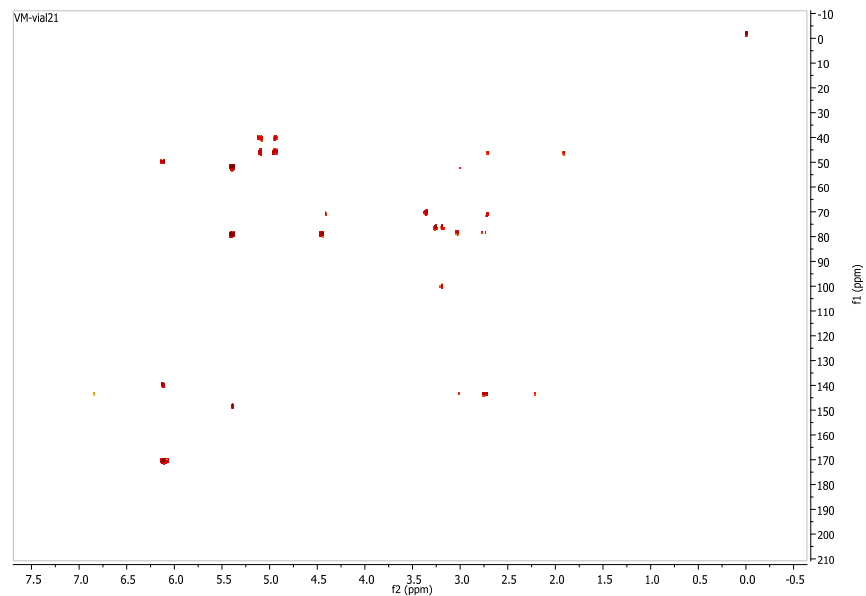
Slika P2.16. ROESY spektar 8-epi-ikserisamina A (3).



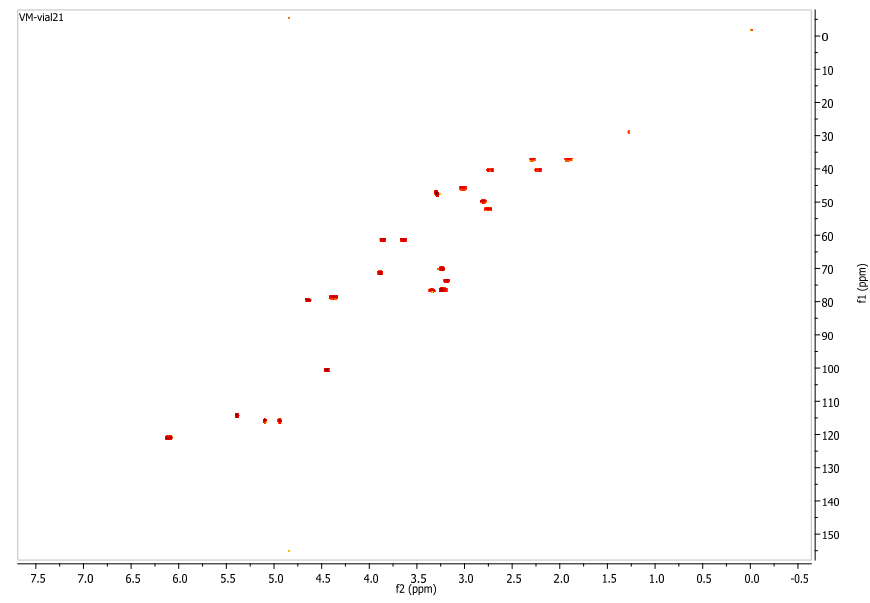
Slika P2.17. ^{13}C (101 MHz) NMR spektar krepizida E (4).



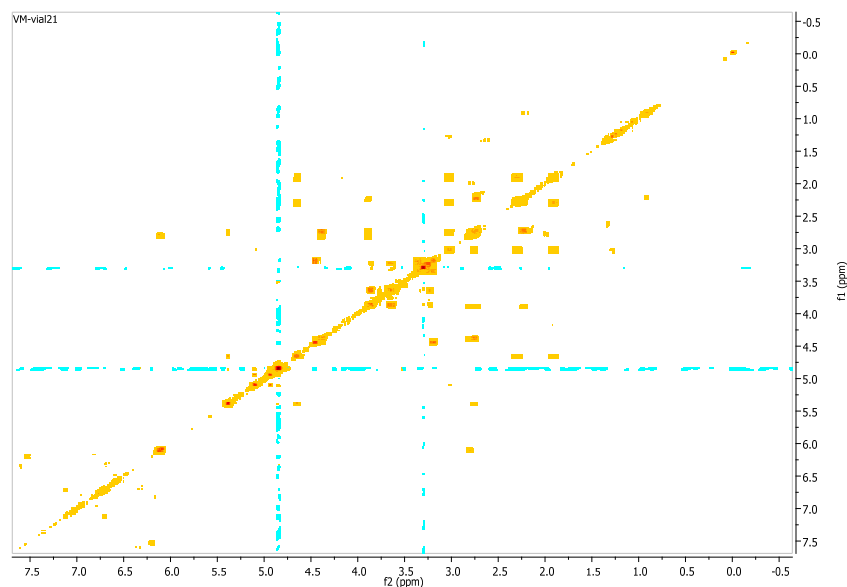
Slika P2.18. DEPT spektar krepizida E (4).



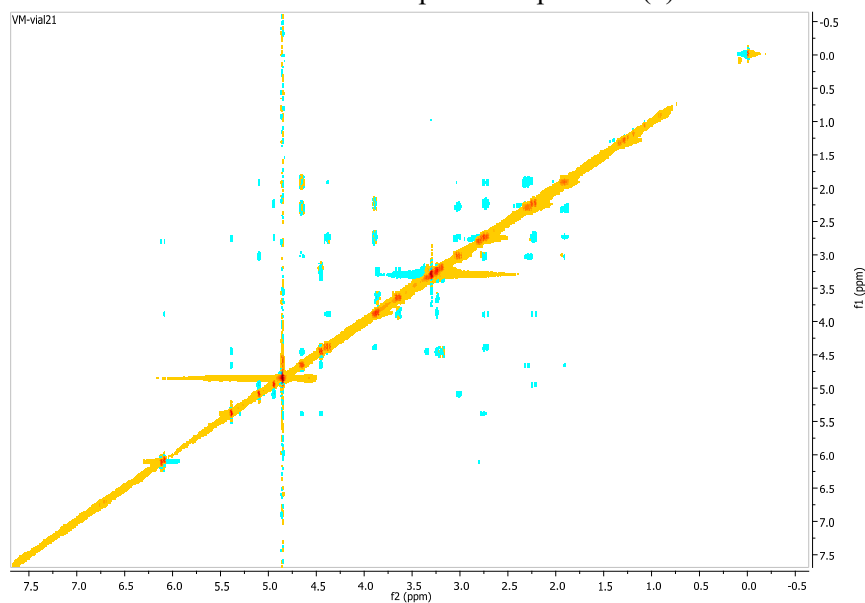
Slika P2.19. HMBC spektar krepizida E (4).



Slika P2.20. HSQC spektar krepizida E (4).

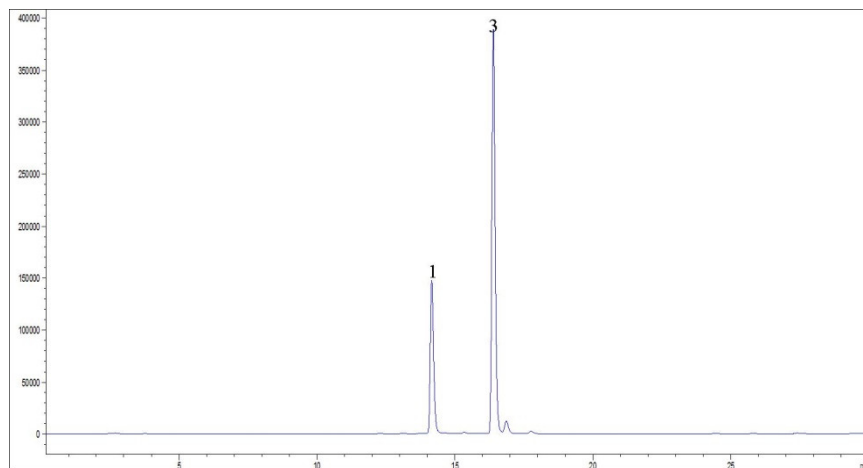


Slika P2.21. COSY spektar krepizida E (4).

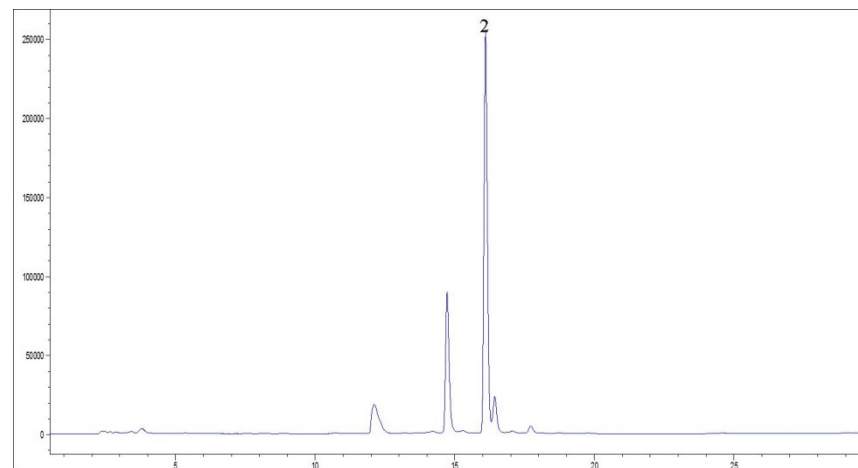


Slika P2.22. ROESY spektar krepizida E (4).

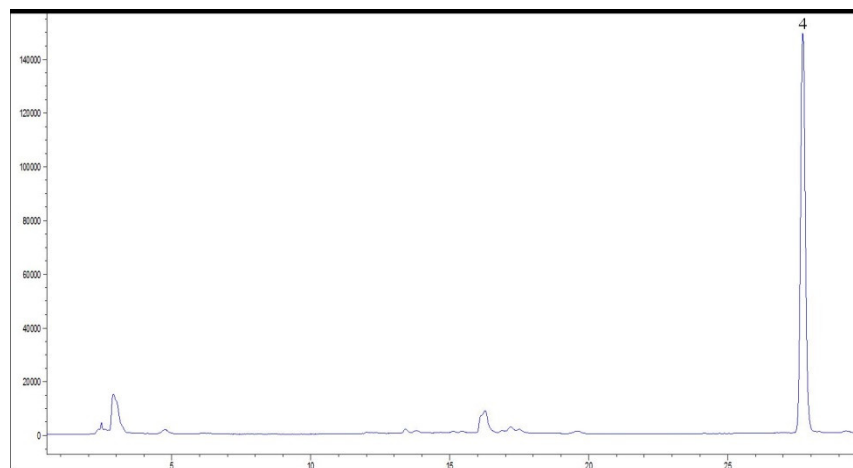
Prilog 3. LC-MS hromatogrami suvih MeOH ekstrakata herbi ispitivanih vrsta roda *Hieracium* (metoda za razdvajanje seskviterpenskih laktona)



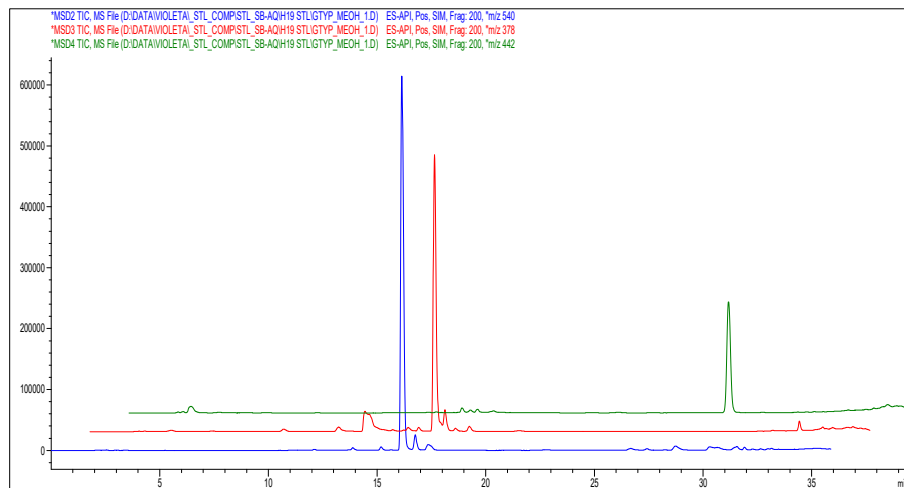
Slika P3.1. SIM hromatogram (m/z 540,20) korišćen za kvantifikaciju kalofilamina B (1) i 8-epi-ikserisamina A (3).



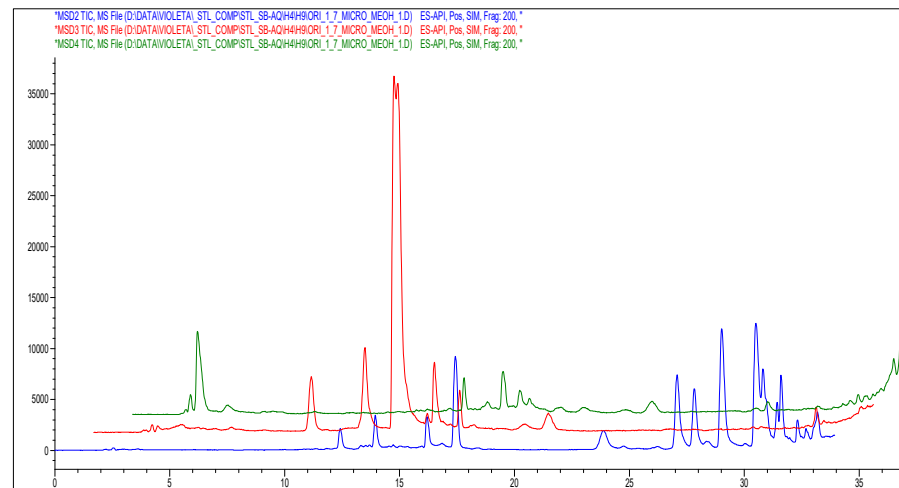
Slika P3.2. SIM hromatogram (m/z 378,10) korišćen za kvantifikaciju kalofilamina A (2).



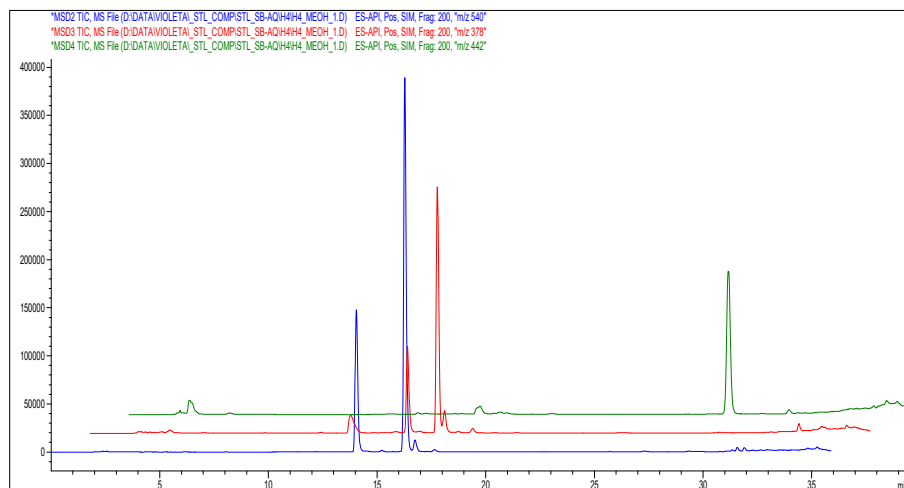
Slika P3.3. SIM hromatogram (m/z 442,20) korišćen za kvantifikaciju krepizida E (4).



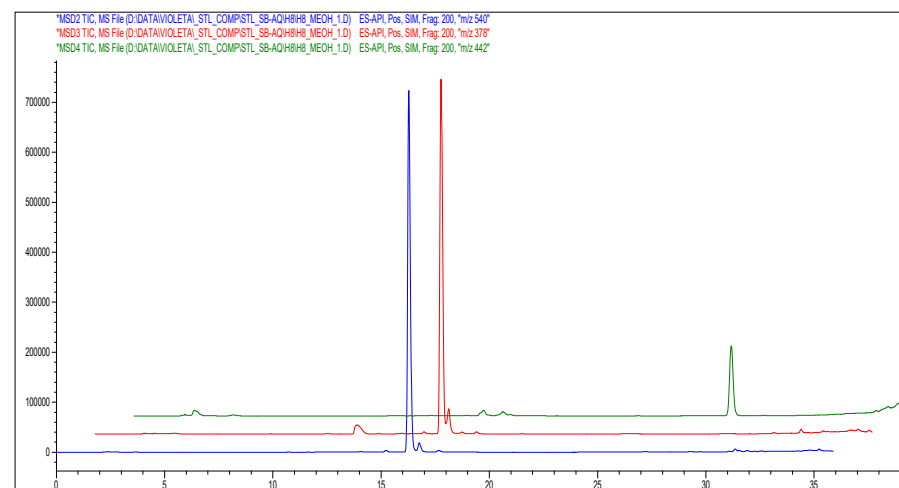
Slika P3.4. Uporedni SIM hromatogrami (m/z 540,20; 378,10; 442,20) MeOH ekstrakta herbe *H. gymnocephalum*.



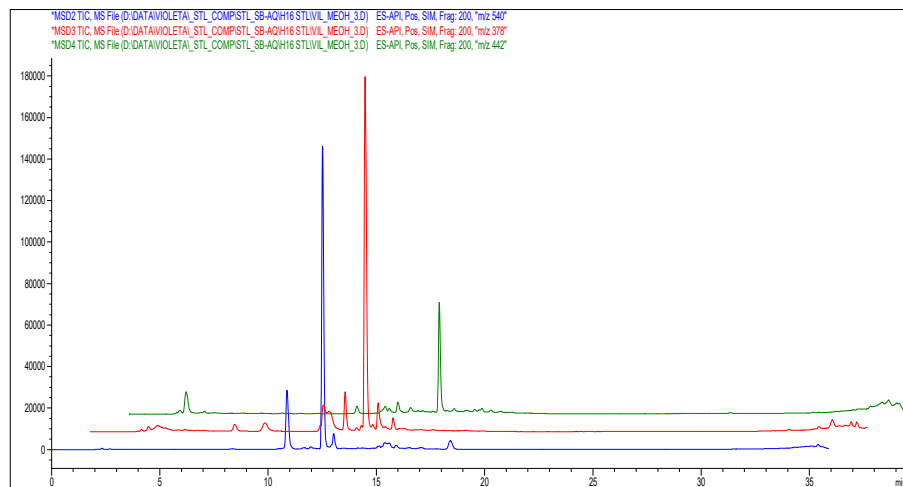
Slika P3.5. Uporedni SIM hromatogrami (m/z 540,20; 378,10; 442,20) MeOH ekstrakta herbe *H. oriens*.



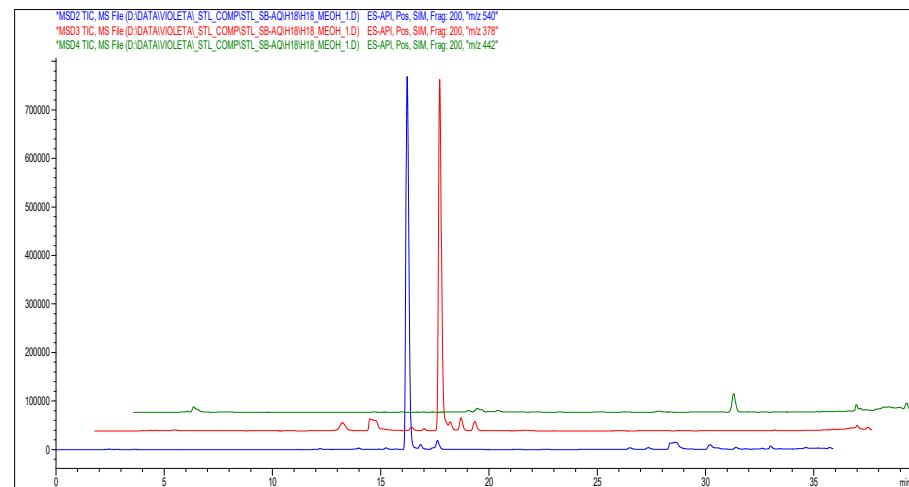
Slika P3.6. Uporedni SIM hromatogrami (m/z 540,20; 378,10; 442,20) MeOH ekstrakta herbe *H. calophyllum*.



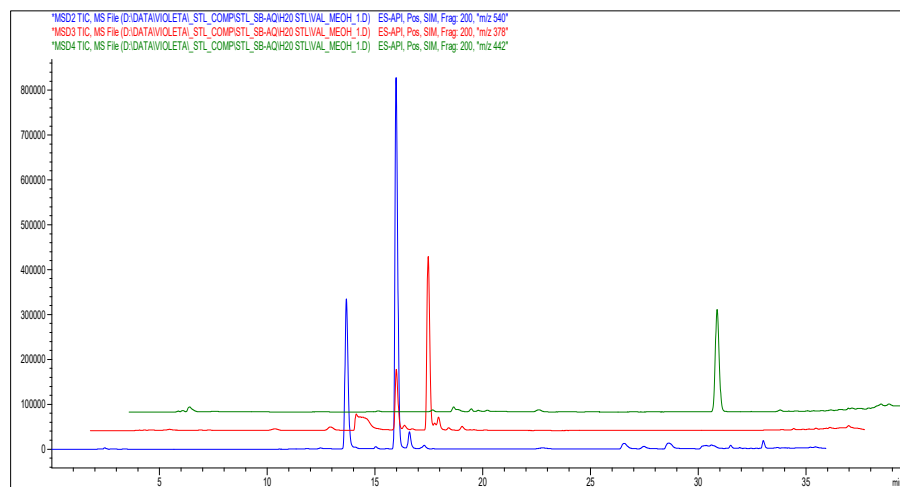
Slika P3.7. Uporedni SIM hromatogrami (m/z 540,20; 378,10; 442,20) MeOH ekstrakta herbe *H. scheppegianum*.



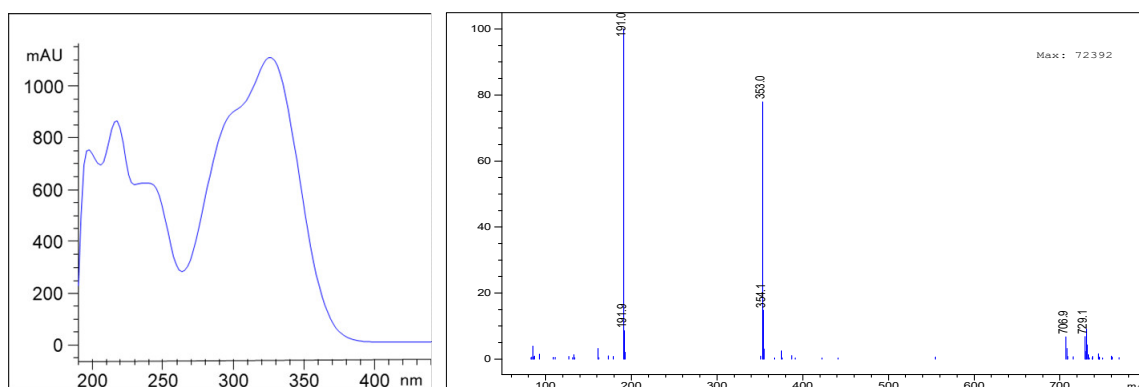
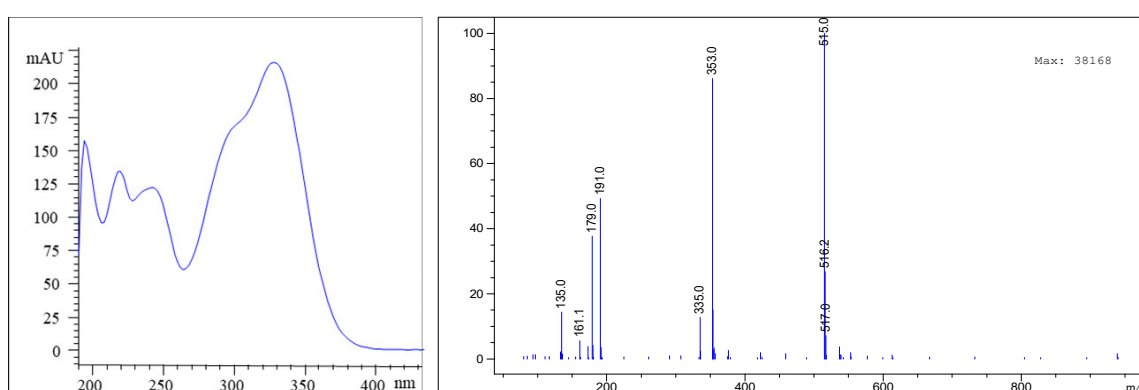
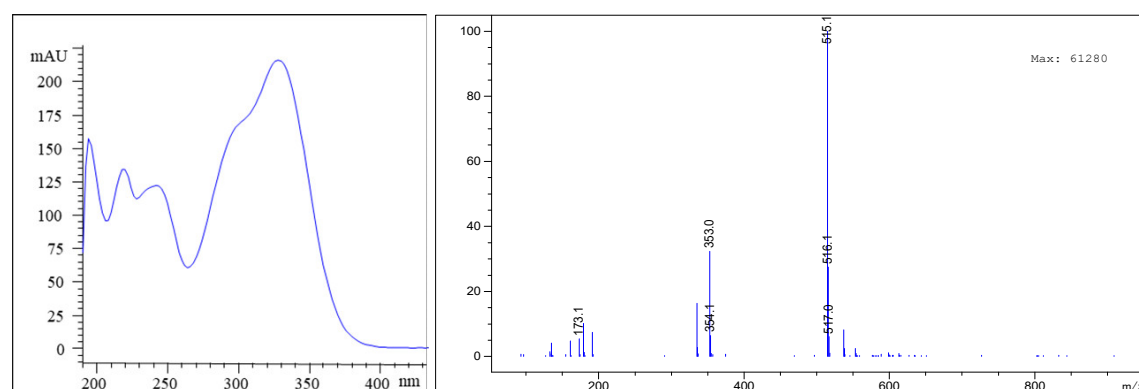
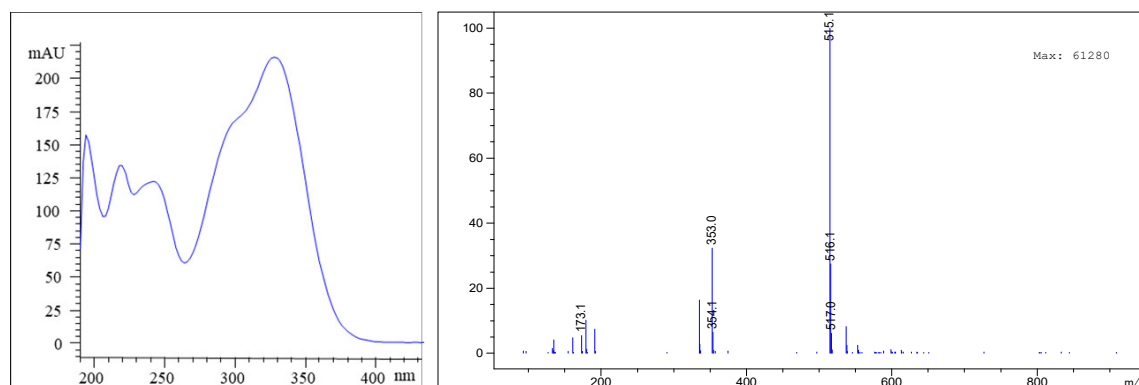
Slika P3.8. Uporedni SIM hromatogrami (m/z 540,20; 378,10; 442,20)
MeOH ekstrakta herbe *H. villosum*.

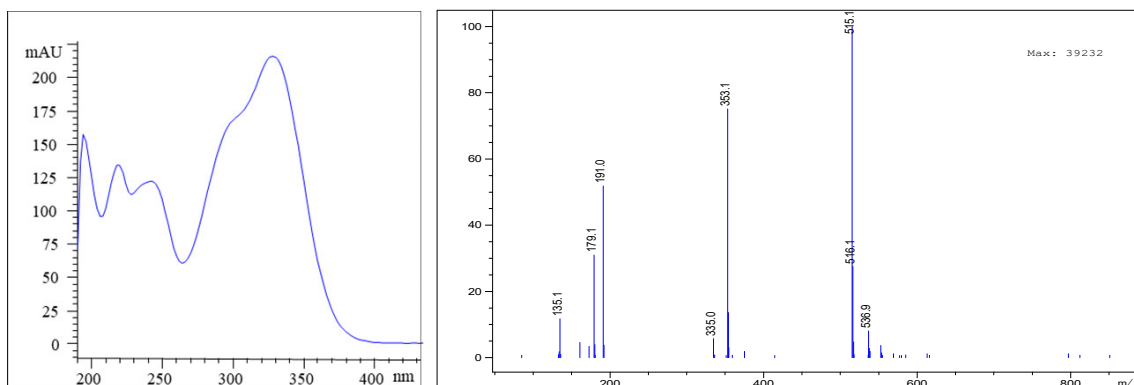


Slika P3.9. Uporedni SIM hromatogrami (m/z 540,20; 378,10; 442,20)
MeOH ekstrakta herbe *H. pseudoshenkii*.

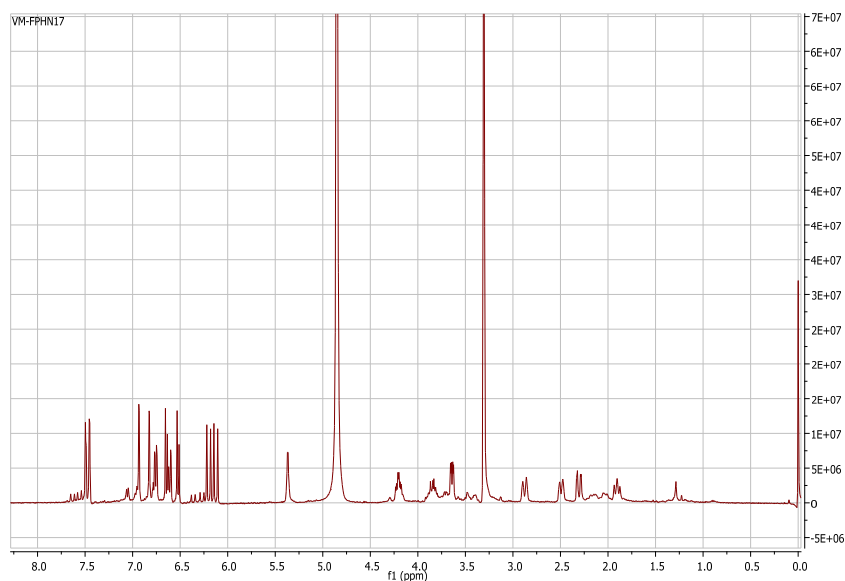


Slika P3.10. Uporedni SIM hromatogrami (m/z 540,20; 378,10; 442,20)
MeOH ekstrakta herbe *H. valdepilosum*.

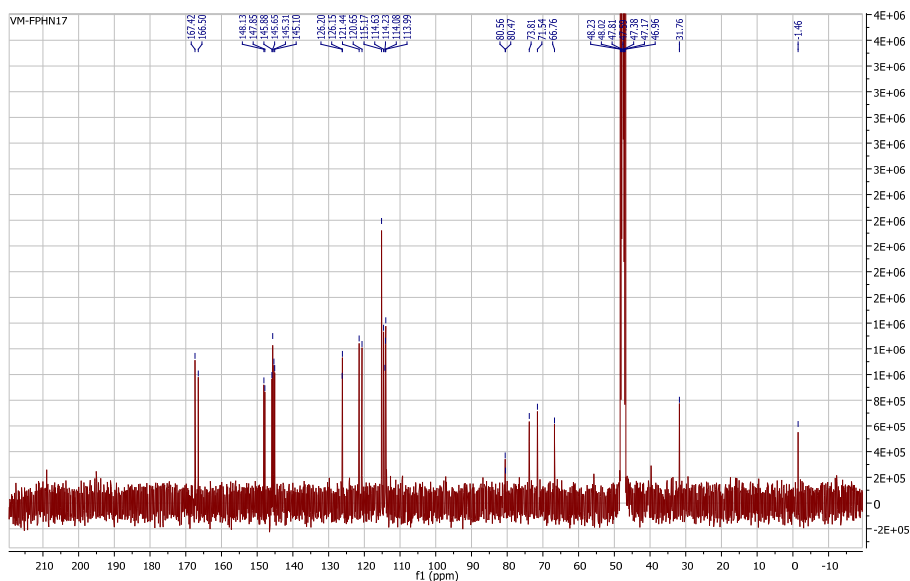
Prilog 4. UV, MS i NMR spektri fenolkarboksilnih kiselina identifikovanih u MeOH ekstraktu podzemnih organa *H. sheppiganum***Slika P4.1. UV i MS spektar hlorogenske kiseline (5).****Slika P4.2. UV i MS spektar 1,3-di-*O*-kafeoilhina kiseline (6).****Slika P4.3. UV i MS spektar 3,4-di-*O*-kafeoilhina kiseline (7).****Slika P4.4. UV i MS spektar 3,5-di-*O*-kafeoilhina kiseline (8).**



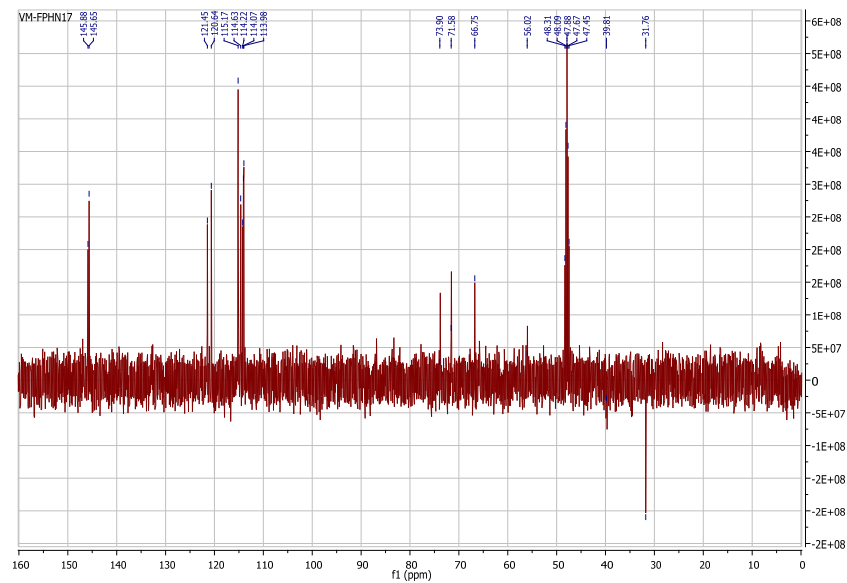
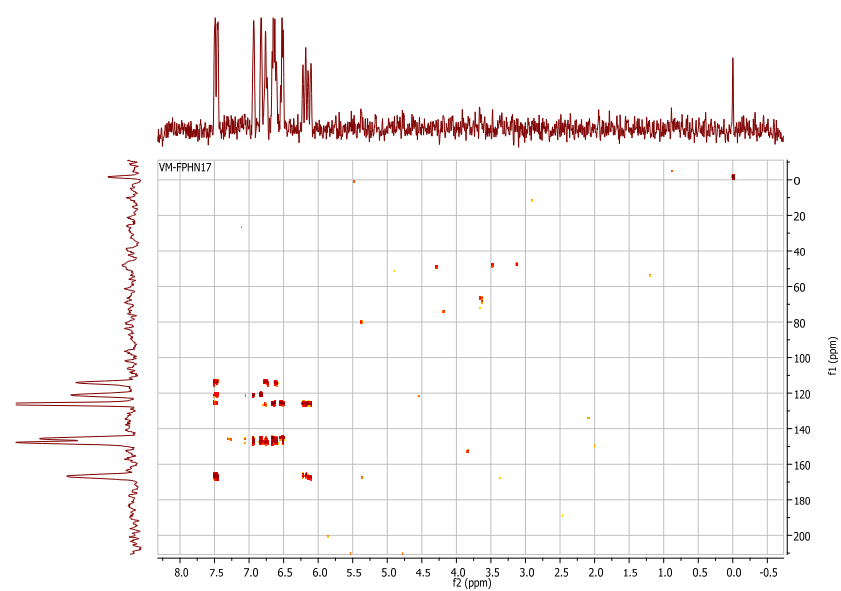
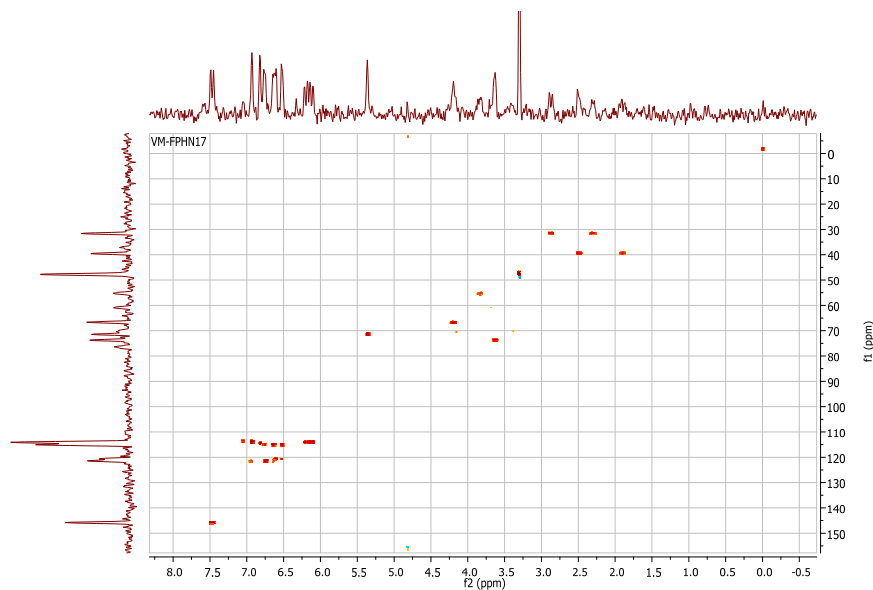
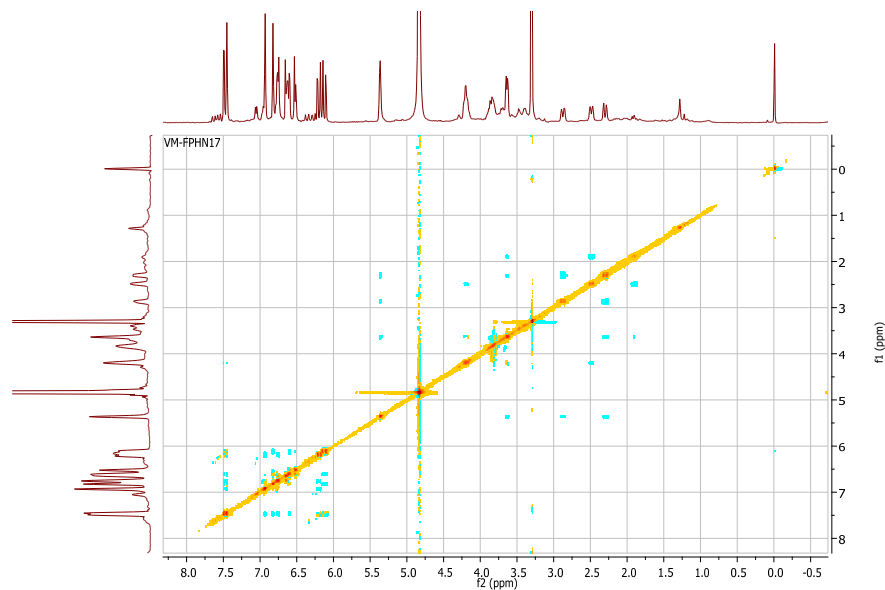
Slika P4.5. UV i MS spektar 1,5-di-*O*-kafeoilhina kiseline (9).

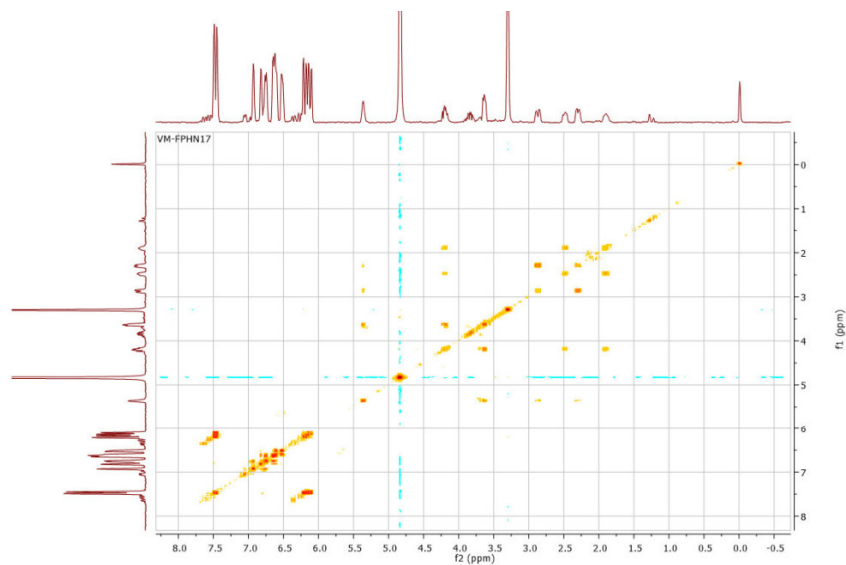


Slika P4.6. ¹H (400 MHz) NMR spektar 1,3-di-*O*-kafeoilhina kiseline (6).

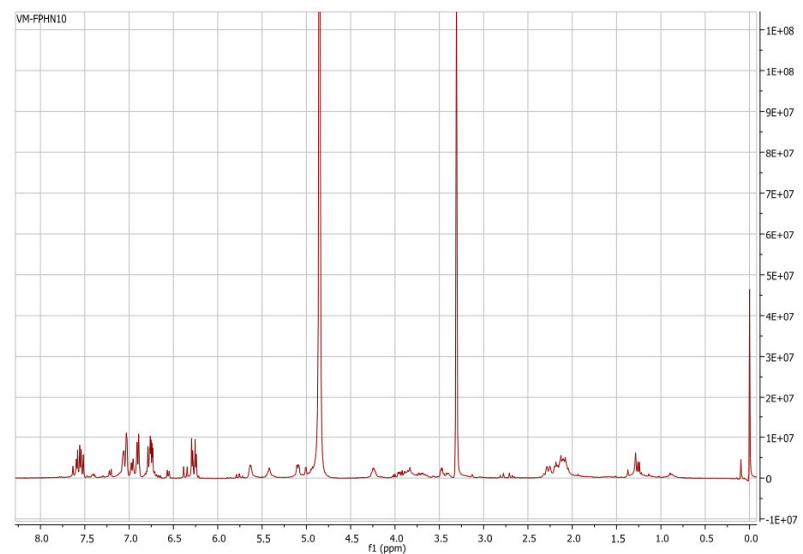


Slika P4.7. ¹³C (101 MHz) NMR spektar 1,3-di-*O*-kafeoilhina kiseline (6).

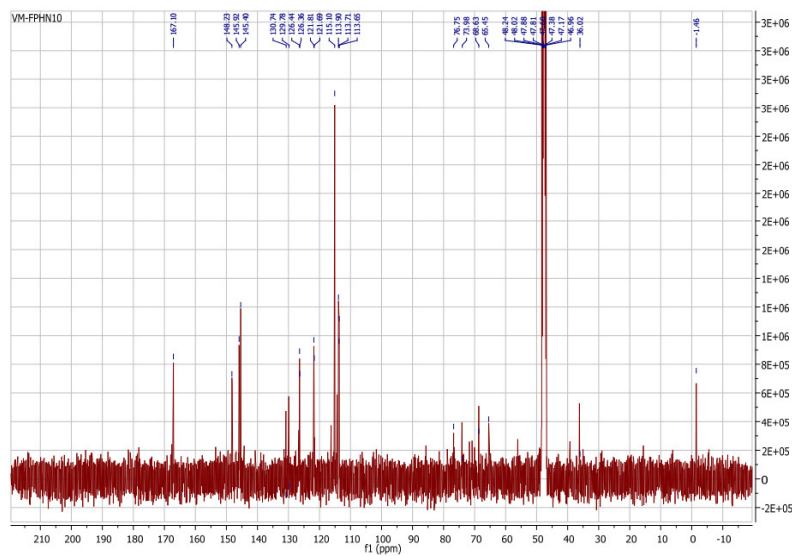
Slika P4.8. DEPT spektar 1,3-di-*O*-kafeoilhina kiseline (6).Slika P4.9. HMBC spektar 1,3-di-*O*-kafeoilhina kiseline (6).Slika P4.10. HSQC spektar 1,3-di-*O*-kafeoilhina kiseline (6).Slika P4.11. ROESY spektar 1,3-di-*O*-kafeoilhina kiseline (6).



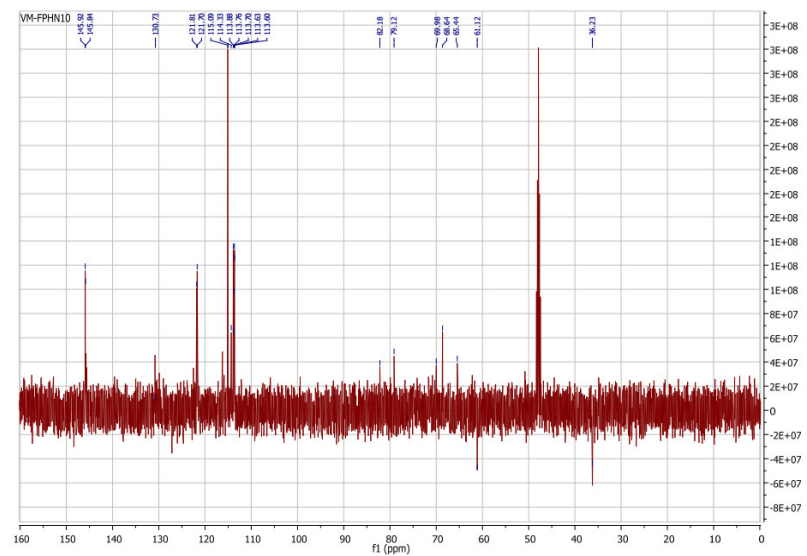
Slika P4.12. COSY spektar 1,3-di-*O*-kafeoilhina kiseline (6).



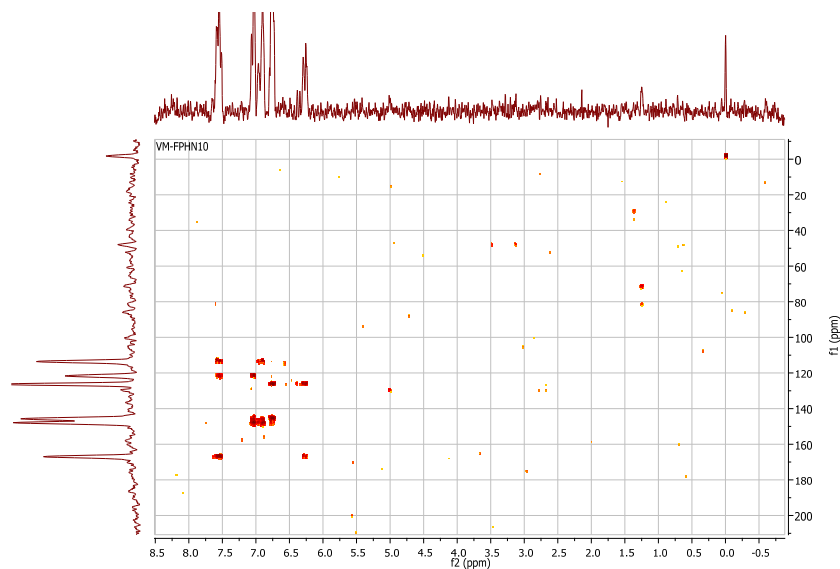
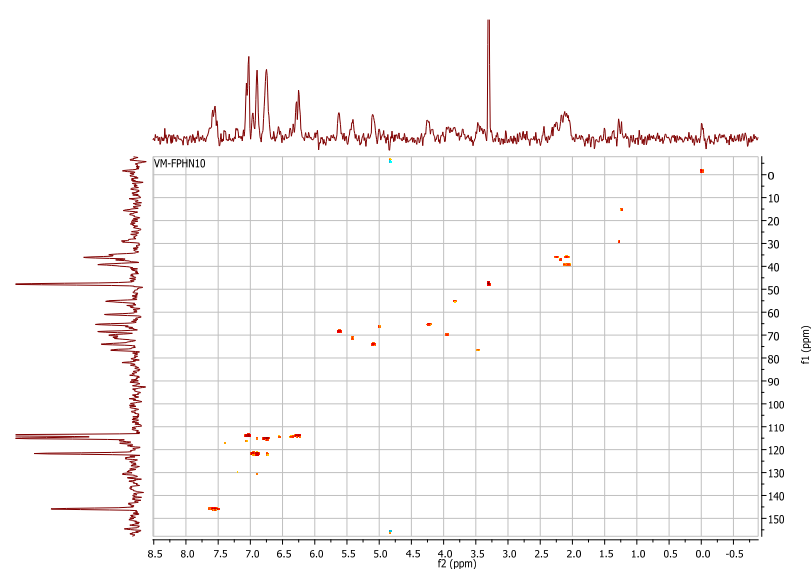
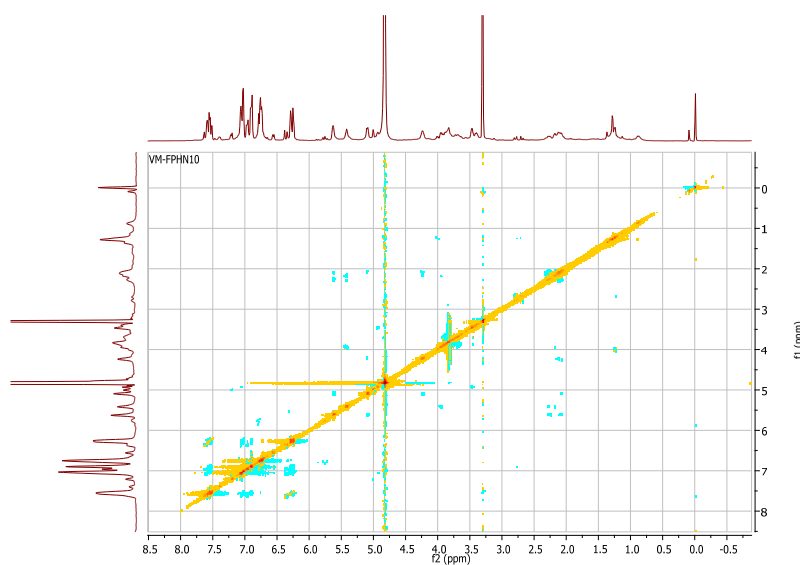
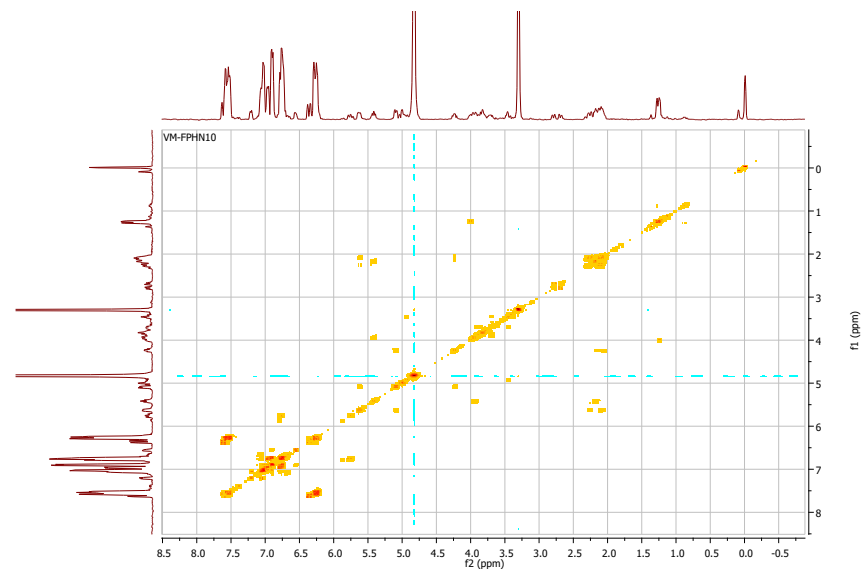
Slika P4.13. ¹H (400 MHz) NMR spektar 3,4-di-*O*-kafeoilhina kiseline (7).

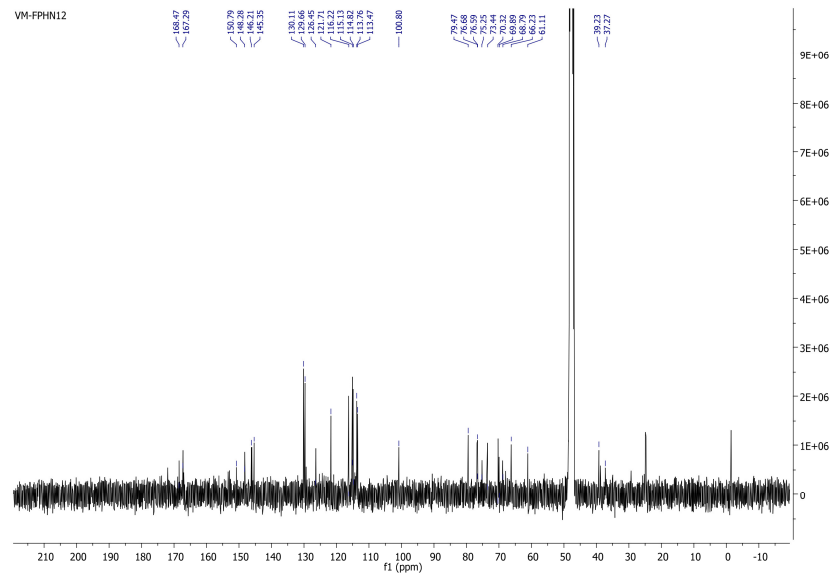


Slika P4.14. ¹³C (101 MHz) NMR spektar 3,4-di-*O*-kafeoilhina kiseline (7).

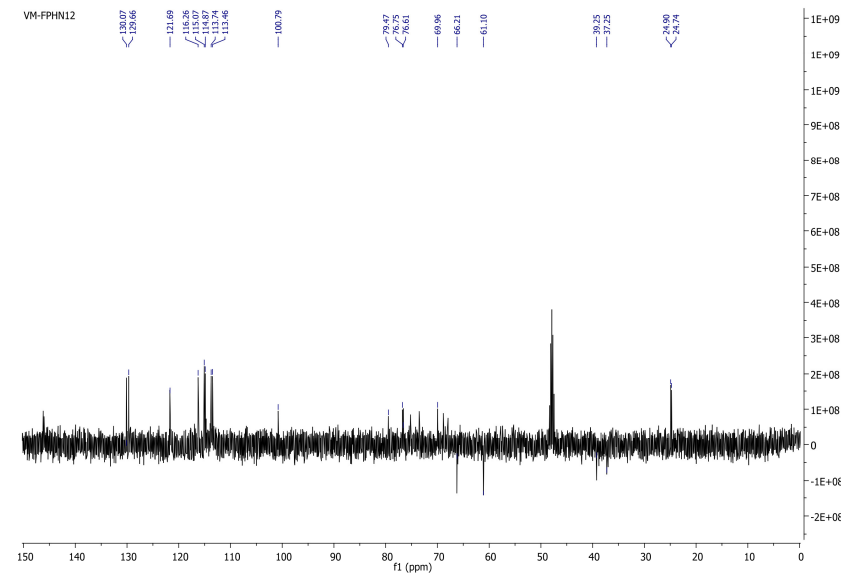


Slika P4.15. DEPT spektar 3,4-di-*O*-kafeoilhina kiseline (7).

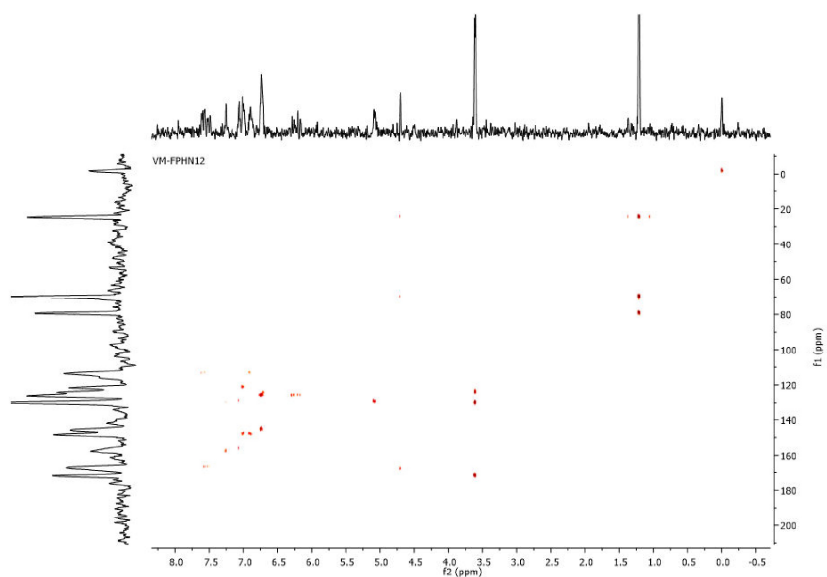
Slika P4.16. HMBC spektar 3,4-di-*O*-kafeoilhina kiseline (7).Slika P4.17. HSQC spektar 3,4-di-*O*-kafeoilhina kiseline (7).Slika P4.18. ROESY spektar 3,4-di-*O*-kafeoilhina kiseline (7).Slika P4.19. COSY spektar 3,4-di-*O*-kafeoilhina kiseline (7).



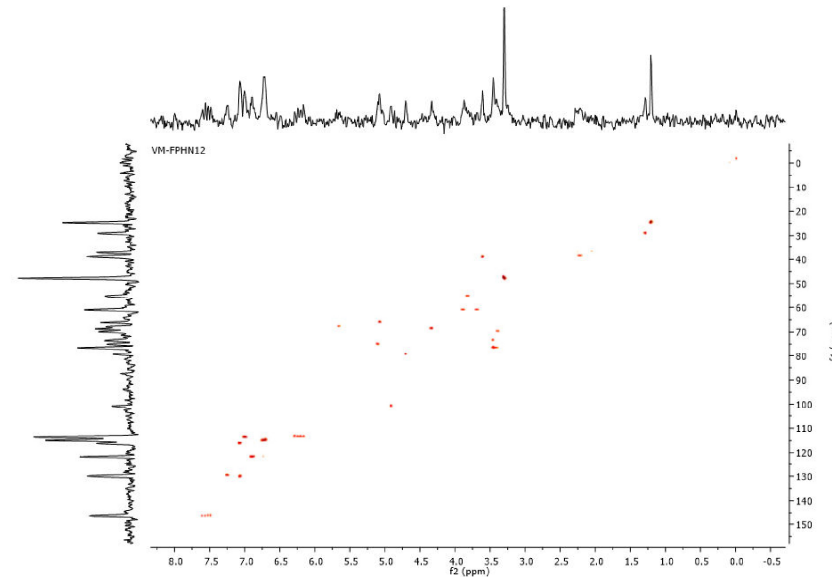
Slika P4.20. ^{13}C (101 MHz) NMR spektar 1,5-di-*O*-kafeoilhina kiseline (9).



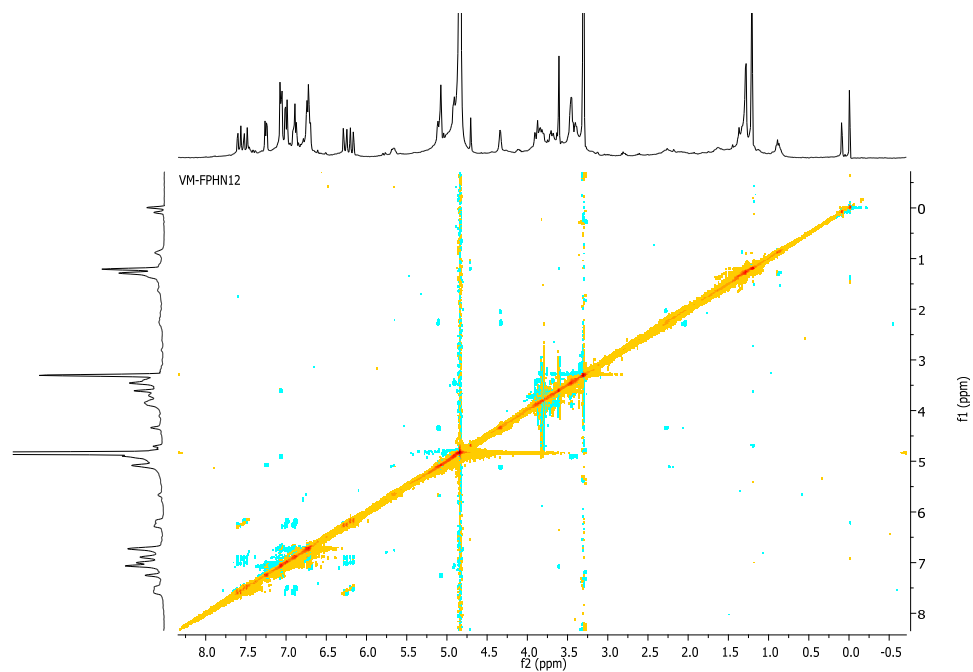
Slika P4.21. DEPT spektar 1,5-di-*O*-kafeoilhina kiseline (9).



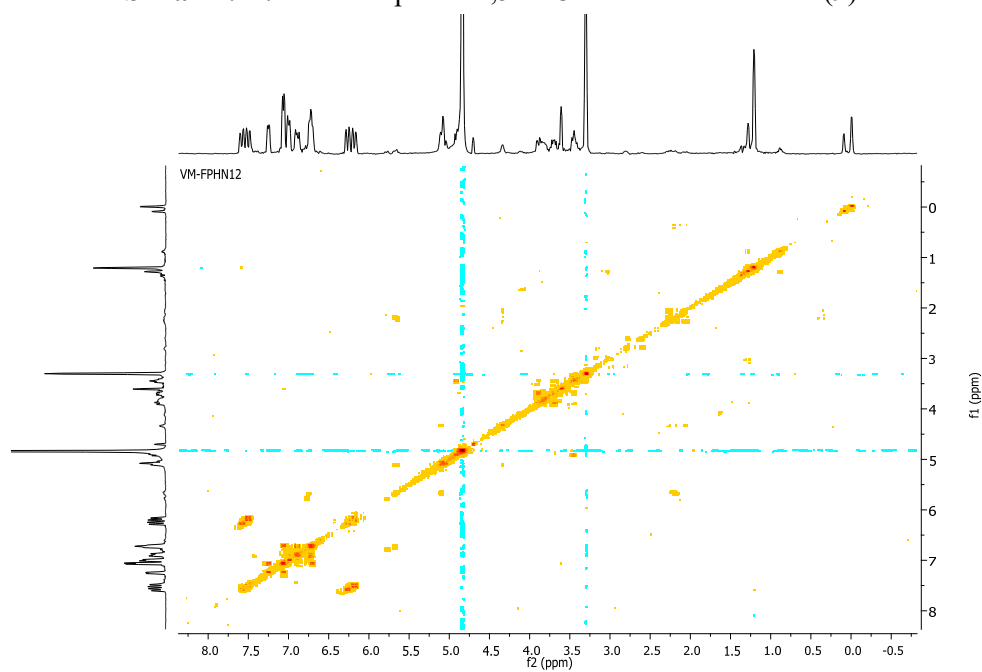
Slika P4.22. HMBC spektar 1,5-di-*O*-kafeoilhina kiseline (9).



Slika P4.23. HSQC spektar 1,5-di-*O*-kafeoilhina kiseline (9).

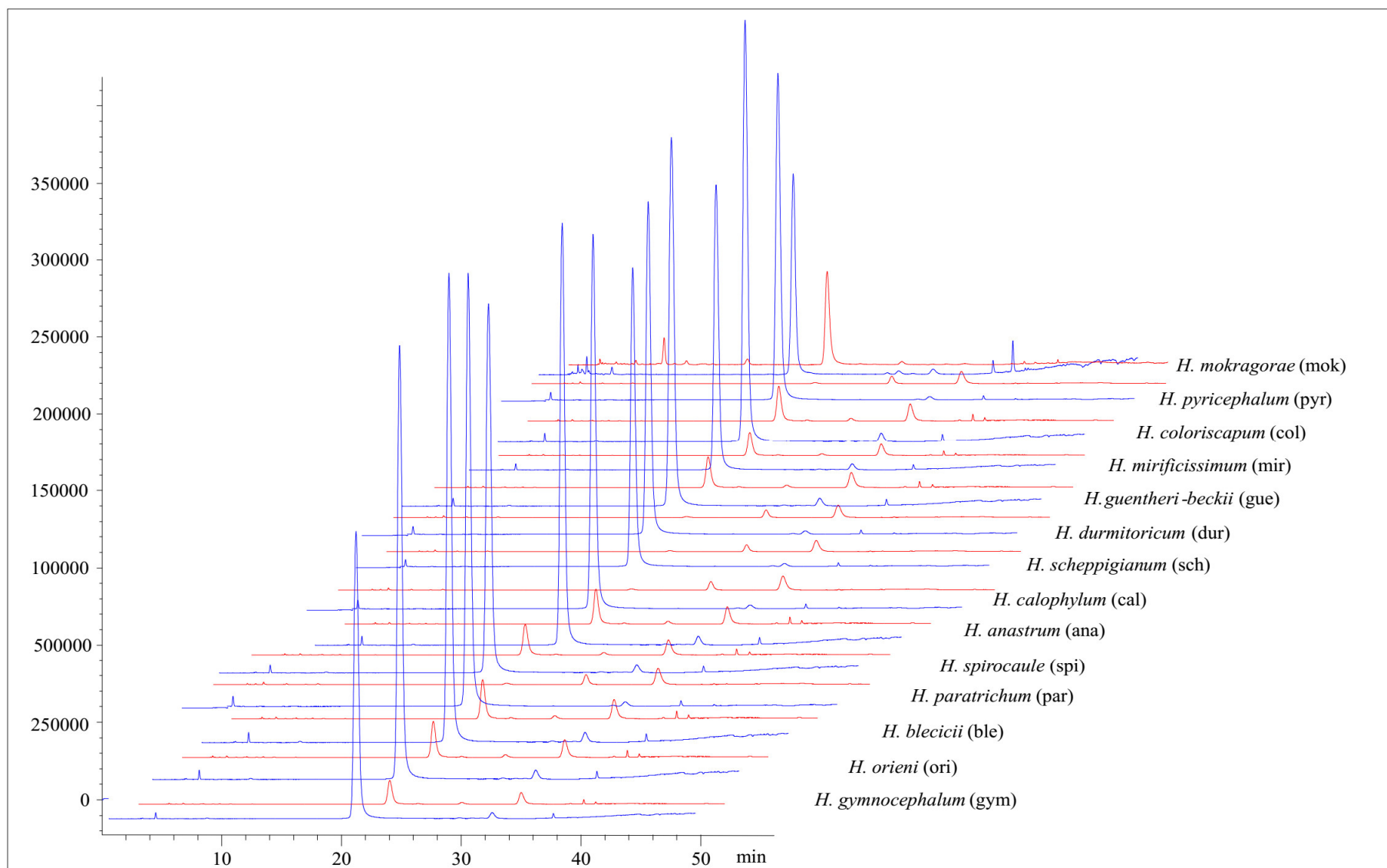


Slika P4.24. ROESY spektar 1,5-di-*O*-kafeoilhina kiseline (9).

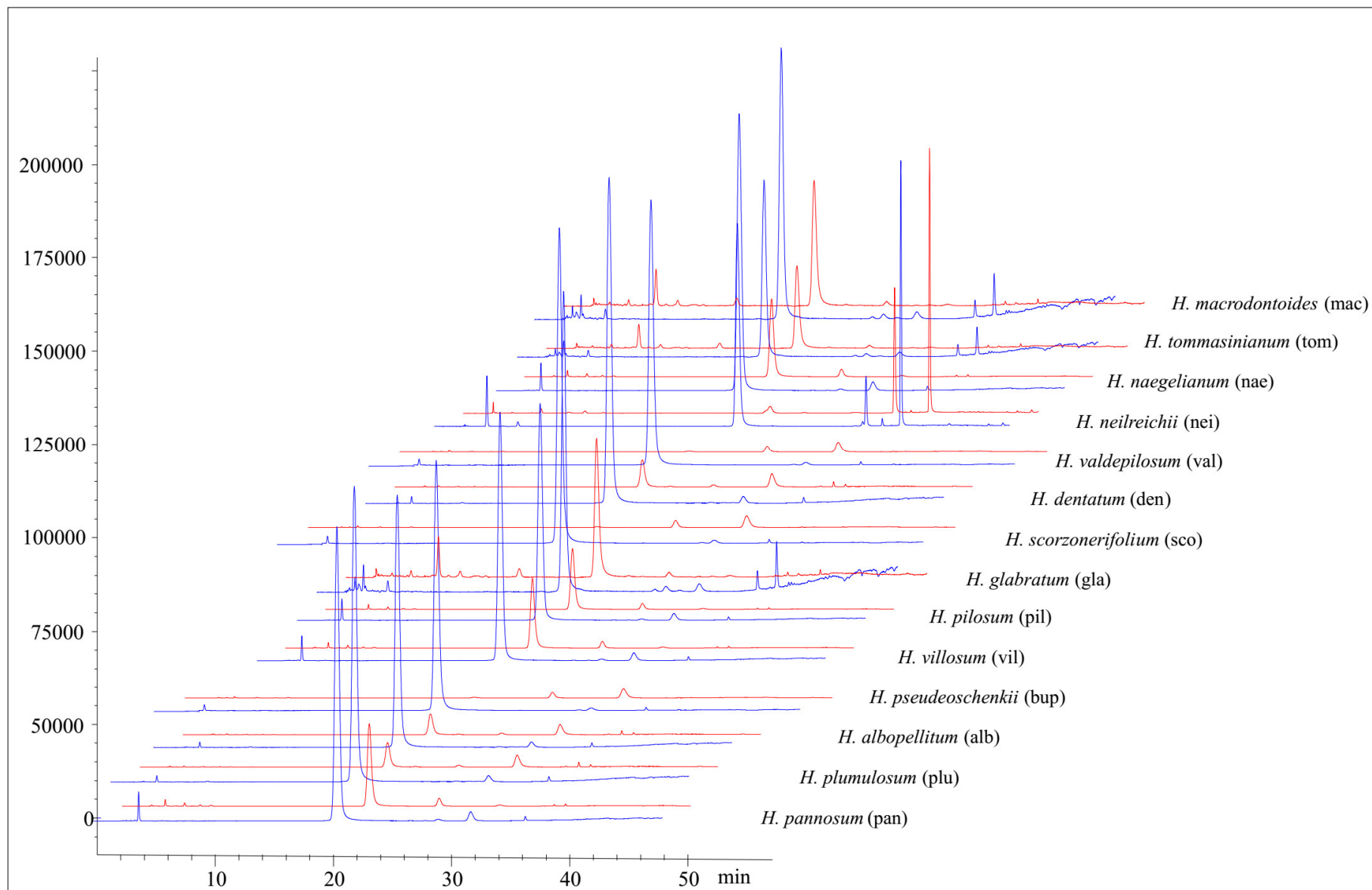


Slika P4.25. COSY spektar 1,5-di-*O*-kafeoilhina kiseline (9).

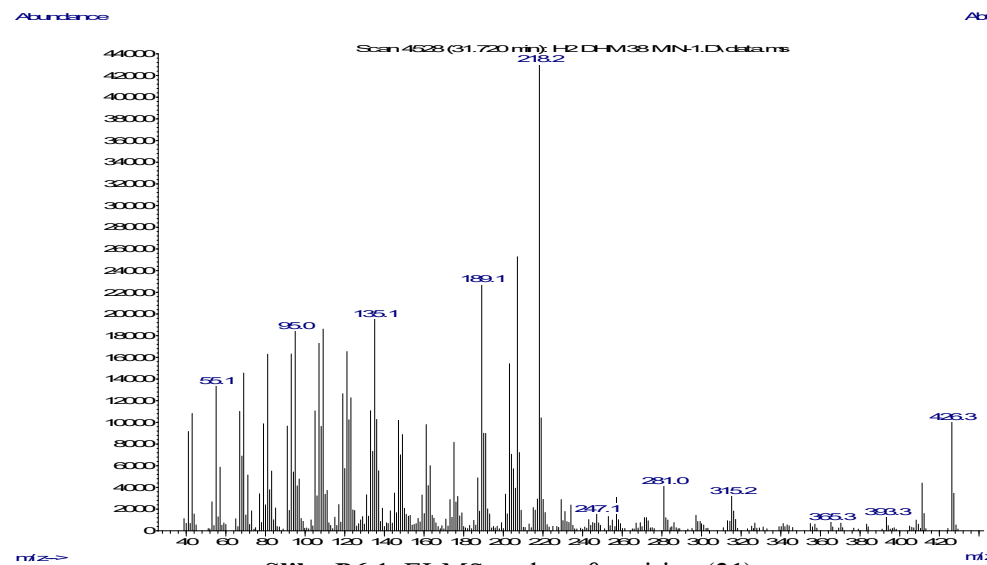
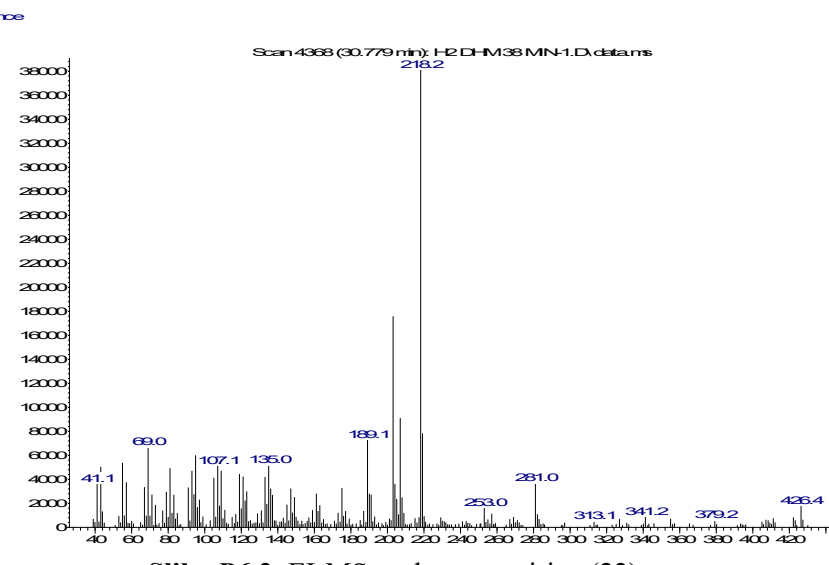
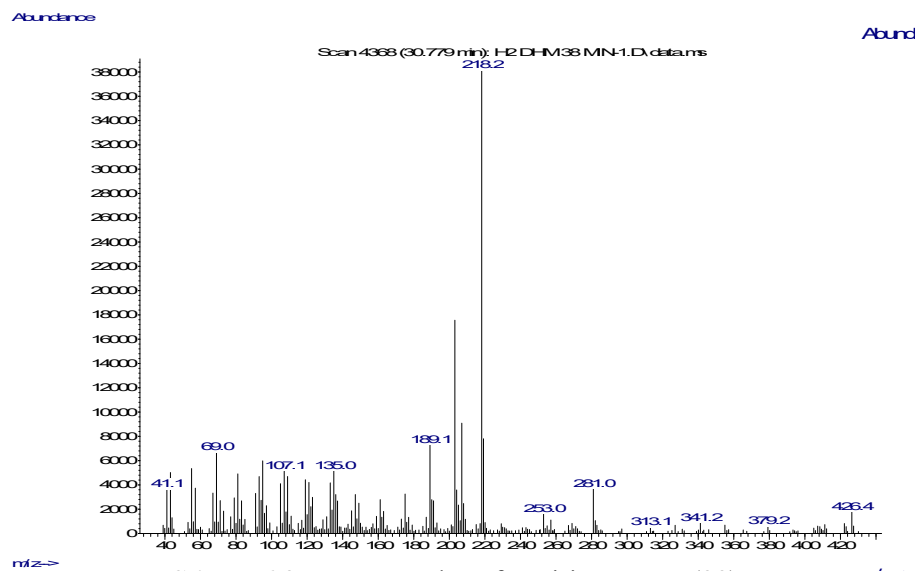
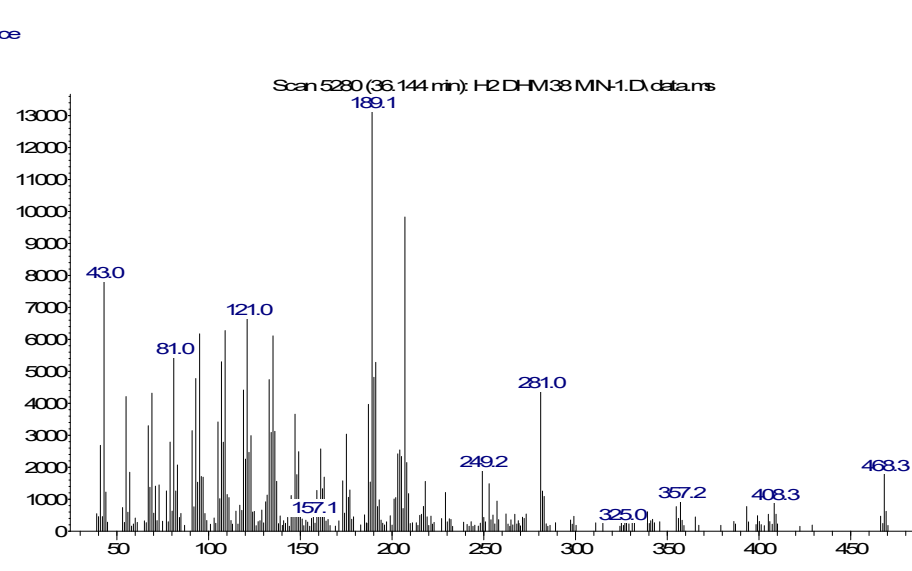
Prilog 5. LC-MS hromatogrami suvih MeOH ekstrakata herbi ispitivanih vrsta roda *Hieracium* (metoda za razdvajanje flavonoida i fenolkarboksilnih kiselina)



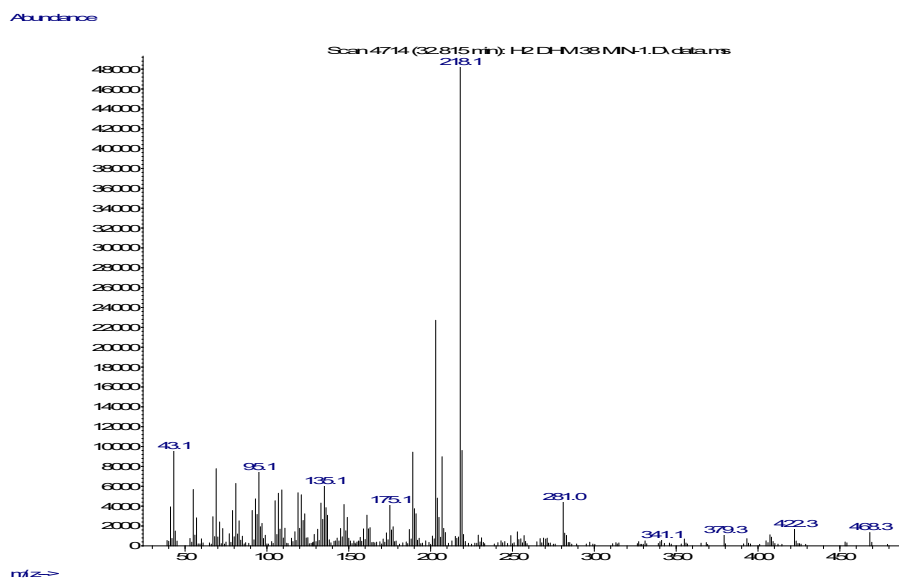
Slika P5.1. Uporedni SIM hromatogrami ($[M-H]^-$ na m/z 447,10 (-); 461,10 (-)) MeOH ekstrakata herbi 14 vrsta roda *Hieracium* (gym-mok).



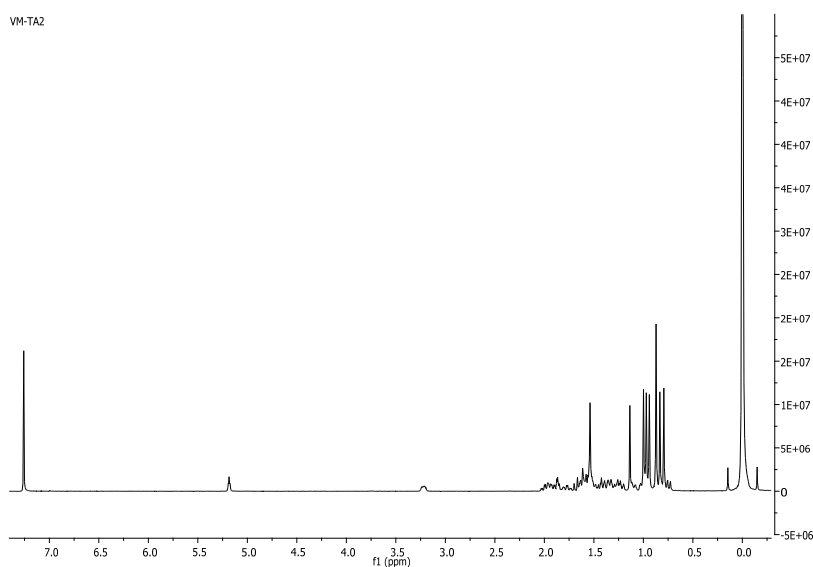
Slika P5.2. Uporedni SIM hromatogrami ($[M-H]^-$ na m/z 447,10 (-); 461,10 (-)) MeOH ekstraktata herbi 14 vrsta roda *Hieracium* (pan-mac).

Prilog 6. MS i NMR spektri triterpena identifikovanih u CH₂Cl₂ ekstraktu herbe *H. gymnocephalum*Slika P6.1. EI-MS spektar β -amirina (31).Slika P6.2. EI-MS spektar α -amirina (32).Slika P6.3. EI-MS spektar β -amirin-acetata (33).

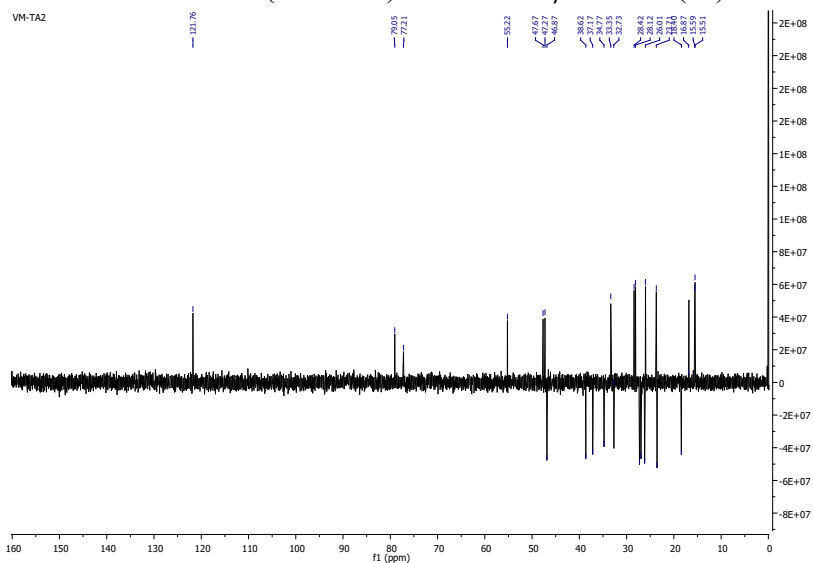
Slika P6.4. EI-MS spektar lupeol-acetata (34).



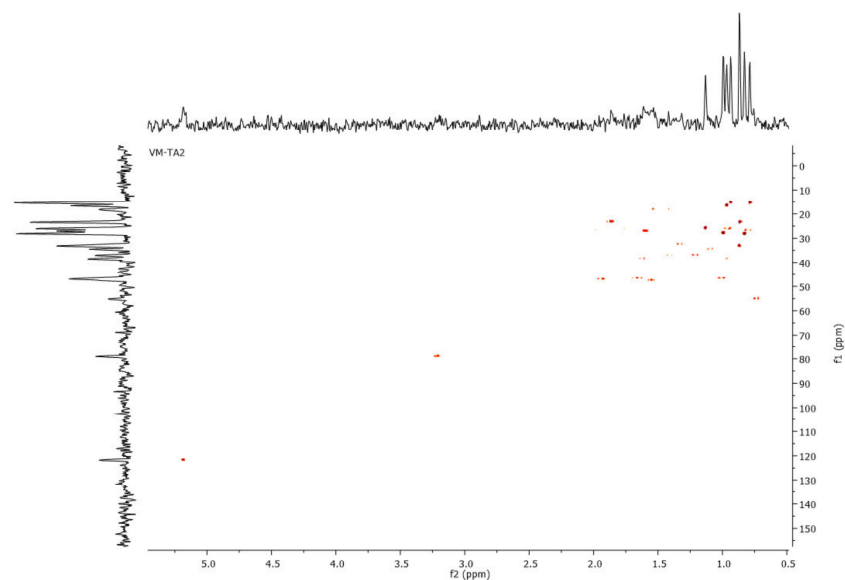
Slika P6.5. EI-MS spektar α -amirin-acetata (35).



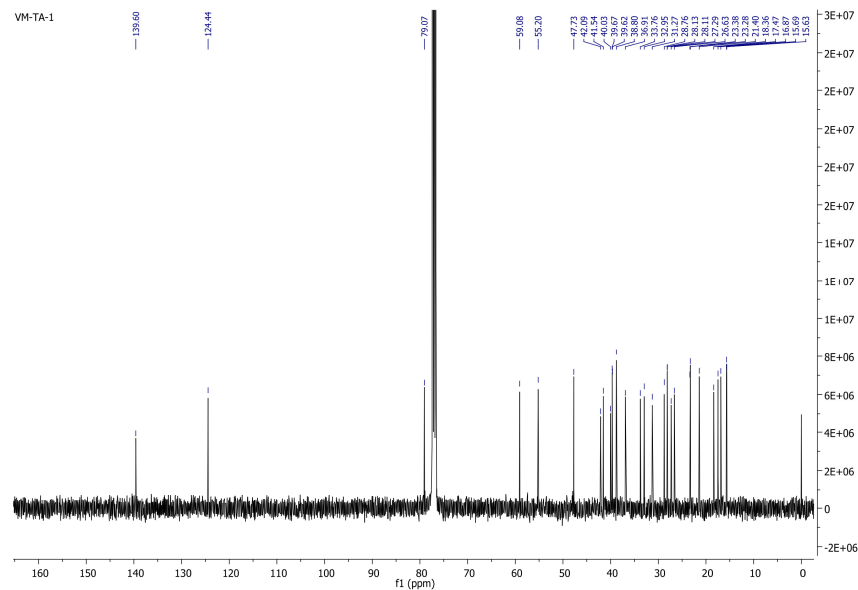
Slika P6.6. ^1H (400 MHz) NMR spektar β -amirina (31).



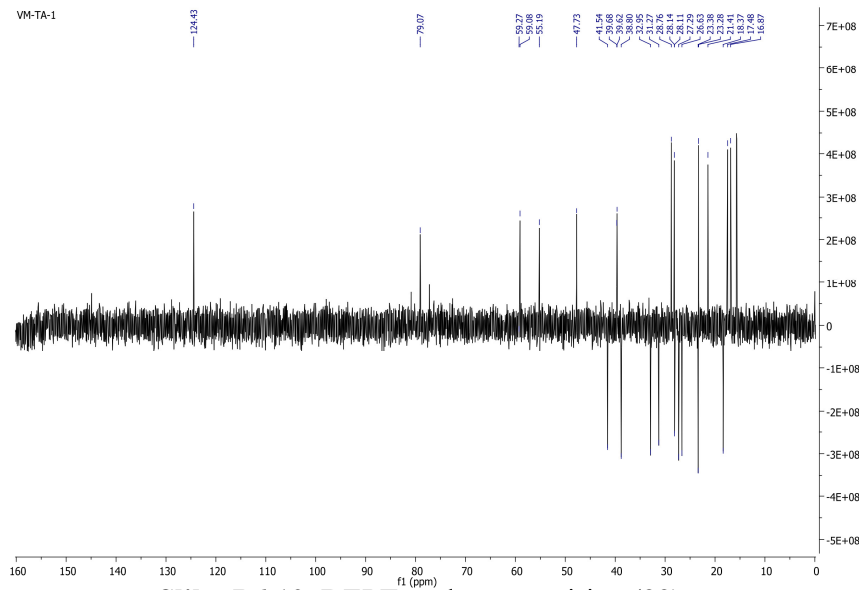
Slika P6.7. DEPT spektar β -amirina (31).



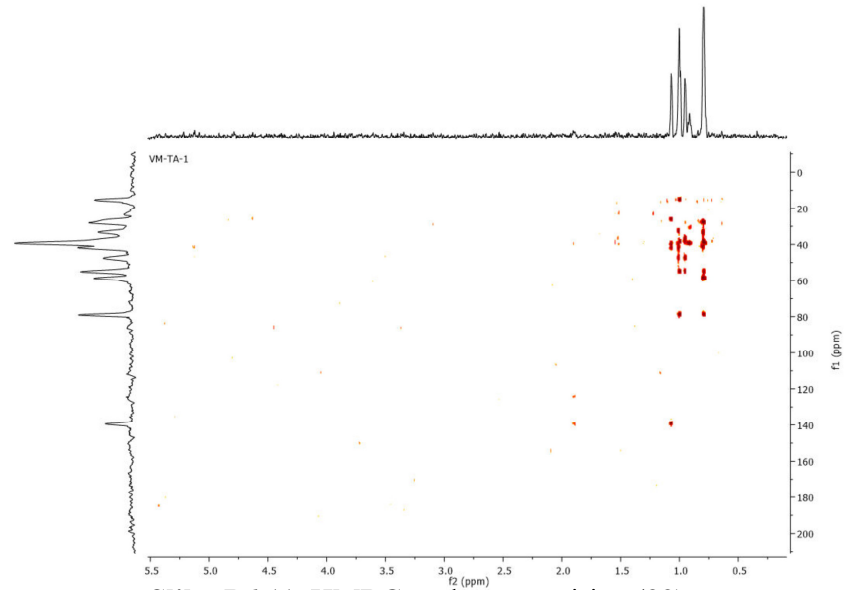
Slika P6.8. HSQC spektar β -amirina (31).



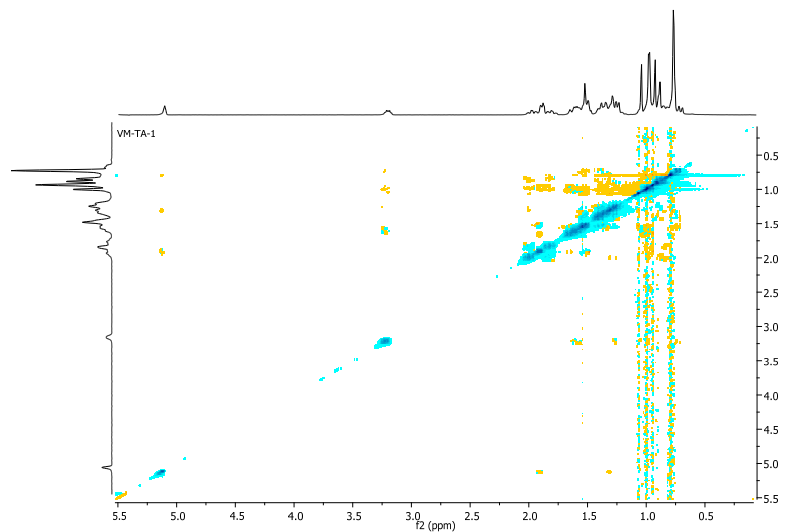
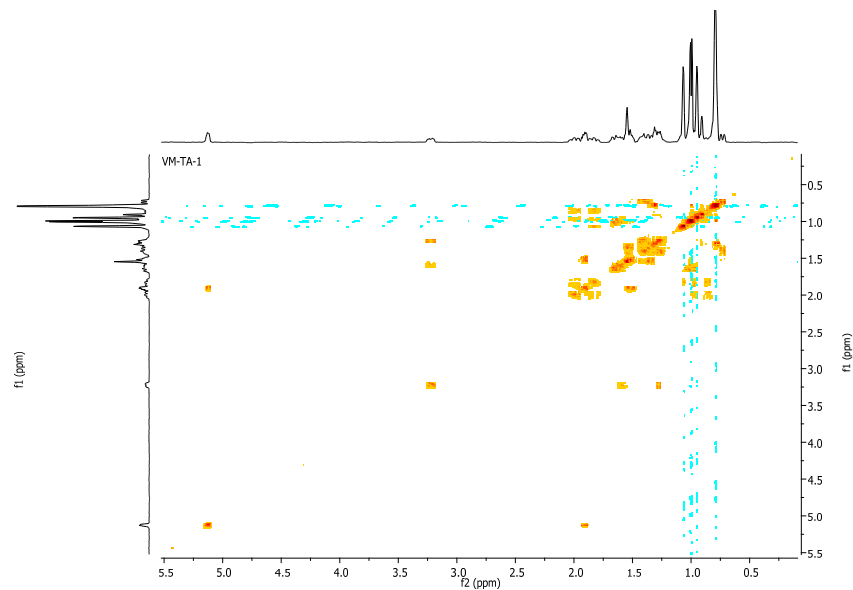
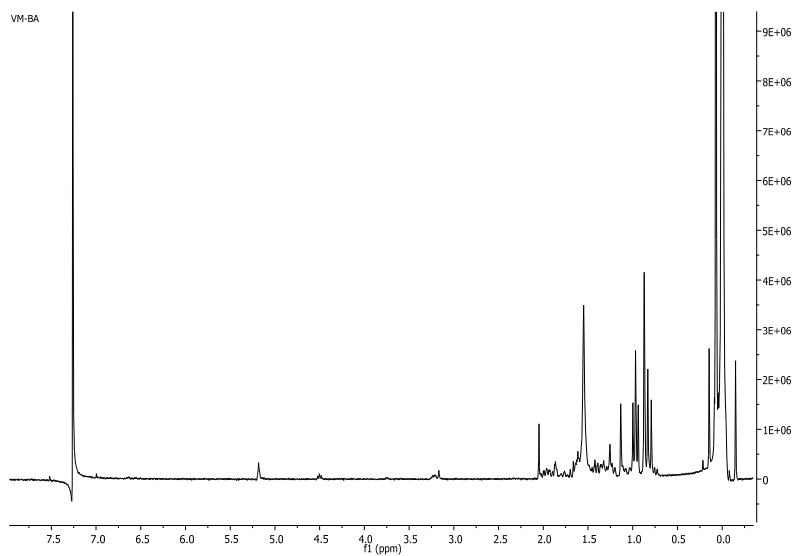
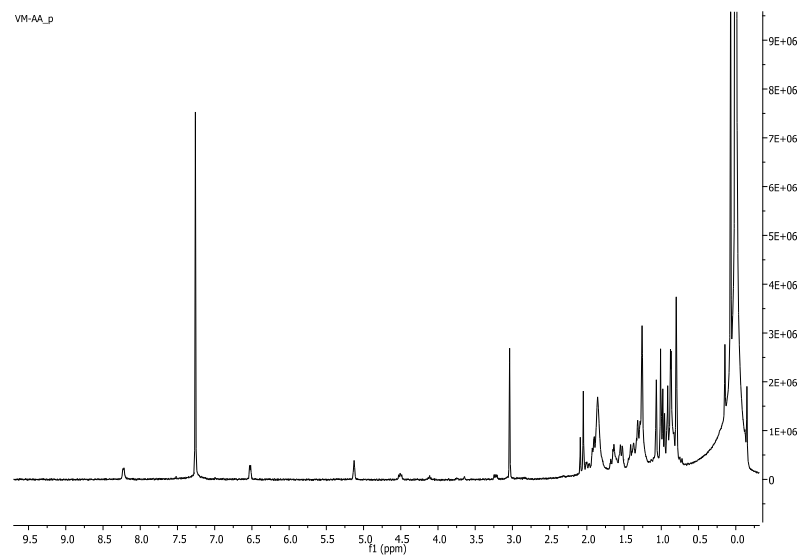
Slika P6.9. ^{13}C (101 MHz) NMR spektar α -amirina (32).



Slika P6.10. DEPT spektar α -amirina (32).



Slika P6.11. HMBC spektar α -amirina (32).

Slika P6.12. ROESY spektar α -amirina (32).Slika P6.13. COSY spektar α -amirina (32).Slika P6.14. ^1H (400 MHz) NMR sektar β -amirin-acetata (33).Slika P6.15. ^1H (400 MHz) NMR sektar α -amirin-acetata (35).

Objavljeni i saopšteni rezultati koji čine deo doktorske disertacije

Rezultati ove doktorske disertacije do sada su objavljeni u tri rada u naučnim časopisima međunarodnog značaja (M20), od toga dva rada u vrhunskim međunarodnim časopisima (M21) i jedan rad u istaknutom međunarodnom časopisu (M22), i saopšteni na jednom međunarodnom naučnom skupu i pet naučnih skupova nacionalnog značaja.

Radovi publikovani u vrhunskim međunarodnim časopisima (M21)

1. **Milutinović V**, Niketić M, Ušjak L, Nikolić D, Krunic A, Zidorn C, Petrović S. Methanol extracts of 28 *Hieracium* species from the Balkan Peninsula – Comparative LC–MS analysis, chemosystematic evaluation of their flavonoid and phenolic acid profiles and antioxidant potentials. *Phytochemical Analysis* 2018;29(1):30–47.
2017: IF 2,337. Plant Sciences: 63/223.
2. **Milutinović V**, Niketić M, Krunic A, Nikolić D, Petković M, Ušjak L, Petrović S. Sesquiterpene lactones from the methanol extracts of twenty-eight *Hieracium* species from the Balkan Peninsula and their chemosystematic significance. *Phytochemistry* 2018;154:19-30.
2016: IF 3,205. Plant Sciences: 34/212.

Rad publikovan u istaknutom međunarodnom časopisu (M22)

1. **Milutinović V**, Pecikoza U, Tomić M, Stepanović-Petrović R, Niketić M, Ušjak L, Petrović S. Investigation of antihyperalgesic and antiedematous activities of three *Hieracium* species. *Natural Product Research* 2020. Doi: 10.1080/14786419.2020.1768086.
2019: IF 2,158. Chemistry, Applied: 30/71.

Saopštenje sa međunarodnog skupa štampano u izvodu (M34)

1. **Milutinović V**, Petrović S, Niketić M, Krunic A, Nikolić D. Phytochemical analysis and antiradical potential of methanol extracts of *Hieracium naegelianum* Pančić and *H. scheppegianum* Freyn underground parts. 10th Conference on Medicinal and Aromatic Plants of Southeast European Countries (CMAPEEC 2018), Split, Croatia, 20-24. 05. 2018. Book of Abstracts, p. 113., P–56.

Predavanje po pozivu sa skupa nacionalnog značaja štampano u izvodu (M62)

1. **Milutinović V**, Pecikoza U, Tomić M, Stepanović-Petrović R, Niketić M, Ušjak L, Petrović S. Ispitivanje antihyperalgezijske i antiedematozne aktivnosti ekstrakata nadzemnih delova u cvetu tri vrste roda *Hieracium*. 14. Kongres farmakologa Srbije i 4. Kongres kliničke farmakologije Srbije sa međunarodnim učešćem. Novi Sad, 18-21.09.2019. Zbornik kratkih sadržaja radova, str. 177. Sesija 9, Farmakologija prirodnih proizvoda.

Saopštenja sa skupova nacionalnog značaja štampana u izvodu (M64)

1. **Milutinović V**, Petrović S, Niketić M. Određivanje sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja, ukupne redukcione i anti-DPPH aktivnosti metanolnih ekstrakata osamnaest vrsta roda *Hieracium* L. VI Kongres Farmaceuta Srbije sa međunarodnim učešćem, Beograd, Srbija, 15-19. 10. 2014. Zbornik sažetaka, str. 329–30.
2. **Milutinović V**, Niketić M, Petković M, Petrović S. Ispitivanje triterpena u dihlormetanskim ekstraktima 28 vrsta roda *Hieracium* L. (Asteraceae) sa Balkanskog poluostrva. VII Kongres Farmaceuta Srbije sa međunarodnim učešćem, Beograd, Srbija, 10-14. 10. 2018. Arhiv za farmaciju 2018;68(3):714–5., LB–P18.

3. **Milutinović V**, Petrović P, Klaus A, Ušjak L, Niketić M, Petrović S. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory activity of methanol extracts of 28 *Hieracium* species and their selected metabolites. 13th Symposium on the Flora of Southeastern Serbia and Neighboring Regions, Stara planina Mt., Serbia, June 20-23, 2019. Book of abstracts, p. 180. P–34.
4. **Milutinović V**, Matić I, Grozdanić-Stanisavljević N, Stanojković T, Soković M, Ćirić A, Niketić M, Petrović S. Cytotoxic and antimicrobial activity of selected *Hieracium* L. extracts and isolated sesquiterpene lactones. 13th Symposium on the Flora of Southeastern Serbia and Neighboring Regions, Stara planina Mt., Serbia, June 20-23, 2019. Book of abstracts, pp. 162–163. P–15.

Biografija

Violeta M. Milutinović je rođena 13.07.1987. god. u Kruševcu. Završila je OŠ „Jovan Kursula“ u Varvarinu i srednju Medicinsku školu u Kraljevu kao nosilac diplome „Vuk Karadžić“. Farmaceutski fakultet Univerziteta u Beogradu upisala je školske 2006/07. god. U toku integrisanih akademskih studija bila je stipendista Ministarstva prosvete i sporta (2007-2011. god.) i opštine Varvarin (2008. god.). Završni rad pod nazivom „Ispitivanje kvaliteta biljnih droga koje ulaze u sastav nekih komercijalnih čajeva“, pod mentorstvom prof. dr Silvine Petrović, odbranila je 10.10.2011. god. na Katedri za farmakognoziju ocenom 10 na diplomskom ispitu i prosečnom ocenom tokom studiranja 9,33. Doktorske akademske studije Univerziteta u Beogradu - Farmaceutskog fakulteta, modul Farmakognozija, upisala je školske 2012/13. god.

Pripravnički staž obavila je u ZU „Apoteka Kruševac“ i Bolničkoj apoteci Zdravstvenog centra Kruševac. Stručni ispit za diplomirane farmaceute položila je u novembru 2012. god. U periodu od septembra 2013. god. do marta 2015. god. bila je zaposlena u ZUA „Oaza zdravlja“.

Na Katedri za farmakognoziju, Univerziteta u Beogradu - Farmaceutskog fakulteta, angažovana je u zvanju istraživača-pripravnika od 9.03.2015. god., a u zvanju istraživača-saradnika od 24.04.2019. god. na Projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja br. 173021 „Ispitivanje lekovitog potencijala biljaka: morfološka, hemijska i farmakološka karakterizacija“, čiji je rukovodilac prof. dr Nada Kovačević. Autor je i koautor 4 rada u časopisima međunarodnog značaja (2 iz kategorije M21, jednog iz kategorije M22 i jednog iz kategorije M23), 4 saopštenja sa međunarodnih skupova i 5 saopštenja sa nacionalnih skupova, štampanih u izvodu.

Govori engleski jezik.

Izjava o autorstvu

Ime i prezime autora Violeta Milutinović
Broj indeksa 19/12

Izjavljujem

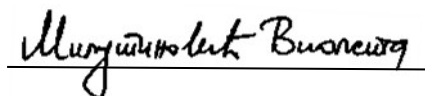
da je doktorska disertacija pod naslovom

**Ispitivanje sekundarnih metabolita i farmakološke aktivnosti odabranih vrsta roda
Hieracium L. (Asteraceae) sa Balkanskog poluostrva**

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada;
- da disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za sticanje druge diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova;
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio/la intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis autora

U Beogradu, 23.06.2021. god.


Violeta Milutinović

IZJAVA O ISTOVETNOSTI ŠTAMPANE I ELEKTRONSKE VERZIJE DOKTORSKOG RADA

Ime i prezime autora Violeta Milutinović

Broj indeksa 19/12

Studijski program Farmakognozija

Naslov rada

**Ispitivanje sekundarnih metabolita i farmakološke aktivnosti odabranih vrsta roda
Hieracium L. (Asteraceae) sa Balkanskog poluostrva**

Mentor Dr sc. Silvana Petrović, redovni profesor

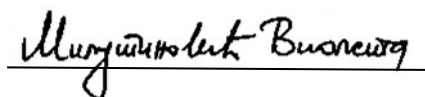
Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la radi pohranjena u Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog naziva doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis autora

U Beogradu, 23.06.2021. god.


Violeta Milutinović

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

Ispitivanje sekundarnih metabolita i farmakološke aktivnosti odabranih vrsta roda
Hieracium L. (Asteraceae) sa Balkanskog poluostrva

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu i dostupnu u otvorenom pristupu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

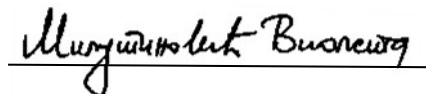
1. Autorstvo (CC BY)
2. Autorstvo – nekomercijalno (CC BY-NC)
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerada (CC BY-NC-ND)
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima (CC BY-NC-SA)
5. Autorstvo – bez prerada (CC BY-ND)
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima (CC BY-SA)

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci.

Kratak opis licenci je sastavni deo ove izjave).

Potpis autora

U Beogradu, 23.06.2021. god.



1. Autorstvo. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.
2. Autorstvo – nekomercijalno. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerada. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.
5. Autorstvo – bez prerada. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.